

CHARAKTERISIERUNG VON  
NEOHEPATOZYTEN ALS ERSATZ  
FÜR HUMANE HEPATOZYTEN UND  
INDUKTIONSENTWICKLUNGEN



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt

von

**Judith Wundt**

Kiel 2008

Referent:	Prof. Dr. B. Clement
Korreferent:	Prof. Dr. E. Beitz
Tag der mündlichen Prüfung:	29. Januar 2009
Zum Druck genehmigt:	27. Februar 2009
	Prof. Dr. L. Kipp
	(Dekan)

*Für meine Eltern*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Metabolismus . . . . .	2
1.1.1. Phase I-Metabolismus . . . . .	3
1.1.1.1. Cytochrom P450 . . . . .	4
1.1.1.2. <i>N</i> -reduktiver drei Komponenten-Enzym-Komplex . . . . .	7
1.1.2. Phase II-Metabolismus . . . . .	12
1.1.3. Interaktionen . . . . .	15
1.1.3.1. Inhibition . . . . .	15
1.1.3.2. Induktion . . . . .	16
1.2. Einsatz von Hepatozyten in Forschung und Therapie . . . . .	21
1.2.1. Einsatz von Hepatozyten in Forschung . . . . .	22
1.2.2. Einsatz von Hepatozyten anderer Spezies in der Forschung . . . . .	23
1.2.3. Zellbasierte Therapien bei Lebererkrankungen . . . . .	24
1.3. Hepatozyten-ähnliche Zellen aus extrahepatischen Stamm- und Vorläuferzellen . . . . .	26
1.4. Zielsetzung . . . . .	31
<b>2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten im Vergleich zu Makrophagen und Hepatozyten</b>	<b>33</b>
2.1. Einleitung . . . . .	33
2.1.1. NeoHepatozyten . . . . .	34
2.1.2. Monozyten und Makrophagen . . . . .	36
2.1.3. Arzneistoff-Metabolismus . . . . .	43
2.1.3.1. Cytochrom P450-Metabolismus . . . . .	44
2.1.3.2. Induktion des Cytochrom P450-Metabolismus . . . . .	48
2.1.3.3. Testosteron-Metabolismus . . . . .	49

2.2. Zielsetzung . . . . .	52
2.3. Methoden . . . . .	53
2.3.1. Isolierung und Kultivierung von Zellen monozytären Ursprungs . . .	53
2.3.1.1. Material und Geräte . . . . .	53
2.3.1.2. Isolierung der Monozyten . . . . .	53
2.3.1.3. Kultivierung von NeoHepatozyten . . . . .	54
2.3.1.4. Kultivierung von Zellen monozytären Ursprungs unter ver- schiedenen Bedingungen . . . . .	54
2.3.1.5. Kultivierung von klassisch aktivierten Makrophagen . . . .	58
2.3.2. Isolierung und Kultivierung primärer Hepatozyten . . . . .	59
2.3.2.1. Material und Geräte . . . . .	59
2.3.2.2. Herkunft des Lebergewebes . . . . .	59
2.3.2.3. Isolierung primärer Hepatozyten . . . . .	60
2.3.2.4. Bestimmung der Ausbeute und Viabilität . . . . .	61
2.3.2.5. Kultivierung primärer Hepatozyten . . . . .	62
2.3.3. Cytochrom P450-Metabolismus . . . . .	64
2.3.3.1. Material und Geräte . . . . .	64
2.3.3.2. Ernten und Homogenisierung der verwendeten Zellen . . .	65
2.3.3.3. CYP1A1/2-Aktivität . . . . .	65
2.3.3.4. CYP2C9-Aktivität . . . . .	67
2.3.3.5. CYP2E1-Aktivität . . . . .	67
2.3.3.5.1. Bestimmung des Metaboliten durch Fluorimetrie .	67
2.3.3.5.2. Bestimmung des Metaboliten durch HPLC . . . .	68
2.3.3.6. CYP3A4/5-Aktivität . . . . .	70
2.3.4. Induktion des Cytochrom P450-Metabolismus . . . . .	72
2.3.4.1. Material und Geräte . . . . .	72
2.3.4.2. Induktion von CYP1A1/2 . . . . .	72
2.3.4.3. Induktion von CYP3A4/5 . . . . .	73
2.3.4.4. Ernten und Homogenisierung der verwendeten Zellen . . .	73
2.3.4.5. CYP1A1/2-Aktivität der induzierten Zellen . . . . .	73
2.3.4.6. CYP3A4/5-Aktivität der induzierten Zellen . . . . .	74
2.3.5. Testosteron-Metabolismus . . . . .	74
2.3.5.1. Material und Geräte . . . . .	74

2.3.5.2.	Induktion des Testosteron-Metabolismus . . . . .	74
2.3.5.3.	Inkubation mit Testosteron . . . . .	75
2.3.5.4.	Untersuchung der Testosteron-Metaboliten durch LC/MS- Analytik . . . . .	76
2.3.5.5.	Quantifizierung der Testosteron-Metaboliten durch HPLC- Analytik . . . . .	77
2.3.6.	Benzamidoxim-Metabolismus . . . . .	79
2.3.6.1.	Material und Geräte . . . . .	79
2.3.6.2.	Ernten und Homogenisierung der verwendeten Zellen . . .	79
2.3.6.3.	Benzamidoxim-Metabolismus . . . . .	79
2.4.	Ergebnisse . . . . .	82
2.4.1.	Isolierung und Kultivierung von Zellen monozytären Ursprungs . . .	82
2.4.2.	Isolierung und Kultivierung primärer Hepatozyten . . . . .	82
2.4.3.	Cytochrom P450-Metabolismus . . . . .	84
2.4.3.1.	CYP1A1/2-Aktivität . . . . .	84
2.4.3.2.	CYP2C9-Aktivität . . . . .	87
2.4.3.3.	CYP2E1-Aktivität . . . . .	90
2.4.3.3.1.	Bestimmung des Metaboliten durch Fluorimetrie .	90
2.4.3.3.2.	Bestimmung des Metaboliten durch HPLC . . . .	93
2.4.3.4.	CYP3A4/5-Aktivität . . . . .	95
2.4.4.	Induktion des Cytochrom P450-Metabolismus . . . . .	99
2.4.4.1.	CYP1A1/2-Aktivität der induzierten Zellen . . . . .	99
2.4.4.2.	CYP3A4/5-Aktivität der induzierten Zellen . . . . .	102
2.4.5.	Testosteron-Metabolismus . . . . .	105
2.4.5.1.	Untersuchung der Testosteron-Metaboliten durch LC/MS- Analytik . . . . .	105
2.4.5.2.	Quantifizierung der Testosteron-Metaboliten durch HPLC- Analytik . . . . .	109
2.4.5.2.1.	Testosteron-Metabolismus von NeoHepatozyten, klassisch aktivierten Makrophagen und primären Hepatozyten . . . . .	110
2.4.5.2.2.	Testosteron-Metabolismus von induzierten huma- nen und porcinen Hepatozyten . . . . .	113

2.4.5.2.3.	Testosteron-Metabolismus von unter verschiedenen Bedingungen kultivierten Zellen monozytären Ursprungs . . . . .	116
2.4.6.	Benzamidoxim-Metabolismus . . . . .	121
2.5.	Diskussion . . . . .	122
2.6.	Zusammenfassung und Ausblick . . . . .	140
<b>3.</b>	<b>Induktion des N-reduktiven drei Komponenten-Enzym-Komplexes</b>	<b>145</b>
3.1.	Einleitung . . . . .	145
3.1.1.	Benzamidoxim- und Guanoxabenz-Metabolismus durch Hepatozyten	146
3.1.2.	Induktion von Molybdoenzymen . . . . .	149
3.2.	Zielsetzung . . . . .	149
3.3.	Methoden . . . . .	151
3.3.1.	Isolierung und Kultivierung primärer Hepatozyten . . . . .	151
3.3.1.1.	Material und Geräte . . . . .	151
3.3.1.2.	Isolierung primärer Hepatozyten . . . . .	151
3.3.1.3.	Kultivierung primärer Hepatozyten . . . . .	151
3.3.2.	Induktion des Benzamidoxim-Metabolismus . . . . .	152
3.3.2.1.	Material und Geräte . . . . .	152
3.3.2.2.	Induktion des Benzamidoxim-Metabolismus durch bekannte Induktoren von Arzneistoff-metabolisierenden Enzymen	153
3.3.2.3.	Induktion des Benzamidoxim-Metabolismus durch Lipopolysaccharid . . . . .	154
3.3.2.4.	Induktion des Benzamidoxim-Metabolismus durch Substrate	154
3.3.2.5.	Inkubation mit Benzamidoxim . . . . .	156
3.3.2.6.	Analytik des Benzamidoxim-Metabolismus . . . . .	157
3.3.3.	Induktion des Guanoxabenz-Metabolismus . . . . .	158
3.3.3.1.	Material und Geräte . . . . .	158
3.3.3.2.	Induktion des Guanoxabenz-Metabolismus durch Benzamidoxim . . . . .	158
3.3.3.3.	Inkubation mit Guanoxabenz . . . . .	159
3.3.3.4.	Analytik des Guanoxabenz-Metabolismus . . . . .	160
3.4.	Ergebnisse . . . . .	162



3.4.1.	Induktion des Benzamidoxim-Metabolismus . . . . .	162
3.4.1.1.	Induktion des Benzamidoxim-Metabolismus durch bekannte Induktoren von Arzneistoff-metabolisierenden Enzymen	162
3.4.1.2.	Induktion des Benzamidoxim-Metabolismus durch Lipopolysaccharid . . . . .	167
3.4.1.3.	Induktion des Benzamidoxim-Metabolismus durch Substrate	168
3.4.2.	Induktion des Guanoxabenz-Metabolismus . . . . .	171
3.5.	Diskussion . . . . .	173
3.6.	Zusammenfassung und Ausblick . . . . .	176
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>178</b>
<b>A.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>183</b>
<b>B.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>212</b>
<b>C.</b>	<b>Strukturformelverzeichnis</b>	<b>216</b>

# 1. Einleitung

Körper-fremde Substanzen können über die Haut, die Lunge und den Magen-Darm-Trakt aufgenommen werden. Für die Arzneimitteltherapie werden ebenfalls diese Aufnahmewege ausgenutzt. Körper-fremde Stoffe, wie Arzneistoffe, Nahrungsmittelzusätze, Pflanzenschutzmittel, Chemikalien und andere Schadstoffe, werden als Xenobiotika bezeichnet (Testa 1995). Oft handelt es sich bei Xenobiotika um lipophile Stoffe, die sich im Fettgewebe des Körpers anreichern können und teilweise eine schädliche Wirkung hervorrufen. Um diese Fremdstoffe in hydrophilere und damit besser ausscheidbare Substanzen zu überführen, besitzt der Organismus spezielle Enzymsysteme. Diese Umwandlung wird auch als Biotransformation oder Metabolismus bezeichnet. Diese Enzymsysteme sind besonders stark in den Geweben lokalisiert, die zuerst mit den Xenobiotika in Kontakt treten, wie Lunge, Darm, Leber und Haut. Aber auch in weiteren Geweben und Organen sind sie zu finden, wie z. B. in den Blutzellen und in der Niere. Nicht nur Enzymsysteme sollen den Organismus vor Fremdstoffen schützen, sondern auch spezielle Transporter sind in Geweben exprimiert, um gezielt Substanzen wieder auszuschleusen.

Die meisten Arzneistoffe gelangen nach oraler Applikation in den Darm, werden aufgenommen, über das Pfortaderblut in die Leber transportiert und dort metabolisiert, bevor sie über den periphere Blutkreislauf im restlichen Körper verteilt werden. Als *First pass*-Effekt bezeichnet man die Metabolisierung während dieser Passage. Dieser Vorgang kann die Wirksamkeit eines Arzneistoffes nach oraler Einnahme entscheidend beeinflussen (Mutschler *et al.* 2001). Da Hepatozyten als Zellen sowohl strukturgebundene und strukturungebundene Enzyme als auch Transporter besitzen, eignen sie sich sehr gut, um dem Metabolismus hinsichtlich möglicher Metabolite und möglicher Interaktionen von neuen Arzneistoffkandidaten zu untersuchen.

## 1. Einleitung

Neben zahlreichen bekannten Arzneistoff-metabolisierenden Enzymen werden immer wieder neue Enzyme entdeckt, wie z. B. die mitochondriale Benzamidoxim-reduzierende Komponente (mARC), welche zusammen mit Cytochrom b<sub>5</sub> und NADH-Cytochrom b<sub>5</sub>-Reduktase, zahlreiche *N*-hydroxylierte Substanzen reduziert (Havemeyer *et al.* 2006, Grünewald *et al.* 2008). Mit dem Bekanntwerden jedes neuen Enzymsystems eröffnet sich die Möglichkeit, weitere Interaktionsmöglichkeiten aufzuklären. Eine mögliche Induktion dieses Enzymsystems wurde in dieser Arbeit an Hepatozyten untersucht.

Von Hepatozyten wird erwartet, dass sie in ausreichender Zahl, leicht beschaffbar und zu einem geplanten Zeitpunkt zur Verfügung stehen. Für den Goldstandard, humane Hepatozyten, ist dies allerdings nicht der Fall. Deswegen werden oft primäre Hepatozyten von anderen Spezies verwendet, die sich allerdings in ihren Enzym-Ausstattungen und -Aktivitäten und in ihrer *in vitro-in vivo*-Korrelation von humanen Zellen unterscheiden. Als Ersatz von humanen Hepatozyten eröffnet sich neben zahlreichen Hepatozytenzelllinien die Möglichkeit, aus Vorgänger- und Stammzellen humane Hepatozyten zu generieren. Inwieweit es sich um Hepatozyten, Hepatozyten-ähnliche Zellen oder um Zellen handelt, die zufällig hepatozytäre Eigenschaften aufweisen, ist Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Diskussionen. Ein Beispiel sind die sogenannten NeoHepatozyten, die in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich ihres Arzneistoff-Metabolismus untersucht wurden. Nicht nur in der Pharmaforschung, sondern auch bei der Therapie von zahlreichen Lebererkrankungen ist das Interesse an adäquaten Hepatozyten groß.

### 1.1. Metabolismus

Der Metabolismus von Arzneistoffen und anderen Xenobiotika ist meist ein zweiphasiger Prozess. Im ersten Schritt (Phase I) erfolgen Funktionalisierungsreaktionen. Durch Oxidation, Reduktion und Hydrolyse werden funktionelle Gruppen in das Fremdstoffmolekül eingebaut oder freigelegt. Im zweiten Schritt (Phase II) finden Konjugationsreaktionen statt. An die, meist in der Phase I-entstandenen,

funktionellen Gruppen werden sehr polare endogene Moleküle, wie unter anderem Glucuronsäure, Sulfat und Aminosäuren, gekoppelt (Testa 1995). So werden lipophile Xenobiotika in hydrophilere Metabolite umgewandelt, die vom Körper über Niere und Galle besser ausgeschieden werden können. Dabei verlieren Arzneistoffe oft ihre Wirkung, es erfolgt eine Inaktivierung. Umgekehrt ist auch eine Bioaktivierung möglich, bei der der entstandene Metabolit eine höhere Wirksamkeit als die Ausgangsverbindung, dann als *Prodrug* bezeichnet, besitzt (Ettmayer *et al.* 2004). Schadstoffe können ebenso durch Metabolismus entgiftet werden, aber auch in schädlichere Metabolite überführt werden.

Der Fremdstoff-Metabolismus wird durch interindividuelle Faktoren, wie Spezies, genetische Veranlagung, z. B. Polymorphismus, und Geschlecht, beeinflusst, aber auch durch intraindividuelle Faktoren, wie Alter, hormonelles Gleichgewicht, Krankheiten, Schwangerschaft, Enzyminduktion und Enzyminhibition (Testa 1995, Parkinson *et al.* 2004, Ingelman-Sundberg *et al.* 2007).

### 1.1.1. Phase I-Metabolismus

Die an den Phase I-Reaktionen beteiligten Enzyme sind sowohl im Endoplasmatischen Retikulum (mikrosomal), in den Mitochondrien als auch im Zytosol zu finden. An Oxidationsreaktionen sind eine Reihe von Enzymen beteiligt, wobei die Cytochrom P450-Isoenzyme für die überwiegende Mehrheit der oxidativen Prozesse an Xenobiotika verantwortlich sind (Kapitel 1.1.1.1). Alkohol-Dehydrogenasen im Zytosol oxidieren primäre und sekundäre Alkohole zu Aldehyden und Ketonen. Aufgrund der breiten Substratspezifität werden aliphatische und aromatische Aldehyde durch Aldehyd-Dehydrogenasen im Endoplasmatischen Retikulum, in den Mitochondrien sowie im Zytosol zu Carbonsäuren metabolisiert. Purin-Analoga werden durch die Xanthinoxidase oxidiert. Am oxidativen Amin-Metabolismus sind Monoaminoxidasen, Diaminoxidasen und flavinhaltige Monooxygenasen beteiligt (Testa 1995, Forth *et al.* 2001). Die mikrosomalen flavinhaltigen Monooxygenasen (FMO) oxidieren nukleophile Heteroatome, wie Stickstoff, Schwefel, Selen und

## 1. Einleitung

Phosphor (Philips und Shephard 2008).

Reduktionen des Kohlenstoffes spielen im Vergleich zu den Oxidationen eine untergeordnete Rolle. Carbonylverbindungen können durch Alkohol-Dehydrogenasen und Aldo-Keto-Reduktasen zu Alkoholen reduziert werden. Wie auch die üblicherweise Oxidationen katalysierenden Alkohol-Dehydrogenasen können auch manche Cytochrom P450-Isoenzyme Reduktionen katalysieren. Auf die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen wird in Kapitel 1.1.1.2 genauer eingegangen.

Verschiedene zytosolische und membrangebundene Esterasen hydrolysieren Ester und Amide. Die Hydrolyse von reaktiven Epoxiden erfolgt durch zytosolische und mikrosomale Epoxidhydrolasen (Forth *et al.* 2001). Häufig stellt eine Ester-Hydrolyse eine Inaktivierung des Arzneistoffes dar. Bei Ester-Prodrugs erfolgt so die Bioaktivierung (Ettmayer *et al.* 2004).

### 1.1.1.1. Cytochrom P450

Cytochrom P450 (CYP)-Enzyme befinden sich in nahezu allen Geweben im Menschen, aber auch in fast allen anderen lebenden Organismen, wie in Tieren, Pflanzen und Bakterien. Die CYP-Isoenzyme, die am Fremdstoff-Metabolismus beteiligt sind, sind hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum zu finden, wohingegen die am Steroid-Metabolismus beteiligten Isoenzyme in den Mitochondrien der endokrinen Organe zu finden sind (Testa 1995).

CYP-Enzyme bestehen als Häm-Proteine aus dem eigentlichen Protein, auch als Apoprotein oder Apoenzym bezeichnet, und aus dem Häm als prosthetische Gruppe, dem Eisen-Protoporphyrin IX. Dieses Porphyrin befindet sich auch in anderen Häm-Proteinen und -Enzymen, wie Hämoglobin und Cytochrom  $b_5$ . Die prosthetische Gruppe ist in allen CYP-Isoenzymen gleich, der Proteinteil der Isoenzyme kann sich aber erheblich unterscheiden. Durch diese Unterschiede entstehen Substrat- und Produkt-Spezifitäten und Sensitivitäten gegenüber Inhibitoren.

Die prosthetische Häm-Gruppe von CYP-Enzymen ist wie folgt aufgebaut: Eisen, als  $Fe^{2+}$  oder  $Fe^{3+}$  vorliegend, bildet das Zentralatom mit vier Pyrrol-Stickstoffen als planare Liganden. Über die Thiol-Gruppe der Aminosäure Cystein des Proteins

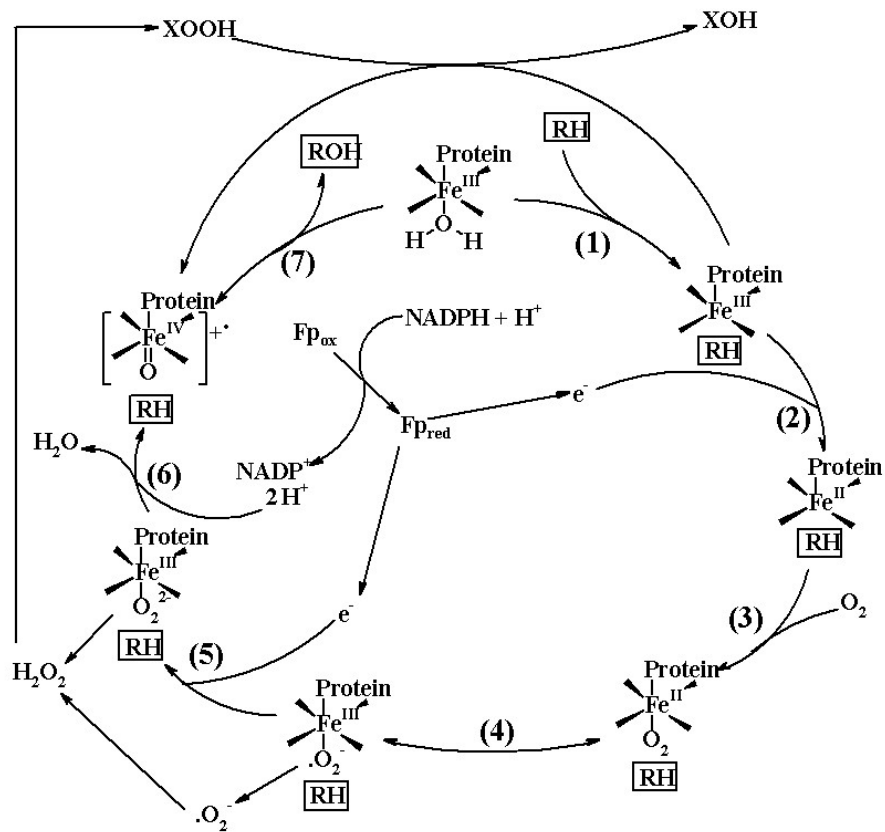
als fünften Liganden ist die prosthetische Gruppe fest mit dem Protein verbunden. Im Ruhezustand bilden Wasser oder eine Hydroxylgruppe einer Aminosäure des Proteins den sechsten Liganden. Im reduzierten Zustand kann an der sechsten Koordinationsstelle ein Sauerstoffmolekül gebunden werden (Testa 1995).

In Abbildung 1.1 ist vereinfacht der mehrstufige katalytische Zyklus einer oxidativen Substratumsetzung durch CYP dargestellt. Das Substrat bindet in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum (1) und angelagertes Wasser kann verdrängt werden. Von NADPH wird über die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase ein Elektron an  $\text{Fe}^{3+}$  übertragen und zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert (2). An das reduzierte Eisen lagert sich molekularer Sauerstoff an (3), der ein Elektron des Eisens übernimmt und ein reaktiver Superoxidation-Komplex entsteht (4). Dieser Komplex nimmt ein weiteres Elektron auf (5). Dieses Elektron kann entweder ebenfalls von der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase oder von Cytochrom  $\text{b}_5$  und NADH-Cytochrom  $\text{b}_5$ -Reduktase übertragen werden. Durch zwei Protonen des oxidierten Flavoproteins wird Wasser abgespalten und ein reaktiver Oxo-Komplex entsteht (6). Dieser überträgt den Sauerstoff auf das Substrat, das Produkt spaltet sich ab und das Enzym kehrt in seinen Ausgangszustand zurück (7). Durch Fehlen eines geeigneten Substrates oder durch Instabilität des Superoxidation-Komplex kann nach Übertragung des ersten Elektrons ein freies Superoxidradikalanion und daraus Wasserstoffperoxid entstehen (Coon *et al.* 1992). Für den beschriebenen Reaktionsablauf lässt sich folgende Bruttogleichung aufstellen:



Bei CYP-Isoenzymen handelt es sich um Monooxygenasen, die eine Vielzahl von Reaktionen vermitteln. Typische ablaufende Reaktionen sind *C*-Oxygenierungen zu Alkoholen, *N*- und *S*-Oxygenierungen, Desalkylierungen, Epoxidbildung und Gruppenumlagerungen (Guengerich 2001).

Je nach Übereinstimmung der Aminosäure-Sequenz werden die Isoenzyme klassifiziert. Zur gleichen Familie, die mit einer arabischen Ziffer bezeichnet wird, gehören die Isoenzyme ab einer Übereinstimmung der Sequenz ab 40% (z. B. CYP3). Ab einer Homologie von 55% erfolgt die Einteilung in dieselbe Subfamilie, die mit



**Abbildung 1.1.:** Katalytischer Zyklus der oxidativen Substratumsetzung durch Cytochrom P450 (modifiziert nach Coon *et al.* 1992).

Fe: Häm-Eisen im katalytischen Zentrum, Fp: Flavoprotein (NADPH-Cytochrom P450-Reduktase), RH: Substrat, ROH: monooxygeniertes Produkt.

einem großen Buchstaben versehen wird (z. B. CYP3A). Die weitere Ziffer steht für ein spezielles Isoenzym (z. B. CYP3A4) (Nelson *et al.* 2004).

Obwohl im Menschen fast 57 CYP-Isoenzym-Gene identifiziert sind, ist nur eine geringe Anzahl von CYP-Isoenzymen am Xenobiotika-Metabolismus beteiligt (Guengerich 2007). Physiologische Funktionen von CYP-Isoenzymen stellen der Arachidonsäure-Metabolismus und die Eicosanoid-Biosynthese, die Biosynthese von Cholesterol, Steroiden und Gallensäure, die Synthese und der Katabolismus von Vitamin D<sub>3</sub> und Retinsäure-Hydroxylierung dar (Nebert und Russell 2002). In Tabelle 1.1 sind die CYP-Isoenzyme mit ihrer Klassifizierung nach Substraten aufgelistet. Die fünf Isoenzyme mit der größten Bedeutung für den Arzneistoff-Metabolismus stellen die Isoenzyme CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 und CYP1A2 dar. Polymorphismen der einzelnen Isoenzyme können den CYP-vermittelten Metabolismus entscheidend beeinflussen (Ingelman-Sundberg *et al.* 2007). Der CYP-vermittelte Metabolismus trägt entscheidend zur Bioverfügbarkeit und Toxizität von Wirkstoffen bei.

### 1.1.1.2. N-reduktiver drei Komponenten-Enzym-Komplex

Die Reduktion Stickstoff-haltiger Gruppen ist zwar weniger intensiv erforscht als deren Oxidation (Testa 1995), aber bereits vor fast 40 Jahren wurde schon die mikrosomal und mitochondrial vermittelte Reduktion von Hydroxylamin beschrieben und die Schlussfolgerung gezogen, dass mehrere Enzyme zusammen mit NADH als Cofaktor die Reduktion vermitteln (Bernheim und Hochstein 1968, Kadlubar *et al.* 1973). Kadlubar und Ziegler (1974) stellten fest, dass Cytochrom b<sub>5</sub>, NADH-Cytochrom b<sub>5</sub>-Reduktase und ein drittes unbekanntes Enzym diese Reduktion vermitteln.

Für weitere *N*-hydroxylierte Verbindungen neben Hydroxylamin, wie Benzamidoxime, *N*-Hydroxyguanidine und *N*-Hydroxyamidinohydrazone, wurde ebenfalls die Reduktion beschrieben (Hauptmann *et al.* 1988, Clement *et al.* 1988a, 1993a und 1996).

Für das mikrosomale *N*-Reduktion-katalysierende Enzym-System ist die dritte Kom-



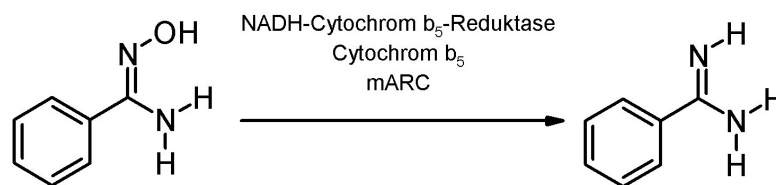
## 1. Einleitung

Steroide	Xenobiotika	Fettsäuren	Eicosanoide	Vitamine	Unbekannt
1B1	1A1	2J2	4F2	2R1	2A7
7A1	1A2	4A11	4F3	24A1	2S1
7B1	2A6	4B1	4F8	26A1	2U1
8B1	2A13	4F12	5A1	26B1	2W1
11A1	2B6		8A1	26C1	3A43
11B1	2C8			27B1	4A22
11B2	2C9				4F11
17A1	2C18				4F22
19A1	2C19				4V2
21A2	2D6				4X1
27A1	2E1				4Z1
39A1	2F1				20A1
46A1	3A4				27C1
51A1	3A5				
	3A7				

**Tabelle 1.1.:** Klassifizierung von humanen Cytochrom P450-Isoenzymen nach ihren Hauptsubstratklassen (Guengerich 2006).

ponente noch nicht vollständig geklärt. An der äußeren Mitochondrien-Membran wird die *N*-Reduktion durch die mitochondriale Benzamidoxim-reduzierende Komponente (mARC), Cytochrom  $b_5$  und die NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase vermittelt. Bei mARC handelt es sich um ein den Molybdän-Cofaktor-enthaltendes Enzym, welches ein Homolog zur C-terminalen Domäne der Molybdän-Cofaktor Sulfurase darstellt (Havemeyer *et al.* 2006). Das humane Genom kodiert für zwei mARC-Proteine, mARC1 und mARC2. Unterschiede und Gemeinsamkeiten in Funktion und Substraten, sowie die physiologische Funktion sind noch unklar (Grünewald *et al.* 2008). mARC1 reduziert in Kombination mit Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase als drei Komponenten-Enzym-Komplex Benzamidoxim zu Benzamidin (Abbildung 1.2).

Da die Effizienz der *N*-Reduktion durch Mitochondrien wesentlich höher ist als durch Mikrosomen (Clement *et al.* 2005), erfolgt der *N*-reduktive Metabolismus in der Zelle wahrscheinlich hauptsächlich über den mitochondrialen drei Komponenten-Enzym-Komplex (Grünewald *et al.* 2008).



**Abbildung 1.2.:** *N*-Reduktion des Modellsubstrates Benzamidoxim zu Benzamidin durch mARC, Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase.

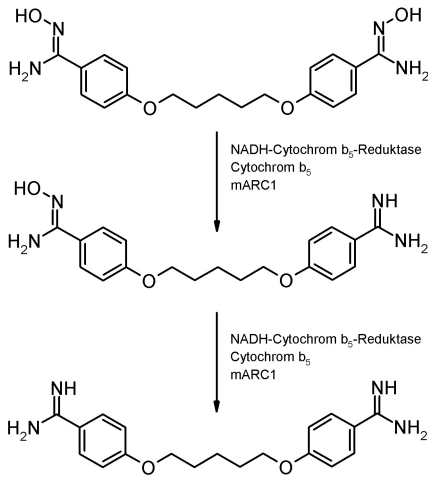
Im Menschen sind neben mARC drei weitere Molybdoenzyme bekannt, die Xanthinoxidoreduktase, die Aldehyd-Oxidase und die Sulfit-Oxidase. Im Gegensatz zu diesen Enzymen besitzt mARC ein separates Elektronen-Transportsystem, be-

## 1. Einleitung

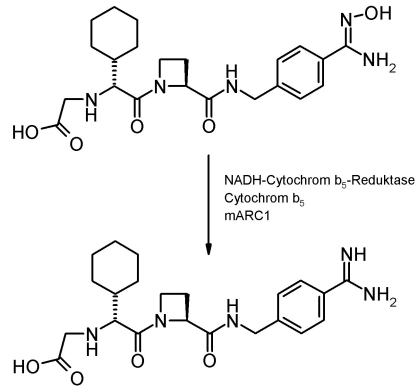
stehend aus dem Häm-Protein Cytochrom  $b_5$  und dem Flavo-Protein NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase. Die Elektronen des Cofaktors NADH werden über das Flavo-Protein NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase auf das Häm-Protein Cytochrom  $b_5$  übertragen, welches dann die Elektronen mARC zur Reduktion zur Verfügung stellt. NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase und Cytochrom  $b_5$  können ebenso ein Elektronentransportsystem für weitere Enzyme darstellen, wie z. B. für die Stearyl-Coenzym A-Desaturase (Strittmatter *et al.* 1974), Sterol-Oxidase (Fukushima *et al.* 1981) und verschiedene CYP-Isoenzyme (Hildebrandt und Estabrook 1971).

Der drei Komponenten-Enzym-Komplex könnte eine physiologische Rolle bei der Reduktion und damit der Detoxifizierung von *N*-hydroxylierten Verbindungen, wie z. B. Hydroxylaminen, Benzamidoximen und *N*-Hydroxyamidinohydrazonen, spielen. Hydroxylamine können im Phase II-Metabolismus zu instabilen Estern konjugiert werden, die zu mutagenen Arylnitreniumionen zerfallen. Eine *N*-Reduktion der promutagenen Hydroxylamine zu Aminen würde zur Entgiftung der Verbindung beitragen (Clement 1998).

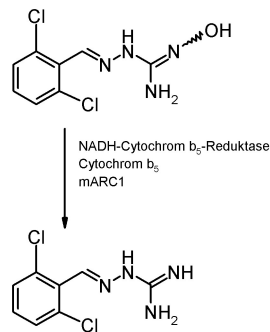
In vielen Arzneistoffen stellen Amidine und Guanidine für die Wirkung essentielle Gruppen dar, die im Gastrointestinal Trakt aufgrund der hohen Basizität geladen vorliegen und somit eine schlechte Bioverfügbarkeit besitzen. Durch *N*-Hydroxylierung werden diese Verbindungen weniger basisch und liegen dadurch ungeladen vor, wodurch die Bioverfügbarkeit erhöht wird. Während des *First pass*-Effektes kann die Aktivierung der *N*-hydroxylierten Prodrugs zur Wirkform erfolgen. Dieses Prodrug-Prinzip wurde erfolgreich bei einer Reihe von peptidomimetischen Inhibitoren und Antikoagulantien, wie Melagatran, und Therapeutika der Afrikanischen Schlafkrankheit und Leishmaniose, wie Pentamidin und Diminazen, angewandt (Peterlin-Masic *et al.* 2006, Gustafsson *et al.* 2001, Clement und Lopian 2003, Clement und Raether 1985, Bray *et al.* 2003). Grünewald *et al.* 2008 konnten an einer Auswahl *N*-hydroxylierter Prodrugs beispielhaft zeigen, dass der drei Komponenten-Enzym-Komplex die Aktivierung der Prodrugs vermittelt (Abbildung 1.3).



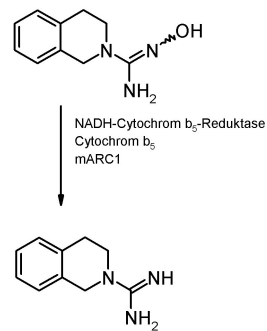
(a) Reduktion des Pentamidin-Diamidoxims zu Pentamidin



(b) Reduktion des *N*-Hydroxymelagatrans zu Melagatran



(c) Reduktion des Guanoxabenz zu Guanabenz



(d) Reduktion des *N*-Hydroxydebrisoquins zu Debrisoquin

**Abbildung 1.3.:** Aktivierung von Amidoxim- und *N*-Hydroxyguanidin-Prodrugs durch mARC1, Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase (Grünewald *et al.* 2008).

## 1. Einleitung

Enzyme	Cofaktoren	Beispielstrukturen im Xenobiotikum
UDP-Glucuronyltransferasen (UGT)	Uridin-5'-diphosphat-glucuronsäure (UDPGA)	Hydroxyl-, Carboxyl-, Hydroxylamin-, primäre Amino- und Thiol-Gruppen
Sulfotransferasen (SULT)	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS)	Hydroxyl-, primäre Amino- und Sulfonamid-Gruppen
Methyltransferasen	S-Adenosylmethionin	Hydroxyl-, Amino- und Thiol-Gruppen
Acetyltransferasen	Acetyl-Coenzym A	Hydroxyl- und primäre Amino-Gruppen
Glutathion-S-Transferasen (GST)	Glutathion	organische Halogenide, Epoxide u. a.

**Tabelle 1.2.:** Phase II-Reaktionen von Xenobiotika.

### 1.1.2. Phase II-Metabolismus

Während des Phase II-Metabolismus wird durch Transferasen eine meist saure Gruppe in das Arzneistoffmolekül einführt, so dass dieses stärker hydrophil wird und besser ausgeschieden werden kann. Einige der an Phase II-Reaktionen beteiligten Enzyme befinden sich membranständig im Endoplasmatischen Retikulum, andere membranungebunden im Zytosol. In Tabelle 1.2 sind die Enzyme und die beteiligten Cofaktoren der Phase II-Reaktionen, sowie die Strukturen in Xenobiotika, an die Gruppen der Cofaktoren gekoppelt werden können, aufgeführt.

Meist sind die Phase II-Metabolite inaktiv, es gibt aber auch wirksame Konjugationsprodukte. Teilweise entstehen als Metabolite reaktive Stoffe, die durch irreversible Bindung an körpereigene Stoffe toxische Effekte verursachen (Mutschler *et al.* 2001).

**Uridindiphosphat-Glucuronyltransferasen** gehören zur Superfamilie der Uridindiphosphat-Glycosyltransferasen, die die Konjugation von aktivierter Glucuronsäure mit nukleophilen Substraten katalysieren (Mackenzie *et al.* 1997).

Das nukleophile Substrat greift im Sinne einer  $S_N2$ -Reaktion am  $C_1$ -Atom des Pyranoseringes des Cofaktors Uridin-5'-diphosphatglucuronsäure (UDPGA) an. Aus der in  $\alpha$ -Form vorliegenden UDPGA entstehen bei der Glucuronidierung das  $\beta$ -Glucuronid des Substrates und Uridin-5'-diphosphat (UDP).

Wie UDP-Glucuronyltransferasen (UGT) sind  $\beta$ -Glucuronidasen auf der Innenseite des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert, die die entstandenen  $\beta$ -Glucuronide wieder aufspalten können. UGT sind in zahlreichen Organen, wie Leber, Darm, Niere und Geweben, die durch Steroide beeinflusst werden, exprimiert (Fisher *et al.* 2001).

Im Menschen sind über 15 UGT-Isoenzyme identifiziert worden (Tukey und Strassburg 2000). Die Nomenklatur der einzelnen Isoformen der UDP-Glucuronyltransferasen orientiert sich an der Nomenklatur der Cytochrom P450-Enzyme (Mackenzie *et al.* 1997, Mackenzie *et al.* 2005). Die Sequenz des C-terminalen Endes der UGT ist recht homolog. Es stellt zum einen den Membran-Anker dar und zum anderen nimmt man an, dass es sich um die UDPGA-Bindungsstelle handelt (Mackenzie *et al.* 1997, Tukey und Strassburg 2000). Der variable N-terminale Teil ist für die Substratspezifität zuständig. Im Menschen sind die drei Subfamilien UGT1A, UGT1B und UGT2A verbreitet.

UGT-Isoenzyme zeichnen sich durch eine breite und einander überlappende Substratspezifität aus. Sie überführen sowohl Xenobiotika als auch endogene Substanzen, wie z. B. Steroide, Bilirubin und Retinolsäure, in Glucuronide, die durch ihre verstärkte Hydrophilie besser renal und biliär ausgeschieden werden können. Die meisten Glucuronid-Metabolite sind inaktiv, aber es gibt auch einige Ausnahmen, z. B. ist Morphin-6-Glucuronid potenter als Morphin. Glucuronidierung stellt die bedeutendste Detoxifizierungsreaktion dar (Burchell und Coughtrie 1997). Über Galle als Glucuronide ausgeschiedene Arzneistoffe können im Darm durch  $\beta$ -Glucuronidasen gespalten und erneut aufgenommen werden. Man spricht dann von dem entero-hepatischen Kreislauf.

UDP-Glucuronyltransferasen sind induzierbar, hemmbar und unterliegen einer genetischen Variabilität. Diese Polymorphismen von UGT-Isoenzymen können sich z. B. als Gilberts-Syndrom und Crigler-Najjar-Syndrom äußern.

## 1. Einleitung

**Sulfotransferasen** (SULT) katalysieren die Konjugation des Sulfat-Restes von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) mit Phenolen, Alkoholen und Aminen. Sowohl endogene als auch exogene Substrate werden so metabolisiert. Sulfotransferasen besitzen eine breite und überlappende Substratspezifität. Durch Einführung der Sulfatgruppe sind die Metabolite hydrophiler, damit besser renal oder biliär ausscheidbar. Oft geht die Sulfatierung mit einem Verlust der biologischen Aktivität einher, in manchen Fällen, wie z. B. bei Minoxidil, ist der Sulfat-Metabolit wirksamer (Gamage *et al.* 2006). Leider kann auch eine Bioaktivierung von Procarcinogenen, wie z. B. bei *N*-Hydroxyarylaminen, zu reaktiven Elektrophilen erfolgen, die sowohl mutagene als auch carcinogene Wirkungen haben können (Falany 1997). Sulfotransferasen sind neben den UDP-Glucuronyltransferasen die wichtigsten entgiftenden Enzyme. Beide Transferasen-Familien haben die gleichen Substrate, wobei Sulfotransferasen eine höhere Affinität besitzen, allerdings eine geringere Kapazität aufweisen als UDP-Glucuronyltransferasen (Burchell und Coughtrie 1997). Induktion, Inhibition, hormonelle und genetische Faktoren beeinflussen die Expression und Aktivität von Sulfotransferasen (Gamage *et al.* 2006).

### 1.1.3. Interaktionen

Die Therapie von Erkrankungen erfolgt häufig durch gleichzeitige Gabe von mehreren Arzneistoffen, so dass Wechselwirkungen mit klinischer Relevanz durch Konkurrenz um dasselbe metabolisierende Enzym auftreten können. Da die so auftretenden Hemmungen und Induktionseffekte für die Arzneimittelsicherheit von großer Bedeutung sind, wird in präklinischen Untersuchungen unter Verwendung von bekannten Markerreaktionen das Wechselwirkungspotential von neuen Arzneistoffkandidaten charakterisiert. Nicht nur auf Enzymebene sind Interaktionen möglich, sondern auch auf der Stufe der Absorption, der Proteinbindung, des aktiven Transports und der Exkretion. Pharmakodynamische Wechselwirkungen sind im Sinne von synergistischen und adversen Effekten möglich, die sich aufgrund des bekannten Wirkmechanismus recht gut vorhersagen lassen.

#### 1.1.3.1. Inhibition

Die Hemmung des Metabolismus durch andere Arzneistoffe kann zu klinisch relevanten Wechselwirkungen führen, so kann die therapeutische Konzentration überschritten oder die Aktivierung von Wirkstoffen verhindert werden. Die Hemmung von Enzymen kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen. Die Hemmung kann Cosubstrat-, Zeit- und Konzentrations-abhängig sein. Eine weitere Unterscheidung in reversibel und irreversibel ist möglich. Bei einer reversiblen, kompetitiven Hemmung konkurrieren üblicherweise das Substrat und ein Struktur-ähnliches Molekül, das nicht umgesetzt wird, um die Bindung an das aktive Zentrum. Bei einer Hemmung von CYP-Enzymen tritt jedoch häufig der Fall auf, dass zwei Substrate um das katalytische Zentrum konkurrieren und es so zu einer kompetitiv-ähnlichen Hemmung kommt. Bei einer reversiblen nicht-kompetitiven Hemmung beeinflusst der Inhibitor die Substrat-Bindung nicht, aber die Substrat-Umsetzung wird verhindert. Eine irreversible Hemmung erfolgt, wenn das aktive Zentrum chemisch verändert wird oder ein Inhibitor irreversibel daran bindet (Karlson *et al.* 1994). Erfolgt eine irreversible Hemmung z. B. von CYP-Isoenzymen, so kann zur



## 1. Einleitung

Aufhebung der Hemmung der Austausch des Häm oder des Proteins nötig sein (McGinnity *et al.* 2006). Durch den Einsatz bekannter spezifischer Inhibitoren kann überprüft werden, welches CYP-Isoenzym am Metabolismus einer Substanz beteiligt ist (Eagling *et al.* 1998, Donato *et al.* 2004, Cohen *et al.* 2003, Ghosal *et al.* 2003).

### 1.1.3.2. Induktion

Am Arzneistoff-Metabolismus beteiligte Enzyme, Phase I- wie Phase II-Enzyme, besitzen eine unstimulierte Basalaktivität und können über bestimmte Wege induziert werden (Xu *et al.* 2005). Eine Vielzahl unterschiedlicher Xenobiotika und endogener Substanzen können eine vermehrte Bildung von Enzymen induzieren. Die klinisch relevanten Induktoren zeigen keine deutlichen strukturellen Übereinstimmungen. Ähnlichkeiten bestehen nur hinsichtlich einer hohen Lipophilie. Wie die meisten pharmakologischen Effekte ist die Induktion Dosis-abhängig. So kann in manchen Fällen, wie z. B. bei Rosiglitazon, die Therapiedosis geringer sein als die Dosis, ab der induktive Effekte auftreten (Smith 2000, Hewitt *et al.* 2007b). Die vermehrte Enzymexpression äußert sich bereits nach weniger als 48 Stunden. Nach dem Absetzen der Substanz sinkt die Enzymexpression innerhalb von Tagen bis Wochen zurück auf die Basalexpression. Die Induktion von am Arzneistoff-Metabolismus beteiligten Enzymen führt zum gesteigerten Abbau der Arzneistoffe bis zum Verlust der therapeutischen Wirkung. Die Induktion kann aber auch durch gesteigerten Metabolismus zur verstärkten Bildung von toxischen und carcinogenen Metaboliten führen. Um diese Effekte ausschließen bzw. einschätzen zu können, wird in präklinischen Studien das induktive Potential von neuen Arzneistoffkandidaten untersucht (Smith 2000, Hewitt *et al.* 2007a).

Die Induktion von CYP2-, CYP3- und CYP4-Isoenzymen erfolgt über die Familie der Kernrezeptoren. Die Isoenzyme der CYP1-Familie werden über den Arylhydrocarbon-Rezeptor induziert (Xu *et al.* 2005, Kawajiri und Fujii-Kuriyama 2007).

Die Kernrezeptoren (*nuclear receptors*) gehören zu einer Supergenfamilie, die für

Liganden	Kernrezeptor	Zielgen	Funktion
Steroide, Xenobiotika	Konstitutiver Androstan-Rezeptor (CAR)	CYP2B, CYP3A, CYP2C, UGT1A1, OATP2, MRP2	Xenobiotika- Metabolismus und -Transport
Steroide, Xenobiotika	Pregnan-X- Rezeptor (PXR)	CYP3A, CYP2B, CYP2C, CYP7A, GST-A2, OATP2, MRP2, MDR1, BSEP	Xenobiotika- Metabolismus und -Transport
Steroide, Xenobiotika	Leber-X- Rezeptor (LXR)	CYP7A	Cholesterol- und Gallensäuren- Metabolismus
Gallensäuren, Xenobiotika	Farnesol-X- Rezeptor (FXR)	CYP7A1, CYP8B, BSEP, IBABP	Cholesterol- und Gallensäuren- Metabolismus
Glitazone, Fibrate	Peroxisom- Proliferator- aktivierten Rezeptor $\alpha$ (PPAR $\alpha$ )	CYP7A, CYP4A, GST	Cholesterol- und Fettsäuren- Metabolismus

**Tabelle 1.3.:** Kernrezeptoren und deren Zielgene (zusammengefasst von Wang und LeCluyse 2003).

Zur spezifischen Bindung und Aktivierung bilden die aufgeführten Kernrezeptoren Heterodimere mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR).

OATP2: Anionen-Transporterpeptid 2, MRP2: *Multidrug resistance-associated protein 2*, MDR1: *Multidrug resistance-gene 1*, BSEP: Gallensalz-Export-Pumpe (*bile salt export pump*), IBABP: ileales Gallensäure-Bindungsprotein (*ileal bile acid-binding protein*).

## 1. Einleitung

Transkriptionsfaktoren kodiert. Sowohl endogene Substanzen, wie kleine lipophile Hormone, als auch exogene Substanzen, wie Wirkstoffe und Umweltgifte, können an diese Kernrezeptoren binden und so die Expression von Zielgenen stimulieren. Durch die Kernrezeptoren werden sowohl die zelluläre Entwicklung als auch der Schutzmetabolismus gesteuert.

Kernrezeptoren teilen sich eine hochkonservierte DNA-Bindungsdomäne (DBD), über die mindestens 70 Kernrezeptoren entdeckt wurden. Deren Funktion ist weitestgehend unbekannt, so dass sie den Namen verwaiste Kernrezeptoren (*orphan nuclear receptors*) erhalten haben. Die DBD vermittelt die Bindung des Rezeptors an die Promotorregion des Zielgens, das sogenannte Hormon-Antwort-Element (HRE, *hormone response element*) bzw. xenobiotische Antwort-Element (XRE, *xenobiotic response element*). Die Kernrezeptoren binden an HRE bzw. XRE als Heterodimer mit Retinoid-X-Rezeptor (RXR) oder als Monomere.

Ein weiterer wichtiger Bereich der Kernrezeptoren ist die Liganden-Bindungsdomäne (LBD). Hier erfolgt die Bindung der Liganden, es enthält das Dimerisierungsmotiv und die Sequenz, die die Lokalisation des Rezeptors vermittelt. Die Liganden-Bindung führt zu einer Konformationsänderung, zur Freisetzung von Coaktivatoren und zur Transaktivierung der Zielgene.

In Tabelle 1.3 ist eine Übersicht der Kernrezeptoren mit Bedeutung für den Phase I- und Phase II-Metabolismus, deren Liganden, Zielgenen und der Funktionen dargestellt. Neben dem Phase I- und Phase II-Metabolismus wird auch die Expression von Zellmembrantransportern, die für die Aufnahme und Ausscheidung von Arzneistoffen in die Zellen mitverantwortlich sind, entscheidend induziert.

Der Pregnan-X-Rezeptor (PXR) spielt eine große Rolle bei der Induktion von CYP3A, die für den Arzneistoff-Metabolismus bedeutenden CYP-Isoenzym darstellen. Die Gewebe-Expression von PXR ähnelt der von CYP3A (Wang und LeCluyse 2003). Rifampicin ist ein Ligand von PXR und ein potenter Induktor der CYP3A-Expression. PXR kann als Heterodimer mit RXR auch an das Phenobarbital-Antwort-Element (PBREM, *phenobarbital response element*) binden und so über den sogenannten *Cross talk* die Expression von CYP2B- und CYP2C-Isoenzymen induzieren. Die Induktion von z. B. der CYP3A-Expression wird über

XREM (*xenobiotic response element module*) vermittelt. Neben Polymorphismus in Enzymgen ansich kann auch der Polymorphismus in der Promotorregion entscheidenden Einfluss auf die Expression haben. Der konstitutive Androstan-Rezeptor (CAR) bildet ebenfalls mit RXR ein Heterodimer, welches an PBREM und an das Retinsäure-Antwort-Element (RARE, *retinoic acid response element*) bindet und so die Expression von CYP2B- und CYP2C-Isoenzymen induziert (Wang und LeCluyse 2003, Xu *et al.* 2005).

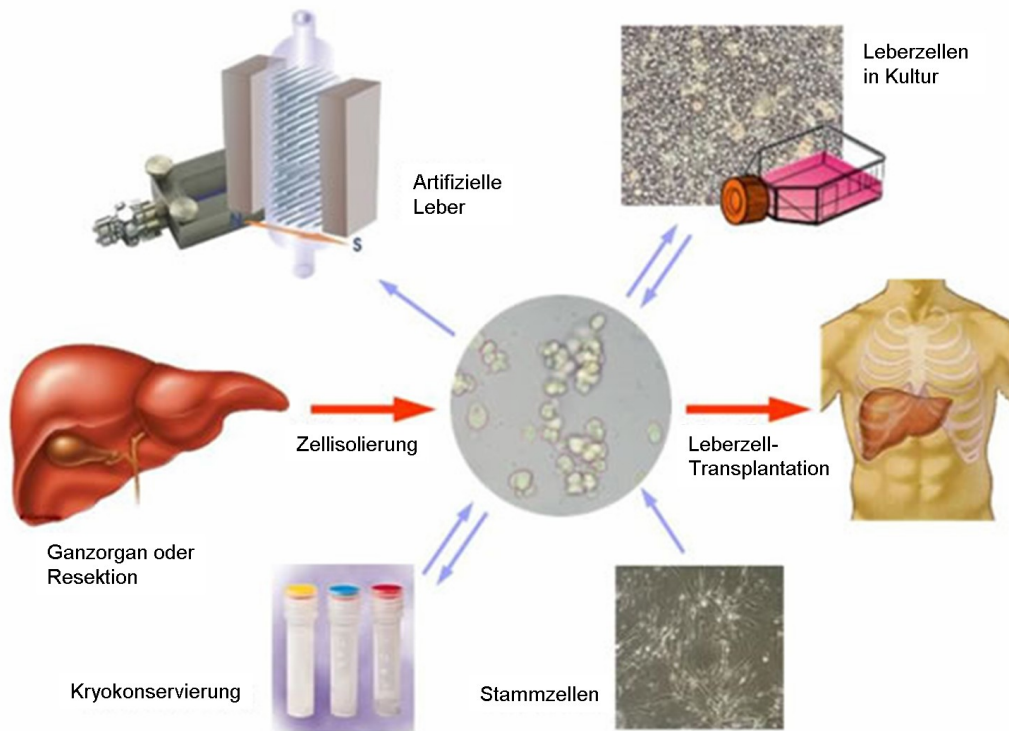
Die Induktion der CYP1A-Isoenzyme, aber auch von UGT1A6 und GST-Isoenzymen, über den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) läuft wie folgt ab. Der inaktive AhR liegt im Zytosol in einem Komplex mit einem Dimer des Chaperon Hitzeshock-Protein90 (Hsp90) und weiteren Proteinen vor. AhR hat eine charakteristische *basic-helix-loop-helix*-Region (bHLH) und eine *PER-Arnt-Sim*-Region (PAS). Hsp90 maskiert einen bestimmten Abschnitt in der bHLH, wodurch AhR im Zytosol zurückgehalten wird. Durch Bindung eines Liganden, z. B. 3-Methylcholanthren, kommt es zur Interaktion dieses Abschnittes mit Komponenten zum Zellkernimport. Im Zellkern bindet AhR an den Arylhydrocarbon-Rezeptor-Zellkern-Translokator (Arnt), dieser besitzt dem AhR entsprechend ebenfalls eine bHLH- und PAS-Region. Im Zellkern bindet das AhR/Arnt-Heterodimer an das xenobiotische Antwort-Element (XRE) in der CYP1-Sequenz. Hinsichtlich der zusätzlichen Aktivierung der Expression bestehen zwischen CYP1A1 und CYP1A2 Unterschiede. Über weitere XRE-Regionen und Transkriptionselemente kann die Expression gesteigert werden. Neben der Transkription von CYP1A wird auch die Transkription des AhR-Repressors induziert. Der AhR-Repressor befindet sich im Zellkern und kann mit Arnt ebenfalls ein Heterodimer bilden, das an XRE bindet, aber eine Repression bewirkt. Hierbei handelt es sich scheinbar um eine Rückkopplungschleife (Xu *et al.* 2005, Fujii-Kuriyama und Mimura 2005, Kawajiri und Fujii-Kuriyama 2007). Die Aktivierung des AhR spielt eine Rolle bei Veränderungen der Zellproliferation, Apoptose, in der Differenzierung des Fettgewebes, in der Tumorpromotion und immunologischen und reproduktiven Funktionen (Kawajiri und Fujii-Kuriyama 2007). Durch die Induktion von CYP1A-Isoenzymen können

## 1. Einleitung

vermehrt procarcinogene und promutagene Substanzen aktiviert werden. Neben exogenen Liganden, wie 3-Methylcholanthren und 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), sind auch einige endogene Liganden, wie Tryptamin, Bilirubin, Biliverdin und Lipoxin A4, bekannt (Fujii-Kuriyama und Mimura 2005). Omeprazol kann auch die CYP1A-Aktivität AhR-vermittelt induzieren, stellt aber keinen AhR-Liganden dar (Dzeletovic *et al.* 1997, Backlund und Ingelman-Sundberg 2005).

Da die Induktion Arzneistoff-metabolisierender Enzyme signifikante Folgen für die Pharmakokinetik und Toxizität hat, ist die Untersuchung des induktiven Potentials von neuen Arzneistoffkandidaten unerlässlich. Wichtig ist aber, dass die Ergebnisse in Korrelation zu bekannten Induktoren, wie 3-Methylcholanthren, Phenobarbital und Rifampicin, gesetzt werden, um die klinische Relevanz abzuschätzen. Deswegen bedeutet in vielen Fällen ein induktives Potential von neuen Arzneistoffkandidaten nicht gleich das Aus der Substanz (Hewitt *et al.* 2007b). Zur Untersuchung von induktiven Effekten neuer Arzneistoffkandidaten gibt es mehrere Verfahren. Eine Möglichkeit stellt die Verabreichung der Substanz an Versuchstiere mit anschließender Mikrosomengewinnung dar. Dazu wird die Induktion in den gewonnenen Mikrosomen untersucht (Sugihara *et al.* 2001). Da für diese Untersuchungen meist Ratten verwendet werden, können starke Speziesunterschiede im Vergleich zum Menschen auftreten. Bei der zweiten und dritten Möglichkeit handelt es sich um *in vitro*-Verfahren. So können Hepatozytenkulturen, vorzugsweise von humanen Hepatozyten verwendet werden, um die Induktion der Expression und Aktivität zu untersuchen (Silva *et al.* 1998, Roymann *et al.* 2005, Hewitt *et al.* 2007b). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, Zellen mit Luciferase-Vector zu transfektieren und die Rezeptor-vermittelte Induktion der Luciferase-Expression per Lumineszenz zu untersuchen (Zhang *et al.* 2003, Yueh *et al.* 2005, Jackson *et al.* 2006).

## 1.2. Einsatz von Hepatozyten in Forschung und Therapie



**Abbildung 1.4.:** Herstellung und Verwendung humaner Hepatozyten für die Forschung und Therapie ([www.medizin.uni-halle/kim1/index.php?id=350](http://www.medizin.uni-halle/kim1/index.php?id=350)).

Trotz der bemerkenswerten Fähigkeit der Leber zur Selbsterneuerung besteht ein Bedarf an Spenderlebern, der durch Organspenden nicht gedeckt werden kann. Auch steigt der Bedarf an primären humanen Hepatozyten für die pharmakologische und toxikologische Forschung. Aus humaner Leber isolierte Hepatozyten können sowohl als Therapie direkt transplantiert werden oder als artifizielle Leber kurzzeitig die Leberfunktion übernehmen, als auch in Kultur und als artifizielle Leber für *in vitro*-Studien verwendet werden. Durch Kryokonservierung können Hepatozyten bei Bedarf zu Verfügung stehen. Aufgrund der Unterversorgung an humanen Lebern stellt die Gewinnung von Hepatozyten-ähnlichen Zellen aus Stamm- und Vorläuferzellen eine vielversprechende Möglichkeit dar (Abbildung 1.4).

### 1.2.1. Einsatz von Hepatozyten in Forschung

Arzneistoff-Metabolismus und -Transport sind bestimmende Faktoren der Arzneistoff-Ausscheidung, der interindividuellen pharmakokinetischen Differenzen, der klinischen Wirkung und der Toxizität (Hewitt *et al.* 2007a). Deswegen ist in der frühen Phase der Wirkstoff-Entwicklung nicht nur die flächendeckende Charakterisierung der pharmakologischen Aktivität von Interesse, sondern die metabolische Stabilität, das Metaboliten-Profil, die daran beteiligten Metabolismuswege und Enzyme sowie das Inhibitions- und Induktionspotential (Hewitt *et al.* 2007a). In den Vorversuchen werden oft Mikrosomen verwendet, aber zur genaueren Charakterisierung stellen Hepatozyten das besser geeignete *in vitro*-Modell dar, da sämtliche Enzyme und Transporter vorhanden sind.

Hepatozyten zeigen eine gute *in vitro-in vivo*-Korrelation (Andersson *et al.* 2001, LeCluyse 2001, Lau *et al.* 2002), da *in vitro* festgestellte Schwankungen in der Enzymaktivität auf interindividuelle Unterschiede *in vivo* zurückzuführen sind (Hewitt *et al.* 2007a). Primäre humane Hepatozyten spiegeln am besten die Heterogenität der Cytochrom P450-Expression in der menschlichen Leber wieder und stellen somit ein unschätzbares Modell zur präklinischen Untersuchung des Metabolismus und der Toxizität dar (Donato *et al.* 1995, LeCluyse 2001, Gomez-Lechon *et al.* 2004). Aufgrund der schlechten und schwer planbaren Verfügbarkeit von humanen Hepatozyten wird nach entsprechenden "Ersatz-Hepatozyten" gesucht. Zwar sind kryokonservierte humane Hepatozyten erhältlich, aber diese sind recht teuer, oft in ihrer Qualität beeinträchtigt und nicht alle Chargen eignen sich für längere Induktionsstudien (Hengstler *et al.* 2005, Hewitt *et al.* 2007b). Neben der Verwendung von humanen Leberkrebszelllinien wird oft auf die Hepatozyten von anderen Spezies, wie Ratte, Affe und Schwein, zurückgegriffen (Guillouzo *et al.* 2007, Kanebratt und Andersson 2008, Donato *et al.* 1999, 2008, Hewitt *et al.* 2007b). Eine weitere Möglichkeit stellt die Kultivierung von humanen Hepatozyten-ähnlichen Zellen aus Stamm- und Vorläuferzellen dar. Eine Proliferation von Hepatozyten *in vitro* ist im Gegensatz zu *in vivo* nicht möglich, obwohl viele, die Proliferation beeinflussende, Faktoren bekannt sind (Hengstler *et al.* 2005).

### 1.2.2. Einsatz von Hepatozyten anderer Spezies in der Forschung

Neben humanen Hepatozyten werden in der präklinischen Forschung auch Hepatozyten von anderen Spezies für Vorversuche eingesetzt. Am häufigsten werden Hepatozyten aus Ratten eingesetzt, aber auch Hepatozyten aus Hund, Affe und Schwein finden Anwendung (Hewitt *et al.* 2007b).

Durch unterschiedliches Ansprechen auf Induktoren und Inhibitoren, unterschiedliche Metabolismuswege und daran beteiligte Enzyme sowie unterschiedliche toxikologische Effekte äußern sich Speziesunterschiede. Auch bei der Übertragung der präklinisch mit anderen Spezies ermittelten Dosen auf die klinischen Dosen zur Anwendung am Menschen offenbaren sich oft Speziesunterschiede (Smith 2000).

Der Protonenpumpen-Inhibitor Pantoprazol wird z. B. im Hund zu einem toxischen Metaboliten umgesetzt. Dieser Metabolit wird im Menschen nicht gebildet, so dass Pantoprazol im Menschen nicht toxisch wirkt (Gebhardt *et al.* 2003).

Im Gegensatz zu Hepatozyten von Menschen, Hunden und Schweinen erweisen sich Rifampicin und Omeprazol in Rattenhepatozyten nicht als Induktoren der CYP3A-Aktivität und CYP1A-Aktivität (Lu und Li 2001, Wang und LeCluyse 2003). Hingegen stellt Dexamethason einen potenten Induktor der CYP3A-Aktivität in Rattenhepatozyten, nicht aber in humanen Hepatozyten dar (Lu und Li 2001). Schweine- und Hundehepatozyten eignen sich besser als Alternative für humane Hepatozyten in Induktionsstudien. Auch im Ansprechen auf Inhibitoren zeigen sich oft Speziesunterschiede (Eagling *et al.* 1998). Gründe hierfür könnten z. B. Unterschiede im aktiven Zentrum, unterschiedliche beteiligte Isoenzyme und ein anderer Aufbau der Hemmstoffbindungsstelle darstellen (Boobis *et al.* 1990). Speziesunterschiede in der Induktion könnten durch andere Induktionsmechanismen, unterschiedliche induzierte Isoenzyme und eine andere Basalregulation verursacht sein (Boobis *et al.* 1990).

Als gute Alternative zu humanen Hepatozyten erweisen sich porcine Hepatozyten. Zum einen steigern alle klinisch relevanten Induktoren die CYP3A-Aktivität (Olsen *et al.* 1997), zum anderen werden sehr ähnliche Metaboliten-Profile zu humanen



## 1. Einleitung

Hepatozyten von Testosteron und Diazepam gebildet (Donato *et al.* 1999, Hansen *et al.* 2000), des Weiteren besteht eine sehr große Homologie der CYP2A-, CYP2C- und CYP3A-Isoenzyme (Soucek *et al.* 2001). Porcine Hepatozyten metabolisieren fast alle Standardsubstrate der humanen CYP-Isoenzyme. Allerdings sind diese teilweise über andere CYP-Isoenzyme vermittelt, so dass sich Inhibitions- und Induktionseffekte auf den Metabolismus der Standardsubstrate unterschiedlich ausüben können (Skaanild 2006). Besonders betroffen ist, trotz großer Homologie der Isoenzyme, der Metabolismus von humanen CYP2C-Substraten. So haben manche typischen Induktoren des CYP2C-Aktivitäten keine Einfluss auf den Tolbutamid-Metabolismus (Myers *et al.* 2001). Ebenso scheint der im Menschen CYP2E1-katalysierte Chlorzoxazon-Metabolismus im Schwein über CYP2A- und CYP3A-vermittelt zu sein (Skaanild 2006). In Tabelle 1.4 ist eine Übersicht der Cytochrom P450-Markerreaktionen und der daran beteiligten humanen und porcinen Isoenzyme aufgeführt. Hingegen zeigen humane und porcine Hepatozyten eine gute Übereinstimmung im Phase II-Metabolitenmuster (Behnia *et al.* 2000, Watkins und Klaassen 1986, Clement *et al.* 2001, Fröhlich *et al.* 2005).

### 1.2.3. Zellbasierte Therapien bei Lebererkrankungen

Unter physiologischen Bedingungen teilen sich zwei- bis dreitausendstel der Hepatozyten, um die physiologische Lebermasse zu erhalten. Als Antwort auf Verletzungen durch Toxine, Krankheiten oder Operationen können Hepatozyten proliferieren (Cantz *et al.* 2008). In der Leber befinden sich als Vorläuferzellen von Hepatozyten und Gallenkanal-Epithelzellen die Ovalzellen (Abbildung 1.5).

Durch Transplantation von humanen Hepatozyten kann die Zeit bis zur Organtransplantation überbrückt werden (Strom *et al.* 1997, Bilir *et al.* 2000), die Sterblichkeit bei akutem Leberversagen reduziert werden (Fisher *et al.* 2000, Ott *et al.* 2000) oder bei metabolischen Lebererkrankungen eine Therapie durchgeführt werden (Burlina 2004, Cantz *et al.* 2008). Gegenüber einer Organtransplantation besitzen zellbasierte Therapien die Vorteil, dass sie weniger invasiv und mehrfach

## 1.2. Einsatz von Hepatozyten in Forschung und Therapie

Markerreaktion	Humanes CYP	Porcines CYP
Ethoxyresorufin- <i>O</i> -Desethylierung	CYP1A2	CYP1A
Cumarin-7-Hydroxylierung	CYP2A6	CYP2A <sup>2</sup>
Nicotin- <i>O</i> -Oxidation	CYP2A6	CYP2A / ?
Benzyloxyresorufin- <i>O</i> -Debenzylierung	CYP2B6	CYP2B?
7-Ethoxyresorufin-4-trifluoromethylcumarin- <i>O</i> -Desethylierung	CYP2B6	CYP2B?
Pentoxyresorufin- <i>O</i> -Desalkylierung	CYP2B6	CYP2B?
Mephenytoin-Demethylierung	CYP2B6	n. d.
Diclofenac-4-Hydroxylierung	CYP2C8/9	CYP2C9 / ?
Tolbutamid-4-Hydroxylierung	CYP2C9	CYP2C <sup>2</sup>
<i>S</i> -Mephenytoin-4-Hydroxylierung	CYP2C19	n. d.
Debrisoquin-4-Hydroxylierung	CYP2D6	n. d. <sup>1</sup>
Bufuralol-1-Hydroxylierung	CYP2D6	CYP2D25 <sup>1</sup>
Dextromethorphan- <i>O</i> -Demethylierung	CYP2D6	CYP2D25 <sup>1</sup>
Chlorzoxazon-6-Hydroxylierung	CYP2E1	CYP2A / CYP3A
<i>p</i> -Nitrophenol-2-Hydroxylierung	CYP2E1	CYP2A / ?
Anilin-4-Hydroxylierung	CYP2E1	CYP2A / ?
Dimethylnitrosamin- <i>N</i> -Demethylierung	CYP2E1	?
Midazolam-4- und 1-Hydroxylierung	CYP3A4	CYP3A
Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung	CYP3A4	CYP3A
Nifedipin- <i>N</i> -Oxidation	CYP3A4	CYP3A29 <sup>2</sup>

**Tabelle 1.4.:** Cytochrom P450-Markerreaktionen und die daran beteiligten humanen und porcinen Isoenzyme (zusammengefasst von Skaanild 2006).

<sup>1</sup>: Friedrich (2003).

<sup>2</sup>: Soucek *et al.* (2001).

n. d.: kein Metabolismus detektiert.

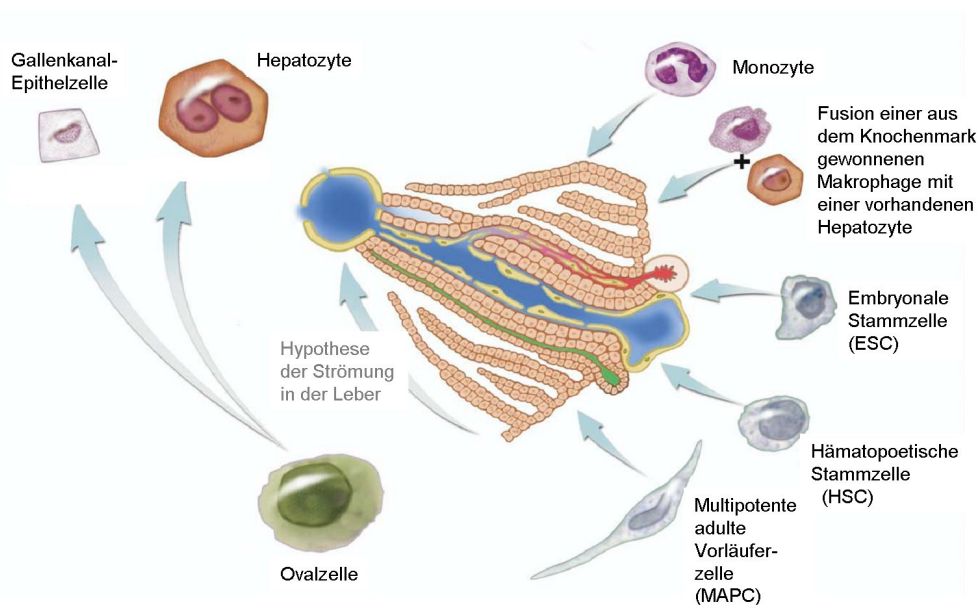
?: das für diese Reaktion verantwortliche porcine CYP-Isoenzym ist nicht identifiziert.

## 1. Einleitung

hintereinander durchgeführt werden können (Nüssler *et al.* 2006).

Als Zellen für die Therapie kommen neben primären adulten Hepatozyten fötale hepatische Vorläuferzellen, Zellen aus dem Knochenmark oder aus dem Nabelschurblut sowie embryonale Stammzellen nach weiterer ausführlicher Charakterisierung in Frage (Cantz *et al.* 2008).

### 1.3. Hepatozyten-ähnliche Zellen aus extrahepatischen Stamm- und Vorläuferzellen



**Abbildung 1.5.:** Aufbau eines Leberläppchens, natürliche Entstehung von Hepatozyten und Zelltypen, aus denen Hepatozyten-ähnliche Zellen gewonnen wurden (Grompe 2005).

Über die Generierung von Hepatozyten-gleichen Zellen aus verschiedenen extrahepatischen Stamm- und Vorläuferzellen wird immer wieder berichtet (Hengstler *et al.* 2005). In Abbildung 1.5 sind sowohl die natürliche Entstehung von Hepatozyten als auch die Zelltypen, aus den Hepatozyten-ähnliche Zellen gewonnen wurden, dargestellt. Für die präklinische Forschung wäre es ein wirklicher Durchbruch, wenn

### 1.3. Hepatozyten-ähnliche Zellen aus extrahepatischen Stamm- und Vorläuferzellen

Hepatozyten in unbeschränkter Menge aus Stamm- oder Vorläuferzellen zur Verfügung stehen wurden. Obwohl es faszinierend ist, dass Stamm- und Vorläuferzellen vorher stille Hepatozyten-Marker exprimieren, sind diese Zellen noch nicht gleich Hepatozyten und müssen kritisch hinsichtlich ihrer Fähigkeiten mit primären humane Hepatozyten verglichen werden. Als Hepatozyten-Ersatz in pharmakokinetischen und toxikologischen Untersuchungen müssen diese Zellen folgende Eigenschaften aufweisen:

- Metabolismus von Xenobiotika und endogenen Substanzen, wie Hormonen und Ammoniak
- Induktion des Cytochrom P450-Metabolismus
- Synthese und Sekretion von Albumin, Gerinnungsfaktoren, Komplementsystemfaktoren, Transporterproteinen, Galle, Lipide und Lipoproteine
- Speicherung von Glucose (Glucagon), fettlöslichen Vitaminen (A, D, E, K), Folsäure, Vitamin B<sub>12</sub>, Kupfer und Eisen

Neben der qualitativen Evaluation, ob bestimmte Marker vorhanden sind oder nicht, ist ein quantitativer Vergleich der Enzymaktivitäten unerlässlich.

*In vivo* kann die Differenzierung zu Hepatozyten durch Wiederherstellung der Leberfunktion in Mäusen durch Repopulationsassays untersucht werden (Hengstler *et al.* 2005). Einer der ersten Berichte stammte von Petersen *et al.* 1999. Das Knochenmark von weiblichen Ratten wurde durch Bestrahlung zerstört. Anschließend wurde den weiblichen Ratten Knochenmarksstammzellen von männlichen Ratten transplantiert. Durch Tetrachlorkohlenstoff und 2-Acetylaminofluoren erfolgte eine massive Schädigung der Leber der weiblichen transplantierten Ratten, so dass eine Regeneration durch Zellteilung der Hepatozyten nicht mehr erfolgen konnte. Durch diese Zerstörung der Leberzellen sollte ein Anreiz geschaffen werden, der die Differenzierung aus den transplantierten Knochenmarkszellen auslöst. Es konnten unter diesen Bedingungen Y-Chromosom-positive Hepatozyten in der Leber der weiblichen Ratten gefunden werden. In weiteren Versuchen wurde

## 1. Einleitung

Dipeptidylpeptidase IV-negativen weiblichen Ratten Knochenmark von männlichen Dipeptidylpeptidase IV-positiven Ratten transplantiert und anschließend die Expression von Dipeptidylpeptidase IV in den Gallengangskanälen zwischen den Hepatozyten der weiblichen Ratte detektiert (Petersen *et al.* 1999).

Theise *et al.* 2000 führten den Versuch ohne Leberschädigung nach der Transplantation von Knochenmark männlicher Mäuse in weibliche Mäuse durch. Auch hier konnten Hepatozyten mit Y-Chromosom in der Leber der weiblichen Mäuse gefunden werden (Theise *et al.* 2000). Diese Ergebnisse konnten anhand weiterer Versuche mit *Knock out*-Mäusen bestätigt werden (Lagasse *et al.* 2000).

*In vivo* können aus Stamm- und Vorläuferzellen gewonnenen Zellen vielleicht zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen differenzieren. Die *in vitro* hergestellten und transplantierten Zellen müssen deswegen noch nicht diese Eigenschaften aufweisen, da die Differenzierung durch die Umgebung in der Leber verursacht werden kann. Ob die als Hepatozyten *in vivo* detektierten Zellen durch Transdifferenzierung oder durch Fusion aus Knochenmarkszellen entstanden sind, ist Gegenstand zahlreicher Diskussionen (Hengstler *et al.* 2005, Cantz *et al.* 2008). Bei der Zellfusion kommt es zur Durchmischung des Zytosols und zu einer Reprogrammierung der Zelleigenschaften. Das Fusionspotential von Stammzellen könnte man zur Gentherapie verwenden, um bestimmte Krankheiten zu heilen, wie z. B. Hämophilie. Dass nach der Transplantation von Knochenmark Zellen des Knochenmarkspenders mit Hepatozyten des Empfängers fusionieren, konnte in Studien gezeigt werden (Wang *et al.* 2003, Vassilopoulos *et al.* 2003, Willenbring *et al.* 2004). Zellfusion erfolgt während der Entwicklung von Monozyten zu Osteoblasten, aber auch über die Fusion von Krebszellen mit Zellen hämatopoetischen Ursprungs und die spontane Fusion von Stammzellen wurde beobachtet. Ob allerdings die aus hämatopoetischen Stammzellen entstandenen Zellen mit Hepatozyten oder eher mit phagozytierenden Kupferzellen fusionieren, wodurch die Entwicklung zu Hepatozyten induziert wird, ist noch unklar (Vassilopoulos *et al.* 2003). Tendenziell ist das Ausmaß der Fusion gering, außer wenn die durch Fusion entstandenen Hepatozyten einen Selektionsvorteil erhalten (Wang *et al.* 2003). Um fusionierte Zellen in der Leber zu erhalten, können statt Knochenmarkszellen auch differenzierte Makrophagen transplantiert

### 1.3. Hepatozyten-ähnliche Zellen aus extrahepatischen Stamm- und Vorläuferzellen

werden, die deutlich einfacher zu erhalten sind (Willenbring *et al.* 2004). Keine Fusion von Nabelblutzellen mit Hepatozyten konnten dagegen Newsome *et al.* (2003) feststellen. *In vitro* können aus Stamm- und Vorläuferzellen schwerlich durch Fusion Hepatozyten-ähnliche Zellen entstehen, so dass in diesen Fällen eher von einer Transdifferenzierung ausgegangen wird.

Die transplantierten Knochenmarkszellen wandern über das Blut in die Leber. Die Zellen, die natürlicher Weise aus hämatopoetische Stammzellen über weitere Zwischenstufen entstehen, sind Monozyten. Monozyten zirkulieren im Blut, wandern in die Gewebe ein, unter anderem auch in die Leber, und können je nach Gewebe zu einer Vielzahl von Zellen, wie Makrophagen, Osteoklasten, Dendritischen Zellen und vielen mehr, differenzieren (Gordon und Taylor 2005). Über die Abnahme von Blut sind diese Zellen sehr gut, einfach und in größeren Mengen zu gewinnen. Deswegen wurde versucht aus Monozyten und hämatopoetischen Stammzellen *in vitro* Hepatozyten-ähnliche Zellen zu kultivieren. Beispielhaft ist in Tabelle 1.5 eine Übersicht dieser Zellen mit den Merkmalen, anhand derer die Zellen als Hepatozyten-ähnlich eingestuft werden, zusammengefasst. Auch bei neueren Berichten über die Kultivierung von Hepatozyten-ähnlichen Zellen aus Knochenmarkszellen, erfolgte meist die Charakterisierung der Zellen nur anhand der Expression von wenigen Markern und unumfassenden Cytochrom P450-Aktivitäten (Snykers *et al.* 2006, Kazemnejad *et al.* 2008).

## 1. Einleitung

Ausgangszellen	Kulturbedingungen	Fähigkeiten	Literatur
Multipotente adulte Vorläuferzellen (MAPC) aus dem Knochenmark	FGF-4 und HGF	induzierbare CYP2B6-Aktivität durch Phenobarbital um 32% LDL-Aufnahme, Glycogen-speicherung, Albumin- und Harnstoff-Bildung Expression von CYP1B1, GATA4, CK18, HNF-3 $\beta$ , -1 $\alpha$ , -4	Schwartz <i>et al.</i> 2002
Adulte pluripotente Stammzellen (PSC) aus peripheren Blutmonozyten	<i>PSC:</i> Monozyten + M-CSF und PMA <i>Hepatozyten:</i> PSC + HGF	Albumin, $\alpha$ -Fetoprotein, CK7  ( <i>Makrophagen:</i> PSC + LPS)	Zhao <i>et al.</i> 2003
Programmierbare Zellen monozytären Ursprungs (PCMO) aus peripheren Blutmonozyten	<i>PCMO:</i> Monozyten + M-CSF und $\beta$ -Mercaptoethanol <i>NeoHepatozyten:</i> PCMO + FGF-4	induzierbare CYP-Aktivität, CYP3A4-Aktivität, Phase II-Aktivität Expression von CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, CK18, Pan-Actin, $\alpha$ -Fetoprotein, Albumin, Faktor II und VII Synthese von Albumin, Harnstoff, Lactat, Freisetzung von LDH und AST	Ruhnke <i>et al.</i> 2005a Ruhnke <i>et al.</i> 2005b

**Tabelle 1.5.:** *In vitro*-kultivierte Hepatozyten-ähnliche Zellen aus Monozyten und hämatopoetischen Stammzellen.

FGF-4: Fibroblasten-Wachstumsfaktor 4, HGF: Hepatozyten-Wachstumsfaktor, GATA4: Transkriptionsfaktor, CK: Cytokeratin, HNF: Hepatozyten-Kern-Faktor, LPS: Lipopolysaccharid, LDH: Lactatdehydrogenase, AST: Aspartat-Aminotransferase

## 1.4. Zielsetzung

Da in den Einleitungen der folgenden Kapitel eine detaillierte Beschreibung der Zielsetzung erfolgt, soll an dieser Stelle nur ein Überblick gegeben werden.

Humane Hepatozyten stellen in der präklinischen Entwicklung ein wichtiges *in vitro*-Modell zur Untersuchung des Metabolismus, möglicher Wechselwirkungen und der Toxizität dar. Aufgrund der schlechten Verfügbarkeit wird ein besser verfügbarer humaner Ersatz für Hepatozyten gesucht. Deswegen gibt es zahlreiche Versuche aus Stammzellen und Vorläuferzellen Zellen mit Hepatozyten-ähnlichen Eigenschaften zu generieren. Ein Beispiel sind die aus Monozyten-kultivierten NeoHepatozyten. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die NeoHepatozyten im Vergleich zu humanen und porcinen Hepatozyten, sowie zu aus Monozyten-kultivierten klassisch aktivierten Makrophagen untersucht werden. Der Vergleich zu primären Hepatozyten ist wichtig, um die Eignung zu beurteilen. Klassisch aktivierte Makrophagen sollten als weiterer Vergleich verwendet werden, um sicherzustellen, dass es sich um Eigenschaften von NeoHepatozyten nicht um für Makrophagen-typische Eigenschaften handelt. Hierfür waren der Metabolismus über Cytochrom P450-Isoenzyme sowie deren Induktion und Inhibition, der Testosteron-Metabolismus und die Aktivierung *N*-hydroxylierter Prodrugs von Interesse.

Diese Untersuchungen können auch die weitere Charakterisierung von porcinen Hepatozyten als Ersatz von humanen Hepatozyten ermöglichen.

Die *N*-Hydroxylierung der essentiellen stark basischen Amidine und Guanidine stellt ein Prodrug-Prinzip zur Verringerung der Basizität und Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit dar. Die Aktivierung dieser Prodrugs wird über den drei Komponenten-Enzym-Komplex, bestehend aus mARC, Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase, vermittelt. In Rahmen dieser Arbeit sollte die Induktion der Aktivität des drei Komponenten-Enzym-Komplex untersucht werden. Zum einen war von Interesse, ob gängige Induktoren Arzneistoff-metabolisierender Enzym und Substrate die Prodrug-Aktivierung als Wechselwirkung induzieren



## 1. Einleitung

können. Zum anderen kann eine Induktion durch mögliche physiologische mutagene *N*-hydroxylierte Nukleinbasen und weiterer Substanzen Rückschlüsse auf eine mögliche physiologische Funktion des drei Komponenten-Enzym-Komplex ermöglichen. Für diese Untersuchungen sollte das geeigneteste Modell im Rahmen der zunächst durchgeführten Studien über verschiedenen Hepatozytenformen gefunden werden.

## **2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten im Vergleich zu Makrophagen und Hepatozyten**

### **2.1. Einleitung**

Seit 1999 berichten diverse Veröffentlichungen über die Erzeugung von Hepatozyten aus verschiedenen extrahepatischen Stammzellen und Vorläuferzellen (zusammengefasst von Hengstler *et al.* 2005). Ein Beispiel sind aus humanen peripheren Blutmonozyten gewonnene NeoHepatozyten (Ruhnke *et al.* 2005a und 2005b).

Durch die Detektion von mRNA mittels Reverse Transkriptase-PCR oder der Expression mittels Antikörper-vermittelten Reaktionen lassen sich zwar Aussagen über das Vorhandensein von Enzymen und Proteinen treffen, aber keine Aussagen über deren Funktionalität. Deswegen sind Untersuchungen zur Aktivität der Enzyme, der aus Stammzellen bzw. Vorläuferzellen generierten Hepatozyten, unerlässlich. Zum einen um die Relevanz der Aktivität zu beurteilen und zum anderen um die Aktivitäten mit denen von primären Hepatozyten und denen der jeweiligen Ausgangszellen zu vergleichen.

### 2.1.1. NeoHepatozyten

NeoHepatozyten werden aus humanen peripheren Blutmonozyten gewonnen, da diese Monozyten in großen Mengen verfügbar sind, bestimmte Marker aufweisen und die Handhabung einfach ist. Gewebe-spezifische Stammzellen, die nur ein restriktives Differenzierungspotential besitzen, und pluripotente Stammzellen sind schwer verfügbar, arm an Markern und schwierig in Kultur zu vermehren (Ruhnke *et al.* 2005a). Hämatopoetische Stammzellen verfügen über die Eigenschaft der Selbsterneuerung und die Fähigkeit sich in alle Zellen der hämatopoetischen Linie zu entwickeln. Diese Vorläuferzellen können sich zu Granulozyten und Monozyten entwickeln. Monozyten können weiter zu Makrophagen, dendritischen Zellen und Osteoklasten differenzieren (Gordon und Taylor 2005).

Der Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktor (M-CSF) fördert die Proliferation und Differenzierung von Monozyten (Gordon und Taylor 2005). Interleukin-3 (IL-3) beeinflusst die Differenzierung von Monozyten und die Selbsterneuerung von pluripotenten Stammzellen positiv (Mangi und Newland 1999). Wegen vermuteter synergistischer Effekte werden M-CSF und IL-3 zur Bildung von sogenannten programmierbaren Zellen monozytären Ursprungs (PCMO, *programmable cells of monocytic origin*) kombiniert (Ruhnke *et al.* 2005a). Dabei kommt es zur Änderung der Morphologie, Fortsetzung der Zellteilung sowie verminderten Bildung von Faktoren, die zur endgültigen Differenzierung führen und typische Marker der hämatopoetischen Linie darstellen, so dass eine Dedifferenzierung vermutet wurde. Dedifferenzierung ist ein vielschrittiger Prozess, währenddessen es zum Verlust von Zelltyp-spezifischen Eigenschaften und zur Freisetzung von *Silencing Genen* kommt. Die als programmierbare Zellen monozytären Ursprungs (PCMO) bezeichneten Zellen weisen weiterhin typische Monozyten-Marker auf, in geringem Ausmaß aber auch Marker von hämatopoetischen Stammzellen. Durch induktive Reize können sich PCMO zu anderen Zelltypen entwickeln (Ruhnke *et al.* 2005a).

Die Differenzierung von PCMO zu NeoHepatozyten erfolgt durch den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-4 (FGF-4) (Ruhnke *et al.* 2005a). Durch FGF-4 können multipotente adulte Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zu Hepatozyten-ähnlichen

Zellen differenzieren (Schwartz *et al.* 2002).

NeoHepatozyten weisen eine Morphologie, serologische Marker und metabolische Funktionen wie humane Hepatozyten *in vitro* auf. Allerdings exprimieren NeoHepatozyten neben Hepatozyten-Markern auch Monozyten-Marker und typische Marker für hämatopoetische Stammzellen (Ruhnke *et al.* 2005a).

NeoHepatozyten sind größer als humane Hepatozyten. Wie die Expression von Connexin 32 zeigt, bilden sie Zellkontakte aus. Zusätzlich werden die Epithelmarker Cytokeratin 18 und Pan-Actin exprimiert (Ruhnke *et al.* 2005b). Die Expression von typischen hepatischen Proteinen wie  $\alpha$ -Fetoprotein, welches als Markerprotein zur Diagnose von Leberkarzinomen dient, Gerinnungsfaktor II (Prothrombin) und VII (Proconvertin) kann in NeoHepatozyten festgestellt werden (Ruhnke *et al.* 2005a und 2005b). Nach Transplantation von NeoHepatozyten in immundefizienten Mäusen ist humanes Albumin detektierbar (Ruhnke *et al.* 2005a). Die Bildung und Freisetzung von Albumin, Harnstoff, Glucose, Lactatdehydrogenase und Aspartat-Aminotransferase durch NeoHepatozyten erfolgt in geringem Ausmaß als durch humanen Hepatozyten (Ruhnke *et al.* 2005b). Als typische Fähigkeiten von Hepatozyten sind normalerweise die Synthese von Albumin, Harnstoff und Gerinnungsfaktoren charakterisiert.

Zum Einsatz in *in vitro*-Studien zur Bestimmung des Arzneistoffmetabolismus und der Toxizität ist der Phase I- und Phase II-Metabolismus von besonderem Interesse. NeoHepatozyten führen im Rahmen von Phase I-Reaktionen 7-Ethoxycumarin-*O*-Desethylierung und Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung durch (Ruhnke *et al.* 2005a und 2005b). Daneben kann die Expression von CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6 und CYP3A4 festgestellt werden (Ruhnke *et al.* 2005b).

Die 7-Ethoxycumarin-*O*-Desethylierung kann durch eine Vielzahl von Cytochrom P450-Isoenzymen (CYP), wie CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2E1 und CYP3A3-5, vermittelt werden (Bayliss *et al.* 1994). Durch Induktion mit 3-Methylcholanthren lässt sich diese Phase I-Aktivität von NeoHepatozyten steigern. Das Ausmaß der Induktion durch 3-Methylcholanthren und die Grundaktivitäten der 7-Ethoxycumarin-*O*-Desethylierung von humanen Hepatozyten und NeoHepatozyten liegen im ähnlichen Bereich (Ruhnke *et al.* 2005b).

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

Die CYP3A4-vermittelte Metabolisierung von Testosteron zu 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron findet zwar in NeoHepatozyten statt, allerdings in einem deutlich geringeren Umfang als in humanen Hepatozyten. Auch die Steigerung der Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierungsaktivität der NeoHepatozyten nach Induktion mit Rifampicin um den Faktor 1,5 ist deutlich geringer als in humanen Hepatozyten (Faktor 8) (Ruhnke *et al.* 2005b).

Die am häufigsten ablaufende Phase II-Reaktion in Hepatozyten ist die Glucuronidierung. NeoHepatozyten sind dazu ebenfalls in der Lage, wie Ruhnke *et al.* (2005a und 2005b) anhand der Glucuronidierung von 4-Methylumbelliferon (7-Methoxy-4-methylcumarin) zeigen.

### 2.1.2. Monozyten und Makrophagen

Hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark differenzieren über Granulozyten/Monozyten-Kolonie-formende Einheiten zu Monozyten-Kolonie-formenden Einheiten. Über weitere Zwischenstufen entstehen aus Monozyten-Kolonie-formenden Einheiten im Knochenmark Monozyten. Diese werden in das periphere Blut freigesetzt, wo sie über mehrere Tage zirkulieren, bevor sie in verschiedene Gewebe einwandern und dort zu residierenden Makrophagen differenzieren können (Gordon und Taylor 2005).

Monozyten sind eine sehr heterogene Zellpopulation, die sich in Größe, Zellkernmorphologie, Granularität, Expression von Antigenen und physiologischen Aktivitäten stark unterscheiden kann, so dass eine Abgrenzung zu anderen Zelltypen, wie Granulozyten, Lymphozyten und natürlichen Killerzellen, teilweise schwierig ist. Deswegen werden Monozyten über die Expression von CD16, CD64 und CD206 identifiziert. Charakterische Eigenschaften von Monozyten sind der geringe Sauerstoffverbrauch, die geringe Proteinsynthese und eine moderate Zytokin-Produktion (Martinez *et al.* 2006).

Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen wird durch den Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF) gesteuert. Dabei kommt es zur einer

bedeutenden Veränderung der Aktivität des zellulären Metabolismus. Die Veränderungen während der Differenzierung sind von den Ausgangsmoноzyten und den einwirkenden proinflammatorischen, metabolischen oder immunogenen Reizen abhängig und können zu unterschiedlichen Makrophagen-Subtypen und dendritischen Zellen führen (Gordon und Taylor 2005, Martinez *et al.* 2006).

Monozyten können in verschiedene Gewebe einwandern und sich zu Gewebemakrophagen entwickeln. Dort spielen sie eine umfassende Rolle in der Erhaltung des Gewebegleichgewichts, in dem sie alternde Zellen entfernen und das Gewebe nach entzündlichen Prozessen reparieren und erneuern. Weitere Aufgaben sind die Phagozytose von Mikroorganismen, Viren und Fremdstoffpartikeln sowie die Antigen-Präsentation. Normalerweise erfolgt die Erneuerung der Gewebemakrophagen aus im Blut zirkulierenden Monozyten. Ob es jeweilige Vorläufermonozyten gibt oder ob Gewebemakrophagen aus zufällig zirkulierenden Monozyten differenzieren, ist noch unklar (Gordon und Taylor 2005). Viele Makrophagen-Populationen können im jeweiligen Gewebe proliferieren. Dies ist eine ungewöhnliche Fähigkeit, denn ausdifferenzierte Zellen sind im Allgemeinen dazu nicht in der Lage.

Je nach Gewebe sind besondere Eigenschaften erforderlich, daher existiert eine Vielzahl von Makrophagen-Subpopulationen. Eine vereinfachte Übersicht ist in Tabelle 2.1 zusammengestellt.

Monozyten und Makrophagen gehören zur unspezifischen Immunantwort. Durch Gewebeschädigung oder Infektionen werden im Gewebe ansässige Makrophagen aktiviert, wodurch die Produktion von Zytokinen, Chemokinen und anderen Entzündungsmediatoren ansteigt und die Rekrutierung von Monozyten beginnt. Aktivatoren sind Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und mikrobielle Auslöser wie Lipopolysaccharide (LPS), aber auch Zytokine wie Tumornekrosefaktor und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor.

Klassisch aktivierte Makrophagen, auch als M1-Zellen bezeichnet, werden durch IFN- $\gamma$  und LPS aktiviert. Sie produzieren in größeren Mengen Effektor-Moleküle, wie reaktive Sauerstoffspezies sowie NO über die induzierbare NO-Synthase, und inflammatorische Zytokine, wie Interleukin- $1\beta$ , Tumornekrosefaktor und

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

Makrophagen-Subpopulation	Lokalisation
Osteoklasten	Knochen
Alveolarmakrophagen	Lunge
Thymusmakrophagen	Lymphknoten
Milzmakrophagen	Milz
Darmmakrophagen	Darm
Kupffer-Sternzellen	Leber
Langerhans-Zellen	Haut
Dendritische Zellen	Blut, Schleimhäute, Lymphe
Mikrogliazellen, perivaskuläre und meningeale Makrophagen	Gewebe des zentralen Nervensystems
Monozytäre inflammatorische Makrophagen	entzündetes Gewebe

**Tabelle 2.1.:** Makrophagen-Populationen und deren Lokalisation (nach Gordon und Taylor 2005).

Interleukin-6. Klassisch aktivierte Makrophagen aktivieren T-Helferzellen, die weitere Makrophagen aktivieren, in diesen Zellen die Fusion von Vesikeln mit Lysosomen auslösen und so der Verdau von phagozytierten Erregern initiiert wird. Als M2-Zellen bezeichnete Makrophagen differenzieren durch im Blut zirkulierenden M-CSF aus Monozyten und stellen so die Standardversion von Makrophagen dar. Je nach Art der Aktivierung können Makrophagen sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Mediatoren, wie Arachidonsäure-Derivate und Phosphosphingolipide, über verschiedene Enzyme synthetisieren, wie z. B. über Cyclooxygenasen 1 und 2 (Martinez *et al.* 2006).

Der Metabolismus von Arachidonsäure, die Cholesterol-Homöostase, die Gallensäure-Biosynthese und die Vitamin D<sub>3</sub>-Bioaktivierung stellen die physiologische Funktion der CYP-Expression in Makrophagen dar (Abraham *et al.* 1991, Gottfried *et al.* 2006). Monozyten und Makrophagen metabolisieren im Rahmen von entzündlichen Prozessen Steroide, wie z. B. Testosteron. Monozyten bilden inaktive Androgen-Derivate, wohingegen Makrophagen anti-inflammatorisch wirkende Androgene synthetisieren können (Schmidt *et al.* 2006).

Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen beeinflusst die CYP-Expression (Baron *et al.* 1998, Gottfried *et al.* 2006, Schmidt *et al.* 2006). Oft zeigen auch verschiedene Makrophagen-Subpopulationen, wie z. B. Alveolarmakrophagen und monozytäre Makrophagen, unterschiedliche CYP-Expressionsmuster. Bei vermeintlich gleichen Makrophagen-Subpopulationen kommen andere Arbeitsgruppen teilweise zu verschiedenen Ergebnissen. Im Unterschied zu den in der Tabelle 2.2 aufgeführten aus Monozyten gewonnenen Makrophagen wurde in Alveolarmakrophagen die Expression von CYP1B1, CYP2B6/7, CYP2C8-19, CYP2E1, CYP2F1, CYP3A5 und CYP4B1 festgestellt, nicht aber von CYP1A1, CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4 und CYP3A7 (Hukkanen *et al.* 1997, Piipari *et al.* 2000).

Periphere Blutmonozyten zeigen eine CYP1A1- und CYP2E1-Aktivität (Peterson 1987, Baron *et al.* 1998). Makrophagen metabolisieren CYP-vermittelt Ethanol (Wickramasinghe 1986). Sowohl der CYP1A1-Metabolismus als auch die CYP1A1-Expression in Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten kann induziert werden



## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

(Baron *et al.* 1998, Borodin *et al.* 2005, Vanden Heuvel *et al.* 1993, Lang *et al.* 1996). Krovat *et al.* 2000 und Nakamura *et al.* 1998 konnten hingegen keine Induktion detektieren.

Monozyten und Leukozyten weisen keine CYP3A-Aktivität auf (Baron *et al.* 1998, Janardan *et al.* 1996). Bei systemischer Gabe von Rifampicin weisen anschließend isolierte mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) eine erhöhte Menge an CYP3A4 mRNA auf (Gashaw *et al.* 2003). In Lymphozyten zeigt sich keine CYP3A-Induktion (Krovat *et al.* 2000).

Alveolarmakrophagen weisen eine UGT1A-vermittelte Aktivität auf (Yamashiki *et al.* 2002). In monozytären Makrophagen lässt sich die Expression von UGT1A9 über die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR)  $\alpha$  und  $\gamma$  induzieren (Barbier *et al.* 2003).

In manchen Fällen wurde die CYP-Expression in PBMC untersucht, um zu überprüfen, ob sich über die Expression in PBMC Rückschlüsse auf die Expression und Aktivität in der Leber ziehen lassen. Für CYP3A4/5 steht die Expression in der Leber in keiner Relation zu der Expression in PBMC (Janardan *et al.* 1996, Gashaw *et al.* 2003). In PBMC von extensiven Debrisoquin-Metabolisierern ist die CYP2D6-Expression im Vergleich erhöht, so dass eine Korrelation aufgezeigt werden kann (Carcillo *et al.* 1996).

Die Myelotoxizität und Leukämogenese mancher Xenobiotika könnte durch den CYP-Metabolismus in Knochenmarksmakrophagen erklärt werden. Diese Toxizität wird durch hoch reaktive und kurzlebige Metabolite verursacht. Während der Blutzirkulation würden die in den Hepatozyten hoch reaktiven Metabolite schon an anderen Orten reagieren, so dass der Metabolismus im Knochenmark stattfinden muss (Hodges *et al.* 2000).

Da verschiedene Makrophagen-Subpopulationen unterschiedliche CYP-Expressionmuster aufweisen, könnten durch verschiedene Kulturbedingungen aus programmierbaren Zellen monozytären Ursprungs (PCMO) möglicherweise Makrophagen-Subpopulationen mit erhöhter CYP-Expression differenzieren.

CYP-Isoenzym	Monozyten	monozytäre Makrophagen	Literatur
CYP1A1	+		Baron <i>et al.</i> 1998
	+	+	Borodin <i>et al.</i> 2005
		+	Hodges <i>et al.</i> 2000
CYP1A2	–		Baron <i>et al.</i> 1998
	+	+	Borodin <i>et al.</i> 2005
CYP1B1	+	+	Baron <i>et al.</i> 1998
CYP2A6/7		+	Hodges <i>et al.</i> 2000
CYP2B6/7	+	+	Baron <i>et al.</i> 1998
CYP2D6		+	Hodges <i>et al.</i> 2000
CYP2E1	+	+ <sup>1</sup>	Baron <i>et al.</i> 1998
		+	Hodges <i>et al.</i> 2000
		+	Hutson und Wickramasinghe 1999
CYP2J2	+	+	Nakayama <i>et al.</i> 2008
CYP3A4	– <sup>2</sup>	–	Baron <i>et al.</i> 1998
		+	Hodges <i>et al.</i> 2000
CYP3A7	–		Baron <i>et al.</i> 1998
CYP4B1	–		Baron <i>et al.</i> 1998

**Tabelle 2.2.:** Expression von Cytochrom P450-Isoenzymen in Monozyten und Makrophagen.

<sup>1</sup>: Nur in proinflammatorischen Makrophagen detektierbar.

<sup>2</sup>: Nur nach Induktion mit Ciclosporin A, Phenobarbital, Benzanthracen oder Ethanol detektierbar.

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

Neben Lipopolysacchariden wird auch Phorbolmyristataacetat (PMA) zur Aktivierung von Makrophagen eingesetzt (Hassan *et al.* 1988, Garle *et al.* 2000, Breimo und Osterud 2005, Nakayama *et al.* 2008). Die Aktivierung mit Phorbolmyristataacetat führt zur gesteigerten Bildung von Peroxiden, wie  $O_2^-$  und  $H_2O_2$ , und erhöht so die Fähigkeit der Zellen zur Oxidation (Hassan *et al.* 1988, Garle *et al.* 2000). Nakayama *et al.* (2008) zeigten, dass Phorbolmyristataacetat zur verstärkten Bildung von CYP2J2 mRNA in Makrophagen führt. CYP2J2 ist am Arachidonsäuremetabolismus beteiligt.

Als katalytisches Zentrum besitzen CYP-Enzyme ein Häm-Molekül. Damit der Mangel an Häm nicht zum limitierenden Faktor der CYP-Bildung wird, wird z. B. bei der Expression von CYP-Isoenzymen in *Escherichia coli*  $\delta$ -Aminolävulinsäure (ALA) hinzugesetzt (Akhtar *et al.* 2003, Harnastai *et al.* 2006). Die  $\delta$ -Aminolävulinsäure-Synthase katalysiert die Synthese von  $\delta$ -Aminolävulinsäure aus Glycin und Succinyl-CoA und stellt damit den ersten und Konzentrations-bestimmenden Schritt der Häm-Biosynthese dar (Cable *et al.* 2000, Ajioka *et al.* 2006). Durch den Zusatz von exogener  $\delta$ -Aminolävulinsäure wird dieser Schritt umgangen und Häm im Überschuß gebildet. Doss *et al.* (1985) stimulierten durch den Zusatz von  $\delta$ -Aminolävulinsäure zum Kulturmedium die Porphyrin-Synthese. Allerdings sankt das Ausmaß der Umwandlung in Protoporphyrin mit steigender Menge von exogener  $\delta$ -Aminolävulinsäure. Der Zusatz von  $100 \mu\text{M}$   $\delta$ -Aminolävulinsäure zum Kulturmedium steigert den Häm-Gehalt in Hepatozyten (Guzelian und Bissell 1976, Weiss *et al.* 2003). Die Menge an funktionellen CYP nimmt durch exogene  $\delta$ -Aminolävulinsäure zu, jedoch bleibt die Cytochrom  $b_5$ -Menge unverändert (Guzelian und Bissell 1976).

### 2.1.3. Arzneistoff-Metabolismus

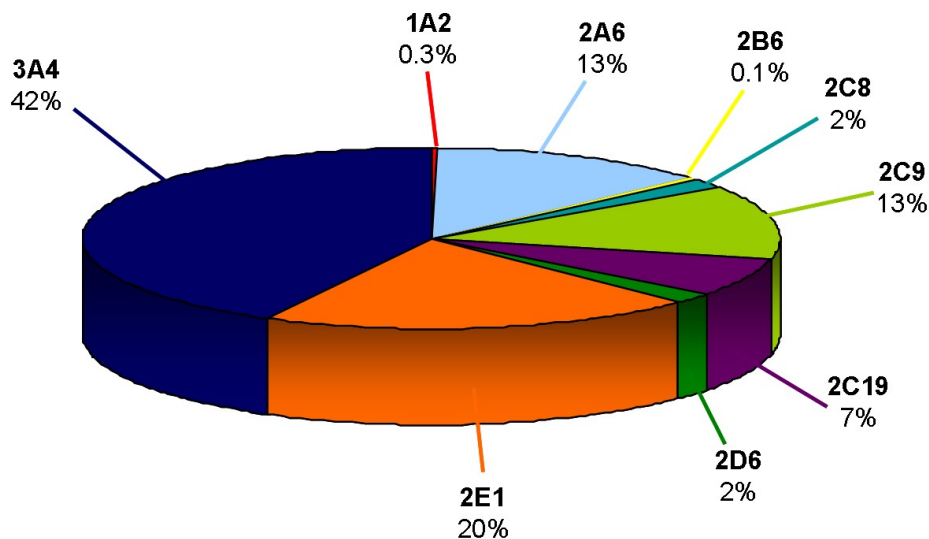
Als Ersatz für humanen Hepatozyten zur Untersuchung des Metabolismus von neuen Arzneistoffkandidaten oder für andere Metabolismusstudien sollten die aus Stamm- und Vorläuferzellen gewonnenen Hepatozyten mindestens die in Tabelle 2.3 aufgelisteten Anforderungen erfüllen.

	Fähigkeiten und Enzyme	Beispiele für Substrate und Induktoren
Biochemische Eigenschaften	Albumin-Synthese Harnstoff-Synthese Fibrinogen-Synthese	
Phase I-Enzyme	CYP1A1/2 CYP2A6 CYP2B6 CYP2C9 CYP2C19 CYP2D6 CYP3A4 und CYP2C9	Coffein Cumarin Bupropion Diclofenac <i>S</i> -Mephenytoin Dextromethorphan Verapamil
Enzyminduktion	CYP1A1/2 CYP2B und CYP2C CYP3A4	3-Methylcholanthren Phenobarbital Rifampicin
Phase II-Enzyme	UDP-Glucuronosyl- transferase (UGT) Glutathion- <i>S</i> - Transferase (GST) Sulfotransferase (SULT)	4-Methylumbelliferon und Dextromethorphan 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen und Dextromethorphan 2-Naphthol und <i>p</i> -Nitrophenol

**Tabelle 2.3.:** Kriterien zur Charakterisierung von aus Stamm- und Vorläuferzellen gewonnenen Hepatozyten (Hengstler *et al.* 2005).

Statt der aufgeführten Substrate können auch andere Markersubstrate für die Untersuchung des Enzym-vermittelten Metabolismus verwendet werden.

### 2.1.3.1. Cytochrom P450-Metabolismus

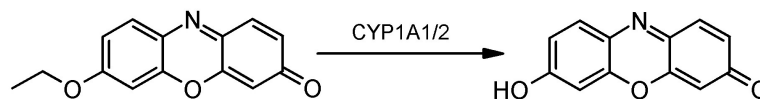


**Abbildung 2.1.:** Relative Verteilung spezifischer Cytochrom P450-Isoenzymaktivitäten in humanen Hepatozyten (Donato *et al.* 1999, Gomez-Lechon *et al.* 2004).

Zur Untersuchung des Phase I-Metabolismus durch CYP-Isoenzyme von NeoHepatozyten wurden die Aktivitäten von vier Isoenzymen sowie der CYP-abhängige regioselektive Testosteron-Metabolismus verwendet. Es wurden die Aktivitäten von CYP3A4, CYP2E1 und CYP2C9 untersucht, weil diese CYP-Isoenzyme an der Gesamtaktivität den größten Anteil haben (Abbildung 2.1). Zudem war die CYP1A1/2-Aktivität von Interesse, da über dieses Enzym Procarcinogene und Promutagene aktiviert werden.

Aufgrund der höheren Empfindlichkeit, schnelleren Analytik und der gleichzeitigen Vermessung einer großen Anzahl an Proben wurden Substrate der einzelnen Isoenzyme verwendet, die zu fluoreszierenden Metaboliten umgesetzt werden. Die Umsetzung von Substraten zu fluoreszierenden Verbindungen steht oft in guter Korrelation zu den konventionellen Reaktionen, die durch HPLC mit UV-Detektion vermessen werden (Bapiro *et al.* 2001, Ghosal *et al.* 2003, Donato *et al.* 2004). An diesen zu fluoreszierenden Metaboliten umsetzbaren Substraten ist die forschende

pharmazeutische Industrie sehr interessiert, da sich so im *High throughput-Screening* sehr viele potentielle neue Arzneistoffkandidaten frühzeitig und in kurzer Zeit hinsichtlich ihres Wechselwirkungspotentials untersuchen lassen (Bapiro *et al.* 2001, Cohen *et al.* 2003). Allerdings ist der Metabolismus der Fluoreszenz-Substrate häufig nicht eindeutig einem einzelnen Isoenzym zuzuordnen und oft sind die Reaktionen auf Inhibitoren anders, als es bei den herkömmlichen Substraten der Fall ist (Stresser *et al.* 2002, Cohen *et al.* 2003). Um allgemeine Aussagen zum Metabolismus treffen zu können, ob z. B. ein aktives Isoenzym vorhanden ist, eignen sich die fluoreszierenden Substrate. Trubetskoy *et al.* (2005a) z. B. untersuchten so die CYP3A4-Induktion und -Inhibition der DPX-2 Zelllinie, einem Abkömmling der HepG2-Zellen.

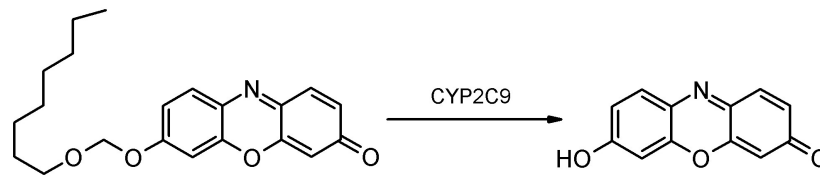


**Abbildung 2.2.:** *O*-Desethylierung des Ethoxyresorufins zu Resorufin durch Cytochrom P450-Isoenzyme 1A1 und 1A2 (Burke und Mayer 1974, Weaver *et al.* 1994).

Die Ethoxyresorufin-*O*-Desethylierung (EROD) eignet sich für die Aktivitätsbestimmung von CYP1A1 und CYP1A2 (Burke und Mayer 1974, Burke *et al.* 1994, Weaver *et al.* 1994) und wird häufig als Markerreaktion dieser Isoenzyme verwendet (Donato *et al.* 1999, Hengstler *et al.* 2000, Lu und Li 2001, Gebhardt *et al.* 2003, Hewitt *et al.* 2007a). Hierbei wird Ethoxyresorufin durch oxidative *O*-Desethylierung zu fluoreszierendem Resorufin und Ethanol umgesetzt (Abbildung 2.2). Ethoxyresorufin ist eine Testsubstanz ohne pharmakologische Bedeutung.

Die Freisetzung von Resorufin aus Octyl-*O*-methoxyresorufin (OOMR) durch enzymatische *O*-Desoethylierung und anschließende enzymatische *O*-Demethylierung kann als Markerreaktion zur Bestimmung der CYP2C9-Aktivität verwendet werden

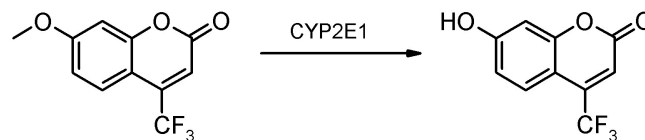
## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten



**Abbildung 2.3.:** Metabolismus des Octyl-*O*-methoxyresorufin zu Resorufin durch das Cytochrom P450-Isoenzym 2C9 (Vivid® CYP450 Screening Kit Protocol).

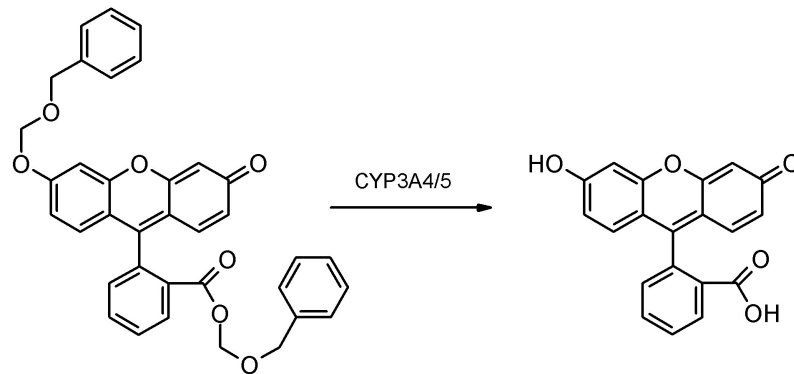
(Abbildung 2.3).

Octyl-*O*-methoxyresorufin (Vivid® CYP2C9 red) kann als CYP2C9-Substrat verwendet werden, um unter anderem Inhibitionseffekte zu untersuchen. Der CYP2C9-vermittelte Metabolismus und der Einfluß von Inhibitoren ist stark Substrat-abhängig (Marks *et al.* 2004, Hummel *et al.* 2006).



**Abbildung 2.4.:** 7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarin-*O*-demethylierung durch das Cytochrom P450-Isoenzym 2E1 (Ghosal *et al.* 2003).

Die CYP2E1-Aktivität kann über die *O*-Demethylierung von 7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarin (MFC) zu fluoreszierendem 7-Hydroxy-4-trifluoromethylcumarin (HFC) bestimmt werden (Abbildung 2.4). 7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarin wird in geringerem Ausmaß durch CYP2C9 und CYP2B6 metabolisiert (Ghosal *et al.* 2003, Donato *et al.* 2004). Deswegen findet 7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarin auch zur Bestimmung der CYP2C9-Aktivität Verwendung (Cohen *et al.* 2003, Hummel *et al.* 2006). Der Trifluoromethyl-Substituent in Position 4 verhindert weitere Phase I-Reaktionen.



**Abbildung 2.5.:** Metabolismus des Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein zu Fluorescein durch die Cytochrom P450 Isoenzyme 3A4 und 3A5 (Vivid® CYP450 Screening Kit Protocol).

Zur Bestimmung der CYP3A-Aktivität kann als Markerreaktion die enzymatische Freisetzung von Fluorescein aus Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein (DBOMF) verwendet werden (Abbildung 2.5).

Die Hemmung des Metabolismus von Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein (Vivid® CYP3A4 green) durch Ketoconazol korreliert sehr gut mit den Ergebnissen aus Hemmstudien mit konventionellen Substraten (Trubetsky *et al.* 2005b). *O*-Debenzylierungen werden oft durch CYP3A4 vermittelt, so dass diese Reaktion verwendet wird, um Substrate mit fluoreszierenden Metaboliten für CYP3A4 zu entwickeln (Stresser *et al.* 2000).

Durch den Einsatz bekannter spezifischer Inhibitoren kann überprüft werden, welches CYP-Isoenzym am Metabolismus einer Substanz beteiligt ist (Eagling *et al.* 1998, Donato *et al.* 2004, Cohen *et al.* 2003, Ghosal *et al.* 2003).

Ketoconazol ist ein selektiver und kompetitiver CYP3A4-Inhibitor (Maurice *et al.* 1992, Baldwin *et al.* 1995, Eagling *et al.* 1998) und wird häufig zur Untersuchung des CYP3A4-Metabolismus eingesetzt (Donato *et al.* 2004, Stresser *et al.* 2002, Gomez-Lechon *et al.* 2004). Zwar hemmt das Antimykotikum Ketoconazol aufgrund der Imidazolstruktur auch andere CYP-Isoenzyme, allerdings erst in deutlich höheren Konzentrationen.



## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

Zur Untersuchung, ob eine Substanz generell über CYP-Isoenzyme metabolisiert wird, kann Metyrapon verwendet werden (Kahl *et al.* 1978, Clement und Kunze 1990, Rankin *et al.* 2008). Metyrapon hemmt nicht-selektiv alle Cytochrom P450-Isoenzyme. Der Stickstoff des Pyridin-Ring geht eine koordinative Bindung mit dem Eisen als Zentralatom im Häm ein und die Carbonylfunktion des Metyrapons bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zur Hydroxylgruppe der Aminosäure Serin des Enzyms aus, dadurch entsteht ein dynamisch stabiler Enzym-Inhibitor-Komplex (Park *et al.* 2005).

Die im Phase I-Metabolismus entstandenen Metabolite können im Phase II-Metabolismus z. B. an Glucuronsäure gekoppelt werden. Durch diese Kopplung verlieren die Metabolite ihre Fluoreszenz und werden mit Fluoreszenzspektroskopie nicht mehr erfasst. Diese Phase II-Metabolisierung kann durch Salicylamid verhindert werden (Lu und Li 2001).

Eine weitere Möglichkeit die gesamte Metabolitenmenge zu bestimmen, ist der Zusatz von  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase. Die  $\beta$ -Glucuronidase spaltet die im Phase II-Metabolismus entstandenen  $\beta$ -Glucuronide und die Sulfatase die entstandenen Sulfate. Auf diese Weise lassen sich Phase II-Metabolite getrennt von Phase I-Metaboliten erfassen, so dass eine Aussage über die Phase II-Aktivität der untersuchten Zellen gemacht werden kann.

### 2.1.3.2. Induktion des Cytochrom P450-Metabolismus

In der Empfindlichkeit gegenüber Induktoren bestehen Speziesunterschiede, deswegen sind humane Hepatozyten besonders zur Untersuchung des Induktionspotential von neuen Arzneistoffkandidaten geeignet (Smith 2000). Die als Ersatz für humane Hepatozyten verwendeten aus Stamm- und Vorläuferzellen gewonnenen Hepatozyten sollten darum neben CYP-Aktivitäten ebenfalls induzierbare CYP-Isoenzyme aufweisen, und das Ansprechen auf die Induktoren sollte dem von humanen Hepatozyten entsprechen.

Zur Untersuchung des Induktionspotentials von neuen Arzneistoffen wird der Einfluss auf die Aktivität von CYP3A4 und CYP1A2 gemessen. Werden diese

beiden Isoenzyme nicht durch den neuen Arzneistoff induziert, sind *in vivo*-Studien hinsichtlich der Induktion weiterer CYP-Isoenzyme und Phase II-Enzyme nicht erforderlich (FDA-Guidance for Industry: Drug interaction studies 2006). Diese Vereinfachung ist möglich, da CYP3A4 ebenfalls durch Liganden des konstitutiven Androstan-Rezeptor und Phase II-Enzyme über Pregnan-X-Rezeptor-Liganden coinduziert werden und somit sich diese Effekte bei CYP3A4-Aktivitätsbestimmung äußern (Hewitt *et al.* 2007b). Das Induktionspotential hinsichtlich dieser beiden CYP-Isoenzyme ist von Bedeutung, da viele Arzneistoffe über CYP3A4 verstoffwechselt werden und es zu den verbreitetsten Isoenzymen in der Leber gehört. CYP1A2 dagegen macht nur einen kleinen Anteil an den Isoenzymen aus, da es aber an der Aktivierung von Procarcinogenen und Promutagenen beteiligt ist, ist eine Induktion unerwünscht (Hewitt *et al.* 2007b).

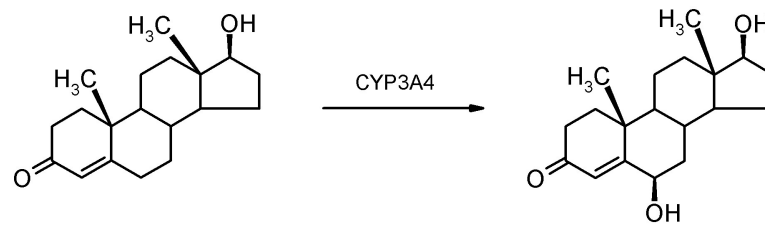
Als Induktoren wurden die von Hengstler *et al.* (2005) (Tabelle 2.3) genannten Substanzen verwendet. Diese kommen auch in präklinischen Studien als Kontrollinduktoren zum Einsatz (Hewitt *et al.* 2007b, FDA-Guidance for Industry: Drug interaction studies 2006).

3-Methylcholanthren induziert CYP1A-Isoenzyme über den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) und steigert so die Ethoxyresorufin-*O*-Desethylierungsaktivität (Burke und Mayer 1974). Rifampicin induziert über den Pregnan-X-Rezeptor (PXR) die CYP3A4-Expression. Phenobarbital kann über den konstitutiven Androstan-Rezeptors (CAR) die Expression von CYP2C-Isoenzymen steigern, aber auch über *Cross talk* CYP3A4 induzieren. Die Grundexpression und somit eine Grundaktivität von CYP-Isoenzymen ist hingegen über die transkriptionale Ebene kontrolliert.

### 2.1.3.3. Testosteron-Metabolismus

Testosteron wird durch verschiedene Enzyme regioselektiv metabolisiert (Tabelle 2.4). Der regioselektive Testosteron-Metabolismus kann daher zur Charakterisierung des Gesamtmetabolismus verwendet werden (Waxman *et al.* 1983, Wood *et al.* 1983, Donato *et al.* 1999 und 2006). Die Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung wird als Markerreaktion für den CYP3A4-vermittelten Metabolismus verwendet (Abbildung

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten



**Abbildung 2.6.:** Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung durch Cytochrom P450-Isoenzym 3A4.

2.6) (Chauret *et al.* 1999, Hewitt *et al.* 2007b). Neben 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron als Hauptmetaboliten wird Testosteron von humanen und porcinen Hepatozyten zu weiteren Metaboliten umgesetzt (Witkamp *et al.* 1995, Donato *et al.* 1999, de Kanter *et al.* 2002).

Zur Inaktivierung wird Testosteron über CYP3A4 in humanen Hepatozyten und über CYP3A29 in porcinen Hepatozyten zu 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron metabolisiert (Soucek *et al.* 2001). Die 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2 (17 $\beta$ -HSD 2) oxidiert hoch potentes Testosteron z. B. in der Leber zu weniger wirksamen Androstendion. In anderen Geweben kann Androstendion durch 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (17 $\beta$ -HSD 1 und 3) zu Testosteron reduziert werden (Vihko *et al.* 2004).

Testosteron-Metabolit	Enzym	Literatur
2 $\beta$ -Hydroxytestosteron	CYP3A4	Waxman <i>et al.</i> 1991 Yamazaki und Shimada 1997
	CYP1A1	Hengstler <i>et al.</i> 2000
6 $\beta$ -Hydroxytestosteron	CYP3A4	Waxman <i>et al.</i> 1991 Yamazaki und Shimada 1997
6 $\alpha$ -Hydroxytestosteron		
7 $\alpha$ -Hydroxytestosteron		
11 $\alpha$ -Hydroxytestosteron		
11 $\beta$ -Hydroxytestosteron	CYP3A4	Choi <i>et al.</i> 2005
15 $\alpha$ -Hydroxytestosteron		
15 $\beta$ -Hydroxytestosteron	CYP3A3/4	Waxman <i>et al.</i> 1991
	CYP3A4 und CYP2C19	Yamazaki und Shimada 1997
16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron	CYP2B?	Donato <i>et al.</i> 1999
16 $\beta$ -Hydroxytestosteron	CYP2C9 und CYP2C19	Yamazaki und Shimada 1997
	CYP2B6	Ohmori <i>et al.</i> 1993
Androstendion	CYP2C19	Yamazaki und Shimada 1997
	17 $\beta$ -Hydroxysteroid- Dehydrogenase	Farthing <i>et al.</i> 1981

**Tabelle 2.4.:** Testosteron-Metabolite in humaner Leber mit den daran beteiligten Enzymen.

In anderen Spezies wird 16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron aus Testosteron über CYP2B-Isoenzyme metabolisiert (Donato *et al.* 1999).

## 2.2. Zielsetzung

NeoHepatozyten sollten hinsichtlich ihrer Eignung als Ersatz für humane Hepatozyten in präklinischen *in vitro*-Studien von neuen Arzneistoffen untersucht werden. Neben anderen qualitativen Untersuchungen, wie PCR oder Western Blot, erlaubt die quantitative Aktivitätsbestimmung den direktesten Vergleich mit humanen Hepatozyten. Deswegen sollte die metabolische Aktivität genauer charakterisiert werden. Wichtige Kriterien sind der Metabolismus über Cytochrom P450-Isoenzyme sowie deren Induktion und Inhibition. Dazu sollten die Aktivitäten der Isoenzyme CYP1A1/2, CYP2C9, CYP2E1 und CYP3A4 von NeoHepatozyten im Vergleich zu humanen und porcinen Hepatozyten und zu klassisch aktivierten Makrophagen vermessen werden. Primäre humane Hepatozyten stellten dabei den gewünschten Standard dar. Die zusätzliche Untersuchung von besser verfügbaren, primären porcinen Hepatozyten ermöglicht gleichzeitig einen Vergleich mit humanen Hepatozyten. Um sicherzustellen, dass die gemessenen Cytochrom P450-Aktivitäten eine Eigenschaft von NeoHepatozyten und nicht eine Eigenschaft von aus Monozyten differenzierten Makrophagen ist, sollten klassisch aktivierte Makrophagen ebenfalls untersucht werden.

Desweiteren sollte der Testosteron-Metabolismus untersucht werden, da Hepatozyten charakteristische Metabolitenmuster aufweisen und um zu bestätigen, dass NeoHepatozyten Testosteron zu 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron metabolisieren (Ruhnke *et al.* 2005b).

Außerdem war von Interesse, ob NeoHepatozyten als Ersatz für humane Hepatozyten zur Untersuchung der Aktivierung und des Metabolismus *N*-hydroxylierter Prodrugs geeignet sind. Hier zu sollte der Metabolismus von Benzamidoxim zu Benzamidin untersucht werden. Schließlich sollte durch diese Studien ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Induktion des an der *N*-Reduktion beteiligten Enzyme gefunden werden.

## 2.3. Methoden

### 2.3.1. Isolierung und Kultivierung von Zellen monozytären

#### Ursprungs

##### 2.3.1.1. Material und Geräte

Ficoll stammte von der Firma Biochrom, Berlin. RPMI 1640-Kulturmedium, humanes AB Serum sowie PBS wurden von Cambrex, Karlskoga, Schweden, bezogen. *L*-Glutamin, Penicillin und Streptomycin stammten von Invitrogen, Karlsruhe. Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin-3 (IL-3) wurden über R&D-System, Wiesbaden, bezogen. Sigma-Aldrich, Steinheim, war Lieferant von Lipopolysaccharid (LPS) aus *Salmonella enterica* Serotyp minnesota, Fibroblasten-Wachstumsfaktor 4 (FGF-4), Rifampicin, Phenobarbital-Natrium, Phorbolmyristataacetat und  $\delta$ -Aminolävulinsäure.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Gewebekulturgefäßen Cell<sup>+</sup> der Firma Sarstedt, Nürnbrecht. Auch weitere, zur Zellkultur benötigte Utensilien wurden von der Firma Sarstedt bezogen.

##### 2.3.1.2. Isolierung der Monozyten

Die Monozyten wurden aus peripheren mononukleären Blutzellen isoliert. Als Ausgangsmaterial dafür dienten Bufficoats, die von der Blutbank des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein bezogen wurden. Während der Aufbereitung von gespendedem Vollblut durch die Blutbank werden durch Zentrifugation drei Fraktionen erhalten, wobei Erythrozyten die untere Schicht bilden, darüber befinden sich Leukozyten und Thrombozyten und zuoberst das zellfreie Blutplasma. Die Zwischenschicht, bestehend aus Leukozyten und Thrombozyten, wird als Bufficoat bezeichnet.

Um die Monozyten zu isolieren, wurde der Bufficoat zunächst im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. Mit dieser Bufficoat-Verdünnung wurde vorsichtig 25 ml vorgelegte Ficoll-Trennlösung in 50 ml Sarstedt-Röhrchen überschichtet und zentrifugiert (2000 U/min, 5 min, 20°C). Anschließend wurde die weiße Interphase, die die mononukleären Zellen enthält, abgenommen und mehrmals gewaschen. Vor dem letzten

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

Waschschritt wurden die Zellen im RPMI 1640 mit dem Zusatz von 0,5% humanem AB Serum, 2 mM *L*-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin resuspendiert, bevor sie in Kollagen-beschichteten Gewebekulturgefäßen ausgesät wurden. Ob die Aussaat der Zellen in Gewebekulturflaschen oder 6-Loch-Gewebekulturplatten erfolgte, richtete sich nach dem geplanten Versuch.

Nach 2-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Feuchte wurde das überstehende RPMI-basierte Medium abgenommen und mit PBS vorsichtig gewaschen, um tote und nicht adhärenente Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die so erhaltenen Monozyten, wie in Kapitel 2.3.1.3 und 2.3.1.5 beschrieben, im jeweiligen Kulturmedium weiter kultiviert.

### 2.3.1.3. Kultivierung von NeoHepatozyten

Für die Kultivierung von NeoHepatozyten wurden Monozyten als Ausgangszellen verwendet (Kapitel 2.3.1.2). Die Kultivierung erfolgte nach Ruhnke *et al.* (2005a und 2005b). Die ersten sechs Tage ab der Isolation wurden die Monozyten in einem speziellen RPMI-basierten Medium, auch als Dedifferenzierungsmedium bezeichnet, kultiviert. Eine Dedifferenzierung in programmierbare Zellen monozytären Ursprungs (PCMO) sollte erfolgen. Die Zusammensetzung des Dedifferenzierungsmediums ist in Tabelle 2.5 beschrieben. Daran schloss sich eine 10-tägige Kultur im sogenannten Differenzierungsmedium (Tabelle 2.6) an, in der die NeoHepatozyten entstanden. In Dedifferenzierungs- und Differenzierungsphase wurde alle 2 Tage das Kulturmedium gewechselt.

### 2.3.1.4. Kultivierung von Zellen monozytären Ursprungs unter verschiedenen Bedingungen

Als Ausgangszellen dienten Monozyten (Kapitel 2.3.1.2), die 6 Tage in Dedifferenzierungsmedium (Tabelle 2.5) kultiviert wurden, wobei eine Dedifferenzierung in programmierbare Zellen monozytären Ursprungs (PCMO) erfolgen sollte. Die genauen Kulturbedingungen sind in Kapitel 2.3.1.3 beschrieben. Daran schloss sich eine 48-stündige Kultur in unterschiedlichen Kulturmedien mit verschiedenen Zusätzen an. Als Grundmedium ab dem 6. Tag diente für die eine Hälfte der Zellen Williams

Substanz	Konzentration im Medium
humanes AB Serum	10%
<i>L</i> -Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 $\mu$ g/ml
M-CSF	5 ng/ml
IL-3	0,4 ng/ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	90 $\mu$ M

**Tabelle 2.5.:** Mediumzusätze zum RPMI-basierten Dedifferenzierungsmedium ohne Phenolrot für die Kultivierung der programmierbaren Zellen monozytären Ursprungs (PCMO).

Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF) und Interleukin-3 (IL-3) werden dem Basismedium zur Kultur von PCMO zugesetzt.

Substanz	Konzentration im Medium
fötales Kälberserum	10%
<i>L</i> -Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 $\mu$ g/ml
FGF-4	3 ng/ml

**Tabelle 2.6.:** Mediumzusätze zum RPMI-basierten Differenzierungsmedium ohne Phenolrot für die Kultivierung der NeoHepatozyten.

Zur Kultivierung der NeoHepatozyten wird statt humanem AB Serum fötales Kälberserum (FCS) eingesetzt. Als weitere Substanz wird nur Fibroblasten-Wachstumsfaktor 4 (FGF-4) zugesetzt.



## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

Substanz	Konzentration im Williams E Medium
humanes AB Serum	0,5%
<i>L</i> -Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 $\mu\text{g/ml}$
Glucagon	0,0014 $\mu\text{g/ml}$
Insulin	0,16 U/ml
Aminolävulinsäure	100 $\mu\text{M}$

**Tabelle 2.7.:** Mediumzusätze zum Williams E-basierten Medium ohne Phenolrot zur weiteren Kultur von Zellen monozytären Ursprungs.

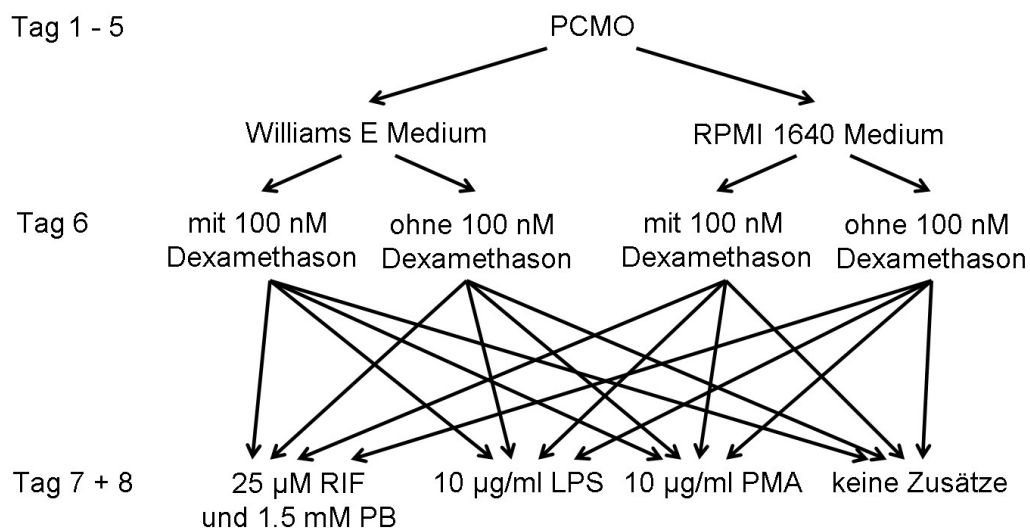
Der Hälfte des Mediums wurde 100 nM Dexamethason zugesetzt.

E Medium, wie es zur Kultur von primären Hepatozyten verwendet wird, und für die andere Hälfte RPMI-Medium, wie es als Grundlage zur Kultur von NeoHepatozyten und klassisch aktivierten Makrophagen dient. Als Ausgangssubstanz zur Häm-Synthese wurde dem Williams E Medium  $\delta$ -Aminolävulinsäure zugesetzt. Die eine Hälfte der Zellen wurde im jeweiligen Medium mit 100 nM Dexamethason kultiviert, die andere Hälfte ohne Dexamethason-Zusatz. Ab dem 7. Tag wurden je vier Kulturansätze jedes Mediums für 48 Stunden mit den Zusätzen 25  $\mu\text{M}$  Rifampicin (RIF) und 1,5 mM Phenobarbital (PB) als Cytochrom P450-Induktoren, 10  $\mu\text{g/ml}$  Lipopolysaccharid (LPS) wie zur Aktivierung von klassisch aktivierten Makrophagen und 10  $\mu\text{g/ml}$  Phorbolmyristataacetat (PMA) ebenfalls zur Aktivierung von Makrophagen behandelt. Der vierte Kulturansatz wurde als Kontrolle ohne Zusätze kultiviert (Abbildung 2.7). Die Zusammensetzung des auf Williams E Medium-basierenden Grundmediums ist in Tabelle 2.7 aufgeführt. Für das auf RPMI-basierende Grundmedium sind die Zusätze in Tabelle 2.8 zu finden. Das Kulturmedium wurde jeweils nach 24 Stunden gewechselt.

Substanz	Konzentration im RPMI-Medium
humanes AB Serum	0,5%
<i>L</i> -Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

**Tabelle 2.8.:** Mediumzusätze zum RPMI-basierten Medium ohne Phenolrot zur weiteren Kultur von Zellen monozytären Ursprungs.

Der Hälfte des Mediums wurde 100 nM Dexamethason zugesetzt.



**Abbildung 2.7.:** Kultivierung von Zellen monozytären Ursprungs unter verschiedenen Bedingungen.

Ab dem 7. Tag wurden für 48 Stunden den Kulturmedien entweder Rifampicin (RIF) und Phenobarbital (PB), Lipopolysaccharid (LPS), Phorbolmyristataacetat (PMA) oder keine weiteren Zusatz als Kontrolle zugesetzt.

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

Substanz	Konzentration im Medium
humanes AB Serum	0,5%
<i>L</i> -Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 $\mu$ g/ml
M-CSF	5 ng/ml

**Tabelle 2.9.:** Mediumzusätze zum RPMI-Medium ohne Phenolrot für die Kultivierung klassisch aktivierter Makrophagen.

### 2.3.1.5. Kultivierung von klassisch aktivierten Makrophagen

Die Monozyten wurden, wie in Kapitel 2.3.1.2 beschrieben, isoliert und in einem RPMI 1640-basierten Medium ohne Phenolrot kultiviert. Die Zusammensetzung des Makrophagen-Kulturmediums ist in Tabelle 2.9 beschrieben. Das RPMI-basierte Medium, in dem die mononukleären Zellen die ersten 120 Minuten kultiviert wurden, ist bis auf den Zusatz von Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF) wie das Makrophagen-Kulturmedium zusammengesetzt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 Stunden.

Am fünften Tag der Kultur wurden dem Medium 25 mg/ml Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und 10 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) zugesetzt, um die Makrophagen auf klassische Weise zu aktivieren (Martinez *et al.* 2006). Die so erhaltenen klassisch aktivierten Makrophagen wurden am sechsten Tag für die Versuche verwendet.

## 2.3.2. Isolierung und Kultivierung primärer Hepatozyten

### 2.3.2.1. Material und Geräte

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei der Firma Merck, Darmstadt, in höchster verfügbarer Reinheit erworben. HEPES Pufferan® zur Gewebezucht stammte von der Firma Carl Roth, Karlsruhe. Desoxyribonuklease I aus bovinem Pankreas (DNase), Trypanblau, Prednisolon, Glucagon und Insulin aus bovinem Pankreas wurden über Sigma-Aldrich, Steinheim, bezogen. Die Firma Biochrom, Berlin, war der Lieferant der Kollagenase II, des William E Mediums, als auch von *L*-Glutamin, Penicillin, Streptomycin und fötalem Kälberserum.

Der pH-Wert der Isolierungspuffer wurde mit dem pH-Messgerät inoLab pH level 1 und der pH-Elektrode SenTix 21, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, eingestellt. Die Glasgeräte zur Perfusion der humanen und porcinen Lebern wurden von der Firma Eydam, Kiel, hergestellt. Die isolierten Hepatozyten wurden in Neubauer improved von LaborOptik, Friedrichsdorf, unter dem Mikroskop CK2 der Firma Olympus, Hamburg, gezählt.

Die Aussaat der Zellen und der Kulturmediumwechsel erfolgte unter der sterilen Werkbank LaminAir HB 2448 der Firma Heraeus, Osterode am Harz. Die Hepatozyten wurden auf 6-Loch-Gewebekulturplatten Cell<sup>+</sup> der Firma Sarstedt, Nümbrecht, kultiviert. Von Sarstedt stammten auch weitere zur Zellkultur benötigte Utensilien.

### 2.3.2.2. Herkunft des Lebergewebes

Humanes Lebergewebe wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Fred Fändrich, Dr. Felix Braun und Dr. Thomas Birkner von der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel zur Verfügung gestellt. Das Lebergewebe stammte von Patienten, Männern und Frauen, im Alter zwischen 11 und 72 Jahren, die sich einer partiellen Hepatektomie aufgrund sekundärer Lebertumore unterzogen haben. Bei Leberkarzinomen, wie z. B. hepatozellulären Karzinomen, Lebermetastasen und Gallengangs-Karzinomen, wird der

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

Tumorherd mit einer Sicherheitszone großzügig herausgeschnitten. Ein Teil des zur pathologischen Untersuchung weitergegebenen Gewebes wurde mit Einverständnis der Patienten für die Isolierung von Hepatozyten verwendet. Das Vorgehen wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt.

Zur Isolierung von Schweinehepatozyten wurde Leber von frisch geschlachteten deutschen Kreuzungsschweinen aus dem örtlichen Schlachthof, Bordesholm, verwendet. Nach Tötung und Ausbluten der Schweine durch Öffnen der Halsschlagader und Reinigung wurde die Leber entnommen.

### 2.3.2.3. Isolierung primärer Hepatozyten

Die Isolierung erfolgte in einer Zwei-Stufen-Perfusion nach der von Christiansen (2000) und Fröhlich (2004) modifizierten Methode, die in Anlehnung an Reese und Byard (1981), Bader *et al.* (1992) sowie Bader *et al.* (2000) entwickelt wurde. Als Transport- und Präperfusionspuffer diente ein Calcium- und Magnesium-freier Krebs-Ringer-Puffer, der zusätzlich als Chelatbildner EDTA enthielt (Tabelle 2.10). Das humane Lebergewebe wurde, wenn möglich, in diesem Präperfusionspuffer transportiert. Der Zeitraum zwischen Entnahme und Beginn der Perfusion wurde möglichst kurz gehalten.

Die Schweineleber wurde direkt nach der Entnahme in eisgekühlten Präperfusionspuffer überführt und transportiert. Zwischen Tötung des Schweins und Beginn der Perfusion lagen maximal 45 Minuten.

Das humane Lebergewebe wurde so präpariert, dass eine gleichmäßige Schnittkante mit deutlich sichtbaren Gefäßöffnungen vorlag. Von der Schweineleber wurde ein unversehrtes Endstück eines Leberlappens abgetrennt, so dass eine glatte Schnittkante mit gut verwendbaren Gefäßöffnungen entstand. Da im weiteren Vorgehen zwischen Isolierung der humanen und porcinen Hepatozyten kein Unterschied bestand, wird im Folgenden der Begriff Leberstück für beide Spezies verwendet.

Vor Beginn der Perfusion wurde das Leberstück in die obere Schale der Isolierungsapparatur, wie von Christiansen (2000) in Anlehnung an Reese und Byard (1981) entwickelt, überführt und bis zu 3 Knopfkanülen in den Gefäßöffnungen platziert.

Im ersten Schritt der Perfusion wurde mit auf 37°C temperierten Präperfusionspuffer pH 7,4 bei einer Flussrate von 12-15 ml/min/Kanüle das Leberstück bis zu einer möglichst vollständigen Entblutung gespült. Anschließend erfolgte eine etwa 10-minütige Spülung durch Calcium-haltigen Perfusionspuffer ohne weitere Zusätze (Tabelle 2.10). Dann wurde auf Perfusionspuffer mit Kollagenase (190 mg Kollagenase, etwa 45.000 U, in 150 ml Perfusionspuffer gelöst) gewechselt und auf ein rezirkulierendes System umgestellt. Nachdem sich deutlich die Wirkung der Calcium-abhängigen Kollagenase durch weiteres Zusammenfallen des Leberstücks und durch Auflösung des inneren Bindegewebes zeigte, meist nach 15 Minuten, wurde das Leberstück in eine Schale mit DNase-haltigem Perfusionspuffer (8 mg Desoxyribonuklease (DNase) in 100 ml Perfusionspuffer gelöst) überführt, um dort die Zellen aus dem Leberstück bzw. aus der Leberkapsel herauszulösen. Der Zusatz von DNase erfolgte in Anlehnung an Bayliss und Somers (2005), um das Verklumpen der isolierten Hepatozyten zu verringern. Nach der Filtration der groben Zellsuspension durch zwei Nylongaze (150  $\mu\text{m}$  und 80  $\mu\text{m}$ ) folgten drei Zentrifugationsgänge zur Abtrennung von toten Hepatozyten (50 g, 4 min, 15°C). Für den zweiten Waschschriff wurde das Hepatozytenpellet in Perfusionspuffer ohne Zusätze aufgenommen, wohingegen der dritte Waschschriff in Williams E Medium mit Zusätzen erfolgte. Die Zusammensetzung des Williams E Mediums mit Zusätzen wird in Kapitel 2.3.2.5 beschrieben. Im letzten Schriff wurde das Zellpellet in 20 ml Williams E Medium mit Zusätzen suspendiert, um die Ausbeute und Viabilität wie folgt zu bestimmen.

### 2.3.2.4. Bestimmung der Ausbeute und Viabilität

Zur Bestimmung der Ausbeute und der Viabilität wurden 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit dem gleichen Volumen Trypanblaulösung (0,4%) versetzt. Trypanblau wird von lebenden Hepatozyten mit intakter Zellmembran ausgeschlossen, so dass sich nur tote Zellen oder Zellen mit kaputter Zellmembran blau anfärben lassen (Lindl und Bauer 1994). Nach einer kurzen Einwirkzeit erfolgte die Zählung der ungefärbten und gefärbten Zellen in der Neubauerkammer. Auf diese Art und Weise wurde die Ausbeute und Viabilität auch von Christiansen (2000) und Fröhlich (2004) bestimmt.

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

Substanz	Präperfusionspuffer		Perfusionspuffer	
	g/l	mmol/l	g/l	mmol/l
EDTA	0,29	1	-	-
HEPES	4,77	20	4,77	20
KCl	0,42	5,6	0,42	5,6
NaCl	9,0	154	9,00	154
NaHCO <sub>3</sub>	2,1	25	2,1	25
Glucose	0,99	5	0,99	5
CaCl <sub>2</sub>	-	-	0,59	4

**Tabelle 2.10.:** Zusammensetzung der verwendeten Isolierungspuffer.

Für die Herstellung der Puffer wurden die Substanzen, bis auf Glucose und Calciumchlorid, in bidestilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit 1 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Anschließend wurde der Puffer durch einen Membranfilter (Porendurchmesser 0,45  $\mu\text{m}$ ) filtriert und im Kühlschrank gelagert. Unmittelbar vor Verwendung wurden Glucose und Calciumchlorid zugesetzt.

### 2.3.2.5. Kultivierung primärer Hepatozyten

Die Hepatozytensuspension wurde mit Williams E Medium mit Zusätzen auf eine Zellzahl von  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro ml Medium eingestellt. Die Zusätze zum Williams E Medium sind in Tabelle 2.11 aufgeführt. Jeweils 2 ml der Hepatozytensuspension wurden auf Kollagen-beschichtete 6-Loch-Gewebekulturplatten ( $\varnothing = 3,49$  cm) pipettiert ( $3 \times 10^6$  Zellen pro Loch). Nach 90-minütiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Feuchte wurde das überstehende Kulturmedium abgenommen, um tote und nicht adhärente Zellen zu entfernen, und durch 2 ml frisches Kulturmedium ersetzt. Alle 24 Stunden wurde das Kulturmedium gewechselt. Die Kultivierung erfolgte für bis zu vier Tagen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Feuchte.

Substanz	Konzentration im Medium
Glucagon	0,0014 $\mu\text{g/ml}$
Prednisolon	9,6 $\mu\text{g/ml}$
Insulin	0,16 U/ml
<i>L</i> -Glutamin	2 mM
Penicillin	150 U/ml
Streptomycin	150 $\mu\text{g/ml}$
Fötale Kälberserum	10%

**Tabelle 2.11.:** Mediumzusätze zum Williams E Medium für die Kultivierung primärer Hepatozyten.



### 2.3.3. Cytochrom P450-Metabolismus

#### 2.3.3.1. Material und Geräte

PBS stammte von der Firma Cambrex, Karlskoga, Schweden. Der Protein-gehalt wurde mit dem BCA-Protein-Assay-Reagent von Pierce, Bonn, be-  
stimmt. Ethoxyresorufin, Resorufin-Natrium, Metyrapon (2-Methyl-1,2-di-3-pyridyl-  
1-propanon), Ketoconazol und  $\beta$ -Glucuronidase Typ *Helix pomatia*-2 wurden von  
Sigma-Aldrich, Steinheim, bezogen. Octyl-*O*-methoxyresorufin (OOMR, Vivid®  
CYP2C9 red) und Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein (DBOMF, Vivid® CYP3A4  
green) stammten von Invitrogen, Karlsruhe. Fluka, Buchs, Schweiz, war der Lie-  
ferant von MgCl<sub>2</sub>-Hexahydrat, 7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarin, 7-Hydroxy-4-  
trifluoromethylcumarin und Salicylamid. NADPH und NADH stammten von Merck,  
Darmstadt. Methanol und Acetonitril in HPLC-Qualität wurden von Mallinckrodt  
Baker B.V., Deventer, Holland bezogen.

Von der Firma Sarstedt, Nürmbrecht, wurden zur Zellkultur und Inkubation benöti-  
gte Utensilien verwendet. Zum Homogenisieren wurde ein Ultraschallhomogenisator  
Sonoplus HD 2070 von Bandelin Electronic GmbH, Berlin, verwendet. Die Multiti-  
terplatten (96 Loch) stammten von Greiner Bio-One, Frickenhausen. Als Fluorimeter  
wurde der Infinite 200 der Firma Tecan, Crailsheim, verwendet. Zum Einstellen der  
pH-Werte diente das pH-Messgerät inoLab pH level 1 mit der pH-Elektrode Sen-  
Tix21 von Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim. Die Suspen-  
dierung der Inkubationsansätze erfolgte mit einem Vibrationsmischer IKA Vibrax  
VXR, Jahnke und Kunkel, Staufen. Inkubationen wurden teilweise im Schüttel-  
wasserbad GFL 1083 der Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, durchgeführt.  
Desweiteren kamen eine Mikroliterzentrifuge von Hettich, Tuttlingen, und ein Ultra-  
schallbad Sonorex Super RK 106, Bandelin Electronic GmbH, Berlin, zum Einsatz.  
HPLC-Fließmittel wurden mit einer Sartorius Vakuumfiltrationseinheit durch einen  
Membranfilter (0,45  $\mu$ m), Sartorius, Göttingen, filtriert.

### 2.3.3.2. Ernten und Homogenisierung der verwendeten Zellen

Um die Inkubationen mit immer der gleichen Menge Protein und um mehrere Inkubationen mit Zellen von den jeweiligen Spendern durchführen zu können, wurden Zellhomogenisate eingesetzt. Ein weiterer Vorteil ist, dass sich Zellhomogenisate einfrieren lassen und so bei Bedarf für die jeweiligen Inkubationen zur Verfügung stehen. Hierbei handelt es sich um eine übliche Methode, bei der den Zellhomogenisaten noch NADPH zugesetzt wird (Hengstler *et al.* 2000).

Am letzten Tag der Kultur von NeoHepatozyten (Kapitel 2.3.1.3), klassisch aktivierten Makrophagen (Kapitel 2.3.1.5) und primären Hepatozyten (Kapitel 2.3.2.5) wurden die Zellen geerntet. Das Ernten und die Homogenisierung erfolgten nach einer persönlichen Vorschrift von Prof. Dr. Jan Hengstler (Dortmund).

Das Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde PBS auf die Zellen gegeben, diese mit einem Zellschaber geerntet und das Gewebekulturgefäß mit PBS gespült. Es folgte eine Zentrifugation bei 400 *g* für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen in PBS resuspendiert und die Homogenisierung mittels Ultraschall (2 x 10 Stöße bei 50% Leistung) durchgeführt. Bis zum späteren Gebrauch wurden die Zellhomogenisate bei -80°C gelagert. Außerdem wurde der Proteingehalt des erhaltenen Zellhomogenisates mit den BCA-Protein-Assay-Reagenzien nach Smith *et al.* (1985) bestimmt.

### 2.3.3.3. CYP1A1/2-Aktivität

Zur Aktivitätsbestimmung von CYP1A1 und CYP1A2 wurde die Ethoxyresorufin-*O*-Desethylierung (EROD) verwendet. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze orientierte sich an Zebothsen (2005), Vivid® CYP450 Screening Kit Protocol und Christiansen (2000). Die Inkubationen wurden in Mikrotiterplatten (96 Loch) in 100  $\mu$ l PBS pH 7,4 bei einer Substratkonzentration von 10  $\mu$ M Ethoxyresorufin durchgeführt. Das Ethoxyresorufin wurde in Ethanol gelöst und mit PBS auf die zu verwendende Konzentration verdünnt. Die Zellhomogenisate wurden in einer Konzentration von 250  $\mu$ g/ml zugesetzt, wobei unter Zellhomogenisat jeweils das Homogenisat von klassisch aktivierten Makrophagen, NeoHepatozyten und jeweils

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

Substanz	Homogenisat	ohne Homogenisat
	ohne/mit Inhibitor	ohne/mit Inhibitor
PBS	ad 100 $\mu$ l	ad 100 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (100 mM)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Homogenisat	25 $\mu$ g	-
Metyrapon (10 mM)	- / 10 $\mu$ l	- / 10 $\mu$ l
Ethoxyresorufin (100 $\mu$ M)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
NADPH (10 mM)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

**Tabelle 2.12.:** Inkubationsansätze zur CYP1A1/2-Aktivitätsbestimmung.

Jeder Ansatz wurde jeweils dreimal hergestellt und vermessen.

primären porcinen bzw. humanen Hepatozyten zu verstehen ist. Die Ansätze enthielten außerdem 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Um zu überprüfen, ob die Ethoxyresorufin-*O*-Desethylierung CYP-vermittelt war, wurde drei zusätzlichen Ansätzen der unspezifische CYP-Inhibitor Metyrapon in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt. Metyrapon wurde in Methanol gelöst und mit PBS bis zur gewünschten Konzentration verdünnt. Es folgte eine dreiminütige Vorinkubation mit dem Inhibitor, bevor die Reaktion mit dem Substrat Ethoxyresorufin (10  $\mu$ M) und NADPH (1 mM) gestartet wurde. Als weitere Kontrolle wurden jeweils drei Ansätze ohne Zellhomogenisat mitvermessen.

Jeder der in Tabelle 2.12 dargestellten Ansätze wurde jeweils dreimal hergestellt und vermessen. Die Inkubation bei 37°C erfolgte im Fluorimeter. Die ansteigende Bildung des Metaboliten Resorufin wurde bei der Excitationswellenlänge von 550 nm und der Emissionswellenlänge 600 nm über einen Zeitraum von 60 Minuten vermessen. Die Kalibrierung von 3,9 nM bis 1000 nM Resorufin wurde bei jeder Multititerplatte erneut hergestellt und vermessen. Resorufin wurde in Ethanol gelöst und mit PBS auf die verwendeten Konzentrationen verdünnt. Nach 60-minütiger Inkubation wurde  $\beta$ -Glucuronidase mit Sulfatase-Aktivität zu den Inkubationsansätzen und den Kalibrieransätzen zugesetzt und nach 2 Stunden erneut vermessen.

Substanz	Homogenisat	ohne Homogenisat
	ohne/mit Inhibitor	ohne/mit Inhibitor
PBS	ad 100 $\mu$ l	ad 100 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (100 mM)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Homogenisat	25 $\mu$ g	-
Metyrapon (10 mM)	- / 10 $\mu$ l	- / 10 $\mu$ l
OOMR (20 $\mu$ M)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
NADPH (10 mM)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

**Tabelle 2.13.:** Inkubationsansätze zur CYP2C9-Aktivitätsbestimmung.

Jeder Ansatz wurde jeweils dreimal hergestellt und vermessen.

#### 2.3.3.4. CYP2C9-Aktivität

Als Substrat wurde Octyl-*O*-methoxyresorufin (Vivid® CYP2C9 red) verwendet. Durch CYP2C9 wird Octyl-*O*-methoxyresorufin (OOMR) zu Resorufin metabolisiert (Invitrogen-Vivid® CYP450 Screening Kit Protocol). OOMR wurde in Acetonitril gelöst und mit PBS auf die zuverwendende Konzentration verdünnt. Die Inkubationen und die Erstellung der Kalibriergeraden erfolgten wie in Kapitel 2.3.3.3 für die CYP1A1/2-Aktivitätsbestimmung beschrieben. Als Substrat wurde allerdings 2  $\mu$ M OOMR verwendet, wie im Vivid® CYP450 Screening Kit Protokoll beschrieben. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze ist in Tabelle 2.13 dargestellt.

#### 2.3.3.5. CYP2E1-Aktivität

Als Substrat wurde 7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarin (MFC) verwendet, welches durch CYP2E1 zu 7-Hydroxy-4-trifluoromethylcumarin (HFC) metabolisiert wird (Ghosal *et al.* 2003).

**2.3.3.5.1. Bestimmung des Metaboliten durch Fluorimetrie** Die Inkubationsansätze der 7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarin-*O*-methoxylierung orientierten sich an den Kapitel 2.3.3.3 und 2.3.3.4 für die CYP1A1/2- und CYP2C9-Aktivitätsbestimmungen und setzten sich wie in Tabelle 2.14 beschrieben zusammen. MFC wurde in Ethanol gelöst und mit PBS auf die verwendete Konzentration

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

verdünnt. Salicylamid wurde in Methanol gelöst, mit PBS verdünnt und in einer Konzentration von 3 mM zugesetzt, um die Phase II-Metabolisierung zu verhindern (Fröhlich 2004, Lu und Li 2001). Metyrapon wurde in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt, um zu überprüfen, ob die Umsetzung von MFC CYP-vermittelt ist. Nach dem Zusatz der Inhibitoren wurde 3 Minuten vorinkubiert, bevor die Reaktion mit dem Substrat MFC (1 mM) und NADPH (1 mM) gestartet wurde. Die Inkubation bei 37°C erfolgte im Fluorimeter. Die ansteigende Bildung des Metaboliten HFC wurde bei der Excitationswellenlänge von 400 nm und der Emissionswellenlänge 502 nm über einen Zeitraum 90 Minuten vermessen. Danach wurden 20 µl PBS mit 1,6 mM Pyruvat und 20 U/ml Lactatdehydrogenase zur NADPH-Zerstörung sowohl zu den Proben als auch zu den Kalibrierungslösungen hinzugegeben. Die Kalibrierung von 1,95 nM bis 1000 nM HFC wurde bei jeder Multititerplatte erneut hergestellt und vermessen. HFC wurde in Methanol gelöst und mit PBS auf die verwendeten Konzentrationen verdünnt.

**2.3.3.5.2. Bestimmung des Metaboliten durch HPLC** Da NADPH die direkte fluorimetrische Quantifizierung in Multititerplatten (96 Loch) bei sehr geringen Aktivitäten stört, wurde der Metabolit HFC durch HPLC in Anlehnung an die Methode von Morse und Lu (1998) analysiert. Die Inkubationsansätze setzten sich, wie in Tabelle 2.14 für die Inkubation im Fluorimeter beschrieben, zusammen. Das Vorgehen entsprach der Vermessung durch Fluorimetrie (Kapitel 2.3.3.5.1). Allerdings erfolgte die Inkubation über 90 Minuten bei 37°C in Schüttelwasserbad. Die Analytik erfolgte unter den nachfolgend angegebenen Bedingungen. Dafür wurden die Inkubationsansätze mit 100 µl Methanol abgestoppt, geschüttelt, das gefällte Protein bei 10.000 U/min für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand in HPLC-Probenfläschchen überführt.

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch einen Sartorius-Membranfilter mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm filtriert und nach Zugabe von Methanol 15 Minuten lang im Ultraschallbad entgast. Zur Quantifizierung des gebildeten HFCs wurde eine 8-Punkt-Kalibrierung erstellt, die den Konzentrationsbereich

Substanz	Homogenisat	ohne Homogenisat
	ohne/mit Inhibitor	ohne/mit Inhibitor
PBS	ad 100 $\mu$ l	ad 100 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (100 mM)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Homogenisat	25 $\mu$ g	-
Metyrapon (10 mM)	- / 10 $\mu$ l	- / 10 $\mu$ l
Salicylamid (30 mM)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
MFC (10 mM)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
NADPH (10 mM)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

**Tabelle 2.14.:** Inkubationsansätze zur CYP2E1-Aktivitätsbestimmung.

Jeder Ansatz wurde jeweils dreimal hergestellt und vermessen.

von 2 nM bis 25 nM HFC abdeckte. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden die für die Kalibrierung angegebenen Konzentrationen des Metaboliten in 10  $\mu$ M MFC-haltigem PBS hergestellt. Diese Ansätze enthielten zusätzlich 25  $\mu$ g Hitze-denaturiertes Protein, MgCl<sub>2</sub>, Salicylamid und NADPH. Die weitere Aufarbeitung der Ansätze erfolgte wie oben beschrieben.

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

HPLC Pumpe	Waters 600, Milford, CT, USA	
Detektor	Waters 474 Scanning Fluorescence, Milford, CT, USA	
Autosampler	Waters 717 plus, Milford, CT, USA	
Integrator	EZ Chrom™ Chromatography Data System, Version 6.7 und EZ Chrom™ SS42 Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA	
Stationäre Phase	Nova-Pak C18 150 × 4 mm (4 μm) VDSoptilab Chromatographie Technik GmbH, Montabaur Vorsäule: C18 4 × 3 mm, Phenomenex, Aschaffenburg	
Mobile Phase	60% 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,5 40% Methanol (v/v)	
Flussrate	1,0 ml/min	
Laufzeit	15 min	
Injektionsvolumen	30 μl	
Detektion	Fluorimetrie: Ex: λ = 410 nm, Em: λ = 510 nm	
Retentionszeiten	HFC	7,4 min ± 0,2 min
	MFC	nicht detektierbar, da MFC keine Fluoreszenz aufweist

### 2.3.3.6. CYP3A4/5-Aktivität

Als Substrat wurde Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein (Vivid® CYP3A4 green) verwendet. Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein (DBOMF) wird durch CYP3A4 und CYP3A5 zu Fluorescein metabolisiert (Invitrogen-Vivid® CYP450 Screening Kit Protocol). Die Inkubationen erfolgten in Anlehnung an die CYP1A1/2-Aktivitätsbestimmung wie in Kapitel 2.3.3.3 beschrieben. Als Substrat wurden 2 μM DBOMF verwendet, wie in Vivid® CYP450 Screening Kit Protocol angegeben. DBOMF wurde in Acetonitril gelöst und mit PBS auf die verwendete Konzentration verdünnt. Als unspezifischer CYP-Inhibitor wurde Metyrapon (1 mM) zugesetzt. Um zu überprüfen, ob der DBOMF-Metabolismus CYP3A vermittelt ist, wurde zusätzlich der selektive CYP3A-Inhibitor Ketoconazol eingesetzt. Ketoconazol wurde in

Substanz	Homogenisat	ohne Homogenisat
	ohne/mit Inhibitor	ohne/mit Inhibitor
PBS	ad 100 $\mu$ l	ad 100 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (100 mM)	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
Homogenisat	25 $\mu$ g	-
Metyrapon (10 mM) bzw. Ketoconazol (200 $\mu$ M)	- / 10 $\mu$ l	- / 10 $\mu$ l
Salicylamid (30 mM)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
DBOMF (20 $\mu$ M)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
NADPH (10 mM)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

**Tabelle 2.15.:** Inkubationsansätze zur CYP3A4/5-Aktivitätsbestimmung.

Jeder Ansatz wurde jeweils dreimal hergestellt und vermessen.

Methanol gelöst, mit PBS verdünnt und in einer Konzentration von 20  $\mu$ M verwendet. Um die Phase II-Metabolisierung zu verhindern, wird Salicylamid in einer Konzentration von 3 mM zugesetzt. Als weitere Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne Zellhomogenisat vermessen. Es folgte eine dreiminütige Vorinkubation mit den Inhibitoren, bevor die Reaktion mit dem Substrat DBOMF (2  $\mu$ M) und NADPH (1 mM) gestartet wurde. In einem Versuch wurde statt 1 mM NADPH 1mM NADH zugesetzt.

Jeder, der in Tabelle 2.15 dargestellten, Ansätze wurde jeweils dreimal hergestellt und vermessen. Die Inkubation bei 37°C erfolgte im Fluorimeter. Die ansteigende Bildung des Metaboliten Fluorescein wurde bei der Excitationswellenlänge von 485 nm und der Emissionswellenlänge 530 nm über einen Zeitraum von 30 Minuten vermessen. Die Kalibrierung von 1,95 nM bis 1000 nM wurde bei jeder Multititerplatte erneut hergestellt und vermessen.



## 2.3.4. Induktion des Cytochrom P450-Metabolismus

### 2.3.4.1. Material und Geräte

3-Methylcholanthren, Phenobarbital-Natrium und Rifampicin stammten von Sigma-Aldrich, Steinheim. DMSO und Acetonitril wurden von Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland, bezogen.

Die weiteren verwendeten Materialien und Geräte wurden bereits in den Kapiteln 2.3.2.1, 2.3.1.1 und 2.3.3.1 beschrieben.

### 2.3.4.2. Induktion von CYP1A1/2

Das Ausplattieren der jeweiligen Zellen, der erste Mediumwechsel und die Kultivierung erfolgte wie in den Kapiteln zuvor erläutert. Für NeoHepatozyten befindet sich die Beschreibung in Kapitel 2.3.1.3, für klassisch aktivierte Makrophagen in Kapitel 2.3.1.5 und für primäre Hepatozyten in Kapitel 2.3.2.5. Die Induktion der NeoHepatozyten begann am achten Tag der Kultur im Differenzierungsmedium, die Induktion der klassisch aktivierten Makrophagen am sechsten Tag der Kultur und die Induktion der primären Hepatozyten nach 24 Stunden in Kultur.

Als Kulturmedium während der Induktion wurde das jeweilige Grundmedium verwendet, dem der Induktor 3-Methylcholanthren oder Acetonitril als Lösungsmittelkontrolle frisch zugesetzt wurden. Die Konzentration von in Acetonitril gelösten 3-Methylcholanthren im Kulturmedium betrug  $2,5 \mu\text{M}$ . Als Kontrolle dienten Zellen mit den reinen jeweiligen Grundmedien und Zellen, deren Grundmedien das Lösungsmittel Acetonitril in einer Konzentration von 0,66% enthielt, entsprechend dem Acetonitril-Anteil im Induktionsmedium. Zu Beginn der Induktion wurde das Kulturmedium abgenommen und durch das Induktionsmedium, Lösungsmittelmedium oder Grundmedium ersetzt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen von altem Medium befreit und mit dem jeweilig neuem Medium überschichtet. Die Induktion erfolgte für 48 Stunden im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  und 95% relativer Luftfeuchte.

### 2.3.4.3. Induktion von CYP3A4/5

Das Ausplattieren der jeweiligen Zellen, der erste Mediumwechsel und die Kultivierung erfolgte wie in den Kapiteln zuvor beschrieben. Für NeoHepatozyten befindet sich die Beschreibung in Kapitel 2.3.1.3, für klassisch aktivierte Makrophagen in Kapitel 2.3.1.5 und für primäre Hepatozyten in Kapitel 2.3.2.5. Die Induktion der NeoHepatozyten begann am achten Tag der Kultur im Differenzierungsmedium, die Induktion der klassisch aktivierten Makrophagen am sechsten Tag der Kultur und die Induktion der primären Hepatozyten nach 24 Stunden in Kultur.

Zu Beginn der Induktion wurde das Kulturmedium abgenommen und durch das jeweilige Grundmedium ersetzt, dem die Induktoren zugesetzt wurden. Als Induktoren wurden Rifampicin und Phenobarbital verwendet. In einem Ansatz erfolgte die Induktion durch Rifampicin, in DMSO gelöst, in einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  und in einem weiteren Ansatz durch 25  $\mu\text{M}$  Rifampicin und 1,5 mM Phenobarbital-Natrium, in *Aqua bidest.* gelöst. Als Kontrolle dienten Zellen mit den reinen jeweiligen Grundmedien sowie Zellen, deren Medien das Lösungsmittel DMSO in einer Konzentration von 0,1% zugesetzt wurde, entsprechend dem DMSO-Anteil in den Induktionsmedium. Nach 24 Stunden wurden die Zellen von altem Medium befreit und dem jeweilig neuem überschichtet. Die Induktion erfolgte für 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchte.

### 2.3.4.4. Ernten und Homogenisierung der verwendeten Zellen

Die Zellen wurden nach 48-stündiger Induktion geerntet und homogenisiert wie in Kapitel 2.3.3.2 beschrieben.

### 2.3.4.5. CYP1A1/2-Aktivität der induzierten Zellen

Die CYP1A1/2-Aktivitätsbestimmung erfolgte wie in Kapitel 2.3.3.3 beschrieben. Für die Inkubation wurde das Homogenisat der mit 3-Methylcholanthren induzierten Zellen, der Lösungsmittelkontrolle und der Mediumkontrolle der jeweiligen Zellart verwendet.

#### **2.3.4.6. CYP3A4/5-Aktivität der induzierten Zellen**

Die CYP3A4/5-Aktivitätsbestimmung erfolgte wie in Kapitel 2.3.3.6 beschrieben. Für die Inkubation wurde das Homogenisat der mit Rifampicin bzw. mit Rifampicin und Phenobarbital induzierten Zellen, der Lösungsmittelkontrolle und der Mediumkontrolle der jeweiligen Zellart verwendet.

### **2.3.5. Testosteron-Metabolismus**

#### **2.3.5.1. Material und Geräte**

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei der Firma Merck, Darmstadt, in höchster verfügbarer Reinheit erworben. Krebs-Henseleit-Puffer, Testosteron, 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron, 11 $\beta$ -Hydroxytestosteron, Phenobarbital-Natrium und Rifampicin stammten von Sigma-Aldrich, Steinheim. Von Steraloids, London, Großbritannien, wurden 2 $\beta$ -Hydroxytestosteron, 16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron und Androstendion verwendet. DMSO und Methanol wurden von Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland, bezogen.

Die weiteren verwendeten Materialien und Geräte wurden bereits in den Kapiteln 2.3.1.1, 2.3.2.1, 2.3.3.1 und 2.3.4.1 beschrieben.

#### **2.3.5.2. Induktion des Testosteron-Metabolismus**

Das Ausplattieren der primären Hepatozyten, der erste Mediumwechsel und die Kultivierung erfolgten wie in Kapitel 2.3.2.5 zuvor beschrieben. Die Induktion der primären Hepatozyten begann nach 24 Stunden in Kultur.

Zu Beginn der Induktion wurde das Kulturmedium abgenommen und durch Kulturmedium ersetzt, dem die Induktoren Rifampicin und Phenobarbital zugesetzt wurden. In einem Ansatz erfolgte die Induktion durch Rifampicin in einer Konzentration von 25  $\mu$ M und in einem weiteren Ansatz durch Rifampicin, in DMSO gelöst, in einer Konzentration von 25  $\mu$ M und Phenobarbital, in *Aqua bidest.* gelöst, in einer Konzentration von 1,5 mM. Als Kontrolle dienten Zellen mit Medium ohne Induktoren sowie Zellen, deren Medium das Lösungsmittel DMSO in einer Konzentration

von 0,1% enthielt. Die Induktion erfolgte für 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchte. Alle 24 Stunden wurde das alte Medium durch das jeweilig neue Medium ersetzt.

### 2.3.5.3. Inkubation mit Testosteron

Im Gegensatz zu den Untersuchungen des Cytochrom P450-Metabolismus (Kapitel 2.3.3) wurde der Testosteron-Metabolismus mit in Kollagen-beschichteten 6-Loch-Gewebekulturplatten ( $\varnothing = 3,49$  cm) kultivierten Zellen durchgeführt. Für die Inkubation mit Testosteron wurden mit Rifampicin bzw. mit Rifampicin und Phenobarbital induzierte Zellen, Lösungsmittelkontrolle und Mediumkontrolle der jeweiligen Zellart (Kapitel 2.3.5.2) verwendet. Von den in Kapitel 2.3.1.4 unter verschiedenen Bedingungen weiter kultivierten PCMO wurde ebenfalls der Testosteron-Metabolismus untersucht.

Das Substrat Testosteron wurde in Methanol gelöst und mit Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4 auf eine Konzentration von 250  $\mu$ M verdünnt. Von einer 6-Loch-Gewebekulturplatte wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit 37°C warmem Krebs-Henseleit-Puffer gewaschen. Durch Zugabe von 1500  $\mu$ l 250  $\mu$ M Testosteron-Inkubationslösung wurde die Inkubation gestartet. Als Kontrolle dienten zum einen Zellen, die mit Krebs-Henseleit-Puffer inkubiert wurden, und zum anderen Zellen, die mit 2 ml eiskaltem Methanol abgetötet und anschließend mit 250  $\mu$ M Testosteron-Inkubationslösung inkubiert wurden. Die Zellkulturplatten wurden für 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Feuchte inkubiert.

Nach 60 Minuten wurden die Zellkulturplatten aus dem Brutschrank genommen, zweimal 600  $\mu$ l Überstand pro Loch abgenommen, in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden die Proben gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Proben wurden bei -20°C gelagert. Kurz vor der Vermessung wurden die gefriergetrockneten Proben in 200  $\mu$ l 45% Methanol und 55% *Aqua bidest.* gelöst, gevortext und für 5 Minuten bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde zur LC/MS- bzw. HPLC-Analyse herangezogen.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden die Zellkulturplatten trocken geklopft

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

und mit 500  $\mu\text{l}$  0,1 M Natronlauge über Nacht versetzt (Lu und Li 2001). Die aufgelösten Zellen wurden am nächsten Tag mit einem Zellschaber abgekratzt und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Der Proteingehalt dieser Lösung wurde mit den BCA-Protein-Assay-Reagenzien nach Smith *et al.* (1985) bestimmt.

### 2.3.5.4. Untersuchung der Testosteron-Metaboliten durch LC/MS-Analytik

Die im Folgenden beschriebene LC/MS-Methode zur Bestimmung von Testosteron-Metaboliten wurde an die von Christiansen (2000) entwickelte Methode angelehnt. Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) wurde nach Friedrich *et al.* (2003) verwendet.

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch einen Sartorius-Membranfilter mit einem Porendurchmesser von 0,45  $\mu\text{m}$  filtriert und nach Zugabe von Methanol 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

HPLC Pumpe	HP 1100 Series mit 1322 A Degasser und 1312 A LC Hochdruckgradientenpumpe, Hewlett Packard, Waldbronn
Injektor	Rheodyne 7725i Injektor mit 50 $\mu\text{l}$ -Probenschleife
Detektor	HP 1314 UV/VIS Detektor, Hewlett Packard, Waldbronn
Massenspektrometer	Esquire LC, Bruker, Bremen
Interface	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI)
Sprühdruck	45 psi
Trockengas	6,00 l/min
Trockentemperatur	320°C
APCI-Temperatur	480°C
Integrator	Data Analysis™, Version 3.0, Bruker Daltonics, Bruker, Bremen
Stationäre Phase	LiChrospher® 60 RP-select B 250 $\times$ 4 mm (5 $\mu\text{m}$ ) Vorsäule: LiChrospher® 60 RP-select B 4 $\times$ 4 mm (5 $\mu\text{m}$ ) beides Merck, Darmstadt

Mobile Phase	55% Methanol 45% <i>Aqua bidest.</i> (v/v)	
Flussrate	0,8 ml/min, Split 1:3	
Laufzeit	60 min	
Injektionsvolumen	50 $\mu$ l	
Detektion	UV: $\lambda = 254$ nm	
Retentionszeiten	6 $\beta$ -Hydroxytestosteron	13 min $\pm$ 0,6 min
	16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron	13,5 min $\pm$ 0,7 min
	2 $\beta$ -Hydroxytestosteron	21 min $\pm$ 0,8 min
	11 $\beta$ -Hydroxytestosteron	21 min $\pm$ 0,8 min
	Androstendion	33 min $\pm$ 2,0 min
	Testosteron	55 min $\pm$ 3,5 min

#### 2.3.5.5. Quantifizierung der Testosteron-Metaboliten durch HPLC-Analytik

Zur Quantifizierung der Testosteron-Metaboliten 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron, 16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron und Androstendion durch HPLC wurde die LC/MS-Methode (2.3.5.4) verwendet.

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch einen Sartorius-Membranfilter mit einem Porendurchmesser von 0,45  $\mu$ m filtriert. Nach Zugabe von Methanol wurde für 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

Die Quantifizierung der Metaboliten erfolgte über eine 7-Punkt-Kalibrierung. Es wurden Konzentrationen von 0,1  $\mu$ M bis 50  $\mu$ M 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron, 16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron und Androstendion im Fließmittel gelöst. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden die oben genannten Konzentrationen der Metaboliten in 250  $\mu$ M Testosteron-haltigem Krebs-Henseleit-Puffer hergestellt, auf Zellkulturplatten ohne Hepatozyten inkubiert und dann wie die Inkubationsansätze behandelt (Kapitel 2.3.5.3).

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

HPLC Pumpe	Waters 600, Milford, CT, USA	
Detektor	Waters 2487 Dual $\lambda$ Absorbance Detector Milford, CT, USA	
Autosampler	Waters 717 plus, Milford, CT, USA	
Integrator	EZ Chrom™ Chromatography Data System, Version 6.7 und EZ Chrom™ SS42 Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA	
Stationäre Phase	LiChrospher® 60 RP-select B 250 × 4 mm (5 $\mu$ m) Vorsäule: LiChrospher® 60 RP-select B 4 × 4 mm (5 $\mu$ m) beides Merck, Darmstadt	
Mobile Phase	55% Methanol 45% <i>Aqua bidest.</i> (v/v)	
Flussrate	0,8 ml/min	
Laufzeit	60 min	
Injektionsvolumen	50 $\mu$ l	
Detektion	UV: $\lambda = 254$ nm	
Retentionszeiten	6 $\beta$ -Hydroxytestosteron	11,2 min $\pm$ 0,6 min
	16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron	12,7 min $\pm$ 0,7 min
	Androstendion	27,3 min $\pm$ 2,0 min
	Testosteron	43,0 min $\pm$ 3,5 min

## 2.3.6. Benzamidoxim-Metabolismus

### 2.3.6.1. Material und Geräte

Neben NADH wurden alle Chemikalien, soweit nicht anders vermerkt, bei der Firma Merck, Darmstadt, in höchster verfügbarer Reinheit erworben. Benzamidin und Octylsulfonat-Natriumsalz stammten von Sigma-Aldrich, Steinheim. Benzamidoxim wurde im Arbeitskreis aus Benzonitril und Hydroxylamin nach Krüger (1885) synthetisiert. Acetonitril in HPLC-Qualität wurde von Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland bezogen.

Weitere verwendete Materialien und Geräte wurden bereits in Kapitel 2.3.3.1 beschrieben.

### 2.3.6.2. Ernten und Homogenisierung der verwendeten Zellen

NeoHepatozyten (Kapitel 2.3.1.3), klassisch aktivierte Makrophagen (Kapitel 2.3.1.5) und primäre Hepatozyten (Kapitel 2.3.2.5) wurden nach Ende der Kulturzeit geerntet und homogenisiert wie in Kapitel 2.3.3.2 beschrieben.

### 2.3.6.3. Benzamidoxim-Metabolismus

Die Benzamidoxim-*N*-Reduktion wurde als Aktivitätsbestimmung des drei Komponentensystems bestehend aus mARC, Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase verwendet. Die Zusammensetzung der Inkubationsansätze orientierte sich an Reeh *et al.* (2007) und den Inkubationen zur Bestimmung der CYP-Aktivitäten (Kapitel 2.3.3). Die Inkubationen wurden in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen in 100  $\mu$ l 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,3 bei einer Substratkonzentration von 200  $\mu$ M Benzamidoxim durchgeführt. Benzamidoxim wurde in *Aqua bidest.* gelöst und auf die verwendete Konzentration verdünnt. Die Zellhomogenisate wurden in einer Proteinkonzentration von 250  $\mu$ g/ml verwendet, wobei unter Zellhomogenisat jeweils das Homogenisat von klassisch aktivierten Makrophagen, NeoHepatozyten und jeweils primären porcinen bzw. humanen Hepatozyten zu verstehen ist. In einer Inkubationsreihe wurde statt einer Protein-



## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

Substanz	Homogenisat	ohne Homogenisat
Kaliumphosphat-Puffer pH 6,3	ad 100 $\mu$ l	ad 100 $\mu$ l
Homogenisat	25 $\mu$ g	-
Benzamidoxim (1 mM)	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l
NADH (10 mM)	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

**Tabelle 2.16.:** Inkubationsansätze zur Aktivitätsbestimmung der Benzamidoxim-Reduktion.

Jeder Ansatz wurde jeweils dreimal hergestellt und vermessen.

konzentration von 250  $\mu$ g/ml eine Proteinkonzentration von 500  $\mu$ g/ml verwendet. Nach einer kurzen Vorinkubation mit dem Substrat Benzamidoxim wurde die Reaktion mit NADH (1 mM) gestartet. Als Kontrolle wurden jeweils drei Ansätze ohne Zellhomogenisat mitvermessen. Jeder, der in Tabelle 2.16 dargestellten, Ansätze wurde dreimal hergestellt und vermessen. Die Inkubation bei 37°C erfolgte über 30 Minuten im Schüttelwasserbad.

Die Inkubationsansätze wurden mit 100  $\mu$ l Acetonitril/Ameisensäure pH 2,5 und mit 100  $\mu$ l 10%iger Ameisensäure abgestoppt, geschüttelt, bei 10.000 U/min für 5 Minuten das gefällte Protein abzentrifugiert und der Überstand in HPLC-Probenfläschchen überführt.

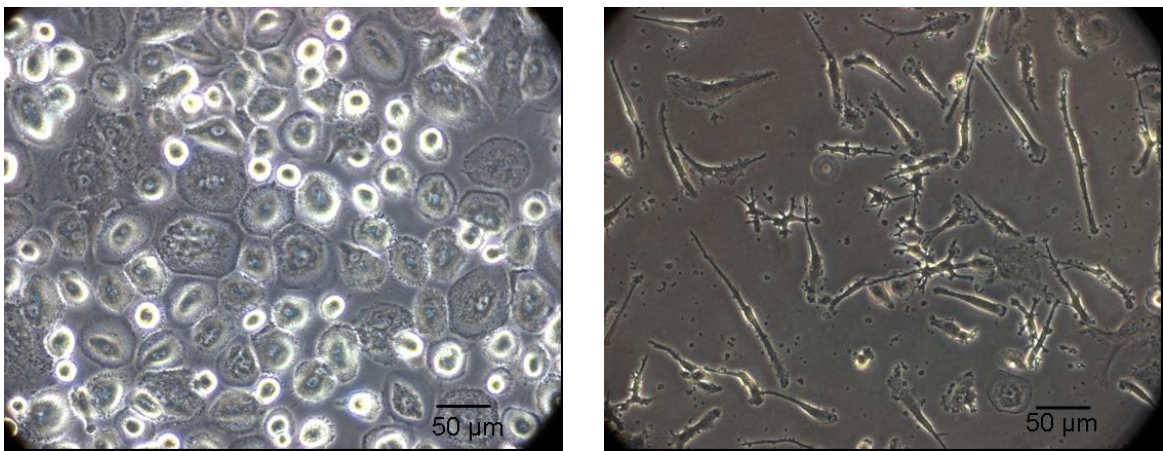
Die Analytik erfolgte unter der nachfolgend angegebenen Methode nach Reeh *et al.* (2007). Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch einen Sartorius-Membranfilter mit einem Porendurchmesser von 0,45  $\mu$ m filtriert und nach Zugabe von Acetonitril 15 Minuten im Ultraschallbad entgast. Eine 7-Punkt-Kalibrierung wurde zur Quantifizierung des gebildeten Benzamidins erstellt, die den Konzentrationsbereich von 0,1  $\mu$ M bis 100  $\mu$ M Benzamidin abdeckte. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden die für die Kalibrierung angegebenen Konzentrationen des Metaboliten in 200  $\mu$ M Benzamidoxim-haltigem 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,3 hergestellt. Diese Ansätze enthielten statt Homogenisat 25  $\mu$ g Hitze-denaturiertes Protein und waren sonst wie die Inkubationsansätze zusammengesetzt. Die weitere Aufarbeitung der Ansätze erfolgte wie oben beschrieben.

HPLC Pumpe	Waters 600, Milford, CT, USA	
Detektor	Waters 2487 Dual $\lambda$ Absorbance Detector Milford, CT, USA	
Autosampler	Waters 717 plus, Milford, CT, USA	
Integrator	EZ Chrom™ Chromatography Data System, Version 6.7 und EZ Chrom™ SS42 Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA	
Stationäre Phase	Synergy Max-RP 80A 250 × 4,6 mm (4 $\mu$ m) Vorsäule: SecurityGuard C18 4 × 3 mm (4 $\mu$ m) beides Phenomenex, Aschaffenburg	
Mobile Phase	82,5% 10 mM Octylsulfonat in <i>Aqua bidest.</i> , pH 2,5 (mit konz. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> eingestellt) 17,5% Acetonitril (v/v)	
Flussrate	1,0 ml/min	
Laufzeit	32 min	
Injektionsvolumen	40 $\mu$ l	
Detektion	UV: $\lambda = 229$ nm	
Retentionszeiten	Benzamidoxim	22,5 min $\pm$ 0,3 min
	Benzamidin	25,4 min $\pm$ 0,3 min

## 2.4. Ergebnisse

### 2.4.1. Isolierung und Kultivierung von Zellen monozytären Ursprungs

Die Kultivierung der klassisch aktivierten Makrophagen und der NeoHepatozyten ist vom Ausgangszustand der Bufficoats abhängig, so dass manche Kulturen besser wachsen als andere. Beispielhaft sind der Abbildung 2.8 NeoHepatozyten (a) und klassisch aktivierte Makrophagen (b) dargestellt.



(a) NeoHepatozyten

(b) klassisch aktivierte Makrophagen

**Abbildung 2.8.:** NeoHepatozyten am 20. Tag und klassisch aktivierte Makrophagen am 6. Tag der Kultivierung.

### 2.4.2. Isolierung und Kultivierung primärer Hepatozyten

In Tabelle 2.17 sind beispielhaft Viabilität der Zellen sowie Ausbeute und Größe des zur Isolierung verwendeten Stückes der Schweineleber aufgeführt. In Tabelle 2.18 sind diese Parameter für die Isolierung humaner Hepatozyten angegeben.

Sowohl humane Hepatozyten, als auch porcine Hepatozyten sind bis zu 4 Tage in Kultur gehalten worden. Nach dem Ausplattieren adhärieren die lebenden Hepatozyten innerhalb von 90 Minuten an der Kollagen-beschichteten Oberfläche der Gewebekulturgefäße. Tote oder nicht-parenchymatische Zellen wachsen nicht

Schwein	Gewicht des Leberstücks (g)	Ausbeute ( $\times 10^6$ Zellen/g Leber)	Viabilität (%)
1	95	1,81	90
2	105	2,83	90
3	98	1,46	81
4	76	1,63	87
5	125	1,67	88
6	132	0,86	92

**Tabelle 2.17.:** Ausbeute und Viabilität der isolierten porcinen Hepatozyten.

Mensch	Gewicht des Leberstücks (g)	Ausbeute ( $\times 10^6$ Zellen/g Leber)	Viabilität (%)
1	41	3,88	77
2	36	0,43	73
3	110	0,52	81

**Tabelle 2.18.:** Ausbeute und Viabilität der isolierten humanen Hepatozyten.

an der Oberfläche an, so dass diese beim Mediumwechsel entfernt werden. Am ersten Tag besitzen die adhärennten Hepatozyten eine kreisrunde Zellform. Innerhalb der nächsten 24 Stunden verändern sie ihre Gestalt und nehmen durch Spreiten Kontakt zu den Nachbarzellen auf, so dass sich ein konfluenter Zellrasen ausbildet.

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

CYP1A1/2	Aktivität		Hemmung	
	- Inhibitor Metyrapon	+ Inhibitor Metyrapon		Signifikanz
Zellart	pmol Resorufin/min/mg Protein	%	Student's t-Test	
klassisch aktivierte				
Makrophagen	0,66 ± 0,07	0,17 ± 0,04	74	$p < 0,001$
NeoHepatozyten	0,33 ± 0,04	0,08 ± 0,05	77	$p < 0,001$
humane Hepatozyten	0,77 ± 0,16	0,38 ± 0,08	50	$p < 0,01$
porcine Hepatozyten	6,57 ± 0,26	2,79 ± 0,37	58	$p < 0,001$

**Tabelle 2.19.:** Übersicht der CYP1A1/2-Aktivitäten und deren Hemmung.

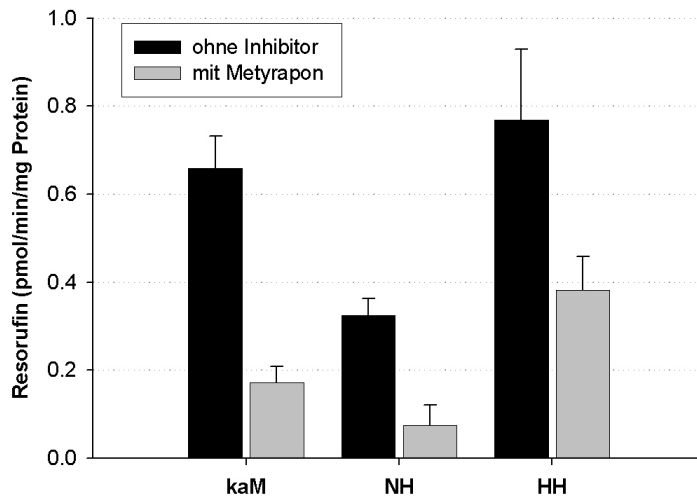
Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SEM aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben. Um diese Werte zu ermitteln, sind kaM und NH von mindestens 3 Spender verwendet worden.

### 2.4.3. Cytochrom P450-Metabolismus

#### 2.4.3.1. CYP1A1/2-Aktivität

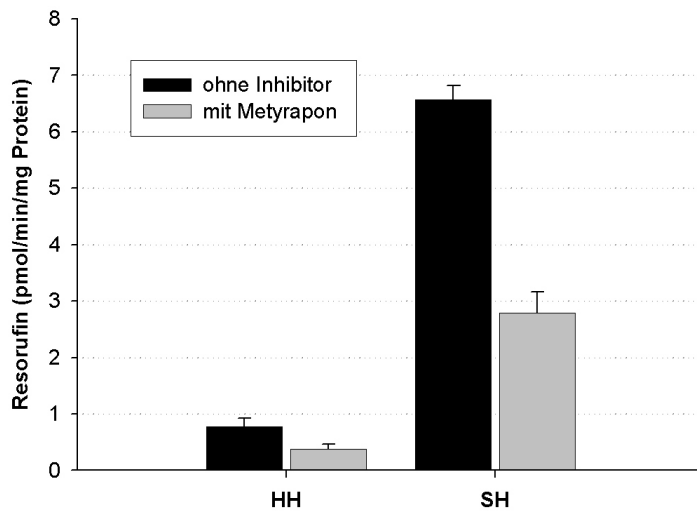
Zur Aktivitätsbestimmung von CYP1A1 und CYP1A2 in den Zellhomogenisaten ist die Umsetzung von Ethoxyresorufin zu fluoreszierendem Resorufin verwendet worden (Abbildung 2.2). Die Kalibrierungen von 3,9 nM bis 1000 nM des Metaboliten Resorufin sind sowohl vor dem Zusatz der  $\beta$ -Glucuronidase ( $r^2 > 0,9993$ ) als auch nach dem Zusatz ( $r^2 > 0,9984$ ) über den gesamten Konzentrationsbereich linear verlaufen.

Die Ethoxyresorufin-*O*-Desethylierungsaktivität von klassisch aktivierten Makrophagen (kaM) und humanen Hepatozyten (HH) liegen im gleichen Bereich, während die Umsetzung durch NeoHepatozyten (NH) geringer ist (Abbildung 2.9). Schweinehepatozyten (SH) besitzen eine achtfach höhere CYP1A1/2-Aktivität als humane Hepatozyten (Abbildung 2.10). Die CYP1A1/2-Aktivitäten von den verwendeten Zellhomogenisaten lassen sich signifikant durch den CYP-Inhibitor Metyrapon hemmen. Die gemessenen Aktivitäten sowie das Ausmaß der Inhibition sind in Tabelle 2.19 aufgeführt.



**Abbildung 2.9.:** CYP1A1/2-Aktivitäten von klassisch aktivierten Makrophagen (kaM), Neo-Hepatozyten (NH) und humanen Hepatozyten (HH) ohne und mit Metyrapon (1 mM) als Inhibitor.

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SEM aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben. Um diese Werte zu ermitteln, sind kaM und NH von mindestens 3 Spender verwendet worden.

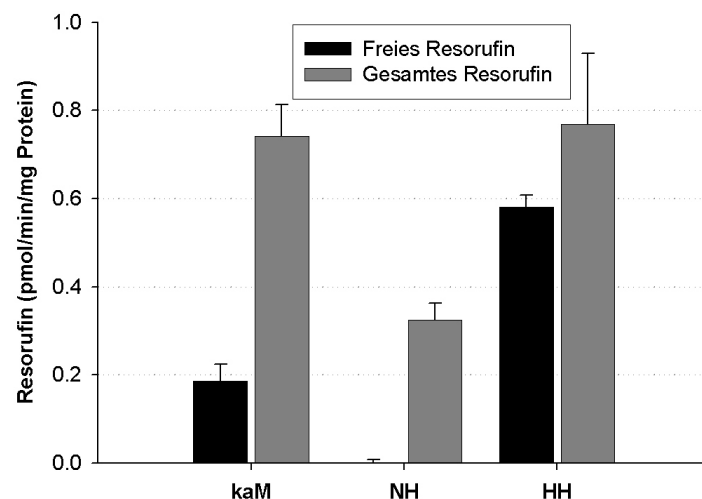


**Abbildung 2.10.:** CYP1A1/2-Aktivitäten von humanen Hepatozyten (HH) und porcinen Hepatozyten (SH) ohne und mit Metyrapon (1 mM) als Inhibitor.

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SEM aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben.

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

In Hepatozyten und anderen Zellen laufen sowohl Phase I- als auch Phase II-Reaktionen ab, so dass durch Phase I-Reaktion gebildetes Resorufin in einer Phase II-Reaktion an Konjugate gekoppelt wird. Konjugiertes Resorufin fluoresziert nicht mehr und entzieht sich so der direkten Vermessung. Durch Zusatz von  $\beta$ -Glucuronidase mit Sulfatase-Aktivität im Anschluss an die eigentliche Inkubation wird Resorufin aus den Konjugaten freigesetzt und kann wiederum fluorimetrisch erfasst werden. Klassisch aktivierte Makrophagen (kaM) und humane Hepatozyten (HH) bilden sowohl freies Resorufin als auch konjugiertes Resorufin. NeoHepatozyten (NH) bilden nur konjugiertes Resorufin (Abbildung 2.11). Bei homogenisierten porcinen Hepatozyten liegt Resorufin im Gegensatz dazu hauptsächlich unkonjugiert vor.



**Abbildung 2.11.:** CYP1A1/2-Aktivität und Phase II-Aktivität anhand der Ethoxyresorufin-O-Desethylierung durch klassisch aktivierte Makrophagen (kaM), NeoHepatozyten (NH) und humanen Hepatozyten (HH).

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SEM aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen von angegeben. sind kaM und NH von mindestens 3 Spender verwendet worden.

### 2.4.3.2. CYP2C9-Aktivität

Zur Bestimmung der CYP2C9-Aktivität wurde der Metabolismus von Octyl-*O*-methoxyresorufin (OOMR) zu Resorufin verwendet (Abbildung 2.3).

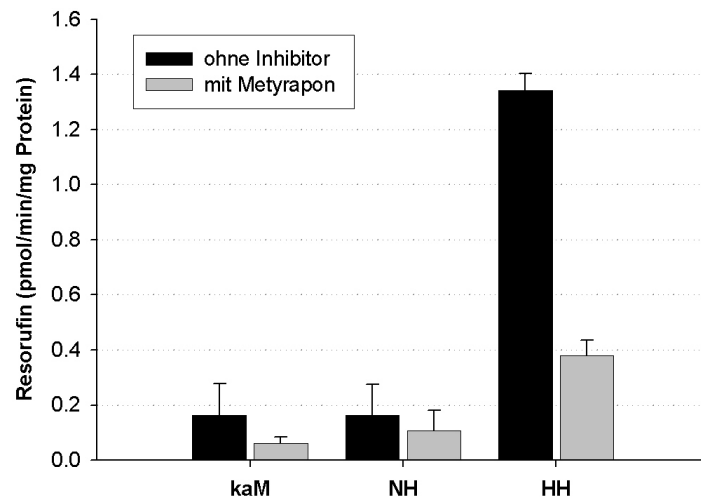
Über den gesamten Konzentrationsbereich von 3,9 nM bis 1000 nM Resorufin sind die Kalibrierungen sowohl vor dem Zusatz ( $r^2 > 0,9998$ ) als auch nach dem Zusatz der  $\beta$ -Glucuronidase ( $r^2 > 0,9990$ ) linear verlaufen.

Auch bei der CYP2C9-Aktivitätsbestimmung wird der Metabolit Resorufin glucuronidiert bzw. sulfatiert. Bei den dargestellten Ergebnisse handelt es sich um das gemessene Gesamtresorufin nach der Behandlung mit  $\beta$ -Glucuronidase mit Sulfatase-Aktivität.

Eine Umsetzung des Octyl-*O*-methoxyresorufin-Metabolismus zu Resorufin ist sowohl in klassisch aktivierten Makrophagen, NeoHepatozyten als auch humanen und porcinen Hepatozyten zu beobachten (Abbildung 2.12). Octyl-*O*-methoxyresorufin wird von klassisch aktivierten Makrophagen und NeoHepatozyten mit der gleichen Aktivität metabolisiert. Diese Aktivität ist um den Faktor acht geringer als von humanen Hepatozyten. Metyrapon ist nicht in der Lage, die Umsetzung von Octyl-*O*-methoxyresorufin zu Resorufin in klassisch aktivierten Makrophagen und NeoHepatozyten signifikant zu hemmen. Der Octyl-*O*-methoxyresorufin-Metabolismus durch humane und porcine Hepatozyten lässt sich signifikant durch Metyrapon hemmen. Wie auch bei der Bestimmung der CYP1A1/2-Aktivität weisen porcine Hepatozyten bei der Bestimmung des CYP2C-Metabolismus eine sieben-fach höhere Aktivität als humane Hepatozyten auf (Abbildung 2.13). Die gemessenen Aktivitäten der Zellhomogenisate, sowie das Ausmaß der Inhibition sind in Tabelle 2.20 aufgeführt.

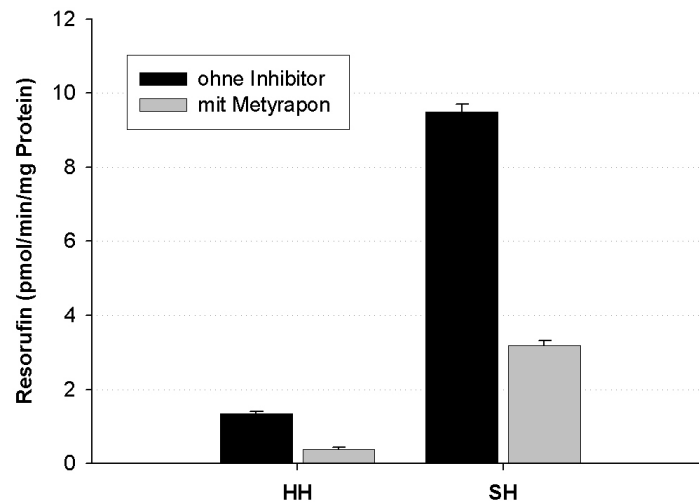


## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten



**Abbildung 2.12.:** CYP2C9-Aktivitäten von klassisch aktivierten Makrophagen (kaM), NeoHepatozyten (NH) und humanen Hepatozyten (HH) ohne und mit Metyrapon (1 mM) als Inhibitor.

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SEM aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben. Um diese Werte zu ermitteln, sind kaM und NH von mindestens 3 Spender verwendet worden.



**Abbildung 2.13.:** CYP2C9-Aktivitäten von humanen Hepatozyten (HH) und porcinen Hepatozyten (SH) ohne und mit Metyrapon (1 mM) als Inhibitor.

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SEM aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben.

CYP2C9	Aktivität		Hemmung	
	- Inhibitor Metyrapon	+ Inhibitor Metyrapon	%	Signifikanz
Zellart	pmol Resorufin/min/mg Protein		%	Student 's t-Test
klassisch aktivierte				
Makrophagen	0,16 ± 0,12	0,06 ± 0,02	63	$p < 0,5$
NeoHepatozyten	0,16 ± 0,11	0,11 ± 0,07	34	$p < 0,1$
humane Hepatozyten	1,34 ± 0,06	0,38 ± 0,06	70	$p < 0,05$
porcine Hepatozyten	9,50 ± 0,20	3,19 ± 0,13	66	$p < 0,001$

**Tabelle 2.20.:** Übersicht der CYP2C9-Aktivität und deren Hemmung.

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SEM aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben. Um diese Werte zu ermitteln, sind kaM und NH von mindestens 3 Spender verwendet worden.

### 2.4.3.3. CYP2E1-Aktivität

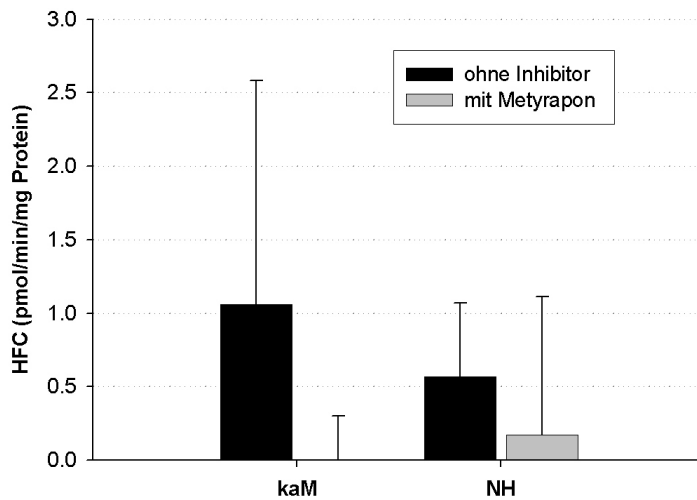
Zur Aktivitätsbestimmung von CYP2E1 in den Zellhomogenisaten wird der Metabolismus von 7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarin (MFC) zu fluoreszierenden 7-Hydroxy-4-trifluoromethylcumarin (HFC) verwendet (Abbildung 2.4).

**2.4.3.3.1. Bestimmung des Metaboliten durch Fluorimetrie** Über den gesamten Konzentrationsbereich von 1,95 nM bis 1000 nM 7-Hydroxy-4-trifluoromethylcumarin (HFC) sind die Kalibrierungen ( $r^2 > 0,9966$ ) linear verlaufen.

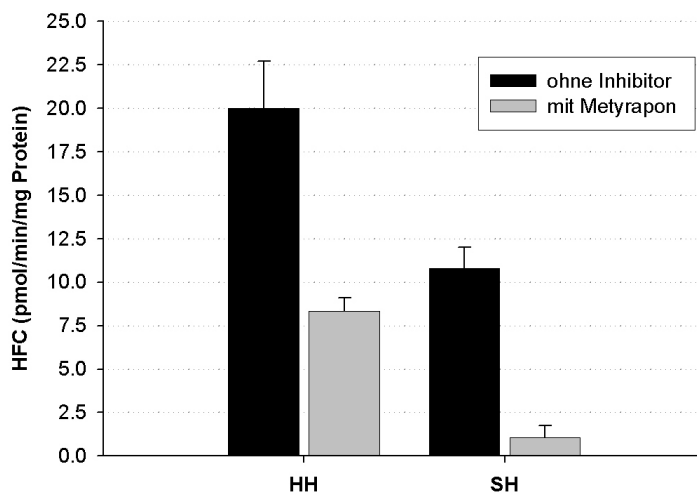
Bei der Vermessung der Inkubationsansätze mit klassisch aktivierten Makrophagen und NeoHepatozyten schwanken die Mengen des detektierten Metaboliten 7-Hydroxy-4-trifluoromethylcumarin stark, so dass nicht von einer signifikanten CYP2E1-Aktivität gesprochen werden kann (Abbildung 2.14). Der Grund dafür könnten störende Einflüsse des NADPH sein.

In humanen und porcinen Hepatozyten konnte eine CYP2E1-Aktivität bestimmt werden, die sich signifikant durch Metyrapon hemmen lässt (Abbildung 2.15), wobei die Hemmung der Aktivität von Schweinehepatozyten geringer ausfällt. Die gemessene Aktivität von humanen Hepatozyten ist zweimal so hoch wie von Schweinehepatozyten.

Die gemessenen Aktivitäten der Zellhomogenisate, sowie das Ausmaß der Inhibition sind in Tabelle 2.21 aufgeführt.



**Abbildung 2.14.:** CYP2E1-Aktivitäten von klassisch aktivierten Makrophagen (kaM) und NeoHepatozyten (NH) ohne und mit Metyrapon (1 mM) als Inhibitor. Die Proben wurden im Fluorimeter vermessen. Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben.



**Abbildung 2.15.:** CYP2E1-Aktivitäten von humanen Hepatozyten (HH) und porcinen Hepatozyten (SH) ohne und mit Metyrapon (1 mM) als Inhibitor. Die Proben wurden im Fluorimeter vermessen. Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben.

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

CYP2E1	Aktivität		Hemmung	
	- Inhibitor Metyrapon	+ Inhibitor Metyrapon	%	Signifikanz
Zellart	pmol HFC/min/mg Protein		%	Student´s t-Test
klassisch aktivierte				
Makrophagen	1,06 ± 1,52	-0,01 ± 0,31	99	$p < 0,1$
NeoHepatozyten	0,57 ± 0,50	0,17 ± 0,94	70	$p < 0,5$
humane Hepatozyten	20,0 ± 2,72	8,31 ± 0,78	58	$p < 0,05$
porcine Hepatozyten	10,81 ± 1,20	1,05 ± 0,70	90	$p < 0,001$

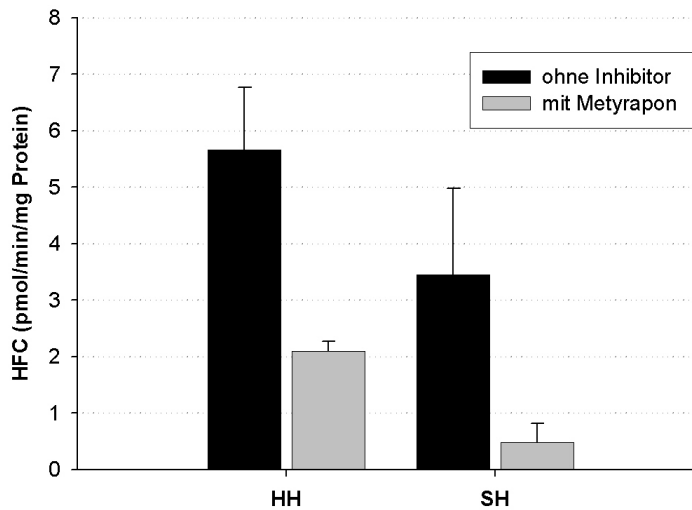
**Tabelle 2.21.:** Übersicht der CYP2E1-Aktivität und deren Hemmung.

Die Proben wurden durch Fluorimetrie vermessen. Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben. Um diese Werte zu ermitteln, sind kaM und NH von mindestens 3 Spender verwendet worden.

CYP2E1	Aktivität		Hemmung	
	- Inhibitor Metyrapon	+ Inhibitor Metyrapon	%	Signifikanz
Zellart	pmol HFC/min/mg Protein		%	Student´s t-Test
klassisch aktivierte				
Makrophagen	n. d.	n. d.	-	-
NeoHepatozyten	n. d.	n. d.	-	-
humane Hepatozyten	5,66 ± 1,11	2,10 ± 0,17	63	$p < 0,001$
porcine Hepatozyten	3,45 ± 1,53	0,49 ± 0,33	86	$p < 0,001$

**Tabelle 2.22.:** Übersicht der CYP2E1-Aktivität und deren Hemmung.

Die Proben wurden durch HPLC mit Fluoreszenz-Detektion vermessen. Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben. Um diese Werte zu ermitteln, sind kaM und NH von mindestens 3 Spender verwendet worden. n. d.: nicht detektierbar.



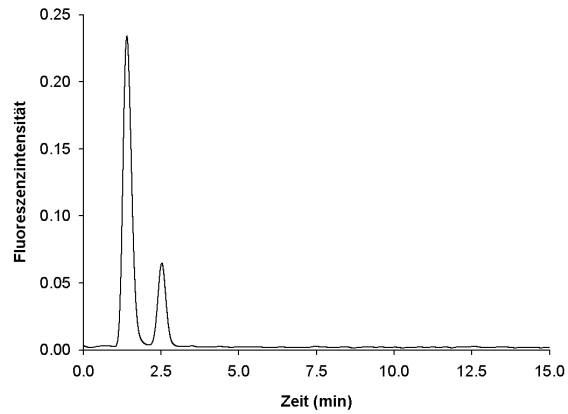
**Abbildung 2.16.:** CYP2E1-Aktivitäten von humanen Hepatozyten (HH) und porcinen Hepatozyten (SH) ohne und mit Metyrapon (1 mM) als Inhibitor.

Die Proben sind durch HPLC mit Fluoreszenz-Detektion vermessen worden. Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben.

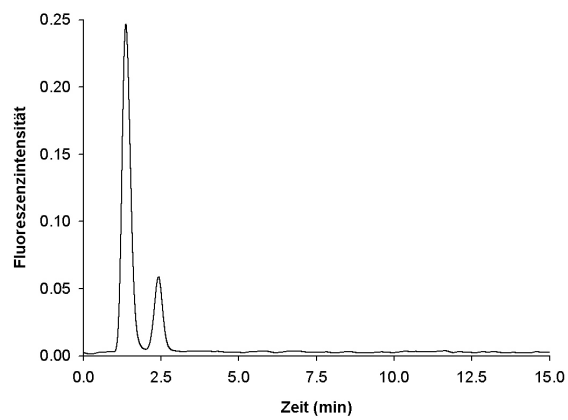
**2.4.3.3.2. Bestimmung des Metaboliten durch HPLC** Zur Kalibrierung und Wiederfindung des 7-Hydroxy-4-trifluoromethylcumarin sind die Flächen der mittels HPLC-Analytik erhaltenen Signale mit den eingesetzten Konzentrationen von 2 nM bis 200 nM korreliert worden. Die Funktionen der Kalibrierung ( $r^2 = 0,9978$ ) und Wiederfindung ( $r^2 = 0,9999$ ) sind über den gesamten Konzentrationsbereich linear verlaufen. Die Wiederfindungsrate hat  $98,6 \pm 9,9\%$  betragen.

Bei der Vermessung der Inkubationsansätze mit klassisch aktivierten Makrophagen und NeoHepatozyten kann der Metabolit 7-Hydroxy-4-trifluoromethylcumarin (HFC) im Gegensatz zu humanen Hepatozyten nicht detektiert werden (2.17). Die Nachweisgrenze liegt bei einer Konzentration von 2 nM HFC, d. h. die Aktivität der klassisch aktivierten Makrophagen und NeoHepatozyten müsste unter 0,09 pmol HFC/min/mg Protein liegen. Humane Hepatozyten setzen 7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarin mit einer 1,6-fach höheren Aktivität als porcine Hepatozyten um (Abbildung 2.16). Metyrapon erweist sich bei Schweinehepatozyten als potenterer Inhibitor als bei humanen Hepatozyten (Tabelle 2.22).

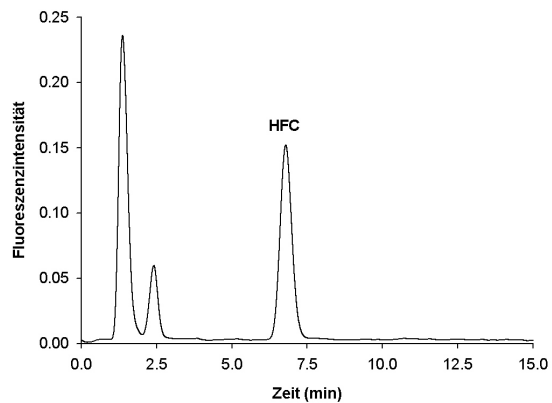
## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten



(a) klassisch aktivierte Makrophagen



(b) NeoHepatozyten



(c) humane Hepatozyten

**Abbildung 2.17.:** Repräsentative HPLC-Chromatogramme nach der Inkubation des 7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarins (MFC) mit (a) klassisch aktivierten Makrophagen, (b) NeoHepatozyten und (c) humanen Hepatozyten.

Der Metabolit 7-Hydroxy-4-trifluoromethylcumarin (HFC) kann nur nach der Inkubation mit humanen und porcinen Hepatozyten detektiert werden.

#### 2.4.3.4. CYP3A4/5-Aktivität

Der Metabolismus von Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein (DBOMF) durch CYP3A4 und CYP3A5 zu fluoreszierendem Fluorescein ist zur Aktivitätsbestimmung verwendet worden (Abbildung 2.5).

Die Kalibrierungen ( $r^2 > 0,9969$ ) von 1,95 nM bis 1000 nM des Metaboliten Fluorescein sind über den gesamten Konzentrationsbereich linear verlaufen.

Durch den Zusatz von Salicylamid werden Phase II-Reaktionen unterbunden.

Klassisch aktivierte Makrophagen und NeoHepatozyten setzen Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein zu Fluorescein um. Allerdings vermindern weder der selektive kompetitive CYP3A-Inhibitor Ketoconazol noch der nicht-selektive Inhibitor Metyrapon die Umsetzung (Abbildung 2.18). In Tabelle 2.23 sind die Umsetzungsraten mit und ohne Inhibitoren aufgeführt. In Tabelle 2.24 ist das Ausmaß der Hemmung zu finden.

Da typische CYP-Inhibitoren keinen Einfluss auf den Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein-Metabolismus durch klassisch aktivierte Makrophagen und NeoHepatozyten haben, ist untersucht worden, in wie weit dieser Metabolismus NADPH-abhängig ist. Die Zugabe von NADPH (1 mM) zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität im Vergleich zu keinem Zusatz von NADPH und NADH zu den jeweiligen Zellhomogenisaten. NADH (1 mM) im Unterschied dazu reduziert die DBOMF-Umsetzung minimal (Abbildung 2.20).

Humane und porcine Hepatozyten metabolisieren Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein zu Fluorescein. Die Inhibitoren Ketoconazol und Metyrapon hemmen die Umsetzung signifikant (Abbildung 2.19). Die gemessene CYP3A-Aktivität von porcinen Hepatozyten ist sechsfach höher als die von humanen Hepatozyten. Ketoconazol erweist sich bei porcinen Hepatozyten als potenterer Inhibitor des Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein-Metabolismus als Metyrapon. Bei humanen Hepatozyten ist es umgekehrt (Tabelle 2.24).



## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

CYP3A	Aktivität		
	- Inhibitor	+ Inhibitor	+ Inhibitor
		Metyrapon	Ketoconazol
Zellart	pmol Fluorescein/min/mg Protein		
klassisch aktivierte			
Makrophagen	0,24 ± 0,11	0,28 ± 0,08	0,23 ± 0,14
NeoHepatozyten	0,26 ± 0,09	0,33 ± 0,08	0,33 ± 0,10
humane Hepatozyten	7,08 ± 0,60	0,96 ± 0,08	2,71 ± 0,14
porcine Hepatozyten	44,3 ± 6,14	3,71 ± 0,24	2,63 ± 0,07

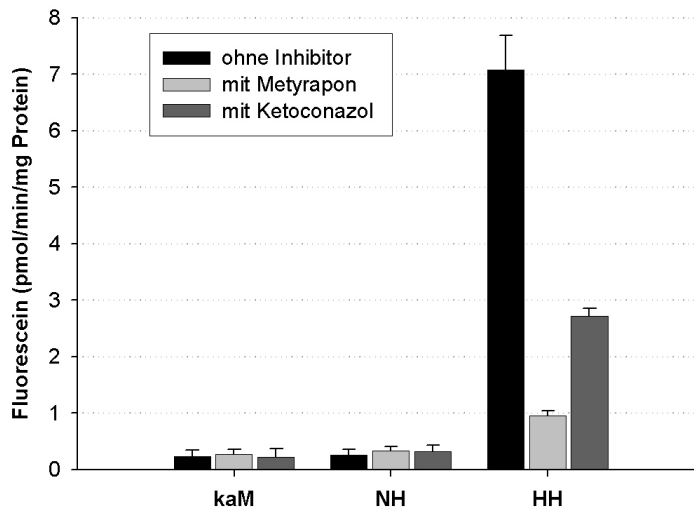
**Tabelle 2.23.:** Übersicht der CYP3A-Aktivitäten und deren Hemmung.

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben. Um diese Werte zu ermitteln, sind kaM und NH von mindestens 3 Spender verwendet worden.

CYP3A4/5	Hemmung			
	Metyrapon		Ketoconazol	
	Hemmung	Signifikanz	Hemmung	Signifikanz
Zellart	%	Student 's t-Test	%	Student 's t-Test
klassisch aktivierte				
Makrophagen	-16	$p < 1$	5	$p < 1$
NeoHepatozyten	-27	$p < 0,1$	-24	$p < 1$
humane Hepatozyten	86	$p < 0,01$	62	$p < 0,001$
porcine Hepatozyten	92	$p < 0,01$	94	$p < 0,01$

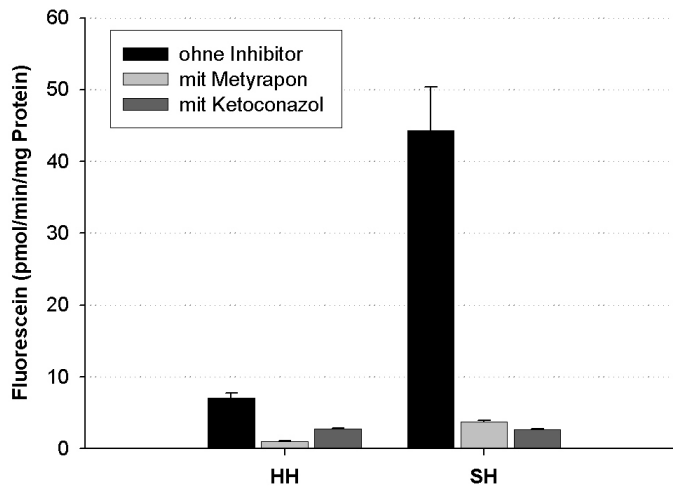
**Tabelle 2.24.:** Übersicht über Ausmaß und Signifikanz der CYP3A-Aktivitätshemmung.

Die Grundaktivität ohne Inhibitor ist jeweils gleich 100% gesetzt. Um diese Werte zu ermitteln, sind kaM und NH von mindestens 3 Spender verwendet worden.



**Abbildung 2.18.:** Hemmung der CYP3A4/5-Aktivitäten durch Metyrapon und Ketoconazol von klassisch aktivierten Makrophagen (kaM), NeoHepatozyten (NH) und humanen Hepatozyten (HH).

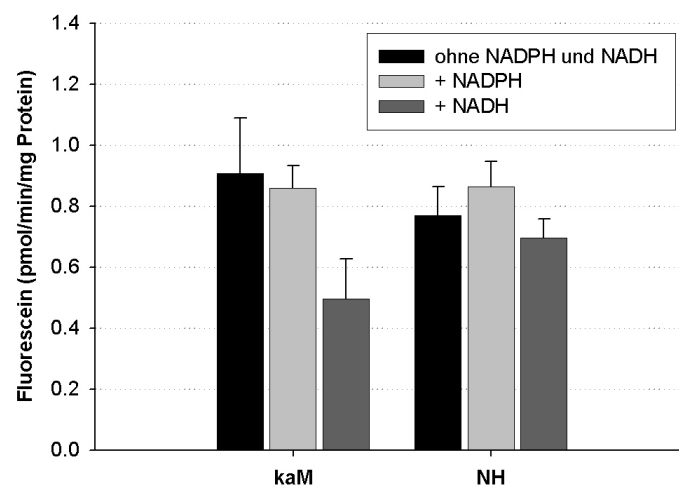
Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben. Um diese Werte zu ermitteln, sind kaM und NH von mindestens 3 Spender verwendet worden.



**Abbildung 2.19.:** Hemmung der CYP3A-Aktivitäten durch Metyrapon und Ketoconazol von humanen Hepatozyten (HH) und porcinen Hepatozyten (SH).

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben.

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten



**Abbildung 2.20.:** Einfluss der Cofaktoren NADPH und NADH auf den Dibenzyl-O-methoxyfluorescein-Metabolismus zu Fluorescein durch klassisch aktivierte Makrophagen (kaM) und NeoHepatozyten (NH).

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben. Um diese Werte zu ermitteln, sind kaM und NH von mindestens 3 Spender verwendet worden.

## 2.4.4. Induktion des Cytochrom P450-Metabolismus

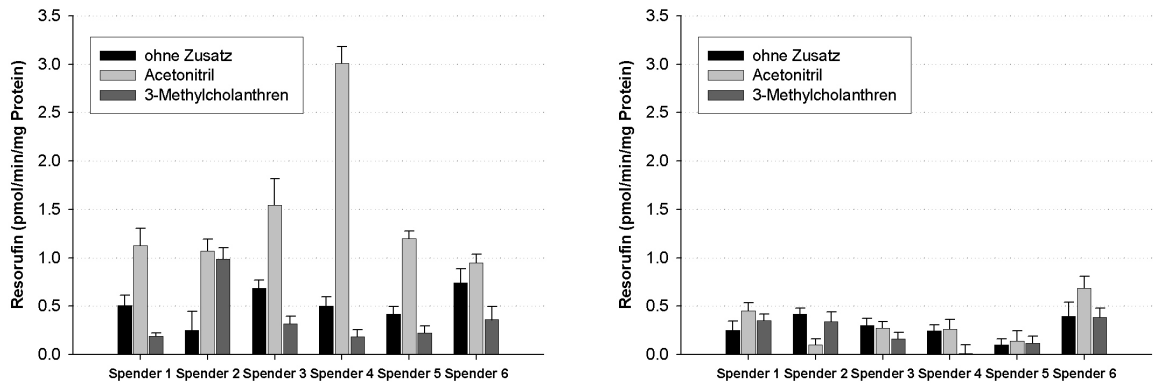
### 2.4.4.1. CYP1A1/2-Aktivität der induzierten Zellen

Zur Untersuchung der Induktion ist als Markerreaktion die Ethoxyresorufin-*O*-Desethylierung verwendet worden, wie bereits in Kapitel 2.4.3.1 für die CYP1A1/2-Aktivität beschrieben. Eine Steigerung der Umsetzung soll dabei auf eine Induktion schließen lassen.

In Abbildung 2.21 sind die CYP1A1/2-Aktivitäten nach 48-stündiger Induktion für klassisch aktivierte Makrophagen (a), für NeoHepatozyten (b) und als Kontrolle der Bedingungen für porcine Hepatozyten (c) aufgeführt. Da große interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Spendern bestehen, sind die Aktivitäten der einzelnen Spender aufgeführt. NeoHepatozyten und klassisch aktivierte Makrophagen stammen aus Buffy Coats von denselben Spendern. In Tabelle 2.25 sind die Aktivitäten in Prozent im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle mit Acetonitril aufgeführt.

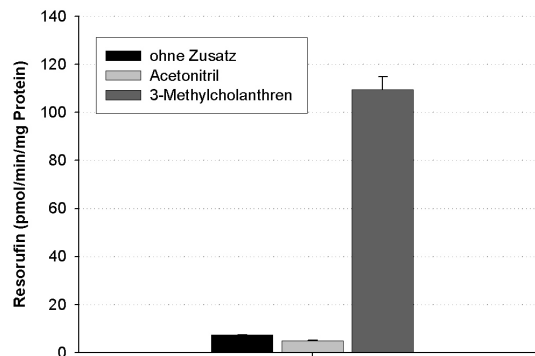
In klassisch aktivierten Makrophagen steigert Acetonitril als Lösungsmittelkontrolle die Aktivität, während 3-Methylcholanthren weitestgehend die Aktivität senkt. In NeoHepatozyten sind keine eindeutigen Effekte durch Acetonitril oder 3-Methylcholanthren zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist bei porcinen Hepatozyten eine Induktion um den Faktor 22 durch 3-Methylcholanthren im Vergleich zur Acetonitrilkontrolle zu beobachten. Acetonitril an sich reduziert die CYP1A1/2-Aktivität um den Faktor 1,5 im Vergleich zum reinen Kulturmedium. Die Ergebnisse der porcinen Hepatozyten zeigen, dass die Bedingungen geeignet gewesen sind, um CYP1A1/2 zu induzieren. In klassisch aktivierten Makrophagen und NeoHepatozyten lässt sich diese Enzymaktivität nicht induzieren.

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten



(a) klassisch aktivierte Makrophagen

(b) NeoHepatozyten



(c) porcine Hepatozyten

**Abbildung 2.21.:** CYP1A1/2 vermittelte Ethoxyresorufin-*O*-Desethylierung nach 48-stündiger Induktion mit 2,5  $\mu\text{M}$  3-Methylcholanthren, Acetonitril (0,66%) als Lösungsmittelkontrolle sowie die Grundaktivität von (a) klassisch aktivierten Makrophagen, (b) NeoHepatozyten und (c) porcinen Hepatozyten. Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SEM aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben.

CYP1A1/2- Induktion	ohne Zusatz	Acetonitril 0,66%	3-Methylcholanthren 2,5 $\mu$ M
Aktivität (%) bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle Acetonitril			
klassisch aktivierte Makrophagen			
Spender 1	45,1 $\pm$ 16,4	100 $\pm$ 26,8	17,0 $\pm$ 4,46
Spender 2	23,7 $\pm$ 31,3	100 $\pm$ 19,3	92,2 $\pm$ 18,3
Spender 3	44,5 $\pm$ 5,33	100 $\pm$ 28,9	20,7 $\pm$ 3,21
Spender 4	16,8 $\pm$ 3,36	100 $\pm$ 9,21	6,14 $\pm$ 0,85
Spender 5	34,9 $\pm$ 5,59	100 $\pm$ 3,97	18,5 $\pm$ 4,15
Spender 6	78,1 $\pm$ 23,7	100 $\pm$ 10,2	38,0 $\pm$ 21,2
NeoHepatozyten			
Spender 1	55,6 $\pm$ 32,3	100 $\pm$ 26,6	77,6 $\pm$ 20,2
Spender 2	453 $\pm$ 12,7	100 $\pm$ 76,9	335 $\pm$ 156
Spender 3	111 $\pm$ 21,7	100 $\pm$ 18,9	58,9 $\pm$ 15,1
Spender 4	92,3 $\pm$ 3,63	100 $\pm$ 73,4	4,00 $\pm$ 42,5
Spender 5	173 $\pm$ 70,9	100 $\pm$ 55,3	203 $\pm$ 119
Spender 6	57,8 $\pm$ 31,4	100 $\pm$ 24,7	56,4 $\pm$ 16,2
porcine Hepatozyten	148,3 $\pm$ 4,74	100 $\pm$ 7,57	1848 $\pm$ 836

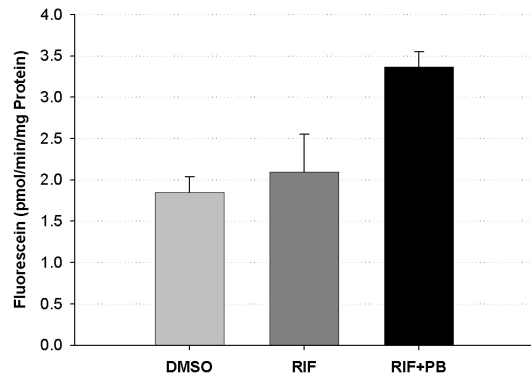
**Tabelle 2.25.:** Übersicht der Induktion der durch CYP1A1/2 katalysierten Ethoxyresorufin-O-Desethylierung im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle Acetonitril. Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SEM aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben.

#### 2.4.4.2. CYP3A4/5-Aktivität der induzierten Zellen

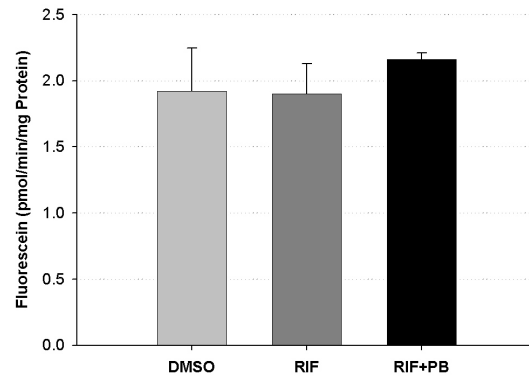
Zur Untersuchung der Induktion ist als Markerreaktion der Metabolismus von Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein (DBOMF) zu Fluorescein vermessen worden, wie bereits in Kapitel 2.4.3.4 für die CYP3A4/5-Aktivität beschrieben. Aus einer Steigerung der Umsetzung soll sich auf eine Induktion schließen lassen.

In Abbildung 2.22 sind die CYP3A4/5-Aktivitäten für klassisch aktivierte Makrophagen (a), für NeoHepatozyten (b) und als Kontrolle der Bedingungen für humane (c) und porcine (d) Hepatozyten aufgeführt. Bei diesem Versuch sind keine sehr großen interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Spender beobachtet worden, so dass die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt sind. NeoHepatozyten und klassisch aktivierte Makrophagen stammen aus Buffycoats von denselben Spendern.

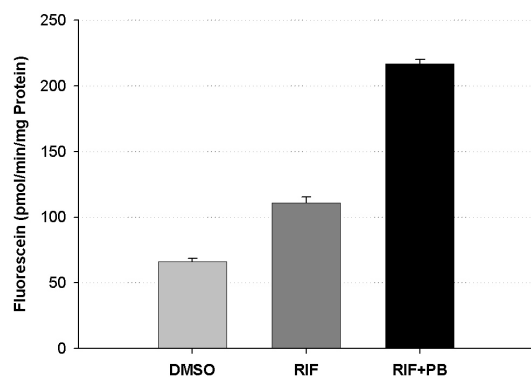
Sowohl in klassisch aktivierten Makrophagen und NeoHepatozyten als auch in humanen und porcinen Hepatozyten steigert der Einsatz von DMSO als Lösungsmittelkontrolle die Bildung des Metaboliten Fluorescein gegenüber der Kontrolle mit reinen Kulturmedium deutlich (Tabelle 2.26). Rifampicin und Phenobarbital zusammen steigern die Aktivität von klassisch aktivierten Makrophagen, wohingegen Rifampicin alleine im Vergleich zu DMSO keine Steigerung bewirkt. Dagegen hat in NeoHepatozyten Rifampicin weder alleine noch mit Phenobarbital zusammen Einfluss auf den DBOMF-Metabolismus. In humanen Hepatozyten zeigt sich durch Rifampicin eine signifikante Steigerung der Aktivität ( $p < 0,01$ ), die sich durch die Kombination von Rifampicin mit Phenobarbital fast verdoppelte. Damit ähnelt das Ansprechen der klassisch aktivierten Makrophagen auf CYP3A-Induktoren dem von humanen Hepatozyten. Porcine Hepatozyten weisen nur eine signifikante Steigerung ( $p < 0,001$ ) durch Rifampicin auf. Die Kombination von Rifampicin mit Phenobarbital führt zur keiner weiteren Steigerung der Aktivität. Das Ausmaß der Induktion durch Rifampicin ist in klassisch aktivierten Makrophagen, humanen und porcinen Hepatozyten unterschiedlich (Tabelle 2.26).



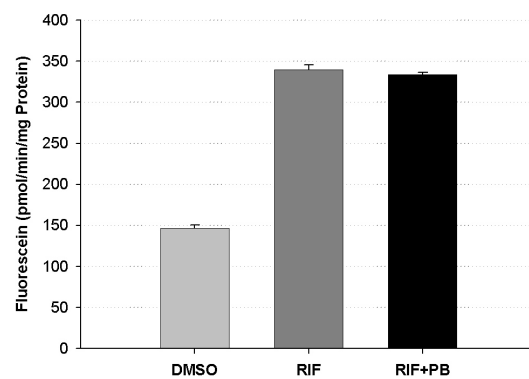
(a) klassisch aktivierte Makrophagen



(b) NeoHepatozyten



(c) humane Hepatozyten



(d) porcine Hepatozyten

**Abbildung 2.22.:** CYP3A4/5 vermittelter Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein-Metabolismus nach 48-stündiger Induktion mit 25  $\mu$ M Rifampicin (RIF), 25  $\mu$ M Rifampicin und 1,5 mM Phenobarbital (RIF+PB) und DMSO (0,1%) als Lösungsmittelkontrolle von (a) klassisch aktivierten Makrophagen, (b) NeoHepatozyten, (c) humanen und (d) porcinen Hepatozyten.

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SEM aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben. Um diese Werte zu ermitteln, sind kaM und NH von mindestens 3 Spender verwendet worden.



## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

CYP3A4/5- Induktion	Kontrolle	DMSO 0,1%	Rifampicin 25 $\mu$ M	Rifampicin und Phenobarbital 25 $\mu$ M und 1,5 mM
Aktivität (%) bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO				
klassisch aktivierte				
Makrophagen	28,7 $\pm$ 21,6	100 $\pm$ 19,6	113 $\pm$ 48,9	183 $\pm$ 24,2
NeoHepatozyten	22,5 $\pm$ 6,11	100 $\pm$ 31,8	86,7 $\pm$ 44,0	113 $\pm$ 5,11
humane Hepatozyten	53,4 $\pm$ 4,57	100 $\pm$ 5,64	168 $\pm$ 8,69	328 $\pm$ 6,53
porcine Hepatozyten	52,9 $\pm$ 8,48	100 $\pm$ 3,51	232 $\pm$ 5,12	228 $\pm$ 2,00

**Tabelle 2.26.:** Übersicht der Induktion des durch CYP3A4/5 katalysierten Dibenzyl-O-methoxyfluorescein-Metabolismus im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO.

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SEM aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben. Um diese Werte zu ermitteln, sind kaM und NH von mindestens 3 Spender verwendet worden.

## 2.4.5. Testosteron-Metabolismus

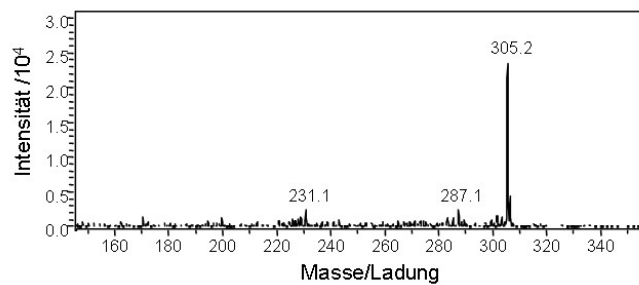
### 2.4.5.1. Untersuchung der Testosteron-Metaboliten durch LC/MS-Analytik

Bei der Vermessung von Inkubationsansätzen von NeoHepatozyten und klassisch aktivierten Makrophagen mit Testosteron durch HPLC mit UV-Detektion ist ein kleiner zeitlich minimal verschobener Peak statt des erwarteten  $6\beta$ -Hydroxytestosteron-Signal detektiert worden. Um zu klären, ob es sich dabei um das erwartete  $\beta$ -Hydroxytestosteron oder einen anderen Metaboliten handelt, sind die Proben durch LC/MS vermessen worden. Dabei hat sich gezeigt, dass der Molekularpeak des  $6\beta$ -Hydroxytestosterons  $m/z$  von 303 ( $[M-H_2+H]^+$ ) und der gebildete Metabolit ein Molekularpeak von  $m/z = 305$  ( $[M+H]^+$ ) aufweist. Die gebildeten Fragmentationen entsprechen der Abspaltung von Wasser. Daraufhin sind verschiedene mögliche Metabolite ausgewählt und als Standard bestellt worden und eine Methode ist entwickelt worden, die die Trennung der beiden Substanzen in kleinen Konzentrationen zur Identifizierung ermöglicht.

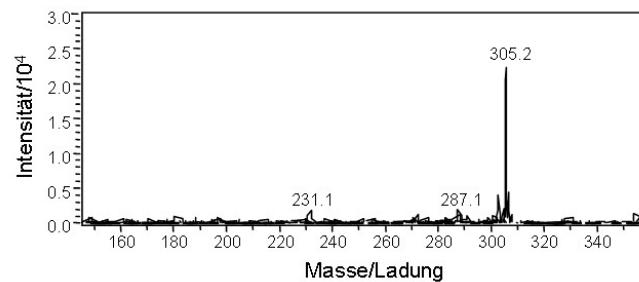
Aufgrund des gleichen Massen/Ladungs-Verhältnisses des Molekularpeaks ( $m/z = 305$ ), der erhaltenen Fragmentierung, des Masse/Ladungs-Verhältnis der Hauptfragmente und der gleichen Retentionszeit kann der Metabolit von NeoHepatozyten sowie von klassisch aktivierten Makrophagen als  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron identifiziert werden (Abbildung 2.23). Außerdem führt das Versetzen eines Inkubationsansatz mit  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron-Standard zu keiner Veränderung von der Retentionszeit, der Peakbreite der Ionenspur und des Massenspektrums bei einer Retentionszeit von 13,5 Minuten im Vergleich zum Inkubationsansatz ohne Zusatz. Als Hauptmetabolit von Testosteron nach der Inkubation mit NeoHepatozyten und klassisch aktivierten Makrophagen kann Androstendion identifiziert werden. Massen/Ladungs-Verhältnis des Molekularpeaks ( $m/z = 287$ ), erhaltene Fragmentierung, Masse/Ladungs-Verhältnis der Hauptfragmente und Retentionszeit von Metabolit und Androstendion-Standard stimmen überein (Abbildung 2.24).

Humane Hepatozyten bilden als Hauptmetaboliten von Testosteron  $6\beta$ -Hydroxytestosteron gefolgt von Androstendion. Weitere Hydroxytestosteron-Derivate entstehen ebenfalls als Metabolite.

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten



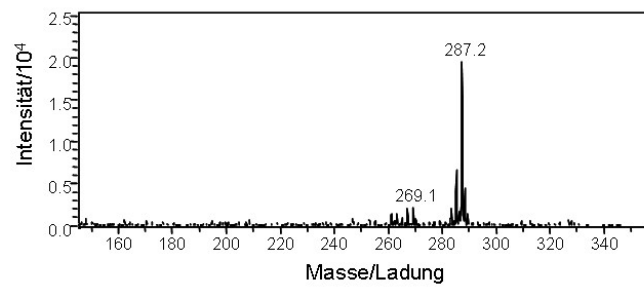
(a)  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron-Standard



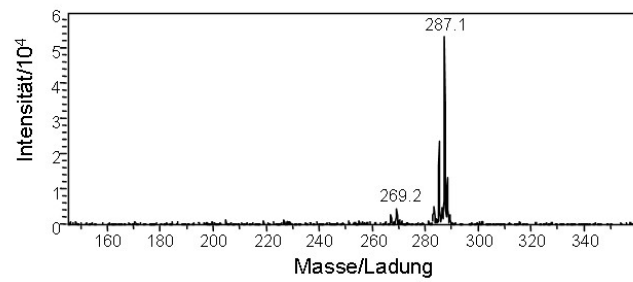
(b) Testosteron-Metabolit aus einer Inkubation mit NeoHepatozyten

**Abbildung 2.23.:** Repräsentative Massenspektren des  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron-Standards (a) und des Metaboliten aus einer Testosteron-Inkubation mit NeoHepatozyten (b) mit einer Retentionszeit von  $13,5 \pm 0,7$  min.

In Abbildung 2.25 sind repräsentative Ionenchromatogramme der Inkubationsansätze von klassisch aktivierten Makrophagen (a), NeoHepatozyten (b) und humane Hepatozyten (c) aufgeführt. In den Ionenchromatogrammen von klassisch aktivierten Makrophagen und NeoHepatozyten kann  $6\beta$ -Hydroxytestosteron in sehr geringen Konzentrationen detektiert werden. Identische Konzentrationen werden auch in der Kontrollinkubation mit durch Methanol getöteten Zellen und in der Testosteron-Substratlösung detektiert. Es scheint als würden NeoHepatozyten und klassisch aktivierte Makrophagen  $6\beta$ -Hydroxytestosteron nicht als Testosteron-Metaboliten bilden. Stattdessen können nur die Metaboliten  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron und Androstendion gefunden werden.



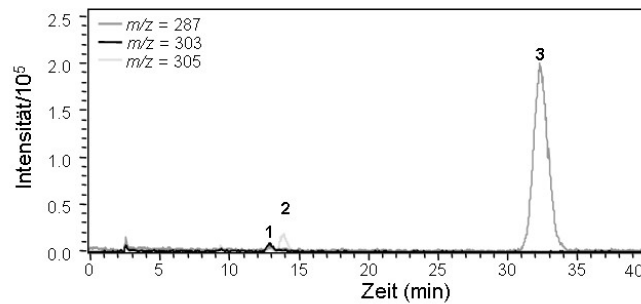
(a) Androstendion-Standard



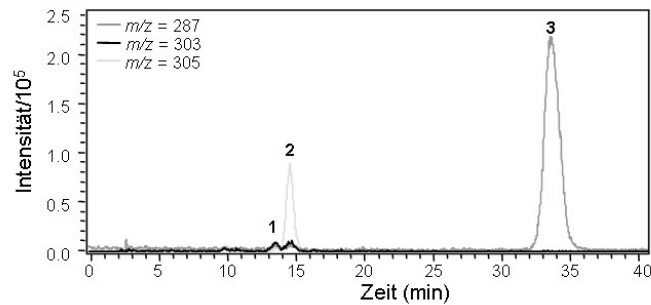
(b) Testosteron-Metabolit aus einer Inkubation mit Neo-Hepatozyten

**Abbildung 2.24.:** Repräsentative Massenspektren des Androstendion-Standards (a) und des Metaboliten aus einer Testosteron-Inkubation mit NeoHepatozyten (b) mit einer Retentionszeit von  $33 \pm 2,0$  min.

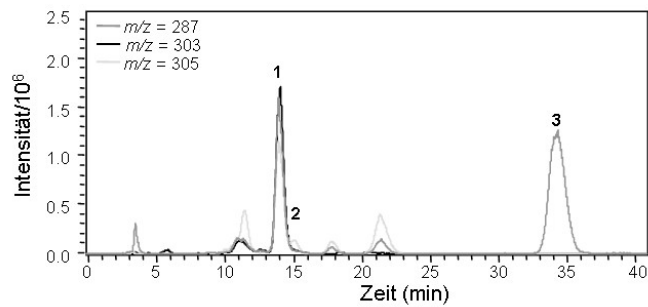
## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten



(a) klassisch aktivierte Makrophagen



(b) NeoHepatozyten



(c) humane Hepatozyten

**Abbildung 2.25.:** Repräsentative Ionenchromatogramme der Ionen 287, 303 und 305 von Testosteron-Inkubationen mit klassisch aktivierten Makrophagen (a), NeoHepatozyten (b) und humanen Hepatozyten (c).  $6\beta$ -Hydroxytestosteron (1),  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron (2) und Androstendion (3) können zugeordnet werden.

### 2.4.5.2. Quantifizierung der Testosteron-Metaboliten durch HPLC-Analytik

Zur Kalibrierung und Wiederfindung sind die Flächen der mittels HPLC-Analytik erhaltenen Signale mit den eingesetzten Konzentrationen korreliert worden. Da sich die Aktivitäten stark unterscheiden, sind unterschiedliche Kalibrierungs- und Wiederfindungskonzentrationen für primäre Hepatozyten und für monozytäre Zellen vermessen worden.

Zur Quantifizierung der durch monozytäre Zellen gebildeten Metabolite sind  $6\beta$ -Hydroxytestosteron und  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron in Konzentrationen von 20 nM bis 500 nM und Androstendion von 20 nM bis 2000 nM eingesetzt worden. Die Funktionen der Kalibrierung und Wiederfindung sind über den gesamten Konzentrationsbereich für  $6\beta$ -Hydroxytestosteron (Kalibrierung:  $r^2 = 0,9992$ ; Wiederfindung:  $r^2 = 0,9989$ ) und  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron (Kalibrierung:  $r^2 = 0,9994$ ; Wiederfindung:  $r^2 = 0,9988$ ) sowie Androstendion (Kalibrierung:  $r^2 = 0,9982$ ; Wiederfindung:  $r^2 = 0,9967$ ) linear verlaufen. Die Wiederfindungsrate für  $6\beta$ -Hydroxytestosteron hat  $174,2 \pm 16,3\%$ , für  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron  $111,0 \pm 23,0\%$  und für Androstendion  $100,9 \pm 8,1\%$  betragen.

$6\beta$ -Hydroxytestosteron ist in Konzentrationen von 10  $\mu$ M bis 150  $\mu$ M,  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron und Androstendion von 0,1  $\mu$ M bis 50  $\mu$ M zur Quantifizierung der durch Hepatozyten gebildeten Metaboliten eingesetzt worden. Die Funktionen der Kalibrierung und Wiederfindung sind über den gesamten Konzentrationsbereich für  $6\beta$ -Hydroxytestosteron (Kalibrierung:  $r^2 = 0,9993$ ; Wiederfindung:  $r^2 = 0,9993$ ) und  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron (Kalibrierung:  $r^2 = 0,9983$ ; Wiederfindung:  $r^2 = 0,9960$ ) sowie Androstendion (Kalibrierung:  $r^2 = 0,9960$ ; Wiederfindung:  $r^2 = 0,9962$ ) linear verlaufen. Die Wiederfindungsrate für  $6\beta$ -Hydroxytestosteron in diesen höheren Konzentrationen hat  $117,3 \pm 16,3\%$ , für  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron  $110,0 \pm 21,5\%$  und für Androstendion  $114,5 \pm 19,2\%$  betragen.

Die Auflösung zwischen  $6\beta$ -Hydroxytestosteron und  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron hat 0,7 betragen, d. h. die Peaks der beiden Substanzen überlappen sich mehr als 2% und sind nicht Basislinien getrennt, da die Auflösung deutlich kleiner als 1,4 ist. Aufgrund der kleinen Auflösung ist die Quantifizierung der Peakflächen von

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

6 $\beta$ -Hydroxytestosteron und 16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron mit einem größeren Fehler behaftet. Die Auflösung ist konzentrationsabhängig. Wird 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron, wie in primären Hepatozyten, in 300-fach höherem Ausmaß gebildet als 16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron, überdeckt der 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron-Peak den deutlich kleineren 16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron-Peak. Die Auflösung geht in diesem Fall gegen null.

### 2.4.5.2.1. Testosteron-Metabolismus von NeoHepatozyten, klassisch aktivierten Makrophagen und primären Hepatozyten

Zur Quantifizierung sind die Inkubationen mit Testosteron von NeoHepatozyten, klassisch aktivierten Makrophagen, humanen und porcinen Hepatozyten durch HPLC analysiert worden.

Der durch CYP3A-gebildete Testosteron-Metabolit 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron lässt sich in den Inkubationsansätzen von NeoHepatozyten und klassisch aktivierte Makrophagen nicht quantifizieren. In den Kontrollansätzen mit durch Methanol abgetöteten Zellen sind die gefundenen Peakflächen ähnlich hoch wie bei den Proben. Die Bestimmungsgrenze liegt bei 20 nM, was einer Aktivität von 0,06 pmol/min/mg Protein entsprechen würde. Diese Ergebnisse entsprechen den Ergebnissen der LC/MS-Vermessung (Kapitel 2.4.5.1). Die Testosteron-Metaboliten 16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron und Androstendion können in Inkubationsüberständen von NeoHepatozyten und klassisch aktivierten Makrophagen quantifiziert werden (Abbildung 2.26). Hierzu sind beispielhaft die Zellen von zwei Spendern verwendet worden. Die Umsetzungen von Testosteron durch beide Spender zu den Metaboliten 16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron (a) und Androstendion (c) erfolgt in stark unterschiedlichem Ausmaß, so dass beim Testosteron-Metabolismus von interindividuellen Einflüssen ausgegangen werden kann. Allerdings scheint der Testosteron-Metabolismus in NeoHepatozyten stärker ausgeprägt zu sein, als in klassisch aktivierten Makrophagen. NeoHepatozyten und klassisch aktivierte Makrophagen bilden als Hauptmetabolite von Testosteron Androstendion.

Humane Hepatozyten metabolisieren Testosteron hauptsächlich über CYP3A4 zu 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron (Abbildung 2.26 (b)). In geringerem Ausmaß wird An-

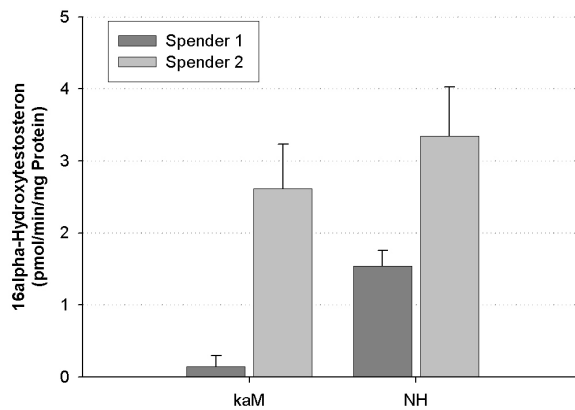
drostendion gebildet (d). Durch LC/MS kann ebenfalls die Bildung von  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron gezeigt werden (Kapitel 2.4.5.1). Wenn die Konzentration von  $6\beta$ -Hydroxytestosteron zu hoch ist, lässt sich mit der verwendeten HPLC-Methode  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron nicht mehr quantifizieren, so dass in Tabelle 2.27 auf Werte von Donato *et al.* (1999) zurückgegriffen worden ist.

Porcine Hepatozyten metabolisieren Testosteron in größeren Anteilen zu Androstendion als zu  $6\beta$ -Hydroxytestosteron (Abbildung 2.26 (b) und (d)). Humane Hepatozyten bilden  $6\beta$ -Hydroxytestosteron mit einer 3-fach höheren Aktivität als porcine Hepatozyten (Abbildung 2.26 (b)). Dagegen ist die Aktivität zur Bildung von Androstendion in porcinen Hepatozyten um den Faktor 3 stärker ausgeprägt (Abbildung 2.26 (d)). Der Metabolit Androstendion lässt sich in etwa 10-fach höheren Konzentrationen in den Inkubationsüberständen von primären Hepatozyten als in den Inkubationsüberständen von NeoHepatozyten und klassisch aktivierten Makrophagen detektieren (Abbildung 2.26 (c) und (d)).

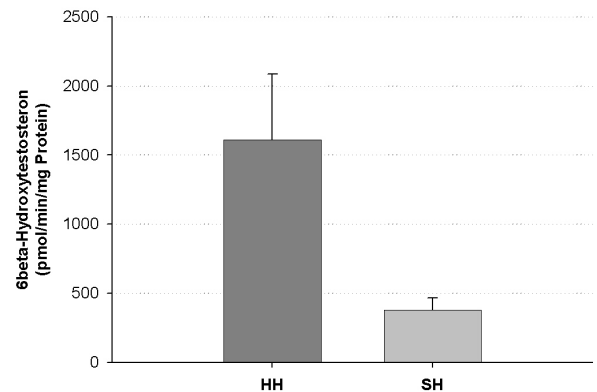
In Tabelle 2.27 sind die Aktivitäten zur Metabolisierung von Testosteron zu den einzelnen Metaboliten aufgeführt.



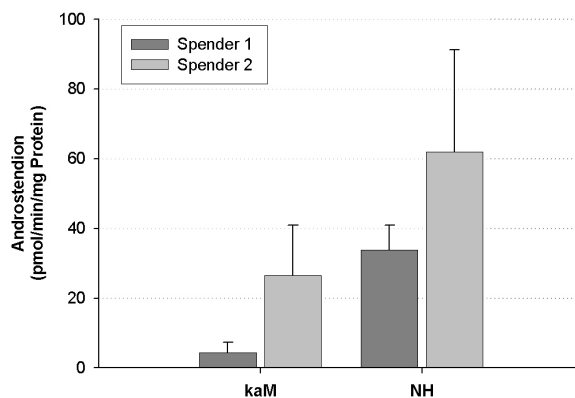
## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten



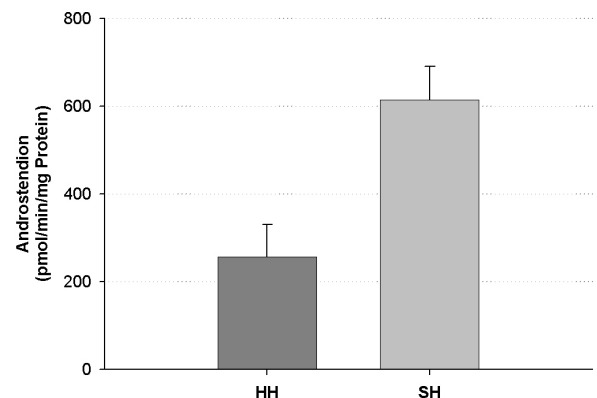
(a) 16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron-Bildung durch klassisch aktivierte Makrophagen und NeoHepatozyten



(b) 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron-Bildung durch humane und porcine Hepatozyten



(c) Androstendion-Bildung durch klassisch aktivierte Makrophagen und NeoHepatozyten



(d) Androstendion-Bildung durch humane und porcine Hepatozyten

**Abbildung 2.26.:** Testosteron-Metabolismus von NeoHepatozyten (NH), klassisch aktivierten Makrophagen (kaM), humanen (HH) und porcinen Hepatozyten (SH).

Testosteron wird durch kaM und NH zu 16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron (a) und Androstendion (c) metabolisiert. 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron als Testosteron-Metabolit von kaM und NH lässt sich nicht quantifizieren und fast nicht detektieren. HH und SH metabolisieren Testosteron zu 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron (b) und Androstendion (d). 16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron lässt sich in HH und SH nicht quantifizieren, da der Hauptmetabolit 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron in großen Konzentrationen den Peak von 16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron überdeckt.

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 4 Inkubationsansätzen angegeben.

	6 $\beta$ -Hydroxy- testosteron	16 $\alpha$ -Hydroxy- testosteron	Androstendion
	pmol/min/mg Protein		
klassisch aktivierte Makrophagen			
Spender 1	n. d.	0,14 $\pm$ 0,16	4,3 $\pm$ 3,1
Spender 2	n. d.	2,6 $\pm$ 0,62	27,6 $\pm$ 14,3
NeoHepatozyten			
Spender 1	n. d.	1,5 $\pm$ 0,22	33,8 $\pm$ 7,2
Spender 2	n. d.	3,4 $\pm$ 0,68	61,9 $\pm$ 29,3
humane Hepatozyten	1608 $\pm$ 480	5,1 $\pm$ 3,5 <sup>1</sup>	257 $\pm$ 73,5
porcine Hepatozyten	377 $\pm$ 89	12,9 $\pm$ 13,9 <sup>1</sup>	615 $\pm$ 76,6

**Tabelle 2.27.:** Übersicht der gebildeten Testosteron-Metaboliten.

<sup>1</sup> nach Donato *et al.* (1999). n. d.: nicht detektierbar. Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 3 verschiedenen Inkubationsansätzen angegeben.

#### 2.4.5.2.2. Testosteron-Metabolismus von induzierten humanen und porcinen Hepatozyten

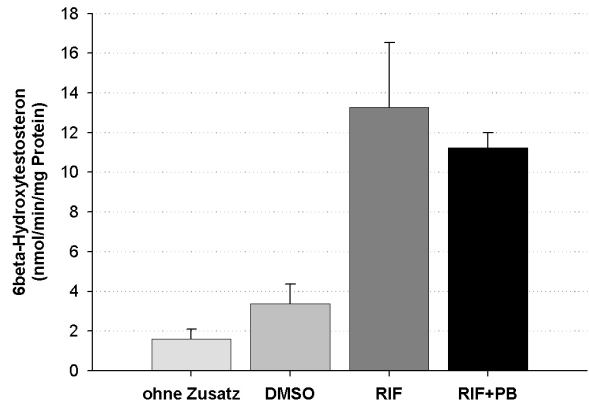
Es ist der Einfluß der CYP3A-Induktoren Rifampicin und Rifampicin in Kombination mit Phenobarbital auf den Metabolismus von Testosteron zu 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron und Androstendion untersucht worden (Abbildung 2.27). Als Kontrollen haben die Aktivitäten von in Kulturmedium ohne Zusätze und in DMSO-haltigem Medium als Lösungsmittelkontrolle kultivierten primären Hepatozyten gedient.

Die Umsetzung von Testosteron zu 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron durch humane Hepatozyten ist um den Faktor 4 stärker ausgeprägt als durch porcine Hepatozyten. Auch im Ansprechen auf die Induktoren bestehen Unterschiede in den beiden Spezies. Durch die Induktion bilden humane Hepatozyten 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron mit einer 8-fach höheren Aktivität als porcine Hepatozyten (Abbildung 2.27 (a) und (b)). In beiden Spezies ist das Ausmaß der Induktion gleich stark ausgeprägt. Sowohl bei humanen als auch bei porcinen Hepatozyten steigert die Kombination von Rifampicin und Phenobarbital den Metabolismus von Testosteron zu 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron

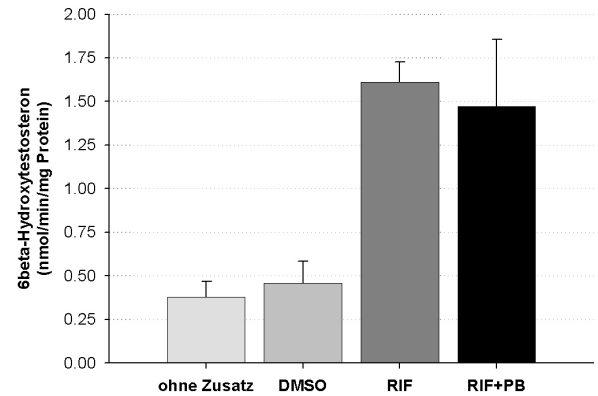
## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

nicht stärker als durch Rifampicin alleine.

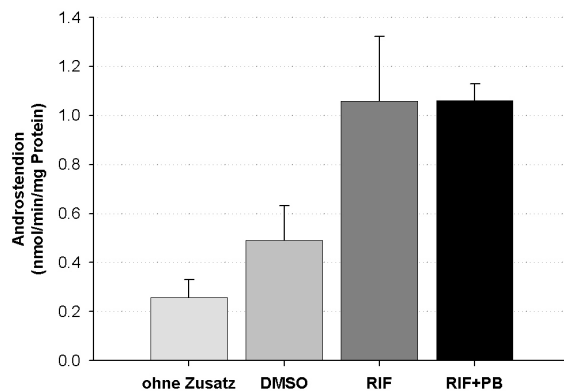
Die CYP3A-Induktoren haben keinen Einfluß auf den Metabolismus von Testosteron zu Androstendion durch Schweinehepatozyten (Abbildung 2.27 (d)). Rifampicin alleine und in Kombination mit Phenobarbital steigert diese Umsetzung durch humane Hepatozyten um den Faktor 4 (Abbildung 2.27 (c)). Porcine Hepatozyten bilden Androstendion mit einer 2,5-fach höheren Aktivität als humane Hepatozyten.



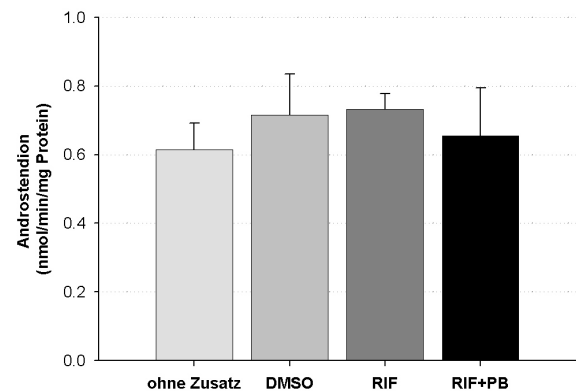
(a) 6β-Hydroxytestosteron-Bildung durch humane Hepatozyten



(b) 6β-Hydroxytestosteron-Bildung durch porcine Hepatozyten



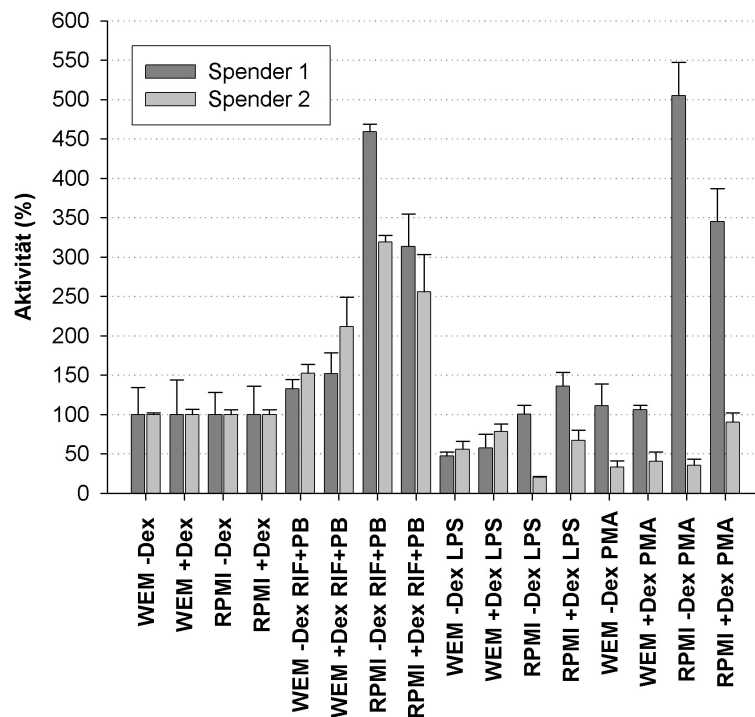
(c) Androstendion-Bildung durch humane Hepatozyten



(d) Androstendion-Bildung durch porcine Hepatozyten

**Abbildung 2.27.:** Testosteron-Metabolismus nach 48-stündiger Induktion durch 25  $\mu\text{M}$  Rifampicin (RIF), 25  $\mu\text{M}$  Rifampicin und 1,5 mM Phenobarbital (RIF+PB) und DMSO (0,1%) als Lösungsmittelkontrolle sowie die Grundaktivität zu 6β-Hydroxytestosteron durch humane (a) und porcine (b) Hepatozyten und zu Androstendion durch humane (c) und porcine (d) Hepatozyten.

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus 4 Inkubationsansätzen angegeben.

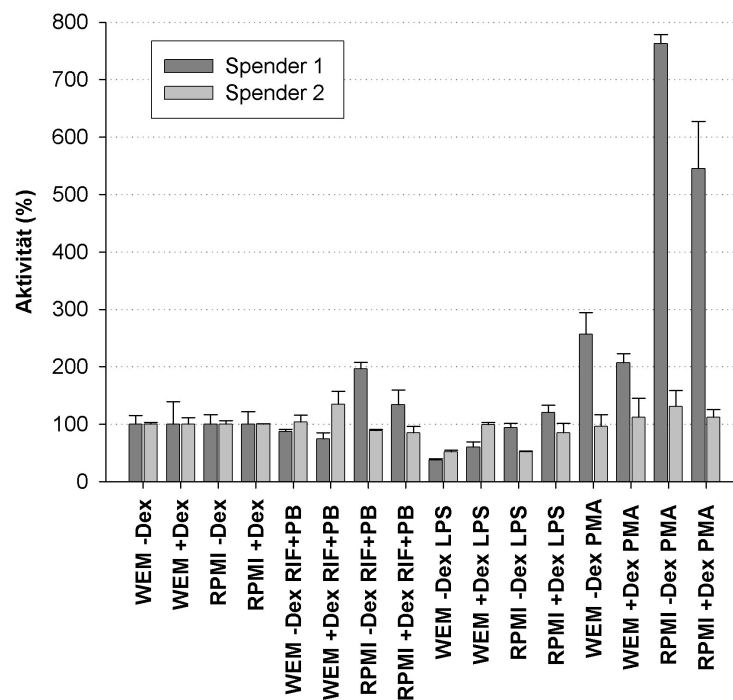


**Abbildung 2.28.:** Testosteron-Metabolismus zu  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron von unter verschiedenen Bedingungen kultivierten Zellen monozytären Ursprungs.

Die Zellen monozytären Ursprungs sind entweder in Williams E Medium (WEM) oder RPMI-Medium mit oder ohne Zusatz von Dexamethason (Dex) kultiviert worden. Dem Medium sind entweder Rifampicin und Phenobarbital (RIF+PB), Lipopolysaccharid (LPS) oder Phorbolmyristatacetat (PMA) zugesetzt worden. Die Aktivitäten sind auf das jeweilige Grundmedium ohne Zusätze bezogen.

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus 3 Inkubationsansätzen angegeben.

**2.4.5.2.3. Testosteron-Metabolismus von unter verschiedenen Bedingungen kultivierten Zellen monozytären Ursprungs** Durch verschiedene Kulturbedingungen ist versucht worden, die Expression von Cytochrom P450-Enzymen zu steigern, deswegen ist der Metabolismus von Testosteron untersucht worden. Die Aktivitäten des Testosteron-Metabolismus zu  $6\beta$ -Hydroxytestosteron,  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron und Androstendion durch die unter verschiedenen Bedingungen kultivierten Zellen monozytären Ursprungs sind in Tabelle 2.28 und 2.29 aufgeführt. In Abbildung 2.28 ist die Umsetzung von Testosteron zu  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron und in Abbildung 2.29 zu Androstendion dargestellt. Die Aktivitäten sind auf das



**Abbildung 2.29.:** Testosteron-Metabolismus zu Androstendion von unter verschiedenen Bedingungen kultivierten Zellen monozytären Ursprungs.

Die Zellen monozytären Ursprungs sind entweder in Williams E Medium (WEM) oder RPMI-Medium mit oder ohne Zusatz von Dexamethason (Dex) kultiviert worden. Dem Medium sind entweder Rifampicin und Phenobarbital (RIF+PB), Lipopolysaccharid (LPS) oder Phorbolmyristatacetat (PMA) zugesetzt worden. Die Aktivitäten sind auf das jeweilige Grundmedium ohne Zusätze bezogen.

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus 3 Inkubationsansätzen angegeben.

jeweilige Grundmedium mit bzw. ohne Zusatz von Dexamethason bezogen.

$6\beta$ -Hydroxytestosteron kann nur in drei Inkubationsüberständen detektiert werden. Bei den übrigen Proben kann kein Unterschied zu den mit Methanol abgetöteten Zellen festgestellt werden. Bei beiden Spendern wird nur  $6\beta$ -Hydroxytestosteron gebildet, wenn die Zellen in RPMI-Medium ohne Dexamethason mit Lipopolysaccharid als Zusatz kultiviert worden sind. In den Zellen von einem Spender, die in RPMI-Medium ohne Dexamethason mit Phorbolmyristatacetat als Zusatz kultiviert worden sind, kann ebenfalls  $6\beta$ -Hydroxytestosteron als Testosteron-Metabolit bestimmt werden (Tabelle 2.29).

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

Der Zusatz der CYP-Induktoren Rifampicin und Phenobarbital zu RPMI als Grundmedium steigert die Umsetzung von Testosteron zu  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron signifikant ( $p < 0,01$ ). Werden die CYP-Induktoren Rifampicin und Phenobarbital dem Williams E Medium zugesetzt, führt dies ebenfalls zu einem gesteigerten Metabolismus zu  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron, der allerdings nicht signifikant ist. Lipopolysaccharid als Zusatz steigert den Metabolismus zu  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron nicht. Eine verstärkte Bildung von  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron bei den in RPMI-Medium kultivierten Zellen mit Phorbolmyristataacetat erfolgt allerdings nur durch Zellen von einem Spender. Bei diesem Spender kann auch der verstärkte Metabolismus zu  $6\beta$ -Hydroxytestosteron festgestellt werden. Bei den Zellen des zweiten Spenders zeigt Phorbolmyristataacetat keinen Einfluss auf die Umsetzung zu  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron (Abbildung 2.28).

Der Testosteron-Metabolismus zu Androstendion bleibt durch die verschiedenen Zusätze weitestgehend unbeeinflusst. Phorbolmyristataacetat steigert lediglich diese Umsetzung bei den Zellen von einem Spender (Abbildung 2.29). Bei diesem Spender steigert Phorbolmyristataacetat die Umsetzung von Testosteron zu den drei untersuchten Metaboliten  $6\beta$ -Hydroxytestosteron,  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron und Androstendion.

	6 $\beta$ -Hydroxy- testosteron	16 $\alpha$ -Hydroxy- testosteron	Androstendion
	pmol/min/mg Protein		
WEM – Dex ohne Zusätze			
Spender 1	n. d.	4,4 $\pm$ 1,5	68,2 $\pm$ 10,5
Spender 2	n. d.	6,1 $\pm$ 0,1	104 $\pm$ 3,0
WEM + Dex ohne Zusätze			
Spender 1	n. d.	4,6 $\pm$ 2,0	85,7 $\pm$ 33,8
Spender 2	n. d.	4,2 $\pm$ 0,3	61,9 $\pm$ 7,0
RPMI – Dex ohne Zusätze			
Spender 1	n. d.	3,0 $\pm$ 0,8	41,2 $\pm$ 7,0
Spender 2	n. d.	5,7 $\pm$ 0,4	75,9 $\pm$ 4,5
RPMI + Dex ohne Zusätze			
Spender 1	n. d.	2,9 $\pm$ 0,8	31,5 $\pm$ 6,9
Spender 2	n. d.	5,6 $\pm$ 0,3	62,7 $\pm$ 0,8
WEM – Dex RIF+PB			
Spender 1	n. d.	5,8 $\pm$ 0,5	59,8 $\pm$ 2,3
Spender 2	n. d.	9,2 $\pm$ 0,7	107 $\pm$ 12,4
WEM + Dex RIF+PB			
Spender 1	n. d.	7,1 $\pm$ 1,2	64,2 $\pm$ 8,8
Spender 2	n. d.	8,9 $\pm$ 1,6	83,3 $\pm$ 14,3
RPMI – Dex RIF+PB			
Spender 1	n. d.	13,8 $\pm$ 0,3	81,2 $\pm$ 4,5
Spender 2	n. d.	18,5 $\pm$ 0,5	67,7 $\pm$ 1,5
RPMI + Dex RIF+PB			
Spender 1	n. d.	6,9 $\pm$ 0,9	42,3 $\pm$ 8,1
Spender 2	n. d.	14,3 $\pm$ 2,7	53,5 $\pm$ 6,8

**Tabelle 2.28.:** Übersicht der durch unter verschiedenen Bedingungen kultivierten Zellen monozytären Ursprungs gebildete Testosteron-Metabolite.

Die Zellen monozytären Ursprungs sind entweder in Williams E Medium (WEM) oder RPMI-Medium mit oder ohne Zusatz von Dexamethason (Dex) kultiviert worden. Dem Medium sind entweder Rifampicin und Phenobarbital (RIF+PB), Lipopolysaccharid (LPS) oder Phorbolmyristatacetat (PMA) zugesetzt worden (Tabelle 2.29).

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus 3 Inkubationsansätzen angegeben. n. d.: nicht detektierbar.



## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

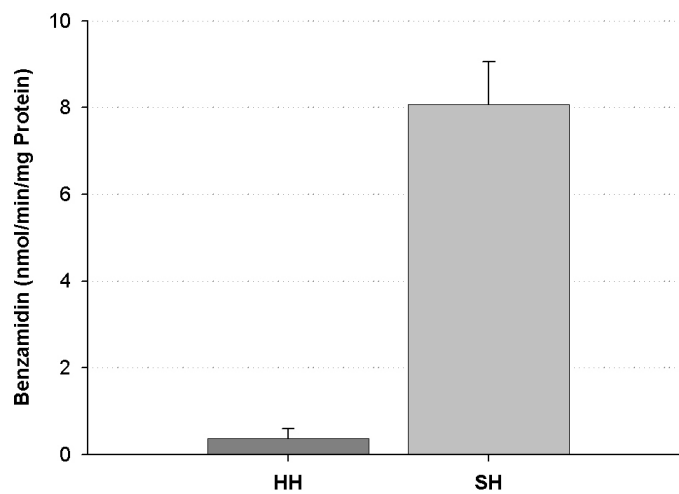
	6 $\beta$ -Hydroxy- testosteron	16 $\alpha$ -Hydroxy- testosteron	Androstendion
	pmol/min/mg Protein		
WEM – Dex LPS			
Spender 1	n. d.	2,1 $\pm$ 0,2	25,5 $\pm$ 1,8
Spender 2	n. d.	3,4 $\pm$ 0,6	54,1 $\pm$ 2,6
WEM + Dex LPS			
Spender 1	n. d.	2,7 $\pm$ 0,8	51,6 $\pm$ 7,9
Spender 2	n. d.	3,3 $\pm$ 0,4	61,4 $\pm$ 2,3
RPMI – Dex LPS			
Spender 1	1,5 $\pm$ 0,51	3,0 $\pm$ 0,3	38,9 $\pm$ 3,0
Spender 2	2,9 $\pm$ 0,37	1,2 $\pm$ 0,1	39,4 $\pm$ 1,3
RPMI + Dex LPS			
Spender 1	n. d.	3,0 $\pm$ 0,4	38,0 $\pm$ 4,1
Spender 2	n. d.	3,8 $\pm$ 0,7	53,1 $\pm$ 10,8
WEM – Dex PMA			
Spender 1	n. d.	4,9 $\pm$ 1,2	175 $\pm$ 26,1
Spender 2	n. d.	2,0 $\pm$ 0,5	99,7 $\pm$ 20,7
WEM + Dex PMA			
Spender 1	n. d.	4,9 $\pm$ 0,3	177 $\pm$ 13,9
Spender 2	n. d.	1,7 $\pm$ 0,5	69,6 $\pm$ 20,4
RPMI – Dex PMA			
Spender 1	18,5 $\pm$ 0,84	15,2 $\pm$ 1,3	314 $\pm$ 6,5
Spender 2	n. d.	2,0 $\pm$ 0,5	99,7 $\pm$ 20,7
RPMI + Dex PMA			
Spender 1	n. d.	7,6 $\pm$ 0,9	172 $\pm$ 25,8
Spender 2	n. d.	5,1 $\pm$ 0,7	70,7 $\pm$ 8,4

**Tabelle 2.29.:** Übersicht der durch unter verschiedenen Bedingungen kultivierten Zellen monozytären Ursprungs gebildete Testosteron-Metabolite.

Die Zellen monozytären Ursprungs sind entweder in Williams E Medium (WEM) oder RPMI-Medium mit oder ohne Zusatz von Dexamethason (Dex) kultiviert worden. Dem Medium sind entweder Rifampicin und Phenobarbital (RIF+PB), Lipopolysaccharid (LPS) oder Phorbolmyristataacetat (PMA) zugesetzt worden (Tabelle 2.29).

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus 3 Inkubationsansätzen angegeben. n. d.: nicht detektierbar.

### 2.4.6. Benzamidoxim-Metabolismus



**Abbildung 2.30.:** Benzamidoxim-Metabolismus zu Benzamidin durch humane (HH) und porcine (SH) Hepatozyten.

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 3 Inkubationsansätzen angegeben.

Zur Kalibrierung und Wiederfindung des Benzamidins sind die Flächen der mittels HPLC-Analytik erhaltenen Signale mit den eingesetzten Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  korreliert worden. Die Funktionen der Kalibrierung ( $r^2 = 0,9998$ ) und Wiederfindung ( $r^2 = 0,9872$ ) sind über den gesamten Konzentrationsbereich linear verlaufen. Die Wiederfindungsrate hat  $104 \pm 14\%$  betragen. Die Bestimmungsgrenze von Benzamidin liegt bei 0,1  $\mu\text{M}$ , das entspricht einer Aktivität von 0,013 nmol/min/mg Protein.

In klassisch aktivierten Makrophagen und NeoHepatozyten kann kein Metabolismus von Benzamidoxim zu Benzamidin detektiert werden. Auch der Einsatz der doppelten Menge Zellhomogenisat führt nicht zur Detektion von Benzamidin. Humane und porcine Hepatozytenhomogenisate metabolisieren Benzamidoxim zu Benzamidin. Allerdings besitzen porcine Hepatozyten eine 20-fach höhere Aktivität als humane Hepatozyten (Abbildung 2.30). Die Aktivität der Benzamidoxim-*N*-Reduktion von humanen Hepatozyten beträgt  $0,38 \pm 0,22$  nmol Benzamidin/min/mg Protein und von porcinen Hepatozyten  $8,1 \pm 0,99$  nmol Benzamidin/min/mg Protein.

## 2.5. Diskussion

Aus Monozyten generierte NeoHepatozyten sind hinsichtlich ihrer Cytochrom P450-Aktivitäten, deren Inhibition und Induktion, ihres Testosteron-Metabolismus und ihrer *N*-reduktiven Fähigkeiten untersucht worden. Diese Bestimmungen sind ebenfalls mit klassisch aktivierten Makrophagen und primären Hepatozyten durchgeführt worden. Klassisch aktivierte Makrophagen dienen als Vergleich, um zu bestimmen, ob die metabolische Kompetenz für NeoHepatozyten spezifisch ist, oder ob es sich um eine generelle Fähigkeit von aus Monozyten differenzierten Zellen handelt. Als Standard dienen humane Hepatozyten, da deren Metabolismus, Inhibition und Induktion NeoHepatozyten als "neuen Hepatozyten" entsprechen sollen.

NeoHepatozyten ähneln in ihrem Verhalten klassisch aktivierten Makrophagen, so dass es sich eher um eine weitere Makrophagen-Subpopulation handelt als um Hepatozyten. Im Rahmen dieser Untersuchungen ist ein Vergleich von porcine Hepatozyten in vielen Kriterien mit humanen Hepatozyten möglich. Porcine Hepatozyten erweisen sich als gute Alternative zu humanen Hepatozyten, um den Metabolismus von Arzneistoffen und deren Wechselwirkungspotential zu untersuchen.

Anhand von Substraten mit fluoreszierenden Metaboliten sind die CYP1A1/2-, CYP2C9-, CYP2E1- und CYP3A4/5-Aktivitäten untersucht worden. Desweiteren ist von Interesse gewesen, ob diese Aktivitäten hemmbar und induzierbar sind.

NeoHepatozyten *O*-desethylieren CYP1A1/2-vermittelt Ethoxyresorufin zu Resorufin. Durch die Hemmung mit Metyrapon wird eine Umsetzung durch CYP-Isoenzyme bestätigt. Die gemessene CYP1A1/2-Aktivität und das Ausmaß der Metyrapon-Hemmung von NeoHepatozyten liegen im gleichen Bereich wie humane Hepatozyten und klassisch aktivierte Makrophagen.

Die Basalaktivität der Ethoxyresorufin-*O*-Desethylierung von humanen Hepatozyten ist gering (Hengstler *et al.* 2000, Xu *et al.* 2000) und erfolgt hauptsächlich über CYP1A2 (Steinberg *et al.* 1999).

Dass NeoHepatozyten in der Lage sind Ethoxyresorufin zu Resorufin metabolisieren, ist bereits von Brulport (2006) gezeigt worden. Auch 3-Cyano-7-ethoxycumarin als Substrat für CYP1A1/2 wird von NeoHepatozyten in ähnlichem Ausmaß wie von humanen Hepatozyten metabolisiert. Diese Umsetzung lässt sich durch CYP-Inhibitoren hemmen (Ehnert *et al.* 2008). Die von Ruhnke *et al.* (2005a und 2005b) bestimmte 7-Ethoxycumarin-*O*-Desethylierung durch NeoHepatozyten wird unter anderem durch CYP1A2 katalysiert, so dass der Metabolismus CYP1A katalysiert sein könnte. Im humanen Hepatozyten erfolgt die Desethylierung von Ethoxycumarin hauptsächlich über CYP1A2, CYP2B6 und CYP2E1 (Steinberg *et al.* 1999).

Klassisch aktivierte Makrophagen weisen ebenfalls eine hemmbare CYP1A1/2-Aktivität auf. Borodin *et al.* (2005) hat in einer anderen Makrophagen-Subpopulation CYP1A-vermittelten Metabolismus detektieren können. Der CYP1A-vermittelte Metabolismus könnte in Makrophagen einen Schutz vor Fremdstoffen darstellen.

Im Gegensatz zu porcinen Hepatozyten kann im Rahmen dieser Arbeit keine Induktion der CYP1A1/2-Aktivität durch den AhR-Liganden 3-Methylcholanthren in NeoHepatozyten detektiert werden. Die Reaktionen auf Lösungsmittel und Induktor zeigen interindividuelle Schwankungen. Ebenso ist durch Brulport (2006) keine Induktion der CYP1A1/2-Aktivität, weder durch 3-Methylcholanthren noch durch Phenobarbital, festgestellt worden. Im Gegensatz dazu haben Ruhnke *et al.* (2005a und 2005b) eine Induktion der 7-Ethoxycumarin-*O*-Desethylierungsaktivität in NeoHepatozyten durch 3-Methylcholanthren im gleichen Ausmaß wie in humanen Hepatozyten detektiert. Ehnert *et al.* (2008) kann die Induktion der CYP1A1/2-Aktivität durch 3-Methylcholanthren, nicht aber durch Rifampicin feststellen. Dazu ist allerdings eine zehnfach höhere Konzentration als für die CYP1A1/2-Induktion in humanen Hepatozyten nötig. Das Ausmaß der Induktion ist in humanen Hepatozyten geringfügig höher als in NeoHepatozyten. Durch den Induktor 3-Methylcholanthren kann in zehnfach geringerer Konzentration die CYP1A1/2-Aktivität um den Faktor 20 bis 42, wie von Masubuchi *et al.* (1998) an-

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

gegeben, statt um den Faktor 4, wie bei Ehnert *et al.* (2008) beschrieben, gesteigert werden. Auch in dem Kontrollansatz für die Induktionsbedingungen, der in dieser Arbeit verwendet worden ist, erfolgt eine Steigerung der CYP1A1/2-Aktivität in porcinen Hepatozyten um den Faktor 22. Wenn ein hoch potenter Induktor wie 3-Methylcholanthren die CYP1A1/2-Aktivität in NeoHepatozyten gar nicht bzw. minimal steigert, werden die Effekte von weniger potenten Induktoren sehr gering sein. Somit sind NeoHepatozyten nicht geeignet, um neue Arzneistoffe hinsichtlich ihres Induktionspotentials zu untersuchen.

Die CYP1A1/2-Aktivität von klassisch aktivierten Makrophagen wird wie bei den NeoHepatozyten, nicht durch 3-Methylcholanthren induziert. Nach der Kultivierung mit Acetonitril als Lösungsmittelkontrolle kann eine gesteigerte Aktivität festgestellt werden. Im Gegensatz dazu kann in porcinen Hepatozyten durch Acetonitril keine Aktivitätssteigerung gemessen werden. In der Literatur finden sich sowohl Hinweise auf eine Induktionsfähigkeit der CYP1A-Aktivität und -Expression in Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten als auch kein Ansprechen von Makrophagen auf CYP1A-Induktoren (Baron *et al.* 1998, Borodin *et al.* 2005, Vanden Heuvel *et al.* 1993, Lang *et al.* 1996, Nakamura *et al.* 1998, Krovat *et al.* 2000).

In dieser Arbeit kann hinsichtlich des CYP1A1/2 deutlich gezeigt werden, dass NeoHepatozyten, wie klassisch aktivierte Makrophagen nicht auf CYP1A1/2-Induktoren ansprechen. In primären Hepatozyten dagegen lässt sich die CYP1A1/2-Aktivität extensiv steigern.

Der CYP2C9-vermittelte Metabolismus von Octyl-*O*-methoxyresorufin zu Resorufin fällt in NeoHepatozyten sehr gering aus und lässt sich durch den CYP-Inhibitor Metyrapon nicht hemmen.

7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarin wird neben CYP2E1 in geringerem Ausmaß auch durch CYP2C9 metabolisiert (Ghosal *et al.* 2003, Donato *et al.* 2004). Durch HPLC-Analytik mit Fluoreszenz-Detektion kann der 7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarin-Metabolit 7-Hydroxy-4-trifluoromethylcumarin nicht detektiert werden. Ruhnke *et al.* (2005b) haben CYP2C9 mRNA aus NeoHepatozyten, nicht aber aus PCMO amplifizieren können. Zur mRNA-Gewinnung werden

verschiedene Zellen gepoolt. Allerdings lassen sich nur in einigen Subpopulation von NeoHepatozyten mittels immunohistochemischer Färbung CYP2D6 und CYP2C9 detektieren (Ruhnke *et al.* 2005b). Diese Ergebnisse legen nahe, dass NeoHepatozyten kein aktives CYP2C9 und CYP2E1 exprimieren bzw. nur in so geringen Mengen, dass eine Aktivitätsbestimmung nicht mehr möglich ist.

Im Widerspruch dazu haben Ehnert *et al.* (2008) in NeoHepatozyten sowohl CYP2C9- also auch CYP2E1-Aktivitäten bestimmt. Allerdings ist nicht untersucht worden, ob CYP-Hemmstoffe diesen Metabolismus beeinflussen. Wird der CYP2E1-Metabolit 7-Hydroxy-4-trifluoromethylcumarin ausschließlich per Fluoreszenz-Plattenleser vermessen, kann ebenso eine Zunahme der Fluoreszenz gemessen werden. In dieser Arbeit kann eindeutig durch die HPLC-Vermessung gezeigt werden, dass NeoHepatozyten kein 7-Hydroxy-4-trifluoromethylcumarin bilden. Da NADPH die direkte fluorimetrische Vermessung von 7-Hydroxy-4-trifluoromethylcumarin stört, ist bekannt, dass sich dieser Metabolit in geringen Konzentrationen nicht korrekt erfassen lässt (Greenlee und Poland 1978, Chauret *et al.* 1999). Aus diesem Grund stellt die Detektion von 7-Hydroxy-4-trifluoromethylcumarin durch HPLC mit Fluoreszenz-Detektion die genauere Methode dar (Chauret *et al.* 1999, Bell *et al.* 2008). Die Unterschiede der direkt fluorimetrisch und durch HPLC mit Fluoreszenz-Detektion bestimmten Aktivitäten von humanen und porcinen Hepatozyten sind groß, obwohl die CYP2E1-Aktivitäten mit beiden Methoden problemlos zu detektieren sind (Tabellen 2.21 und 2.22). Die direkte fluorimetrisch bestimmte Aktivität des 7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarin-Metabolismus von homogenisierten humanen Hepatozyten liegt im gleichen Bereich, wie die von Ghosal *et al.* (2003) auf die gleiche Weise bestimmte Aktivität für humane kryokonservierte Hepatozyten.

Klassisch aktivierte Makrophagen setzen Octyl-*O*-methoxyresorufin zu Resorufin um. Eine signifikante Hemmung durch den CYP-Inhibitor Metyrapon erfolgt wie in NeoHepatozyten jedoch nicht. Auch bei dieser Umsetzung konnte für NeoHepatozyten das gleiche Verhalten wie für klassisch aktivierte Makrophagen gezeigt werden. Im Gegensatz dazu kann für humane primäre Hepatozyten eine fast 10-fach höhere Umsetzungsrate bestimmt werden, die sich signifikant durch

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

Metyrapon hemmen lässt.

In Monozyten und monozytären Makrophagen ist bisher keine CYP2C9-Expression entdeckt worden. In Alveolarmakrophagen kann hingegen CYP2C mRNA detektiert werden (Hukkanen *et al.* 1997). Monozyten zeigen eine CYP2E1-Aktivität und -Expression (Peterson 1987, Baron *et al.* 1998). CYP2E1 mRNA kann hingegen nicht in allen Makrophagen-Subpopulationen detektiert werden (Baron *et al.* 1998). Klassisch aktivierte Makrophagen scheinen somit zu einer Subpopulation zugehören, die kein aktives CYP2E1 besitzen, wie die HPLC-Chromatogramme der Inkubationsansätze mit dem CYP2E1-Substrat 7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarin zeigen.

NeoHepatozyten setzen Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein zu Fluorescein um. Hierbei finden sowohl *O*-Debenzylierungen als auch *O*-Demethylierungen statt. Diese Reaktionen scheinen in NeoHepatozyten aber nicht CYP3A4- oder CYP3A5-vermittelt zu sein, da weder der selektive CYP3A4-Inhibitor Ketoconazol noch der nicht-selektive CYP-Inhibitor Metyrapon die Umsetzung beeinflussen. Ketoconazol ist ein potenter Inhibitor des Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein-Metabolismus durch rekombinate humane Enzyme (Trubetskoy *et al.* 2005b). Keinen Effekt auf die Umsetzung hat der Zusatz von NADH statt NADPH und das Weglassen von NADPH auf die Umsetzung. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Zellhomogenisate entweder selbst in Lage zu sind, NADPH und NADH zu generieren, oder der Metabolismus von Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein zu Fluorescein durch diese Cofaktoren nicht beeinflusst wird.

NeoHepatozyten exprimieren kein CYP3A5, aber in sehr geringen Mengen CYP3A4 (Riquelme *et al.* 2008). Diese sehr geringe Expression erklärt einen nicht detektierbaren Metabolismus. Die von Ruhnke *et al.* (2005b) verwendeten Primer für CYP3A4 amplifizieren auch CYP3A7, welches NeoHepatozyten interindividuell exprimieren (Riquelme *et al.* 2008). Riquelme *et al.* (2008) haben viele potentielle Primer für CYP3A4 mRNA getestet, bis mittels eines spezifischen Primers CYP3A4 mRNA detektiert werden konnte.

Ehnert *et al.* (2008) stellen in NeoHepatozyten einen deutlich geringen CYP3A4-

Metabolismus als in humanen Hepatozyten fest. Als CYP3A4-Substrat ist 7-Benzyloxy-4-trifluoromethylcumarin verwendet worden, welches zu 7-Hydroxy-4-trifluoromethylcumarin metabolisiert wird. Wie schon für den Metabolismus von 7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarin als CYP2E1-Substrat beschrieben, ist die direkt fluorimetrische Erfassung von 7-Hydroxy-4-trifluoromethylcumarin fehlerbehaftet. Vielleicht stellt 7-Benzyloxy-4-trifluoromethylcumarin ein CYP3A4-Substrat mit höherer Affinität zum CYP3A4-Isoenzym als Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein dar, so dass mit diesem Substrat sehr geringe CYP3A4-Aktivitäten detektiert werden können.

Klassisch aktivierte Makrophagen exprimieren kein CYP3A4, aber in sehr geringen Mengen CYP3A5 und CYP3A7 (Riquelme *et al.* 2008). Das CYP3A4/5-Substrat Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein wird zu Fluorescein durch klassisch aktivierte Makrophagen metabolisiert, allerdings haben die Inhibitoren wie bei NeoHepatozyten keinen Einfluß auf die *O*-Debenzylierungen und *O*-Demethylierungen. Die CYP3A5-Expression ist scheinbar zu gering, um meßbare Enzymaktivitäten hervorzurufen. Alveolarmakrophagen exprimieren CYP3A5 (Hukkanen *et al.* 1997, Piipari *et al.* 2000). In monozytären Makrophagen finden Hodges *et al.* (2000) CYP3A4 mRNA. Baron *et al.* (1998) dagegen kann in Monozyten und Makrophagen keine CYP3A4 mRNA amplifizieren. Auch von anderen Arbeitskreisen kann keine CYP3A-Aktivität in Monozyten und Leukozyten bestimmt werden (Baron *et al.* 1998, Jarnadon *et al.* 1996).

Weder Rifampicin alleine noch in Kombination mit Phenobarbital steigern den Metabolismus von Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein in NeoHepatozyten. Da der CYP1A1/2-Metabolismus und der Metabolismus eines CYP3A4-Substrates in NeoHepatozyten nicht induzierbar ist, sind NeoHepatozyten nicht geeignet, um auf das Induktionspotential von neuen Arzneistoffkandidaten zu prüfen. Um Einflüsse von unbekanntem Substanzen im Serum ausschließen zu können, sollte eigentlich das Induktionspotential in Serum-freiem Medium durchgeführt werden (LeCluyse 2001). Im Serum-freiem Medium lassen sich klassisch aktivierte Makrophagen nicht kultivieren. Zur Schaffung einheitlicher Bedingungen ist die Serumkonzentration



## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

beibehalten worden. Im Körper kann ein Arzneistoff auch mit dem Serum interagieren, somit spiegelt die frei vorliegende Konzentration des Induktors reellere Voraussetzungen wieder (Hewitt *et al.* 2007b).

Die von Ruhnke *et al.* (2005b) gemessene Steigerung des Testosteron-Metabolismus durch Rifampicin war sehr gering und nicht repräsentativ, da die verwendete HPLC-Analytik nicht geeignet gewesen ist. Ehnert *et al.* (2008) können in NeoHepatozyten eine Induktion der CYP3A4-Aktivität und -Expression durch Rifampicin in ähnlichem Ausmaß wie in humanen Hepatozyten detektieren. Da die detektierte Aktivität in NeoHepatozyten sehr gering ist und die Induktion ins Verhältnis zum sehr potenten Induktor Rifampicin gesetzt werden soll (Hewitt *et al.* 2007b), wird es schwierig das Ausmaß der Induktion von weniger effektiven Induktoren zuverlässig zu detektieren.

In klassisch aktivierten Makrophagen kann die Umsetzungsrate von Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein zu Fluorescein durch die Kombination der Induktoren Rifampicin und Phenobarbital gesteigert werden, allerdings ist die Umsetzung in Gegenwart des CYP3A-Inhibitors Ketoconazol nicht signifikant reduziert (Daten nicht gezeigt).

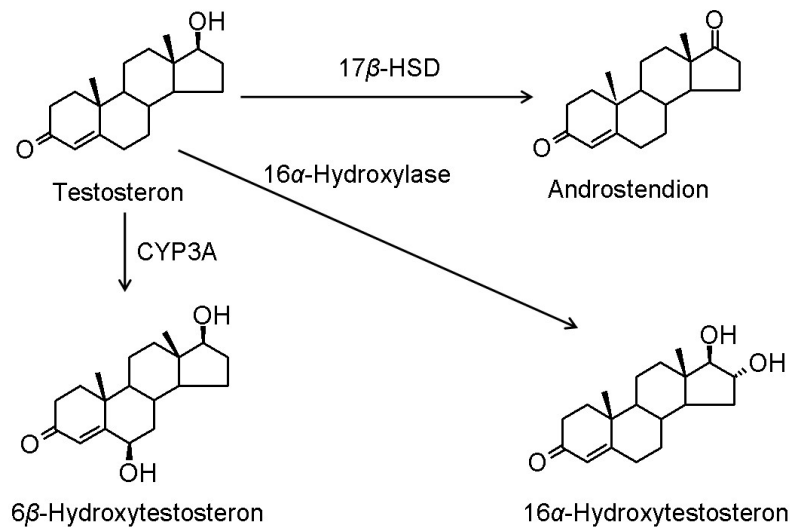
Im Rahmen dieser Arbeit kann eindeutig gezeigt werden, dass NeoHepatozyten für Induktionsstudien nicht geeignet sind, da weder die CYP1A1/2- noch die CYP3A4-Aktivität durch Standardinduktoren induzierbar sind. Damit können nicht einmal die Minimalanforderungen der FDA hinsichtlich der Induktionsprüfungen von neuen Arzneistoffkandidaten durchgeführt werden, in denen nur auf die Induktion von CYP1A1/2 und CYP3A4 geprüft werden muss (FDA-Guidance for Industry: Drug interaction studies 2006).

Die widersprüchlichen Ergebnisse aus dieser Arbeit und von Ehnert *et al.* (2008) könnten verschiedene Ursachen haben. Veränderungen der Kulturbedingungen von NeoHepatozyten könnten die Expression von CYP-Isoenzymen positiv beeinflussen. Eine weitere Möglichkeit stellt die Auswahl der Spender von Monozyten dar. Wie von Riquelme *et al.* (2008) gezeigt, bestehen Unterschiede zwischen

NeoHepatozyten von verschiedenen Spendern in der Expression von Albumin, Carbamoylphosphat-Synthetase 1 und CYP3A7. Auch die stark interindividuellen CYP1A1/2-Aktivitäten lassen vermuten, dass NeoHepatozyten von ausgesuchten Spendern unter abgewandelten Kulturbedingungen andere CYP-Isoenzyme wie CYP2C9 exprimieren können. Ruhnke *et al.* (2005b) detektieren in bestimmten Zellen eine CYP2C9-Expression, die zu gering ist, um eine Aktivität zu bestimmen. Ehnert *et al.* (2008) haben noch weitere Aktivitäten von Cytochrom P450-Isoenzymen untersucht. Die bestimmten Aktivitäten der NeoHepatozyten sind deutlich geringer als die der humanen Hepatozyten. Auch ist nicht untersucht worden, ob diese Reaktionen durch CYP-Inhibitoren gehemmt werden können. Da fluoreszierende Metabolite in geringeren Konzentration als nicht fluoreszierende Metabolite detektiert werden können, ist eine Detektion des CYP-vermittelten Metabolismus von anderen Standardreaktionen oder neuen Arzneistoffen nicht möglich, da eventuelle Metabolite unter der Nachweisgrenze liegen.

Der Phase II-Metabolismus von NeoHepatozyten, klassisch aktivierten Makrophagen, humanen und porcinen Hepatozyten ist nicht explizit untersucht worden. In Phase I gebildetes Resorufin wird in Phase II weiter metabolisiert. Durch Vermessung vor Zugabe von  $\beta$ -Glucuronidase lässt sich das nicht konjugierte Resorufin detektieren. Nach Inkubation mit  $\beta$ -Glucuronidase kann das gesamte in Phase I-gebildete Resorufin erfasst werden, so dass man über die Differenz das Ausmaß des Phase II-Metabolismus bestimmen kann. NeoHepatozyten, klassisch aktivierte Makrophagen und humane Hepatozyten sind in der Lage Resorufin zu glucuronidieren. Dass NeoHepatozyten zum Phase II-Metabolismus fähig sind, entspricht den Ergebnissen aus der Literatur (Ehnert *et al.* 2008, Ruhnke *et al.* 2005a und 2005b). In verschiedenen Makrophagen-Subpopulationen ist UDP-Glucuronyltransferase-Aktivität und -Expression festgestellt worden (Yamashiki *et al.* 2002, Barbier *et al.* 2003). Somit stellt UDP-Glucuronyltransferasen-Aktivität eine Eigenschaft dar, zu der nicht nur Hepatozyten befähigt sind, sondern auch Makrophagen.

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten



**Abbildung 2.31.:** Metabolismus von Testosteron zu  $6\beta$ -Hydroxytestosteron,  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron und Androstendion.

An dem Metabolismus von Testosteron sind nicht nur CYP-Isoenzyme, sondern auch weitere Enzyme beteiligt, die regioselektiv Testosteron metabolisieren (Waxman *et al.* 1983, Wood *et al.* 1983, Donato *et al.* 1999, 2006). Dadurch ist Testosteron sehr gut als Substrat geeignet, um die Arzneistoff-metabolisierende Kompetenz zu beurteilen.

NeoHepatozyten und klassisch aktivierte Makrophagen metabolisieren Testosteron zu Androstendion und in geringerem Ausmaß zu  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron, aber nur nicht in nicht zuverlässig detektierbaren Konzentrationen zu  $6\beta$ -Hydroxytestosteron (Abbildung 2.31). Humane Hepatozyten bilden als Hauptmetaboliten CYP3A-vermittelt  $6\beta$ -Hydroxytestosteron und als weitere Metabolite Androstendion,  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron und einige weitere Hydroxytestosteron-Metabolite (Tabelle 2.4).

Im Gegensatz zu Ruhnke *et al.* (2005b) kann in den Inkubationsansätzen von NeoHepatozyten kein  $6\beta$ -Hydroxytestosteron detektiert werden. Die mittels der entwickelten LC/MS-Analytik erhaltenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass es sich bei dem von Ruhnke *et al.* (2005b) als  $6\beta$ -Hydroxytestosteron bezeichneten

Metaboliten um  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron handelt. Da die gängigen HPLC-Methoden, die zur Charakterisierung des CYP3A4-Metabolismus anhand der Testosteron- $6\beta$ -Hydroxylierung verwendet werden, darauf ausgerichtet sind, nur den Testosteron-Metaboliten  $6\beta$ -Hydroxytestosteron in hohen Konzentration und mit einer kurzen Laufzeit zu detektieren, kann es zu Überlagerungen der Peaks der einzelnen Hydroxytestosteron-Metaboliten kommen. Friedrich *et al.* (2003) verweisen auf mehrere Publikation, die über Probleme bei der Trennung von  $6\beta$ -Hydroxytestosteron und  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron berichten. Untersuchungen der gesamten Testosteron-Metabolite zeigen, dass es schwierig ist, die einzelnen Testosteron-Metabolite adäquat zu trennen (van't Klooster *et al.* 1993, Yamazaki und Shimada 1997, Friedrich *et al.* 2003). Die entwickelte LC/MS- und HPLC-Methode ist speziell darauf ausgelegt,  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron und  $6\beta$ -Hydroxytestosteron in kleinen Konzentrationen zu trennen.

Da NeoHepatozyten nicht in der Lage sind,  $6\beta$ -Hydroxytestosteron in quantifizierbaren Mengen als Testosteron-Metaboliten zu bilden, ist die Induktion nicht untersucht worden. Wie die Ergebnisse zum Testosteron-Metabolismus der unter verschiedenen Bedingungen kultivierten Zellen monozytären Ursprungs zeigen, kann die Testosteron- $16\alpha$ -Hydroxylierung durch Rifampicin und Phenobarbital induziert werden. Dies könnte die von Ruhnke *et al.* (2005b) gemessene minimale Induktion erklären. Über eine Induktion der Bildung von  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron durch Phenobarbital berichten mehrere Autoren (van't Klooster *et al.* 1993, Ohmori *et al.* 1993, Donato *et al.* 1995). Welches Enzym für diese Umsetzung verantwortlich ist, ist allerdings unklar. In anderen Spezies sind CYP2B-Isoenzyme an der Bildung von  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron beteiligt (Donato *et al.* 1999).

Die unter verschiedenen Bedingungen kultivierten Zellen monozytären Ursprungs metabolisieren Testosteron hauptsächlich zu Androstendion und in geringen Mengen zu  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron. Die CYP3A4-vermittelte Bildung von  $6\beta$ -Hydroxytestosteron kann in sehr geringem Maße durch Kultur in Dexamethason-freiem RPMI-Medium mit Lipopolysaccharid-Zusatz erreicht werden. Lipopolysaccharid induziert während der Differenzierung von Monozyten

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

zu aktivierten Makrophagen die Expression der Aromatase (CYP19) (Schmidt *et al.* 2000). Durch keine weitere Kulturbedingung lässt sich 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron als Metabolit von beiden Spendern detektieren. Starke interindividuelle Unterschiede der Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung sind bekannt (Westlind *et al.* 1999, Soars *et al.* 2004). Eine Aktivierung der Zellen monozytären Ursprungs beider Spender durch Phorbolmyristataacetat beeinflusst den Testosteron-Metabolismus nicht.

$\delta$ -Aminolävulinsäure, deren Synthese den ersten und Ausmaß-bestimmenden Schritt der Häm-Biosynthese darstellt (Cable *et al.* 2000, Ajioka *et al.* 2006), ist im Überschuß zur Hämbildung vorhanden gewesen, so dass genug Häm für Cytochrom P450-Isoenzyme in den Zellen vorhanden war. Im Gegensatz zu Hepatozyten lässt sich in Zellen monozytären Ursprungs durch exogene  $\delta$ -Aminolävulinsäure die CYP3A4-Aktivität nicht steigern bzw. hervorrufen (Guzelian und Bissell 1976, Weiss *et al.* 2003).

Einzig die Kombination von Rifampicin und Phenobarbital steigert den Metabolismus von Testosteron zu 16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron. In RPMI-Medium ist das Ausmaß der Steigerung dieses Metabolismus höher als mit Williams E Medium als Grundmedium. Nach Hewitt *et al.* (2007b) soll Dexamethason unter 1  $\mu$ M im Kulturmedium CYP3A und CYP2B nicht induzieren, aber Hepatozyten gegenüber weiteren Induktoren sensitivieren. Der Zusatz von 0,1  $\mu$ M Dexamethason zum jeweiligen Medium scheint allerdings in diesem Fall keinen Effekt zu haben.

Der Metabolismus von Testosteron zu Androstendion in Zellen monozytären Ursprungs wird durch keine Kulturbedingung beeinflusst. Nur in den Zellen eines Spenders kann ein Effekt durch Phorbolmyristataacetat festgestellt werden.

Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC) sind in der Lage Testosteron über die 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen 4 und 5 sowie die 5 $\alpha$ -Reduktase zu metabolisieren. Dabei entsteht in höheren Konzentrationen Androstendion. Ebenso metabolisieren PBMC Dehydroepiandrosteron über die 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu Androstendion und über 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen zu Androstendiol und weiter zu Testosteron (Hammer *et al.* 2005). Schmidt *et al.* (2000) haben sowohl in Monozyten als auch in Makrophagen Androstendion und in geringen Konzentrationen 16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron als Testosteron-Metabolite

detektieren können. Diese Unterschiede lassen sich dadurch erklären, dass Hammer *et al.* (2005) PBMC, die zum größten Teil aus peripheren T- und B-Lymphozyten bestanden, untersucht haben. Makrophagen-ähnliche Synoviozyten sind in der Lage Testosteron zu  $6\beta$ -Hydroxytestosteron abzubauen (Schmidt *et al.* 2006). Bei Synoviozyten handelt es sich um Zellen der Synovialmembran, einer Innenhaut zur Unterteilung der Gelenkkapseln. Dehydroepiandrosteron und seine Metaboliten Androstendion und Testosteron wirken anti-inflammatorisch, da sie die Sekretion von Interleukin  $1\beta$ , Interleukin 6, Tumor Nekrose Faktor (TNF) und weiterer proinflammatorischer Mediatoren hemmen (Schmidt *et al.* 2005).

Diese Ergebnisse und die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Testosteron-Metabolismus zu Androstendion und  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron bei klassisch aktivierten Makrophagen, bei unter verschiedenen Bedingungen kultivierten Zellen monozytären Ursprungs und auch bei NeoHepatozyten eine physiologische Funktion von aus Monozyten differenzierten Zellen ist. Dies macht noch einmal mehr deutlich, dass es sich bei NeoHepatozyten nicht um Hepatozyten, sondern um eine Makrophagen-Subpopulation handelt.

Die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen ist eine weitere Fähigkeit von Hepatozyten. NeoHepatozyten und klassisch aktivierte Makrophagen sind zur *N*-Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin nicht in der Lage. Humane Erythrozyten können Benzamidoxim zu Benzamidin reduzieren, porcine Erythrozyten, Plasma und Vollblut sind dazu ebenfalls in der Lage (Mau 2002). So kann festgestellt werden, dass *N*-hydroxylierte Prodrugs generell nicht durch Makrophagen, weder im Blut noch in anderen Geweben, reduziert werden, durch Erythrozyten aber eine Aktivierung erfolgen kann.

NeoHepatozyten verhalten sich in ihrem Phase I- und Phase II-Metabolismus wie klassisch aktivierte Makrophagen und nicht wie Hepatozyten, so dass es sich eher um eine weitere Makrophagen-Subpopulation handelt als um Hepatozyten. Prinzipiell wäre es für Studien des Arzneistoffmetabolismus und des Interaktionspotential egal, ob es sich um Makrophagen oder Hepatozyten handelt, solange Makrophagen sich in

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

ihrem Metabolismus wie Hepatozyten verhalten. Da dies aber nicht der Fall ist, ist die metabolische Kompetenz von Makrophagen hauptsächlich aus physiologischen Aspekten interessant. Obwohl ein pharmakokinetisches Interesse darin bestehen könnte, den Metabolismus von Arzneistoffen durch Makrophagen und Monozyten im Blut, in der Lunge, im Knochenmark und an Entzündungsorten zu untersuchen.

Eine Transdifferenzierung von Monozyten zu Hepatozyten ist im Fall der NeoHepatozyten nicht erfolgt. Als Transdifferenzierung bezeichnet man den Prozess der Überführung in einen Zelltyp mit einer vollkommen anderen Zellentwicklung.

Um repräsentative Aussagen treffen zu können, ob es sich bei den durch Kultur erhaltenen Zellen mit Hepatozyten-Eigenschaften wirklich um Hepatozyten handelt, sollen die von Hengstler *et al.* (2005) geforderten Eigenschaften charakterisiert und mit primären Hepatozyten verglichen werden. Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen aktiviert die Gen-Expression von sehr vielen Genen, so dass durch verschiedene Ausgangszellen und Kulturbedingungen sehr viele Makrophagen-Subpopulationen mit verschiedenen Fähigkeiten generiert werden können, ohne dass eine Transdifferenzierung stattfindet.

Ehnert *et al.* (2008) können im Gegensatz zu NeoHepatozyten keine CYP-Aktivitäten und -Expressionen in Monozyten, aber teilweise in PCMO detektieren. Hierbei kann es sich um die normale Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen handeln, bei der die CYP-Expression beeinflusst wird (Baron *et al.* 1998, Gottfried *et al.* 2006, Schmidt *et al.* 2006). Bei dem CYP-Metabolismus von Makrophagen könnte es sich auch um eine physiologische Funktion handeln, um deren Überleben in kontaminierten Geweben zu gewährleisten.

Die Expression von Connexin 32, Cytokeratin 18, Albumin, Gerinnungsfaktoren und der an der Harnstoff-beteiligten Carbamoylphosphat-Synthetase 1 kann von Riquelme *et al.* (2008) in NeoHepatozyten bestätigt werden (Ruhnke *et al.* 2005a und 2005b). Neben NeoHepatozyten exprimieren auch andere Makrophagen-Subpopulationen diese Proteine, so dass es sich nicht exklusiv um eine Eigenschaft von NeoHepatozyten handelt, sondern die Expression während der normalen Makrophagen-Differenzierung aktiviert wird (Riquelme *et al.* 2008).

Weitere Ergebnisse bestätigen, dass es sich bei den von Ruhnke *et al.* (2005a und 2005b) beschriebenen NeoHepatozyten um eine deaktivierte, Gewebe-ansässige Makrophagen-Subpopulation handelt (Riquelme *et al.* 2008, Hutchinson *et al.* 2008, Brem-Exner *et al.* 2008). So scheint die Expression von Hepatozyten-ähnlichen Merkmalen, wie in dieser Arbeit für den Phase I-Metabolismus gezeigt werden kann, während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen ein normaler Prozess zu sein. Nach Transplantation von NeoHepatozyten in die Leber von NOD/SCID-Mäusen ist zwar humanes Albumin detektiert worden, aber die Zellen mit humanem Zellkern habe keine Hepatozyten-typische Morphologie aufgewiesen. Diese kleinen Zellen haben nur einen ungleichmäßigen Zellkern besessen und sich in der Nähe von kleinen Gefäßen angelagert. Aus diesen Ergebnissen ist der Schluß gezogen worden, dass diese Zellen kein Produkt einer Monozyten-Hepatozyten-Transdifferenzierung darstellen (Brulport *et al.* 2007). Wenn NeoHepatozyten nicht durch Transdifferenzierung entstanden sind, können programmierbare Zellen monozytären Ursprungs (PCMO) nicht als multipotente Vorläuferzellen betrachtet werden. Trotzdem scheinen diese Zellen *in vivo* die Gewebewiederherstellung zu unterstützen und könnten zur Überbrückung bis zur Transplantation einer Leber bei akuten schweren Lebererkrankungen Einsatz finden (Hutchinson *et al.* 2007).

Im Rahmen der Arzneistoffmetabolismus-Untersuchungen ist es möglich gewesen, porcine Hepatozyten im Vergleich zu humanen Hepatozyten hinsichtlich ihrer Aktivitäten, deren Inhibition und Induktion zu charakterisieren.

Die CYP1A1/2-vermittelte Ethoxyresorufin-*O*-Desethylierungsaktivität in porcinen Hepatozyten ist gegenüber humanen Hepatozyten deutlich erhöht. Donato *et al.* (1999) finden im Unterschied eine höhere Aktivität in humanen Hepatozyten. Die Ethoxycumarin-Desethylierungsaktivität von porcinen Hepatozyten war dagegen deutlich höher als von humanen Hepatozyten (Donato *et al.* 1999).

Der Metabolismus über CYP2C-Markerreaktionen durch porcine Hepatozyten ist teilweise möglich, weist aber im Blick auf Inhibitoreffekte und Substrate Unterschiede auf (Skaanild 2006). Die CYP2C9-katalysierte Octyl-*O*-methoxyresorufin-*O*-Desalkylierung findet im stärkeren Ausmaß in porcinen Hepatozyten statt, ebenso



## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

ist der Effekt des CYP-Inhibitors Metyrapon stärker ausgeprägt als in humane Hepatozyten. Allgemein ist der CYP2C9-vermittelte Metabolismus und der Einfluß von Inhibitoren stark Substrat-abhängig (Marks *et al.* 2004, Hummel *et al.* 2006). Metyrapon hemmt alle CYP-vermittelten Reaktionen, so dass keine Rückschlüsse gezogen werden können, ob an diesen Reaktionen ein porcines CYP2C-Isoenzym beteiligt ist.

Die CYP2E1-Aktivität mit 7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarin als Substrat ist in humanen Hepatozyten gegenüber porcinen Hepatozyten erhöht. Porcine Hepatozyten metabolisieren das CYP2E1-Substrat Chlorzoxazon. Diese Reaktion scheint in porcinen Hepatozyten CYP2A und CYP3A vermittelt zu sein (Skaanild 2006). Da mit Metyrapon ein unspezifischer CYP-Inhibitor verwendet worden ist, kann gezeigt werden, dass die Reaktion CYP-vermittelt ist, aber nicht welches Enzym das katalysierende Isoenzym darstellt. Sollte während präklinischer Untersuchungen mit porcinen Hepatozyten der Verdacht aufkommen, dass klinisch relevante Wechselwirkungen über CYP2C- und CYP2E1-Isoenzyme möglich sind, so sollte mit äußerster Sorgfalt der Metabolismus auch unter Verwendung von humanen Hepatozyten untersucht werden.

Mit Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein als CYP3A-Substrat kann für porcine Hepatozyten eine höhere Umsetzung als für humane Hepatozyten bestimmt werden. Die Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung durch CYP3A4 erfolgt im Gegensatz dazu mit einer höheren Umsetzungsrate durch humane Hepatozyten. Der Metabolismus von Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein in porcinen Hepatozyten ist CYP3A-vermittelt, da sich Ketoconazol als sehr potenter Inhibitor dieser Umsetzung erweist. Eine unterschiedliche Affinität der Substrate zu den metabolisierenden Isoenzymen könnte eine mögliche Erklärung darstellen. Dass die Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung als Markerreaktion für CYP3A4 in humanen Hepatozyten in stärkerem Ausmaß als in porcinen Hepatozyten erfolgt, kann in dieser Arbeit bestätigt werden (Donato *et al.* 1999, Skaanild 2006).

Der Testosteron-Metabolismus in humanen und porcinen Hepatozyten ist sehr ähnlich, da als Hauptmetabolit 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron gebildet wird. In humanen

Hepatozyten wird Testosteron allerdings in deutlich geringerem Umfang zu Androstendion metabolisiert als in porcinen Hepatozyten. In anderen humanen Geweben wird Testosteron hauptsächlich zu Androstendion metabolisiert (de Kanter *et al.* 2002). Humane und porcine Hepatozyten bilden wie NeoHepatozyten und Makrophagen  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron als Metabolit. Der Metabolismus zu  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron spielt in Hepatozyten eine weniger wichtige Rolle (Donato *et al.* 1999, de Kanter *et al.* 2002).

Durch Rifampicin kann die Testosteron- $6\beta$ -Hydroxylierungsaktivität in ähnlichem Ausmaß in porcinen und humanen Hepatozyten induziert werden. Tendenziell ist das Ausmaß der Induktion in humanen Hepatozyten höher als in porcinen, aber die Steigerung unterliegt interindividuellen Schwankungen (Lu und Li 2001). Die Kombination der Induktoren Rifampicin und Phenobarbital zeigt bei beiden Spezies keinen zusätzlichen Induktionseffekt. Phenobarbital alleine, wie auch viele klinisch relevante CYP3A4-Induktoren, steigert die CYP3A-Aktivität in porcinen Hepatozyten (Olsen *et al.* 1997). Die Bildung von Androstendion kann in porcinen Hepatozyten durch die Induktoren nicht beeinflusst werden. In humanen Hepatozyten steigert Rifampicin signifikant den Metabolismus zu Androstendion. In Hepatozyten anderer Spezies lässt sich der Metabolismus zu Androstendion nicht induzieren (van't Klooster *et al.* 1993). Phenobarbital steigert die Bildung von  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron in humanen Hepatozyten und Hepatozyten von Wiederkäuern (Donato *et al.* 1995, van't Klooster *et al.* 1993). In porcinen Hepatozyten sind die Effekte von Rifampicin allein und in Kombination mit Phenobarbital auf den CYP3A-vermittelten Metabolismus von Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein dieselben wie auf die Testosteron- $6\beta$ -Hydroxylierung. In humanen Hepatozyten vermag die Kombination von Rifampicin mit Phenobarbital die Aktivität des Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein-Metabolismus zusätzlich zur alleinigen Induktion durch Rifampicin zu steigern.

Die *N*-reduktive Aktivität, gemessen anhand der Umsetzung von Benzamidoxim zu Benzamidin, ist in porcinen Hepatozyten ebenfalls deutlich stärker ausgeprägt als in humanen Hepatozyten. Porcine Lebermikrosomen und Lebermitochondrien be-

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

sitzen ebenfalls eine höhere Aktivität als humane (Mau 2002, Clement *et al.* 2005). Porcine und humanen Hepatozyten reduzieren Benzamidoxim zu Benzamidin als Hauptmetaboliten (Clement *et al.* 2001, Fröhlich *et al.* 2005). Benzamidin wird von porcinen und humanen Hepatozyten in Phase II-Reaktionen zu Benzamidoxim-*O*-Glucuronid metabolisiert, allerdings scheinen nur porcine Hepatozyten in geringen Mengen Benzamidoxim-*O*-Sulfat zu bilden (Clement *et al.* 2001, Fröhlich *et al.* 2005). So zeigen frühere Arbeiten anhand von Benzamidoxim und 4-Nitrophenol, dass porcine Hepatozyten zur Untersuchung des Phase II-Metabolismus geeignet sind (Christiansen 2000, Fröhlich 2004). Die Literatur berichtet ebenso über eine Reihe weiterer Substanzen, die durch Schweineleberpräparationen im Phase II-Metabolismus umgesetzt werden (Behnia *et al.* 2000, Watkins und Klaassen 1986).

Die Effekte von Induktoren und Inhibitoren auf die CYP-Aktivitäten von porcinen Hepatozyten sind denen von humanen Hepatozyten ähnlich, so dass sich Schweinehepatozyten als guter Ersatz für humane Hepatozyten erweisen. Mit dem Wissen über Unterschiede des CYP2C- und CYP2E1-Metabolismus zwischen den beiden Spezies lassen sich die *in vitro*-Methoden anpassen und gegebenenfalls die Wechselwirkungsuntersuchungen mit humanen Hepatozyten durchführen. Porcine Hepatozyten bilden den humanen Hepatozyten sehr ähnliche Metabolitenmuster, wie anhand von Testosteron gezeigt werden konnte. Donato *et al.* (1999) konnten ebenfalls zeigen, dass die Testosteron-Metabolite und das Ausmaß der Bildung der Metabolite von porcinen Hepatozyten denen von humanen Hepatozyten im Vergleich zu Ratten-, Kaninchen- und Hundehepatozyten am nächsten ist (Donato *et al.* 1999). Schweinehepatozyten metabolisieren Diazepam, welches über mehrere CYP-Enzyme zu verschiedenen Metaboliten umgesetzt wird, zu denselben Metaboliten wie humane Hepatozyten (Hansen *et al.* 2000). Diese Ergebnisse aus der Literatur sowie die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass porcine Hepatozyten eine gute Alternative zu humanen Hepatozyten darstellen, um den Metabolismus von neuen Arzneistoffkandidaten zu untersuchen.

Die Aktivitäten von CYP2E1 und CYP3A4 sind sowohl direkt fluorimetrisch als auch durch HPLC bestimmt worden.

Als Substrat für CYP2E1 ist direkt fluorimetrisch und durch HPLC 7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarin vermessen worden, welches zu 7-Hydroxy-4-trifluoromethylcumarin metabolisiert wird. Die für humane und porcine Hepatozyten direkt fluorimetrisch bestimmte CYP2E1-Aktivität ist um den Faktor 4 höher als die durch HPLC mit Fluoreszenz-Detektion bestimmte Aktivität. Die fluoreszierenden Eigenschaften von NADPH könnten die erhöhten Aktivitäten erklären. Da die Fluoreszenz von 7-Hydroxy-4-trifluoromethylcumarin über die Zeit abnimmt (Wundt 2004), könnte dies die niedrigen durch HPLC bestimmten Werte erklären. Zwar unterscheiden sich die absoluten Umsetzungsraten, die Relationen waren aber bei beiden Verfahren gleich. So zeigt sich, dass die CYP2E1-Aktivität von humanen Hepatozyten doppelt so hoch ist wie die von porcinen Hepatozyten, und auch das Ausmaß der Hemmung durch Metyrapon entsprechend ist. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Aussagen über Hemmeffekte gut direkt fluorimetrisch quantifiziert werden können, da dieses Verfahren deutlich schneller ist.

Zur Bestimmung der CYP3A4-Aktivität sind unterschiedliche Substrate verwendet worden, so dass die Aktivitäten nicht absolut verglichen werden können. Das Ausmaß der Induktion und die Speziesrelation sollten gleich sein. Dies ist nicht der Fall, da porcine Hepatozyten eine deutlich höhere Aktivität als humane Hepatozyten bei der direkten fluorimetrischen Aktivitätsbestimmung mit Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein als Substrat aufweisen und hingegen die Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierungsaktivität von humanen Hepatozyten deutlich höher ist. Auch die Induktoren zeigen unterschiedliche Effekte, je nach verwendetem Substrat. Allerdings kann mit beiden Substraten und beiden analytischen Verfahren gezeigt werden, dass NeoHepatozyten und Makrophagen keine CYP3A4-Aktivität besitzen. Für die Untersuchung von potentiellen Arzneistoffen auf ihr Induktionspotential sollte besser Testosteron als Substrat verwendet werden, da hier die Induktion der Aktivität durch Rifampicin deutlich stärker ausfällt und so auch die Effekte weniger potenter Induktoren detektiert werden können.

## 2.6. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser *in vitro*-Studie ist erstmal die Arzneistoff-metabolisierende Kompetenz im Hinblick auf Aktivität, Inhibition und Induktion von NeoHepatozyten neben Makrophagen und humanen Hepatozyten untersucht worden, um zu klären, ob es sich bei NeoHepatozyten um Hepatozyten oder um Makrophagen handelt, und ob die Fähigkeit zum Arzneistoffmetabolismus eine Makrophagen-Eigenschaft darstellt. Außerdem ist sowohl der Arzneistoffmetabolismus als auch der Einfluss von Induktoren und Inhibitoren von porcinen Hepatozyten mit humanen Hepatozyten verglichen worden.

NeoHepatozyten metabolisieren CYP1A1/2-, CYP2C9- und CYP3A4-Substrate und können im Rahmen von Phase II-Reaktionen Glucuronidierungen durchführen. Die CYP1A1/2-Aktivität von NeoHepatozyten lässt sich inhibieren und liegt im gleichen Bereich wie von klassisch aktivierten Makrophagen und humanen Hepatozyten. Von humanen Hepatozyten ist allerdings bekannt, dass die CYP1A1/2-Aktivität sehr gering ist (Hengstler *et al.* 2000, Xu *et al.* 2000). Durch 3-Methylcholanthren lässt sich CYP1A1/2-Aktivität in primären Hepatozyten deutlich steigern. Hingegen lassen sich weder die CYP1A1/2-Aktivitäten von NeoHepatozyten noch von klassisch aktivierten Makrophagen durch 3-Methylcholanthren induzieren. Auch Brulport (2006) hat keine Induktion der CYP1A1/2-Aktivität von NeoHepatozyten detektieren können. Ein CYP2E1-vermittelter Metabolismus kann in NeoHepatozyten und in klassisch aktivierten Makrophagen nicht detektiert werden. Der Metabolismus der CYP2C9- und CYP3A4-Substrate Octyl-*O*-methoxyresorufin und Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein kann durch den CYP-Inhibitor Metyrapon nicht signifikant beeinflusst werden. Auch der potente und selektive CYP3A4-Inhibitor Ketoconazol hemmt die Umsetzung des CYP3A4-Substrates nicht. Rifampicin allein und in Kombination mit Phenobarbital steigert die Umsetzung des CYP3A4-Substrates durch NeoHepatozyten nicht. Diese Ergebnisse legen nahe, dass dieser Metabolismus von Octyl-*O*-methoxyresorufin und Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein durch NeoHepatozyten nicht über ein CYP-Isoenzym vermittelt wird. Zur Aktivierung

*N*-hydroxylierter Prodrugs sind NeoHepatozyten ebenfalls nicht in der Lage. Entgegen früherer Ergebnisse von Ruhnke *et al.* (2005b) metabolisieren NeoHepatozyten Testosteron nicht zu  $6\beta$ -Hydroxytestosteron, sondern zu Androstendion und  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron. Aufgrund der entwickelten LC/MS-Methode kann gezeigt werden, dass es sich bei dem von Ruhnke *et al.* (2005b) als  $6\beta$ -Hydroxytestosteron bezeichneten Metaboliten um  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron handelt. Der Metabolismus zu  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron kann durch Rifampicin und Phenobarbital induziert werden.  $6\beta$ -Hydroxytestosteron kann durch entwickelte LC/MS-Analytik nicht als Testosteron-Metabolit von NeoHepatozyten und klassisch aktivierten Makrophagen detektiert werden, was die fehlende CYP3A4-Aktivität dieser Zelltypen zeigt.

Erstmals ist die Arzneistoff-metabolisierende Kompetenz von klassisch aktivierten Makrophagen charakterisiert worden. Klassisch aktivierte Makrophagen können Arzneistoffe in einer Phase II-Reaktion glucuronidieren, CYP1A1/2-vermittelt Substrate metabolisieren und weitere Substanzen nicht CYP-vermittelt umsetzen. Der Metabolismus des CYP3A-Substrates Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein lässt sich durch die Kombination von Rifampicin und Phenobarbital induzieren. 7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarin als CYP2E1-Substrat wird durch klassisch aktivierte Makrophagen nicht metabolisiert, ebenso findet keine *N*-Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin statt. Der Metabolismus von Testosteron zu Androstendion und  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron durch klassisch aktivierte Makrophagen ist auch für andere Makrophagen-Subpopulationen beschrieben (Schmidt *et al.* 2006).

Durch die Kultur von monozytären Zellen unter verschiedenen Bedingungen können keine Hepatozyten-ähnlichen Zellen erhalten werden.

NeoHepatozyten besitzen ein den klassisch aktivierten Makrophagen sehr ähnliches Verhalten im Phase I- und Phase II-Metabolismus. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass eine Transdifferenzierung von Monozyten zu Hepatozyten nicht erfolgt ist und es sich bei NeoHepatozyten um eine deaktivierte, Gewebe-ansässige Makrophagen-Subpopulation handelt (Riquelme *et al.* 2008, Hutchinson *et al.* 2008, Brem-Exner *et al.* 2008). Während der Differenzierung von Monozyten

## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

zu Makrophagen erfolgt die Aktivierung der Expression von sehr vielen Genen, unter anderem auch der CYP-Expression, so dass die begrenzte Fähigkeit zum Metabolismus von Xenobiotika eine physiologische Eigenschaft von Makrophagen darstellt.

Makrophagen befinden sich in verschiedenen Geweben, wie in der Lunge, der Leber, der Haut, im Knochenmark, im Lymphsystem und an Entzündungsorten, an denen sie viele wichtige Funktionen erfüllen. Durch genauere Untersuchung des Metabolismus von Xenobiotika durch Makrophagen könnten eventuell verschiedene unerwünschte Effekte der Arzneimitteltherapie erklärt werden, wie z. B. Agranulozytose durch Metamizol, und Prodrugs entwickelt werden, die nur durch Makrophagen-Subpopulationen am Wirkort aktiviert werden, z. B. zur Therapie bei Entzündungen und Tuberkulose.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass NeoHepatozyten nicht als Ersatz von humanen Hepatozyten geeignet sind und porcine Hepatozyten die bessere Alternative darstellen. Der Metabolismus von verschiedenen Substraten erfolgt zwar durch NeoHepatozyten, selten aber erfolgt eine Inhibition der Aktivitäten durch CYP-Hemmstoffe. Zwar können Ehnert *et al.* (2008) CYP-Aktivitäten bestimmen, aber diese sind sehr gering und oft fehlen die Angaben zur Inhibition. So kann selbst mit fluoreszierenden Substraten der inhibierende Einfluss von neuen Arzneistoffkandidaten nicht untersucht werden. Aufgrund der geringeren Bestimmungsgrenze bei nicht fluoreszierenden Substanzen ist es gar nicht möglich den Metabolismus von neuen Arzneistoffkandidaten zu untersuchen. Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Eignung als Ersatz für humane Hepatozyten ist die Induktion von CYP-Aktivitäten. Die Minimalanforderungen der FDA sieht nur die Überprüfung der Induktion durch neue Arzneistoffkandidaten von CYP1A1/2 und CYP3A4 vor (FDA-Guidance for Industry: Drug interaction studies 2006). Da eine Induktion von CYP1A1/2 und CYP3A4 in NeoHepatozyten nicht detektiert werden kann, sind NeoHepatozyten auch hierfür nicht geeignet.

Die am Anfang vielversprechenden NeoHepatozyten stellen keine adäquate Alternative für humane Hepatozyten in der pharmakologischen und toxikologischen

Forschung dar. Eine weitere Erforschung der Differenzierung und welche Faktoren hervorrufen, dass bestimmte Gene exprimiert und aktiviert werden, könnte zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen aus Vorläuferzellen führen. Zur Unterstützung der Lebergewebe-Wiederherstellung und zur Überbrückung bis zur Transplantation bei akuten und schweren Lebererkrankungen könnten Monozyten und aus Monozyten-differenzierten Zellen eine vielversprechende Alternative darstellen (Hutchinson *et al.* 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgt ein umfassender Vergleich der metabolischen Kompetenz von porcinen und humanen Hepatozyten. Von porcinen Hepatozyten werden die verwendeten Markersubstrate für CYP1A1/2 und CYP2C mit einer höheren Aktivität als von humanen Hepatozyten umgesetzt, die CYP2E1-Aktivität war in humanen Hepatozyten höher. Unter Verwendung von Dibenzyl-*O*-methoxyfluorescein als CYP3A-Substrat weisen porcine Hepatozyten die höhere Umsetzungsrate auf. Die Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung durch CYP3A4 erfolgt im Gegensatz dazu mit einer höheren Aktivität durch humane Hepatozyten. Die Hemmung bei allen CYP-Aktivitäten in humanen und porcinen Hepatozyten erfolgt in einem ähnlichem Ausmaß. Teilweise ist die Hemmung bei porcinen Hepatozyten stärker ausgeprägt. Hinsichtlich ihres Ansprechens auf Induktoren zeigen porcine und humane Hepatozyten ein ähnliches Verhalten.

Durch die Bestimmung des Benzamidoxim-Metabolismus von humanen und porcinen Hepatozyten ist erstmals ein direkter Vergleich der *N*-reduktiven Aktivität von Hepatozyten beider Spezies möglich. Aus vorherigen Arbeiten war bekannt, dass durch humane und porcine Hepatozyten die gleichen Benzamidoxim-Metabolite gebildet werden (Clement *et al.* 2001, Fröhlich *et al.* 2005). Dass das Testosteron-Metabolitenmuster von porcinen Hepatozyten denen von humanen Hepatozyten entspricht, kann in dieser Arbeit bestätigt werden.

Porcine Hepatozyten stellen eine gute Alternative zu humanen Hepatozyten dar, da sie Substrate mit ähnlichen Aktivitäten und ähnlichem Metabolitenmuster umsetzen. Ebenso zeigen Induktoren und Inhibitoren vergleichbaren Einfluss auf die Enzymaktivitäten. Mit porcinen Hepatozyten lassen sich sämtliche Metabolite von



## 2. Charakterisierung des Arzneistoff-Metabolismus von NeoHepatozyten

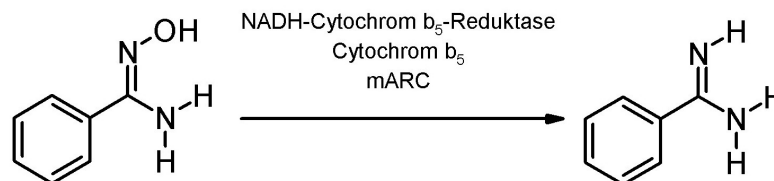
neuen Arzneistoffkandidaten sowie mögliche Induktions- und Inhibitionseffekte von neuen Arzneistoffkandidaten untersuchen. Die Aktivitäten und inhibitorischen und induktorischen Effekte sind aufgrund den mit humanen Hepatozyten vergleichbaren Umsetzungsraten gut zu detektieren und zu vergleichen. Trotz vergleichbar hoher Homologien der einzelnen porcinen CYP-Isoenzyme zu entsprechenden humanen Isoenzymen, scheinen teilweise jedoch andere Isoenzyme am Metabolismus beteiligt zu sein. Eine bessere Charakterisierung könnte die Übertragung der *in vitro*-Ergebnisse auf *in vivo*-Vorhersagen im Menschen verbessern. Ein weiterer großer Vorteil von porcinen Hepatozyten ist die gute Verfügbarkeit, die Planbarkeit der Isolierung und Versuchsdurchführung und keine zusätzliche Tötung von Tieren, da die Lebern von zum Verzehr geschlachteten Schweinen stammen.

# 3. Induktion des N-reduktiven drei Komponenten-Enzym-Komplexes

## 3.1. Einleitung

Amidine und Guanidine stellen oft essentielle Gruppen in Arzneistoffen dar. Unter physiologischen Bedingungen liegen diese stark basischen Verbindungen protoniert vor und können so im Gastrointestinal Trakt schlecht resorbiert werden. Die *N*-Hydroxylierung von Amidinen und Guanidinen stellt ein Prodrug-Prinzip dar, da durch Verringerung der Basizität diese Substanzen als Amidoxim und *N*-Hydroxyguanidin ungeladen vorliegen und besser oral bioverfügbar sind. Auf peptidomimetische Inhibitoren, wie z. B. den Thrombin-Inhibitor Melagatran, und Therapeutika der Afrikanischen Schlafkrankheit und Leishmaniose ist dieses Prodrug-Prinzip bereits angewandt worden (Gustafsson *et al.* 2001, Clement und Lopian 2003, Clement und Raether 1985, Bray *et al.* 2003). Die Aktivierung der Prodrugs sollte kein zusätzliches Potential für Interaktionen mit anderen Arzneistoffen hervorrufen. Deswegen ist es von Interesse, ob der an der Aktivierung beteiligte drei Komponenten-Enzym-Komplex, bestehend aus mitochondrialer Benzamidoxim-reduzierender Komponente (mARC), Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase, durch klassische Induktoren Arzneistoff-metabolisierender Enzyme oder durch eigene Substrate induzierbar ist.

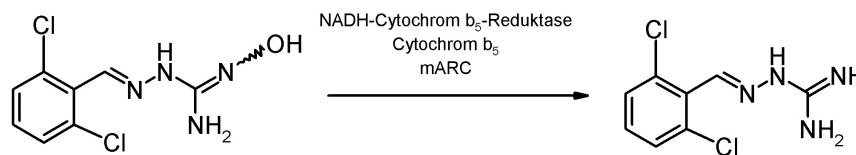
### 3.1.1. Benzamidoxim- und Guanoxabenz-Metabolismus durch Hepatozyten



**Abbildung 3.1.:** *N*-Reduktion des Modellsubstrates Benzamidoxim zu Benzamidin.

Der Benzamidoxim-Metabolismus von Hepatozyten ist sehr ausführlich untersucht worden (Christiansen 2000, Fröhlich 2004). Benzamidoxim wird zu 98% zu Benzamidin metabolisiert (Fröhlich *et al.* 2005) (Abbildung 3.1). In Phase II-Reaktionen metabolisieren Hepatozyten Benzamidoxim zu Benzamidoxim-*O*-Glucuronid. Benzamidoxim-*O*-Sulfat wird nur in sehr geringen Konzentrationen von porcinen, nicht aber von humanen Hepatozyten gebildet (Clement *et al.* 2001, Fröhlich *et al.* 2005). Der Benzamidoxim-Metabolismus in den Hepatozyten kann mikrosomal am Endoplasmatischen Retikulum oder durch Mitochondrien erfolgen. Sowohl mikrosomal als auch mitochondrial ist wahrscheinlich das gleiche Enzymsystem beteiligt. Unklar ist allerdings, ob mikrosomal neben Cytochrom b<sub>5</sub> und NADH-Cytochrom b<sub>5</sub>-Reduktase ein anderes Enzym als die mitochondriale Benzamidoxim-reduzierende Komponente beteiligt ist. Die Effizienz des mitochondrialen Enzym-Komplexes ist wesentlich höher als die des mikrosomalen (Clement *et al.* 2005). Dies legt nahe, dass in der Zelle der Metabolismus hauptsächlich über den mitochondrialen Enzym-Komplex erfolgt. Teilweise sind Mitochondrien auch in der Lage eigene Enzyme zu exprimieren, aber oft produziert die umgebende Zelle die Enzyme, die dann in die Mitochondrien eingebaut werden. Benzamidoxim ist sehr gut als Modellsubstrat für die Aktivität des drei Komponenten-Enzym-Komplexes, beste-

hend aus mARC, Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase, geeignet, da Hepatozyten Benzamidoxim fast ausschließlich zu Benzamidin metabolisieren und dieser Metabolismus wahrscheinlich an der äußeren mitochondrialen Membran erfolgt, an der der Enzym-Komplex lokalisiert ist (Fröhlich *et al.* 2005, Havemeyer *et al.* 2006, Grünewald *et al.* 2008).



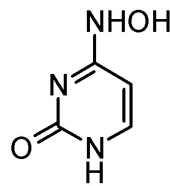
**Abbildung 3.2.:** *N*-Reduktion des Guanoxabenz zu Guanabenz.

Bei Guanoxabenz und Guanabenz handelt es sich um Arzneistoffe mit einer zentralen agonistischen Wirkung an  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren, die als Antihypertensiva teilweise noch zugelassen sind. Guanoxabenz und Guanabenz gehören zur chemischen Klasse der Amidinohydrazone (Guanylhydrazone, Aminoguanidine). Im Menschen erfolgt die *N*-Oxygenierung von Guanabenz zu Guanoxabenz ausschließlich über CYP1A2, so dass diese Umsetzung als Markerreaktion für dieses CYP-Isoenzym verwendet werden kann (Clement und Demesmaeker 1997). In Hepatozyten kann hingegen kein Metabolismus von Guanabenz zu Guanoxabenz detektiert werden (Fröhlich 2004). Die umgekehrte *N*-Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz vermittelt sowohl der drei Komponenten-Enzym-Komplex als auch die Xanthinoxidase, allerdings bevorzugt unter anaeroben Bedingungen (Grünewald *et al.* 2008, Dambrova *et al.* 1998a und 1998b). Der Metabolismus von Guanoxabenz erfolgt in Hepatozyten hauptsächlich zu Guanabenz (Fröhlich 2004) (Abbildung 3.2). Da der Guanoxabenz-Metabolit Guanabenz in Studien eine 100-fach höhere Affinität zum  $\alpha_2$ -Adrenozeptor in der Rattenmilz zeigt (Uhlen *et al.* 1998), kann man Guanoxabenz als Prodrug von Guanabenz ansehen.

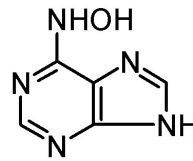
Im Rahmen des Phase I-Metabolismus wird Guanoxabenz nicht weiter hydroxyliert.

### 3. Induktion des *N*-reduktiven drei Komponenten-Enzym-Komplexes

Guanabenz dagegen kann am Benzolring hydroxyliert werden (Fröhlich 2004, Meacham *et al.* 1980, Miyamoto *et al.* 1982). Im Phase II-Metabolismus werden von Schweinehepatozyten fünf verschiedene Glucuronid-Metabolite aus Guanoxabenz gebildet. Guanabenz wird zu Guanabenz-*N*-Glucuronid und zu einem Glucuronid eines *C*-hydroxylierten Guanabenz metabolisiert (Fröhlich 2004).



(a) *N*<sup>4</sup>-Hydroxycytosin



(b) *N*<sup>6</sup>-Hydroxyaminopurin

**Abbildung 3.3.:** Potentielle physiologische Substrate von mARC, Cytochrom b<sub>5</sub> und NADH-Cytochrom b<sub>5</sub>-Reduktase.

Oft weisen *N*-hydroxylierte Verbindungen mutagene Eigenschaften auf, z. B. zeigt sich Guanoxabenz im Gegensatz zu Guanabenz im Ames-Test als mutagen (Clement *et al.* 1996). Gleiches gilt für Benzamidoxim im Vergleich zu Benzamidin (Clement *et al.* 1988b). Die rasch ablaufende *N*-Reduktion führt zu Detoxifizierung. Bei den in Abbildung 3.3 dargestellten *N*<sup>4</sup>-Hydroxycytosin und *N*<sup>6</sup>-Hydroxyaminopurin handelt es sich um mögliche physiologisch vorkommende *N*-hydroxylierte Verbindungen mit toxischen und mutagenen Eigenschaften (Clement und Kunze 1990, Khromov-Borisov 1997). Dass die *N*-Hydroxylierung von Adenin zu *N*<sup>6</sup>-Hydroxyaminopurin physiologisch *in vitro* möglich ist, ist von Clement und Kunze (1990) gezeigt worden. Der drei Komponenten-Enzym-Komplex, bestehend aus mARC, Cytochrom b<sub>5</sub> und NADH-Cytochrom b<sub>5</sub>-Reduktase, kann *N*<sup>4</sup>-Hydroxycytosin zum untoxischen Cytosin reduzieren (Grünewald 2008).

### 3.1.2. Induktion von Molybdoenzymen

Bei der mitochondrialen Benzamidoxim-reduzierenden Komponente (mARC) handelt es sich um ein Molybdän-haltiges Enzym. Die drei weiteren in Säugetieren bekannten Molybdo-Enzyme sind die Xanthinoxidoreduktase, die Aldehyd-Oxidase und die Sulfit-Oxidase. Die Xanthindehydrogenase und die Xanthinoxidase stellen zwei ineinander überführbare Formen der Xanthinoxidoreduktase dar. Sugihara *et al.* (2001) können zeigen, dass 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) die Aktivitäten der Xanthindehydrogenase, der Xanthinoxidase und der Aldehyd-Oxidase induziert und dass die Induktion von Xanthindehydrogenase und Xanthinoxidase über den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) erfolgt. 3-Methylcholanthren ist ebenfalls in der Lage die Aktivitäten von Xanthindehydrogenase und Xanthinoxidase zu steigern (Sugihara *et al.* 2001). Bakteriellies Lipopolysaccharid (LPS) kann ebenfalls die Xanthindehydrogenase und Xanthinoxidase induzieren (Kurosaki *et al.* 1995).

## 3.2. Zielsetzung

Bisherige Studien im Arbeitskreis haben sich sehr ausführlich mit dem Metabolismus *N*-hydroxylierter Verbindungen beschäftigt. Inzwischen ist aufgeklärt, dass der drei Komponenten-Enzym-Komplex, bestehend aus mARC, Cytochrom b<sub>5</sub> und NADH-Cytochrom b<sub>5</sub>-Reduktase, die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen vermittelt. Die *N*-Hydroxylierung von Amidinen und Guanidinen stellt ein anerkanntes Prodrug-Prinzip dar (Clement 2002). Deswegen ist von Interesse, ob sich die Aktivierung dieser Prodrugs induzieren lässt und welche Arzneistoffe und Substanzen dazu in der Lage sind. Über die Untersuchung der Induktion lassen sich auch Rückschlüsse über die physiologische Funktion von Enzymen ziehen. So könnte eine Induktion des drei Komponenten-Enzym-Komplexes z. B. eine Schutzfunktion des Organismus vor mutagenen *N*-hydroxylierten Nukleinbasen darstellen.

Anhand von klassischen Induktoren Arzneistoff-metabolisierender Enzyme soll das Potential der Induktion der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen un-

### 3. Induktion des *N*-reduktiven drei Komponenten-Enzym-Komplexes

tersucht werden. Als Induktoren sollen der AhR-Ligand 3-Methylcholanthren, der CAR-Ligand Phenobarbital und der PXR-Ligand Rifampicin verwendet werden. 3-Methylcholanthren als Induktor ist von besonderen Interesse, da dieser AhR-Ligand die Aktivität der Molybdoenzyme Xanthindehydrogenase und Xanthinoxidase induziert (Sugihara *et al.* 2001). Bakteriell Lipopolysaccharid kann den Metabolismus von Molybdoenzymen ebenfalls steigern (Kurosaki *et al.* 1995). Deswegen soll versucht werden, die Aktivität des zu untersuchenden Enzymkomplexes mit Lipopolysaccharid zu steigern.

Des Weiteren soll untersucht werden, ob Substrate des drei Komponenten-Enzym-Komplexes ihren eigenen Metabolismus induzieren können. Hierzu sollen die Modellschubstanzen für Amidoxime und *N*-Hydroxyguanidine, Benzamidoxim und Guanoxabenz, sowie die möglichen physiologischen Substanzen *N*<sup>4</sup>-Hydroxycytosin und *N*<sup>6</sup>-Hydroxyaminopurin verwendet werden.

In Kapitel 2 und in der Literatur ist gezeigt worden, dass porcine Hepatozyten eine gute Alternative zu humanen Hepatozyten in Induktionsuntersuchungen darstellen, da sie sehr ähnlich auf Induktoren ansprechen (Behnia *et al.* 2000, Hansen *et al.* 2000, Fröhlich 2004). Deswegen können für die Induktionsuntersuchungen porcine Hepatozyten verwendet werden.

Die Substrate sind in verschiedenen Konzentrationen als Induktoren dem Kulturmedium zugesetzt worden, da die Induktion Konzentrations-abhängig ist. Für die Induktoren 3-Methylcholanthren, Phenobarbital und Rifampicin ist in Kapitel 2 und von Fröhlich (2004) gezeigt worden, dass die dort verwendeten Induktorkonzentrationen geeignet sind, um die Aktivität von CYP1A1/2, CYP2C und CYP3A zu induzieren.

Das Ausmaß der Induktion soll über eine Steigerung der *N*-Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin als Markerreaktion untersucht werden. Die Benzamidoxim-*N*-Reduktion ist sehr gut als Aktivitätsbestimmung des Enzym-Komplexes, bestehend aus mARC, Cytochrom b<sub>5</sub> und NADH-Cytochrom b<sub>5</sub>-Reduktase, geeignet.

## 3.3. Methoden

### 3.3.1. Isolierung und Kultivierung primärer Hepatozyten

#### 3.3.1.1. Material und Geräte

In Kapitel 2.3.2.1 wurden alle zur Isolierung und Kultur verwendeten Materialien und Geräte aufgeführt.

#### 3.3.1.2. Isolierung primärer Hepatozyten

Zur Untersuchung der Induktion der *N*-Reduktion wurden porcine Hepatozyten verwendet. Die Isolierung von Schweinehepatozyten aus Lebern von frisch geschlachteten deutschen Kreuzungsschweinen erfolgte wie in Kapitel 2.3.2.3 beschrieben.

#### 3.3.1.3. Kultivierung primärer Hepatozyten

Nach Isolierung der porcinen Hepatozyten wurde wie in Kapitel 2.3.2.4 die Ausbeute und Viabilität bestimmt. Die Hepatozytensuspension wurde mit Williams E Medium mit Zusätzen und fötalem Kälberserum (Tabelle 3.1) auf eine Zellzahl von  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro ml Medium eingestellt. Wie bereits in Kapitel 2.3.2.5 beschrieben, wurden jeweils 2 ml der Hepatozytensuspension (etwa  $3 \times 10^6$  Zellen pro Loch) auf Kollagen-beschichtete 6-Loch-Gewebekulturplatten ( $\varnothing = 3,49$  cm) pipettiert. Nach 90-minütiger Inkubation im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  und 95% relativer Feuchte wurde das überstehende Kulturmedium abgenommen, um tote und nicht adhärenente Zellen zu entfernen, und durch 2 ml frisches Kulturmedium ersetzt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank unter aufgeführten Bedingungen.



### 3. Induktion des *N*-reduktiven drei Komponenten-Enzym-Komplexes

Substanz	Kulturmedium für die ersten 24 Stunden	Grundmedium für die Induktion
Glucagon	0,0014 $\mu\text{g/ml}$	0,0014 $\mu\text{g/ml}$
Prednisolon	9,6 $\mu\text{g/ml}$	9,6 $\mu\text{g/ml}$
Insulin	0,16 U/ml	0,16 U/ml
<i>L</i> -Glutamin	2 mM	2 mM
Penicillin	150 U/ml	150 U/ml
Streptomycin	150 $\mu\text{g/ml}$	150 $\mu\text{g/ml}$
Fötale Kälberserum	10%	-

**Tabelle 3.1.:** Mediumzusätze zum Williams E Medium zur Kultivierung primärer Hepatozyten in den ersten 24 Stunden und als Grundmedium für die Induktion.

## 3.3.2. Induktion des Benzamidoxim-Metabolismus

### 3.3.2.1. Material und Geräte

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei der Firma Merck, Darmstadt, in höchster verfügbarer Reinheit erworben. Krebs-Henseleit-Puffer, 3-Methylcholanthren, Phenobarbital-Natrium, Rifampicin, Benzamidin, Octylsulfonat-Natriumsalz und Lipopolysaccharid (LPS) aus *Salmonella enterica* Serotyp minnesota stammten von Sigma-Aldrich, Steinheim. R. I. Chemicals Inc., Orange, CA, USA, war der Lieferant von  $N^4$ -Hydroxycytosin.  $N^6$ -Hydroxyaminopurin wurde von Aurora Fine Chemicals Ltd, Graz, Österreich, bezogen. Guanabenz-Acetat wurde freundlicherweise von Wyeth-Pharma GmbH, Münster, zur Verfügung gestellt. Guanoxabenz-Hydrotosilat und Benzamidoxim wurden im Arbeitskreis synthetisiert. DMSO, Methanol und Acetonitril wurden von Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland, bezogen. Der Proteingehalt wurde mit dem BCA-Protein-Assay-Reagent von Pierce, Bonn, bestimmt.

Weitere verwendete Materialien und Geräte wurden in Kapitel 2.3.2.1 beschrieben.

Induktor	Induktor-Konzentration	Lösungsmittelkontrolle	Lösungsmittel-Konzentration
3-Methylcholanthren	2,5 $\mu$ M	Acetonitril	0,66%
Phenobarbital-Natrium	1,5 mM	<i>Aqua bidest.</i>	-
Rifampicin	25 $\mu$ M	DMSO	0,1%

**Tabelle 3.2.:** Eingesetzte Konzentrationen der Induktoren von Arzneistoff-metabolisierenden Enzymen und der verwendeten Lösungsmittel als Kontrollen.

### 3.3.2.2. Induktion des Benzamidoxim-Metabolismus durch bekannte Induktoren von Arzneistoff-metabolisierenden Enzymen

Das Ausplattieren der primären Hepatozyten, der erste Mediumwechsel und die Kultivierung erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben. Die Induktion der primären Hepatozyten begann nach 24 Stunden in Kultur.

Zu Beginn der Induktion wurde das Kulturmedium abgenommen und durch Induktionsmedium ersetzt. Dem Induktionsmedium (Tabelle 3.1) wurden die Induktoren vorher frisch zugesetzt. Als Kontrolle dienten zum einen Hepatozytenkulturplatten, bei denen dem Induktionsmedium das Lösungsmittel des Induktors zugesetzt wurde und zum anderen Hepatozytenkulturplatten mit reinem Induktionsmedium. Als bekannte Induktoren von Arzneistoff-metabolisierenden Enzymen wurden der AhR-Ligand 3-Methylcholanthren, der CAR-Ligand Phenobarbital und der PXR-Ligand Rifampicin verwendet. In Tabelle 3.2 sind die eingesetzten Konzentrationen der Induktoren und die jeweilige Lösungsmittelkontrolle aufgeführt. Die Induktion mit dem jeweiligen Zusatz zum Induktionsmedium erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchte über einen Zeitraum von 72 Stunden. Alle 24 Stunden wurden die Zellen von altem Medium befreit und mit dem jeweilig neuem überschichtet.

### 3.3.2.3. Induktion des Benzamidoxim-Metabolismus durch Lipopolysaccharid

Das Ausplattieren der primären Hepatozyten, der erste Mediumwechsel und die Kultivierung erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben. Das weitere Vorgehen ist in Kapitel 3.3.2.2 beschrieben. Dem Induktionsmedium (Tabelle 3.1) wurde Lipopolysaccharid (LPS) aus *Salmonella enterica* Serotyp minnesota in einer Konzentration von 0,1 µg/ml zugesetzt. Die eingesetzte Konzentration von LPS entsprach der zur Aktivierung von klassisch aktivierten Makrophagen verwendeten Konzentration (Martinez *et al.* 2006). Da LPS in PBS pH 7,4 gelöst war, wurde auf eine Kontrolle mit Lösungsmittel verzichtet und nur eine Kontrolle ohne weitere Zusätze zum Induktionsmedium verwendet. Die Induktion erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchte über einen Zeitraum von 72 Stunden. Alle 24 Stunden wurde das Induktionsmedium durch das jeweilig neue ersetzt.

### 3.3.2.4. Induktion des Benzamidoxim-Metabolismus durch Substrate

Die primären Hepatozyten wurden ausgesät und kultiviert, wie in Kapitel 3.3.1.3 beschrieben, und die Vorbereitung zur Induktion erfolgte wie in Kapitel 3.3.2.2. In Tabelle 3.3 sind die Induktoren und Lösungsmittelkontrollen mit den eingesetzten Konzentrationen aufgeführt. Als Induktoren wurden die Substrate Benzamidoxim, Guanoxabenz, *N*<sup>4</sup>-Hydroxycytosin und *N*<sup>6</sup>-Hydroxyaminopurin verwendet. Da die Substrate zum ersten Mal hinsichtlich ihres Induktionspotentials untersucht wurden, wurden sie in mindestens zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Als weitere Kontrolle wurden Zellen mit Induktionsmedium ohne Zusätze kultiviert. Über einen Zeitraum von 72 Stunden erfolgte die Induktion mit dem jeweiligen Induktor bzw. Lösungsmittel im Induktionsmedium im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchte. Alle 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel.

Induktor	Induktor- Konzentration	Lösungsmittel- kontrolle	Lösungsmittel- Konzentration
Benzamidoxim	20 $\mu\text{M}$	<i>Aqua bidest.</i>	-
	50 $\mu\text{M}$		-
	100 $\mu\text{M}$		-
	200 $\mu\text{M}$		-
	500 $\mu\text{M}$		-
	750 $\mu\text{M}$		-
	1000 $\mu\text{M}$		-
Guanoxabenz	2 $\mu\text{M}$	Methanol	0,05%
	20 $\mu\text{M}$	Methanol	0,05%
	200 $\mu\text{M}$	Methanol	0,5%
<i>N</i> <sup>4</sup> -Hydroxy- cytosin	20 $\mu\text{M}$	Phosphatpuffer	-
	200 $\mu\text{M}$	(10 mM) pH 6,0	-
<i>N</i> <sup>6</sup> -Hydroxy- aminopurin	20 $\mu\text{M}$	Methanol	0,2%
	200 $\mu\text{M}$	Methanol	2%

**Tabelle 3.3.:** Eingesetzte Konzentrationen von Substraten als Induktoren und der verwendeten Lösungsmittel als Kontrollen.

### 3.3.2.5. Inkubation mit Benzamidoxim

Nach 72-stündiger Induktion erfolgte die Inkubation mit Benzamidoxim zur Aktivitätsbestimmung des drei Komponentensystems, bestehend aus mARC, Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase.

Da die Inkubation in den Gewebekulturplatten stattfinden sollte, wurde das Induktionsmedium von den Kulturplatten abgenommen und die Zellen zweimal mit Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4 gewaschen. Daran schloss sich eine 2-stündige Vorinkubation mit 1500  $\mu$ l Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4 im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Feuchte an, um die Induktoren auszuwaschen. Diese Vorinkubation sollte mögliche Beeinträchtigungen der anschließenden Inkubation durch Induktoren reduzieren.

Das Substrat Benzamidoxim wurde in *Aqua bidest.* gelöst und mit Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4 auf eine Konzentration von 200  $\mu$ M verdünnt. Für die eigentliche Inkubation wurde der Vorinkubationspuffer abgenommen und die Reaktion durch Zugabe von 1500  $\mu$ l 200  $\mu$ M Benzamidoxim-Inkubationslösung gestartet. Als Kontrolle dienten zum einen Hepatozyten, die mit Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4 ohne Substrat inkubiert wurden, und zum anderen Hepatozyten, die mit 2 ml eiskaltem Methanol abgetötet und anschließend mit 200  $\mu$ M Benzamidoxim-Inkubationslösung versetzt wurden. Die Zellkulturplatten wurden für 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Feuchte inkubiert.

Nach 60 Minuten wurden die Zellkulturplatten aus dem Brutschrank genommen, zweimal 600  $\mu$ l Überstand pro Loch abgenommen, in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden die Proben gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Proben wurden bei -20°C gelagert. Kurz vor der Vermessung wurden die gefriergetrockneten Proben in 200  $\mu$ l 100 mM Phosphatpuffer pH 2,2 gelöst, gevortext und für 5 Minuten bei 10.000 U/min zentrifugiert. Die klaren Überstände wurden zur HPLC-Analyse herangezogen.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden die Zellkulturplatten trocken geklopft, mit 500  $\mu$ l 0,1 M Natronlauge versetzt und über Nacht dicht verschlossen stehen

gelassen (Lu und Li 2001). Die aufgelösten Zellen wurden am nächsten Tag mit einem Zellschaber abgekratzt und in 1,5 ml Eppendorfgläser überführt. Der Proteingehalt dieser Lösung wurde mit den BCA-Protein-Assay-Reagenzien nach Smith *et al.* (1985) bestimmt.

### 3.3.2.6. Analytik des Benzamidoxim-Metabolismus

Die Analytik erfolgte mit der nachfolgend angegebenen Methode in Anlehnung an Reeh *et al.* 2007 und Kapitel 2.3.6.3. Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch einen Sartorius-Membranfilter mit einem Porendurchmesser von 0,45  $\mu\text{m}$  filtriert und nach Zugabe von Acetonitril 15 Minuten im Ultraschallbad entgast. Zur Quantifizierung des gebildeten Benzamidins wurde eine 8-Punkt-Kalibrierung erstellt, die den Konzentrationsbereich von 0,1  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  Benzamidin abdeckte. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden die für die Kalibrierung angegebenen Konzentrationen des Metaboliten in 200  $\mu\text{M}$  Benzamidoxim-haltigem Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4 hergestellt. Diese Ansätze wurden auf Kollagenbeschichtete 6-Loch-Gewebekulturplatten gegeben und 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Feuchte inkubiert. Die weitere Aufarbeitung der Ansätze erfolgte wie beschrieben (Kapitel 3.3.2.5).

HPLC Pumpe	Waters 600, Milford, CT, USA
Detektor	Waters 2487 Dual $\lambda$ Absorbance Detector Milford, CT, USA
Autosampler	Waters 717 plus, Milford, CT, USA
Integrator	EZ Chrom™ Chromatography Data System, Version 6.7 und EZ Chrom™ SS42 Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA
Stationäre Phase	Synergy Max-RP 80A 250 × 4,6 mm (4 $\mu\text{m}$ ) Vorsäule: SecurityGuard C18 4 × 3 mm (4 $\mu\text{m}$ ) beides Phenomenex, Aschaffenburg

### 3. Induktion des N-reduktiven drei Komponenten-Enzym-Komplexes

Mobile Phase	82,5% 10 mM Octylsulfonat in Aqua bidest, pH 2,5 (mit konz. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> eingestellt) 17,5% Acetonitril (v/v)
Flussrate	1,0 ml/min
Laufzeit	32 min
Injektionsvolumen	40 $\mu$ l
Detektion	UV: $\lambda = 229$ nm
Retentionszeiten	Benzamidoxim 22,8 min $\pm$ 0,3 min Benzamidin 26,0 min $\pm$ 0,4 min

### 3.3.3. Induktion des Guanoxabenz-Metabolismus

#### 3.3.3.1. Material und Geräte

Die verwendeten Materialien und Geräte wurden in Kapitel 3.3.2.1 bereits beschrieben.

#### 3.3.3.2. Induktion des Guanoxabenz-Metabolismus durch Benzamidoxim

In Kapitel 3.3.1.3 ist die Aussaat und Kultivierung beschrieben. Nach 24 Stunden in Kultur wurde das Kulturmedium abgenommen und durch Induktionsmedium ersetzt. Dem Induktionsmedium wurde Benzamidoxim in den Konzentrationen 20  $\mu$ M, 200  $\mu$ M und 1 mM zugesetzt. Auf eine Lösungsmittelkontrolle wurde verzichtet, da Benzamidoxim in *Aqua bidest.* gelöst wurde. Als einzige Kontrolle diente die Kultur der Hepatozyten mit reinem Induktionsmedium (Tabelle 3.1). Die Induktion mit der jeweiligen Konzentration im Induktionsmedium erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchte über einen Zeitraum von 72 Stunden. Alle 24 Stunden wurde das alte Medium durch das jeweilig neue Induktionsmedium ausgetauscht.

### 3.3.3.3. Inkubation mit Guanoxabenz

Als weiteres Substrat des drei Komponentensystems wurde Guanoxabenz zur Bestimmung der Induktion durch Benzamidoxim eingesetzt. Die Inkubation fand mit in Kollagen-beschichteten 6-Loch-Gewebekulturplatten ( $\varnothing = 3,49$  cm) kultivierten Hepatozyten nach 72-stündiger Induktion statt. Die Durchführung orientierte sich an Fröhlich (2004) und der Inkubation mit Benzamidoxim (Kapitel 3.3.2.5).

Das Induktionsmedium wurde von den Kulturplatten abgenommen und die Zellen zweimal mit Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4 gewaschen. Daran schloss sich eine 2-stündige Vorinkubation mit 1500  $\mu$ l Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4 im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Feuchte an, um Benzamidoxim auszuwaschen. Als Inkubationslösung wurde Guanoxabenz, in einem Gemisch aus gleichen Teilen PBS pH 7,4 und Methanol gelöst, in einer Konzentration von 200  $\mu$ M in Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4 verwendet. Nach der Vorinkubation wurde der Puffer abgenommen und die Reaktion durch Zugabe von 1500  $\mu$ l 200  $\mu$ M Guanoxabenz-Inkubationslösung gestartet. Als Kontrolle dienten zum einen Hepatozyten, die mit Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4 ohne Substrat inkubiert wurden, und zum anderen Hepatozyten, die mit 2 ml eiskaltem Methanol abgetötet und anschließend mit 200  $\mu$ M Guanoxabenz-Inkubationslösung überschichtet wurden. Die Zellkulturplatten wurden für 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Feuchte inkubiert.

Nach 60 Minuten wurden die Zellkulturplatten aus dem Brutschrank genommen, zweimal 600  $\mu$ l Überstand pro Loch abgenommen, in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden die Proben gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert. Kurz vor der Vermessung wurden die gefriergetrockneten Proben in 200  $\mu$ l Fließmittel (Kapitel 3.3.3.4) gelöst, gevortext und für 5 Minuten bei 10.000 U/min zentrifugiert. Die klaren Überstände wurden zur HPLC-Analyse herangezogen.

Der Proteingehalt wurde wie in Kapitel 3.3.2.5 beschrieben bestimmt.



#### 3.3.3.4. Analytik des Guanoxabenz-Metabolismus

Die Analytik des Guanoxabenz-Metaboliten Guanabenz erfolgte mit einer HPLC-Methode, die aus der LC/MS-Methode von Fröhlich (2004) und Dambrova *et al.* (1998a) abgeleitet wurde. Der Ammoniumacetat-Puffer der mobilen Phase wurde durch einen Sartorius-Membranfilter mit einem Porendurchmesser von 0,45  $\mu\text{m}$  filtriert. Im Ultraschallbad wurde nach der Zugabe von Methanol 15 Minuten entgast. Zur Kalibrierung der HPLC-Analytik wurde eine 6-Punkt-Kalibrierung in einem Konzentrationsbereich von 2  $\mu\text{M}$  bis 200  $\mu\text{M}$  Guanabenz erstellt. Um die Wiederfindung zu bestimmen, wurden ebenfalls die für die Kalibrierung angegebenen Konzentrationen des Metaboliten in 200  $\mu\text{M}$  Guanoxabenz-haltigem Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4 hergestellt und auf mit Kollagen-beschichteten 6-Loch-Gewebekulturplatten für 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Feuchte inkubiert. Die weitere Aufarbeitung der Ansätze erfolgte wie in Kapitel 3.3.3.3 beschrieben.

HPLC Pumpe	Waters 600, Milford, CT, USA	
Detektor	Waters 2487 Dual $\lambda$ Absorbance Detector Milford, CT, USA	
Autosampler	Waters 717 plus, Milford, CT, USA	
Integrator	EZ Chrom™ Chromatography Data System, Version 6.7 und EZ Chrom™ SS42 Interface, Scientific Software Inc., Pleasanton, CA, USA	
Stationäre Phase	LiChrospher® 60 RP-select B 125 × 4 mm (5 $\mu$ m) Vorsäule: LiChrospher® 60 RP-select B 4 × 4 mm (5 $\mu$ m) beides Merck, Darmstadt	
Mobile Phase	75% 20 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 4,5 (mit Eisessig eingestellt) 25% Methanol (v/v)	
Flussrate	1,0 ml/min	
Laufzeit	50 min	
Injektionsvolumen	20 $\mu$ l	
Detektion	UV: $\lambda = 272$ nm	
Retentionszeiten	Guanoxabenz	19,1 min $\pm$ 0,5 min
	Guanabenz	25,6 min $\pm$ 0,5 min

## 3.4. Ergebnisse

### 3.4.1. Induktion des Benzamidoxim-Metabolismus

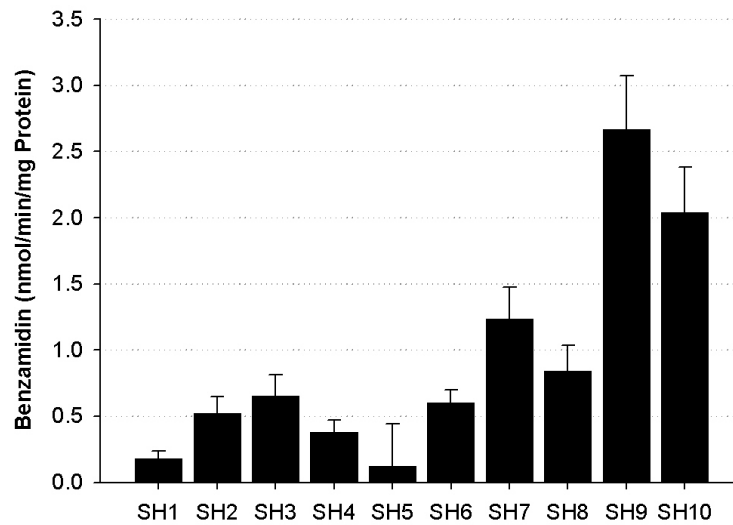
Zur Kalibrierung und Wiederfindung des Benzamidoxim-Metaboliten Benzamidin sind die Flächen der mittels HPLC-Analytik erhaltenen Signale mit den eingesetzten Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  korreliert worden. Die Funktionen der Kalibrierung ( $r^2 = 0,9998$ ) und Wiederfindung ( $r^2 = 0,9999$ ) sind über den gesamten Konzentrationsbereich linear verlaufen. Die Wiederfindungsrate hat  $103,9 \pm 3,8\%$  betragen.

Das Ausmaß der Induktion ist durch eine Aktivitätsbestimmung des *N*-reduktiven drei Komponenten-Enzym-Komplex mit Benzamidoxim als Substrat bestimmt worden. Benzamidoxim wird durch mARC, Cytochrom  $b_5$  und der NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase zu Benzamidin reduziert. Die *N*-reduktive Grundaktivität der verschiedenen Schweinehepatozyten-Präparationen ist stark unterschiedlich. Deswegen sind die Induktionseffekte der einzelnen Substanzen, die hinsichtlich ihres Induktionspotentials an mehreren Hepatozytenchargen untersucht worden sind, in Prozent bezogen auf die jeweilige Grundaktivität angegeben. In Abbildung 3.4 sind die individuellen Aktivitäten aufgeführt.

#### 3.4.1.1. Induktion des Benzamidoxim-Metabolismus durch bekannte Induktoren von Arzneistoff-metabolisierenden Enzymen

In vorherigen Studien dieser Arbeit ist gezeigt worden, dass 3-Methylcholanthren einen potenten Induktor der CYP1A-vermittelten Ethoxyresorufin-*O*-Desethylierung in porcinen Hepatozyten darstellt (Kapitel 2.4.4.1). Ebenso hat sich Rifampicin als Induktor der CYP3A-vermittelten Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung (Kapitel 2.4.5.2.2) erwiesen. Als Positivkontrolle der Induktionsbedingen mit Phenobarbital ist die von Fröhlich (2004) nachgewiesene Induktion der Tolbutamid-4-Hydroxylierung durch Phenobarbital herangezogen worden.

Der AhR-Ligand 3-Methylcholanthren induziert die CYP1A-Aktivität in Schwei-



**Abbildung 3.4.:** Interindividuelle Unterschiede der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinehepatozyten (SH).

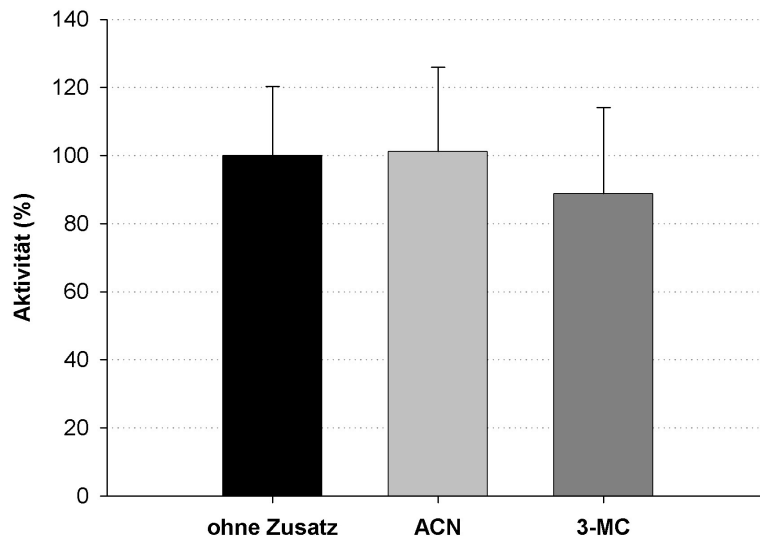
Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 4 Inkubationsansätzen angegeben.

nehepatozyten um den Faktor 22. Im Gegensatz dazu zeigt 3-Methylcholanthren keinen induktiven Einfluss auf die Umsetzung von Benzamidoxim zu Benzamidin, sondern reduziert die Aktivität nicht signifikant (Abbildung 3.5).

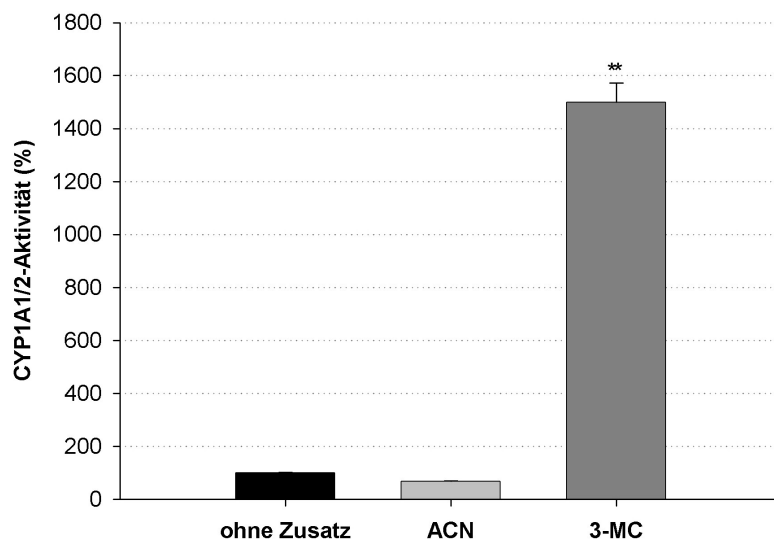
Phenobarbital steigert die Umsetzung von Benzamidoxim zu Benzamidin minimal und nicht signifikant (Abbildung 3.6). Dagegen wird die Tolbutamid-4-Hydroxylierung durch den CAR-Liganden Phenobarbital um den Faktor 4 signifikant gesteigert (Fröhlich 2004).

Durch die Lösungsmittelkontrolle DMSO wird sowohl die Benzamidoxim-Reduktion als auch die Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung signifikant ( $p < 0,01$ ) gesteigert. Durch Rifampicin lässt sich nur die CYP3A-vermittelte Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung induzieren. Die von mARC, Cytochrom b<sub>5</sub> und der NADH-Cytochrom b<sub>5</sub>-Reduktase katalysierte Benzamidoxim-Reduktion wird nicht signifikant durch Rifampicin im Vergleich zum Kulturmedium ohne Zusätze gesteigert, im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO nimmt die Aktivität hingegen nicht signifikant ab (Abbildung 3.7).

### 3. Induktion des *N*-reduktiven drei Komponenten-Enzym-Komplexes



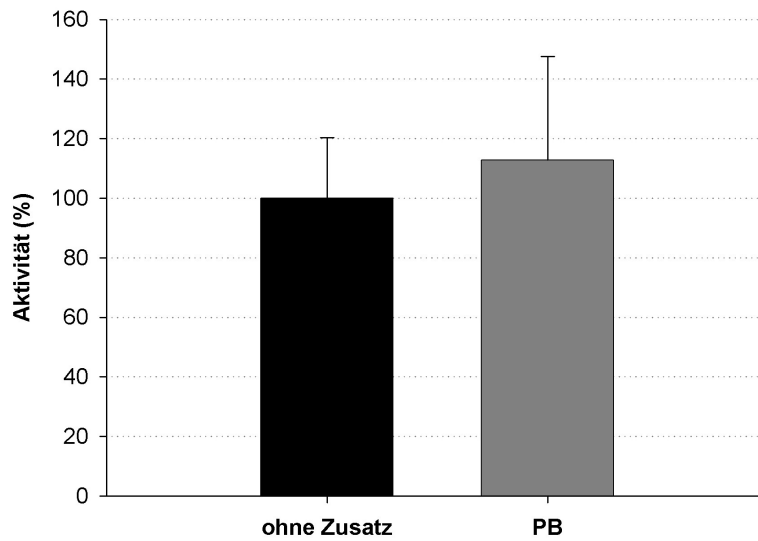
(a) Benzamidoxim-Reduktion



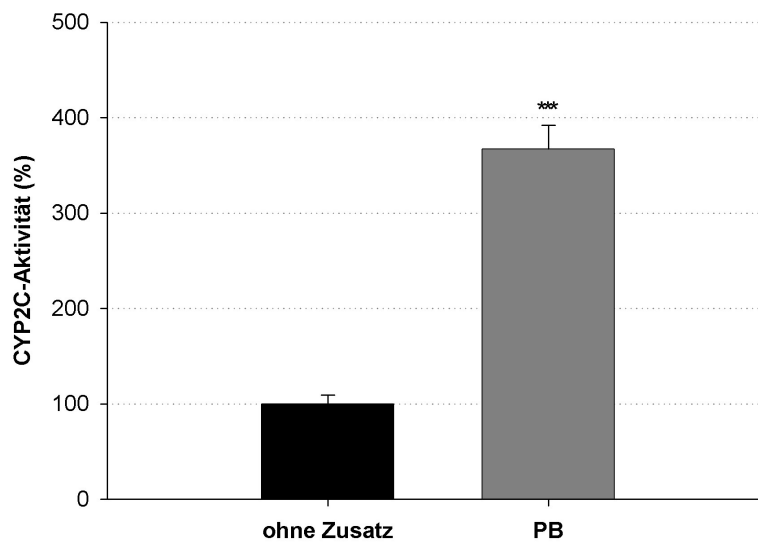
(b) CYP1A1/2-vermittelte Ethoxyresorufin-*O*-Desethylierung

**Abbildung 3.5.:** Einfluss des Induktors 3-Methylcholanthren (3-MC) und der Lösungsmittelkontrolle Acetonitril (ACN) auf die (a) durch mARC, Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase vermittelte *N*-Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin und (b) auf die CYP1A-vermittelte Ethoxyresorufin-*O*-Desethylierung.

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 4 Inkubationsansätzen angegeben. \*\*  $p < 0,01$  gegenüber der Lösungsmittelkontrolle Acetonitril.



(a) Benzamidoxim-Reduktion

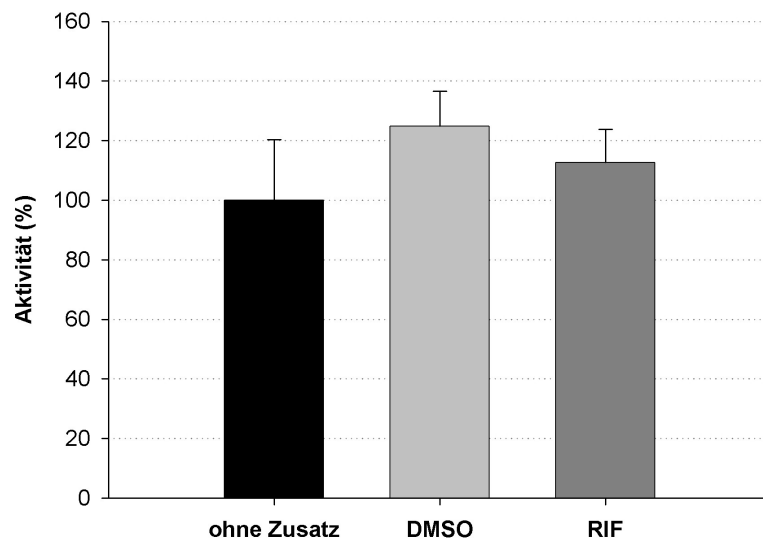


(b) CYP2C-vermittelte Tolbutamid-4-Hydroxylierung

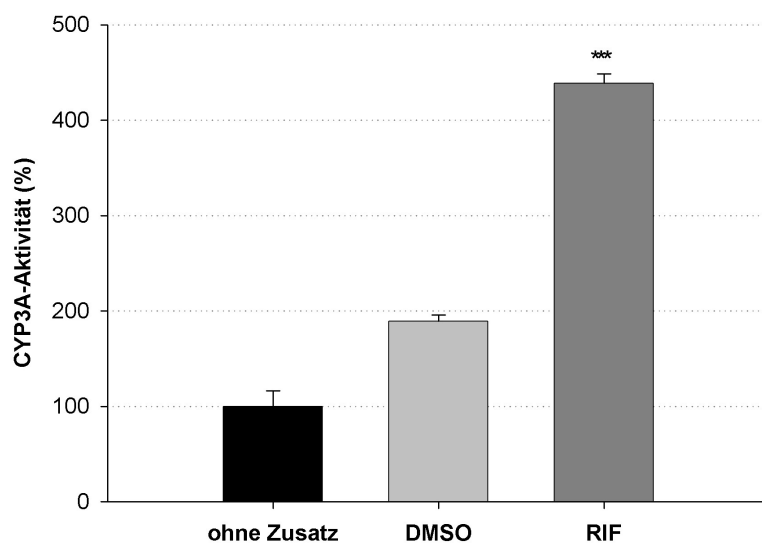
**Abbildung 3.6.:** Einfluss des Induktors Phenobarbital (PB) auf die (a) durch mARC, Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase vermittelte *N*-Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin und (b) auf die wahrscheinlich CYP2C-vermittelte Tolbutamid-4-Hydroxylierung (Fröhlich 2004).

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 4 Inkubationsansätzen angegeben. \*\*\*  $p < 0,001$  gegenüber dem Induktionsmedium ohne Zusatz.

### 3. Induktion des *N*-reduktiven drei Komponenten-Enzym-Komplexes



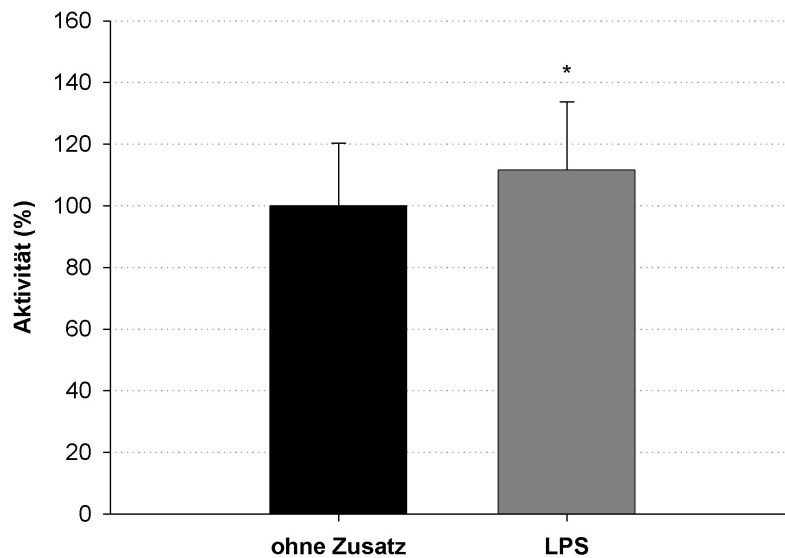
(a) Benzamidoxim-Reduktion



(b) CYP3A-vermittelte Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung

**Abbildung 3.7.:** Einfluss des Induktors Rifampicin (RIF) und der Lösungsmittelkontrolle DMSO auf die (a) durch mARC, Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase vermittelte *N*-Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin und (b) auf die CYP3A-vermittelte Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung. Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 4 Inkubationsansätzen angegeben. \*\*\*  $p < 0,001$  gegenüber der Lösungsmittelkontrolle DMSO.

## 3.4.1.2. Induktion des Benzamidoxim-Metabolismus durch Lipopolysaccharid



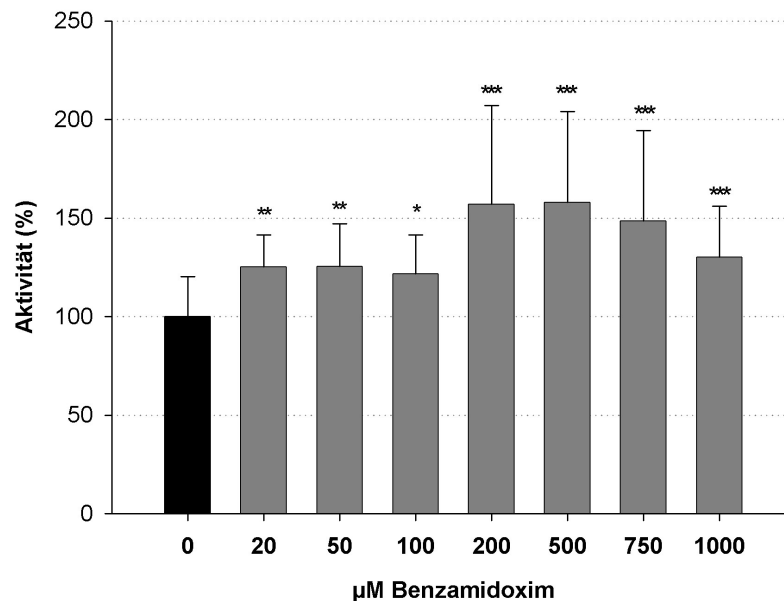
**Abbildung 3.8.:** Einfluss des Toxins Lipopolysaccharid (LPS) auf die durch mARC, Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase vermittelte *N*-Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin.

Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 4 Inkubationsansätzen angegeben. \* $p < 0,05$  gegenüber dem Induktionsmedium ohne Zusatz.

Durch das Toxin Lipopolysaccharid kann die Benzamidoxim-Aktivität signifikant ( $p < 0,05$ ) um 10% gesteigert werden. Von einer starken Induktion der an der Benzamidoxim-Reduktion beteiligten Enzyme, mARC, Cytochrom  $b_5$  und der NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase kann somit nicht gesprochen werden (Abbildung 3.8).



### 3.4.1.3. Induktion des Benzamidoxim-Metabolismus durch Substrate



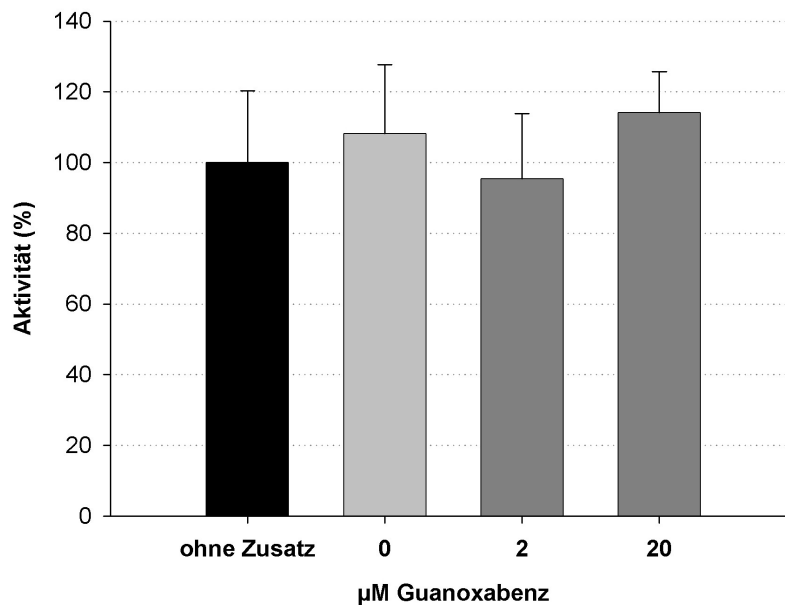
**Abbildung 3.9.:** Einfluss von Benzamidoxim in verschiedenen Konzentrationen auf die durch mARC, Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase vermittelte *N*-Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin.

Mit 0  $\mu\text{M}$  Benzamidoxim ist das Kontroll-Inkubationsmedium bezeichnet. Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 4 Inkubationsansätzen angegeben. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  und \*\*\*  $p < 0,001$  gegenüber dem Induktionsmedium ohne Zusatz.

Wenn es sich bei Substrat und Induktor um dieselbe Substanz handelt, sind Kontrollen wichtig. Zum einen ist 2 Stunden mit Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4 vorinkubiert worden, um sowohl den Induktor als auch während der Induktionszeit gebildete Metabolite aus den Zellen zu waschen. Zum anderen ist als Kontrollwert statt mit Inkubationslösung mit reinem Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4 inkubiert worden, um noch aus dem Induktor gebildetes Benzamidin, welches in dieser Zeit freigesetzt wird, zu detektieren und in die Berechnung des gebildeten Metaboliten während der eigentlichen Inkubation mit einzubeziehen.

Mit Berücksichtigung dieser Kontrollen kann Benzamidoxim in den Konzentrationen von 200  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  und 750  $\mu\text{M}$  seinen eigenen durch mARC, Cytochrom  $b_5$  und der NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase vermittelten Metabolismus bis zu 60% signifi-

kant ( $p < 0,001$ ) steigern. Benzamidoxim in geringen Konzentrationen, wie  $20 \mu\text{M}$ ,  $50 \mu\text{M}$  und  $100 \mu\text{M}$ , und in der Konzentration von  $1000 \mu\text{M}$  steigert die Umsetzung signifikant um den Faktor 1,3 (Abbildung 3.9).

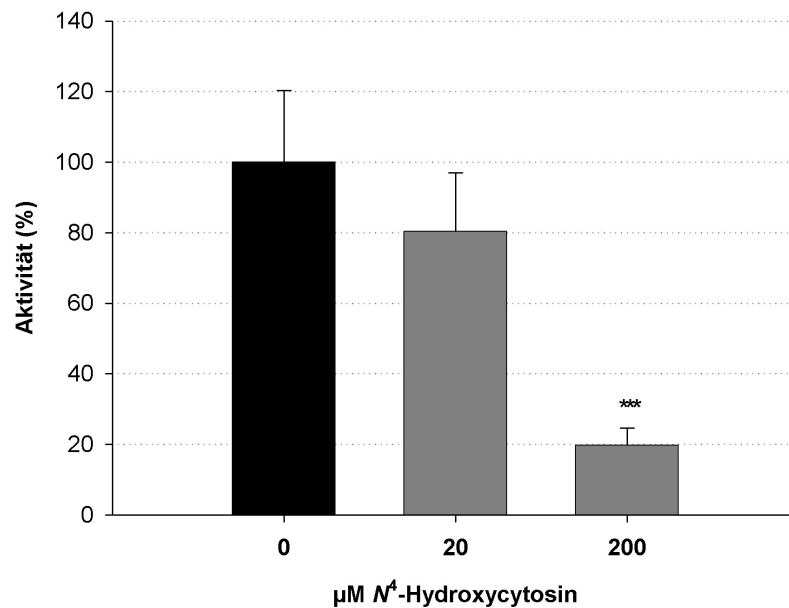


**Abbildung 3.10.:** Einfluss von Guanoxabenz in verschiedenen Konzentrationen auf die durch mARC, Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase vermittelte *N*-Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin.

Mit  $0 \mu\text{M}$  Guanoxabenz ist die Lösungsmittelkontrolle mit 0,05% Methanol bezeichnet. Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 4 Inkubationsansätzen angegeben.

Guanoxabenz hat in den Konzentrationen von  $2 \mu\text{M}$  und  $20 \mu\text{M}$  keinen Einfluss auf die Benzamidoxim-Reduktion, sowohl im Vergleich zum reinen Kulturmedium als auch zur Lösungsmittelkontrolle mit einem Methanolgehalt von 0,05% ( $0 \mu\text{M}$  Guanoxabenz) (Abbildung 3.10). Eine Induktion mit einer Konzentration von  $200 \mu\text{M}$  Guanoxabenz im Induktionsmedium führt zum kompletten Absterben der Hepatozyten innerhalb von 48 Stunden.

### 3. Induktion des *N*-reduktiven drei Komponenten-Enzym-Komplexes

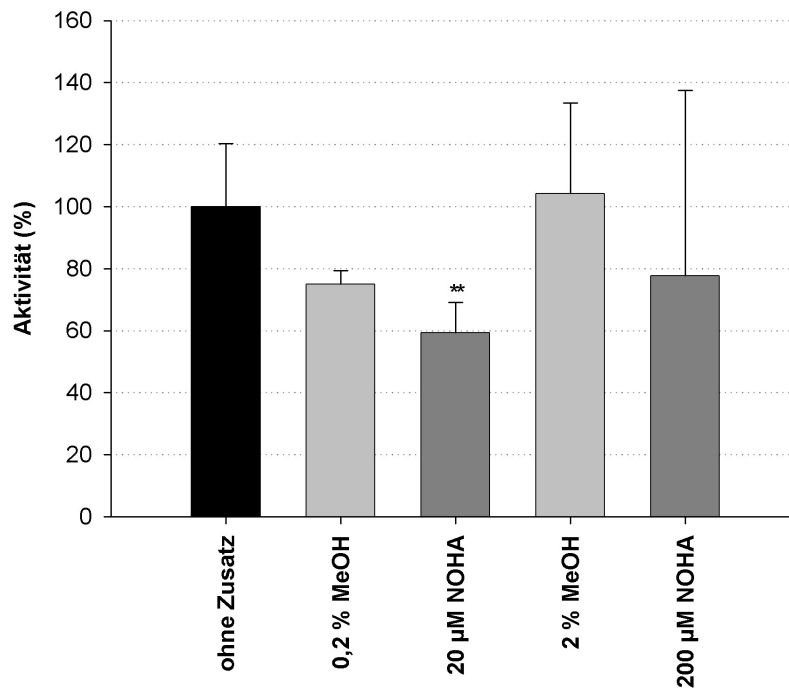


**Abbildung 3.11.:** Einfluss von *N*<sup>4</sup>-Hydroxycytosin in verschiedenen Konzentrationen auf die durch mARC, Cytochrom b<sub>5</sub> und NADH-Cytochrom b<sub>5</sub>-Reduktase vermittelte *N*-Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin.

Mit 0 µM *N*<sup>4</sup>-Hydroxycytosin ist das Kontroll-Inkubationsmedium bezeichnet. Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 4 Inkubationsansätzen angegeben. \*\*\*  $p < 0,001$  gegenüber dem Induktionsmedium ohne Zusatz.

Das mögliche physiologische Substrat *N*<sup>4</sup>-Hydroxycytosin des drei Komponenten-Enzym-Komplexes beeinflusst nach 72-stündiger Induktion die Umsetzung von Benzamidoxim zu Benzamidin zwar, aber statt die Aktivität zu steigern, führt *N*<sup>4</sup>-Hydroxycytosin zur deutlichen Reduktion der Benzamidoxim-Reduktionsaktivität (Abbildung 3.11). *N*<sup>4</sup>-Hydroxycytosin senkt die Umsetzungsrate von Benzamidoxim in geringer Konzentration von 20 µM auf etwa 80%. In der höheren Konzentration von 200 µM wird die Aktivität auf 20% reduziert.

Auch *N*<sup>6</sup>-Hydroxyaminopurin als weiteres mögliches physiologische Substrat induziert die Benzamidoxim-Reduktionsaktivität in Hepatozyten nicht (Abbildung 3.12). Im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrollen reduziert *N*<sup>6</sup>-Hydroxyaminopurin die Aktivität leicht.



**Abbildung 3.12.:** Einfluss von  $N^6$ -Hydroxyaminopurin (NOHA) in verschiedenen Konzentrationen auf die durch mARC, Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase vermittelte  $N$ -Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin. Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 4 Inkubationsansätzen angegeben. \*\* $p < 0,01$  gegenüber der Lösungsmittelkontrolle.

### 3.4.2. Induktion des Guanoxabenz-Metabolismus

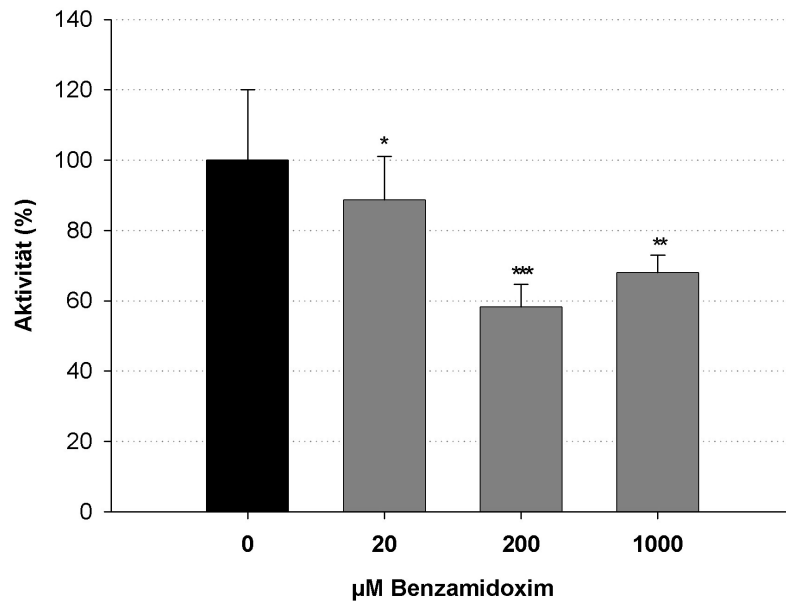
Zur Kalibrierung und Wiederfindung des Guanoxabenz-Metaboliten Guanabenz sind die Flächen der mittels HPLC-Analytik erhaltenen Signale mit den eingesetzten Konzentrationen von  $2 \mu\text{M}$  bis  $200 \mu\text{M}$  korreliert worden. Die Funktionen der Kalibrierung ( $r^2 = 0,9996$ ) und Wiederfindung ( $r^2 = 0,9992$ ) sind über den gesamten Konzentrationsbereich linear verlaufen. Die Wiederfindungsrate hat  $96,4 \pm 2,0\%$  betragen.

Von porcinen Hepatozyten wird Guanoxabenz mit etwa der gleichen Umsetzungsrate metabolisiert wie Benzamidoxim.

Um sicherzustellen, dass die durch Benzamidoxim erreichte Steigerung der eigenen Umsetzung auch die Umsetzungsrate von weiteren Substraten des drei

### 3. Induktion des *N*-reduktiven drei Komponenten-Enzym-Komplexes

Komponenten-Enzym-Komplexes positiv beeinflusst, ist Guanoxabenz als Substrat verwendet worden. Trotz der gleichen Behandlung und Kontrollen reduziert Benzamidoxim die Umsetzungsrate von Guanoxabenz zu Guanabenz in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration (Abbildung 3.13).



**Abbildung 3.13.:** Einfluss von Benzamidoxim in verschiedenen Konzentrationen auf die durch mARC, Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase vermittelte *N*-Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz.

Mit 0  $\mu\text{M}$  Benzamidoxim ist das Kontroll-Inkubationsmedium bezeichnet. Die Umsetzungen sind als Mittelwerte + SD aus mindestens 4 Inkubationsansätzen angegeben. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$  gegenüber dem Induktionsmedium ohne Zusatz.

### 3.5. Diskussion

Im Rahmen dieser Studie kann gezeigt werden, dass die Aktivität des Enzymkomplexes, bestehend aus mARC, Cytochrom b<sub>5</sub> und NADH-Cytochrom b<sub>5</sub>-Reduktase, *in vitro* durch gängige Induktoren Arzneistoff-metabolisierender Enzyme, wie 3-Methylcholanthren, Phenobarbital und Rifampicin, und die Substrate, Benzamidoxim und Guanoxabenz, nicht induzierbar ist. Auch die *N*-hydroxylierten Nukleinbasen *N*<sup>4</sup>-Hydroxycytosin und *N*<sup>6</sup>-Hydroxyaminopurin zeigen keine induktiven Effekte auf die Enzymkomplex-Aktivität.

Die Aktivität der Benzamidoxim-*N*-Reduktion unterscheidet sich zwischen den Hepatozyten-Präparationen. Ursache könnten zum einen interindividuelle Schwankungen sein, zum anderen können minimale Unterschiede in der Qualität der Hepatozyten nicht ausgeschlossen werden. Für interindividuelle Unterschiede sprechen, dass bei Ratten nach Gabe von Benzamidoxim große Unterschiede in den Plasmakonzentrationen von Benzamidin festzustellen sind (Clement *et al.* 1993b). Für weitere am Phase I-Metabolismus beteiligte Enzyme, wie CYP1A1/2 und CYP3A4, werden starke interindividuelle Unterschiede für die Aktivitäten im Menschen beschrieben (Westlind *et al.* 1999, Soars *et al.* 2004, Parkinson *et al.* 2004, Ingelman-Sundberg *et al.* 2007).

Anhand der Positivkontrollen, die bekannte Induktion einer Markeraktivität, kann gezeigt werden, dass die Bedingungen geeignet gewesen sind, um durch die gewählten Induktoren über den jeweiligen Rezeptor Aktivitäten zu induzieren. Da weder durch 3-Methylcholanthren, noch durch Phenobarbital oder durch Rifampicin eine Induktion der Benzamidoxim-*N*-Reduktion erreicht werden kann, kann die Aktivität des drei Komponenten-Enzym-Komplexes weder über AhR, noch über CAR oder über PXR induziert werden. Prinzipiell ist es etwas schwieriger über die Aktivität eines Enzym-Komplexes Rückschlüsse über die Induktion der einzelnen beteiligten Enzyme zu ziehen. Würde aber die Expression von mARC induziert, könnte dies die Aktivität des drei Komponenten-Enzym-Komplexes bis zu einem

### 3. Induktion des *N*-reduktiven drei Komponenten-Enzym-Komplexes

gewissen Grad steigern (Grünewald 2008). Diese Ergebnisse legen nahe, dass mARC durch 3-Methylcholanthren, Phenobarbital und Rifampicin nicht induziert wird. Eine Beeinflussung der Aktivierung von *N*-hydroxylierten Prodrugs durch gängige Induktoren kann also ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zu mARC induziert 3-Methylcholanthren die Aktivität von weiteren Molybdoenzymen, wie Xanthindehydrogenase und die Xanthinoxidase (Sugihara *et al.* 2001). Durch den weiteren potenten AhR-Liganden 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) wird neben Xanthindehydrogenase und Xanthinoxidase auch das Molybdoenzym Aldehyd-Oxidase induziert. Durch 3-Methylcholanthren erfolgt die Induktion der Aldehyd-Oxidase hingegen nicht (Sugihara *et al.* 2001).

Bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) kann ebenfalls die Xanthindehydrogenase und Xanthinoxidase induzieren (Kurosaki *et al.* 1995). LPS in der Konzentration, in der es zur Aktivierung von Makrophagen auf klassische Weise verwendet wird (Martinez *et al.* 2006), steigert zwar signifikant die Aktivität des *N*-reduktiven drei Komponenten-Enzym-Komplexes, aber nur um 10%, so dass nicht von einer starken Induktion gesprochen werden kann. Zur Untersuchung der entzündungsauslösenden Effekte von LPS sind Hepatozyten prinzipiell geeignet (Jeschke *et al.* 2008), so dass davon ausgegangen werden kann, dass der drei Komponenten-Enzym-Komplex keine entscheidende physiologische Rolle bei entzündlichen Prozessen spielt.

Als Induktoren eingesetzte Substanzen werden durch die Hepatozyten metabolisiert, so dass über die 24 Stunden bis zum Mediumwechsel die Konzentration abnimmt. Soll, wie in dieser Studie, das Induktionspotential von Substraten des drei Komponenten-Enzym-Komplexes auf eben diesen untersucht werden, reduziert der *N*-reduktive Enzym-Komplex die Induktorkonzentration. Teilweise wurde das als Induktor dem Kulturmedium zugesetzte Substrat fast vollständig metabolisiert. Im Falle der Induktion mit Benzamidoxim wird so während des Induktionszeitraums kontinuierlich Benzamidin in den Hepatozyten gebildet, deswegen sind die Vorinkubation und die Inkubationskontrollen von Bedeutung. Nach Berücksichtigung dieser Kontrollen kann mit Benzamidoxim als Substrat zur Aktivitätsbestimmung eine

Aktivitätssteigerung des Enzym-Komplexes bestimmt werden. Allerdings kann diese Steigerung der *N*-reduktiven Aktivität unter Verwendung von Guanoxabenz als Substrat zur Aktivitätsbestimmung nicht bestätigt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der vermutete durch sich selbst gesteigerte Benzamidoxim-Metabolismus durch fälschlicher Weise als Metabolit der Aktivitätsbestimmung bestimmtes Benzamidin hervorgerufen wird. Benzamidin ist anscheinend noch aus der Induktionsphase in den Hepatozyten vorhanden gewesen, obwohl als Kontrolle untersucht worden ist, wie viel Benzamidin während der Inkubation aus der Induktionsphase freigesetzt worden ist.

Der  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Agonist Guanoxabenz hat keinen Einfluss auf die Aktivität des drei Komponenten-Enzym-Komplexes. In einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  als Induktor kommt es, verursacht durch die Mutagenität von Guanoxabenz, zum Absterben der Hepatozyten (Clement *et al.* 1996). In geringeren Konzentrationen kann Guanoxabenz vollständig zum untoxischen Guanabenz metabolisiert werden, in höheren Konzentrationen kann Guanoxabenz nicht mehr vollständig *N*-reduziert werden, so dass sich die mutagene Wirkung entfalten kann.

Die *N*-hydroxylierten Nukleinbasen  $N^4$ -Hydroxycytosin und  $N^6$ -Hydroxyaminopurin induzieren nicht die Aktivität des drei Komponenten-Enzym-Komplexes, bestehend aus mARC, Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase. Diese Ergebnisse legen nahe, dass entweder die Grundaktivität des Enzym-Komplexes ausreicht, physiologisch vorkommende Konzentrationen von *N*-hydroxylierten Nukleinbasen zu reduzieren, und/oder dass keine Induktion erfolgt, da die Reduktion *N*-hydroxylierter Nukleinbasen nicht die physiologische Funktion des Enzym-Komplexes darstellt.



### 3.6. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit ist zum ersten Mal die Induktion des drei Komponenten-Enzym-Komplexes, bestehend aus mARC, Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase, untersucht worden. Zur Untersuchung der Induktion sind porcine Hepatozyten verwendet worden.

Die gängigen Induktoren Arzneistoff-metabolisierender Enzyme der AhR-Ligand 3-Methylcholanthren, der CAR-Ligand Phenobarbital und der PXR-Ligand Rifampicin induzieren die Aktivität des Enzym-Komplexes nicht. Auch die Substrate, Benzamidoxim und Guanoxabenz, beeinflussen die *N*-reduktive Aktivität des Enzym-Komplexes kaum. Durch diese Ergebnisse kann somit erstmals gezeigt werden, dass bei der Aktivierung *N*-hydroxylierter Prodrugs durch bekannte induzierende Arzneistoffe keine Wechselwirkungen zu befürchten sind.

Durch die Ergebnisse dieser *in vitro*-Studie kann angenommen werden, dass der drei Komponenten-Enzym-Komplex keine entscheidende physiologische Rolle in entzündlichen Prozessen spielt, da bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) die *N*-reduktive Aktivität nicht stark verändert.

Da die *N*-hydroxylierten Nukleinbasen  $N^4$ -Hydroxycytosin und  $N^6$ -Hydroxyaminopurin keine steigernde Wirkung auf die Enzym-Komplex-Aktivität aufweisen, sind folgende Schlüsse möglich: Die physiologisch vorkommenden Konzentrationen *N*-hydroxylierter Nukleinbasen werden durch die Grundaktivität des Enzym-Komplexes reduziert oder es erfolgt keine Induktion durch mutagene *N*-hydroxylierte Nukleinbasen, da deren Reduktion nicht eine der physiologischen Funktionen des drei Komponenten-Enzym-Komplexes darstellt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Induktionsuntersuchungen stellen den Anfang in der Untersuchung der möglichen Induktion des drei Komponenten-Enzym-Komplexes dar. Als weitere Induktoren wären bekannte Liganden weiterer Kernrezeptoren, z. B. PPAR- oder LXR-Liganden, von Interesse. Zusätzliche Substrate, wie Ximelagatran, könnten ebenfalls untersucht werden. Zur Aufklärung der physiologischen Funktion könnten die Induktion der eigenen Entgiftung durch

toxische Hydroxylamine und eine Mitwirkung an der NO-Synthese und -Freisetzung durch daran beteiligte endogene Substanzen untersucht werden. Neben der Bestimmung der Gesamtzymaktivität kann über die mRNA die Veränderung der Expression der einzelnen beteiligten Enzyme bestimmt werden. Ein weiterer Ansatz stellt die Untersuchung der kodierenden Promotorregion der Gene der beteiligten Enzyme dar, um so Rückschlüsse über beteiligte Kernrezeptoren und Liganden ziehen zu können.

## 4. Zusammenfassung

In der präklinischen Forschung stellen humane Hepatozyten ein wichtiges *in vitro*-Modell zur Untersuchung des Metabolismus, möglicher Wechselwirkungen mit anderen Wirkstoffen und der Toxizität von neuen Arzneistoffkandidaten dar. Aufgrund der schlechten, schwer planbaren und unvorhersehbaren Verfügbarkeit von humanen Hepatozyten wird nach entsprechenden "Ersatz-Hepatozyten" gesucht. Statt der Verwendung von humanen Hepatozyten kann z. B. auf die Hepatozyten anderer Spezies zurückgegriffen werden. Allerdings bestehen Unterschiede zwischen den Spezies in den Enzymen an sich, sowie in deren Aktivität und Spezifität. Die Verwendung von Schweinehepatozyten als Ersatz für humane Hepatozyten scheint eine gute Alternative darzustellen. Zum einen sind porcine Hepatozyten sehr gut verfügbar und zum anderen ähneln die Aktivitäten, die Metabolitenmuster und das Ansprechen auf Induktoren und Inhibitoren dem Verhalten von humanen Hepatozyten (Donato *et al.* 1999, Behnia *et al.* 2000, Skaanild 2006). Trotz allem handelt es sich hier nicht um humane Zellen, so dass Speziesunterschiede bestehen bleiben. Seit etwa zehn Jahren wird versucht, aus verschiedenen extrahepatischen Stammzellen und Vorläuferzellen Hepatozyten zu erzeugen (zusammengefasst von Hengstler *et al.* 2005). Häufig verwendete Vorläuferzellen stellen periphere Blutmonozyten dar, da sie in ausreichenden Mengen verfügbar sind und das Potential besitzen, sich im Körper in eine Vielzahl von verschiedenen Makrophagen-Subpopulationen zu entwickeln. Ein vielversprechendes Beispiel für aus Monozyten-differenzierte Hepatozyten-ähnliche Zellen sind die sogenannten NeoHepatozyten (Ruhnke *et al.* 2005a und 2005b).

Im Rahmen dieser Arbeit sind verschiedene Cytochrom P450-Isoenzym-Aktivitäten, der Einfluss von Inhibitoren und Induktoren auf die Aktivität, der Testosteron-Metabolismus sowie die *N*-reduktive Kompetenz von NeoHepatozyten charakterisiert worden. Erst eine Untersuchung der Funktionalität ermöglicht einen sinnvollen Vergleich, da detektierte Expressionslevel oft sehr gering und für Hepatozyten zu unspezifisch sind. Das Verhalten der untersuchten Eigenschaften soll dem von humanen Hepatozyten entsprechen. Deswegen sind diese Untersuchungen mit humanen und porcinen Hepatozyten parallel durchgeführt worden. Dies ermöglicht zusätzlich den direkten Vergleich von Hepatozyten des Menschen und des Schwein bezüglich vieler Charakteristika des Arzneistoff-Metabolismus. Klassisch aktivierte Makrophagen sind exemplarisch als aus Monozyten-differenzierte Zellen verwendet worden, um zu untersuchen, ob z. B. Cytochrom P450-Aktivitäten eine typische Eigenschaft von NeoHepatozyten oder eine allgemeine Eigenschaft von aus Monozyten-differenzierten Makrophagen darstellen.

So kann gezeigt werden, dass NeoHepatozyten eine nicht-induzierbare CYP1A1/2-Basalaktivität besitzen. Die CYP1A1/2-Basalaktivität von NeoHepatozyten ähnelt der von klassisch aktivierten Makrophagen und humanen Hepatozyten. Im Gegensatz zu primären Hepatozyten lässt sich diese Basalaktivität von NeoHepatozyten und klassisch aktivierten Makrophagen nicht induzieren. Zwar metabolisieren NeoHepatozyten mit geringen Aktivitäten CYP2C9- und CYP3A4-Substrate, aber es kann erstmals gezeigt werden, dass diese Umsetzungen nicht durch Cytochrom P450-Isoenzyme vermittelt werden. Der unspezifische Cytochrom P450-Inhibitor Metyrapon und der selektive CYP3A4-Inhibitor Ketoconazol beeinflussen diese Aktivitäten nicht. Durch die Induktoren Rifampicin und Phenobarbital kann der Metabolismus des CYP3A4-Substrates nicht gesteigert werden. Des Weiteren kann beobachtet werden, dass NeoHepatozyten CYP2E1-abhängige Reaktionen nicht metabolisieren. Allerdings können NeoHepatozyten im Rahmen von Phase II-Reaktionen Glucuronidierungen durchführen. Diese Eigenschaften hinsichtlich des Metabolismus weisen auch klassisch aktivierte Makrophagen auf. Humane Hepatozyten besitzen dagegen wie erwartet CYP2C9-, CYP2E1- und eine induzierbare CYP3A4-Aktivität.

#### 4. Zusammenfassung

NeoHepatozyten metabolisieren Testosteron wie klassisch aktivierte Makrophagen zu  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron und Androstendion, aber nicht zu  $6\beta$ -Hydroxytestosteron, einem für Hepatozyten typischen CYP3A4-Metaboliten. Anhand der entwickelten LC/MS-Methode kann gezeigt werden, dass es sich bei dem von Ruhnke *et al.* (2005b) quantifizierten " $6\beta$ -Hydroxytestosteron" um  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron handelt und dass durch Rifampicin und Phenobarbital diese Bildung induziert werden kann. Im Gegensatz zu Erythrozyten sind NeoHepatozyten, wie auch klassisch aktivierte Makrophagen, nicht in der Lage, *N*-hydroxylierte Verbindungen zu reduzieren, wie anhand von Benzamidoxim als Markersubstrat zum ersten Mal gezeigt werden kann. Da NeoHepatozyten keine hemmbaren und induzierbaren CYP2C9-, CYP2E1- und CYP3A4-Isoenzyme besitzen, sind sie als Ersatz für humane Hepatozyten in *in vitro*-Studien nicht geeignet.

Diese dargestellten Arzneistoff-metabolisierenden Eigenschaften für klassisch aktivierte Makrophagen sind erstmals im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert worden. Des Weiteren kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass NeoHepatozyten sich hinsichtlich ihres Phase I- und Phase II-Metabolismus wie klassisch aktivierte Makrophagen verhalten. Diese Ergebnisse stützen die These, dass es sich bei der Entstehung von NeoHepatozyten als weitere Makrophagen-Subpopulation, um eine normale Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen handelt und somit keine Transdifferenzierung von Monozyten zu Hepatozyten erfolgt (Riquelme *et al.* 2008). Während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen erfolgt die Aktivierung der Expression von sehr vielen Genen, unter anderem auch der Cytochrom P450-Expression, so dass die begrenzte Fähigkeit zum Metabolismus von Xenobiotika eine physiologische Eigenschaft von Makrophagen darstellen könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgt ein umfassender Vergleich der metabolischen Kompetenz von porcinen und humanen Hepatozyten. Porcine Hepatozyten stellen eine gute Alternative zu humanen Hepatozyten dar. Zwar unterscheiden sich die absoluten Umsetzungsraten der einzelnen Markerreaktionen der beiden Spezies im

geringen Maße, aber die gebildeten Testosteron-Metabolite und das Ansprechen auf Induktoren und Inhibitoren von humanen und porcinen Hepatozyten ist sehr ähnlich. Da porcine Hepatozyten, ähnlich wie humane Hepatozyten, auf Induktoren wie z. B. Rifampicin reagieren und *N*-reduktive Eigenschaften aufweisen, sind sie geeignet, um die Induktion des *N*-reduktiven drei Komponenten-Enzym-Komplexes zu untersuchen.

Für die Wirkung essentielle Gruppen in Arzneistoffen stellen oft stark basische Amidine und Guanidine dar. Die *N*-Hydroxylierung dieser funktionellen Gruppen verringert die Basizität und erhöht so die orale Bioverfügbarkeit. Auf peptidomimetische Inhibitoren, wie z. B. den Thrombin-Inhibitor Melagatran, und Therapeutika der Afrikanischen Schlafkrankheit und Leishmaniose ist die *N*-Hydroxylierung als Prodrug-Prinzip angewendet worden (Gustafsson *et al.* 2001, Clement und Lopian 2003, Clement und Raether 1985, Bray *et al.* 2003). Die Aktivierung der *N*-hydroxylierten Prodrugs soll keine zusätzlichen Wechselwirkungen mit anderen Arzneistoffen hervorrufen bzw. durch andere Arzneistoffe beeinflusst werden. Im Rahmen dieser Arbeit ist erstmals die Induktion des die Aktivierung vermittelnden drei Komponenten-Enzym-Komplexes, bestehend aus mARC, Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase, in Hepatozyten untersucht worden. Wegen der unbefriedigenden Ergebnisse mit NeoHepatozyten ist dabei auf porcine Hepatozyten als Alternative zurückgegriffen worden. Es kann gezeigt werden, dass die gängigen Induktoren von Arzneistoff-metabolisierenden Enzymen, wie 3-Methylcholanthren, Phenobarbital und Rifampicin, die Aktivierung nicht beeinflussen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass weitere bekannte induktive Arzneistoffe die Prodrug-Aktivierung ebenfalls nicht ändern und damit keine Wechselwirkungen zu befürchten sind. Auch die untersuchten Substrate des drei Komponenten-Enzym-Komplexes, Benzamidoxim und Guanoxabenz, zeigen keine induktiven Effekte auf die Enzym-Komplex-Aktivität.

Über das Ansprechen auf bekannte Induktoren lassen sich Rückschlüsse auf mögliche physiologische Funktionen der Enzyme ziehen. Die im Körper vorkommenden *N*-hydroxylierten Nukleinbasen könnten natürliche Substrate des drei Komponenten-

#### 4. Zusammenfassung

Enzym-Komplexes darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit kann aber gezeigt werden, dass die beiden untersuchten *N*-hydroxylierten Nukleinbasen, *N*<sup>4</sup>-Hydroxycytosin und *N*<sup>6</sup>-Hydroxyaminopurin, keine Induktion der *N*-Reduktion hervorrufen. Dies lässt vermuten, dass die Reduktion *N*-hydroxylierter Nukleinbasen keine bedeutende physiologische Funktion des drei Komponenten-Enzym-Komplexes darstellt. Bei entzündlichen Prozessen scheint der drei Komponenten-Enzym-Komplex, ebenso keine entscheidende physiologische Rolle zu spielen, da bakterielle Lipopolysaccharide die Aktivität des Enzym-Komplexes nicht induzieren.

# A. Literaturverzeichnis

ABRAHAM N, FELDMAN E, FALCK J, LUTTON J UND SCHWARTZMAN M. Modulation of erythropoiesis by novel human bone marrow cytochrome P450-dependent metabolites of arachidonic acid. *Blood*, **1991**, 78(6):1461-1466.

AJIOKA RS, PHILLIPS JD UND KUSHNER JP. Biosynthesis of heme in mammals. *Biochimica et biophysica acta*, **2006**, 1763(7):723-736.

AKHTAR MK, KADERBHAI NN, HOPPER DJ, KELLY SL UND KADERBHAI MA. Export of a heterologous cytochrome P450 (CYP105D1) in *Escherichia coli* is associated with periplasmic accumulation of uroporphyrin. *The journal of biological chemistry*, **2003**, 278(46):45555-45562.

ANDERSSON TB, SJOBERG H, HOFFMANN KJ, BOOBIS AR, WATTS P, EDWARDS RJ, LAKE BG, PRICE RJ, RENWICK AB, GOMEZ-LECHON MJ, CASTELL JV, INGELMAN-SUNDBERG M, HIDESTRAND M, GOLDFARB PS, LEWIS DF, CORCOS L, GUILLOUZO A, TAAVITSAINEN P UND PELKONEN O. An assessment of human liver-derived *in vitro* systems to predict the *in vivo* metabolism and clearance of almokalant. *Drug metabolism and disposition*, **2001**, 29(5):712-720.

BACKLUND M UND INGELMAN-SUNDBERG M. Regulation of aryl hydrocarbon receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Cellular signalling*, **2005**, 17(1):39-48.

BADER A, BOREL RINKES IH, CLOSS EI, RYAN CM, TONER M, CUNNINGHAM JM, TOMPKINS RG UND YARMUSH ML. A stable long-term hepatocyte culture system for studies of physiologic processes: Cytokine stimulation of the acute phase response in rat and human hepatocytes. *Biotechnology progress*, **1992**, 8(3):219-225.



## A. Literaturverzeichnis

BADER A, HANSEN T, KIRCHNER G, ALLMELING C, HAVERICH A UND BORLAK JT. Primary porcine enterocyte and hepatocyte cultures to study drug oxidation reactions. *British journal of pharmacology*, **2000**, 129(2):331-342.

BALDWIN S, BLOOMER J, SMITH G, AYRTON A, CLARKE S UND CHENERY R. Ketoconazole and sulphaphenazole as the respective selective inhibitors of P4503A and 2C9. *Xenobiotica*, **1995**, 25(3):261-270.

BAPIRO TE, EGNELL AC, HASLER JA UND MASIMIREMBWA CM. Application of higher throughput screening (HTS) inhibition assays to evaluate the interaction of antiparasitic drugs with cytochrome P450s. *Drug metabolism and disposition*, **2001**, 29(1):30-35.

BARBIER O, VILLENEUVE L, BOCHER V, FONTAINE C, TORRA IP, DUHEM C, KOSYKH V, FRUCHART JC, GUILLEMETTE C UND STAELS B. The UDP-glucuronosyltransferase 1A9 enzyme is a peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma target gene. *The journal of biological chemistry*, **2003**, 278(16):13975-13983.

BARON J, ZWADLO-KLARWASSER G, JUGERT F, HAMANN W, RUBBEN A, MUKHTAR H UND MERK H. Cytochrome P450 1B1: A major P450 isoenzyme in human blood monocytes and macrophage subsets. *Biochemical pharmacology*, **1998**, 56(9):1105-1110.

BAYLISS MK, BELL JA, WILSON K UND PARK GR. 7-Ethoxycoumarin O-deethylase kinetics in isolated rat, dog and human hepatocyte suspensions. *Xenobiotica*, **1994**, 24(3):231-241.

BAYLISS M UND SOMERS G. Isolation and culture of human hepatocytes. *Methods in molecular medicine*, **2005**, 107:249-267.

BEHNIA K, BHATIA S, JASTROMB N, BALIS U, SULLIVAN S, YARMUSH M UND TONER M. Xenobiotic metabolism by cultured primary porcine hepatocytes. *Tissue engineering*, **2000**, 6(5):467-479.

BELL L, BICKFORD S, NGUYEN PH, WANG J, HE T, ZHANG B, FRICHE Y, ZIMMERLIN A, URBAN L UND BOJANIC D. Evaluation of fluorescence- and mass spectrometry-based CYP inhibition assays for use in drug discovery. *Journal of biomolecular screening*, **2008**, 13(5):343-353.

BERNHEIM M UND HOCHSTEIN P. Reduction of hydroxylamine by rat liver mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics*, **1968**, 124(1):436-442.

BILIR BM, GUINETTE D, KARRER F , KUMPE DA, KRYSL J, STEPHENS J, MCGAVRAN L, OSTROWSKA A UND DURHAM J. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver transplantation*, **2000**, 6(1):32-40.

BOOBIS A, SESARDIC D, MURRAY B, EDWARDS R, SINGLETON A, RICH K, MURRAY S, DE LA TORRE R, EGURA J, PELKONEN O, PASANEN M, KOBAYASHI S, ZHI-GUANG T UND DAVIES DS. Species variation in the response of the cytochrome P-450-dependent monooxygenase system to inducers and inhibitors. *Xenobiotica*, **1990**, 20(11):1139-1161.

BORODIN Y, MAIBORODIN I, SAFINA A UND STRUNKIN D. The possibility of cytochrome P450 1A1/1A2 induction in cells of distant lymph nodes of rats after enteral treatment with benzo[c]pyrene. *Bulletin of experimental biology and medicine*, **2005**, 140(5):564-567.

BRAY PG, BARRETT MP, WARD SA UND DE KONING HP. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: Past, present and future. *Trends in parasitology*, **2003**, 19(5):232-239.

BREIMO ES UND OSTERUD B. Generation of tissue factor-rich microparticles in an *ex vivo* whole blood model. *Blood coagulation and fibrinolysis*, **2005**, 16(6):399-405.

BREM-EXNER BG, SATTLER C, HUTCHINSON JA, KOEHL GE, KRONENBERG K, FARKAS S, INOUE E, BLANK C, KNECHTLE SJ, SCHLITT HJ, FÄNDRICH F UND GEISSLER EK. Macrophages driven to a novel state of activation have anti-inflammatory properties in mice. *Journal of immunology*, **2008**, 180(1):335-349.

## A. Literaturverzeichnis

BRULPORT M. Differenzierung adulter Stammzellen nach Transplantation in die Leber immundefizienter Mäuse. *Dissertation, Kaiserslautern*, **2006**.

BRULPORT M, SCHORMANN W, BAUER A, HERMES M, ELSNER C, HAMMERSEN FJ, BEERHEIDE W, SPITKOVSKY D, HARTIG W, NÜSSLER A, HORN LC, EDELMANN J, PELZ-ACKERMANN O, PETERSEN J, KAMPRAD M, VON MACH M, LUPP A, ZULEWSKI H UND HENGSTLER JG. Fate of extrahepatic human stem and precursor cells after transplantation into mouse livers. *Hepatology*, **2007**, 46(3):861-870.

BURCHELL B UND COUGHTRIE MW. Genetic and environmental factors associated with variation of human xenobiotic glucuronidation and sulfation. *Environmental health perspectives*, **1997**, 105(4):739-747.

BURKE MD UND MAYER RT. Ethoxyresorufin: Direct fluorimetric assay of a microsomal *O*-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug metabolism and disposition*, **1974**, 2(6):583-588.

BURKE MD, THOMPSON S, WEAVER RJ, WOLF CR UND MAYER RT. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin *O*-dealkylation in human and rat liver. *Biochemical pharmacology*, **1994**, 48(5):923-936.

BURLINA AB. Hepatocyte transplantation for inborn errors of metabolism. *Journal of inherited metabolic disease*, **2004**, 27(3):373-383.

CABLE EE, MILLER TG UND ISOM HC. Regulation of heme metabolism in rat hepatocytes and hepatocyte cell lines:  $\delta$ -Aminolevulinic acid synthase and heme oxygenase are regulated by different heme-dependent mechanisms. *Archives of biochemistry and biophysics*, **2000**, 384(2):280-295.

CANTZ T, MANNS MP UND OTT M. Stem cells in liver regeneration and therapy. *Cell and tissue research*, **2008**, 331(1):271-282.

CARCILLO JA, PARISE RA, ADEDOYIN A, FRYE R, BRANCH RA UND ROMKES M. CYP2D6 mRNA expression in circulating peripheral blood mononuclear cells correlates with *in vivo* debrisoquine hydroxylase activity in extensive metabolizers. *Research communications in molecular pathology and pharmacology*, **1996**, 91(2):149-159.

CHAURET N, TREMBLAY N, LACKMAN RL, GAUTHIER JY, SILVA JM, MAROIS J, YERGEY JA UND NICOLL-GRIFFITH DA. Description of a 96-well plate assay to measure cytochrome P4503A inhibition in human liver microsomes using a selective fluorescent probe. *Analytical biochemistry*, **1999**, 276(2):215-226.

CHOI MH, SKIPPER PL, WISHNOK JS UND TANNENBAUM SR. Characterization of testosterone 11 $\beta$ -hydroxylation catalyzed by human liver microsomal cytochromes P450. *Drug metabolism and disposition*, **2005**, 33(6):714-718.

CHRISTIANSEN K. Charakterisierung und Einsatz von Hepatozyten-Kulturen als *in vitro*-Modell zur Untersuchung von Phase 2-Reaktionen des Benzamidoxims. *Dissertation, Kiel*, **2000**.

CLEMENT B UND RAETHER W. Amidoximes of pentamidine: Synthesis, trypanocidal and leishmanicidal activity. *Arzneimittelforschung*, **1985**, 35(7):1009-1014.

CLEMENT B, SCHMITT S UND ZIMMERMANN M. Enzymatic reduction of benzamidoxime to benzamidine. *Archiv der Pharmazie*, **1988a**, 321(12):955-956.

CLEMENT B, SCHMEZER P, WEBER H, SCHLEHOFER JR, SCHMITT S UND POOL BL. Genotoxic activities of benzamidine and its *N*-hydroxylated metabolite benzamidoxime in *Salmonella typhimurium* and mammalian cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*, **1988b**, 114(4):363-368.

CLEMENT B UND KUNZE T. Hepatic microsomal *N*-hydroxylation of adenine to 6-*N*-hydroxylaminopurine. *Biochemical pharmacology*, **1990**, 39(5):925-933.

## A. Literaturverzeichnis

CLEMENT B, SCHULTZE-MOSGAU M UND WOHLERS H. Cytochrome P450 dependent *N*-hydroxylation of a guanidine (debrisoquine), microsomal catalysed reduction and further oxidation of the *N*-hydroxy-guanidine metabolite to the urea derivative. Similarity with the oxidation of arginine to citrulline and nitric oxide. *Biochemical pharmacology*, **1993a**, 46(12):2249-2267.

CLEMENT B, IMMEL M, SCHMITT S UND STEINMANN U. Biotransformation of benzamide and benzamidoxime *in vivo*. *Archiv der Pharmazie*, **1993b**, 326(10):807-812.

CLEMENT B, DEMESMAEKER M UND LINNE S. Microsomal catalyzed *N*-hydroxylation of guanabenz and reduction of the *N*-hydroxylated metabolite: Characterization of the two reactions and genotoxic potential of guanoxabenz. *Chemical research in toxicology*, **1996**, 9(4):682-688.

CLEMENT B UND DEMESMAEKER M. Formation of guanoxabenz from guanabenz in human liver. A new metabolic marker for CYP1A2. *Drug metabolism and disposition*, **1997**, 25(11):1266-1271.

CLEMENT B. Oxidation and reduction of Nitrogen via CYP 450: Importance of the reduction of genotoxic *N*-hydroxylated functional groups. *Drug metabolism: Towards the next millennium*. N. Gooderham (Hrsg.), IOS Press. **1998**, 59-71.

CLEMENT B, CHRISTIANSEN K UND GIRRESER U. Phase 2 metabolites of *N*-hydroxylated amidines (amidoximes): Synthesis, *in vitro* formation by pig hepatocytes, and mutagenicity testing. *Chemical research in toxicology*, **2001**, 14(3):319-326.

CLEMENT B. Reduction of *N*-hydroxylated compounds: Amidoximes (*N*-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug metabolism reviews*, **2002**, 34(3):565-579.

CLEMENT B UND LOPIAN K. Characterization of *in vitro* biotransformation of new, orally active, direct thrombin inhibitor ximelagatran, an amidoxime and ester prodrug. *Drug metabolism and disposition*, **2003**, 31(5):645-651.

CLEMENT B, MAU S, DETERS S UND HAVEMEYER A. Hepatic, extrahepatic, microsomal, and mitochondrial activation of the *N*-hydroxylated prodrugs benzamidoxime, guanoxabenz, and Ro 48-3656 ([1-[(2*S*)-2-[[4-[(hydroxyamino)iminomethyl]benzoyl]amino]-1-oxopropyl]-4-piperidinyloxy]-acetic acid). *Drug metabolism and disposition*, **2005**, 33(11):1740-1747.

COHEN LH, REMLEY MJ, RAUNIG D UND VAZ AD. *In vitro* drug interactions of cytochrome P450: An evaluation of fluorogenic to conventional substrates. *Drug metabolism and disposition*, **2003**, 31(8):1005-1015.

COON MJ, DING XX, PERNECKY SJ UND VAZ AD. Cytochrome P450: Progress and predictions. *The FASEB journal*, **1992**, 6(2):669-673.

DAMBROVA M, UHLEN S, WELCH CJ UND WIKBERG JE. Identification of an *N*-hydroxyguanidine reducing activity of xanthine oxidase. *European journal of biochemistry*, **1998a**, 257(1):178-184.

DAMBROVA M, UHLEN S, WELCH CJ, PRUSIS P UND WIKBERG JE. Characterization of the enzymatic activity for biphasic competition by guanoxabenz (1-(2,6-dichlorobenzylidene-amino)-3-hydroxyguanidine) at  $\alpha$ 2-adrenoceptors. II. Description of a xanthine-dependent enzymatic activity in spleen cytosol. *Biochemical pharmacology*, **1998b**, 56(9):1121-1128.

DE KANTER R, DE JAGER MH, DRAAISMA AL, JURVA JU, OLINGA P, MEIJER DK UND GROOTHUIS GM. Drug-metabolizing activity of human and rat liver, lung, kidney and intestine slices. *Xenobiotica*, **2002**, 32(5):349-362.

DONATO MT, CASTELL JV UND GOMEZ-LECHON MJ. Effect of model inducers on cytochrome P450 activities of human hepatocytes in primary culture. *Drug metabolism and disposition*, **1995**, 23(5):553-558.

## A. Literaturverzeichnis

DONATO MT, CASTELL JV UND GOMEZ-LECHON MJ. Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: Comparison with other hepatic cellular models. *Journal of hepatology*, **1999**, 31(3):542-549.

DONATO MT, JIMENEZ N, CASTELL JV UND GOMEZ-LECHON MJ. Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug metabolism and disposition*, **2004**, 32(7):699-706.

DONATO MT, LAHOZ A, JIMENEZ N, PEREZ G, SERRALTA A, MIR J, CASTELL JV UND GOMEZ-LECHON MJ. Potential impact of steatosis on cytochrome P450 enzymes of human hepatocytes isolated from fatty liver grafts. *Drug metabolism and disposition*, **2006**, 34(9):1556-1562.

DONATO MT, LAHOZ A, CASTELL JV UND GOMEZ-LECHON MJ. Cell lines: A tool for *in vitro* drug metabolism studies. *Current drug metabolism*, **2008**, 9(1):1-11.

DOSS M, SIXEL-DIETRICH F UND VERSPOHL F. "Glucose effect" and rate limiting function of uroporphyrinogen synthase on porphyrin metabolism in hepatocyte culture: Relationship with human acute hepatic porphyrias. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*, **1985**, 23(9):505-513.

DZELETOVIC N, MCGUIRE J, DAUJAT M, THOLANDER J, EMA M, FUJII-KURIYAMA Y, BERGMAN J, MAUREL P UND POELLINGER L. Regulation of dioxin receptor function by omeprazole. *The journal of biological chemistry*, **1997**, 272(19):12705-12713.

EAGLING V, TJIA J UND BACK D. Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probe substrates in human and rat liver microsomes. *British journal of clinical pharmacology*, **1998**, 45(2):107-114.

EHNERT S, NÜSSLER AK, LEHMANN A UND DOOLEY S. Blood monocyte-derived neohepatocytes as *in vitro* test system for drug metabolism. *Drug metabolism and disposition*, **2008**, 36(9):1922-1929.

ETTMAYER P, AMIDON GL, CLEMENT B UND TESTA B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *Journal of medicinal chemistry*, **2004**, 47(10):2393-2404.

FALANY CN. Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *The FASEB journal*, **1997**, 11(4):206-216.

FARTHING MJ, VINSON GP, EDWARDS CR UND DAWSON MA.  $17\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase activity in the mucosa of rat and human small intestine. *Journal of steroid biochemistry*, **1981**, 14(11):1107-1113.

FDA (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). Guidance for industry: Drug interaction studies - Study design, data analysis, and implications for dosing and labeling. **2006**.

FISHER MB, PAINE MF, STRELEVITZ TJ UND WRIGHTON SA. The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism. *Drug metabolism reviews*, **2001**, 33(3-4):273-297.

FISHER RA, BU D, THOMPSON M, TISNADO J, PRASAD U, STERLING R, POSNER M UND STROM S. Defining hepatocellular chimerism in a liver failure patient bridged with hepatocyte infusion. *Transplantation*, **2000**, 69(2):303-307.

FORTH W, HENSCHLER D, RUMMEL W, FÖRSTERMANN U UND STARKE K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban und Fischer Verlag, München. **2001**.

FRIEDRICH G, ROSE T UND RISSLER K. Determination of testosterone metabolites in human hepatocytes. I. Development of an on-line sample preparation liquid chromatography technique and mass spectroscopic detection of  $6\beta$ -hydroxytestosterone. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, **2003**, 784(1):49-61.

FRIEDRICH S. Aktivität und Kinetik eines mikrosomalen CYP2D-Enzymes. *Dissertation, Kiel*, **2003**.



## A. Literaturverzeichnis

FRÖHLICH AK. Studium neuer Phase II-Reaktionen von ausgewählten Arzneistoffe mithilfe von Hepatozytenkulturen und UDP-Glucuronyltransferasen. *Dissertation, Kiel*, **2004**.

FRÖHLICH AK, GIRRESER U UND CLEMENT B. Metabolism of benzamidoxime (*N*-hydroxyamidine) in human hepatocytes and role of UDP-glucuronosyltransferases. *Xenobiotica*, **2005**, 35(1):17-25.

FUJII-KURIYAMA Y UND MIMURA J. Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochemical and biophysical research communications*, **2005**, 338(1):311-317.

FUKUSHIMA H, GRINSTEAD GF UND GAYLOR JL. Total enzymic synthesis of cholesterol from lanosterol. Cytochrome b<sub>5</sub>-dependence of 4-methyl sterol oxidase. *The journal of biological chemistry*, **1981**, 256(10):4822-4826.

GAMAGE N, BARNETT A, HEMPEL N, DUGGLEBY RG, WINDMILL KF, MARTIN JL UND MCMANUS ME. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicological sciences*, **2006**, 90(1):5-22.

GARLE MJ, KNIGHT A, DOWNING AT, JASSI KL, CLOTHIER RH UND FRY JR. Stimulation of dichlorofluorescein oxidation by capsaicin and analogues in RAW 264 monocyte/macrophages: Lack of involvement of the vanilloid receptor. *Biochemical pharmacology*, **2000**, 59(5):563-572.

GASHAW I, KIRCHHEINER J, GOLDAMMER M, BAUER S, SEIDEMANN J, ZOLLER K, MROZIKIEWICZ PM, ROOTS I UND BROCKMOLLER J. Cytochrome P450 3A4 messenger ribonucleic acid induction by rifampin in human peripheral blood mononuclear cells: Correlation with alprazolam pharmacokinetics. *Clinical pharmacology and therapeutics*, **2003**, 74(5):448-457.

GEBHARDT R, HENGSTLER J, MÜLLER D, GLOCKNER R, BUENNING P, LAUBE B, SCHMELZER E, ULLRICH M, UTESCH D, HEWITT N, RINGEL M, HILZ B, BADER A, LANGSCH A, KOOSE T, BURGER H, MAAS J UND OESCH F. New hepatocyte *in vitro* systems for drug metabolism: Metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. *Drug metabolism reviews*, **2003**, 35(2-3):145-213.

GHOSAL A, HAPANGAMA N, YUAN Y, LU X, HORNE D, PATRICK JE UND ZBAIDA S. Rapid determination of enzyme activities of recombinant human cytochromes P450, human liver microsomes and hepatocytes. *Biopharmaceutics and drug disposition*, **2003**, 24(9):375-384.

GOMEZ-LECHON MJ, DONATO MT, CASTELL JV UND JOVER R. Human hepatocytes in primary culture: The choice to investigate drug metabolism in man. *Current drug metabolism*, **2004**, 5(5):443-462.

GORDON S UND TAYLOR P. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews. Immunology*, **2005**, 5(12):953-964.

GOTTFRIED E, REHLI M, HAHN J, HOLLER E, ANDREESEN R UND KREUTZ M. Monocyte-derived cells express CYP27A1 and convert vitamin D3 into its active metabolite. *Biochemical and biophysical research communications*, **2006**, 349(1):209-213.

GREENLEE WF UND POLAND A. An improved assay of 7-ethoxycoumarin *O*-deethylase activity: Induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **1978**, 205(3):596-605.

GROMPE M. The origin of hepatocytes. *Gastroenterology*, **2005**, 128(7):2158-2160.

## A. Literaturverzeichnis

GRÜNEWALD S, WAHL B, BITTNER F, HUNGELING H, KANZOW S, KOTTHAUS J, SCHWERING U, MENDEL RR UND CLEMENT B. The fourth molybdenum containing enzyme mARC: Cloning and involvement in the activation of *N*-hydroxylated prodrugs. *Journal of medicinal chemistry*, **2008**, 51(24):8173-8177.

GRÜNEWALD S. Studien zur Biotransformation *N*-hydroxylierter Verbindungen durch molybdäncofaktorabhängige Enzymssysteme. *Dissertation, Kiel*, **2008**.

GUENGERICH F. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical research in toxicology*, **2001**, 14(6):611-650.

GUENGERICH F. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *The AAPS journal*, **2006**, 8(1):101-111.

GUENGERICH F. Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, **2007**, 21(4):163-168.

GUILLOUZO A, CORLU A, ANINAT C, GLAISE D, MOREL F UND GUGUEN-GUILLOUZO C. The human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chemico-biological interactions*, **2007**, 168(1):66-73.

GUSTAFSSON D, NYSTROM J, CARLSSON S, BREDBERG U, ERIKSSON U, GYZANDER E, ELG M, ANTONSSON T, HOFFMANN K, UNGELL A, SORENSEN H, NAGARD S, ABRAHAMSSON A UND BYLUND R. The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: Intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. *Thrombosis research*, **2001**, 101(3):171-181.

GUZELIAN PS UND BISSELL DM. Effect of cobalt on synthesis of heme and cytochrome P-450 in the liver. Studies of adult rat hepatocytes in primary monolayer culture and *in vivo*. *The journal of biological chemistry*, **1976**, 251(14):4421-4427.

HAMMER F, DRESCHER DG, SCHNEIDER SB, QUINKLER M, STEWART PM, ALLOLIO B UND ARLT W. Sex steroid metabolism in human peripheral blood mononuclear cells changes with aging. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*, **2005**, 90(11):6283-6289.

HANSEN T, BORLAK J UND BADER A. Cytochrome P450 enzyme activity and protein expression in primary porcine enterocyte and hepatocyte cultures. *Xenobiotica*, **2000**, 30(1):27-46.

HARNASTAI IN, GILEP AA UND USANOV SA. The development of an efficient system for heterologous expression of cytochrome P450s in Escherichia coli using hemA gene co-expression. *Protein expression and purification*, **2006**, 46(1):47-55.

HAVEMEYER A, BITTNER F, WOLLERS S, MENDEL R, KUNZE T UND CLEMENT B. Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *The journal of biological chemistry*, **2006**, 281(46):34796-34802.

HASSAN NF, CAMPBELL DE UND DOUGLAS SD. Phorbol myristate acetate induced oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein by neutrophils from patients with chronic granulomatous disease. *Journal of leukocyte biology*, **1988**, 43(4):317-322.

HAUPTMANN J, PAINTZ M, KAISER B UND RICHTER M. Reduction of a benzamidoxime derivative to the corresponding benzamidine *in vivo* and *in vitro*. *Die Pharmazie*, **1988**, 43(8):559-560.

HENGSTLER J, UTESCH D, STEINBERG P, PLATT K, DIENER B, RINGEL M, SWALES N, FISCHER T, BIEFANG K, GERL M, BOTTGER T UND OESCH F. Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available *in vitro* model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug metabolism reviews*, **2000**, 32(1):81-118.

## A. Literaturverzeichnis

HENGSTLER JG, BRULPORT M, SCHORMANN W, BAUER A, HERMES M, NÜSSLER AK, FÄNDRICH F, RUHNKE M, UNGEFROREN H, GRIFFIN L, BOCKAMP E, OESCH F UND VON MACH MA. Generation of human hepatocytes by stem cell technology: Definition of the hepatocyte. *Expert opinion on drug metabolism and toxicology*, **2005**, 1(1):61-74.

HEWITT NJ, LECHON MJ, HOUSTON JB, HALLIFAX D, BROWN HS, MAUREL P, KENNA JG, GUSTAVSSON L, LOHMANN C, SKONBERG C, GUILLOUZO A, TUSCHL G, LI AP, LECLUYSE E, GROOTHUIS GM UND HENGSTLER JG. 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 metabolism reviews*, **2007a**, 39(1):159-234.

HEWITT NJ, DE KANTER R UND LECLUYSE E. Induction of drug metabolizing enzymes: A survey of *in vitro* methodologies and interpretations used in the pharmaceutical industry - Do they comply with FDA recommendations? *Chemico-biological interactions*, **2007b**, 168(1):51-65.

HILDEBRANDT A UND ESTABROOK R. Evidence for the participation of cytochrome b<sub>5</sub> in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions. *Archives of biochemistry and biophysics*, **1971**, 143(1):66-79.

HODGES V, MOLLOY G UND WICKRAMASINGHE S. Demonstration of mRNA for five species of cytochrome P450 in human bone marrow, bone marrow-derived macrophages and human haemopoietic cell lines. *British journal of haematology*, **2000**, 108(1):151-156.

HUKKANEN J, HAKKOLA J, ANTTILA S, PIIPARI R, KARJALAINEN A, PELKONEN O UND RAUNIO H. Detection of mRNA encoding xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in human bronchoalveolar macrophages and peripheral blood lymphocytes. *Molecular carcinogenesis*, **1997**, 20(2):224-230.

HUMMEL MA, TRACY TS, HUTZLER JM, WAHLSTROM JL, ZHOU Y UND ROCK DA. Influence of fluorescent probe size and cytochrome b<sub>5</sub> on drug-drug interactions in CYP2C9. *Journal of biomolecular screening*, **2006**, 11(3):303-309.

HUTCHINSON JA, RIQUELME P, WUNDT J, HENGSTLER JG, FÄNDRICH F, UNGEFROREN H UND CLEMENT B. Could treatment with neohepatocytes benefit patients with decompensated chronic liver disease? *American journal of hematology*, **2007**, 82(11):947-948.

HUTCHINSON JA, RIQUELME P, BREM-EXNER BG, SCHULZE M, MATTHAI M, RENDERS L, KUNZENDORF U, GEISSLER EK UND FÄNDRICH F. Transplant acceptance-inducing cells as an immune-conditioning therapy in renal transplantation. *Transplant international*, **2008**, 21(8):728-741.

HUTSON J UND WICKRAMASINGHE S. Expression of CYP2E1 by human monocyte-derived macrophages. *The journal of pathology*, **1999**, 188(2):197-200.

INGELMAN-SUNDBERG M, SIM SC, GOMEZ A UND RODRIGUEZ-ANTONA C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacology and therapeutics*, **2007**, 116(3):496-526.

JACKSON JP, FERGUSON SS, NEGISHI M UND GOLDSTEIN JA. Phenytoin induction of the cyp2c37 gene is mediated by the constitutive androstane receptor. *Drug metabolism and disposition*, **2006**, 34(12):2003-2010.

JANARDAN SK, LOWN KS, SCHMIEDLIN-REN P, THUMMEL KE UND WATKINS PB. Selective expression of CYP3A5 and not CYP3A4 in human blood. *Pharmacogenetics*, **1996**, 6(5):379-385.

JESCHKE MG, KLEIN D, THASLER WE, BOLDER U, SCHLITT HJ, JAUCH KW UND WEISS TS. Insulin decreases inflammatory signal transcription factor expression in primary human liver cells after LPS challenge. *Molecular medicine*, **2008**, 14(1-2):11-19.

## A. Literaturverzeichnis

KADLUBAR F, MCKEE E UND ZIEGLER D. Reduced pyridine nucleotide-dependent *N*-hydroxy amine oxidase and reductase activities of hepatic microsomes. *Archives of biochemistry and biophysics*, **1973**, 156(1):46-57.

KADLUBAR F UND ZIEGLER D. Properties of a NADH-dependent *N*-hydroxy amine reductase isolated from pig liver microsomes. *Archives of biochemistry and biophysics*, **1974**, 162(1):83-92.

KAHL GF, MULLER W, KAHL R, JONEN HG UND NETTER KJ. Differential inhibition of biphenyl hydroxylation in perfused rat liver. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, **1978**, 304(3):297-301.

KANEBRATT KP UND ANDERSSON TB. Evaluation of HepaRG cells as an *in vitro* model for human drug metabolism studies. *Drug metabolism and disposition*, **2008**, 36(7):1444-1452.

KARLSON P, DOENECKE D UND KOOLMAN J. Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. **1994**.

KAWAJIRI K UND FUJII-KURIYAMA Y. Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Archives of biochemistry and biophysics*, **2007**, 464(2):207-212.

KAZEMNEJAD S, ALLAMEH A, SOLEIMANI M, GHAREHBAGHIAN A, MOHAMMADI Y, AMIRIZADEH N UND JAZAYERY M. Biochemical and molecular characterization of hepatocyte-like cells derived from human bone marrow mesenchymal stem cells on a novel three-dimensional biocompatible nanofibrous scaffold. *Journal of gastroenterology and hepatology.*, **2008**, im Druck

KHROMOV-BORISOV NN. Naming the mutagenic nucleic acid base analogs: The Galatea syndrome. *Mutation research*, **1997**, 379(1):95-103.

KROVAT BC, TRACY JH UND OMIECINSKI CJ. Fingerprinting of cytochrome P450 and microsomal epoxide hydrolase gene expression in human blood cells. *Toxicological sciences*, **2000**, 55(2):352-360.

KRÜGER P. Über Abkömmlinge des Bensenylamidoxims. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **1885**, 18:1055-1060.

KUROSAKI M, LI CALZI M, SCANZIANI E, GARATTINI E UND TERAIO M. Tissue- and cell-specific expression of mouse xanthine oxidoreductase gene *in vivo*: Regulation by bacterial lipopolysaccharide. *The biochemical journal*, **1995**, 306(Pt 1):225-234.

LAGASSE E, CONNORS H, AL-DHALIMY M, REITSMA M, DOHSE M, OSBORNE L, WANG X, FINEGOLD M, WEISSMAN IL UND GROMPE M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nature medicine*, **2000**, 6(11):1229-1234.

LANG DS, BECKER S, DEVLIN RB UND KOREN HS. 2,3,7,8-TCDD induces cytochrome P450 enzyme activity but not proliferation or phenotypical changes in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology letters*, **1996**, 88(1-3):317-325.

LAU YY, SAPIDOU E, CUI X, WHITE RE UND CHENG KC. Development of a novel *in vitro* model to predict hepatic clearance using fresh, cryopreserved, and sandwich-cultured hepatocytes. *Drug metabolism and disposition*, **2002**, 30(12):1446-1454.

LECLUYSE E. Human hepatocyte culture systems for the *in vitro* evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *European journal of pharmaceutical sciences*, **2001**, 13(4):343-368.

LINDL T UND BAUER J. Zell- und Gewebekultur. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York. **1994**.



A. Literaturverzeichnis

LU C UND LI AP. Species comparison in P450 induction: Effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog. *Chemico-biological interactions*, **2001**, 134(3):271-281.

MACKENZIE PI, OWENS IS, BURCHELL B, BOCK KW, BAIROCH A, BELANGER A, FOURNEL-GIGLEUX S, GREEN M, HUM DW, IYANAGI T, LANCET D, LOUISOT P, MAGDALOU J, CHOWDHURY JR, RITTER JK, SCHACHTER H, TEPHLY TR, TIPTON KF UND NEBERT DW. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: Recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics*, **1997**, 7(4):255-269.

MACKENZIE PI, BOCK KW, BURCHELL B, GUILLEMETTE C, IKUSHIRO S, IYANAGI T, MINERS JO, OWENS IS UND NEBERT DW. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenetics and genomics*, **2005**, 15(10):677-685.

MANGI MH UND NEWLAND AC. Interleukin-3 in hematology and oncology: Current state of knowledge and future directions. *Cytokines, cellular and molecular therapy*, **1999**, 5(2):87-95.

MARKS BD, THOMPSON DV, GOOSSENS TA UND TRUBETSKOY OV. High-throughput screening assays for the assessment of CYP2C9\*1, CYP2C9\*2, and CYP2C9\*3 metabolism using fluorogenic Vivid substrates. *Journal of biomolecular screening*, **2004**, 9(5):439-449.

MARTINEZ FO, GORDON S, LOCATI M UND MANTOVANI A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: New molecules and patterns of gene expression. *The journal of immunology*, **2006**, 177(10):7303-7311.

MASUBUCHI N, LI AP UND OKAZAKI O. An evaluation of the cytochrome P450 induction potential of pantoprazole in primary human hepatocytes. *Chemico-biological interactions*, **1998**, 114(1-2):1-13.

MAU S. Studien zur extrahepatischen Reduktion verschiedener *N*-hydroxylierter Verbindungen *Dissertation, Kiel, 2002*.

MAURICE M, PICHARD L, DAUJAT M, FABRE I, JOYEUX H, DOMERGUE J UND MAUREL P. Effects of imidazole derivatives on cytochromes P450 from human hepatocytes in primary culture. *The FASEB journal*, **1992**, 6(2):752-758.

MCGINNITY DF, BERRY AJ, KENNY JR, GRIME K UND RILEY RJ. Evaluation of time-dependent cytochrome P450 inhibition using cultured human hepatocytes. *Drug metabolism and disposition*, **2006**, 34(8):1291-1300.

MEACHAM RH, EMMETT M, KYRIAKOPOULOS AA, CHIANG ST, RUELIUS HW, WALKER BR, NARINS RG UND GOLDBERG M. Disposition of <sup>14</sup>C-guanabenz in patients with essential hypertension. *Clinical pharmacology and therapeutics*, **1980**, 27(1):44-52.

MIYAMOTO A, SODA Y, MORI I, YOKOYAMA N, HORISAKA K, SHICHINO F, SHIMADA A, KASHIMA K, KATAOKA T UND TATSUMI H. Metabolic fate of guanabenz-acetate. *Iyakuhin Kenkyu*, **1982**, 13:1214-1230.

MORSE MA UND LU J. High-performance liquid chromatographic method for measurement of cytochrome P450-mediated metabolism of 7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin. *Journal of chromatography B*, **1998**, 708(1-2):290-293.

MUTSCHLER E, GEISSLINGER G, KROEMER H UND SCHÄFER-KORTING M. Arzneimittelwirkungen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaften mbH, Stuttgart. **2001**.

MYERS MJ, FARRELL DE, HOWARD KD UND KAWALEK JC. Identification of multiple constitutive and inducible hepatic cytochrome P450 enzymes in market weight swine. *Drug metabolism and disposition*, **2001**, 29(6):908-915.

## A. Literaturverzeichnis

NAKAMURA M, IMAOKA S, AMANO F UND FUNAE Y. P450 isoforms in a murine macrophage cell line, RAW264.7, and changes in the levels of P450 isoforms by treatment of cells with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *Biochimica et biophysica acta*, **1998**, 1385(1):101-106.

NAKAYAMA K, NITTO T, INOUE T UND NODE K. Expression of the cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2 in human monocytic leukocytes. *Life sciences*, **2008**, 83(9-10):339-345.

NEBERT DW UND RUSSELL DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*, **2002**, 360(9340):1155-1162.

NELSON DR, ZELDIN DC, HOFFMAN SM, MALTAIS LJ, WAIN HM UND NEBERT DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics*, **2004**, 14(1):1-18.

NEWSOME PN, JOHANNESSEN I, BOYLE S, DALAKAS E, MCAULAY KA, SAMUEL K, RAE F, FORRESTER L, TURNER ML, HAYES PC, HARRISON DJ, BICKMORE WA UND PLEVRIS JN. Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology*, **2003**, 124(7):1891-1900.

NÜSSLER A, KONIG S, OTT M, SOKAL E, CHRIST B, THASLER W, BRULPORT M, GABELEIN G, SCHORMANN W, SCHULZE M, ELLIS E, KRAEMER M, NOCKEN F, FLEIG W, MANNS M, STROM SC UND HENGSTLER JG. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. *Journal of hepatology*, **2006**, 45(1):144-159.

OHMORI S, SHIRAKAWA C, MOTOHASHI K, YOSHIDA H, ABE H, NAKAMURA T, HORIE T, KITAGAWA H, ASAOKA K, RIKIHISA T, KANAKUBO Y UND KITADA M. Purification from liver microsomes from untreated cynomolgus monkeys of cytochrome P450 closely related to human cytochrome P450 2B6. *Molecular pharmacology*, **1993**, 43(2):183-190.

OLSEN A, HANSEN K UND FRIIS C. Pig hepatocytes as an *in vitro* model to study the regulation of human CYP3A4: Prediction of drug-drug interactions with 17 $\alpha$ -ethynylestradiol. *Chemico-biological interactions*, **1997**, 107(1-2):93-108.

OTT M, SCHMIDT HH, CICHON G UND MANN S. Emerging therapies in hepatology: Liver-directed gene transfer and hepatocyte transplantation. *Cells, tissues, organs*, **2000**, 167(2-3):81-87.

PARK H, LEE S UND SUH J. Structural and dynamical basis of broad substrate specificity, catalytic mechanism, and inhibition of cytochrome P450 3A4. *Journal of the American Chemical Society*, **2005**, 127(39):13634-13642.

PARKINSON A, MUDRA DR, JOHNSON C, DWYER A UND CARROLL KM. The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology*, **2004**, 199(3):193-209.

PETERLIN-MASIC L, CESAR J UND ZEGA A. Metabolism-directed optimisation of anti-thrombotics: The prodrug principle. *Current pharmaceutical design*, **2006**, 12(1):73-91.

PETERSEN BE, BOWEN WC, PATRENE KD, MARS WM, SULLIVAN AK, MURASE N, BOGGS SS, GREENBERGER JS UND GOFF JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, **1999**, 284(5417):1168-1170.

PETERSON T. Drug-metabolizing enzymes in rat, mouse, pig and human macrophages and the effect of phagocytic activation. *Biochemical pharmacology*, **1987**, 36(22):3911-3916.

PHILLIPS IR UND SHEPHARD EA. Flavin-containing monooxygenases: Mutations, disease and drug response. *Trends in pharmacological sciences*, **2008**, 29(6):294-301.

A. Literaturverzeichnis

PIIPARI R, SAVELA K, NURMINEN T, HUKKANEN J, RAUNIO H, HAKKOLA J, MANTYLA T, BEAUNE P, EDWARDS R, BOOBIS A UND ANTTILA S. Expression of CYP1A1, CYP1B1 and CYP3A, and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in bronchoalveolar macrophages of smokers and non-smokers. *International journal of cancer*, **2000**, 86(5):610-616.

RANKIN GO, HONG SK, ANESTIS DK, BALL JG UND VALENTOVIC MA. Mechanistic aspects of 4-amino-2,6-dichlorophenol-induced *in vitro* nephrotoxicity. *Toxicology*, **2008**, 245(1-2):123-129.

REEH C, WUNDT J UND CLEMENT B. *N,N'*-dihydroxyamidines: A new prodrug principle to improve the oral bioavailability of amidines. *Journal of medicinal chemistry*, **2007**, 50(26):6730-6734.

REESE JA UND BYARD JL. Isolation and culture of adult hepatocytes from liver biopsies. *In vitro*, **1981**, 17(11):935-940.

RIQUELME P, WUNDT J, HUTCHINSON JA, BRULPORT M, JUN Y, SOTNIKOVA A, GIRRESER U, BRAUN F, GÖVERT F, SORIA B, NÜSSLER A, CLEMENT B, HENGSTLER JG UND FÄNDRICH F. A refined characterisation of the NeoHepatocyte phenotype necessitates a reappraisal of the transdifferentiation hypothesis. *Differentiation*, **2008**, im Druck.

ROYMANS D, ANNAERT P, VAN HOUTD J, WEYGERS A, NOUKENS J, SENSENHAUSER C, SILVA J, VAN LOOVEREN C, HENDRICKX J, MANNENS G UND MEULDERMANS W. Expression and induction potential of cytochromes P450 in human cryopreserved hepatocytes. *Drug metabolism and disposition*, **2005**, 33(7):1004-1016.

RUHNKE M, UNGEFROREN H, NÜSSLER A, MARTIN F, BRULPORT M, SCHORMANN W, HENGSTLER JG, KLAPPER W, ULRICHS K, HUTCHINSON JA, SORIA B, PARWARESCH RM, HEECKT P, KREMER B UND FÄNDRICH F. Differentiation of *in vitro*-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology*, **2005a**, 128(7):1774-1786.

RUHNKE M, NÜSSLER AK, UNGEFROREN H, HENGSTLER JG, KREMER B, HOECKH W, GOTTWALD T, HEECKT P UND FÄNDRICH F. Human monocyte-derived neohepatocytes: A promising alternative to primary human hepatocytes for autologous cell therapy. *Transplantation*, **2005b**, 79(9):1097-1103.

SCHMIDT M, KREUTZ M, LOFFLER G, SCHOLMERICH J UND STRAUB RH. Conversion of dehydroepiandrosterone to downstream steroid hormones in macrophages. *The journal of endocrinology*, **2000**, 164(2):161-169.

SCHMIDT M, WEIDLER C, NAUMANN H, ANDERS S, SCHOLMERICH J UND STRAUB RH. Androgen conversion in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synoviocytes - Androstenedione and testosterone inhibit estrogen formation and favor production of more potent 5 $\alpha$ -reduced androgens. *Arthritis research and therapy*, **2005**, 7(5):R938-948.

SCHMIDT M, NAUMANN H, WEIDLER C, SCHELLENBERG M, ANDERS S UND STRAUB RH. Inflammation and sex hormone metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2006**, 1069:236-246.

SCHWARTZ RE, REYES M, KOODIE L, JIANG Y, BLACKSTAD M, LUND T, LENVIK T, JOHNSON S, HU WS UND VERFAILLIE CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *The journal of clinical investigation*, **2002**, 109(10):1291-1302.

SILVA JM, MORIN PE, DAY SH, KENNEDY BP, PAYETTE P, RUSHMORE T, YERGEY JA UND NICOLL-GRIFFITH DA. Refinement of an *in vitro* cell model for cytochrome P450 induction. *Drug metabolism and disposition*, **1998**, 26(5):490-496.

SKAANILD MT. Porcine cytochrome P450 and metabolism. *Current pharmaceutical design*, **2006**, 12(11):1421-1427.

SMITH D. Induction and drug development. *European journal of pharmaceutical sciences*, **2000**, 11(3):185-189.

A. Literaturverzeichnis

SMITH PK, KROHN RI, HERMANSON GT, MALLIA AK, GARTNER FH, PROVENZANO MD, FUJIMOTO EK, GOEKE NM, OLSON BJ UND KLENK DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, **1985**, 150(1):76-85.

SNYKERS S, VANHAECKE T, PAPELEU P, LUTTUN A, JIANG Y, VANDER HEYDEN Y, VERFAILLIE C UND ROGIERS V. Sequential exposure to cytokines reflecting embryogenesis: The key for *in vitro* differentiation of adult bone marrow stem cells into functional hepatocyte-like cells. *Toxicological sciences*, **2006**, 94(2):330-341

SOARS MG, PETULLO DM, ECKSTEIN JA, KASPER SC UND WRIGHTON SA. An assessment of UDP-glucuronosyltransferase induction using primary human hepatocytes. *Drug metabolism and disposition*, **2004**, 32(1):140-148.

SOUCEK P, ZUBER R, ANZENBACHEROVA E, ANZENBACHER P UND GUENGERICH FP. Minipig cytochrome P450 3A, 2A and 2C enzymes have similar properties to human analogs. *BMC pharmacology*, **2001**, 1:11.

STEINBERG P, FISCHER T, KIULIES S, BIEFANG K, PLATT KL, OESCH F, BOTTGER T, BULITTA C, KEMPF P UND HENGSTLER J. Drug metabolizing capacity of cryopreserved human, rat, and mouse liver parenchymal cells in suspension. *Drug metabolism and disposition*, **1999**, 27(12):1415-1422.

STRESSER DM, BLANCHARD AP, TURNER SD, ERVE JC, DANDENEAU AA, MILLER VP UND CRESPI CL. Substrate-dependent modulation of CYP3A4 catalytic activity: Analysis of 27 test compounds with four fluorometric substrates. *Drug metabolism and disposition*, **2000**, 28(12):1440-1448.

STRESSER DM, TURNER SD, BLANCHARD AP, MILLER VP UND CRESPI CL. Cytochrome P450 fluorometric substrates: Identification of isoform-selective probes for rat CYP2D2 and human CYP3A4. *Drug metabolism and disposition*, **2002**, 30(7):845-852.

STRITTMATTER P, SPATZ L, CORCORAN D, ROGERS M, SETLOW B UND REDLINE R. Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1974**, 71(11):4565-4569.

STROM SC, FISHER RA, THOMPSON MT, SANYAL AJ, COLE PE, HAM JM UND POSNER MP. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation*, **1997**, 63(4):559-569.

SUGIHARA K, KITAMURA S, YAMADA T, OHTA S, YAMASHITA K, YASUDA M UND FUJII-KURIYAMA Y. Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated induction of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biochemical and biophysical research communications*, **2001**, 281(5):1093-1099.

TESTA B. Biochemistry of redox reactions. Testa B und Cadwell J (Hrsg.), Academic Press Inc., San Diego, California. **1995**.

THEISE ND, BADVE S, SAXENA R, HENEGARIU O, SELL S, CRAWFORD JM UND KRAUSE DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology*, **2000**, 31(1):235-240.

TRUBETSKOY O, MARKS B, ZIELINSKI T, YUEH M UND RAUCY J. A simultaneous assessment of CYP3A4 metabolism and induction in the DPX-2 cell line. *The AAPS journal*, **2005a**, 7(1):E6-13.

TRUBETSKOY OV, GIBSON JR UND MARKS BD. Highly miniaturized formats for *in vitro* drug metabolism assays using vivid fluorescent substrates and recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Journal of biomolecular screening*, **2005b**, 10(1):56-66.

TUKEY RH UND STRASSBURG CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: Metabolism, expression, and disease. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **2000**, 40:581-616.



## A. Literaturverzeichnis

UHLEN S, DAMBROVA M, TIGER G, OLIVER DW UND WIKBERG JE. Characterization of the enzymatic activity for biphasic competition by guanoxabenz (1-(2,6-dichlorobenzylidene-amino)-3-hydroxyguanidine) at  $\alpha$ 2-adrenoceptors. I. Description of an enzymatic activity in spleen membranes. *Biochemical pharmacology*, **1998**, 56(9):1111-1119.

VANDEN HEUVEL J, CLARK G, THOMPSON C, MCCOY Z, MILLER C, LUCIER G UND BELL D. CYP1A1 mRNA levels as a human exposure biomarker: Use of quantitative polymerase chain reaction to measure CYP1A1 expression in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis*, **1993**, 14(10):2003-2006.

VAN'T KLOOSTER GA, BLAAUBOER BJ, NOORDHOEK J UND VAN MIERT AS. Cytochrome P450 induction and metabolism of alkoxyresorufins, ethylmorphine and testosterone in cultured hepatocytes from goats, sheep and cattle. *Biochemical pharmacology*, **1993**, 46(10):1781-1790.

VASSILOPOULOS G, WANG PR UND RUSSELL DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*, **2003**, 422(6934):901-904.

VIHKO P, HARKONEN P, SORONEN P, TORN S, HERRALA A, KURKELA R, PULKKA A, ODUWOLE O UND ISOMAA V.  $17\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenases - Their role in pathophysiology. *Molecular and cellular endocrinology*, **2004**, 215(1-2):83-88.

VIVID® CYP450 SCREENING KIT PROTOCOL O-13873-r1 US 0405 *Invitrogen*, **2007**.

WANG H UND LECLUYSE EL. Role of orphan nuclear receptors in the regulation of drug-metabolising enzymes. *Clinical pharmacokinetics*, **2003**, 42(15):1331-1357.

WANG X, WILLENBRING H, AKKARI Y, TORIMARU Y, FOSTER M, AL-DHALIMY M, LAGASSE E, FINEGOLD M, OLSON S UND GROMPE M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*, **2003**, 422(6934):897-901.

WATKINS JB 3RD UND KLAASSEN CD. Xenobiotic biotransformation in livestock: Comparison to other species commonly used in toxicity testing. *Journal of animal science*, **1986**, 63(3):933-942.

WAXMAN DJ, KO A UND WALSH C. Regioselectivity and stereoselectivity of androgen hydroxylations catalyzed by cytochrome P-450 isozymes purified from phenobarbital-induced rat liver. *The journal of biological chemistry*, **1983**, 258(19):11937-11947.

WAXMAN D, LAPENSON D, AOYAMA T, GELBOIN H, GONZALEZ F UND KORZEKWA K. Steroid hormone hydroxylase specificities of eleven cDNA-expressed human cytochrome P450s. *Archives of biochemistry and biophysics*, **1991**, 290(1):160-166.

WEAVER RJ, THOMPSON S, SMITH G, DICKINS M, ELCOMBE CR, MAYER RT UND BURKE MD. A comparative study of constitutive and induced alkoxyresorufin *O*-dealkylation and individual cytochrome P450 forms in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), human, mouse, rat and hamster liver microsomes. *Biochemical pharmacology*, **1994**, 47(5):763-773.

WEISS TS, PAHERNIK S, SCHERUEBL I, JAUCH KW UND THASLER WE. Cellular damage to human hepatocytes through repeated application of 5-aminolevulinic acid. *Journal of hepatology*, **2003**, 38(4):476-482.

WESTLIND A, LOFBERG L, TINDBERG N, ANDERSSON TB UND INGELMAN-SUNDBERG M. Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: Relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. *Biochemical and biophysical research communications*, **1999**, 259(1):201-205.

WICKRAMASINGHE SN. Observations on the biochemical basis of ethanol metabolism by human macrophages. *Alcohol and alcoholism*, **1986**, 21(1):57-63.

WILLENBRING H, BAILEY AS, FOSTER M, AKKARI Y, DORRELL C, OLSON S, FINEGOLD M, FLEMING WH UND GROMPE M. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nature medicine*, **2004**, 10(7):744-748.

## A. Literaturverzeichnis

WITKAMP RF, NIJMEIJER SM, MONSHOUWER M UND VAN MIERT AS. The antibiotic tiamulin is a potent inducer and inhibitor of cytochrome P4503A via the formation of a stable metabolic intermediate complex. Studies in primary hepatocyte cultures and liver microsomes of the pig. *Drug metabolism and disposition*, **1995**, 23(5):542-547.

WOOD AW, RYAN DE, THOMAS PE UND LEVIN W. Regio- and stereoselective metabolism of two C19 steroids by five highly purified and reconstituted rat hepatic cytochrome P-450 isozymes. *The journal of biological chemistry*, **1983**, 258(14):8839-8847.

WUNDT J. Drug uptake and metabolism studies by isolated rat hepatocytes. *Diplomarbeit, Kiel*, **2004**.

[www.medizin.uni-halle/kim1/index.php?id=350](http://www.medizin.uni-halle/kim1/index.php?id=350), HOMEPAGE DER FORSCHERGRUPPE HEPATOZYTENTRANSPLANTATION der Universitätsklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Halle (Saale).

XU C, LI CY UND KONG AN. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of pharmacal research*, **2005**, 28(3):249-268.

XU L, LI AP, KAMINSKI DL UND RUH MF. 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induction of cytochrome P4501A in cultured rat and human hepatocytes. *Chemico-biological interactions*, **2000**, 124(3):173-189.

YAMASHIKI N, YOKOTA H, SAKAMOTO M UND YUASA A. Presence of phenol UDP-glucuronosyltransferase in bovine alveolar macrophages and bronchial epithelial cells. *Toxicology*, **2002**, 176(3):221-227.

YAMAZAKI H UND SHIMADA T. Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Archives of biochemistry and biophysics*, **1997**, 346(1):161-169.

YUEH MF, KAWAHARA M UND RAUCY J. High volume bioassays to assess CYP3A4-mediated drug interactions: Induction and inhibition in a single cell line. *Drug metabolism and disposition*, **2005**, 33(1):38-48.

ZEBOTHSSEN I. Charakterisierung, Metabolismus und Interaktionspotential zytostatisch wirksamer 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine. *Dissertation, Kiel*, **2005**.

ZHANG W, PURCHIO AF, CHEN K, WU J, LU L, COFFEE R, CONTAG PR UND WEST DB. A transgenic mouse model with a luciferase reporter for studying *in vivo* transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene. *Drug metabolism and disposition*, **2003**, 31(8):1054-1064.

ZHAO Y, GLESNE D UND HUBERMAN E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2003**, 100(5):2426-2431.

## B. Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AhR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
ALA	$\delta$ -Aminolävulinsäure ( <i><math>\delta</math>-aminolevulinic acid</i> )
APCI	chemische Ionisation bei Atmosphärendruck ( <i>atmospheric pressure chemical ionisation</i> )
Arnt	Arylhydrocarbon-Rezeptor-Zellkern-Translokator ( <i>arylhydrocarbon receptor nuclear translocator</i> )
AST	Aspartat-Aminotransferase
BCA	Bicinchoninsäure ( <i>bicinchonic acid</i> )
bHLH	<i>basic-helix-loop-helix</i> -Region
BSEP	Gallensalz-Export-Pumpe ( <i>bile salt export pump</i> )
CAR	konstitutiver Androstan-Rezeptor ( <i>constitutive androstane receptor</i> )
CD	Charakterisierung der Differenzierung ( <i>cluster of differentiation</i> )
CD16	Rezeptor für das Fc-Fragment von IgG mit einer geringen Affinität
CD64	Rezeptor für das Fc-Fragment von IgG mit einer hohen Affinität
CD206	Mannose-Rezeptor
CK	Cytokeratin
CYP	Cytochrom P450
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DBOMF	Dibenzyl- <i>O</i> -methoxyfluorescein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EROD	Ethoxyresorufin- <i>O</i> -Desethylierung
ESC	embryonale Stammzelle ( <i>embryonic stem cell</i> )

Fc-Fragment	kristallisierbares Fragment-Fragment ( <i>fragment crystallisable</i> )
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF-4	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 4 ( <i>fibroblast growth factor</i> )
FMO	flavinhaltige Monooxygenase
Fp	Flavoprotein (NADPH-Cytochrom P450-Reduktase)
FXR	Farnesol-X-Rezeptor
GATA4	Transkriptionsfaktor
GST	Glutathion- <i>S</i> -Transferase
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
HFC	7-Hydroxy-4-(trifluoromethyl)-cumarin
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor ( <i>hepatocyte growth factor</i> )
HH	humane Hepatozyten
HNF	Hepatozyten-Kernfaktor ( <i>hepatocyte nuclear factor</i> )
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRE	Hormon-Antwort-Element ( <i>hormone response element</i> )
HSC	hämatopoetische Stammzelle ( <i>hematopoietic stem cell</i> )
17 $\beta$ -HSD	17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
Hsp90	Hitzeshock-Protein90
IBABP	ilealen Gallensäure-Bindungsproteins ( <i>ileal bile acid-binding protein</i> )
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
IL-3	Interleukin-3
kaM	klassisch aktivierte Makrophagen
LBD	Liganden-Bindungsdomäne
LC/MS	Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie ( <i>liquid chromatographie/mass spectrometry</i> )
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
LXR	Leber-X-Rezeptor
MAPC	multipotente adulte Vorläuferzelle ( <i>multipotent adult progenitor cell</i> )

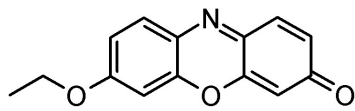
## B. Abkürzungsverzeichnis

mARC	mitochondriale Benzamidoxim-reduzierende Komponente ( <i>mitochondrial benzamidoxime reducing component</i> )
3-MC	3-Methylcholanthren
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor ( <i>macrophage colony stimulating factor</i> )
MDR	<i>Multidrug resistance-gene</i>
MeOH	Methanol
MFC	7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarin
MRP	<i>multidrug resistance-associated protein</i>
mRNA	Vorläufer-Ribonukleinsäure ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NH	NeoHepatozyten
NOD/SCID	nicht-fettleibig-diabetisch/schwerer kombinierter Immundefekt ( <i>non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency</i> )
NOHA	<i>N</i> <sup>6</sup> -Hydroxyaminopurin
OOMR	Octyl- <i>O</i> -methoxyresorufin
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PAS	<i>PER-Arnt-Sim</i> -Region
PB	Phenobarbital
PBMC	mononukleäre Zellen aus peripherem Blut ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBREM	Phenobarbital-Antwort-Elementmodul ( <i>phenobarbital response element module</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffer saline</i> )
PCMO	programmierbare Zellen monozytären Ursprungs ( <i>programmable cells of monocytic origin</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PMA	Phorbolmyristataacetat ( <i>phorbol myristate acetate</i> )
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PSC	pluripotente Stammzelle ( <i>pluripotent stem cell</i> )
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
OATP	organisches Anionen-Transporterpeptid

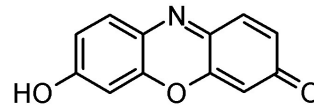
r <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
RARE	Retinsäure-Antwort-Element ( <i>retinoic acid response element</i> )
RH	Substrat
RIF	Rifampicin
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ROH	monooxygeniertes Produkt
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SEM	Standardabweichung der Differenz zwischen zwei Mittelwerten ( <i>standard error of the difference of two means</i> )
SH	Schweinehepatozyten
SULT	Sulfotransferasen
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDPGA	Uridin-5'-diphosphatglucuronsäure ( <i>uridine-5'-diphosphate-glucuronic acid</i> )
UGT	UDP-Glucuronyltransferase
WEM	Williams E Medium
XRE	xenobiotisches Antwort-Element ( <i>xenobiotic response element</i> )
XREM	xenobiotisches Antwort-Elementmodul ( <i>xenobiotic response element module</i> )



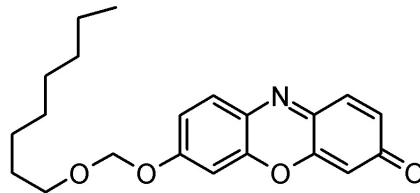
## C. Strukturformelverzeichnis



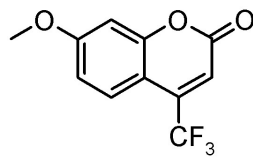
Ethoxyresorufin



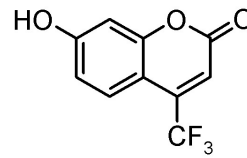
Resorufin



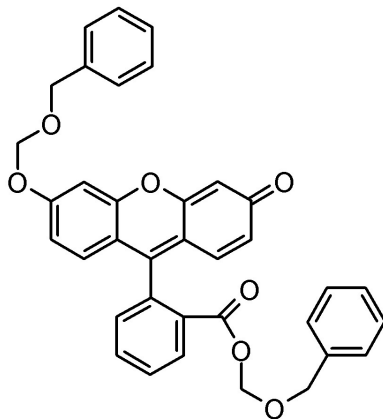
Octyl-O-methoxyresorufin (OOMR)



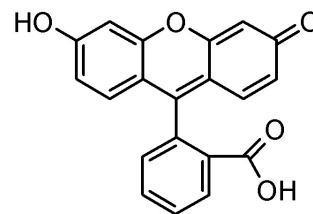
7-Methoxy-4-trifluoromethylcumarin (MFC)



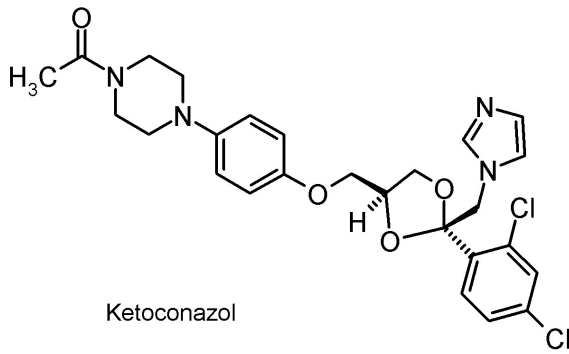
7-Hydroxy-4-trifluoromethylcumarin (HFC)



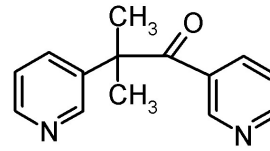
Dibenzyl-O-methoxyfluorescein (DBOMF)



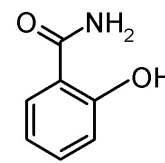
Fluorescein



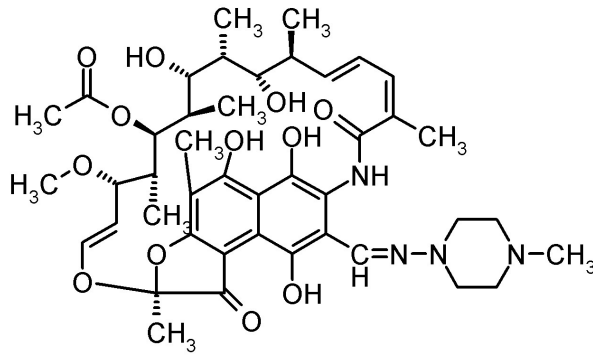
Ketoconazol



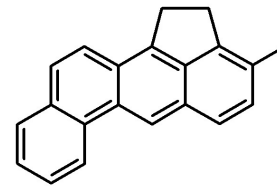
Metyrapon



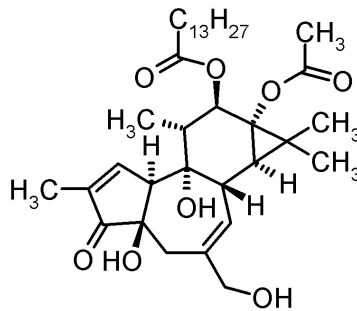
Salicylamid



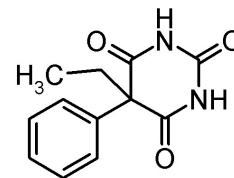
Rifampicin (RIF)



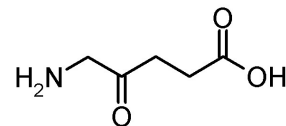
3-Methylcholanthren (3-MC)



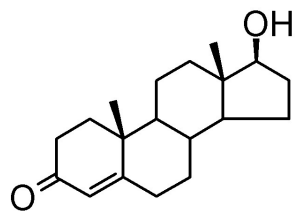
Phorbolmyristatacetat (PMA)



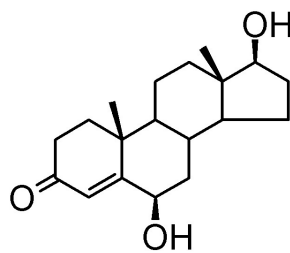
Phenobarbital (PB)



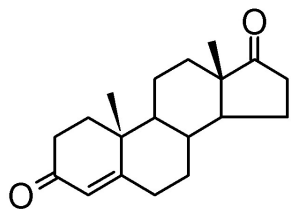
Aminolävulinsäure (ALA)



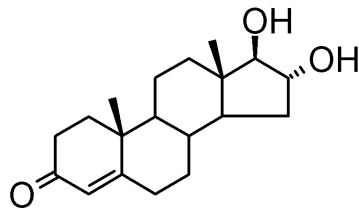
Testosteron



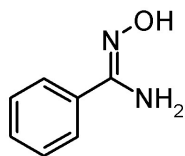
6 $\beta$ -Hydroxytestosteron



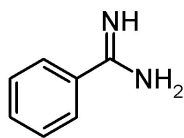
Androstendion



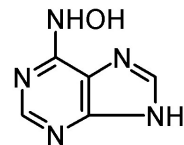
16 $\alpha$ -Hydroxytestosteron



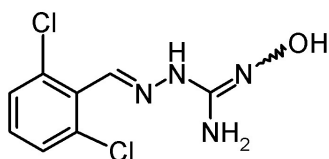
Benzamidoxim



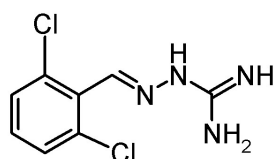
Benzamidin



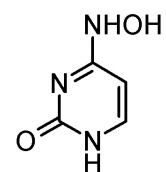
N<sup>6</sup>-Hydroxyaminopurin



Guanoxabenz



Guanabenz



N<sup>4</sup>-Hydroxycytosin



## *Danksagung*

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter Leitung von

**Prof. Dr. Bernd Clement.**

Für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Themas, die mir gewährten Freiheiten und die Förderung möchte ich meinem Doktorvater herzlich danken.

Prof. Dr. Fred Fändrich danke ich für die Kooperation zur Charakterisierung der NeoHepatozyten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. James A. Hutchinson für die sehr gute Zusammenarbeit, den Enthusiasmus und die stete wertvolle Diskussionsbereitschaft.

Bei Ingrid Berg möchte ich mich sehr herzlich für die unerlässliche Hilfe bei der Kultur der Zellen und die Unterstützung bedanken. Auch dem weiteren Arbeitskreis der Transplantationsforschung möchte ich für die freundliche Aufnahme und Unterstützung Danke sagen.

Bei Prof. Dr. Jan Hengstler möchte ich mich für die kritische und motivierende Diskussion der NeoHepatozyten-Ergebnisse bedanken.

Dr. Anja Fröhlich gilt mein Dank für die Einführung in die Isolierung der Hepatozyten und die beratende Funktion besonders in der Anfangszeit.

Bei Dr. Ulrich Girreser möchte ich mich für die LC/MS-Vermessungen und die wertvolle Diskussion dieser Ergebnisse bedanken. HD Dr. Thomas Kunze gilt mein Dank für die Anregungen bei analytischen und biochemischen Fragen.

Für die Einarbeitung in die HPLC-Analytik, die LC/MS-Messungen sowie der schnellen und freundlichen Hilfe bei Problemen aller Art bedanke ich mich bei Sven Wichmann. Petra Köster danke ich für die Hilfe bei der Hepatozytenkultur. Ein Dankeschön geht an Susanne Voss und Moni Ihlow aus dem Geschäftszimmer für die Erledigung von „Papierkram.“, sowie an Kalle Bock für den technischen Sofortservice.

Allen Mitarbeitern und Kollegen des Pharmazeutischen Instituts, insbesondere denen meines Arbeitskreises, sei für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die daraus resultierende schöne Zeit gedankt.

Für das kritische und konstruktive Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich hiermit besonders herzlich bei Nikola, Anja und Momme.

Tessie, Ina und Maja danke ich für die angenehme und unkomplizierte Zusammenarbeit im 5. Semester und die lustigen Kaffeepausen während der Praktikumsaufsicht.

Christiane, Kerstin, Tessie, Anja, Ina, Alrun, Nikola, Helen und Sanja danke ich für die vielen schönen Stunden und für die fachliche wie emotionale Unterstützung. Vielen lieben Dank auch an alle Freunde außerhalb des Institutes für die Ablenkung.

Besonders danke ich Hauke dafür, dass er mir in den wichtigen Momenten zur Seite steht.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder von ganzem Herzen dafür danken, dass ich mir jederzeit ihrer liebevollen Unterstützung, ihrem Verständnis und ihrem Vertrauen sicher sein kann.

### **Persönliche Daten**

Vor- und Familienname Judith Maria Eleonore Wundt  
Geburtsdatum 11. August 1978  
Geburtsort Marburg/Lahn  
Staatsangehörigkeit deutsch

### **Schulbildung**

1985 - 1989 Grund- und Hauptschule Marburg-Wehrda  
1989 - 1998 Gymnasium Philippinum, Marburg  
Juni 1998 Allgemeine Hochschulreife

### **Studium und Ausbildung**

1998 - 1999 Studium der Chemie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
1999 - 2003 Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
Juli - Dezember 2003 Pharmaziepraktikum und Erstellung der Diplomarbeit  
zum Thema "Drug uptake and metabolism studies  
by isolated rat hepatocytes" bei der  
Firma Astra Zeneca, R&D, Mölndal, Schweden  
Januar - Juni 2004 Pharmaziepraktikum, Esmarch-Apotheke, Kiel  
August 2004 Erteilung der Approbation als Apothekerin

### **Berufliche Tätigkeit und Weiterbildung**

Dezember 2004 Apothekerin in der Zentralapotheke der Kliniken des  
- März 2005 Kreises Pinneberg, Elmshorn  
seit April 2005 Wissenschaftliche Angestellte am Pharmazeutischen  
Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter  
Leitung von Prof. Dr. B. Clement  
seit April 2005 Ausbildung zur Apothekerin für Pharmazeutische Analytik

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, selbständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden.

Kiel, im Dezember 2008

Judith Wundt



## Publikationen

HUTCHINSON JA, RIQUELME P, WUNDT J, HENGSTLER JG, FÄNDRICH F, UNGEFROREN H UND CLEMENT B. Could treatment with neohepatocytes benefit patients with decompensated chronic liver disease? *American journal of hematology*, **2007**, 82(11):947-948.

REEH C, WUNDT J UND CLEMENT B. *N,N'*-dihydroxyamidines: A new prodrug principle to improve the oral bioavailability of amidines. *Journal of medicinal chemistry*, **2007**, 50(26):6730-6734.

RIQUELME P, WUNDT J, HUTCHINSON JA, BRULPORT M, JUN Y, SOTNIKOVA A, GIRRESER U, BRAUN F, GÖVERT F, SORIA B, NÜSSLER A, CLEMENT B, HENGSTLER JG UND FÄNDRICH F. A refined characterisation of the NeoHepatocyte phenotype necessitates a reappraisal of the transdifferentiation hypothesis. *Differentiation*, **2008**, im Druck.

## Tagungsbeiträge

WUNDT J. Induction of CYP3A activity in monocyte-derived cells. *Symposium "NeoHepatocytes", Konstanz, 2007*.

WUNDT J, RIQUELME P UND CLEMENT B. Aspects of drug metabolism capabilities of macrophage subpopulations. *DPhG Jahrestagung, Erlangen, 2007*.

WUNDT J UND CLEMENT B. Induction of the three-component enzyme complex consisting of mARC, cytochrome b<sub>5</sub> and NADH cytochrome b<sub>5</sub> reductase. *DPhG Jahrestagung, Bonn, 2008*.

In der präklinischen Forschung stellen humane Hepatozyten ein wichtiges *in vitro*-Modell zur Untersuchung des Metabolismus und der Toxizität dar. Aufgrund der schlechten Verfügbarkeit von humanen Hepatozyten wird nach geeigneten alternativen Zelltypen gesucht. Oft wird auf Hepatozyten anderer Spezies zurückgegriffen, aber auch die Gewinnung von Zellen aus verschiedenen extrahepatischen Stamm- und Vorläuferzellen stellt eine vielversprechende Möglichkeit dar. Ein Beispiel dafür stellen die aus Monozyten kultivierten NeoHepatozyten dar.

In dieser Arbeit ist die Arzneistoff-metabolisierende Kompetenz von NeoHepatozyten im Rahmen des Phase I-Metabolismus mit der von humanen und porcinen Hepatozyten, sowie aus Monozyten kultivierten klassisch aktivierten Makrophagen verglichen worden. NeoHepatozyten besitzen keine CYP2C9-, CYP2E1- und CYP3A4-Aktivitäten, aber eine allerdings durch 3-Methylcholanthren nicht induzierbare CYP1A1/2-Basalaktivität. NeoHepatozyten und klassisch aktivierte Makrophagen metabolisieren Testosteron zu  $16\alpha$ -Hydroxytestosteron und Androstendion, aber nicht zu  $6\beta$ -Hydroxytestosteron, einem für Hepatozyten typischen CYP3A4-Metaboliten. Im Gegensatz zu früheren Behauptungen, zeigt diese Arbeit, dass sich NeoHepatozyten in ihrem Arzneistoff-Metabolismus wie klassisch aktivierte Makrophagen und nicht wie primäre Hepatozyten verhalten. NeoHepatozyten sind somit kaum als Ersatz für humane Hepatozyten geeignet.

Um die Induktion des *N*-reduktiven drei Komponenten-Enzym-Komplexes, bestehend aus mARC, Cytochrom  $b_5$  und NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase, zu untersuchen, ist nach anderen Alternativen zu humanen Hepatozyten gesucht worden, dabei haben sich porcine Hepatozyten als geeignet erwiesen. Die *N*-Hydroxylierung als Prodrug-Prinzip für Amidine und Guanidine verringert deren Basizität und erhöht so die orale Bioverfügbarkeit. Die Prodrug-Aktivierung sollte nicht durch die Induktion anderer Arzneistoffe beeinflusst werden. Da in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden kann, dass gängige Induktoren Arzneistoff-metabolisierender Enzyme, *N*-hydroxylierte physiologische und synthetische Substrate, sowie Lipopolysaccharide keine induktiven Effekte auf die Prodrug-Aktivierung durch den drei Komponenten-Enzym-Komplex aufweisen, sind keine Wechselwirkungen bei der Aktivierung *N*-hydroxylierter Prodrugs zu befürchten.

In preclinical research, human hepatocytes represent an important *in vitro* model to investigate drug metabolism and toxicity of new drug candidates. Owing to the scarce supply of primary human hepatocytes, there is a need to identify suitable alternative cell types for such purpose. Presently, hepatocytes from animals are often used, but also the possibility of generating human hepatocyte-like cells from different extrahepatic stem cells and progenitors is very promising. One particular example of an alternative model cell is the monocyte-derived NeoHepatocyte.

In the current study, the Phase I drug metabolising capabilities of NeoHepatocytes were compared to those of primary human and pig hepatocytes, as well as to monocyte-derived classically activated macrophages. NeoHepatocytes possessed no CYP2C9, CYP2E1 and CYP3A4 activities, except for a low basal CYP1A1/2 activity, which was not inducible with 3-methylcholanthrene. Both NeoHepatocytes and classically activated macrophages were able to metabolise testosterone to 16 $\alpha$ -hydroxytestosterone and androstendione, but were not capable of the CYP3A4-mediated conversion of testosterone to 6 $\beta$ -hydroxytestosterone, which is typical of hepatocytes. Thus, contrary to earlier claims, this study shows that NeoHepatocytes more closely resembles classically activated macrophages than hepatocytes in their Phase I drug metabolising activities. It must be concluded that NeoHepatocytes make poor substitute for primary human hepatocytes in drug metabolism testing.

To investigate the induction of the activity of the *N*-reductive three component enzyme complex consisting of mARC, cytochrome b<sub>5</sub> and NADH cytochrome b<sub>5</sub> reductase, it was searched for another alternatives to human hepatocytes, thereby pig hepatocytes proved to be a good alternative. The *N*-hydroxylation of amidines and guanidines as prodrug principle increases the oral bioavailability by reducing the basicity. Prodrug activation should not be affected by other drug, for instance, through induction. In this study it was demonstrated that inducers of common drug metabolising enzymes, physiological and synthetic substrates and lipopolysaccharide have no inducing effect on the prodrug activation by the three component enzyme complex. This strongly indicates no risk for inducing interaction by the activation of *N*-hydroxylated prodrugs.