

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie

Auswirkung von Darbepoetin alpha auf den Lebermetabolismus

Ruben Mühl-Benninghaus

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. A. K. Nüssler,

Eberhard- Karls-Universität Tübingen

2. Univ.-Prof. Dr. R. M.Schmidt

Die Dissertation wurde am 12.09.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.12.2013 angenommen.

Für meine liebe Familie

Jutta, Gerd, Esther, Daniel und Dieter Mühl-Benninghaus

in ewiger Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	10
1.1 Erythropoetin, sensationsträchtiges Medikament und skandalöses Dopingmittel	10
1.2 Erythropoetin (EPO)	10
1.2.1 Einführung	10
1.2.2 Struktur des EPO-Proteins	12
1.2.3 EPO-Synthese in Abhängigkeit von Sauerstoff	13
1.2.4 Rolle des EPO-Rezeptors und anschließende Signalkaskade	14
1.2.5 Vergleich unterschiedlicher rekombinanter Erythrozyten stimulierender Agentien (ESA)	16
1.2.6 Therapeutischer Einsatz von DPO.....	17
1.2.7 Applikation von DPO.....	18
1.2.8 Alternative Therapieansätze für DPO	19
1.2.9 Missbrauch von EPO-Produkten	20
1.2.10 Kontraindikationen und Nebenwirkungen der Therapie mit DPO	21
1.3 Die menschliche Leber	21
1.3.1 Leberschäden und Therapieansätze mit DPO.....	23
1.4 Rolle der Leber im Stoffwechsel von Arzneimitteln	24
1.4.1 Biotransformation.....	24
1.4.2 Phase I-Reaktionen	26
1.4.3 Oxidationsreaktion am Beispiel der Monooxygenase	26
1.4.4 Phase II-Reaktionen	27
1.4.5 Phase III-Reaktionen	27
1.5 Zytochrom P450-Enzyme (CYPs)	28
1.5.1 CYP Polymorphismus	30
1.5.2 Arzneimittelinteraktion durch CYP-Induktion/-Inhibition	30
2 Zielsetzung	32
3 Materialien	33
3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	33
3.2 Geräte	40
3.3 Software	42

4 Methoden	43
4.1 Kulturmedien	43
4.1.1 Verwendete Medien	43
4.2 Hepatozytenisolation	43
4.2.1 Verwendete Lösungen zur Hepatozytenisolation	43
4.2.2 Durchführung	44
4.3 Zellzahlbestimmung und anschließendes Ausplattieren	46
4.3.1 Durchführung	46
4.4 Zytotoxizitätstest nach Stimulation mit Darbepoetin alpha	47
4.4.1 verwendete Lösungen für die Messung der Toxizität	48
4.4.2 Durchführung	48
4.5 Stimulation humaner Hepatozyten mit DPO alpha	49
4.5.1 Durchführung	49
4.6 Photometrische Messung der Phase I- und II-Enzymaktivität	50
4.6.1 verwendete Lösungen für die Messung der Enzymaktivität	50
4.6.2 Durchführung	50
4.7 Sulforhodamin B Färbung (SRB)	52
4.7.1 Verwendete Lösungen zur SRB Färbung	52
4.7.2 Durchführung	52
4.8 Isolation von Ribonukleinsäure (RNA) aus Hepatozyten	53
4.8.1 verwendete Lösungen für die RNA Isolation	53
4.8.2 Durchführung	53
4.9 Photometrische Bestimmung der RNA Konzentration und Reinheit	54
4.9.1 Überprüfung der RNA Qualität	55
4.9.2 Herstellung komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA), als Voraussetzung für die reverse Transkriptase	56
4.9.3 Durchführung	56
4.9.4 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	57
4.9.5 Durchführung	58
4.10 Western Blot	59
4.10.1 verwendete Lösungen für das Blotting	60
4.10.2 Durchführung	61
4.11 Densitometrische Analyse der Signale von PCR und WB	64
4.12 Statistik	65

5	Ergebnisse.....	66
5.1	Keine Toxizität nach Stimulation mit DPO alpha	66
5.2	DPO alpha beeinflusst die Genexpression wichtiger CYPs über die Zeit von 72 Stunden auf RNA Ebene	67
5.3	DPO alpha beeinflusst die Proteinexpression wichtiger CYPs über 72 Stunden.....	69
5.4	DPO alpha beeinflusst vor allem die Enzymaktivität der Phase I humaner Hepatozyten über 72 Stunden.....	71
6	Diskussion.....	75
7	Zusammenfassung	81
8	Ausblick	83
9	Verzeichnisse	84
9.1	Abbildungsverzeichnis	84
9.2	Tabellenverzeichnis	85
9.3	Literaturverzeichnis	86
10	Danksagung.....	94

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
4-MU	4-Methylumbelliferon
7 ER	7-Ethoxyresorufin
ABC	ATP-bindende Kasette
AHMC	3-(2-N,N-diethylaminoethyl)-7-hydroxy-4-methylkumarin
AMMC	3-(2-(N,N-diethyl-N-methylaminoethyl)-7-methoxy-4-methylkumarin
Asn	Asparagin
BFC	7-Benzyloxy-4(trifluoromethyl)koumarin
BFU-E	burst-forming units-erythroid
Bp	Basenpaare
C	Coumarin
CD-Marker	„Unterscheidungsgruppen“-Marker
CERA	Continuous Erythropoiesis Receptor Activator
CFU-E	colony-forming units-erythroid
CHC	3-cyano-7-hydroxycoumarin
CYP	Zytochrom P450- Isoenzyme
DBF	Dibenzylfluorescein
DEPC	Diethylpyrocarbionat
DIC	Dicumarol
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DPO	Darbepoetin

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFC	7-ethoxy-4(trifluoromethyl)kumarin
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
EPO-R	Erythropoetinrezeptor
ESA	Erythropoiesis Stimulating Agents
ex/em	Extinktion/Emission
FCS	Fetales Rinderserum
FL	Fluorescein
G	relative Zentrifugenbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
Hb	Hämoglobin
HBS	HIF Binding Site
HC	7-hydroxycoumarin
HFC	7-hydroxy-4-(trifluoromethyl)kumarin
HIF	Hypoxia-Inducible Transcription Factors
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRE	Hypoxia response element
IGF-1	Insulin Growth Factor-1
IL 1-11	Interleukin 1-11
JAK	Januskinase
Lnk	Lymphocyte Adaptor Protein
MAP	Mitogen-activated protein

Abkürzungsverzeichnis

MCB	Monochlorobimane
MEG	Megakaryoblasten
MFC	7-methoxy-4-(trifluoromethyl)kumarin
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHD	Prolyl hydroxylase
PRO	Probenecid
pVHL	Von Hippel-Lindau Protein
RAS	G-Protein RAS
RES	Resorufin
rhEPO	rekombinantes humanes Erythropoietin
SAL	Salicylamid
SCF	Stem Cell Factor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase

1 Einleitung

1.1 Erythropoetin, sensationsträchtiges Medikament und skandalöses Dopingmittel

Das endogene Hormon Erythropoetin (EPO), das natürlicher Weise von der Niere gebildet wird, kann seit etwa 20 Jahren gentechnisch hergestellt werden. Seine damit einhergehende Verfügbarkeit hat nicht nur in der Medizin, sondern auch in anderen Bereichen unterschiedlichste Eindrücke hinterlassen.

Unersetzlich ist der Einsatz von EPO als „erfolgreiches“ Blutdoping bei chronisch Nierenerkrankten geworden (17). Auch bei anderen Anämieformen wird EPO inzwischen standardmäßig eingesetzt.

Nachdem Leistungssportler durch die Anwendung von EPO reihenweise Weltrekorde erzielten, steht es wegen Manipulation seit 1992 auf der Dopingliste. „EPO schafft viel böses Blut“ heißt es in diesem Zusammenhang in einem Artikel aus der Zeitung „Die Zeit“ (86).

Neben dem Einsatz zur Therapie von Anämieformen und dem Missbrauch als Dopingmittel entstehen zurzeit neue Forschungserkenntnisse, die das Spektrum von EPO und seinen Analoga erweitern. Denn die Wirkung von EPO auf den Körper ist vielfältig. So sporne EPO nicht nur die Ausdauer, sondern auch das Gehirn zu Glanzleistungen an und wird als „Dopingmittel gegen Depression“ beschrieben (21,22). Das Hormon zeigte sogar kardioprotektive Eigenschaften (131). In der regenerativen Medizin wird an der Verwendung von EPO intensiv geforscht. Hier stellte sich heraus, dass verschiedene vorgeschädigte Gewebearten, wie zum Beispiel Haut oder Lebergewebe, durch EPO in der Regeneration beschleunigt werden konnten (5,6,123).

1.2 Erythropoetin (EPO)

1.2.1 Einführung

EPO wurde erstmals 1903 von Carnot und DeFlandre als „Hämatopoetin“ beschrieben. In ihren Experimenten entnahmen sie anämischen Kaninchen Serum und transfundierten es gesunden Empfängern. Dabei stellte sich heraus, dass es im direkten Anschluss bei den

Einleitung

Empfängern zu einer Retikulozytose kam (14). 1948 gaben Bonsdorff und Jalavisto dem Protein schließlich den Namen EPO (10). Beim Fetus ist dessen überwiegende Produktion in der Leber lokalisiert, während sie bei Erwachsenen zu 90% von peritubulären Zellen (Fibroblasten) der Niere stattfindet (95,145). In Hepatozyten, peripheren Endothelialzellen, Kardiomyozyten, Astrozyten oder Trophoblasten wird EPO ebenfalls in geringem Maße synthetisiert (118,130).

EPO spielt eine zentrale Rolle für das Sauerstoffangebot im menschlichen Körper, indem es die gesamte periphere Zellzahl der Erythrozyten konstant hält. Es wird als „Schlüssel-Hormon“ in der Erneuerung roter Blutzellen bezeichnet (41). Während der Erythropoese beeinflusst EPO maßgeblich die Produktion der Erythrozyten. Aus diesem Grund wird es zu den Erythropoiesis Stimulating Agents (ESA) gezählt (128). Zusammen mit anderen Wachstumsfaktoren beschleunigt EPO die Ausdifferenzierung unreifer erythrozytärer Vorläuferzellen (*Abbildung 1*) wie beispielsweise die burst-forming units-erythroid (BFU-E) oder die colony-forming units-erythroid (CFU-E) (23,48).

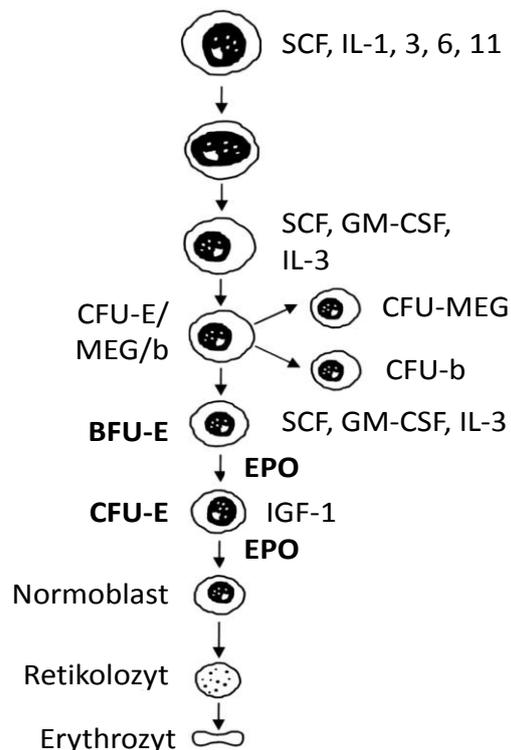


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Erythropoese unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren

Einfluss von Wachstumsfaktoren, wie G-CSF, SCF, IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-9, IL-11, GM-CSF, IGF-1 und EPO auf die Erythropoese. EPO interagiert in den späteren Stadien der Zelldifferenzierung mit den Erythroid Progenitor Zellen. Primär vermindert EPO Apoptosevorgänge der Progenitor Zellen im Knochenmark. Modifiziert nach (39).

Einleitung

Die Regulation der EPO-Synthese hängt vor allem vom Sauerstoffgehalt des Blutes, im Sinne einer negativen Rückkopplung, ab. Ein niedriger O_2 -Level im Blut führt zu einer vermehrten Synthese und Freisetzung des Hormons, welches dann die Ausdifferenzierung erythrozytärer Vorläuferzellen im Knochenmark beschleunigt. Folglich kann der Körper durch die erhöhte Anzahl reifer Erythrozyten im Blut mehr O_2 aus der eingeatmeten Luft aufnehmen (*Abbildung 2*). Ein hoher O_2 -Level hingegen senkt die Synthese und Freisetzung (78).

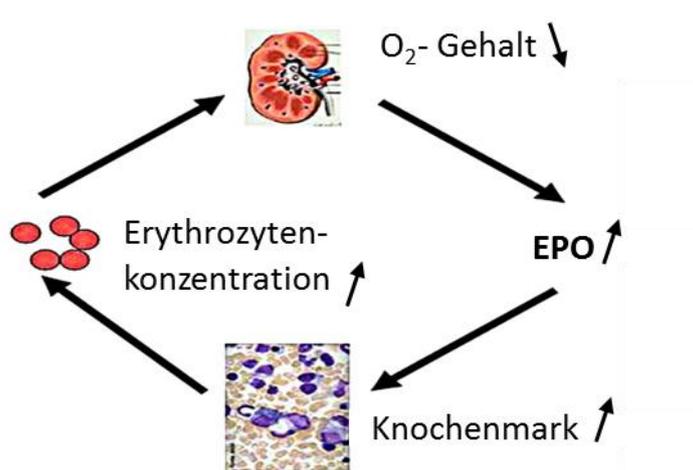


Abbildung 2: EPO - endokriner Feedback bei niedrigem O_2 -Gehalt

Sauerstoffmangel regt die Synthese von EPO an. Die erhöhte EPO-Konzentration steigert die Bildung reifer Erythrozyten im Knochenmark. Dies führt zur Erhöhung der Erythrozytenkonzentration und damit der Sauerstoffaufnahme im Blut. Modifiziert nach (78).

1.2.2 Struktur des EPO-Proteins

Als endogenes Hormon gehört EPO zur Gruppe der Glycoproteine. Bestehend aus 165 Aminosäuren (AS), besitzt es ein Molekulargewicht von 30,4 kDA. Der Genlocus für EPO liegt auf dem Chromosom 7 (39,100). Seine Molekülstruktur besteht aus einem Kohlenhydratanteil von etwa 40% (*Abbildung 3*). Für die Synthese und Sekretion des EPO-Proteins sind die Stickstoff (N)-gebundenen Seitenketten verantwortlich (116). Die Aktivität des Proteins wird durch zwei Disulfidbrücken, welche sich zwischen Cystinresten befinden, bestimmt (76). Die Halbwertszeit von EPO beträgt circa fünf Stunden, während seine Wirkung erst nach etwa 36 Stunden eintritt (119).

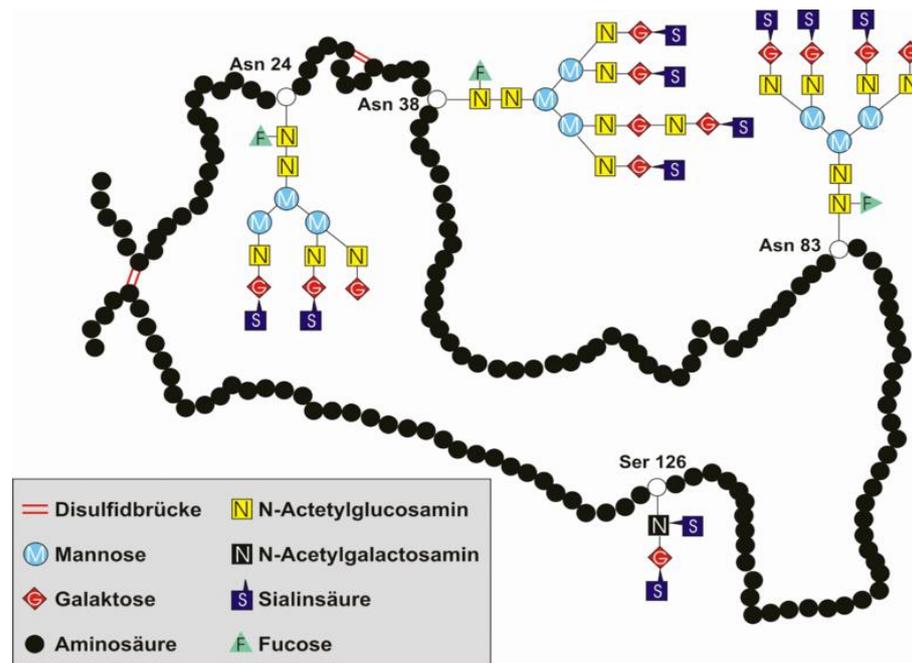


Abbildung 3: Molekularstruktur des EPO-Proteins (65)

Bei Asn 24, 38 und 83 ist je eine N-gebundene Seitenkette an das Aminosäuregerüst (schwarze Punkte) angehängt. Die zwei roten Doppelstriche stehen für Disulfidbrücken und verbinden zwei AS innerhalb des Hormons.

1.2.3 EPO-Synthese in Abhängigkeit von Sauerstoff

Der primäre physiologische Reiz zur Steigerung der Transkription des EPO-Gens ist analog zu dem zuvor beschriebenen Prozess ein verringerter Sauerstoffgehalt im Organismus. Transkriptionsfaktoren, wie die hypoxia-inducible transcription factors (HIFs) bedingen die Einleitung der Transkription. Sie bestehen aus zwei O₂-regulierten α-Untereinheiten und einer β-Untereinheit (α- und β- UE). Bei Normoxie, liegen die beiden α-UE hydroxyliert vor und werden vom Von Hippel-Lindau Protein (pVHL) ubiquitiniert und durch Proteasome abgebaut (36). Unter Hypoxie sind die Untereinheiten nicht hydroxyliert und somit stabiler. Die stabilen Untereinheiten gelangen vom Zytosol in den Zellkern und können dann an den Enhancer (hier HRE) binden (Abbildung 4). Dieser wiederum bindet an den Promoter für das EPO-Gen und beschleunigt auf diese Weise den Transkriptionsvorgang um ein Vielfaches (30,36). Die mittels Transkription entstandene mRNA gelangt in das Zytosol und wird an den Ribosomen zu dem EPO-Protein translatiert. Die Translation selbst unterliegt keinen besonderen Regulationsmechanismen.

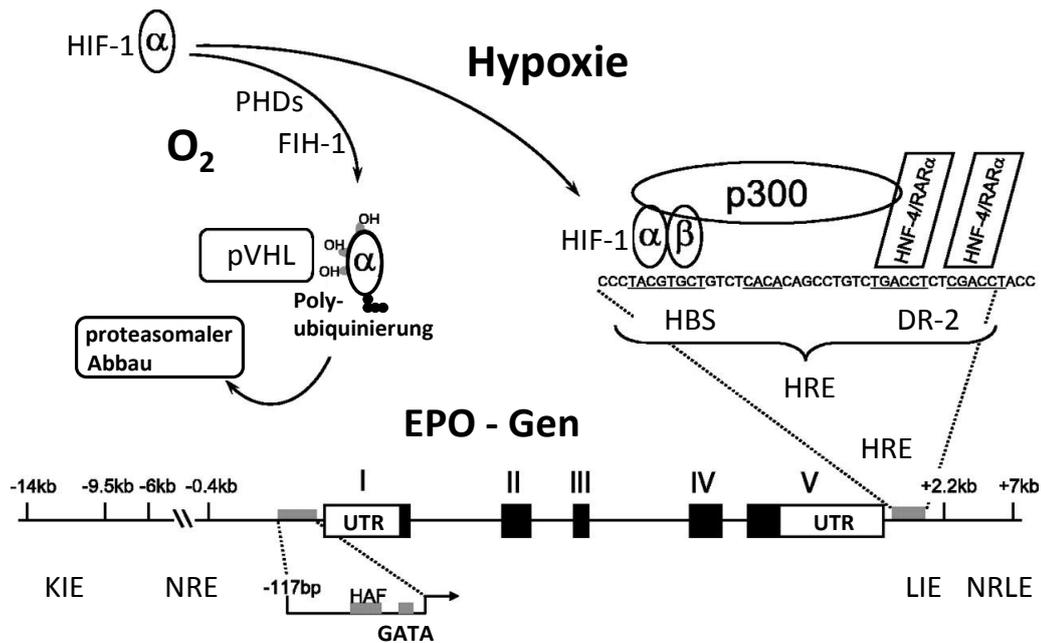


Abbildung 4: Transkription des EPO-Gens unter Hypoxie und Normoxie

Bei Normoxie wird die HIF-1 α -UE von PHDs hydroxyliert. Der pVHL-Komplex (Teil eines Ubiquitin-E3-Ligase-Komplexes) erkennt die hydroxylierte α -UE und sorgt mittels Polyubiquitinierung für deren Abbau durch das Proteasom 26S. Die Transkription des EPO-Gens ist somit nicht möglich. Bei Hypoxie entgeht die α -UE der Degeneration und dringt in den Zellkern ein. Sie verbindet sich mit der β -UE zu einem Heterodimer und kann mit Hilfe des Co-Aktivators p300 an der HBS binden. Die HBS und die beiden DR-2-Bindungsstellen bilden das HRE, welches den Enhancer des EPO-Gens darstellt. Nach Aktivierung des Enhancers wird die Transkription des Gens gesteigert. Abbildung modifiziert nach (36).

1.2.4 Rolle des EPO-Rezeptors und anschließende Signalkaskade

In der Signaltransduktion kann EPO an allen Zellen binden, die einen EPO-Rezeptor (EPO-R) besitzen. Dies ist vor allem bei Stammzellen im Knochenmark der Fall. Der EPO-R gehört zur Familie der Zytokinrezeptoren. In unreifen erythrozytären Vorläuferzellen beeinflusst EPO rezeptorvermittelt über den JAK-STAT-Signalweg deren Wachstum, indem es vor allem die Apoptose der Zelle verhindert (Abbildung 5). Nachdem EPO an den EPO-R bindet, dimerisiert dieser, sodass transmembranständige JAK2-Kinasen phosphoryliert werden (60). Die dadurch aktivierten JAK2-Kinasen phosphorylieren weitere Tyrosinreste der zytosolischen Domäne des EPO-R (154). Während des Vorganges der Signaltransduktion wird unter anderem die Ras/MAP-Kaskade aktiviert, welche maßgeblich an der Zellproliferation beteiligt ist (99). Des Weiteren aktiviert EPO diverse Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel STAT1, STAT3, STAT5A und STAT5B (111,144). So können die erythrozytären Vorläuferzellen

Einleitung

zu reifen Erythrozyten ausdifferenzieren, das Knochenmark verlassen und ihre Funktion als O₂-Transporter aufnehmen (139,144).

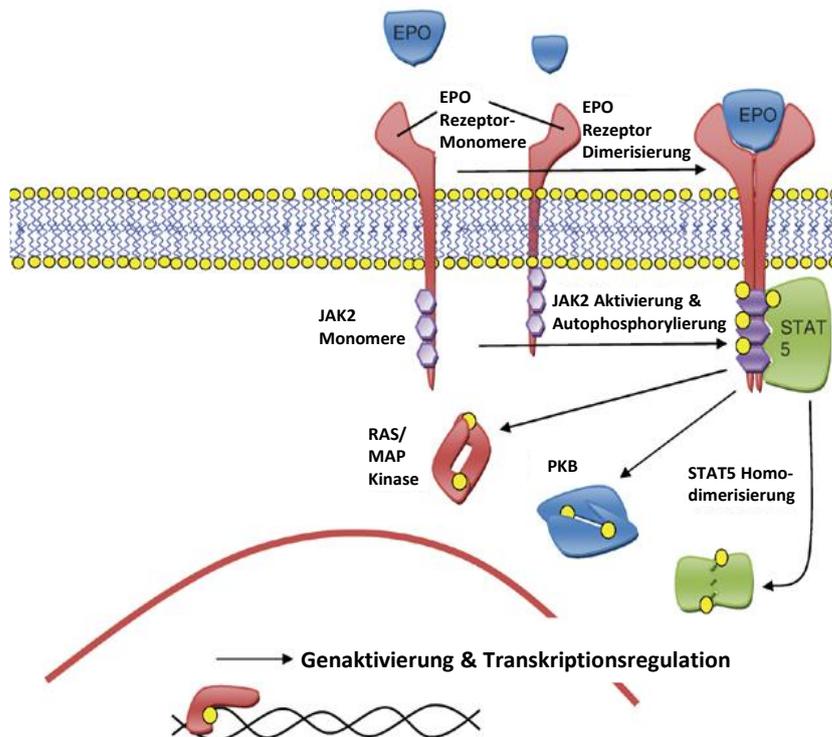


Abbildung 5: EPO-R mit nachgeschalteter Signalkaskade

Dargestellt sind EPO-Moleküle (blau), welche nach Bindung an den membranständigen EPO-Rezeptor-Monomeren eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen. Zu ihr gehören der JAK-STAT-Signalweg, die PKB- und die RAS/MAP-Kaskade. Nach Ablauf der Kaskaden kommt es unter anderem zur Zellproliferation durch Genaktivierung und Transkriptionsregulation. Modifiziert nach (110).

Durch welchen Prozess diese Signalkaskade nach überwundener Hypoxie wieder herunter reguliert werden kann, ist noch nicht vollständig geklärt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Aktivität des EPO-R durch Ubiquitinierung beeinflusst wird und somit auch die Wirkung von EPO als dessen Bindungspartner (13). Die Anwesenheit aktiver Proteinkinase C scheint ebenfalls an der Aktivität des EPO-Signalweges beteiligt zu sein, wobei das ganze Wirkungsausmaß noch unklar ist (138). Zudem beeinflusst ein Adapter Protein Lnk ebenfalls die Signalkaskade. Bei vermehrter Expression wird die Aktivität der Kaskade gesenkt und damit die Differenzierung der Vorläuferzellen gehemmt (133). Doch der EPO-R ist nicht nur bei Stammzellen im Knochenmark vorhanden, sondern auch bei zahlreichen nicht-hämatopoetischen Zellen. Zu ihnen gehören unter anderem das zentrale Nervensystem, Uterusgewebe, diverse solide Tumoren und auch die Leber (38,94).

1.2.5 Vergleich unterschiedlicher rekombinanter Erythrozyten stimulierender Agentien (ESA)

Der Begriff ESA fasst alle synthetisch hergestellten EPO-Analoga zusammen. Zum therapeutischen Einsatz kommen einerseits rekombinante humane Erythropoetine (rhEPO) (33) und andererseits Novel erythropoiesis stimulating proteins (NESP). Von den letztgenannten ist das Darbepoetin alpha (DPO alpha) wohl am bekanntesten (91). Beide werden synthetisch hergestellt und wirken über denselben Rezeptor wie endogenes EPO. Der molekulare Aufbau des menschlichen EPO und des rHuEPO ist identisch. Sie besitzen drei Kohlenhydratketten, die an einem Aspartylrest gebunden sind (*vergleiche Abbildung 3 und Abbildung 6*). DPO alpha hingegen besitzt fünf dieser Ketten (*Abbildung 6*), welche sich in ihrem Aufbau nicht von denen des endogenen Hormons unterscheiden. Aufgrund des unterschiedlichen Kohlenhydratanteils weist DPO alpha eine bedeutend längere Halbwertszeit (HWZ) auf. Während rHuEPO eine HWZ von circa 8,5 h zeigt, ist sie bei DPO alpha etwa 25,3 h lang (91). Infolgedessen besitzt DPO alpha eine wesentlich stärker ausgeprägte *in vivo*-Aktivität (46,57). Die Spezifität des DPO alpha für den EPO-R ist trotz dieser strukturellen Veränderung extrem hoch und gleicht fast der des endogenen Hormons (32,90). Durch die verlängerte HWZ kann unter Therapieeinsatz mit DPO alpha die Applikationsfrequenz von mehrmals wöchentlich auf einmal pro Woche oder gar einmal pro Monat verringert werden. Aufgrund dieser pharmakokinetischen Eigenschaften und wegen seiner höheren Bioverfügbarkeit wurde DPO alpha in den Versuchen bei dieser Arbeit verwendet.

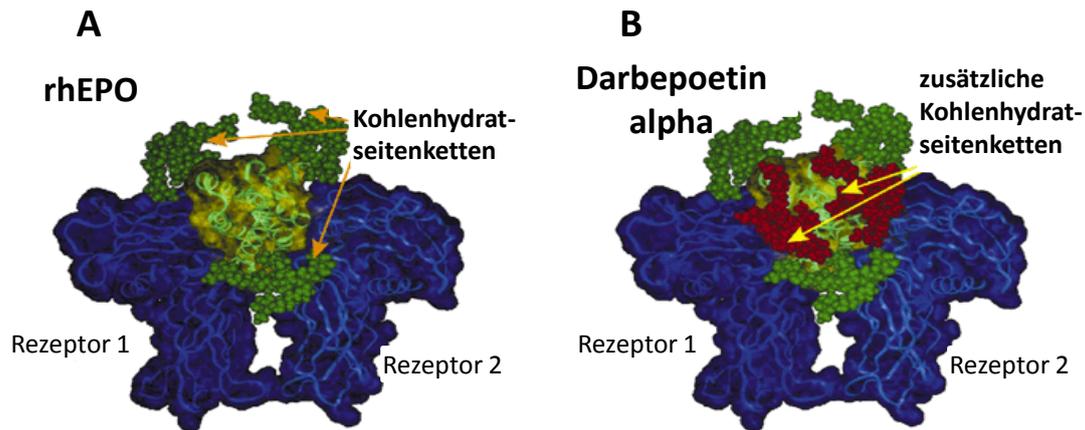


Abbildung 6: Strukturaufbau des rhEPO im Vergleich zu DPO alpha

Abgebildet ist die Struktur des rhEPO links (A) und rechts die des DPO alpha (B). Grün dargestellt sind die Kohlenhydratreste, welche beide Substanzen gemeinsam aufweisen. Rot dargestellt sind die zusätzlichen Kohlenhydratreste, die nur das DPO alpha besitzt. Blau dargestellt sind die EPO-R, an denen sowohl rhEPO als auch DPO alpha binden kann. Modifiziert nach (32).

1.2.6 Therapeutischer Einsatz von DPO

Ziel der Therapie mit DPO ist es, den physiologischen Hämoglobinwert bei anämischen Patienten ohne Transfusion von Erythrozytenkonzentraten, wieder herzustellen. Laut WHO liegt eine Anämie bei Hämoglobinwerten unter 12 g/dl bei Frauen und unter 13 g/dl bei Männern vor (71). Wie bereits in Punkt 1.1 erwähnt, werden ESA wie das DPO am häufigsten bei chronischem Nierenversagen (CRF), eingesetzt. Hier kommt es zur renalen Anämie durch den Untergang peritubulärer Zellen, welche für die EPO-Bildung verantwortlich sind (28).

Weitere Gründe für anämische Zustände sind Tumorerkrankungen (52), chronische Viruserkrankungen, wie zum Beispiel HIV (58) oder immunologische Erkrankungen aus dem rheumatischen Formkreis, wie die rheumatoide Arthritis (67). Selten verursachen die Krankheiten allein die Blutarmut. Vielmehr führen Nebenwirkungen von Chemotherapeutika, antiviralen Medikamenten oder Immunsuppressiva zu einer medikamenteninduzierten Anämie. Diese kann durch DPO oftmals erfolgreich therapiert werden (68). Auch Prä- und postoperativ werden EPO Produkte in der Chirurgie eingesetzt. Hier kann bei Operationen, bei denen ein hoher Blutverlust erwartet wird, die Notwendigkeit von Bluttransfusionen gesenkt oder sogar ganz vermieden werden (26).

1.2.7 Applikation von DPO

Folgende Laborparameter, wie in *Tabelle 1* gelistet, sollten vor dem Therapiebeginn mit DPO ermittelt werden.

Tabelle 1: Zu ermittelnde Laborparameter vor DPO-Therapiebeginn

Die aufgeführten Werte gelten als Mindestvoraussetzung für den Therapiebeginn mit DPO. Erstellt nach der Richtlinie von Triolo (134).

Parameter	Basalwerte
Hb-Wert	< 11-12 g/dL
Erythrozytenindizes	MCV, MCH, MCHC
Retikulozytenanzahl	Im Verlauf beobachten
Eisengehalt	Serumferritin > 100 mcg/L Transferrin-Sättigung > 20%

Interpretation der Werte aus *Tabelle 1*:

Ist die Hämoglobinkonzentration unter 11-12 g/dL, kann laut Richtlinie von Tirolo der Einsatz von DPO erfolgen (134). Die Erythrozytenindizes weisen auf die Art der bestehenden Anämie des Patienten hin, beispielsweise bedingt Eisenmangel das Vorliegen einer mikrozytären hypochromen Anämie. In diesem Fall wäre die DPO-Therapie ohne die erforderliche Eisengabe wenig erfolgversprechend. Für alle zu behandelnden Anämieformen spiegelt ein Anstieg der Retikulozytenanzahl - abhängig vom Ausgangswert - den Therapieerfolg wider. Auf eine Anämie hinweisend ist ein Retikulozytenanteil von unter 0,5 % im Blut, dieser sollte unter DPO-Gabe ansteigen. Aus diesem Grund wird zunächst der Ausgangswert benötigt, um im Verlauf die Zellzahl der Retikulozyten zu bestimmen. Der minimal angestrebte Hb-Wert liegt mit seinem unteren Grenzwert bei 11 g/dL. Die meisten Patienten erreichen diesen Wert unter DPO-Gabe in der Dosis von 4.000-1.0000 IU über einen Zeitraum von etwa zwei Monaten. Hierbei ist die zusätzliche Gabe von Eisen essentiell (Substitution von 150 mg Eisen pro Anstieg des Hb-Wertes um 1 g/dL) (134).

Die Applikationsform eines Arzneistoffes richtet sich grundsätzlich nach dessen physikalischen sowie chemischen Eigenschaften, dem gewünschten Wirkungseintritt, der geforderten Wirkdauer und dem Zustand des Patienten (102). DPO wird grundsätzlich parenteral verabreicht (intravenös, subkutan oder intraperitoneal) (4). Denn es ist, wie alle

Einleitung

ESA, ein Protein und als solches empfindlich gegenüber Änderungen im pH-Wert; in einem sauren Milieu, sprich im Magen, denaturiert es und verliert damit seine biologische Funktion. Die subkutane Injektion wird bevorzugt, da HWZ und Bioverfügbarkeit von DPO im Vergleich zu den anderen Applikationsformen höher sind (91). Die Verabreichungsfrequenz hingegen ist vom verwendeten Präparat abhängig. Bei Patienten mit einer renal bedingten Anämie, die DPO alpha anstelle von rhEPO erhielten, konnte die Frequenz verringert werden, wobei in beiden Therapieschemata der Hb-Wert in gleichem Maße angehoben wurde (46).

1.2.8 Alternative Therapieansätze für DPO

Klinische Studien zeigten kürzlich, dass DPO auch bei anderen Erkrankungen hilfreich sein kann. Von diversen Arbeitsgruppen wurden innerhalb ihrer Versuchsreihen an verschiedenen Organen ischämische Gewebsschäden und somit Apoptoseprozesse induziert. Die Gabe von DPO reduzierte diese, sodass größere Anteile vitalen Gewebes erhalten werden konnte (47). Gao et al. veranschaulichten dieses Phänomen beispielhaft an Herzmuskelgewebe. Sie provozierten durch künstliche Minderperfusion an Mäuseherzen einen Myokardinfarkt. Hier zeigten sie durch einmalige Bolusgabe von DPO, dass der ischämisch bedingte Zelluntergang und damit das Infarktareal am Herzmuskel reduziert werden konnte. Die Herzfunktion nach Infarkt war besser als bei der Kontrollgruppe (ohne DPO-Gabe) (43). Dieser Schutzmechanismus wird als ischämisches Preconditioning (IPC) beschrieben (112). Weitere Organe bei denen sich bisher solch ein protektiver Effekt zeigte, sind Niere (151), Gehirn (92), Darm (51) und Leber (49,80,153).

Außerdem besitzt DPO weitere Eigenschaften, nämlich die zur Steigerung der Neoangiogenese. Dieser Effekt wirkt sich gerade bei verletztem Endothel als zusätzlicher Schutzfaktor, also positiv auf den Heilungsprozess aus (11,122). Das DPO alpha toxisch für bestimmte Leberzelltumorreihen sein kann, wurde kürzlich von unserer Arbeitsgruppe gezeigt. Hier scheint es ganz neue Therapieansätze in der Tumorthherapie zu geben. Weiterhin gibt es, wie in Punkt 1.1 bereits erwähnt, viele experimentelle Studien im Bereich der regenerativen Medizin. Hier wird die Wirkung von DPO als Antioxidans und als Proliferationsstimulus bei unterschiedlichen Gewebearten, wie zum Beispiel defekter Haut (5,6,54) oder Lebergewebe intensiv untersucht (73)

1.2.9 Missbrauch von EPO-Produkten

Während der Einsatz von DPO in der Medizin vor allem die Therapie einer Anämie durch Anhebung des Hämoglobin-/Hämatokritspiegels als Ziel hat, wird dieser Effekt im Profisport nicht selten missbraucht, um das körperliche Leistungsvermögen zu steigern. Infolge der zunehmenden Erythrozytenzahl im Blut, kann der Körper durch Doping mit EPO-Produkten mehr Sauerstoff aufnehmen und somit die Leistung des Einzelnen noch weiter verbessern (44).

Bevor ESA im Profisport eingesetzt wurden, nutzten die Sportler zunächst klassisches Blutdoping, um ihre Leistung zu steigern. Dieses Verfahren beruht auf der Transfusion von Blutprodukten. Hierfür ist nicht nur qualifizierte Hilfe bei der Applikation, sondern auch eine gewisse Infrastruktur für den Erwerb dieser Produkte von Nöten. Anders ist es hingegen beim Doping mit synthetischem EPO, hier können die Substanzen intravenös oder subkutan verabreicht werden, um so den erwünschten Effekt zu erzielen (132). Zu den am häufigsten verwendeten ESA als Dopingmittel gehören rHuEPO, Darbepoetin alpha und CERA (66).

Kurz nachdem rhEPO 1988 klinische Anwendung fand, mehrten sich die Gerüchte über dessen Einsatz im Leistungssport. So soll laut Catlin et al. erstmals in den olympischen Winterspielen von 1988 in Calgary, Kanada, rhEPO als Dopingmittel eingesetzt worden sein (15). Bevorzugt werden die EPO-Analoga in Ausdauersportarten wie zum Beispiel dem Ski-, Lauf und Radsport benutzt (31). Wegen des leistungssteigernden Effektes wurde der Gebrauch ESA im Sport bereits seit 1990 vom International Olympic Committee (IOC) verboten (96).

Der Nachweis dieser Dopingmittel gelingt mittels isoelektrischer Fokussierung und Immunoblot aus Proben von Urin und Blut (12,117). Denn obwohl die Aminosäuresequenz der ESA dem endogenen Hormon gleicht, unterscheiden sie sich in der Anzahl ihrer Glykane und können folglich in den Testverfahren unterschieden werden. Allerdings wird der Nachweis durch die große Vielzahl von EPO-Analoga zunehmend erschwert (109).

Trotz des Verbotes für die Anwendung von ESA im Leistungssport wird gegenwärtig immer wieder Profisportlern wie zum Beispiel Lance Armstrong das Doping mit EPO vorgeworfen bzw. nachgewiesen (82,83).

1.2.10 Kontraindikationen und Nebenwirkungen der Therapie mit DPO

Alle ESA wie auch DPO sind nicht für die Therapie der Anämie bei Tumorpatienten mit Beteiligung des Knochenmarks indiziert, da hier gesunde Knochenmarkszellen durch Tumorzellen verdrängt werden. Folglich ist dadurch bedingt auch die Anzahl erythrozytärer Vorläuferzellen erniedrigt. Dieser Umstand hat zur Folge, dass ESA und andere Wachstumsfaktoren die Ausdifferenzierung hin zum reifen Erythrozyten kaum beeinflussen können (118). Ferner zeigte sich bei vereinzelt Brusttumor-Zelllinien, welche den EPO-R exprimieren, dass durch DPO-Gabe ein schlechteres Ansprechen auf die spezifische Chemotherapie ausgelöst wurde. Daraus resultierte ein verkürztes rezidivfreies Intervall und somit sank auch die absolute Überlebenszeit der Patienten signifikant (85). Zu anderen Tumorarten, bei denen unter der Therapie mit DPO teilweise eine gesteigerte Proliferation festgestellt werden konnte, gehören verschiedene Uterustumore und das Nierenzellkarzinom (147,152). Neben den Kontraindikationen können weiterhin Komplikationen unter der Therapie mit DPO auftreten. Bei dialysepflichtigen Patienten auf Grund von Niereninsuffizienz, wurden gehäuft unter DPO-Therapie hypertensive Entgleisungen registriert (69,135). Darüber hinaus zeigten Patienten, die kardiovaskuläre Vorerkrankungen hatten, in einer Studie unter DPO-Gabe ein erhöhtes Thromboembolierisiko. Dies wurde unter anderem auf die Thrombozytenaktivierung zurückgeführt, doch der genaue Mechanismus ist noch nicht geklärt (130).

Neben dem therapeutischen Einsatz, den Kontraindikationen und Nebenwirkungen von DPO, sind Fragen hinsichtlich medikamentöser Wechselwirkungen, speziell in der Leber, noch nicht beantwortet (37).

1.3 Die menschliche Leber

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des Körpers und trägt mit 1,3 - 1,5 kg zu circa 2 - 5% unseres Körpergewichtes bei. Als unpaares Organ liegt sie im rechten Oberbauch dem Zwerchfell an. Sie differenziert sich im Laufe der Embryonalentwicklung aus dem Gewebe der primitiven Darmwand. Die Leber ist die größte Drüse im menschlichen Körper und benötigt durch ihre hohe Stoffwechsellätigkeit circa ein Viertel des Herzzeitvolumens. Beim Menschen überwiegt der exokrine Drüsenanteil mit der Produktion von Gallenflüssigkeit und deren Ausführungsmöglichkeit (Gallengänge). Die Leber wirkt auch als endokrines Organ, so

Einleitung

ist sie beispielsweise maßgeblich an der Synthese von Vitamin D beteiligt. Weitere wichtige Funktionen der Leber sind in *Tabelle 2* dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht über wichtige Funktionen der Leber

<p>Synthese lebensnotwendiger Plasmaproteine:</p> <ul style="list-style-type: none">• Albumin• Gerinnungsfaktoren• Globuline• Lipoproteine• akute Phase Proteine <p>Speicherfunktion von:</p> <ul style="list-style-type: none">• Glukose (als Glykogen)• Vitaminen (A, D, K) <p>Entgiftungsfunktion (Detoxifikation):</p> <ul style="list-style-type: none">• Biotransformation endogener (z.B. Ammoniak) und exogener (z.B. Arzneimittel) Substanzen <p>Sekretionsfunktion:</p> <ul style="list-style-type: none">• Galle• Bilirubin
--

Die Leber wird von verschiedenen Zellarten gebildet: Hepatozyten, Kupffer-Zellen (oder Ito-Zellen), Sternzellen, Gallengangsepithel- und Gefäßendothelzellen. Den größten zellulären Anteil bilden mit etwa 80 % die Hepatozyten. Sie sind polygonale, vielkernige Zellen mit einem Durchmesser von 20 - 30 µm. Ihre Aufgabe besteht darin, die genannten metabolischen Leistungen zu erbringen (24).

Strukturell kann man die Leber mikroskopisch in Leberläppchen aufteilen (*Abbildung 7*). Im Zentrum der Lläppchen verlaufen Zentralvenen, welche das gesamte Blut aus der Leber in die obere Hohlvene (V. Cava inf.) leiten. Um die Zentralvenen herum sind Hepatozyten lokalisiert, die untereinander von Bindegewebssepten getrennt werden. In den Septen liegen

Einleitung

Periportalfelder in denen sich die Glisson'sche Trias befindet. Die Trias wird durch Gallengänge (Ductuli interlobulares), kleine Venen (Venae interlobulares) und kleine Arterien (Arteria interlobulares) gebildet. Die Hepatozyten filtern das nährstoffreiche Blut aus den Gefäßen der Glisson'schen Trias und geben es nach erfolgter Verstoffwechslung an die Zentralvenen ab (146).

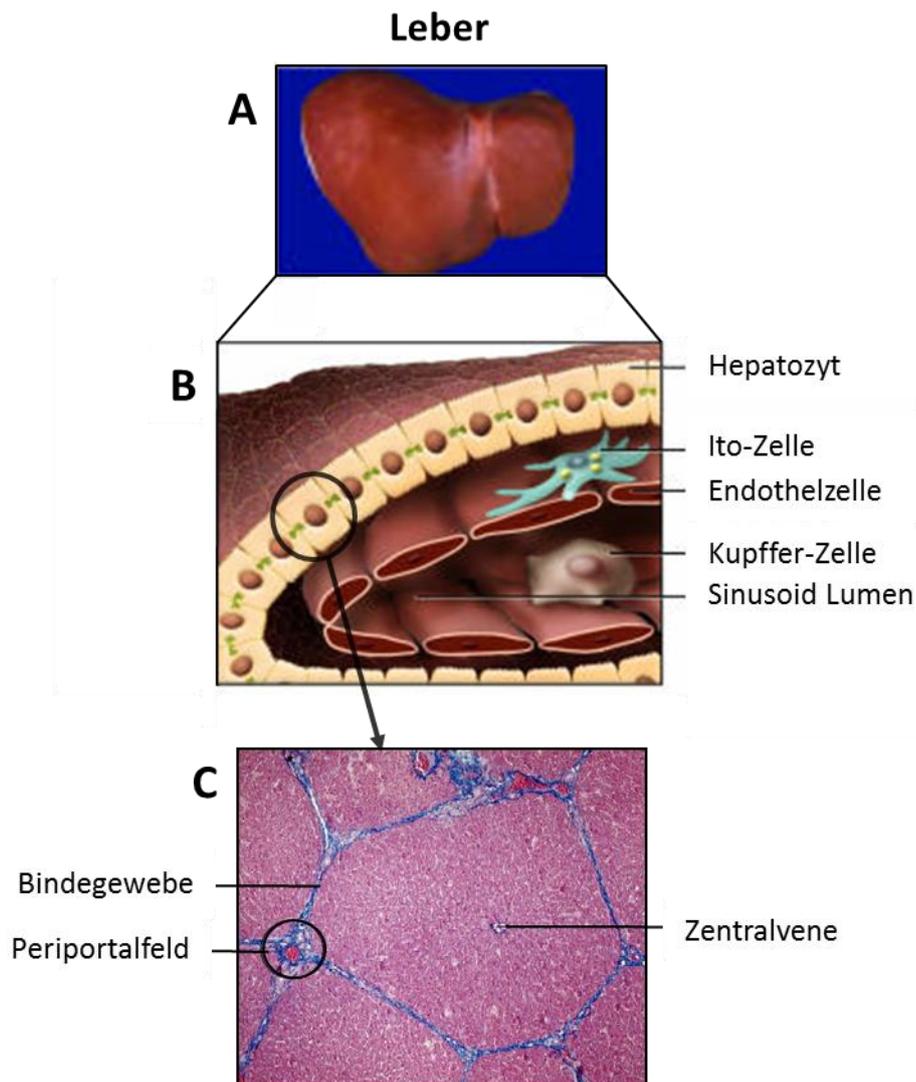


Abbildung 7: Anatomischer Aufbau der Leber

Abgebildet ist ein makroskopisches Foto der Leber (A), die schematische Darstellung der Leber im Querschnitt (B) und ein mikroskopischer Ausschnitt eines Leberläppchens in Hämatoxylin-Eosin (H. E.) - Färbung und 70facher Vergrößerung (C). Modifiziert nach (7,114).

1.3.1 Leberschäden und Therapieansätze mit DPO

Während chirurgischer Eingriffe wie zum Beispiel bei Subtotal- beziehungsweise Totalresektion und Transplantation der Leber besteht große Gefahr des Leberversagens,

Einleitung

hervorgerufen durch Ischämie und Reperfusion des Organs (127). Hier kann, wie bereits in Punkt 1.2.8 beschrieben, DPO als Therapeutikum eingesetzt werden. Ist die Funktion der Leber, außer bei chirurgischen Eingriffen, akut oder chronisch gestört, so gerät die Stoffwechsellage im Organismus durcheinander und es droht ebenfalls ein Ausfall des Organs.

In diesem Zusammenhang wird der therapeutische Einsatz von DPO neuerdings diskutiert. Es konnte in unterschiedlichen Versuchen gezeigt werden, dass bei akutem Leberausfall durch Gabe von DPO der Untergang von Hepatozyten signifikant gemindert wird (61,80). Ähnliche Ergebnisse erzielten Sigal et al. bei Patienten im Rahmen von Erkrankungen mit chronischer Leberfibrose (129).

Aber es gibt auch Einschränkungen für den Einsatz von DPO bei Lebererkrankungen. Beispielsweise bei den Leberteilresektionen, die wegen kolorektaler Lebermetastasen vorgenommen werden. Hier ist von der Behandlung mit ESA abzuraten, da EPO die Apoptose von Tumorzellen vermindern und deren Neoangiogenese fördern kann, was zu einer Wachstumssteigerung der Metastasen führt (120).

1.4 Rolle der Leber im Stoffwechsel von Arzneimitteln

Die Leber ist verantwortlich für Konzentrierung, Metabolisierung (Biotransformation) und Eliminierung der meisten Arzneimittel und toxischen Substanzen, die vom menschlichen Körper aufgenommen werden (79,108).

1.4.1 Biotransformation

Ziel des Körpers ist es, Fremdstoffe wie Medikamente oder Toxine nach der Aufnahme schnellstmöglich wieder auszuscheiden. Die Elimination richtet sich nach den physikalisch-chemischen Eigenschaften eines Fremdstoffes. Ist er lipophil und damit schlecht wasserlöslich, so kann er nur sehr langsam über die Niere oder Gallenflüssigkeit ausgeschieden werden. Es gibt Enzymsysteme, die diese Fremdstoffe in hydrophile, leichter ausscheidbare Stoffe, umwandeln können. Diese Umwandlung, auch Biotransformation

Einleitung

genannt (102), findet größten Teils in den Hepatozyten der Leber (bis zu 95%) und zu geringen Anteilen auch in anderen Organen wie Niere, Lunge und Darm statt (140).

Die an der Biotransformation beteiligten Enzyme, wie zum Beispiel Monooxygenasen oder Gluconyltransferasen, sind hauptsächlich an der Membran des endoplasmatischen Retikulums gebunden (79) oder auch in den Mitochondrien lokalisiert (121). Sie weisen häufig eine geringe Substratspezifität auf, sodass verschiedene Substrate unterschiedlicher chemischer Struktur von ihnen umgesetzt werden können. Außer Fremdstoffen werden auch körpereigene Stoffe (Gallensäure oder Bilirubin) von den Enzymen umgesetzt (102).

Die Biotransformation läuft in mehreren Reaktionsschritten ab. Dazu gehören die Phase I, Phase II- und Phase III- Reaktionen. Sie können getrennt voneinander, nacheinander oder parallel ablaufen (*Abbildung 8*). Oft geht jedoch die erste der zweiten Phase voraus, bevor das Substrat während der dritten Phase ausgeschieden wird. Ziel der Phase I und Phase II- Reaktionen ist es, die Wasserlöslichkeit eines Fremdstoffes zu erhöhen, damit dieser leichter ausgeschieden werden kann (34).

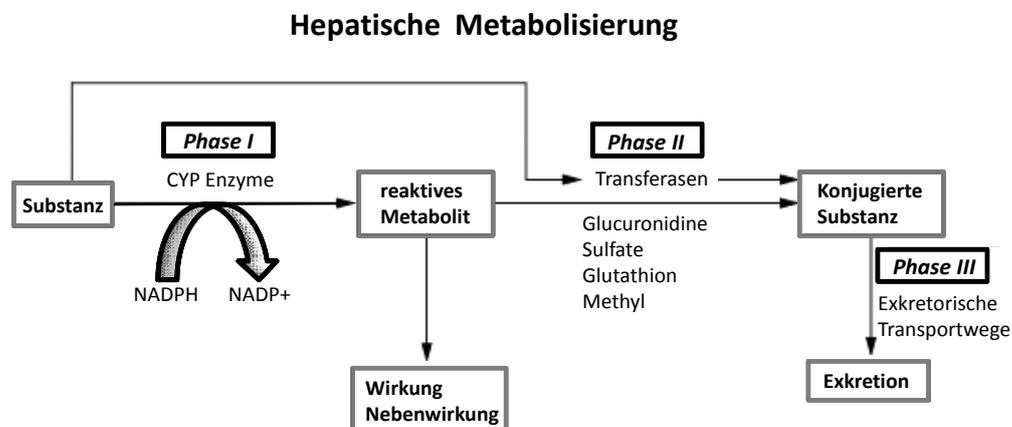


Abbildung 8: Hepatische Metabolisierung

Schematische Darstellung der Metabolisierung einer Substanz in der Leber. Zunächst durchläuft sie die Phase I und/oder direkt Phase II. Nach der Konjugation erfolgt durch Phase III die Ausscheidung der Metaboliten. Modifiziert nach (79).

Der Mechanismus der Biotransformation wird in der Pharmakologie häufig genutzt. Nachdem ein Medikament in den Blutkreislauf gelangt ist, kann es je nach physikalisch-chemischer Eigenschaft direkt oder nach Umwandlung durch Hepatozyten als sein aktiver

Einleitung

Metabolit wirken. Das Prodrug Norverapamil beispielsweise, ist der wichtigste aktive Metabolit von Verapamil und entsteht erst nach N-Dealkylierung von Verapamil in der ersten Phase der Biotransformation (64).

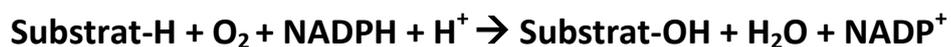
1.4.2 Phase I-Reaktionen

Die Phase I-Reaktionen werden auch als Funktionalisierungsreaktionen bezeichnet. Hier werden polare, funktionelle Gruppen durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse an ein Fremdstoffmolekül angehängt oder in ihm verändert (*Tabelle 3*). Dadurch entstehen meist hydrophilere Metaboliten, welche zum Teil direkt oder nachdem sie die Phase-II durchlaufen haben, ausgeschieden werden können. Diese Reaktionen werden überwiegend von der Zytochrom-P450-Familie katalysiert (140).

1.4.3 Oxidationsreaktion am Beispiel der Monooxygenase

Bei dieser Oxidationsreaktion bindet das Enzym molekularen Sauerstoff, überträgt eines der Sauerstoffatome (O-Atom) auf das Substrat und das zweite O-Atom reagiert frei zu H₂O.

Vereinfachte Reaktionsgleichung:



Im Gegensatz zu anderen Hämoproteinen, wie beispielsweise Hämoglobin oder Peroxidasen, dient den CYPs eine Thiol-Gruppe als Ligand. Diese verändert die Elektronendichte im Porphyrin-Ring des Eisens und stellt somit ein negativ geladenes Zentrum für die Aktivierung molekularen Sauerstoffs her (*Abbildung 9*). Die Reaktionen benötigen außer dem Zytochrom P-450 eine NADPH-CytochromP-450-Reduktase, molekularen Sauerstoff und NADPH (56).

Einleitung

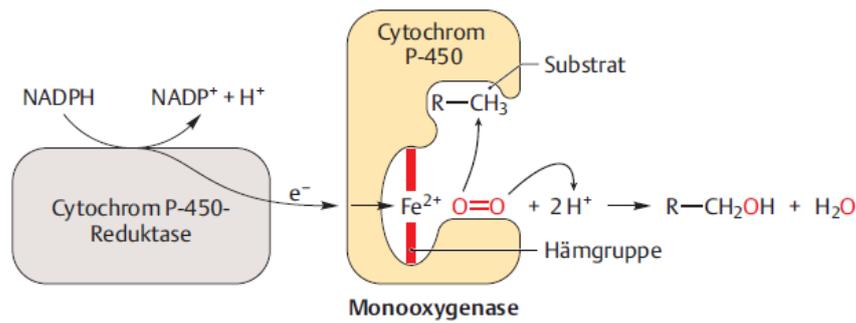


Abbildung 9: Reaktionsmechanismus der Monooxygenasen (115)

Zunächst wird das Substrat von einer hydrophoben Bindungsstelle der Oxygenase gebunden. Anschließend wird ein Elektron auf das Eisen der Hämgruppe übertragen. Hierbei entsteht zweiwertiges Eisen, welches den molekularen Sauerstoff binden kann. Eines der O₂-Atome dient der Oxidation des Substrates und das zweite wird mit zwei Protonen und einem Elektron, das während der Reaktion der CYP-Reduktase frei wird, zu H₂O reduziert. Das oxidierte Substrat und H₂O liegen somit als Reaktionsprodukte vor.

1.4.4 Phase II-Reaktionen

Die Phase II-Reaktionen werden als Konjugationsreaktionen bezeichnet. Transferasen übertragen dabei zusätzlich chemische funktionelle Gruppen an ein Substrat (*Tabelle 3*). Diese Substrate können sowohl körpereigene Stoffe, wie zum Beispiel Bilirubin, Fremdstoffe als auch deren durch Phase-I umgewandelten Metabolite sein. Die Substrate werden in der Regel mit polaren, negativ geladenen Molekülen wie Glucuronsäure, Sulfat, Acetat, Aminosäuren oder Glutathion, konjugiert. Besitzt ein Substrat allerdings schon eine funktionelle Gruppe, so kann es auch ohne vorangegangene Phase I-Reaktion direkt konjugiert und anschließend ausgeschieden werden (140).

1.4.5 Phase III-Reaktionen

Die Phase III dient vor allem dem Transport der Reaktionsprodukte aus den Zellen. Anschließend können diese über die Niere oder Galle ausgeschieden werden. Der Transport wird hauptsächlich durch ATP-abhängige Transporter, die zur Familie der ATP-binding cassette (ABC) gehören, Effluxpumpen oder anderen speziellen Carriern wie die Multidrug Resistance-Related Proteine vermittelt (*Tabelle 3*). Ist die Exkretion über Nieren oder Galle nach der Phase II nicht möglich, so gibt es auch in der Phase III noch vereinzelt Konjugationsreaktionen, wie die von Glutathion, welche das Ausscheiden einer Substanz verbessern (62,70,150).

Tabelle 3: Übersicht über die unterschiedlichen Phase I-/II-/III-Reaktionen der Biotransformation.
 Modifiziert nach (70,102).

Phase I-Reaktionen	Phase II-Reaktionen	Phase III-Reaktionen
<p>Oxidation von</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alkoholen und Aldehyden • aliphatischen Ketten • aromatischen Aminen • oxidativer N-/O-Desalkylierung • oxidativer Desaminierung • Desulfurierung • oxidativer Dehalogenierung • Hydroxylierung von Aromaten • N, S-Oxidation Flavin-Monooxygenasen <p>Reduktion von</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aldehyden, Nitrogruppen, Azoverbindungen • Dehalogenierung <p>Hydrolyse von</p> <ul style="list-style-type: none"> • Estern, Säureamiden, Epoxiden, Acetalen <p>Sonstige</p> <ul style="list-style-type: none"> • Peroxidation Glutathion-Peroxidasen • Decarboxylasen 	<p>Konjugation von</p> <ul style="list-style-type: none"> • Glucuronidierung UDP Glucuronosyltransferasen • Sulfatierung • Sulfotransferasen • Acetylierung O-, N-Acetyltransferasen • Methylierung O-, N-, S-Methyltransferasen • Glutathion Konjugation • Glutathion-S-Transferasen 	<p>Konjugation von</p> <ul style="list-style-type: none"> • Glutathion <p>Transport aus Zelle</p> <ul style="list-style-type: none"> • ABC Transporter • Multidrug Resistance-Related Proteine • Effluxpumpen

1.5 Zytochrom P450-Enzyme (CYPs)

Die zentrale Bedeutung in der oxidativen Biotransformation und damit im Metabolismus von Medikamenten haben die CYPs der Hepatozyten (25,97,143,149). Sie sind Monooxygenasen

Einleitung

und enthalten Hämoproteine vom Typ des Zytochrom P450. Bestehend aus mehreren hundert Aminosäuren (circa 500), haben sie ein Molekulargewicht zwischen 45–62 kDa und besitzen ein Eisen III-Ion (Fe^{3+}) im aktiven Zentrum (77).

Im Körper kommen die CYPs ubiquitär vor, sind jedoch hauptsächlich am glatten-ER in den Hepatozyten lokalisiert. Entdeckt wurden die Zytochrom P450-Enzyme zufällig von Martin Klingenberg 1958 bei der Arbeit mit "Zytochrom b5". Ihr Name leitet sich von ihrem Absorptionsmaximum ab, das bei 450 nm liegt. Bisher sind in menschlicher DNA 58 verschiedene Gene sequenzanalytisch detektiert worden (103).

Durch die Vielzahl der verschiedenen CYP-Gene werden sie anhand ihrer Sequenzhomologie in Familien (> 40% Aminosäuren identisch) und Unterfamilien (> 55% Aminosäuren identisch) eingeteilt (63). Daraus ergibt sich beispielsweise der Familienname Cyp2 oder der Unterfamilienname CYP2A. Innerhalb dieser Unterfamilien können auch noch Isoformen, wie zum Beispiel CYP2A1 oder CYP2A2 unterteilt werden (104).

Zu den wichtigsten Vertretern der CYPs gehören drei Familien: CYP1, CYP2 und CYP3. Ihr Anteil am Gesamtanteil der CYPs ist am höchsten. Aus diesem Grund spielen sie die wichtigste Rolle beim hepatischen Metabolismus von Medikamenten (79). Von den Isoenzymen der Phase I Reaktionen macht CYP3A4 den größten Anteil aus (Abbildung 10). Daher wird angenommen, dass dieses Enzym auch an Metabolisierungsschritten der meisten Medikamente beteiligt ist (35).

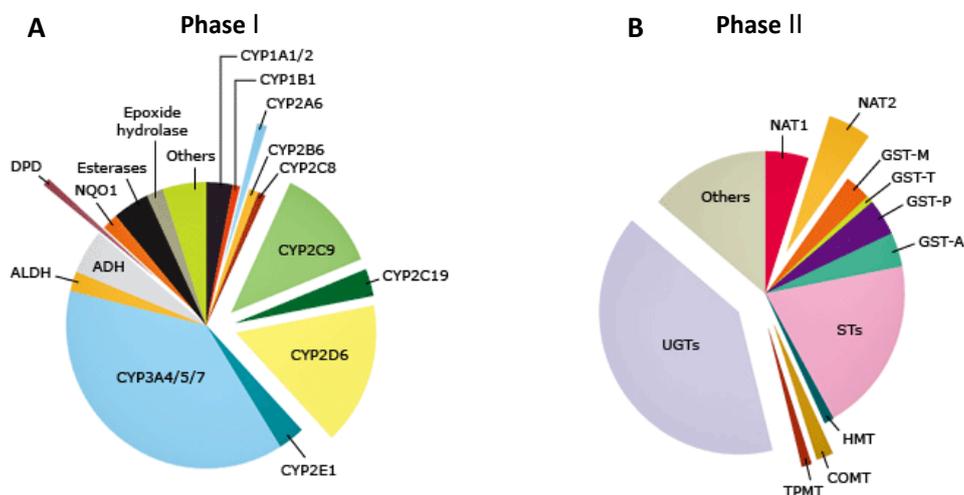


Abbildung 10: Durchschnittliche Verteilung der CYPs beim Menschen

Verteilung beteiligter Enzyme der hepatischen Metabolisierung, aufgeteilt in Phase I (A) und Phase II (B). Sie ist stark abhängig vom Individuum (35).

1.5.1 CYP Polymorphismus

Genetischer Polymorphismus führt zu unterschiedlicher Verteilung der CYPs in der Phase I und II der Biotransformation beim Menschen. Durch Senkung oder gar Abwesenheit von bestimmten CYPs, ist der Medikamentenabbau vermindert. Patienten, bei denen dies der Fall ist, werden als Poor Metabolizer bezeichnet. Wenn andererseits eines der Gene stärkerer Expression unterliegt, ist das Enzym vermehrt vorhanden und kann ein Medikament, welches seiner Metabolisierung unterliegt, schneller abbauen (Rapid Metabolizer) (87). Besonders gut ist dieser Mechanismus an den Subfamilien CYP2C19 und CYP2D6 erforscht (8). Der hohe Polymorphismus kommt durch die über 90 verschiedenen Allelvarianten zustande (101).

1.5.2 Arzneimittelinteraktion durch CYP-Induktion/-Inhibition

Die Arzneimittelinteraktion spielt in der Pharmakotherapie eine große Rolle. Sowohl Induktion als auch Inhibition sind am Ausmaß der Interaktionen beteiligt. Viele Medikamente können die Aktivität unterschiedener CYPs erhöhen oder erniedrigen, indem sie die Biosynthese eines Isoenzym induzieren oder inhibieren. Wenn ein Medikament die CYP-vermittelte Metabolisierung eines anderen inhibiert, so akkumuliert letzteres im Körper und kann teilweise toxische Spiegel annehmen (107). Zu den starken Enzyminhibitoren zählen beispielsweise Grapefruitsaft, Psychopharmaka wie Fluoxetin, Paroxetin, Antibiotika wie Clarithromycin, Erythromycin oder Proteaseinhibitoren wie Indinavir, Ritonavir und Sequinavir (68). Eine verminderte Wirkung eines Medikamentes durch beschleunigten Abbau ist aufgrund von Interaktion mit anderen Substanzen ebenfalls möglich. Diesen Umstand beschrieb Crawford am Beispiel der Arzneimittelinteraktion zwischen Ethinylestradiol (Bestandteil oraler Kontrazeptiva) und Phenobarbital. Das Phenobarbital induziert die CYP2A4-Aktivität, welche ihrerseits den Abbau des Ethinylestradiol beschleunigt. So sinkt der Plasmaspiegel des Estradiols und daraus resultierend die Wirksamkeit des oralen Kontrazeptivums (20). Weitere wichtige Enzyminduktoren sind zum Beispiel Johanneskrautextrakt, das Antibiotikum Rifampicin, das Antiepileptikum Phenobarbital und auch Tabak ist ein wichtiger Vertreter der CYP-Induktoren (68). In diesem Zusammenhang ist zu klären, inwieweit DPO, welches in der Therapie von

Einleitung

Lebererkrankungen einsetzbar ist, den Metabolismus der Leber beeinflusst und welche Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten entstehen können.

2 Zielsetzung

Es gibt viele Bereiche in der Medizin, in denen der Einsatz von DPO mittlerweile Standard ist. Hauptsächlich wird es bei Anämieformen unterschiedlicher Ursachen eingesetzt. In der Leberchirurgie wurden mit DPO vielversprechende Ergebnisse erzielt. Bei Leber-Transplantation oder -Teilresektion unterliegt das Organ oft längeren Ischämiezeiten. Mit Hilfe von DPO konnte zum einen die Reperfusion gesteigert, zum anderen die Apoptoserate gesenkt und damit die Regenerationsfähigkeit der Leberzellen deutlich verbessert werden (80,153). Neben der Leber profitieren andere Gewebstypen wie zum Beispiel Haut oder Herz von DPO. In diesen Bereichen und sogar bei Missbrauch (Doping) wird DPO nahezu ausschließlich als Co-Medikation verabreicht. Unerforscht ist bislang, wie DPO den Lebermetabolismus verändert und dadurch die Wirkung anderer Arzneimittel beeinflusst. In wie weit wirkt sich DPO auf die Zytochrom P450-Isoenzyme aus? Wirkt DPO als Enzyminduktor, Enzyminhibitor? Beeinflusst es wenig oder gar nicht die Biotransformation in der Leber?

Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit die Auswirkung von DPO alpha auf den Lebermetabolismus untersucht. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Enzymaktivität der Zytochrom P450-Enzymfamilien, gelegt.

Daraus lassen sich folgende Fragestellungen ableiten:

- 1. Welchen Einfluss hat DPO alpha auf die Phase I und Phase II Enzyme von primären humanen Hepatozyten aus Leberresektaten?**
- 2. Auf welcher zellulären Ebene beeinflusst DPO alpha die Enzymreaktionen?**
 - a. Beeinflusst DPO alpha die Enzymaktivität einzelner CYPs über einen definierten Zeitraum?**
 - b. Wie wirkt sich DPO alpha auf die Expression der verschiedenen CYPs auf mRNA-Ebene aus?**
 - c. Ändert DPO alpha die Expression der verschiedenen CYPs auf Proteinebene?**

3 Materialien

3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
3.1.1.1 3-(2-(N,N-Diethylamino)Ethyl)-7-Hydroxy-4-Methyl-Coumarin (AHMC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
3.1.1.2 3-(2-N, N-Diethyl-N-Methylaminoethyl)-7-Methoxy-4-Methylcoumarin (AMMC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
3.1.1.3 3-Cyano-7-Hydroxycoumarin (CHC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
3.1.1.4 4-Methylumbelliferon (4-MU)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
3.1.1.5 7-Benzyloxy-4(Trifluoromethyl) Coumarin (BFC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
7-Ethoxy-4(trifluoromethyl) Coumarin (EFC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
7-Ethoxycoumarin (7-EC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
3.1.1.6 7-Ethoxyresorufin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
3.1.1.7 7-Hydroxy-4(trifluoromethyl) Coumarin (HFC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
3.1.1.8 7-Hydroxycoumarin (HC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
3.1.1.9 7-Methoxy-4(trifluoromethyl)coumarin (MFC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Acrylamid-Bisacrylamid Lösung	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Agarose Gel, peqGold Universal Agarose	Peqlab, Erlangen (Deutschland)
Alamarblau	Biozol GmbH, Eching (Deutschland)

Materialien

Alufolie	TIM-KWK Folien Verkaufs GmbH, Gaierhofen (Deutschland)
Albumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Aquacare	neoLab Migge, München (Deutschland)
Aranesp [®] , (Darbepoetin alpha) 20µg	Amgen GmbH, München (Deutschland)
Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Bromphenol blau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Buchnertrichter	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Cellstrainer	Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG, Bremen (Deutschland)
Chloroform	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Chlorwasserstoff (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
D-(+)-Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Deckgläschen	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig (Deutschland)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Axon, Kaiserslautern (Deutschland)
destilliertes Wasser, doppelt (ddH ₂ O)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
Dibenzylfluorescein (DBF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Materialien

	(Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
DMEM Medium Glukose angereichert (4,5 d/l)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Doxycholicsäure (0,5 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
DPBS ohne Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Easycoll Separation Lösung	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
Einmalspritzen, 2-teilig, steril, 10 ml, 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
Eppendorfgfäße	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Essigsäure, purum > 99,0 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Ethanol 70 %, 99,8 %	Apotheke, MRI München (Deutschland)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Fetales Rinderserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Fluorescein (FL)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Formaldehyd	Apotheke, MRI München (Deutschland)
Gaze	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied (Deutschland)
Gewebekleber (Histoacryl)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
Glasflasche für Agarosegel	Schott AG, Mainz (Deutschland)

Materialien

Glaspipette, serologisch, steril 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	SPL Life Sciences, Gyeonggi-do (Südkoera)
Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Guanidinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Hepes	Applichem, Darmstadt (Deutschland)
humanes Insulin	Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz (Deutschland)
Hydrokortison	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin (Deutschland)
Isomylalkohol	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
3.1.1.10 Isopropanol	Materiallager, MRI München (Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Kanülen	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Kollagenase P	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen (Deutschland)
Konische Röhrchen, steril 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (Deutschland)
Kumarin (C)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Luminol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Methanol	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)

Materialien

MgCl ₂ -Lösung 25 µM	Axon, Kaiserslautern (Deutschland)
Milchpulver (wenig Fett)	J.M. Gabler Saliter GmbH & Co. KG, Obergrünburg (Deutschland)
Monochlorobenzen (MCB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
N, N, N', N'- TMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
N-Acetyl-L-Zystein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Nicht-essentielle Aminosäuren	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Nitrozellulosemembran	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Nonident P-40 (0,5 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Pasteurpipetten, Glas, Größe 230 mm, 150 mm	neoLab Migge, München (Deutschland)
p-Coumarinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
PCR 8er-Strips	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim (Deutschland) GmbH & Co KG, Wertheim
Penicillin/ Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Percoll-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Petrischale	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)

Materialien

Phenol	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Pipettenspitzen 0,1-10 µl, 2-200 µl, 50-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Ponceau S	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Probenecid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Proteinase K	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen (Deutschland)
Puc19 DNA-Größenmarker	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Reaktions-Puffer 10 x (Mg ²⁺ frei)	Axon, Kaiserslautern (Deutschland)
Resorufin (RES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
RNAse A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Rubber policeman	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Safe-Lock Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2.0 ml	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Salicylamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Skalpell	Materiallager, MRI München (Deutschland)
Steri-Drape 2 Inzisionsfolie 600 mmx450 mm	3M Deutschland GmbH, Neuss (Deutschland)
Sterilfilter	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Sulforhodamin B Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Tape	Materiallager, MRI München (Deutschland)
Taq DNA Polymerase	Axon, Kaiserslautern, (Deutschland)
TBE-Puffer 10X	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)

Materialien

Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen (Deutschland)
TRIFAST	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen (Deutschland)
TRIS (hydroxymethyl) aminomethan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Tris-EDTA Pufferlösung (TE-Puffer)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Trypanblau	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Trypsin	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Umbelliferon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) Lösung (30 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)
Whatman Papier	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Williams E Medium	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach (Deutschland)
Zellkulturflasche 175 cm ² und 75 cm ² mit Filterkappe	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich))
Zellkulturplatten mit je 6, 48 und 96 Vertiefungen, Flachboden mit Deckel	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Zellkulturschalen 10 cm	Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG, Bremen (Deutschland)

3.2 Geräte

Gerät	Hersteller
8-Kanal Pipette Research® (variabel)	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
1-Kanal Pipette Research® (variabel)	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Absaugpumpe: Vacusafe comfort	IBS Integra Biosciences, Fernwald (Deutschland)
Abzug	Köttermann GmbH & Co, KG, Uetze (Deutschland)
Autoklav: 2540 SL	Systec GmbH, Wettenberg (Deutschland)
Bio Photometer	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
ELISA-Reader: FluoStar OMEGA	BMG LabTech GmbH, Ortenberg (Deutschland)
Inkubator, Hera Cell 150	Haereus Holding GmbH, Hanau (Deutschland)
Intas Gel Jet Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen (Deutschland)
Kühl- und Gefrierschränke	
- 80 °C	Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf (Deutschland)
- 20 °C No Frost Premium	Liebherr-Holding GmbH, Biberach an der Riss (Deutschland)
+ 4 °C Profiline	Liebherr-Holding GmbH, Biberach an der Riss (Deutschland)
Luer-Zange	Materialwirtschaft Klinikum MRI, München (Deutschland)
Magnet Mixer: MR Hei-Mix L	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach (Deutschland)
Mastercycler Gradient S	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Mikroskop: mAxiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG, Oberkochen (Deutschland)
Mikroskop: Eclipse TS 100	Nikon, Tokio (Japan)
Mikrowelle	TechnoStar, Hannhofen (Deutschland)

Materialien

NanoDrop®	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold (Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen (Deutschland)
Peristaltikpumpe	Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe (Deutschland)
Ph-Meter: PB-11	Sartorius AG, Göttingen (Deutschland)
Pipetus®Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt (Deutschland)
PowerPac™ HC Power Supply	BioRad Laboratories GmbH, München (Deutschland)
Shaker	Labinco BV, Breda (Holland)
Sterilbank (Bench)	BDK (Luft- und Reinraumtechnik GmbH), Sonnebühl – Genkingen (Deutschland)
Thermostat	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Waage: EG 220-3 NM	Kern und Sohn GmbH, Balingen (Deutschland)
Wasserbad	MemmertGmbH Co Kg, Schwabach (Deutschland)
WB Zubehör:	
Gel Kammer: Wide Mini Sub Cell 6R	BioRad Laboratories GmbH, München (Deutschland)
Gießständer	BioRad Laboratories GmbH, München (Deutschland)
Glasplatten	BioRad Laboratories GmbH, München (Deutschland)
Zentrifuge: Centrifuge 5804R	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Zentrifuge: Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)

3.3 Software

Verwendete Software	Hersteller
EndNote X3.0.1	Japone/ Team LnDL, Thomas Reuters, San Francisco, USA
FloJo 7.5	Tree Star, Inc., Ashland, OR (USA)
Graph Pad Prism 5.01	GraphPad Software Inc., San Diego (USA)
ImageJ 1.42q	National Institute of Health (USA)
Intas Image Software	Imaging Instruments GmbH, Göttingen (Deutschland)
OMEGA Software für FLUOstar, V1.10	BMG Labtech, Offenburg (Deutschland)

4 Methoden

4.1 Kulturmedien

4.1.1 Verwendete Medien

Medium	Mediumzusätze	Konzentration
Kulturmedium (William's Medium E)	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 µg/ml
	Hydrokortison	0,8 µg/ml
	HEPES	15 mM
	Insulin	1 mM
	FCS	10 %
	L-Glutamin	1 %
	nicht essentielle Aminosäuren	
	Natriumpyruvat	1 mM
	<i>Setzt sich aus oben stehenden Substanzen zusammen und wird bei 4°C gelagert.</i>	
Hungermedium	William's Medium E	
	Glutamin	1 %
	HEPES	15 mM
	Penicillin	100 U
	Streptomycin	100 µM
	<i>Substanzen steril filtrieren und bei 4°C lagern</i>	
Stimulationsmedium	William's Medium E (Kulturmedium)	
	Darbepoetin alpha	2 µl

4.2 Hepatozytenisolation

Die Isolation der humanen Hepatozyten beruht dem Isolationsverfahren, beschrieben von Knobloch et al (74).

4.2.1 Verwendete Lösungen zur Hepatozytenisolation

Lösungen	Menge	Chemikalien	Konzentration
Perfusionslösung I (pH 7,4)	83 g	Natriumchlorid	142 mmol
	5 g	Kaliumchlorid	6,7 mmol
	24 g	Hepes	100 mmol
	0,408 g	N-Acetyl-L-Zystein	100 mmol
	0,475 g	EGTA	2,4 M
	<i>Lösung steril filtrieren und bei 4 °C lagern.</i>		
Stopp-Lösung	100 ml	FCS	20 %
	500 ml	DPBS	

(pH 7,4)	Lösung steril filtrieren und bei 4 °C lagern.		
Perfusions-Lösung II (pH 7,6)	5,85 g	Natriumchlorid	67 mmol
	0,75 g	Kaliumchlorid	6,7 mmol
	36,0 g	HEPESs	100 mmol
	7,5 g	Albumin	0,5 %
	1,05 g	Kalziumchlorid	4,8 mM
	Substanzen in dH ₂ O lösen und auf 1500 ml mit dH ₂ O auffüllen.		

4.2.2 Durchführung

Sämtliche Arbeitsschritte während der Isolation wurden unter sterilen Voraussetzungen durchgeführt. Alle Lösungen wurden steril bei 4 °C gelagert. Zur Vorbereitung wurde ein Wasserbad auf eine Temperatur von 39 °C erhitzt, da bei einer Temperatur zwischen 37-40 °C die Enzymaktivität der für die Hepatozyten-Isolation benötigte Kollagenase optimal ist. Ein chirurgisches Abdecktuch und ein Becherglas mit darin enthaltenem zerstoßenem Eis und einigen 50 ml Röhren wurden für die Hepatozytenisolation benötigt.

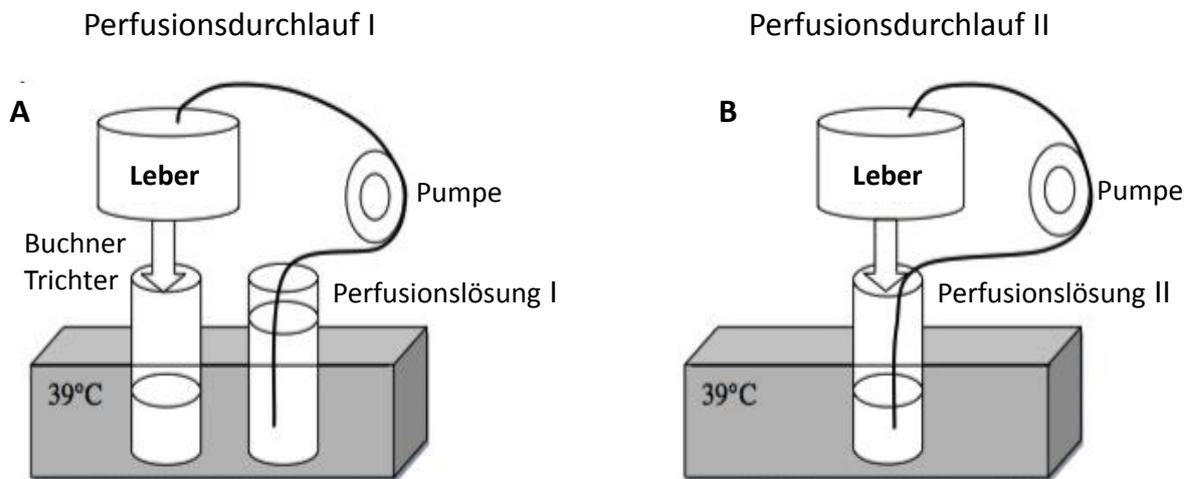


Abbildung 11: Perfusionsschritte für die Hepatozytenisolation

Bildabschnitt A zeigt den ersten Perfusionsdurchlauf. Die Perfusionslösung I entfernt verbliebenes Blut aus dem Leberresektat. Bildabschnitt B zeigt den zweiten Perfusionsdurchlauf, bei dem die Hepatozyten durch die der Perfusionslösung II zugefügten Kollagenase aus dem Lebergewebe herausgelöst werden.

Nachdem das Resektat der Leber in eine Petrischale gegeben wurde, konnten makroskopisch kleine Gefäße an dessen Resektionsenden ausfindig gemacht werden. Um den Gefäßaufbau des Präparats zu nutzen, wurde jeweils eine Kanüle an mindestens drei der größten Gefäße unter Zuhilfenahme eines Gewebeklebers eingeklebt. Die übrigen kleinen noch offenen

Methoden

Gefäße, welche sich an der Resektionsstelle befanden, wurden abgedichtet. Die Kanülen wurden nun mit einem Silikonschlauch, der an die Pumpe angeschlossen war, verbunden und die präparierte Leber in den Buchnertrichter platziert. Es begann der erste Perfusionsdurchlauf (*Abbildung 11 A*). Zur Optimierung der Lebergewebsperfusion wurden die Lebergefäße zunächst mit mindestens 500 ml der Perfusionslösung I durchspült. Das in der Lösung enthaltene EGTA verhinderte die Gerinnung von noch in den Gefäßen vorhandenem Blut und spülte es heraus. Dieser Arbeitsschritt wurde so lange wiederholt, bis das Blut komplett aus dem Gewebe ausgewaschen war (20 - 30 min.). Je besser die Perfusion innerhalb des Resektates war, umso mehr Lebergewebe konnte durch die Kollagenase angedaut werden.

Während dieses Waschvorgangs wurde der Perfusionslösung II (circa 100 ml) diejenige Menge an Kollagenase P hinzugefügt, die man benötigte, um das Gewebeskollagen aufzulösen. Die Menge hing von der Größe des Resektates ab.

Im zweiten Perfusionsdurchlauf wurde die Perfusions-Lösung und dessen Zirkulation geändert, sodass die Lösung nicht mehr über den Buchnertrichter in den Abfall gelangte, sondern erneut mit Hilfe der Pumpe im Lebergewebe rezirkulierte (*Abbildung 11 B*). Nach etwa 20 min., beziehungsweise wenn das Gewebe sich durch geringen Druck verformen ließ, konnte dieser Prozess beendet werden. Anschließend erfolgte die Perfusion mit 50 ml der Stopp-Lösung, um weiteren Verdau des Lebergewebes und der darin enthaltenen Hepatozyten zu verhindern.

Dann wurde das Leberstück in die Petrischale gelegt und erneut Stopp-Lösung hinzugefügt. Das Resektat wurde mittels Butterflyschnitt in zwei Hälften geschnitten und mit dem Skalpell und einer Pinzette zerkleinert, sodass die Hepatozyten besser isoliert werden konnten. Nun wurde erneut Stopp-Lösung hinzugefügt und der gesamte Inhalt der Petrischale über trichterförmige Mullkompressen in 50 ml Röhrchen gegeben. So war gewährleistet, dass vor allem Zellen und kaum Gewebstrümmer in die Röhrchen gelangten. Die Hepatozyten wurden mittels Zentrifugation für 5 min. bei 4 °C und 100 g von der Kollagenaselösung getrennt und einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zell-Pellet in William's Medium E (Kulturmedium) resuspendiert und bei 4 °C gelagert werden. Nun folgte die Berechnung der Gesamtzellzahl (wie unter Punkt 4.3 beschrieben) und die Beurteilung Viabilität der Hepatozyten.

Methoden

Berechnung der Viabilität (V_i):

$$V_i = Z \times 100/G$$

V_i : Viabilität in %

Z: Lebende Zellen

G: Gesamtzellzahl

Wenn die Viabilität der Gesamtzellzahl gering ausfiel, das heißt unter 75 %, erfolgte die Trennung von toten und lebenden Zellen durch eine Dichtegradientenzentrifugation.

Während der gesamten Zellisolation konnten Kulturplatten für die Kultivierung der isolierten Hepatozyten vorbereitet werden. Die Voraussetzung für die Adhäsion der Hepatozyten war zum einen der Zell-Zell-Kontakt und zum anderen eine geeignete Oberfläche. Die Zelldichte spielte für die kontinuierliche Verteilung und den Kontakt der Zellen untereinander eine große Rolle, daher wurden die Hepatozyten auf $0.1 - 0.2 \times 10^6$ Zellen pro cm^2 ausplattiert. Die Oberfläche der Kulturplatten wurde zuvor mit einer Proteinmatrix überzogen. Sie enthielt ausschließlich Kollagen Typ I, welches von Rattenschwänzen gewonnen wurde. Diese Beschichtung ermöglichte den Hepatozyten schnell Aktinfilamente auszubilden und so an der Platte anzuhaften.

4.3 Zellzahlbestimmung und anschließendes Ausplattieren

Die Zellzahlbestimmung dient der gleichmäßigen Verteilung einer bestimmten Anzahl von Zellen auf eine Well-Platte.

4.3.1 Durchführung

Zellsuspension und Trypan blau wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und ein Teil in die Neubauer Zählkammer zwischen Deckglas und Kammerboden pipettiert, sodass sich die Suspension gleichmäßig unter dem Deckglas verteilen konnte.

Methoden

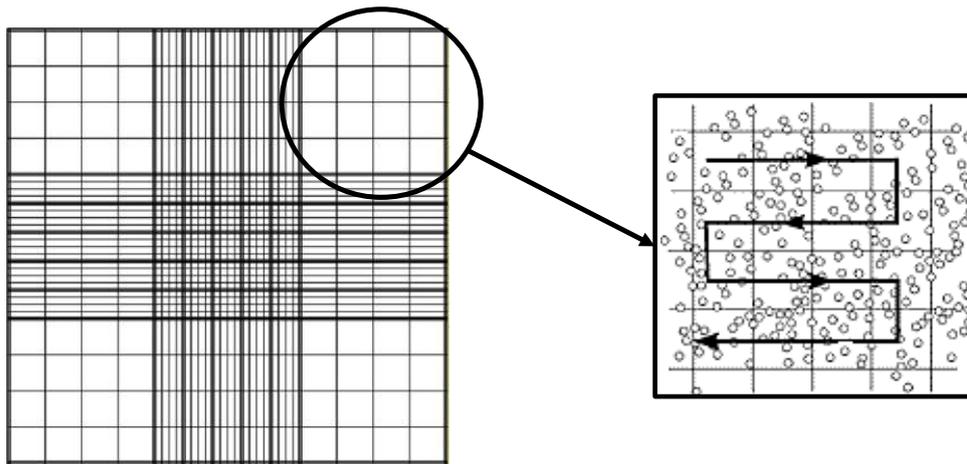


Abbildung 12: Neubauer Zählkammer (unterschiedliche Mikroskopansichten)

Links dargestellt ist die Sicht auf die vollständige Zählkammer. Das rechte Bild zeigt den Ausschnitt des rechten oberen Feldes der Zählkammer mit darin enthaltenen Zellen (kleine Kreise). Der Pfeil im rechten Bild schlägt eine Zählrichtung für die Zellzahlbestimmung vor.

In den jeweiligen Quadranten wurden nur die im Mikroskop hellblau erscheinenden, lebenden Zellen gezählt und von ihnen ein Mittelwert gebildet (Abbildung 12). Mit diesem Ergebnis ließ sich die Gesamtzellzahl (G) der Zellsuspension berechnen (124).

Berechnung der Gesamtzellzahl (G):

$$G = m \times V_f \times V \times F$$

G: Gesamtzellzahl

m: Mittelwert aller lebenden Zellen

V_f : Verdünnungsfaktor (hier: 10)

V: Volumen der Zellsuspension

F: Faktor der Zählkammer (10^4)

Für das Ausplattieren einer bestimmten Zellanzahl, wurde der Anteil an der Gesamtzellzahl (G) berechnet der 1 ml Zellsuspension enthielt. Anschließend wurde das gewünschte Volumen aus der Zellsuspension entnommen, mit Medium verdünnt und in eine Kulturplatte pipettiert.

4.4 Zytotoxizitätstest nach Stimulation mit Darbepoetin alpha

Dieser Versuch soll sicherstellen, dass die in der vorgelegten Arbeit ausgewählte Konzentration an DPO alpha nicht toxisch für die humanen Hepatozyten ist. Zur Bestimmung

Methoden

der Zytotoxizität wird der Fluoreszenzfarbstoff Alamarblau benutzt. Die Methode beruht auf dem Analyseverfahren von O'Brien et al. (106).

4.4.1 verwendete Lösungen für die Messung der Toxizität

Lösungen	Chemikalien	Konzentrationen
DPO alpha-Lösungen	DPO alpha	40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 und 0,3125 ng/ml
	<i>DPO alpha mit Hungermedium in den angegebenen Konzentrationen mischen.</i>	

4.4.2 Durchführung

Zunächst wurden humane Hepatozyten auf eine 96 Well Zellkulturplatte, wie unter Punkt 4.3 beschrieben, ausgesät; wobei die äußersten Wells der Platte frei blieben. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Hepatozyten mit DPO alpha-Lösungen (in absteigenden Konzentrationen) über den Zeitraum von 72 h stimuliert. Der Versuchsaufbau stellte sich wie folgt dar:

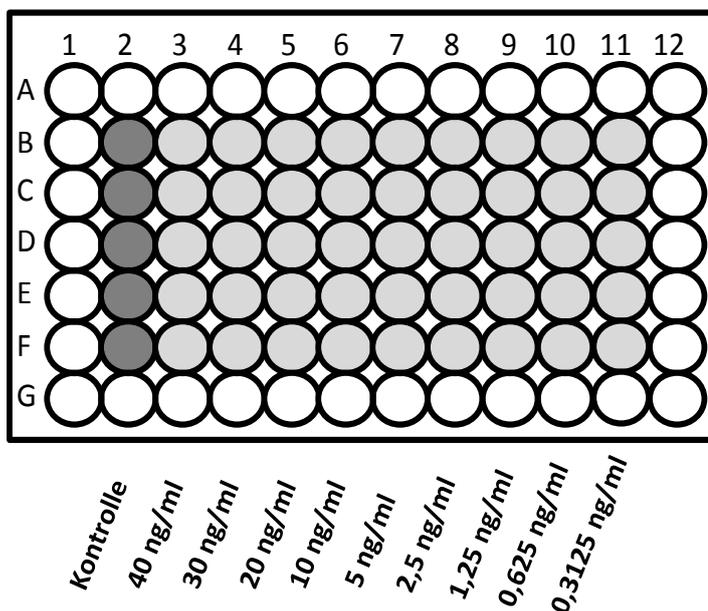


Abbildung 13: Versuchsaufbau des Toxizitätstests

Schematische Darstellung einer 96 WP. Die äußeren Wells (weiße Kreise) und die Kontrolle (dunkelgraue Kreise) enthielten Hungermedium. In den übrigen Wells (hellgraue Kreise) befanden sich DPO alpha-Lösungen in absteigender Konzentration.

Methoden

In die Wells am Rand der Platte wurde nur Medium pipettiert, zum Schutze der inneren Wells vor Verdunstung. Die übrigen Wells wurden mit je 100 μl absteigender Konzentrationen DPO alpha-Lösungen belegt. Als Kontrolle diente Hungermedium ohne Zusatz mit DPO alpha. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Lösungen entfernt und durch 10 μl Alamarblau Reagenz ersetzt. Dieses wurde von den Zellen allmählich metabolisch zu Resorufin umgesetzt und konnte so photometrisch erfasst werden. Die Fluoreszenz wurde nach 2 und 4 h bei 530/630 ex/em gemessen.

4.5 Stimulation humaner Hepatozyten mit DPO alpha

Für die Stimulation werden primäre humane Hepatozyten auf fünf 96 Well-Platten ausplattiert. Jede Platte steht für einen bestimmten Zeitpunkt in der Zeitkurve und wird zu diesem mit DPO (8 ng/ml) stimuliert. Der 0 h Zeitpunkt dient als Kontrolle, er bleibt während der gesamten Zeit unstimuliert (*Abbildung 14*).

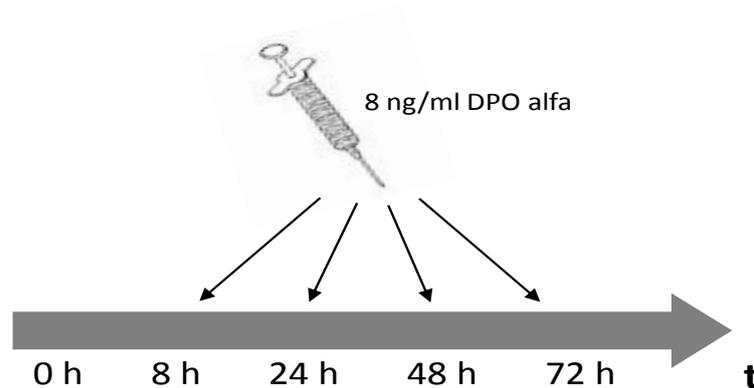


Abbildung 14: Stimulations-Schema

Zu den Zeitpunkten 8, 24, 48 und 72 h wurde je eine 96 Well-Platte mit 2 μl DPO alpha stimuliert, während die Kontrolle nicht stimuliert wurde.

4.5.1 Durchführung

Als erster Schritt wurden die humanen Hepatozyten, wie unter Punkt 4.3 beschrieben, ausplattiert und zur Adhäsion für 24 h in den Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂ gestellt. Nach Ablauf der 24 h wurde das Medium durch Hungermedium ersetzt. Hierbei durften die adhärenierten Zellen nicht vom Boden gelöst werden. Die Stimulation der einzelnen Platten erfolgte nach dem oben beschriebenen Schema. Die letzte Platte (0 h), welche über die drei Tage nicht stimuliert wurde, diente als Referenz.

Nach Ablauf der drei Tage konnten die Aktivitäten verschiedener Phase I und Phase II Enzyme mittels photometrischer Fluoreszenzmessung ermittelt werden.

4.6 Photometrische Messung der Phase I- und II-Enzymaktivität

Die Messung der Enzymaktivität von Phase I- und II-Enzymen beruht auf einem modifizierten Fluoreszenz-basierten Verfahren von Donato et al. (27).

4.6.1 verwendete Lösungen für die Messung der Enzymaktivität

Lösungen	Menge	Chemikalien	Konzentration
CYP-Puffer (pH 7,4)	0,178 g	Natriumhydrogenphosphat	1 mM
	8,006 g	Natriumchlorid	137 mM
	0,373 g	Kaliumchlorid	5 mM
	0,048 g	Magnesiumchlorid	0,5 mM
	0,222 g	Kalziumchlorid	2 mM
	1,802 g	D-(+)-Glucose	10 mM
	2,383 g	HEPES	10 mM
<i>Substanzen in einem Volumen von 900 ml dH₂O lösen und bis zu 1 l mit dH₂O auffüllen.</i>			
Salicylamid Stock- Lösung (Sal)	137,1 mg	Salicylamid	
	<i>Salicylamid in einem Volumen von 10 ml DMSO lösen und bei -20 °C lagern.</i>		
Probenecid Stock- Lösung (Pro)	570,8 µg	Probenecid	200 mM
	<i>Probenecid in einem Volumen von 10 ml DMSO lösen und bei -20 °C lagern.</i>		
Dicumarol Stock- Lösung (Dic)	33,6 mg	3,3'-Methylene-bis-(4-hydroxycoumarin)	10 mM
	<i>Dicumarol in einem Volumen von 10 ml DMSO lösen und bei -20 °C lagern.</i>		

4.6.2 Durchführung

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der einzelnen CYPs wurde jedem Enzym ein Substrat zugeordnet, welches durch Inkubation mit den Hepatozyten in ein Stoffwechselprodukt umgesetzt wurde (**Tabelle 4**). Über den Zeitraum von 100 min. konnte durch eine Zu-beziehungsweise Abnahme der Fluoreszenz auf die jeweilige Enzymaktivität rückgeschlossen werden.

Tabelle 4: Phase I/II Enzyme und deren Substrate

Phase I Enzymaktivität			Phase II Enzymaktivität		
Reaktionsenzym	Substrat	Substrat konz.	Metabolite (Phase I) Substrate (Phase II)	Substrat konz.	Anregung/ Emission
CYP1A1/2	7-ethoxykumarin	25 µM	7-hydroxykumarin	50 µM	355 nm / 460 nm
CYP2A6	Kumarin	50 µM			
CYP2D6	AMMC	10 µM	AHMC	5 µM	
			CHC	12,5 µM	
			Monochlorobimane	50 µM	
			4-methylumbelliferon	12,5 µM	
CYP2B6	EFC	30 µM	HFC	25 µM	
CYP2E1	MFC	5 µM			
CYP3A4	BFC	5 µM			
CYP2C8/9	DBF	12,5 µM	Fluoreszein	0,25 µM	
CYP1/2A1	7ER	7,5 µM	Resorufin	1 µM	544 nm / 590 nm

Zu jeder Stocklösung der Substrate wurde der CYP Puffer hinzugegeben. Zusätzlich wurden jedem Substrat der Phase I 15 µl Sal und 10 µl Pro hinzugefügt. DBF und 7ER wurden noch 1 µl Dic hinzugegeben. Diese Zusätze hinderten die Substrate an ihrem spontanen Zerfall. Als Negativkontrolle dienten zwei Wells für jedes zu untersuchende Enzym, die mit Methanol für 15 min. bei 37 °C fixiert wurden (Abbildung 15). Der Alkohol tötete die Zellen ab und sorgte dafür, dass kein enzymatischer Umsatz der Substrate mehr zustande kommen konnte.

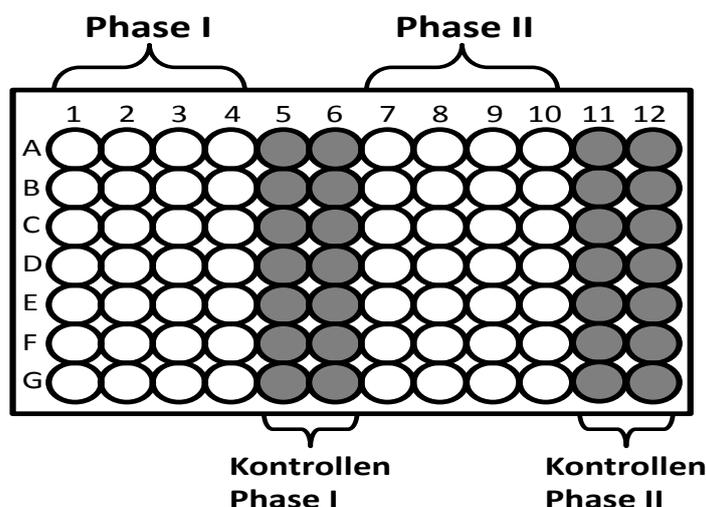


Abbildung 15: Schematische Darstellung einer 96 Well-Platte zur Untersuchung der Phase I- und Phase II Enzymaktivität

Dargestellt ist das Pipettierschema für die Bestimmung der Aktivität der Phase I und Phase II Enzyme. In die Wells A1-A6, B1-B6 und so weiter wurden jeweils die Substratlösung für eines der CYPs aus Phase I gegeben. Das gleiche Schema wurde bei der Bestimmung der Phase II Enzymaktivität für die Wells 7A-12A usw. angewendet. Als Negativkontrollen der einzelnen Phase I und Phase II Enzyme dienten die Wells 5, 6 A - G und 11, 12 A - G (graue Kreise).

Anschließend wurden alle Wells mit der dazugehörigen Substratlösung belegt und über den Zeitraum von 100 min. im Abstand von 10 min. photometrisch vermessen. Nach den Messungen wurden auch die übrigen Zellen mit Methanol fixiert. Die Gesamtmenge an Protein konnte mittels Sulforhodamin B Färbung erfasst und mit der umgesetzten Substratmenge verrechnet werden.

4.7 Sulforhodamin B Färbung (SRB)

Die SRB Färbung beruht auf der Methode von Voigt (137). Mit ihr kann die Proteinmenge und somit die Zellzahl einer Probe photometrisch bestimmt werden.

4.7.1 Verwendete Lösungen zur SRB Färbung

Lösungen	Menge	Chemikalien	Konzentration
SRB Lösung	0,2 g	Sulforhodamin B (SRB)	0,4 %
	50 ml	Essigsäure	1 %
	<i>Sulforhodamin B in Essigsäure lösen und im Dunkeln bei RT lagern.</i>		
Essigsäurelösung	500 µl	Essigsäure	1 %
	<i>Essigsäure mit 44,5 ml dH₂O vermischen.</i>		
TRIS Lösung (ungepuffert)	0,606 g	TRIS	10 mM
	<i>TRIS in 500 ml dH₂O lösen und bei RT lagern.</i>		

4.7.2 Durchführung

Zunächst wurde den humanen Hepatozyten das Nährmedium entnommen und durch Methanol ersetzt. Dieser Vorgang diente der Fixation der Zellen. Nach 15 min. konnte das Methanol entfernt und die Proben für 30 min. bei RT auf einem Schwenkinkubator mit der SRB Lösung inkubiert werden. In dieser Zeit bindet das SRB an Aminosäuren der Zelloberflächen. Nach Ablauf der Zeit wurde die Lösung wieder entfernt. Um das restliche, ungebundene SRB zu entfernen, wurden die Zellen vier Mal mit der Essigsäurelösung gewaschen. Durch anschließende Zugabe der TRIS Lösung (100 µl/Well) wurde der pH Wert angehoben. So konnte sich das gebundene SRB von den Zellen ablösen und photometrisch

bestimmt werden. Es wurde die Absorption bei 565 nm und 690 nm (Hintergrund) gemessen und voneinander subtrahiert. Die ermittelten Messwerte korrelierten mit dem Proteingehalt der Zellen und somit ließ sich auch die Zellzahl einer Probe bestimmen.

4.8 Isolation von Ribonukleinsäure (RNA) aus Hepatozyten

Die Isolation der RNA beruht auf der Methode von Chomczynski (16). Anschließend erfolgte die Bestimmung der Menge und Reinheit der RNA. Nachdem auch die Intaktheit der RNA überprüft wurde, konnte die RNA in cDNA umgeschrieben und für die PCR verwendet werden.

4.8.1 verwendete Lösungen für die RNA Isolation

Lösungen	Menge	Chemikalien	Konzentration
DEPC-H ₂ O	1 ml	Diethylpyrocarbonat	5
	<i>Diethylpyrocarbonat in 1000 ml dH₂O lösen. Die Lösung autoklavieren und bei RT lagern.</i>		
TBE Puffer 10 X (pH 8,3)	540 g	TRIS (hydroxymethyl)aminomethan	0,89 M
	275 g	Borsäure	0,89 M
	37,3 g	Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	20 mM
	<i>Substanzen in 5000 ml dH₂O auflösen und bei RT lagern.</i>		
Agarosegel (1,5%)	100 ml	TBE Puffer	1M
	1,5 g	peqGOLD Universal Agarose	1,5 %
	6 µl	Ethidiumbromid	
	<i>Die Agarose und den TBE-Puffer miteinander vermischen und für 2 min. bei 900 Watt in die Mikrowelle stellen, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hat. Nach Zugabe von 6 µl Ethidiumbromid pro 100 ml das Gel in eine vorbereitete Gelkammer, die zuvor mit einem gewünschten Gelkammerrechen versehen ist, gießen. Die Aushärtung dauert etwa 20 min.</i>		
PCR-Ladepuffer 5 X	1 mg	Bromphenol blau	7
	25 ml	TBE-Puffer	5-fach
	5 ml	Glycerol	10 %
	<i>TBE-Puffer, Glycerol sowie 20 ml H₂O miteinander vermischen und darin das Bromphenol blau lösen. Bei 4 °C lagern.</i>		

4.8.2 Durchführung

Für die RNA-Isolation aus humanen Hepatozyten wurde als erstes das Kulturmedium aus jedem Well einer kultivierten 6 Well-Platte aspiriert. Als nächstes wurde jedem Well 1 ml

TRIFAST hinzugegeben und durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt. Dieser Vorgang diente der Zellwandlyse. Um eine vollständige Lyse zu erreichen, wurde die Platte für ca. 15 min. auf Eis gestellt. Die Zellysate konnten mittels Zellschaber vollständig vom Boden abgelöst, in ein steriles 2 ml Eppendorfgefäß überführt und für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde die Zellsuspension für 15 s auf dem Vortexgerät gemischt. Danach folgte eine erneute 5-minütige Inkubationszeit unter RT. Bei einer Zentrifugalbeschleunigung von 14.000 g und einer Temperatur von 4 °C wurden die Zellysate für 10 min. zentrifugiert. Während dieser Zeit wurden in frische Eppendorfgefäße 500 µl Isopropanol gegeben. Durch die Zentrifugation teilten sich die Zellproben in drei Phasen auf. Eine klare obere Phase, die enthielt die gewünschte RNA, eine trüb-milchige Phase, welche die klare von der unteren rötlichen Phase trennte. In der rötlichen Phase befanden sich TRIFAST und Proteine. Durch vorsichtiges Pipettieren wurde die obere klare Phase in das mit Isopropanol gefüllte Eppendorfgefäß überführt, anschließend leicht gemischt und für 5 min. auf Eis gestellt. Die Kühlung erfolgte zum Schutze der RNA.

Die folgenden Arbeitsschritte dienten der Aufreinigung der RNA, welche zum jetzigen Zeitpunkt noch mit Proteinen und Trifast-Rückständen leicht verunreinigt war.

Das Eppendorfgefäß, welches nur noch die klare RNA-Lösung und das Isopropanol enthielt, wurde bei 14.000 g und 4 °C für 10 min. zentrifugiert. Hierdurch setzte sich die gallertige RNA am Boden des Eppendorfgefäßes ab, so dass der Isopropanolüberstand vorsichtig abgenommen werden konnte und ein RNA-Pellet zurück blieb. Dieses Pellet wurde im Anschluss daran drei Mal mit Ethanol gereinigt. Dazu wurde 1 ml Ethanol (70%) auf das Pellet pipettiert und für 10 min. bei 14.000 g und 4 °C erneut zentrifugiert. Nach dem Waschvorgang wurde das RNA-Pellet in 30 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Das Eppendorfgefäß musste nun noch für etwa 30 min. offen auf Eis gelagert werden, damit noch vorhandenes Ethanol verdampfen konnte. Die RNA Proben wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

4.9 Photometrische Bestimmung der RNA Konzentration und Reinheit

Konzentration und Reinheit der RNA konnten mit Hilfe der Photometrie bestimmt werden. Hierzu wurde der NanoDrop verwendet. Da die RNA-Proben in DEPC-H₂O gelöst waren wurde als erstes der Blindwert mit DEPC-H₂O vom Gerät ermittelt. Dieser Wert wurde später

bei den Messungen der Proben automatisch vom Gerät verrechnet. Nun wurden 2 µl Probe in das Photometer gegeben und die Extinktion bei 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt. Für die Quantifizierung der RNA war vor allem die Extinktion bei 260 nm von Bedeutung, da hier die Absorptionseinheit von 4 µg der einzelsträngigen RNA pro µl entsprach. Die RNA-Menge wurde durch folgende Formel berechnet:

Berechnung der Konzentration (C):

$$C = E_{260\text{nm}} \times V_f \times 4\mu\text{g}/\mu\text{l}$$

C: Konzentration

E: Extinktion

V_f: Verdünnungsfaktor (hier: 50)

Die RNA-Konzentration konnte direkt am Photometer abgelesen werden. Für die Reinheitsbestimmung waren zusätzlich die Ergebnisse der ermittelten Extinktionen bei 230 nm und 280 nm jeder Probe hilfreich. Es wurden die Quotienten $Ex_{260\text{ nm}}/Ex_{280\text{ nm}}$ und $Ex_{260\text{ nm}}/Ex_{230\text{ nm}}$ gebildet. Anhand des ersten konnten Rückschlüsse auf Verunreinigung mit Proteinen gezogen werden. Der zweite gab Hinweise auf Verunreinigung mit Phenolen. Bei Werten zwischen 1,5 und 2,0 konnten die Proben als annähernd rein betrachtet werden und wurden anschließend auf ihre Intaktheit geprüft.

4.9.1 Überprüfung der RNA Qualität

0,5 µg RNA je Probe wurden mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt und mit 3 µl PCR-Ladepuffer vermischt. Alle Proben plus einmal ein DNA-Größenmarker wurden anschließend in die Taschen des Agarosegels, welches sich in der Gelkammer befand, übertragen. Im Anschluss wurde die Gelkammer bei einer Gleichspannung von 90 V für 40 min. angeschlossen. Durch die angelegte Spannung konnten die Proben vom Negativ- zum Positivpol „laufen“. Hierbei interkalierte das Ethidiumbromid in die Nukleinsäuren der RNA, sodass sie unter UV-Licht sichtbar wurde. Wenn zwei deutlich abgrenzbare Banden (18S- und 28S-Banden) wie in *Abbildung 16* gezeigt, zu erkennen waren, galt die RNA-Probe als intakt.

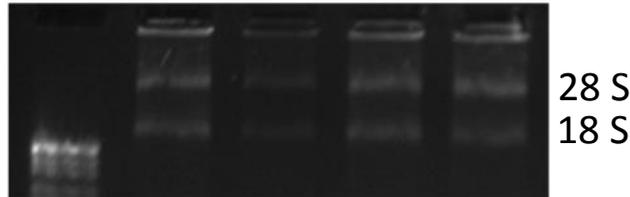


Abbildung 16: Beispiel für intakte RNA

Links zu sehen ist eine helle Bande, der Größenmarker. Die weiteren Banden stellen intakte RNA aus vier verschiedenen Proben dar, zu erkennen an jeweils zwei scharfbegrenzten 18S- und 28S Banden.

4.9.2 Herstellung komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA), als Voraussetzung für die reverse Transkriptase

Die angewandte Methode beruht auf dem Verfahren nach Wiame et al. (148). Für die Herstellung von cDNA aus RNA wurde das Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit benutzt (Tabelle 5).

Tabelle 5: High Fidelity cDNA Synthesis Kit

Caps	Chemikalien	Konzentration	RNA-Mastermix
I	Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase		1,1 µl
II	Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer	5-fach	4 µl
III	Protector RNase Inhibitor	40 U/l	0,5 µl
IV	Desoxynucleotide Mix	10 mM	2 µl
V	Anchored-oligo(dT)18Primer	50 pmol/µl	
VI	Dithiothreitol (DTT)		1 µl
VII	Eppendorfgefäße 0,5 ml PCR clear		

4.9.3 Durchführung

Zunächst musste errechnet werden, welches Volumen (x in µl) nötig war, um 2 µg RNA einer RNA-Probe zu erhalten. Überstieg x ein Volumen von 10,4 µl, so wurden x=10,4 µl verwendet. Zunächst erfolgte das Ansetzen des Proben-Primer-Mix:

- 1 µl der High Fidelity Reverse Transcriptase
- x µl RNA-Probe
- (10,4-x) µl DEPC-H₂O

Der Mix aus Primer und Proben wurde im Thermocycler für 10 min. bei 65 °C denaturiert und anschließend auf 4 °C abgekühlt.

Währenddessen konnte der Mastermix für die cDNA-Synthese angesetzt werden (Zusammensetzung siehe *Tabelle 5*). 8,6 µl des Mastermix wurden dem abgekühlten Eppendorfggefäß mit dem Proben-Primer-Mix hinzugefügt, sodass das Gesamtvolumen nun 20 µl betrug. Im direkten Anschluss wurde mit der Inkubation begonnen. Sie erfolgte für 30 min. bei 45 °C im Thermocycler. Durch Erhitzen der Probe auf 85 °C für 5 min. wurde die High Fidelity Reverse Transcriptase inaktiviert. Während die Proben anschließend wieder auf 4 °C abgekühlt wurden, kam es zur Reaktion. So konnte aus der einstigen RNA einer Probe die gewünschte cDNA gewonnen werden. Zuletzt wurde die synthetisierte cDNA mit DEPC-H₂O 10-fach verdünnt und konnte im Folgenden für die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion verwendet werden. Die Intaktheit und die relative Quantität der cDNA wurden mittels PCR unter Verwendung des Primers für Glycerinaldehyd-5-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ermittelt.

4.9.4 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die PCR ist eine enzymatisch katalysierte Methode zur Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen. Diese DNA-Replikation läuft *in vitro* ab und dient sowohl dem Nachweis, als auch der Vervielfältigung kleinster DNA-Mengen. Durch Erhitzen der DNA-Matrize auf 95 °C denaturieren die DNA-Fragmente und es entstehen Einzelstränge. Nun erfolgt die Anlagerung (Annealing) des Primerpaares (sequenzspezifische Oligonukleotide) an die jeweils komplementäre DNA-Sequenz. Die dafür benötigte Temperatur ist abhängig vom verwendeten Primerpaar. Anschließend erfolgt die DNA-Synthese. Bei einer Temperatur von 70-72 °C werden durch eine thermostabile Taq-DNA-Polimerase die Primerenden mit Hilfe verschiedener Oligonukleotide verlängert (Elongation). Durch das Wiederholen dieses Zyklus in einem Thermocycler ist es möglich, die gewünschte DNA-Sequenz beliebig zu replizieren. Die verwendeten Primer sind in der *Tabelle 6* aufgeführt.

Table 6: Used Primers

Listed are all primers used during the DNA analysis. The primers were created using www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/ and ordered from MWG Operon. The specificity of the primers was verified by a genome-wide blast.

Gen	Sequenz 5' nach 3'		Annealing Temperatur [°C]	Amplifikations-Größe [bp]	Accession Nummer	Template [ng]
	Sense Primer	antiSense Primer				
CYP1A1	TTC GTC CCC TTC ACC ATC	CTG AAT TCC ACC CGT TGC	55	302	000499	30
CYP1A2	TCG ACC CTT ACA ATC AGG TGG	GCA GGT AGC GAA GGA TGG G	60	254	000761	30
CYP2C9	CTG GAT GAA GGT GGC AAT TT	AGA TGG ATA ATG CCC CAG AG	59	308	000771	30
CYP2E1	GAC TGT GGC CGA CCT GTT	AC ACG ACT GTG CCC TGG G	59	297	000773	30
CYP3A4	ATT CAG CAA CAA GAA CAA GGA CA	TGG TGT TCT CAG GCA CAG AT	64	314	017460	30
GAPDH	GTC AGT GGT GGA CCT GAC CT	AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG	56	112	002046.3	30

4.9.5 Durchführung

Von der zu untersuchenden cDNA-Probe wurde ein Volumen x zwischen 2 und 10 µl in ein Eppendorfgefäß überführt. Als Negativkontrolle diente DEPC-H₂O, von welchem die gleiche Menge ebenfalls in ein Eppendorfgefäß pipettiert wurde. Die Herstellung des PCR - Master-Mix war der nächste Schritt.

Für jede Probe wurden (20-x) µl Mastermix benötigt, welcher sich wie folgt zusammensetzte:

- 1 µl antiSense Primer
- 1 µl Sense Primer
- (20-(6,6+x)) µl DEPC-H₂O
- 0,5 µl dNTP-Mix
- 2 µl Mg²⁺
- 2 µl Reaktionspuffer (Mg²⁺-frei)
- 0,1 µl Taq-Polymerase

Nun wurde der PCR - Mastermix zu jeder Probe und zur Negativkontrolle hinzugefügt, leicht durch Vortexen vermischt und anschließend in den Thermocycler gestellt. Folgendes Programm wurde angewendet:

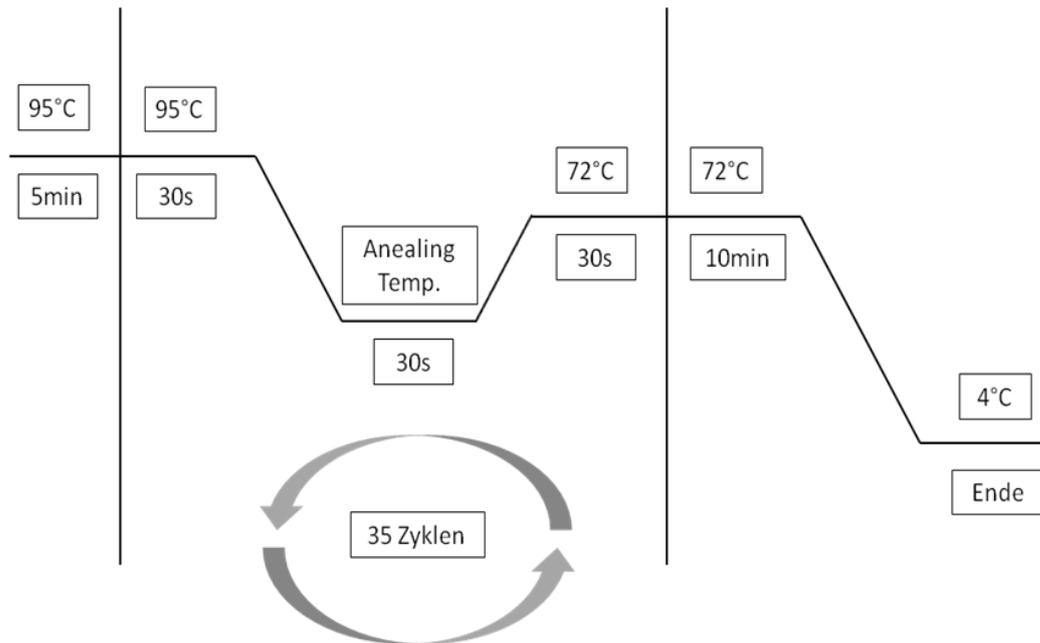


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Thermocycler-Einstellung für die RT-PCR

Abgebildet ist die Einstellung eines Thermocyclers, die standardmäßig zur Durchführung einer PCR verwendet wurde. Hierbei war zu beachten, dass für jeden Primer eine spezifische Annealing-Temperatur zu wählen ist.

Nach diesem Vorgang wurden jeweils 7 µl PCR-Ladepuffer zur Probe und Negativkontrolle gegeben, mit dem Vortexer vermischt und für kurze Zeit zentrifugiert. Anschließend wurden 10 µl einer Probe in je eine Geltasche des Agarosegels überführt und unter Anlegen einer Spannung von 90 V für 40 min. trennten sich die DNA-Fragmente der Ladung nach auf. Zuletzt konnte das Gel unter UV-Belichtung fotografiert werden. Es folgte die densitometrische Analyse der einzelnen Gele wie unter Punkt 4.11 beschrieben.

4.10 Western Blot

Der Western Blot (WB) ist ein Verfahren, gezielt bestimmte Proteine aus einem Proteingemisch zu isolieren und so nachzuweisen. Zunächst wird das Proteingemisch auf ein Elektrophorese-Gel aufgetragen, um anschließend die Proteine ihrer molekularen Größe und/ oder Ladung entsprechend elektrophoretisch in Banden auftrennen zu können. Nun werden die Proteine vom Elektrophorese-Gel auf eine geeignete Trägermembran (aus Nitrocellulose oder Nylon) übertragen. Dieser Vorgang ist das eigentliche Blotting. Bei dem Prozess binden die aufgetrennten Proteine an die Trägermembran und können mittels

unterschiedlicher Liganden sowohl selbst identifiziert, als auch hinsichtlich ihrer Qualität und Quantität verifiziert werden.

4.10.1 verwendete Lösungen für das Blotting

Lösungen	Menge	Agens	Konzentration
Tris Puffer (pH 8.8)	181,7 g	TRIS (hydroxymethyl)aminomethan	1,5 M
	<i>TRIS auf 1 l mit dH₂O auffüllen.</i>		
Lämmli Ladepuffer 5X	6 ml	TRIS (hydroxymethyl)aminomethan	300 mM
	10 ml	Glycerol	50 %
	200 µl	Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	20 mM
	2 g	SDS	10 %
	10 mg	Bromphenol blau	0,05 %
	2,5 ml	β-mercaptoethanol	12,5 %
	<i>Substanzen in 20 ml dH₂O lösen und in 1-2 ml Aliquots aufbewahren.</i>		
Lämmli Laufpuffer 10X (pH 8,3)	144 g	Glycin	2 M
	33,34 g	TRIS (hydroxymethyl)aminomethan	250 mM
	10 g	SDS	1 %
	<i>Substanzen in 1 l dH₂O lösen.</i>		
Lämmli Laufpuffer 1X	100 ml	Lämmli Laufpuffer 10X	
	<i>Lämmli Laufpuffer in 900 ml dH₂O auflösen.</i>		
TRIS (pH 6,8)	60,6 g	TRIS (hydroxymethyl)aminomethan	0,4 M
	<i>TRIS auf 1 l mit dH₂O auffüllen.</i>		
APS-Lösung	2 g	Ammonium Persulfat	10 %
	<i>Ammonium Persulfat in 20 ml dH₂O auflösen.</i>		
SDS-Lösung	2 g	SDS	10 %
	<i>SDS in 20 ml dH₂O auflösen.</i>		
Transferpuffer Stock-Lösung 10X	58 g	TRIS (hydroxymethyl)aminomethan	0,5 M
	29 g	Glyzin	0,4 M
	3,75 g	SDS	0,5 %
	<i>Substanzen in 1000 ml dH₂O auflösen.</i>		
Transfer-Puffer Arbeitslösung	100 ml	Transferpuffer Stock-Lösung (10X)	
	200 ml	Methanol	20 %
	<i>Transferpuffer und Methanol in dH₂O geben und vermischen.</i>		
Ponceau S Lösung	0,2 mg	Ponceau S	0,1 %
	200 ml	Essigsäure	1 %
	<i>Ponceau S in 200 ml 1% Essigsäure auflösen.</i>		
TRIS gepufferte Salzlösung (TBS)	12,1 g	TRIS (hydroxymethyl)aminomethan	100 mM
	87,66 g	Natriumchlorid	1,5 M

10X (pH 7,6)	<i>TRIS und NaCl in 1 l dH₂O lösen.</i>		
Tween-20 Lösung	100 ml	Tween-20	10 %
	<i>Tween-20 mit 900 ml dH₂O vermischen.</i>		
TBS-T Wasch-Puffer	100 ml	TRIS gepufferte Salzlösung (TBS) 10 X	
	10 ml	Tween-20 Lösung	
	<i>TBS und Tween-20 mit 900 ml dH₂O vermischen.</i>		
TRIS (PH 8,5)	12.1 g	TRIS (hydroxymethyl)aminomethan	100 mM
	<i>TRIS auf 1 l mit dH₂O auffüllen.</i>		
Luminol Lösung	0,88 g	Luminol	250 mM
	20 ml	DMSO	
	<i>DMSO und Luminol vermischen.</i>		
p-Coumarinsäure Stock-Lösung	0.15 g	p-Coumarinsäure	90 mM
	10 ml	DMSO	
	<i>DMSO und p-Coumarinsäure vermischen.</i>		
Natronlauge	200 ml	NaOH	200 mM
	<i>NaOH auf 1 l mit 800 ml dH₂O auffüllen und gut vermischen.</i>		
ECL Lösung A	2,5 ml	TRIS (pH 8,5)	100 mM
	25 µl	Luminol Lösung	250 mM
	1 µl	p-Coumarinsäure Stocklösung	90 mM
ECL Lösung B	2,5 ml	TRIS (PH 8,5)	100 mM
	2 µl	H ₂ O ₂	30 %
	<i>ECL Lösung A und B erst unmittelbar vor Gebrauch zusammengeben.</i>		

4.10.2 Durchführung

Um die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben zu bestimmen, ging dem Blotting-Verfahren die Proteinmessung nach Lowry (89) voraus. Nach Testläufen mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen und Gelkonzentrationen wurden 50 µg/Spur und einer Gelkonzentration von 10 % verwendet. Zunächst wurden 1,5 mm dicke Gele mit 15 Taschen pro Gel für die Proteinproben gegossen (*Abbildung 18*).

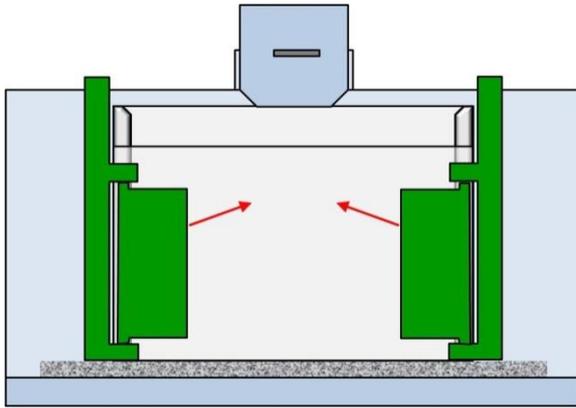


Abbildung 18: Schematische Darstellung einer Gelkammer

Dargestellt ist eine Gelkammer, in die zwei Glasplatten eingespannt sind. Zwischen den Platten wird das flüssige Gel hineingegossen und härtet anschließend mindestens 2 h aus.

Bevor die einzelnen Proben in die Gel-Kammern gegeben werden konnten, wurden jeder Probe 5 μl Lämmli Lade-Puffer (5x) hinzugefügt. Um ein Totalvolumen von 20 μl zu erhalten, wurde das restliche Volumen mit dH_2O aufgefüllt. Nach kurzem Mischen wurden die Proben für 10 min. auf 99 °C erhitzt, sodass die Proteine denaturierten. Anschließend konnten die Proteinproben nach kurzer Zentrifugation auf die Geltaschen verteilt werden. Als Referenzgröße wurde der Roti Marker Plus verwendet. Die Negativkontrolle stellte sich aus Lämmli Lade-Puffer (5x) und dH_2O zusammen. Die Proteine wurden bei 200 V mit Hilfe der Gel-Elektrophorese aufgetrennt (Abbildung 19).

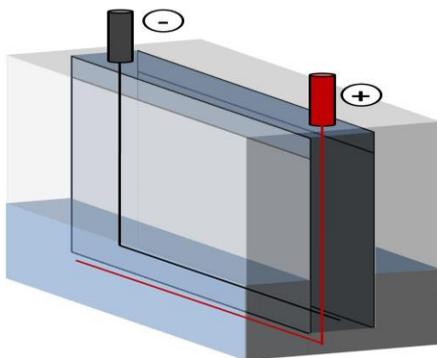


Abbildung 19: Schematische Darstellung einer Gelelektrophorese

Durch Anlegen eines Stromfeldes trennen sich die Proteine der jeweiligen Proben ihrer Größe und Ladung nach auf.

Nach der Auftrennung wurde das Gel auf zwei mit Lade-Puffer getränkte Whatman Papiere gelegt und anschließend mit einer Nitrozellulose-Membran und zwei weiteren Whatman Papieren, welche ebenfalls mit Lade-Puffer getränkt wurden, abgedeckt (*Abbildung 20*). Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran erfolgte bei einer Spannung von 250 mA über 30 min. mittels Semi-Dry-Blot.

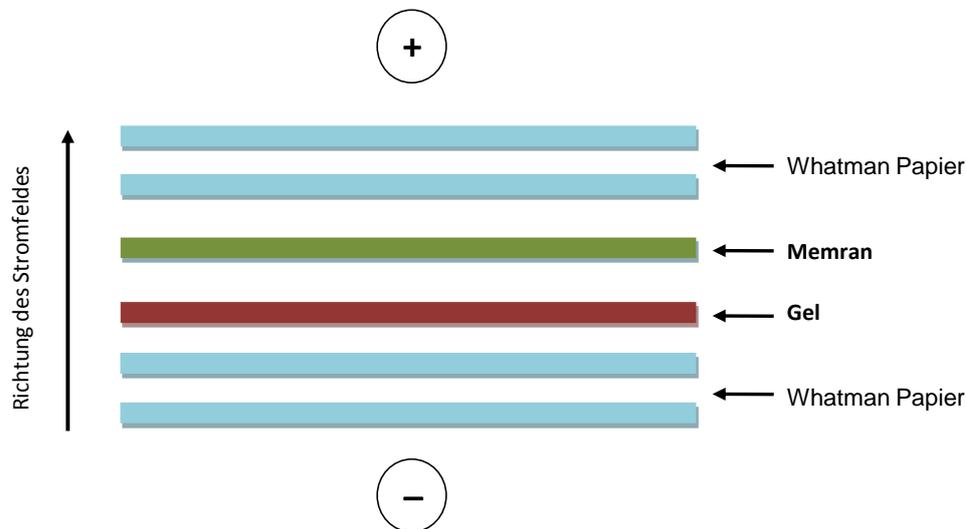


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Blotting-Verfahrens

Dargestellt ist der eigentliche Blotting-Vorgang. Hier findet unter Anlegen eines Stromfeldes der Transfer der Proteine von dem Elektrophorese-Gel auf die Nitrozellulose-Membran statt.

Um den erfolgten Transfer zu überprüfen, wurde die Membran mit Ponceau S angefärbt, sodass die Proteinbanden und der Marker sichtbar wurden. Im Anschluss wurden die Membranen mit H₂O gewaschen. Nun konnten die Proteine mit 5 % fettfreiem Milchpulver auf der Membran für eine Stunde geblockt und über Nacht mit dem jeweiligen Antikörper (*Tabelle 7*) inkubiert werden.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Membran gründlich mit TBS-T gewaschen und mit einem Zweitantikörper (*Tabelle 8*) erneut für ein bis zwei Stunden inkubiert. Der Waschvorgang wurde wiederholt und anschließend konnte mit dem Entwickeln der Membran begonnen werden.

Tabelle 7: Verwendete Erstantikörper

Antikörper	Isotyp	Verdünnung	Größe [kD]	Firma
CYP1A1/2	Kaninchen IgG1	1:1000	58	Millipore, Billerica, USA
CYP2A6	Kaninchen IgG1	1:1000	57	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
CYP2B6	Kaninchen IgG1	1:1000	57	Millipore, Billerica, USA
CYP2C8/9	Kaninchen IgG1	1:1000	56	Millipore, Billerica, USA
CYP2E1	Kaninchen IgG1	1:1000	57	Merck, Darmstadt, Deutschland
CYP3A4	Maus IgG1	1:1000	50	Santa Cruz, California, U.S.A
GAPDH	Kaninchen IgG1	1:5000	37	Santa Cruz, California, U.S.A

Tabelle 8: Verwendete Zweitantikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma
Ziege anti-Hase IgG1:HRP	1:10000	Santa Cruz, California, U.S.A
Ziege anti-Maus IgG1:HRP	1:10000	Santa Cruz, California, U.S.A

Dafür wurden die beiden ECL-Lösungen A und B unmittelbar vor diesem Schritt zusammengegeben und die Membran für circa 1 min. darin eingelegt. Nun wurde die Membran auf eine transparente Folie gelegt.

Nachdem jeweils ein Röntgenfilm über die beiden Membranen gelegt wurde, konnte mit der Belichtung des Filmes begonnen werden. Die Belichtungszeiten richteten sich nach der Signalstärke der Antikörper. Im direkten Anschluss wurde der Film für 1 min. in eine Entwicklungs- und Fixierlösung getaucht, die danach mit Leitungswasser wieder abgewaschen wurde.

4.11 Densitometrische Analyse der Signale von PCR und WB

Zur densitometrischen Analyse der PCR und WB Signale wurde die Software ImageJ verwendet. Die gemessenen Werte wurden anschließend auf die densitometrischen Werte des korrespondierenden GAPDH-Signals der untersuchten Probe normiert.

4.12 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde GraphPad Prism verwendet. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Waren drei oder mehr Testbedingungen gegeben erfolgte die statistische Auswertung durch einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von Bonferronis multiplen Vergleichstest. Als statistisch ausreichendes Signifikanzniveau wurde für * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ festgelegt.

5 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der untersuchten Phase I und Phase II Enzyme über die Zeit von 72 h dargestellt. Die in der vorgelegten Arbeit untersuchten Enzyme machen den größten Teil am Medikamentenmetabolismus aus. Sie wurden in Bezug auf Gen-, Proteinexpression und Enzymaktivität untersucht. Der 0 h Wert stellte bei allen Versuchen den Kontrollwert dar.

5.1 Keine Toxizität nach Stimulation mit DPO alpha

Mit Hilfe des Toxizitätstests sollte sichergestellt werden, dass die in den durchgeführten Versuchen verwendete Konzentration an DPO alpha nicht toxisch für humane Hepatozyten war. Nach der Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen des DPO alpha konnte durch die gemessene Fluoreszenzaktivität der Zellen auf deren Viabilität rückgeschlossen werden (Abbildung 21).

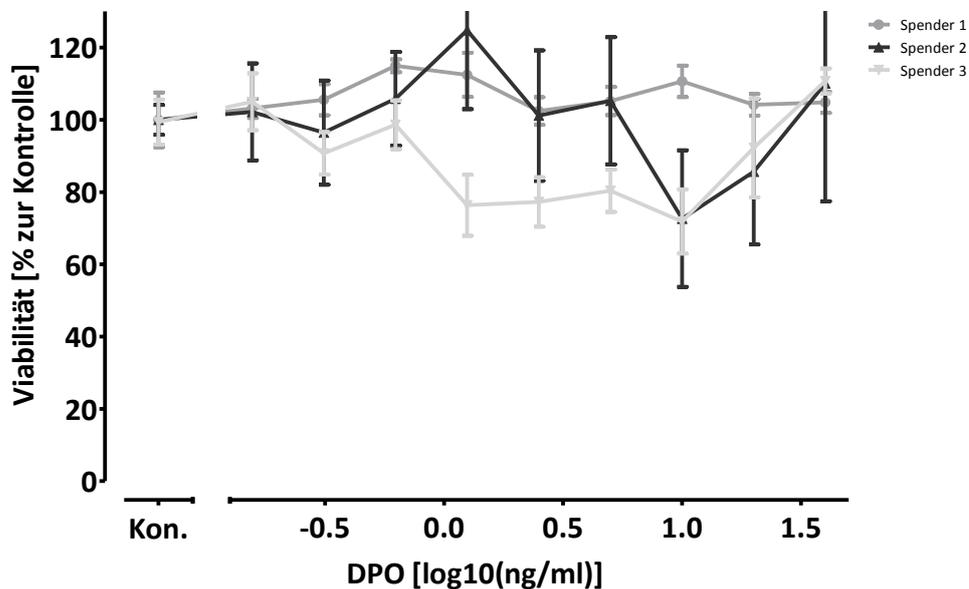


Abbildung 21: Viabilität humaner Hepatozyten unter Stimulation mit DPO alpha aufsteigender Konzentration

Dargestellt sind Viabilitätsmessungen von humanen Hepatozyten unterschiedlicher Spender (Grauabstufungen) nach Stimulation mit aufsteigenden Konzentrationen von DPO alpha (n= 3, N=3).

Ergebnisse

Die humanen Hepatozyten zeigten kaum Einbußen in der Viabilität nach Stimulation mit DPO alpha. Weder in geringeren, noch in höheren Konzentrationen wirkte sich die Stimulation auf die Zellpopulationen toxisch aus.

5.2 DPO alpha beeinflusst die Genexpression wichtiger CYPs über die Zeit von 72 Stunden auf RNA Ebene

Mittels PCR wurden verschiedene Marker über den Zeitraum von 72 h in den Hepatozyten untersucht. Zur Normierung wurden alle PCR-Proben auf das Housekeeping-Gen GAPDH untersucht (Abbildung 22).

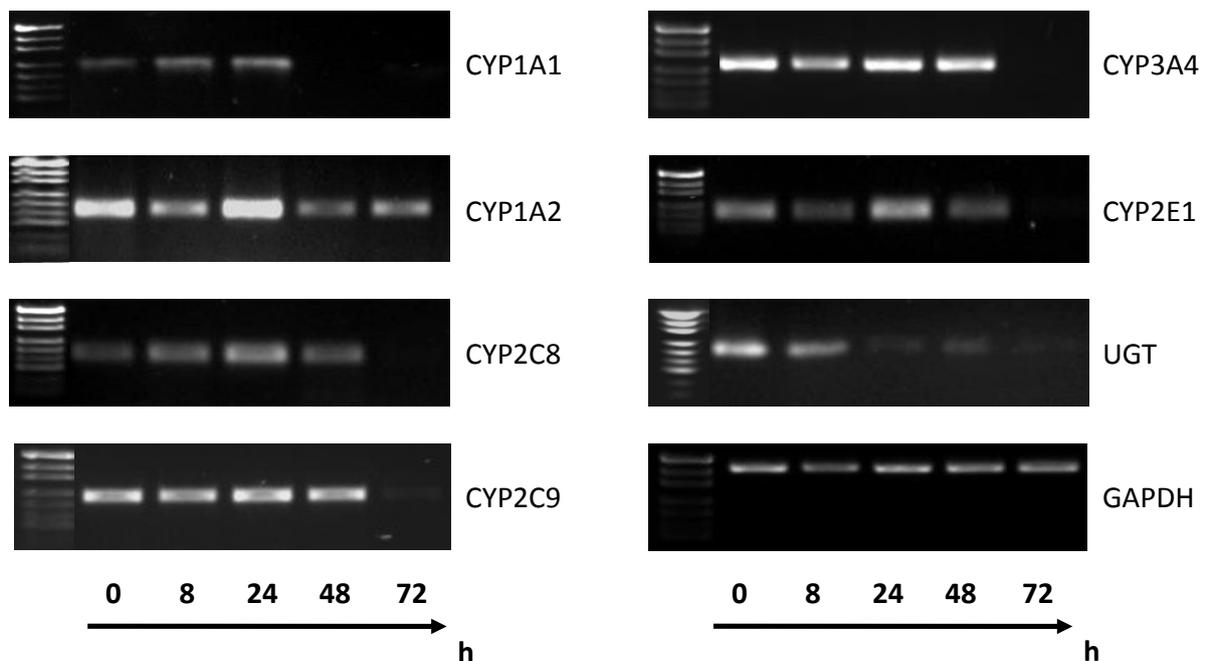


Abbildung 22: Einfluss von DPO alpha auf die Expression wichtiger Gene für die Enzymaktivität über 72 h

Dargestellt ist die Expression verschiedener CYPs nach Stimulation mit DPO alpha über den Zeitraum von 72 h. Repräsentative Bilder aus 3 unabhängigen Versuchen.

Die Expressionen aller CYPs waren zu jedem Zeitpunkt detektierbar. Jedoch zeigten CYP1A1 und UGT bei den Zeitpunkten 24, 48, und 72 h schwächere Signalstärken im Vergleich zu den 0 h und 8 h Zeitpunkten. Eine schwache Expression zum 72 h Zeitpunkt war bei CYP2C8/9, CYP3A4 und CYP2E1 detektierbar.

Ergebnisse

Die densitometrische Auswertung der PCR gab den Verlauf der Expression wie folgt wieder (Abbildung 23):

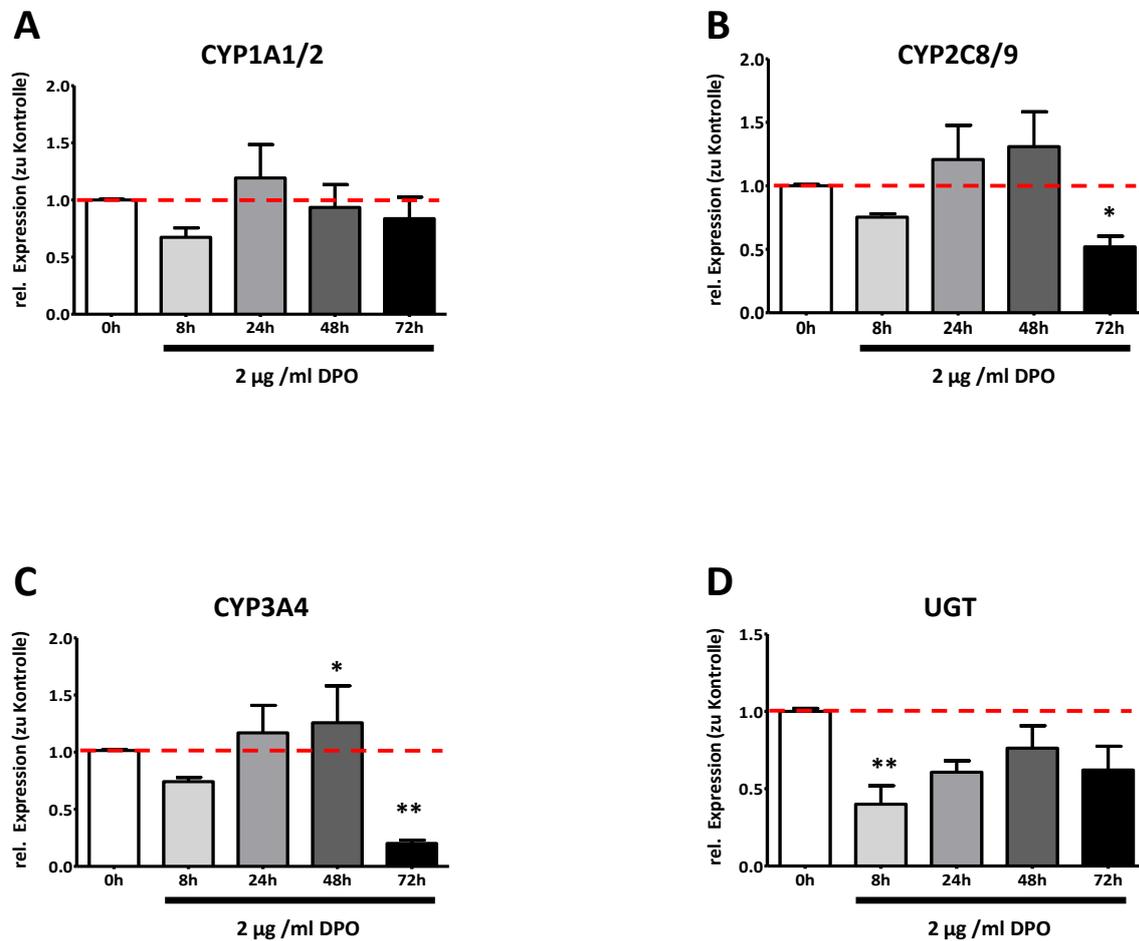


Abbildung 23: densitometrische Auswertung der PCR Bilder

Dargestellt sind densitometrische Auswertungen von CYP1A1 (A), CYP2C9 (B), CYP3A4 (C) und UGT (D) nach 0, 8, 24, 48, 72 h Stimulation mit 2 µl DPO alpha. Die rote Linie stellt die Genexpression der Kontrollzellen dar (---). * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle ($N=3$, $n=3$).

Im Vergleich zum Kontrollwert kam es bei allen ausgewerteten CYPs nach der mit DPO alpha durchgeführten Stimulation zunächst zu einer Abnahme der Expression nach 8 h (Abbildung 23 A, B, C, D). CYP1A1/2 wies nach 24 h Stimulation seinen höchsten Level hinsichtlich der Expression auf. Dieser sank aber kontinuierlich bis zum Untersuchungsendpunkt nach 72 h. Im Gegensatz dazu stieg bei CYP2C8/9 und CYP3A4 die Expression nach dem 8 h bis zum 48-Stundenwert. Dann nahm sie aber signifikant ab, sodass CYP2C8/9 fast nur noch die Hälfte

Ergebnisse

und CYP3A4 sogar nur noch ein Viertel der Expression im Vergleich zu ihren Kontrollen zeigten (Abbildung 23 B und C). UGT zeigte einen ähnlichen Verlauf hinsichtlich des Expressionslevels, jedoch nahm die Expression nach 72 h Stimulation nicht so stark ab, wie im Vergleich zu CYP2C8/9 und CYP3A4 (Abbildung 23 D).

5.3 DPO alpha beeinflusst die Proteinexpression wichtiger CYPs über 72 Stunden

Mittels WB wurden verschiedene CYP-Proteine über 72 h in den Hepatozyten untersucht. Alle WB Signale wurden auf GAPDH normiert (Abbildung 24).

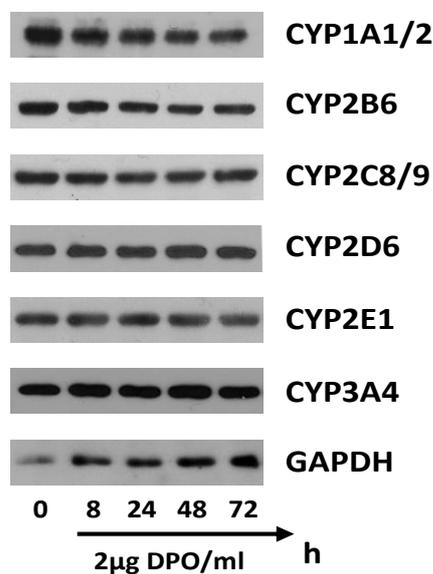


Abbildung 24: WB von wichtigen CYP450 Proteinen nach Stimulation von DPO alpha über 72 h
Dargestellt ist die Expression ausgewählter CYP-Proteine humaner Hepatozyten. Sie wurde nach Stimulation mit DPO alpha über den Zeitraum von 72 h gemessen. Repräsentative Bilder aus 3 unabhängigen Experimenten.

Zu den Zeitpunkten 0, 8, 24, 48 und 72 h konnte bei allen Proben die Expression der jeweiligen Proteine detektiert werden. Die densitometrischen Auswertungen der WB Signale sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

Ergebnisse

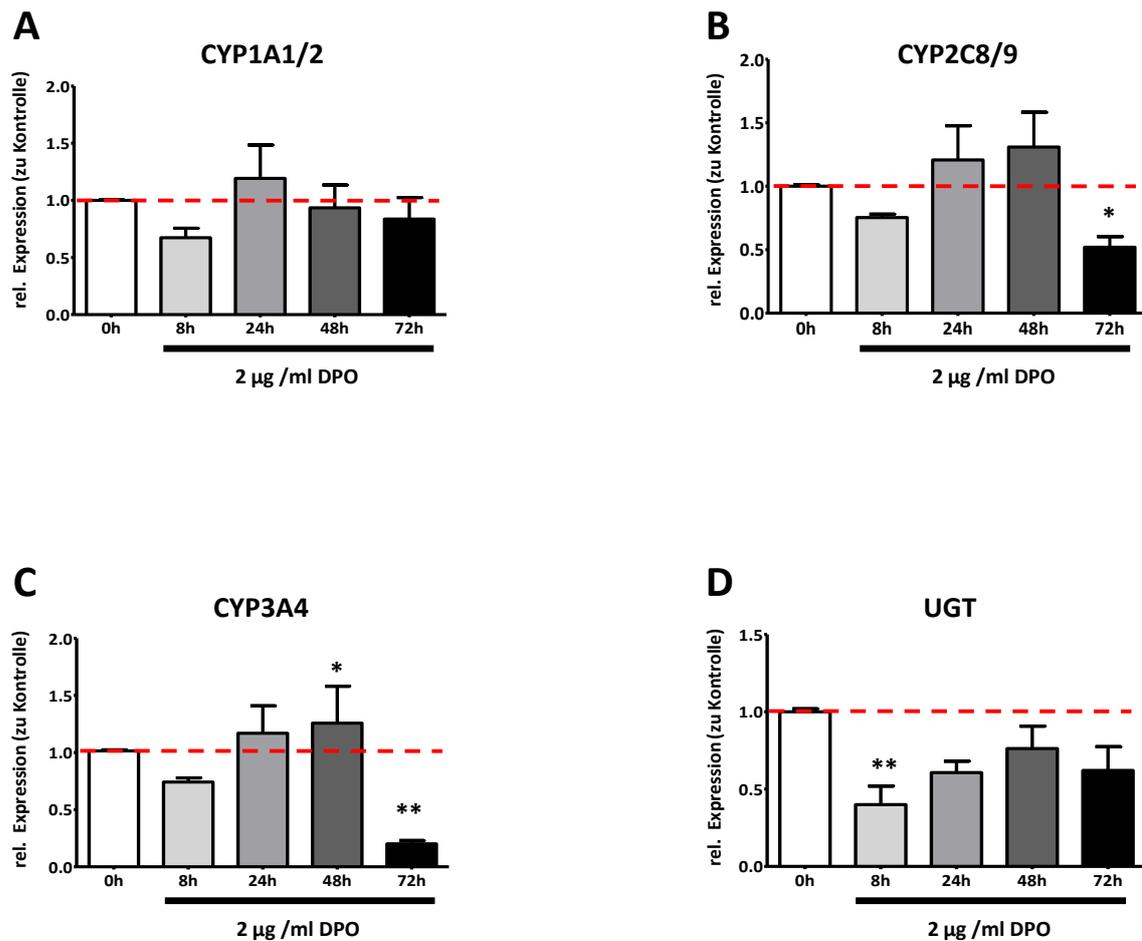


Abbildung 25: densitometrische Auswertung der WB Bilder

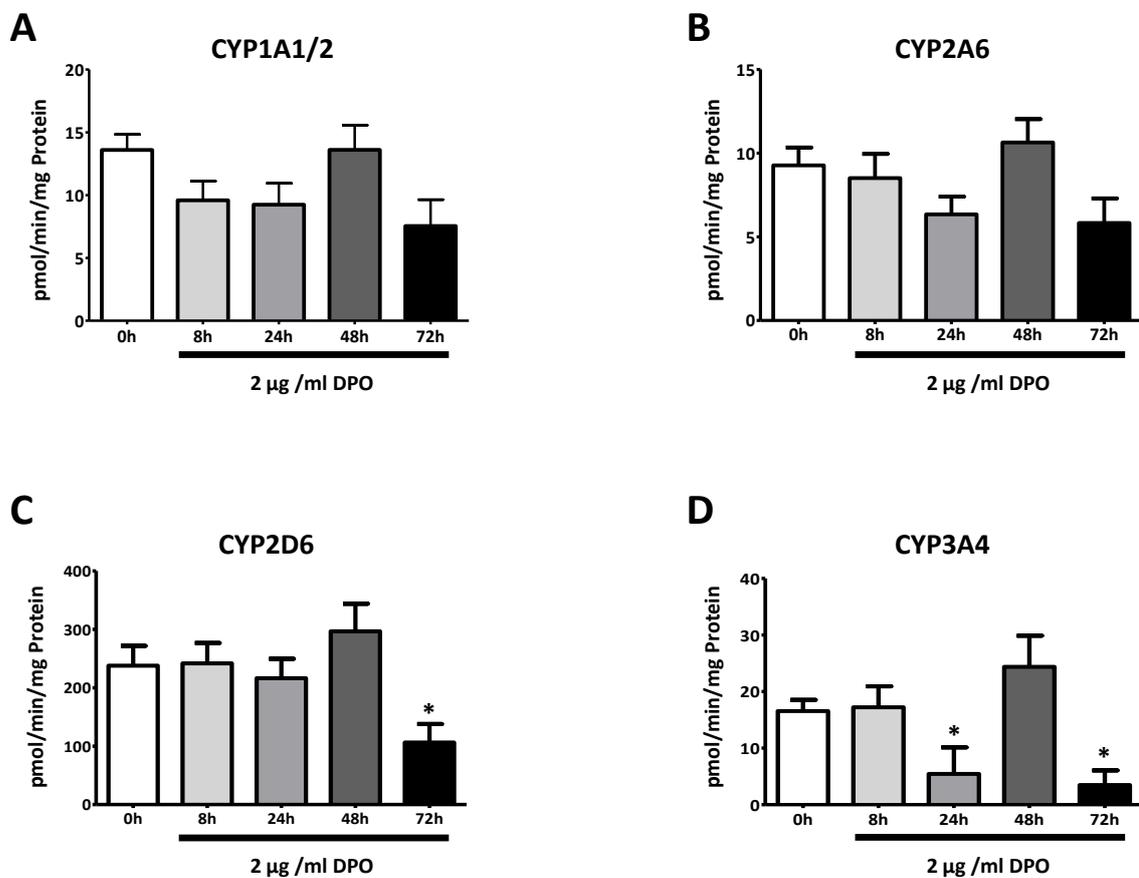
Dargestellt sind beispielhaft die graphischen Auswertungen der densitometrischen Analyse von CYP1A1 (A), CYP2C8/9 (B), CYP2E1 (C), CYP3A4 (D). Die rote Linie stellt die Proteinexpression der Kontrollzellen dar (---).

Die Auswertungen zeigten, dass die Protein-Expression aller dargestellten CYPs einen parabelförmigen Verlauf nahmen (Abbildung 25). Nach 24 h war die Expression bei CYP1A1/2 und CYP2C8/9 um fast das 1,5 fache gestiegen. Sie nahm anschließend jedoch bis zum 72 h Zeitpunkt wieder ab und lag ähnlich der Kontrolle vor (Abbildung 25 A und B). Das Expressionslevel von CYP2E1 und CYP3A4 nahm ebenfalls um fast das 1,5 fache zu, allerdings war hier das Maximum schon nach 8 h Stimulation erreicht, und sank anschließend kontinuierlich ab (Abbildung 25 C und D).

5.4 DPO alpha beeinflusst vor allem die Enzymaktivität der Phase I humaner Hepatozyten über 72 Stunden

Nach Stimulation der einzelnen Proben mit DPO alpha wurde die Aktivität verschiedener Phase I und Phase II Enzyme photometrisch gemessen. Die umgesetzte Substratmenge wurde photometrisch bestimmt und anschließend mit dem Gesamtprotein verrechnet (Abbildung 26).

Phase I



Ergebnisse

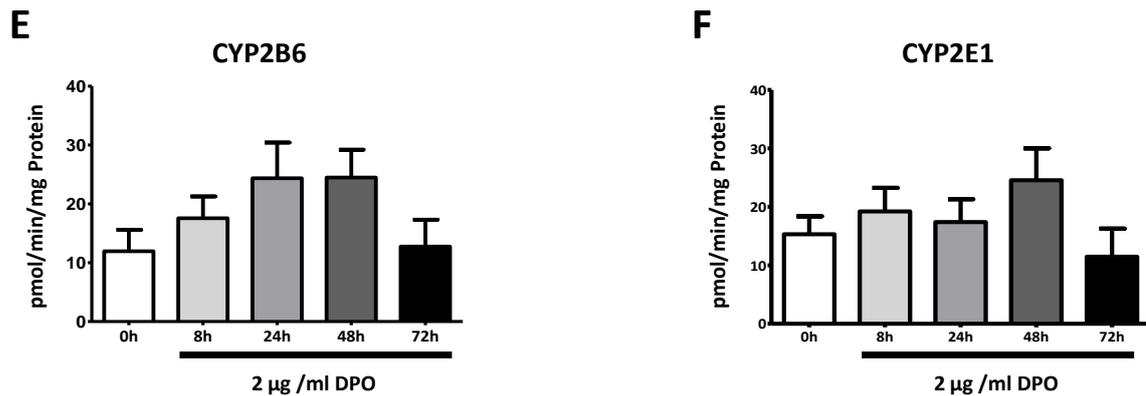


Abbildung 26: Enzymaktivitäten der Phase I Enzyme nach Stimulation mit DPO alpha

Dargestellt sind die Aktivitäten der Phase I Enzyme, sowie deren jeweiliges Substrat, welches von ihnen umgesetzt wurde, nach Stimulation mit DPO alpha über den Zeitraum von 72 h. * $p < 0,05$ Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle (N=4, n=3).

CYP1A1/2, CYP2A6, CYP2D6 und CYP3A4 zeigten einen ähnlichen Verlauf bei ihrer Enzymaktivität über den Zeitraum von 72 h. Die Aktivität jedes dieser Enzyme nahm kontinuierlich bis zum Zeitpunkt der 24-Stundenmessung ab und erreichte beim 48 h-Zeitpunkt ihr Maximum. Anschließend kam es zum Abfall, bei den 72-Stundenwerten wurden die signifikant geringsten Aktivitätswerte gemessen (siehe *Abbildung 26 A, B, C, D*). Die Aktivität der CYP 2B6 und CYP2E1 stieg zunächst an, wobei CYP2B6 sein Maximum bei 24 h und CYP2E1 bei 48 h erreichte. Beide Enzyme zeigten die geringste Aktivität nach 72 h Stimulation mit DPO alpha (*Abbildung 26 E und F*).

Phase II

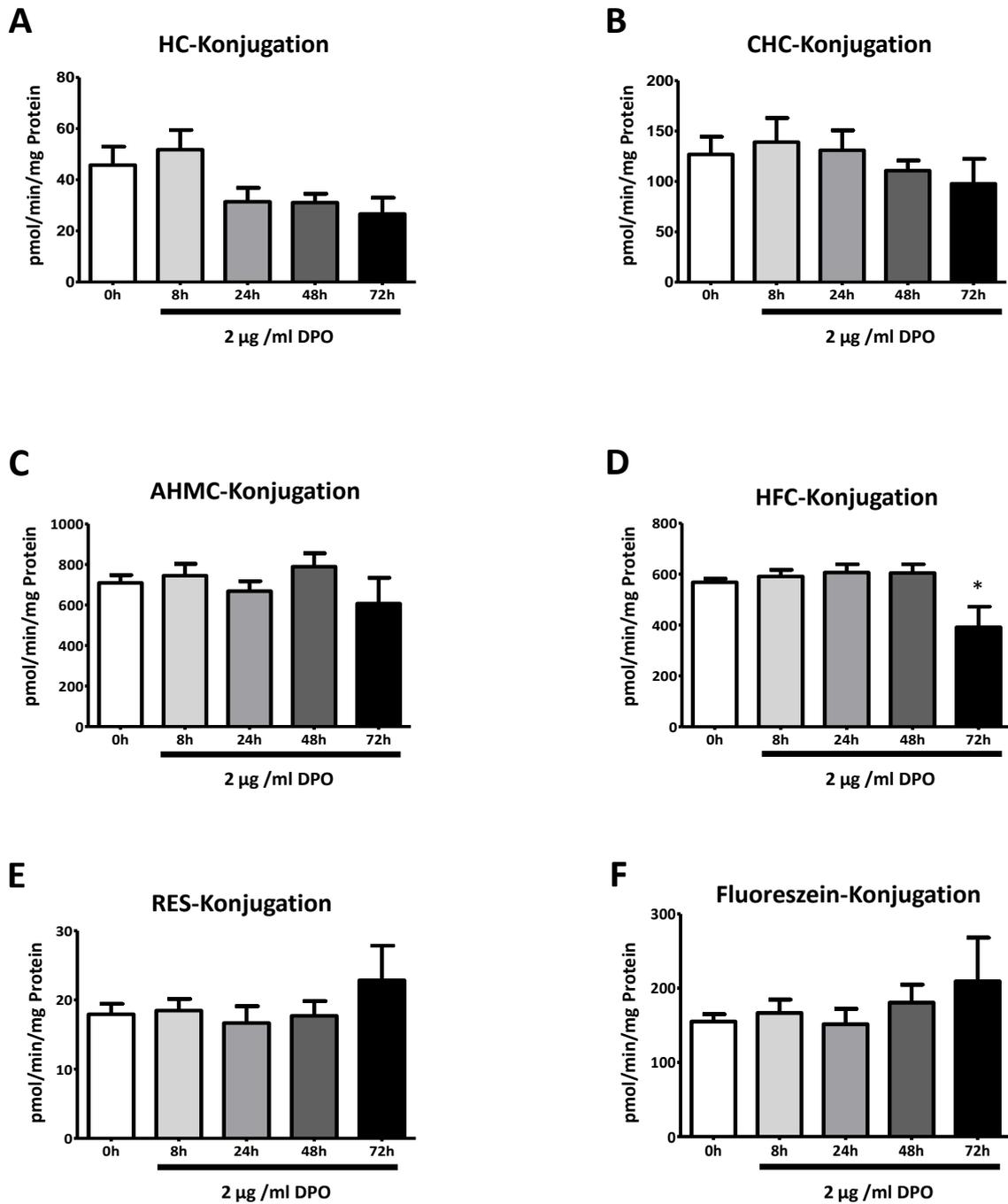


Abbildung 27: Enzymaktivitäten der Phase II Enzyme nach Stimulation mit DPO alpha
 Dargestellt sind die Aktivitäten der Phase II Enzyme, sowie deren jeweiliges Substrat, welches von ihnen umgesetzt wurde, nach Stimulation mit DPO alpha über den Zeitraum von 72 h (N=4, n=3).

Die Aktivitätskurven der HC- und CHC Konjugation verliefen ähnlich. Nach 8 h erreichten sie ihren Höhepunkt und nahmen dann kontinuierlich ab (Abbildung 27 A, B). Bei den AHMC- und HFC-Konjugationen war über die gesamte Zeit kaum ein Unterschied ihrer

Ergebnisse

Enzymaktivität zu registrieren (*Abbildung 27 C und D*). Die Aktivität von RES und Fluoreszein änderten sich bis zum 48 Stundenwert kaum, jedoch stiegen beide bis zum 72 -Stundenwert an und erreichten dann ihr Maximum (*Abbildung 27 E und F*).

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung von DPO alpha auf die Biotransformation primärer humaner Hepatozyten zu untersuchen. Dabei war der Einfluss von DPO alpha auf die Phase I und Phase II Enzyme - im Besonderen die CYPs - von besonderem Interesse. Zu den wichtigsten CYP450 Enzymen gehören CYP3A4/5, CYP2D6, CYP2C8/9, CYP1A1/2 und CYP2E1, denn sie übernehmen circa 90 % der Oxidation von toxischen Substanzen im Körper (35). Aus diesem Grund wurde das Augenmerk vor allem auf die genannten Isoenzyme gerichtet.

Für den Menschen ist Erythropoetin, das fast ausschließlich in der Niere produziert wird, ein essentielles Hormon. Als Hauptbestandteil der Hämatopoese steigert es bei vermindertem Sauerstoffgehalt im Blut die Erythropoese und damit die Möglichkeit Sauerstoff aus der Atemluft in den Blutkreislauf aufzunehmen (41). Seitdem die industrielle Herstellung von EPO möglich ist, wird es mit unterschiedlichster Zielsetzung zu therapeutischen Zwecken in der Medizin verwendet (91). Insbesondere zur Therapie bei gestörter Erythropoese kommt EPO und seine Analoga zum Einsatz, am Häufigsten bei renaler Anämie, hervorgerufen durch eine Niereninsuffizienz (39). Außerdem findet es bei weiteren Anämieformen anderer medizinischer Bereiche, wie beispielsweise in der Chirurgie (26), inneren Medizin im Rahmen von chronischen entzündlichen Erkrankungen (67) oder in der Onkologie (52) Anwendung. In der Öffentlichkeit ist EPO allerdings vor allem als Dopingmittel für Leistungssportler bekannt geworden (66). Doch neben der Fähigkeit, die Erythrozytenzahl im Blut zu steigern, besitzt das Hormon noch andere Eigenschaften. So kommt EPO aufgrund protektiver Effekte, wie Hemmung von Apoptosevorgängen (80), Wirkung als Antioxidans (3) und Steigerung der Neoangiogenese (11), weitaus vielseitiger zum Einsatz. In der regenerativen Medizin hat sich gezeigt, dass EPO sich durch diese Effekte protektiv auf Herz-, Haut-, Gehirn- oder Lebergewebe auswirkt (45).

Dass EPO den Stoffwechsel der Leber und damit auch die CYP450 Enzyme beeinflusst, ist bekannt, doch in welchem Ausmaß, ist noch weitgehend ungeklärt (37). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich aus diesem Grund mit dieser Frage. Ziel der Untersuchungen war es, die Einflussnahme von DPO alpha auf eines oder mehrere CYP450 Isoenzyme zu überprüfen. Falls es deren Aktivität induzierte oder inhibierte, so wurde dieser Mechanismus auf zellulärer Ebene untersucht. Denn die Beantwortung dieser Fragen ermöglicht die Dosisanpassung anderer gleichzeitig verabreichter Medikamente, sodass sie ihren optimalen

Diskussion

Wirkspiegel im Körper des Patienten erreichen können. Vorab wurde der zytotoxische Einfluss von DPO alpha auf die humanen Hepatozyten analysiert. Es zeigte sich, dass ansteigende Konzentrationen nicht toxisch für die Zellen waren. Daher konnte ausgeschlossen werden, dass die für die vorliegenden Versuche verwendete Konzentration vom DPO alpha die Viabilität und damit auch die Enzymaktivität der Zellen beeinträchtigte.

Das Isoenzym CYP3A4 macht den größten Anteil der Phase I Enzyme der Biotransformation aus, außerdem ist es am Metabolismus von einer Vielzahl an Medikamenten beteiligt (35). Als Beispiel: nach Organtransplantation benötigt der Empfänger des Organs lebenslang immunsupprimierende Medikamente zur Steuerung immunologischer Prozesse mit dem Ziel, die Organabstoßung zu verhindern. Zu diesen Medikamenten gehören unter anderem Calcineurininhibitoren wie Tacrolimus oder Cyclosporin. Ihr Einsatz bei Lebertransplantationen ist Standard (53). Sie werden überwiegend in der Leber durch das CYP3A4 verstoffwechselt (68). Vor und / oder nach der Transplantation kann die zusätzliche Gabe von DPO alpha vorgesehen sein, weil es im Transplantat die Reperfusion steigert und Apoptosevorgänge verhindert oder zumindest reduziert (123). Wenn DPO alpha seinerseits das CYP3A4 in seiner Funktion beeinflusst, so würden unterschiedliche Wirkspiegel der Immunsuppressiva vorliegen. Während zu hohe Spiegel ein Nierenversagen auslösen können (9), würde bei zu niedrigen Spiegel unter Umständen sogar die Abstoßung des Organs drohen (19). Bei anämischen Patienten mit einer chronischen Viruserkrankung, wie zum Beispiel HIV, hat die Therapie mit DPO alpha zu einem Anstieg des Hämatokrit-Wertes und damit zu einer Besserung der Symptome geführt. Bekanntlich müssen auch diese Patienten lebenslang Medikamente einnehmen (2). Proteaseinhibitoren sind ein wichtiger Bestandteil der antiviralen Therapie gegen die Ausbreitung der Viren. Indinavir, Ritonavir oder Saquinavir gehören zu den Vertretern aus dieser Gruppe, sie werden ebenfalls überwiegend von CYP3A4 metabolisiert (68). Die Ergebnisse aus PCR, WB und auch die der Enzymaktivität von CYP3A4 zeigten alle einen ähnlichen Verlauf. Nach einem kurzen Anstieg hinsichtlich der Gen- und Proteinexpression sowie Enzymaktivität, waren nach 72 h Stimulation mit DPO alpha niedrigere Werte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu beobachten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass DPO alpha zwar zunächst die Enzymaktivität steigert, doch nach drei Tagen nahm die Enzymaktivität signifikant ab. In Bezug auf die Arzneimittelinteraktion bedeuten diese Resultate: Wenn bei gleichzeitiger Gabe mit DPO alpha ein Medikament von CYP3A4 metabolisiert wird, reichen über längere Hinsicht

Diskussion

niedrige Konzentrationen aus, um den gleichen Wirkspiegel zu erzielen als ohne DPO alpha als Co-Medikation.

In der Kardiologie gehören bei den unterschiedlichsten Herzerkrankungen Betablocker zur Standardtherapie (75). Nachdem in verschiedenen Versuchen gezeigt wurde, dass DPO alpha kardioprotektive Wirkung besitzt (43,88), kann bei gleichzeitiger Einnahme der Medikamente ebenfalls eine Arzneimittelinteraktion stattfinden. Einer der am häufigsten verwendeten Betablocker ist Metoprolol. Dieses wird genauso wie Timolol über CYP2D6 metabolisiert (68). Das gleiche Isoenzym ist an der Verstoffwechslung von Antidepressiva wie Duloxetin, Paroxetin, Desipramin oder Imipramin beteiligt. Weil DPO alpha bei Depression eingesetzt wird, um die Kognitivität zu steigern und depressives Verhalten zu mindern (98), besteht auch hier die Möglichkeit einer Interaktion zwischen den Antidepressiva und DPO alpha. CYP2D6 erzielte ähnliche Ergebnisse in unseren Versuchen wie CYP3A4. Nach einem leichten Anstieg in der Genexpression, Proteinexpression und Enzymaktivität kommt es spätestens nach 72 h zu einer Abnahme unterhalb der Kontrollwerte. Folglich müsste auch hier eine Anpassung der Medikation stattfinden, da bei Co-Medikation mit DPO alpha weniger Arzneimittel nötig wäre.

CYP2C8/9 sind weitere Isoenzyme, die eine wichtige Rolle in der Biotransformation von endogenen Substanzen und Xenobiotika spielen. In der Rheumatologie finden nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) standardmäßig Anwendung zur Schmerzlinderung (1,125). Da sie zum Teil frei verkäuflich sind, werden sie häufig in Selbstmedikation der Patienten gegen Kopf- und Gliederschmerzen eingenommen. Neben Aspirin gehören Diclofenac und Ibuprofen zu den bekanntesten NSAR, letztere werden über CYP2C8/9 metabolisiert (68). Da DPO alpha auch bei Erkrankungen aus dem rheumatischen Formkreis eingesetzt wird, kann es bei gleichzeitiger Anwendung zu einer Interaktion kommen. Darüber hinaus werden orale Antidiabetika wie zum Beispiel Tolbutamid und Glipizid ebenso über CYP2C8/9 metabolisiert (68). Die Ergebnisse zeigten, dass es nach 72 h Stimulation mit DPO alpha sowohl in der Genexpression als auch in der Proteinexpression im Vergleich zu den Kontrollen zu einer Senkung kam, aber die Enzymaktivität anstieg. Daraus folgt, dass DPO alpha CYP2C8/9 induziert. Dementsprechend müssten Medikamente, die über diese Enzyme verstoffwechselt werden, eine Dosissteigerung erfahren, damit sie den benötigten Wirkspiegel erreichen können.

Diskussion

Ferner sind die Isoenzyme CYP1A1/2 an der Biotransformation von Xenobiotika wie Carbamazepin oder Clozapin beteiligt (68,93). Beide Medikamente kommen häufig in der Psychiatrie zum Einsatz und werden meist über einen langen Zeitraum verabreicht (141,142). Bei zusätzlicher Gabe von DPO alpha, bestünde die Möglichkeit einer Arzneimittelinteraktion. Die Ergebnisse lassen erkennen, dass bei der Gen- und Proteinexpression zwar ein leichter Anstieg zu registrieren war, jedoch nach 72 h der Level bei beiden Versuchsreihen annähernd den Kontrollen gleich. Die Enzymaktivität hingegen war nach 72 h unter den Kontrollwert gesunken. DPO alpha beeinflusst also CYP1A1/2, wahrscheinlich vor allem auf der Ebene der Enzymaktivität.

In den Untersuchungsreihen blieb das CYP2E1 nach Stimulation mit DPO alpha nahezu unbeeinflusst. Auf den drei untersuchten Ebenen gab es nach 72 h kaum Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen. Daher ist davon auszugehen, dass DPO alpha kaum oder keinen Einfluss auf das CYP2E1 nimmt. Infolgedessen könnten Medikamente wie Paracetamol oder diverse Inhalationsanästhetika (Enfluran, Halotan oder Sevofluran), welche unter anderem durch CYP2E1 oxidiert werden, zusammen mit DPO alpha dargereicht werden, ohne dass dieses durch das CYP2E1 mit ihnen interagiert.

Die Aktivitäten der Phase II-Enzyme, welche neben der aus Phase I ebenfalls eine wichtige Rolle in der Biotransformation von endogenen Substanzen und Xenobiotika spielen, haben sich im Verlauf der untersuchten Zeitkurve wenig geändert. Lediglich bei der HFC-Konjugation zeigte sich nach 72 h eine signifikante Abnahme der Enzymaktivität. Dagegen war ein leichter Anstieg bei der Enzymaktivität für RES-Konjugation und Fluoreszeinkonjugation am Ende des untersuchten Zeitraumes zu beobachten.

Sehr unterschiedliche Faktoren können sich neben DPO alpha auf die von uns untersuchten Enzyme der Phase I und -II und somit auf die Biotransformation von Medikamenten auswirken. Die CYP Isoenzyme unterliegen einem hohen Maße an genetischem Polymorphismus, welcher das heterogene Ansprechen auf bestimmte Medikamente innerhalb einer Population erklären könnte (126). Die Nahrungsmittelaufnahme ist ein weiterer wichtiger Aspekt, der den Stoffwechsel der Leber beeinflussen kann. Beispielsweise verändert Konsum von Alkohol die CYP2E1 Aktivität und das GSH Level. Die chronische Aufnahme von Alkohol erhöht die CYP2E1 Aktivität und inhibiert die GSH Syntheserate (113). Neben Alkohol beeinflusst auch Nikotin die CYPs (156). Andere Nahrungsmittel wie Salat,

Diskussion

Brokkoli oder gegrilltes Fleisch können im Besonderen CYP1A2 induzieren (18). Im Gegensatz dazu ist beispielsweise Grapefruitsaft ein starker CYP3A4 Inhibitor (42). Die CYP Aktivität kann sogar durch die tägliche Proteinaufnahme verändert werden. Eine hohe Zufuhr an Proteinen erhöht und eine niedrige senkt die Aktivität einiger CYPs (157). Es gilt zusätzlich zu erwähnen, dass auch das Alter eines Patienten eine Rolle bei der Metabolisierung von Xenobiotika spielt. Hilmer et al. beschrieben die allgemeine Abnahme der Phase I Enzyme bei steigendem Lebensalter (59). Hingegen scheint die Phase II vom Lebensalter unbeeinträchtigt (72). Neben genetischer Komponente, Ernährungsverhalten und dem Alter eines Patienten, können vorbestehende Erkrankungen und andere Begleitmedikation ebenfalls die Phase I und Phase II Enzyme beeinflussen (40,136).

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Hepatozyten wurden aus Leberteileresektaten von verschiedenen Spendern isoliert. Aus diesem Grund konnten alle aufgeführten Faktoren die Untersuchungsergebnisse beeinflussen und sind bei der Interpretation der Ergebnisse als bedingte Störvariablen zu berücksichtigen. Demzufolge bestand die Möglichkeit, dass die in den Versuchen gemessene Enzymaktivität der isolierten Zellen sowohl durch Ernährungsverhalten, Zustand und Alter des Spenders, als auch durch Prämedikation beeinflusst werden konnte. Diese Faktoren können die Aussagekraft der erhobenen Werte limitieren.

Expression, Regulation und Aktivität der an der Biotransformation beteiligten Enzyme hängt zusätzlich zu den genannten Faktoren auch von der Hepatozytenumgebung ab. Grundsätzlich stellen die Versuche an *in vivo* lebenden Zellen die beste Voraussetzung für eine gesicherte wissenschaftliche Aussage dar. Jedoch konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen und auch von der eigenen gezeigt werden, dass sich *in vitro* isolierte humane Hepatozyten ebenso hervorragend für die Bestimmung der Aktivität, sprich ihrer Fähigkeit zur Metabolisierung von Medikamenten, eignen. Letztere zeigte im Vergleich zur *in vivo* Aktivität kaum Unterschiede. In den Versuchen wurde einerseits die Lebensfähigkeit und andererseits die Aufrechterhaltung ihrer Metabolisierungsfähigkeit über eine lange Zeitperiode nachgewiesen (81,84,155).

Allerdings ist die *in vitro* Aktivität der humanen Hepatozyten von der Art und Weise der Isolation und Kultivierung abhängig. Das von uns angewandte Isolationsverfahren eignet sich ausschließlich zur Hepatozytenisolation und ist inzwischen etabliert. Bei der Kultivierung gibt

Diskussion

es unterschiedlichste Verfahren. So gibt es diverse Matrizen, welche für die Adhäsion der Hepatozyten geeignet sind. In der Literatur werden die besten Ergebnisse mit einer Kollagenmatrix, welche auch in den Versuchen dieser Arbeit benutzt wurde, erzielt (81,105). Die Zellzahl pro cm^2 und damit auch die Möglichkeit für den Zell-Zell Kontakt spielt eine große Rolle für den Metabolismus der Hepatozyten, denn der Verlust des Kontaktes untereinander führt zu einer dramatischen Abnahme der Genexpression der CYPs (50,55).

Diese Arbeit lässt die Beeinflussung von DPO alpha auf verschiedene Phase I und Phase II Enzyme erkennen und weist auf mögliche Arzneimittelinteraktionen zwischen DPO alpha und anderen Medikamenten hin. Infolgedessen besteht die Möglichkeit vorauszusagen, ob ein Medikament bei der gewöhnlichen Dosis ausreichend oder zu viel und damit eventuell sogar toxisch ist. Dementsprechend kann die Anpassung von Medikamenten, welche neben DPO alpha als Co-Medikation verabreicht werden, schon zu Beginn der Therapie erfolgen.

7 Zusammenfassung

EPO und seine Analoga werden vor allem zur Therapie bei Anämien renaler, tumoröser Genese und als Folge von Chemotherapie eingesetzt. Neben dem hämatopoetischen Effekt besitzt EPO aber noch andere Eigenschaften, die es weitaus vielseitiger einsetzbar machen. Sei es in der Chirurgie, wo durch ESA eine Verbesserung der Reperfusion, sowie Senkung der Apoptose- beziehungsweise Nekroserate des Gewebes erzielt wird oder in der regenerativen Medizin, bei der durch selbige Eigenschaften der Heilungsverlauf verschiedener Gewebearten beschleunigt werden kann. Durch diese Wirkungsvielfalt konnten die Indikationen für den Einsatz von ESA immer mehr ausgeweitet werden. Infolge dessen, auch aufgrund seiner hohen Produktionskosten, stehen die Kosten für rekombinantes EPO weltweit mittlerweile an vorderer Stelle des Arzneimittelbudgets (29).

Grundsätzlich beeinflussen verschiedenste Faktoren Verfügbarkeit und Wirkung eines Medikamentes. So können beispielsweise Alter, Lebensstil, Ernährung, aber auch genetische Voraussetzungen und körperlicher Status des Patienten dessen Wirkung beeinflussen. Häufig interagieren Medikamente zudem untereinander, sodass es zu veränderten Dosis-Wirkungsbeziehungen kommt. Daher steigt mit zunehmendem Gebrauch von Medikamenten auch die Wahrscheinlichkeit möglicher Arzneimittelinteraktionen. Die Abschätzung bezüglich des zu erwartenden Ausmaßes dieser Interaktionen hat große Bedeutung für die biologisch wirksame Konzentration und damit die Wirksamkeit einer Substanz im Körper. Während niedrige Wirkspiegel zur Abschwächung oder gar zum Ausbleiben einer Wirkung führen, können zu hohe Spiegel toxisch für den Organismus werden.

Die Biotransformation nimmt den größten Anteil an der Verstoffwechslung von Xenobiotika ein. Hier werden sowohl endogene als auch fremde Substanzen enzymatisch in ihrer Struktur verändert, wodurch deren Ausscheidung meist erst ermöglicht wird. Die beteiligten Enzyme befinden sich fast ausschließlich in der Leber. Sie werden in Phase I (Redoxreaktionen) und Phase II (Konjugationsreaktionen) Enzyme unterteilt. Werden Medikamente, deren Metabolisierung über das gleiche Enzym erfolgt, gemeinsam verabreicht, dann verändern beide die Aktivität dieses Enzyms in unterschiedlichem Maße. Folglich beeinflussen sie gegenseitig ihre biologische Wirksamkeit. So gibt es Medikamente die Enzyme induzieren oder inhibieren können.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung von DPO alpha auf den Lebermetabolismus untersucht. Im Speziellen wurden primäre humane Hepatozyten isoliert und mit DPO alpha über ein Zeitintervall von 72 h stimuliert. Anschließend konnten mittels PCR, Immunoblot und photometrischer Messungen der Enzymaktivitäten, die Auswirkung dieser Stimulation auf verschiedenen zellulären Ebenen untersucht werden. Die gewonnenen Ergebnisse ermöglichen es, eine Prognose hinsichtlich des Wirkungsgrades von DPO alpha auf die Biotransformation der Leber und damit auch auf mögliche Arzneimittelinteraktionen abzugeben. Isoenzyme aus der Phase I wie das CYP3A4 CYP1A1/2 und CYP2D6 zeigten während des untersuchten Zeitraumes zunächst eine Steigerung in Gen- und Proteinexpression sowie Enzymaktivität; nach 72 h kam es allerdings auf allen drei Ebenen zur Senkung. Es ist davon auszugehen, dass DPO alpha auf die Enzyme inhibierend wirkt, sodass Medikamente, die durch die gleichen Isoenzyme metabolisiert werden, in einer geringeren Dosis verabreicht werden können und trotzdem ihren gewünschten Wirkspiegel erreichen. Die Enzymaktivitäten von CYP2C8/9 haben entgegengesetzt ihrer Gen- und Proteinexpression über den definierten Zeitraum zugenommen. Hingegen scheint DPO alpha die Aktivität von CYP2E1 im Vergleich zu den Kontrolluntersuchungen kaum zu verändern. Die Stimulation der Hepatozyten mit DPO alpha hatte auf eine große Anzahl der Phase I Enzyme Einfluss. Dies war jedoch bei den Phase II Enzymen in den durchgeführten Versuchen nicht der Fall. Lediglich die HFC-Konjugation zeigte eine signifikante Abnahme hinsichtlich der Enzymaktivität nach 72 h. Unsere Ergebnisse suggerieren, dass es bei der Gabe von DPO alpha und anderen Arzneimitteln zu Arzneimittelinteraktionen kommen kann, was bei gleichzeitiger Applikation mehrerer Arzneimittel berücksichtigt werden sollte.

Der wissenschaftliche Wert der vorgelegten Untersuchungen liegt daher in der Möglichkeit, bereits im Vorfeld therapeutischer Maßnahmen einen optimalen Wirkspiegel hinsichtlich verschiedener Medikation festlegen zu können. Diese hat sowohl einen sehr wesentlichen medizinischen, aber auch einen wichtigen ökonomischen Aspekt, denn DPO alpha gehört zu den am häufigsten verwendeten ESA. Deshalb muss es Ziel sein, die exakte Darreichung einer mit diesem Medikament eingeleiteten Kombinationstherapie sicherzustellen.

8 Ausblick

Diese Arbeit hat sich mit dem Einfluss von DPO alpha auf den Lebermetabolismus, im Besonderen auf die Phase I und Phase II der Biotransformation, primärer humaner Hepatozyten *in vitro* beschäftigt. Die Enzyme wurden auf den Ebenen der Gen-, Proteinexpression und Enzymaktivität untersucht. Noch nicht geklärt ist allerdings wie die Ebenen durch DPO alpha beeinflusst werden. Mithilfe von Promotoranalysen könnte der Einfluss von DPO alpha auf die Genexpression der Enzyme aus Phase I und Phase II näher untersucht werden. Diese Analysen sind als Folgeprojekt geplant und schließen sich an die vorgelegte Arbeit an.

Die ermittelten Ergebnisse ermöglichen die Vorhersage möglicher Arzneimittelinteraktionen zwischen DPO alpha und anderen Medikamenten. Da die Enzyme der Biotransformation einem starken Polymorphismus unterliegen und durch Faktoren wie Ernährungsverhalten, Alter oder Prämedikation des Patienten beeinflusst werden können, hätte eine größere Spenderzahl von humanen Hepatozyten eine stärkere Aussagekraft bezüglich der Vorhersage. Daher ist in unserer Arbeitsgruppe die Untersuchung des Einflusses von DPO alpha auf die Biotransformation humaner Hepatozyten mit einer erheblich größeren Spenderzahl geplant.

9 Verzeichnisse

9.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Schematische Darstellung der Erythropoese unter dem Einfluss von Wachstums-faktoren</i>	11
<i>Abbildung 2: EPO - endokriner Feedback bei niedrigem O₂-Gehalt</i>	12
<i>Abbildung 3: Molekularstruktur des EPO-Proteins (65)</i>	13
<i>Abbildung 4: Transkription des EPO-Gens unter Hypoxie und Normoxie</i>	14
<i>Abbildung 5: EPO-R mit nachgeschalteter Signalkaskade</i>	15
<i>Abbildung 6: Strukturaufbau des rhEPO im Vergleich zu DPO alpha</i>	17
<i>Abbildung 7: Anatomischer Aufbau der Leber</i>	23
<i>Abbildung 8: Hepatische Metabolisierung</i>	25
<i>Abbildung 9: Reaktionsmechanismus der Monooxygenasen (115)</i>	27
<i>Abbildung 10: Durchschnittliche Verteilung der CYPs beim Menschen</i>	29
<i>Abbildung 11: Perfusionsschritte für die Hepatozytenisolation</i>	44
<i>Abbildung 12: Neubauer Zählkammer (unterschiedliche Mikroskopansichten)</i>	47
<i>Abbildung 13: Versuchsaufbau des Toxizitätstests</i>	48
<i>Abbildung 14: Stimulations-Schema</i>	49
<i>Abbildung 15: Schematische Darstellung einer 96 Well-Platte zur Untersuchung der Phase I- und Phase II Enzymaktivität</i>	51
<i>Abbildung 16: Beispiel für intakte RNA</i>	56
<i>Abbildung 17: Schematische Darstellung der Thermocycler-Einstellung für die RT-PCR</i>	59
<i>Abbildung 18: Schematische Darstellung einer Gelkammer</i>	62
<i>Abbildung 19: Schematische Darstellung einer Gelelektrophorese</i>	62

Verzeichnisse

Abbildung 20: Schematische Darstellung des Blotting-Verfahrens	63
Abbildung 21: Viabilität humaner Hepatozyten unter Stimulation mit DPO alpha aufsteigender Konzentration	66
Abbildung 22: Einfluss von DPO alpha auf die Expression wichtiger Gene für die Enzymaktivität über 72 h	67
Abbildung 23: densitometrische Auswertung der PCR Bilder	68
Abbildung 24: WB von wichtigen CYP450 Proteinen nach Stimulation von DPO alpha über 72 h.....	69
Abbildung 25: densitometrische Auswertung der WB Bilder	70
Abbildung 26: Enzymaktivitäten der Phase I Enzyme nach Stimulation mit DPO alpha	72
Abbildung 27: Enzymaktivitäten der Phase II Enzyme nach Stimulation mit DPO alpha	73

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zu ermittelnde Laborparameter vor DPO-Therapiebeginn	18
Tabelle 2: Übersicht über wichtige Funktionen der Leber	22
Tabelle 3: Übersicht über die unterschiedlichen Phase I-/II-/III-Reaktionen der Biotransformation. Modifiziert nach (70,102).	28
Tabelle 4: Phase I/II Enzyme und deren Substrate	51
Tabelle 5: High Fidelity cDNA Synthesis Kit.....	56
Tabelle 6: Verwendete Primer.....	58
Tabelle 7: Verwendete Erstantikörper	64
Tabelle 8: Verwendete Zweitantikörper	64

9.3 Literaturverzeichnis

1. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update. *Arthritis Rheum* 46(2):328-346; 2002.
2. AIDS-Gesellschaft, D. D. D. Leitlinien für Diagnostik und Therapie der HIV-Infektion. Die Deutsche AIDS-Gesellschaft (DAIG); 2012
3. Amer, J.; Dana, M.; Fibach, E. The antioxidant effect of erythropoietin on thalassemic blood cells. *Anemia* 2010:978710; 2010.
4. Ateshkadi, A.; Johnson, C. A.; Oxtan, L. L.; Hammond, T. G.; Bohenek, W. S.; Zimmerman, S. W. Pharmacokinetics of intraperitoneal, intravenous, and subcutaneous recombinant human erythropoietin in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 21(6):635-642; 1993.
5. Bader, A.; Ebert, S.; Giri, S.; Kremer, M.; Liu, S.; Nerlich, A.; Gunter, C. I.; Smith, D. U.; Machens, H. G. Skin regeneration with conical and hair follicle structure of deep second-degree scalding injuries via combined expression of the EPO receptor and beta common receptor by local subcutaneous injection of nanosized rhEPO. *Int J Nanomedicine* 7:1227-1237; 2012.
6. Bader, A.; Pavlica, S.; Deiwick, A.; Lotkova, H.; Kucera, O.; Darsow, K.; Bartel, S.; Schulze, M.; Lange, H. A.; Cervinkova, Z. Proteomic analysis to display the effect of low doses of erythropoietin on rat liver regeneration. *Life Sci* 89(23-24):827-833; 2011.
7. Bataller, R.; Brenner, D. A. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115(2):209-218; 2005.
8. Belpaire, F. M.; Bogaert, M. G. Cytochrome P450: genetic polymorphism and drug interactions. *Acta Clin Belg* 51(4):254-260; 1996.
9. Bennett, W. M.; Burdmann, E. A.; Andoh, T. F.; Houghton, D. C.; Lindsley, J.; Elzinga, L. W. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs. *Nephrol Dial Transplant* 9 Suppl 4:141-145; 1994.
10. Bonsdorf, E.; Jalavisto, E. A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Acta Physiol Scand.*; 1948.
11. Boucher, M.; Pesant, S.; Lei, Y. H.; Nanton, N.; Most, P.; Eckhart, A. D.; Koch, W. J.; Gao, E. Simultaneous administration of insulin-like growth factor-1 and darbepoetin alfa protects the rat myocardium against myocardial infarction and enhances angiogenesis. *Clin Transl Sci* 1(1):13-20; 2008.
12. Breidbach, A.; Catlin, D. H.; Green, G. A.; Tregub, I.; Truong, H.; Gorzek, J. Detection of recombinant human erythropoietin in urine by isoelectric focusing. *Clin Chem* 49(6 Pt 1):901-907; 2003.
13. Bulut, G. B.; Sulahian, R.; Ma, Y.; Chi, N. W.; Huang, L. J. Ubiquitination regulates the internalization, endolysosomal sorting, and signaling of the erythropoietin receptor. *J Biol Chem* 286(8):6449-6457; 2011.
14. Carnot, P.; DeFlandre, C. Sur l'activite hemopoietique de serum au cours de la regeneration du sang. *C R Acad Sci (Paris)*; 1903.
15. Catlin, D.; Hatton, C.; Lasne, F. Abuse of recombinant erythropoietins by athletes. *Erythropoietins and Erythropoiesis*. Birkhauser Verlag; 2003.
16. Chomczynski, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15(3):532-534, 536-537; 1993.
17. Clasing, D. Doping: Erythropoetin – Medikament und Dopingmittel. *Deutsches Ärzteblatt*; 2007.
18. Conney, A. H.; Buening, M. K.; Pantuck, E. J.; Pantuck, C. B.; Fortner, J. G.; Anderson, K. E.; Kappas, A. Regulation of Human Drug Metabolism by Dietary Factors. *Ciba Foundation Symposium 76 - Environmental Chemicals, Enzyme Function and Human Disease*: John Wiley & Sons, Ltd.; 2008:147-167.
19. Cosio, F. G.; Amer, H.; Grande, J. P.; Larson, T. S.; Stegall, M. D.; Griffin, M. D. Comparison of low versus high tacrolimus levels in kidney transplantation: assessment of efficacy by protocol biopsies. *Transplantation* 83(4):411-416; 2007.

Verzeichnisse

20. Crawford, P. Interactions between antiepileptic drugs and hormonal contraception. *CNS Drugs* 16(4):263-272; 2002.
21. Creutz, O. Dopingmittel gegen Depressionen. *Die Welt online*; Dezember 2007.
22. Creutz, O. Epo spornt auch Gehirn zu Glanzleistungen an. *Die Welt online*; Juli 2009.
23. Dai, C. H.; Krantz, S. B.; Zsebo, K. M. Human burst-forming units-erythroid need direct interaction with stem cell factor for further development. *Blood* 78(10):2493-2497; 1991.
24. Dancygier, H. *Clinical Hepatology: Principles and Practice of Hepatobiliary Diseases*, 1 ed: Springer, Berlin 2009; 2010.
25. Danielson, P. B. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab* 3(6):561-597; 2002.
26. de Andrade, J. R.; Jove, M.; Landon, G.; Frei, D.; Guilfoyle, M.; Young, D. C. Baseline hemoglobin as a predictor of risk of transfusion and response to Epoetin alfa in orthopedic surgery patients. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 25(8):533-542; 1996.
27. Donato, M. T.; Jimenez, N.; Castell, J. V.; Gomez-Lechon, M. J. Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* 32(7):699-706; 2004.
28. Dunn, C. J.; Markham, A. Epoetin beta. A review of its pharmacological properties and clinical use in the management of anaemia associated with chronic renal failure. *Drugs* 51(2):299-318; 1996.
29. Eckardt, K.-U. Erythropoietin: Karriere eines Hormons. *Deutsches Ärzteblatt*; 1998.
30. Eckardt, K. U.; Kurtz, A. Regulation of erythropoietin production. *Eur J Clin Invest* 35 Suppl 3:13-19; 2005.
31. Elliott, S. Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport. *Br J Pharmacol* 154(3):529-541; 2008.
32. Elliott, S.; Lorenzini, T.; Asher, S.; Aoki, K.; Brankow, D.; Buck, L.; Busse, L.; Chang, D.; Fuller, J.; Grant, J. and others. Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nat Biotechnol* 21(4):414-421; 2003.
33. Eschbach, J. W.; Egrie, J. C.; Downing, M. R.; Browne, J. K.; Adamson, J. W. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *N Engl J Med* 316(2):73-78; 1987.
34. Estler, C.-J. *Pharmakologie und Toxikologie. Lehrbuch für Studierende der Medizin, Pharmazie und Naturwissenschaften*, 6 ed; 2006.
35. Evans, W. E.; Relling, M. V. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286(5439):487-491; 1999.
36. Fandrey, J. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286(6):R977-988; 2004.
37. Fandrey, J.; Seydel, F. P.; Siegers, C. P.; Jelkmann, W. Role of cytochrome P450 in the control of the production of erythropoietin. *Life Sci* 47(2):127-134; 1990.
38. Farrell, F.; Lee, A. The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *Oncologist* 9 Suppl 5:18-30; 2004.
39. Fisher, J. W. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med (Maywood)* 228(1):1-14; 2003.
40. Flockhart, D. A.; Oesterheld, J. R. Cytochrome P450-mediated drug interactions. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 9(1):43-76; 2000.
41. Frede, S.; Freitag, P.; Geuting, L.; Konietzny, R.; Fandrey, J. Oxygen-regulated expression of the erythropoietin gene in the human renal cell line REPC. *Blood* 117(18):4905-4914; 2011.
42. Fuhr, U. Drug interactions with grapefruit juice. Extent, probable mechanism and clinical relevance. *Drug Saf* 18(4):251-272; 1998.
43. Gao, E.; Boucher, M.; Chuprun, J. K.; Zhou, R. H.; Eckhart, A. D.; Koch, W. J. Darbepoetin alfa, a long-acting erythropoietin analog, offers novel and delayed cardioprotection for the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(1):H60-68; 2007.
44. Gaudard, A.; Varlet-Marie, E.; Bressolle, F.; Audran, M. Drugs for increasing oxygen and their potential use in doping: a review. *Sports Med* 33(3):187-212; 2003.

Verzeichnisse

45. Ghezzi, P.; Brines, M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ* 11 Suppl 1:S37-44; 2004.
46. Gobin, J.; Cernii, A.; McLean, R.; Finkelstein, F. O.; Simon, D. B. Conversion from Epoetin Alfa to Darbepoetin Alfa for Management of Anaemia in a Community Chronic Kidney Disease Centre: A Retrospective Cohort Study. *Clin Drug Investig*; 2010.
47. Gottlieb, R. A.; Burlison, K. O.; Kloner, R. A.; Babior, B. M.; Engler, R. L. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 94(4):1621-1628; 1994.
48. Gregory, C. J.; Eaves, A. C. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* 51(3):527-537; 1978.
49. Greif, F.; Ben-Ari, Z.; Taya, R.; Pappo, O.; Kurtzwald, E.; Cheporko, Y.; Ravid, A.; Hochhauser, E. Dual effect of erythropoietin on liver protection and regeneration after subtotal hepatectomy in rats. *Liver Transpl* 16(5):631-638; 2010.
50. Greuet, J.; Pichard, L.; Ourlin, J. C.; Bonfils, C.; Domergue, J.; Le Treut, P.; Maurel, P. Effect of cell density and epidermal growth factor on the inducible expression of CYP3A and CYP1A genes in human hepatocytes in primary culture. *Hepatology* 25(5):1166-1175; 1997.
51. Guneli, E.; Cavdar, Z.; Islekel, H.; Sarioglu, S.; Erbayraktar, S.; Kiray, M.; Sokmen, S.; Yilmaz, O.; Gokmen, N. Erythropoietin protects the intestine against ischemia/ reperfusion injury in rats. *Mol Med* 13(9-10):509-517; 2007.
52. Gupta, S.; Singh, P. K.; Bisth, S. S.; Bhatt, M. L.; Pant, M.; Gupta, R.; Singh, S.; Negi, M. P. Role of recombinant human erythropoietin in patients of advanced cervical cancer treated "by chemoradiotherapy". *Cancer Biol Ther* 8(1):13-17; 2009.
53. Haddad, E. M.; McAlister, V. C.; Renouf, E.; Malthaner, R.; Kjaer, M. S.; Gluud, L. L. Cyclosporin versus tacrolimus for liver transplanted patients. *Cochrane Database Syst Rev* (4):CD005161; 2006.
54. Hamed, S. Beyond hematopoietic targets: the role of erythropoietin in diabetic wound healing. *Biomark Med* 5(3):365-367; 2011.
55. Hamilton, G. A.; Jolley, S. L.; Gilbert, D.; Coon, D. J.; Barros, S.; LeCluyse, E. L. Regulation of cell morphology and cytochrome P450 expression in human hepatocytes by extracellular matrix and cell-cell interactions. *Cell Tissue Res* 306(1):85-99; 2001.
56. Hasler, J. A. Pharmacogenetics of cytochromes P450. *Mol Aspects Med* 20(1-2):12-24, 25-137; 1999.
57. Heatherington, A. C.; Schuller, J.; Mercer, A. J. Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP) in cancer patients: preliminary report. *Br J Cancer* 84 Suppl 1:11-16; 2001.
58. Henry, D. H.; Beall, G. N.; Benson, C. A.; Carey, J.; Cone, L. A.; Eron, L. J.; Fiala, M.; Fischl, M. A.; Gabin, S. J.; Gottlieb, M. S. and others. Recombinant human erythropoietin in the treatment of anemia associated with human immunodeficiency virus (HIV) infection and zidovudine therapy. Overview of four clinical trials. *Ann Intern Med* 117(9):739-748; 1992.
59. Hilmer, S. N.; Shenfield, G. M.; Le Couteur, D. G. Clinical implications of changes in hepatic drug metabolism in older people. *Ther Clin Risk Manag* 1(2):151-156; 2005.
60. Hilton, C. J.; Berridge, M. V. Conserved region of the cytoplasmic domain is not essential for erythropoietin-dependent growth. *Growth Factors* 12(4):263-276; 1995.
61. Hochhauser, E.; Pappo, O.; Ribakovskiy, E.; Ravid, A.; Kurtzwald, E.; Cheporko, Y.; Lelchuk, S.; Ben-Ari, Z. Recombinant human erythropoietin attenuates hepatic injury induced by ischemia/reperfusion in an isolated mouse liver model. *Apoptosis* 13(1):77-86; 2008.
62. Homolya, L.; Varadi, A.; Sarkadi, B. Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors* 17(1-4):103-114; 2003.
63. Ingelman-Sundberg, M.; Daly, A. K.; Nebert, D. W. Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee 2008.
64. Jahn, S.; Baumann, A.; Roscher, J.; Hense, K.; Zazzeroni, R.; Karst, U. Investigation of the biotransformation pathway of verapamil using electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry - a comparative study with liver cell microsomes. *J Chromatogr A* 1218(51):9210-9220; 2011.

Verzeichnisse

65. Jamiri. Schematische Darstellung des EPO-Moleküls. 2006.
66. John, M. J.; Jaison, V.; Jain, K.; Kakkar, N.; Jacob, J. J. Erythropoietin use and abuse. *Indian J Endocrinol Metab* 16(2):220-227; 2012.
67. Kaltwasser, J. P.; Kessler, U.; Gottschalk, R.; Stucki, G.; Moller, B. Effect of recombinant human erythropoietin and intravenous iron on anemia and disease activity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28(11):2430-2436; 2001.
68. Karow, T.; Lang-Roth, R. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 18 ed: Karow, Köln 2010; 2010.
69. Kaupke, C. J.; Kim, S.; Vaziri, N. D. Effect of erythrocyte mass on arterial blood pressure in dialysis patients receiving maintenance erythropoietin therapy. *J Am Soc Nephrol* 4(11):1874-1878; 1994.
70. Keppler, D.; Leier, I.; Jedlitschky, G.; Konig, J. ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP2. *Chem Biol Interact* 111-112:153-161; 1998.
71. Khusun, H.; Yip, R.; Schultink, W.; D., D. World Health Organization Hämoglobin Cut-off-Punkte für den Nachweis von Anämie sind für eine indonesische Bevölkerung Valid. *Journal of Nutrition*; 1999.
72. Kinirons, M. T.; O'Mahony, M. S. Drug metabolism and ageing. *Br J Clin Pharmacol* 57(5):540-544; 2004.
73. Klemm, K.; Eipel, C.; Cantre, D.; Abshagen, K.; Menger, M. D.; Vollmar, B. Multiple doses of erythropoietin impair liver regeneration by increasing TNF-alpha, the Bax to Bcl-xL ratio and apoptotic cell death. *PLoS One* 3(12):e3924; 2008.
74. Knobloch, D.; Ehnert, S.; Schyschka, L.; Büchler, P.; Schoenberg, M.; Kleeff, J.; Thasler, W. E.; Nussler, N. C.; Godoy, P.; Hengstler, J. and others. *Human Hepatocytes: Isolation, Culture & Quality Procedures*. 2011.
75. Koch-Weser, J.; Frishman, W. H. beta-Adrenoceptor antagonists: new drugs and new indications. *N Engl J Med* 305(9):500-506; 1981.
76. Krantz, S. B. Erythropoietin. *Blood* 77(3):419-434; 1991.
77. Lane, C. S.; Wang, Y.; Betts, R.; Griffiths, W. J.; Patterson, L. H. Comparative cytochrome P450 proteomics in the livers of immunodeficient mice using 18O stable isotope labeling. *Mol Cell Proteomics* 6(6):953-962; 2007.
78. Lappin, T. R.; Maxwell, A. P.; Johnston, P. G. EPO's alter ego: erythropoietin has multiple actions. *Stem Cells* 20(6):485-492; 2002.
79. Larson, A. M. *Drugs and the liver: Metabolism and mechanisms of injury Up ToDate*; 2011.
80. Le Minh, K.; Klemm, K.; Abshagen, K.; Eipel, C.; Menger, M. D.; Vollmar, B. Attenuation of inflammation and apoptosis by pre- and posttreatment of darbepoetin-alpha in acute liver failure of mice. *Am J Pathol* 170(6):1954-1963; 2007.
81. LeCluyse, E. L. Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *Eur J Pharm Sci* 13(4):343-368; 2001.
82. Lehnebach, N. Di Grégorio wegen Dopingbesitz angeklagt. *SpiegelOnline*; 2012.
83. Lehnebach, N. Drei Armstrong-Helfer lebenslang gesperrt. *SpiegelOnline*; 2012.
84. Li, A. P.; Reith, M. K.; Rasmussen, A.; Gorski, J. C.; Hall, S. D.; Xu, L.; Kaminski, D. L.; Cheng, L. K. Primary human hepatocytes as a tool for the evaluation of structure-activity relationship in cytochrome P450 induction potential of xenobiotics: evaluation of rifampin, rifapentine and rifabutin. *Chem Biol Interact* 107(1-2):17-30; 1997.
85. Liang, K.; Esteva, F. J.; Albarracin, C.; Stemke-Hale, K.; Lu, Y.; Bianchini, G.; Yang, C. Y.; Li, Y.; Li, X.; Chen, C. T. and others. Recombinant human erythropoietin antagonizes trastuzumab treatment of breast cancer cells via Jak2-mediated Src activation and PTEN inactivation. *Cancer Cell* 18(5):423-435; 2010.
86. Lindner, M. Epo in der Medizin Die gute Seite des Bösen. *Die Zeit online*; März 2009.
87. Liou, Y. H.; Lin, C. T.; Wu, Y. J.; Wu, L. S. The high prevalence of the poor and ultrarapid metabolite alleles of CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, and CYP3A5 in Taiwanese population. *J Hum Genet* 51(10):857-863; 2006.

Verzeichnisse

88. Lipsic, E.; Schoemaker, R. G.; van der Meer, P.; Voors, A. A.; van Veldhuisen, D. J.; van Gilst, W. H. Protective effects of erythropoietin in cardiac ischemia: from bench to bedside. *J Am Coll Cardiol* 48(11):2161-2167; 2006.
89. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-275; 1951.
90. Macdougall, I. C. Darbepoetin alfa: a new therapeutic agent for renal anemia. *Kidney Int Suppl* (80):55-61; 2002.
91. Macdougall, I. C. An overview of the efficacy and safety of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Nephrol Dial Transplant* 16 Suppl 3:14-21; 2001.
92. Marti, H. H. Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol* 207(Pt 18):3233-3242; 2004.
93. Masubuchi, Y.; Nakano, T.; Ose, A.; Horie, T. Differential selectivity in carbamazepine-induced inactivation of cytochrome P450 enzymes in rat and human liver. *Arch Toxicol* 75(9):538-543; 2001.
94. Masuda, S.; Nagao, M.; Takahata, K.; Konishi, Y.; Gallyas, F., Jr.; Tabira, T.; Sasaki, R. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem* 268(15):11208-11216; 1993.
95. Maxwell, P. H.; Osmond, M. K.; Pugh, C. W.; Heryet, A.; Nicholls, L. G.; Tan, C. C.; Doe, B. G.; Ferguson, D. J.; Johnson, M. H.; Ratcliffe, P. J. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int* 44(5):1149-1162; 1993.
96. McGrath, J. C.; Cowan, D. A. Drugs in sport. *Br J Pharmacol* 154(3):493-495; 2008.
97. Meyer, U. A. Overview of enzymes of drug metabolism. *J Pharmacokinet Biopharm* 24(5):449-459; 1996.
98. Miskowiak, K. W.; Vinberg, M.; Harmer, C. J.; Ehrenreich, H.; Kessing, L. V. Erythropoietin: a candidate treatment for mood symptoms and memory dysfunction in depression. *Psychopharmacology (Berl)* 219(3):687-698; 2012.
99. Miura, Y.; Miura, O.; Ihle, J. N.; Aoki, N. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the erythropoietin receptor. *J Biol Chem* 269(47):29962-29969; 1994.
100. Miyake, T.; Kung, C. K.; Goldwasser, E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 252(15):5558-5564; 1977.
101. Mizutani, T. PM frequencies of major CYPs in Asians and Caucasians. *Drug Metab Rev* 35(2-3):99-106; 2003.
102. Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Ruth, P.; Schäfer-Korting, M. Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie 9. vollständig bearbeitete und erweiterte Auflage ed: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2008; 2008.
103. Nelson, D. R. The cytochrome p450 homepage. *Hum Genomics* 4(1):59-65; 2009.
104. Nelson, D. R. Cytochrome P450 nomenclature, 2004. *Methods Mol Biol* 320:1-10; 2006.
105. Nussler, A. K.; Wang, A.; Neuhaus, P.; Fischer, J.; Yuan, J.; Liu, L.; Zeilinger, K.; Gerlach, J.; Arnold, P. J.; Albrecht, W. The suitability of hepatocyte culture models to study various aspects of drug metabolism. *ALTEX* 18(2):91-101; 2001.
106. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267(17):5421-5426; 2000.
107. Ogu, C. C.; Maxa, J. L. Drug interactions due to cytochrome P450. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 13(4):421-423; 2000.
108. Park, B. K.; Pirmohamed, M.; Kitteringham, N. R. The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacol Ther* 68(3):385-424; 1995.
109. Pascual, J. A.; Belalcazar, V.; de Bolos, C.; Gutierrez, R.; Llop, E.; Segura, J. Recombinant erythropoietin and analogues: a challenge for doping control. *Ther Drug Monit* 26(2):175-179; 2004.
110. Patnaik, M. M.; Tefferi, A. The complete evaluation of erythrocytosis: congenital and acquired. *Leukemia* 23(5):834-844; 2009.

Verzeichnisse

111. Penta, K.; Sawyer, S. T. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation, nuclear translocation, and DNA binding of STAT1 and STAT5 in erythroid cells. *J Biol Chem* 270(52):31282-31287; 1995.
112. Prass, K.; Scharff, A.; Ruscher, K.; Lowl, D.; Muselmann, C.; Victorov, I.; Kapinya, K.; Dirnagl, U.; Meisel, A. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke* 34(8):1981-1986; 2003.
113. Prescott, L. F. Paracetamol, alcohol and the liver. *Br J Clin Pharmacol* 49(4):291-301; 2000.
114. Radtke-Schuller, S.; Bartels, H. Leber, Schwein - übersicht. 2003-2011.
115. Rassow, J.; Hauser, K.; Netzker, R.; Deutzmann, R. Duale Reihe: Biochemie. Thieme Verlag, Stuttgart 2008; 2008.
116. Recny, M. A.; Scoble, H. A.; Kim, Y. Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. Identification of des-arginine 166 erythropoietin. *J Biol Chem* 262(35):17156-17163; 1987.
117. Reichel, C. Recent developments in doping testing for erythropoietin. *Anal Bioanal Chem* 401(2):463-481; 2011.
118. Rizzo, J. D.; Brouwers, M.; Hurley, P.; Seidenfeld, J.; Arcasoy, M. O.; Spivak, J. L.; Bennett, C. L.; Bohlius, J.; Evanchuk, D.; Goode, M. J. and others. American society of clinical oncology/american society of hematology clinical practice guideline update on the use of epoetin and darbepoetin in adult patients with cancer. *J Clin Oncol* 28(33):4996-5010; 2010.
119. Robert S. Hoffman, L. S. N., Mary Ann Howland, Neal A. Lewin, Neal E. Flomenbaum, Lewis R. Goldfrank. *Goldfrank's Manual of Toxicologic Emergencies*, 8 ed: McGraw-Hill, New York 2006; 2006.
120. Rupertus, K.; Sperling, J.; Corsten, M.; Scheuer, C.; Nickels, R. M.; Schilling, M. K.; Menger, M. D.; Kollmar, O. Darbepoetin-alpha enhances hepatectomy-associated stimulation of colorectal liver metastatic growth. *Ann Surg* 252(1):131-141; 2010.
121. Sangar, M. C.; Anandatheerthavarada, H. K.; Tang, W.; Prabu, S. K.; Martin, M. V.; Dostalek, M.; Guengerich, F. P.; Avadhani, N. G. Human liver mitochondrial cytochrome P450 2D6-- individual variations and implications in drug metabolism. *FEBS J* 276(13):3440-3453; 2009.
122. Santhanam, A. V.; d'Uscio, L. V.; Katusic, Z. S. Cardiovascular effects of erythropoietin an update. *Adv Pharmacol* 60:257-285; 2010.
123. Schmeding, M.; Boas-Knoop, S.; Lippert, S.; Ruehl, M.; Somasundaram, R.; Dagdelen, T.; Neuhaus, P.; Neumann, U. P. Erythropoietin promotes hepatic regeneration after extended liver resection in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 23(7 Pt 1):1125-1131; 2008.
124. Schmitz, S. *Der Experimentator: Zellkultur*, 3 ed: Springer Verlag, Berlin 2011; 2011.
125. Schnitzer, T. J. Update of ACR guidelines for osteoarthritis: role of the coxibs. *J Pain Symptom Manage* 23(4 Suppl):S24-30; discussion S31-24; 2002.
126. Scordo, M. G.; Akillu, E.; Yasar, U.; Dahl, M. L.; Spina, E.; Ingelman-Sundberg, M. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in a Caucasian and a black African population. *Br J Clin Pharmacol* 52(4):447-450; 2001.
127. Serafin, A.; Fernandez-Zabalegui, L.; Prats, N.; Wu, Z. Y.; Rosello-Catafau, J.; Peralta, C. Ischemic preconditioning: tolerance to hepatic ischemia-reperfusion injury. *Histol Histopathol* 19(1):281-289; 2004.
128. Sharma, A.; Yee, J.; Gandra, S. R.; Khan, I.; Petersen, J. Estimate of maintenance EPO to darbepoetin alfa dose conversion ratio in a hospital-based dialysis patient population. *Curr Med Res Opin* 26(11):2679-2687; 2010.
129. Sigal, M.; Siebert, N.; Zechner, D.; Menschikow, E.; Abshagen, K.; Vollmar, B.; Eipel, C. Darbepoetin-alpha inhibits the perpetuation of necro-inflammation and delays the progression of cholestatic fibrosis in mice. *Lab Invest* 90(10):1447-1456; 2010.
130. Smith, K. J.; Bleyer, A. J.; Little, W. C.; Sane, D. C. The cardiovascular effects of erythropoietin. *Cardiovasc Res* 59(3):538-548; 2003.
131. Stein, A.; Knodler, M.; Makowski, M.; Kuhnel, S.; Nekolla, S.; Keithahn, A.; Weidl, E.; Groha, P.; Schurmann, M.; Saraste, A. and others. Local erythropoietin and endothelial progenitor

Verzeichnisse

- cells improve regional cardiac function in acute myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord* 10:43; 2010.
132. Thieme, D.; Hemmersbach, P. *Handbook of Experimental Pharmacology - Doping in sports*, 1 ed: Springer, Berlin 2009; 2009.
 133. Tong, W.; Zhang, J.; Lodish, H. F. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood* 105(12):4604-4612; 2005.
 134. Triolo, G. [Guidelines for the treatment of anemia in chronic renal failure]. *G Ital Nefrol* 20 Suppl 24:S61-82; 2003.
 135. Vaziri, N. D.; Zhou, X. J.; Naqvi, F.; Smith, J.; Oveisi, F.; Wang, Z. Q.; Purdy, R. E. Role of nitric oxide resistance in erythropoietin-induced hypertension in rats with chronic renal failure. *Am J Physiol* 271(1 Pt 1):E113-122; 1996.
 136. Verbeek, R. K. Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with hepatic dysfunction. *Eur J Clin Pharmacol* 64(12):1147-1161; 2008.
 137. Voigt, W. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods Mol Med* 110:39-48; 2005.
 138. von Lindern, M.; Parren-van Amelsvoort, M.; van Dijk, T.; Deiner, E.; van den Akker, E.; van Emst-de Vries, S.; Willems, P.; Beug, H.; Lowenberg, B. Protein kinase C alpha controls erythropoietin receptor signaling. *J Biol Chem* 275(44):34719-34727; 2000.
 139. von Lindern, M.; Schmidt, U.; Beug, H. Control of erythropoiesis by erythropoietin and stem cell factor: a novel role for Bruton's tyrosine kinase. *Cell Cycle* 3(7):876-879; 2004.
 140. W. Forth, D. H., W. Rummel. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 9 ed: Elsevier GmbH, Urban & Fisher, München 2004; 2004.
 141. Wahlbeck, K.; Cheine, M.; Essali, A.; Adams, C. Evidence of clozapine's effectiveness in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am J Psychiatry* 156(7):990-999; 1999.
 142. Wang, P. W.; Ketter, T. A. Clinical use of carbamazepine for bipolar disorders. *Expert Opin Pharmacother* 6(16):2887-2902; 2005.
 143. Watkins, P. B. Drug metabolism by cytochromes P450 in the liver and small bowel. *Gastroenterol Clin North Am* 21(3):511-526; 1992.
 144. Watowich, S. S.; Mikami, A.; Busche, R. A.; Xie, X.; Pharr, P. N.; Longmore, G. D. Erythropoietin receptors that signal through Stat5 or Stat3 support fetal liver and adult erythropoiesis: lack of specificity of stat signals during red blood cell development. *J Interferon Cytokine Res* 20(12):1065-1070; 2000.
 145. Weidemann, A.; Johnson, R. S. Nonrenal regulation of EPO synthesis. *Kidney Int* 75(7):682-688; 2009.
 146. Welsch, U. *Lehrbuch Histologie*, 2 ed: Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München 2006; 2006.
 147. Westenfelder, C.; Baranowski, R. L. Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. *Kidney Int* 58(2):647-657; 2000.
 148. Wiame, I.; Remy, S.; Swennen, R.; Sagi, L. Irreversible heat inactivation of DNase I without RNA degradation. *Biotechniques* 29(2):252-254, 256; 2000.
 149. Wrighton, S. A.; VandenBranden, M.; Ring, B. J. The human drug metabolizing cytochromes P450. *J Pharmacokinet Biopharm* 24(5):461-473; 1996.
 150. Xu, C.; Li, C. Y.; Kong, A. N. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* 28(3):249-268; 2005.
 151. Yang, C. W.; Li, C.; Jung, J. Y.; Shin, S. J.; Choi, B. S.; Lim, S. W.; Sun, B. K.; Kim, Y. S.; Kim, J.; Chang, Y. S. and others. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB J* 17(12):1754-1755; 2003.
 152. Yasuda, Y.; Fujita, Y.; Masuda, S.; Musha, T.; Ueda, K.; Tanaka, H.; Fujita, H.; Matsuo, T.; Nagao, M.; Sasaki, R. and others. Erythropoietin is involved in growth and angiogenesis in malignant tumours of female reproductive organs. *Carcinogenesis* 23(11):1797-1805; 2002.
 153. Yilmaz, S.; Ates, E.; Tokyol, C.; Pehlivan, T.; Erkasap, S.; Koken, T. The protective effect of erythropoietin on ischaemia/reperfusion injury of liver. *HPB (Oxford)* 6(3):169-173; 2004.
 154. Yoshimura, A.; Lodish, H. F. In vitro phosphorylation of the erythropoietin receptor and an associated protein, pp130. *Mol Cell Biol* 12(2):706-715; 1992.

Verzeichnisse

155. Yuan, J.; Liu, L.; Shimada, M.; Wang, A.; Ruhnke, M.; Heeckt, P.; Muller, A. R.; Nussler, N. C.; Neuhaus, P.; Nussler, A. Induction, expression and maintenance of cytochrome P450 isoforms in long-term cultures of primary human hepatocytes. *ALTEX* 21 Suppl 3:3-11; 2004.
156. Zevin, S.; Benowitz, N. L. Drug interactions with tobacco smoking. An update. *Clin Pharmacokinet* 36(6):425-438; 1999.
157. Zhang, W.; Parentau, H.; Greenly, R. L.; Metz, C. A.; Aggarwal, S.; Wainer, I. W.; Tracy, T. S. Effect of protein-calorie malnutrition on cytochromes P450 and glutathione S-transferase. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 24(2):141-147; 1999.

10 Danksagung

- Mein Dank gilt im Besonderen Prof. Nüssler, der mich stets unterstützt, gefordert und gefördert hat, dieses spannende Projekt zu bewältigen. Daneben danke ich Frau Dr. Sabrina Ehnert für die Einführung in wissenschaftliches Arbeiten und für konstruktive Kritik.
- Weiterhin bedanke ich mich sehr bei den beiden Postdocs Frau Dr. Lilianna Schyschka und Frau Dr. Claudine Seeliger. Sie halfen mir bei schwierigeren Analysen, Aufarbeitungen der Ergebnisse und gaben mir Hilfestellung bei der Verfassung meiner Arbeit. Vor allem aber danke ich beiden für Ihre Freundschaft und die aufmunternden Worte in den richtigen Momenten☺.
- Dem ganzen Laborteam sei gedankt für die schöne Zeit und gute Zusammenarbeit. Auch Fritz Seidl danke ich für seine Unterstützung in organisatorischen Fragen. An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Marina Unger für ihre Geduld, Hilfe und natürlich für ihre Freundschaft bedanken.
- Fabian Schmidt und Jan Neumann danke ich für die gemeinsame Zeit im und außerhalb des Labors, Hilfestellungen bei medizinischen Fragen und natürlich die Freundschaft seit Studienbeginn!!!
- Mein Dank gilt natürlich auch meiner geliebten Familie und meiner Freundin Hannah Winkelmann, die mich in Rat und Tat unterstützt haben und mir immer zur Seite standen!!!
- Abschließend bedanke ich mich bei meinem ehemaligen Chemielehrer Herrn Uwe Harmel. Er weckte das Interesse für die Naturwissenschaften in mir. Außerdem gelang ihm der Spagat zwischen wissenschaftlicher Lehre und Weitergabe von Lebensweisheiten, sowie unterschiedlichster Betrachtungsweisen für ein und dieselbe Sache, erscheint sie noch so banal...