

# **Rolle der nukleären Rezeptoren CAR und PXR bei der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme sowie der Hemmung der UV- induzierten Apoptose durch nicht-dioxinartige PCBs**

Dem Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern  
zur Verleihung des akademischen Grades „Doktor der  
Naturwissenschaften“ genehmigte

**Dissertation**

**(D386)**



vorgelegt von

Diplom-Biophysikerin  
**Maike Wolf**

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 29.10.2020

Kaiserslautern, 2020

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation wurde im Zeitraum von Juni 2010 bis Oktober 2013 an der Technischen Universität Kaiserslautern im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk durchgeführt.

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 28.11.2012

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 29.10.2020

Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Helmut Sitzmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk

2. Berichterstatter: Jun.-Prof. Dr. Alexander Cartus

---

# Inhaltsverzeichnis

|   |            |
|---|------------|
| <b>Inhaltsverzeichnis</b> .....                         | <b>I</b>   |
| <b>Kurzzusammenfassung</b> .....                        | <b>V</b>   |
| <b>Abstract</b> .....                                   | <b>VI</b>  |
| <b>Abbildungsverzeichnis</b> .....                      | <b>VII</b> |
| <b>Tabellenverzeichnis</b> .....                        | <b>X</b>   |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....                      | <b>XI</b>  |
| <b>1 Einleitung</b> .....                               | <b>1</b>   |
| <b>2 Theoretischer Hintergrund</b> .....                | <b>3</b>   |
| <b>2.1 Fremdstoffmetabolismus</b> .....                 | <b>3</b>   |
| <b>2.2 Cytochrom-P450-Enzyme</b> .....                  | <b>5</b>   |
| <b>2.3 Nukleäre Rezeptoren</b> .....                    | <b>7</b>   |
| 2.3.1 Aufbau und Struktur .....                         | 7          |
| 2.3.2 Der konstitutive Androstan-Rezeptor (CAR) .....   | 8          |
| 2.3.3 Der Pregnan-X-Rezeptor (PXR) .....                | 10         |
| 2.3.4 Crosstalk von CAR und PXR .....                   | 12         |
| <b>2.4 Induktoren von CAR und PXR</b> .....             | <b>14</b>  |
| 2.4.1 Phenobarbital .....                               | 14         |
| 2.4.2 Dexamethason .....                                | 15         |
| 2.4.3 Polychlorierte Biphenyle (PCBs) .....             | 16         |
| 2.4.3.1 Dioxinartige und nicht-dioxinartige PCBs .....  | 17         |
| 2.4.3.2 Anwendung und Exposition .....                  | 19         |
| 2.4.3.3 Toxikologische Relevanz .....                   | 19         |
| 2.4.3.4 Toxizitätsäquivalent-Faktoren (TEF) .....       | 20         |
| <b>2.5 Chemische Kanzerogenese</b> .....                | <b>21</b>  |
| 2.5.1 Mehrstufenmodell der Kanzerogenese .....          | 21         |
| 2.5.2 Bedeutung der Apoptose in der Kanzerogenese ..... | 23         |
| <b>2.6 Apoptose – der programmierte Zelltod</b> .....   | <b>23</b>  |
| 2.6.1 Caspasen .....                                    | 25         |
| 2.6.2 Apoptotische Signalwege .....                     | 26         |
| 2.6.2.1 Der extrinsische Signalweg .....                | 26         |
| 2.6.2.2 Der intrinsische Signalweg .....                | 27         |
| <b>3 Zielsetzung</b> .....                              | <b>29</b>  |
| <b>4 Materialien und Methoden</b> .....                 | <b>31</b>  |
| <b>4.1 Materialien</b> .....                            | <b>31</b>  |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.1.1 Chemikalien und Reagenzien .....  | 31        |
| 4.1.2 Geräte und Materialien .....  | 34        |
| <b>4.2 Methoden .....</b>   | <b>36</b> |
| 4.2.1 NDL-PCBs .....  | 36        |
| 4.2.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung .....   | 36        |
| 4.2.3 Isolierung von Rattenhepatozyten nach Meredith .....  | 36        |
| 4.2.4 Bestimmung der Gesamt- und Lebendzellzahl der primären Hepatozyten .....  | 40        |
| 4.2.5 Herstellung der Kollagenlösung .....  | 41        |
| 4.2.6 Kollagenieren von 24-Well-Platten und Petrischalen .....  | 41        |
| 4.2.7 Kultivierung und Behandlung der Hepatozyten .....   | 41        |
| 4.2.8 Small interfering RNA (siRNA) .....   | 44        |
| 4.2.9 Resazurin-Reduktionstest .....  | 45        |
| 4.2.10 Isolierung der RNA .....   | 47        |
| 4.2.11 Bestimmung der Quantität der RNA .....   | 48        |
| 4.2.12 Bestimmung der Qualität der RNA .....  | 48        |
| 4.2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....  | 50        |
| 4.2.13.1 Reverse Transkription .....  | 51        |
| 4.2.13.2 Quantitative Real-Time PCR .....   | 51        |
| 4.2.14 Mikrosomenpräparation .....  | 54        |
| 4.2.15 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....  | 55        |
| 4.2.16 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....  | 56        |
| 4.2.17 Western Blot und Immunoblot .....  | 57        |
| 4.2.17.1 Western Blot .....   | 57        |
| 4.2.17.2 Immunoblot .....   | 59        |
| 4.2.17.3 Antikörperentfernung (Stripping) .....   | 61        |
| 4.2.18 Immunzytochemie und Epifluoreszenzmikroskopie .....  | 61        |
| 4.2.19 Chromatinfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) .....  | 63        |
| 4.2.20 Caspase-Assay .....  | 63        |
| 4.2.21 Statistische Auswertung .....  | 65        |
| <b>5 Ergebnisse und Diskussion .....</b>  | <b>67</b> |
| <b>5.1 Einfluss von Phenobarbital und Dexamethason auf die Expression von CYP2B1<br/>    und CYP3A1 .....</b>               | <b>68</b> |
| <b>5.2 Einfluss der NDL-PCBs auf die Expression von CYP2B1 und CYP3A1 .....</b>   | <b>73</b> |
| <b>5.3 Inhibition der nukleären Rezeptoren CAR und PXR mittels small interfering RNA<br/>    (siRNA) .....</b>              | <b>79</b> |
| 5.3.1 Überprüfung der Effektivität der CAR- und PXR-siRNA .....   | 79        |
| 5.3.2 Bedeutung von CAR und PXR für die Induktion der CYP2B1- und CYP3A1-mRNA<br>durch Phenobarbital und Dexamethason ..... | 82        |

|  |            |
|--|------------|
| 5.3.3 Bedeutung von CAR und PXR für die Induktion der CYP2B1- und CYP3A1-mRNA durch NDL-PCBs .....   | 86         |
| 5.3.4 Bedeutung der Funktion von CAR und PXR für die Proteinexpression von CYP2B1 und CYP3A1 .....   | 90         |
| <b>5.4 Einfluss von Okadainsäure und Ketoconazol auf die CAR- bzw. PXR-vermittelte Induktion von CYP2B1 und CYP3A1 .....</b>                               | <b>98</b>  |
| 5.4.1 Überprüfung der Zytotoxizität von Okadainsäure in primären Rattenhepatozyten .....   | 98         |
| 5.4.2 Einfluss von Okadainsäure auf die basale Induktion von CYP2B1 und CYP3A1 sowie nach Applikation von Phenobarbital und Dexamethason .....             | 101        |
| 5.4.3 Einfluss von Okadainsäure auf die NDL-PCB-vermittelte Induktion von CYP2B1 und CYP3A1 .....  | 104        |
| 5.4.4 Überprüfung der Zytotoxizität von Ketoconazol in primären Rattenhepatozyten .....  | 107        |
| 5.4.5 Einfluss von Ketoconazol auf die basale Induktion von CYP2B1 und CYP3A1 sowie nach Applikation von Phenobarbital und Dexamethason .....              | 108        |
| 5.4.6 Einfluss von Ketoconazol auf die NDL-PCB-vermittelte Induktion von CYP2B1 und CYP3A1 .....   | 112        |
| 5.4.7 Effekt von Okadainsäure und Ketoconazol auf die basale Proteinexpression von CYP2B1 und CYP3A1 .....   | 114        |
| 5.4.8 Effekt von Okadainsäure und Ketoconazol auf die Induktion der CYP2B1-Proteinexpression durch Phenobarbital und NDL-PCBs .....                        | 116        |
| 5.4.9 Effekt von Okadainsäure und Ketoconazol auf die Induktion der CYP3A1-Proteinexpression durch Dexamethason und NDL-PCBs .....                         | 119        |
| <b>5.5 Einfluss eines aktivierten PXR auf die CYP2B1-Expression und von CAR-Induktoren auf die CYP3A1-Expression .....</b>                                 | <b>122</b> |
| <b>5.6 Zusammenfassendes Modell bezüglich der Rezeptor-abhängigen Induktion von CYP2B1 und CYP3A1 durch Phenobarbital, Dexamethason und NDL-PCBs .....</b> | <b>124</b> |
| <b>5.7 Einfluss von Phenobarbital, Dexamethason und NDL-PCBs auf die induzierte Apoptose und die Kanzerogenese .....</b>                                   | <b>125</b> |
| 5.7.1 Analyse der Apoptoserate mittels DAPI .....  | 127        |
| 5.7.1.1 Einfluss von Phenobarbital und Dexamethason auf die UV-induzierte Apoptose in primären Rattenhepatozyten .....                                     | 129        |
| 5.7.1.2 Einfluss der NDL-PCBs auf die UV-induzierte Apoptose in primären Rattenhepatozyten .....   | 142        |
| 5.7.2 Analyse der Apoptoserate anhand der UV-induzierten Aktivität verschiedener Caspasen .....  | 150        |
| 5.7.2.1 Einfluss von Phenobarbital und Dexamethason auf die UV-induzierte Aktivität verschiedener Caspasen in primären Rattenhepatozyten .....             | 151        |
| 5.7.2.2 Einfluss der NDL-PCBs auf die UV-induzierte Aktivität verschiedener Caspasen in primären Rattenhepatozyten .....                                   | 154        |

|  |            |
|--|------------|
| 5.7.3 Analyse der Bedeutung von CAR und PXR für die Tumorpromotor-bedingte Hemmung der UV-induzierten Apoptose anhand spezifischer siRNAs .....                            | 157        |
| 5.7.3.1 Bedeutung von CAR und PXR für die Phenobarbital- und Dexamethason-bedingte Inhibition der UV-induzierten Apoptose sowie der Aktivität verschiedener Caspasen ..... | 159        |
| 5.7.3.2 Bedeutung von CAR und PXR für die NDL-PCB-bedingte Inhibition der UV-induzierten Apoptose sowie der Aktivität verschiedener Caspasen .....                         | 167        |
| <b>6 Zusammenfassung und Ausblick .....</b>  | <b>175</b> |
| <b>7 Literatur .....</b>   | <b>182</b> |
| <b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>   | <b>205</b> |
| <b>Danksagung .....</b>  | <b>206</b> |
| <b>Lebenslauf .....</b>  | <b>207</b> |

## Kurzzusammenfassung

Polychlorierte Biphenyle (PCBs) zählen aufgrund ihrer chemischen Stabilität sowie der toxischen Eigenschaften zu den persistenten organischen Schadstoffen. Im Gegensatz zu den dioxinartigen PCBs ist über die nicht-dioxinartigen (NDL) Verbindungen jedoch nur wenig bekannt. Ihre Wirkung wurde entsprechend jener von Phenobarbital bisher vorwiegend auf eine Aktivierung des konstitutiven Androstan-Rezeptors (CAR) zurückgeführt und mit den fremdstoffmetabolisierenden Enzymen CYP2B1 und CYP3A1 assoziiert. Da zwischen dem CAR und dem Pregnan-X-Rezeptor (PXR), welcher vor allem mit der Induktion von CYP3A-Isoenzymen in Verbindung gebracht wird, jedoch ein komplexer Crosstalk besteht, sollte in primären Rattenhepatozyten anhand spezifischer siRNAs zunächst analysiert werden, ob die ausgewählten, hoch aufgereinigten NDL-PCBs 28, 52, 101, 138, 153 und 180 ihre Effekte hinsichtlich einer Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme auch über den PXR entfalten. Anschließend sollten die Effekte der NDL-PCBs mit jenen des CAR-Aktivators Phenobarbital sowie mit dem PXR-Agonisten Dexamethason verglichen werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit detektierte Induktion von CYP2B1 und CYP3A1 durch Phenobarbital wird hierbei vornehmlich über den CAR vermittelt, während dem PXR für diese Induktionen bestenfalls eine geringe Rolle zugesprochen werden kann. Die CYP3A1-Expression durch Dexamethason wird dagegen erwartungsgemäß über den Pregnan-X-Rezeptor reguliert. Die durch die NDL-PCBs vermittelte Expression von CYP2B1 wird wiederum ähnlich wie bei Phenobarbital über den CAR reguliert, jedoch scheinen sich die NDL-PCBs in Bezug auf die CYP3A1-Expression von einer klassischen Induktion vom Phenobarbital-Typ abzugrenzen. So fällt die CYP3A1-Expression durch die NDL-PCBs im Vergleich zu jener von Phenobarbital signifikant höher aus und wird im Falle der NDL-PCBs zwar ebenfalls zum Großteil über den CAR reguliert, allerdings wird diese Induktion im Gegensatz zu Phenobarbital zum Teil auch über den PXR vermittelt. Das Induktionsvermögen der jeweiligen NDL-PCBs konnte hierbei weitgehend mit ihrem Chlorierungsgrad bzw. der zugehörigen Hydrophobizität in Verbindung gebracht werden. Zudem vermag der PXR die CAR-regulierte CYP2B1- und CYP3A1-Expression durch Phenobarbital sowie die NDL-PCBs effektiv zu stören, wohingegen der CAR keinen solch starken Einfluss auf die PXR-vermittelte CYP3A1-Expression durch Dexamethason zu besitzen scheint.

Da viele Induktoren fremdstoffmetabolisierender Enzyme nachweislich auch als potente Tumorpromotoren in der Rattenleber fungieren, allerdings die NDL-PCBs und gerade solche Substanzen, die spezifisch den PXR aktivieren, in Bezug auf ihre tumorigenen Eigenschaften bisher nur unzureichend charakterisiert sind, wurden weiterhin die antiapoptotischen Eigenschaften der NDL-PCBs untersucht. Hierbei konnte sowohl für die NDL-PCBs als auch für Phenobarbital und Dexamethason ein hemmender Einfluss auf die UV-induzierte Apoptose in primären Rattenhepatozyten beobachtet werden, wobei der überwiegende Teil der NDL-PCB-bedingten Apoptoseinhibition wieder dem CAR zugesprochen werden kann. Im Gegensatz zu Phenobarbital, dessen Wirkung ausschließlich über den CAR reguliert wird, leistet jedoch auch der PXR bei den NDL-PCBs wieder einen Beitrag zu deren antiapoptotischen Effekten. Sowohl bei der NDL-PCB-bedingten Apoptosehemmung als auch bei der Induktion von CYP3A1 sind CAR und PXR demnach im jeweils gleichen Verhältnis beteiligt. Obwohl der PXR jedoch die über CAR regulierte CYP2B1- und CYP3A1-Expression effektiv inhibiert, trat dieser Effekt hingegen nicht bei der CAR-vermittelten Hemmung der Apoptose auf. Dies legt wiederum den Schluss nahe, dass zwischen der NDL-PCB-bedingten Apoptosehemmung und der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme keine hinreichende Korrelation besteht.

Während für den Menschen bisher kein erhöhtes Lebertumorrisiko infolge einer chronischen Exposition gegenüber Phenobarbital gefunden werden konnte, konnte für den PXR-Agonisten Dexamethason dagegen auch ein Einfluss auf die Apoptose in humanen Hepatozyten nachgewiesen werden. In Anbetracht dessen, dass auch der PXR mit der NDL-PCB-bedingten Apoptosehemmung in Verbindung gebracht wird, muss auch ein möglicher Einfluss der nicht-dioxinartigen PCBs auf die Kanzerogenese beim Menschen in Betracht gezogen werden.

---

## Abstract

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are among the persistent organic pollutants due to their chemical stability and toxic properties. In contrast to dioxinlike PCBs, the non-dioxinlike (NDL) compounds and their mode of action are less characterized. Corresponding to those of phenobarbital, their effects have been attributed to an activation of the constitutive androstane receptor (CAR) and are associated with the drug metabolizing enzymes CYP2B1 and CYP3A1. However, there exists a complex crosstalk between CAR and the pregnane X receptor (PXR), which is mainly associated with the induction of CYP3A isoenzymes. Therefore, using specific siRNAs targeting CAR and PXR in primary rat hepatocytes, it should be analyzed whether the selected, highly purified NDL-PCBs 28, 52, 101, 138, 153 and 180 also exert their effects on the induction of drug metabolizing enzymes via the pregnane X receptor. Subsequently, the effects of the NDL-PCBs were to be compared with those of the CAR activator phenobarbital and the PXR agonist dexamethasone.

The detected induction of CYP2B1 and CYP3A1 by phenobarbital is mediated by CAR, whereas the PXR can be assigned at best a minor role for these induction processes. In contrast, the expression of CYP3A1 by dexamethasone is exclusively regulated by the pregnane X receptor. The expression of CYP2B1 mediated by the NDL-PCBs is in turn regulated by CAR in a similar way to the prototype inducer phenobarbital, but with regard to CYP3A1 expression, the NDL-PCBs appear to act distinct from a classical phenobarbital-type induction. Thus, on the one hand, the CYP3A1 expression mediated by the NDL-PCBs is significantly higher than that of phenobarbital. On the other hand, the CYP3A1 induction mediated by the NDL-PCBs is as well mainly under the regulation of the constitutive androstane receptor, but in contrast to phenobarbital, this induction is also partly mediated by the pregnane X receptor. The induction capacity of the respective NDL-PCBs was found to be positively correlated with their degree of chlorination or the corresponding hydrophobicity. Furthermore, the PXR is able to effectively interfere with the CAR-regulated CYP2B1 and CYP3A1 expression by phenobarbital as well as the NDL-PCBs, whereas the constitutive androstane receptor does not seem to have such a strong influence on the PXR-mediated CYP3A1 expression by dexamethasone.

Many inducers of enzymes metabolizing xenobiotic substances have also been shown to act as potent tumor promoters in rat liver. Since the NDL-PCBs and especially those substances that specifically activate the PXR have not been sufficiently characterized with respect to their tumorigenic properties, the anti-apoptotic potential of the NDL-PCBs was further investigated. An inhibitory effect on UV-induced apoptosis in primary rat hepatocytes could be observed for NDL-PCBs as well as for phenobarbital and dexamethasone, whereby the majority of the NDL-PCB-related inhibition of apoptosis can be attributed to CAR again. In contrast to phenobarbital, whose effect is exclusively regulated by CAR, the pregnane X receptor also contributes to the anti-apoptotic effects of the NDL-PCBs. CAR and PXR are therefore involved at the same ratio in both NDL-PCB-related inhibition of apoptosis and in the induction of CYP3A1. However, although PXR effectively inhibits CAR-regulated CYP2B1 and CYP3A1 expression, this effect did not occur in CAR-mediated inhibition of apoptosis. This, in turn, suggests that there is no adequate correlation between the NDL-PCB-related inhibition of apoptosis and the induction of drug metabolizing enzymes.

While no increased risk of liver tumors as a result of chronic exposure to phenobarbital has been found in humans so far, the PXR agonist dexamethasone, in contrast, has been shown to have an inhibitory effect on apoptosis in human hepatocytes. Considering that the pregnane X receptor is also associated with NDL-PCB-related inhibition of apoptosis, a potential impact of non-dioxinlike PCBs on human carcinogenesis has to be considered in human risk assessment.

---

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| 1: Phasen des Fremdstoffmetabolismus .....  | 3  |
| 2: Katalytischer Zyklus von Cytochrom P450 .....  | 6  |
| 3: Schematische Darstellung der Struktur eines nukleären Rezeptors .....  | 7  |
| 4: Aktivierung von CYP2B über CAR-Liganden bzw. indirekte Agonisten .....   | 9  |
| 5: Liganden-abhängige Aktivierung von PXR .....   | 11 |
| 6: Crosstalk von CAR und PXR .....  | 13 |
| 7: Strukturformel von Phenobarbital .....   | 14 |
| 8: Strukturformel von Dexamethason .....  | 15 |
| 9: Allgemeine Strukturformel der PCBs .....   | 16 |
| 10: Dioxinartiges PCB-Kongener mit koplanarer Konformation .....  | 17 |
| 11: Nicht-dioxinartiges PCB-Kongener mit verdrehter, gewinkelter Konformation .....   | 18 |
| 12: Vereinfachtes Mehrstufenmodell der Kanzerogenese .....  | 22 |
| 13: Morphologische Gegenüberstellung von Apoptose und Nekrose .....   | 24 |
| 14: Extrinsischer und intrinsischer Signalweg der Apoptose .....  | 26 |
| 15: Perfusionsaufbau für die Isolierung nach Meredith (1988) .....  | 37 |
| 16: Mechanismus des siRNA-induzierten mRNA-Abbaus .....   | 44 |
| 17: Umwandlung von Resazurin zu Resorufin .....   | 46 |
| 18: Schema des Temperaturprogramms für die Reverse Transkription .....  | 51 |
| 19: Schema des Temperaturprogramms für die qRT-PCR .....  | 53 |
| 20: Aufbau des Blotting-Stapels .....   | 58 |
| 21: Expressionsprofil von CYP2B1 und CYP3A1 nach Inkubation mit Phenobarbital und<br>Dexamethason .....   | 69 |
| 22: Expressionsprofil von CYP2B1 nach Inkubation mit verschiedenen NDL-PCBs .....   | 74 |
| 23: Expressionsprofil von CYP3A1 nach Inkubation mit verschiedenen NDL-PCBs .....   | 77 |
| 24: Expression der CAR- und PXR-mRNA nach Inkubation mit NDL-PCBs, Phenobarbital und<br>Dexamethason sowie nach Hemmung der Rezeptoren durch CAR- bzw. PXR-siRNA . .....    | 80 |
| 25: Auswirkungen der Hemmung von CAR und PXR auf die Phenobarbital- und Dexamethason-<br>induzierte Expression von CYP2B1 und CYP3A1 .....                                  | 83 |
| 26: Schematisches Modell bezüglich der Rezeptor-abhängigen Induktionswege von CYP2B1<br>und CYP3A1 durch Phenobarbital und Dexamethason in primären Rattenhepatozyten ..... | 86 |
| 27: Auswirkungen der Hemmung von CAR und PXR auf die NDL-PCB-induzierte Expression<br>von CYP2B1 .....  | 87 |
| 28: Auswirkungen der Hemmung von CAR und PXR auf die NDL-PCB-induzierte Expression<br>von CYP3A1 .....  | 89 |
| 29: Immunzytochemische Analyse zur Auswirkung der Hemmung von CAR und PXR auf die<br>Phenobarbital-induzierte Proteinexpression von CYP2B1 .....                            | 91 |

---

|  |     |
|--|-----|
| 30: Immunzytochemische Analyse zur Auswirkung der Hemmung von CAR und PXR auf die durch NDL-PCBs induzierte Proteinexpression von CYP2B1 .....   | 93  |
| 31: Immunzytochemische Analyse zur Auswirkung der Hemmung von CAR und PXR auf die Dexamethason-induzierte Proteinexpression von CYP3A1 .....   | 94  |
| 32: Immunzytochemische Analyse zur Auswirkung der Hemmung von CAR und PXR auf die durch NDL-PCBs induzierte Proteinexpression von CYP3A1 .....   | 95  |
| 33: Repräsentative Western-Blot-Analyse zur Rolle von CAR und PXR bei der CYP2B1- und CYP3A1-Proteinexpression durch NDL-PCBs, Phenobarbital und Dexamethason .....                                    | 97  |
| 34: Einfluss von Okadainsäure auf die Vitalität der nach Meredith isolierten Rattenhepatozyten .....   | 100 |
| 35: Auswirkungen von Okadainsäure auf die basale sowie durch Phenobarbital und Dexamethason induzierte Expression von CYP2B1 bzw. CYP3A1 .....   | 102 |
| 36: Auswirkungen von Okadainsäure auf die durch NDL-PCBs induzierte Expression von CYP2B1 .....  | 105 |
| 37: Auswirkungen von Okadainsäure auf die durch NDL-PCBs induzierte Expression von CYP3A1 .....  | 106 |
| 38: Einfluss von Ketoconazol auf die Vitalität der nach Meredith isolierten Rattenhepatozyten.   | 108 |
| 39: Auswirkungen von Ketoconazol auf die basale sowie durch Phenobarbital und Dexamethason induzierte Expression von CYP2B1 bzw. CYP3A1 .....  | 110 |
| 40: Auswirkungen von Ketoconazol auf die durch NDL-PCBs induzierte Expression von CYP2B1 und CYP3A1 .....  | 113 |
| 41: Einfluss von Okadainsäure und Ketoconazol auf die basale CYP2B1- und CYP3A1-Proteinexpression .....  | 115 |
| 42: Beeinflussung der Phenobarbital-induzierten CYP2B1-Proteinexpression durch Okadainsäure und Ketoconazol .....  | 116 |
| 43: Hemmung der durch PCB 52 und 153 induzierten CYP2B1-Proteinexpression durch Okadainsäure und Ketoconazol .....   | 118 |
| 44: Beeinflussung der Dexamethason-induzierten CYP3A1-Proteinexpression durch Okadainsäure und Ketoconazol .....   | 120 |
| 45: Hemmung der durch die PCBs 52 und 153 induzierten CYP3A1-Proteinexpression durch Okadainsäure und Ketoconazol .....  | 121 |
| 46: Einfluss von Dexamethason auf die CYP2B1-Expression und von CAR-Induktoren auf die CYP3A1-Expression .....   | 122 |
| 47: Schematisches Modell bezüglich der Rezeptor-abhängigen Induktionswege von CYP2B1 und CYP3A1 durch Phenobarbital, Dexamethason und die nicht-dioxinartigen PCBs in primären Rattenhepatozyten ..... | 125 |
| 48: Fluoreszenzmikroskopische Analyse morphologischer Apoptosemerkmale mittels DAPI ..   | 128 |
| 49: Einfluss von Phenobarbital und Dexamethason auf die durch UV-Strahlung induzierte Apoptose in primären Rattenhepatozyten .....   | 129 |

---

|  |     |
|--|-----|
| 50: Einfluss der NDL-PCBs auf die durch UV-Strahlung induzierte Apoptose in primären Rattenhepatozyten .....   | 142 |
| 51: Untersuchung der Aktivität der Caspasen 3/7, 8 und 9 nach UV-Bestrahlung unter dem Einfluss von Phenobarbital und Dexamethason .....   | 152 |
| 52: Untersuchung der Aktivität der Caspasen 3/7, 8 und 9 nach UV-Bestrahlung unter dem Einfluss verschiedener NDL-PCBs .....   | 155 |
| 53: Bedeutung von CAR und PXR für die Hemmung der UV-induzierten Apoptose durch Phenobarbital und Dexamethason .....   | 160 |
| 54: Bedeutung von CAR und PXR für die Hemmung der UV-induzierten Caspase-Aktivität durch Phenobarbital und Dexamethason .....  | 162 |
| 55: Bedeutung von CAR und PXR für die Hemmung der UV-induzierten Apoptose durch verschiedene NDL-PCBs .....  | 168 |
| 56: Bedeutung von CAR und PXR für die Hemmung der UV-induzierten Caspase-Aktivität durch verschiedene NDL-PCBs .....   | 170 |
| 57: Schematische Darstellung der Rezeptor-abhängigen Induktion von CYP2B1 und CYP3A1 bzw. der Apoptosehemmung durch Phenobarbital, Dexamethason sowie die nicht-dioxinartigen PCBs ..... | 178 |

---

## Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| 1: Chemikalien und Reagenzien .....                                       | 31 |
| 2: Geräte und Materialien .....   | 34 |
| 3: Angabe der Reinheit sowie der TEQ-Werte der verwendeten NDL-PCBs ..... | 36 |
| 4: Perfusionslösungen .....   | 38 |
| 5: Williams' E Aussaatmedium .....  | 42 |
| 6: Williams' E Kulturmedium .....   | 42 |
| 7: Verwendete Konzentrationen der Inkubationssubstanzen .....             | 43 |
| 8: Lösungen für den Resazurin-Reduktionstest .....                        | 46 |
| 9: Lösungen für die RNA-Agarose-Gelelektrophorese .....                   | 49 |
| 10: Lösungen für die Mikrosomenpräparation .....                          | 54 |
| 11: Pipettierschema für die BSA-Eichgerade .....                          | 55 |
| 12: Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE .....                           | 56 |
| 13: 6x Ladepuffer für die SDS-PAGE .....                                  | 57 |
| 14: Zusammensetzung des 10x Elektrophorese-Puffers .....                  | 57 |
| 15: Zusammensetzung der Blotting-Puffer .....                             | 58 |
| 16: Zusammensetzung des Blocking-Puffers .....                            | 59 |
| 17: Zusammensetzung von TBS und TBS-T .....                               | 59 |
| 18: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper .....                       | 60 |
| 19: Chemilumineszenz-Detektionslösungen .....                             | 60 |
| 20: Zusammensetzung des Stripping-Puffers .....                           | 61 |
| 21: Verwendete Substanzen für die Epifluoreszenzmikroskopie .....         | 62 |
| 22: Verwendete Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe .....                 | 62 |
| 23: Zusammensetzung der DAPI-Färbelösung .....                            | 63 |
| 24: Verwendete Substrate für den Caspase-Assay .....                      | 64 |
| 25: Pipettierschema und Lösungen für den Caspase-Assay .....              | 64 |

## Abkürzungsverzeichnis

Folgende Abkürzungen wurden im Rahmen dieser Arbeit verwandt:

|                   |   |
|-------------------|---|
| <b>AAF</b>        | 2-Acetylaminofluoren  |
| <b>Abb.</b>       | Abbildung   |
| <b>ABC</b>        | <i>ATP-binding cassette</i>   |
| <b>ADH</b>        | Alkoholdehydrogenase  |
| <b>AF</b>         | aktivierende Funktion   |
| <b>AFC</b>        | 7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin   |
| <b>AhR</b>        | Arylhydrocarbon-Rezeptor  |
| <b>AMPK</b>       | AMP-aktivierte Proteinkinase  |
| <b>Apaf-1</b>     | <i>Apoptotic protease activating factor-1</i>   |
| <b>APS</b>        | Ammoniumperoxodisulfat  |
| <b>ATP</b>        | Adenosintriphosphat   |
| <b>Bad</b>        | <i>Bcl-2-associated agonist of cell death</i>   |
| <b>Bak</b>        | <i>Bcl-2 homologous antagonist / killer</i>   |
| <b>BaP</b>        | Benzo[a]pyren   |
| <b>Bax</b>        | <i>Bcl-2-associated X protein</i>   |
| <b>Bcl-2</b>      | <i>B-cell lymphoma 2</i>  |
| <b>BCRP</b>       | <i>Breast cancer resistance protein</i>   |
| <b>Bid</b>        | <i>BH3 interacting domain death agonist</i>   |
| <b>BSA</b>        | Bovines Serumalbumin  |
| <b>CAD</b>        | <i>Caspase-activated DNase</i>  |
| <b>CAR</b>        | konstitutiver Androstan-Rezeptor  |
| <b>Casp1</b>      | Caspase 1   |
| <b>Caspase</b>    | <i>Cysteiny l aspartate-specific protease</i>   |
| <b>CCD</b>        | <i>Charge coupled device</i>  |
| <b>Ccnd1</b>      | Cyclin D1   |
| <b>CCRP</b>       | <i>Cytoplasmic CAR retention protein</i>  |
| <b>Cdc2a</b>      | <i>Cell division cycle 2 homolog A</i>  |
| <b>cDNA</b>       | komplementäre DNA   |
| <b>cFLIP</b>      | <i>Cellular FLICE inhibitory protein</i>  |
| <b>CHAPS</b>      | 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat                                   |
| <b>CITCO</b>      | (6-(4-Chlorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehyde O-(3,4-dichlorobenzyl)oxime |
| <b>cm</b>         | Zentimeter  |
| <b>Ct</b>         | <i>Threshold cycle</i>  |
| <b>Ctnnb1</b>     | Catenin beta 1  |
| <b>Ctrl-siRNA</b> | Kontroll-siRNA  |
| <b>Cx43</b>       | Connexin 43   |
| <b>CYP</b>        | Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase  |
| <b>DABCO</b>      | 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan  |
| <b>DAPI</b>       | 4',6-Diamidin-2-phenylindol   |

---

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>DBD</b>              | DNA-Bindungsdomäne  |
| <b>ddH<sub>2</sub>O</b> | Doppelt destilliertes Wasser ( <i>aqua bidestillata</i> )             |
| <b>DEN</b>              | Diethylnitrosamin   |
| <b>DEPC</b>             | Diethylpyrocarbonat   |
| <b>Dexa</b>             | Dexamethason  |
| <b>DISC</b>             | <i>Death-inducing signaling complex</i>                               |
| <b>DL</b>               | dioxinartig   |
| <b>DMF</b>              | <i>N,N</i> -Dimethylformamid  |
| <b>DMSO</b>             | Dimethylsulfoxid  |
| <b>DNA</b>              | Desoxyribonukleinsäure  |
| <b>DR</b>               | <i>Direct repeat</i>  |
| <b>DTT</b>              | 1,4-Dithiothreitol  |
| <b>EC<sub>50</sub></b>  | mittlere effektive Konzentration                                      |
| <b>ECT2</b>             | <i>Epithelial cell transforming 2</i>                                 |
| <b>EDTA</b>             | Ethylendiamintetraessigsäure  |
| <b>EFSA</b>             | European Food Safety Authority  |
| <b>EGTA</b>             | Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure |
| <b>EMSA</b>             | <i>Electrophoretic mobility shift assay</i>                           |
| <b>ER</b>               | <i>Everted repeat</i>   |
| <b>ERK</b>              | <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>                         |
| <i>et al.</i>           | <i>et alii</i> (dt.: und andere)                                      |
| <b>FADD</b>             | <i>Fas-associated death domain</i>                                    |
| <b>F-Aktin</b>          | filamentöses Aktin  |
| <b>FMO</b>              | Flavinabhängige Monooxygenase   |
| <b>FoxO3a</b>           | <i>Forkhead box protein O3a</i>                                       |
| <b>g</b>                | Gramm   |
| <i>g</i>                | Erdbeschleunigung ( $\approx 9,81 \text{ m/s}^2$ )                    |
| <b>GABA</b>             | $\gamma$ -Aminobuttersäure  |
| <b>GADD45</b>           | <i>Growth arrest and DNA-damage-inducible 45</i>                      |
| <b>Gas1</b>             | <i>Growth arrest specific 1</i>                                       |
| <b>GJIC</b>             | interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions                       |
| <b>Gmnn</b>             | <i>Geminin</i>  |
| <b>°C</b>               | Grad Celsius  |
| <b>GRIP</b>             | Glutamatrezeptor-interagierendes Protein                              |
| <b>GST</b>              | Glutathion-S-Transferase  |
| <b>h</b>                | Stunde  |
| <b>Ha-ras</b>           | <i>Harvey rat sarcoma oncogene</i>                                    |
| <b>hCAR</b>             | humaner CAR   |
| <b>HEPES</b>            | <i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure      |
| <b>hPXR</b>             | humaner PXR   |
| <b>HRP</b>              | Meerrettich-Peroxidase  |
| <b>HSP90</b>            | <i>Heat shock protein 90</i>  |
| <b>IARC</b>             | Internationale Agentur für Krebsforschung                             |
| <b>IC<sub>50</sub></b>  | mittlere inhibitorische Konzentration                                 |
| <b>IEB</b>              | <i>Isotonic extraction buffer</i>                                     |
| <b>J</b>                | Joule   |

---

|               |   |
|---------------|---|
| <b>Keto</b>   | Ketoconazol   |
| <b>kg</b>     | Kilogramm   |
| <b>KG</b>     | Körpergewicht   |
| <b>l</b>      | Liter   |
| <b>LDB</b>    | Ligand-Bindungsdomäne   |
| <b>M</b>      | Molar (1M = 1 mol/l)  |
| <b>mA</b>     | Milliampere   |
| <b>MAO</b>    | Monoaminoxidase   |
| <b>Mdm2</b>   | <i>Murine double minute 2 homolog</i>                                   |
| <b>MDR</b>    | <i>Multi drug resistance protein</i>                                    |
| <b>mg</b>     | Milligramm  |
| <b>µg</b>     | Mikrogramm  |
| <b>min</b>    | Minute  |
| <b>MKP-1</b>  | <i>Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1</i>                   |
| <b>ml</b>     | Milliliter  |
| <b>µl</b>     | Mikroliter  |
| <b>mM</b>     | Millimolar  |
| <b>µm</b>     | Mikrometer  |
| <b>µM</b>     | Mikromolar  |
| <b>MOPS</b>   | 3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure                              |
| <b>MPA</b>    | Medroxyprogesteronacetat  |
| <b>mRNA</b>   | Messenger-RNA   |
| <b>MRP</b>    | <i>Multi drug resistance-related protein</i>                            |
| <b>MW</b>     | arithmetischer Mittelwert   |
| <b>Myc</b>    | Myelocytomatose-Onkogen   |
| <b>n</b>      | Anzahl der unabhängig durchgeführten Experimente                        |
| <b>NADH</b>   | Nicotinamidadenindinukleotid  |
| <b>NADPH</b>  | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat                                    |
| <b>NAT</b>    | <i>N</i> -Acetyltransferase   |
| <b>NCS</b>    | Neugeborenen-Kälberserum  |
| <b>NDL</b>    | nicht-dioxinartig   |
| <b>NF-κB</b>  | <i>Nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> |
| <b>ng</b>     | Nanogramm   |
| <b>NGFI-B</b> | <i>Nerve growth factor I-B</i>  |
| <b>NGS</b>    | Normales Ziegenserum  |
| <b>nm</b>     | Nanometer   |
| <b>nM</b>     | Nanomolar   |
| <b>NR</b>     | nukleärer Rezeptor  |
| <b>OAT</b>    | <i>Organic anion transporter</i>  |
| <b>OATP</b>   | <i>Organic anion transporting polypeptide</i>                           |
| <b>Oka</b>    | Okadainsäure  |
| <b>OTC</b>    | <i>Organic cation transporter</i>                                       |
| <b>p</b>      | Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert                      |
| <b>PAGE</b>   | Polyacrylamid-Gelelektrophorese   |
| <b>PARP</b>   | Poly(ADP-Ribose)-Polymerase   |
| <b>PB</b>     | Phenobarbital   |

---

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>PBREM</b>      | <i>Phenobarbital responsive enhancer module</i>                    |
| <b>PBS</b>        | <i>Phosphate buffered saline</i>                                   |
| <b>PCBs</b>       | Polychlorierte Biphenyle   |
| <b>PCDDs</b>      | Polychlorierte Dibenzodioxine                                      |
| <b>PCDFs</b>      | Polychlorierte Dibenzofurane                                       |
| <b>PCN</b>        | Pregnenolon-16 $\alpha$ -carbonitril                               |
| <b>PCR</b>        | Polymerase-Kettenreaktion  |
| <b>PGC</b>        | Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\gamma$ Coaktivator   |
| <b>PI3K</b>       | Phosphoinositid-3-Kinase   |
| <b>PIPES</b>      | Piperazin- <i>N,N'</i> -bis-(2-ethansulfonsäure)                   |
| <b>POPs</b>       | Persistente organische Schadstoffe                                 |
| <b>PP1</b>        | Protein-Phosphatase 1  |
| <b>PP2A</b>       | Protein-Phosphatase 2A   |
| <b>PPAR</b>       | Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor                        |
| <b>PROD</b>       | 7-Pentoxyresorufin- <i>O</i> -Depentylase                          |
| <b>PT</b>         | <i>Permeability transition</i>                                     |
| <b>PVDF</b>       | Polyvinylidenfluorid   |
| <b>PXR</b>        | Pregnan-X-Rezeptor   |
| <b>qRT-PCR</b>    | quantitative Real-Time PCR   |
| <b>raf</b>        | <i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>                            |
| <b>RISC</b>       | <i>RNA-induced silencing complex</i>                               |
| <b>RNA</b>        | Ribonukleinsäure   |
| <b>ROR1</b>       | <i>Receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1</i>             |
| <b>ROS</b>        | reaktive Sauerstoffspezies   |
| <b>rPXR</b>       | PXR der Ratte  |
| <b>RT</b>         | Raumtemperatur   |
| <b>RXR</b>        | Retinoid-X-Rezeptor  |
| <b>s</b>          | Sekunde  |
| <b>SD</b>         | Standardabweichung   |
| <b>SDS</b>        | Natriumdodecylsulfat   |
| <b>SGK-1</b>      | <i>Serum and GC-inducible protein kinase-1</i>                     |
| <b>siRNA</b>      | <i>small interfering RNA</i>                                       |
| <b>SLC</b>        | <i>Solute carriers</i>   |
| <b>SMRT</b>       | <i>Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor</i> |
| <b>SRC</b>        | Steroidrezeptor Coaktivator  |
| <b>STK11/LKB1</b> | Serin-Threonin-Kinase 11 / Leberkinase B1                          |
| <b>Stlsg.</b>     | Stammlösung  |
| <b>SULT</b>       | Sulfotransferase   |
| <b>SXR</b>        | Steroid- und Xenobiotika-Rezeptor                                  |
| <b>tBid</b>       | <i>truncated Bid</i>   |
| <b>TBS</b>        | <i>Tris-buffered saline</i>  |
| <b>TBS-T</b>      | <i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>                          |
| <b>TCDD</b>       | 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin                       |
| <b>TCPOBOP</b>    | 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen                          |
| <b>TEF</b>        | Toxizitätsäquivalent-Faktoren                                      |
| <b>TEMED</b>      | <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin                         |

---

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Temp.</b>                  | Temperatur   |
| <b>TEQ</b>                    | Toxizitätsäquivalente  |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b> | <i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i>                         |
| <b>TIF</b>                    | transkriptioneller intermediärer Faktor                                      |
| <b>TNF</b>                    | <i>Tumor necrosis factor</i>   |
| <b>TRAIL</b>                  | <i>Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>               |
| <b>Tris</b>                   | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  |
| <b>TUNEL</b>                  | <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling</i> |
| <b>UDP</b>                    | Uridindiphosphat   |
| <b>UGT</b>                    | UDP-Glucuronosyltransferase  |
| <b>UV</b>                     | Ultraviolette Strahlung  |
| <b>V</b>                      | Volt   |
| <b>VDAC</b>                   | <i>Voltage-dependent anion channel</i>                                       |
| <b>Wee1</b>                   | <i>Wee 1 homolog</i>   |
| <b>WHO</b>                    | Weltgesundheitsorganisation  |
| <b>XREM</b>                   | <i>Xenobiotic responsive enhancer module</i>                                 |

# 1 Einleitung

Tagtäglich ist der Mensch einer großen Menge an Fremdstoffen und Chemikalien ausgesetzt, die aufgrund unseres hohen Lebensstandards und als Folge der Industrialisierung in die Umwelt gelangen. Zu solchen Kontaminanten gehören u. a. auch die polychlorierten Biphenyle (PCBs), die angesichts ihrer chemischen Stabilität sowie ihrer toxischen Eigenschaften zu den persistenten organischen Schadstoffen (POPs) gezählt werden (Jones und de Voogt, 1999). Obwohl sie Ende der 1980er Jahre in den meisten Industrieländern verboten wurden, sind sie weiterhin ubiquitär in der Umwelt verbreitet (Safe, 1994). Wegen ihrer ausgeprägten Lipophilie einerseits und der geringen Abbaubarkeit andererseits reichern sie sich in der Nahrungskette an, woraus sich vor allem über den Verzehr fetthaltiger, tierischer Lebensmittel eine Belastung für den menschlichen Organismus ergibt (Beyer und Biziuk, 2009).

Unter dem Begriff der polychlorierten Biphenyle werden 209 verschiedene Kongenere zusammengefasst, die sich anhand der Position bzw. der Anzahl an Chlorverbindungen an ihrem Biphenylgerüst unterscheiden. Entsprechend ihrer chemischen Struktur werden sie hierbei in zwei Gruppen unterteilt: Die kleinere Gruppe stellen dabei die 12 dioxinartigen PCBs (DL-PCBs) dar, welche strukturelle und toxikologische Gemeinsamkeiten mit den Dioxinen haben und vornehmlich an den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) binden (Safe, 1990; EFSA, 2005).

90 Prozent der Kongenere und damit die wesentlich größere Gruppe fällt jedoch unter die nicht-dioxinartigen PCBs (NDL-PCB), die vor allem mit dem konstitutiven Androstan-Rezeptor (CAR) bzw. dem Pregnan-X-Rezeptor (PXR) in Verbindung gebracht werden. Diese nukleären Rezeptoren regulieren einerseits die Transkription zahlreicher fremdstoffmetabolisierender Enzyme und Transporter, wodurch sie eine wichtige Funktion bei den Entgiftungsprozessen in der Leber einnehmen (Pascussi *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010; Pustylnyak *et al.*, 2007). Andererseits sind sie allerdings auch an der Regulation von Wachstum, Differenzierung und Zelltod beteiligt (Hernandez *et al.*, 2009; Rudraiah *et al.*, 2016) und werden mit tumorpromovierenden Eigenschaften assoziiert (Yamamoto *et al.*, 2004).

Im Gegensatz zu den dioxinartigen Verbindungen kam den NDL-PCBs bisher jedoch nur wenig Aufmerksamkeit zu, so dass das Wissen über ihre Auswirkungen v. a. auf die menschliche Gesundheit in vielen Aspekten noch immer begrenzt ist. Hinzu kommt, dass kommerziell erhältliche NDL-PCB-Produkte zumeist mit dioxinartigen Verunreinigungen kontaminiert sind, wodurch eine einwandfreie Zuordnung der jeweiligen Effekte zusätzlich erschwert wird (Viluksela *et al.*, 2014).

Vor dem Hintergrund einer lebenslangen Exposition und der potentiell toxikologisch relevanten physiologischen Vorgänge ist es erforderlich, mehr über die Wirkungsweise der NDL-PCBs zu

erfahren, so dass wichtige Grundvoraussetzungen für eine fundierte Risikoanalyse und -bewertung geschaffen werden können.

Hierzu sollte in dieser Arbeit die Wirkung ausgewählter, hoch aufgereinigter NDL-PCBs zum einen hinsichtlich ihrer Effekte auf die über CAR und PXR regulierten fremdstoff-metabolisierenden Enzyme CYP2B1 und CYP3A1 untersucht werden, zum anderen sollten auch ihre tumorpromovierenden Eigenschaften anhand ihres Einflusses auf die UV-induzierte Apoptose ergründet werden. Weiterhin sollte durch die gezielte Inhibition von CAR und PXR mittels *small interfering RNAs* (siRNAs) bzw. einer Hemmung ihrer Signalwege mittels Okadainsäure und Ketoconazol analysiert werden, inwiefern diese Rezeptoren bei diesen beiden Prozessen eine Rolle spielen.

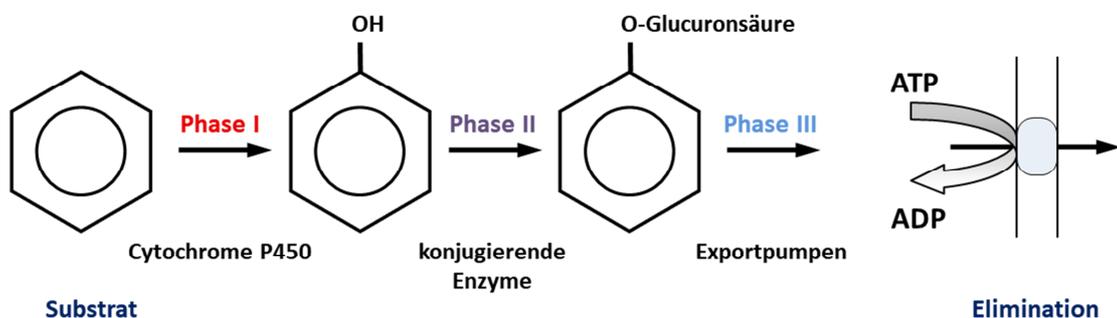
## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.1 Fremdstoffmetabolismus

Fortwährend nehmen wir über die Nahrung und die Umwelt zahllose Substanzen bzw. Fremdstoffe auf, die weder als Energielieferant dienen noch ohne weitere funktionelle Modifikationen ausgeschieden werden können. Hierzu zählen u. a. Lebensmittelzusatzstoffe, Pflanzeninhaltsstoffe oder Arznei- und Genussmittel, aber auch Kontaminanten und Umweltgifte wie Dioxine oder polychlorierte Biphenyle. Um einer schädlichen Anreicherung solcher Substanzen bzw. einer daraus resultierenden Störung physiologischer Funktionen entgegenzuwirken, ist eine effiziente Eliminierung von essenzieller Bedeutung. Hierbei dient der Fremdstoffmetabolismus als adaptive Antwort auf diese Exposition, indem er die Umwandlung von Fremdstoffen in ausscheidbare Metaboliten katalysiert und so toxische Effekte auf den Organismus minimiert (Handschin und Meyer, 2003; Scheer *et al.*, 2008).

Die Ausscheidung einer Substanz setzt in der Regel eine gewisse Hydrophilie voraus, andererseits werden allerdings gerade hydrophobe Substanzen besonders gut resorbiert. Um diese Diskrepanz auszugleichen, benötigen viele Fremdstoffe aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften eine metabolische Transformation zu hydrophileren Derivaten (Gao und Xie, 2010). Die grundsätzliche Vorgehensweise zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit einer Substanz stellt ihre Konjugation mit hydrophilen, endogenen Verbindungen wie etwa Glucuronsäure, Glutathion oder aktiviertem Sulfat dar. Für eine solche Konjugation ist jedoch initial die Existenz einer geeigneten funktionellen Gruppe erforderlich, welche häufig zunächst in das Fremdstoffmolekül eingeführt werden muss (Marquardt und Schäfer, 2004; di Masi *et al.*, 2009).

Die beim Fremdstoffmetabolismus überwiegend in der Leber ablaufenden Reaktionen können hierbei im Wesentlichen in drei Phasen unterteilt werden (Abb. 1).



**Abb. 1: Phasen des Fremdstoffmetabolismus** (modifiziert nach Schrenk, 2006)

In Phase I des Fremdstoffmetabolismus erfolgt eine Funktionalisierung der Ausgangs-Verbindung, bei welcher polare funktionelle Gruppen wie z. B. –OH, –SH, –NH<sub>2</sub> oder –COOH gebildet oder neu in das Molekül eingeführt werden. Die so eingefügten funktionellen Gruppen können die Wasserlöslichkeit des Substrats bereits in einem ausreichenden Maß erhöhen, um eine renale oder biliäre Ausscheidung zu ermöglichen. Ansonsten dienen sie als „Ankergruppen“, so dass die entstandenen Metaboliten in weiteren Reaktionen zu polaren Stoffen umgewandelt werden können (Mutschler *et al.*, 2001; di Masi *et al.*, 2009).

Katalysiert werden die Phase I-Reaktionen unter anderem durch Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen (CYP), Flavinabhängige Monooxygenasen (FMO), Monoaminoxidasen (MAO), Alkoholdehydrogenasen (ADH) oder Esterasen (Marquardt und Schäfer, 2004; Eisenbrand *et al.*, 2005). Die wichtigste Enzymfamilie stellen hierbei die Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen dar (Kalra *et al.*, 2009), welche in Kapitel 2.2 ausführlich vorgestellt werden.

In Phase II erfahren die in das Molekül eingeführten bzw. bereits vorhandenen funktionellen Gruppen eine Konjugation mit einer hydrophilen, endogenen Verbindung (z. B. Glutathion oder Sulfat), um so eine bessere Ausscheidung zu ermöglichen. Enzyme, die diese Reaktionen katalysieren, sind unter anderem Glutathion-S-Transferasen (GST), UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT), Sulfotransferasen (SULT) oder N-Acetyltransferasen (NAT) (Omiecinski *et al.*, 2011).

In Phase III erfolgt anschließend die Ausscheidung des nun wasserlöslichen Substrats (Xu *et al.*, 2005). Zu den hierbei beteiligten Transportern zählen u. a. die Exportpumpen aus der Familie der ABC-Transporter (*ATP-binding cassette transporter*), z. B. MDR1 (*Multi drug resistance protein 1*), MRP1 (*Multi drug resistance-related protein 1*) oder BCRP (*Breast cancer resistance protein*). Als weitere Gruppe sind die SLC-Transporter (*Solute carriers*) wie OATs (*organic anion transporter*), OCTs (*organic cation transporter*) oder OATPs (*organic anion transporting polypeptide*) zu nennen (Yamazaki *et al.*, 1996; Mizuno *et al.*, 2003; di Masi *et al.*, 2009).

Letztendlich kann auf diese Weise der schädlichen Anreicherung von einer Reihe von Substanzen entgegengewirkt werden. Dennoch darf der Fremdstoffmetabolismus nicht gemeinhin als rein protektives System verstanden werden, da aus einigen Verbindungen erst infolge solcher enzymatischer Modifikationen toxische oder kanzerogene Stoffe hervorgehen können. Ein Beispiel für diesen als Giftung bezeichneten Prozess ist die Umwandlung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen wie beispielsweise Benzo[a]pyren zu ultimalen Kanzerogenen (Shimada, 2006).

Eine kritische Rolle spielt der Fremdstoffmetabolismus auch im Zuge der Entwicklung von Pharmaka, von denen einige ihre Wirksamkeit erst nach gezielter Metabolisierung entfalten sollen, während andererseits auch eine entsprechende Abschwächung ihrer Wirkung infolge von Wechselwirkungen berücksichtigt werden muss (Marquardt und Schäfer, 2004).

## 2.2 Cytochrom-P450-Enzyme

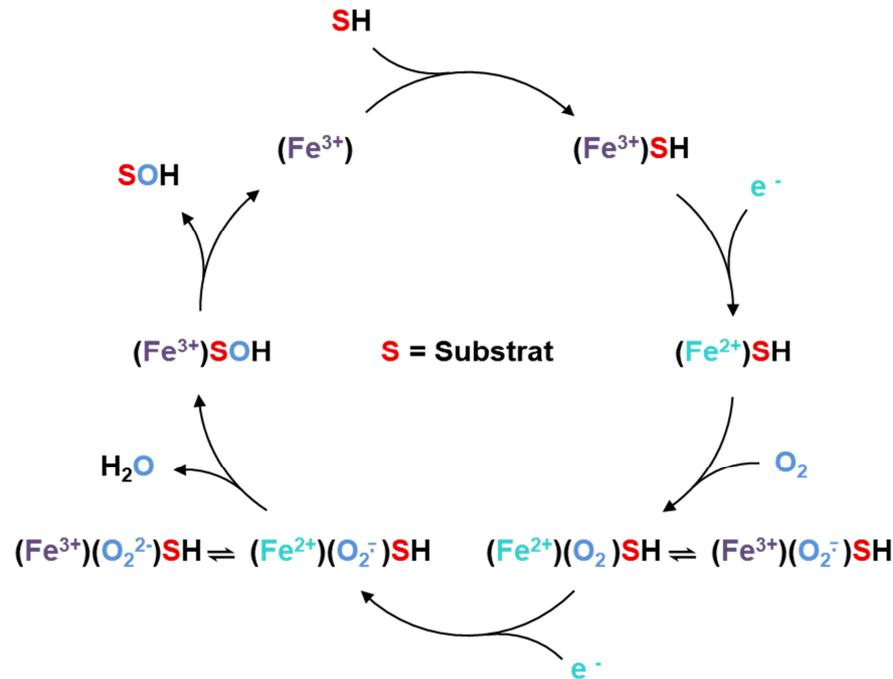
Die bedeutendste Enzymfamilie der Phase I des Fremdstoffmetabolismus stellen die Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen dar, bei welchen es sich um eine Superfamilie von Häm-Proteinen mit enzymatischer Oxidoreduktase-Aktivität handelt (Ioannides, 2006; Honkakoski und Negishi, 2000). Die durch sie katalysierten Biotransformationen finden in erster Linie in der Leber statt, allerdings sind CYPs in nahezu allen Geweben nachweisbar, insbesondere in der Niere, der Lunge, der Haut, der Plazenta, dem Gehirn oder im Intestinum (Nishimura *et al.*, 2003; Mutschler *et al.*, 2001).

Die Enzyme der Cytochrom-P450-Familie sind u. a. sowohl in die Synthese als auch den Abbau zahlreicher endogener Steroide, Vitamine oder Fettsäuren involviert, spielen aber auch bei der Metabolisierung von exogenen Fremdstoffen wie Arzneimitteln, Umweltgiften oder Kanzerogenen eine entscheidende Rolle (Honkakoski und Negishi, 2000). Ihren Namen erhielten sie aufgrund der spektrometrischen Eigenschaften der prominenten Häm-Gruppe im CYP( $\text{Fe}^{2+}$ )-CO-Komplex, welche ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 450 nm zeigt (Omura und Sato, 1962).

Die grundlegende enzymatische Aktivität der Monooxygenasen basiert hierbei auf dem Transfer eines Sauerstoffatoms auf das jeweilig gebundene Substrat, während das andere Atom des Sauerstoffmoleküls unter Verbrauch von NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) zu Wasser reduziert wird.

Für diese Reaktionen lagert sich das jeweilige Substratmolekül zunächst an das  $\text{Fe}^{3+}$ -Zentrum der Monooxygenase an und induziert die Übertragung eines Elektrons von der NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase (Eisenbrand *et al.*, 2005). Dies hat die Reduktion des im Häm gebundenen  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  zur Folge (Abb. 2), woraufhin die Affinität für molekularen Sauerstoff entsprechend erhöht wird. Nach anschließender Bindung eines Sauerstoffmoleküls erfolgt die Aufnahme eines weiteren Elektrons, was die Aktivierung des Sauerstoffs zur Folge hat. Die für die Funktionalisierungsreaktionen benötigten Reduktionsäquivalente werden hierbei wiederum von der NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase bereitgestellt (Ortiz de Montellano, 2010). Über den entstandenen, hochreaktiven Komplex erfolgt nun über instabile Zwischenstufen die Übertragung des Sauerstoffs auf das Substratmolekül, woraufhin  $\text{Fe}^{2+}$  wiederum zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert wird.

Infolge der abschließenden Abspaltung des oxygenierten Substratmoleküls kehrt das Häm wieder in seinen Ausgangszustand zurück, so dass das Cytochrom-P450-Enzym wieder für einen neuen Reaktionszyklus zur Verfügung steht (Eisenbrand *et al.*, 2005; Marquardt und Schäfer, 2004).



**Abb. 2: Katalytischer Zyklus von Cytochrom P450** (modifiziert nach Mutschler *et al.*, 2020; Gähns, 2010)

Die Einteilung der verschiedenen Cytochrom-P450-Enzyme erfolgt dabei auf Basis ihrer strukturellen Verwandtschaft entsprechend dem Grad ihrer Sequenzhomologie. Enzyme mit einer zu mehr als 40 % übereinstimmenden Aminosäuresequenz werden in einer Familie zusammengefasst und erhalten zur Kennzeichnung eine arabische Ziffer (Wandel *et al.*, 1994). Enzyme, deren Sequenz mehr als 55 % Übereinstimmung aufweist, bilden eine Unterfamilie und werden anhand von Großbuchstaben unterteilt. Innerhalb der Unterfamilien werden die Isoenzyme mit Hilfe weiterer Zahlen voneinander unterschieden, z. B. CYP1A1 bzw. CYP2B1 (Nelson *et al.*, 1996; Wrighton und Stevens, 1992). Humane Cytochrom-P450-Enzyme bzw. jene der Ratte werden hierbei großgeschrieben, murine CYPs werden dagegen durch Kleinschreibung angezeigt (z. B. Cyp2b10) (Nelson *et al.*, 1996).

Als wichtigste Vertreter für die Metabolisierung von Fremdstoffen und endogenen lipophilen Substanzen sind vor allem die Enzyme der Unterfamilien CYP1–4 zu nennen, die mehr als 90 % der verfügbaren Therapeutika metabolisieren (Wang und Tompkins, 2008; Marquardt und Schäfer, 2004).

Die Induktion der verschiedenen CYPs erfolgt dabei vorwiegend über die jeweilig zuständigen nukleären Rezeptoren. Der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) ist hierbei vor allem für die Induktion von CYP1A-Isoenzymen verantwortlich, die erhöhte Expression der *CYP2B*-Gene wird hingegen im Wesentlichen über den konstitutiven Androstan-Rezeptor (CAR) vermittelt. Der Pregnan-X-Rezeptor (PXR) und der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor (PPAR) regulieren vornehmlich die Expression der CYP3A- bzw. CYP4A-Isoenzyme (Waxman, 1999).

## 2.3 Nukleäre Rezeptoren

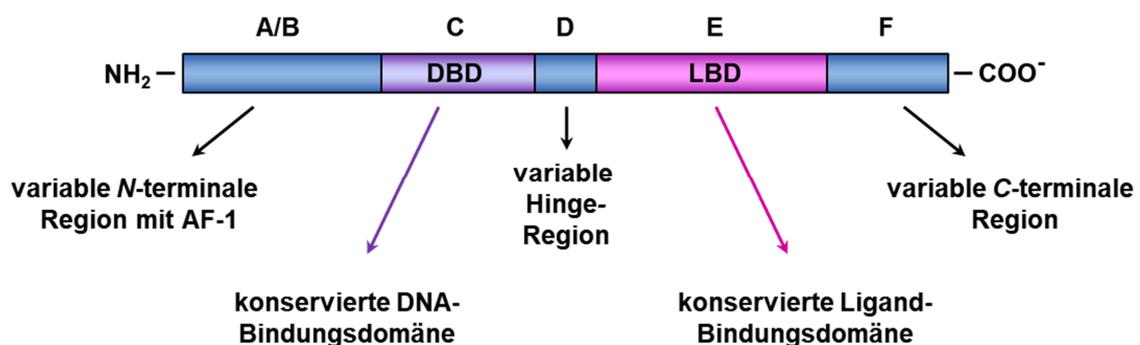
Die Superfamilie der nukleären Rezeptoren (NR) kodiert für eine große Gruppe Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktoren, welche sowohl durch zahlreiche Xenobiotika als auch durch verschiedene endogene, lipophile Substanzen aktiviert werden (Pascussi *et al.*, 2008; Tolson und Wang, 2010).

Aufgrund ihrer Fähigkeit, als Transkriptionsfaktoren auf die Genexpression zu wirken, stellen sie wichtige Elemente bei der Anpassung an Veränderungen des äußeren und inneren Milieus dar, da sie so z. B. eine gezielte Verstärkung des Fremdstoffmetabolismus auslösen können (Rosenfeld *et al.*, 2003; di Masi *et al.*, 2009). Weiterhin spielen sie eine wichtige Rolle bei der Differenzierung, der Reproduktion, der Hormonbiosynthese oder auch im Fettstoffwechsel (Konno *et al.*, 2008; Rudraiah *et al.*, 2016).

### 2.3.1 Aufbau und Struktur

Den nukleären Rezeptoren, welche gegenwärtig in die 6 Subgruppen NR1 bis NR6 unterteilt werden, ist eine modulare Struktur gemeinsam (Abb. 3), die sich aus mehreren verschiedenen Domänen (A-F) zusammensetzt (Reschly und Krasowski, 2006).

Hierbei besitzen sie vom *N*-Terminus beginnend eine regulierende (A/B) und eine hochkonservierte DNA-Bindungsdomäne (C), an die sich eine Hinge- (D) sowie eine Ligand-Bindungsdomäne (E) anschließt, gefolgt von einer abschließenden variablen Domäne (F) (Aranda und Pascual, 2001).



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Struktur eines nukleären Rezeptors.** DBD: DNA-Bindungsdomäne, LBD: Ligand-Bindungsdomäne (modifiziert nach Hart, 2002; Handschin und Meyer, 2003)

Den einzelnen Domänen können dabei verschiedene Funktionen der Rezeptoren zugeordnet werden, wobei die Regionen A/B und E/F eine aktivierende Funktion (AF-1 bzw. AF-2) enthalten (Moras und Gronemeyer, 1998). Diese Sequenzen werden von Coaktivatoren oder

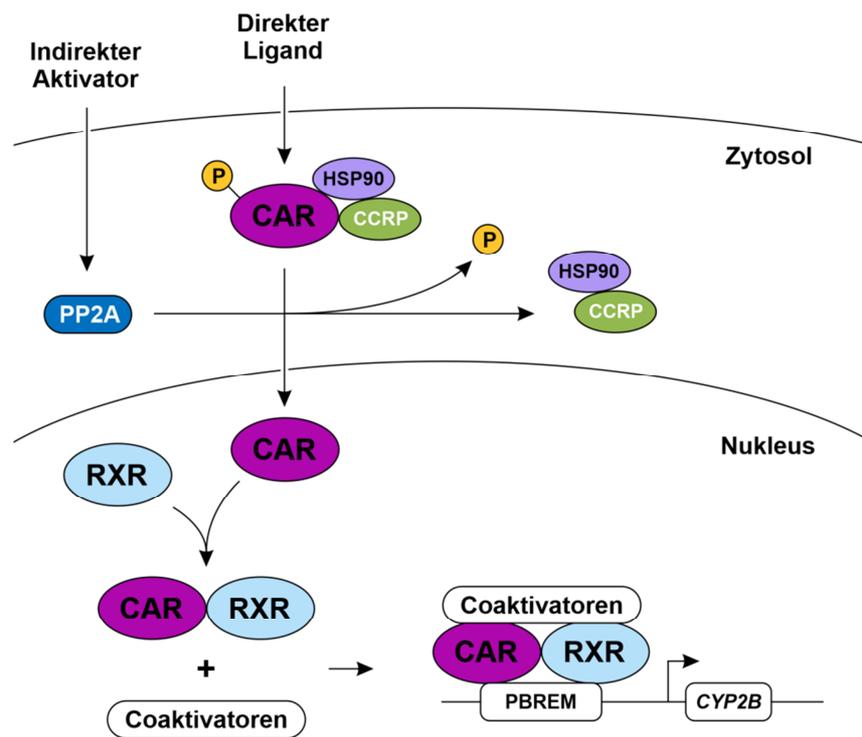
anderen Transkriptionsfaktoren erkannt und können durch Wechselwirkung mit der DNA-Bindungsdomäne (DBD) die Transkription aktivieren. Diese zwei Zinkfinger-Motive enthaltende DNA-Bindungsdomäne vermittelt hierbei die sequenzspezifische Bindung an responsive Elemente (Hart, 2002), wohingegen die Ligand-Bindungsdomäne (LBD) aus einer sandwichartigen Anordnung mehrerer  $\alpha$ -Helices besteht, durch die eine hydrophobe Bindungstasche für die Liganden geformt wird (Bourguet *et al.*, 2000). Zwischen der DNA-Bindungsdomäne und der Ligand-Bindungsdomäne existiert eine flexible Hinge-Domäne, die eine Vielzahl von Konformationen und somit eine gleichzeitige Bindung an Dimerisierungspartner und responsive Elemente ermöglicht. Die Dimerisierung erfolgt hierbei bei den meisten der zur NR1-Unterfamilie zugehörigen Rezeptoren, zu welchen auch der konstitutive Androstan-Rezeptor (CAR; NR1I3) und der Pregnan-X-Rezeptor (PXR; NR1I2) zählen, mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR). Nach Heterodimerisierung mit dem RXR erfolgt schließlich die Bindung an spezielle DNA-Sequenzen, die die Transkription der Zielgene veranlasst (Handschin und Meyer, 2003; Carnahan und Redinbo, 2005).

### 2.3.2 Der konstitutive Androstan-Rezeptor (CAR)

Der konstitutive Androstan-Rezeptor oder auch konstitutiv aktive Rezeptor spielt eine wichtige Rolle als Regulator des Fremdstoffmetabolismus. Als Antwort auf diverse Chemikalien induziert CAR hierbei zahlreiche hepatische Gene, deren Produkte für alle drei Phasen der Biotransformation von Relevanz sind (Swales und Negishi, 2004). Insbesondere sind hier unter anderem die CYP2B- und in geringerem Maße die CYP3A-Enzyme der Phase I zu nennen (Honkakoski *et al.*, 1998; Sueyoshi *et al.*, 1999; Goodwin *et al.*, 2002), darüber hinaus wird dem Rezeptor ebenfalls eine Bedeutung bei der Regulation der in Phase II aktiven UDP-Glucuronosyltransferasen, Sulfotransferasen oder Glutathion-S-Transferasen zugesprochen (Sugatani *et al.*, 2001; Ueda *et al.*, 2002; Pustylnyak *et al.*, 2007; di Masi *et al.*, 2009). Abgesehen von seiner Funktion im Fremdstoffmetabolismus ist CAR allerdings auch in zahlreiche weitere Prozesse wie die Fettsäureoxidation, Glukoneogenese oder die Sekretion von Steroidhormonen und Bilirubin involviert (Molnár *et al.*, 2013; Yang und Wang, 2014).

Wie in Abbildung 4 dargestellt, kann der konstitutive Androstan-Rezeptor durch zwei verschiedene Mechanismen aktiviert werden, und zwar sowohl Liganden-abhängig als auch durch einen indirekten Agonisten. In Abwesenheit eines Liganden oder indirekten Aktivators ist CAR im Zytoplasma lokalisiert, wo er gebunden in einem Komplex aus dem *cytoplasmic CAR retention protein* (CCRP) und dem *Heat shock protein 90* (HSP90) vorliegt (Kobayashi *et al.*, 2003; Timsit und Negishi, 2007).

Die Bindung eines Liganden bzw. die indirekte Aktivierung durch einen Agonisten führt zur Dissoziation von CAR aus diesem inhibitorischen Komplex, in dessen Folge die Translokation des Rezeptors in den Zellkern erfolgt (Pustylnyak *et al.*, 2007).



**Abb. 4: Aktivierung von CYP2B über CAR-Liganden bzw. indirekte Agonisten** (modifiziert nach Pustylnyak *et al.*, 2007)

Ein Beispiel für eine indirekte Aktivierung von CAR durch Substanzen, die keine direkte Bindung mit dem Rezeptor eingehen, ist der klassische CAR-Aktivator Phenobarbital (Kawamoto *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2000; Yang und Wang, 2014).

Dabei bleibt festzuhalten, dass der Mechanismus der indirekten Aktivierung von CAR noch nicht bis ins Detail aufgeklärt werden konnte (Kawamoto *et al.*, 1999; Pustylnyak *et al.*, 2007; Yang und Wang, 2014). So postulieren Blättler *et al.* (2007) ein Aktivierungsmodell, in dem Phenobarbital in den Mitochondrien von Hepatozyten eine Kinasekaskade auslöst, die über die Serin-Threonin-Kinase 11 / Leberkinase B1 (STK11/LKB1) bis zur AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) führt und letztlich die Protein-Phosphatase 2A (PP2A) aktiviert. Die PP2A dephosphoryliert daraufhin CAR, wodurch dessen Translokation in den Zellkern ermöglicht wird.

Auch bei der direkten Bindung eines Liganden an den konstitutiven Androstan-Rezeptor spielt die Rekrutierung der Protein-Phosphatase 2A eine wichtige Rolle, woraufhin der Rezeptor aus dem Komplex mit den Corepressoren dissoziiert und nach entsprechender Dephosphorylierung in den Nukleus transloziert (Yoshinari *et al.*, 2003; Pustylnyak *et al.*, 2007). Die Bedeutung der Protein-Phosphatase 2A konnte hierbei in mehreren Studien gezeigt werden, in denen der Übergang von CAR in den Zellkern durch den PP2A-Inhibitor

Okadainsäure repressiert werden konnte (Kawamoto *et al.*, 1999; Yoshinari *et al.*, 2003; Sidhu und Omiecinski, 1997; Honkakoski und Negishi, 1998).

Im Anschluss an die Translokation in den Zellkern erfolgt unter Einbeziehung von weiteren Coaktivatoren die Heterodimerisierung des konstitutiven Androstan-Rezeptors mit dem RXR (Retinoid-X-Rezeptor). Das entstandene CAR-RXR-Heterodimer fungiert als Transkriptionsfaktor, indem es mit dem *Phenobarbital responsive enhancer module* (PBREM) im Promotorbereich des Zielgens wechselwirkt (Sueyoshi und Negishi, 2001).

Durch die Rekrutierung der Coaktivatoren SRC-1 (Steroidrezeptor Coaktivator), PGC-1 (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\gamma$  Coaktivator), TIF2 (transkriptioneller intermediärer Faktor) oder GRIP1 (Glutamatrezeptor-interagierendes Protein) an die Ligand-Bindungsdomäne von CAR wird die Genexpression der CAR-Zielgene getriggert (Forman *et al.*, 1998; Sueyoshi und Negishi, 2001; Min *et al.*, 2002; Miao *et al.*, 2006). Als Konsequenz der Bindung des CAR-RXR-Heterodimers an die responsiven Elemente (DR4) kann anschließend die Transkription des Zielgens erfolgen (Zelko und Negishi, 2000; Sueyoshi und Negishi, 2001).

### **2.3.3 Der Pregnan-X-Rezeptor (PXR)**

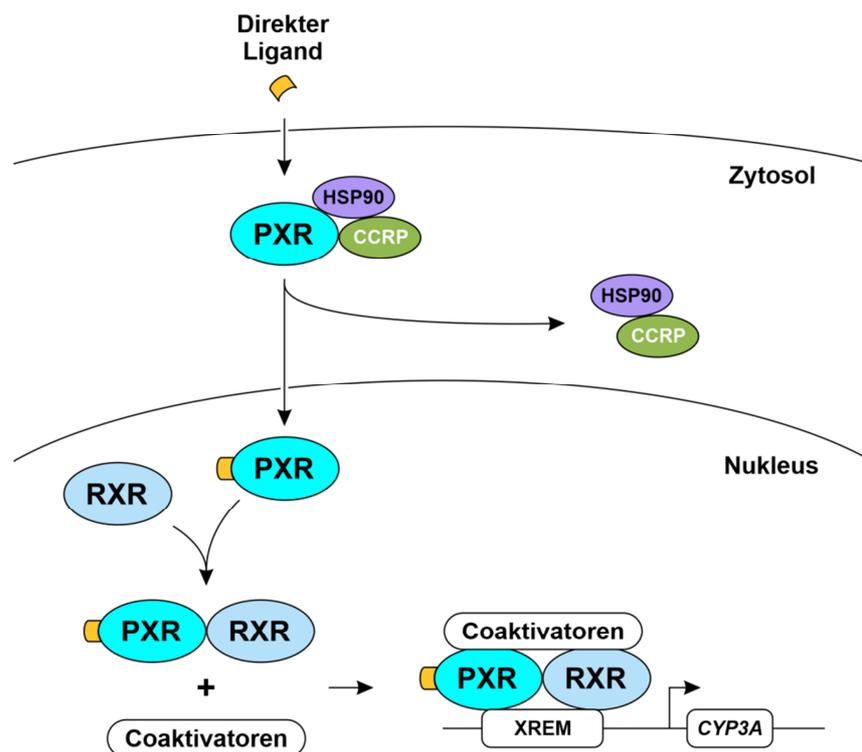
Beim Pregnan-X-Rezeptor (PXR) handelt es sich um einen Xenorezeptor mit hoher Promiskuität, der sowohl durch eine Reihe von Fremdstoffen wie Industriechemikalien, Arzneimittel oder Zusatzstoffe als auch durch Stoffe endogener Herkunft aktiviert wird (Ekins *et al.*, 2009). Aufgrund seiner Vielzahl an Liganden wird er oftmals auch als Steroid- und Xenobiotika-Rezeptor (SXR) bezeichnet (Blumberg *et al.*, 1998).

Begründet ist die Promiskuität des Rezeptors vor allem durch die einzigartige Struktur, Größe und Beweglichkeit seiner Liganden-Bindungstasche (Watkins *et al.*, 2001), wodurch diese in der Lage ist, ihre Form den spezifischen Liganden entsprechend anzupassen (Ekins *et al.*, 2009; Kliewer *et al.*, 2002). Typische PXR-Agonisten sind hierbei Arzneistoffe wie Rifampicin, Clotrimazol oder Tamoxifen (Lehmann *et al.*, 1998; Jacobs *et al.*, 2005), als endogene Liganden sind zahlreiche Pregnan-Steroide (Kliewer *et al.*, 1998) oder die sekundäre Gallensäure Lithocholsäure bekannt (Staudinger *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2001). Beispiele für aktivierende Umweltschadstoffe sind einige Organochlor-Pestizide sowie Industriechemikalien wie z. B. Flammenschutzmittel oder polychlorierte Biphenyle (Ma *et al.*, 2008b; Al-Salman und Plant, 2012).

Der PXR spielt somit neben dem Metabolismus von Fremdstoffen auch eine wichtige Rolle bei der Regulation einer Vielzahl von Genen, die bei endogenen Stoffwechselwegen wie der Cholesteroll-Homöostase bzw. der Entgiftung von Gallensäuren eine bedeutende Funktion ausüben (di Masi *et al.*, 2009).

Im Gegensatz zum konstitutiven Androstan-Rezeptor benötigt der Pregnan-X-Rezeptor zu seiner nachfolgenden Aktivierung die Bindung eines Liganden (Timsit und Negishi, 2007; Yang und Wang, 2014).

Im inaktivierten Zustand ist der Rezeptor im Zytoplasma lokalisiert, wo er gebunden in einem Komplex aus dem *cytoplasmic CAR retention protein* (CCRP) und dem *Heat shock protein 90* (HSP90) vorliegt (Squires *et al.*, 2004). Infolge einer Ligandenbindung dissoziieren die Corepressoren HSP90 und CCRP durch eine Konformationsänderung vom Rezeptor (Abb. 5), woraufhin der PXR/Liganden-Komplex in den Zellkern transloziert (di Masi *et al.*, 2009).



**Abb. 5: Liganden-abhängige Aktivierung von PXR** (modifiziert nach Timsit und Negishi, 2007)

Im Zellkern bildet der PXR ebenso wie CAR ein Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor und bindet in der Promotorregion seiner Zielgene an responsive Elemente (ER6 und DR3) innerhalb des *Xenobiotic responsive enhancer modules* (XREM). Aufgrund der daraufhin erfolgenden Veränderung der Chromatinstruktur sowie durch die Rekrutierung von entsprechenden Coaktivatoren wird anschließend die Transkription der Zielgene veranlasst (Lehmann *et al.*, 1998; Goodwin *et al.*, 2002; Timsit und Negishi, 2007). Da CAR und PXR viele gemeinsame Zielgene aufweisen, überschneiden sich dementsprechend auch einige der hierfür benötigten Cofaktoren wie z. B. SRC-1, GRIP1, TIF2 oder PGC-1 (di Masi *et al.*, 2009; Orans *et al.*, 2005).

Ähnlich wie die Vielfalt der Liganden ist auch die Zahl der Zielgene groß, vor allem die Expression der überaus wichtigen CYP3A-Unterfamilie wird überwiegend durch den Pregnan-X-Rezeptor reguliert (Goodwin *et al.*, 2002). So werden z. B. mehr als 50 % der gängigen Therapeutika durch CYP3A-Enzyme metabolisiert (Lehmann *et al.*, 1998; Kliewer *et al.*, 2002; Goodwin *et al.*, 2002), CYP3A4 stellt hierbei auch quantitativ mit bis zu 30 % das mit Abstand häufigste CYP des Fremdstoffmetabolismus dar (Shimada *et al.*, 1994).

Abgesehen von der CYP3A-Unterfamilie führt der PXR zudem sowohl zu einer Induktion der Transkription weiterer Phase I-Enzyme (CYP2B, CYP2C, Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenasen) als auch zur Induktion zahlreicher Phase II-Enzyme wie UGT1A1 und SULT2A1 (Tolson und Wang, 2010; Maglich *et al.*, 2002; Chen und Goldstein, 2009; Sugatani *et al.*, 2008) sowie zu einer Expression von Phase III-Transportern wie OATP2 oder MDR1 (Staudinger *et al.*, 2001; Geick *et al.*, 2001; di Masi *et al.*, 2009).

Dabei variieren die Liganden allerdings je nach Spezies. Dexamethason beispielsweise, welches als starker Induktor des PXR in der Ratte und in der Maus gilt, ruft beim humanen PXR hingegen keine Aktivierung hervor (Ma *et al.*, 2008b). Einer der bekanntesten und stärksten Induktoren des humanen PXR ist Rifampicin, ein Beispiel für einen CYP3A4-Inhibitor hingegen ist das Antimykotikum Ketoconazol (Ma *et al.*, 2008a; Fuchs *et al.*, 2013).

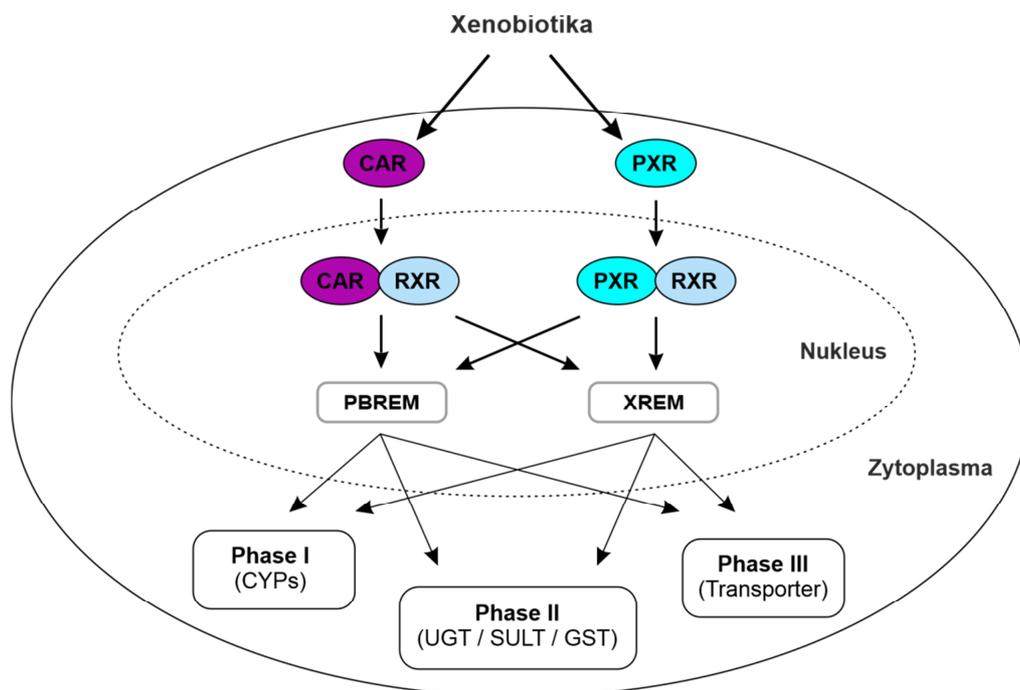
### **2.3.4 Crosstalk von CAR und PXR**

Der Crosstalk zwischen verschiedenen Kernrezeptoren stellt einen kollaborativen Mechanismus für das Fremdstoff-regulierende Netzwerk dar und kann somit einen besseren metabolischen Schutz gegen potentiell toxische Substanzen gewährleisten (Xie *et al.*, 2000; Maglich *et al.*, 2002). Der konstitutive Androstan-Rezeptor und der Pregnan-X-Rezeptor, die beide zur NR1-Familie der Kernrezeptoren gehören, zeigen hierbei verglichen mit anderen Kernrezeptoren einen der höchsten Verwandtschaftsgrade.

Dabei besitzen diese beiden Rezeptoren zum Teil die gleichen Komplexbindungspartner, Liganden, responsiven Elemente und Zielgene. Somit ist es naheliegend, dass zwischen den verschiedenen Signalwegen von CAR und PXR eine Interaktion bestehen kann und die beiden Rezeptoren eine teilweise überlappende Funktionalität zeigen (Moore *et al.*, 2002; Lim und Huang, 2008). Das Ausmaß dieser Wechselwirkungen hängt dabei von verschiedenen Faktoren wie z. B. der Bindungsaffinität des Rezeptors an die jeweiligen responsiven Elemente oder auch vom entsprechenden Induktor ab (Xie *et al.*, 2000; Pascussi *et al.*, 2008). Während der Pregnan-X-Rezeptor vorwiegend als zentraler Regulator der CYP3A-Enzyme bekannt war, verband man den konstitutiven Androstan-Rezeptor mit der Regulation der Expression von CYP2B-Enzymen. Inzwischen weiß man allerdings, dass das PXR-RXR-Heterodimer auch mit der Promotorregion von CYP2B interagieren kann, so wie umgekehrt

die Bindung des CAR-RXR-Heterodimers an die Promotorregion von CYP3A eine Induktion der CYP3A-Isoenzyme zur Folge hat (Xie *et al.*, 2000; Pascussi *et al.*, 2008).

Hierbei binden CAR und PXR an die jeweiligen gleichen responsiven Elemente, woraus ein komplexer Crosstalk zwischen den regulatorischen Wegen der beiden Rezeptoren resultiert (Faucette *et al.*, 2006; Tolson und Wang, 2010). Aufgrund des Crosstalks regulieren CAR und PXR ein überlappendes Spektrum an Genen (Pascussi *et al.*, 2008; di Masi *et al.*, 2009), wobei zu ihren gemeinsamen Zielgenen abgesehen von einigen Phase I-Enzymen wie CYP2B, CYP3A oder CYP2C auch verschiedene Phase II-Enzyme wie UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT), Sulfotransferasen (SULT) oder Glutathion-S-Transferasen (GST) gehören (Abb. 6). Weiterhin werden in der Phase III auch Transporter wie MDR1, MRP2 oder MRP3 durch die beiden Rezeptoren koreguliert (Köhle und Bock, 2009; Tolson und Wang, 2010).



**Abb. 6: Crosstalk von CAR und PXR** (modifiziert nach Scheer *et al.*, 2008)

Dennoch besteht ein Unterschied in der Stärke der Aktivierung der spezifischen Gene durch CAR und PXR. So konnte in Studien gezeigt werden, dass das CAR/RXR-Heterodimer die „CAR-regulierten“ DR4-Elemente bevorzugt, wohingegen beispielsweise die „PXR-regulierten“ DR3- bzw. ER6-Elemente in der Promotorregion von CYP3A wesentlich schwächer erkannt werden (Faucette *et al.*, 2006; Molnár *et al.*, 2013).

Zusätzlich zu der Tatsache, dass die beiden Rezeptoren an die jeweils gleichen responsiven Elemente binden können, kommt noch erschwerend hinzu, dass einige Substanzen sowohl den konstitutiven Androstan-Rezeptor als auch den Pregnan-X-Rezeptor direkt aktivieren (Tojima *et al.*, 2012). Somit ist es nicht immer ohne Weiteres möglich, dem jeweiligen

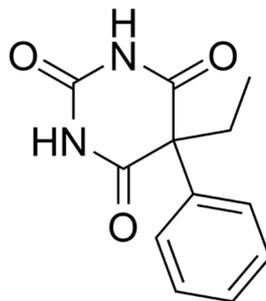
Rezeptor spezifische Genregulationen zuzuordnen bzw. zu unterscheiden, über welchen Rezeptor die entsprechenden Substanzen diese jeweils induzieren. Aufgrund dessen sollte der Crosstalk zwischen CAR und PXR bei Substanzen, deren Wirkweise mit einem dieser beiden Rezeptoren assoziiert ist, in zukünftige Untersuchungen mit einbezogen werden.

## 2.4 Induktoren von CAR und PXR

In den folgenden Abschnitten werden einige ausgewählte Induktoren des konstitutiven Androstan- bzw. Pregnan-X-Rezeptors vorgestellt, insbesondere die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Agonisten Phenobarbital, Dexamethason sowie die polychlorierten Biphenyle.

### 2.4.1 Phenobarbital

Phenobarbital ist ein Arzneimittel aus der Gruppe der Barbiturate (Abb. 7), das aufgrund seiner sedierenden, narkotisierenden und antikonvulsiven Eigenschaften zur Epilepsiebehandlung sowie zur Narkosevorbereitung eingesetzt wird (Brodie und Kwan, 2012). Hierbei wirkt Phenobarbital wie auch andere Barbiturate über die Bindung an den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, wodurch die Wirkung des inhibitorischen Neurotransmitters GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) am Rezeptor verstärkt wird (Twyman *et al.*, 1989).



**Abb. 7: Strukturformel von Phenobarbital**

Einer der bekanntesten Effekte von Phenobarbital ist die erhöhte Expression von CYP2B-Isoenzymen (Sueyoshi *et al.*, 1999; Zelko und Negishi, 2000), weiterhin durch Phenobarbital induzierbar sind unter anderem Cytochrome der Unterfamilien 2C und 3A sowie Glutathion-S-Transferasen, UDP-Glucuronosyltransferasen oder Sulfotransferasen (Ueda *et al.*, 2002; Sueyoshi und Negishi, 2001).

Die durch Phenobarbital bedingte Regulation der CYP2B-Genexpression wird hierbei vorwiegend über den konstitutiven Androstan-Rezeptor vermittelt (Sueyoshi und Negishi, 2001). Dies konnte beispielsweise von Wei *et al.* (2000) belegt werden, die zeigen konnten, dass die Cyp2b10-Expression in CAR-Knockout-Mäusen nahezu vollständig unterdrückt wird.

Neben der Rolle im Fremdstoffmetabolismus stellt die tumorpromovierende Wirkung in der Leber einen weiteren Effekt von Phenobarbital dar (Peraino *et al.*, 1971). So konnte z. B. in Studien an primären Rattenhepatozyten eine Inhibition der UV-induzierten Apoptose beobachtet werden (Wörner und Schrenk, 1996; Bohnenberger *et al.*, 2001). Weiterhin ergab sich aus zahlreichen Studien, dass die erhöhte Proliferationsrate in präneoplastischen Zellpopulationen auf eine durch Phenobarbital bedingte verstärkte Hemmung der Apoptose zurückzuführen ist (Schulte-Hermann *et al.*, 1990; Bursch *et al.*, 1984).

### 2.4.2 Dexamethason

Dexamethason ist ein synthetisches Glukokortikoid (Abb. 8), das aufgrund seiner entzündungshemmenden und immunsuppressiven Eigenschaften eine breite therapeutische Anwendung findet (Scheer *et al.*, 2010). So wird es z. B. bei der Chemotherapie als Antiemetikum (Chu *et al.*, 2014), bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen, rheumatoider Arthritis oder bei Autoimmunerkrankungen eingesetzt (Islander *et al.*, 2011).

Des Weiteren ist Dexamethason für die Induktion einer Vielzahl fremdstoffmetabolisierender Enzyme bekannt, wobei hier vor allem die Genregulation der CYP3A-Isoenzyme zu nennen ist (Kliwer *et al.*, 2002; Goodwin *et al.*, 2002; Pascussi *et al.*, 2000). Diese Expression wird hierbei überwiegend durch den Pregnan-X-Rezeptor reguliert (Goodwin *et al.*, 2002; Pascussi *et al.*, 2000), so konnte z. B. gezeigt werden, dass die Cyp3a11-Induktion in PXR-Knockout-Mäusen im Gegensatz zu jener in Wildtyp-Mäusen vernachlässigbar gering ist (Scheer *et al.*, 2008).

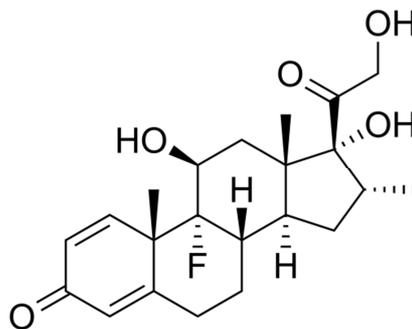


Abb. 8: Strukturformel von Dexamethason

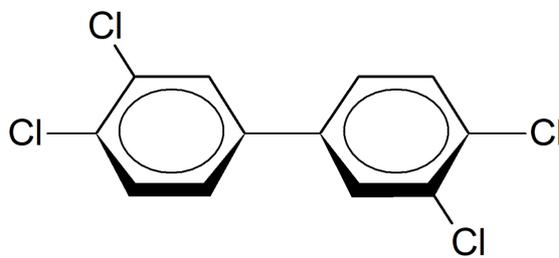
Abgesehen von der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme wird zusätzlich eine tumorpromovierende Wirkung bzw. ein Einfluss von Dexamethason auf die Apoptose diskutiert. Diesbezüglich fanden Herr *et al.* (2003) in Zell- und Tierversuchen heraus, dass Dexamethason durch die Inhibition der Aktivität verschiedener Caspasen auf molekularer Ebene die Apoptose bei Krebszellen beeinflusst. Weiterhin konnte in primären Ratten-



### 2.4.3.1 Dioxinartige und nicht-dioxinartige PCBs

Entsprechend ihrer chemischen Struktur werden die polychlorierten Biphenyle in zwei große Gruppen unterteilt, und zwar zum einen in die dioxinartigen (DL) PCBs und zum anderen in die Gruppe der überwiegend vorhandenen nicht-dioxinartigen (NDL) Kongenere (Giesy und Kannan, 1998).

Die Gruppe der dioxinartigen PCBs umfasst hierbei 12 Kongenere, bei welchen es sich strukturell um mono- und non-*ortho*-substituierte Verbindungen mit Chlorsubstituenten in beiden *para*-Positionen sowie mehreren *meta*-Positionen handelt (Goldstein *et al.*, 1977; Safe *et al.*, 1985; EFSA, 2005). Durch die uneingeschränkte freie Drehbarkeit um die Sigmabindung können sie ähnlich zu den Dioxinen eine koplanare Konformation einnehmen (Abb. 10) und sind somit in der Lage, an den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) zu binden (Safe, 1990).

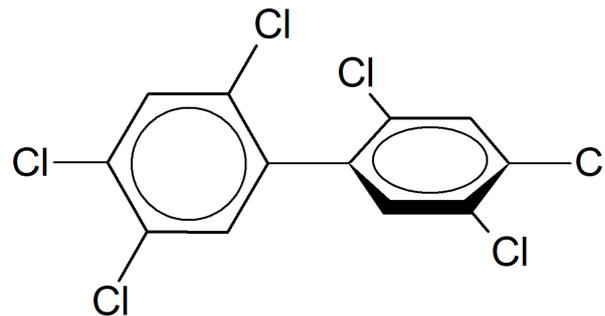


**Abb. 10: Dioxinartiges PCB-Kongener mit koplanarer Konformation**

Nach einer entsprechenden Aktivierung des Rezeptors durch dioxinartige Verbindungen erfolgt die Translokation des Ligand-Rezeptor-Komplexes in den Nukleus, woraufhin der Rezeptor an spezifische responsive Elemente (*Dioxin-Responsive Elements*) bindet und auf diese Weise u. a. die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme CYP1A1 und CYP1A2 induzieren kann (Zeiger *et al.*, 2001).

Die wesentlich größere Gruppe der PCB-Kongenere fällt jedoch unter die nicht-dioxinartigen PCBs (NDL-PCBs), die vor allem mit dem konstitutiven Androstan-Rezeptor (CAR) bzw. dem Pregnan-X-Rezeptor (PXR) in Verbindung gebracht werden (Roos *et al.*, 2011; Viluksela *et al.*, 2012).

Die Chlorsubstituenten der NDL-PCBs in den *ortho*-Positionen (2,2',6,6') schränken hierbei die freie Drehbarkeit um die Sigmabindung ein und bewirken somit eine Drehung der Biphenylringe aus der gemeinsamen Ebene (Abb. 11).



**Abb. 11: Nicht-dioxinartiges PCB-Kongener mit verdrehter, gewinkelter Konformation**

Aufgrund dieser sterischen Hinderung besteht im Gegensatz zu den DL-PCBs nur eine geringe Wahrscheinlichkeit, dass sie eine koplanare Struktur einnehmen, so dass die nicht-dioxinartigen PCBs eine deutlich herabgesetzte Bindungsaffinität zum Arylhydrocarbon-Rezeptor aufweisen (Safe *et al.*, 1985).

Diejenigen Kongenere, die an mindestens zwei *ortho*-Positionen Chloratome aufweisen, induzieren ähnliche Enzyme wie Phenobarbital (z. B. CYP2B) und interagieren vor allem mit dem konstitutiven Androstan-Rezeptor bzw. dem Pregnan-X-Rezeptor (Al-Salman und Plant, 2012; Dean *et al.*, 2002).

Vertreter dieser Gruppe sind unter anderem die in dieser Arbeit verwendeten Kongenere PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 und PCB 180. Zusammen mit PCB 28, einem mono-*ortho*-substituierten Kongener, handelt es sich bei diesen sechs PCBs um die sogenannten Indikator-Kongenere, die häufig stellvertretend für die Vielzahl an nicht-dioxinartigen Verbindungen untersucht werden (EFSA, 2005). Abgesehen davon, dass diese Kongenere aufgrund ihres hohen Anteils in den technischen Gemischen etwa 50 % des Gesamt-NDL-PCB-Gehalts widerspiegeln, war für ihre Auswahl weiterhin ausschlaggebend, dass sie die restlichen Verbindungen aufgrund ihrer verschiedenen Chlorierungsgrade gut repräsentieren (EFSA, 2010).

Obwohl die nicht-dioxinartigen PCBs prozentual den wesentlich größeren Teil der PCBs ausmachen, kam diesen Verbindungen im Gegensatz zu den DL-PCBs jedoch nur wenig Aufmerksamkeit zu. Hinzu kommt, dass kommerziell erhältliche Produkte meist noch mit dioxinartigen Verunreinigungen kontaminiert sind, wodurch eine einwandfreie Zuordnung der jeweiligen Effekte zusätzlich erschwert wird. Aufgrund dessen ist das Wissen über die Auswirkungen der nicht-dioxinartigen PCBs auf die menschliche Gesundheit zum Teil noch immer begrenzt (EFSA, 2010; Viluksela *et al.*, 2014).

### 2.4.3.2 Anwendung und Exposition

Die charakteristischen chemischen Eigenschaften der PCBs wie z. B. die hohe thermische Stabilität, die damit einhergehende schwere Entflammbarkeit sowie darüber hinaus die hohe Lipophilie in Kombination mit gleichzeitig niedrigen Produktionskosten prädestinierten diese Verbindungen für eine breite industrielle Anwendung sowohl in offenen als auch in geschlossenen Systemen (EFSA, 2005; Hamers *et al.*, 2011). Ferner zeichnen sich die PCBs durch ihre hohe Beständigkeit gegenüber Säuren und Alkalien, eine hohe Viskosität sowie eine geringe elektrische Leitfähigkeit und im Gegenzug sehr gute Wärmeleitfähigkeit aus (Lemesh, 1992; IARC, 2016).

Eingesetzt wurden die unter den Handelsnamen Aroclor, Clophen oder Kanechlor vermarkteten Produkte verschiedener PCBs vor allem als Dichtmittel oder Weichmacher in Kunststoffen, weiterhin wurden sie auch in Hydraulikflüssigkeiten, Wärmeaustauschern, Imprägnier- oder Flammschutzmitteln verwendet. Daneben dienten die polychlorierten Biphenyle zusätzlich als Isolier- und Kühlflüssigkeiten für Transformatoren oder auch als Bestandteil von Antifouling-Farben sowie Lacken und Klebstoffen (Safe, 1990; Safe, 1994; Giesy und Kannan, 1998; Jensen *et al.*, 1972; EFSA, 2010).

Aufgrund ihrer umfangreichen Verwendung sowie der hohen chemischen Inertheit sind die polychlorierten Biphenyle in nahezu allen Umweltkompartimenten nachweisbar und stellen daher ein gutes Beispiel für die unkontrollierte Verbreitung von Industriechemikalien dar.

Obwohl sie Ende der 1980er Jahre in Deutschland verboten wurden, gehören sie aufgrund ihrer schlechten Abbaubarkeit und Persistenz noch immer zu den größten Umweltkontaminanten und werden vom Menschen überwiegend über den Verzehr tierischer Fette und Lebensmittel aufgenommen (EFSA, 2005; Beyer und Biziuk, 2009; Safe, 1994). Hierbei liegt die geschätzte durchschnittliche Aufnahme an NDL-PCBs bei Erwachsenen bei 10 bis 45 ng/kg KG pro Tag, bei Kindern bis sechs Jahren zwischen 27 und 50 ng/kg KG pro Tag (EFSA, 2005). Die Aufnahme an PCBs über die Nahrung ist jedoch in den meisten Industrieländern rückläufig, ebenso gehen die PCB-Gehalte in menschlicher Muttermilch seit Ende der 1970er Jahre merklich zurück (Norén, 1993; Patterson *et al.*, 1994; Fång *et al.*, 2013).

### 2.4.3.3 Toxikologische Relevanz

Auf die Toxizität der polychlorierten Biphenyle wurde man nach Vergiftungsfällen aufmerksam, die zu den als „Yushō“ (Japan, 1968) und „Yu-Cheng“ (Taiwan, 1979) bekannt gewordenen Erkrankungen führten (Kunita *et al.*, 1985). Hierbei kam es durch einen technischen Defekt bei der Reisölproduktion zu erheblichen Verunreinigungen der Erzeugnisse mit PCBs und polychlorierten Dibenzofuranen (PCDFs) (Yoshimura, 2012).

Bei den betroffenen Personen äußerten sich die Vergiftungserscheinungen vor allem durch Hautveränderungen in Form von Chlorakne, Narbenbildungen und Pigmentierungsstörungen (Yoshimura, 2012; Mitoma *et al.*, 2015; IARC, 2016). Außerdem konnten bei zahlreichen Personen weitere Symptome wie Schwellungen der Augenlider, Schwindelanfälle, Atemwegsstörungen, Gefühllosigkeit der Extremitäten oder Erbrechen festgestellt werden. Neben diesen akuten Symptomen zeigten sich weiterhin Missbildungen bei den Nachkommen PCB-exponierter Mütter, abgesehen davon konnte eine chronische Exposition gegenüber erhöhten PCB-Gehalten während der Schwangerschaft mit dem erhöhten Aufkommen von Lernstörungen beim Nachwuchs in Verbindung gebracht werden (Kuratsune *et al.*, 1972; Safe, 1994; Jacobson *et al.*, 1990; Aoki, 2001). Weiterhin wiesen derart exponierte Kinder ebenfalls Hyperpigmentierungen, eine abnorme Anzahl an Zähnen, Hyperplasien des Zahnfleisches sowie ein signifikant verringertes Geburtsgewicht (fetales PCB-Syndrom) auf (Rylander *et al.*, 1995; Masuda, 2001; Aoki, 2001). Die Bewertung der jeweiligen Effekte wird hierbei jedoch durch das gleichzeitige Auftreten von dioxinartigen Verbindungen wie PCDDs (polychlorierte Dibenzodioxine) oder PCDFs erschwert, so dass sich die Symptome aufgrund der Mischexposition nicht eindeutig den PCBs zuordnen lassen (Aoki, 2001; Ahlborg *et al.*, 1992). Experimentellen Studien zufolge zeigen die polychlorierten Biphenyle zudem neurotoxische Wirkungen (Giesy und Kannan, 1998; Fonnum und Mariussen, 2009), verursachen endokrine Störungen (Vansell *et al.*, 2004) und werden mit adversen Effekten wie z. B. Reproduktionsstörungen (Gerhard *et al.*, 1998; Ulbrich und Stahlmann, 2004) oder Schädigungen des Immunsystems (Lyche *et al.*, 2006) in Verbindung gebracht. Darüber hinaus fungieren sie als potente Tumorpromotoren in der Rattenleber (Hemming *et al.*, 1993; Buchmann *et al.*, 1991; Giesy und Kannan, 1998), insbesondere konnte in *in vitro*-Studien ein Einfluss der PCBs auf die intrazelluläre Kommunikation über Gap Junctions (Machala *et al.*, 2003; Hamers *et al.*, 2011), die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Tharappel *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2004) sowie eine Inhibition der Apoptose gezeigt werden (Bohnenberger *et al.*, 2001; Al-Anati *et al.*, 2009).

#### 2.4.3.4 Toxizitätsäquivalent-Faktoren (TEF)

Infolge dessen, dass in technischen PCB-Gemischen neben den nicht-dioxinartigen PCBs immer auch Dioxine oder dioxinartige Verbindungen enthalten sind, wird eine Bestimmung der Toxizität einzelner NDL-PCBs dadurch erschwert, dass zusätzliche Effekte durch dioxinartige Verunreinigungen bei den jeweiligen Untersuchungen berücksichtigt werden müssen. Um eine entsprechende Risikobewertung zu erleichtern, existiert für die 12 Kongenere mit dioxinartiger Wirkung bzw. deren Gemische das System der Toxizitätsäquivalente (TEQ), bei welchem die jeweiligen Kongenere zur besseren Einschätzung durch spezifische Toxizitätsäquivalent-Faktoren (TEF) charakterisiert werden (Kannan *et al.*, 1988). Die TEFs setzen hierbei die

Toxizität des jeweiligen polychlorierten Biphenyls in Relation zu jener von TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin), für welches ein TEF-Wert von 1 definiert wurde (Zeiger *et al.*, 2001). Aus dem Produkt der einzelnen TEF-Werte einer jeden Substanz des Gemischs und den jeweiligen Konzentrationen resultiert hierbei das entsprechende Toxizitätsäquivalent:

$$\text{TEQ} = \sum (\text{Konzentration} \times \text{TEF})$$

Die jeweiligen TEF-Werte der einzelnen PCB-Verbindungen wurden hierbei von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) festgelegt und zuletzt im Jahr 2005 aktualisiert (Van den Berg, 2006).

Da es für entsprechende Analysen mit NDL-PCBs zielführend ist, Verbindungen einzusetzen, die geringe Kontaminationen mit dioxinartigen Komponenten aufweisen, wurden in dieser Arbeit ausschließlich hoch aufgereinigte PCB-Kongenere mit möglichst niedrigen TEF-Werten verwendet.

## 2.5 Chemische Kanzerogenese

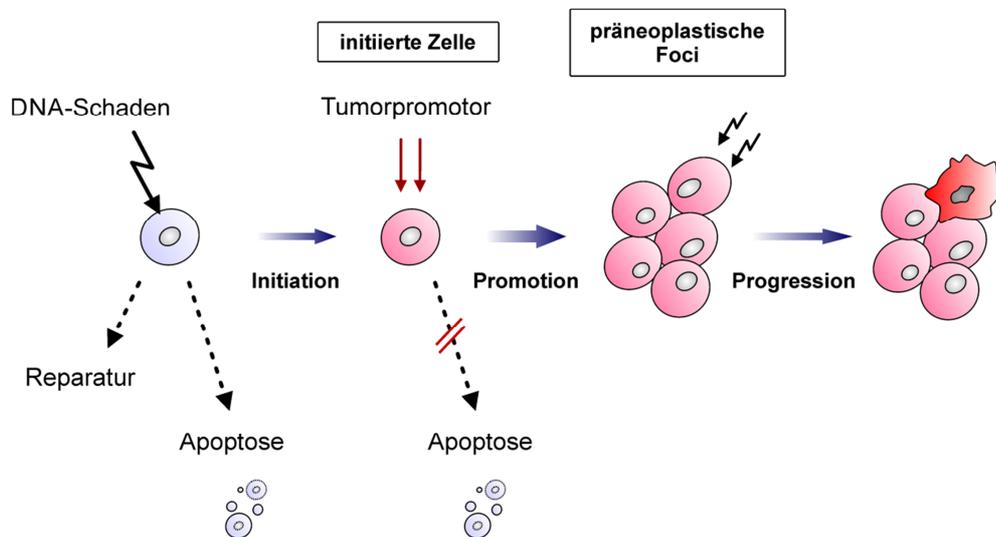
Mittlerweile sind Krebserkrankungen in einigen Industrieländern noch vor den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache (Yusuf *et al.*, 2020). Die Kanzerogenese, also die Entstehung von Krebs, umschreibt hierbei einen vielstufigen Prozess, bei welchem gesunde Zellen in maligne Krebszellen übergehen (Isaacs, 1993). Dabei wird das komplizierte Gleichgewicht von Apoptose und Zellwachstum gestört, indem es sich zur selektiven Vermehrung der malignen Zellen hin verschiebt.

Die Tumorentstehung ist hierbei in der Regel ein langjähriger, mehrstufiger Prozess, der die Phasen Initiation, Promotion und Progression mit einschließt (Scherer, 1984).

### 2.5.1 Mehrstufenmodell der Kanzerogenese

Im ersten Schritt der Tumorentstehung, der Initiation, wird z. B. aufgrund der modifizierenden Einwirkung genotoxischer Kanzerogene eine Veränderung in der DNA-Sequenz ausgelöst (Mulware, 2013). In diesem Stadium besteht noch die Möglichkeit, den DNA-Schaden durch intrazelluläre Reparaturmechanismen wieder zu beheben (Abb. 12). Sofern die Reparatur jedoch nicht greift und auch die apoptotische Eliminierung der geschädigten Zelle ausbleibt, wird der Schaden bei der nächsten Zellteilung irreversibel fixiert (Lutz, 1990; Pitot und Sirica, 1980; Schulte-Hermann *et al.*, 1995). Solche Mutationen können z. B. sowohl durch chemische oder biologische Einflüsse wie ROS (*reactive oxygen species*), kanzerogene Chemikalien oder diverse Viren als auch durch physikalische Wechselwirkungen wie UV- oder

$\gamma$ -Strahlung hervorgerufen werden (Lutz, 1990; Pitot, 1993). Hierbei besonders relevant sind Defekte in Genen, welche für die Kontrolle des Zellzyklus oder DNA-Reparaturmechanismen verantwortlich sind, wie beispielsweise Tumorsuppressorgene (Pitot, 1993).



**Abb. 12: Vereinfachtes Mehrstufenmodell der Kanzerogenese** (modifiziert nach Katiyar, 2011)

Initiierte Zellen, welche durch die entsprechenden Mutationen einen selektiven Wachstumsvorteil erlangen konnten, sind in der Lage, unter dem Einfluss sogenannter Tumorpromotoren klonal zu expandieren (Schulte-Hermann, 1985). Dieses gesteigerte Wachstum der initiierten Zellen hat eine Ausbildung sogenannter präneoplastischer Foci zur Folge, welche Karzinomvorstufen darstellen und sich zunächst zu gutartigen Neoplasien weiterentwickeln. Dabei agieren Tumorpromotoren in präneoplastischen Zellen als „survival factors“, da sie beispielsweise durch die Hemmung der Apoptose zu einem Überleben der geschädigten Zellen führen (Pitot *et al.*, 1978; Schulte-Hermann *et al.*, 1995; Bursch *et al.*, 1984; Stinchcombe *et al.*, 1995). Substanzen mit tumorpromovierendem Potential sind z. B. nicht-genotoxische Kanzerogene wie 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD), polychlorierte Biphenyle oder Phenobarbital (Schrenk *et al.*, 1994; Buchmann *et al.*, 1991; Hemming *et al.*, 1993; Bursch *et al.*, 1984). Die Wirkung der Tumorpromotoren ist hierbei reversibel und muss zur Entwicklung von Präneoplasien über einen längeren Zeitraum hin erfolgen (Pitot, 1993).

Die letzte Phase der mehrstufigen Kanzerogenese, die Progression, ist durch eine Zunahme der Wachstumsautonomie gekennzeichnet, wobei die während der beiden vorangegangenen Stufen gebildeten Präneoplasien in maligne Tumoren umgewandelt werden (Pitot, 1989; Scherer, 1984). Hierbei entziehen sich die Tumorzellen nach und nach einer extrazellulären Wachstumskontrolle, wofür vor allem die Anhäufung weiterer Mutationen in wachstumsregulierenden Tumorsuppressorgenen verantwortlich ist. Durch die hierdurch bedingte

Zunahme der Malignität weisen die entstandenen Tumorzellen zumeist eine starke Dedifferenzierung auf, proliferieren unkontrolliert, sind insensitive gegenüber Apoptose und können autonom für sie positive Wachstumssignale produzieren (Hanahan und Weinberg, 2000). Die Folge ist ein invasiv wachsender Tumor, der durch Metastasierung sowie die Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) charakterisiert ist (O'Byrne *et al.*, 2000; Folkman, 2002).

### **2.5.2 Bedeutung der Apoptose in der Kanzerogenese**

Die Apoptose nimmt im Prozess der Kanzerogenese eine bedeutende Rolle ein, da sie ein wesentliches Kriterium für das weitere Schicksal der Zelle darstellt. Erfolgt nach einer Läsion durch genotoxische Substanzen keine Reparatur des Zellschadens und auch keine Eliminierung der betroffenen Zelle, so wird diese Läsion im Zuge einer Zellteilung als Mutation fixiert (Lutz, 1990; Pitot und Sirica, 1980; Schulte-Hermann *et al.*, 1995).

Bei einer Inhibition der Apoptose durch endo- oder exogene Faktoren greift dieser Schutzmechanismus nicht, so dass es aufgrund dieses Wachstumsvorteils zur klonalen Expansion und somit zur Bildung von Tumoren kommen kann (Bursch *et al.*, 1984; Tomei *et al.*, 1988; Wright *et al.*, 1994). Die Inhibition der Apoptose nimmt daher eine wesentliche Schlüsselrolle im Rahmen der Kanzerogenese ein, durch den nicht-genotoxische Tumorpromotoren anhand der gestörten Regulation von Wachstum, Differenzierung und Zelltod zur Krebsentstehung beitragen können (Schulte-Hermann, 1985). Der Proliferation der Tumorzellen steht in diesem Fall eine zu geringe Apoptoserate gegenüber, woraus als Konsequenz die selektive Vermehrung der malignen Zellen resultieren kann (Schulte-Hermann *et al.*, 1995; Bursch *et al.*, 1984; Stinchcombe *et al.*, 1995).

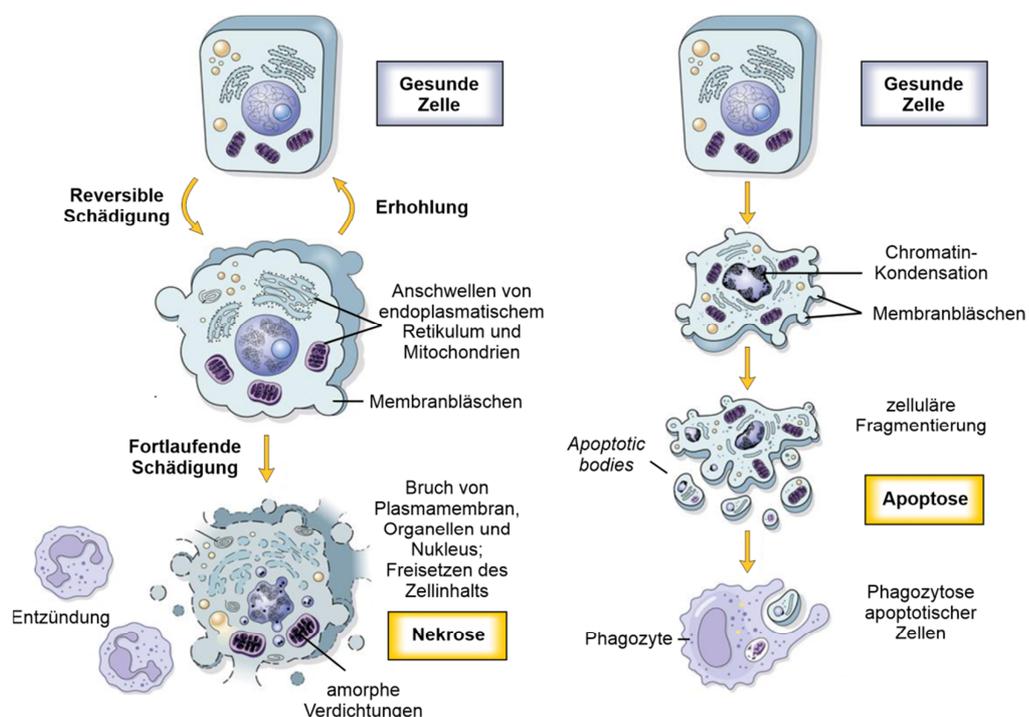
### **2.6 Apoptose – der programmierte Zelltod**

Die Regulation des Gleichgewichts von Zellteilung und Zelltod spielt in allen Organismen eine entscheidende Rolle (Vaux und Korsmeyer, 1999). Der Zelltod ist hierbei in zwei Formen differenzierbar – zum einen in die Apoptose, den sogenannten programmierten Zelltod und zum anderen in die Nekrose, einen passiven, degenerativen Prozess (Kerr *et al.*, 1972; Columbano, 1995). Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose ein aktiver, energieverbrauchender Prozess, welcher der Beseitigung überflüssiger oder unerwünschter Zellen dient. Die Apoptose kann hierbei durch verschiedene exogene und endogene Faktoren wie zum Beispiel hormonelle Einflüsse (Steroide), Entzug von Wachstumsfaktoren, Hitzeschock, UV-Strahlung, Chemotherapeutika, oxidativen Stress oder DNA-Schäden eingeleitet werden (Barr und Tomei, 1994).

Im menschlichen Organismus nimmt die Apoptose unter anderem wichtige Funktionen bei der Regulation des Immunsystems sowie der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase ein (Renehan *et al.*, 2001; Elmore, 2007). Des Weiteren ist sie von besonderer Bedeutung für die Elimination geschädigter bzw. entarteter Zellen, die beispielsweise infolge von Mutationen oder durch eine fehlerhafte Replikation entstehen können (Bursch *et al.*, 1992; Vaux und Korsmeyer, 1999). Defekte in den apoptotischen Signalwegen begünstigen hierbei die Entstehung vieler pathologischer Prozesse, so werden mit einer hoch- oder herabregulierten Apoptoserate z. B. Krankheitsbilder wie Autoimmunerkrankungen (AIDS), neurodegenerative Erkrankungen oder Krebs in Verbindung gebracht (Thompson, 1995; Lowe und Lin, 2000).

Aufgrund der aktiven Initiierung des Zelltods sowie der hierbei erfolgenden charakteristischen morphologischen Veränderungen lässt sich die Apoptose vom nekrotischen Zelltod abgrenzen (Kerr *et al.*, 1972).

Die Nekrose ist hierbei durch einen Verlust der Membranintegrität gekennzeichnet, welcher sich auf die Ionenpumpen auswirkt und zunächst zu einem Ausfall dieser führt (Zong und Thompson, 2006). Infolge des hierdurch bedingten Anschwellens von Zytoplasma und Organellen platzt die Zelle aufgrund der Osmose (Abb. 13), so dass der Zellinhalt in die Umgebung austreten kann (Elmore, 2007). Hierdurch werden Zellen des Immunsystems angelockt, wodurch als Folge der Immunreaktion eine Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe ausgelöst wird (Proskuryakov *et al.*, 2003).



**Abb. 13: Morphologische Gegenüberstellung von Apoptose und Nekrose** (modifiziert nach Kumar *et al.*, 2010)

Im Gegensatz zur Nekrose zieht die Apoptose keine inflammatorischen Prozesse nach sich. Morphologisch ist sie gekennzeichnet durch einen Wasserverlust der Zelle, die damit einhergehende Kondensation von Chromatin und Zytoplasma, das Kollabieren des Zytoskeletts, einen Abbau der Kernhülle sowie durch die Fragmentierung der DNA (Kerr *et al.*, 1972; Kitazumi und Tsukahara, 2011).

Des Weiteren bilden sich im Verlauf der Apoptose Ausstülpungen der Plasma- und Kernmembran, wodurch ein Teil des Zellinhalts vom Rest der Zelle abgeschnürt wird und sogenannte membranumschlossene „*apoptotic bodies*“ entstehen (Abb. 13). An der Oberfläche dieser Partikel dient die Präsentation von Phosphatidylserin, welches sich in nicht-apoptotischen Zellen auf der Innenseite der Zellmembran befindet, als Erkennungssignal für phagozytierende Zellen (Darzynkiewicz *et al.*, 1997). Hierdurch werden die Zellen bzw. Teilstücke direkt durch Makrophagen aufgenommen, so dass durch den lysosomalen Verdau eine inflammatorische Reaktion verhindert werden kann (Elmore, 2007).

### 2.6.1 Caspasen

Im Zentrum der Apoptosesteuerung stehen die kaskadenartig aktivierten Caspasen (*cysteiny/aspartate-specific proteases*), welchen die charakteristischen morphologischen Veränderungen im apoptotischen Prozess zugeschrieben werden können (Degterev *et al.*, 2003; Eckle *et al.*, 2004; Wolf und Green, 1999). Zunächst liegen sie in der Zelle als inaktive Vorstufen, sogenannte Procaspasen, vor (Green, 1998). Im Verlauf der Apoptose werden sie allerdings durch proteolytische Spaltung zu aktiven Caspasen prozessiert, woraufhin sie die enzymatische Spaltung ihrer Zielproteine an einer Peptidbindung C-terminal von Aspartat vermitteln (Earnshaw *et al.*, 1999; Vaux und Korsmeyer, 1999).

Je nach ihrer Aufgabe unterscheidet man im Rahmen der Apoptose die apikalen Initiatorcaspasen von den distalen Effektorcaspasen (Degterev *et al.*, 2003). Die Initiatorcaspasen (Caspase 2, 8, 9 und 10) stellen hierbei die Starter der Kaskade dar und kontrollieren die Effektorcaspasen (Caspase 3, 6 und 7), die wichtige Zellproteine angreifen und somit den Zelltod herbeiführen (Elmore, 2007).

Die Proteolyse der Initiatorcaspasen am Beginn der Signalwege erfolgt über diverse Proteine bzw. proapoptotische Stimuli, die Effektorcaspasen werden anschließend durch Initiatorcaspasen aktiviert (Slee *et al.*, 2001; Fulda und Debatin, 2006).

Substrate der Effektorcaspasen sind beispielsweise Strukturproteine wie Lamin A, DNA-Reparaturenzyme wie PARP (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase) oder der Inhibitor der DNase CAD (*Caspase-activated DNase*). Dessen Inaktivierung führt z. B. dazu, dass CAD in den Zellkern translozieren und dort anschließend die für die Apoptose typische genomische DNA-Fragmentierung in Gang setzen kann (Slee *et al.*, 2001; Ruchaud *et al.*, 2002; Nagata, 2000).

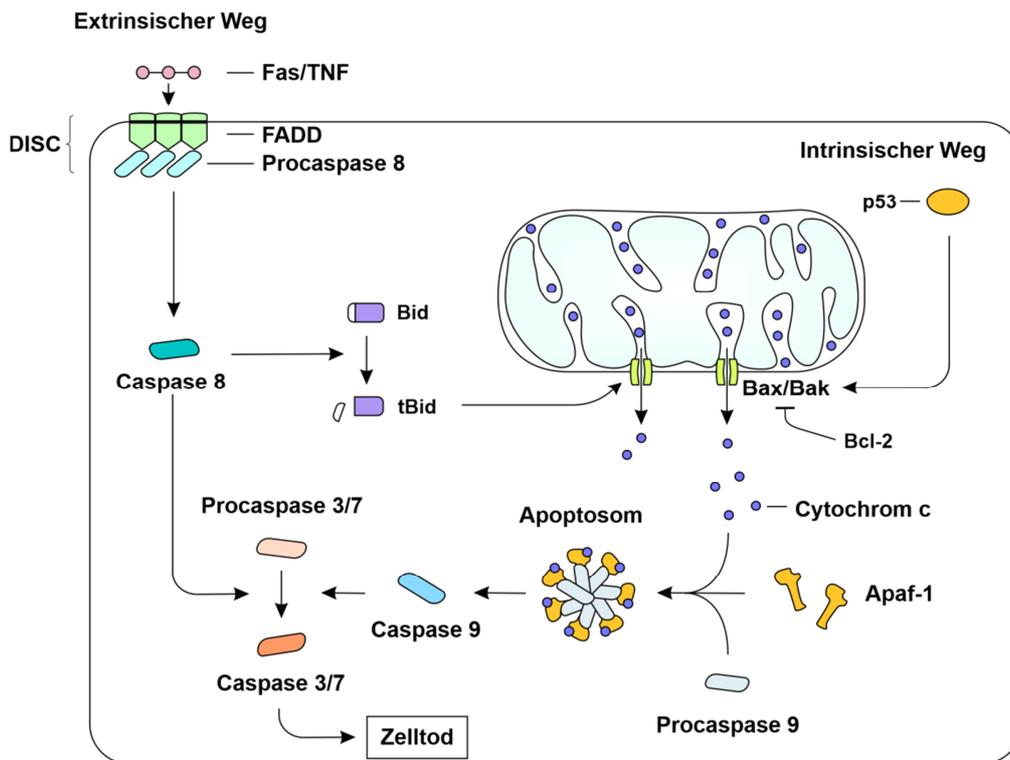
## 2.6.2 Apoptotische Signalwege

Grundsätzlich können zwei verschiedene Signalwege unterschieden werden, die die Caspasekaskade initiieren und so die Apoptose einleiten. Und zwar zum einen der extrinsische Signalweg über entsprechende Todesrezeptoren und zum anderen der intrinsische, mitochondriale Signalweg, wobei zwischen diesen beiden Signalpfaden auch eine Interaktion erfolgen kann (Elmore, 2007; Fiandalo und Kyprianou, 2012).

Beide Signalwege führen zunächst zu einer Aktivierung jeweils spezifischer Initiatorcaspasen, woraus wiederum die Initiierung gemeinsamer Effektorcaspasen resultiert (Budihardjo *et al.*, 1999; Wolf und Green, 1999).

### 2.6.2.1 Der extrinsische Signalweg

Der extrinsische Aktivierungsweg wird durch sogenannte Todesrezeptoren wie den Fas-Rezeptor oder den TNF-Rezeptor (*Tumor necrosis factor receptor*) vermittelt (Hassan *et al.*, 2014), die in der Zellmembran verankert sind und durch Bindung ihrer Liganden zu trimere Proteinkomplexen aggregieren (Abb. 14).



**Abb. 14: Extrinsischer und intrinsischer Signalweg der Apoptose** (modifiziert nach Zaman *et al.*, 2014)

Diese Rezeptor-Trimerisierung hat zur Folge, dass intrazelluläre Adaptermoleküle wie FADD (*Fas-associated death domain*) mittels ihrer Todesdomäne mit der entsprechenden Todesdomäne des Rezeptors interagieren (Mayer und Oberbauer, 2003). FADD seinerseits verfügt über eine weitere Interaktionsdomäne, die sogenannte *N*-terminale Todeseffektor-domäne, die nun ihrerseits zur Rekrutierung der Procaspase 8 führt, welche zusammen mit FADD und dem Todesrezeptor den *death-inducing signaling complex* (DISC) bildet (Kaufmann *et al.*, 2012). In diesem Komplex wird die Procaspase 8 proteolytisch zu ihrer aktiven Form prozessiert, woraus die Aktivierung von Downstream-Caspasen (Caspase 3 oder 7) resultiert und so letztendlich der Zelltod eingeleitet wird (Budihardjo *et al.*, 1999; Boatright *et al.*, 2003; Elmore, 2007).

### 2.6.2.2 Der intrinsische Signalweg

Der mitochondriale, intrinsische Signalweg wird im Gegensatz zum extrinsischen über zellinterne Stimuli wie DNA-Schäden, ROS oder andere Formen von zellulärem Stress induziert (Redza-Dutordoir und Averill-Bates, 2016).

Auf solche Schäden kann die Zelle z. B. mit einer Aktivierung des Tumorsuppressorgens *p53* reagieren (Abb. 14) und auf diese Weise eine Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase herbeiführen (Blomen und Boonstra, 2007). Für die Zelle besteht nun die Möglichkeit, den entstandenen Defekt vor der Replikation zu reparieren. Gelingt dies nicht, führt die *p53*-vermittelte Expression von Zielgenen, welche beispielsweise Mitglieder der Bcl-2-Familie (*B-cell lymphoma 2 family*) mit einschließt, zur Initiation der Apoptosekaskade (Basu und Haldar, 1998).

Die pro- und antiapoptotischen Vertreter der Bcl-2-Familie sind hierbei maßgeblich an der Regulation der Integrität der äußeren Mitochondrienmembran sowie der Aktivität von Membrankanälen beteiligt (Mayer und Oberbauer, 2003; Brenner und Mak, 2009). Als Antwort auf verschiedene Apoptosesignale wird dabei das Gleichgewicht der Bcl-2-Proteine zur Seite der proapoptotischen Vertreter wie Bad (*Bcl-2-associated agonist of cell death*), Bax (*Bcl-2-associated X protein*) oder Bak (*Bcl-2 homologous antagonist / killer*) hin verlagert. Dies führt über die Aktivierung sogenannter PT-Poren (*Permeability transition pore*) zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch die Freisetzung proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom c aus dem Mitochondrium ins Zytosol ermöglicht wird (Narita *et al.*, 1998; Martinou und Youle, 2011).

Das freigesetzte Cytochrom c formt nun zusammen mit Apaf-1, dem *apoptotic protease activating factor-1*, Adenosintriphosphat (ATP) und der Procaspase 9 das Apoptosom (Wu und Bratton, 2013). In diesem wird die Caspase 9 anschließend proteolytisch aktiviert, woraus nachfolgend wiederum ebenso wie beim extrinsischen Signalweg die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 resultiert (Green, 2005; Slee *et al.*, 1999).

Der extrinsische und der intrinsische Signalweg konvergieren also in der Initiierung der ausführenden Caspasen, woraus infolge der proteolytischen Spaltung zahlreicher Substrate letztendlich die morphologischen Veränderungen im Zuge der Apoptose hervorgehen (Budihardjo *et al.*, 1999). Zudem sind die beiden Signalwege auch über die durch die Caspase 8 vermittelte Aktivierung von Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) miteinander quervernetzt (Abb. 14). Caspase 8 prozessiert Bid hierbei durch Proteolyse zu tBid (*truncated Bid*), woraufhin dieses in die äußere Mitochondrienmembran transloziert und zur Aktivierung der pro-apoptotischen Vertreter Bax und Bak führt (Kaufmann *et al.*, 2012).

### 3 Zielsetzung

Die polychlorierten Biphenyle weisen neben ihrer hohen chemischen Stabilität auch zahlreiche toxische Eigenschaften auf und zählen daher zu den persistenten organischen Schadstoffen (Van den Berg *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu den dioxinartigen Verbindungen kam den nicht-dioxinartigen PCBs in der Vergangenheit jedoch weit weniger Aufmerksamkeit zu, so dass das Wissen über ihre Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit in vielen Aspekten noch immer begrenzt ist. In Anlehnung an ihre Anreicherung in der Nahrungskette und der lebenslangen Exposition ist es jedoch erforderlich, mehr über die Wirkmechanismen der NDL-PCBs zu erfahren, so dass wichtige Grundvoraussetzungen für eine fundierte Risikoanalyse und -bewertung geschaffen werden können. Die nicht-dioxinartigen PCBs werden hierbei häufig als Substanzen vom Phenobarbital-Typ bezeichnet, so dass oftmals davon ausgegangen wird, dass diese PCBs ähnliche Wirkungen wie Phenobarbital aufweisen und vor allem mit dem konstitutiven Androstan-Rezeptor in Verbindung gebracht werden. Da jedoch zwischen dem Pregnan-X-Rezeptor und dem konstitutiven Androstan-Rezeptor ein komplexer Crosstalk besteht (Xie *et al.*, 2000; Tolson und Wang, 2010), sollten nähere Kenntnisse darüber erlangt werden, ob die NDL-PCBs ihre Wirkung zum Teil auch über den Pregnan-X-Rezeptor entfalten. Gerade solche Substanzen, die spezifisch den Pregnan-X-Rezeptor aktivieren, sind bisher in Bezug auf ihre tumorpromovierenden Eigenschaften nur unzureichend charakterisiert (Elcombe *et al.*, 2014), insbesondere ein Einfluss des PXR auf eine potentielle NDL-PCB-bedingte Hepatokanzerogenität wurde bisher noch nicht ergründet. Erschwerend bei Analysen mit nicht-dioxinartigen PCBs ist hierbei allerdings häufig das gleichzeitige Auftreten von Verunreinigungen mit dioxinartigen PCBs, polychlorierten Dibenzofuranen oder polychlorierten Dibenzodioxinen, so dass sich die Effekte aufgrund der Mischexposition oftmals nicht eindeutig den NDL-PCBs zuordnen lassen. Um bei unseren Untersuchungen Auswirkungen durch Verunreinigungen mit dioxinartigen Verbindungen zu minimieren, sollten in dieser Arbeit ausschließlich hoch aufgereinigte Verbindungen verwendet werden.

Da sich Phenobarbital vor allem durch eine effiziente Induktion von CYP2B-Isoenzymen auszeichnet (Kawamoto *et al.*, 1999) und in geringerem Maße auch für die Expression von CYP3A-Isoenzymen bekannt ist, sollte der Einfluss der untersuchten Substanzen zunächst mittels quantitativer Real-Time PCR, immunzytochemischer Fluoreszenzfärbungen sowie Western-Blot-Analysen hinsichtlich ihrer Effekte auf die Induktion der fremdstoff-metabolisierenden Enzyme CYP2B1 und CYP3A1 analysiert werden. Dabei sollten die ausgewählten nicht-dioxinartigen PCBs 28, 52, 101, 138, 153 und 180 sowohl auf mögliche Unterschiede zwischen den einzelnen aufgereinigten NDL-PCBs hin untersucht werden als auch mit den entsprechenden Wirkungen des bekannten CAR-Agonisten Phenobarbital sowie

des PXR-Aktivators Dexamethason verglichen werden. Zur Isolierung der hierbei verwendeten primären Rattenhepatozyten sollte ein entsprechend modifiziertes Perfusionsprotokoll nach Meredith (1988) herangezogen werden, welches eine verbesserte Stabilität des Cytochrom-P450-Systems in den isolierten Hepatozyten verspricht (Bayad *et al.*, 1991) und demzufolge auch auf eine erhöhte Funktionalität der beiden Rezeptoren CAR und PXR schließen lässt. Zusätzlich sollte anhand einer gezielten Inhibition der einzelnen Rezeptorfunktion mittels spezifischer siRNAs sowie einer Hemmung der Signalwege seitens Okadainsäure und Ketoconazol geprüft werden, inwieweit sich der CAR bzw. der PXR für die Induktion der jeweiligen fremdstoffmetabolisierenden Enzyme verantwortlich zeigen. Weiterhin sollten nähere Kenntnisse darüber erlangt werden, ob sich der Ausfall eines Rezeptors auf die jeweilige CYP-Expression durch den anderen Rezeptor auswirkt bzw. ob eine mögliche Konkurrenz zwischen den beiden Rezeptoren besteht und eine zeitgleiche Aktivierung beider Rezeptoren somit einen Einfluss auf die Induktion durch den jeweils anderen nukleären Rezeptor aufweist.

Infolgedessen, dass viele Induktoren fremdstoffmetabolisierender Enzyme nachweislich auch als potente Tumorpromotoren in der Rattenleber fungieren (Hemming *et al.*, 1993; Bursch *et al.*, 1984), sollte der Einfluss der nicht-dioxinartigen PCBs zudem hinsichtlich ihrer Effekte auf die UV-induzierte Apoptose ergründet werden. Hierbei sollte auch verglichen werden, ob die zugrunde liegenden Mechanismen ausschließlich jenen von Phenobarbital ähneln oder ob diese auch mit den apoptosehemmenden Wirkungen von PXR-Aktivatoren wie Dexamethason in Verbindung gebracht werden können. Weiterhin sollten Untersuchungen mit spezifischen siRNAs Hinweise darüber liefern, ob die antiapoptotische Wirkung der NDL-PCBs über den CAR, den PXR oder möglicherweise über beide Rezeptoren vermittelt wird.

Beim Vergleich zwischen der NDL-PCB-bedingten Apoptosehemmung und der Enzyminduktion sollte anschließend die Frage geklärt werden, ob zwischen den beiden Prozessen eine hinreichende Korrelation besteht und jeweils dieselben Rezeptoren beteiligt sind, so dass möglicherweise aus einer Aktivierung spezifischer fremdstoffmetabolisierender Enzyme auf eine entsprechende Tumorpromotion geschlossen werden kann. Abschließend sollte in Anbetracht dessen, dass sich aus epidemiologischen Studien aufgrund diverser Verunreinigungen keine Rückschlüsse auf Effekte ziehen lassen, die ausschließlich den NDL-PCBs zuzuordnen sind, analysiert werden, ob sich über den Vergleich der Wirkmechanismen der nicht-dioxinartigen PCBs mit dem CAR-Agonisten Phenobarbital bzw. mit dem PXR-Agonisten Dexamethason eine Einschätzung über das tumorpromovierende Potential dieser Verbindungen beim Menschen ableiten lässt.

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

| Chemikalie/Reagenz  | Hersteller, Ort             |
|---|-----------------------------|
| 2,2',3,4,4',5,5'-Heptachlorbiphenyl (PCB 180)   | Chiron AS, Trondheim        |
| 2,2',3,4,4',5'-Hexachlorbiphenyl (PCB 138)  | Chiron AS, Trondheim        |
| 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl (PCB 153)  | Chiron AS, Trondheim        |
| 2,2',4,5,5'-Pentachlorbiphenyl (PCB 101)  | Chiron AS, Trondheim        |
| 2,2',5,5'-Tetrachlorbiphenyl (PCB 52)   | Chiron AS, Trondheim        |
| 2,4,4'-Trichlorbiphenyl (PCB 28)  | Chiron AS, Trondheim        |
| Ac-DEVD-AFC (C <sub>30</sub> H <sub>34</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>13</sub> )                                      | Santa Cruz, Heidelberg      |
| Ac-IETD-AFC (C <sub>31</sub> H <sub>38</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>12</sub> )                                      | Santa Cruz, Heidelberg      |
| Ac-LEHD-AFC (C <sub>33</sub> H <sub>38</sub> F <sub>3</sub> N <sub>7</sub> O <sub>11</sub> )                                      | Santa Cruz, Heidelberg      |
| Agarose (C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub> )   | AppliChem, Darmstadt        |
| 7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin (AFC, C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> )                           | Enzo Life Sciences, Lörrach |
| Ammoniumperoxodisulfat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )   | Merck, Darmstadt            |
| Bromphenolblau (C <sub>19</sub> H <sub>9</sub> Br <sub>4</sub> NaO <sub>5</sub> S)  | Sigma-Aldrich, Schnelldorf  |
| BSA (Fraktion V, Bovines Serumalbumin)  | Roth, Karlsruhe             |
| Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O)   | Merck, Darmstadt            |
| Chloroform (CHCl <sub>3</sub> )   | Merck, Darmstadt            |
| 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan sulfonat (CHAPS, C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S) | Merck, Darmstadt            |
| <i>p</i> -Coumarinsäure (C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> )   | Sigma-Aldrich, Schnelldorf  |
| Dexamethason (C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> FO <sub>5</sub> )   | Sigma-Aldrich, Schnelldorf  |
| 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> )   | AppliChem, Darmstadt        |
| 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO, C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> )  | Sigma-Aldrich, Schnelldorf  |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC, C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> )  | Sigma-Aldrich, Schnelldorf  |
| <i>N,N</i> -Dimethylformamid (DMF, C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO)  | Sigma-Aldrich, Schnelldorf  |
| Dimethylsulfoxid (DMSO, C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)   | Sigma-Aldrich, Schnelldorf  |
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O)   | Riedel-de Haën, Seelze      |
| 1,4-Dithiothreitol (DTT, C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> )   | AppliChem, Darmstadt        |
| Essigsäure (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )  | Roth, Karlsruhe             |

| <b>Chemikalie/Reagenz</b>  | <b>Hersteller, Ort</b>       |
|--|------------------------------|
| Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)  | Roth, Karlsruhe              |
| Ethidiumbromid (C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub> )   | Sigma-Aldrich, Schnelldorf   |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )                                | Roth, Karlsruhe              |
| Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA, C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> ) | Roth, Karlsruhe              |
| Formaldehyd (CH <sub>2</sub> O)-Lösung (37 %)  | Merck, Darmstadt             |
| Formamid (CH <sub>3</sub> NO)  | Merck, Darmstadt             |
| Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )   | Merck, Darmstadt             |
| Glycerin (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> )   | Sigma-Aldrich, Schnelldorf   |
| Glycin (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )  | Sigma-Aldrich, Schnelldorf   |
| Hoechst 33342  | Invitrogen, Darmstadt        |
| N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES, C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S)            | Roth, Karlsruhe              |
| Insulin  | Sigma-Aldrich, Schnelldorf   |
| <i>iScript cDNA Synthesis Kit</i>  | Bio-Rad, München             |
| Isopropanol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O)  | Merck Darmstadt              |
| Kaisers Glyceringelatine   | Merck Darmstadt              |
| Kaliumchlorid (KCl)  | Roth, Karlsruhe              |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )  | Merck, Darmstadt             |
| Ketoconazol (C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> )                                       | Sigma-Aldrich, Schnelldorf   |
| Laktat-Sirup (60 %)  | Sigma-Aldrich, Schnelldorf   |
| <i>Lipofectamine RNAiMAX</i>   | Invitrogen, Darmstadt        |
| Luminol (C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )   | Sigma-Aldrich, Schnelldorf   |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O)   | Sigma-Aldrich, Steinheim     |
| Medium 199 10x   | Invitrogen, Darmstadt        |
| β-Mercaptoethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)   | AppliChem, Darmstadt         |
| Methanol (CH <sub>3</sub> OH)  | Merck, Darmstadt             |
| Milchpulver  | Spinnrad GmbH, Gelsenkirchen |
| Natriumacetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> )  | Sigma-Aldrich, Schnelldorf   |
| 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS, C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub> S)   | Roth, Karlsruhe              |
| Natriumchlorid (NaCl)  | Roth, Karlsruhe              |
| Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )  | Merck, Darmstadt             |
| Natriumdodecylsulfat (SDS, CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> OSO <sub>3</sub> Na)                                   | Merck, Darmstadt             |
| Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )  | Merck, Darmstadt             |
| Natriumhydroxid (NaOH)   | Sigma-Aldrich, Schnelldorf   |

| <b>Chemikalie/Reagenz</b>  | <b>Hersteller, Ort</b>         |
|--|--------------------------------|
| Neugeborenen-Kälberserum (NCS)   | Invitrogen, Darmstadt          |
| Normales Ziegenserum (NGS)   | Invitrogen, Darmstadt          |
| Okadainsäure (C <sub>44</sub> H <sub>68</sub> O <sub>13</sub> )  | Calbiochem, Darmstadt          |
| Paraformaldehyd (OH(CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub> H)   | Sigma-Aldrich, Schnelldorf     |
| Penicillin-Streptomycin (100x)   | PAA Laboratories, Cölbe        |
| Pentobarbital (C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )   | Sigma-Aldrich, Schnelldorf     |
| Percoll  | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Phenobarbital (C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )   | Sigma-Aldrich, Schnelldorf     |
| Piperazin- <i>N,N'</i> -bis-(2-ethansulfonsäure) (PIPES, C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> ) | Roth, Karlsruhe                |
| Polyvinylalkohol (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O)   | AppliChem, Darmstadt           |
| Primer   | MWG-Biotech AG, Ebersberg      |
| Proteaseinhibitor-Cocktail   | Sigma-Aldrich, Schnelldorf     |
| <i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i>   | Bio-Rad, München               |
| Pyruvat (C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> )  | AppliChem, Darmstadt           |
| Resazurin (C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub> )  | Sigma-Aldrich, Schnelldorf     |
| Rhodamin-Phalloidin  | Invitrogen, Darmstadt          |
| <i>RNase AWAY</i>  | Sigma-Aldrich, Schnelldorf     |
| Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid-Mix)  | Roth, Karlsruhe                |
| Saccharose (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )  | Sigma-Aldrich, Schnelldorf     |
| Salzsäure (HCl)  | Roth, Karlsruhe                |
| Saponin  | Sigma-Aldrich, Schnelldorf     |
| <i>SYBR Green Fluorescein</i>  | Thermo Scientific, Karlsruhe   |
| <i>Stealth RNAi Negative Control</i>   | Invitrogen, Darmstadt          |
| <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin (TEMED, C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> )                                     | Serva, Heidelberg              |
| <i>Thermo Scientific SuperSignal West Femto</i><br>Chemilumineszenz-Substrat   | Thermo Scientific              |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris, C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )  | Roth, Karlsruhe                |
| Triton X-100 (C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> )  | Roth, Karlsruhe                |
| TRizol   | Thermo Scientific, Karlsruhe   |
| Trypanblau (C <sub>34</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O <sub>14</sub> S <sub>4</sub> )  | Sigma-Aldrich, Schnelldorf     |
| Tween 20 (Polysorbat 20, C <sub>58</sub> H <sub>114</sub> O <sub>26</sub> )  | Sigma-Aldrich, Schnelldorf     |
| <i>UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water</i>  | Gibco BRL, Karlsruhe           |
| Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )-Lösung (30 %)  | AppliChem, Darmstadt           |
| Williams' Medium E   | Invitrogen, Darmstadt          |

## 4.1.2 Geräte und Materialien

Tabelle 2: Geräte und Materialien

| Geräte  | Hersteller, Ort                        |
|---|--|
| Autoklav UNOLD Elektro                          | UNOLD, Hockenheim                      |
| Autoklav Varioklav Typ 500                      | H & P Labortechnik,<br>Oberschleißheim |
| Biofreezer MDF-U6086S                           | Sanyo, München                         |
| Biofreezer Skadi                                | MS-L GmbH, Dielheim                    |
| Brutschrank BBD6220 Heraeus                     | Heraeus, Hanau                         |
| Eagle Eye II Imaging System                     | Stratagene, Amsterdam                  |
| Elektrophoresekammer Mini Protean III Apparatus | Bio-Rad, München                       |
| Heizblock Thermostat 5320                       | Eppendorf, Hamburg                     |
| Lumi-Imager                                     | Roche, Mannheim                        |
| Magnetrührer MR 3001                            | Heidolph Elektro GmbH, Kelheim         |
| Mikroskop Axioskop 2                            | Zeiss, Jena                            |
| Mikroskop Axiovert 25                           | Zeiss, Jena                            |
| Mikroskop Leica DM IRB                          | Leica, Wetzlar                         |
| MyCycler Thermal Cycler                         | Bio-Rad, München                       |
| MyiQ Thermal Cycler                             | Bio-Rad, München                       |
| NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer              | Thermo Scientific, Karlsruhe           |
| Perfusionspumpe BVP                             | Ismatec SA, Wertheim                   |
| Pipetus-Akku                                    | Hirschmann Laborgeräte,<br>Eberstadt   |
| Plattenreader Flourosan Ascent FL               | Thermo Scientific, Karlsruhe           |
| Plattenreader Synergy HAT Multi                 | BioTek, Bad Friedrichshall             |
| pH-Meter pH 510                                 | Eutech Instruments, Nijkerk            |
| Semi-Dry-Blotting-Apparatur                     | Hoefer Inc., Holliston                 |
| Sterilbank Steag MRF-B                          | STEAG GmbH, Essen                      |
| Sterilfilter Rotilabo Spritzenfilter 0,22 µm    | Roth, Karlsruhe                        |
| Sterilfilter Rotilabo Spritzenfilter 0,45 µm    | Roth, Karlsruhe                        |
| Ultraschallnadelsonde Labsonic                  | B. Braun, Melsungen                    |
| Ultrazentrifuge Optima TL 100                   | Beckman Coulter, Krefeld               |
| Vortexer Agitateur Top-Mix 11118                | Bioblock Scientific AG, Frenkendorf    |
| Vortexer Reax 2000                              | Heidolph Elektro GmbH, Kelheim         |
| Waage Sartorius BP 210 S                        | Sartorius AG, Göttingen                |

---

| <b>Geräte</b>                          | <b>Hersteller, Ort</b>           |
|--|----------------------------------|
| Waage Sartorius CP64-OCE               | Sartorius AG, Göttingen          |
| Waage OHAUS Precision Standard         | OHAUS, Gießen                    |
| Wärmeblock AccuBlock Digital Dry Baths | Labnet International, Edison     |
| Wasserbad GFL 1083                     | GFL, Burgwedel                   |
| Wasserbad Julabo 13                    | Julabo, Seelbach                 |
| Wasserbad T Lauda                      | Lauda, Lauda-Königshofen         |
| Zählkammer Fuchs-Rosenthal             | Brand, Wertheim                  |
| Zentrifuge 1K1S                        | Sigma Laborzentrifugen, Osterode |
| Zentrifuge GS-6R                       | Beckman Coulter, Krefeld         |
| Zentrifuge JA-14                       | Beckman Coulter, Krefeld         |
| Zentrifuge Rotina 45                   | Beckman Coulter, Krefeld         |

---

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 NDL-PCBs

Die nicht-dioxinartigen polychlorierten Biphenyle (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 und PCB 180) wurden an der Universität von Umeå auf ihre Reinheit hin überprüft (Tabelle 3). Bei möglichen dioxinartigen Verunreinigungen, wie z. B. PCDDs, PCDFs oder DL-PCBs wurden die NDL-PCBs anschließend nach einer Methode von Danielsson *et al.* (2008) aufgereinigt.

**Tabelle 3: Angabe der Reinheit sowie der TEQ-Werte der verwendeten NDL-PCBs**

| NDL-PCB | Reinheit [%] | TEQ [ng/g] |
|---------|--------------|------------|
| 28      | <99,9        | 40,9       |
| 52      | 99,9         | 0,39       |
| 101     | 99,4         | 0,79       |
| 138     | <99,9        | 11,9       |
| 153     | 99,2         | 0,7        |
| 180     | 98,9         | 0,3        |

### 4.2.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Zur Gewinnung der benötigten primären Hepatozyten wurden adulte, männliche Wistar-Ratten (Charles River, Kißlegg) mit einem Körpergewicht von 200 bis 250 g verwendet. Die Versuchstiere wurden unter künstlichen Tag-Nacht-Lichtverhältnissen (12-h-Rhythmus) in Makrolon-Käfigen im Tierhaus der TU Kaiserslautern gehalten. Sie hatten zu Trinkwasser und Trockenfutter (Altromin, Lage) freien Zugang.

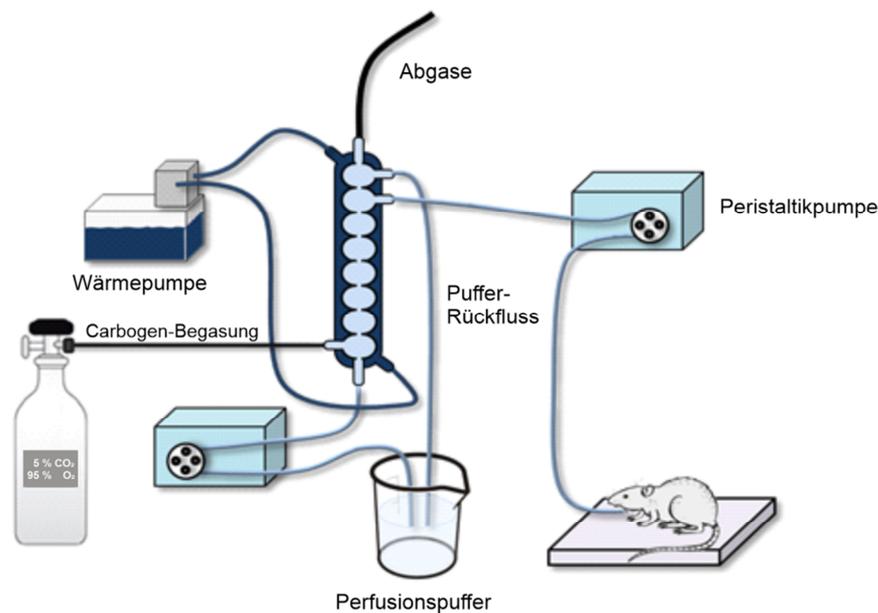
### 4.2.3 Isolierung von Rattenhepatozyten nach Meredith

Zur Isolierung der primären Rattenhepatozyten wurde ein Perfusionsprotokoll nach Meredith (1988) verwendet, durch welches sich die Sensitivität des Cytochrom-P450-Systems im Gegensatz zu klassischen Kollagenase-haltigen Perfusionsmethoden funktionell besser erhalten lässt (Bayad *et al.*, 1991).

Zur Gewährleistung einer sterilen Präparation wurden die verwendeten Glasgeräte, das Präparierbesteck sowie auch das Perfusionssystem autoklaviert und alle verwendeten Lösungen durch einen 0,2 µm-Filter sterilfiltriert. Der Perfusionspuffer wurde direkt vor Beginn der Perfusion für 45 min bei 37 °C mit Carbogengas [95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>] äquilibriert (Abb. 15).

Der Waschpuffer sowie das Medium 199 wurden ebenfalls auf 37 °C temperiert und im Anschluss der pH-Wert der drei Lösungen auf pH 7,4 eingestellt.

Zur Anästhesierung der für die Perfusion herangezogenen Ratten wurden 300 µl Pentobarbital-Lösung (Tabelle 4) je 100 g Körpergewicht intraperitoneal injiziert und die Tiere anschließend in Rückenlage auf einer Styroporunterlage an den Gliedmaßen fixiert. Die Wirksamkeit der Narkose wurde mittels Bauchmuskelreflextest überprüft, welcher bei unvollständig eingetretener Narkose zur Kontraktion der Bauchmuskulatur nach Zusammendrücken der Schwanzwurzel führt.



**Abb. 15: Perfusionsaufbau für die Isolierung nach Meredith (1988)** (modifiziert nach Gähns, 2010)

Anschließend wurde das Abdomen durch Längsschnitt entlang der *Linea alba* bis zum Sternum eröffnet und die Leber mit dem dazugehörigen Gefäßsystem freipräpariert. Über eine Braunüle in der Pfortader (*Vena portae*) wurde der Perfusionspuffer mit einer Durchflussrate von 40 ml/min in die Leber geleitet und anschließend die *Vena cava inferior* unterhalb der Leber durchtrennt, um das Abfließen von Blut und Perfusat in den Bauchraum zu gewährleisten. Durch die Verwendung des EDTA-haltigen und  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Perfusionspuffers (Tabelle 4) werden dem Gewebe dabei Calciumionen entzogen, so dass sich die Verbindungen zwischen den einzelnen Leberzellen (Desmosomen) lösen.

Eine zusätzliche Venenverweilkanüle (Braunüle) wurde in die *Vena cava inferior* kurz unterhalb des Herzens eingeführt, wodurch nun der Austrag nach Verschließen der *Vena cava inferior* unterhalb der Leber nicht mehr über diese, sondern über die Braunüle unterhalb des Herzens erfolgte, um einen optimalen Durchfluss des Perfusionspuffers durch die Leber zu

ermöglichen. Nach Durchfluss des gesamten Perfusionspuffers weist das Gewebe eine netzartige Oberflächenstruktur auf, woraufhin die Leber vorsichtig aus dem Tier herauspräpariert werden kann.

Um die Zellen aus den Leberlappen zu lösen, wurde die Leberkapsel mit Hilfe einer Pinzette in einer sterilen Glasschale mit 100 ml Waschpuffer geöffnet. Um Bindegewebsreste und größere Zellverbände zu entfernen, wurde die Zellsuspension durch ein Nylonnetz der Netzstärke 250  $\mu\text{m}$  filtriert. Dieser Vorgang wurde mit einem feinmaschigeren Netz mit einer Netzstärke von 100  $\mu\text{m}$  wiederholt und anschließend die Zellsuspension für 3 min bei 50  $g$  und Raumtemperatur (RT) ohne Bremskrafteinsatz zentrifugiert, um lebende Hepatozyten zu sedimentieren und von Zelltrümmern und toten Zellen im Überstand zu trennen. Nach Absaugen des Überstands wurde das Pellet in 50 ml Waschpuffer resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Das nach der dritten Zentrifugation entstandene Zellsediment wurde in 16 ml Waschpuffer und 32 ml Percoll-Dichtegradientenlösung resuspendiert. Die Suspension mit einer finalen Konzentration von 58 % (v/v) Percoll wurde anschließend bei 800  $g$  und RT für 5 min ohne Bremskrafteinsatz zentrifugiert. Durch die Zentrifugation reicherten sich Zellreste und tote Hepatozyten in einer Bande auf dem Gradienten an, so dass diese zusammen mit dem überschüssigen Puffer abgesaugt werden konnten. Im Anschluss wurde das Sediment der Hepatozyten in 20 ml Medium 199 resuspendiert und zur Aussaat eingesetzt.

**Tabelle 4: Perfusionslösungen**

|   |   |                             |
|---|---|-----------------------------|
| <b>Pentobarbitallösung</b>                | Pentobarbital (3,3 % (w/v))                                   | 33 mg                       |
|   | ddH <sub>2</sub> O  | ad 1 ml                     |
|   | kurz vor Gebrauch ansetzen                                    |                             |
| <b>Perfusionspuffer-Stammlösung (10x)</b> | NaCl (1,4 M)  | 81,82 g                     |
|   | KCl (50 mM)   | 3,73 g                      |
|   | MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O (8 mM)                 | 1,63 g                      |
|   | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O (16 mM) | 2,85 g                      |
|   | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (4 mM)                        | 0,544 g                     |
|   | ddH <sub>2</sub> O  | ad 1 l                      |
|   |   | pH 7,4<br>Lagerung bei 4 °C |
| <b>NaHCO<sub>3</sub>-Stammlösung</b>      | NaHCO <sub>3</sub> (1 M)                                      | 8,4 g                       |
|   | ddH <sub>2</sub> O  | ad 100 ml                   |
|   | Lagerung bei RT   |                             |

|                                       |   |   |
|---------------------------------------|---|---|
| <b>EDTA-Stammlösung</b>               | EDTA (0,5 M)<br>ddH <sub>2</sub> O<br><br>pH 8,0<br>Lagerung bei 4 °C   | 14,61 g<br>ad 100 ml  |
| <b>Glucose-Stammlösung</b>            | D-Glucose (2 M)<br>ddH <sub>2</sub> O<br><br>Lagerung bei 4 °C  | 36,03 g<br>ad 100 ml  |
| <b>Laktat-Stammlösung</b>             | Laktat-Sirup (60 % (w/w))<br>(0,5 M)<br>ddH <sub>2</sub> O<br><br>Lagerung bei 4 °C   | 7 ml<br>ad 100 ml   |
| <b>Pyruvat-Stammlösung</b>            | Pyruvat (200 mM)<br>ddH <sub>2</sub> O<br><br>Lagerung bei 4 °C   | 2,2 g<br>ad 100 ml  |
| <b>Calciumchlorid-Stammlösung</b>     | CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O (2 M)<br>ddH <sub>2</sub> O<br><br>Lagerung bei -20 °C   | 29,4 g<br>ad 100 ml   |
| <b>Perfusionspuffer</b>               | Perfusionspuffer-Stlsg. (10x)<br>NaHCO <sub>3</sub> (25 mM)<br>EDTA (2 mM)<br>Glucose (15 mM)<br>Laktat (2 mM)<br>Pyruvat (0,2 mM)<br>ddH <sub>2</sub> O<br><br>pH 7,4<br>Lagerung bei 4 °C | 200 ml<br>50 ml (1 M Stlsg.)<br>8 ml (0,5 M Stlsg.)<br>15 ml (2 M Stlsg.)<br>8 ml (0,5 M Stlsg.)<br>2 ml (0,2 M Stlsg.)<br>ad 2 l |
| <b>Waschpuffer</b>                    | Perfusionspuffer-Stlsg. (10x)<br>CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O (1 mM)<br>ddH <sub>2</sub> O<br><br>pH 7,4<br>Lagerung bei 4 °C   | 50 ml<br>250 µl (2 M Stlsg.)<br>ad 500 ml   |
| <b>Percoll-Dichtegradientenlösung</b> | Percoll<br>Perfusionspuffer-Stlsg. (10x)<br><br>Lagerung bei 4 °C   | 27,8 ml<br>4,2 ml   |

---

|                          |                            |        |
|--------------------------|----------------------------|--------|
| <b>Medium 199 (M199)</b> | Medium 199 (10x)           | 100 ml |
|                          | D-Glucose (5,5 mM)         | 0,99 g |
|                          | HEPES (15 mM)              | 3,57 g |
|                          | NaHCO <sub>3</sub> (18 mM) | 1,51 g |
|                          | BSA (0,2 % (w/v))          | 2,00 g |
|                          | ddH <sub>2</sub> O         | ad 1 l |
|                          |                            |        |
|                          | pH 7,4                     |        |
|                          | Lagerung bei 4 °C          |        |

---

#### 4.2.4 Bestimmung der Gesamt- und Lebendzellzahl der primären Hepatozyten

Für die Ermittlung der Gesamt- und Lebendzellzahl der Zellsuspension wurde eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer verwendet.

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden zunächst 10 µl Zellsuspension mit 990 µl Waschpuffer versetzt, eine ausreichende Menge in die Zählkammer pipettiert und anschließend die Zellen dreier Großquadrate mikroskopisch ausgezählt. Mit dem Mittelwert dieser wurde die Zellzahl unter Einbeziehung der Kammerfaktoren sowie des Verdünnungsfaktors folgendermaßen berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{Z * 80.000 * 100}{16}$$

*Z: Mittelwert der ausgezählten Zellen dreier Großquadrate*

*100: Verdünnungsfaktor*

*80.000; 16: Faktoren der Zählkammer*

Die Bestimmung der Vitalität erfolgte anhand des Trypanblau-Ausschlusstests. Hierzu wurden 150 µl Waschpuffer mit 150 µl Trypanblau sowie 10 µl Zellsuspension versetzt und sowohl die Anzahl der blau gefärbten, toten Zellen als auch der nicht gefärbten, lebenden Zellen in der Zählkammer bestimmt. Aus dem Verhältnis von lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl ergibt sich dabei der Vitalitätsfaktor. Die Anzahl der vitalen Zellen entspricht hierbei dem Produkt von Gesamtzellzahl und Vitalitätsfaktor. Für die durchgeführten Experimente wurden ausschließlich Zellsuspensionen mit einer Vitalitätsrate von mindestens 95 % herangezogen, um eine homogene und erfolgreiche Versuchsdurchführung sicherzustellen.

#### 4.2.5 Herstellung der Kollagenlösung

Etwa 20 Rattenschwänze wurden in 70 %-igem Ethanol desinfiziert und die Haut unter der Sterilbank entfernt. Die Kollagenfasern wurden mit einer Pinzette an der Schwanzspitze herausgezogen und über Nacht mittels UV-Strahlung getrocknet und sterilisiert. Im Anschluss wurden die Fasern in 2 cm große Stücke zerschnitten und durch Zerreiben zwischen den Fingern vereinzelt, erneut über Nacht unter UV-Licht sterilisiert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Herstellung von 500 ml Stocklösung wurden 2 g der Kollagenfasern unter der Sterilbank mit 100 ml ddH<sub>2</sub>O versetzt und etwa 1 h unter Rühren gewaschen. Die gereinigten Fasern wurden in 500 ml sterilfiltrierte Essigsäure (0,1 %) überführt, für 24 h unter Rühren gelöst und anschließend bei 3.000 g und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 3 h zentrifugiert, um sie von nicht in Lösung gegangenen Fasern abzutrennen.

Die so gewonnene Stammlösung kann nach Bestimmung der Proteinkonzentration für 6 Monate bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden. Für das Beschichten von Zellkulturschalen wird die Stammlösung mit steriler 0,1 %-iger Essigsäure auf einen Proteingehalt von 0,5 mg Protein/ml eingestellt.

#### 4.2.6 Kollagenieren von 24-Well-Platten und Petrischalen

Für eine optimale Adhäsion der primären Hepatozyten auf den verwendeten Kulturgefäßen wurden diese jeweils mit einer dünnen Kollagenschicht versehen.

Hierzu wurden 500  $\mu\text{l}$  einer sterilen Kollagen-Lösung (0,5 mg Protein/ml in 0,1 %-iger Essigsäure) in jedes Well der 24-Well-Platten gegeben und anschließend mit einer Pipette wieder entfernt, so dass ein dünner Flüssigkeitsfilm im Well zurückbleibt. 60 mm- bzw. 90 mm-Petrischalen wurden kollageniert, indem eine ausreichende Menge der sterilen Kollagen-Lösung jeweils von einer in die nächste Petrischale überführt wurde.

Abschließend wurden die so präparierten Well-Platten bzw. Kulturschalen über Nacht in der Sterilbank mittels UV-Bestrahlung getrocknet und sterilisiert.

#### 4.2.7 Kultivierung und Behandlung der Hepatozyten

Je kollagenierte 60 mm-Petrischale wurden  $2,5 \cdot 10^6$  primäre Hepatozyten in 4 ml Williams' E Aussaatmedium mit 0,5 nM Insulin, 4 % Neugeborenen-Kälberserum (NCS), 0,1  $\mu\text{M}$  Dexamethason und 1 % Antibiotika ausgesät (Tabelle 5).

In jede 24-Well-Platte wurden  $5,5 \cdot 10^6$  primäre Hepatozyten in insgesamt 12 ml Williams' E Aussaatmedium ausgesät und pro 90 mm-Petrischale wurden je  $6 \cdot 10^6$  primäre Hepatozyten in 6 ml Medium verwendet.

**Tabelle 5: Williams' E Aussaatmedium**

|                                 |                                      |                        |
|---------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| <b>Aussaatmedium</b>            | Williams' Medium E                   | 500 ml                 |
|                                 | NCS (4 % (v/v))                      | 20 ml                  |
|                                 | Insulin (0,5 nM)                     | 25 µl (10 µM Stlsg.)   |
|                                 | Dexamethason (0,1 µM)                | 500 µl (100 µM Stlsg.) |
|                                 | Penicillin-Streptomycin (1 % (v/v))  | 5 ml                   |
| Lagerung bei 4 °C               |                                      |                        |
| <b>Insulin-Stammlösung I</b>    | Insulin (10 µM)                      | 2,9 g                  |
|                                 | BSA (0,1 % (w/v))                    | 50,0 mg                |
|                                 | NaCl-Lösung (0,9 % (w/v))            | ad 50 ml               |
|                                 | Sterilfiltration und Sterilkontrolle |                        |
| Lagerung bei -20 °C             |                                      |                        |
| <b>Dexamethason-Stammlösung</b> | Dexamethason (100 µM)                | 2,0 mg                 |
|                                 | Ethanol (0,3 % (v/v))                | 150 µl                 |
|                                 | NaCl (0,9 % (w/v))                   | ad 50 ml               |
|                                 | Sterilfiltration und Sterilkontrolle |                        |
| Lagerung bei -20 °C             |                                      |                        |

Nach einer 3–4-stündigen Anhaftungsphase im Brutschrank (37 °C, 95 % relative Luftfeuchte, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden tote Zellen durch Absaugen des Mediums entfernt und die Zellkulturschale wieder mit serumfreiem Williams' E Kulturmedium mit 1 µM Insulin versetzt (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Williams' E Kulturmedium**

|                                      |                                     |                        |
|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| <b>Kulturmedium</b>                  | Williams' Medium E                  | 500 ml                 |
|                                      | Insulin (1 µM)                      | 5 ml (100 µM Stlsg.)   |
|                                      | Dexamethason (0,1 µM)               | 500 µl (100 µM Stlsg.) |
|                                      | Penicillin-Streptomycin (1 % (v/v)) | 5 ml                   |
|                                      | Lagerung bei 4 °C                   |                        |
| <b>Insulin-Stammlösung II</b>        | Insulin (100 µM)                    | 29 g                   |
|                                      | BSA (0,1 % (w/v))                   | 50,0 mg                |
|                                      | NaCl-Lösung (0,9 % (w/v))           | ad 50 ml               |
|                                      | pH 7,4                              |                        |
| Sterilfiltration und Sterilkontrolle |                                     |                        |
| Lagerung bei -20 °C                  |                                     |                        |

|   |                       |          |
|---|-----------------------|----------|
| <b>Dexamethason-Stammlösung</b>                             | Dexamethason (100 µM) | 2,0 mg   |
|   | Ethanol (0,3 % (v/v)) | 150 µl   |
|   | NaCl (0,9 % (w/v))    | ad 50 ml |
| Sterilfiltration und Sterilkontrolle<br>Lagerung bei –20 °C |                       |          |

Im Anschluss erfolgte die Zugabe der Inkubationssubstanzen für je 24 Stunden, als Positivkontrolle wurden 0,1 mM Phenobarbital bzw. 10 µM Dexamethason, als Negativkontrolle das verwendete Lösungsmittel mitgeführt. Die Konzentration vom Lösungsmittel DMSO betrug hierbei stets 0,5 %.

Gegebenenfalls wurden die Zellen während des Mediumwechsels vor der Zugabe der Inkubationssubstanzen mit der entsprechenden Dosis an UV-C-Licht bestrahlt, um Apoptose zu induzieren.

Für Experimente mit Okadainsäure bzw. Ketoconazol wurden die Zellen jeweils für 1 h mit diesen Substanzen vorbehandelt, bevor die Zellen mit PCBs, Phenobarbital oder Dexamethason in verschiedenen Konzentrationen inkubiert wurden (Tabelle 7). Im Anschluss an die 24-stündige Inkubation im Brutschrank (37 °C, 95 % relative Luftfeuchte, 5 % CO<sub>2</sub>) erfolgte die Zellernte.

**Tabelle 7: Verwendete Konzentrationen der Inkubationssubstanzen**

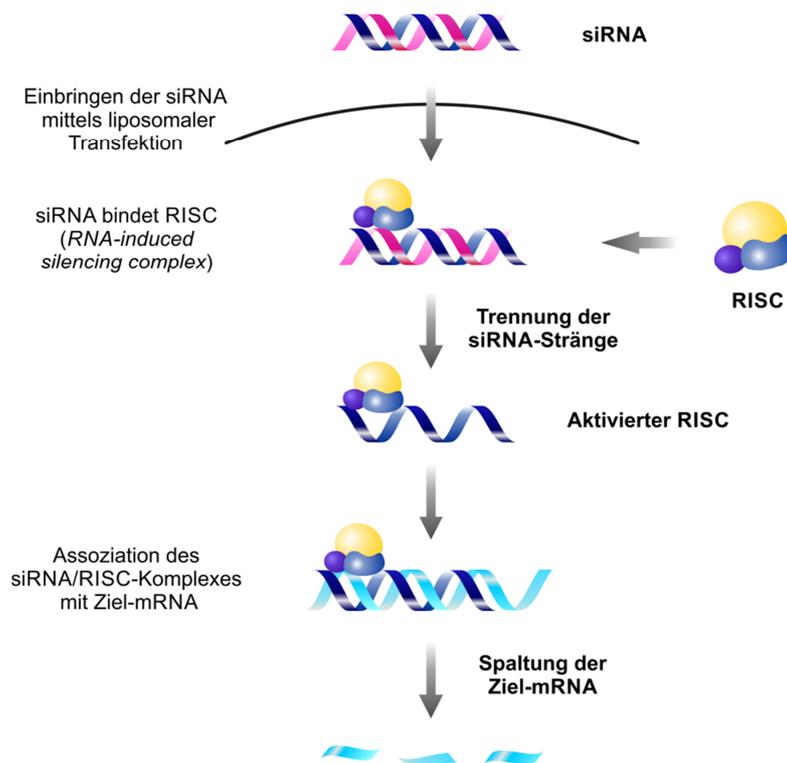
| <b>Substanz</b> | <b>Konzentration</b>                             |
|-----------------|--|
| Phenobarbital   | 0,01 / 0,05 / 0,1 / 0,5 / 1 / 1,5 / 2,5 / 5 mM   |
| Dexamethason    | 0,1 / 0,5 / 1 / 2,5 / 5 / 10 / 25 / 50 µM        |
| PCB 28          | 0,01 / 0,1 / 0,5 / 1 / 5 / 10 / 30 / 50 / 100 µM |
| PCB 52          | 0,01 / 0,1 / 0,5 / 1 / 5 / 10 / 30 / 50 / 100 µM |
| PCB 101         | 0,01 / 0,1 / 0,5 / 1 / 5 / 10 / 30 / 50 / 100 µM |
| PCB 138         | 0,01 / 0,1 / 0,5 / 1 / 5 / 10 / 30 / 50 / 100 µM |
| PCB 153         | 0,01 / 0,1 / 0,5 / 1 / 5 / 10 / 30 / 50 / 100 µM |
| PCB 180         | 0,01 / 0,1 / 0,5 / 1 / 5 / 10 / 30 / 50 / 100 µM |
| Okadainsäure    | 0,1 / 0,5 / 1 / 2 / 2,5 / 5 / 10 / 25 nM         |
| Ketoconazol     | 5 / 10 / 15 / 20 / 40 / 50 µM                    |

#### 4.2.8 Small interfering RNA (siRNA)

Um den Einfluss von CAR und PXR auf die Emzyminduktion bzw. die Apoptosehemmung zu untersuchen, wurden *small interfering RNAs* (siRNAs) verwendet, welche mit Hilfe liposomaler Transfektionsmittel künstlich in die Zelle eingebracht werden können.

siRNAs sind kleine doppelsträngige RNA-Moleküle von 19 bis 25 Nukleotiden Länge, die mittels RNA-Interferenz zur Reduktion der Genexpression mittels eines schnellen Abbaus der transkribierten mRNA durch die homologe siRNA führen. Die RNA-Interferenz kann hierbei im Allgemeinen in mehrere Phasen unterteilt werden (Abb. 16).

Im ersten Schritt bindet die siRNA an den *RNA-induced silencing complex* (RISC), welcher das zentrale Glied der RNA-Interferenz darstellt (Hammond *et al.*, 2001; Ambesajir *et al.*, 2012). Im zweiten Schritt wird der Doppelstrang der gebundenen siRNA innerhalb des RISC entwunden und gespalten. Der als Leitstrang bezeichnete RNA-Einzelstrang verbleibt hierbei im RISC und aktiviert den Enzymkomplex, während der andere Strang den Komplex verlässt und abgebaut wird.



**Abb. 16: Mechanismus des siRNA-induzierten mRNA-Abbaus** (modifiziert nach Hammond *et al.*, 2001)

Im dritten Schritt assoziiert die zum Leitstrang komplementäre Ziel-mRNA mit dem siRNA/RISC-Komplex, woraufhin diese als Konsequenz gespalten wird (Nykänen *et al.*, 2001).

Die zerschnittene, dissoziierte mRNA ist sehr instabil und wird somit schnell durch intrazelluläre Nukleasen abgebaut.

Nach der Spaltung der Ziel-mRNA bleibt der Leitstrang der siRNA unbeeinträchtigt bestehen, so dass der weiterhin aktivierte RISC den nächsten Degradationszyklus einleiten kann.

Für Experimente mit den jeweiligen siRNAs wurden je kollagenierte 60 mm-Petrischale  $2,5 \cdot 10^6$  primäre Hepatozyten in 4 ml Williams' E Aussaatmedium mit 0,5 nM Insulin, 4 % Neugeborenen-Kälberserum, 0,1  $\mu$ M Dexamethason und 1 % Antibiotika ausgesät. Nach der 3-stündigen Anwuchsphase wurde das Aussaatmedium durch 3,2 ml Serum- und Supplement-freies Williams' E Medium ersetzt.

Die siRNAs (100 nM) für CAR, PXR oder die Negativkontrolle (*Stealth RNAi Negative Control*, Invitrogen) wurden jeweils mit 400  $\mu$ l Serum- und Supplement-freiem Williams' E Medium versetzt. Ebenso wurden für jeden siRNA-Ansatz jeweils 8  $\mu$ l *Lipofectamine RNAiMAX* (Invitrogen) in 400  $\mu$ l Serum- und Supplement-freiem Williams' E Medium vereint. Im Anschluss wurden die beiden Lösungen unter leichtem Invertieren miteinander vermischt und nach 20 Minuten auf die Zellen gegeben.

Vier Stunden später wurde das Medium mit der siRNA durch Williams' E Kulturmedium mit 1  $\mu$ M Insulin und 1 % Antibiotika ersetzt und die Hepatozyten nachfolgend mit verschiedenen Testsubstanzen für 24 h inkubiert.

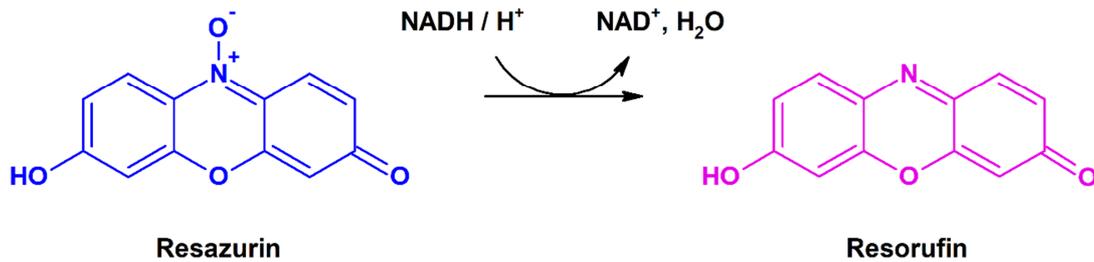
Für CAR und PXR wurde folgende *Stealth RNAi*, die jeweils spezifisch bei Invitrogen angefertigt wurde, verwendet:

|             |                  |   |
|-------------|------------------|---|
| <b>CAR:</b> | <i>sense</i>     | 5'- AUU GAU AUC UGC AAA GUG UGU GAG C -3' |
|             | <i>antisense</i> | 5'- GCU CAC ACA CUU UGC AGA UAU CAA U -3' |
| <b>PXR:</b> | <i>sense</i>     | 5'- AAA GGU UUG CAU CUG AGC GUC CAU C -3' |
|             | <i>antisense</i> | 5'- GAU GGA CGC UCA GAU GCA AAC CUU U -3' |

#### 4.2.9 Resazurin-Reduktionstest

Der Resazurin-Reduktionstest stellt eine schnelle, einfache und sensitive Methode zur *in vitro*-Erfassung der Zytotoxizität von Substanzen dar.

Die grundlegende Reaktion des Resazurin-Reduktionstests (siehe Abb. 17), welche in lebenden Zellen unter NADH-Verbrauch stattfindet, beruht auf der Umwandlung des blauen, nicht-fluoreszierenden Resazurins zu pinkfarbenem, fluoreszierendem Resorufin (O'Brien *et al.*, 2000).



**Abb. 17: Umwandlung von Resazurin zu Resorufin** (modifiziert nach Gähns, 2010)

Zur Durchführung des Resazurin-Reduktionstests wurden je kollagenierte 24-Well-Platte  $5,5 \cdot 10^6$  primäre Hepatozyten in 12 ml Williams' E Aussaatmedium gegeben und entsprechend den unter 4.2.7 beschriebenen Bedingungen in Kultur gehalten.

Jede der verwendeten Testsubstanzen bzw. die Positivkontrolle Saponin (0,1 %) wurde in Doppelbestimmung eingesetzt und für 24 h inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde das Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen mit 0,5 ml vorgewärmtem PBS je Well gewaschen. Von der gemäß Tabelle 8 unmittelbar vor Gebrauch hergestellten Resazurin-Arbeitslösung wurde jeweils 1 ml der Lösung in die Wells pipettiert und die primären Hepatozyten anschließend für 90 min lichtgeschützt bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

**Tabelle 8: Lösungen für den Resazurin-Reduktionstest**

|  |   |          |
|--|---|----------|
| <b>Resazurin-Stammlösung</b>               | Resazurin   | 110,5 mg |
|  | <i>N,N</i> -Dimethylformamid                          | 1 ml     |
| Lagerung bei 4 °C; 7 Tage; dunkel          |   |          |
| <b>NaCl/P<sub>i</sub>-Puffer</b>           | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 144 mg   |
|  | NaCl  | 9 g      |
|  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O | 528 mg   |
|  | ddH <sub>2</sub> O                                    | ad 1 l   |
| Lagerung bei 4 °C                          |   |          |
| <b>Resazurin-NaCl/P<sub>i</sub>-Lösung</b> | Resazurin-Stammlösung                                 | 1:1000   |
|  | NaCl/P <sub>i</sub> -Puffer                           |          |
| Lagerung bei 4 °C; 4 Wochen; dunkel        |   |          |
| <b>Resazurin-Arbeitslösung</b>             | Resazurin-NaCl/P <sub>i</sub> -Lösung                 | 1:10     |
|  | Williams' E Medium                                    |          |
| unmittelbar vor Gebrauch; dunkel           |   |          |

---

|  |   |         |
|--|---|---------|
| <b>PBS (phosphate buffered saline) – Calcium- und Magnesium-frei</b> | NaCl (137 mM)                             | 8,006 g |
|  | KCl (2,7 mM)                              | 0,201 g |
|  | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (6,5 mM) | 0,923 g |
|  | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,5 mM)  | 0,204 g |
|  | ddH <sub>2</sub> O                        | ad 1 l  |
|  | pH 7,4                                    |         |
|  | Lagerung bei RT bzw. 4 °C                 |         |

---

Im Anschluss wurde die Lichtemission der 24-Well-Platten bei 37 °C im Fluoroscan Ascent Plattenreader nach Anregung bei einer Wellenlänge von 544 nm bei einer Wellenlänge von 590 nm fluoreszenzspektrometrisch gemessen.

Hierbei steht die Vitalität der Zellen in direkter Korrelation zur Fluoreszenz des gebildeten Resorufins und wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{M_{B-L}}{M_{K-L}} * 100$$

*M<sub>B-L</sub>*: Messwert der behandelten Zellen abzüglich des Leerwerts

*M<sub>K-L</sub>*: Messwert der Lösungsmittelkontrolle abzüglich des Leerwerts

#### 4.2.10 Isolierung der RNA

Die Isolierung der RNA erfolgte mittels TRIzol (Thermo Scientific) entsprechend den Angaben des Herstellers, welche auf einem adaptierten Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987) beruhen. Hierfür wurde der Zellrasen im Anschluss an die 24-stündige Inkubation mit den Testsubstanzen dreimal mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung gewaschen und die 60 mm-Petrischalen bis zur weiteren Aufarbeitung im Biofreezer bei –80 °C aufbewahrt. Zur Isolierung der RNA wurden die Primärhepatozyten zunächst auf Eis aufgetaut, anschließend unter Zugabe von 1,5 ml TRIzol je Zellkulturschale mit einem sterilen *Rubber Policeman* homogenisiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt.

Zur weiteren Auflösung der Nukleotid-Protein-Komplexe wurde das Homogenat für 5 min auf Eis inkubiert, anschließend 300 µl Chloroform hinzupipettiert und durch Invertieren 15 s gemischt. Nach weiteren 5 min Inkubationszeit auf Eis wurde der Ansatz bei 4 °C und 12.000 g für 15 min zentrifugiert. Hierbei trennt sich der Ansatz in eine Phenol-Chloroform-Phase am Boden des Reaktionsgefäßes, eine Interphase sowie die obere wässrige Phase auf, in welcher die RNA enthalten ist.

Zur Fällung der RNA wurde die wässrige Phase vorsichtig entnommen und mit dem gleichen Volumen an Isopropanol (4 °C) versetzt. Durch vorsichtiges Invertieren wurde der Ansatz bis zur Ausbildung weißer Schlieren gemischt, die anschließende 10-minütige Inkubation auf Eis bewirkte eine vollständige Fällung der RNA. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C wurde der Überstand entfernt und das entstandene RNA-haltige Pellet zweimal durch Vortexen mit 1,5 ml RNase-freiem Ethanol (75 %) gewaschen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 7.500 g und 4 °C wurde der Überstand restlos entfernt und das Pellet für 10 min im offenen Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur stehen gelassen, um das Abdampfen verbleibenden Ethanols zu ermöglichen.

Die RNA wurde anschließend mit 50 µl RNase-freiem Wasser versetzt, durch Auf- und Abpipettieren darin resuspendiert, 1 min gevortext und nachfolgend bei 60 °C für 10 bis 15 min vollständig solubilisiert. Nach der im Folgenden beschriebenen quantitativen und qualitativen Bestimmung der RNA wurde diese bei –80 °C gelagert.

#### 4.2.11 Bestimmung der Quantität der RNA

Das NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer kann zur Bestimmung von DNA-, RNA- oder Proteinmengen eingesetzt werden, wobei die RNA-Konzentration bei 260 nm basierend auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz ermittelt wird:

$$c = \frac{A * e}{b}$$

*c* = Konzentration der RNA (ng/µl)

*A* = Absorption

*e* = wellenlängenabhängiger Extinktionskoeffizient

*b* = Weglänge in cm (Standard: 10,0 mm)

Die Reinheit der RNA kann anschließend über das Verhältnis der Messwerte von 260 nm zu 280 nm bzw. 260 nm zu 230 nm beurteilt werden. Hierbei zeigt ein Quotient von ~ 2,0 eine RNA-Probe mit einer hohen Reinheit an (Sambrook *et al.*, 1982).

#### 4.2.12 Bestimmung der Qualität der RNA

Die Genauigkeit der quantitativen Real-Time PCR ist u. a. von der Integrität der untersuchten RNA abhängig (Fleige und Pfaffl, 2006), welche anhand einer formaldehydhaltigen Agarose-Gelelektrophorese ermittelt werden kann.

Für die optimale Darstellung der RNA wurde ein 1 %-iges Agarosegel herangezogen. Hierzu wurden je Agarosegel zunächst 1,5 g Agarose in 108 ml DEPC-H<sub>2</sub>O durch Erhitzen in Lösung

gebracht und nach einer kurzen Abkühlphase 15 ml 10x MOPS (Tabelle 9) sowie 27 ml 37 %-ige Formaldehyd-Lösung unter Rühren hinzugegeben. Im noch flüssigen Zustand wurde die Gellösung in die Elektrophoresekammer gegossen und mit einem geeigneten Probenkamm versehen. Nach dem vollständigen Aushärten des Gels wurde dieses mit 1x MOPS überschichtet und anschließend der Probenkamm entfernt.

Zur Vorbereitung der RNA-Proben für die Gelelektrophorese wurde 5 µl der Probe (0,2 µg RNA je µl) mit je 15 µl Denaturierungspuffer und 5 µl Auftragungspuffer versetzt und für 10 min bei 65 °C denaturiert. Abschließend wurden die Proben für 5 min auf Eis inkubiert und nachfolgend in die Geltaschen pipettiert.

**Tabelle 9: Lösungen für die RNA-Agarose-Gelelektrophorese**

|                                      |   |         |
|--------------------------------------|---|---------|
| <b>RNA-Gel</b>                       | Agarose (1 %)   | 1,5 g   |
|                                      | DEPC-H <sub>2</sub> O                                       | 108 ml  |
|                                      | MOPS (10x)  | 15 ml   |
|                                      | Formaldehyd-Lösung (37 %)                                   | 27 ml   |
| <b>DEPC-H<sub>2</sub>O</b>           | DEPC  | 1 ml    |
|                                      | ddH <sub>2</sub> O  | ad 1 l  |
|                                      | Rühren über Nacht; autoklavieren<br>Lagerung bei RT; dunkel |         |
| <b>MOPS (10x)</b>                    | 3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure (200 mM)         | 41,85 g |
|                                      | Natriumacetat (50 mM)                                       | 4,10 g  |
|                                      | EDTA (10 mM)  | 2,92 g  |
|                                      | DEPC-H <sub>2</sub> O                                       | ad 1 l  |
|                                      | pH 7,4<br>Sterilfiltration<br>Lagerung bei RT; dunkel       |         |
| <b>Denaturierungspuffer</b>          | Formamid  | 345 µl  |
|                                      | Formaldehyd-Lösung (37 %)                                   | 120 µl  |
|                                      | MOPS (10x)  | 35 µl   |
|                                      | DEPC-H <sub>2</sub> O                                       | 11,5 µl |
|                                      | Ethidiumbromid  | 5,5 µl  |
| Herstellung unmittelbar vor Gebrauch |   |         |
| <b>TAE-Puffer (50x)</b>              | Tris Base (2 M)   | 242,2 g |
|                                      | EDTA (50 mM)  | 14,6 g  |
|                                      | Essigsäure (100 %)  | 57,2 ml |
|                                      | ddH <sub>2</sub> O  | ad 1 l  |
| pH 8,3                               |   |         |

---

|                          |                       |      |
|--------------------------|-----------------------|------|
| <b>Auftragungspuffer</b> | Glycerin              | 50 % |
|                          | TAE (50x)             | 10 % |
|                          | DEPC-H <sub>2</sub> O | 40 % |

etwas Bromphenolblau zugeben  
Lagerung bei 4 °C

---

Die Elektrophorese wurde über einen Zeitraum von etwa zwei Stunden mit einer Spannung von 90 Volt bis zum Austreten der Lauffront aus dem Gel durchgeführt. Anschließend konnten die Gele im Gel-Dokumentationssystem Eagle Eye II begutachtet werden, in welchem das mit der RNA interkalierte Ethidiumbromid des Denaturierungspuffers durch Anregung mit UV-Licht visualisiert wird.

Die Qualität der RNA wurde anhand der Integrität der 18S- und 28S-ribosomalen RNA beurteilt, welche sich bei guter Qualität der RNA-Präparation als zwei deutlich voneinander getrennten Banden unterscheiden lassen, während eine undeutliche Trennung oder Schmierbilder auf Degradierungen der RNA oder Verunreinigungen dieser durch genomische DNA hinweisen.

#### 4.2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion, oder auch PCR, stellt eine Methode zur *in vitro*-Vervielfältigung von DNA dar, deren Zyklen sich aus jeweils drei Reaktionsschritten zusammensetzen.

Dabei wird zunächst durch Erhitzen (meist 95 °C) die Denaturierung der Template-DNA induziert, in deren Verlauf sich die beiden DNA-Stränge auftrennen. In der anschließenden sogenannten Annealing-Phase erfolgt bei einer niedrigeren Temperatur die Bindung der Primer, die als Startpunkt für die DNA-replizierenden Enzyme (Polymerasen) dienen, an die freien DNA-Einzelstränge. Im nächsten Schritt, der Elongationsphase, synthetisieren die Polymerasen bei einer konstanten Temperatur von 72 °C die DNA-Stränge mittels DNA-Bausteinen aus dem zugesetzten Desoxynukleosid-Triphosphat-Gemisch zu Doppelsträngen. Bei x-facher Ausführung dieses Prozesses entstehen somit 2<sup>x</sup> Kopien des ursprünglichen DNA-Templates (Saiki *et al.*, 1988).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die nachfolgend beschriebenen abgewandelten PCR-Methoden „Reverse Transkription“ und „quantitative Real-Time PCR“ verwendet.

### 4.2.13.1 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription erfolgt die Synthese der zu einer beliebigen RNA gehörigen DNA (cDNA). Für die experimentelle Durchführung wurde auf das *iScript cDNA Synthesis Kit* von Bio-Rad zurückgegriffen und gemäß der Beschreibung des Herstellers eingesetzt.

Hierzu wurden 1 µg der jeweiligen RNA-Probe mit 4 µl *iScript Reaction Mix* (5x) und 1 µl *iScript Reverse Transcriptase* versetzt und anschließend der Ansatz mit Nuklease-freiem Wasser bis zu einer Gesamtmenge von 20 µl ergänzt. Die Reverse Transkription wurde entsprechend dem in der folgenden Abbildung dargestellten Temperaturprotokoll im MyCycler Thermal Cycler von Bio-Rad durchgeführt (Abb. 18):

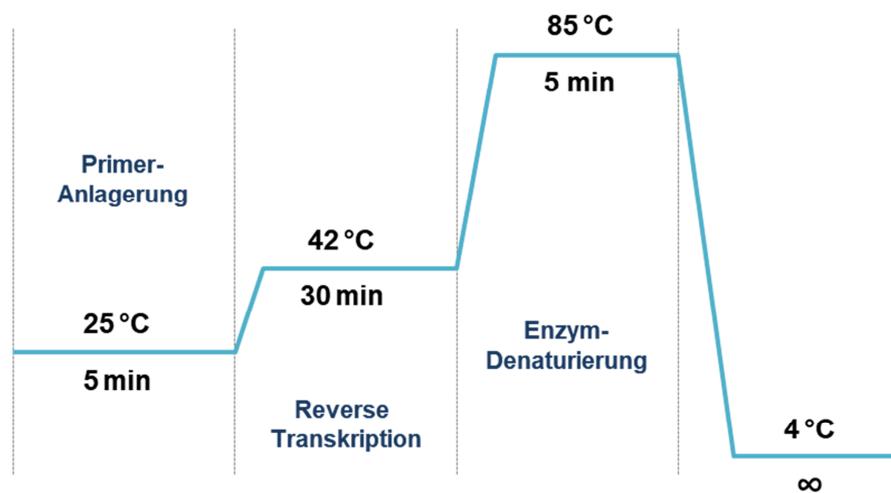


Abb. 18: Schema des Temperaturprogramms für die Reverse Transkription

Die so generierte cDNA wurde bis zur Verwendung für die nachfolgende quantitative Real-Time PCR bei –20 °C gelagert.

### 4.2.13.2 Quantitative Real-Time PCR

Bei einer quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) kann die durch die PCR amplifizierte Target-DNA durch den Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffs *SYBR Green*, welcher in den Doppelstrang des PCR-Produkts interkaliert, zusätzlich quantifiziert werden. Der detektierte Fluoreszenzanstieg verhält sich dabei proportional zur Amplifikation und liefert somit die Möglichkeit einer einfachen direkten Quantifizierung der PCR-Produkte (Higuchi *et al.*, 1993; Heid *et al.*, 1996).

Die relative Quantifizierung der Genexpression wurde auf das Referenzgen  $\beta$ -Aktin normiert, bei welchem man davon ausgeht, dass seine Expression durch das jeweilige Experiment

keine Veränderung erfährt. Durch das mitgeführte Referenzgen kann sichergestellt werden, dass Unterschiede in der eingesetzten Probenmenge detektiert werden und Berücksichtigung finden.

Neben dem Referenzgen  $\beta$ -Aktin wurden im Rahmen dieser Arbeit noch CYP2B1, CYP3A1, CAR und PXR mittels PCR untersucht, hierfür wurden folgende Primer in einer Konzentration von 10 pmol/ $\mu$ l eingesetzt:

**CYP2B1** (Annealing Temperatur: 64 °C):

|                  |                                     |
|------------------|-------------------------------------|
| <i>sense</i>     | 5'-ATG GAG AAG GAG AAG TCG AAC C-3' |
| <i>antisense</i> | 5'-CTT GAG CAT CAG CAG GAA ACC-3'   |

**CYP3A1** (Annealing Temperatur: 52 °C):

|                  |                                     |
|------------------|-------------------------------------|
| <i>sense</i>     | 5'- CCA GCA GCA CAC TTT CCT TTG -3' |
| <i>antisense</i> | 5'- GGT GGG AGG TGC CTT ATT GG -3'  |

**CAR** (Annealing Temperatur: 57 °C):

|                  |                                    |
|------------------|------------------------------------|
| <i>sense</i>     | 5'- ACC AGA TCT CCC TTC TCA AG -3' |
| <i>antisense</i> | 5'- CTC GTA CTG GAA CCC TA -3'     |

**PXR** (Annealing Temperatur: 55 °C):

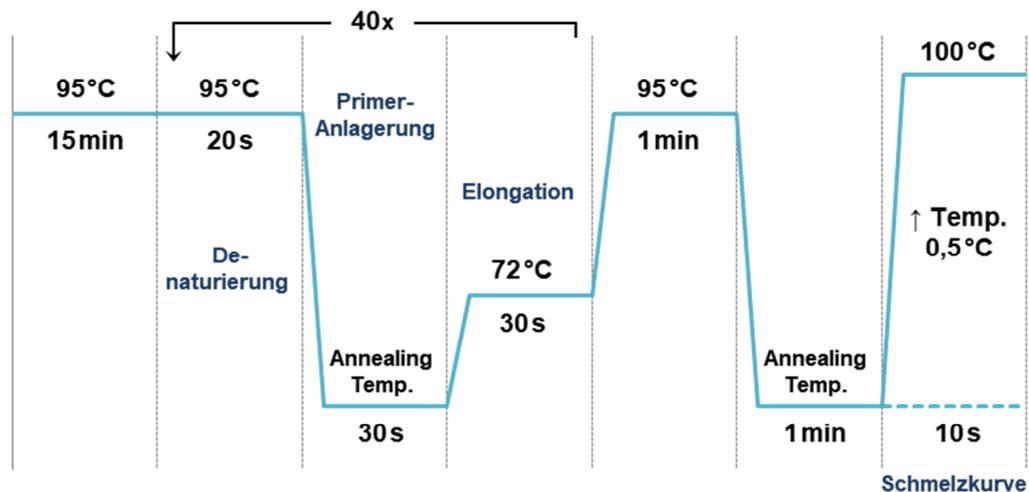
|                  |  |
|------------------|--|
| <i>sense</i>     | 5'- CGA TTT GCC CTC ACC CTG AAG G -3'  |
| <i>antisense</i> | 5'- CGT CCG TGC TGC TGA ATA ACT CC -3' |

**$\beta$ -Aktin** (Annealing Temperatur: 58 °C):

|                  |                                   |
|------------------|-----------------------------------|
| <i>sense</i>     | 5'-AGC CAT GTA CGT AGC CAT CCA-3' |
| <i>antisense</i> | 5'-TCT CCG GAG TCC ATC ACA ATG-3' |

Die Durchführung der quantitativen PCR erfolgte im MyiQ Thermal Cycler mittels des *SYBR Green Fluorescein Mix* (Thermo Scientific) gemäß den Angaben des Herstellers.

Der Reaktionsansatz, bestehend aus 1  $\mu$ l der zu amplifizierenden cDNA, 12,5  $\mu$ l *SYBR Green Fluorescein*, jeweils 1  $\mu$ l des *sense*- und des *antisense*-Primers sowie 9,5  $\mu$ l Nuklease-freiem Wasser, wurde hierbei folgendem Temperaturprogramm unterzogen (Abb. 19):



**Abb. 19: Schema des Temperaturprogramms für die qRT-PCR**

Im Anschluss an die Amplifikation wurde eine Schmelzkurvenanalyse angeschlossen, um die Spezifität der jeweiligen PCR-Produkte zu analysieren. In dieser erfolgt, ausgehend von der Annealing Temperatur der verwendeten Primer, ein schrittweiser Temperaturanstieg von 0,5 °C in Zyklen von je 10 s Dauer.

Amplifikationen mit hoher Spezifität zeichnen sich durch einen eingipfeligen Kurvenverlauf aus, während mehrgipfelige Kurven auf unspezifische Bindungen der Primer hinweisen.

Die Quantifizierung der Target-DNA erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode von Pfaffl (2001). Dabei ermittelt die verwendete Software MyiQ (Bio-Rad) den sogenannten *threshold cycle* ( $C_t$ ), bei welchem es sich um denjenigen PCR-Zyklus handelt, bei dem erstmals ein gegenüber der Hintergrundfluoreszenz signifikant erhöhtes Fluoreszenzsignal für die jeweilige Probe gemessen werden kann.

Für die Auswertung wurden die erhaltenen  $C_t$ -Werte des Referenzgens zunächst von den  $C_t$ -Werten der zu untersuchenden Proben subtrahiert ( $\Delta C_t$ ). Im Anschluss wurde von diesen ermittelten Probenwerten der  $\Delta C_t$ -Wert der Lösungsmittelkontrolle subtrahiert ( $\Delta\Delta C_t$ ), so dass die jeweiligen Expressionslevel der Proben in Relation zu dieser anhand folgender Formel berechnet werden konnten:

$$\text{x-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

#### 4.2.14 Mikrosomenpräparation

Zur Isolierung der Mikrosomen wurden die Hepatozyten im Anschluss an die 24-stündige Inkubation mit den Testsubstanzen dreimal mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung gewaschen, daraufhin nach Hinzugabe von 1,5 ml 1x IEB-Puffer (Tabelle 10) mit einem sterilen *Rubber Policeman* abgelöst und in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt. Nachfolgend wurde die Suspension mittels Ultraschallsonde homogenisiert und anschließend für 15 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde vorsichtig in ein vorgekühltes Ultrazentrifugen-Eppendorfgefäß überführt und für 60 min eine Ultrazentrifugation bei 100.000 g und 4 °C angeschlossen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet je nach Größe in der entsprechenden Menge an 50 mM Na/P<sub>i</sub>-Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde erneut mittels Ultraschallsonde homogenisiert und bis zu einer Proteinbestimmung nach Bradford bei –80 °C gelagert.

**Tabelle 10: Lösungen für die Mikrosomenpräparation**

|  |   |           |
|--|---|-----------|
| <b>5x Isotonic extraction buffer (IEB)</b> | HEPES (50 mM)   | 1,2 g     |
|  | Saccharose (1,25 M)   | 42,8 g    |
|  | EGTA (5 mM)   | 0,19 g    |
|  | KCl (125 mM)  | 0,93 g    |
|  | ddH <sub>2</sub> O  | ad 100 ml |
|  | pH 7,8  |           |
|  | Sterilfiltration<br>Lagerung bei 4 °C                           |           |
| <b>1x IEB</b>                              | 5x IEB  | 20 %      |
|  | ddH <sub>2</sub> O  | 80 %      |
|  | unter der Sterilbank ansetzen                                   |           |
|  | kurz vor Verwendung 0,1 %<br>Proteaseinhibitor-Cocktail zugeben |           |
| <b>50 mM Na/P<sub>i</sub>-Puffer</b>       | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O           | 7,52 g    |
|  | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                | 1,07 g    |
|  | ddH <sub>2</sub> O  | ad 1 l    |
|  | pH 7,6  |           |
|  | Lagerung bei 4 °C   |           |

#### 4.2.15 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte photometrisch nach der Methode von Bradford (1976), wobei eine BSA-Eichgerade gemäß dem unten aufgeführten Pipettierschema mitgeführt wurde (Tabelle 11).

Das Prinzip des Assays beruht darauf, dass die Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brilliantblau an Proteine zu einer Verschiebung seines Absorptionsmaximums von 465 nm hin zu 595 nm führt. Die Konzentration des eingesetzten Proteins korreliert hierbei mit der Zunahme der Absorption bei 595 nm.

**Tabelle 11: Pipettierschema für die BSA-Eichgerade**

| Protein/Well<br>[µg] | Proteingehalt<br>[µg/µl] | BSA (0,5 mg/ml)<br>[µl]      | ddH <sub>2</sub> O<br>[µl] |
|----------------------|--------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 0                    | 0                        | 0                            | 100                        |
| 1                    | 0,05                     | 10                           | 90                         |
| 2                    | 0,1                      | 20                           | 80                         |
| 4                    | 0,2                      | 40                           | 60                         |
| 6                    | 0,3                      | 60                           | 40                         |
| 8                    | 0,4                      | 80                           | 20                         |
| 10                   | 0,5                      | 100                          | 0                          |
| 15                   | 0,75                     | 12 aus 5 mg/ml<br>BSA-Lösung | 68                         |

Zur Durchführung des Assays wurden die Proben 1:20 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und anschließend von den Kalibrierpunkten sowie den Proben je 20 µl / Well in Triplikaten in eine 96-Well-Platte pipettiert. Nachfolgend wurden in die verwendeten Wells je 200 µl der 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnten Färbelösung (*Protein Assay Dye Reagent Concentrate*, Bio-Rad) hinzugegeben. Nach 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Vermessung der Extinktion bei 595 nm im Plattenreader. Aus der Kalibriergeraden der BSA-Standardreihe kann nun der Proteingehalt der Proben berechnet werden. Die gewonnenen Messwerte wurden in die mittels linearer Regression ermittelte Geradengleichung eingesetzt und so der Proteingehalt [µg/µl] der jeweiligen Probelösung bestimmt.

#### 4.2.16 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird zur Trennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht herangezogen. Ihr Prinzip beruht hierbei auf der Trennung von geladenen Teilchen durch das Anlegen eines elektrischen Feldes.

Für die SDS-PAGE werden die Proteine mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt, wodurch die Disulfidbindungen der Proteine reduktiv gespalten werden. Durch das Hinzufügen des anionischen Detergenzes SDS wird zudem die Eigenladung der Proteine maskiert, wodurch sich anionische Micellen mit konstantem Masse/Ladungsverhältnis ausbilden und die Proteine folglich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden können (Rehm, 2006). Das Mitführen von bekannten Markerproteinen erlaubt die Zuordnung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine.

Zur Herstellung der Gele für die Gelelektrophorese wurden zwei Glasplatten mit Abstandshalter in einen Gießstand eingespannt und die Lösung für das 12 %-ige Trenngel (Tabelle 12) hineingegossen. Um eine gerade, ebene Oberfläche zu erhalten, wurde das Trenngel mit einigen Tropfen 70 %-igem Isopropanol überschichtet, welches nach Auspolymerisieren des Gels (ca. 30 min) mit Filterpapier wieder entfernt wurde. Im Anschluss wurde die Lösung für das 4 %-ige Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zur Ausbildung der Probenaschen eingefügt.

**Tabelle 12: Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE**

|                        |  |             |
|------------------------|--|-------------|
| <b>Trenngel (12 %)</b> | ddH <sub>2</sub> O                               | 1,75 ml     |
|                        | Tris / HCl (1,5 M; pH 8,8)                       | 1,25 ml     |
|                        | Rotiphorese Gel 30                               | 2 ml        |
|                        | SDS (10 %)                                       | 50 $\mu$ l  |
|                        | Ammoniumperoxodisulfat (APS; 10 %)               | 50 $\mu$ l  |
|                        | <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED) | 2,5 $\mu$ l |
|                        | <hr/>  |             |
| <b>Sammelgel (4 %)</b> | ddH <sub>2</sub> O                               | 1,2 ml      |
|                        | Tris / HCl (0,5 M; pH 6,8)                       | 0,5 ml      |
|                        | Rotiphorese Gel 30                               | 0,25 ml     |
|                        | SDS (10 %)                                       | 20 $\mu$ l  |
|                        | Ammoniumperoxodisulfat (APS; 10 %)               | 20 $\mu$ l  |
|                        | <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED) | 2 $\mu$ l   |

Die zuvor gewonnenen Mikrosomen wurden so mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt, dass ein konstanter Proteingehalt vorlag. Die entsprechend verdünnten Proben wurden im Anschluss mit 6x Ladepuffer (Tabelle 13) versetzt und 15 min lysiert. Nach Denaturierung der Proteine für 5 min bei 95 °C wurde das Lysat für 15 min bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert.

**Tabelle 13: 6x Ladepuffer für die SDS-PAGE**

|                      |                            |           |
|----------------------|----------------------------|-----------|
| <b>6x Ladepuffer</b> | Tris / HCl (0,5 M; pH 6,8) | 50 ml     |
|                      | SDS                        | 1,244 g   |
|                      | Glycerin                   | 40 ml     |
|                      | Bromphenolblau             | 1,6 g     |
|                      | β-Mercaptoethanol          | 5 ml      |
|                      | ddH <sub>2</sub> O         | ad 100 ml |
| Lagerung bei -20 °C  |                            |           |

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurden die ausgehärteten Gele in die Gelkammer eingespannt und mit 1x Elektrophorese-Puffer (Tabelle 14) überschichtet. Nach Entfernen des Probenkamms wurden jeweils 15 µl der Proben sowie 5 µl des Molekulargewichtsmarkers in die Geltaschen pipettiert.

Für die Elektrophorese wurde zunächst eine konstante Spannung von 80 V angelegt und die Spannung nach Eintritt der Lauffront in das Trenngel auf 100 V erhöht. Kurz vor dem Austreten der Lauffront aus dem Gel wurde die Elektrophorese beendet (nach ca. 2 h).

**Tabelle 14: Zusammensetzung des 10x Elektrophorese-Puffers**

|                                  |                    |                      |
|----------------------------------|--------------------|----------------------|
| <b>10x Elektrophorese-Puffer</b> | Glycin (2 M)       | 720 g                |
|                                  | Tris (250 mM)      | 150 g                |
|                                  | SDS (1 % v/v)      | 250 ml (20 % Lösung) |
|                                  | ddH <sub>2</sub> O | ad 5 l               |
|                                  | Lagerung bei RT    |                      |

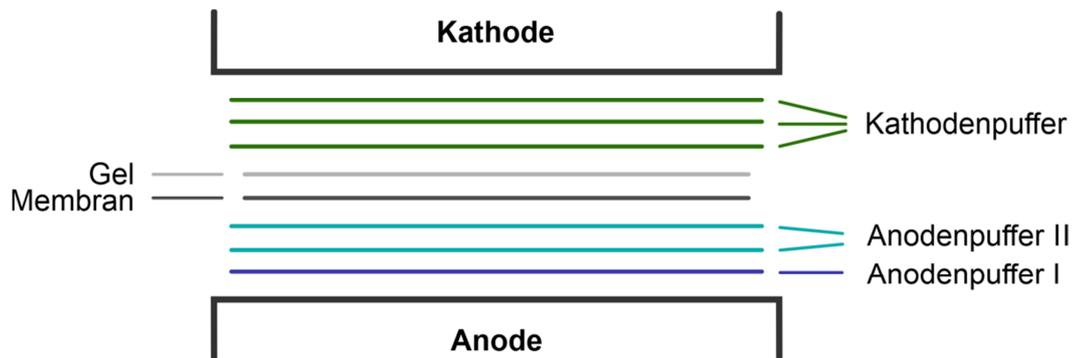
## 4.2.17 Western Blot und Immunoblot

### 4.2.17.1 Western Blot

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde der Western Blot durchgeführt. Hierbei erfolgt die Übertragung der im Gel aufgetrennten Proteine per Semi-Dry-Blotting-Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran.

Hierzu wurde die initial hydrophobe PVDF-Membran zunächst für 10 s in Methanol aktiviert, anschließend in ddH<sub>2</sub>O und nachfolgend in Anodenpuffer II (Tabelle 15) äquilibriert. Die Polyacrylamid-Gele wurden aus der Gelkammer genommen, das Sammelgel abgetrennt und die Gele anschließend bis zum Blotting in Kathodenpuffer äquilibriert. Weiterhin wurden die benötigten Filterpapiere mit den entsprechenden Puffern getränkt und nachfolgend der

Blotting-Stapel aus Filterpapieren, Gel und Membran folgendermaßen zusammengesetzt (Abbildung 20).



**Abb. 20: Aufbau des Blotting-Stapels**

Der Transfer der Proteine erfolgte in der Blotting-Apparatur für 75 min bei einer konstanten Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  (45 mA pro Membran).

**Tabelle 15: Zusammensetzung der Blotting-Puffer**

|                        |                    |        |
|------------------------|--------------------|--------|
| <b>Anodenpuffer I</b>  | Tris (300 mM)      | 36,3 g |
|                        | Methanol           | 100 ml |
|                        | ddH <sub>2</sub> O | ad 1 l |
|                        | pH 10,4            |        |
|                        | Lagerung bei RT    |        |
| <b>Anodenpuffer II</b> | Tris (25 mM)       | 3 g    |
|                        | Methanol           | 100 ml |
|                        | ddH <sub>2</sub> O | ad 1 l |
|                        | pH 10,4            |        |
|                        | Lagerung bei RT    |        |
| <b>Kathodenpuffer</b>  | Glycin (40 mM)     | 3 g    |
|                        | Tris (25 mM)       | 3 g    |
|                        | Methanol           | 200 ml |
|                        | SDS (20 % Lösung)  | 250 µl |
|                        | ddH <sub>2</sub> O | ad 1 l |
|                        | pH 9,4             |        |
|                        | Lagerung bei RT    |        |

Nach Abschluss des Blotvorgangs wurde die Membran entweder über Nacht bei 4 °C oder alternativ bei Raumtemperatur für 1 h in Blocking-Puffer (Tabelle 16) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Membran zu besetzen.

**Tabelle 16: Zusammensetzung des Blocking-Puffers**

|                        |                  |        |
|------------------------|------------------|--------|
| <b>Blocking-Puffer</b> | TBS              | 100 ml |
|                        | Tween 20 (0,1 %) | 100 µl |
|                        | Milchpulver      | 5 g    |
|                        | Lagerung bei RT  |        |

#### 4.2.17.2 Immunoblot

Beim Immunoblot wird die Membran zunächst mit einem Primärantikörper inkubiert, der an ein Epitop des nachzuweisenden Proteins bindet. Die gebundenen Primärantikörper werden anschließend durch Sekundärantikörper markiert, die speziesspezifische Epitope des Primärantikörpers erkennen und daran binden. Die Sekundärantikörper sind mit Enzymen oder alternativ Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, welche eine Visualisierung der gebundenen Antikörper auf der Membran ermöglichen.

Zur Durchführung der Antikörpermarkierung wurde die Membran zunächst dreimal für 5 min mit 0,1 % TBS-T (Tabelle 17) gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper (Tabelle 18), gelöst in 5 ml 0,1 % TBS-T, bei 4 °C in einem 50 ml-Röhrchen über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 % TBS-T über 5 min wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (ebenfalls in 5 ml 0,1 % TBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Beseitigung ungebundener Antikörper wurde die Membran erneut dreimal mit 0,1 % TBS-T sowie einmal fünf Minuten mit 1x TBS gewaschen und bis zur Chemilumineszenz-Detektion in 1x TBS gelagert.

**Tabelle 17: Zusammensetzung von TBS und TBS-T**

|                    |                           |        |
|--------------------|---------------------------|--------|
| <b>20x TBS</b>     | NaCl (2,6 M)              | 304 g  |
|                    | Tris (0,4 M)              | 97 g   |
|                    | ddH <sub>2</sub> O        | ad 2 l |
|                    | pH 7,4<br>Lagerung bei RT |        |
| <b>0,1 % TBS-T</b> | 1x TBS                    | 2 l    |
|                    | Tween 20 (0,1 %)          | 2 ml   |
|                    | Lagerung bei RT           |        |

Für den Western Blot wurden folgende Primär- bzw. Sekundärantikörper verwendet (Tabelle 18).

**Tabelle 18: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper**

| Antikörper               | Hersteller                 | Konzentration |
|--------------------------|----------------------------|---------------|
| mouse-anti-CYP450 2B1    | Oxford Biomedical Research | 1:500         |
| mouse-anti-CYP450 3A1    | Santa Cruz Biotechnology   | 1:1000        |
| rabbit-anti-VDAC1        | Cell Signalling Technology | 1:1000        |
| goat anti-mouse IgG-HRP  | Santa Cruz Biotechnology   | 1:5000        |
| goat anti-rabbit IgG-HRP | Santa Cruz Biotechnology   | 1:5000        |

Zur Chemilumineszenz-Detektion mittels der an den Sekundärantikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP) wurden die Membranen eine Minute in 10 ml des Detektionsreagenzes (Tabelle 19) inkubiert und die Chemilumineszenz anschließend mittels einer CCD-Kamera im Lumi-Imager (Roche) registriert.

Da CYP450 2B1 mit dem genannten Reagenz nur ein sehr schwaches Signal lieferte, wurde für diese Detektion das *Thermo Scientific SuperSignal West Femto* Chemilumineszenz-Substrat entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

**Tabelle 19: Chemilumineszenz-Detektionslösungen**

|   |  |                          |
|---|--|--------------------------|
| <b>0,1 M Tris / HCl</b>                               | Tris (0,1 M)<br>ddH <sub>2</sub> O<br><br>pH 8,6<br>Lagerung bei RT                  | 2,428 g<br>ad 200 ml     |
| <b>Lösung A</b>                                       | Luminol<br>Tris (0,1 M)<br><br>Lagerung bei 4 °C; dunkel                             | 50 mg<br>200 ml          |
| <b>Lösung B</b>                                       | <i>p</i> -Coumarinsäure<br>DMSO<br>ddH <sub>2</sub> O<br><br>Lagerung bei RT; dunkel | 22 mg<br>20 ml<br>ad 1 l |
| <b>Detektionsreagenz</b><br>kurz vor Gebrauch mischen | Lösung A<br>Lösung B<br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1,5 %)                        | 10 ml<br>1 ml<br>100 µl  |

### 4.2.17.3 Antikörperentfernung (Stripping)

Um weitere Proteine auf derselben Membran erfassen zu können, ist es nach der Immundetektion möglich, die gebundenen Antikörper mittels Strippings wieder zu entfernen. Hierfür wurde die Membran über 30 min mit Stripping-Puffer (Tabelle 20) bei 50 °C behandelt und anschließend sechsmal für 5 min mit 0,1 % TBS-T gewaschen. Nachfolgend wurden die Membranen erneut in Blocking-Puffer inkubiert und weitere Immunoblots wie unter 4.2.17.2 beschrieben durchgeführt.

**Tabelle 20: Zusammensetzung des Stripping-Puffers**

|                         |                            |                     |
|-------------------------|----------------------------|---------------------|
| <b>Stripping-Puffer</b> | Tris (62,5 mM)             | 757 mg              |
|                         | SDS (2 % v/v)              | 10 ml (20 % Lösung) |
|                         | β-Mercaptoethanol (100 mM) | 700 µl              |
|                         | ddH <sub>2</sub> O         | 100 ml              |
|                         | pH 6,7; Lagerung bei RT    |                     |

### 4.2.18 Immunzytochemie und Epifluoreszenzmikroskopie

Der Effekt unterschiedlicher Testsubstanzen auf die Expression und intrazelluläre Verteilung verschiedener Zielproteine in primären Rattenhepatozyten wurde mittels immunzytochemischer Färbungen und fluoreszenzmikroskopischer Visualisierung untersucht. Hierfür wurden primäre Rattenhepatozyten auf kollagenierte Deckgläschen in 24-Well-Platten ausgesät und für 24 h mit den entsprechenden Testsubstanzen behandelt.

Im Anschluss wurde das Inkubationsmedium entfernt, die Zellen mit 4 %-igem Paraformaldehyd in PBS für 15 min fixiert und im Anschluss zweimal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu reduzieren, wurden die Kulturen zunächst für 1 Stunde bei RT in Blocking-Puffer (Tabelle 21) inkubiert und nachfolgend über Nacht bei 4 °C mit den primären Antikörpern versehen (Tabelle 22).

Nach dreimaligem fünfminütigem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers sowie die Anfärbung von filamentösem Aktin (F-Aktin) mit Rhodamin-Phalloidin für 1 h bei Raumtemperatur. Darüber hinaus wurden die Zellkerne der Kulturen ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur mit Höchst 33342 markiert (Tabelle 22). Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen auf Objektträger mit selbsthärtendem Eindeckmedium überführt. Im Anschluss wurden die Deckgläschen mit Klarlack fixiert und bis zur weiteren Verwendung dunkel bei 4 °C gelagert.

Die Visualisierung der immunzytochemischen Färbungen wurde mittels Epifluoreszenzmikroskopie an einem Mikroskop Axioskop 2 von Zeiss durchgeführt. Die Fluoreszenz-

aufnahmen erfolgten mit Hilfe der Software Cell P (Olympus) sowie einer F-View2 CCD-Kamera (Olympus) in verschiedenen Vergrößerungen mit den Objektiven Plan Neofluar 10x/0,3, Plan Neofluar 20x/0,45 und Plan Apochromat 40x/0,75.

Für die Fluoreszenzaufnahmen erfolgte die Anregung der Proben mit einer Quecksilber-Bogenlampe (HBO 102 W/2), deren Licht mit entsprechenden Filtersätzen in die Anregungswellenlängen 488 nm, 546 nm und 647 nm aufgeteilt wurde.

**Tabelle 21: Verwendete Substanzen für die Epifluoreszenzmikroskopie**

|  |                                    |             |
|--|------------------------------------|-------------|
| <b>Blocking-Puffer</b>                   | BSA (2,5 % w/v)                    | 2,5 g       |
|  | NGS (normales Ziegenserum, 10,5 %) | 10,5 ml     |
|  | Triton X-100 (0,3 %)               | 300 µl      |
|  | PBS                                | ad 100 ml   |
| Lagerung bei -20 °C                      |                                    |             |
| <b>Carrier</b>                           | BSA (1 % w/v)                      | 1 g         |
|  | NGS (1 %)                          | 1 ml        |
|  | Triton X-100 (0,3 %)               | 300 µl      |
|  | PBS                                | ad 100 ml   |
| Lagerung bei -20 °C                      |                                    |             |
| <b>Selbsthärtendes<br/>Eindeckmedium</b> | Glycerol                           | 30 % (v/v)  |
|  | Polyvinylalkohol                   | 12 % (v/v)  |
|  | Tris                               | 0,1 M (w/v) |
|  | DABCO                              | 2,5 % (w/v) |
| Lagerung bei -20 °C                      |                                    |             |

**Tabelle 22: Verwendete Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe**

| <b>Antikörper/<br/>Fluoreszenzfarbstoff</b> | <b>Hersteller</b>          | <b>Konzentration</b> |
|---|----------------------------|----------------------|
| mouse-anti-CYP450 2B1                       | Oxford Biomedical Research | 1:50                 |
| mouse-anti-CYP450 3A1                       | Santa Cruz Biotechnology   | 1:200                |
| anti-mouse-Alexa Fluor 488                  | Invitrogen                 | 1:1000               |
| Rhodamin-Phalloidin                         | Invitrogen                 | 1:1000               |
| Hoechst 33342                               | Invitrogen                 | 1:1000               |

### 4.2.19 Chromatinfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)

Da der Fluoreszenzfarbstoff DAPI in doppelsträngige DNA interkaliert, lassen sich die Zellkerne fixierter Zellen mit diesem Farbstoff selektiv anfärben und mittels eines Fluoreszenzmikroskops detektieren. Apoptotische Zellkerne weisen hierbei eine stark kondensierte, halbmond-förmige oder fragmentierte Morphologie auf (Taatjes *et al.*, 2008).

$1,5 \cdot 10^6$  primäre Rattenhepatozyten wurden in 60 mm-Petrischalen ausgesät, gegebenenfalls vor Zugabe der Inkubationssubstanzen mit der entsprechenden Dosis an UV-Licht bestrahlt und der Zellrasen nach der 24-stündigen Inkubation zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen.

Für die Fixierung wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 15 min mit Methanol behandelt und anschließend für 15 min mit DAPI-Färbelösung (Tabelle 23) inkubiert, wobei Triton X-100 der Permeabilisierung der Zellmembran diente. Nachfolgend wurden die Zellen zweimal für 5 min mit Methanol gespült und bis zur Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop dunkel und trocken gelagert.

**Tabelle 23: Zusammensetzung der DAPI-Färbelösung**

|                         |              |          |
|-------------------------|--------------|----------|
| <b>DAPI-Färbelösung</b> | PBS          | 50 ml    |
|                         | Methanol     | 50 ml    |
|                         | DAPI         | 10 µg/ml |
|                         | Triton X-100 | 100 µl   |
| Lagerung bei 4 °C       |              |          |

Im Anschluss wurde nun jeweils ein Deckglas mit 50 µl erwärmter Kaisers Glyceringelatine auf den Platten fixiert. Pro Zellkulturschale wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop mäanderförmig je 1.000 Zellkerne morphologisch untersucht und der Prozentsatz apoptotischer Zellen als Apoptoserate angegeben.

### 4.2.20 Caspase-Assay

Die Aktivität spezifischer Caspasen kann als Maß für die Apoptoserate herangezogen werden, wobei in diesem Assay die Aktivität der ausführenden Caspase 3/7 sowie der Initiatorcaspasen 8 und 9 untersucht wurde.

Zur Bestimmung der Caspase-Aktivität wurde die Eigenschaft der Caspasen genutzt, ihre Substrate spezifisch nach einem Aspartat-Rest zu spalten. Hierfür wurden spezielle Modellssubstrate verwendet, die am C-Terminus des Aspartat-Rests das Fluorophor 7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin (AFC) enthalten. Dieses wird bei vorhandener Aktivität der Caspasen vom Substrat abgespalten (Wudtiwai *et al.*, 2011; Kottke *et al.*, 2002) und emittiert nachfolgend Licht der Wellenlänge 505 nm, wobei die Fluoreszenzintensität hierbei mit der

Caspase-Aktivität korreliert. Zur Ermittlung der Aktivität der verschiedenen Caspasen wurden jeweils spezifische Substrate verwendet (Tabelle 24).

**Tabelle 24: Verwendete Substrate für den Caspase-Assay**

| Substrat    | Caspase                             |
|-------------|-------------------------------------|
| Ac-DEVD-AFC | Caspase 3/7 (Effektorcaspase)       |
| Ac-IETD-AFC | Caspase 8 (extrinsischer Signalweg) |
| Ac-LEHD-AFC | Caspase 9 (intrinsischer Signalweg) |

Zur Durchführung des Caspase-Assays wurden  $6 \cdot 10^6$  primäre Rattenhepatozyten in 90 mm-Petrischalen ausgesät und gegebenenfalls vor Zugabe der Inkubationssubstanzen mit der entsprechenden Dosis an UV-Licht bestrahlt.

Nach 24-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen wurden die Zellen mit einem sterilen *Rubber Policeman* abgelöst und anschließend im verwendeten Inkubationsmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nachfolgend bei 4 °C und 800 g für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml eiskaltem PBS aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation bei 800 g wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

Zur weiteren Aufbereitung wurden die Zellen in 250 µl Lysepuffer (Tabelle 25) resuspendiert, kurz gevortext und vier 5-minütigen Freeze-Thaw-Zyklen in flüssigem Stickstoff und einem 37 °C warmen Wasserbad unterzogen. Abschließend wurden die Zellen 30 min bei 4 °C und 20.000 g zentrifugiert, das Zelllysate vorsichtig abgenommen und bis zur Vermessung bei –80 °C gelagert.

Die Messung der Caspase-Aktivität erfolgte bei 37 °C im Fluoroscan Ascent Plattenreader bei einer Emissionswellenlänge von 510 bis 540 nm (Extinktion 390–400 nm) über einen Zeitraum von 90 min in jeweils 5-minütigen Intervallen. Für die Proben bzw. die AFC-Kalibriergerade wurde folgendes Pipettierschema in einer 96-Well-Platte verwendet (Tabelle 25).

**Tabelle 25: Pipettierschema und Lösungen für den Caspase-Assay**

|                        |  |        |
|------------------------|--|--------|
| <b>Kalibriergerade</b> | ddH <sub>2</sub> O                         | 170 µl |
|                        | 10 x Caspase-Reaktionspuffer               | 20 µl  |
|                        | AFC-Standard in folgenden Konzentrationen: | 10 µl  |
|                        | 25 µM; 12,5 µM; 6,5 µM; 3,2 µM; 1,6 µM;    |        |
|                        | 0,8 µM; 0,4 µM; 0,2 µM; 0,1 µM; 0,05 µM;   |        |
|                        | 0 µM                                       |        |

|  |                                       |               |
|--|---------------------------------------|---------------|
| <b>Blank</b>                             | ddH <sub>2</sub> O                    | 170 µl        |
|  | 10 x Caspase-Reaktionspuffer          | 20 µl         |
|  | Substrat in DMSO (1 mM)               | 10 µl         |
| <b>Probe</b>                             | ddH <sub>2</sub> O                    | 140 µl        |
|  | 10 x Caspase-Reaktionspuffer          | 20 µl         |
|  | Substrat in DMSO (1 mM)               | 10 µl         |
|  | Lysat                                 | 30 µl         |
| <b>Lysepuffer</b>                        | HEPES (10 mM)                         | 119,2 mg      |
|  | CHAPS (0,1 %)                         | 50 mg         |
|  | EDTA (5 mM)                           | 29,2 mg       |
|  | ddH <sub>2</sub> O                    | ad 50 ml      |
|  | pH 7,4                                |               |
|  | Sterilfiltration; Lagerung bei -20 °C |               |
| kurz vor Gebrauch                        | DTT (5 mM)                            | 77 mg/100 ml  |
|  | Proteaseinhibitor-Cocktail            | 0,1 %         |
| <b>10x Caspase -<br/>Reaktionspuffer</b> | PIPES (250 nM)                        | 1,512 g       |
|  | CHAPS (1 %)                           | 0,5 g         |
|  | EDTA (50 mM)                          | 292 mg        |
|  | ddH <sub>2</sub> O                    | ad 50 ml      |
|  | pH 7,4                                |               |
|  | Sterilfiltration; Lagerung bei -20 °C |               |
| kurz vor Gebrauch                        | DTT (50 mM)                           | 770 mg/100 ml |

Die während der Reaktion entstandene Menge AFC wurde anhand der erstellten Kalibriergerade ermittelt und unter Berücksichtigung der im Bradford-Assay bestimmten Proteinmenge die Aktivität der untersuchten Caspasen in pmol AFC/min x mg ermittelt.

#### 4.2.21 Statistische Auswertung

Für jede Untersuchung wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt und anschließend die Mittelwerte (MW) sowie die Standardabweichungen (SD) der Einzelwerte bestimmt.

Die in den einzelnen experimentellen Versuchsreihen ermittelten Werte von behandelten sowie Kontroll-Proben wurden mit der Software GraphPad InStat 3.0 (GraphPad Software San Diego, USA) einer statistischen Analyse unterzogen. Der Vergleich mit den normierten Lösungsmittelkontrollen, die eine zu den behandelten Proben ungleiche Varianz der Grundgesamtheit aufwiesen, erfolgte mittels eines zweiseitigen heteroskedatischen Student's

t-Tests, während die übrigen Vergleiche mit einem homoskedatischen Student's t-Test analysiert wurden.

Die jeweiligen  $EC_{50}$ - bzw.  $IC_{50}$ -Werte wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software San Diego, USA) ermittelt und mit den zugehörigen 95 %-Konfidenzintervallen angegeben.

In den erstellten Diagrammen wurden statistische Vergleiche mit einem signifikanten Unterschied ( $p$ -Wert  $< 0,05$ ) abhängig von der jeweiligen Art des Vergleichs mit Hilfe von Sternchen (\*) bzw. Rauten (#) kenntlich gemacht. Dabei entspricht die Markierung mit einem Sternchen bzw. einer Raute einem  $p$ -Wert zwischen 0,01 und 0,05, während zwei Sternchen bzw. zwei Rauten einen  $p$ -Wert  $< 0,01$  symbolisieren.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Die polychlorierten Biphenyle zählen aufgrund ihrer chemischen Stabilität sowie ihren toxischen Eigenschaften zu den persistenten organischen Schadstoffen (Jones und de Voogt, 1999; Van den Berg *et al.*, 2006). Da sie auch heute noch ubiquitär in der Umwelt vorhanden sind und sich angesichts ihrer hohen Lipophilie in der Nahrungskette anreichern, ist es von essentieller Bedeutung, die Wirkmechanismen dieser Substanzen entsprechend aufzuschlüsseln.

Die nicht-dioxinartigen PCBs sind hierbei als Induktoren der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme der CYP2B-Unterfamilie bekannt und ähneln darin dem Arzneimittel Phenobarbital (Goldstein, 1979; Safe, 1994; Dean *et al.*, 2002), darüber hinaus fungieren sie zudem als potente Tumorpromotoren in der Rattenleber (Hemming *et al.*, 1993; Safe, 1994). Die Bewertung der jeweiligen Symptome wird hierbei jedoch zumeist durch das gleichzeitige Auftreten von dioxinartigen PCBs, polychlorierten Dibenzodioxinen (PCDDs) oder polychlorierten Dibenzofuranen (PCDFs) erschwert, so dass sich die auftretenden Effekte durch die Mischexposition oftmals nicht eindeutig den NDL-PCBs zuordnen lassen. Um bei der Untersuchung von nicht-dioxinartigen PCBs Effekte durch Verunreinigungen mit DL-PCBs oder anderen Dioxinverbindungen zu minimieren, wurden in dieser Arbeit hoch aufgereinigte Verbindungen verwendet.

Zunächst sollte die Wirkung ausgewählter NDL-PCBs zum einen hinsichtlich ihrer Effekte auf die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme CYP2B1 und CYP3A1 untersucht werden, zum anderen mittels *small interfering RNA* (siRNA) bzw. Hemmung der Signalwege analysiert werden, inwiefern der konstitutive Androstan-Rezeptor bzw. der Pregnan-X-Rezeptor bei diesen Prozessen eine Rolle spielen.

Um weiterhin die tumorpromovierende Wirkung der NDL-PCBs zu analysieren, sollte in primären Rattenhepatozyten zudem ihr Einfluss auf die Hemmung der Apoptose ergründet werden. Außerdem sollte die Frage geklärt werden, ob die antiapoptotische Wirkung der NDL-PCBs über den CAR oder den PXR bzw. möglicherweise über beide Rezeptoren vermittelt wird.

Zur Isolierung der primären Rattenhepatozyten wurde hierfür ein Perfusionsprotokoll nach Meredith (1988) herangezogen, welches gegenüber häufig verwendeten Kollagenase-haltigen Perfusionsmethoden wie jener von Seglen (1972) vor allem im Hinblick auf die funktionelle Aufrechterhaltung des Cytochrom-P450-Systems als überlegen gilt. So zeigten Bayad *et al.* (1991) beim Vergleich der Abundanz von Cytochrom-P450-Enzymen, dass die Gesamtmenge an Cytochrom-P450-Proteinen an allen untersuchten Kulturtagen in nach Meredith isolierten Hepatozyten um mehr als das Doppelte, die Aktivität von CYP2B1 nach einem Tag in Kultur sogar vierfach gegenüber nach Seglen (1972) isolierten Hepatozyten erhöht war.

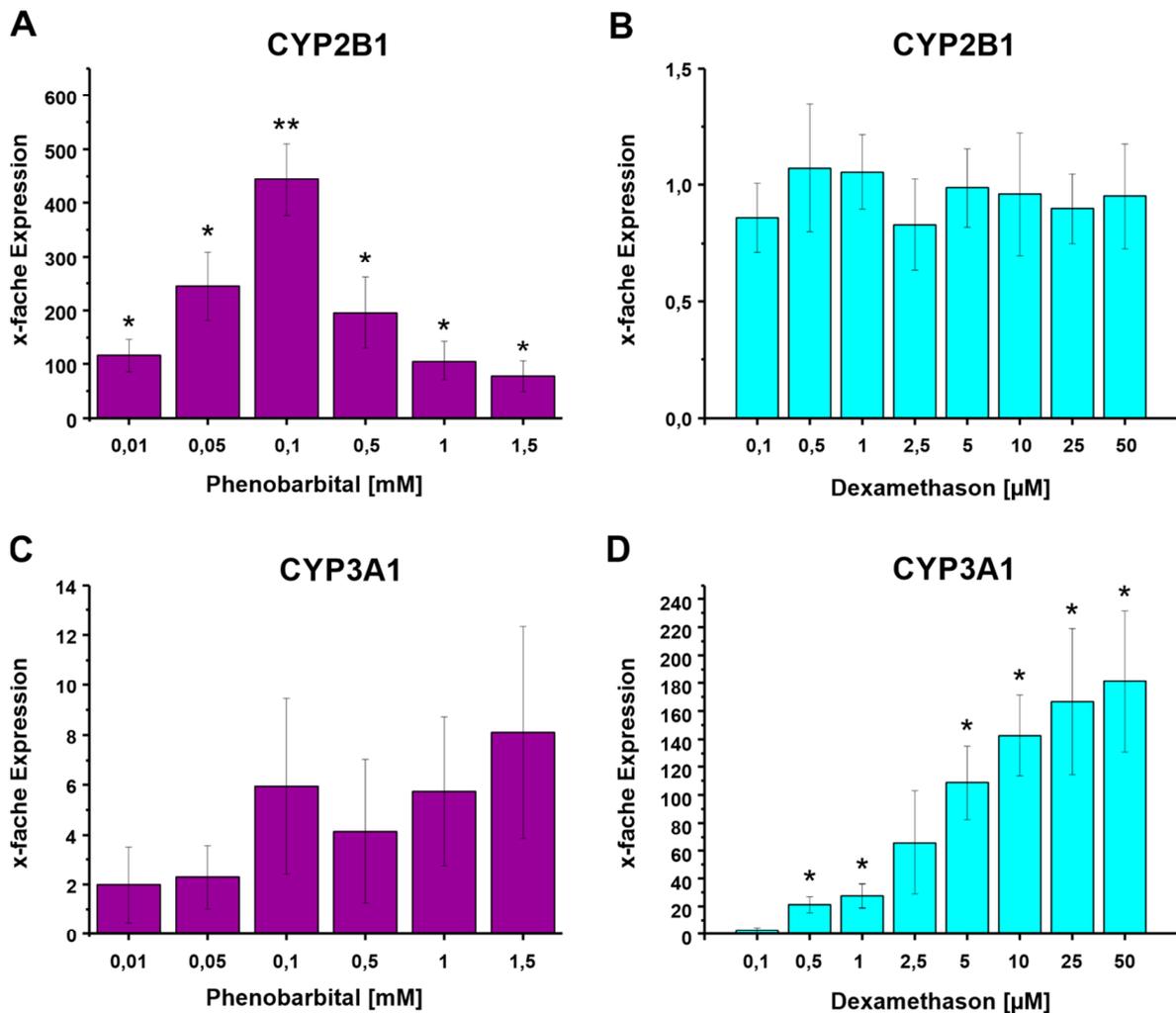
Eine Abnahme der Expression bzw. Aktivität der Cytochrom-P450-Enzyme ist für gewöhnlich Folge einer zunehmenden Dedifferenzierung der Hepatozyten (Meredith, 1988), wobei insbesondere die Isolations- und Kulturbedingungen einen signifikanten Einfluss auf die Erhaltung eines solchen differenzierten Status aufweisen. Bei der Perfusionsmethode nach Meredith scheint die verwendete Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) die differenzierte Morphologie der Hepatozyten besser konservieren zu können als die zumeist verwendete Kollagenase. Dabei stellt die mögliche enzymatische Schädigung der Zelloberfläche durch diese (Meredith, 1988) vor allem in Bezug auf die potentiell über membranständige Interaktionspartner vermittelte Wirkung von CAR-Induktoren (Koike *et al.*, 2005) einen besonders kritischen Punkt dar, welcher zu einer verbesserten Induzierbarkeit der Cytochrom-P450-Enzyme in nach Meredith isolierten Hepatozyten beitragen könnte. Somit sind gerade im Hinblick auf die beiden Rezeptoren CAR und PXR positive Effekte durch die Verwendung der Perfusionsmethode nach Meredith zu erwarten, die sich neben einer verbesserten Induktion der Cytochrom-P450-Enzyme auch vorteilhaft auf die Erhaltung der tumorpromovierenden Wirkung der Testsubstanzen auswirken könnte.

### **5.1 Einfluss von Phenobarbital und Dexamethason auf die Expression von CYP2B1 und CYP3A1**

Aufgrund dessen, dass die nicht-dioxinartigen PCBs hinsichtlich ihrer Effekte dem Arzneimittel Phenobarbital ähnlich sind, sollten zunächst die durch Phenobarbital prominent induzierbaren fremdstoffmetabolisierenden Enzyme CYP2B1 und CYP3A1 untersucht werden.

Phenobarbital ist hierbei vor allem als indirekter Aktivator des nukleären Rezeptors CAR bekannt (Kawamoto *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2000; Yang und Wang 2014), dessen Aktivität sich nach nukleärer Translokation insbesondere durch eine effiziente Induktion von CYP2B-Isoenzymen auszeichnet (Sueyoshi *et al.*, 1999; Zelko und Negishi, 2000). Im Zuge einer besseren Vergleichbarkeit der NDL-PCBs mit prototypischen Induktoren der jeweilig beteiligten nukleären Rezeptoren wurde zusätzlich der potente PXR-Aktivator und CYP3A-Induktor Dexamethason (Pascussi *et al.*, 2000; Goodwin *et al.*, 2002; Hewitt *et al.*, 2007) untersucht.

Um das Induktionspotential von Phenobarbital und Dexamethason unter den gegebenen Kulturbedingungen zu ermitteln, wurden die Hepatozyten zunächst für 24 Stunden mit Phenobarbital bzw. Dexamethason verschiedener Konzentrationen inkubiert und die Expressionslevel von CYP2B1 und CYP3A1 mittels quantitativer Real-Time PCR analysiert (Abb. 21).



**Abbildung 21: Expressionsprofil von CYP2B1 und CYP3A1 nach Inkubation mit Phenobarbital und Dexamethason.** Dosisabhängige Expression von CYP2B1 (A und B) und CYP3A1 (C und D) in primären Rattenhepatozyten nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Phenobarbital und Dexamethason gegenüber der Lösungsmittelkontrolle. MW  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ , statistische Analyse: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ .

Hierbei induzierten alle gemessenen Konzentrationen von Phenobarbital zwischen 0,01 und 1,5 mM eine statistisch signifikante Erhöhung der mRNA-Expression des Cytochrom-P450-Enzyms CYP2B1 um das 77- bis 442-Fache der basalen Expression (Abb. 21 A).

Dabei führten Phenobarbitalkonzentrationen zwischen 0,01 mM und 0,1 mM zu einer stetigen Zunahme der mRNA-Expression, während eine weitere Erhöhung der Phenobarbitalkonzentration auf 1 mM bzw. 1,5 mM hingegen eine Verringerung der CYP2B1-Expression zur Folge hatte. So vermochte die höchste eingesetzte Konzentration von 1,5 mM keine höhere CYP2B1-Expression als jene der geringsten Konzentration (0,01 mM) zu induzieren.

Bezüglich dieses konzentrationsabhängigen Verlaufs der Phenobarbital-bedingten CYP2B1-Induktion konnten bisher mehrere Autoren in Übereinstimmung mit den obigen Ergebnissen belegen, dass diese Induktion bei Phenobarbitalkonzentrationen zwischen 0,1 mM und 0,3 mM ihr Maximum erreicht (Lecluyse *et al.*, 1999; Madan *et al.*, 1999). Des Weiteren war die eingesetzte Induktorkonzentration von 0,1 mM Phenobarbital auch von Kocarek und Reddy (1998) in primären Rattenhepatozyten als optimal beschrieben worden. Für die entsprechende CYP2B-Expression durch Phenobarbital konnte dabei in einer Vielzahl von Untersuchungen der konstitutive Androstan-Rezeptor als wichtiger Faktor herauskristallisiert werden. So zeigte sich in Maus-Studien, dass die Inaktivierung des CAR mittels eines Knockouts das Ausbleiben der Phenobarbital-induzierten Cyp2b10-Induktion zur Folge hatte (Wei *et al.*, 2000).

Entgegen Phenobarbital vermochte der prototypische CYP3A-Induktor Dexamethason dagegen bei keiner der gemessenen Konzentrationen eine signifikante Veränderung der CYP2B1-Expression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu induzieren (Abb. 21 B). Diese Beobachtung deckt sich mit vorherigen *in vivo*- und *in vitro*-Studien, in welchen keine Dexamethason-bedingte Induktion von CYP2B-Isoenzymen in der Ratte gemessen werden konnte (Sidhu und Omiecinski, 1995; Sueyoshi *et al.*, 1999). Bemerkenswerterweise konnten Scheer *et al.* (2010) jedoch die Induktion von Cyp2b10 durch Dexamethason in Mäusen nachweisen, was die bekannten speziesspezifischen Unterschiede im Fremdstoff-metabolismus sowie der Induktion von Cytochrom-P450-Isoenzymen unterstreicht (Lu und Li, 2001) und die bei der speziessübergreifenden Bewertung von experimentellen Ergebnissen zu berücksichtigen sind.

Die Untersuchung des Effekts von Phenobarbital und Dexamethason auf die Expression von CYP3A1 ergab ein gegenüber CYP2B1 verändertes Bild. Entgegen der starken Induktion der CYP2B1-mRNA über das gesamte Konzentrationsspektrum vermochte Phenobarbital in den getesteten Konzentrationen von 0,01 bis 1,5 mM lediglich eine geringe, im Maximum 8-fache Zunahme der CYP3A1-mRNA-Expression zu induzieren, die jedoch keine statistisch signifikante Veränderung aufwies (Abb. 21 C).

Die Inkubation mit Dexamethason führte im Gegensatz zu Phenobarbital zu einer mit der Konzentration zunehmenden CYP3A1-Expression, die bereits ab 0,5 µM signifikant erhöht war und ihr Maximum bei 50 µM Dexamethason mit einer im Mittel 180-fachen Erhöhung erreichte (Abb. 21 D). Auch in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Dexamethason in der Ratte einen potenten Induktor von CYP3A-Enzymen darstellt (Meredith *et al.*, 2003; Lu und Li, 2001), wobei diese Expression hierbei überwiegend durch den Pregnan-X-Rezeptor reguliert wird (Pascussi *et al.*, 2000). So konnte z. B. gezeigt werden, dass die Cyp3a11-Induktion durch Dexamethason in PXR-Knockout-Mäusen im Gegensatz zu jener in Wildtyp-Mäusen vernachlässigbar gering ist (Scheer *et al.*, 2008).

Eine Abnahme der CYP3A1-mRNA-Expression mit steigender Konzentration von Dexamethason, wie sie bei der Phenobarbital-induzierten CYP2B1-Expression zu verzeichnen war, konnte im untersuchten Konzentrationsspektrum dagegen nicht beobachtet werden.

Beim Vergleich der jeweiligen Induktion von CYP2B1 und CYP3A1 durch Phenobarbital fällt auf, dass Phenobarbital im Gegensatz zu seiner prominenten Wirkung auf die CYP2B1-Expression mit einer bis zu 442-fachen Erhöhung nur wenig potent erscheint, Gene der CYP3A-Familie in großem Maße zu induzieren (maximal 8-fache Expression). Hinzu kommt, dass die Induktion von CYP3A1 durch den PXR-Agonisten Dexamethason mit einer ca. 180-fachen Expression deutlich höher ausfällt als die durch Phenobarbital vermittelte CYP3A1-Expression. Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, ob die CYP3A-Induktion durch Phenobarbital über den für diese Wirkung bekannten Pregnan-X-Rezeptor vermittelt wird, oder ob in Anbetracht dieser Unterschiede bzw. des Crosstalks zwischen den Rezeptoren ein alternativer Wirkmechanismus von Phenobarbital über den CAR angenommen werden kann. Zunächst wurde der Effekt der Induktion von CYP3A-Enzymen durch Phenobarbital bereits in mehreren Studien in Ratte und Maus beobachtet (Wright und Paine, 1994; Faucette *et al.*, 2006). Eine PXR-abhängige Induktion konnte dabei jedoch mittels PXR-Knockout-Mäusen ausgeschlossen werden, da die Cyp3a11-Induktion durch Phenobarbital in diesen Mäusen unverändert blieb (Staudinger *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu hatte ein Knockout des CAR eine starke Minderung der Cyp3a11-Induktion zur Folge (Wei *et al.*, 2002; Scheer *et al.*, 2008), so dass die gesteigerte Expression der Cyp3a-mRNA durch die Phenobarbital-Behandlung vornehmlich dem CAR zugeschrieben werden kann.

Die Ursachen und Mechanismen, die der geringeren Induktion von CYP2B1 bei höheren Phenobarbitalkonzentrationen zugrunde liegen, konnten bisher nicht vollständig aufgeklärt werden (Mutoh *et al.*, 2009). Nachweislich konnte in primären Rattenhepatozyten eine zellschädigende Wirkung durch hohe Konzentrationen von Phenobarbital, wie sie auch in dieser Versuchsreihe verwendet wurden, bei einer 24-stündigen Inkubation nicht festgestellt werden (Ponsoda *et al.*, 1995; Gähns, 2010). Hingegen können andere, die CYP2B1-Expression modulierende Effekte durch hohe Konzentrationen von Phenobarbital nicht ausgeschlossen werden. So hat Phenobarbital eine direkte oder indirekte Wirkung auf die Genexpression und -regulation von weit mehr als 130 Genen, darunter auch einige andere Cytochrom-P450-Gene sowie fremdstoffmetabolisierende Enzyme wie Aldehyd-Dehydrogenasen, NADPH-P450-Reduktasen oder UDP-Glucuronosyltransferasen (Ueda *et al.*, 2002; Corcos und Lagadic-Gossmann, 2001), wobei einige dieser additional induzierten Transkripte die Expression von CYP2B1 beeinflussen könnten.

Darüber hinaus gibt es eine Reihe von bekannten Inhibitoren der CYP2B-Expression, die durch Phenobarbital aktiviert oder moduliert werden können. So sind etwa reaktive

Sauerstoffspezies (ROS) als Teil eines regulativen Feedback-Mechanismus gegenüber dem Cytochrom-P450-System bekannt (Hirsch-Ernst *et al.*, 2001).

ROS stellen dabei ein Nebenprodukt der katalytischen Aktivität des Cytochrom-P450-Systems dar (Heinemeyer *et al.*, 1980; Puntarulo und Cederbaum, 1998) und reichern sich während intensiver metabolischer Aktivität in der Leber an. Eine ROS-vermittelte Hemmung des Cytochrom-P450-Systems in Abhängigkeit des Redox-Zustands der Zelle vermag die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies und somit oxidativen Stress zu verhindern oder zumindest zu reduzieren (Hirsch-Ernst *et al.*, 2001; Morel und Barouki, 1999). So konnte durch Simulation erhöhter ROS-Level durch Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Inkubationsmedium bzw. Inhibition H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-reduzierender Katalasen in primären Rattenhepatozyten eine 30 %-ige Reduktion der Phenobarbital-induzierten CYP2B1-Expression beobachtet werden, wohingegen der antioxidative Wirkstoff *N*-Acetylcystein die CYP2B1-Expression annähernd verzehnfachte (Hirsch-Ernst *et al.*, 2001).

Neben der direkten Hemmung könnten ROS auch indirekt über eine Modulation des Phosphorylierungszustands von CAR und seinen Interaktionspartnern, vermittelt durch etwa Serin/Threonin-Phosphatasen, Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Kinasen oder extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen die Inhibition der CYP2B1-Expression auslösen (Bauer *et al.*, 2004; Joannard *et al.*, 2006). So führt etwa die experimentelle Hemmung der Serin/Threonin-Phosphatase durch Okadainsäure oder der Phosphotyrosin-Phosphatase mittels Orthovanadat zu einer Reduktion bzw. Hemmung der CYP2B-Induktion (Sidhu und Omiecinski, 1997; Honkakoski und Negishi, 1998; Kawamura *et al.*, 1999). Dabei konnte für nukleäre Rezeptoren wie etwa NGFI-B (*Nerve growth factor I-B*) oder CAR gezeigt werden, dass eine zelluläre Hyperphosphorylierung als Folge einer Phosphatase-Inhibierung die Hemmung der Translokation des Rezeptors in den Zellkern sowie die Auflösung und Elimination aktiver Rezeptor-Komplexe wie etwa dem NGFI-B-Retinoid-X-Rezeptor-Komplex zur Folge hat (Katagiri *et al.*, 2000; Kawamoto *et al.*, 1999). Reaktive Sauerstoffspezies könnten bei dieser Inhibition von CYP2B einen entscheidenden Faktor darstellen, da eine solche Hyperphosphorylierung durch eine durch ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) vermittelte verminderte Aktivität von Protein-Tyrosin-Phosphatasen oder Serin/Threonin-Phosphatasen bedingt sein könnte (Wright *et al.*, 2009).

Eine weitere Theorie von Hosseinpour *et al.* (2007) besagt, dass das Protein ECT2 (*Epithelial cell transforming 2*) ebenfalls eine kritische Rolle beim regulativen Feedback-Mechanismus der CAR-regulierten Transkription spielen könnte.

Zunächst konnten die Autoren zeigen, dass eine Behandlung von Wildtyp-Mäusen mit Phenobarbital über einen Zeitraum von 24 Stunden zu einer 3-fachen Induktion von ECT2 führt, wohingegen diese in CAR-Knockout-Mäusen jedoch ausblieb. Da ECT2 dafür bekannt ist, die zelluläre Verteilung von Proteinen zu beeinflussen (Saito *et al.*, 2004), sollte weiterhin untersucht werden, ob ECT2 die nukleäre Translokation von CAR in der Mausleber

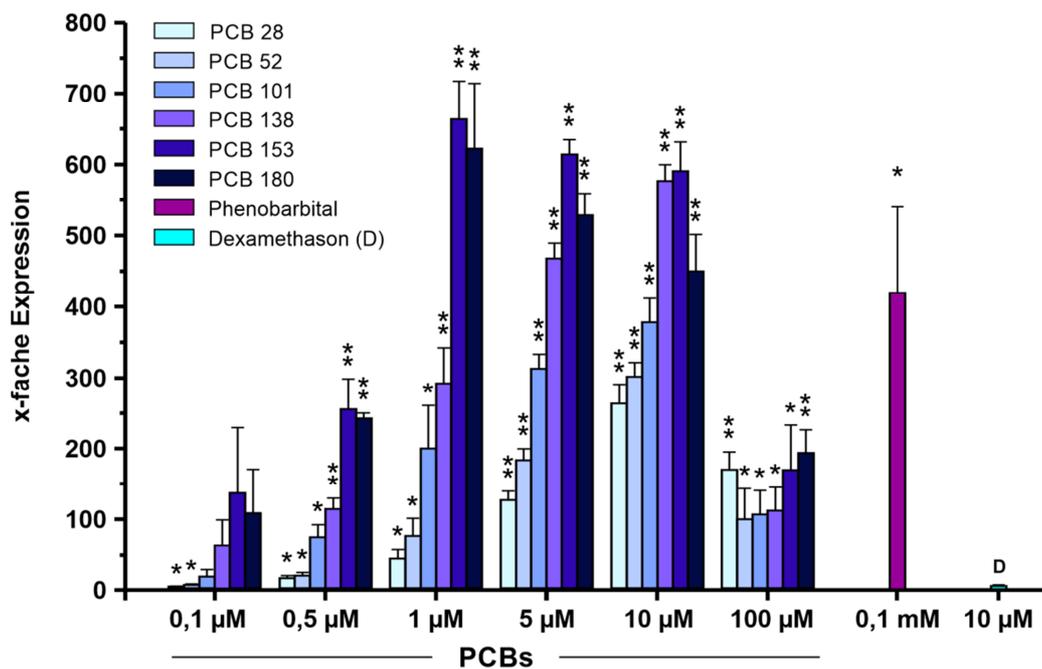
beeinträchtigt. Die Coexpression von ECT2 mit CAR in der Leber von CAR-Knockout-Mäusen hatte eine durch ECT2 vermittelte Repression der nukleären Translokation von CAR zur Folge, welche auch mit zeitgleicher Phenobarbital-Behandlung gegenwärtig war. Eine Analyse mittels Fluoreszenzprotein-assoziierten ECT2- und CAR-Fusionsproteinen in 100 Phenobarbital-behandelten Hepatozyten ergab, dass der konstitutive Androstan-Rezeptor bei ca. der Hälfte der Hepatozyten nicht mehr im Zellkern lokalisiert ist, sondern stattdessen im Zytoplasma verbleibt. Somit konnte ECT2 als Regulator der CAR-abhängigen Transkription identifiziert werden, der eine weitere Expression von CYP2B-Enzymen mittels Hemmung der nukleären Translokation von CAR verhindern kann.

Interessanterweise konnte dieser Feedback-Mechanismus durch ECT2 zwar für CAR, jedoch nicht für den Pregnan-X-Rezeptor in Gegenwart oder Abwesenheit des PXR-Agonisten PCN (Pregnenolon-16 $\alpha$ -carbonitril) bestätigt werden. Das Ausbleiben der biphasischen Reaktion bei durch den PXR vermittelten Effekten deckt sich mit unseren Ergebnissen, da auch hier keine Abnahme der CYP3A1-Expression mit steigender Konzentration von Dexamethason zu verzeichnen war. Bei den Versuchen von Hosseinpour *et al.* (2007) bleibt allerdings zu eruieren, ob diese Spezifität in der Divergenz der beiden Rezeptoren oder in den verschiedenen Signalwegen der beiden Substanzen begründet ist.

## 5.2 Einfluss der NDL-PCBs auf die Expression von CYP2B1 und CYP3A1

Bei den nicht-dioxinartigen PCB-Kongeneren, die ebenso wie Phenobarbital Gene der CYP2B-Unterfamilie induzieren, handelt es sich vor allem um diejenigen PCBs, die mindestens an zwei *ortho*-Positionen chloriert sind und somit aufgrund der dadurch bedingten sterischen Hinderung eine höhere Wahrscheinlichkeit aufweisen, eine non-koplanare Konformation einzunehmen. Vertreter dieser Gruppe sind unter anderem die PCB-Kongenere 52, 101, 138, 153 und 180, während das außerdem untersuchte PCB 28 nur an einer *ortho*-Position mit einer Chlorierung versehen ist. Dabei stellt PCB 28 ein Trichlorbiphenyl, PCB 52 ein Tetrachlorbiphenyl sowie PCB 101 ein Pentachlorbiphenyl dar, während es sich bei den PCB-Kongeneren 138 und 153 jeweils um ein Hexachlorbiphenyl sowie bei PCB 180 um ein Heptachlorbiphenyl handelt (Connor *et al.*, 1995).

Zur Überprüfung der Auswirkungen von nicht-dioxinartigen PCBs auf die Expression von CYP2B1 und CYP3A1 wurden die primären Rattenhepatozyten mit verschiedenen Konzentrationen der sechs hoch aufgereinigten Indikatorkongenere PCB 28, 52, 101, 138, 153 und 180 für 24 Stunden inkubiert (Abb. 22 und Abb. 23). Um hierbei eine gute Vergleichbarkeit der Responsivität in Bezug auf die beteiligten Rezeptoren zu gewährleisten, wurden weiterhin die prototypischen CYP2B1- bzw. CYP3A1-Induktoren Phenobarbital (0,1 mM) und Dexamethason (10  $\mu$ M) mitgeführt.



**Abbildung 22: Expressionsprofil von CYP2B1 nach Inkubation mit verschiedenen NDL-PCBs.** Dosisabhängige Induktion der CYP2B1-mRNA-Expression in primären Rattenhepatozyten nach 24-stündiger Inkubation mit den nicht-dioxinartigen PCB-Kongeneren 28, 52, 101, 138, 153 und 180 sowie Phenobarbital (0,1 mM) und Dexamethason (10 µM) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle. MW ± SD,  $n \geq 3$ , statistische Analyse: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ .

Die jeweilige Inkubation der Hepatozytenkulturen mit den nicht-dioxinartigen PCBs zeigte einen konzentrationsabhängigen Verlauf der CYP2B1-Expression, wie er bereits auch bei Phenobarbital zu verzeichnen war (Abb. 22).

Hierbei war generell auffällig, dass das Induktionsvermögen der PCBs weitgehend mit ihrem Chlorierungsgrad in Verbindung gebracht werden konnte. Während PCB 28 bei der geringsten untersuchten Konzentration von 0,1 µM lediglich eine Induktion des 2,4-Fachen der basalen Expression von CYP2B1 bewirken konnte, führte die Inkubation des höher chlorierten PCBs 153 bereits zu einer um das 134-Fache gesteigerten CYP2B1-Expression. Weiterhin variierten unter den PCB-Kongeneren jene Konzentrationen, bei welchen die jeweils maximalen CYP2B1-Expressionen hervorgerufen werden konnten. Während die PCBs 28, 52, 101 und 138 erst bei einer Konzentration von 10 µM das Expressionsmaximum erzielten, erreichten die PCBs 153 und 180 ihr jeweiliges Maximum dagegen bereits bei einer Konzentration von 1 µM. Die Gegenüberstellung der jeweiligen maximalen CYP2B1-Induktionen der PCBs ergab zudem, dass die maximale Expression von PCB 28 mit einer 262-fachen Induktion weniger als die Hälfte des maximalen Effekts von PCB 153 betrug (662-fach), während die höchste

Amplifizierung der CYP2B1-Transkripte aller anderen Kongenere zwischen diesen beiden Werten zu finden war.

Der Vergleich der jeweiligen PCB-Kongenere mit Phenobarbital (442-fache Induktion) ergab, dass die Kongenere 28, 52 und 101, welche maximale Expressionsraten vom Faktor 262 bis 376 induzierten, eine geringere als die maximal durch Phenobarbital hervorgerufene Induktion bewirkten. Die Kongenere 138, 153 und 180 hingegen erreichten Induktionen zwischen dem 575- und 662-Fachen und vermochten somit eine höhere maximale Induktion als Phenobarbital auszulösen.

Bei genauerer Betrachtung der durch die PCB-Inkubationen hervorgerufenen Expressionsmaxima lässt sich erkennen, dass diese mit steigendem Chlorierungsgrad des PCBs tendenziell größer werden. Lediglich die Applikation von PCB 180 bewirkt keine weitere Steigerung der CYP2B1-Expression, sondern dessen Wirkung bleibt leicht, jedoch nicht signifikant hinter jener von PCB 153 zurück. Mittels sigmoidaler Näherungsfunktion und unter Berücksichtigung von PCB-Konzentrationen  $\leq 10 \mu\text{M}$  konnten für die nicht-dioxinartigen PCBs folgende  $\text{EC}_{50}$ -Werte für die CYP2B1-Expression ermittelt werden: PCB 28:  $4,49 \mu\text{M}$  (95 %-Konfidenzintervall:  $3,37 - 5,99 \mu\text{M}$ ), PCB 52:  $3,14 \mu\text{M}$  (95 %-Konfidenzintervall:  $2,25 - 4,38 \mu\text{M}$ ), PCB 101:  $1,07 \mu\text{M}$  (95 %-Konfidenzintervall:  $0,80 - 1,43 \mu\text{M}$ ), PCB 138:  $1,30 \mu\text{M}$  (95 %-Konfidenzintervall:  $0,92 - 1,83 \mu\text{M}$ ), PCB 153:  $0,45 \mu\text{M}$  (95 %-Konfidenzintervall:  $0,19 - 1,09 \mu\text{M}$ ) und PCB 180:  $0,55 \mu\text{M}$  (95 %-Konfidenzintervall:  $0,24 - 1,24 \mu\text{M}$ ).

Hinsichtlich der durch die jeweiligen PCB-Kongenere hervorgerufenen maximalen CYP2B1-Expressionen sowie unter Berücksichtigung der  $\text{EC}_{50}$ -Werte lässt sich für die einzelnen NDL-PCBs folgende Reihenfolge des Induktionsvermögens aufstellen: PCB 28 < PCB 52 < PCB 101 < PCB 138 < PCB 180  $\approx$  PCB 153. Da die Kongenere nur geringe Variationen bezüglich der Positionen der am Biphenylgerüst befindlichen Chloratome aufzeigen, lässt sich daraus schließen, dass die Reihenfolge des Induktionspotentials der *ortho*-substituierten Kongenere weitgehend dem Chlorierungsgrad bzw. der Hydrophobizität der Verbindungen folgt, was sich mit Untersuchungen von Al-Salman und Plant (2012) sowie Connor *et al.* (1995) deckt. Hinsichtlich dieses Effekts könnte eine vermehrte unspezifische Affinität der weniger polaren Moleküle gegenüber Zellmembranen eine Rolle spielen, welche womöglich mit einer stärker ausgeprägten zellulären Verfügbarkeit der höher chlorierten PCBs einhergeht. Des Weiteren könnte die Bindungsaffinität bezüglich des CAR oder PXR, sofern diese für die Induktion einen ausschlaggebenden Faktor darstellt, vom Grad der Chlorierung oder der Polarität des jeweiligen PCB-Kongenens abhängen. Zudem wird durch einen höheren Chlorierungsgrad in den meisten Fällen auch die metabolische Persistenz des Kongenens gesteigert (Mathews und Anderson, 1975). Insofern könnten von den höher chlorierten PCBs höhere Konzentrationen an nicht-metabolisierten Verbindungen vorliegen, welche so am intrazellulären Rezeptor eine verstärkte CYP2B1-Expression begünstigen könnten.

Auffallend ist hierbei jedoch, dass das Hexachlorbiphenyl 153 denselben Chlorierungsgrad aufweist wie PCB 138, dessen induzierte CYP2B1-Expression jedoch wesentlich geringer ausfällt als jene von PCB 153. Zudem bewirkt PCB 153 trotz des geringeren Chlorierungsgrades sogar eine höhere CYP2B1-Induktion als das Heptachlorbiphenyl 180. Für das hohe Induktionspotential von PCB 153 könnten sich die Positionen der am Biphenylsystem befindlichen Chloratome verantwortlich zeigen, welche eine besonders hohe Affinität zum konstitutiven Androstan-Rezeptor begünstigen könnten. Allerdings kann auch eine mögliche Rolle des Pregnan-X-Rezeptors oder weiterer Transkriptionsfaktoren als Ursache für die verstärkte CYP2B1-Expression durch PCB 153 nicht ausgeschlossen werden. Zur Struktur-Wirkungs-Beziehung bezüglich einer durch die NDL-PCBs induzierten mRNA-Expression von CYP2B1 liegen in der Literatur bisher keine ausreichenden Kenntnisse vor, allerdings existieren Untersuchungen auf Ebene der Enzym-Aktivität mittels PROD-Assay. So analysierten Connor *et al.* (1995) die Dosis-Wirkungs-Beziehungen mehrerer NDL-PCBs in Sprague-Dawley Ratten und formulierten folgende Reihenfolge für ihr Vermögen zur Induktion von CYP2B1: PCB 28 < PCB 52 < PCB 101 < PCB 153 < PCB 180. Hierbei weichen lediglich die PCBs 153 und 180 von der in dieser Arbeit aufgestellten Reihenfolge ab, wobei in diesem Zusammenhang jedoch die unterschiedlichen experimentellen und toxikokinetischen Eigenschaften von *in vitro*- und *in vivo*-Studien und damit einhergehende Veränderungen der Wirksamkeit zu berücksichtigen sind, welche die Vergleichbarkeit der Studien entsprechend beeinträchtigen können.

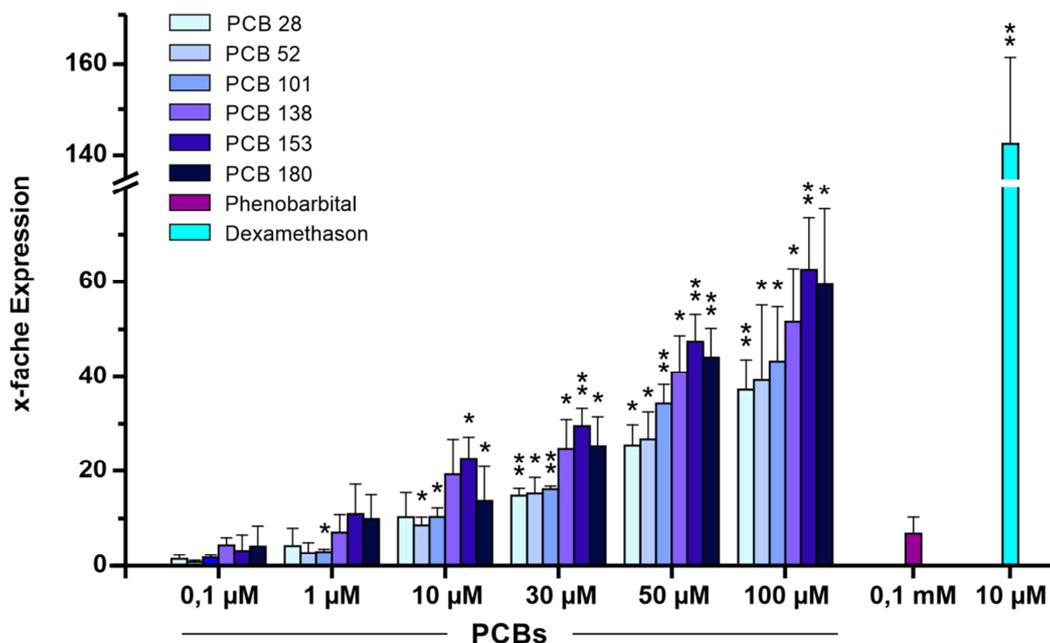
Eine vergleichbare *in vitro*-Studie von Schrenk *et al.* (2004), in welcher nach Seglen (1972) isolierte Rattenhepatozyten verwendet wurden, postuliert für die PROD-Induktion durch die nicht-dioxinartigen PCBs die der vorliegenden Arbeit entsprechende Reihenfolge PCB 28 < PCB 101 < PCB 138 < PCB 153, wobei PCB 180 in benannter Studie jedoch nicht untersucht wurde. Zusätzlich zu diesen Untersuchungen konnten Al-Salman und Plant (2012) mittels eines Aktivierungs-Assays für nukleäre Rezeptoren zeigen, dass non-koplanare PCBs, insbesondere PCB 153 und PCB 180, Agonisten des humanen PXR bzw. CAR darstellen. Auch Sueyoshi *et al.* (1999) konnten PCBs als Induktoren von CAR identifizieren.

Betrachtet man bei allen getesteten PCBs die auch bereits bei Phenobarbital aufgetretene Verringerung der CYP2B1-Induktion bei Applikation höherer Kongener-Konzentrationen (100 µM), so lässt sich erkennen, dass sich die Werte unabhängig vom Chlorierungsgrad oder der maximalen Expression der jeweiligen PCBs im Rahmen einer 98- bis 191-fachen Expression gegenüber der Lösungsmittelkontrolle bewegen. Ein weiterer interessanter Aspekt zeigt sich in diesem Zusammenhang darin, dass die verminderte Expression in mit PCB 153 und PCB 180 inkubierten Hepatozytenkulturen bereits bei einer zehnfach geringeren Konzentration erfolgte als bei den anderen Kongeneren, was die Vermutung nahelegt, dass diese mit der Potenz zur CAR-Aktivierung in Verbindung gebracht werden könnten. In Anbetracht der ähnlichen Wirkmechanismen der NDL-PCBs und des prototypischen Induktors

Phenobarbital kann die verringerte CYP2B1-Induktion bei hohen PCB-Konzentrationen voraussichtlich auf die bereits bei Phenobarbital erwähnten Ursachen zurückgeführt werden.

Entgegen dieser Abnahme der CYP2B1-Induktion durch steigende PCB-Konzentrationen konnte für die CYP3A1-Expression wiederum keine solche Verringerung im untersuchten Konzentrationsspektrum beobachtet werden. Die Induktion der CYP3A1-Expression zeigte hierbei einen von der eingesetzten PCB-Konzentration und dem jeweiligen Chlorierungsgrad des PCBs abhängigen Verlauf (Abb. 23).

So stieg bei allen getesteten nicht-dioxinartigen PCBs die induzierte CYP3A1-mRNA mit zunehmender Konzentration an. Dabei wurde die maximale CYP3A1-Induktion innerhalb des untersuchten Konzentrationsspektrums in allen Fällen mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  erreicht und betrug zwischen dem 37-Fachen (PCB 28) und 62-Fachen (PCB 153) der basalen CYP3A1-Expression.



**Abbildung 23: Expressionsprofil von CYP3A1 nach Inkubation mit verschiedenen ND1-PCBs.** Dosisabhängige Induktion der CYP3A1-mRNA-Expression in primären Rattenhepatozyten nach 24-stündiger Inkubation mit den nicht-dioxinartigen PCB-Kongeneren 28, 52, 101, 138, 153 und 180 sowie Phenobarbital (0,1 mM) und Dexamethason (10  $\mu\text{M}$ ) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle. MW  $\pm$  SD,  $n \geq 3$ , statistische Analyse: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ .

Generell fielen bei CYP3A1 jedoch sowohl die individuellen Unterschiede zwischen den einzelnen PCBs bei den jeweilig verwendeten Konzentrationen als auch die Höhe der maximal induzierten Expressionen deutlich geringer aus als bei der CYP2B1-Induktion. So war etwa die maximale CYP3A1-Induktion von PCB 153 bei 100  $\mu\text{M}$  nur um das 1,7-Fache gegenüber

der maximalen Induktion durch PCB 28 erhöht, während dieser Unterschied bei der CYP2B1-Expression dagegen mehr als das 2,5-Fache betrug. Auch innerhalb der einzelnen Konzentrationsstufen wiesen die hervorgerufenen Induktionswerte eine deutlich geringere Varianz auf als bei der Induktion von CYP2B1. Weiterhin zeigte sich, dass die nicht-dioxinartigen PCBs im Gegensatz zur CYP3A1-Induktion mehr als 10-fach potenter erscheinen, Gene der CYP2B-Unterfamilie zu induzieren.

Mit Ausnahme von PCB 180 erzielten die PCBs mit einem höheren Chlorierungsgrad entsprechend stärkere CYP3A1-Expressionen, das Induktionsvermögen von PCB 180 blieb jedoch, wie auch bereits bei CYP2B1, bei der Mehrheit der gemessenen Konzentrationen hinter dem von PCB 153 zurück. Hinsichtlich der durch die jeweiligen Kongenere maximal induzierten CYP3A1-Expression lässt sich folgende Reihenfolge des Induktionspotentials für die einzelnen ND-L-PCBs aufstellen, welche zu jener von CYP2B1 identisch ist: PCB 28 < PCB 52 < PCB 101 < PCB 138 < PCB 180 ≈ PCB 153. Anhand dieser Parallelen bei den jeweiligen CYP-Induktionen kann vermutet werden, dass die nicht-dioxinartigen PCBs die Expression von CYP2B1 und CYP3A1 vornehmlich über denselben Rezeptor vermitteln könnten.

Hinzu kommt, dass die Induktion von CYP3A1 durch den PXR-Agonisten Dexamethason (150-fache Expression) deutlich höher ausfällt als die durch die PCBs vermittelte CYP3A1-Expression (bis zu 62-fache Expression durch PCB 153). Somit scheinen die nicht-dioxinartigen PCBs im Vergleich zu Dexamethason nicht in großem Maße den Pregnan-X-Rezeptor zu aktivieren, sondern ihre Wirkung hauptsächlich über den konstitutiven Androstan-Rezeptor zu entfalten.

Allerdings ergibt sich für die PCBs dagegen wiederum eine bis zu 8-fach höhere maximale Induktion der CYP3A1-Expression als für den klassischen CAR-Agonisten Phenobarbital. Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, ob die CYP3A-Induktion durch die ND-L-PCBs zumindest zum Teil auch über den für diese Wirkung bekannten PXR vermittelt wird, da die Höhe der CYP3A1-Expression ohne dessen Einfluss vermutlich vergleichbarer zu jener von Phenobarbital wäre.

Für eine mögliche Beteiligung des Pregnan-X-Rezeptors sprechen Beobachtungen von Al-Salman und Plant (2012), die neben einer Aktivierung des CAR auch einen Einfluss der nicht-dioxinartigen PCBs 153 und 180 auf den PXR nachweisen konnten. Eine weitere Tatsache, die einen Beitrag des PXR nahelegen könnte, stellt dessen wesentlich größere Liganden-Bindungstasche dar (Molnár *et al.*, 2013; Watkins *et al.*, 2001; di Masi *et al.*, 2009), wodurch der Pregnan-X-Rezeptor im Gegenzug zu CAR in der Lage ist, eine Vielzahl von Liganden zu binden (Moore *et al.*, 2000; Willson und Kliewer, 2002; Suino *et al.*, 2004). So kann eine Rolle des Pregnan-X-Rezeptors bei der Induktion von CYP3A1 durch die verwendeten ND-L-PCBs nicht ohne Weiteres ausgeschlossen werden.

### 5.3 Inhibition der nukleären Rezeptoren CAR und PXR mittels small interfering RNA (siRNA)

Um die genauen Wirkmechanismen der Induktion von Cytochrom-P450-Enzymen durch die NDL-PCBs näher zu untersuchen, wurde im Folgenden zunächst ein Blick auf die Rolle der einzelnen nukleären Rezeptoren CAR und PXR bei dieser Induktion geworfen. Da zwischen den verschiedenen Signalwegen von CAR und PXR eine Interaktion bestehen kann und diese beiden Rezeptoren eine teilweise überlappende Funktionalität zeigen (Xie *et al.*, 2000; Smirlis *et al.*, 2001; Maglich *et al.*, 2002; Lim und Huang, 2008), ist es nicht immer ohne Weiteres möglich, den spezifischen Rezeptor für die jeweilige Genregulation zu erörtern (Wang und Negishi, 2003; Li *et al.*, 2010).

Um dennoch Aufschluss über eine Beteiligung von CAR und PXR an der Induktion von CYP2B1 und CYP3A1 durch die getesteten NDL-PCBs zu erhalten sowie darüber, in welchem Maße die Rezeptoren bei diesen Induktionen jeweils eine Rolle spielen, sollte eine Möglichkeit gefunden werden, eine gezielte Inhibition der einzelnen Rezeptorfunktion herbeizuführen.

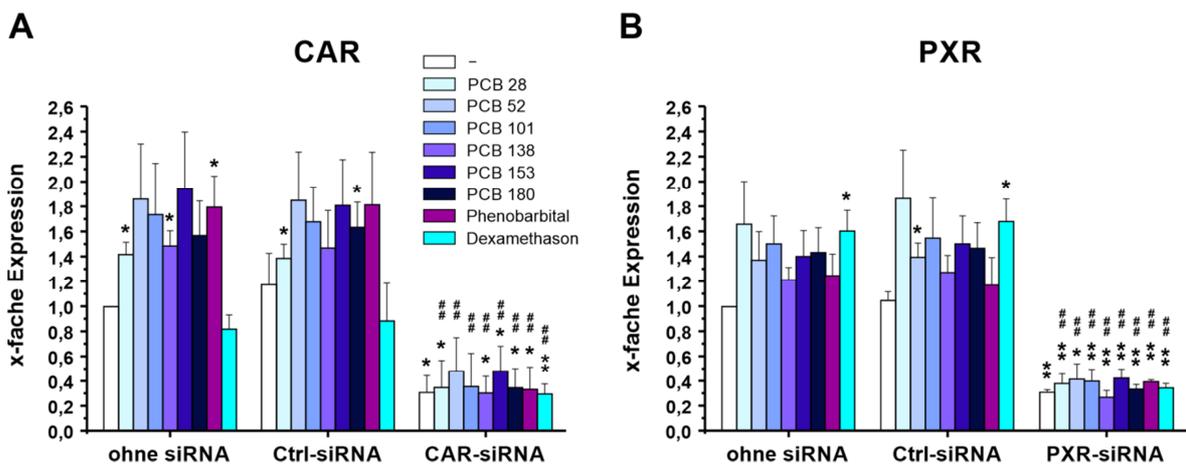
Zu diesem Zweck wurden für die jeweiligen Rezeptoren spezifische siRNA-Sequenzen verwendet, welche mit Hilfe liposomaler Transfektionsmittel künstlich in die Zelle eingebracht werden können. Die RNA-Interferenz beruht hierbei auf der Wechselwirkung der jeweiligen siRNA mit den komplementären mRNA-Sequenzen des CAR bzw. PXR, woraufhin die darauffolgende Degradation der Ziel-mRNA zu einer damit einhergehenden Reduktion der Genexpression führt (Jinek und Doudna, 2009).

Neben der Inkubation mit den spezifischen siRNAs wurde in allen Experimenten mit Hilfe einer Kontroll-siRNA (Ctrl-siRNA), basierend auf einer für CAR und PXR unspezifischen Nukleotidsequenz, überprüft, ob die zur liposomalen Transfektion verwendeten Reagenzien in den primären Rattenhepatozyten einen zusätzlichen hemmenden oder möglicherweise auch stimulierenden Einfluss auf die Expression der untersuchten Ziel-mRNA ausüben. Dabei zeigte sich in allen durchgeführten Experimenten, dass die verwendete Methode zur Transfektion der siRNA in den primären Rattenhepatozyten unter den gegebenen Kulturbedingungen keine signifikante Veränderung der untersuchten mRNA herbeiführte und die Induktion von CYP2B1 und CYP3A1 durch den Transfektionsprozess nicht beeinflusst wurde.

#### 5.3.1 Überprüfung der Effektivität der CAR- und PXR-siRNA

Zunächst sollte überprüft werden, ob die ausgewählten siRNA-Konstrukte die mRNA-Expression von CAR und PXR sowohl basal als auch unter dem Einfluss von CYP2B1- und CYP3A1-Induktoren wie Phenobarbital, Dexamethason und NDL-PCBs effektiv inhibieren.

Dazu wurden die primären Rattenhepatozyten nach der 4-stündigen siRNA-Transfektion mit den jeweiligen Testsubstanzen inkubiert und die zugehörige mRNA-Expression von CAR und PXR mit der nicht-transfizierten Kontrolle verglichen. Dabei wurde für jedes der verwendeten NDL-PCBs mit jeweils 10  $\mu$ M eine repräsentative Konzentration verwendet, die in den vorherigen Experimenten eine hinreichend starke Veränderung der Expression von CYP2B1 bzw. CYP3A1 herbeiführte (vgl. Kapitel 5.2, Abb. 22 und 23).



**Abbildung 24: Expression der CAR- und PXR-mRNA nach Inkubation mit NDL-PCBs, Phenobarbital und Dexamethason sowie nach Hemmung der Rezeptoren durch CAR- bzw. PXR-siRNA.** CAR- bzw. PXR-Expression in primären Rattenhepatozyten relativ zur Lösungsmittelkontrolle (-) nach Inkubation mit jeweils 10  $\mu$ M der NDL-PCBs sowie den prototypischen Induktoren Phenobarbital (0,1 mM) und Dexamethason (10  $\mu$ M) bzw. nach Hemmung von CAR bzw. PXR mittels siRNA-Transfektion. MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ , statistischer Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ ; Vergleich zur Induktion ohne siRNA: #:  $p < 0,05$  und ##:  $p < 0,01$ .

Die Bestimmung der mRNA-Gehalte von CAR in mit Phenobarbital inkubierten Hepatozyten zeigte zunächst, dass die Induktion mit dem CAR-Agonisten eine Zunahme der zellulären CAR-mRNA um etwa das 1,8-Fache bewirkte (Abb. 24 A). Auch Dail *et al.* (2008) konnten eine im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle signifikante Steigerung der CAR-mRNA infolge einer Phenobarbital-Behandlung feststellen. Demgegenüber führte das vornehmlich als PXR-Induktor bekannte Dexamethason basal zu keiner signifikanten Veränderung der CAR-mRNA-Expression.

Ähnlich wie nach der Inkubation mit Phenobarbital bewirkte die Inkubation mit dem nicht-dioxinartigen PCB 28 eine signifikante Steigerung des CAR-mRNA-Levels auf das 1,4-Fache der basalen Expression. Auch die übrigen getesteten NDL-PCBs führten zu um einer bis zu 90 % erhöhten CAR-mRNA-Expression, wobei aufgrund experimenteller Schwankungen nur wenige dieser Veränderungen statistisch signifikant ausfielen. Dabei konnte anders als etwa

bei der Induktion von CYP2B1 oder CYP3A1 durch die NDL-PCBs keine Abhängigkeit des Induktionspotentials angesichts des Chlorierungsgrades der PCBs festgestellt werden.

Die Transfektion mit der spezifischen siRNA gegen den CAR führte in den mit der Lösungsmittelkontrolle inkubierten Hepatozyten zu einer signifikanten, 70 %-igen Verringerung der nachweisbaren CAR-mRNA. Ebenfalls stark reduziert waren die CAR-mRNA-Level in den transfizierten Hepatozyten nach Inkubation mit Phenobarbital und den NDL-PCBs, die nur noch etwa 30 bis 48 % der mRNA-Werte in der Lösungsmittelkontrolle bzw. 20 bis 26 % der CAR-mRNA-Level, die durch die Induktoren unter Kontrollbedingungen hervorgerufen wurden, betragen. Vergleichbar geringe mRNA-Level von CAR konnten auch in den mit Dexamethason inkubierten Kulturen gemessen werden. Die jeweilige erhebliche Inhibition der CAR-mRNA-Expression infolge der CAR-siRNA und der daraus resultierenden Degradation der Ziel-mRNA bestätigt hierbei die gute Effektivität der verwendeten CAR-siRNA.

Die Untersuchung der PXR-mRNA-Level nach Inkubation mit den verschiedenen Testsubstanzen zeigte zunächst, dass Phenobarbital im Gegensatz zur CAR-Expression keine signifikante Induktion der PXR-mRNA auslöste, während Dexamethason eine signifikante, 60 %-ige Steigerung der basalen mRNA-Expression bewirkte (Abb. 24 B). Auch Pascussi *et al.* (2000) beobachteten in humanen Hepatozyten eine Dexamethason-bedingte Steigerung der mRNA-Expression des Pregnan-X-Rezeptors, zudem konnten auch Rigalli *et al.* (2012) eine erhöhte Induktion der PXR-mRNA infolge einer Behandlung mit dem PXR-Agonisten Rifampicin zeigen. Zu Dexamethason ähnliche, jedoch nicht ganz so potente Induktoren waren die NDL-PCBs, die alle zu Steigerungen der PXR-mRNA um etwa 20 bis 65 % führten. Dabei war auch hier kein Zusammenhang zwischen dem Chlorierungsgrad des jeweiligen PCBs und seinem Potential zur Induktion der PXR-mRNA festzustellen. Insgesamt jedoch waren die durch die NDL-PCBs hervorgerufen Veränderungen der PXR-mRNA mit einer mittleren Steigerung um 42 % etwas geringer als die der CAR-mRNA, die im Mittel um etwa 66 % erhöht war.

Das Maß der Hemmung der PXR-Expression durch die Transfektion mit der PXR-siRNA war mit jener Hemmung von CAR infolge der CAR-siRNA vergleichbar. Auch hier betragen die PXR-mRNA-Level nach Transfektion und Behandlung mit den Testsubstanzen nur noch zwischen 26 und 41 % der basalen PXR-Expression. Somit bestätigt die drastische Reduktion der PXR-mRNA infolge der PXR-siRNA die Effektivität dieser, so dass die beiden spezifischen siRNAs für die jeweiligen Rezeptoren für weitere Untersuchungen zur Cytochrom-P450-Induktion bzw. für Analysen zur Apoptosehemmung verwendet werden können.

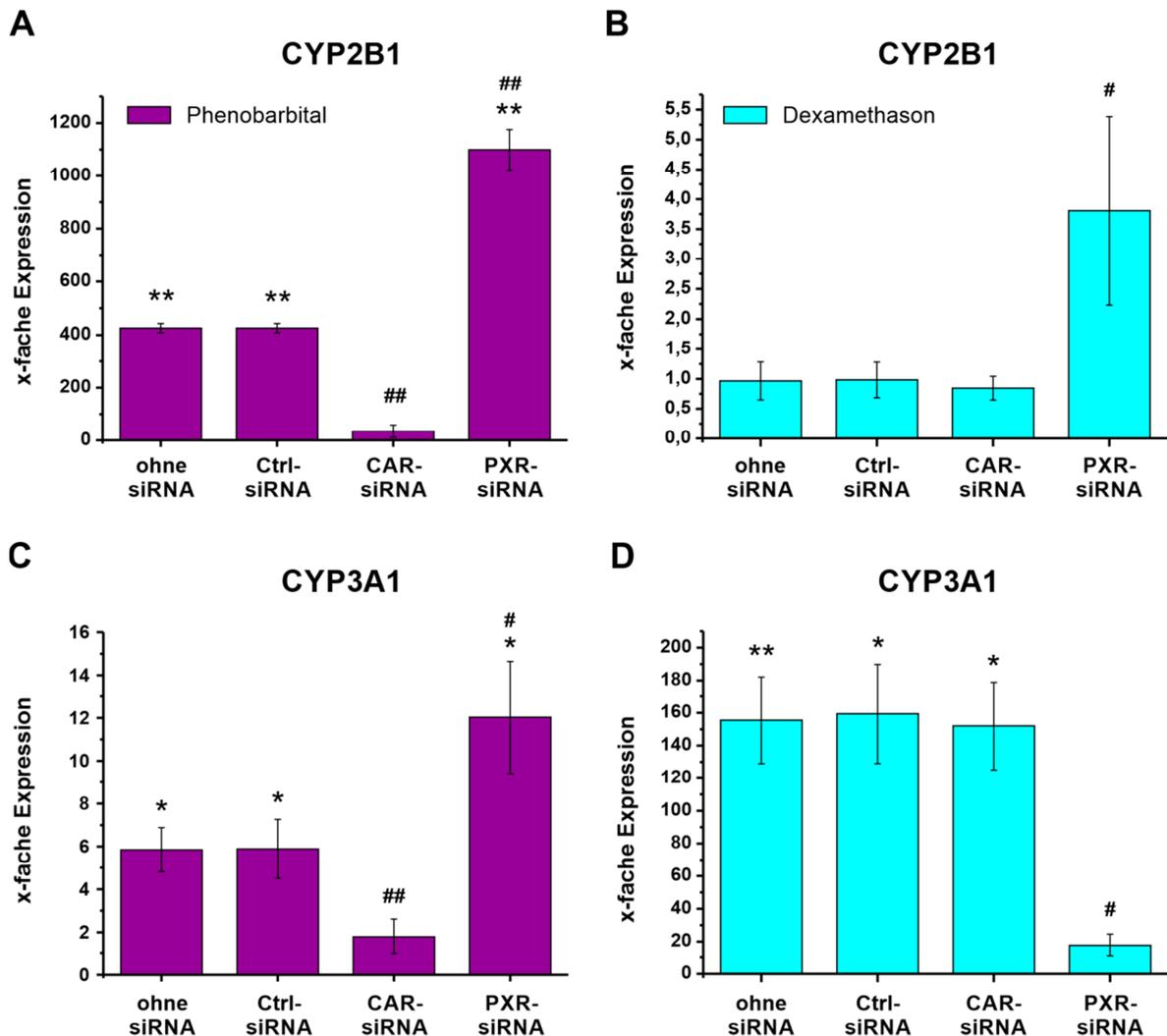
### 5.3.2 Bedeutung von CAR und PXR für die Induktion der CYP2B1- und CYP3A1-mRNA durch Phenobarbital und Dexamethason

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die verwendeten siRNA-Konstrukte die Expression von CAR und PXR sowohl unter Kontrollbedingungen als auch in induzierten Systemen signifikant hemmen, sollte untersucht werden, welchen Einfluss diese Hemmung auf die Induktion von CYP2B1 sowie CYP3B1 durch die prototypischen Induktoren Phenobarbital und Dexamethason hat und inwieweit sich die beiden Rezeptoren für die Induktion dieser Cytochrom-P450-Enzyme spezifisch oder wechselwirkend verantwortlich zeigen.

Dafür wurden wie bereits zuvor die mRNA-Level von CYP2B1 und CYP3A1 unter Kontrollbedingungen sowie nach Transfektion mit der unspezifischen Kontroll-siRNA und den spezifischen CAR- und PXR-Konstrukten ermittelt und miteinander verglichen (Abb. 25).

Im Falle der Induktion von CYP2B1 durch Phenobarbital (0,1 mM) zeigte sich dabei kein nachweisbarer Effekt hinsichtlich der Kontroll-siRNA, da auch in den mit der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen eine gegenüber der Lösungsmittelkontrolle um das 425-Fache erhöhte mRNA-Expression gemessen werden konnte, die sich nicht von der Induktion durch Phenobarbital ohne Transfektion unterschied (Abb. 25 A). Die Behandlung der Hepatozyten mit der CAR-siRNA hatte dagegen eine hochsignifikante Verringerung der Phenobarbital-induzierten CYP2B1-Expression zur Folge, die nur noch das 35-Fache der basalen Expression betrug. Demgegenüber führte die Inkubation mit Phenobarbital nach einer Hemmung des PXR zu einer im Mittel um das ca. 1.100-Fache gesteigerten CYP2B1-Expression, die somit gegenüber der Expression ohne siRNA bzw. Kontroll-siRNA signifikant erhöht war.

Ein vergleichbares Expressionsmuster bei jedoch geringerer Gesamtexpression zeigte sich bei der Phenobarbital-vermittelten CYP3A1-Induktion (Abb. 25 C). So hatte auch hier die liposomale Transfektion mit der Kontroll-siRNA selbst keinen Einfluss auf die CYP3A1-Induktion durch Phenobarbital, die etwa dem 6-Fachen der basalen CYP3A1-Expression entsprach. Die Hemmung des konstitutiven Androstan-Rezeptors reduzierte die CYP3A1-Expression auf das 1,8-Fache, wodurch sich diese nicht mehr signifikant von der basalen Induktion unterschied und somit die CYP3A1-Induktion durch Phenobarbital vollständig blockierte. Ähnlich zu CYP2B1 vermittelte die Hemmung des Pregnan-X-Rezeptors eine signifikante Verstärkung der Phenobarbital-induzierten CYP3A1-Induktion, die mit einer 12-fachen Expression nun etwa das Doppelte der Induktion ohne siRNA betrug.



**Abbildung 25: Auswirkungen der Hemmung von CAR und PXR auf die Phenobarbital- und Dexamethason-induzierte Expression von CYP2B1 und CYP3A1.** CYP2B1- und CYP3A1-Expression in primären Rattenhepatozyten relativ zur Lösungsmittelkontrolle nach Inkubation mit 0,1 mM Phenobarbital (A und C) sowie 10  $\mu$ M Dexamethason (B und D) bzw. nach Hemmung von CAR bzw. PXR mittels siRNA-Transfektion. MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ , statistischer Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ ; Vergleich zur Induktion ohne siRNA: #:  $p < 0,05$  und ##:  $p < 0,01$ .

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen konnten auch Sueyoshi und Negishi (2001) sowie Handschin und Meyer (2003) zeigen, dass die durch Phenobarbital bedingte Regulation der CYP2B-Genexpression überwiegend über den konstitutiven Androstan-Rezeptor vermittelt wird. Zudem konnte in weiteren Studien belegt werden, dass die Cyp2b10-Induktion durch Phenobarbital in CAR-Knockout-Mäusen im Gegensatz zu jener in Wildtyp-Mäusen vernachlässigbar gering ist (Wei *et al.*, 2000; Ueda *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2004). Bezüglich der Expression von CYP3A durch Phenobarbital konnte eine PXR-abhängige Regulation ebenfalls ausgeschlossen werden, da die Phenobarbital-bedingte Cyp3a11-

Induktion in PXR-Knockout-Mäusen entsprechend unverändert blieb (Staudinger *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2000). Ebenso wie bei der CYP2B-Expression durch Phenobarbital konnte dagegen in einer Vielzahl von Untersuchungen wieder der konstitutive Androstan-Rezeptor als wichtiger Faktor für die CYP3A-Induktion herauskristallisiert werden (Smirlis *et al.*, 2001; Anakk *et al.*, 2004). So zeigte sich in Maus-Studien, dass die Inaktivierung des CAR mittels eines Knockouts das Ausbleiben der Phenobarbital-induzierten Cyp3a11-Induktion zur Folge hatte (Wei *et al.*, 2002; Scheer *et al.*, 2008).

Dexamethason (10  $\mu$ M), das auch bereits unter Kontrollbedingungen nicht zu einer Induktion der CYP2B1-Expression führte, tat dies auch weder nach Transfektion mit der Kontroll-siRNA noch unter Einfluss der CAR-siRNA (Abb. 25 B). Im Gegensatz dazu hatte die Hemmung der PXR-Expression durch die PXR-spezifische siRNA einen signifikanten, positiven Effekt auf die Induzierbarkeit von CYP2B1 durch Dexamethason. So war die CYP2B1-Expression nach Hemmung des Pregnan-X-Rezeptors durch die spezifische siRNA im Mittel um annähernd das 4-Fache gegenüber der Induktion durch Dexamethason unter Kontrollbedingungen erhöht.

Die Expression von CYP3A1 nach der 24-stündigen Dexamethason-Behandlung, welche unter Kontrollbedingungen sowie auch nach Transfektion mit der Kontroll-siRNA ca. das 160-Fache der Expression in der Lösungsmittelkontrolle betrug, wurde durch eine zusätzliche Hemmung des konstitutiven Androstan-Rezeptors nicht signifikant beeinflusst (Abb. 25 D). Hingegen hatte die Inhibition des PXR einen blockierenden Einfluss auf die Induktion der CYP3A1-Expression durch den PXR-Agonisten, die gegenüber der Lösungsmittelkontrolle nun nicht mehr signifikant erhöht war und nur noch ca. ein Achtel der Dexamethason-bedingten CYP3A1-Induktion ohne PXR-siRNA betrug.

Auch Pascussi *et al.* (2000) konnten beobachten, dass die Expression von CYP3A durch Dexamethason dem PXR zugeschrieben werden kann und nicht über den CAR reguliert wird (Wei *et al.*, 2002). Dies konnte beispielsweise auch von Scheer *et al.* (2008) oder Xie *et al.* (2000) belegt werden, die zeigen konnten, dass die Cyp3a11-Expression durch Dexamethason in PXR-Knockout-Mäusen nahezu vollständig unterdrückt wird.

Sowohl die Induktion von CYP2B1 als auch die Expression von CYP3A1 durch Phenobarbital werden nachweislich vornehmlich über den konstitutiven Androstan-Rezeptor reguliert. Die jeweilige Verdopplung (Ab. 25 C) bzw. Vervielfachung (Abb. 25 A und B) der CYP2B1- bzw. CYP3A1-Expression bei gleichzeitiger Inhibition des Pregnan-X-Rezeptors legt diesbezüglich die Vermutung nahe, dass diese über den konstitutiven Androstan-Rezeptor hervorgerufenen Induktionen durch das Vorhandensein des Pregnan-X-Rezeptors in irgendeiner Weise beeinträchtigt werden könnten.

Hierbei scheint der Pregnan-X-Rezeptor auch ohne eine eigene Aktivierung durch einen Agonisten einen Einfluss auf die CAR-vermittelte Expression zu besitzen. Staudinger *et al.*

(2003) konnten bei CAR-regulierten Genen ebenfalls höhere Level nach einem Knockout des PXR feststellen und schlossen daraus, dass auch der nicht-aktivierte PXR eine negative oder kompetitive Rolle bei der CAR-vermittelten Induktion spielen könnte. Im Gegensatz dazu scheint das gleichzeitige Vorhandensein des CAR keine Auswirkung auf die durch den PXR hervorgerufene Expression von CYP3A1 zu haben, da diese durch eine entsprechende CAR-siRNA nicht beeinflusst wird (Abb. 25 D).

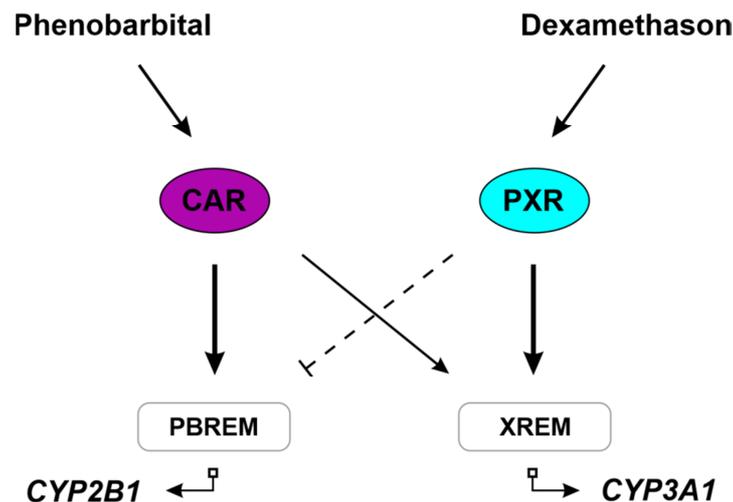
Des Weiteren scheint diese Beeinträchtigung durch den PXR sowohl für die durch CAR regulierte CYP2B1- als auch für die CYP3A1-Expression zu gelten, obwohl sich der Pregnan-X-Rezeptor vornehmlich für die Induktion von CYP3A1-Enzymen verantwortlich zeichnet. Eine deutlich erhöhte Cyp3a11-Expression durch Phenobarbital infolge eines Knockouts des Pregnan-X-Rezeptors konnte auch von Staudinger *et al.* (2003) bestätigt werden. Ähnlich wie bei unseren Ergebnissen zur CYP3A1-Induktion durch Dexamethason konnten allerdings für den PXR-Agonisten PCN wiederum keine erhöhten CYP3A-Level bedingt durch einen PXR-Knockout beobachtet werden. Stattdessen führte die Inaktivierung des PXR wie erwartet zu einer nahezu vollständigen Unterdrückung der CYP3A-Expression, so dass die beobachtete Beeinträchtigung infolge einer Inaktivierung des PXR vermutlich nicht mit den betreffenden jeweiligen Genen, sondern vor allem mit der funktionellen Regulierung über den CAR zusammenzuhängen scheint.

Als mögliche Ursache für solch eine Beeinträchtigung der CAR-vermittelten Enzyminduktion durch den Pregnan-X-Rezeptor kommt z. B. eine Konkurrenz der beiden Rezeptoren um die bei der jeweiligen Aktivierung beteiligten gemeinsamen Cofaktoren in Frage, wobei der PXR hierbei gegenüber dem CAR favorisiert sein könnte. Des Weiteren wäre auch denkbar, dass einige Substanzen wegen dessen größerer Bindungstasche mit dem Pregnan-X-Rezeptor interagieren, allerdings nicht zu einer Aktivierung von diesem führen. Infolgedessen würden die jeweiligen Substanzen allerdings auch nicht für eine mögliche Induktion am konstitutiven Androstan-Rezeptor vorliegen. Zudem könnte die Modulation durch den PXR auch auf einem Wettbewerb der beiden Rezeptoren am jeweiligen Promotor beruhen, wobei der PXR die Bindung von CAR an den Promotor antagonisieren könnte.

Interessanterweise führte eine Inhibition des PXR ebenfalls zu einer verstärkten CYP2B1-Expression durch Dexamethason, obwohl CAR keinen Einfluss auf die Dexamethason-regulierte Induktion von CYP2B1 zu besitzen scheint. In diesem Fall kann jedoch eine mögliche Beteiligung des Glukokortikoid-Rezeptors nicht ausgeschlossen werden, welcher in Anbetracht verminderter PXR-Level die Dexamethason-bedingte Induktion zumindest zu einem kleinen Teil übernehmen könnte. Diesbezüglich konnte bereits gezeigt werden, dass Dexamethason seine Wirkung auch über den Glukokortikoid-Rezeptor entfalten kann (Schuetz *et al.*, 2000; Audet-Walsh und Anderson, 2009) und infolgedessen auch eine CYP2B1-Induktion über den Glukokortikoid-Rezeptor möglich wäre. Denkbar wäre allerdings auch,

dass Dexamethason in Abwesenheit des PXR auch in geringem Maße mit dem CAR interagieren und so zu einer geringen Expression von CYP2B1 führen könnte.

Einen kurzen Überblick über die Induktionswege von CYP2B1 und CYP3A1 durch Phenobarbital und Dexamethason bietet das nachfolgende Modell (Abb. 26), in welchem die jeweilige Beteiligung der beiden Rezeptoren CAR und PXR noch einmal zusammengefasst wird.

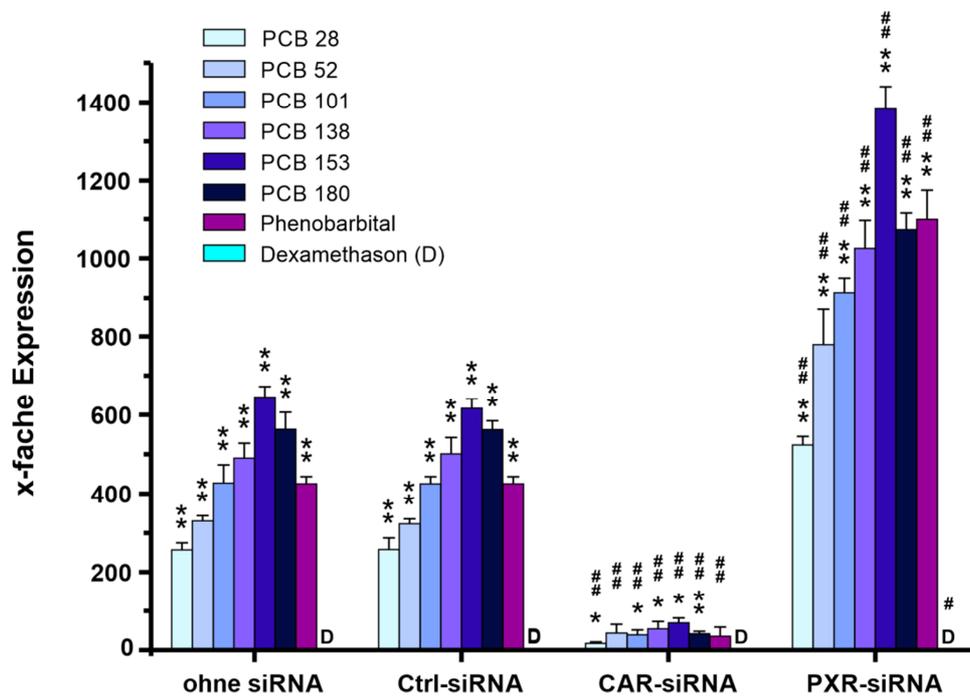


**Abbildung 26: Schematisches Modell bezüglich der Rezeptor-abhängigen Induktionswege von CYP2B1 und CYP3A1 durch Phenobarbital und Dexamethason in primären Rattenhepatozyten.** Die Induktion von CYP2B1 und CYP3A1 durch Phenobarbital wird hierbei vornehmlich über den CAR vermittelt, während dem PXR für diese Induktionen bestenfalls eine geringe Rolle zugesprochen werden kann. Dexamethason dagegen wird überwiegend über den Pregnan-X-Rezeptor reguliert. Zudem scheint der PXR die CAR-regulierte Expression durch Phenobarbital zu stören, wohingegen der CAR keinen solchen Einfluss auf die PXR-vermittelte CYP3A1-Expression durch Dexamethason besitzt.

### 5.3.3 Bedeutung von CAR und PXR für die Induktion der CYP2B1- und CYP3A1-mRNA durch NDL-PCBs

Die nicht-dioxinartigen PCBs werden im Allgemeinen als Induktoren vom Phenobarbital-Typ bezeichnet, wobei von Phenobarbital bekannt ist, dass dieses seine Wirkungen über den CAR entfaltet. Bei den PCBs hingegen konnte eine mögliche Beteiligung des PXR an der Induktion von CYP3A1 in unseren vorherigen Versuchen nicht ausgeschlossen werden. Generell ist es aufgrund der speziesspezifischen Unterschiede sowie des Crosstalks der beiden Rezeptoren schwer vorherzusagen, über welchen Rezeptor die Wirkung der jeweiligen Substanz reguliert wird (Wei *et al.*, 2002). Um zu untersuchen, ob und in welchem Maße sich die beiden Rezeptoren jeweils für die NDL-PCB-vermittelte Induktion verantwortlich zeigen, wurden die

Auswirkungen der Hemmung von CAR und PXR mittels siRNA auf die Induktion von CYP2B1 und CYP3A1 analysiert (Abb. 27 und Abb. 28).



**Abbildung 27: Auswirkungen der Hemmung von CAR und PXR auf die NDL-PCB-induzierte Expression von CYP2B1.** CYP2B1-Expression in primären Rattenhepatozyten relativ zur Lösungsmittelkontrolle nach Inkubation mit jeweils 10  $\mu$ M der NDL-PCBs sowie den prototypischen Induktoren Phenobarbital (0,1 mM) und Dexamethason (10  $\mu$ M) bzw. nach Hemmung von CAR bzw. PXR mittels siRNA-Transfektion. MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ , statistischer Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ ; Vergleich zur Induktion ohne siRNA: #:  $p < 0,05$  und ##:  $p < 0,01$ .

Die Inkubation der Hepatozyten mit der CAR-siRNA bewirkte hierbei eine Abnahme der NDL-PCB-induzierten CYP2B1-Expression bei allen getesteten PCBs um etwa 90 Prozent, wie sie bereits für den prototypischen CYP2B1-Induktor Phenobarbital gezeigt werden konnte (Abb. 27). Die verbleibenden Expressionslevel unterscheiden sich dabei nicht mehr in starkem Maße von der basalen CYP2B1-Expression in der DMSO-Lösungsmittelkontrolle. Somit wird die NDL-PCB-bedingte Induktion von CYP2B1 in primären Rattenhepatozyten durch die Reduktion des konstitutiven Androstan-Rezeptors mittels siRNA annähernd vollständig unterdrückt. Auch Al-Salman und Plant (2012) konnten in Huh-7-Zellen zeigen, dass non-koplanare PCBs, insbesondere PCB 153 und PCB 180, Agonisten des humanen CAR darstellen.

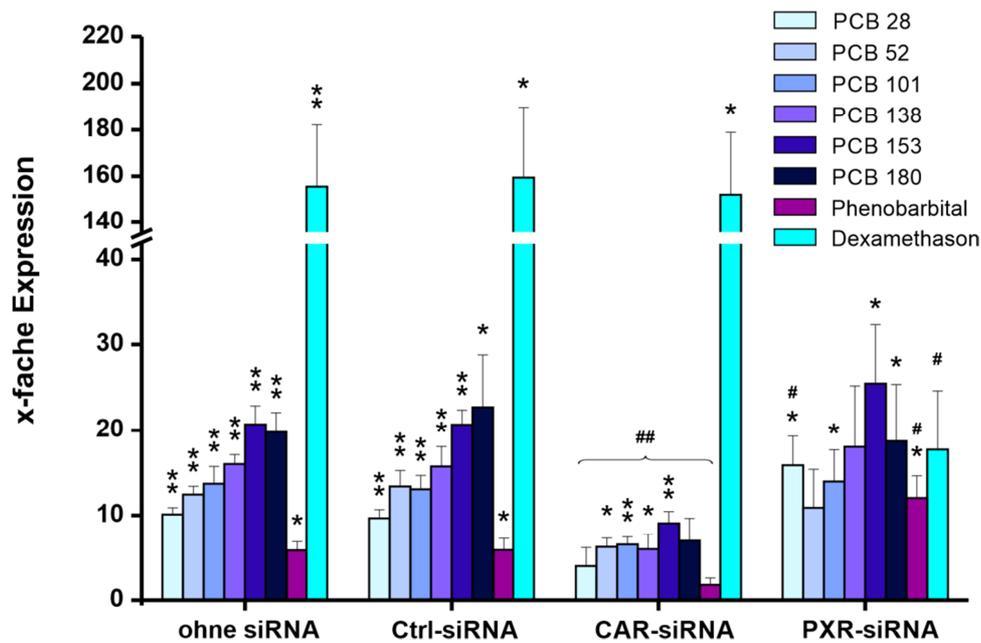
Demgegenüber bewirkte die Hemmung des Pregnan-X-Rezeptors mit der spezifischen siRNA gegen den PXR wiederum eine signifikante Steigerung der durch die NDL-PCBs induzierten CYP2B1-Expression. Ähnlich wie nach der Inkubation mit Phenobarbital resultierte die

Transfektion mit der PXR-siRNA bei allen getesteten ND-L-PCBs etwa in einer Verdopplung der CYP2B1-Induktion. Dabei konnte, mit Ausnahme der bereits bekannten Abweichung bei PCB 180, eine mit dem Chlorierungsgrad der PCBs zunehmende CYP2B1-Expression gemessen werden.

Ein deutliches Ansteigen der durch Aroclor 1260 bedingten Cyp2b10-Induktion infolge eines Knockouts des Pregnan-X-Rezeptors konnte auch von Wahlang *et al.* (2016) gezeigt werden. Die Autoren vermuteten, dass diese erhöhte Expression von Cyp2b10 infolge der Inaktivierung des PXR im Ausbleiben einer durch den PXR vermittelten Repression von CAR begründet ist. Für solch eine PXR-bedingte Beeinträchtigung des konstitutiven Androstan-Rezeptors können wiederum dieselben Ursachen angenommen werden, die auch bereits bei Phenobarbital diskutiert wurden.

Bezüglich der Expression von CYP3A1 zeigte die qRT-PCR nach Hemmung des CAR eine signifikante Verringerung der Induktion durch die ND-L-PCBs, welche jedoch nicht so groß ausfiel wie die Hemmung der CYP2B1-Induktion (Abb. 28). So waren die mRNA-Level je nach betrachtetem ND-L-PCB lediglich um 40 bis 65 % gegenüber der Induktion unter Kontrollbedingungen reduziert. Ebenfalls unterschiedlich zur CYP2B1-Expression erfuhr die CYP3A1-Expression nach Inkubation mit den ND-L-PCBs durch die Hemmung des PXR keine wesentliche Veränderung. So wies lediglich PCB 28 eine im Mittel um etwa 50 % erhöhte, statistisch signifikante Veränderung der CYP3A1-Expression auf, während die Expressionswerte aller anderen PCBs nahe an denen der Kontrolle bzw. Transfektion mit der Kontroll-siRNA lagen.

Diesbezüglich werden Unterschiede zu Phenobarbital deutlich, welches eine drastische Verminderung der CYP3A1-Induktion durch eine Inhibition des konstitutiven Androstan-Rezeptors erfuhr, während eine Transfektion mit der PXR-siRNA dagegen eine signifikante Verdopplung der CYP3A1-Expression zur Folge hatte. Die bei einer zu der von Phenobarbital ähnlichen Wirkweise erwartete Steigerung der CYP3A1-Expression infolge einer Behandlung mit der PXR-siRNA war bei den ND-L-PCBs dagegen nicht zu verzeichnen. Dies spricht dafür, dass die jeweiligen ND-L-PCBs die CYP3A1-Expression im Gegensatz zu Phenobarbital zum Teil auch über den Pregnan-X-Rezeptor regulieren. Der Großteil kann jedoch weiterhin dem CAR zugesprochen werden, da die CYP3A1-Expression durch die ND-L-PCBs infolge der PXR-siRNA keine signifikante Verringerung erfuhr, wie dies dagegen beispielsweise bei dem PXR-Agonisten Dexamethason der Fall war.



**Abbildung 28: Auswirkungen der Hemmung von CAR und PXR auf die NDL-PCB-induzierte Expression von CYP3A1.** CYP3A1-Expression in primären Rattenhepatozyten relativ zur Lösungsmittelkontrolle nach Inkubation mit jeweils 10  $\mu$ M der NDL-PCBs sowie den prototypischen Induktoren Phenobarbital (0,1 mM) und Dexamethason (10  $\mu$ M) bzw. nach Hemmung von CAR bzw. PXR mittels siRNA-Transfektion. MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ , statistischer Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ ; Vergleich zur Induktion ohne siRNA: #:  $p < 0,05$  und ##:  $p < 0,01$ .

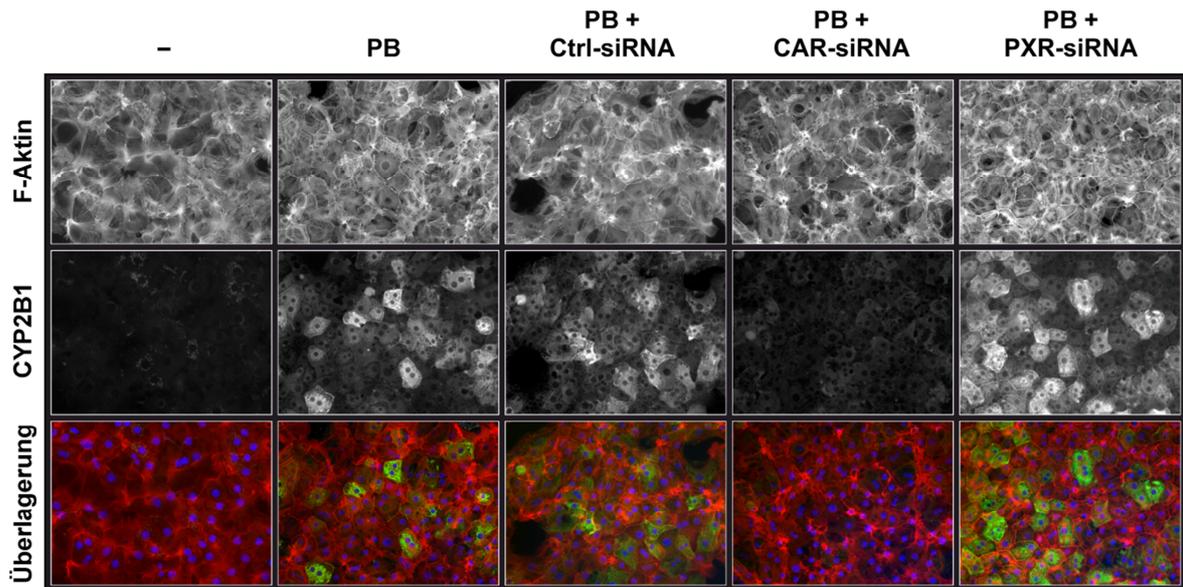
Eine Beteiligung des PXR an der durch die nicht-dioxinartigen PCBs vermittelten CYP3A-Induktion wird auch durch Untersuchungen mittels eines humanen Reporter-gen-Assays unterstützt, in welchem die NDL-PCBs 101, 138, 153 und 180 als Agonisten des Pregnan-X-Rezeptors identifiziert werden konnten (Creusot *et al.*, 2010). Das ebenfalls analysierte PCB 28 führte bei einer 1  $\mu$ M Konzentration dagegen nicht zu einer Aktivierung des PXR, allerdings konnte auch bei unseren Untersuchungen erst ab einer 30  $\mu$ M Konzentration von PCB 28 eine signifikante Induktion von CYP3A1 verzeichnet werden (vergleiche Abb. 23). Zudem konnte von Al-Salman und Plant (2012) mittels eines Reporter-gen-Assays neben einer Aktivierung des konstitutiven Androstan-Rezeptors auch eine durch die NDL-PCBs vermittelte Aktivierung des Pregnan-X-Rezeptors belegt werden. Insbesondere die nicht-dioxinartigen PCBs 138, 153 und 180 konnten dabei als Agonisten des PXR ermittelt werden, wobei die Stärke der Aktivierung der einzelnen PCBs mit PCB 153 > PCB 180 > PCB 138 mit jener von unseren Ergebnissen vergleichbar ist. Diese Reihenfolge bezüglich des Ausmaßes der PXR-Aktivierung scheint hierbei vornehmlich mit dem Chlorierungsgrad der PCBs zusammenzuhängen und für die beiden beteiligten Rezeptoren CAR und PXR identisch zu sein.

### 5.3.4 Bedeutung der Funktion von CAR und PXR für die Proteinexpression von CYP2B1 und CYP3A1

Die bisherigen Resultate der nicht-dioxinartigen PCBs zur Induktion von Cytochrom-P450-Enzymen auf mRNA-Ebene sollten im Folgenden auch durch Analysen zur Proteinexpression unterstützt werden. Da die transkriptionelle Regulation sowie zahlreiche posttranskriptionelle Modifikationen einen signifikanten Einfluss auf die RNA-Stabilität, Proteintranslation und Proteinstabilität besitzen können, ist es möglich, dass Protein-Abundanz und mRNA-Menge nicht immer direkt miteinander korrelieren (Vogel und Marcotte, 2012; Liu *et al.*, 2016). Daher ist es von Bedeutung, die mRNA-induzierenden Effekte der NDL-PCBs auch auf Proteinebene zu verifizieren. Zu diesem Zweck wurden sowohl immunzytochemische Fluoreszenzfärbungen für CYP2B1 und CYP3A1 als auch entsprechende Western Blots mit den jeweiligen Testsubstanzen durchgeführt.

Für die immunzytochemischen Fluoreszenzfärbungen wurden primäre Rattenhepatozyten für 24 h mit den NDL-PCBs, Phenobarbital oder Dexamethason behandelt, anschließend chemisch fixiert und mit Antikörpern inkubiert, die spezifisch an die Zielproteine CYP2B1 und CYP3A1 binden. Die spezifisch gebundenen Antikörper wurden anschließend mit fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern markiert, welche unter einem Epifluoreszenzmikroskop visualisiert werden können. Des Weiteren wurden markante zelluläre Strukturen wie etwa das filamentöse Aktin-Zytoskelett oder der Nukleus mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher Emissions- und Extinktionsspektren markiert, welche so eine exakte Lokalisation der einzelnen Hepatozyten in der Kulturschale sowie der intrazellulären Verteilung der Zielproteine ermöglichen.

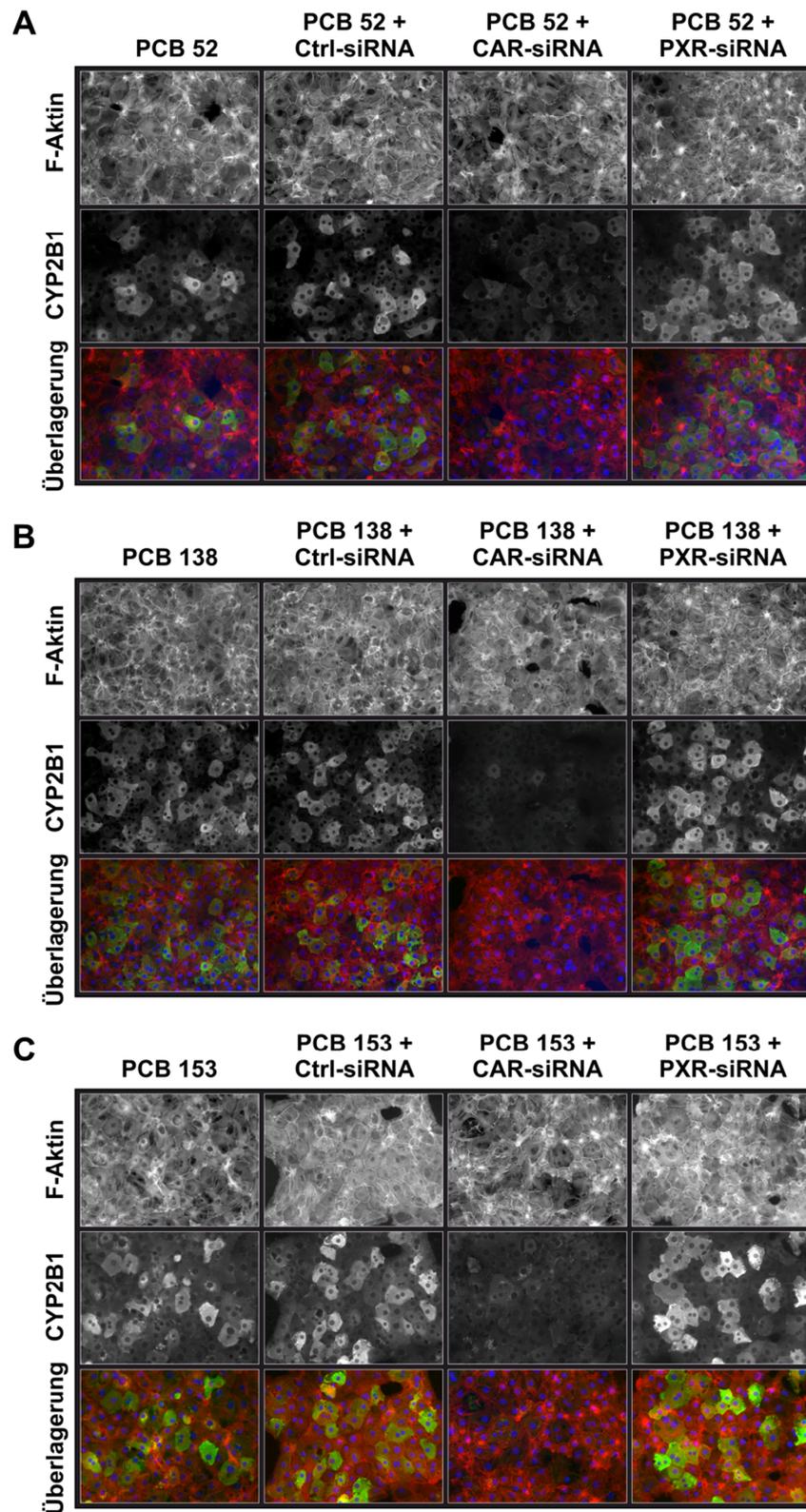
Von den behandelten Zellkulturplatten wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops Aufnahmen mit identischer Vergrößerung und Belichtungsdauer für das jeweilige Protein erstellt und eine hinsichtlich der Zelldichte sowie der Verteilung und Intensität der zellulären Färbung repräsentative Aufnahme für die Bewertung der Proteinexpression ausgewählt. Abbildung 29 zeigt hierbei repräsentative Aufnahmen der zellulären Verteilung von CYP2B1-Protein (Reihe 2) in der Lösungsmittelkontrolle, nach Inkubation mit Phenobarbital sowie unter dem Einfluss der spezifischen siRNA-Konstrukte für CAR und PXR. Die Färbung des Aktin-Zytoskeletts zur Identifikation der Hepatozyten ist in der ersten Reihe dargestellt, während die dritte Reihe eine Überlagerung der Färbungen gegen CYP2B1 (grün eingefärbt), das Aktin-Zytoskelett (rot gefärbt) sowie den Nukleus (blau) zeigt. Die Färbung von Aktin zeigt einen dichten Zellrasen mit aneinandergrenzenden Zellen, die Charakteristik der Nukleusfärbung mit Hilfe des DNA-bindenden Farbstoffs Hoechst 33342 zeigt nur sehr wenige Zellkerne mit kondensierter Chromatinstruktur, was auf eine hohe Vitalität der Zellkultur schließen lässt.



**Abbildung 29: Immunzytochemische Analyse zur Auswirkung der Hemmung von CAR und PXR auf die Phenobarbital-induzierte Proteinexpression von CYP2B1.** CYP2B1-Proteinexpression in primären Rattenhepatozyten nach Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle (–) sowie nach 24-stündiger Inkubation mit 0,1 mM Phenobarbital mit und ohne Hemmung von CAR bzw. PXR mittels siRNA-Transfektion. Zur Visualisierung von F-Aktin wurden die Zellen mit Rhodamin-Phalloidin markiert, die Zellkerne der Hepatozyten mit Höchst 33342.

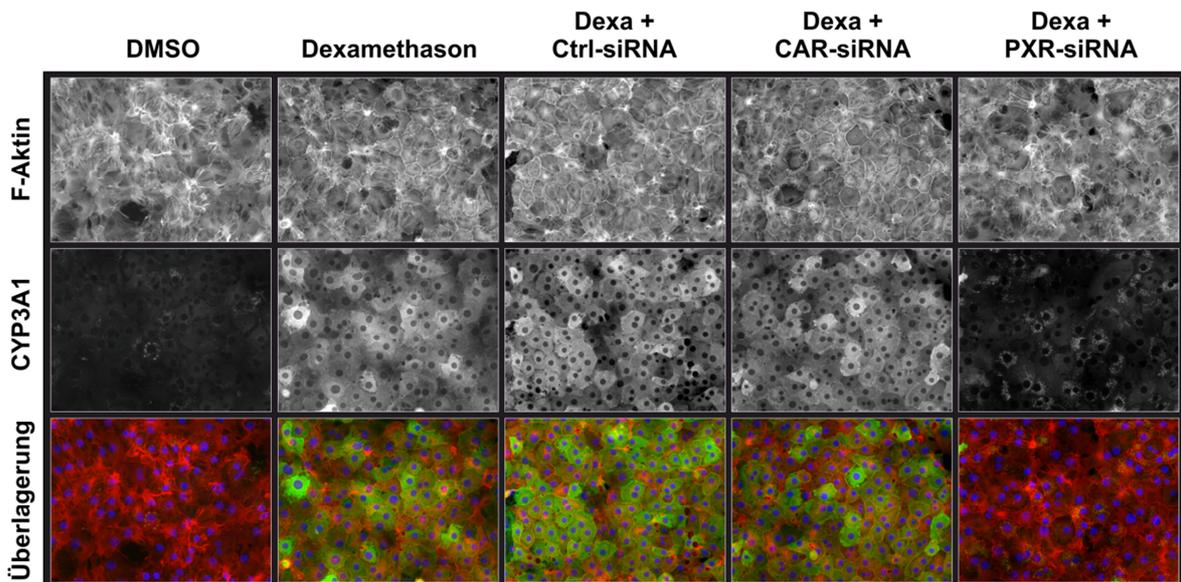
Während sich in der Lösungsmittelkontrolle nur eine schwache intrazelluläre Färbung von CYP2B1 erkennen lässt, treten in den mit Phenobarbital behandelten Zellkulturen einzelne Zellen mit einer intensiven, den gesamten Intrazellulärraum ausfüllenden Färbung hervor (Abb. 29). Bemerkenswerterweise unterscheidet sich die Intensität der CYP2B1-Färbung zwischen den Hepatozyten stark. So erscheinen einzelne Hepatozyten intensiv gefärbt, während sich die Intensität des Fluoreszenzsignals in anderen Zellen nur gering von der Signalintensität in den mit der Lösungsmittelkontrolle behandelten Zellkulturen unterscheidet. Dabei konnten jedoch zwischen den Zellen mit besonders starker Intensität und den schwächer gefärbten Zellen anhand der Färbung des Aktin-Zytoskeletts weder eindeutige morphologische Unterschiede noch eine veränderte Nukleus-Struktur ausgemacht werden. Eine vergleichbare Charakteristik ergab sich bei mit Phenobarbital inkubierten Hepatozyten, die zuvor mit der unspezifischen Kontroll-siRNA inkubiert wurden. Auch hier traten einige Zellen mit einer besonders starken Färbung hervor, während bei mit der CAR-siRNA behandelten Kulturen nur eine sehr geringe Färbung von CYP2B1 erkennbar war und sich die Intensität bei diesen kaum von jener der Lösungsmittelkontrolle unterschied. Die Behandlung mit der PXR-siRNA führte hingegen wiederum zu einer starken CYP2B1-Proteinexpression, welche etwas ausgeprägter erschien als jene in den ausschließlich mit Phenobarbital behandelten Kulturen.

Zur Untersuchung der durch die nicht-dioxinartigen PCBs vermittelten Proteinexpression von CYP2B1 wurden die Zellkulturen exemplarisch für das gesamte Wirkspektrum der NDL-PCBs ausschließlich mit den ausgewählten PCBs 52, 138 und 153 inkubiert (Abb. 30 A–C). In diesen Experimenten konnten mit der Wirkung von Phenobarbital vergleichbare Expressionsmuster von CYP2B1 beobachtet werden. Auch hier wiesen die Hepatozyten in den mit den NDL-PCBs inkubierten Kulturschalen eine deutlich erkennbare Immunfluoreszenzfärbung auf, deren Intensität sich wie bereits bei Phenobarbital zwischen den einzelnen Zellen deutlich unterschied. Die Transfektion mit der CAR-siRNA bewirkte dagegen das erwartete Ausbleiben der Induktion der CYP2B1-Proteinexpression durch die NDL-PCBs. In den mit der PXR-siRNA transfizierten Kulturen erschienen die Zellen hingegen intensiv gefärbt mit einer im Vergleich zu den jeweiligen NDL-PCBs ohne entsprechende siRNA-Transfektion durchschnittlich leicht erhöhten Intensität der Färbung in den Zellen. Allerdings ist es aufgrund methodischer Einschränkungen und der nur subjektiv erfolgten Bewertung der Fluoreszenzintensität nicht möglich, anhand der Fluoreszenzfärbungen exakte Unterschiede in der Proteinmenge zu detektieren.



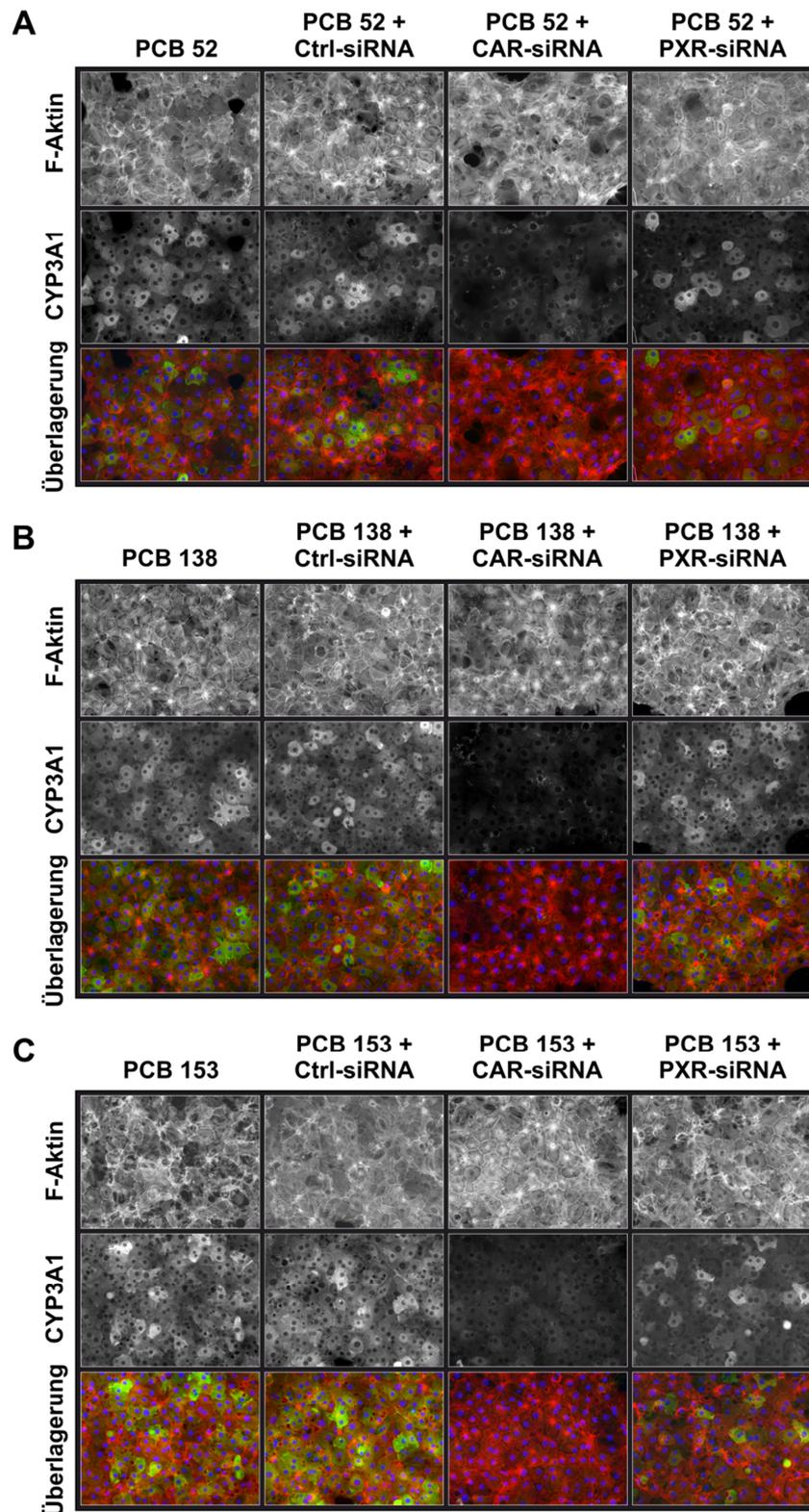
**Abbildung 30: Immunzytochemische Analyse zur Auswirkung der Hemmung von CAR und PXR auf die durch NDL-PCBs induzierte Proteinexpression von CYP2B1.** CYP2B1-Proteinexpression in primären Rattenhepatozyten nach 24-stündiger Inkubation mit den NDL-PCBs 52 (A), 138 (B) und 153 (C) mit und ohne Hemmung von CAR bzw. PXR mittels siRNA-Transfektion. Zur Visualisierung von F-Aktin wurden die Zellen mit Rhodamin-Phalloidin markiert, die Zellkerne der Hepatozyten mit Höchst 33342.

Die Inkubation mit Dexamethason führte erwartungsgemäß sowohl unter Kontrollbedingungen als auch mit der Kontroll-siRNA zu einer starken Induktion der CYP3A1-Proteinexpression, welche auch durch eine Transfektion mit der CAR-siRNA nicht beeinflusst wurde (Abb. 31). Nach einer siRNA-bedingten Inhibition des PXR vermochte der PXR-Agonist dagegen keine Induktion von CYP3A1 mehr zu bewirken.



**Abbildung 31: Immunzytochemische Analyse zur Auswirkung der Hemmung von CAR und PXR auf die Dexamethason-induzierte Proteinexpression von CYP3A1.** CYP3A1-Proteinexpression in primären Rattenhepatozyten nach Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO sowie nach 24-stündiger Inkubation mit 10  $\mu$ M Dexamethason mit und ohne Hemmung von CAR bzw. PXR mittels siRNA-Transfektion. Zur Visualisierung von F-Aktin wurden die Zellen mit Rhodamin-Phalloidin markiert, die Zellkerne der Hepatozyten mit Höchst 33342.

Auch mit den getesteten NDL-PCBs konnte eine gesteigerte Proteinexpression von CYP3A1 beobachtet werden (Abb. 32 A – C), die mit steigendem Chlorierungsgrad der jeweiligen PCBs hinsichtlich zellulärer Verteilung und Intensität zunahm. Die Behandlung der Hepatozyten mit der CAR-siRNA hatte hingegen in allen Zellen eine nur sehr geringe Intensität der Färbung zur Folge, welche ähnlich zu jener in der Lösungsmittelkontrolle ausfiel. Ebenso führte die Transfektion mit der PXR-siRNA zu einer leichten Verringerung der Immunfluoreszenzfärbung bzw. der Anzahl der gefärbten Zellen, die jedoch nicht so stark ausfiel wie die Hemmung nach Inkubation mit der CAR-siRNA. Dennoch scheint auch der PXR einen Einfluss auf die durch die nicht-dioxinartigen PCBs vermittelte Proteinexpression von CYP3A1 zu besitzen.

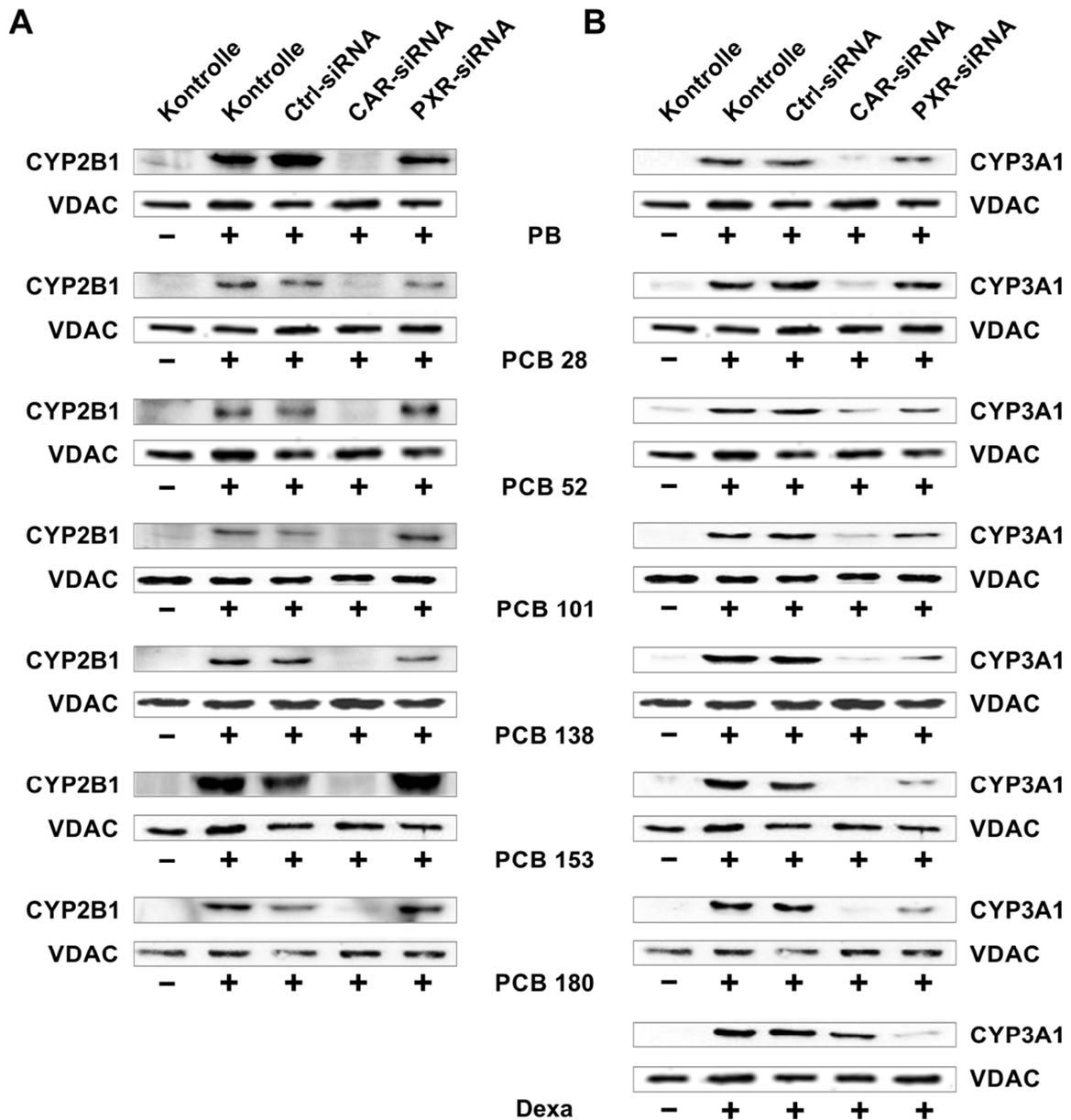


**Abbildung 32: Immunzytochemische Analyse zur Auswirkung der Hemmung von CAR und PXR auf die durch NDL-PCBs induzierte Proteinexpression von CYP3A1.** CYP3A1-Proteinexpression in primären Rattenhepatozyten nach 24-stündiger Inkubation mit den NDL-PCBs 52 (A), 138 (B) und 153 (C) mit und ohne Hemmung von CAR bzw. PXR mittels siRNA-Transfektion. Zur Visualisierung von F-Aktin wurden die Zellen mit Rhodamin-Phalloidin markiert, die Zellkerne der Hepatozyten mit Höchst 33342.

In allen Zellkulturen, in denen ein entsprechender Induktor appliziert wurde, war die stark unterschiedliche Intensität der Färbung von CYP2B1 und CYP3A1 in den einzelnen, teils unmittelbar aneinandergrenzenden Zellen auffällig. Dies deutet auf eine hohe Heterogenität der Zellen innerhalb einer Zellkultur hinsichtlich der Stärke der Reaktion auf unterschiedliche Induktoren hin. Dabei bleibt unklar, ob sich in diesen Zellen nur das Maß der Translation von CYP2B1- oder CYP3A1-Proteinen oder auch die Induktion der jeweiligen mRNA selbst unterscheidet. Zumindest aus morphologischer Sicht konnten weder in der Komposition des zellulären Aktin-Zytoskeletts noch der Beschaffenheit des Nukleus Unterschiede zwischen diesen Zellen ermittelt werden.

Um die in den immunzytochemischen Färbungen beobachtete Induktion der Proteinexpression von CYP2B1 und CYP3A1 mit einer weiteren Methode zu verifizieren, wurde die Proteinexpression in den behandelten Zellkulturen zusätzlich mittels Western-Blot-Analysen bestimmt. Dabei wurden die Zellkulturen mit den verschiedenen siRNA-Konstrukten transfiziert und anschließend mit den verschiedenen Testsubstanzen oder der Lösungsmittelkontrolle über 24 Stunden inkubiert. Zur Gelelektrophorese und Durchführung des Western Blots wurden aus den Zellkulturen Mikrosomen gewonnen und identische Proteinmengen elektrophoretisch aufgetrennt. Parallel zu den spezifischen Antikörpern gegen CYP2B1 und CYP3A1 wurde zudem ein Antikörper gegen das mitochondriale Protein VDAC (*Voltage-dependent anion channel*) als Ladungskontrolle mitgeführt.

Bezüglich der Proteinexpression von CYP2B1 konnten nach Inkubation mit den Induktoren starke Antikörpersignale für CYP2B1 und somit eine deutliche zelluläre Akkumulation festgestellt werden (Abb. 33 A). Wie bereits in den mRNA-Experimenten zu beobachten war, erzeugte die Transfektion mit der Kontroll-siRNA keine auffällige Veränderung der durch die Induktoren hervorgerufenen Proteinexpression. In den mit der spezifischen siRNA-Sequenz gegen den CAR transfizierten Proben konnten dagegen bei allen Applikationen keine oder nur schwache Antikörpersignale des CYP2B1-Antikörpers, ähnlich denen der Lösungsmittelkontrolle, detektiert werden. In den mit der PXR-siRNA transfizierten Proben induzierten die verabreichten Testsubstanzen wiederum CYP2B1-Proteinexpressionen, die mit denen der Kontrollapplikation vergleichbar waren. Die Intensität der Antikörpersignale in den PXR-siRNA-Proben waren zwar in einigen Proben gegenüber denen der Kontrollapplikationen stärker ausgeprägt, eine durchgängige Verdopplung der Proteinmengen, wie sie auf RNA-Ebene bei den qRT-PCR-Experimenten beobachtet werden konnten, war jedoch nicht festzustellen.



**Abbildung 33: Repräsentative Western-Blot-Analyse zur Rolle von CAR und PXR bei der CYP2B1- und CYP3A1-Proteinexpression durch NDL-PCBs, Phenobarbital und Dexamethason.** Repräsentative Western Blots gegen CYP2B1 und CYP3A1 sowie die Ladungskontrolle VDAC mit und ohne Hemmung von CAR bzw. PXR mittels siRNA-Transfektion. Diejenigen Proben, die mit den jeweiligen NDL-PCBs (10  $\mu$ M) sowie Phenobarbital (0,1 mM) und Dexamethason (10  $\mu$ M) inkubiert wurden, sind jeweils mit „+“ gekennzeichnet.

Das Expressionsmuster von CYP3A1 ähnelte dem von CYP2B1 hinsichtlich der Induktion unter Kontrollbedingungen bzw. nach Transfektion der CAR-siRNA stark. Während alle Testsubstanzen zu ausgeprägten Induktionen der CYP3A1-Proteinexpression führten, unterschied sich die Behandlung der Hepatozyten mit der CAR-siRNA dagegen bei den NDL-PCBs und Phenobarbital nicht wesentlich von jener der unbehandelten Kontrollen (Abb. 33 B).

Nach einer Transfektion mit der PXR-siRNA war bei den NDL-PCBs, mit Ausnahme von PCB 28, ebenfalls eine Verringerung der CYP3A1-Proteinexpression zu verzeichnen. Diese durch die Inhibition des PXR bedingte Hemmung der CYP3A1-Expression, die auch bereits bei den immunzytochemischen Färbungen zu beobachten war, spricht für eine Beteiligung des PXR an der durch die NDL-PCBs vermittelten CYP3A1-Induktion. Aufgrund der markanten Inhibition der CYP3A1-mRNA bzw. der CYP3A1-Proteinexpression durch die CAR-siRNA kann der Großteil dieser Induktion allerdings vermutlich dennoch dem konstitutiven Androstan-Rezeptor zugesprochen werden.

PCB 28 scheint dabei allerdings nicht im selben Ausmaß über den PXR reguliert zu werden wie die anderen PCBs, da für dieses PCB keine Verringerung der CYP3A1-Induktion infolge der PXR-siRNA zu verzeichnen war. Ein ähnlicher Effekt konnte auch bereits bei der durch PCB 28 induzierten CYP3A1-mRNA beobachtet werden. Möglicherweise könnte dieser Unterschied zwischen den PCBs darin begründet sein, dass PCB 28 abgesehen von seinem geringeren Chlorierungsgrad im Gegensatz zu den anderen verwendeten NDL-PCBs nur an einer *ortho*-Position chloriert ist, wodurch beispielsweise die Bindungsaffinität dieses PCBs zum Pregnan-X-Rezeptor eingeschränkt sein könnte.

#### **5.4 Einfluss von Okadainsäure und Ketoconazol auf die CAR- bzw. PXR-vermittelte Induktion von CYP2B1 und CYP3A1**

Um die mit den jeweiligen siRNAs gewonnenen Ergebnisse zu verifizieren bzw. methodische Einflüsse dieser auszuschließen, sollte zusätzlich der Einfluss von CAR und PXR auf die durch die NDL-PCBs vermittelte Expression mittels spezifischer Hemmer der CAR- bzw. PXR-regulierten Induktion analysiert werden. Dabei wurde sowohl die in der Literatur als Hemmer der nukleären Translokation von CAR dargestellte Substanz Okadainsäure (Kawamoto *et al.*, 1999; Yoshinari *et al.*, 2003) verwendet als auch mit Ketoconazol ein für den PXR beschriebener Antagonist (Banerjee *et al.*, 2014). Bei den nachfolgenden Versuchen wurden die beiden Inhibitoren hierfür jeweils für eine Stunde vorinkubiert, bevor die verschiedenen Testsubstanzen für 24 Stunden appliziert wurden.

##### **5.4.1 Überprüfung der Zytotoxizität von Okadainsäure in primären Rattenhepatozyten**

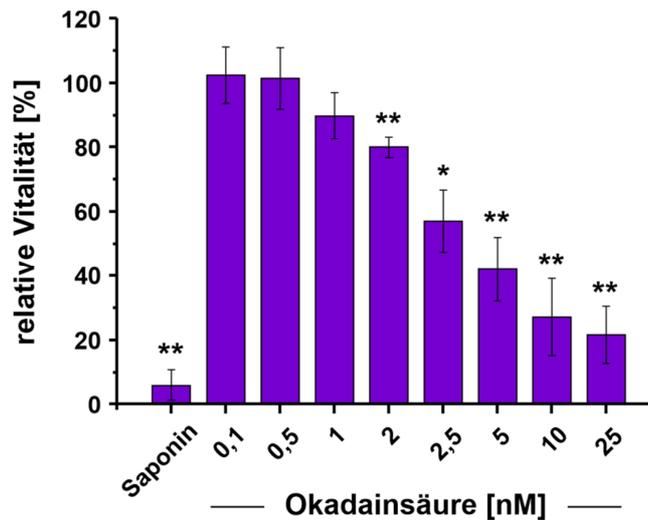
Eine in der Literatur mehrfach beschriebene Substanz zur selektiven Inhibition der Phenobarbital-vermittelten Induktion von Cytochrom-P450-Enzymen ist das vornehmlich in Meerestieren zu findende Toxin Okadainsäure (Sidhu und Omiecinski, 1997; Pustyl'nyak *et al.*, 2005), welches als Inhibitor der Protein-Phosphatasen des Typs 1 (PP1) sowie des Typs 2A (PP2A) fungiert (Valdiglesias *et al.*, 2013; Takai *et al.*, 1992). Mit Hilfe dieses Toxins konnte

letztlich auch ein essentieller Funktionsmechanismus für die Translokation von CAR in den Nukleus identifiziert werden, welcher auf die Aktivität einer Phosphorylierungs-sensitiven Signalkaskade angewiesen ist (Honkakoski und Negishi, 1998; Kawamoto *et al.*, 1999). Dabei scheint letztlich die Dephosphorylierung von CAR an Serin-202 durch die PP2A ein essentieller Schritt für die Translokation des nukleären Rezeptors in den Kern zu sein (Hosseinpour *et al.*, 2007; Timsit und Negishi, 2007). Durch die Okadainsäure-bedingte Hemmung der PP2A wird hierbei der Übergang von CAR in den Zellkern repressiert (Yoshinari *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2006), wodurch unter anderem die CAR-induzierte Genexpression von Cytochrom-P450-Enzymen blockiert wird.

Da Okadainsäure durch seine Wirkung auf den Phosphorylierungsstatus unterschiedlicher Proteine mit teils essentieller funktioneller Bedeutung in höheren Konzentrationen zytotoxisch wirkt (Joannard *et al.*, 2000), wurde zunächst der Vitalitätsstatus der primären Hepatozyten in Kultur unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen von Okadainsäure ermittelt, um die zytotoxische Wirkung von der Wirkung auf die Induktion der Cytochrom-P450-Enzyme abgrenzen zu können.

Hierzu wurden die Hepatozyten über 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,1 und 25 nM Okadainsäure inkubiert, einem Konzentrationsspektrum, welches zu jenen in früheren Arbeiten zur Wirkung von Okadainsäure vergleichbar ist (Sidhu und Omiecinski, 1997; Joannard *et al.*, 2000). Die Vitalität der Hepatozyten wurde anschließend mit Hilfe des Resazurin-Reduktionstests ermittelt, in welchem die Fähigkeit der Hepatozyten zur Reduktion des Redoxindikators Resazurin zu seinem fluoreszierenden Produkt Resorufin quantitativ bestimmt und in Relation zur unbehandelten Lösungsmittelkontrolle dargestellt wird. Dabei wurde zusätzlich 0,1 %-iges Saponin als Positivkontrolle für den Assay eingesetzt, welche im Versuch nur noch eine Restvitalität von etwa 5 % der Lösungsmittelkontrolle aufweisen konnte (Abb. 34).

Unter dem Einfluss von Okadainsäure zeigte sich zunächst bei Konzentrationen von 0,1 nM, 0,5 nM und 1 nM keine signifikante Veränderung der Vitalität der Rattenhepatozyten. Bei einer Konzentration von 2 nM Okadainsäure war die Vitalität dagegen mit einer durchschnittlichen Resazurin-Reduktion von 80 % im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle erstmals statistisch signifikant reduziert. Mit steigender Konzentration der applizierten Okadainsäure verstärkte sich dieser Effekt bis hin zu einer nur noch etwa 20 %-igen Vitalität der Hepatozyten in einer 25 nM Lösung von Okadainsäure. Der entsprechende  $IC_{50}$ -Wert bezüglich der Zytotoxizität von Okadainsäure lag bei 3,73 nM (95 %-Konfidenzintervall: 2,82 – 4,92 nM).



**Abbildung 34: Einfluss von Okadainsäure auf die Vitalität der nach Meredith isolierten Rattenhepatozyten.** Vitalität der Hepatozytenkulturen entsprechend Resazurin-Reduktionstest in Relation zur unbehandelten Lösungsmittelkontrolle nach 24-stündiger Inkubation mit Okadainsäure verschiedener Konzentrationen zwischen 0,1 und 25 nM. Behandlung mit 0,1 % Saponin als zytotoxische Positivkontrolle. MW  $\pm$  SD,  $n = 5$ , statistischer Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ .

Der Vergleich dieser Daten mit den in der Literatur beschriebenen zytotoxischen Effekten von Okadainsäure legt eine höhere Sensitivität der nach Meredith (1988) gewonnenen primären Rattenhepatozyten nahe, da in mit Kollagenase isolierten Rattenhepatozyten erst ab einer Okadainsäurekonzentration von mehr als 10 nM eine signifikante Reduktion der zellulären Vitalität beobachtet werden konnte (Joannard *et al.*, 2000). Auch Sidhu und Omiecinski (1997) berichteten bis zu einer Konzentration von 25 nM Okadainsäure nicht über eine verringerte Viabilität der mittels Kollagenase isolierten Rattenhepatozyten, während bei unseren Ergebnissen in nach Meredith gewonnenen Rattenhepatozyten bereits eine Applikation von 2 nM Okadainsäure eine statistisch signifikante Vitalitätsminderung zur Folge hatte.

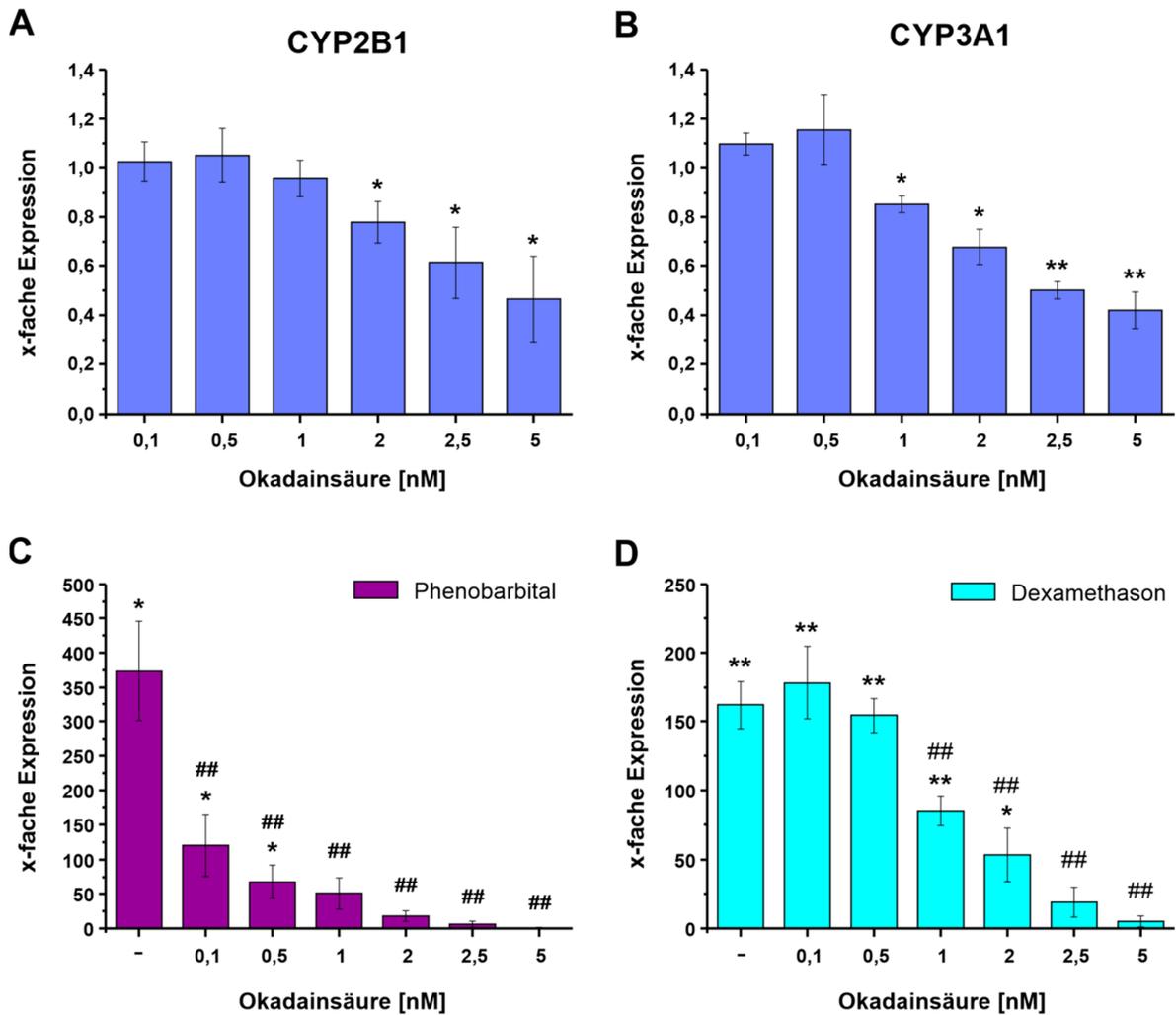
Dass die Wahl der Isolationsmethode für die Aufrechterhaltung des differenzierten Status von essentieller Bedeutung ist, äußert sich mitunter darin, dass in nach Meredith (1988) isolierten Hepatozyten im Gegensatz zu Kollagenase-haltigen Isolationen sowohl differenzierte Funktionen wie die Albumin- und Triglycerid-Synthese bzw. -Sekretion länger erhalten bleiben (Wang *et al.*, 1985) als auch Markerenzyme einer Dedifferenzierung nicht im gleichen Maße ansteigen (Bayad *et al.*, 1991). Hier scheint die Verwendung von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) die charakteristische Morphologie der Hepatozyten besser zu erhalten (Gullberg *et al.*, 1988), wohingegen die mit Kollagenase behandelten Hepatozyten durch den Einsatz von Proteasen entsprechend beeinträchtigt werden und eine dedifferenzierende, möglicherweise sogar zellschädigende Veränderung ihrer Morphologie erfahren (Bayad *et al.*, 1991). Somit führt die höhere Sensitivität in unseren nach Meredith (1988) gewonnenen

primären Rattenhepatozyten dazu, dass lediglich bis zu Okadainsäurekonzentrationen von 2 nM keine zytotoxischen Effekte zu verzeichnen sind. Um einen optimalen Vergleich unserer Experimente mit Daten aus der Literatur zu gewährleisten, wurden dennoch zumindest Konzentrationen bis 5 nM Okadainsäure für die weiteren Versuche verwendet.

#### **5.4.2 Einfluss von Okadainsäure auf die basale Induktion von CYP2B1 und CYP3A1 sowie nach Applikation von Phenobarbital und Dexamethason**

Vor dem Hintergrund dieser zytotoxischen Effekte wurde im Folgenden zunächst überprüft, welchen Einfluss die verwendeten Konzentrationen von Okadainsäure auf die basale Expression von CYP2B1, aber auch von CYP3A1 besitzen. Dazu wurden die Expressionslevel mittels qRT-PCR gemessen und in Relation zur Expression in der Lösungsmittelkontrolle dargestellt (Abb. 35 A und B). Dabei zeigten sich mit steigender Okadainsäurekonzentration geringer werdende Expressionslevel, die im Falle von CYP2B1 bei einer Konzentration von 2 nM um 20 % bis hin zu 50 % bei einer Konzentration von 5 nM statistisch signifikant reduziert waren. Die Expression von CYP3A1 war in vergleichbarem Maße reduziert, wobei eine statistisch signifikante Reduktion der Expression bereits bei einer Konzentration von 1 nM Okadainsäure gemessen werden konnte. Nach Vergleich des Grades der Reduktion der CYP2B1- und CYP3A1-Expression durch Okadainsäure mit der im Resazurin-Reduktionstest bestimmten Vitalität der Hepatozyten (vgl. Abb. 34) kann aufgrund der sehr ähnlichen Reduktionswerte angenommen werden, dass die Veränderungen in der Expression der Cytochrom-P450-Enzyme weitgehend auf die verringerte Vitalität der Hepatozyten zurückzuführen sind.

In der Literatur finden sich zu einem Einfluss von Okadainsäure auf die basale CYP2B-Induktion widersprüchliche Ergebnisse. Während Okadainsäure bei Untersuchungen von Pustylnyak *et al.* (2005) in Wistar-Ratten zu einer Reduktion der basalen CYP2B1/2-Level führte, konnten Honkakoski und Negishi (1998) in Maushepatozyten dagegen keine signifikante Beeinträchtigung der basalen Cyp2b10-Expression detektieren.



**Abbildung 35: Auswirkungen von Okadainsäure auf die basale sowie durch Phenobarbital und Dexamethason induzierte Expression von CYP2B1 bzw. CYP3A1.** mRNA-Expression von CYP2B1 (A) und CYP3A1 (B) in Relation zur Expression in der Okadainsäure-freien Lösungsmittelkontrolle nach 24-stündiger Inkubation mit Okadainsäure verschiedener Konzentrationen zwischen 0,1 und 5 nM sowie nach zusätzlicher Inkubation mit 0,1 mM Phenobarbital (C) bzw. 10  $\mu$ M Dexamethason (D). MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ , statistischer Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle: \* :  $p < 0,05$  und \*\* :  $p < 0,01$ ; Vergleich zur Induktion ohne Okadainsäure: # :  $p < 0,05$  und ## :  $p < 0,01$ .

Nach Applikation der CYP2B1- bzw. CYP3A1-Induktoren Phenobarbital und Dexamethason ergab sich dagegen ein anderes Bild als bei der basalen Expression (Abb. 35 C und D).

Bei der durch Phenobarbital bedingten CYP2B1-Expression zeigte sich bereits bei einer Konzentration von 0,1 nM Okadainsäure, bei welcher noch keine zytotoxischen Einflüsse zu verzeichnen waren, eine statistisch hochsignifikante Reduktion der CYP2B1-Expression um nahezu 60 %. Mit weiter steigenden Okadainsäurekonzentrationen wurde die Phenobarbital-bedingte CYP2B1-Expression zunehmend verringert und ab einer Inkubation mit 2,5 nM Okadainsäure bis auf das basale Level zurückgedrängt (Abb. 35 C). Bereits ab einer

Behandlung mit 1 nM Okadainsäure konnte keine signifikante Erhöhung der CYP2B1-Expression gegenüber der Lösungsmittelkontrolle mehr verzeichnet werden.

Eine dementsprechende Repression der nukleären Translokation von CAR (Yoshinari *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 2006; Pustylnyak *et al.*, 2009) sowie die damit verbundene Inhibition der Phenobarbital-vermittelten Induktion von CYP2B1 konnte ebenfalls bereits von Sidhu und Omiecinski (1997) bzw. Joannard *et al.* (2000) in primären Rattenhepatozyten detektiert werden. Auch Honkakoski und Negishi (1998) sowie Kawamoto *et al.* (1999) konnten eine solche Inhibition der Phenobarbital-vermittelten Cyp2b10-Expression beobachten, womit deutlich wird, dass Okadainsäure die CAR-vermittelte Induktion von CYP2B-Isoenzymen effektiv hemmt.

Auch bezüglich der CYP3A1-Expression durch Dexamethason konnte bereits bei 1 nM Okadainsäure eine statistisch signifikant verringerte Induktion um nahezu 50 % festgestellt werden (Abb. 35 D). Allerdings konnte bei einer Applikation von 0,1 bzw. 0,5 nM Okadainsäure im Gegensatz zur CYP2B1-Expression noch keine Verringerung der CYP3A1-Expression verzeichnet werden. Mit steigenden Okadainsäurekonzentrationen zeigten sich jedoch zunehmend geringer werdende Dexamethason-bedingte Expressionslevel, welche ab Konzentrationen von 2 nM um 67 % bis hin zu 97 % statistisch signifikant reduziert waren.

Da Dexamethason über den Pregnan-X-Rezeptor reguliert wird und bei einer Konzentration von 1 nM Okadainsäure noch keine Zytotoxizität, dafür aber eine deutliche Reduktion der CYP3A1-Expression vorliegt, legt dies den Schluss nahe, dass Okadainsäure ab einer Konzentration von 1 nM auch die PXR-vermittelte Expression beeinflusst. Beim Vergleich mit der CYP2B1-Induktion durch Phenobarbital wird allerdings auffällig, dass die Reduktion der CYP3A1-Expression deutlich geringer ausfällt als jene von CYP2B1 und die Okadainsäure-bedingte Inhibition von CYP3A1 abgesehen davon auch erst bei höher konzentrierten Okadainsäure-Applikationen einsetzt. So wurde beispielsweise die CAR-vermittelte CYP2B1-Expression nach Behandlung mit 0,5 nM Okadainsäure bereits deutlich gehemmt, wohingegen diese Applikation noch keinen Einfluss auf die CYP3A1-Expression durch den PXR-Agonisten Dexamethason zur Folge hatte. Somit besitzt Okadainsäure zwar ebenfalls einen Einfluss auf die durch den PXR vermittelte Induktion von Cytochrom-P450-Enzymen, jedoch wird die Translokation von CAR und die damit verbundene Induktion der CAR-regulierten Zielgene wesentlich stärker beeinträchtigt als jene des PXR.

Dies spiegelt sich auch im Vergleich der jeweiligen  $IC_{50}$ -Werte wider, welche für die durch Okadainsäure inhibierte Phenobarbital-bedingte CYP2B1-Expression bei 0,035 nM (95 %-Konfidenzintervall: 0,012–0,102 nM) lagen sowie für die Dexamethason-bedingte CYP3A1-Expression bei 1,116 nM (95 %-Konfidenzintervall: 0,913–1,364 nM). Auch Sidhu und Omiecinski (1997) konnten eine konzentrationsabhängige Hemmung der Phenobarbital-induzierten CYP2B1-Expression durch Okadainsäure feststellen ( $IC_{50}$ : 1,5–2 nM). Aufgrund dieses vergleichsweise wesentlich größeren  $IC_{50}$ -Wertes ist anzunehmen, dass die hier

verwendeten primären Hepatozyten eine höhere Suszeptibilität gegenüber Okadainsäure aufweisen als mit Kollagenase isolierte Hepatozyten, welche mit einer verminderten CYP2B1-Expression einhergeht.

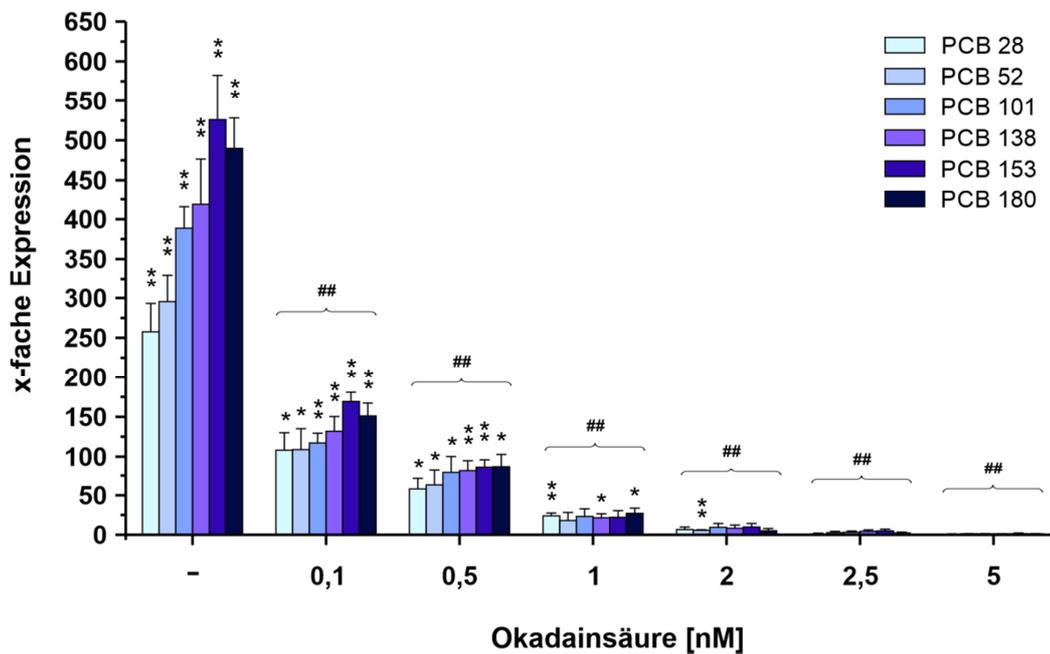
In der Literatur war Okadainsäure bisher nicht explizit als Inhibitor der PXR-vermittelten Translokation bekannt, sondern vornehmlich als Hemmer der nukleären Translokation von CAR beschrieben (Yoshinari *et al.*, 2003; Pustyl'nyak *et al.*, 2009). Eine derartige Repression der PXR-Aktivität bzw. der PXR-regulierten Induktion von Cyp3a11 wurde jedoch bereits von Ding und Staudinger (2005) in einem Reporter-gen-Assay bzw. in primären Maushepatozyten detektiert. Allerdings wurde bei nahezu allen Experimenten eine Konzentration von 100 nM verwendet, wohingegen in unseren Experimenten bereits eine 2 nM Okadainsäurekonzentration zu zytotoxischen Effekten führte. Auch in mit Kollagenase isolierten Rattenhepatozyten konnte zumeist bereits ab einer Konzentration von 10 nM Okadainsäure eine Verringerung der Vitalität beobachtet werden (Joannard *et al.*, 2000). Bei den Untersuchungen von Ding und Staudinger (2005) war jedoch eine Überprüfung, ob die verwendete Konzentration von 100 nM Okadainsäure bereits an sich zelluläre Funktionen beeinflussen kann, nicht erkennbar. Daher kann bei diesen Experimenten nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Verminderung der PXR-Aktivität nicht auf einer gezielten Inhibition der PXR-Translokation erfolgt, sondern auf einer geringen Viabilität der Hepatozyten beruhen könnte.

#### **5.4.3 Einfluss von Okadainsäure auf die ND-L-PCB-vermittelte Induktion von CYP2B1 und CYP3A1**

Im Folgenden sollte überprüft werden, welchen Einfluss die verwendeten Konzentrationen von Okadainsäure auf die ND-L-PCB-vermittelte Expression der jeweiligen durch CAR bzw. PXR regulierten Enzyme CYP2B1 und CYP3A1 besitzen.

Hierbei ergab sich für die durch die nicht-dioxinartigen PCBs induzierte CYP2B1-Expression ein vergleichbares Bild zu jenem von Phenobarbital (Abb. 36). So hatte auch hier die Behandlung der Hepatozyten mit Okadainsäure bereits bei einer Konzentration von 0,1 nM eine signifikante Verringerung der ND-L-PCB-induzierten CYP2B1-Expression zur Folge, die nur noch das 108-Fache bis 169-Fache der basalen Expression betrug. Weiter ansteigende Konzentrationen von Okadainsäure bewirkten dabei bei allen getesteten PCBs eine zunehmende Abnahme der CYP2B1-Expression bis auf das basale Level, wie sie bereits für den prototypischen CYP2B1-Induktor Phenobarbital gezeigt werden konnte. Die verbleibenden Expressionslevel unterschieden sich dabei bei einigen der untersuchten ND-L-PCBs bereits ab 1 nM Okadainsäure, sowie bei allen ND-L-PCBs ab 2,5 nM Okadainsäure nicht mehr signifikant von der basalen CYP2B1-Expression in der DMSO-Lösungsmittelkontrolle. Somit wird die ND-L-PCB-vermittelte CYP2B1-Induktion in primären Ratten-

hepatozyten anhand der Repression der nukleären Translokation von CAR mittels Okadainsäure vollständig unterdrückt.



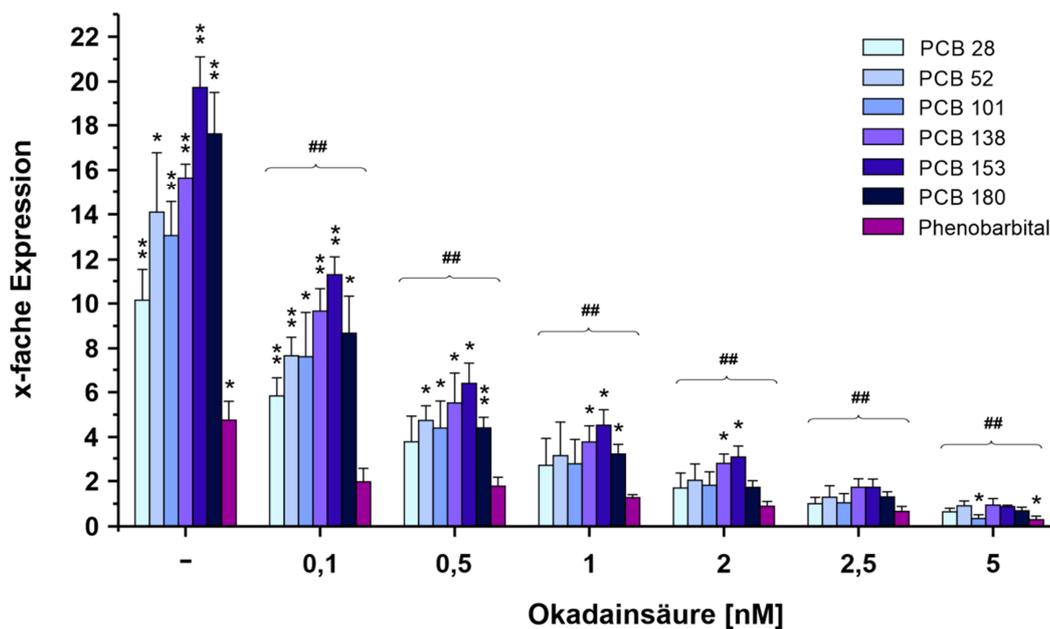
**Abbildung 36: Auswirkungen von Okadainsäure auf die durch NDL-PCBs induzierte Expression von CYP2B1.** mRNA-Expression von CYP2B1 in Relation zur Expression in der Okadainsäure-freien Lösungsmittelkontrolle nach 24-stündiger Inkubation mit 10  $\mu$ M der jeweiligen NDL-PCBs ohne (-) sowie mit zusätzlicher Inkubation von Okadainsäure verschiedener Konzentrationen zwischen 0,1 und 5 nM. MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ , statistischer Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle: \* :  $p < 0,05$  und \*\* :  $p < 0,01$ ; Vergleich zur Induktion ohne Okadainsäure: # :  $p < 0,05$  und ## :  $p < 0,01$ .

Auch bei der CYP3A1-Expression durch die NDL-PCBs zeigte sich nach Applikation von Okadainsäure bereits ab einer Konzentration von 0,1 nM eine statistisch signifikante Reduktion (Abb. 37). Bei dieser Konzentration sowie der nächsthöheren getesteten Okadainsäurekonzentration von 0,5 nM spielen jedoch weder zytotoxische Effekte durch diese Behandlung noch eine Inhibition der PXR-vermittelten CYP3A1-Induktion eine Rolle, was dafür spricht, dass die Regulation von CYP3A1 durch die nicht-dioxinartigen PCBs vornehmlich dem CAR zugesprochen werden kann.

Die jeweilige CYP3A1-Hemmung bei diesen beiden Applikationen von Okadainsäure fiel allerdings im Vergleich zu jener zur CAR-vermittelten CYP2B1-Induktion mit 38 bis 75 % nicht so stark aus wie diese, so dass generell ein Einfluss des PXR, dessen Aktivität bis 1 nM Okadainsäure noch nicht gehemmt wird und welcher somit bei diesen beiden Okadainsäurekonzentrationen noch zur CYP3A1-Expression beitragen konnte, als wahrscheinlich gilt. Hierfür spricht ebenfalls, dass der CAR-Agonist Phenobarbital im

Gegensatz zu den NDL-PCBs bereits bei einer 0,1 nM Konzentration von Okadainsäure keine statistisch signifikante CYP3A1-Expression mehr hervorrief sowie außerdem die durch Phenobarbital vermittelte CYP3A1-Induktion eine deutlich stärkere Repression erfuhr als jene der NDL-PCBs. Bei den NDL-PCBs fiel bezüglich der Inhibition von CYP3A1 weiterhin auf, dass diese ab einer 1 nM Okadainsäurekonzentration mit einer mutmaßlich zusätzlichen Hemmung der PXR-regulierten Induktion höher ausfiel als bei den vorherigen Konzentrationen, was sich auch darin widerspiegelt, dass bei 1 nM Okadainsäure lediglich noch drei der getesteten NDL-PCBs eine statistisch signifikante CYP3A1-Expression gegenüber der Lösungsmittelkontrolle aufweisen konnten.

Dass die NDL-PCB-vermittelte CYP2B1-Expression durch Okadainsäure stärker gehemmt wird als jene von CYP3A1 lässt sich ebenfalls an den  $IC_{50}$ -Werten erkennen. Für alle getesteten NDL-PCBs zeigte sich Okadainsäure mit  $IC_{50}$ -Werten zwischen 0,035 und 0,074 nM als starker Inhibitor der CAR-vermittelten CYP2B1-Expression, wohingegen die Hemmung der CYP3A1-Expression mit  $IC_{50}$ -Werten zwischen 0,090 und 0,193 nM wesentlich schwächer ausfiel.



**Abbildung 37: Auswirkungen von Okadainsäure auf die durch NDL-PCBs induzierte Expression von CYP3A1.** mRNA-Expression von CYP3A1 in Relation zur Expression in der Okadainsäure-freien Lösungsmittelkontrolle nach 24-stündiger Inkubation mit 10 µM der jeweiligen NDL-PCBs ohne (-) sowie mit zusätzlicher Inkubation von Okadainsäure verschiedener Konzentrationen zwischen 0,1 und 5 nM. MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ , statistischer Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ ; Vergleich zur Induktion ohne Okadainsäure: #:  $p < 0,05$  und ##:  $p < 0,01$ .

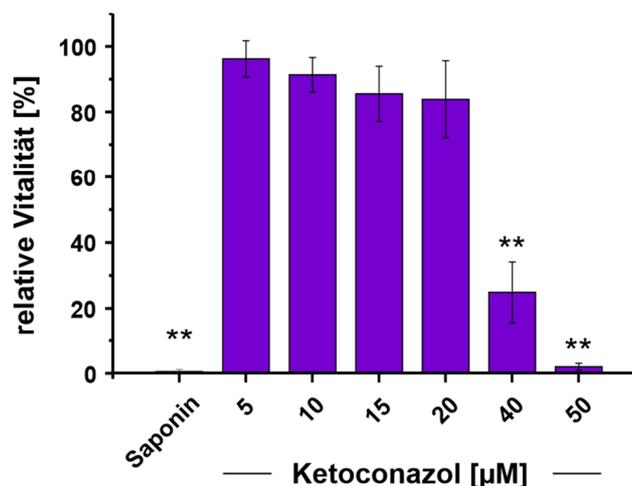
Da bei einer Okadainsäurekonzentration von 0,5 nM bereits eine hochsignifikante Hemmung der Aktivität von CAR zu verzeichnen ist, diese Konzentration jedoch noch keinen Einfluss auf die PXR-regulierte Expression zu besitzen scheint, wurde Okadainsäure in einer Konzentration von 0,5 nM für alle weiteren Analysen zur Proteinexpression bzw. zur Apoptosehemmung eingesetzt. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, eine für den CAR spezifische Inhibition untersuchen zu können sowie diese von einer Beeinträchtigung durch den PXR abgrenzen zu können. Des Weiteren hat eine Konzentration von 0,5 nM Okadainsäure den Vorteil, dass auch in nach Meredith (1988) isolierten Hepatozyten noch keine verringerte Viabilität der primären Hepatozyten detektiert werden konnte.

#### **5.4.4 Überprüfung der Zytotoxizität von Ketoconazol in primären Rattenhepatozyten**

In Bezug auf eine Beeinträchtigung der CYP2B1- bzw. CYP3A1-Expression sollte zusätzlich zu Okadainsäure, welche vornehmlich als Inhibitor der Translokation von CAR gilt, mit Ketoconazol weiterhin ein für den PXR beschriebener Antagonist untersucht werden (Takeshita *et al.*, 2002; Mani *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). Hierbei setzt Ketoconazol die jeweilige Interaktion von SMRT (*Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor*) oder SRC-1 (Steroidrezeptor Coaktivator-1) mit dem Pregnan-X-Rezeptor nach einer Aktivierung von diesem bis nahezu auf das basale Level wieder herab (Takeshita *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2007). Eine Analyse von Huang *et al.* (2007) zu den molekularen Mechanismen dieser Inhibition ergab, dass Ketoconazol spezifisch die Interaktion des nukleären Rezeptors mit Coregulatoren stört, die Bindung der jeweiligen Liganden bzw. die Rezeptor-Dimerisierung oder DNA-Bindung dagegen allerdings nicht beeinträchtigt. Während Liganden des PXR wie Rifampicin zu einer verstärkten Interaktion zwischen SMRT oder dem Coaktivator SRC-1 und dem PXR führen (Takeshita *et al.*, 2002), hat die zusätzliche Applikation von Ketoconazol eine darauffolgende stark verminderte Interaktion des PXR mit diesen beiden Coregulatoren zur Folge, welche so letztlich zu einer Inhibition der PXR-vermittelten Zielgene führt (Wang *et al.*, 2007; Ekins *et al.*, 2007).

Zunächst sollte wie bereits bei Okadainsäure der Vitalitätsstatus der primären Hepatozyten unter dem Einfluss von Ketoconazol ermittelt werden. Dazu wurden die Hepatozytenkulturen für 24 h mit einem Spektrum unterschiedlicher Konzentrationen von Ketoconazol inkubiert, welche in der Literatur üblicherweise Anwendung finden (Wang *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2007). Ketoconazol zeigte sich dabei in den Konzentrationen 5 µM, 10 µM, 15 µM und 20 µM als nicht zytotoxisch, führte jedoch bei einer Konzentration von 40 µM erstmals zu einer signifikanten Reduktion der zellulären Vitalität auf etwa 25 % der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 38). Bei einer Inkubation mit 50 µM Ketoconazol wiesen die getesteten Zellkulturen lediglich noch eine durchschnittliche Vitalität von unter 2 % auf. Somit weist Ketoconazol in einem

Konzentrationspektrum von 5  $\mu\text{M}$  bis 20  $\mu\text{M}$  lediglich eine geringe Zytotoxizität auf, während Konzentrationen ab 40  $\mu\text{M}$  stark zellschädigend wirken. Der daraus ermittelte  $\text{IC}_{50}$ -Wert lag in nach Meredith (1988) isolierten Hepatozyten bei 31,96  $\mu\text{M}$  (95 %-Konfidenzintervall: 27,69 – 36,90  $\mu\text{M}$ ). Dagegen wurde in früheren Studien von Wang *et al.* (2007) bzw. Huang *et al.* (2007) für die verwendeten Konzentrationen von Ketoconazol bisher kein Einfluss dieser auf die Viabilität der jeweiligen Zellen berichtet. Dies legt den Schluss nahe, dass nach Meredith (1988) isolierte Rattenhepatozyten eine höhere Sensitivität gegenüber Ketoconazol aufweisen als beispielsweise Zelllinien oder humane Hepatozyten.



**Abbildung 38: Einfluss von Ketoconazol auf die Vitalität der nach Meredith isolierten Rattenhepatozyten.** Vitalität der Hepatozytenkulturen entsprechend Resazurin-Reduktionstest in Relation zur unbehandelten Lösungsmittelkontrolle nach 24-stündiger Inkubation mit Ketoconazol verschiedener Konzentrationen zwischen 5 und 50  $\mu\text{M}$ . Behandlung mit 0,1 % Saponin als zytotoxische Positivkontrolle.  $\text{MW} \pm \text{SD}$ ,  $n = 3$ , statistischer Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ .

#### 5.4.5 Einfluss von Ketoconazol auf die basale Induktion von CYP2B1 und CYP3A1 sowie nach Applikation von Phenobarbital und Dexamethason

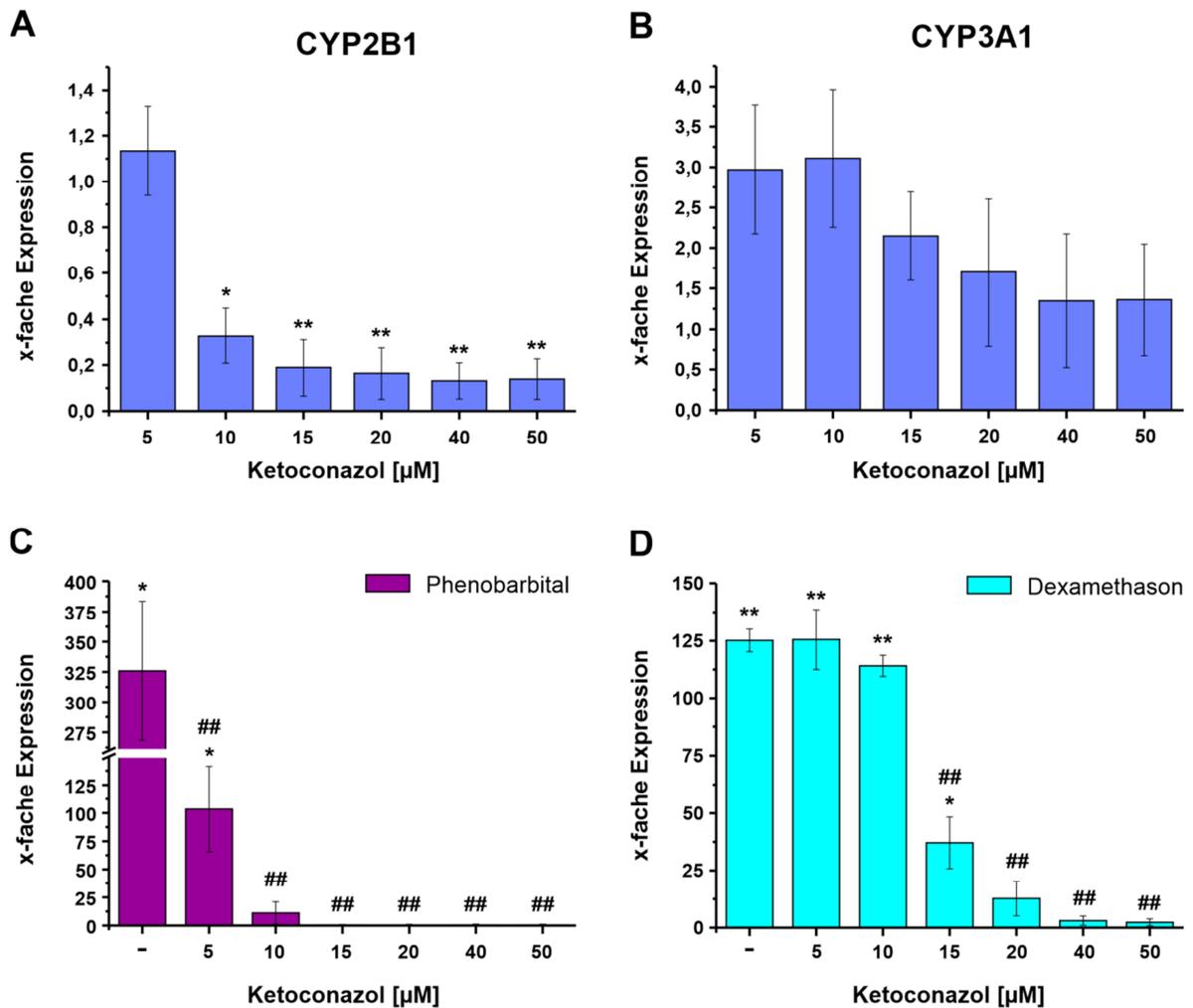
Zunächst sollte im Folgenden überprüft werden, welchen Einfluss die verwendeten Konzentrationen von Ketoconazol auf die basale Expression von CYP2B1 und CYP3A1 besitzen. Dazu wurden die Expressionslevel nach 24-stündiger Inkubation der jeweiligen Substanzen mittels qRT-PCR gemessen und in Relation zur Expression in der Lösungsmittelkontrolle dargestellt (Abb. 39 A und B).

Während Ketoconazol in der geringsten getesteten Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  keinen Effekt auf die basale Expression von CYP2B1 hatte, führten alle höheren Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  bis 50  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten Verringerung der basalen CYP2B1-Level um etwa 67 % bis

86 %. Dabei erfuhren die verringerten Expressionslevel auch durch die hohe Toxizität von Ketoconazol bei 40  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  keine weitere Verringerung (Abb. 39 A).

Entgegen der starken Reduktion der Expression von CYP2B1 bewirkten geringe Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  Ketoconazol zunächst eine ca. 3-fache Steigerung der basalen CYP3A1-Expression (Abb. 39 B). Auch mit steigender Ketoconazolkonzentration blieben die Expressionswerte im Mittel, wenn auch nicht statistisch signifikant, gegenüber der Lösungsmittelkontrolle erhöht, bemerkenswerterweise sogar bei Applikation von Ketoconazolkonzentrationen mit ausgeprägter zytotoxischer Wirkung.

Dies legt den Schluss nahe, dass die basale CYP3A1-Expression durch Ketoconazol nicht beeinträchtigt wird, sondern Ketoconazol stattdessen an sich zu einer leichten Erhöhung der CYP3A1-Expression führt. Dies deckt sich mit bisherigen Studien von Wang *et al.* (2007) bzw. Huang *et al.* (2007), ebenso konnten auch Takeshita *et al.* (2002) eine etwa 8-fache Induktion nach Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Ketoconazol in HepG2-Zellen detektieren. Entgegen dieser Ketoconazol-bedingten gesteigerten Expression von CYP3A1 wurde die CYP2B1-Expression bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Ketoconazol signifikant inhibiert, woraus sich ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 8,9  $\mu\text{M}$  (95 %-Konfidenzintervall: 7,12 – 11,13  $\mu\text{M}$ ) ergibt. Huang *et al.* (2007) konnten diesbezüglich zeigen, dass Ketoconazol in Mäusen die basale Aktivierung von CAR hemmt, woraus die verminderte basale Expression von CYP2B1 resultieren könnte.



**Abbildung 39: Auswirkungen von Ketoconazol auf die basale sowie durch Phenobarbital und Dexamethason induzierte Expression von CYP2B1 bzw. CYP3A1.** mRNA-Expression von CYP2B1 (A) und CYP3A1 (B) in Relation zur Expression in der Ketoconazol-freien Lösungsmittelkontrolle nach 24-stündiger Inkubation mit Ketoconazol verschiedener Konzentrationen zwischen 5 und 50 µM sowie nach zusätzlicher Inkubation mit 0,1 mM Phenobarbital (C) bzw. 10 µM Dexamethason (D). MW ± SD,  $n = 3$ , statistischer Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ ; Vergleich zur Induktion ohne Ketoconazol (-): #:  $p < 0,05$  und ##:  $p < 0,01$ .

Die durch Phenobarbital induzierte CYP2B1-Expression, welche unter Kontrollbedingungen um etwa das 325-Fache gegenüber der Lösungsmittelkontrolle erhöht war, erfuhr durch Ketoconazol in allen Konzentrationen eine signifikante Reduktion (Abb. 39 C). Beginnend bei einer nur noch 103-fachen Expression unter 5 µM Ketoconazol war bei 10 µM bereits nur noch eine im Mittel 11-fach erhöhte Expression zu verzeichnen, die nicht mehr statistisch signifikant gegenüber der basalen Expression erhöht war. Weiter ansteigende Konzentrationen von Ketoconazol reduzierten die Phenobarbital-bedingte CYP2B1-Expression bis auf das basale Level.

CYP3A1, dessen Expression durch Dexamethason unter Kontrollbedingungen eine etwa 125-fache Induktion erfuhr, wurde in seiner Expression durch 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Ketoconazol nicht signifikant beeinflusst (Abb. 39 D). Die Tatsache, dass die Inkubation mit Ketoconazol bei diesen Konzentrationen nach 24 Stunden zu einer Verdreifachung der basalen CYP3A1-Expression führte, ist bei der Bewertung der CYP3A1-Expressionswerte nach Zugabe von Dexamethason jedoch zu berücksichtigen. Auch wenn Ketoconazol bei dieser Versuchsreihe vor der Zugabe von Dexamethason nur für eine Stunde vorinkubiert wurde, so könnte dies dennoch zu einer leichten Erhöhung der basalen CYP3A1-Expression zum Zeitpunkt der Zugabe von Dexamethason geführt haben. Unter dieser Annahme würden die basalen Bezugspunkte für die CYP3A1-Expression nach Vorinkubation mit 5  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  Ketoconazol über denen der Lösungsmittelkontrolle liegen, weshalb die nach der Dexamethason-Applikation gemessenen mRNA-Level entsprechend nach unten korrigiert werden müssten. Somit könnte die durch Dexamethason induzierte Expression auch bereits bei 5  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  Ketoconazol gegenüber der Dexamethason-Kontrolle ohne Ketoconazol reduziert sein. Allerdings darf hierbei auch nicht vernachlässigt werden, dass keine Daten darüber vorliegen, ob sich Ketoconazol zusammen mit einem Agonisten des PXR noch gleichermaßen oder ähnlich induzierend auf die CYP3A1-Induktion auswirkt wie bei alleiniger Applikation.

Nach Behandlung mit einer 15  $\mu\text{M}$  Lösung war die CYP3A1-Expression auf etwa ein Drittel der Expression unter Kontrollbedingungen abgesunken, mit höheren Konzentrationen nahm die nachweisbare CYP3A1-mRNA auf nur noch etwa das 3-Fache der basalen Expression in der Lösungsmittelkontrolle ab. Da die basale CYP3A1-Expression ab einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  Ketoconazol nicht mehr in hohem Maße erhöht war, bedürfen die Dexamethason-bedingten Expressionswerte von CYP3A1 bei diesen Ketoconazolkonzentrationen mit hoher Wahrscheinlichkeit keiner Korrektur.

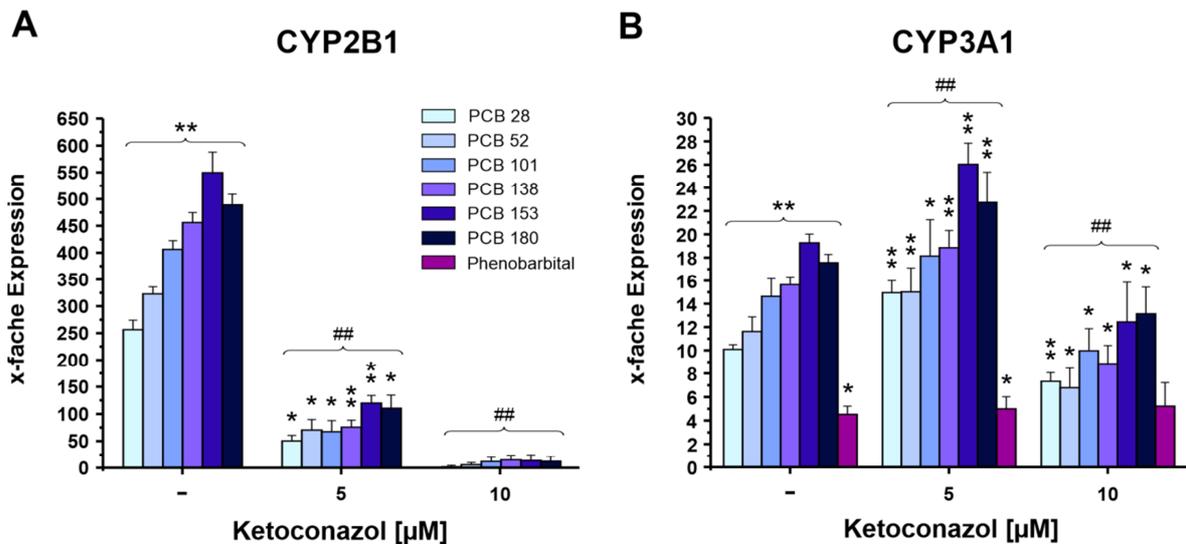
Ähnlich wie bei unseren Ergebnissen mit Dexamethason konnten Huang *et al.* (2007) in HepG2-Zellen bzw. humanen Hepatozyten beobachten, dass eine zeitgleiche Ketoconazol-Inkubation die vorherige CYP3A4-Induktion sowohl durch Rifampicin als auch durch Paclitaxel signifikant inhibiert. Zusätzlich konnte mittels eines Luciferase-Assays auch eine Ketoconazol-bedingte Hemmung der Corticosteron-induzierten Aktivierung des humanen PXR detektiert werden (Takeshita *et al.*, 2002). Bei diesen bisherigen Arbeiten wurde jedoch die leicht erhöhte basale CYP3A4-Induktion durch Ketoconazol nicht mit einbezogen, um die jeweilige Ketoconazol-bedingte Hemmung der CYP3A4-Induktion in Verbindung mit einem PXR-Agonisten zu ermitteln. Daher kann auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass die Normierung auf die Lösungsmittelkontrolle bei beispielsweise mittels qRT-PCR gewonnenen Daten zu einer Unterschätzung der Ketoconazol-bedingten Inhibition der CYP3A4-Expression geführt haben könnte.

Weiterhin ist bemerkenswert, dass eine Applikation von Ketoconazol allein zu einer leicht erhöhten CYP3A1-Induktion führt (Abb. 39 B), Ketoconazol in Kombination mit einem PXR-Agonisten allerdings die durch diesen bedingte Induktion von CYP3A1 nahezu bis auf das basale Level antagonisiert (Abb. 39 D). Aus diesem Grund wird Ketoconazol in der Literatur häufig auch als „activating antagonist“ bezeichnet (Wang *et al.*, 2007). Dabei konnte von Takeshita *et al.* (2002) nachgewiesen werden, dass die Ketoconazol-bedingte Hemmung des PXR auf einer Störung der Interaktion von diesem mit dem Cofaktor SRC-1 beruht. Da für eine Aktivierung von CAR derselbe Cofaktor benötigt wird, legt dies die Vermutung nahe, dass Ketoconazol auch die CAR-vermittelte Regulation von Zielgenen beeinflussen könnte. Neben unseren Ergebnissen, die sowohl eine basale als auch eine Hemmung der CYP2B1-Expression nach Phenobarbital-Applikation durch Ketoconazol belegen (Abb. 39 A und C), konnte zudem von Huang *et al.* (2007) eine Ketoconazol-bedingte Inhibition des humanen CAR nach Applikation von Phenobarbital beobachtet werden. Weiterhin konnten die Autoren zeigen, dass Ketoconazol in Mäusen sowohl die basale als auch die durch TCPOBOP (1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen) induzierte Aktivierung von CAR hemmt.

Die Beeinträchtigung der CAR-vermittelten Regulation scheint hierbei stärker betroffen zu sein als die des PXR, was sich auch darin widerspiegelt, dass die CYP2B1-Expression früher durch Ketoconazol inhibiert wird als jene von CYP3A1. Der  $IC_{50}$ -Wert für die Ketoconazol-bedingte Hemmung der Phenobarbital-induzierten CYP2B1-Induktion lag bei  $4,09 \mu\text{M}$  (95 %-Konfidenzintervall:  $3,21 - 5,20 \mu\text{M}$ ), während dieser für die Dexamethason-induzierte CYP3A1-Induktion  $13,41 \mu\text{M}$  (95 %-Konfidenzintervall:  $12,75 - 14,11 \mu\text{M}$ ) betrug. Ähnliche Ergebnisse erzielten Wang *et al.* (2007) in humanen Hepatozyten bezüglich ihrer  $IC_{50}$ -Werte für die Ketoconazol-bedingte Inhibition nach einer Induktion der jeweiligen Cytochrom-P450-Enzyme durch Rifampicin. Während der  $IC_{50}$ -Wert für die Ketoconazol-bedingte Inhibition der Rifampicin-induzierten CYP3A4-Expression mit  $13,4 \pm 1,12 \mu\text{M}$  nahezu identisch zu unserem ist, war der  $IC_{50}$ -Wert für die CYP2B6-Expression mit  $9,7 \pm 4,18 \mu\text{M}$  mehr als doppelt so hoch. Aufgrund dieser Diskrepanz kann angenommen werden, dass unsere nach Meredith (1988) isolierten Rattenhepatozyten eine höhere Sensitivität gegenüber einem Einfluss von Ketoconazol in Bezug auf die CAR-vermittelte Regulation aufweisen als humane Hepatozyten.

#### **5.4.6 Einfluss von Ketoconazol auf die NDL-PCB-vermittelte Induktion von CYP2B1 und CYP3A1**

Im Folgenden sollten die Auswirkungen einer  $5 \mu\text{M}$  bzw.  $10 \mu\text{M}$  Konzentration von Ketoconazol auf die Expression von CYP2B1 und CYP3A1 bei zeitgleicher Applikation der nicht-dioxinartigen PCBs ermittelt werden (Abb. 40).



**Abbildung 40: Auswirkungen von Ketoconazol auf die durch NDL-PCBs induzierte Expression von CYP2B1 und CYP3A1.** mRNA-Expression von CYP2B1 und CYP3A1 in Relation zur Expression in der Ketoconazol-freien Lösungsmittelkontrolle nach 24-stündiger Inkubation mit 10 µM der jeweiligen NDL-PCBs sowie zusätzlicher Inkubation mit Ketoconazol verschiedener Konzentrationen (5 und 10 µM). MW ± SD,  $n = 3$ , statistischer Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ ; Vergleich zur Induktion ohne Ketoconazol (-): #:  $p < 0,05$  und ##:  $p < 0,01$ .

Wie bei der Induktion von CYP2B1 durch Phenobarbital, die durch bereits geringe Konzentrationen von Ketoconazol stark gehemmt wurde, erfuhr auch die Induktion von CYP2B1 durch die NDL-PCBs bei Zugabe kleinster Konzentrationen eine starke Hemmung (Abb. 40 A). So reduzierte sich die CYP2B1-Expression durch die NDL-PCBs unter dem Einfluss von 5 µM Ketoconazol im Schnitt um etwa 80 %, sowie nach Zugabe von 10 µM Ketoconazol um mehr als 95 %.

Demgegenüber erfuhr die durch die nicht-dioxinartigen PCBs induzierte Expression von CYP3A1 durch die Zugabe von 5 µM Ketoconazol bei allen PCBs eine mittlere Steigerung um etwa 25 %, die bei allen PCBs statistisch signifikant ausfiel (Abb. 40 B). Eine Verdopplung der Ketoconazolkonzentration bewirkte wiederum bei allen NDL-PCBs eine signifikante Abnahme der CYP3A1-Expression im Vergleich zur Ketoconazol-freien Messung. Bezüglich der verbliebenen CYP3A1-Expression ist zudem die Diskrepanz der NDL-PCBs zum CAR-Agonisten Phenobarbital auffällig, bei welchem die Werte sowohl bei der basalen Induktion als auch nach Applikation von 5 µM bzw. 10 µM Ketoconazol mit einer etwa 5-fachen CYP3A1-Expression jeweils nahezu identisch bleiben. Dies ist bei der 5 µM bzw. 10 µM Applikation von Ketoconazol vermutlich dadurch bedingt, dass sich der Effekt der etwa 3-fach erhöhten CYP3A1-Expression durch Ketoconazol an sich bei diesen beiden Konzentrationen mit jenem der Ketoconazol-bedingten Hemmung der CAR-regulierten CYP3A1-Induktion gegenseitig aufhebt.

Auch bei der Hemmung der NDL-PCB-bedingten CYP3A1-Induktion sind wieder wie auch bei Dexamethason die erhöhten Expressionswerte durch Ketoconazol an sich zu berücksichtigen, so dass Ketoconazol auch bereits bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  zu einer entsprechenden Hemmung der CYP3A1-Expression führen könnte. Für diese Tatsache spricht, dass die CYP3A1-Induktion durch die nicht-dioxinartigen PCBs vornehmlich über den CAR reguliert wird, die CAR-vermittelte Induktion, wie aus der entsprechenden CAR-regulierten CYP2B1-Expression ersichtlich, auch bereits bei einer 5  $\mu\text{M}$  Ketoconazolkonzentration hochsignifikant gehemmt wird, die CYP3A1-Expression sich dagegen bei dieser Konzentration jedoch nicht im erwarteten Maße verringert.

#### **5.4.7 Effekt von Okadainsäure und Ketoconazol auf die basale Proteinexpression von CYP2B1 und CYP3A1**

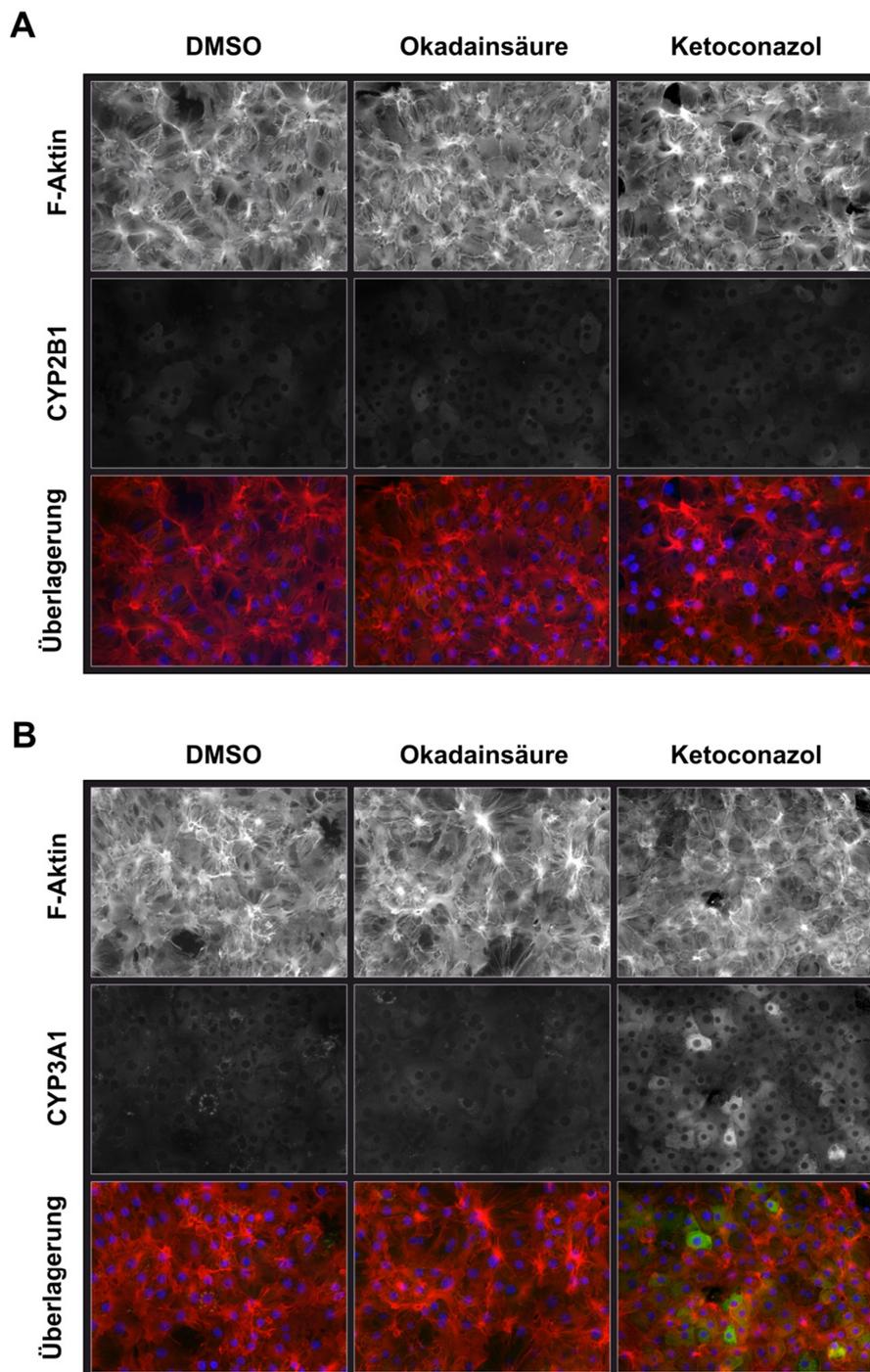
Zunächst wurde mittels immunzytochemischer Färbungen an primären Rattenhepatozyten überprüft, ob sich die auf mRNA-Ebene gezeigten Veränderungen der CYP2B1- und CYP3A1-Expression durch Okadainsäure und Ketoconazol auch in der Proteinexpression widerspiegeln. Dazu wurden die Hepatozyten unter identischen Bedingungen mit Okadainsäure und Ketoconazol inkubiert und die Zellen nach der Fixierung in der Kulturschale mittels einer Antikörperfärbung gegen CYP2B1, CYP3A1 sowie den Markern Phalloidin für das Aktin-Zytoskelett und dem Nukleus-Marker Hoechst 33342 gefärbt.

Die Inkubation der Zellen mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO resultierte wie bereits in früheren Versuchsreihen in keiner sichtbaren Färbung der Hepatozyten gegen CYP2B1 (Abb. 41 A). Auch die Inkubation mit Okadainsäure (0,5 nM) führte nicht zu einer sichtbaren Veränderung der CYP2B1-Expression auf Proteinebene, ebenso wie die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Ketoconazol. Weiterhin konnte durch die Behandlung mit den beiden Testsubstanzen keine Veränderung der Zelldichte, Zellstruktur bzw. Morphologie der Kerne festgestellt werden.

Auch die Färbung mit dem CYP3A1-Antikörper in den mit 0,5 nM Okadainsäure behandelten Hepatozytenkulturen ließ keine sichtbaren Veränderungen der CYP3A1-Färbung gegenüber der DMSO-Kontrolle erkennen (Abb. 41 B). Demgegenüber bewirkte Ketoconazol in der eingesetzten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine sichtbare CYP3A1-Antikörperfärbung im gesamten Zytosol der Hepatozyten. Dabei stachen einige der Zellen, wie bereits bei den Färbungen nach Behandlung mit Dexamethason oder den NDL-PCBs, mit einer intensiveren Färbung hervor.

Somit folgt die Entwicklung der Proteinexpression von CYP3A1 nach Inkubation mit Okadainsäure und Ketoconazol weitgehend der mRNA-Expression von CYP3A1, welche nach Applikation von Ketoconazol eine annähernde Verdreifachung des basalen mRNA-Levels

zeigte, während Okadainsäure keine signifikante Veränderung der CYP3A1-Expression hervorrief.

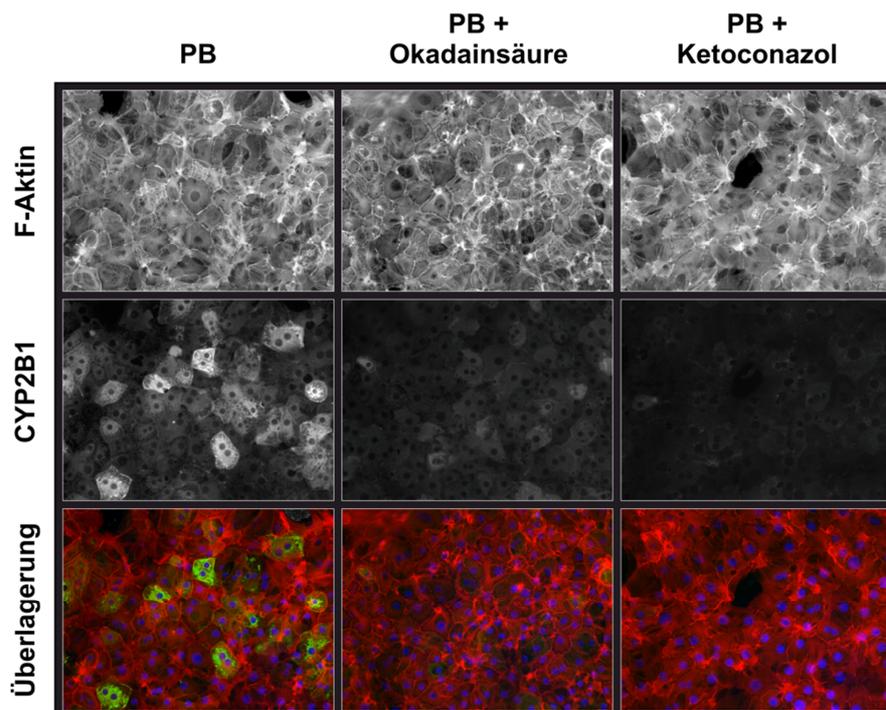


**Abbildung 41: Einfluss von Okadainsäure und Ketoconazol auf die basale CYP2B1- und CYP3A1-Proteinexpression.** Immunocytochemische Färbung des Aktin-Zytoskeletts (F-Aktin) mit Rhodamin-Phalloidin (1. Zeile) sowie einem Antikörper gegen CYP2B1 (A) bzw. CYP3A1 (B, jeweils zweite Zeile) nach Inkubation mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO sowie Okadainsäure (0,5 nM) und Ketoconazol (10  $\mu$ M). Überlagerung der CYP2B1- bzw. CYP3A1-Färbung und der F-Aktin-Färbung sowie den mittels Hoechst 33342 markierten Zellkernen (3. Zeile).

#### 5.4.8 Effekt von Okadainsäure und Ketoconazol auf die Induktion der CYP2B1-Proteinexpression durch Phenobarbital und NDL-PCBs

Um die Wirkung von Okadainsäure und Ketoconazol auf die Induktion der Proteinexpression von CYP2B1 durch verschiedene Agonisten zu testen, wurden die Zellkulturen entsprechend den Analysen zur mRNA-Expression nach einstündiger Vorinkubation mit Okadainsäure bzw. Ketoconazol für weitere 24 Stunden mit Phenobarbital oder den PCBs 52 und 153 inkubiert.

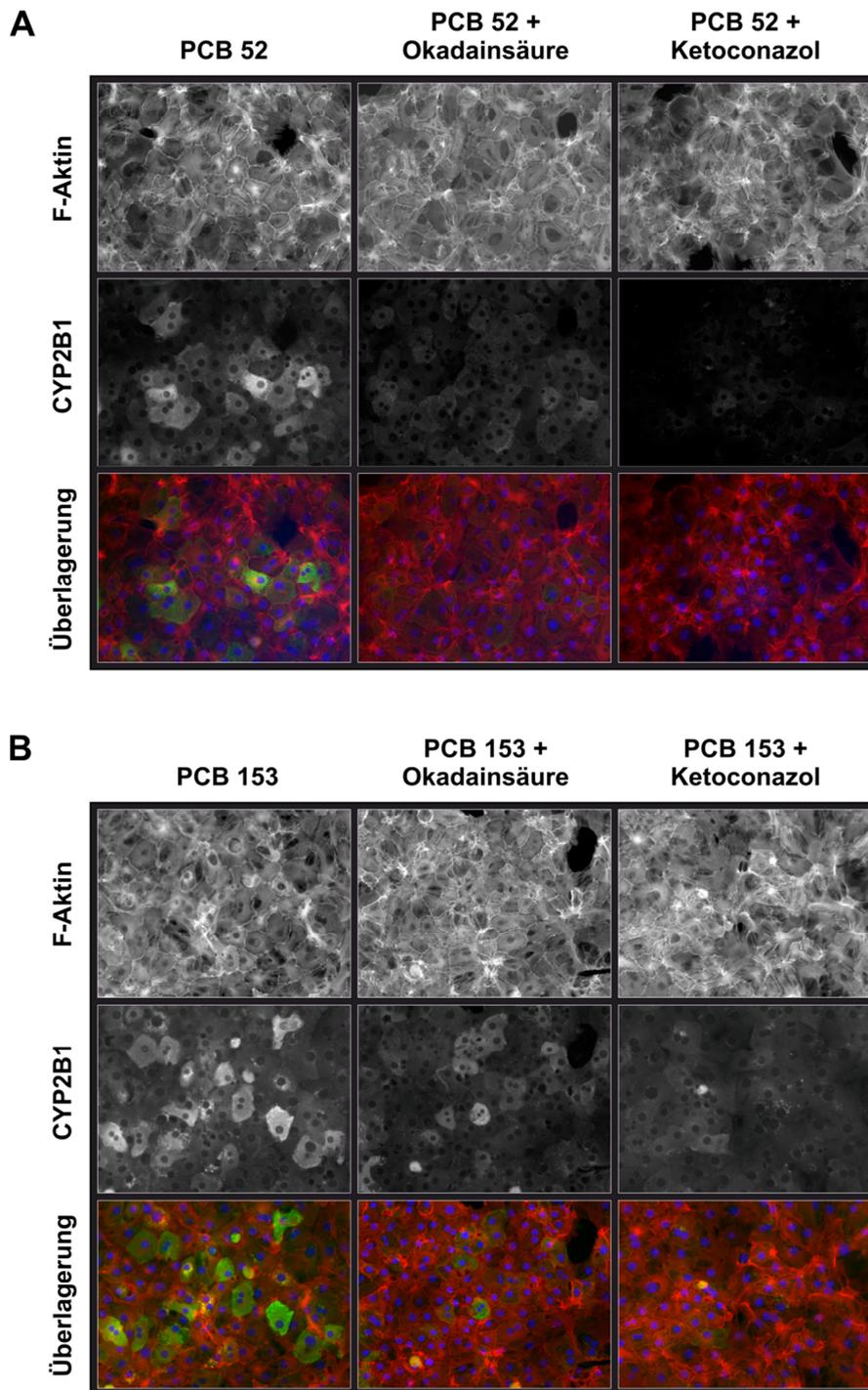
Die markante Induktion von CYP2B1 durch Phenobarbital, die sich in den immunzytochemischen Färbungen in intensiv gefärbten Zellen bemerkbar machte (Abb. 42), wurde bei vorheriger Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Ketoconazol in sehr starkem Maße gehemmt, so dass sich die Färbung von CYP2B1 nicht von der Expression in der Lösungsmittelkontrolle unterschied. Auch bei Zugabe von 0,5 nM Okadainsäure nahm die Intensität der Färbung in den Hepatozyten signifikant gegenüber der reinen Phenobarbital-Inkubation ab, wobei die Hemmung durch Okadainsäure schwächer erschien als die durch Ketoconazol hervorgerufene.



**Abbildung 42: Beeinflussung der Phenobarbital-induzierten CYP2B1-Proteinexpression durch Okadainsäure und Ketoconazol.** Immunzytochemische Färbung von CYP2B1 (2. Zeile) nach Inkubation mit Phenobarbital (0,1 mM) sowie nach vorheriger Behandlung mit Okadainsäure (0,5 nM) und Ketoconazol (10  $\mu\text{M}$ ). Lokalisation der Zellen mittels Färbung von F-Aktin (jeweils 1. Zeile) sowie Überlagerung der beiden Färbungen mit einer Färbung der Zellkerne (3. Zeile).

Die Induktion der CYP2B1-Proteinexpression durch die PCBs 52 und 153, welche für diese Untersuchung als Vertreter für die nicht-dioxinartigen PCBs ausgewählt wurden, wurde durch Okadainsäure in ähnlich starkem Maße gehemmt wie die durch Phenobarbital induzierte Expression (Abb. 43). Während sich die Intensität der Proteinfärbung nach Inkubation mit Okadainsäure bei den mit PCB 52 behandelten Kulturen kaum von jener der unbehandelten Kontrolle (0,5 % DMSO) unterschied, war bei den mit PCB 153 behandelten Kulturschalen ein etwas stärkeres residuales Fluoreszenzsignal zu erkennen, welches sich deutlich von dem in der Lösungsmittelkontrolle (vgl. Abb. 41, DMSO) abhob. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der mRNA-Analyse, bei der die messbare CYP2B1-Expression nach Einsatz von Okadainsäure in den mit PCB 153 behandelten Proben etwa 36 % höher war als jene in mit PCB 52 inkubierten Proben (vergleiche 5.4.3).

Auch die Inkubation der primären Hepatozyten mit 10  $\mu$ M Ketoconazol hemmte die Induktion der CYP2B1-Proteinexpression durch PCB 52 und 153 deutlich, wobei auch hier die Färbung in den mit PCB 153 behandelten Kulturen stärker war als in jenen, welche mit PCB 52 behandelt wurden. Beim abschließenden Vergleich zwischen Okadainsäure und Ketoconazol erschien die Hemmung durch Okadainsäure wiederum wie auch bereits bei der mRNA-Expression geringer ausgeprägt als jene durch Ketoconazol hervorgerufene.

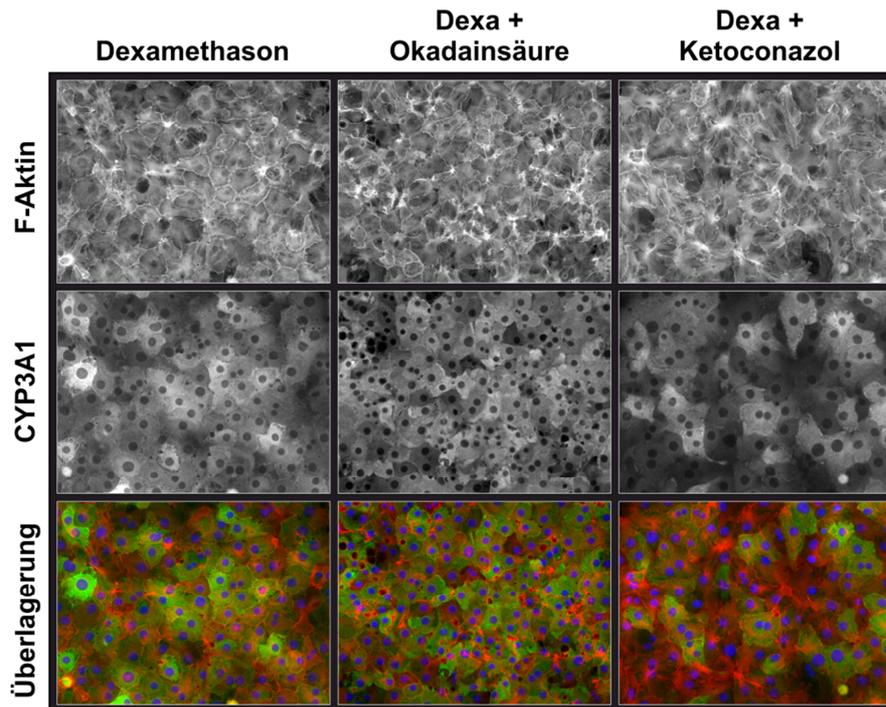


**Abbildung 43: Hemmung der durch PCB 52 und 153 induzierten CYP2B1-Proteinexpression durch Okadainsäure und Ketoconazol.** Immunzytochemische Färbung von CYP2B1 (2. Zeile) nach Inkubation mit 10  $\mu$ M PCB 52 (A) bzw. PCB 153 (B) sowie nach vorheriger Behandlung mit Okadainsäure (0,5 nM) und Ketoconazol (10  $\mu$ M). Lokalisation der Zellen mittels Färbung von F-Aktin (jeweils 1. Zeile) sowie Überlagerung der beiden Färbungen mit einer Färbung der Zellkerne (3. Zeile).

#### 5.4.9 Effekt von Okadainsäure und Ketoconazol auf die Induktion der CYP3A1-Proteinexpression durch Dexamethason und NDL-PCBs

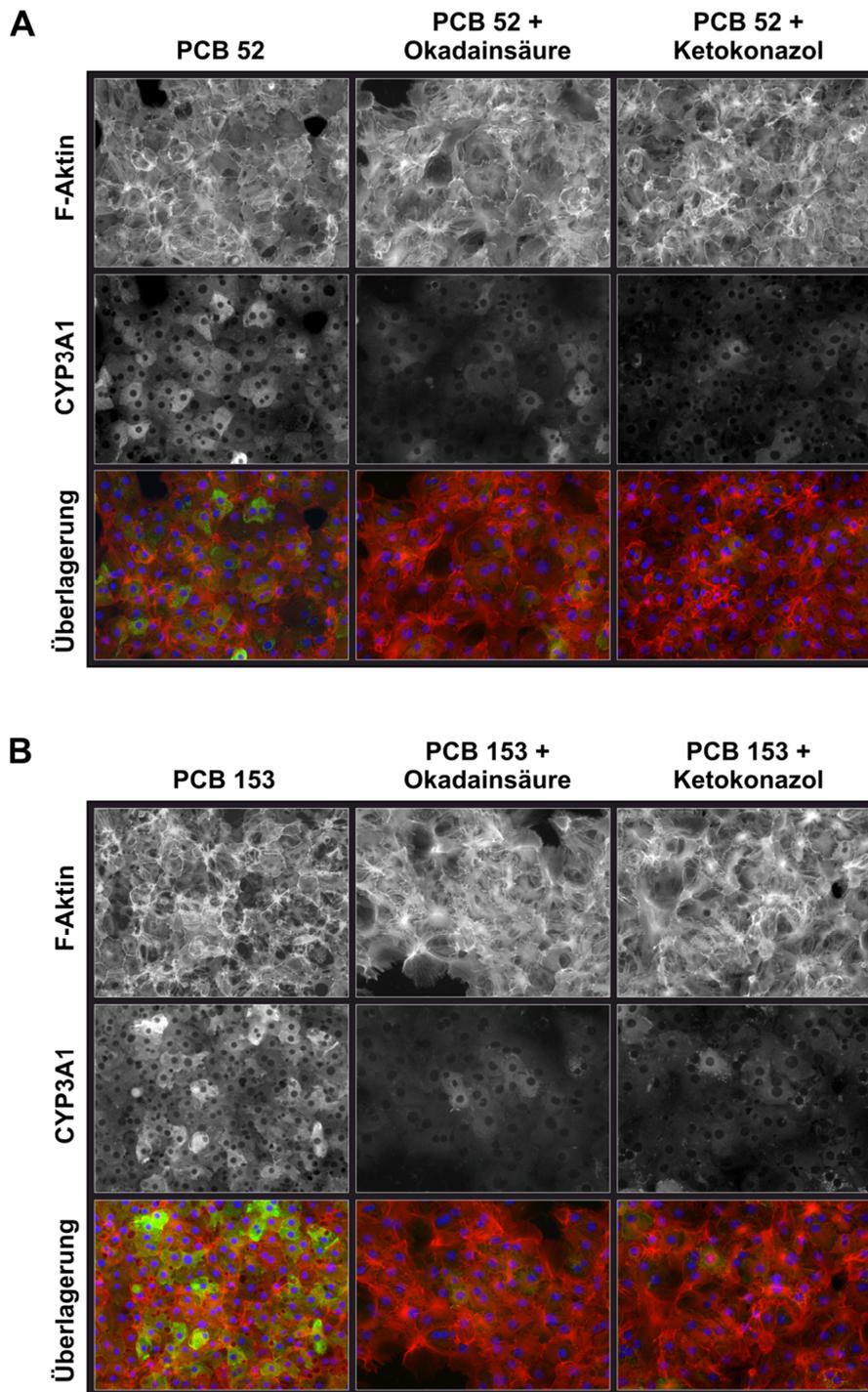
Die Inkubation von primären Hepatozyten mit Dexamethason über 24 Stunden, die unter Kontrollbedingungen ein signifikantes Fluoreszenzsignal des CYP3A1-Antikörpers in allen Zellen der Kulturschale hervorrief, wurde durch eine einstündige Vorinkubation der Hepatozyten mit Okadainsäure nicht wesentlich verändert (Abb. 44). Das Expressionsmuster von CYP3A1 auf Proteinebene unter dem Einfluss von Okadainsäure folgt somit weitgehend der Dexamethason-induzierten mRNA-Expression, welche durch 0,5 nM Okadainsäure noch keine signifikante Veränderung erfuhr.

Die Inkubation mit 10  $\mu$ M Ketoconazol bewirkte dagegen eine signifikante Abnahme der durch Dexamethason vermittelten CYP3A1-Expression im Vergleich zur Ketoconazol-freien Messung. Dies steht im Widerspruch zu den gewonnenen mRNA-Ergebnissen, bei welchen die CYP3A1-Expression durch Dexamethason infolge einer zusätzlichen Ketoconazol-Applikation nicht beeinflusst wurde, wobei hier wiederum die erhöhten CYP3A1-Expressionswerte durch Ketoconazol an sich zu berücksichtigen sind. Unter dieser Annahme würden die basalen Bezugspunkte für die CYP3A1-mRNA-Expression nach Vorinkubation mit Ketoconazol über denen der Lösungsmittelkontrolle liegen, weshalb die nach der Dexamethason-Applikation gemessenen mRNA-Level entsprechend nach unten korrigiert werden müssten. Unter Beachtung dieses Aspekts legt dies den Schluss nahe, dass auch die PXR-vermittelte Induktion von CYP3A1 bereits bei einer Ketoconazolkonzentration von 10  $\mu$ M eine entsprechende Hemmung erfährt. In ähnlichen Untersuchungen konnte ebenfalls demonstriert werden, dass eine zeitgleiche Applikation von Ketoconazol die durch Paclitaxel und Rifampicin hervorgerufenen erhöhten CYP3A4-Proteinlevel wieder annähernd auf das basale Level zurückführte (Huang *et al.*, 2007).



**Abbildung 44: Beeinflussung der Dexamethason-induzierten CYP3A1-Proteinexpression durch Okadainsäure und Ketoconazol.** Immunzytochemische Färbung von CYP3A1 (2. Zeile) nach Inkubation mit 10 µM Dexamethason sowie nach vorheriger Behandlung mit Okadainsäure (0,5 nM) und Ketoconazol (10 µM). Lokalisation der Zellen mittels Färbung von F-Aktin (jeweils 1. Zeile) sowie Überlagerung der beiden Färbungen mit einer Färbung der Zellkerne (3. Zeile).

Des Weiteren wurde die Expression von CYP3A1 nach Inkubation mit den beiden repräsentativen NDL-PCBs 52 und 153 untersucht (Abb. 45 A und B). Wie bereits bei den immunzytochemischen Färbungen zur Untersuchung der Effekte der CAR- und PXR-siRNA war die Intensität der CYP3A1-Färbung nach 24-stündiger Inkubation mit PCB 52 gegenüber der Inkubation mit PCB 153 signifikant schwächer ausgeprägt. In beiden Fällen bewirkte eine einstündige Vorinkubation mit Okadainsäure bzw. Ketoconazol eine starke Reduktion des Fluoreszenzsignals von CYP3A1 in den Hepatozyten, so dass die Regulation von CYP3A1 durch die nicht-dioxinartigen PCBs vornehmlich dem CAR zugesprochen werden kann. Dabei war die verbleibende Expression von CYP3A1 zwischen den Inkubationen mit PCB 52 und PCB 153 in etwa vergleichbar, erschien bei beiden PCBs in den mit Ketoconazol behandelten Zellkulturen jedoch etwas geringer als in den mit Okadainsäure behandelten Proben.

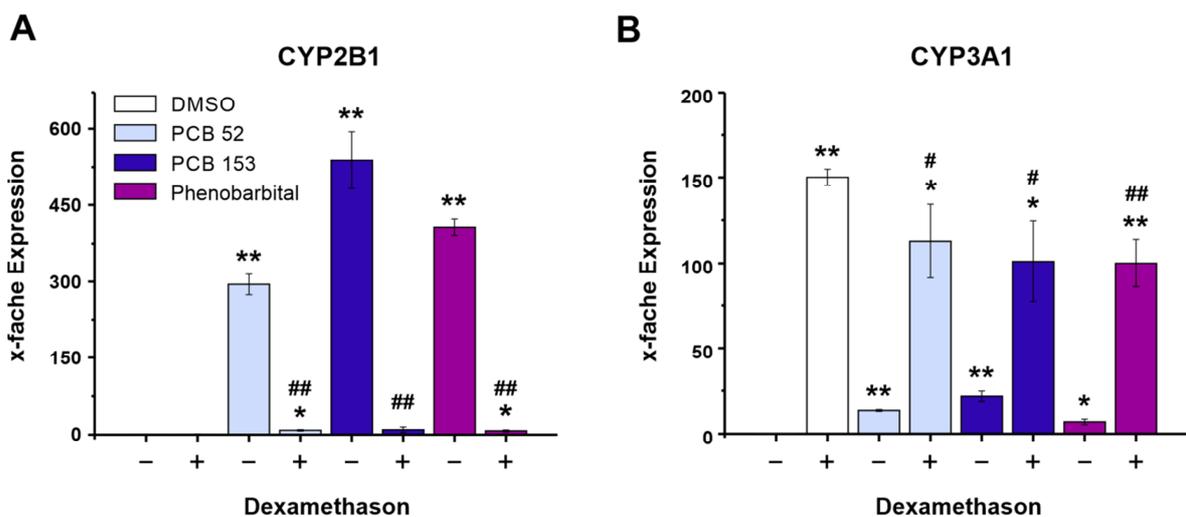


**Abbildung 45: Hemmung der durch die PCBs 52 und 153 induzierten CYP3A1-Proteinexpression durch Okadainsäure und Ketoconazol.** Immunzytochemische Färbung von CYP3A1 (2. Zeile) nach Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  PCB 52 (A) bzw. PCB 153 (B) sowie nach vorheriger Behandlung mit Okadainsäure (0,5 nM) und Ketoconazol (10  $\mu\text{M}$ ). Lokalisation der Zellen mittels Färbung von F-Aktin (jeweils 1. Zeile) sowie Überlagerung der beiden Färbungen mit einer Färbung der Zellkerne (3. Zeile).

## 5.5 Einfluss eines aktivierten PXR auf die CYP2B1-Expression und von CAR-Induktoren auf die CYP3A1-Expression

Während die CAR-siRNA den CYP2B1-induzierenden Effekt von Phenobarbital und den NDL-PCBs erwartungsgemäß annähernd vollständig blockieren konnte, führte gegenteilig die Behandlung mit der PXR-siRNA im Schnitt mindestens zu einer Verdopplung der CYP2B1-Induktion (vgl. Abb. 25 und 27). Die Tatsache, dass der Knockdown des PXR eine erhöhte Induzierbarkeit der CAR-regulierten CYP2B1-Expression zur Folge hatte, deutet auf eine Beeinträchtigung dieser Induktion durch das Vorhandensein des PXR hin bzw. lässt eine mögliche Konkurrenz dieser beiden Rezeptoren vermuten.

Um diesbezüglich näher zu beleuchten, ob ein aktivierter PXR einen Einfluss auf die CAR-vermittelte Expression hat und umgekehrt, wurden im folgenden Versuch CAR- und PXR-Induktoren gleichzeitig inkubiert und jeweils die CYP2B1- bzw. die CYP3A1-Expression gemessen. Ein Vergleich mit den jeweiligen Induktoren allein ermöglicht eine Aussage darüber, ob die aktivierten Rezeptoren einen Effekt auf die jeweilige CYP-Expression durch den anderen Rezeptor besitzen (Abb. 46).



**Abbildung 46: Einfluss von Dexamethason auf die CYP2B1-Expression und von CAR-Induktoren auf die CYP3A1-Expression.** Expression von CYP2B1 (A) und CYP3A1 (B) in Relation zur Expression in der Lösungsmittelkontrolle nach Inkubation mit 10  $\mu$ M PCB 52, 10  $\mu$ M PCB 153 sowie 0,1 mM Phenobarbital mit (+) bzw. ohne (-) gleichzeitige Zugabe von 10  $\mu$ M Dexamethason. MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ , statistischer Vergleich zur DMSO-Kontrolle: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ ; statistischer Vergleich zur jeweiligen Inkubation ohne Dexamethason (A) bzw. Vergleich zu alleinig mit Dexamethason behandelten Zellen (B): #:  $p < 0,05$  und ##:  $p < 0,01$ .

Die alleinige Applikation von 0,1 mM Phenobarbital sowie 10  $\mu$ M PCB 52 und PCB 153 stellvertretend für die Gruppe der NDL-PCBs vermochte jeweils eine 407-, 295- bzw. 538-fache Erhöhung der CYP2B1-Expression zu induzieren (Abb. 46 A). Bei zusätzlicher

Inkubation mit dem PXR-Agonisten Dexamethason wurde die CYP2B1-Expression durch PCB 52, PCB 153 oder Phenobarbital hingegen annähernd vollständig blockiert. So betrug die CYP2B1-mRNA-Level mit dem 9-, 10- bzw. 7-Fachen der basalen Induktion nur noch maximal 3 % der CYP2B1-Expression ohne Dexamethason-Zugabe. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit jenen von Kocarek und Reddy (1998), die in primären Rattenhepatozyten ebenfalls eine Suppression der Phenobarbital-induzierten CYP2B1/2-Expression infolge einer zusätzlichen Inkubation mit 10  $\mu$ M Dexamethason zeigen konnten. Ein vorhandener bzw. aktivierter PXR scheint die CAR-vermittelte CYP2B1-Expression also effektiv zu inhibieren.

Demgegenüber konnten PCB 153 und Phenobarbital die unter Kontrollbedingungen etwa 150-fache CYP3A1-Induktion durch 10  $\mu$ M Dexamethason nur um etwa 33 % reduzieren, während die Zugabe von 10  $\mu$ M PCB 52 sogar nur eine Reduktion der Dexamethason-induzierten CYP3A1-Expression um 25 % herbeiführte. Die nur in geringem Maße durch Phenobarbital oder die NDL-PCBs gehemmte Dexamethason-induzierte CYP3A1-Expression deutet auf eine nur mäßige Regulation der PXR-vermittelten zellulären Effekte durch einen aktivierten CAR hin. Während der PXR die CAR-vermittelte CYP2B1-Expression also effektiv inhibiert, scheint eine Beeinflussung der PXR-regulierten Expression durch den CAR nicht im selben Maße gegeben zu sein.

Da bisher keine direkten Interaktionen zwischen den beiden Rezeptoren gezeigt werden konnten, kommen als Auslöser dieser Beeinträchtigung bzw. Interaktion vor allem indirekte Mechanismen in den Signalkaskaden der beiden Rezeptoren in Frage. Dabei könnte der aktivierte PXR beispielsweise einen Wettbewerb mit dem CAR am CYP2B1-Promotor eingehen und eine Bindung von CAR an diesen antagonisieren; ein Mechanismus, der bereits für einige nukleäre Rezeptoren gezeigt werden konnte, welche die basalen und induzierten Expressionslevel mehrerer Cytochrom-P450-Gene durch eine kompetitive Interaktion mit den beteiligten responsiven Elementen beeinflussen (Drocourt *et al.*, 2002). Über den PXR ist hierbei bekannt, dass er an die DR4-Motive des CYP2B6-Promotors sowie an die ER6-Elemente des CYP3A4-Promotors gleichermaßen bindet (Wang und Tompkins, 2008). Demgegenüber bevorzugt das CAR/RXR-Heterodimer die „CAR-regulierten“ DR4-Elemente, wohingegen die „PXR-regulierten“ ER6-Elemente in der Promotorregion von CYP3A wesentlich schwächer erkannt werden (Faucette *et al.*, 2006; Molnár *et al.*, 2013). Dies könnte auch die aufgetretene Diskrepanz erklären in Bezug auf die Tatsache, dass der CAR die PXR-regulierte Expression nicht im selben Maße beeinträchtigt wie der PXR die CAR-vermittelte Expression.

Auf der anderen Seite könnte auch eine Konkurrenz der beiden Rezeptoren um gemeinsame Cofaktoren wie z. B. SRC-1 eine Rolle spielen, welche für die jeweilige Aktivierung dieser beiden Rezeptoren vonnöten sind. Diesbezüglich haben detaillierte Untersuchungen von Saini *et al.* (2005) ergeben, dass der Liganden-freie PXR von Cofaktoren wie SRC-1 bevorzugt wird

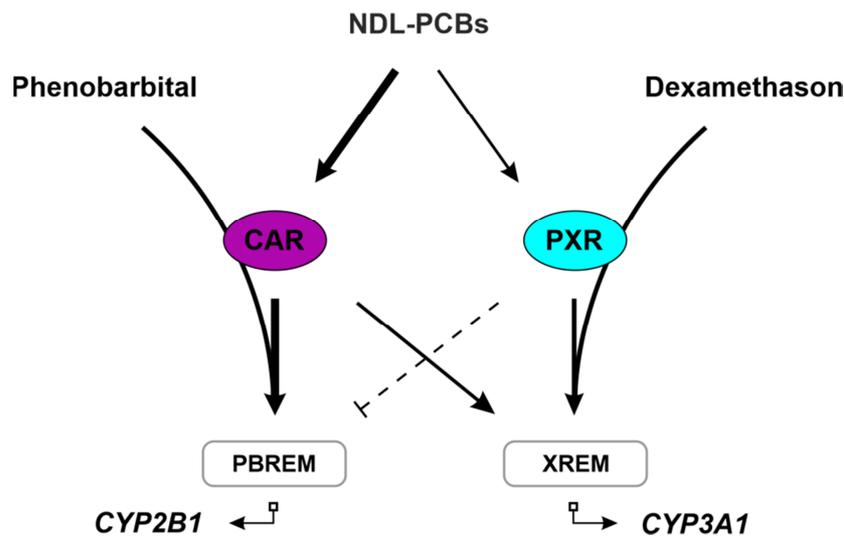
und diese von CAR zu sich herüberziehen kann, um so über die Aktivität von CAR zu dominieren. Hierauf basierend unterdrückt der Liganden-freie PXR sowohl die basale als auch die Liganden-induzierte Aktivität von CAR, da er in der Lage ist, die Liganden-unabhängige Interaktion von SRC-1 und CAR zu stören. Allerdings kann hierbei nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass auch Corepressoren in diese regulatorischen Prozesse involviert sein könnten (Saini *et al.*, 2005; Pavek, 2016).

Spätere Untersuchungen von Wahlang *et al.* (2016) bestätigen unsere Ergebnisse hinsichtlich dessen, dass die durch Aroclor 1260 stimulierte Cyp2b10-Expression in PXR-Knockout-Mäusen im Vergleich zu jener in Wildtyp-Mäusen deutlich hochreguliert wird. Die Autoren schlossen daraus, dass die erhöhten basalen und Aroclor-stimulierten Cyp2b10-Level auf einem Verlust der PXR-vermittelten Repression der durch CAR regulierten Effekte beruhen. Während somit auch von Wahlang *et al.* (2016) eine Inhibition der CAR-vermittelten Expression durch den PXR detektiert werden konnte, hatte im Gegenzug ein zeitgleiches Vorhandensein des CAR in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wiederum keine nennenswerten Effekte auf die basale PXR-Expression.

## **5.6 Zusammenfassendes Modell bezüglich der Rezeptor-abhängigen Induktion von CYP2B1 und CYP3A1 durch Phenobarbital, Dexamethason und NDL-PCBs**

Einen kurzen Überblick über die Induktionswege von CYP2B1 und CYP3A1 durch Phenobarbital, Dexamethason sowie die nicht-dioxinartigen PCBs bietet das nachfolgende Modell (Abb. 47), in welchem die jeweilige Beteiligung der beiden Rezeptoren CAR und PXR noch einmal zusammengefasst wird.

Die Induktion von CYP2B1 und CYP3A1 durch Phenobarbital wird hierbei vornehmlich über den CAR vermittelt, während dem PXR für diese Induktionen bestenfalls eine geringe Rolle zugesprochen werden kann. Die CYP3A1-Expression durch Dexamethason wird dagegen überwiegend über den Pregnan-X-Rezeptor reguliert, wobei eine Induktion von CYP2B1 durch Dexamethason bzw. ein Einfluss des CAR diesbezüglich nicht nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 47: Schematisches Modell bezüglich der Rezeptor-abhängigen Induktionswege von CYP2B1 und CYP3A1 durch Phenobarbital, Dexamethason und die nicht-dioxinartigen PCBs in primären Rattenhepatozyten.** (modifiziert nach Gähns *et al.*, 2013)

Die durch die ND-L-PCBs vermittelte Expression von CYP2B1 wird hingegen wiederum ähnlich wie bei Phenobarbital überwiegend über den CAR reguliert, jedoch unterscheidet sich die Induktion von CYP3A1 durch die ND-L-PCBs von jener durch Phenobarbital. Zum einen fällt die CYP3A1-Expression durch die ND-L-PCBs im Gegensatz zu jener von Phenobarbital signifikant höher aus und wird im Falle der ND-L-PCBs ebenfalls zu einem großen Teil über den CAR reguliert, zum anderen wird diese Induktion allerdings teilweise auch über den PXR vermittelt. Zumindest in Bezug auf die CYP3A1-Expression scheinen sich die nicht-dioxinartigen PCBs von einer klassischen Induktion vom Phenobarbital-Typ abzugrenzen. Zudem vermag der PXR die CAR-regulierte Expression durch Phenobarbital sowie die ND-L-PCBs effektiv zu stören, wohingegen der CAR keinen solch starken Einfluss auf die PXR-vermittelte CYP3A1-Expression durch Dexamethason zu besitzen scheint.

## 5.7 Einfluss von Phenobarbital, Dexamethason und ND-L-PCBs auf die induzierte Apoptose und die Kanzerogenese

Viele Induktoren der Cytochrom-P450-Enzyme wie z. B. Phenobarbital oder TCDD weisen neben ihrem Einfluss auf den Fremdstoffmetabolismus ebenfalls regulierende Eigenschaften in Bezug auf Wachstum oder Apoptose auf (Schulte-Hermann *et al.*, 1990; Wörner und Schrenk, 1996). Die hieraus resultierende Beeinflussung zahlreicher zellulärer Prozesse führt beispielsweise zu adaptiven Veränderungen wie Hypertrophie bzw. Hyperplasie der Leber, zudem fungieren solche Verbindungen häufig als potente Tumorpromotoren in der Rattenleber (Hemming *et al.*, 1993; Bursch *et al.*, 1984; Bohnenberger *et al.*, 2001). Aus diesem Grund

wird die Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme nach wie vor häufig mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht (Rodriguez-Antona und Ingelman-Sundberg, 2006).

Bei der Kanzerogenese bzw. der Tumorpromotion hat sich dabei insbesondere die Apoptose als entscheidender Faktor herauskristallisiert (Schulte-Hermann *et al.*, 1993). Unterbleiben nach einem eingetretenen Zellschaden sowohl die Reparatur als auch die Auslösung der Apoptose, so wird die daraus resultierende Mutation infolge einer Zellteilung irreversibel an die Tochterzellen weitergegeben (Lutz, 1990). Insbesondere Mutationen in Genen, welche für die Kontrolle des Zellzyklus oder die Zellteilung verantwortlich sind, haben sich dabei als folgenreich erwiesen (Pitot, 1993), da initiierte Zellen durch die Möglichkeit einer unkontrollierten Vermehrung einen entsprechenden Wachstumsvorteil erlangen können. Der Wirkmechanismus vieler Tumorpromotoren beruht hierbei unter anderem auf der gezielten Hemmung der Apoptose, so dass die Einwirkung tumorpromovierender Substanzen zu einer selektiven Vermehrung dieser initiierten Zellen und somit zu einem Fortschreiten in die Malignität führt (Bursch *et al.*, 1984; Stinchcombe *et al.*, 1995).

Zu solchen tumorpromovierenden Substanzen gehören beispielsweise Phenobarbital oder TCDD (Schrenk *et al.*, 1994; Kolaja *et al.*, 1996b), aber auch Gemische polychlorierter Biphenyle bzw. einige Einzelverbindungen dieser haben sich als tumorpromovierend erwiesen (Anderson *et al.*, 1986; Hemming *et al.*, 1993). Hierbei ist aufgrund diverser Verunreinigungen in PCB-Verbindungen jedoch nicht auszuschließen, dass einige dieser Effekte auch auf dioxinartige Verbindungen wie z. B. polychlorierte Dibenzofurane (PCDF) oder polychlorierte Dibenzodioxine (PCDD) zurückzuführen sind. Um in der vorliegenden Arbeit Einflüsse durch solche Verunreinigungen zu vermeiden, wurde der tumorpromovierende Einfluss der NDL-PCBs mit hoch aufgereinigten Verbindungen analysiert.

Zunächst sollte dabei die Frage geklärt werden, inwiefern sowohl einige ausgewählte NDL-PCBs als auch Phenobarbital und Dexamethason die Apoptose in primären Rattenhepatozyten hemmen. Hierfür wurde zum einen mittels spezifischer Tetrapeptid-Substrate die Aktivität der Caspasen 3/7, 8 und 9 fluorimetrisch bestimmt, zum anderen wurden morphologische Analysen des Zellkerns anhand einer Färbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) durchgeführt. Des Weiteren sollte mittels *small interfering RNAs* analysiert werden, ob die antiapoptotische Wirkung der NDL-PCBs über den CAR oder den PXR bzw. möglicherweise über beide Rezeptoren vermittelt wird. Während für den tumorpromovierenden Effekt von Phenobarbital eine Abhängigkeit von CAR bekannt ist (Yamamoto *et al.*, 2004), wurde ein Einfluss des PXR auf die Apoptosehemmung durch NDL-PCBs bisher noch nicht ergründet. Da die nicht-dioxinartigen PCBs insbesondere bei der Induktion von CYP3A1 ebenfalls mit dem PXR interagieren, könnte der Pregnan-X-Rezeptor auch an einer Hemmung der Apoptose durch die NDL-PCBs beteiligt sein.

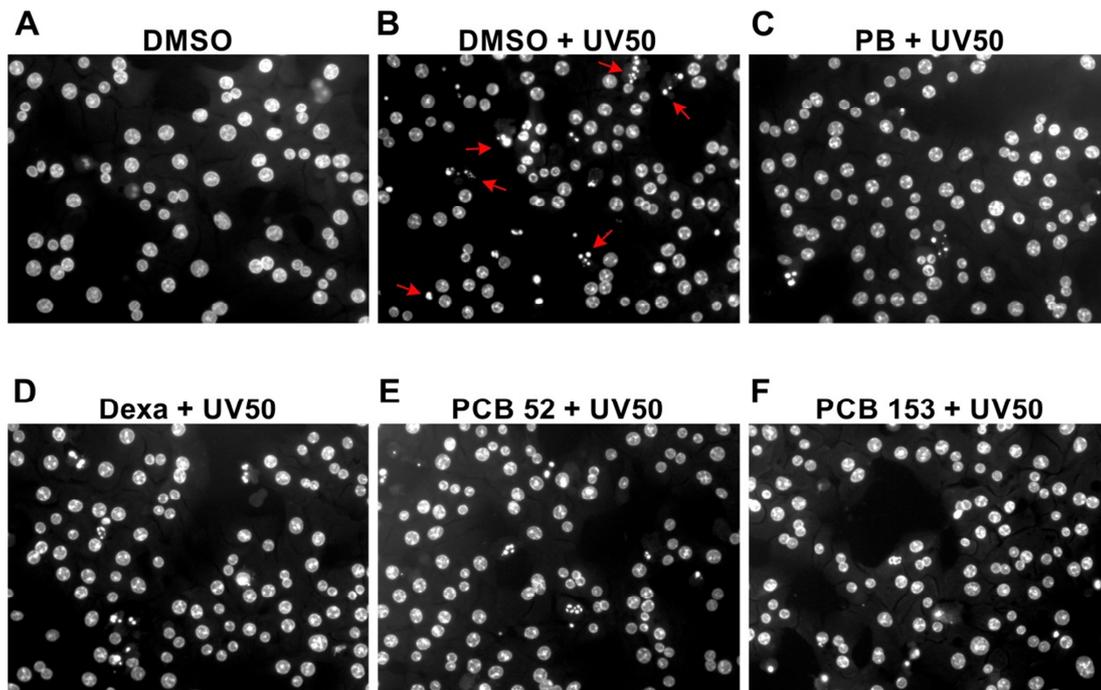
Hierbei gibt möglicherweise auch die Verwendung des Perfusionsprotokolls nach Meredith (1988) weiteren Aufschluss, welches gegenüber klassischen Kollagenase-haltigen Perfusionen als überlegen gilt und woraus im Hinblick auf die beiden Rezeptoren CAR und PXR eine erhöhte Funktionalität dieser resultieren könnte, die sich auf die Erhaltung der tumorpromovierenden Wirkung der Testsubstanzen positiv auswirken könnte.

### 5.7.1 Analyse der Apoptoserate mittels DAPI

Die Inhibition der Apoptose nimmt eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Tumoren in der Rattenleber ein. Um diese Hemmung in primären Rattenhepatozyten untersuchen zu können, wurden die Zellen zunächst mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gefärbt und anschließend die prozentuale Rate apoptotischer Zellen fluoreszenzmikroskopisch ermittelt. Hierbei bindet DAPI bevorzugt an Adenin/Thymin-Cluster in doppelsträngiger DNA (Chazotte, 2011), so dass charakteristische Apoptosemerkmale anhand morphologischer Analysen des Zellkerns detektiert werden können.

Als typische morphologische Merkmale der Apoptose sind beispielsweise das Schrumpfen der betroffenen Zelle, die Kondensation des Chromatins, das Kollabieren des Zytoskeletts sowie die Fragmentierung der DNA zu nennen (Taatjes *et al.*, 2008; Kitazumi und Tsukahara, 2011). Der weitere Verlauf der Apoptose ist durch die Bildung von membranumgrenzten Vesikeln, den sogenannten *apoptotic bodies*, gekennzeichnet, welche beispielsweise Organellen und DNA-Fragmente enthalten und letztendlich von Makrophagen aufgenommen werden (Kerr *et al.*, 1972; Zhang und Xu, 2000). Um die Hemmung der Apoptose in einem *in vitro*-Modell untersuchen zu können, wurden primäre Rattenhepatozyten einer apoptoseinduzierenden UV-Dosis ( $50 \text{ J/m}^2$ ) ausgesetzt und anschließend für 24 Stunden entweder mit Phenobarbital, Dexamethason oder ausgewählten nicht-dioxinartigen PCBs inkubiert.

Die im Anschluss detektierte Zellkern-Morphologie kultivierter Hepatozyten unter Kontrollbedingungen (0,5 % DMSO) ist in der repräsentativen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme in Abbildung 48 A ersichtlich. Die mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI visualisierten Zellkerne besitzen eine runde bis elliptische Form, bei welcher sich Eu- und Heterochromatin klar unterscheiden lassen.



**Abbildung 48: Fluoreszenzmikroskopische Analyse morphologischer Apoptosemerkmale mittels DAPI.** Repräsentative Aufnahmen von mittels DAPI gefärbten Nuklei primärer Rattenhepatozyten nach einer UV-Bestrahlung (UV50) unter Kontrollbedingungen (DMSO) sowie zusätzlicher Behandlung mit Dexamethason (10  $\mu$ M), Phenobarbital (1 mM) oder den NDL-PCBs 52 und 153 (jeweils 10  $\mu$ M). Rote Pfeile markieren repräsentative Erscheinungsformen von Nuklei apoptotischer Zellen (B).

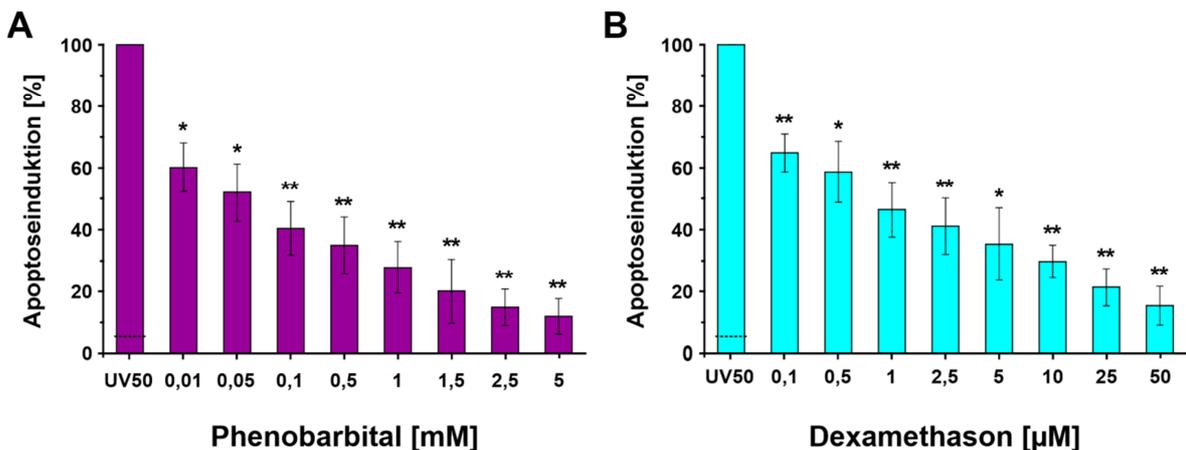
Demgegenüber resultiert die apoptoseinduzierende Bestrahlung der Kulturschale mit UV-C-Licht (Wellenlängenbereich 100-280 nm) mit einer Strahlungssumme von 50 J/m<sup>2</sup> in einigen der Zellen in einer signifikanten Veränderung der Zellkern-Morphologie. So lassen sich einige Zellkerne erkennen (in der repräsentativen Abbildung 48 B mit roten Pfeilen markiert), die ihre elliptische Form verloren haben und in denen sich Eu- und Heterochromatin nicht mehr eindeutig identifizieren lassen. Je nach Stadium der Apoptose besitzen Zellkerne unterschiedliche charakteristische Erscheinungsformen, meist lassen sich apoptotische Zellen mit stark kondensiertem oder fragmentiertem Zellkern (Abb. 48), oder aber Zellkerne mit einer halbmondartigen Form unterscheiden (Taatjes *et al.*, 2008).

Generell ist in den Abbildungen 48 B-F ersichtlich, dass eine zusätzliche Behandlung sowohl mit Phenobarbital als auch mit Dexamethason oder den NDL-PCBs im Gegensatz zu einer alleinigen Behandlung mit UV-Licht zu einer verminderten Apoptoserate führt.

### 5.7.1.1 Einfluss von Phenobarbital und Dexamethason auf die UV-induzierte Apoptose in primären Rattenhepatozyten

Um den Einfluss von Phenobarbital und Dexamethason auf die UV-induzierte Apoptose zu untersuchen, wurden primäre Rattenhepatozyten in Kultur mit verschiedenen Konzentrationen an Phenobarbital und Dexamethason über 24 Stunden inkubiert. Die mittels DAPI visualisierten Zellkerne wurden mikroskopisch auf Anzeichen von Apoptosen überprüft und die Rate apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl ermittelt.

So wiesen bei allen mit der Lösungsmittelkontrolle inkubierten Hepatozytenkulturen im Mittel 11,2 % der Zellkerne nach UV-Bestrahlung Anzeichen von Apoptose auf, während unbestrahlte Zellkulturen im Mittel nur 0,6 % apoptotische Zellen enthielten, womit die UV-Bestrahlung die basale Apoptoserate um annähernd das 20-Fache erhöhte. Die Apoptoseraten in den mit den Testsubstanzen inkubierten Zellkulturen wurden in Relation zur Apoptoserate in nur mit der Lösungsmittelkontrolle inkubierten Hepatozytenkulturen dargestellt (Abb. 49 A und B). Hierbei wurden Dexamethason und Phenobarbital in Konzentrationen eingesetzt, die in vorherigen Versuchsreihen keinen Einfluss auf die Vitalität der Hepatozyten gezeigt haben und somit selbst keine Apoptosen induzieren.



**Abbildung 49: Einfluss von Phenobarbital und Dexamethason auf die durch UV-Strahlung induzierte Apoptose in primären Rattenhepatozyten.** Quantitative Analyse der mittels fluoreszenzmikroskopischer Auszählung DAPI-gefärbter Nuklei ermittelten Apoptoseinduktion infolge einer UV-Bestrahlung ( $50 \text{ J/m}^2$ ) sowie nach zusätzlicher Inkubation mit Phenobarbital (A) bzw. Dexamethason (B) in verschiedenen Konzentrationen. Die ermittelten Apoptoseraten in den einzelnen Konzentrationsstufen sind prozentual zur Apoptoserate nach UV-Bestrahlung in der Lösungsmittelkontrolle (UV50) dargestellt. Die basale Rate apoptotischer Zellen in unbehandelten Kulturen in Relation zu den UV-behandelten Zellkulturen ist mit einer schwarzen Linie markiert. MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ , statistischer Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ .

Die Untersuchung der mit Phenobarbital inkubierten Kulturschalen zeigte in allen Konzentrationsstufen einen signifikanten, hemmenden Effekt von Phenobarbital auf die UV-

induzierte Apoptose (Abb. 49 A). Bereits bei einer Inkubation mit der niedrigsten getesteten Phenobarbitalkonzentration von 0,01 mM betrug die Apoptoserate nur etwa 60 % der Rate der Apoptosen in den zur Kontrolle mit dem Lösungsmittel inkubierten Kulturschalen. Mit steigender Phenobarbitalkonzentration nahm die relative Anzahl der durch die UV-Bestrahlung induzierten Apoptosen weiter ab. Nach Inkubation mit der höchsten getesteten Konzentration von Phenobarbital (5 mM) konnten nur noch 12 % der Apoptosen in der Kontrollkultur gezählt werden.

Einen vergleichbaren Effekt hatte die Inkubation der Hepatozytenkulturen mit Dexamethason. Auch hier bewirkten alle getesteten Dexamethasonkonzentrationen zwischen 0,1 und 50  $\mu\text{M}$  eine signifikante Reduktion des Auftretens von Apoptosen nach Bestrahlung mit UV-Licht (Abb. 49 B). Das Ausmaß der Reduktion variierte dabei zwischen einer Reduktion der Apoptosen auf 65 % der Apoptosen unter Kontrollbedingungen bedingt durch eine Dexamethasonkonzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  bis hin zu einer Abnahme auf 15 % bei Inkubation mit einer 50  $\mu\text{M}$  Dexamethasonlösung.

Somit bleibt festzuhalten, dass sowohl Phenobarbital als auch Dexamethason die Apoptoserate in der jeweils höchsten eingesetzten Konzentration annähernd auf das Kontrollniveau zurückdrängen konnten. Von Phenobarbital ist bereits hinreichend bekannt, dass eine Behandlung mit dieser Substanz die Entstehung von Lebertumoren in Ratten und Mäusen fördert (IARC, 2001; Whysner *et al.*, 1996). Insbesondere eine durch Phenobarbital bedingte Hemmung der Apoptose wurde bereits von Wörner und Schrenk (1996) bzw. Bohnenberger *et al.* (2001) nachgewiesen. So konnte gezeigt werden, dass eine Applikation von Phenobarbital die durch UV-Licht oder 2-Acetylaminofluoren induzierte Apoptose in primären Rattenhepatozyten nahezu vollständig unterdrückt.

Aus den vorhandenen Literaturdaten wurde von Elcombe *et al.* (2014) ein Wirkmechanismus für die durch Phenobarbital induzierte Bildung von Lebertumoren erarbeitet, welcher vor allem für Nager relevant ist. Als Schlüsselereignisse dieser Phenobarbital-induzierten Lebertumorbildung wurden die Aktivierung des nukleären Rezeptors CAR, welche in einer pleiotropen Antwort resultiert, einschließlich einer für CAR spezifischen, veränderten Genexpression identifiziert sowie des Weiteren eine erhöhte Zellproliferation (Cohen, 2010; Lake, 2009). Assoziative Ereignisse für den Wirkmechanismus umfassen die Induktion von Cytochrom-P450-Enzymen (insbesondere CYP2B-Enzyme), Hypertrophie der Leber, die Hemmung der Apoptose sowie zudem für eine CAR-Aktivierung spezifische epigenetische Veränderungen (Holsapple *et al.*, 2006; Haines *et al.*, 2018). Die Phenobarbital-bedingte Inhibition der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions stellt weiterhin ein assoziatives Ereignis oder einen modulierenden Faktor dar (Elcombe *et al.*, 2014). Eine längere Behandlung mit Phenobarbital führt so letztlich zur Bildung veränderter, präneoplastischer Foci infolge einer klonalen Expansion sowie anschließend zur Entwicklung von hepatozellulären Adenomen und Karzinomen (Jones *et al.*, 2009; Whysner *et al.*, 1996).

Nukleäre Rezeptoren wie der konstitutive Androstan-Rezeptor sind hierbei an der Regulation zahlreicher zellulärer Reaktionen beteiligt, beispielsweise infolge einer Exposition gegenüber verschiedenen Xenobiotika bzw. insbesondere Tumorpromotoren. Die Aktivierung von CAR ist in diesem Zusammenhang das molekulare Initiierungsereignis für die Phenobarbital-induzierte Bildung von Lebertumoren. Sowohl bei der Maus als auch bei der Ratte hat die Aktivierung des Rezeptors eine Veränderung der Expression einer großen Anzahl von Genen zur Folge, die unter anderem am xenobiotischen Metabolismus der Phase I und II, der Zellproliferation, der Apoptose oder dem Energiestoffwechsel beteiligt sind (Elcombe *et al.*, 2014; Hamadeh *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2009 & 2010; Tien und Negishi, 2006; Ueda *et al.*, 2002; Waterman *et al.*, 2010; Yoshinari *et al.*, 2008). Die Bedeutung von CAR wird zudem in Studien an CAR-Knockout-Mäusen deutlich, in welchen gezeigt werden konnte, dass Phenobarbital in diesen Mäusen im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen weder Cyp2b-Enzyme induziert, noch die DNA-Synthese stimuliert oder zu einem erhöhten Lebergewicht führt (Huang *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2004). Während Phenobarbital darüber hinaus in Wildtyp-Mäusen nach einer Behandlung mit dem genotoxischen Karzinogen Diethylnitrosamin (DEN) Lebertumoren förderte, konnten bei CAR-Knockout-Mäusen hingegen keine hepatozellulären Adenome oder Karzinome beobachtet werden (Huang *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2004). Vergleichende Studien an Wildtyp-Mäusen und CAR-Knockout-Mäusen haben jedoch auch gezeigt, dass nicht alle durch Phenobarbital induzierten Gene CAR-abhängig sind (Ueda *et al.*, 2002). Weiter kommt hinzu, dass Phenobarbital in Wildtyp-Mäusen zwar Auswirkungen auf die Expression einer großen Anzahl von Genen zeigte, in humanisierten Mäusen, bei welchen CAR und PXR genetisch durch die humanen Gegenstücke (hCAR/hPXR) ersetzt wurden, jedoch nur einen deutlich begrenzteren Satz an Genen beeinflusste (Ross *et al.*, 2010). Dieses Phänomen einer im Vergleich zur Nagerleber ausbleibenden ähnlich starken Reaktion in humanen Hepatozyten wird nach einer Behandlung mit Phenobarbital auch in Bezug auf die Zellproliferation deutlich. Während eine Phenobarbital-bedingte Hypertrophie sowohl in der Leber von Nagetieren als auch in humanen Hepatozyten nachweisbar ist, wird die DNA-Synthese hingegen zwar auch in Primärkulturen von Nagetierhepatozyten gesteigert, nicht jedoch in humanen Hepatozyten (Hirose *et al.*, 2009; Lake, 2009; Parzefall *et al.*, 1991; Yamada *et al.*, 2014; Yamada *et al.*, 2015; Okuda *et al.*, 2017).

Die während der Bildung von Tumoren beobachtete Lebervergrößerung nach Behandlung mit Phenobarbital ist sowohl auf eine Hepatozytenhypertrophie als auch auf Hyperplasie zurückzuführen, wobei ultrastrukturelle Untersuchungen eine Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums zeigen (IARC, 2001; Lake, 2009; Nims und Lubet, 1996; Whysner *et al.*, 1996). Bei Ratten und Mäusen wird die Phenobarbital-induzierte Hypertrophie üblicherweise in der zentrilobulären Region des Leberlappens beobachtet, obwohl einige verwandte Verbindungen auch entweder eine diffuse Hypertrophie oder Hypertrophie in anderen Regionen des Leberlappens erzeugen können (Elcombe *et al.*, 2014). Neben der

Hypertrophie tritt auch die durch Phenobarbital erzeugte Stimulation der DNA-Synthese überwiegend im zentrilobulären Bereich des Leberlappens auf (Schulte-Hermann *et al.*, 1986; Orton *et al.*, 1996). Bezüglich der DNA-Synthese haben zudem mehrere Untersuchungen gezeigt, dass die Stimulierung dieser in der Ratten- und Mäuseleber nach Behandlung mit Phenobarbital nicht fortwährend, sondern lediglich vorübergehend ist. So wird eine erhöhte DNA-Synthese zwar zu frühen Zeitpunkten wie innerhalb von 7 Tagen und möglicherweise auch nach 14 oder 28 Tagen Behandlung mit Phenobarbital beobachtet, im Allgemeinen jedoch nicht nach längeren Behandlungszeiten (IARC, 2001; Kolaja *et al.*, 1996a; Orton *et al.*, 1996; Phillips *et al.*, 1997; Whysner *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu diesen Wirkungen in kultivierten Nagetierhepatozyten induziert Phenobarbital jedoch keine DNA-Synthese in humanen Hepatozyten (Lake, 2009; Hirose *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 2015). Diese offensichtliche Unempfindlichkeit von humanen Hepatozyten gegenüber einer Phenobarbital-vermittelten Stimulation der DNA-Synthese zeigt sich zudem übereinstimmend in hCAR/hPXR-Mäusen (Ross *et al.*, 2010) sowie in einer *in vivo*-Studie an humanen Hepatozyten aus chimären Mäusen (Yamada *et al.*, 2014). Basierend auf den verfügbaren Daten können humane Hepatozyten daher als resistent gegen eine Stimulation der Zellproliferation durch Phenobarbital bzw. andere CAR-Aktivatoren wie Metofluthrin, Momfluorothrin oder CITCO angesehen werden (Yamada *et al.*, 2015; Okuda *et al.*, 2017; Soldatow *et al.*, 2016).

Neben der Zellproliferation scheint die Hemmung der Apoptose ein weiterer Hauptfaktor zu sein, der zum klonalen Wachstum phänotypisch veränderter, präneoplastischer Hepatozyten in der Nagetierleber beiträgt (Schulte-Hermann *et al.*, 1993). Unter dem Einfluss von Lebertumorpromotoren kann das Risiko für die Entwicklung maligner Tumoren infolge einer Unterdrückung der Apoptose erhöht werden, indem so das Überleben genetisch veränderter Zellen erleichtert wird (Schulte-Hermann, 1985). Diesbezüglich konnte in der Rattenleber sowie auch in isolierten Rattenhepatozyten bereits eine entsprechende Phenobarbital-bedingte Hemmung der Apoptose detektiert werden (Foster, 2000; James und Roberts, 1996). Zudem inhibiert Phenobarbital sowohl die *Transforming growth factor-β* (TGF-β)- als auch die Bleomycin-induzierte Apoptose in Maushepatozyten, wohingegen die Basalrate der Apoptose in unbehandelten Maushepatozyten jedoch nicht beeinflusst wurde (Christensen *et al.*, 1998). In Initiations-Promotions-Studien an F344-Ratten und B6C3F1-Mäusen wurde nach einer vorherigen Initiation mit Diethylnitrosamin weiterhin gezeigt, dass Phenobarbital auch eine Hemmung der Apoptose in veränderten Leber-Foci hervorruft (Kolaja *et al.*, 1996b).

In einer Studie von Wörner und Schrenk (1996) wurden zudem die Auswirkungen einer Behandlung mit UV-Licht bzw. des karzinogenen aromatischen Amins 2-Acetylaminofluoren (2-AAF) auf die Apoptose in primären Rattenhepatozyten untersucht. Während jede dieser beiden Behandlungsarten eine signifikant erhöhte Inzidenz apoptotischer Kerne zur Folge hatte, konnte der Anstieg der Apoptoseinzidenz nach Zugabe von 2 mM Phenobarbital nahezu

vollständig unterdrückt werden. Darüber hinaus wurde auch die durch UV-Strahlung hervorgerufene internukleosomale Fragmentierung der DNA infolge einer zusätzlichen Behandlung mit Phenobarbital annähernd wieder auf das Kontrollniveau zurückgedrängt.

Die in einigen Nagerstudien festgestellte mangelnde Wirkung auf die Apoptose nach einer Behandlung mit Phenobarbital kann beispielsweise auf die angewandte Technik oder auf unzureichende Gruppengrößen zurückzuführen sein, wodurch Variabilitäten zwischen den Tieren nicht ausreichend ausgeglichen werden können (Elcombe et al., 2014). Übereinstimmend mit den vorherigen Ergebnissen zeigten sich auch bei Bohnenberger *et al.* (2001) konzentrationsabhängige apoptosehemmende Effekte durch eine zusätzliche Behandlung mit Phenobarbital, welche eine vollständige Unterdrückung der UV-bedingten Apoptose in primären Rattenhepatozyten zur Folge hatte. Im Gegensatz zu Ratten- bzw. Maushepatozyten scheinen andere Spezies gegenüber einer Phenobarbital-bedingten antiapoptotischen Wirkung jedoch resistent zu sein. Beispielsweise wurde berichtet, dass Phenobarbital die Apoptose in kultivierten Hamster- und Meerschweinchenhepatozyten nicht inhibiert (James und Roberts, 1996). Weitere signifikante Speziesunterschiede konnten ebenfalls in Bezug auf humane Hepatozyten festgestellt werden, welche ebenfalls nicht auf die antiapoptotischen Eigenschaften von Phenobarbital ansprechen (Hasmall und Roberts, 1999). Dennoch scheint die Hemmung der Apoptose in Ratten und Mäusen das Überleben von Hepatozyten mit vorhandenen Läsionen zu ermöglichen und so für eine tumorpromovierende Wirkung von Phenobarbital in der Leber von entscheidender Bedeutung zu sein.

Eine weitere Komponente, die zur Phenobarbital-vermittelten Tumorpromotion beiträgt, stellen spezifische epigenetische Veränderungen dar, die in Bezug auf Phenobarbital infolge einer Aktivierung des konstitutiven Androstan-Rezeptors auftreten (Phillips *et al.*, 2007). Generell zeigen aktuelle Studien zur Hepatokarzinogenese in Nagetieren, dass eine Exposition gegenüber nicht-genotoxischen Hepatokarzinogenen zu Veränderungen im Epigenom führt und auf diese Weise die Genexpression vererbbar beeinflussen kann. Eine Behandlung von tumoranfälligen B6C3F1- und C3H-Mäusen mit Phenobarbital für 2 oder 4 Wochen bewirkte diesbezüglich die Bildung von Regionen mit veränderter DNA-Methylierung, wobei insbesondere eine Anhäufung hypomethylierter Regionen auftrat (Bachman *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2007; Phillips und Goodman, 2008).

Die nähere Analyse dieser Regionen enthüllte 51 Gene, von denen viele eine für die Tumorgenese relevante Rolle spielen (Phillips und Goodman, 2008). Eine veränderte Methylierung von kritischen Genen, beispielsweise solchen, die die Zellproliferation regulieren, könnte eine Änderung der jeweiligen Expression dieser Gene erleichtern und den auf diese Weise betroffenen Zellen einen Wachstumsvorteil verschaffen (Bachman *et al.*, 2006). So verursachte eine 4-wöchige Behandlung mit Phenobarbital beispielsweise eine Hypomethylierung von *Ha-ras* in B6C3F1-Mäusen, welche mit einem selektiven Anstieg der

Genexpression dieses Onkogens einherging. Weiterhin veränderte Phenobarbital die Expression einiger weiterer Gene, die entweder die Zellzyklusprogression regulieren können (z. B. *Cdc2a*, *Ccnd1*, *Gadd45a*, *Gadd45b*, *Gmnn*, *Mdm2*, *Wee1*) oder zusätzlich auch Gene, die Verbindungen zum Zellzyklus und zum Zellwachstum zeigen (Phillips *et al.*, 2009a). Abgesehen davon werden durch eine Behandlung mit Phenobarbital auch Gene beeinflusst, die an der Apoptose beteiligt sind (z. B. *Casp1*, *Gadd45a*, *Gadd45b*, *Gas1*, *Myc* und *p21*). In diesem Zusammenhang ist insbesondere die Hochregulation von *Gadd45b* (*Growth arrest and DNA-damage-inducible 45b*), zu nennen, welche auch in präkanzerösem Lebergewebe und einzelnen Lebertumoren zu finden ist, da *Gadd45b* als Inhibitor der Apoptose fungieren kann (Papa *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2010) und darüber hinaus eine erhöhte Expression von *Gadd45b* zur Demethylierung von DNA führt (Ma *et al.*, 2009). Zusammengenommen zeigen diese Daten zum einen, dass nicht-zufällige, spezifische Änderungen in der Methylierung einen epigenetischen Mechanismus darstellen, welcher der Fähigkeit von Phenobarbital zugrunde liegt, Lebertumoren zu verursachen. Zum anderen scheint die Empfindlichkeit gegenüber der Hepatokarzinogenese vermutlich umgekehrt proportional mit der Fähigkeit zusammenzuhängen, normale Profile der DNA-Methylierung aufrechtzuerhalten (Goodman und Watson, 2002; Bachman *et al.*, 2006).

Eine weitere Rolle bei der Phenobarbital-bedingten Tumorpromotion fällt der Inhibition der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions (GJIC) zu, wobei unter Gap Junctions interzelluläre Membrankanäle zu verstehen sind, die den direkten Austausch kleiner Moleküle zwischen benachbarten Zellen ermöglichen (Elcombe *et al.*, 2014). Da Gap Junctions auf diese Weise wichtige Funktionen u. a. bei der Regulierung der zellulären Homöostase oder der Differenzierung einnehmen (Kolaja *et al.*, 2000), hat die anhaltende Herunterregulierung einer solchen interzellulären Kommunikation einen Verlust der tumorsuppressiven Wirkung zur Folge (Chipman *et al.*, 2003). In mehreren Studien wurde diesbezüglich gezeigt, dass Phenobarbital und eine Reihe weiterer nicht-genotoxischer Hepatokarzinogene die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions in Hepatozyten von Ratten und Mäusen hemmen (Klaunig *et al.*, 1990; Neveu *et al.*, 1994; Chipman *et al.*, 2003). Des Weiteren wurde in einer Studie von Moennikes *et al.* (2000) gezeigt, dass Phenobarbital Diethylnitrosamin-induzierte Lebertumoren lediglich in Wildtyp-Mäusen fördert, nicht jedoch in Knockout-Mäusen für Connexin 32, einem essentiellen Protein für die Bildung von Gap Junctions in der Leber. Abgesehen davon konnten auch Kolaja *et al.* (2000) nach einer 7-tägigen Behandlung mit Phenobarbital eine Verringerung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions um mehr als 30 % in der Rattenleber feststellen, die mit einer zeitgleichen Abnahme der Apoptose sowie einer erhöhten Hepatozytenproliferation einherging.

Im Gegensatz zu den ausgeprägten Wirkungen in kultivierten Nagetierhepatozyten wurde die interzelluläre Kommunikation zwischen Gap Junctions in humanen Hepatozyten infolge einer Phenobarbital-Behandlung jedoch nicht gehemmt (Baker *et al.*, 1995; Klaunig und Ruch,

1987). Da zudem keine Abhängigkeit der in Nagetieren vorhandenen Hemmung vom konstitutiven Androstan-Rezeptor nachgewiesen werden konnte, wurde eine solche Hemmung der interzellulären Kommunikation zwischen Gap Junctions nicht als Schlüsselereignis für die durch Phenobarbital induzierte Bildung von Lebertumoren erachtet, sondern eher als assoziatives Ereignis oder modulierender Faktor berücksichtigt (Elcombe *et al.*, 2014).

Als weiterer modulierender Faktor ist zudem oxidativer Stress zu nennen, da oxidative Schäden an Makromolekülen infolge einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies eine Rolle im Prozess der Karzinogenese spielen können (Klaunig *et al.*, 2010). Diesbezüglich wurde in einigen Studien berichtet, dass eine längere Verabreichung von Phenobarbital mit oxidativem Stress einhergeht, da die Phenobarbital-bedingte Induktion von CYP2B-Enzymen in der Nagetierleber zu einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies führt (Dostalek *et al.*, 2007; Imaoka *et al.*, 2004). Diese These wird ebenfalls durch Untersuchungen von Lehman-McKeeman *et al.* (1999) gestützt, die zeigen konnten, dass die Überexpression von Cyp2b-Isoformen in der Leber von transgenen Mäusen mit einer erhöhten Tumorbildung einhergeht, die möglicherweise mit Cyp-generierten reaktiven Sauerstoffspezies zusammenhängt.

Des Weiteren aktiviert Phenobarbital in diesem Zusammenhang den auf oxidativen Stress reagierenden Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, was eine erhöhte DNA-Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B in der Rattenleber zur Folge hat (Li *et al.*, 1996; Calfee-Mason *et al.*, 2002). Da NF- $\kappa$ B Gene reguliert, die an der Apoptose und der Zellproliferation beteiligt sind (Barkett und Gilmore, 1999; Hinz *et al.*, 1999), kann eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B zum Teil für die metabolischen Veränderungen verantwortlich sein, die nach einer Behandlung mit Phenobarbital in Nagetieren auftreten (Calfee-Mason *et al.*, 2002). Um dieser Hypothese bezüglich einer Abhängigkeit der durch Phenobarbital hervorgerufenen Tumorpromotion von NF- $\kappa$ B nachzugehen, untersuchten Tharappel *et al.* (2008) die Wirkung von Phenobarbital in Knockout-Mäusen, die eine Deletion der p50-Untereinheit von NF- $\kappa$ B aufwiesen. Da die Phenobarbital-bedingten Veränderungen jedoch sowohl in Wildtyp-Mäusen als auch in den p50-Knockout-Mäusen weiterhin detektiert werden konnten, legt dies den Schluss nahe, dass NF- $\kappa$ B nicht für die beobachteten Änderungen bezüglich der Zellproliferation und der durch Phenobarbital induzierten Hemmung der Apoptose erforderlich ist. Zusammengenommen ließ sich nach Auswertung der verfügbaren Literatur keine eindeutige Rolle für oxidativen Stress im Wirkmechanismus für die Phenobarbital-induzierte Lebertumorbildung nachweisen, so dass diesem eher eine untergeordnete Rolle zugesprochen werden kann (Elcombe *et al.*, 2014).

Ein klarer Einfluss in Bezug auf die Phenobarbital-induzierte Tumorgenese konnte dagegen wiederum für  $\beta$ -Catenin gefunden werden (Rignall *et al.*, 2011; Aydinlik *et al.*, 2001). So konnte gezeigt werden, dass Phenobarbital während der Promotionsphase jene Hepatozyten selektiert, die aktivierende Mutationen des *Ctnnb1*-Gens tragen, welches für eine mutierte und

konstitutiv aktive Version von  $\beta$ -Catenin kodiert (Aydinlik *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang wiesen etwa 80 % der aufgetretenen Lebertumoren in mit Diethylnitrosamin und anschließend mit Phenobarbital behandelten Mäusen  $\beta$ -Catenin-Mutationen auf.

Es gibt Hinweise darauf, dass eine anomale  $\beta$ -Catenin-abhängige Signalgebung sowohl zu einer erhöhten Zellproliferation führt als auch gleichzeitig eine Inhibition der Apoptose zur Folge hat, wodurch den betroffenen Hepatozyten ein selektiver Wachstumsvorteil verschafft werden kann (Shang *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2014). Die Bedeutung von  $\beta$ -Catenin für die Phenobarbital-induzierte Tumorpromotion wird zusätzlich dadurch bestätigt, dass ein Knockout des für  $\beta$ -Catenin kodierenden Gens *Ctnnb1* die Phenobarbital-vermittelte Tumorpromotion vollständig eliminiert (Rignall *et al.*, 2011). Allerdings konnte bei diesen Mäusen noch eine Phenobarbital-bedingte Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme festgestellt werden (Braeuning *et al.*, 2009; Braeuning *et al.*, 2011), was den Schluss nahelegt, dass zwischen der Enzyminduktion und der durch Phenobarbital hervorgerufenen Tumorpromotion keine hinreichende Korrelation besteht.

Obwohl Phenobarbital aus zahlreichen Studien als nicht-genotoxisches Hepatokarzinogen bei Nagetieren (Whysner *et al.*, 1996; Braeuning *et al.*, 2014) bekannt ist, gibt es Bedenken hinsichtlich der Relevanz dieser tumorpromovierenden Wirkung für den Menschen. Da humane Hepatozyten weder eine Phenobarbital-bedingte erhöhte Zellproliferation aufweisen (Yamada *et al.*, 2015; Okuda *et al.*, 2017) noch auf die antiapoptotischen Eigenschaften von Phenobarbital (Hasmall und Roberts, 1999) ansprechen, kam das Gremium um Elcombe *et al.* (2014) zu dem Schluss, dass der Wirkmechanismus für die Lebertumorbildung bei Nagern für den Menschen wahrscheinlich als nicht qualitativ plausibel angesehen werden kann. Diese Schlussfolgerung wird zusätzlich durch Daten aus einer Reihe epidemiologischer Studien gestützt, welche wenig Anhaltspunkte dafür liefern, dass aufgrund einer chronischen Exposition gegenüber Phenobarbital eindeutige Hinweise auf ein erhöhtes Lebertumorrisiko bestehen (Friedman *et al.*, 2009; IARC, 2001; La Vecchia und Negri, 2014; Olsen *et al.*, 1989; Selby *et al.*, 1989; Whysner *et al.*, 1996; Elcombe *et al.*, 2014).

Jedoch muss festgehalten werden, dass für verschiedene CAR-Aktivatoren unterschiedliche Wirkmechanismen bestehen können, so dass diese Schlussfolgerung für Phenobarbital nicht grundsätzlich für die Tumorrelevanz beim Menschen für andere CAR-abhängige Substanzen herangezogen werden kann. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Ratte gegenüber einer Phenobarbital-induzierten Tumorbildung resistenter zu sein scheint als die Maus (Rossi *et al.*, 1977; Butler, 1978; Hagiwara *et al.*, 1999; Whysner *et al.*, 1996; Elcombe *et al.*, 2014), wohingegen bei einigen anderen CYP2B-Enzyminduktoren wie Pyrethrin oder Metofluthrin, welche einen ähnlichen Wirkmechanismus für die Lebertumorbildung wie Phenobarbital zu haben scheinen, jedoch Lebertumoren bei der Ratte und nicht bei der Maus beobachtet wurden (Osimitz und Lake, 2009; Yamada *et al.*, 2009). Zusammenfassend zeigen auch die Ergebnisse von Buchmann *et al.* (1999), dass die primären Signale, welche Zellen letztendlich

vor Apoptose schützen, für verschiedene in der Studie getestete antiapoptotische Wirkstoffe unterschiedlich sein können. Somit kann der Wirkmechanismus für die als vom Phenobarbital-Typ bezeichneten nicht-dioxinartigen PCBs möglicherweise ein anderer sein als jener von Phenobarbital, wodurch auch eine Relevanz der NDL-PCBs für den Menschen nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann und weiterer Untersuchungen bedarf.

Entgegen des beschriebenen Wirkmechanismus für die durch Phenobarbital induzierte Hepatokarzinogenese wurde für PXR-Aktivatoren wie Dexamethason mangels geeigneter Literaturdaten kein entsprechender Wirkmechanismus von Elcombe *et al.* (2014) etabliert. Gerade bezüglich der Kanzerogenese bzw. der Bildung von Lebertumoren sind für Dexamethason nur wenige Angaben in der Literatur zu finden, jedoch liegen einige Daten zur Hemmung der Apoptose vor. So konnten auch Zucchini *et al.* (2005) in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zeigen, dass eine Vorbehandlung mit Dexamethason in primären Rattenhepatozyten eine nahezu vollständige Unterdrückung der Staurosporin-induzierten Apoptose zur Folge hatte. Während eine 100 nM Staurosporin-Exposition die Überlebensfähigkeit der Hepatozyten auf 44 % reduzierte, konnte eine Vorbehandlung mit 10–50  $\mu$ M Dexamethason ein Absinken des Überlebens der Hepatozyten entsprechend verhindern. Darüber hinaus verringerte die Vorinkubation der Zellen mit Dexamethason auch die durch Staurosporin induzierten Apoptose-bedingten morphologischen Veränderungen, die durch Vakuolisierung im Zytoplasma sowie Kondensation des Zytoplasmas oder des Zellkerns gekennzeichnet sind (Zucchini *et al.*, 2005). Des Weiteren konnten Bailly-Maitre *et al.* (2001) zeigen, dass eine Behandlung mit Dexamethason zudem die Anfälligkeit für spontane Apoptose in primären Rattenhepatozyten senken kann. Diesbezüglich zeichnete sich die Dexamethason-bedingte verlängerte Lebensfähigkeit der Hepatozyten sowohl durch eine verringerte Anzahl an TUNEL-positiven apoptotischen Kernen als auch durch die Inhibition der DNA-Fragmentierung aus (Bailly-Maitre *et al.*, 2001).

Abgesehen von einer Hemmung der Apoptose in primären Rattenhepatozyten konnte auch in mehreren Rattenhepatom-Zelllinien eine entsprechende Inhibition nachgewiesen werden. So konnten Buchmann *et al.* (1999) zeigen, dass die TGF- $\beta$ -induzierte Apoptose bei einer zeitgleichen Behandlung mit Phenobarbital in FTO-2B-Rattenhepatomzellen um 50 % inhibiert wurde, wohingegen mit Dexamethason sogar eine 80 %-ige Hemmung der DNA-Fragmentierung erreicht wurde. Zusätzlich konnten auch Scoltock *et al.* (2007) mittels durchflusszytometrischer Analyse nachweisen, dass eine Vorbehandlung mit Dexamethason die UV-induzierte Apoptose in Rattenhepatomzellen (HTC) entsprechend wieder in Richtung des Ausgangsniveaus zurückdrängt. Im Gegensatz dazu verhinderte eine Dexamethason-Vorbehandlung das Fas-Ligand-bedingte Auftreten von Apoptosen in diesen Hepatomzellen jedoch nicht. Interessanterweise unterscheiden sich diese Ergebnisse von jenen von Oh *et al.* (2006), die hingegen berichteten, dass primäre Hepatozyten durch Hochregulierung von cFLIP

(cellular FLICE-like inhibitory protein) durch hohe Dosen von Dexamethason vor Fas-Ligand-induzierter Apoptose geschützt werden können. Die Tatsache, dass sich die Zelltypen von normalen zu Krebszellen unterscheiden, bietet eine mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede. Zur weiteren Klärung, ob sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Apoptoseweg durch die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen eine Beeinträchtigung erfahren, sollte in den nachfolgenden Kapiteln zusätzlich der Einfluss auf verschiedene Caspasen analysiert werden, die entweder im intrinsischen oder im extrinsischen Apoptoseweg selektiv aktiviert werden.

Bezüglich einer durch Dexamethason verursachten Apoptosehemmung konnte des Weiteren auch von Yamamoto *et al.* (1998) eine dosisabhängige Inhibition sowohl der spontanen als auch der durch TGF- $\beta_1$ -induzierten Apoptose in zwei weiteren Rattenhepatom-Zelllinien (McA-RH7777 und McA-RH8994) beobachtet werden. Ein vorherrschender Wirkmechanismus für die Dexamethason-bedingte Inhibition der Apoptose scheint hierbei eine erhöhte Expression des Apoptoserepressors Bcl-xL zu beinhalten. Sowohl in primären Rattenhepatozyten als auch in Rattenhepatomzellen konnte eine erhöhte mRNA-Expression sowie eine erhöhte Bcl-xL-Proteinexpression gefunden werden. So wirkte sich Dexamethason in primären Rattenhepatozyten bei einer Behandlungsdauer von 4 Stunden noch moderat auf Bcl-xL aus, während eine längere Exposition (24 h) eine signifikante Induktion der Bcl-xL-mRNA-Expression verursachte (Zucchini *et al.*, 2005). Darüber hinaus führte Dexamethason zu einem parallelen Anstieg des Expressionsniveaus sowohl von Bcl-xL- als auch von CYP3A23-Proteinen. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse von Zucchini *et al.* (2005), dass Dexamethason primäre Rattenhepatozyten durch Hochregulierung von Bcl-xL vor Staurosporin-induzierter Apoptose schützen kann. Außerdem verzögerte Dexamethason die spontane Apoptose in primären Rattenhepatozyten, indem es die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-xL erhöhte, während die Expression der proapoptotischen Proteine Bcl-xS oder Bad hingegen nicht nachgewiesen werden konnte oder unverändert blieb (Bailly-Maitre *et al.*, 2001).

Des Weiteren konnte eine Dexamethason-bedingte Erhöhung der Bcl-xL-Expression auch in mehreren Rattenhepatom-Zelllinien nachgewiesen werden (Yamamoto *et al.*, 1998; Buchmann *et al.*, 1999; Scoltock *et al.*, 2007). So führte die Applikation von Dexamethason in FTO-2B-Hepatomzellen zu einem zeitabhängigen Anstieg der Bcl-xL-Spiegel, der 4 h nach Zugabe zu den Kulturen ein Maximum erreichte (dreifacher Anstieg) und über den gesamten Beobachtungszeitraum von 24 h erhöht blieb (Buchmann *et al.*, 1999). Auch in der Rattenhepatom-Zelllinie HTC bewirkte die Vorbehandlung mit Dexamethason einen zeitabhängigen Anstieg sowohl der Bcl-xL-mRNA als auch des Proteins (Scoltock *et al.*, 2007).

Somit scheint Bcl-xL eine wesentliche Rolle bei der durch Dexamethason induzierten Hemmung der Apoptose zu spielen. In diesem Punkt unterscheidet sich der

Wirkmechanismus der Dexamethason-bedingten Inhibition der Apoptose von jenem von Phenobarbital, da für Phenobarbital hingegen kein durchgehender bzw. vorherrschender Einfluss auf Bcl-xL in der Literatur gefunden werden konnte. Zwar konnten Zucchini *et al.* (2005) eine geringe Wirkung von Phenobarbital auf Bcl-xL in primären Rattenhepatozyten detektieren, jedoch wurde die Bcl-xL-Expression in FTO-2B-Hepatomzellen durch eine Phenobarbitalbehandlung nicht beeinflusst (Buchmann *et al.*, 1999). Auch von Elcombe *et al.* (2014) wurde keine entsprechende Abhängigkeit von Bcl-xL in Bezug auf den Wirkmechanismus für die Phenobarbital-bedingte Bildung von Lebertumoren berücksichtigt.

Abgesehen davon scheinen sich die beiden Substanzen noch in einem weiteren Punkt zu unterscheiden. Im Gegensatz zu Phenobarbital konnte für Dexamethason auch ein Einfluss auf die Apoptose in humanen Hepatozyten gefunden werden. Dies lässt darauf schließen, dass Dexamethason auch stärkere Auswirkungen auf die Kanzerogenese beim Menschen haben könnte. So konnten Zucchini *et al.* (2005) nachweisen, dass eine Behandlung von primär kultivierten humanen Hepatozyten mit Dexamethason diese vor einer durch Staurosporin induzierten Apoptose schützen kann. Die durch Dexamethason bedingte antiapoptotische Kapazität korrelierte dabei mit der Induktion des Apoptosehemmers Bcl-2 sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinniveau. Darüber hinaus ging die erhöhte Bcl-2-Expression mit einer Hochregulierung von CYP3A4 in humanen Hepatozyten einher, wohingegen keine Auswirkungen von Dexamethason auf das Expressionsniveau von Bax detektiert werden konnten (Zucchini *et al.*, 2005). Des Weiteren konnten Bailly-Maitre *et al.* (2001) zeigen, dass Dexamethason zudem in der Lage ist, die spontane Apoptose in primären humanen Hepatozyten zu hemmen. Hierbei verlängerte Dexamethason die Überlebensfähigkeit der Zellen, indem sowohl das antiapoptotische Protein Bcl-2 hochreguliert als auch die Entwicklung einer apoptotischen Morphologie inhibiert wurde.

Abgesehen von diesen Faktoren wurde für die Dexamethason-bedingte Hemmung der Apoptose zusätzlich ein Wirkmechanismus von Dexamethason über die Regulation von P-Glykoprotein (P-gp) identifiziert. So konnten Zhao *et al.* (2015) zeigen, dass eine Behandlung mit Dexamethason humane Leberzellen (L-02) vor einer durch TRAIL (*Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*) induzierten Apoptose schützt, indem die Expression von P-Glykoprotein Dexamethason-abhängig hochreguliert wird. Bei P-Glykoprotein handelt es sich um einen primär aktiven Effluxtransporter, welcher als Transportbarriere gegen zahlreiche Substanzen, darunter insbesondere Xenobiotika, fungiert (Ruefli und Johnstone, 2003). Zusätzlich zu seiner Schutzfunktion und Rolle bei der Entgiftung ist P-Glykoprotein jedoch auch dafür bekannt, die zelluläre Akkumulation von chemotherapeutischen Wirkstoffen zu reduzieren (Ambudkar *et al.*, 1999) bzw. eine entscheidende Rolle bei der Inhibition der Apoptose zu spielen (Ruefli *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2015).

Die Ergebnisse aus immunzytochemischen, durchflusszytometrischen und Western Blot-Analysen sowie qRT-PCR zeigen, dass Dexamethason die mRNA- und Proteinspiegel von P-

Glykoprotein in humanen L-02-Leberzellen zeit- und dosisabhängig (1 – 10  $\mu$ M) hochreguliert, woraus ein signifikant niedrigerer Apoptosespiegel in der Gruppe mit Dexamethason-vorbehandelten Zellen resultierte als jener in der Kontrollgruppe (Zhao *et al.*, 2015). Die Behandlung mit Tariquidar, einem P-Glykoprotein-Inhibitor, verringerte die antiapoptotischen Wirkungen von Dexamethason, was den Schluss nahelegt, dass die Dexamethason-bedingte Apoptosehemmung in humanen L-02-Leberzellen mit einer Hochregulierung der Expression von P-Glykoprotein verbunden ist.

Glukokortikoide wie Dexamethason werden häufig bei der Therapie von soliden Tumoren verabreicht, um die Nebenwirkungen einer Chemotherapie zu lindern. In Anbetracht der antiapoptotischen Wirkung von Dexamethason in verschiedenen Zelltypen stellt sich jedoch die Frage, ob sich diese gängige Verabreichung auch nachteilig auf die Tumorentwicklung auswirken kann. Tatsächlich beschreiben Sui *et al.* (2006), dass Dexamethason die Wirksamkeit von Paclitaxel, einem der Standardmedikamente in der Krebstherapie, bei der Behandlung von Brust- und Ovarial-Xenotransplantat-Tumoren beeinträchtigt. Abgesehen davon konnte auch in einer weiteren Studie von Herr und Pfitzenmaier (2006) eine schützende Wirkung von Glukokortikoiden auf solide Tumoren belegt werden.

In einer Untersuchung zum Einfluss von Dexamethason auf Brustkrebs implantierten Obradović *et al.* (2019) Mäusen humane Brustkrebstumoren und wiesen so in den Metastasen von Brustkrebs-Patientinnen eine deutlich erhöhte Dichte an Glukokortikoid-Rezeptoren im Vergleich zum Primärtumor nach. Behandelten sie die entsprechenden Mäuse mit Dexamethason, förderte dies sowohl die Heterogenität der Tumorzellen als auch die Metastasierung (Bildung und Wachstum). Zudem wurde die Wirksamkeit des Medikaments Paclitaxel anhand einer parallelen Behandlung mit Dexamethason herabgesetzt. Maßgeblich beteiligt an der erhöhten Anzahl der Glukokortikoid-Rezeptoren scheint in diesem Tumormodell die Tyrosinkinase ROR1 zu sein. Eine entsprechende Ablation von ROR1 reduzierte das Wachstum von Metastasen und korrelierte weiterhin mit einem verlängerten Überleben in präklinischen Modellen (Obradović *et al.*, 2019).

Auch Wu *et al.* (2004) konnten zeigen, dass eine Dexamethason-Vorbehandlung von Brustkrebszelllinien die Chemotherapie-induzierte Apoptose hemmt und mit der Transkriptionsinduktion von SGK-1 (*Serum and GC-inducible protein kinase-1*) und MKP-1 (*Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1*) assoziiert ist. Die Verwendung von siRNA zur Verringerung der SGK-1- und MKP-1-Expression kehrte die antiapoptotischen Wirkungen der Dexamethason-Behandlung wieder entsprechend um (Wu *et al.*, 2004).

Zusammengenommen legen diese Daten nahe, dass eine Behandlung mit Dexamethason das Überlebenssignal durch direkte Aktivierung von Genen reguliert, die für Proteine kodieren, die die Anfälligkeit für Apoptose verringern. Angesichts der weitverbreiteten klinischen Verabreichung von Dexamethason im Zuge einer Chemotherapie ist das Verständnis der Mechanismen von entscheidender Bedeutung, um ein optimales therapeutisches Ansprechen

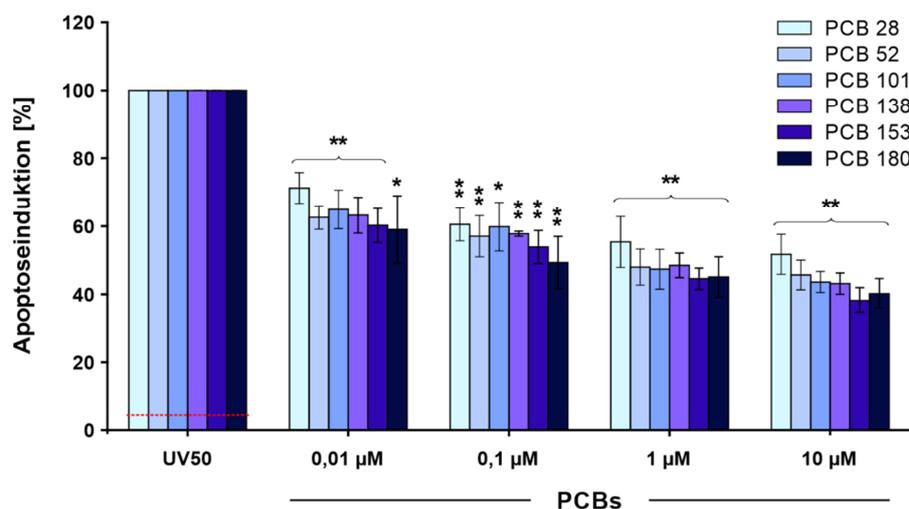
zu erzielen. Die oben genannten Beispiele veranschaulichen, dass sich die Hemmung der Apoptose durch Dexamethason nachteilig auf die Tumorentwicklung auswirken kann, was darauf hindeutet, dass bei der Verwendung von Glukokortikoiden während einer Krebstherapie Vorsicht geboten ist.

Einen weiteren Faktor, der bei der Apoptosehemmung durch Dexamethason eine entscheidende Rolle einnimmt, stellt NF- $\kappa$ B dar. Die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors, welcher an der antiapoptotischen Regulation in verschiedenen Zellsystemen beteiligt ist, wurde von Buchmann *et al.* (1999) anhand eines *Electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) analysiert. So konnte in FTO-2B-Hepatomzellen, ähnlich wie zuvor bereits für Phenobarbital gezeigt, eine verstärkte NF- $\kappa$ B-Aktivität infolge einer Behandlung mit Dexamethason nachgewiesen werden. Auch Evans-Storms und Cidlowski (2000) fanden heraus, dass NF- $\kappa$ B bei der Regulierung der Apoptose in HTC-Zellen eine wichtige Funktion zukommt, da eine Abnahme des Transkriptionsfaktors mit der Induktion des Zelltods in diesen Zellen verbunden ist. Eine zusätzliche Behandlung der HTC-Zellen mit Dexamethason blockierte diesen Verlust von NF- $\kappa$ B effektiv, was darauf hindeutet, dass die durch Serumentzug induzierte Apoptose über die Regulation von NF- $\kappa$ B unterdrückt werden kann. Diese Hypothese wird darüber hinaus durch Transfektionsexperimente gestützt, welche zeigen, dass die Expression eines Repressors von NF- $\kappa$ B die Fähigkeit von Dexamethason aufheben kann, HTC-Zellen vor Apoptose zu schützen (Evans-Storms und Cidlowski, 2000). Somit scheint NF- $\kappa$ B eine wesentliche Rolle bei der durch Dexamethason bedingten Hemmung der Apoptose zu spielen und sich in diesem Punkt vom Wirkmechanismus von Phenobarbital zu unterscheiden, da für Phenobarbital hingegen kein vorherrschender Einfluss von NF- $\kappa$ B auf die Apoptosehemmung gefunden werden konnte (Tharappel *et al.*, 2008).

Im Folgenden sollte untersucht werden, inwiefern auch die jeweiligen in unserer Arbeit verwendeten nicht-dioxinartigen PCBs eine antiapoptotische Funktion in primären Rattenhepatozyten einnehmen. Zusätzlich sollte verglichen werden, ob die zugrunde liegenden Mechanismen ausschließlich jenen von Phenobarbital ähneln oder ob diese auch mit den apoptosehemmenden Wirkungen von PXR-Aktivatoren wie Dexamethason in Verbindung gebracht werden können.

### 5.7.1.2 Einfluss der NDL-PCBs auf die UV-induzierte Apoptose in primären Rattenhepatozyten

Der Einfluss der nicht-dioxinartigen PCBs auf die UV-induzierte Apoptose in primären Rattenhepatozyten wurde wie bereits in der vorangegangenen Versuchsreihe ermittelt, indem Hepatozytenkulturen nach Bestrahlung mit UV-Licht ( $50 \text{ J/m}^2$ ) mit den NDL-PCBs 28, 52, 101, 138, 153 und 180 in Konzentrationen zwischen  $0,01$  und  $10 \text{ }\mu\text{M}$  für  $24 \text{ h}$  inkubiert wurden und die Zellkernmorphologie nach Färbung mit DAPI fluoreszenzmikroskopisch analysiert wurde. Von jeder Konzentrationsstufe eines jeden PCBs wurden  $6$  individuelle Kulturschalen aus drei unterschiedlichen Perfusionen untersucht und die mittlere Rate apoptotischer Zellen in Relation zum Auftreten von Apoptosen in nicht mit NDL-PCBs behandelten Kulturen bestimmt. Dabei konnte, wie auch bereits bei Phenobarbital und Dexamethason, ein hemmender Einfluss der NDL-PCBs auf die Apoptoseinduktion durch UV-Strahlung beobachtet werden (Abb. 50).



**Abbildung 50: Einfluss der NDL-PCBs auf die durch UV-Strahlung induzierte Apoptose in primären Rattenhepatozyten.** Quantitative Analyse der Apoptoseinduktion durch UV-Bestrahlung ( $50 \text{ J/m}^2$ ) in primären Rattenhepatozyten nach 24-stündiger Inkubation mit den NDL-PCBs 28, 52, 101, 138, 153 bzw. 180 in verschiedenen Konzentrationen. Die mittels fluoreszenzmikroskopischer Auszählung DAPI-gefärbter Nuklei ermittelten Apoptoseraten in den einzelnen Konzentrationsstufen sind prozentual zur Apoptoserate nach UV-Bestrahlung sowie Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO (UV50) dargestellt. MW  $\pm$  SD,  $n=3$ , statistischer Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ . Die basale Apoptoserate in nicht mit UV behandelten Zellkulturen in Relation zu den UV-behandelten Kulturen ist mittels der roten Linie gekennzeichnet.

Mit der Höhe der eingesetzten NDL-PCB-Konzentration wuchs dabei wie auch bei Phenobarbital und Dexamethason der Grad der Hemmung. So betrug in der niedrigsten getesteten Konzentration von  $0,01 \text{ }\mu\text{M}$  die Rate apoptotischer Zellen je nach untersuchtem

NDL-PCB im Mittel zwischen 60 % und 73 % der Rate in den nur mit der Lösungsmittelkontrolle inkubierten Zellkulturen, während die 1.000-fach höhere Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Hemmungen der Apoptose auf 40 bis 58 % der Referenzrate induzierte. Vergleicht man die Höhe sowie die konzentrationsabhängige Entwicklung der NDL-PCB-bedingten Apoptosehemmung mit jener von Phenobarbital oder Dexamethason, so fällt auf, dass die nicht-dioxinartigen PCBs die Apoptoseinduktion in geringerem Maße beeinflussen und auch in der höchsten eingesetzten Konzentration nicht in gleicher Weise auf das Grundniveau zurückdrängen können wie die beiden anderen Substanzen.

Innerhalb der Gruppe der untersuchten NDL-PCBs variierten die ermittelten Hemmungsraten in den einzelnen Konzentrationsstufen um bis zu 15 Prozentpunkte. Dabei konnte allgemein eine Tendenz bezüglich einer Abhängigkeit des Inhibitionsvermögens der NDL-PCBs von ihrem Chlorierungsgrad festgestellt werden, so bewirkte etwa PCB 28 in den Konzentrationen 0,01  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  eine statistisch signifikant kleinere Hemmung als PCB 153. Dass die Stärke der Apoptosehemmung weitgehend dem Chlorierungsgrad der PCBs folgt, legt den Schluss nahe, dass in gewisser Weise eine Korrelation zwischen der Hemmung der Apoptose und der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme besteht. Auch hier folgte die Stärke der Induktion weitgehend dem Chlorierungsgrad, mit Ausnahme von PCB 153, welches die jeweiligen Enzyme etwas stärker induzierte als das höher chlorierte PCB 180. Bei der Hemmung der Apoptose hingegen scheinen jedoch keine wesentlichen Unterschiede zwischen diesen beiden PCBs zu bestehen.

Hinweise aus der Literatur legen jedoch auch nahe, dass die Korrelation zwischen der Enzyminduktion und der Hemmung der Apoptose unvollständig ist und aus einer Aktivierung spezifischer fremdstoffmetabolisierender Enzyme nicht auf eine entsprechende Tumorpromotion bzw. Hemmung der Apoptose geschlossen werden kann. So konnten James und Roberts (1996) beispielsweise zeigen, dass eine Behandlung mit Phenobarbital in syrischen Hamster- sowie Meerschweinchenhepatozyten zwar zu einer entsprechenden CYP2B-Enzyminduktion führt, sich diese beiden Spezies gegenüber einer Phenobarbital-bedingten antiapoptotischen Wirkung hingegen jedoch als resistent erweisen. Auch humane Hepatozyten sprechen nicht auf die antiapoptotischen Eigenschaften von Phenobarbital an (Hasmall und Roberts, 1999), obwohl in diesen wie auch bei Nagetieren fremdstoffmetabolisierende Enzyme induziert werden konnten (Hirose *et al.*, 2009).

Dennoch scheint zwischen diesen beiden Prozessen ein Zusammenhang zu bestehen, da viele Induktoren fremdstoffmetabolisierender Enzyme nachweislich auch tumorpromovierende Eigenschaften aufweisen (Hemming *et al.*, 1993; Bursch *et al.*, 1984). Möglicherweise ist die Korrelation zwischen der Enzyminduktion und der Hemmung der Apoptose sowie die Abhängigkeit dieser beiden Prozesse vom Chlorierungsgrad der PCBs in der jeweiligen Aktivierung des nukleären Rezeptors CAR begründet. So konnte belegt werden, dass CAR sowohl für die Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme als auch für eine tumor-

promovierende Wirkung vonnöten ist (Wei *et al.*, 2000; Ueda *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2004). Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass auch der Pregnan-X-Rezeptor eine Rolle bei der durch die NDL-PCBs vermittelten Inhibition der Apoptose spielen könnte.

Nicht-dioxinartige PCBs werden oft als Substanzen vom Phenobarbital-Typ bezeichnet, so dass häufig davon ausgegangen wird, dass diese PCBs ähnliche Wirkungen wie Phenobarbital aufweisen. Es wird daher oftmals vermutet, dass die NDL-PCB-vermittelte Tumorpromotion bzw. Hemmung der Apoptose ebenfalls über den für Phenobarbital bekannten Wirkmechanismus verläuft. Dieser beinhaltet beispielsweise eine Aktivierung des nukleären Rezeptors CAR mit der entsprechenden Induktion von Cytochrom-P450-Enzymen, eine erhöhte Zellproliferation sowie neben der Hemmung der Apoptose auch spezifische epigenetische Veränderungen bzw. die Inhibition der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions (Elcombe *et al.*, 2014). Jedoch wurde für die NDL-PCBs bereits bei der CYP3A1-Enzyminduktion ersichtlich, dass diese zwar vornehmlich über den CAR reguliert, jedoch zu einem geringeren Teil auch über den PXR vermittelt wird. Es ist also nicht auszuschließen, dass die Inhibition der Apoptose auch teilweise dem PXR zugesprochen werden kann. Der Wirkmechanismus von PXR-Agonisten wie Dexamethason umfasst hierbei unter anderem die erhöhte Expression der Apoptoserepressoren Bcl-xL bzw. Bcl-2, die Inhibition der Apoptose (auch in humanen Hepatozyten), eine Steigerung der Expression von P-Glykoprotein sowie eine verstärkte NF- $\kappa$ B-Aktivität (Zucchini *et al.*, 2005; Bailly-Maitre *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2015; Buchmann *et al.*, 1999).

Angesichts der lebenslangen Exposition der menschlichen Bevölkerung gegenüber den nicht-dioxinartigen PCBs sowie der daraus resultierenden zahlreichen nachteiligen Effekte ist es notwendig, näheren Aufschluss über die Wirkmechanismen der NDL-PCBs zu erhalten und diese bei einer Risikobewertung dieser Substanzen zu berücksichtigen. Bezüglich der Kanzerogenität von polychlorierten Biphenylen liegen bei Versuchstieren seit längerer Zeit hinreichende Nachweise vor. So haben bereits mehrere Untersuchungen gezeigt, dass kommerzielle technische PCB-Gemische wie Aroclor 1260, Aroclor 1254 oder Kanechlor 500 bzw. einzelne PCB-Kongeneren nach Initiierung mit einem genotoxischen Karzinogen als Lebertumorpromotoren bei Nagetieren fungieren (Buchmann *et al.*, 1991; Hemming *et al.*, 1993; Knerr und Schrenk, 2006; IARC, 2016). Allerdings kann aus diesen Untersuchungen nicht daraus geschlossen werden, zu welchen Teilen die jeweiligen Wirkungen auf DL- oder auf NDL-PCBs zurückzuführen sind, da es aufgrund des gleichzeitigen Vorhandenseins dieser Verbindungen sowie zusätzlichen Verunreinigungen mit Dibenzodioxinen und Dibenzofuranen in technischen Gemischen nicht möglich ist, die spezifischen Wirkungen der NDL-PCBs von jenen dioxinartiger Verbindungen zu unterscheiden.

Aus diesem Grund ist es unerlässlich, spezifische Untersuchungen zu einer möglichen tumorpromovierenden Wirkung nicht mit technischen Gemischen, sondern einzelnen nicht-dioxinartigen PCB-Kongeneren durchzuführen. So konnten in Nagetierstudien nach

Applikation von verschiedenen Initiatoren auch für einige NDL-PCB-Kongenere tumorpromovierende Effekte demonstriert werden, wobei sich hierbei die nicht-dioxinartigen PCB-Kongenere 47, 49, 52 und 153 als tumorpromovierend in der Nagetierleber erwiesen haben (Preston *et al.*, 1985; Buchmann *et al.*, 1991; Hemming *et al.*, 1993). Beim Vergleich mit den entsprechenden dioxinartigen Verbindungen fällt jedoch auf, dass die NDL-PCBs in dieser Hinsicht um einiges weniger wirksam zu sein scheinen als die dioxinartigen Kongenere (Buchmann *et al.*, 1986; Hemming *et al.*, 1993).

Von den nicht-dioxinartigen Kongeneren wurde insbesondere das häufig vorkommende PCB 153 eingehend untersucht, so auch in einer Studie von Glauert *et al.* (2008), um zu analysieren, ob das NDL-PCB bei männlichen B6129SF2/J-Mäusen die Aktivität von *N*-Nitrosodiethylamin-initiierten Lebertumoren beeinflusst. Als Folge der Behandlung mit dem nicht-dioxinartigen Kongener war die Inzidenz von hepatozellulären Tumoren bei Wildtyp-Mäusen, die mit PCB 153 behandelt wurden, gegenüber jenen Mäusen, die lediglich Maiskeimöl erhielten, entsprechend erhöht. Auch in Strathmann *et al.* (2006) wiesen Mäuse nach zusätzlicher Gabe des NDL-PCBs 153 im Anschluss an eine einmalige Verabreichung von DEN eine gesteigerte Tumoranzahl im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Es liegen jedoch auch Studien in weiblichen Wistar-Ratten vor, in denen weder für das nicht-dioxinartige PCB-Kongener 28 noch für PCB 101 eine entsprechende Wirksamkeit als Lebertumorpromotor gefunden werden konnte (Kunz *et al.*, 2006).

Der Wirkmechanismus in Bezug auf die tumorpromovierenden Effekte der NDL-PCBs umfasst hierbei insbesondere die Unterdrückung der Apoptose in präneoplastischen Zellen, wodurch diesen initiierten Zellen die Möglichkeit eines erleichterten, unkontrollierten Wachstums gegeben wird (Bohnenberger *et al.*, 2001). Des Weiteren zählen beispielsweise sowohl die Induktion von oxidativem Stress sowie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Tharappel *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2014) als auch eine Störung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions (Umannová *et al.*, 2008; Machala *et al.*, 2003) zu den Mechanismen, die nach einer Exposition gegenüber nicht-dioxinartigen PCBs auftreten und eine relevante Rolle bei der tumorpromovierenden Wirkung einnehmen.

Bezüglich der Inhibition der Apoptose konnten auch Bohnenberger *et al.* (2001) in Korrelation mit den Ergebnissen dieser Arbeit nachweisen, dass eine zusätzliche Applikation von nicht-dioxinartigen PCBs eine nahezu vollständige Unterdrückung der durch UV-Strahlung induzierten Apoptose zur Folge hatte. Sowohl PCB 28 als auch die PCB-Kongenere 101 und 187 zeigten nach vorheriger, einmaliger Bestrahlung mit UV-Licht ( $90 \text{ J/m}^2$ ) konzentrationsabhängige, apoptosehemmende Effekte in primären Hepatozyten von männlichen Wistar-Ratten (Bohnenberger *et al.*, 2001). Um näheren Aufschluss über die Wirkmechanismen der NDL-PCB-bedingten Hemmung der Apoptose zu erlangen, analysierten Al-Anati *et al.* (2009) in humanen HepG2-Zellen den Einfluss der nicht-dioxinartigen PCBs 28, 101 und 153 auf die durch Etoposid vermittelte Akkumulation des Tumorsuppressorproteins p53. In diesem

Zusammenhang konnte die Arbeitsgruppe um Al-Anati eine durch die ND-L-PCBs induzierte Phosphorylierung des regulatorischen Proteins Mdm2 (*Murine double minute 2 homolog*) an Ser166 detektieren, was mit einer Verringerung der durch Etoposid induzierten p53-Spiegel sowie einer abgeschwächten p53-Reaktion einherging und woraus letztlich eine entsprechende Inhibition der Apoptose resultierte. Abgesehen von ihren Untersuchungen mit Etoposid konnten Al-Anati *et al.* (2010) mittels durchflusszytometrischer Analyse zudem zeigen, dass auch die Anzahl der durch Benzo[*a*]pyren (BaP) induzierten apoptotischen Zellen nach zusätzlicher Behandlung mit den hoch aufgereinigten ND-L-PCBs 28, 101 und 153 deutlich verringert wurde. Im Gegensatz zu ihrer vorherigen Studie führte die Applikation der nicht-dioxinartigen PCBs jedoch zu einer reduzierten Phosphorylierung von Mdm2 an Ser166, was mit einer daraus resultierenden verstärkten p53-Antwort verbunden war und von daher für gewöhnlich mit einer vermehrten Apoptose assoziiert ist. Um dieser Diskrepanz auf den Grund zu gehen, wurde der Einfluss der ND-L-PCBs auf FoxO3a (*Forkhead box protein O3*) analysiert, da FoxO3a p53 ins Zytoplasma verlagern kann und daher eine entscheidende Funktion bei der ND-L-PCB-bedingten Inhibition der Apoptose einnehmen könnte. Die diesbezüglichen Untersuchungen ergaben eine entsprechend verringerte Menge an phosphoryliertem FoxO3a bei Thr32, so dass diese Daten nahelegen, dass nicht-dioxinartige PCBs die BaP-induzierte Apoptose hemmen können, indem sie eine FoxO3a-abhängige Translokation von p53 in das Zytoplasma verhindern (Al-Anati *et al.*, 2010).

Zusätzlich zum beobachteten Effekt auf p53 wurde wie auch bereits bei Phenobarbital eine Hochregulierung von Gadd45 $\beta$  durch das ND-L-PCB 153 belegt (Kopeck *et al.*, 2010). Diese könnte in Anbetracht dessen, dass Gadd45 $\beta$  als Inhibitor der Apoptose fungieren (Papa *et al.*, 2004) sowie darüber hinaus eine erhöhte Expression von Gadd45 $\beta$  zur Demethylierung von DNA führen kann (Ma *et al.*, 2009), von entsprechender Bedeutung für die Tumorpromotion sein. Eine weitere Rolle bei der ND-L-PCB-bedingten Promotion von Lebertumoren fällt der Inhibition der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions (GJIC) zu, da eine anhaltende Herunterregulierung dieser einen Verlust der tumorsuppressiven Wirkung in den betroffenen Zellen zur Folge hat (Chipman *et al.*, 2003). So konnte eine entsprechende Hemmung der GJIC durch eine Reihe nicht-dioxinartiger PCBs bestätigt werden (Machala *et al.*, 2003; Hamers *et al.*, 2011), welche auf diese Weise den direkten Austausch kleiner Moleküle zwischen benachbarten Zellen verhindern. Dies stellt eine weitere Gemeinsamkeit zum Wirkmechanismus von Phenobarbital dar, da auch nach einer Behandlung mit Phenobarbital eine vergleichbare Verringerung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions detektiert werden konnte (Kolaja *et al.*, 2000).

In epithelialen WB-F344-Zellen der Rattenleber konnten Šimečková *et al.* (2009a) zudem nachweisen, dass das nicht-dioxinartige PCB 153 im Gegensatz zu dioxinartigen Verbindungen nicht nur zu einer vorübergehenden, sondern auch zu einer langanhaltenden Hemmung der GJIC führte. In dem Bestreben, die zugrunde liegenden Mechanismen für die

NDL-PCB-bedingte Inhibition der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions aufzuklären, wurde von der Arbeitsgruppe sowohl der Einfluss auf die Konzentration von Connexin 43 (Cx43) als auch auf die zelluläre Verteilung näher analysiert. Obwohl PCB 153 in der Rattenleber-Epithelzelllinie keine Auswirkungen auf die Cx43-mRNA-Spiegel hatte, ging die PCB-Applikation mit der Herunterregulierung von Cx43-Protein einher, welche auf einen verstärkten proteasomalen und lysosomalen Abbau von Connexin 43 zurückzuführen ist (Šimečková *et al.*, 2009a). Zudem verhinderte das nicht-dioxinartige PCB zum einen den Transport von Connexin 43 zur Plasmamembran und verringerte zum anderen sowohl die Größe als auch die Anzahl von Gap-Junction-Plaques in dieser signifikant. Zusammengekommen scheinen somit mehrere Wirkmechanismen in die durch PCB 153 bedingte Herunterregulierung von Cx43 involviert zu sein und so zu den tumorfördernden Effekten der nicht-dioxinartigen PCBs in Rattenleber-Epithelzellen beitragen zu können.

Da Hinweise darauf existieren, dass eine NDL-PCB-induzierte Störung der Lipidsignalwege mit einer Hemmung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions in Zusammenhang stehen könnte, untersuchten Umannová *et al.* (2008) weiterhin die Auswirkungen von NDL-PCBs auf eine entsprechende Freisetzung des Second Messengers Arachidonsäure. Hierbei induzierten sowohl das NDL-PCB 47 als auch PCB 153 in Rattenleber-Epithelzellen eine massive Freisetzung von Arachidonsäure in dosis- und zeitabhängiger Weise, womit auch die Beeinflussung der Arachidonsäure-Signalwege zu einer kanzerogenen Wirkung der nicht-dioxinartigen PCBs beitragen könnte (Umannová *et al.*, 2008).

Neben ihrer hemmenden Wirkung auf die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions rufen NDL-PCBs zusätzliche Effekte auf membranassoziierte Proteine hervor, die eng mit der Tumorpromotion und -progression zusammenhängen. So wurde von Šimečková *et al.* (2009b) in Rattenleber-Epithelzellen nachgewiesen, dass das nicht-dioxinartige PCB-Kongener 153 über einen allmählichen Abbau die Spiegel mehrerer Proteine von Adherens Junctions senkt, einschließlich E-Cadherin, Plakoglobin und  $\beta$ -Catenin. Des Weiteren wurde festgestellt, dass PCB 153 nach einer Injektion von *N*-Nitrosodiethylamin die Inzidenz von Glutaminsynthetase-positiven Lebertumoren bei männlichen B6129SF2/J-Mäusen erhöht sowie fast 90 % aller Tumoren von mit PCB 153 behandelten Mäusen Mutationen in dem für  $\beta$ -Catenin kodierenden Gen aufwies (Strathmann *et al.*, 2006). Tumoren, die Mutationen von *Ha-ras* und *B-raf* enthielten, waren hingegen selten und unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Behandlungsgruppen.

Diesbezüglich stimmt der Wirkmechanismus von PCB 153 wiederum mit jenem von Phenobarbital überein, da auch Phenobarbital während der Promotionsphase nach solchen Hepatozyten selektiert, die aktivierende Mutationen des für  $\beta$ -Catenin kodierenden Gens tragen (Aydinlik *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang wiesen ebenfalls etwa 80 % der aufgetretenen Lebertumoren in mit Diethylnitrosamin und anschließend mit Phenobarbital behandelten Mäusen  $\beta$ -Catenin-Mutationen auf. In Anbetracht dessen, dass es Hinweise

darauf gibt, dass eine anomale  $\beta$ -Catenin-abhängige Signalgebung sowohl zu einer erhöhten Zellproliferation führt als auch gleichzeitig eine Inhibition der Apoptose zur Folge hat (Shang *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2014), scheint diesbezüglich ein klarer Einfluss auf die NDL-PCB-induzierte Tumorgenese gegeben zu sein.

Abgesehen von diesen Effekten wird insbesondere eine Verkürzung von Telomeren mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht, da eine solche Verkürzung zu einer genetischen Instabilität mit entsprechender Prädisposition für Krebs führen kann (Bailey und Murnane, 2006; Meeker *et al.*, 2004). Um herauszufinden, ob eine längere Behandlung mit NDL-PCBs mit einem störenden Einfluss auf die Telomeraseaktivität oder einer Verringerung der Telomerlänge in Verbindung steht, wurden humane Keratinozyten bis zu 48 Tage lang den nicht-dioxinartigen PCB-Kongeneren 28 oder 52 ausgesetzt (Senthilkumar *et al.*, 2011). Beide PCBs reduzierten die Telomeraseaktivität im Vergleich zur Kontrolle ab dem 18. Tag signifikant, wobei die Telomeraseaktivität bis zum 48. Tag um 30 bis 35 % verringert wurde. Die Telomerlänge wurde von Tag 18 an durch PCB 52 und von Tag 30 an infolge einer Behandlung mit PCB 28 entsprechend verkürzt. So verursachte PCB 52 in den behandelten Zellen an Tag 48 eine Verringerung der mittleren Telomerlänge um 40 %, wohingegen in mit PCB 28 behandelten Zellen lediglich eine Abnahme der mittleren Telomerlänge von ungefähr 10 % nachweisbar war (Senthilkumar *et al.*, 2011). Diese signifikante Hemmung der Telomeraseaktivität und die Verringerung der Telomerlänge durch PCB-Kongeneren legen einen möglichen Wirkmechanismus nahe, durch den diese Verbindungen zum Entstehen von Krebs beitragen können. Hierbei liegen mehrere Mechanismen vor, welchen bei der Verkürzung von Telomeren eine entsprechende Bedeutung zuzuschreiben ist, wobei als einer der identifizierten Hauptfaktoren eine hohe Empfindlichkeit von Telomeren gegenüber oxidativem Stress zu nennen ist (Henle *et al.*, 1999; Oikawa und Kawanishi, 1999).

Zu oxidativem Stress wurde bereits berichtet, dass eine Verabreichung von CYP2B-Induktoren wie Phenobarbital oder NDL-PCBs mit Auswirkungen auf diesen verbunden sein kann, da die Induktion dieser fremdstoffmetabolisierenden Enzyme zu einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in der Nagetierleber führt (Dostalek *et al.*, 2007). So wurde in einer Initiations-Promotions-Studie an weiblichen Sprague-Dawley-Ratten nach Applikation von PCB 153 neben einer Erhöhung der Häufigkeit mehrerer präneoplastischer Herde auch ein signifikanter Anstieg der Bindungsaktivität des auf oxidativen Stress reagierenden Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in der Leber nachgewiesen (Tharappel *et al.*, 2002). Auch Liu *et al.* (2014) beobachteten in BRL-Zellen nach Exposition gegenüber PCB 153 signifikante Veränderungen zwischen der Hochdosisgruppe und der Kontrollgruppe, wobei der NF- $\kappa$ B-p65-Proteingehalt nach Behandlung mit 10  $\mu$ M PCB 153 im Vergleich zur Kontrolle um 61,5 % erhöht war.

Um festzustellen, ob die Aktivierung von NF- $\kappa$ B für die tumorpromovierende Aktivität von PCB 153 erforderlich ist, wurden für die weiteren Untersuchungen Mäuse mit einer Deletion der

p50-Untereinheit von NF- $\kappa$ B herangezogen (Lu *et al.*, 2004; Glauert *et al.*, 2008). Ein Vergleich der Wirkungen von PCB 153 in Wildtyp-Mäusen mit jenen Mäusen, denen die NF- $\kappa$ B-p50-Untereinheit fehlt, deutete auf eine entsprechende Beteiligung von NF- $\kappa$ B an den durch PCB 153 herbeigeführten apoptotischen Veränderungen sowie der modulierten Zellproliferation hin (Lu *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde von Glauert *et al.* (2008) in diesem Zusammenhang nachgewiesen, dass die Deletion der p50-Untereinheit von NF- $\kappa$ B zudem die tumorpromovierende Aktivität von PCB 153 hemmt, da sowohl die Tumorinzidenz als auch das Volumen der Glutamin-Synthetase-positiven Tumoren in p50<sup>-/-</sup>-Mäusen erniedrigt waren sowie zusätzlich die durch PCB 153 vermittelte Induktion der Zellproliferation in diesen Mäusen inhibiert wurde. Zusammengenommen implizieren diese Daten eine bedeutende Rolle für die durch oxidativen Stress vermittelte Aktivierung von spezifischen Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B für die NDL-PCB-bedingte Kanzerogenese (Glauert *et al.*, 2008).

Während eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B eine entscheidende Rolle bei der NDL-PCB-vermittelten Tumorpromotion einnimmt, weicht der Wirkmechanismus nicht-dioxinartiger PCBs in diesem Zusammenhang vom Wirkmechanismus von Phenobarbital ab und ähnelt eher jenem von Dexamethason. Zwar konnte für beide Substanzen eine verstärkte NF- $\kappa$ B-Aktivität infolge einer Behandlung mit Phenobarbital oder Dexamethason nachgewiesen werden (Calfee-Mason *et al.*, 2002; Buchmann *et al.*, 1999), jedoch konnte für Phenobarbital gezeigt werden, dass NF- $\kappa$ B nicht für die beobachteten Veränderungen bezüglich der Zellproliferation oder der durch Phenobarbital induzierten Hemmung der Apoptose erforderlich ist (Tharappel *et al.*, 2008). Für Dexamethason hingegen konnte ein entscheidender Einfluss von NF- $\kappa$ B auf die Inhibition der Apoptose detektiert werden, da die Expression eines Repressors von NF- $\kappa$ B die Fähigkeit von Dexamethason entsprechend aufheben konnte, HTC-Zellen vor Apoptose zu schützen (Evans-Storms und Cidlowski, 2000). Dies lässt darauf schließen, dass der Wirkmechanismus für die nicht-dioxinartigen PCBs auch einige Gemeinsamkeiten mit jenem von Dexamethason aufweist und der Pregnan-X-Rezeptor ebenfalls eine Rolle bei der NDL-PCB bedingten Tumorpromotion bzw. Hemmung der Apoptose spielen könnte.

Eine weitere Gemeinsamkeit zum Wirkmechanismus von Dexamethason konnte zudem in Bezug auf eine gesteigerte Induktion des Apoptoserepressors Bcl-2 gefunden werden. So ging die um 75 % verringerte Anzahl Benzo[a]pyren-induzierter apoptotischer HepG2-Zellen infolge einer zusätzlichen Behandlung mit PCB 101 zugleich mit erhöhten Bcl-2-Spiegeln einher (Al-Anati *et al.*, 2010). Auch Zucchini *et al.* (2005) konnten nachweisen, dass die Dexamethason-bedingte antiapoptotische Kapazität in humanen Hepatozyten mit der Induktion des Apoptosehemmers Bcl-2 sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinniveau korrelierte. Angesichts dessen, dass für Dexamethason auch ein Einfluss auf die Apoptose in humanen Hepatozyten gefunden werden konnte und der Wirkmechanismus der NDL-PCB-bedingten Tumorpromotion in Bezug auf Bcl-2 und NF- $\kappa$ B eher jenem von Dexamethason als

dem von Phenobarbital ähnelt, kann ein möglicher Einfluss der nicht-dioxinartigen PCBs auf die Kanzerogenese beim Menschen nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Von der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) wurde 2016 der Schluss gezogen, dass für die Kanzerogenität von polychlorierten Biphenylen beim Menschen ausreichend Belege vorliegen. Die Korrelation zwischen einer Exposition gegenüber PCBs und einem erhöhten Krebsrisiko beim Menschen wurde in zahlreichen epidemiologischen Studien untersucht, wobei ein konsistenter Zusammenhang zwischen malignen Melanomen und einer entsprechenden PCB-Exposition nachgewiesen wurde. Weitere positive Assoziationen wurden für Non-Hodgkin-Lymphome und Brustkrebs beobachtet, für andere Krebsarten konnten im Gegenzug keine ausreichenden Hinweise auf ein erhöhtes Risiko aus den epidemiologischen Studien gefunden werden (IARC, 2016).

Allerdings können in solchen epidemiologischen Studien nicht die spezifischen Wirkungen der NDL-PCBs analysiert werden, da der Mensch immer gleichzeitig komplexen Gemischen von dioxinartigen und nicht-dioxinartigen Verbindungen ausgesetzt ist, so dass sich keine Rückschlüsse auf Effekte ziehen lassen, die ausschließlich den NDL-PCBs zuzuordnen sind.

Die IARC geht jedoch davon aus, dass die Kanzerogenität der PCBs nicht allein der Kanzerogenität der dioxinartigen PCBs zugeschrieben werden kann (IARC, 2016).

### **5.7.2 Analyse der Apoptoserate anhand der UV-induzierten Aktivität verschiedener Caspasen**

Die Untersuchung der Aktivität verschiedener Caspasen erlaubt Rückschlüsse darauf, inwiefern die unterschiedlichen Apoptosewege durch die inhibitorische Wirkung nicht-dioxinartiger PCBs eine entsprechende Beeinträchtigung erfahren. Hierbei wird der Einfluss auf spezielle Caspasen analysiert, die entweder im intrinsischen oder im extrinsischen Apoptoseweg selektiv aktiviert werden. So führt der extrinsische Apoptoseweg, der über Todesrezeptoren auf der Zellmembran vermittelt wird, zur Aktivierung von Caspase 8, während der intrinsische Apoptoseweg auf einer Änderung der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran beruht und mit der Aktivierung von Caspase 9 einhergeht (Malhi *et al.*, 2010). Sowohl Caspase 8 als auch Caspase 9 aktivieren infolgedessen wiederum die Effektorcaspase 3/7 (Budihardjo *et al.*, 1999).

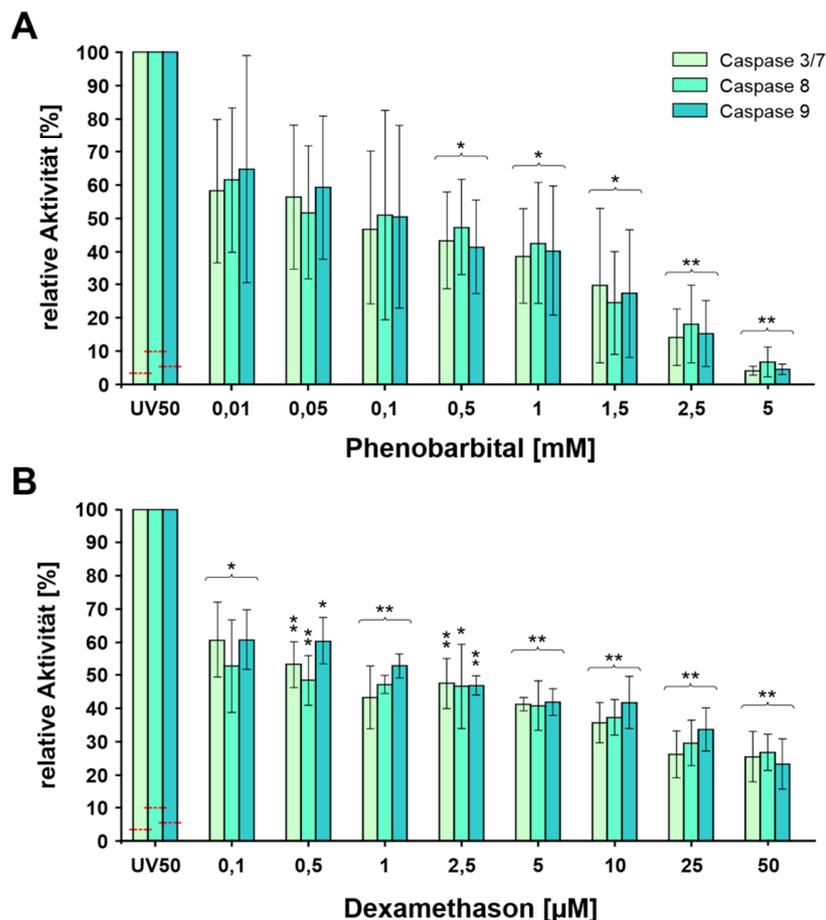
Während für Dexamethason von Oh *et al.* (2006) zwar gezeigt werden konnte, dass eine entsprechende Verabreichung primäre Hepatozyten vor Fas-Ligand-induzierter Apoptose schützen kann, konnten Scoltock *et al.* (2007) in Rattenhepatomzellen nach Dexamethason-Vorbehandlung hingegen keine Hemmung der durch den Fas-Ligand induzierten Apoptose nachweisen. In Anbetracht dessen, dass in der Literatur Unstimmigkeit darüber herrscht, ob Dexamethason auch einen Einfluss auf den extrinsischen Apoptoseweg ausübt, sollte gerade in Bezug auf die nicht-dioxinartigen PCBs anhand der Enzymaktivität der Caspasen 8, 9 und

3/7 der Einfluss dieser Tumorpromotoren auf die verschiedenen Apoptosewege analysiert werden. Hierfür wurden Zelllysate mit unterschiedlichen, für die jeweiligen Caspasen spezifischen Tetrapeptid-Substraten (Ac-IETD, Ac-LEHD bzw. Ac-DEVD) inkubiert, an deren C-terminalen Aspartat-Rest das Fluorophor 7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin (AFC) gekoppelt ist, welches durch aktivierte Caspasen eine proteolytische Abspaltung erfährt. Die fluorimetrisch bestimmte Menge an freigesetztem AFC korreliert hierbei mit der Aktivität der entsprechenden Caspasen und kann daher zur Bestimmung der inhibitorischen Einflüsse von Phenobarbital, Dexamethason oder den aufgereinigten NDL-PCBs auf die UV-induzierte Apoptose eingesetzt werden.

Der Vergleich der Caspase-Aktivität in Hepatozyten nach UV-Bestrahlung mit der basalen Aktivität in unbehandelten Hepatozyten bestätigt hierbei die Reaktivität des Assays sowie die signifikante Aktivierung aller untersuchten Caspasen durch die gewählte UV-Intensität (50 J/qm<sup>2</sup>). So ist die Aktivität der Caspase 3/7 nach Apoptoseinduktion im Mittel aller durchgeführten Messungen gegenüber der basalen Aktivität um etwa das 27-Fache erhöht. Ein vergleichbarer, jedoch etwas geringer ausfallender Anstieg der Caspase-Aktivität konnte im Anschluss an eine UV-Bestrahlung auch für die Caspasen 8 und 9 verzeichnet werden (Faktor 10 bzw. 16 gegenüber der basalen Aktivität).

#### **5.7.2.1 Einfluss von Phenobarbital und Dexamethason auf die UV-induzierte Aktivität verschiedener Caspasen in primären Rattenhepatozyten**

Um den Einfluss der beiden Tumorpromotoren Phenobarbital und Dexamethason auf die UV-induzierte Caspase-Aktivierung zu erörtern, wurden Hepatozytenkulturen nach UV-Bestrahlung mit den beiden Testsubstanzen im üblichen Konzentrationsspektrum behandelt und die Caspase-Aktivität in Relation zur Aktivierung in nicht mit Phenobarbital oder Dexamethason behandelten Kontrollkulturen abgebildet (Abb. 51 A). Vergleichbar zur Abnahme apoptotischer Zellkerne (vgl. 5.7.1.1) unter dem Einfluss von Phenobarbital nahm die Aktivität der getesteten Caspasen 3/7, 8 und 9 konzentrationsabhängig mit zunehmender Phenobarbitalkonzentration ab. Dabei war die Aktivität aller Caspasen bei einer Konzentration von 0,5 mM mit Abnahmen von 53 % bis 59 % gegenüber der Aktivität in den Kontrollkulturen erstmals statistisch signifikant gehemmt. In der höchsten getesteten Phenobarbitalkonzentration (5 mM) betrug die Aktivität je nach betrachteter Caspase nur noch zwischen 4 % und 6 % der Caspase-Aktivität in den UV-bestrahlten Kontrollkulturen. Damit lagen die bei dieser Phenobarbitalkonzentration nachweisbaren Caspase-Aktivitäten auf dem Niveau der basalen Caspase-Aktivitäten in unbehandelten, nicht UV-bestrahlten Hepatozytenkulturen. Beim Vergleich der drei getesteten Caspasen untereinander konnten in keiner der getesteten Konzentrationsstufen signifikante Unterschiede bezüglich der durch Phenobarbital bewirkten Hemmung beobachtet werden.



**Abb. 51: Untersuchung der Aktivität der Caspasen 3/7, 8 und 9 nach UV-Bestrahlung unter dem Einfluss von Phenobarbital und Dexamethason.** Quantitative Analyse der relativen Caspase-Aktivität nach Apoptoseinduktion durch UV-Bestrahlung ( $50 \text{ J/m}^2$ ) sowie nach zusätzlicher Inkubation mit Phenobarbital (A) und Dexamethason (B) in verschiedenen Konzentrationen. Die in primären Hepatozyten ermittelten Caspase-Aktivitäten in den einzelnen Konzentrationsstufen sind prozentual zur Caspase-Aktivität nach UV-Bestrahlung in der Lösungsmittelkontrolle (UV50) dargestellt. MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ , statistischer Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ . Die basalen Aktivitätslevel der jeweiligen Caspasen in nicht mit UV-Licht behandelten Kulturen in Relation zu den UV-behandelten Zellkulturen sind durch gestrichelte rote Linien gekennzeichnet.

Auch die Inkubation der Hepatozytenkulturen mit Dexamethason bewirkte eine im Vergleich zu Phenobarbital ähnliche Abnahme der Caspase-Aktivitäten nach UV-Bestrahlung (Abb. 51 B). Bereits bei der geringsten getesteten Konzentration von  $0,1 \mu\text{M}$  waren die Aktivitätslevel aller betrachteten Caspasen um etwa 40 % gegenüber der Aktivierung in den Kontrollkulturen signifikant reduziert. Eine Erhöhung der Dexamethasonkonzentration bewirkte eine weitere Abnahme der in UV-behandelten Hepatozyten nachweisbaren Caspase-Aktivität, die in der höchsten getesteten Konzentration ( $50 \mu\text{M}$  Dexamethason) nur noch zwischen 23 % und 27 % der Aktivität in der Kontrolle betrug. Somit fiel die durch Dexamethason bewirkte maximale

Hemmung der Caspase-Aktivität in den untersuchten Konzentrationsbereichen etwas geringer aus als jene durch Phenobarbital, dessen zusätzliche Applikation die Caspase-Aktivität wieder vollständig auf das Kontrollniveau zurückdrängen konnte. Beim Vergleich der Hemmungen der einzelnen Caspasen untereinander konnten auch für Dexamethason wiederum in keiner der getesteten Konzentrationsstufen signifikante Unterschiede festgestellt werden.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass beide Substanzen sowohl eine inhibitorische Wirkung auf Caspasen des extrinsischen als auch des intrinsischen Apoptosewegs ausüben. Eine entsprechende Hemmung der Caspase-Aktivität durch Phenobarbital und Dexamethason konnte in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen auch von Zucchini *et al.* (2005) gefunden werden. Während die apoptoseinduzierende Behandlung der primären Rattenhepatozyten mit 100 nM Staurosporin noch zu einem sechsfachen Anstieg der Caspase-3-Aktivität führte, konnte eine Vorbehandlung der Zellen mit 1 mM Phenobarbital oder 25 µM Dexamethason das Absinken der Vitalität der Hepatozyten sowie die zugehörige Aktivierung von Caspase 3 hingegen entsprechend verhindern (Zucchini *et al.*, 2005).

Abgesehen von einer Hemmung der Caspase-Aktivität in primären Rattenhepatozyten konnte auch eine entsprechende Inhibition in mehreren Rattenhepatom-Zelllinien nachgewiesen werden. So konnten Buchmann *et al.* (1999) in FTO-2B-Rattenhepatomzellen zeigen, dass die TGF- $\beta$ -induzierte Aktivität der Caspase 3 bei einer zeitgleichen Behandlung mit Phenobarbital um nahezu 50 % inhibiert wurde, wohingegen mit Dexamethason sogar eine mehr als 70 %-ige Hemmung erreicht wurde. Auch in Studien von Wanke *et al.* (2004) ging die Hemmung der TGF- $\beta$ -induzierten Apoptose durch Dexamethason mit einer starken Verringerung der Caspase-3-Aktivität einher. Zudem wurde durch eine zusätzliche Behandlung mit Dexamethason sowohl die Caspase-8-Aktivierung fast vollständig unterdrückt als auch die Aktivität der Caspase 9 auf Werte geringfügig oberhalb von nicht stimulierten Kontrollzellen verringert (Wanke *et al.*, 2004). Auch Scoltock *et al.* (2007) kamen zu dem Schluss, dass eine Vorbehandlung von Rattenhepatomzellen (HTC) mit Dexamethason die Signalübertragung des apoptotischen Signalwegs selektiv beeinflusst, da eine zusätzliche Applikation des Tumorpromotors die UV-induzierte Aktivierung der Caspase 3 in diesen Zellen entsprechend blockierte.

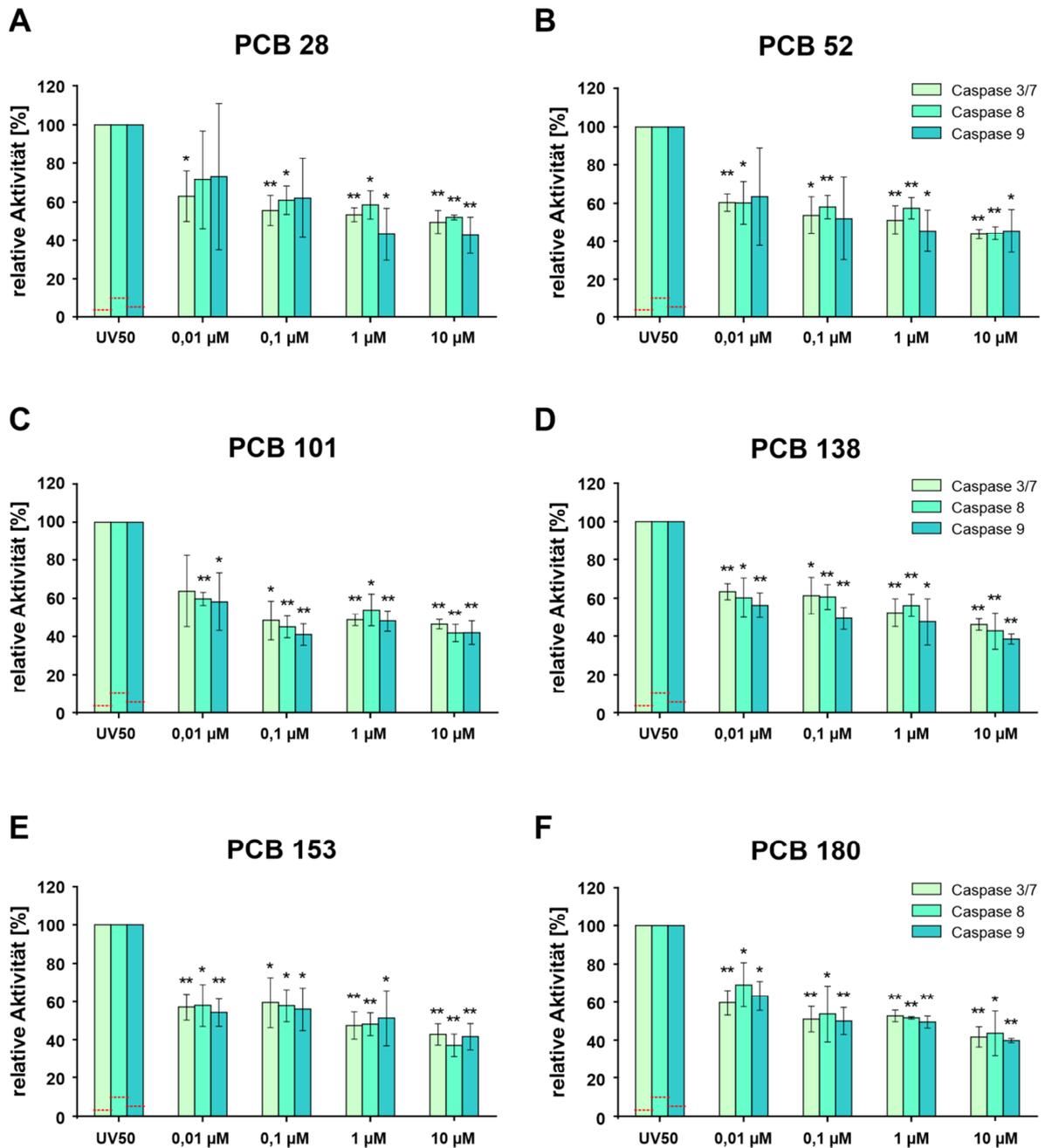
Neben der induzierten Apoptose schützt Dexamethason zudem sowohl Rattenhepatozyten als auch humane Hepatozyten vor spontaner Apoptose, wobei auch hier die dosisabhängige, Dexamethason-bedingte Inhibition der Apoptose stark mit einer Abnahme der Caspase-3-Aktivität korrelierte (Bailly-Maitre *et al.*, 2001). Weiterhin hatte eine Behandlung mit dem Tumorpromotor eine Stabilisierung der jeweiligen Procaspasen 3, 8 und 9 zur Folge, was mit einer Hemmung der proteolytischen Prozessierung dieser Caspasen einhergeht und so den weiteren Verlauf der Apoptose verhindert (Bailly-Maitre *et al.*, 2002).

Im Folgenden sollte zudem analysiert werden, inwiefern auch durch die jeweiligen nicht-dioxinartigen PCBs eine inhibierende Wirkung auf die entsprechenden Caspase-Aktivitäten zu

verzeichnen ist und ob diese Effekte mit jenen von Phenobarbital oder Dexamethason vergleichbar sind.

#### **5.7.2.2 Einfluss der NDL-PCBs auf die UV-induzierte Aktivität verschiedener Caspasen in primären Rattenhepatozyten**

Die Untersuchung der Wirkung der NDL-PCBs 28, 52, 101, 138, 153 und 180 auf die Aktivität der Caspasen 3/7, 8 und 9 nach UV-Bestrahlung erfolgte experimentell analog zur Untersuchung der Rolle von Phenobarbital und Dexamethason. Die Inkubation mit 0,01  $\mu\text{M}$  PCB 28 bewirkte hierbei eine Reduktion der Aktivität der jeweilig getesteten Caspasen um 27 % bis 37 % (Abb. 52 A). Die weitere Steigerung der PCB-Konzentration um das jeweils 10-Fache bis zur höchsten untersuchten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  bewirkte eine zunehmende Reduktion der Caspase-Aktivitäten bis hin zur maximal ermittelten Hemmung bei Caspase 9 auf 43 % der Aktivität in den UV-bestrahlten Kontrollkulturen. Signifikante Unterschiede im Aktivierungsverhalten der einzelnen Caspasen konnten auch hier nicht ermittelt werden.



**Abb. 52: Untersuchung der Aktivität der Caspasen 3/7, 8 und 9 nach UV-Bestrahlung unter dem Einfluss verschiedener NDL-PCBs.** Quantitative Analyse der relativen Caspase-Aktivität nach Apoptoseinduktion durch UV-Bestrahlung ( $50 \text{ J/m}^2$ ) sowie nach zusätzlicher Inkubation mit den NDL-PCBs 28, 52, 101, 138, 153 bzw. 180 (A–F) in verschiedenen Konzentrationen. Die in primären Hepatozyten ermittelten Caspase-Aktivitäten in den einzelnen Konzentrationsstufen sind prozentual zur Caspase-Aktivität nach UV-Bestrahlung in der Lösungsmittelkontrolle (UV50) dargestellt.  $MW \pm SD$ ,  $n = 3$ , statistischer Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ . Die basalen Aktivitätslevel der jeweiligen Caspasen in nicht mit UV-Licht behandelten Kulturen in Relation zu den UV-behandelten Zellkulturen sind durch gestrichelte rote Linien gekennzeichnet.

Die weiteren getesteten NDL-PCBs 52, 101, 138, 153 und 180 (Abb. 52 B–F) hatten einen mit PCB 28 vergleichbaren Einfluss auf die Caspase-Aktivierung durch UV-Bestrahlung. Alle Kongenere bewirkten eine signifikante Reduktion der Caspase-Aktivität um mindestens 30 %, wobei in keiner der getesteten Konzentrationsstufen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Caspasen festgestellt werden konnten.

Weiterhin konnten beim Vergleich der jeweiligen NDL-PCBs untereinander, die in der höchsten eingesetzten Konzentration (10 µM) eine Reduktion der Caspase-Aktivitäten um 48 % (Caspase 8 bei PCB 28) bis 63 % (Caspase 8 bei PCB 153) bewirkten, im Gegensatz zur Anzahl apoptotischer Zellkerne keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Jedoch ist auch hier der Trend erkennbar, dass der Chlorierungsgrad der PCBs im Wesentlichen mit der Stärke der Hemmung der Caspase-Aktivität zusammenhängt.

Beim Vergleich der durch die NDL-PCBs bedingten Hemmung der Caspase-Aktivitäten mit jenen Hemmungen von Phenobarbital und Dexamethason fällt zudem auf, dass das Aktivitätslevel der Caspasen durch die höchsten eingesetzten Konzentrationen der jeweiligen polychlorierten Biphenyle nicht so sehr auf das basale Grundniveau zurückgedrängt wird wie durch die beiden anderen Substanzen. Insgesamt ist der NDL-PCB-bedingte Grad der Inhibition allerdings eher mit jenem von Dexamethason vergleichbar als mit dem von Phenobarbital, da die zusätzliche Applikation von Phenobarbital die entsprechende Caspase-Aktivität in den vorherigen Versuchsreihen nahezu vollständig unterdrücken konnte.

In der Literatur sind bezüglich einer Hemmung der Aktivität von Caspasen durch einzelne nicht-dioxinartige PCB-Kongenere nur wenige Angaben zu finden. Lediglich zu PCB 153 liegen mit mRNA-Expressions- und Aktivitätsanalysen verschiedener Caspasen einige Untersuchungen vor. Um den antiapoptotischen Effekt von PCB 153 näher zu beleuchten, verabreichten Liu *et al.* (2014) Sprague-Dawley-Ratten an fünf aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal PCB 153 in Dosen von 4, 16 bzw. 32 mg/kg Körpergewicht. Die im Anschluss in der Leber analysierte mRNA-Expression sowie die Aktivität der Caspasen 3 und 9 zeigten hierbei abnehmende Trends. So war der mRNA-Spiegel von Caspase 3 in der mittleren bzw. hohen Dosisgruppe gegenüber der Kontrolle um 30,0 % bzw. 35,0 % verringert, ähnlich hierzu waren auch die mRNA-Spiegel von Caspase 9 signifikant niedriger als jene in der unbehandelten Kontrollgruppe. Darüber hinaus wurden auch die Caspase-3- und Caspase-9-Aktivitäten in der Hochdosisgruppe im Vergleich zur Kontrolle entsprechend um 38,7 % bzw. um 17,8 % durch die PCB-Applikation reduziert. Im Gegensatz zu den beiden Caspasen 3 und 9 zeigte Caspase 8 bei mit PCB 153 behandelten Ratten jedoch keine signifikanten Veränderungen bezüglich der mRNA-Spiegel oder der Caspase-Aktivität. Liu *et al.* (2014) fanden diesbezüglich heraus, dass Caspase 8 nach Exposition gegenüber PCB 153 *in vivo* und *in vitro* unterschiedliche Reaktionen aufwies. So wurde die Aktivität der Caspase 8 in BRL-Zellen hingegen nach einer Behandlung mit PCB 153 wiederum signifikant unterdrückt (Liu *et al.*, 2014). Dies steht im Einklang mit unseren Ergebnissen, da auch in unseren

Versuchsreihen mit primären Rattenhepatozyten die Aktivität aller drei untersuchten Caspasen nach Exposition gegenüber PCB 153 entsprechend inhibiert wurde.

Weitere Analysen von Liu *et al.* (2014) ergaben, dass die PCB 153-induzierte Inhibition der Caspase-Aktivität sowie der Caspase-mRNA-Spiegel über die PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase)/Akt (Protein Kinase B)- und ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*)-Signalwege vermittelt wird. Da eine Exposition gegenüber PCB 153 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu einer Aktivierung der PI3K/Akt- und ERK-Signalwege führte, sollte die Rolle dieser beiden Signalwege bei der NDL-PCB-bedingten Regulation von Caspasen durch die Verwendung geeigneter Inhibitoren der jeweiligen Signalwege ermittelt werden. So konnte nach einer entsprechenden Hemmung des PI3K/Akt-Signalwegs ein signifikanter Einfluss von diesem auf die Aktivität der Caspasen 3, 8 und 9 belegt werden, während der ERK-Signalweg lediglich die Caspase-9-Aktivität synergistisch regulierte (Liu *et al.*, 2014).

Des Weiteren konnten auch Al-Anati *et al.* (2014) zeigen, dass eine Vorbehandlung mit PCB 153 die durch Benzo[*a*]pyren induzierte Apoptose in HepG2-Zellen unterdrückt sowie außerdem, dass diese Inhibition mit einer PCB-bedingten Reduktion der Caspase-3-Aktivität korreliert.

Beim Vergleich der NDL-PCB-bedingten Inhibition der Apoptose mit der von Phenobarbital oder Dexamethason fällt auf, dass die nicht-dioxinartigen PCBs insgesamt zwar mehr Gemeinsamkeiten mit Phenobarbital aufweisen (z. B. Inhibition der GJIC, Hochregulierung von Gadd45 $\beta$ , Selektion nach aktivierenden Mutationen in  $\beta$ -Catenin), jedoch auch jene Gemeinsamkeiten mit Dexamethason nicht außer Acht gelassen werden dürfen. Gerade in Bezug auf eine erhöhte Expression von Bcl-xL/Bcl-2 bzw. einer essentiellen Aktivierung von NF- $\kappa$ B ähnelt die antiapoptotische Wirkung der NDL-PCBs eher jener von Dexamethason, zusätzlich gibt die Interaktion der PCBs mit dem PXR bei der Induktion von CYP3A1 weiterhin Hinweise zu der Annahme, dass auch der PXR einen Einfluss auf die NDL-PCB-bedingte Tumorpromotion ausüben könnte. Mit Hilfe von spezifischen siRNAs gegen die beiden Rezeptoren CAR und PXR sollte daher in den nachfolgenden Kapiteln näherer Aufschluss darüber erlangt werden, inwiefern die beiden Rezeptoren einen Beitrag zur antiapoptotischen Wirkung der NDL-PCBs leisten.

### **5.7.3 Analyse der Bedeutung von CAR und PXR für die Tumorpromotorbedingte Hemmung der UV-induzierten Apoptose anhand spezifischer siRNAs**

Aufgrund der überlappenden Funktionalität der beiden Rezeptoren sollten im Folgenden nähere Kenntnisse darüber erlangt werden, ob die antiapoptotische Wirkung von Phenobarbital, Dexamethason oder den NDL-PCBs über den CAR, den PXR oder möglicherweise über beide Rezeptoren vermittelt wird. Während für den

tumorpromovierenden Effekt von Phenobarbital eine Abhängigkeit von CAR bekannt ist (Yamamoto *et al.*, 2004), wurde ein Einfluss des PXR auf die Apoptosehemmung durch NDL-PCBs bisher noch nicht ergründet. Generell liegen zu solchen Verbindungen, die spezifisch den Pregnan-X-Rezeptor aktivieren, vergleichsweise nur wenige Daten in Bezug auf eine mögliche Hepatokarzinogenität vor (Elcombe *et al.*, 2014). Während beispielsweise für CAR-Aktivatoren wie Phenobarbital eine umfangreiche Datenmenge zur Förderung von Lebertumoren bei Nagetieren vorhanden ist (Whysner *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2005), sind nicht-genotoxische PXR-Aktivatoren wie Dexamethason oder PCN hingegen bezüglich einer tumorigenen Wirkung nur unzureichend charakterisiert.

Um daher der Frage nachzugehen, inwieweit sich die beiden Rezeptoren für die antiapoptotischen Effekte der untersuchten Substanzen spezifisch oder wechselwirkend verantwortlich zeigen, wurden für die jeweiligen Rezeptoren spezifische siRNA-Sequenzen verwendet, welche auf diese Weise eine gezielte Inhibition der einzelnen Rezeptorfunktion herbeiführen. Hierbei wurde auf jene siRNAs zurückgegriffen, die zuvor bereits zum Nachweis einer Beteiligung von CAR und PXR bei der CYP2B1- und CYP3A1-Induktion erfolgreich genutzt werden konnten (siehe Kapitel 5.3.2). Für die Analyse des Einflusses von CAR und PXR auf die induzierte Apoptose wurden daher entsprechend zu den vorherigen Versuchsreihen sowohl identische siRNA-Konzentrationen als auch identische Inkubationszeiten gewählt.

Um zunächst sicherzustellen, dass nicht bereits der Transfektionsprozess an sich zur Induktion oder Inhibition von Apoptosen führt, wurden die Hepatozyten neben den spezifischen siRNAs mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA inkubiert und im Anschluss die ermittelte Rate apoptotischer Hepatozyten mit jener von lediglich mit der Lösungsmittelkontrolle inkubierten Hepatozytenkulturen verglichen. Dabei konnte zwischen der basalen Rate apoptotischer Hepatozyten in der Lösungsmittelkontrolle (0,37 %) und den mit der Kontroll-siRNA behandelten Kulturen (0,38 %) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, so dass ein Einfluss der zur liposomalen Transfektion verwendeten Reagenzien entsprechend ausgeschlossen werden kann.

Weiterhin wurde überprüft, ob sich die Inhibition der beiden Rezeptoren CAR und PXR an sich auf die Induktion von durch UV-Strahlung bedingten Apoptosen in Hepatozytenkulturen auswirkt. Hierzu wurden die Hepatozyten vor UV-Bestrahlung mit den spezifischen siRNAs transfiziert und die in diesen Kulturen ermittelten Raten apoptotischer Zellkerne mit jenen in nicht-transfizierten Kulturen verglichen. Während in den nicht-transfizierten Kulturen nach UV-Bestrahlung 11,0 % der Hepatozyten apoptotische Zellkerne aufwiesen, zeigten in den mit der CAR-siRNA inkubierten 11,1 %, bei den mit der PXR-siRNA inkubierten Zellen 11,3 % sowie in den gleichzeitig mit CAR- und PXR-siRNA behandelten Kulturen 11,8 % der Zellkerne Anzeichen von Apoptose auf. Der statistische Vergleich dieser Werte lieferte keine Hinweise darauf, dass die Inhibition von CAR, PXR oder beiden Rezeptoren in Kombination einen

Einfluss auf die Entstehung von durch UV-Strahlung induzierten Apoptosen in primären Hepatozytenkulturen aufweist.

Bezüglich der beiden nukleären Rezeptoren CAR und PXR könnte sich bei unseren Untersuchungen zur tumorigenen Wirkung der analysierten Substanzen neben der Applikation hoch aufgereinigter NDL-PCBs auch die Verwendung des Perfusionsprotokolls nach Meredith (1988) als Vorteil erweisen. Die verwendete Perfusion mit EDTA gilt gegenüber klassischen Kollagenase-haltigen Perfusionen gerade in Bezug auf die Erhaltung der Sensitivität des Cytochrom-P450-Systems als überlegen, was im Hinblick auf die beiden Rezeptoren CAR und PXR aus einer erhöhten Funktionalität dieser resultieren könnte, die sich auch auf die Erhaltung der tumorpromovierenden Wirkung der Testsubstanzen positiv auswirken könnte.

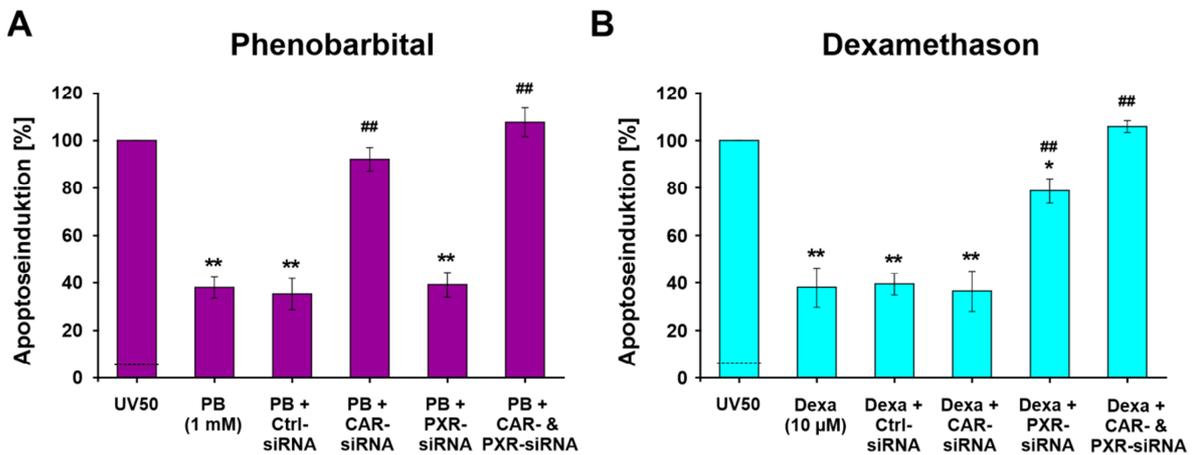
### **5.7.3.1 Bedeutung von CAR und PXR für die Phenobarbital- und Dexamethason-bedingte Inhibition der UV-induzierten Apoptose sowie der Aktivität verschiedener Caspasen**

Nachdem ein allgemein apoptoseauslösender oder apoptosehemmender Effekt des Transfektionsprozesses sowie ein Einfluss der Hemmung von CAR und PXR an sich auf die Induktion von Apoptosen durch UV-Strahlung ausgeschlossen werden konnten, sollte weiterhin untersucht werden, ob CAR und PXR am apoptosehemmenden Effekt von Phenobarbital und Dexamethason funktionell beteiligt sind. Um die Tumorpromotor-bedingte Hemmung der Apoptoserate in mit siRNA vorbehandelten Hepatozyten mit jener von nicht-transfizierten und mit der entsprechenden Substanz behandelten Hepatozyten vergleichen zu können, wurden zunächst fluoreszenzmikroskopische Analysen morphologischer Apoptosemerkmale mittels DAPI herangezogen (vergleiche 5.7.1).

Die Inkubation der Hepatozyten mit 1 mM Phenobarbital unmittelbar nach UV-Bestrahlung führte hierbei in den mit der Kontroll-siRNA inkubierten Hepatozyten zu einer Verringerung der Rate apoptotischer Zellkerne auf 35 % der Rate in nicht mit Phenobarbital behandelten Hepatozyten (Abb. 53 A). Dieser Wert unterschied sich dabei nicht signifikant von der Apoptoserate in Hepatozytenkulturen, die vor der Phenobarbital-Zugabe nicht mit der Kontroll-siRNA behandelt wurden (38 %), womit für diese Versuchsreihe ein Effekt der Transfektionsprozedur auf die Apoptoseinduktion oder die Wirkung von Phenobarbital ausgeschlossen werden konnte. Nach Transfektion der Hepatozyten mit der CAR-siRNA blieb der apoptosehemmende Effekt von Phenobarbital annähernd vollständig aus. So unterschied sich die Anzahl apoptotischer Zellkerne in diesen Kulturen mit einer mittleren Rate von 92 % der Anzahl apoptotischer Kerne der lediglich mit UV bestrahlten Kulturen statistisch nicht signifikant von den Kontrollbedingungen.

Dahingegen hatte die Hemmung der Aktivität des PXR durch Transfektion mit der entsprechenden siRNA keinen signifikanten Einfluss auf die durch Phenobarbital bewirkte

Hemmung der UV-induzierten Apoptose (39 %). Nach gleichzeitiger Transfektion von siRNAs gegen CAR und PXR konnte hingegen wiederum eine mittlere Rate apoptotischer Zellkerne von 108 % der Rate von lediglich mit UV bestrahlten Kulturen gemessen werden. Dabei verstärkte die zusätzliche Hemmung des PXR, welche alleine keinen Einfluss auf die Phenobarbital-bedingte Inhibition apoptotischer Zellkerne hatte, den Effekt der alleinigen CAR-bedingten Hemmung signifikant.



**Abbildung 53: Bedeutung von CAR und PXR für die Hemmung der UV-induzierten Apoptose durch Phenobarbital und Dexamethason.** Quantitative Analyse der mittels fluoreszenzmikroskopischer Auszählung DAPI-gefärbter Nuklei ermittelten Apoptoseinduktion nach UV-Bestrahlung ( $50 \text{ J/m}^2$ ) in mit  $1 \text{ mM}$  Phenobarbital (A) sowie  $10 \text{ }\mu\text{M}$  Dexamethason (B) behandelten Kulturen nach Vorinkubation mit einer Kontroll-siRNA (Ctrl) bzw. CAR-siRNA, PXR-siRNA oder beiden siRNAs in Kombination (CAR & PXR). Darstellung der Apoptoserate in Relation (%) zur Anzahl apoptotischer Nuklei in mit der Lösungsmittelkontrolle behandelten Hepatozytenkulturen (UV50). MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ , statistischer Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ ; Vergleich zur Apoptoseinduktion in ausschließlich mit Phenobarbital/Dexamethason behandelten Kulturen: #:  $p < 0,05$  und ##:  $p < 0,01$ . Die mittlere basale Apoptoserate in unbehandelten Kulturen in Relation zu den UV-behandelten Zellkulturen ist jeweils durch die gestrichelte schwarze Linie gekennzeichnet.

Gegenüber Phenobarbital, dessen apoptosehemmende Wirkung maßgeblich über die Funktion des konstitutiven Androstan-Rezeptors reguliert zu werden scheint, ergab die Analyse der apoptosehemmenden Wirkung von Dexamethason ein divergierendes Bild hinsichtlich der Rolle von CAR und PXR (Abb. 53 B). Nachdem zunächst durch die Transfektion mit einer Kontroll-siRNA nachgewiesen werden konnte, dass der Transfektionsprozess keinen Einfluss auf die durch  $10 \text{ }\mu\text{M}$  Dexamethason bewirkte Hemmung der UV-Induzierten Apoptose aufweist (Hemmung durch Dexamethason auf 38 % der Apoptosen unter Kontrollbedingungen; Hemmung auf 39 % nach Transfektion mit der Kontroll-siRNA), zeigte die Inhibition der CAR-Aktivität durch Transfektion mit der entsprechenden

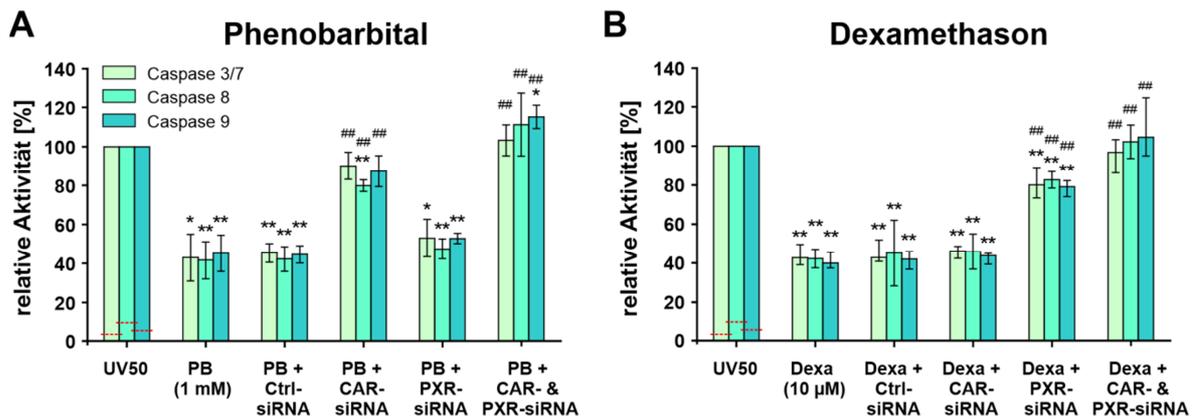
CAR-siRNA im Gegensatz zu Phenobarbital keine Wirkung auf die Dexamethason-vermittelte Apoptosehemmung (36 %).

Nach Hemmung der PXR-Aktivität hingegen, welche auf die Phenobarbital-vermittelte Apoptosehemmung keinen Einfluss hatte, vermochte Dexamethason die UV-induzierte Apoptose nur noch um etwa 20 % zu inhibieren (79 % der Apoptoserate unter Kontrollbedingungen). Im Vergleich zur nahezu vollständigen Aufhebung der Phenobarbital-bedingten Apoptosehemmung durch die CAR-siRNA reduzierte die Behandlung mit der PXR-siRNA die Dexamethason-vermittelte Apoptosehemmung jedoch nicht wieder zurück auf das Grundniveau, sondern wies noch eine gegenüber den Kontrollbedingungen signifikante Inhibition der UV-induzierten Apoptose auf. Erst die parallele Hemmung von CAR und PXR durch gleichzeitige Transfektion von CAR- und PXR-siRNA bewirkte dagegen wiederum einen vollständigen Verlust der apoptosehemmenden Wirkung von Dexamethason. Mit einer mittleren Rate von 105 % unterschied sich die Zahl apoptotischer Zellkerne in diesen Kulturen nicht mehr von jener in den nur mit UV-Licht bestrahlten Zellkulturen.

Neben der Analyse der morphologischen Apoptosemerkmale mittels DAPI sollte die Abhängigkeit der durch Phenobarbital und Dexamethason bewirkten Apoptosehemmung von der Funktion der nukleären Rezeptoren CAR und PXR auch hinsichtlich der während der Apoptose induzierten Caspasen untersucht werden. Hierzu wurde die UV-bedingte Aktivierung der Caspasen 3/7, 8 und 9 unter dem Einfluss von Phenobarbital und Dexamethason nach vorheriger Hemmung der Rezeptoren durch die entsprechende siRNA-Transfektion analog zu vorangegangenen Versuchsreihen gemessen.

Die Reduktion der UV-induzierten Aktivierung der getesteten Caspasen durch Phenobarbital auf ca. 40 % konnte hierbei auch in mit der Kontroll-siRNA transfizierten Hepatozytenkulturen beobachtet werden und bestätigte somit auch für die Aktivierung von Caspasen keinen störenden Einfluss der Transfektionsprozedur (Abb. 54 A).

Vergleichbar mit dem Effekt auf die Entwicklung apoptotischer Nuklei wurde auch die durch Phenobarbital vermittelte Inhibition der Caspase-Aktivitäten durch die Hemmung des konstitutiven Androstan-Rezeptors annähernd vollständig aufgehoben. So lag die Aktivität der untersuchten Caspasen bei allen mit der CAR-siRNA behandelten Kulturen bei 80 % bis 90 % der Caspase-Aktivität der nicht mit Phenobarbital inkubierten Kulturen. Lediglich für Caspase 8 konnte noch eine durch Phenobarbital bedingte signifikante Verringerung der Caspase-Aktivität gegenüber den Kontrollbedingungen nachgewiesen werden.



**Abbildung 54: Bedeutung von CAR und PXR für die Hemmung der UV-induzierten Caspase-Aktivität durch Phenobarbital und Dexamethason.** Analyse der enzymatischen Aktivität der Caspasen 3/7, 8 und 9 nach UV-Bestrahlung ( $50 \text{ J/m}^2$ ) in mit 1 mM Phenobarbital (A) sowie 10 µM Dexamethason (B) behandelten Kulturen nach Vorinkubation mit einer Kontroll-siRNA (Ctrl) bzw. CAR-siRNA, PXR-siRNA oder beiden siRNAs in Kombination (CAR & PXR). Darstellung der Caspase-Aktivität in Relation (%) zu jener in mit der Lösungsmittelkontrolle behandelten Hepatozytenkulturen (UV50). MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ , statistischer Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ ; Vergleich zur Caspase-Aktivität in ausschließlich mit Phenobarbital/Dexamethason behandelten Kulturen: #:  $p < 0,05$  und ##:  $p < 0,01$ . Die basalen Aktivitätslevel der jeweiligen Caspasen in nicht mit UV-Licht behandelten Kulturen in Relation zu den UV-behandelten Zellkulturen sind durch gestrichelte rote Linien gekennzeichnet.

Hingegen sorgte die Hemmung des Pregnan-X-Rezeptors nur für eine geringe, nicht signifikante Reduktion der Inhibition der Caspase-Aktivität durch Phenobarbital. Diese betrug über alle getesteten Caspasen hinweg im Maximum 8,3 Prozentpunkte gegenüber der mit der Kontroll-siRNA behandelten Kultur. Nach gleichzeitiger Hemmung von CAR und PXR konnte dagegen wiederum eine Caspase-Aktivität von 102 % bis 115 % der Aktivität von lediglich mit UV bestrahlten Kulturen gemessen werden und somit eine vollständige Unterdrückung der Phenobarbital-induzierten Reduktion der Caspase-Aktivität bestätigt werden. Die Aktivität der Caspase 9 war durch die simultane Hemmung von CAR und PXR sogar signifikant gegenüber jener der Kontrolle erhöht.

Die apoptosehemmende Wirkung von Dexamethason (Abb. 54 B) konnte durch die alleinige Transfektion der Hepatozyten mit der CAR-siRNA wiederum nicht aufgehoben werden. So betrug die Aktivität aller betrachteten Caspasen nur zwischen 44 % und 46 % der unter Kontrollbedingungen ermittelten Aktivität und war somit mit der Aktivität in den ausschließlich mit Dexamethason behandelten Kulturen vergleichbar.

Ähnlich zu den Ergebnissen bei der Auszählung apoptotischer Nuklei bewirkte die Hemmung des PXR dagegen eine signifikante, jedoch nicht vollständige Aufhebung des apoptose-inhibierenden Effekts von Dexamethason. So konnten bei allen drei Caspasen Aktivitätslevel

von etwa 80 % der in den Referenzproben ermittelten Caspase-Aktivitäten gemessen werden, welche gegenüber den Kontrollbedingungen noch signifikant reduziert waren. Erst die Hemmung der Expression beider Rezeptoren ließ die Aktivität der Caspasen 3/7, 8 und 9 unter dem Einfluss von Dexamethason auf Werte steigen, die mit denen von nicht mit Dexamethason behandelten Kontrollkulturen vergleichbar waren (im Mittel zwischen 97 % bei Caspase 3/7 und 105 % bei Caspase 9).

Zusammengenommen lässt sich erkennen, dass die durch Phenobarbital vermittelte Inhibition der Apoptose wie auch bereits bei der Enzyminduktion vornehmlich über den CAR reguliert wird, wohingegen die Dexamethason-bedingte Hemmung der UV-induzierten Apoptose weitgehend unter dem Einfluss des PXR zu stehen scheint. Ein Unterschied besteht allerdings darin, dass die Hemmung des Pregnan-X-Rezeptors bei der Analyse des Zelltods im Gegensatz zu jener bei der Induktion von CYP3A1 nicht zu einer vollständigen Aufhebung der Dexamethason-bedingten Effekte führt, sondern im Falle der Apoptose noch immer eine Dexamethason-bedingte signifikante Reduktion der induzierten Apoptosen nachweisbar ist. Da der konstitutive Androstan-Rezeptor gemäß unserer Versuche nicht an der Dexamethason-vermittelten Apoptosehemmung beteiligt zu sein scheint, lässt dies die Vermutung zu, dass ein Teil der durch Dexamethason bedingten Effekte abgesehen von der Regulation über den PXR möglicherweise auch über andere Rezeptoren wie den Glukokortikoid-Rezeptor vermittelt werden könnte.

Für die Phenobarbital-bedingte Hemmung der Apoptose liegen in der Literatur klare Hinweise dazu vor, dass diese eine Regulation über den konstitutiven Androstan-Rezeptor erfährt. So konnten beispielsweise Yamamoto *et al.* (2004) und Huang *et al.* (2005) in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen nachweisen, dass sich Phenobarbital in Rezeptor-defizienten Mäusen als nicht-promovierend erwiesen hat. Die Aktivierung von CAR führt in diesem Zusammenhang zu Veränderungen im Expressionsprofil einer großen Anzahl von Genen, einschließlich jenen, die am xenobiotischen Stoffwechsel der Phasen I, II und III beteiligt sind oder an der Regulation von Genen, die mit der Zellproliferation oder der Apoptose assoziiert werden (Ueda *et al.*, 2002; Tien und Negishi, 2006; Yoshinari *et al.*, 2008; Ross *et al.*, 2010).

Während es generell aufgrund der überlappenden Funktionalität zu einem erheblichen Crosstalk zwischen CAR und PXR kommen kann (Xie *et al.*, 2000), scheinen die Schlüsselereignisse für die Phenobarbital-induzierte Bildung von Lebertumoren jedoch überwiegend CAR-abhängig zu sein. So wird die Bedeutung von CAR in Studien mit CAR-Knockout-Mäusen deutlich, in welchen gezeigt werden konnte, dass Phenobarbital in diesen Mäusen weder zu einem erhöhten Lebergewicht führt, noch die DNA-Synthese stimuliert oder im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen keine Phenobarbital-bedingten hepatozellulären Adenome oder Karzinome gefördert werden (Huang *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 2010). In diesem Zusammenhang fanden Yamamoto *et al.* (2004) in ihrer

Studie heraus, dass alle untersuchten Wildtyp-Mäuse multiple und große Lebertumoren nach einer 32-wöchigen Phenobarbitalbehandlung im Anschluss an eine Tumorinduktion durch Diethylnitrosamin entwickelten und infolgedessen auch zwischen der 39. und 52. Woche der Studie verstarben. Im Gegensatz dazu führte dieselbe Behandlung hingegen in keiner der CAR-Knockout-Mäuse zu eosinophilen Herden oder fortgeschrittenen Lebertumoren, was zusätzlich durch das Überleben der Mäuse im untersuchten Zeitraum weiter belegt wurde. Die Ergebnisse von Yamamoto *et al.* (2004) bestätigen demnach, dass die Aktivierung von CAR als molekulares Initiierungsereignis in diesem Prozess fungiert und daher eine wesentliche Voraussetzung für die Phenobarbital-induzierte Entwicklung von Lebertumoren darstellt.

Auch Huang *et al.* (2005) konnten zeigen, dass die Rezeptor-defizienten Mäuse gegenüber den tumorigenen Effekten von Phenobarbital resistent sind, da in den CAR-Knockout-Mäusen sowohl die Induktion der DNA-Replikation als auch die Unterdrückung der Apoptose im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen ausblieb. Zudem führte eine Behandlung mit Diethylnitrosamin und Phenobarbital bei CAR-Knockout-Mäusen weder zu hepatozellulären Adenomen noch zu Karzinomen, während in Wildtyp-Mäusen hingegen entsprechende Lebertumoren durch Phenobarbital gefördert werden konnten (Huang *et al.*, 2005).

Bezüglich der Dexamethason-vermittelten Inhibition der Apoptose liegen in der Literatur nur wenige Angaben zur Beteiligung der verantwortlichen Rezeptoren vor. Im Gegensatz zu Phenobarbital, das häufig als Modellverbindung für Studien verwendet wurde, um die zugrunde liegenden Mechanismen der nicht-genotoxischen Hepatokarzinogenese zu analysieren (Yamamoto *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2009b; Ross *et al.*, 2010; Elcombe *et al.*, 2014), sind nicht-genotoxische PXR-Aktivatoren wie Dexamethason bezüglich einer tumorigenen Wirkung sowie der hierbei beteiligten Rezeptoren generell nur unzureichend charakterisiert.

Im Hinblick auf die Entwicklung von Lebertumoren konnten lediglich Zucchini *et al.* (2005) sowohl in humanen Hepatozyten als auch in Rattenhepatozyten nachweisen, dass eine Behandlung mit PXR-Agonisten wie Dexamethason, Clotrimazol oder PCN die Überlebensfähigkeit der Hepatozyten erhöht und sie vor Staurosporin-induzierter Apoptose schützen kann. Die antiapoptotische Kapazität von Dexamethason korrelierte hierbei neben der Bcl-xL-Induktion auch mit der Bcl-2-Induktion sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene. Anhand der PXR-Aktivatoren Clotrimazol und PCN sollte daher die Bedeutung des Pregnan-X-Rezeptors für die Regulation der Bcl-xL-Expression und damit der Apoptose unter Verwendung eines gegen rPXR gerichteten Antisense-Oligonukleotids untersucht werden. Die folgende Analyse der durch Clotrimazol oder PCN bedingten Apoptoseinhibition ergab eine Abhängigkeit dieser vom PXR, da die entsprechende Hemmung der PXR-Expression die Induktion von Bcl-xL wieder annähernd vollständig aufheben konnte. Dementsprechend führte eine Überexpression von hPXR in HepG2-Zellen bei Behandlung mit Clotrimazol zu einer

vermehrten Induktion von Bcl-2 und konnte so die Zellen auch vor einer durch Fas induzierten Apoptose bewahren. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse von Zucchini *et al.* (2005) übereinstimmend mit den Daten dieser Arbeit, dass der Pregnan-X-Rezeptor für die Induktion von antiapoptotischen Proteinen sowohl in primär kultivierten humanen Hepatozyten als auch in Rattenhepatozyten essentiell ist und die Zellen entsprechend vor einer induzierten Apoptose schützen kann.

Insgesamt liegen jedoch nur wenige Informationen zur Hepatokarzinogenese von PXR-Aktivatoren vor, allerdings sind zumindest in einigen anderen Organsystemen Studien zu einer entsprechenden Apoptosehemmung sowie deren Abhängigkeit vom PXR vorhanden. So fanden Masuyama *et al.* (2007) beispielsweise heraus, dass eine Suppression des Pregnan-X-Rezeptors in Endometriumkarzinom-Zellen zu einer signifikanten Verstärkung der Apoptose in Gegenwart der Antikrebsmittel Paclitaxel, Cisplatin oder MPA (Medroxyprogesteronacetat) führte. Dementsprechend verursachte eine Überexpression des Pregnan-X-Rezeptors eine signifikante Inhibition der Apoptose in Gegenwart der PXR-Aktivatoren Paclitaxel oder Cisplatin. Auch in Ovarialkarzinom-Zellen konnten Gupta *et al.* (2008) nachweisen, dass eine Aktivierung des PXR sowohl die Proliferation der Zellen erhöht als auch die Resistenz gegen verschiedene Medikamente herbeiführt. Die antiapoptotische Rolle des Pregnan-X-Rezeptors konnten auch Zhou *et al.* (2008) in der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 zeigen. Die Aktivierung des PXR unter Verwendung eines konstitutiv aktivierten Rezeptors schützte die Kolonkarzinom-Zellen dementsprechend sowohl vor der durch Desoxycholsäure induzierten als auch vor der durch Adriamycin bedingten Apoptose, so dass ersichtlich wird, dass dieser Rezeptor eine wichtige Funktion bei der Hemmung der induzierten Apoptose einnimmt.

Die Tatsache, dass eine Hemmung des PXR bei unseren Ergebnissen im untersuchten Konzentrationsspektrum jedoch nicht zu einer vollständigen Reduktion der Dexamethason-bedingten Inhibition der Apoptose führte, legt die Vermutung nahe, dass möglicherweise auch andere Rezeptoren wie der Glukokortikoid-Rezeptor eine Rolle bei der Apoptosehemmung durch Dexamethason spielen könnten. Entsprechende Hinweise auf eine Beteiligung des Glukokortikoid-Rezeptors an der Dexamethason-bedingten Inhibition der Apoptose konnten zumindest in verschiedenen Rattenhepatom-Zelllinien gefunden werden. So fanden Scoltock *et al.* (2007) heraus, dass eine Vorbehandlung mit Dexamethason die UV-induzierte Apoptose in der Rattenhepatom-Zelllinie HTC inhibiert. Um festzustellen, ob die antiapoptotische Wirkung der Dexamethason-Behandlung abhängig vom Glukokortikoid-Rezeptor ist, wurde der selektive Glukokortikoid-Rezeptor-Antagonist RU486 herangezogen. Die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit dem Antagonisten RU486 hob die antiapoptotischen Effekte von Dexamethason auf den durch UV-Strahlung verursachten Zelltod wieder auf, was auf eine Glukokortikoid-Rezeptor-vermittelte Wirkung hinweist (Scoltock *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse konnten auch durch Yamamoto *et al.* (1998) bestätigt werden, die sowohl einen dosisabhängigen Einfluss von Dexamethason auf die spontane als auch auf die TGF- $\beta$ -

induzierte Apoptose in der Rattenhepatom-Zelllinie McA-RH8994 detektieren konnten. Progesteron, ein partieller Antagonist des Glukokortikoid-Rezeptors, inhibierte wiederum die hemmende Wirkung von Dexamethason auf die Apoptose. Die Ergebnisse von Yamamoto *et al.* (1998) und Scoltock *et al.* (2007) zeigen somit, dass die Dexamethason-bedingte Hemmung der Apoptose zumindest in Rattenhepatomzellen eine Regulation über den Glukokortikoid-Rezeptor erfährt, allerdings stellt sich hierbei die Frage, inwieweit sich diese Ergebnisse auf primäre Rattenhepatozyten übertragen lassen.

Des Weiteren ist an unseren Ergebnissen auffällig, dass ein zeitgleich vorhandener PXR zwar die über CAR regulierte CYP2B1- und CYP3A1-Expression in irgendeiner Weise inhibiert (siehe Kapitel 5.3.2), dieser Effekt jedoch nicht bei der CAR-vermittelten Hemmung der Apoptose auftritt. Während die Inhibition des Pregnan-X-Rezeptors mindestens zu einer Verdopplung der über CAR regulierten CYP2B1- bzw. CYP3A1-Expression nach einer Behandlung mit Phenobarbital führte, wurde die CAR-vermittelte Hemmung der Apoptose nicht im gleichen Maße beeinflusst. Hier wurde der über CAR regulierte Effekt, also die Phenobarbital-bedingte Inhibition der Apoptose, nicht durch die gleichzeitige Hemmung des Pregnan-X-Rezeptors verstärkt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das Vorhandensein des Pregnan-X-Rezeptors nur die Induktion der untersuchten Enzyme, nicht jedoch die CAR-vermittelte Inhibition der Apoptose beeinträchtigt.

Als mögliche Ursache für die Beeinträchtigung der CAR-regulierten Enzyminduktion durch den PXR wurde unter anderem eine Konkurrenz der beiden Rezeptoren um die bei der jeweiligen Aktivierung beteiligten gemeinsamen Cofaktoren diskutiert. Gegen diese Vermutung spricht jedoch die Tatsache, dass die Inhibition der Apoptose keine entsprechende Beeinflussung erfährt, obwohl hierfür voraussichtlich dieselben Cofaktoren benötigt werden. Wahrscheinlicher ist daher, dass die Modulation durch den PXR auf einem Wettbewerb der beiden Rezeptoren an den jeweiligen Promotoren beruht, wobei der Pregnan-X-Rezeptor an diesen favorisiert sein könnte und auf diese Weise eine Bindung von CAR an den entsprechenden Promotor antagonisieren könnte. Dies würde für eine spezifische Wirkung auf das jeweilige Enzym bzw. den jeweiligen Promotor sprechen und eine Erklärung dafür liefern, dass die CAR-bedingte Inhibition der Apoptose nicht vom Vorhandensein des Pregnan-X-Rezeptors beeinflusst wird.

Weiterhin ist bei unseren Ergebnissen auffallend, dass die gleichzeitige Hemmung der beiden Rezeptoren CAR und PXR generell zu einer größeren Reduzierung der Tumorpromotor-bedingten Apoptoseinhibition führt als die Summe der jeweiligen Rezeptoren allein. So verstärkte beispielsweise die zusätzliche Hemmung des Pregnan-X-Rezeptors die durch die Hemmung von CAR bedingte Reduktion der Phenobarbital-vermittelten Apoptoseinhibition signifikant, obwohl eine Hemmung des PXR allein keinen Einfluss auf Anzahl der Apoptosen hatte. Dies legt die Vermutung nahe, dass beide Rezeptoren bei der jeweiligen Apoptosehemmung eine Rolle spielen könnten und möglicherweise beim Ausfall eines

Rezeptors für den anderen einspringen könnten. Solange jedoch der vorwiegend zuständige Rezeptor vorhanden ist, scheint der PXR keinen Einfluss auf die CAR-vermittelte Apoptosehemmung durch Phenobarbital zu haben so wie umgekehrt ebenso wenig der CAR auf die Dexamethason-bedingte Inhibition der Apoptose.

Um im weiteren Verlauf der Frage nachzugehen, inwiefern sich die beiden nukleären Rezeptoren CAR und PXR für die antiapoptotischen Effekte der NDL-PCBs spezifisch oder wechselwirkend verantwortlich zeigen, sollte im folgenden Kapitel der Einfluss der beiden Rezeptoren auf die NDL-PCB-bedingte Apoptosehemmung ergründet werden.

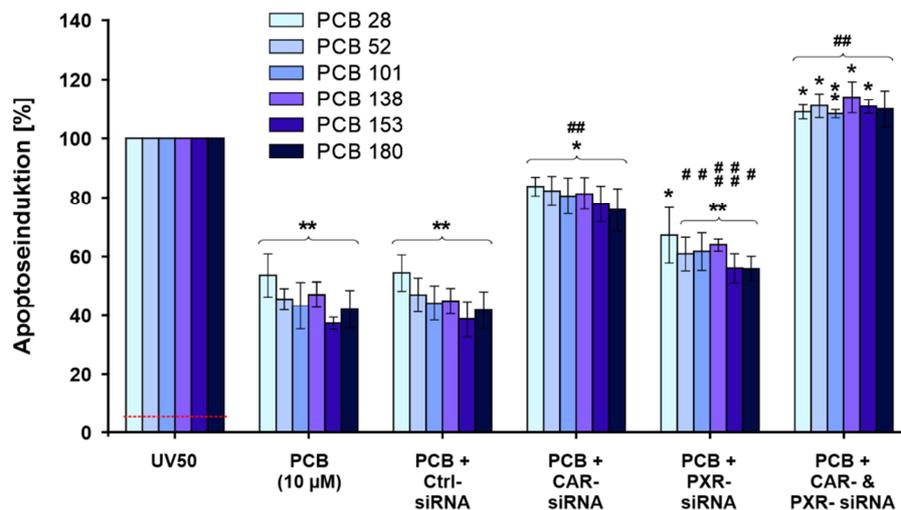
### **5.7.3.2 Bedeutung von CAR und PXR für die NDL-PCB-bedingte Inhibition der UV-induzierten Apoptose sowie der Aktivität verschiedener Caspasen**

Aufgrund der überlappenden Funktionalität der beiden nukleären Rezeptoren sollten nähere Kenntnisse darüber erlangt werden, ob die antiapoptotische Wirkung der NDL-PCBs über den CAR, den PXR oder möglicherweise über beide Rezeptoren vermittelt wird. Während für den tumorpromovierenden Effekt der NDL-PCBs eine Abhängigkeit von CAR angenommen werden kann, wurde ein Einfluss des PXR auf die Apoptosehemmung durch nicht-dioxinartige PCBs bisher noch nicht ergründet.

Bei der NDL-PCB-bedingten Induktion von CYP3A1 wurde bereits ersichtlich, dass diese zwar vornehmlich eine Regulation über den konstitutiven Androstan-Rezeptor erfährt, jedoch auch zu einem geringen Teil über den Pregnan-X-Rezeptor vermittelt wird. Diesbezüglich stellt sich die Frage, ob auch die inhibitorische Wirkung auf die Apoptose möglicherweise durch den PXR beeinflusst wird bzw. welchen Anteil die beiden Rezeptoren jeweils an der durch die nicht-dioxinartigen PCBs bewirkten Apoptosehemmung aufweisen. Um die Mitwirkung von CAR und PXR bei der Inhibition UV-induzierter Apoptosen in primären Rattenhepatozyten zu untersuchen, wurde mit Hilfe spezifischer siRNAs gegen CAR und PXR überprüft, inwiefern sich die Beeinflussung der Aktivität der beiden Rezeptoren auf die mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung der Nukleusmorphologie bestimmte Apoptoserate bzw. die Aktivierung der untersuchten Caspasen auswirkt. Hierfür wurden die Hepatozyten vor der UV-Bestrahlung mit den jeweiligen siRNAs transfiziert und nach 24-stündiger Inkubation mit den jeweiligen NDL-PCBs zunächst die mittels Analyse DAPI-gefärbter Nuklei ermittelte Apoptoserate nach Transfektion mit den spezifischen CAR- und PXR-siRNA-Konstrukten mit jener von nicht-transfizierten und mit der entsprechenden Substanz behandelten Hepatozyten verglichen.

Hierbei konnten die NDL-PCBs, welche die UV-induzierten Apoptosen je nach Chlorierungsgrad auf 37 % bis 53 % der Kontrollinkubation reduzierten, nach Transfektion mit der CAR-siRNA nur noch eine geringe Hemmung der Apoptosen auf 76 % (PCB 180) bis 84 % (PCB

28) der Kontrolle bewirken (Abb. 55). Der hemmende Effekt durch die CAR-Inhibition war dabei bei allen NDL-PCBs hoch signifikant ( $p < 0,01$ ). Anders als bei Phenobarbital jedoch, dessen apoptosehemmende Wirkung durch die CAR-siRNA nahezu vollständig unterdrückt wurde, unterschied sich die Apoptoserate bei den NDL-PCBs statistisch auch weiterhin von jener der Kontrolle ohne entsprechende NDL-PCB-Inkubation.



**Abbildung 55: Bedeutung von CAR und PXR für die Hemmung der UV-induzierten Apoptose durch verschiedene NDL-PCBs.** Quantitative Analyse der mittels fluoreszenzmikroskopischer Auszählung DAPI-gefärbter Nuklei ermittelten Apoptoseinduktion nach UV-Bestrahlung ( $50 \text{ J/m}^2$ ) in mit jeweils  $10 \mu\text{M}$  der NDL-PCBs 28, 52, 101, 138, 153 bzw. 180 behandelten Kulturen nach Vorinkubation mit einer Kontroll-siRNA (Ctrl) bzw. CAR-siRNA, PXR-siRNA oder beiden siRNAs in Kombination (CAR & PXR). Darstellung der Apoptoserate in Relation (%) zur Anzahl apoptotischer Nuklei in mit der Lösungsmittelkontrolle behandelten Hepatozytenkulturen (UV50). MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ , statistischer Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ ; Vergleich zur Apoptoseinduktion in ausschließlich mit den NDL-PCBs behandelten Kulturen: #:  $p < 0,05$  und ##:  $p < 0,01$ . Die mittlere basale Apoptoserate in unbehandelten Kulturen in Relation zu UV-behandelten Kulturen ist durch die gestrichelte rote Linie gekennzeichnet.

Auch die Inhibition des Pregnan-X-Rezeptors bewirkte eine Reduktion des apoptosehemmenden Effekts der NDL-PCBs, die bei allen PCBs bis auf PCB 28 statistisch signifikant gegenüber der alleinigen Inkubation mit den jeweiligen PCBs war. Dabei lag die durch den PXR-Knockdown bewirkte Reduktion des apoptoseinhibierenden Effekts mit Werten von 56 % (PCB 180) bis 67 % (PCB 28) unter jener durch die CAR-Hemmung hervorgerufenen Reduktion. Im Gegensatz zu Phenobarbital hatte die Hemmung des Pregnan-X-Rezeptors demnach einen Einfluss auf den apoptoseinhibierenden Effekt der NDL-PCBs, so dass davon auszugehen ist, dass ein geringer Teil dieser apoptosehemmenden Wirkung auch über den PXR vermittelt wird. Der Großteil der inhibitorischen Wirkung auf die Apoptose

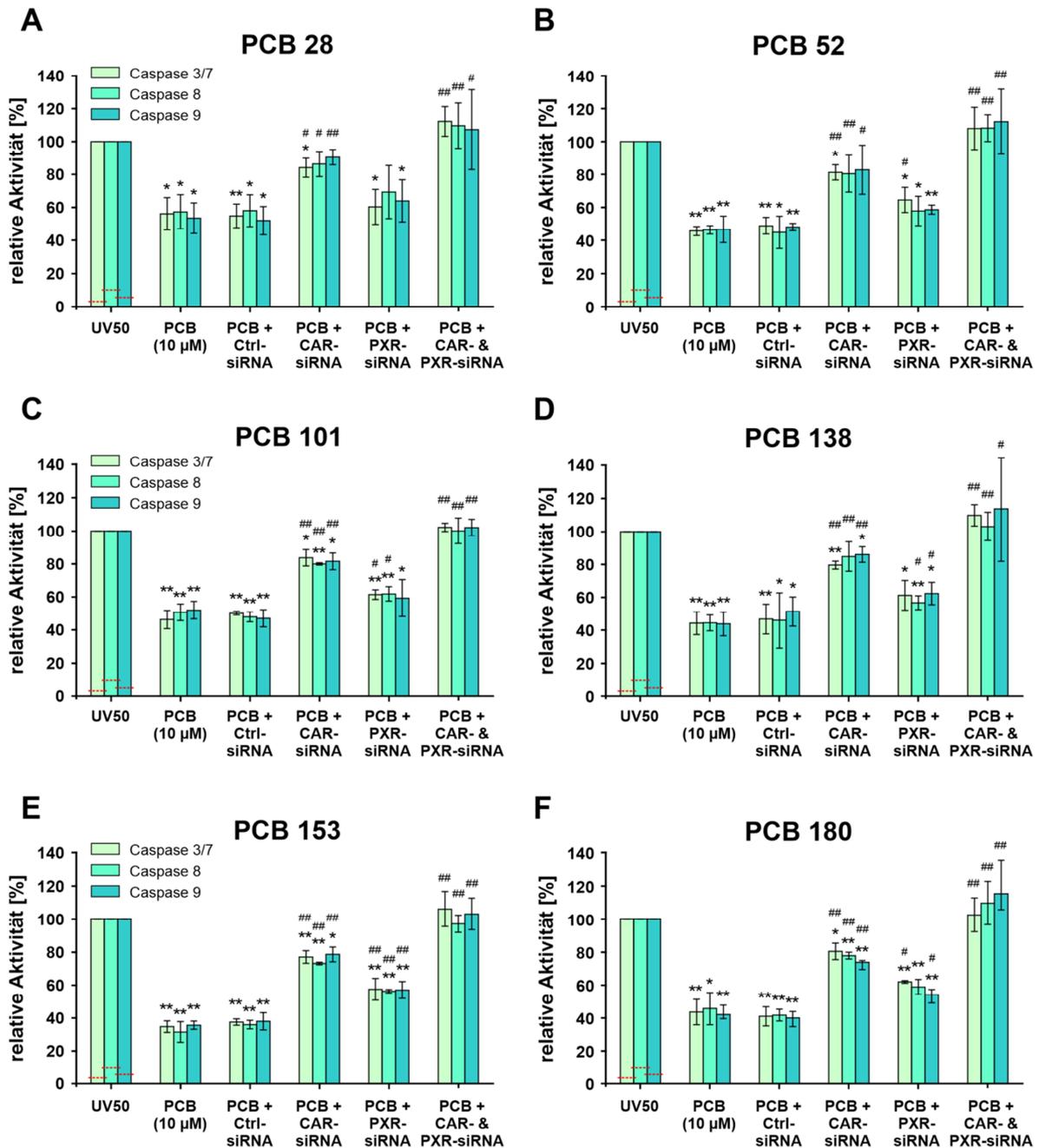
scheint jedoch auch bei den NDL-PCBs wieder über den konstitutiven Androstan-Rezeptor reguliert zu werden.

Die simultane Hemmung von CAR und PXR führte wiederum wie bereits bei Phenobarbital und Dexamethason zum vollständigen Verlust der durch die NDL-PCBs bewirkten Apoptosehemmung. Dabei waren die Apoptoseraten bei den NDL-PCBs 28, 52, 101, 138 sowie 153 signifikant gegenüber jener der Kontrolle erhöht.

Abschließend sollte die Abhängigkeit der durch die NDL-PCBs bewirkten Apoptosehemmung von der Funktion der nukleären Rezeptoren CAR und PXR auch hinsichtlich der während der Apoptose induzierten Caspasen untersucht werden. Analog zu vorherigen Versuchsreihen wurde hierzu die UV-bedingte Aktivierung der Caspasen 3/7, 8 und 9 unter dem Einfluss der jeweiligen nicht-dioxinartigen PCBs nach vorangegangener Hemmung der entsprechenden Rezeptoren durch die jeweilige spezifische siRNA-Transfektion gemessen. Die bereits bei der fluoreszenzmikroskopischen Bestimmung apoptotischer Zellkerne beobachtete Abhängigkeit der apoptosehemmenden Wirkung von der Funktion der beiden Rezeptoren CAR und PXR konnte hierbei auch durch die Analyse der Caspase-Aktivierung nochmals bestätigt werden (Abb. 56).

Während die NDL-PCBs die Caspase-Aktivität nach UV-Bestrahlung je nach eingesetztem NDL-PCB und betrachteter Caspase auf 32 % bis 57 % der Aktivität unter Kontrollbedingungen reduzierten, bewirkten die PCBs nach Inhibition der CAR-Expression nur noch eine Reduktion der Caspase-Aktivität auf 73 % bis 91 %. Dies entsprach im Mittel einer Reduktion der durch die nicht-dioxinartigen PCBs bewirkten Hemmung um etwa zwei Drittel. Somit führte die Hemmung des konstitutiven Androstan-Rezeptors auch bei den untersuchten Caspasen nicht zu einer vollständigen Aufhebung des apoptoseinhibierenden Effekts der NDL-PCBs, wobei vor allem die höher chlorierten Verbindungen noch eine signifikante Wirkung gegenüber den ausschließlich mit der Lösungsmittelkontrolle inkubierten Hepatozyten aufwiesen.

Durch die Hemmung des Pregnan-X-Rezeptors konnte ebenfalls eine Reduktion des apoptoseinhibierenden Effekts der NDL-PCBs nachgewiesen werden, welche ähnlich zu den Ergebnissen bei der Auszählung apoptotischer Nuklei wieder geringer ausfiel als jene Aufhebung durch die Hemmung des konstitutiven Androstan-Rezeptors. So konnten bei allen drei Caspasen Aktivitätslevel zwischen 54 % und 69 % der in den Referenzproben ermittelten Caspase-Aktivitäten gemessen werden, wobei sich vornehmlich bei den höher chlorierten NDL-PCBs signifikante Auswirkungen zeigten. Auffällig ist hierbei, dass eine Hemmung des Pregnan-X-Rezeptors bei PCB 28 abermals keine signifikante Verringerung des apoptoseinhibierenden Effekts bewirkte, wohingegen diese Hemmung bei PCB 153 besonders ausgeprägte Effekte aufwies und in einer hochsignifikanten Reduktion von dessen apoptosehemmender Wirkung mündete.



**Abbildung 56: Bedeutung von CAR und PXR für die Hemmung der UV-induzierten Caspase-Aktivität durch verschiedene NDL-PCBs.** Analyse der enzymatischen Aktivität der Caspasen 3/7, 8 und 9 nach UV-Bestrahlung ( $50 \text{ J/m}^2$ ) in mit jeweils  $10 \mu\text{M}$  der NDL-PCBs 28, 52, 101, 138, 153 bzw. 180 (A – F) behandelten Kulturen nach Vorinkubation mit einer Kontroll-siRNA (Ctrl) bzw. CAR-siRNA, PXR-siRNA oder beiden siRNAs in Kombination (CAR & PXR). Darstellung der Caspase-Aktivität in Relation (%) zu jener in mit der Lösungsmittelkontrolle behandelten Hepatozytenkulturen (UV50). MW  $\pm$  SD,  $n = 3$ , statistischer Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle: \*:  $p < 0,05$  und \*\*:  $p < 0,01$ ; Vergleich zur Caspase-Aktivität in ausschließlich mit den NDL-PCBs behandelten Kulturen: #:  $p < 0,05$  und ##:  $p < 0,01$ . Die basalen Aktivitätslevel der jeweiligen Caspasen in nicht mit UV-Licht behandelten Kulturen in Relation zu den mit UV bestrahlten Kulturen sind durch gestrichelte rote Linien gekennzeichnet.

Diesbezüglich ergeben sich Parallelen zur NDL-PCB-bedingten Induktion von CYP3A1, da auch hier bei PCB 28 infolge einer Hemmung des Pregnan-X-Rezeptors keine Effekte auftraten, während für PCB 153 der stärkste Rückgang der CYP3A1-Induktion durch die Inhibition des Rezeptors zu verzeichnen war. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass PCB 28 demnach nicht im selben Maße über den PXR reguliert zu werden scheint wie die anderen PCBs, was möglicherweise in einer geringeren Bindungsaffinität dieses mono-*ortho*-chlorierten PCBs zum Pregnan-X-Rezeptor begründet sein könnte.

Da die apoptoseinhibierende Wirkung der NDL-PCBs 52, 101, 138, 153 und 180 dagegen durch eine entsprechende Hemmung des Pregnan-X-Rezeptors eine Beeinträchtigung erfuhr, kann davon ausgegangen werden, dass dem PXR bei diesen nicht-dioxinartigen PCBs auch eine Rolle bei der Inhibition der Apoptose zukommt. Aufgrund der markanten Reduktion der NDL-PCB-bedingten Apoptosehemmung durch die CAR-siRNA kann der Großteil dieser Inhibition allerdings vermutlich dennoch wieder dem konstitutiven Androstan-Rezeptor zugesprochen werden.

Dass die antiapoptotischen Effekte der NDL-PCBs zum Teil auch über den PXR vermittelt werden, steht im Einklang damit, dass diese apoptosehemmende Wirkung gerade in Bezug auf eine erhöhte Expression von Bcl-xL / Bcl-2 bzw. einer essentiellen Aktivierung von NF- $\kappa$ B eher jener von Dexamethason ähnelt als der von Phenobarbital. So konnte anhand von Knockout-Mäusen mit einer Deletion der p50-Untereinheit von NF- $\kappa$ B gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor nicht für die beobachteten Änderungen bezüglich der Zellproliferation bzw. der durch Phenobarbital induzierten Apoptose erforderlich ist (Tharappel *et al.*, 2008), während eine solche Aktivierung von NF- $\kappa$ B sowohl bei der Dexamethason- als auch bei der NDL-PCB-vermittelten Tumorpromotion eine entscheidende Rolle einnimmt (Lu *et al.*, 2004; Glauert *et al.*, 2008; Evans-Storms und Cidlowski, 2000). Weiterhin wird eine Beteiligung des PXR an der Apoptosehemmung auch durch Reporter-gen-Assays untermauert, in welchen die NDL-PCBs 101, 138, 153 und 180 als Agonisten des Pregnan-X-Rezeptors identifiziert werden konnten (Creusot *et al.*, 2010; Al-Salman und Plant, 2012). In Anbetracht dessen, dass der Pregnan-X-Rezeptor bei den NDL-PCBs 52, 101, 138, 153 und 180 auch einen Beitrag zu deren antiapoptotischen Effekten leistet, ist die Wirkweise dieser NDL-PCBs zum Teil von Phenobarbital abzugrenzen, da dessen Wirkung ausschließlich über den konstitutiven Androstan-Rezeptor reguliert wird.

Insgesamt überwiegen jedoch auch bei der NDL-PCB-bedingten Apoptoseinhibition wieder die Gemeinsamkeiten mit Phenobarbital, was sich auch in der detektierten Abhängigkeit der Apoptosehemmung vom konstitutiven Androstan-Rezeptor konsistent widerspiegelt. Dies stimmt auch mit den in der Fachliteratur beschriebenen Erkenntnissen überein, wobei sich insbesondere bei der Selektion nach aktivierenden Mutationen in dem für  $\beta$ -Catenin kodierenden Gen bzw. der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions (GJIC) Parallelitäten zwischen den Substanzen zeigen. So konnte sowohl nach einer Behandlung mit

einer Reihe nicht-dioxinartiger PCBs als auch mit Phenobarbital eine vergleichbare Verringerung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions detektiert werden (Kolaja *et al.*, 2000; Machala *et al.*, 2003; Hamers *et al.*, 2011), woraus letztlich ein Verlust der tumorsuppressiven Wirkung in den betroffenen Zellen resultiert (Chipman *et al.*, 2003). Auch eine anomale  $\beta$ -Catenin-abhängige Signalgebung hat eine erhöhte Zellproliferation zur Folge sowie gleichzeitig eine Inhibition der Apoptose (Shang *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2014), in diesem Zusammenhang wiesen etwa 80 % der in Mäusen aufgetretenen Lebertumoren sowohl nach einer Behandlung mit Phenobarbital als auch mit dem NDLC-PCB 153 Mutationen in dem für  $\beta$ -Catenin kodierenden Gen auf (Aydinlik *et al.*, 2001; Strathmann *et al.*, 2006).

Ebenfalls gemeinsam mit Phenobarbital trat der Effekt auf, dass ein zeitgleich vorhandener PXR auch bei den NDLC-PCBs nicht zu einer Inhibition der CAR-vermittelten Apoptosehemmung führte, obwohl der PXR die über CAR regulierte CYP2B1- und CYP3A1-Expression effektiv inhibierte. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass zwischen diesen beiden Prozessen der Apoptosehemmung und der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme keine hinreichende Korrelation besteht und weitreichende Unterschiede bezüglich der Signalwege existieren könnten. Diese Erkenntnis wird beispielsweise auch durch Studien bestätigt, die  $\beta$ -Catenin betreffen, da ein Knockout des für  $\beta$ -Catenin kodierenden Gens *Cttnb1* zu einer vollständigen Elimination der Phenobarbital-vermittelten Tumorpromotion führte (Rignall *et al.*, 2011), bei diesen Mäusen allerdings noch eine Phenobarbital-bedingte Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme festgestellt werden konnte (Braeuning *et al.*, 2009; Braeuning *et al.*, 2011). Hierdurch wird die CAR-abhängige, durch Phenobarbital bedingte Cyp2b10-Regulation von einem für die Phenobarbital-vermittelte Hepatokarzinogenese erforderlichen Schlüsselsignalweg getrennt (Rignall *et al.*, 2011). Dies spiegelt sich auch in Studien von Li *et al.* (2017) wider, welche anhand eines Mausmodells mit einer Deletion aller *Cyp2b*-Gene zeigen konnten, dass die Phenobarbital-bedingte Rate an proliferierenden Hepatozyten in diesen Tieren zwar signifikant gegenüber jener in Wildtyp-Mäusen verringert wurde, die Proliferation jedoch nicht vollständig aufgehoben wurde und auch ohne Cyp2b-Induktion weiterhin viele proliferierende Hepatozyten im Vergleich zu den Kontrolltieren nachgewiesen werden konnten. Weiterhin sprechen auch humane Hepatozyten nicht auf die antiapoptotischen Eigenschaften von Phenobarbital an (Hasmall und Roberts, 1999), obwohl in diesen wie auch bei Nagetieren fremdstoffmetabolisierende Enzyme induziert werden konnten (Hirose *et al.*, 2009). Somit kann aus einer Aktivierung spezifischer fremdstoffmetabolisierender Enzyme nicht auf eine entsprechende Tumorpromotion bzw. Hemmung der Apoptose geschlossen werden.

Gleichwohl scheint zwischen der Hemmung der Apoptose und der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme ein Zusammenhang zu bestehen, da bei beiden Prozessen sowie bei der Abhängigkeit dieser beiden Prozesse vom Chlorierungsgrad der NDLC-PCBs dieselben Rezeptoren beteiligt sind. So konnte belegt werden, dass CAR und PXR sowohl für die

Enzyminduktion als auch für die Inhibition der Apoptose jeweils im gleichen Verhältnis verantwortlich sind, wobei der Großteil dieser Wirkungen über den konstitutiven Androstan-Rezeptor reguliert wird und der Pregnan-X-Rezeptor eine wesentlich geringere Rolle einnimmt. Weiterhin scheinen beide Prozesse auch über oxidativen Stress miteinander verbunden zu sein, so könnte der in den Studien von Li *et al.* (2017) gefundene Einfluss der Enzyminduktion auf die Phenobarbital-bedingte Proliferation der Hepatozyten mit der zugehörigen Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zusammenhängen. Zu oxidativem Stress wurde diesbezüglich bereits berichtet, dass eine Verabreichung von CYP2B-Induktoren wie Phenobarbital oder NDL-PCBs mit Auswirkungen auf diesen verbunden sein kann, da die Induktion der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme zu einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in der Nagetierleber führt (Dostalek *et al.*, 2007). Vor allem in Bezug auf die Tumorpromotion durch die nicht-dioxinartigen PCBs implizieren die vorhandenen Daten aus der Literatur eine bedeutende Rolle für eine durch oxidativen Stress vermittelte Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B (Lu *et al.*, 2004; Glauert *et al.*, 2008), so dass auch die Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme mit Auswirkungen auf die Kanzerogenese verbunden sein kann.

Obwohl Phenobarbital aus zahlreichen Studien als nicht-genotoxisches Hepatokarzinogen bei Nagetieren bekannt ist (Whysner *et al.*, 1996; Braeuning *et al.*, 2014), gibt es Bedenken hinsichtlich der Relevanz dieser tumorpromovierenden Wirkung für den Menschen. Diese werden beispielsweise auch durch Daten aus einer Reihe epidemiologischer Studien gestützt, welche kaum Anhaltspunkte dafür liefern, dass aufgrund einer chronischen Exposition gegenüber Phenobarbital ein erhöhtes Lebertumorrisiko besteht (IARC, 2001; Elcombe *et al.*, 2014). In Anbetracht dessen, dass bei der NDL-PCB-bedingten Apoptosehemmung jedoch auch der Pregnan-X-Rezeptor mit dieser in Verbindung gebracht wird, ist die Tumorpromotion der nicht-dioxinartigen PCBs teilweise von jener von Phenobarbital abzugrenzen. Es kann daher angenommen werden, dass die NDL-PCB-vermittelte Hemmung der Apoptose bzw. Tumorpromotion zum Teil auch über den für PXR-Aktivatoren wie Dexamethason bekannten Wirkmechanismus verläuft. Angesichts dessen, dass für Dexamethason auch ein hemmender Einfluss auf die Apoptose in humanen Hepatozyten gefunden werden konnte (Zucchini *et al.*, 2005; Bailly-Maitre *et al.*, 2001) und der Wirkmechanismus der NDL-PCB-bedingten Tumorpromotion in Bezug auf Bcl-2 und NF- $\kappa$ B eher jenem von Dexamethason als dem von Phenobarbital ähnelt, kann ein möglicher Einfluss der nicht-dioxinartigen PCBs auf die Kanzerogenese beim Menschen nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Aufgrund der lebenslangen Exposition der menschlichen Bevölkerung gegenüber den nicht-dioxinartigen PCBs ist es unerlässlich, näheren Aufschluss über die Wirkmechanismen der NDL-PCBs zu erhalten, um diese bei einer Risikobewertung dieser Substanzen entsprechend berücksichtigen zu können. Gerade in Bezug auf die Tumorpromotion sind weitere

Untersuchungen notwendig, welche ausschließlich die spezifischen Wirkungen der NDL-PCBs berücksichtigen und die Auswirkungen dieser Verbindungen auf die menschliche Gesundheit adressieren.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Aufgrund ihrer chemischen Stabilität sowie ihrer toxischen Eigenschaften zählen die polychlorierten Biphenyle zu den persistenten organischen Schadstoffen (Van den Berg *et al.*, 2006). Da sie auch heute noch ubiquitär in der Natur vorhanden sind und sich angesichts ihrer hohen Lipophilie in der Nahrungskette anreichern, ist es gerade im Hinblick auf die lebenslange Exposition der menschlichen Bevölkerung von großer Bedeutung, näheren Aufschluss über die Wirkmechanismen dieser Substanzen zu erhalten und diese bei einer entsprechenden Risikobewertung zu berücksichtigen.

Die nicht-dioxinartigen PCBs werden hierbei oft als Substanzen vom Phenobarbital-Typ bezeichnet, so dass häufig davon ausgegangen wird, dass diese PCBs ähnliche Wirkungen wie Phenobarbital aufweisen und auch eine NDL-PCB-vermittelte Tumorpromotion über den für Phenobarbital bekannten Wirkmechanismus verläuft. Während für den tumorpromovierenden Effekt von Phenobarbital eine Abhängigkeit vom konstitutiven Androstan-Rezeptor bekannt ist (Yamamoto *et al.*, 2004), wurde ein Einfluss des Pregnan-X-Rezeptors auf die Apoptosehemmung durch nicht-dioxinartige PCBs bisher jedoch noch nicht ergründet. Da jedoch aufgrund der überlappenden Funktionalität dieser beiden Rezeptoren ein komplexer Crosstalk zwischen ihren Signalwegen besteht, sollte erörtert werden, ob eine NDL-PCB-bedingte Inhibition der Apoptose auch zu einem gewissen Teil dem PXR zugesprochen werden kann. Gerade solche Substanzen, die spezifisch den Pregnan-X-Rezeptor aktivieren können, sind bisher in Bezug auf eine mögliche Hepatokarzinogenität nur unzureichend charakterisiert (Elcombe *et al.*, 2014).

Neben der Analyse der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme CYP2B1 und CYP3A1 sollte der Einfluss ausgewählter nicht-dioxinartiger PCBs daher zudem hinsichtlich ihrer Effekte auf die UV-induzierte Apoptose untersucht und mit den entsprechenden Wirkungen des bekannten CAR-Agonisten Phenobarbital sowie des PXR-Aktivators Dexamethason verglichen werden. Weiterhin sollten mittels spezifischer siRNAs bzw. einer Hemmung der Signalwege durch Okadainsäure und Ketoconazol nähere Erkenntnisse darüber erlangt werden, inwiefern der konstitutive Androstan-Rezeptor bzw. der Pregnan-X-Rezeptor bei der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme sowie der Inhibition der Apoptose eine entscheidende Rolle spielen und ob zwischen diesen beiden Prozessen eine hinreichende Korrelation besteht. Um hierbei die Problematik vieler nicht-dioxinartiger PCB-Verbindungen zu umgehen, dass die jeweiligen Effekte aufgrund eines gleichzeitigen Auftretens von dioxinartigen PCBs, polychlorierten Dibenzofuranen (PCDFs) oder polychlorierten Dibenzodioxinen (PCDDs) nicht eindeutig den NDL-PCBs zugeordnet werden können, wurden in dieser Arbeit ausschließlich hoch aufgereinigte Verbindungen verwendet.

Zur Analyse der Expressionslevel von CYP2B1 und CYP3A1 wurde weiterhin ein entsprechend modifiziertes Perfusionsprotokoll nach Meredith (1988) herangezogen, welches gegenüber klassischen Kollagenase-haltigen Perfusionen eine verbesserte Stabilität des Cytochrom-P450-Systems verspricht und demzufolge auch auf eine erhöhte Funktionalität der jeweiligen Rezeptoren schließen lässt. Während Phenobarbital hierbei über nahezu das gesamte gemessene Konzentrationsspektrum eine signifikante Erhöhung der CYP2B1-mRNA-Expression um das bis zu 442-Fache in den isolierten Hepatozyten verzeichnen konnte, vermochte der CAR-Agonist bei der CYP3A1-mRNA-Expression dagegen lediglich eine geringe, jedoch nicht signifikante Erhöhung auf das 8-Fache der basalen Expression zu induzieren. Die Inkubation mit dem PXR-Agonisten Dexamethason führte im Gegensatz zu Phenobarbital wiederum zu einer mit der Konzentration zunehmenden CYP3A1-Expression, welche ihr Maximum bei 50  $\mu\text{M}$  Dexamethason mit einer im Mittel 180-fachen Erhöhung erreichte. Bezüglich der an den jeweiligen Genregulationen beteiligten Rezeptoren ergaben die Untersuchungen mittels siRNA, Okadainsäure und Ketoconazol, dass die Induktion von CYP2B1 und CYP3A1 durch Phenobarbital hierbei vornehmlich über den CAR vermittelt wird, während dem PXR für diese Induktionen bestenfalls eine geringe Rolle zugesprochen werden kann. Die CYP3A1-Expression durch Dexamethason wird dagegen über den Pregnan-X-Rezeptor reguliert, wobei eine Induktion von CYP2B1 durch Dexamethason bzw. ein Einfluss des konstitutiven Androstan-Rezeptors diesbezüglich nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 57).

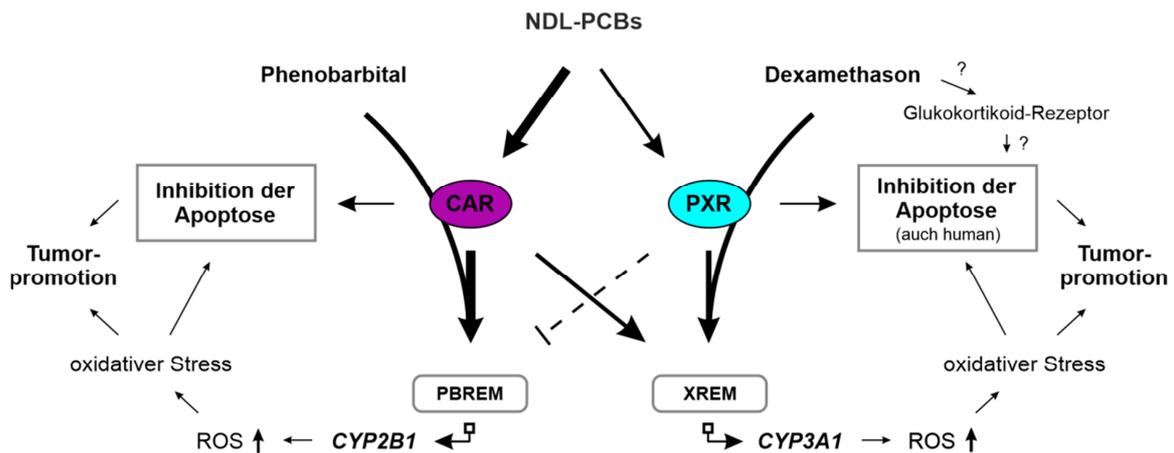
Ebenso wie Phenobarbital konnten auch die nicht-dioxinartigen PCBs eine signifikante Induktion des fremdstoffmetabolisierenden Enzyms CYP2B1 verzeichnen. Der Vergleich der jeweiligen PCB-Kongeneren mit Phenobarbital ergab, dass die Kongeneren 28, 52 und 101, welche maximale Expressionsraten vom Faktor 262 bis 376 induzierten, eine geringere als die maximal durch Phenobarbital hervorgerufene Induktion bewirkten. Die Kongeneren 138, 153 und 180 hingegen erreichten Induktionen zwischen dem 575- und 662-Fachen und vermochten somit eine höhere maximale Induktion als Phenobarbital auszulösen. Hierbei war auffällig, dass das Induktionsvermögen der jeweiligen NDL-PCBs weitgehend mit ihrem Chlorierungsgrad bzw. der zugehörigen Hydrophobizität in Verbindung gebracht werden konnte. Hinsichtlich der durch die jeweiligen Kongeneren maximal induzierten CYP2B1-Expression lässt sich dabei folgende Reihenfolge des Induktionspotentials für die einzelnen NDL-PCBs aufstellen, welche identisch zu jener von CYP3A1 ausfällt: PCB 28 < PCB 52 < PCB 101 < PCB 138 < PCB 180  $\approx$  PCB 153.

Für CYP3A1 fiel jedoch die Höhe der maximal induzierten Expressionslevel deutlich geringer aus als jene bei der CYP2B1-Induktion, so zeigte sich, dass die nicht-dioxinartigen PCBs im Vergleich zur CYP3A1-Induktion mehr als 10-fach potenter erscheinen, Gene der CYP2B-Familie zu induzieren. Hierbei wurde die maximale CYP3A1-Induktion bei allen untersuchten NDL-PCBs mit der höchsten eingesetzten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  erreicht und betrug

zwischen dem 37-Fachen (PCB 28) und dem 62-Fachen (PCB 153) der basalen Expression. Beim Vergleich mit Dexamethason wird deutlich, dass die Induktion von CYP3A1 durch den PXR-Agonisten wesentlich höher ausfiel als jene durch die NDL-PCBs vermittelte CYP3A1-Expression. Demgegenüber ergab sich für die NDL-PCBs dagegen wiederum eine bis zu 8-fach höhere maximale Induktion der CYP3A1-Expression als für den klassischen CAR-Agonisten Phenobarbital. Diese Beobachtung warf die Frage auf, ob sich nicht zumindest zum Teil auch der Pregnan-X-Rezeptor für die CYP3A1-Induktion durch die nicht-dioxinartigen PCBs verantwortlich zeichnet. Die nachfolgenden Untersuchungen ergaben, dass die Hemmung des konstitutiven Androstan-Rezeptors eine vollständige Unterdrückung der CYP2B1-Induktion zur Folge hatte, so dass die NDL-PCB-bedingte Expression von CYP2B1 wie bereits bei Phenobarbital wieder ausschließlich dem konstitutiven Androstan-Rezeptor zugesprochen werden kann. Zumindest in Bezug auf die CYP3A1-Expression scheinen sich die nicht-dioxinartigen PCBs jedoch von einer klassischen Induktion vom Phenobarbital-Typ abzugrenzen. So wird die CYP3A1-Expression im Falle der NDL-PCBs zwar zum Großteil ebenfalls wieder über den konstitutiven Androstan-Rezeptor reguliert, kann im Gegensatz zu jener von Phenobarbital allerdings auch zu einem gewissen Teil dem Pregnan-X-Rezeptor zugeordnet werden (Abb. 57).

Hierbei scheint PCB 28 allerdings nicht im selben Ausmaß über den PXR reguliert zu werden wie die anderen PCBs, da für dieses NDL-PCB keine Verringerung der CYP3A1-Induktion infolge der PXR-siRNA zu verzeichnen war. Möglicherweise könnte dieser Unterschied zwischen den PCBs darin begründet sein, dass PCB 28 abgesehen von seinem geringeren Chlorierungsgrad im Gegensatz zu den anderen verwendeten NDL-PCBs nur an einer *ortho*-Position chloriert ist, wodurch beispielsweise die Bindungsaffinität dieses PCBs zum Pregnan-X-Rezeptor eingeschränkt sein könnte.

Weiterhin führte die Behandlung mit der PXR-siRNA im Schnitt mindestens zu einer Verdopplung der CAR-regulierten CYP2B1-Induktion, so dass ein vorhandener bzw. aktivierter PXR die CAR-vermittelte CYP2B1-Expression effektiv zu inhibieren scheint. So wurde die CYP2B1-Expression durch PCB 52, PCB 153 oder Phenobarbital anhand einer zusätzlichen Inkubation mit dem PXR-Agonisten Dexamethason annähernd vollständig blockiert und betrug nur noch maximal 3 % der CYP2B1-Expression ohne zeitgleiche Dexamethason-Zugabe. Demgegenüber vermochten PCB 52, PCB 153 und Phenobarbital die unter Kontrollbedingungen etwa 150-fache CYP3A1-Expression infolge einer Behandlung mit Dexamethason jedoch nur um maximal 33 Prozent zu reduzieren. Während der Pregnan-X-Rezeptor die CAR-vermittelte CYP2B1-Expression durch Phenobarbital sowie die NDL-PCBs also effektiv zu inhibieren vermag, scheint eine Beeinflussung der PXR-regulierten CYP3A1-Expression durch den konstitutiven Androstan-Rezeptor im Gegenzug nicht im selben Maße gegeben zu sein (Abb. 57).



**Abbildung 57: Schematische Darstellung der Rezeptor-abhängigen Induktion von CYP2B1 und CYP3A1 bzw. der Apoptosehemmung durch Phenobarbital, Dexamethason sowie die nicht-dioxinartigen PCBs.**

Aufgrund der überlappenden Funktionalität der beiden Rezeptoren sollten weiterhin nähere Kenntnisse darüber erlangt werden, ob die antiapoptotische Wirkung der NDL-PCBs über den CAR, den PXR oder möglicherweise über beide Rezeptoren vermittelt wird. Zur Analyse der inhibitorischen Wirkung der Substanzen auf die UV-induzierte Apoptose wurden hierfür sowohl die Aktivitätslevel der Caspasen 3/7, 8 und 9 fluorimetrisch bestimmt als auch morphologische Analysen des Zellkerns nach einer Färbung mit DAPI herangezogen. Hierbei zeigten sowohl Phenobarbital als auch der PXR-Agonist Dexamethason in allen Konzentrationsstufen einen hemmenden Effekt auf die UV-induzierte Apoptose. Die relative Anzahl der Apoptosen nahm dabei bei beiden Substanzen mit steigender Konzentration kontinuierlich ab und konnte bei der höchsten eingesetzten Konzentration annähernd wieder das Niveau der unbestrahlten Hepatozytenkulturen erreichen. Nach Transfektion der Hepatozyten mit der CAR-siRNA blieb der apoptosehemmende Effekt von Phenobarbital jedoch nahezu vollständig aus und unterschied sich statistisch nicht mehr signifikant von den Kontrollbedingungen. Der Pregnan-X-Rezeptor konnte im Gegenzug keinen Einfluss auf diese Apoptosehemmung verzeichnen, so dass die durch Phenobarbital vermittelte Inhibition der Apoptose wie auch bereits die Enzyminduktion vornehmlich über den konstitutiven Androstan-Rezeptor reguliert wird (Abb. 57). Dagegen bewirkte die Hemmung des Pregnan-X-Rezeptors, dass Dexamethason die UV-induzierte Apoptose nur noch um etwa 20 % zu inhibieren vermochte, was darauf hindeutet, dass die Dexamethason-bedingte Inhibition der Apoptose weitgehend unter dem Einfluss des Pregnan-X-Rezeptors zu stehen scheint. Jedoch hatte die Hemmung des PXR keine vollständige Reduktion der Dexamethason-bedingten Inhibition der Apoptose gegenüber den Kontrollbedingungen zur Folge, so dass möglicherweise auch andere Rezeptoren wie der Glukokortikoid-Rezeptor eine geringe Rolle bei der Dexamethason-vermittelten Apoptosehemmung spielen könnten (Abb. 57).

Für die nicht-dioxinartigen PCBs konnte ebenfalls ein hemmender Einfluss auf die UV-induzierte Apoptose beobachtet werden, welcher wie auch bereits bei den beiden anderen Substanzen mit steigender PCB-Konzentration stetig zunahm. Beim Vergleich der NDL-PCB-bedingten Apoptosehemmung mit jener von Phenobarbital oder Dexamethason fällt jedoch auf, dass die nicht-dioxinartigen PCBs die Apoptoseinduktion auch in der höchsten eingesetzten Konzentration nicht so sehr wieder auf das basale Grundniveau zurückdrängen wie die beiden anderen Substanzen. Für die Stärke des Inhibitionsvermögens der NDL-PCBs in Bezug auf die Apoptose konnte dabei wie auch bereits bei der Induktion fremdstoff-metabolisierender Enzyme eine Abhängigkeit vom Chlorierungsgrad der jeweiligen PCBs festgestellt werden, so dass zumindest in diesem Zusammenhang eine Korrelation zwischen diesen beiden Prozessen zu bestehen scheint.

Nach Transfektion mit der CAR-siRNA vermochten die NDL-PCBs nur noch eine geringe Hemmung der induzierten Apoptosen zu verursachen. Anders als bei Phenobarbital jedoch, dessen apoptosehemmende Wirkung durch die CAR-siRNA nahezu vollständig unterdrückt wurde, unterschied sich die Apoptoserate bei den NDL-PCBs statistisch auch weiterhin von jener der Kontrolle ohne NDL-PCB-Inkubation. So konnte zudem auch die Inhibition des Pregnan-X-Rezeptors eine Reduktion des apoptosehemmenden Effekts der NDL-PCBs bewirken, die für alle PCBs bis auf PCB 28 statistisch signifikant gegenüber der alleinigen Inkubation mit den jeweiligen PCBs war. Dabei fiel die durch die Hemmung des Pregnan-X-Rezeptors hervorgerufene Reduktion des apoptoseinhibierenden Effekts jedoch deutlich geringer aus als jene durch die CAR-Hemmung hervorgerufene, so dass der Großteil der NDL-PCB-bedingten Apoptoseinhibition wieder dem konstitutiven Androstan-Rezeptor zugesprochen werden kann (Abb. 57). In Anbetracht dessen, dass der Pregnan-X-Rezeptor bei den NDL-PCBs 52, 101, 138, 153 und 180 jedoch auch einen Beitrag zu deren antiapoptotischen Effekten leistet, ist die Wirkweise der nicht-dioxinartigen PCBs in dieser Hinsicht von Phenobarbital abzugrenzen, da dessen Wirkung ausschließlich über den konstitutiven Androstan-Rezeptor reguliert wird. Dass die antiapoptotischen Effekte der NDL-PCBs zum Teil auch über den PXR vermittelt werden, steht im Einklang damit, dass die zugrunde liegenden Mechanismen gerade in Bezug auf eine erhöhte Expression von Bcl-xL / Bcl-2 bzw. einer essentiellen Aktivierung von NF- $\kappa$ B eher jenen vom PXR-Agonisten Dexamethason ähneln als jenen von Phenobarbital (Zucchini *et al.*, 2005; Al-Anati *et al.*, 2010; Tharappel *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2004; Glauert *et al.*, 2008; Evans-Storms und Cidlowski, 2000). Weiterhin wird eine Beteiligung des PXR auch durch Reporter-gen-Assays untermauert, in welchen die NDL-PCBs 101, 138, 153 und 180 als Agonisten des Pregnan-X-Rezeptors identifiziert werden konnten (Creusot *et al.*, 2010; Al-Salman und Plant, 2012).

Während ein zeitgleich vorhandener Pregnan-X-Rezeptor zwar die über CAR regulierte CYP2B1- und CYP3A1-Expression effektiv inhibierte, trat dieser Effekt jedoch nicht bei der CAR-vermittelten Hemmung der Apoptose auf, so dass davon ausgegangen werden kann,

dass das Vorhandensein des Pregnan-X-Rezeptors lediglich die Induktion der untersuchten Enzyme beeinträchtigt. Dies legt wiederum den Schluss nahe, dass zwischen der Apoptosehemmung und der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme keine hinreichende Korrelation besteht und weitreichende Unterschiede bezüglich der Signalwege existieren könnten. Diese Erkenntnis wird auch durch die Tatsache gestützt, dass humane Hepatozyten nicht auf die antiapoptotischen Eigenschaften von Phenobarbital ansprechen, obwohl in diesen fremdstoffmetabolisierende Enzyme induziert werden konnten (Hasmall und Roberts, 1999; Hirose *et al.*, 2009). Weiterhin wird auch im Falle von  $\beta$ -Catenin die Phenobarbital-bedingte Cyp2b10-Regulation von einem für die Hepatokarzinogenese erforderlichen Schlüsselsignalweg getrennt (Rignall *et al.*, 2011). Somit kann aus einer Aktivierung spezifischer fremdstoffmetabolisierender Enzyme nicht auf eine entsprechende Tumorpromotion bzw. Hemmung der Apoptose durch die jeweiligen Substanzen geschlossen werden. Dennoch sind die hierbei involvierten Rezeptoren CAR und PXR bei beiden Prozessen im jeweils gleichen Verhältnis beteiligt, so dass für die untersuchten NDL-PCBs zumindest in gewisser Weise ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Prozessen zu bestehen scheint. Zudem ist die Kanzerogenese auch über oxidativen Stress mit der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme verbunden (Abb. 57), da die hierbei gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (Dostalek *et al.*, 2007) beispielsweise über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B eine bedeutende Rolle bei der NDL-PCB-bedingten Tumorpromotion bzw. der Apoptosehemmung einnehmen (Lehman-McKeeman *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2004; Glauert *et al.*, 2008).

Während Phenobarbital aus zahlreichen Studien als Hepatokarzinogen bei Nagetieren bekannt ist (Whysner *et al.*, 1996; Braeuning *et al.*, 2014), haben eine Reihe epidemiologischer Studien hingegen gezeigt, dass für den Menschen kein erhöhtes Lebertumorrisiko infolge einer chronischen Exposition gegenüber Phenobarbital besteht (IARC, 2001; Olsen *et al.*, 1989; Whysner *et al.*, 1996; Elcombe *et al.*, 2014). Im Gegensatz zu Phenobarbital konnte für Dexamethason dagegen jedoch auch ein Einfluss auf die Apoptose in humanen Hepatozyten nachgewiesen werden (Zucchini *et al.*, 2005; Bailly-Maitre *et al.*, 2001). Dies lässt darauf schließen, dass PXR-Aktivatoren wie Dexamethason auch stärkere Auswirkungen auf die Kanzerogenese beim Menschen haben könnten. So fanden Sui *et al.* (2006) beispielsweise heraus, dass Dexamethason die Wirksamkeit des Zytostatikums Paclitaxel bei der Behandlung von Brust- und Ovarial-Xenotransplantat-Tumoren herabsetzen kann.

In Anbetracht dessen, dass auch der PXR mit der NDL-PCB-bedingten Apoptosehemmung in Verbindung gebracht wird, kann angenommen werden, dass die NDL-PCB-vermittelte Hemmung der Apoptose bzw. Tumorpromotion zum Teil auch über den für PXR-Aktivatoren wie Dexamethason bekannten Wirkmechanismus verläuft. Demzufolge muss also auch ein möglicher Einfluss der nicht-dioxinartigen PCBs auf die Kanzerogenese beim Menschen in Betracht gezogen werden. 2016 wurde von der IARC anhand zahlreicher epidemiologischer

Studien der Schluss gezogen, dass für die Kanzerogenität von polychlorierten Biphenylen beim Menschen ausreichend Belege vorliegen, da ein konsistenter Zusammenhang zwischen malignen Melanomen und einer entsprechenden PCB-Exposition nachgewiesen werden konnte sowie zudem weitere positive Assoziationen für Non-Hodgkin-Lymphome und Brustkrebs beobachtet werden konnten. Da der Mensch in epidemiologischen Studien allerdings immer gleichzeitig komplexen Gemischen von dioxinartigen und nicht-dioxinartigen Verbindungen ausgesetzt ist, lassen sich hierbei keine Rückschlüsse auf Effekte ziehen, die ausschließlich den NDL-PCBs zuzuordnen sind. Auch in Untersuchungen mit einzelnen NDL-PCBs wurden die Gehalte an dioxinartigen Verunreinigungen oftmals nicht quantifiziert oder ausreichend angegeben, so dass die Ergebnisse dieser Untersuchungen hierdurch in unterschiedlichem Maße beeinflusst worden sein könnten (Viluksela *et al.*, 2014). Somit sind weitere Untersuchungen mit hoch aufgereinigten Verbindungen notwendig, welche explizit die Korrelation zwischen einer Exposition gegenüber nicht-dioxinartigen PCBs und einem erhöhten Krebsrisiko beim Menschen adressieren.

Angesichts der lebenslangen Exposition der menschlichen Bevölkerung gegenüber den nicht-dioxinartigen PCBs ist es unerlässlich, näheren Aufschluss über die exakten Wirkmechanismen der NDL-PCBs zu erhalten, um diese bei einer Risikobewertung dieser Substanzen entsprechend berücksichtigen und den Menschen auf diese Weise vor gesundheitlichen Folgen schützen zu können. Gerade im Hinblick auf den Crosstalk zwischen den beiden Rezeptoren CAR und PXR deuten die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse auf die Notwendigkeit einer differenzierteren Betrachtung dieser Thematik hin. So sollte der Crosstalk zwischen CAR und PXR bei Substanzen, deren Wirkweise mit einem dieser beiden Rezeptoren assoziiert ist, in künftige Untersuchungen mit einbezogen werden. Gerade bei CAR-Agonisten sollte zusätzlich auch ein möglicher Einfluss auf den Pregnan-X-Rezeptor mit untersucht werden, um so potentielle Auswirkungen dieser Verbindungen auf die menschliche Gesundheit erfassen zu können. Generell sollten auch PXR-Aktivatoren und ihre Auswirkungen auf die Kanzerogenese näher beleuchtet werden, da sich die Dexamethason-bedingte Hemmung der Apoptose nachteilig auf die Tumorentwicklung auswirken kann, so dass bei der Verwendung von Dexamethason während einer Krebstherapie Vorsicht geboten ist (Sui *et al.*, 2006; Herr und Pfitzenmaier, 2006; Obradović *et al.*, 2019). Daher ist es auch von entscheidender Bedeutung, die genauen Wirkmechanismen von PXR-Aktivatoren oder auch Agonisten des Glukokortikoid-Rezeptors zu erörtern, um nachteilige Effekte bei Chemotherapien berücksichtigen zu können und infolgedessen ein optimales therapeutisches Ansprechen erzielen zu können.

## 7 Literatur

- Ahlborg UG**, Hanberg A & Kenne K (1992), Risk Assessment of Polychlorinated Biphenyls (PCBs), *Nordic Council of Ministers, Copenhagen*.
- Al-Anati L**, Högberg J & Stenius U (2009), Non-dioxin-like-PCBs phosphorylate Mdm2 at Ser166 and attenuate the p53 response in HepG2 cells, *Chem Biol Interact*, 182(2-3), 191-198.
- Al-Anati L**, Högberg J & Stenius U (2010), Non-dioxin-like-PCBs interact with benzo[a]pyrene-induced p53-responses and inhibit apoptosis, *Toxicol Appl Pharmacol*, 249(2), 166-177.
- Al-Anati L**, Kadekar S, Högberg J & Stenius U (2014), PCB153, TCDD and estradiol compromise the benzo[a]pyrene-induced p53-response via FoxO3a, *Chem Biol Interact*, 219,159-167.
- Al-Salman F** & Plant N (2012), Non-coplanar polychlorinated biphenyls (PCBs) are direct agonists for the human pregnane-X receptor and constitutive androstane receptor, and activate target gene expression in a tissue-specific manner, *Toxicol Appl Pharmacol*, 263, 7-13.
- Ambesajir A**, Kaushik A, Kaushik JJ & Petros ST (2012), RNA interference: A futuristic tool and its therapeutic applications, *Saudi J Biol Sci*, 19(4), 395-403.
- Ambudkar SV**, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I & Gottesman MM (1999), Biochemical, cellular and pharmacological aspects of the multidrug transporter, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39, 361-398.
- Anakk S**, Kalsotra A, Kikuta Y, Huang W, Zhang J, Staudinger JL, Moore DD & Strobel HW (2004), CAR/PXR provide directives for Cyp3a41 gene regulation differently from Cyp3a11, *Pharmacogenomics J*, 4(2), 91-101.
- Anderson LM**, Ward JM, Fox SD, Isaaq HJ & Riggs CW (1986), Effects of a single dose of polychlorinated biphenyls to infant mice on N-nitrosodimethylamine-initiated lung and liver tumors, *Int J Cancer*, 38(1), 109-116.
- Aoki Y** (2001), Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters--what we have learned from Yusho disease, *Environ Res*, 86(1), 2-11.
- Aranda A** & Pascual A (2001), Nuclear hormone receptors and gene expression, *Physiol Rev*, 81(3), 1269-1304.
- Audet-Walsh E** & Anderson A (2009), Dexamethasone induction of murine CYP2B genes requires the glucocorticoid receptor, *Drug Metab Dispos*, 37(3), 580-588.
- Aydinlik H**, Nguyen TD, Moennikes O, Buchmann A & Schwarz M (2001), Selective pressure during tumor promotion by phenobarbital leads to clonal outgrowth of beta-catenin-mutated mouse liver tumors, *Oncogene*, 20, 7812-7816.
- Bachman AN**, Phillips JM & Goodman JI (2006), Phenobarbital induces progressive patterns of GC-rich and gene-specific altered DNA methylation in the liver of tumor-prone B6C3F1 mice, *Toxicol Sci*, 91,393-405.
- Bailey SM** & Murnane JP (2006), Telomeres, chromosome instability and cancer, *Nucleic Acids Res*, 34, 2408-2417.
- Bailly-Maitre B**, de Sousa G, Boulukos K, Gugenheim J & Rahmani R (2001), Dexamethasone inhibits spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes via Bcl-2 and Bcl-xL induction, *Cell Death Differ*, 8(3), 279-288.
- Bailly-Maitre B**, de Sousa G, Zucchini N, Gugenheim J, Boulukos KE & Rahmani R (2002), Spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes: molecular mechanisms and regulation by dexamethasone, *Cell Death Differ*, 9(9), 945-955.

- Baker TK**, Bachowski S, Stevenson DE, Walborg EF Jr & Klaunig JE (1995), Modulation of gap junctional intercellular communication in rodent, monkey and human hepatocyte by nongenotoxic compounds, *Prog Clin Biol Res*, 391, 771-780.
- Ballschmiter K**, Bacher R, Mennel A, Fischer R, Riehle U & Swerev M (1992), The determination of chlorinated biphenyls, chlorinated dibenzodioxins, and chlorinated dibenzofurans by GC MS, *Journal of high resolution chromatography*, 15, 260-270.
- Ballschmiter K** & Zell M (1980), Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography, *Fresenius Z Anal Chem*, 302, 20-31.
- Banerjee M**, Robbins D & Chen T (2014), Targeting xenobiotic receptors PXR and CAR in human diseases, *Drug Discov Today*, 20(5), 618-628.
- Barkett M** & Gilmore TD (1999), Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors, *Oncogene*, 18, 6910-6924.
- Barr PJ** & Tomei LD (1994), Apoptosis and its role in human disease, *Biotechnology (NY)*, 12(5), 487-493.
- Basu A** & Haldar S (1998), The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death, *Mol Hum Reprod*, 4(12), 1099-1109.
- Bauer D**, Wolfram N, Kahl GF & Hirsch-Ernst KI (2004), Transcriptional regulation of CYP2B1 induction in primary rat hepatocyte cultures: repression by epidermal growth factor is mediated via a distal enhancer region, *Mol Pharmacol*, 65(1), 172-180.
- Bayad J**, Sabolovic N, Bagrel D, Magdalou J & Siest G (1991), Influence of the isolation method on the stability of differentiated phenotype in cultured rathepatocytes, *J Pharmacol Methods*, 25(1), 85-94.
- Benthe HF**, Knop J & Schmoltdt A (1972), Aufnahme und Verteilung nach Inhalation polychlorierter Biphenyle (PCB), *Arch Toxikol*, 29(2), 85-95.
- Beyer A** & Biziuk M (2009), Environmental fate and global distribution of polychlorinated biphenyls, *Rev Environ Contam Toxicol*, 201, 137-158.
- Blättler SM**, Rencurel F, Kaufmann M & Meyer UA (2007), In the regulation of cytochrome P450 genes, phenobarbital targets LKB1 for necessary activation of AMP-activated protein kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(3), 1045-1050.
- Blomen VA** & Boonstra J (2007), Cell fate determination during G1 phase progression, *Cell Mol Life Sci*, 64(23), 3084-3104.
- Blumberg B**, Sabbagh W Jr, Juguilon H, Bolado J Jr, van Meter CM, Ong ES & Evans RM (1998), SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor, *Genes Dev*, 12(20), 3195-3205.
- Boatright KM**, Rensatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR & Salvesen GS (2003), A unified model for apical caspase activation, *Mol Cell*, 11(2), 529-541.
- Bohnenberger S**, Wagner B, Schmitz HJ & Schrenk D (2001), Inhibition of apoptosis in rat hepatocytes treated with 'non-dioxin-like' polychlorinated biphenyls, *Carcinogenesis*, 22(10), 1601-1606.
- Bourguet W**, Germain P & Gronemeyer H (2000), Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications, *Trends Pharmacol Sci*, 21(10), 381-388.
- Braeuning A**, Gavrilov A, Brown S, Wolf CR, Henderson CJ & Schwarz M (2014), Phenobarbital-mediated tumor promotion in transgenic mice with humanized CAR and PXR, *Toxicol Sci*, 140(2), 259-270.
- Braeuning A**, Heubach Y, Knorpp T, Kowalik MA, Templin M, Columbano A & Schwarz M (2011), Gender-specific interplay of signaling through beta-catenin and CAR in the regulation of xenobiotic-induced hepatocyte proliferation, *Toxicol Sci*, 123, 113-122.

- Braeuning A**, Sanna R, Huelsken J & Schwarz M (2009), Inducibility of drug-metabolizing enzymes by xenobiotics in mice with liver-specific knockout of Ctnnb1, *Drug Metab Dispos*, 37, 1138-1145.
- Bradford MM** (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Brenner D** & Mak TW (2009), Mitochondrial cell death effectors, *Curr Opin Cell Biol*, 21(6), 871-877.
- Brodie MJ** & Kwan P (2012), Current position of phenobarbital in epilepsy and its future, *Epilepsia*, 53(8), 40-46.
- Buchmann A**, Kunz W, Wolf CR, Oesch F & Robertson LW (1986), Polychlorinated biphenyls, classified as either phenobarbital or 3-methylcholanthrene-type inducers of cytochrome P-450, are both hepatic tumor promoters in diethylnitrosamine-initiated rats, *Cancer Lett*, 32, 243-253.
- Buchmann A**, Willy C, Buenemann CL, Stroh C, Schmiechen A & Schwarz M (1999), Inhibition of transforming growth factor beta1-induced hepatoma cell apoptosis by liver tumor promoters: characterization of primary signaling events and effects on CPP32-like caspase activity, *Cell Death Differ*, 6(2), 190-200.
- Buchmann A**, Ziegler S, Wolf A, Robertson LW, Durham SK & Schwarz M (1991), Effects of polychlorinated biphenyls in rat liver: Correlation between primary subcellular effects and promoting activity, *Toxicol Appl Pharmacol*, 111(3), 454-468.
- Budihardjo I**, Oliver H, Lutter M, Luo X & Wang X (1999), Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15, 269-290.
- Bursch W**, Lauer B, Timmermann-Trosiener I, Barthel G, Schuppler J & Schulte-Hermann R (1984), Controlled death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters, *Carcinogenesis*, 5(4), 453-458.
- Bursch W**, Oberhammer F & Schulte-Hermann R (1992), Cell death by apoptosis and its protective role against disease, *Trends Pharmacol Sci*, 13(6), 245-251.
- Butler WH** (1978), Long-term effects of phenobarbitone-Na on male Fischer rats, *Br J Cancer*, 37(3), 418-423.
- Calfee-Mason KG**, Spear BT & Glauert HP (2002), Vitamin E inhibits hepatic NF-kappa B activation in rats administered the hepatic tumor promoter, phenobarbital, *J Nutr*, 132, 3178-3185.
- Carnahan VE** & Redinbo MR (2005), Structure and function of the human nuclear xenobiotic receptor PXR, *Curr Drug Metab*, 6(4), 357-367.
- Chazotte B** (2011), Labeling nuclear DNA using DAPI, *Cold Spring Harb Protoc*, 1, pdb.prot5556.
- Chen Y** & Goldstein JA (2009), The transcriptional regulation of the human CYP2C genes, *Curr Drug Metab*, 10(6), 567-578.
- Chipman JK**, Mally A & Edwards GO (2003), Disruption of gap junctions in toxicity and carcinogenicity, *Toxicol Sci*, 71, 146-153.
- Chomczynski P** & Sacchi N (1987), Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem*, 162(1), 156-159.
- Christensen JG**, Gonzales AJ, Cattley RC & Goldsworthy TL (1998), Regulation of apoptosis in mouse hepatocytes and alteration of apoptosis by nongenotoxic carcinogens, *Cell Growth Differ*, 9, 815-825.
- Chu CC**, Hsing CH, Shieh JP, Chien CC, Ho CM & Wang JJ (2014), The cellular mechanisms of the antiemetic action of dexamethasone and related glucocorticoids against vomiting, *Eur J Pharmacol*, 722, 48-54.
- Cohen SM** (2010), Evaluation of possible carcinogenic risk to humans based on liver tumors in rodent assays:

- the two-year bioassay is no longer necessary, *Toxicol Pathol*, 38, 487-501.
- Columbano A (1995)**, Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo, *J Cell Biochem*, 58(2), 181-190.
- Connor K, Safe S, Jefcoate CR & Larsen M (1995)**, Structure-dependent induction of CYP2B by polychlorinated biphenyl congeners in female Sprague-Dawley rats, *Biochem Pharmacol*, 50(11), 1913-1920.
- Corcos L & Lagadic-Gossmann D (2001)**, Gene induction by Phenobarbital: an update on an old question that receives key novel answers, *Pharmacol Toxicol*, 89, 113-122.
- Creusot N, Kinani S, Balaguer P, Tapie N, LeMenach K, Maillot-Maréchal E, Porcher JM, Budzinski H & Aït-Aïssa S (2010)**, Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: screening of chemicals and application to water samples, *Anal Bioanal Chem*, 396(2), 569-583.
- Dail MB, Shack LA, Chambers JE & Burgess SC (2008)**, Global Liver Proteomics of Rats Exposed for 5 Days to Phenobarbital Identifies Changes Associated with Cancer and with CYP Metabolism, *Toxicological sciences*, 106(2), 556-569.
- Danielsson C, Harju M, Halldin K, Tysklind M & Andersson PL (2008)**, Comparison of levels of PCDD/Fs and non-ortho PCBs in PCB 153 from seven different suppliers, *Organohalogen Compd*, 70, 1201-1203.
- Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T & Traganos F (1997)**, Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis), *Cytometry*, 27(1), 1-20.
- Dean CE Jr, Benjamin SA, Chubb LS, Tessari JD & Keefe TJ (2002)**, Nonadditive hepatic tumor promoting effects by a mixture of two structurally different polychlorinated biphenyls in female rat livers, *Toxicol Sci*, 66(1), 54-61.
- Degterev A, Boyce M & Yuan J (2003)**, A decade of caspases, *Oncogene*, 22(53), 8543-8567.
- di Masi A, De Marinis E, Ascenzi P & Marino M (2009)**, Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects, *Mol Aspects Med*, 30(5), 297-343.
- Ding X & Staudinger JL (2005)**, Repression of PXR-mediated induction of hepatic CYP3A gene expression by protein kinase C, *Biochem Pharmacol*, 69(5), 867-873.
- Dostalek M, Brooks JD, Hardy KD, Milne GL, Moore MM, Sharma S, Morrow JD & Guengerich FP (2007)**, In vivo oxidative damage in rats is associated with barbiturate response but not other cytochrome P450 inducers, *Mol Pharmacol*, 72, 1419-1424.
- Drocourt L, Ourlin JC, Pascussi JM, Maurel P & Vilarem MJ (2002)**, Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes, *J Biol Chem*, 277, 25125-25132.
- Earnshaw WC, Martins LM & Kaufmann SH (1999)**, Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis, *Annu Rev Biochem*, 68, 383-424.
- Eckle VS, Buchmann A, Bursch W, Schulte-Hermann R & Schwarz M (2004)**, Immunohistochemical detection of activated caspases in apoptotic hepatocytes in rat liver, *Toxicol Pathol*, 32(1), 9-15.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2005)**, Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to the presence of non dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food, *EFSA J*, 284, 1-137.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2010)**, Scientific Report of EFSA: Results of the monitoring of non dioxin-like PCBs in food and feed, *EFSA J*, 8(7), 1701.
- Eisenbrand G, Metzler M & Hennecke FJ (2005)**, Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner. Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren, *Wiley-VCH, Weinheim an der Bergstraße*, 3. Auflage.

- Ekins S**, Chang C, Mani S, Krasowski MD, Reschly EJ, Iyer M, Kholodovych V, Ai N, Welsh WJ, Sinz M, Swaan PW, Patel R & Bachmann K (2007), Human pregnane X receptor antagonists and agonists define molecular requirements for different binding sites, *Mol Pharmacol*, 72(3), 592-603.
- Ekins S**, Kortagere S, Iyer M, Reschly EJ, Lill MA, Redinbo MR & Krasowski D (2009), Challenges predicting ligand-receptor interactions of promiscuous proteins: the nuclear receptor PXR, *PLoS Comput Biol*, 5(12), e1000594.
- Elcombe CR**, Peffer RC, Wolf DC, Bailey J, Bars R, Bell D, Cattley RC, Ferguson SS, Geter D, Goetz A, Goodman JI, Hester S, Jacobs A, Omiecinski CJ, Schoeny R, Xie W & Lake BG (2014), Mode of action and human relevance analysis for nuclear receptor-mediated liver toxicity: a case study with phenobarbital as a model constitutive androstane receptor (CAR) activator, *Crit Rev Toxicol*, 44, 64-82.
- Elmore S** (2007), Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516.
- Evans-Storms RB** & Cidlowski JA (2000), Delineation of an antiapoptotic action of glucocorticoids in hepatoma cells: the role of nuclear factor-kappaB, *Endocrinology*, 141(5), 1854-1862.
- Fång J**, Nyberg E, Bignert A & Bergman Å (2013), Temporal trends of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls in mothers' milk from Sweden, 1972-2011, *Environ Int*, 60, 224-231.
- Faucette SR**, Sueyoshi T, Smith CM, Negishi M, Lecluyse EL & Wang H (2006), Differential regulation of hepatic CYP2B6 and CYP3A4 genes by constitutive androstane receptor but not pregnane X receptor, *J Pharmacol Exp Ther*, 317(3), 1200-1209.
- Fiandalo MV** & Kyprianou N (2012), Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis, *Exp Oncol*, 34(3), 165-175.
- Fleige S** & Pfaffl MW (2006), RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance, *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 126-139.
- Folkman J** (2002), Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis, *Semin Oncol*, 29(6/16), 15-18.
- Fonnum F** & Mariussen E (2009), Mechanisms involved in the neurotoxic effects of environmental toxicants such as polychlorinated biphenyls and brominated flame retardants, *J Neurochem*, 111(6), 1327-1347.
- Forman BM**, Tzamelis I, Choi HS, Chen J, Simha D, Seol W, Evans RM & Moore DD (1998), Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta, *Nature*, 395(6702), 612-615.
- Foster JR** (2000), Cell death and cell proliferation in the control of normal and neoplastic tissue growth, *Toxicol Pathol*, 28, 441-446.
- Friedman GD**, Jiang SF, Udaltsova N, Quesenberry CP Jr, Chan J & Habel LA (2009), Epidemiologic evaluation of pharmaceuticals with limited evidence of carcinogenicity, *Int J Cancer*, 125(9), 2173-2178.
- Fuchs I**, Hafner-Blumenstiel V, Markert C, Burhenne J, Weiss J, Haefeli WE & Mikus G (2013), Effect of the CYP3A inhibitor ketoconazole on the PXR-mediated induction of CYP3A activity. *Eur J Clin Pharmacol*, 69(3), 507-513.
- Fulda S** & Debatin KM (2006), Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy, *Oncogene*, 25(34), 4798-4811.
- Gährs M** (2010), Induktion von CYP2B1 in primären Hepatozyten der Ratte unter Verwendung einer Collagenase-freien Leberperfusion. Diplomarbeit, Technische Universität Kaiserslautern, AK Schrenk.
- Gährs M**, Roos R, Andersson PL & Schrenk D (2013), Role of the nuclear xenobiotic receptors CAR and PXR in induction of cytochromes P450 by non-dioxinlike polychlorinated biphenyls in cultured rat hepatocytes, *Toxicol Appl Pharmacol*, 272(1), 77-85.
- Gao J** & Xie W (2010), Pregnane X receptor and constitutive androstane receptor at the crossroads of drug metabolism and energy metabolism, *Drug Metab Dispos*, 38(12), 2091-2095.

- Geick A**, Eichelbaum M & Burk O (2001), Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin, *J Biol Chem*, 276(18), 14581-14587.
- Gerhard I**, Daniel V, Link S, Monga B & Runnebaum B (1998), Chlorinated hydrocarbons in women with repeated miscarriages, *Environ Health Perspect*, 106(10), 675-681.
- Giesy JP** & Kannan K (1998), Dioxin-like and non-dioxin-like toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for risk assessment, *Crit Rev Toxicol*, 28(6), 511-569.
- Glauert HP**, Tharappel JC, Lu Z, Stemm D, Banerjee S, Chan LS, Lee EY, Lehmler HJ, Robertson LW & Spear BT (2008), Role of oxidative stress in the promoting activities of pcbs, *Environ Toxicol Pharmacol*, 25(2), 247-250.
- Goldstein JA** (1979), The structure-activity relationships of halogenated biphenyls as enzyme Inducers, *Ann N Y Acad Sci*, 320, 164-178.
- Goldstein JA**, Hickman P, Bergman H, McKinney JD & Walker MP (1977), Separation of pure polychlorinated biphenyl isomers into two types of inducers on the basis of induction of cytochrome P-450 or P-448, *Chem Biol Interact*, 17(1), 69-87.
- Goodman JI** & Watson RE (2002), Altered DNA methylation: A secondary mechanism involved in carcinogenesis, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42, 501-525.
- Goodwin B**, Redinbo MR & Kliewer SA (2002), Regulation of cyp3a gene transcription by the pregnane x receptor, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42, 1-23.
- Green DR** (1998), Apoptotic pathways: the roads to ruin, *Cell*, 94(6), 695-698.
- Green DR** (2005), Apoptotic pathways: ten minutes to dead, *Cell*, 121(5), 671-674.
- Gullberg D**, Terracio L & Rubin K (1988), Membrane glycoproteins involved in hepatocyte adhesion to collagen type I, *Exp Cell Res*, 175(2), 388-395.
- Gupta D**, Venkatesh M, Wang H, Kim S, Sinz M, Goldberg GL, Whitney K, Longley C & Mani S (2008), Expanding the roles for pregnane X receptor in cancer: proliferation and drug resistance in ovarian cancer, *Clin Cancer Res*, 14(17), 5332-5340.
- Hagiwara A**, Miyata E, Tamano S, Sano M, Masuda C, Funae Y, Ito N, Fukushima S & Shirai T (1999), Non-carcinogenicity, but dose-related increase in preneoplastic hepatocellular lesions, in a two-year feeding study of phenobarbital sodium in male F344 rats, *Food Chem Toxicol*, 37(8), 869-879.
- Haines C**, Chatham LR, Vardy A, Elcombe CR, Foster JR & Lake BG (2018), Comparison of the hepatic and thyroid gland effects of sodium phenobarbital in wild type and constitutive androstane receptor (CAR) knockout rats and pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile in wild type and pregnane X receptor (PXR) knockout rats, *Toxicology*, 400-401, 20-27.
- Hamadeh HK**, Bushel PR, Jayadev S, Martin K, DiSorbo O, Sieber S, Bennett L, Tennant R, Stoll R, Barrett JC, Blanchard K, Paules RS & Afshari CA (2002), Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles, *Toxicol Sci*, 67, 219-231.
- Hamers T**, Kamstra JH, Cenijn PH, Pencikova K, Palkova L, Simeckova P, Vondracek J, Andersson PL, Stenberg M & Machala M (2011), In vitro toxicity profiling of ultrapure non-dioxin-like polychlorinated biphenyl congeners and their relative toxic contribution to PCB mixtures in humans, *Toxicol Sci*, 121(1), 88-100.
- Hammond S**, Caudy A & Hannon G (2001), Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA, *Nat Rev Genet*, 2, 110-119.
- Hanahan D** & Weinberg RA (2000), The hallmarks of cancer, *Cell*, 100(1), 57-70.
- Handschin C** & Meyer UA (2003), Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors, *Pharmacol Rev*, 55(4), 649-673.

- Hart SM (2002)**, Modulation of nuclear receptor dependent transcription, *Biol Res*, 35(2), 295-303.
- Hasmall SC & Roberts RA (1999)**, The perturbation of apoptosis and mitosis by drugs and xenobiotics, *Pharmacol Ther*, 82, 63-70.
- Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y & Sakuragi N (2014)**, Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer, *Biomed Res Int* 2014, 150845.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ & Williams PM (1996)**, Real time quantitative PCR, *Genome Res*, 6(10), 986-994.
- Heinemeyer G, Nigam S & Hildebrandt AG (1980)**, Hexobarbital-binding, hydroxylation and hexobarbital-dependent hydrogen peroxide production in hepatic microsomes of guinea pig, rat and rabbit, *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 314(2), 201-210.
- Hemming H, Flodström S, Wärngård L, Bergman A, Kronevi T, Nordgren I & Ahlberg UG (1993)**, Relative tumour promoting activity of three polychlorinated biphenyls in rat liver, *Eur J Pharmacol*, 248(2), 163-174.
- Henle ES, Han Z, Tang N, Rai P, Luo Y & Linn S (1999)**, Sequence-specific DNA cleavage by Fe<sup>2+</sup>-mediated fenton reactions has possible biological implications, *J Biol Chem*, 274, 962-971.
- Hernandez JP, Mota LC & Baldwin WS (2009)**, Activation of CAR and PXR by Dietary, Environmental and Occupational Chemicals Alters Drug Metabolism, Intermediary Metabolism, and Cell Proliferation, *Curr Pharmacogenomics Person Med*, 7(2), 81-105.
- Herr I & Pfizenmaier J (2006)**, Glucocorticoid use in prostate cancer and other solid tumours: implications for effectiveness of cytotoxic treatment and metastases, *Lancet Oncol*, 7, 425-430.
- Herr I, Ucur E, Herzer K, Okouoyo S, Ridder R, Krammer PH, von Knebel Doeberitz M & Debatin KM (2003)**, Glucocorticoid cotreatment induces apoptosis resistance toward cancer therapy in carcinomas, *Cancer Res*, 63(12), 3112-3120.
- Hewitt NJ, Lecluyse EL & Ferguson SS (2007)**, Induction of hepatic cytochrome P450 enzymes: methods, mechanisms, recommendations, and in vitro-in vivo correlations, *Xenobiotica*, 37(10-11), 1196-1224.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G & Watson R (1993)**, Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Biotechnology*, 11(9), 1026-1030.
- Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C & Strauss M (1999)**, NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition, *Mol Cell Biol*, 19, 2690-2698.
- Hirose Y, Nagahori H, Yamada T, Deguchi Y, Tomigahara Y, Nishioka K, Uwagawa S, Kawamura S, Isobe N, Lake BG & Okuno Y (2009)**, Comparison of the effects of the synthetic pyrethroid Metofluthrin and phenobarbital on CYP2B form induction and replicative DNA synthesis in cultured rat and human hepatocytes, *Toxicology*, 258(1), 64-69.
- Hirsch-Ernst KI, Schlaefer K, Bauer D, Heder AF & Kahl GF (2001)**, Repression of phenobarbital-dependent CYP2B1 mRNA induction by reactive oxygen species in primary rat hepatocyte cultures, *Mol Pharmacol*, 59(6), 1402-1409.
- Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SM, Boobis AR, Klaunig JR, Pastoor T, Dellarco VL & Dragan YP (2006)**, Mode of action in relevance of rodent liver tumors to human cancer risk, *Toxicol Sci*, 89, 51-56.
- Honkakoski P & Negishi M (1998)**, Protein serine/threonine phosphatase inhibitors suppress phenobarbital-induced Cyp2b10 gene transcription in mouse primary hepatocytes, *Biochem J*, 330(2), 889-895.
- Honkakoski P & Negishi M (2000)**, Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors, *Biochem J*, 347(2), 321-337.
- Honkakoski P, Zelko I, Sueyoshi T & Negishi M (1998)**, The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene, *Mol Cell Biol*, 18(10), 5652-5658.

- Hosseinpour F**, Timsit Y, Koike C, Matsui K, Yamamoto Y, Moore R & Negishi M (2007), Overexpression of the Rho-guanine nucleotide exchange factor ECT2 inhibits nuclear translocation of nuclear receptor CAR in the mouse liver, *FEBS Lett*, 581(25), 4937-4942.
- Huang H**, Wang H, Sinz M, Zoeckler M, Staudinger J, Redinbo MR, Teotico DG, Locker J, Kalpana GV & Mani S (2007), Inhibition of drug metabolism by blocking the activation of nuclear receptors by ketoconazole, *Oncogene*, 26(2), 258-268.
- Huang W**, Zhang J, Washington M, Liu J, Parant JM, Lozano G & Moore DD (2005), Xenobiotic stress induces hepatomegaly and liver tumors via the nuclear receptor constitutive androstane receptor, *Mol Endocrinol*, 19(6), 1646-1653.
- IARC (2001)**, Some Thyrotropic Agents, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 79.
- IARC (2016)**, Polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 107.
- Imaoka S**, Osada M, Minamiyama Y, Yukimura T, Toyokuni S, Takemura S, Hiroi T & Funae Y (2004), Role of phenobarbital-inducible cytochrome P450s as a source of active oxygen species in DNA-oxidation, *Cancer Lett*, 203, 117-125.
- Ioannides C (2006)**, Cytochrome p450 expression in the liver of food-producing animals, *Curr Drug Metab*, 7(4), 335-348.
- Isaacs JT (1993)**, Role of programmed cell death in carcinogenesis, *Environ Health Perspect*, 101(5), 27-33.
- Islander U**, Jochems C, Stubelius A, Andersson A, Lagerquist MK, Ohlsson C & Carlsten H (2011), Combined treatment with dexamethasone and raloxifene totally abrogates osteoporosis and joint destruction in experimental postmenopausal arthritis, *Arthritis Res Ther*, 13(3), R96.
- Jacobs MN**, Nolan GT & Hood SR (2005), Lignans, bacteriocides and organochlorine compounds activate the human pregnane X receptor (PXR), *Toxicol Appl Pharmacol*, 209, 123-133.
- Jacobson JL**, Jacobson SW & Humphrey HEB (1990), Effects of exposure to PCBs and related compounds on growth and activity in children, *Neurotoxicol Teratol*, 12, 319-326.
- James NH & Roberts RA (1996)**, Species differences in response to peroxisome proliferators correlate in vitro with induction of DNA synthesis rather than suppression of apoptosis, *Carcinogenesis*, 17, 1623-1632.
- Jensen S**, Renberg L & Olsson M (1972), PCB contamination from boat bottom paint and levels of PCB in plankton outside a polluted area, *Nature*, 240(5380), 358-360.
- Jinek M & Doudna JA (2009)**, A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference, *Nature*, 457(7228), 405-412.
- Joannard F**, Galisteo M, Corcos L, Guillouzo A & Lagadic-Gossmann D (2000), Regulation of phenobarbital-induction of CYP2B and CYP3A genes in rat cultured hepatocytes: involvement of several serine/threonine protein kinases and phosphatases, *Cell Biol Toxicol*, 16(5), 325-337.
- Joannard F**, Rissel M, Gilot D, Anderson A, Orfila-Lefevre L, Guillouzo A, Atfi A & Lagadic-Gossmann D (2006), Role for mitogen-activated protein kinases in phenobarbital-induced expression of cytochrome P450 2B in primary cultures of rat hepatocytes, *Toxicol Lett*, 161(1), 61-72.
- Jones HB**, Orton TC & Lake BG (2009), Effect of chronic phenobarbitone administration on liver tumour formation in the C57BL/10J mouse, *Food Chem Toxicol*, 47, 1333-1340.
- Jones KC & de Voogt P (1999)**, Persistent organic pollutants (POPs): state of the science, *Environ Pollut*, 100(1-3), 209-221.
- Kalra K**, Jarmal G & Mishra N (2009), Drugs impact on CYP-450 enzyme family: A pharmacogenetical study of response variation, *Indian J Hum Genet*, 15(2), 78-83.

- Kannan N**, Tanabe S & Tatsukawa R (1988), Toxic potential of non-ortho and mono-ortho coplanar PCBs in commercial PCB preparations: "2,3,7,8-T4 CDD toxicity equivalence factors approach, *Bull Environ Contam Toxicol*, 41(2), 267-276.
- Katagiri Y**, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Ozato K & Guroff G (2000), Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B, *Nat Cell Biol*, 2(7), 435-440.
- Katiyar SK** (2011), Green tea prevents non-melanoma skin cancer by enhancing DNA repair, *Arch Biochem Biophys*, 508(2), 152-158.
- Kaufmann T**, Strasser A & Jost PJ (2012), Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP, *Cell Death Differ*, 19(1), 42-50.
- Kawamoto T**, Sueyoshi T, Zelko I, Moore R, Washburn K & Negishi M (1999), Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene, *Mol Cell Biol*, 19(9), 6318-6322.
- Kawamura A**, Yoshida Y, Kimura N, Oda H & Kakinuma A (1999), Phosphorylation/ Dephosphorylation steps are crucial for the induction of CYP2B1 and CYP2B2 gene expression by phenobarbital, *Biochem Biophys Res Commun*, 264(2), 530-536.
- Kerr JF**, Wyllie AH & Currie AR (1972), Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*, 26(4), 239-257.
- Kitazumi I** & Tsukahara M (2011), Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation, *FEBS J*, 278(3), 427-441.
- Klaunig JE**, Kamendulis LM & Hocevar BA (2010), Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis, *Toxicol Pathol*, 38, 96-109.
- Klaunig JE** & Ruch RJ (1987), Strain and species effects on the inhibition of hepatocyte intercellular communication by liver tumor promoters, *Cancer Lett*, 36, 161-168.
- Klaunig JE**, Ruch RJ & Weghorst CM (1990), Comparative effects of phenobarbital, DDT, and lindane on mouse hepatocyte gap junctional intercellular communication, *Toxicol Appl Pharmacol*, 2, 553-563.
- Kliwer SA**, Goodwin B & Willson TM (2002), The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism, *Endocr Rev*, 23(5), 687-702.
- Kliwer SA**, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Willson TM, Zetterström RH, Perlmann T & Lehmann JM (1998), An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway, *Cell*, 92(1), 73-82.
- Knerr S** & Schrenk D (2006), Carcinogenicity of 'non-dioxinlike' polychlorinated biphenyls, *Crit Rev Toxicol*, 36, 663-694.
- Kobayashi K**, Sueyoshi T, Inoue K, Moore R & Negishi M (2003), Cytoplasmic accumulation of the nuclear receptor CAR by a tetratricopeptide repeat protein in HepG2 cells, *Mol Pharmacol*, 64(5), 1069-1075.
- Kocarek TA** & Reddy AB (1998), Negative regulation by dexamethasone of fluvastatin-inducible CYP2B expression in primary cultures of rat hepatocytes: role of CYP3A, *Biochem Pharmacol*, 55(9), 1435-1443.
- Köhle C** & Bock KW (2009), Coordinate regulation of human drug-metabolizing enzymes, and conjugate transporters by the Ah receptor, pregnane X receptor and constitutive androstane receptor, *Biochem Pharmacol*, 77(4), 689-699.
- Koike C**, Moore R & Negishi M (2005), Localization of the nuclear receptor CAR at the cell membrane of mouse liver, *FEBS Lett*, 579(30), 6733-6736.
- Kolaja KL**, Engelken DT & Klaassen CD (2000), Inhibition of gap-junctional-intercellular communication in intact rat liver by nongenotoxic hepatocarcinogens, *Toxicology*, 146(1), 15-22.
- Kolaja KL**, Stevenson DE, Johnson JT, Walborg EF Jr & Klaunig JE (1996a), Subchronic effects of dieldrin

- and phenobarbital on hepatic DNA synthesis in mice and rats, *Fundam Appl Toxicol*, 29(2), 219-228.
- Kolaja KL**, Stevenson DE, Walborg EF Jr & Klaunig JE (1996b), Dose dependence of phenobarbital promotion of preneoplastic hepatic lesions in F344 rats and B6C3F1 mice: effects on DNA synthesis and apoptosis, *Carcinogenesis*, 17(5), 947-954.
- Konno Y**, Negishi M & Kodama S (2008), The roles of nuclear receptors CAR and PXR in hepatic energy metabolism, *Drug Metab Pharmacokinet*, 23(1), 8-13.
- Kopec AK**, Burgoon LD, Ibrahim-Aibo D, Mets BD, Tashiro C, Potter D, Sharratt B, Harkema JR & Zacharewski TR (2010), PCB153-elicited hepatic responses in the immature, ovariectomized C57BL/6 mice: comparative toxicogenomic effects of dioxin and non-dioxin-like ligands, *Toxicol Appl Pharmacol*, 243(3), 359-371.
- Kottke TJ**, Blajeski AL, Meng XW, Svingen PA, Ruchaud S, Mesner PW Jr, Boerner SA, Samejima K, Henriquez NV, Chilcote TJ, Lord J, Salmon M, Earnshaw WC & Kaufmann SH (2002), Lack of correlation between caspase activation and caspase activity assays in paclitaxel-treated MCF-7 breast cancer cells, *J Biol Chem*, 277, 804-815.
- Kumar V**, Abbas AK & Aster JC (2010), Robbins and Cotran pathologic basis of disease, *Saunders, Philadelphia*, 3. Auflage.
- Kunita N**, Hori S, Obana H, Otake T, Nishimura H, Kashimoto T & Ikegami N (1985), Biological effect of PCBs, PCQs and PCDFs present in the oil causing yusho and yu-cheng, *Environ Health Perspect*, 59, 79-84.
- Kunz S**, Schwarz M, Schilling B, Papke O, Lehmler HJ, Robertson LW, Schrenk D & Schmitz HJ (2006), Tumor promoting potency of PCBs 28 and 101 in rat liver, *Toxicol Lett*, 164(2), 133-143.
- Kuratsune M**, Yoshimura T, Matsuzaka J & Yamaguchi A (1972), Epidemiologic study on Yusho, a Poisoning Caused by Ingestion of Rice Oil Contaminated with a Commercial Brand of Polychlorinated Biphenyls, *Environ Health Perspect*, 1, 119-128.
- La Rocca C** & Mantovani A (2006), From environment to food: the case of PCB, *Ann Ist Super Sanita*, 42(4), 410-416.
- La Vecchia C** & Negri E (2014), A review of epidemiological data on epilepsy, phenobarbital, and risk of liver cancer, *Eur J Cancer Prev*, 23(1), 1-7.
- Lake BG** (2009), Species differences in the hepatic effects of inducers of CYP2B and CYP4A subfamily forms: relationship to rodent liver tumour formation, *Xenobiotica*, 39, 582-596.
- Lecluyse E**, Bullock P, Madan A, Carroll K & Parkinson A (1999), Influence of extracellular matrix overlay and medium formulation on the induction of cytochrome P-450 2B enzymes in primary cultures of rat hepatocytes, *Drug Metab Dispos*, 27, 909-915.
- Lehmann JM**, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT & Kliewer SA (1998), The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions, *J Clin Invest*, 102(5), 1016-1023.
- Lehman-McKeeman LD**, Caudill D, Vassallo JD & Fix AS (1999), Increased spontaneous liver tumor susceptibility in cytochrome P450 2B1 (CYP2B1) transgenic mice, *Toxicol Sci*, 48, 253.
- Lemesh RA** (1992), Polychlorinated biphenyls: an overview of metabolic toxicologic and health consequences, *Vet Hum Toxicol*, 34(3), 256-260.
- Li L**, Bao X, Zhang QY, Negishi M & Ding X (2017), Role of CYP2B in Phenobarbital-Induced Hepatocyte Proliferation in Mice, *Drug Metab Dispos*, 45(8), 977-981.
- Li L**, Hassan HE, Tolson AH, Ferguson SS, Eddington ND & Wang H (2010), Differential activation of pregnane X receptor and constitutive androstane receptor by buprenorphine in primary human

- hepatocytes and HepG2 cells, *J Pharmacol Exp Ther*, 335(3), 562-571.
- Li Y**, Leung LK, Spear BT & Glauert HP (1996), Activation of hepatic NF-kappaB by phenobarbital in rats, *Biochem Biophys Res Commun*, 229, 982-989.
- Lim YP** & Huang JD (2008), Interplay of pregnane X receptor with other nuclear receptors on gene regulation, *Drug Metab Pharmacokinet*, 23(1), 14-21.
- Liu C**, Yang J, Fu W, Qi S, Wang C, Quan C & Yang K (2014), Coactivation of the PI3K/Akt and ERK signaling pathways in PCB153-induced NF-kB activation and caspase inhibition, *Toxicol Appl Pharmacol*, 277(3), 270-278.
- Liu Y**, Beyer A & Aebersold R (2016), On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance, *Cell*, 165(3), 535-550.
- Lowe SW** & Lin AW (2000), Apoptosis in cancer, *Carcinogenesis*, 21(3), 485-495.
- Lu C** & Li AP (2001), Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog, *Chem Biol Interact*, 134(3), 271-281.
- Lu Z**, Lee EY, Robertson LW, Glauert HP & Spear BT (2004), Effect of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB-153) on hepatocyte proliferation and apoptosis in mice deficient in the p50 subunit of the transcription factor NF-kappaB, *Toxicol Sci*, 81(1), 35-42.
- Lutz WK** (1990), Endogenous genotoxic agents and processes as a basis of spontaneous carcinogenesis, *Mutat Res*, 238(3), 287-295.
- Lyche JL**, Larsen HJ, Skaare JU, Tverdal A, Johansen GM & Ropstad E (2006), Perinatal exposure to low doses of PCB 153 and PCB 126 affects maternal and neonatal immunity in goat kids, *J Toxicol Environ Health A*, 69(1-2), 139-158.
- Ma DK**, Guo JU, Ming GL & Song H (2009), DNA excision repair proteins and Gadd45 as molecular players for active DNA demethylation, *Cell Cycle*, 8(10), 1526-1531.
- Ma X**, Cheung C, Krausz KW, Shah YM, Wang T, Idle JR & Gonzalez FJ (2008a), A double transgenic mouse model expressing human pregnane X receptor and cytochrome P450, *Drug Metab Dispos*, 36(12), 2506-2512.
- Ma X**, Idle JR & Gonzalez FJ (2008b), The pregnane X receptor: from bench to bedside, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 4(7), 895-908.
- Machala M**, Bláha L, Vondráček J, Trosko JE, Scott J & Upham BL (2003), Inhibition of gap junctional intercellular communication by noncoplanar polychlorinated biphenyls: inhibitory potencies and screening for potential mode(s) of action, *Toxicol Sci*, 76(1), 102-111.
- Madan A**, DeHaan R, Mudra D, Carroll K, LeCluyse E & Parkinson A (1999), Effect of cryo-preservation on cytochrome P-450 enzyme induction in cultured rat hepatocytes, *Drug Metab Dispos*, 27(3), 327-335.
- Maglich JM**, Stoltz CM, Goodwin B, Hawkins-Brown D, Moore JT & Kliewer SA (2002), Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification, *Mol Pharmacol*, 62(3), 638-646.
- Malhi H**, Guicciardi ME & Gores GJ (2010), Hepatocyte death: a clear and present danger, *Physiol Rev*, 90(3), 1165-1194.
- Mani S**, Huang H, Sundarababu S, Liu W, Kalpana G, Smith AB & Horwitz SB (2005), Activation of the steroid and xenobiotic receptor (human pregnane X receptor) by nontaxane microtubule-stabilizing agents, *Clin Cancer Res*, 11, 6359-6369.
- Marquardt H** & Schäfer SG (2004), Lehrbuch der Toxikologie. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart*, 2. Auflage.

- Martinou JC** & Youle RJ (2011), Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics, *Dev Cell*, 21(1), 92-101.
- Masuda Y** (2001), Fate of PCDF/PCB congeners and change of clinical symptoms in patients with Yusho PCB poisoning for 30 years, *Chemosphere*, 43(4-7), 925-930.
- Masuyama H**, Nakatsukasa H, Takamoto N & Hiramatsu Y (2007), Down-regulation of pregnane X receptor contributes to cell growth inhibition and apoptosis by anticancer agents in endometrial cancer cells, *Mol Pharmacol*, 72(4), 1045-1053.
- Mathews HB** & Anderson MW (1975), Effect of chlorination on the distribution and excretion of polychlorinated biphenyls, *Drug Metab Dispos*, 3, 371-380.
- Mayer B** & Oberbauer R (2003), Mitochondrial regulation of apoptosis, *News Physiol Sci*, 18, 89-94.
- Meeker AK**, Hicks JL, Iacobuzio-Donahue CA, Montgomery EA, Westra WH, Chan TY, Ronnett BM & De Marzo AM (2004), Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis, *Clin Cancer Res*, 10, 3317-3326.
- Mendoza G**, Gutierrez L, Pozo-Gallardo K, Fuentes-Rios D, Montory M, Urrutia R & Barra R (2006), Polychlorinated biphenyls (PCBs) in mussels along the Chilean coast, *Environ Sci Pollut Res Int*, 13(1), 67-74.
- Meredith C**, Scott MP, Renwick AB, Price RJ & Lake BG (2003), Studies on the induction of rat hepatic CYP1A, CYP2B, CYP3A and CYP4A subfamily form mRNAs in vivo and in vitro using precision-cut rat liver slices, *Xenobiotica*, 33(5), 511-527.
- Meredith MJ** (1988), Rat hepatocytes prepared without collagenase: prolonged retention of differentiated characteristics in culture, *Cell Biol Toxicol*, 4(4), 405-425.
- Miao J**, Fang S, Bae Y & Kemper JK (2006), Functional inhibitory cross-talk between constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor-4 in hepatic lipid/glucose metabolism is mediated by competition for binding to the DR1 motif and to the common coactivators, GRIP-1 and PGC-1alpha, *J Biol Chem*, 281(21), 14537-14546.
- Mills SA** 3rd, Thal DI & Barney J (2007), A summary of the 209 PCB congener nomenclature, *Chemosphere*, 68(9), 1603-1612.
- Min G**, Kemper JK & Kemper B (2002), Glucocorticoid receptor-interacting protein 1 mediates ligand-independent nuclear translocation and activation of constitutive androstane receptor in vivo, *J Biol Chem*, 277(29), 26356-26363.
- Mitoma C**, Mine Y, Utani A, Imafuku S, Muto M, Akimoto T, Kanekura T, Furue M & Uchi H (2015), Current skin symptoms of Yusho patients exposed to high levels of 2,3,4,7,8-pentachlorinated dibenzofuran and polychlorinated biphenyls in 1968, *Chemosphere*, 137, 45-51.
- Mizuno N**, Niwa T, Yotsumoto Y & Sugiyama Y (2003), Impact of drug transporter studies on drug discovery and development, *Pharmacol Rev*, 55, 425-461.
- Moennikes O**, Buchmann A, Romualdi A, Ott T, Werringloer J, Willecke K & Schwarz M (2000), Lack of phenobarbital-mediated promotion of hepatocarcinogenesis in Connexin32-null mice, *Cancer Res*, 60, 5087-5091.
- Molnár F**, Küblbeck J, Jyrkkäinen J, Prantner V & Honkakoski P (2013), An update on the constitutive androstane receptor (CAR), *Drug Metabol Drug Interact*, 28(2), 79-93.
- Moore LB**, Maglich JM, McKee DD, Wisely B, Willson TM, Kliewer SA, Lambert MH & Moore JT (2002), Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors, *Mol Endocrinol*, 16(5), 977-986.
- Moore LB**, Parks DJ, Jones SA, Bledsoe RK, Consler TG, Stimmel JB, Goodwin B, Liddle C, Blanchard SG,

- Willson TM, Collins JL & Kliewer SA (2000), Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands, *J Biol Chem*, 275(20), 15122-15127.
- Moras D** & Gronemeyer H (1998), The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function, *Curr Opin Cell Biol*, 10(3), 384-391.
- Morel Y** & Barouki R (1999), Repression of gene expression by oxidative stress, *Biochem J*, 342(3), 481-496.
- Mulware SJ** (2013), Trace elements and carcinogenicity: a subject in review, *3 Biotech*, 3(2), 85-96.
- Mutoh S**, Osabe M, Inoue K, Moore R, Pedersen L, Perera L, Reboloso Y, Sueyoshi T & Negishi M (2009), Dephosphorylation of threonine 38 is required for nuclear translocation and activation of human xenobiotic receptor, CAR (NR113), *J Biol Chem*, 284, 34785-34792.
- Mutschler E**, Geisslinger G, Kroemer HK & Schäfer-Korting M (2001), Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart*, 7. Auflage.
- Mutschler E**, Geisslinger G, Menzel S, Gudermann T, Hinz B & Ruth P (2020), Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart*, 11. Auflage.
- Nagata S** (2000), Apoptotic DNA fragmentation, *Exp Cell Res*, 256(1), 12-18.
- Narita M**, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H & Tsujimoto Y (1998), Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(25), 14681-14686.
- Nelson DR**, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC & Nebert DW (1996), P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature, *Pharmacogenetics*, 6(1), 1-42.
- Neveu MJ**, Babcock KL, Hertzberg EL, Paul DL, Nicholson BJ & Pitot HC (1994), Colocalized alterations in connexin32 and cytochrome P450IIB1/2 by phenobarbital and related liver tumor promoters, *Cancer Res*, 54, 3145-3152.
- Nims RW** & Lubet RA (1996), The CYP2B subfamily. In: Ioannides C: Cytochromes P450: metabolic and toxicological aspects, *Boca Raton: CRC Press*, 135-160.
- Nishimura M**, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S & Satoh T (2003), Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR, *Yakugaku Zasshi*, 123, 369-375.
- Norén K** (1993), Contemporary and retrospective investigations of human milk in the trend studies of organochlorine contaminants in Sweden, *Sci Total Environ*, 139-140, 347-355.
- Nykänen A**, Haley B & Zamore PD (2001), ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway, *Cell*, 107, 107309-107321.
- O'Brien J**, Wilson I, Orton T & Pognan F (2000), Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity, *Eur J Biochem*, 267, 5421-5426.
- O'Byrne KJ**, Dalgleish AG, Browning MJ, Steward WP & Harris AL (2000), The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease, *Eur J Cancer*, 36(2), 151-169.
- Obradović MMS**, Hamelin B, Mnevski N, Couto JP, Sethi A, Coissieux MM, Müntz S, Okamoto R, Kohler H, Schmidt A & Bentires-Alj M (2019), Glucocorticoids promote breast cancer metastasis, *Nature*, 567(7749), 540-544.
- Oh HY**, Namkoong S, Lee SJ, Por E, Kim CK, Billiar TR, Han JA, Ha KS, Chung HT, Kwon YG, Lee H & Kim YM (2006), Dexamethasone protects primary cultured hepatocytes from death receptor-mediated

- apoptosis by upregulation of cFLIP, *Cell Death Differ*, 13(3), 512-523.
- Oikawa S** & Kawanishi S (1999), Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening, *FEBS Lett*, 453, 365-368.
- Okuda Y**, Kushida M, Kikumoto H, Nakamura Y, Higuchi H, Kawamura S, Cohen SM, Lake BG & Yamada T (2017), Evaluation of the human relevance of the constitutive androstane receptor-mediated mode of action for rat hepatocellular tumor formation by the synthetic pyrethroid momfluorothrin, *J Toxicol Sci*, 42(6), 773-788.
- Olsen JH**, Boice JD Jr, Jensen JPA & Fraumeni JF Jr (1989), Cancer among epileptic patients exposed to anticonvulsant drugs, *J Natl Cancer Inst*, 81, 803-808.
- Omicinski CJ**, Vanden Heuvel JP, Perdew GH & Peters JM (2011), Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities, *Toxicol Sci*, 120(1), 49-75.
- Omura T** & Sato R (1962), A new cytochrome in liver microsomes, *J Biol Chem*, 237, 1375-1376.
- Orans J**, Teotico DG & Redinbo MR (2005), The nuclear xenobiotic receptor pregnane X receptor: recent insights and new challenges, *Mol Endocrinol*, 19(12), 2891-2900.
- Ortiz de Montellano PR** (2010), Hydrocarbon hydroxylation by cytochrome P450 enzymes, *Chem Rev*, 110(2), 932-948.
- Orton TC**, Doughty SE, Kalinowski AE, Lord PG & Wadsworth PF (1996), Expression of growth factors and growth factor receptors in the liver of C57BL/10J mice following administration of phenobarbitone, *Carcinogenesis*, 17(5), 973-981.
- Osimitz TG** & Lake BG (2009), Mode-of-action analysis for induction of rat liver tumors by pyrethrins: relevance to human cancer risk, *Crit Rev Toxicol*, 39(6), 501-511.
- Papa S**, Zazzeroni F, Bubici C, Jayawardena S, Alvarez K, Matsuda S, Nguyen DU, Pham CG, Nelsbach AH, Melis T, De Smaele E, Tang WJ, D'Adamo L & Franzoso G (2004), Gadd45b mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2, *Nat Cell Biol*, 6, 146-153.
- Parzefall W**, Erber E, Sedivy R & Schulte-Hermann R (1991), Testing for induction of DNA synthesis in human hepatocyte primary cultures by rat liver tumor promoters, *Cancer Res*, 51(4), 1143-1147.
- Pascussi JM**, Drocourt L, Fabre JM, Maurel P & Vilarem MJ (2000), Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor-alpha expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators, *Mol Pharmacol*, 58(2), 361-372.
- Pascussi JM**, Gerbal-Chaloin S, Duret C, Daujat-Chavanieu M, Vilarem MJ & Maurel P (2008), The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 48, 1-32.
- Patterson DG Jr**, Todd GD, Turner WE, Maggio V, Alexander LR & Needham LL (1994), Levels of non-ortho-substituted (coplanar), mono- and di-ortho-substituted polychlorinated biphenyls, dibenzo-p-dioxins, and dibenzofurans in human serum and adipose tissue, *Environ Health Perspect*, 102(1), 195-204.
- Pavek P** (2016), Pregnane X Receptor (PXR)-Mediated Gene Repression and Cross-Talk of PXR with Other Nuclear Receptors via Coactivator Interactions, *Front Pharmacol*, 7, 456.
- Peraino C**, Fry RJ & Staffeldt E (1971), Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene, *Cancer Res*, 31(10), 1506-1512.
- Pfaffl MW** (2001), A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.
- Phillips JC**, Price RJ, Cunningham ME, Osimitz TG, Cockburn A, Gabriel KL, Preiss FJ, Butler WH & Lake BG (1997), Effect of piperonyl butoxide on cell replication and xenobiotic metabolism in the livers of CD-1

- mice and F344 rats, *Fundam Appl Toxicol*, 38, 64-74.
- Phillips JM**, Burgoon LD & Goodman JI (2009a), The Constitutive Active/Androstane Receptor Facilitates Unique Phenobarbital-Induced Expression Changes of Genes Involved in Key Pathways in Precancerous Liver and Liver Tumors, *Toxicol Sci*, 110(2), 319-333.
- Phillips JM**, Burgoon LD & Goodman JI (2009b), Phenobarbital elicits unique, early changes in the expression of hepatic genes that affect critical pathways in tumor-prone B6C3F1 mice, *Toxicol Sci*, 109(2), 193-205.
- Phillips JM** & Goodman JI (2008), Identification of genes that may play critical roles in phenobarbital (PB)-induced liver tumorigenesis due to altered DNA methylation, *Toxicol Sci*, 104, 86-99.
- Phillips JM**, Yamamoto Y, Negishi M, Maronpot RR & Goodman JI (2007), Orphan nuclear receptor constitutive active/androstane receptor-mediated alterations in DNA methylation during phenobarbital promotion of liver tumorigenesis, *Toxicol Sci*, 96, 72-82.
- Pitot HC** (1989), Progression: the terminal stage in carcinogenesis, *Jpn J Cancer Res*, 80(7), 599-607.
- Pitot HC** (1993), The molecular biology of carcinogenesis, *Cancer*, 72(3), 962-970.
- Pitot HC**, Barsness L, Goldsworthy T & Kitagawa T (1978), Biochemical characterisation of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine, *Nature*, 271(5644), 456-458.
- Pitot HC** & Sirica AE (1980), The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis, *Biochim Biophys Acta*, 605(2), 191-215.
- Ponsoda X**, Jover R, Núñez C, Royo M, Castell JV & Gómez-Lechón MJ (1995), Evaluation of the cytotoxicity of 10 chemicals in human and rat hepatocytes and in cell lines: Correlation between in vitro data and human lethal concentration, *Toxicol In Vitro*, 9(6), 959-966.
- Preston BD**, Miller EC & Miller JA (1985), The activities of 2,2,5,5-tetrachlorobiphenyl, its 3,4-oxide metabolite, and 2,2,4,4-tetrachlorobiphenyl in tumor induction and promotion assays, *Carcinogenesis*, 6(3), 451-453.
- Proskuryakov SY**, Konoplyannikov AG & Gabai VL (2003), Necrosis: a specific form of programmed cell death?, *Exp Cell Res*, 283(1), 1-16.
- Puntarulo S** & Cederbaum AI (1998), Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes, *Free Radic Biol Med*, 24(7-8), 1324-1330.
- Pustyl'nyak VO**, Gulyaeva LF & Lyakhovich VV (2005), CAR expression and inducibility of CYP2B genes in liver of rats treated with PB-like inducers, *Toxicology*, 216(2-3), 147-153.
- Pustyl'nyak VO**, Gulyaeva LF & Lyakhovich VV (2007), Induction of cytochrome P4502B: role of regulatory elements and nuclear receptors, *Biochemistry (Mosc)*, 72(6), 608-617.
- Pustyl'nyak VO**, Pivovarova E, Slynko N, Gulyaeva L & Lyakhovich V (2009), Species-specific induction of CYP2B by 2,4,6-triphenyldioxane-1,3 (TPD), *Life Sci*, 85(23-26), 815-821.
- Redza-Dutordoir M** & Averill-Bates DA (2016), Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species, *Biochim Biophys Acta*, 1863(12), 2977-2992.
- Rehm H** (2006), Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics, *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*, 5. Auflage.
- Renehan AG**, Booth C & Potten CS (2001), What is apoptosis, and why is it important?, *BMJ*, 322(7301), 1536-1538.
- Reschly EJ** & Krasowski MD (2006), Evolution and function of the NR11 nuclear hormone receptor subfamily (VDR, PXR, and CAR) with respect to metabolism of xenobiotics and endogenous compounds. *Curr Drug Metab*, 7(4), 349-365.

- Rigalli JP**, Perdomo VG, Luquita MG, Villanueva SS, Arias A, Theile D, Weiss J, Mottino AD, Ruiz ML & Catania VA (2012), Regulation of biotransformation systems and ABC transporters by benzimidazole in HepG2 cells: involvement of pregnane X-receptor, *PLoS Negl Trop Dis*, 6(12), e1951.
- Rignall B**, Braeuning A, Buchmann A & Schwarz M (2011), Tumorformation in liver of conditional beta-catenin-deficient mice exposed to adiethylnitrosamine/phenobarbital tumor promotion regimen, *Carcinogenesis*, 32, 52-57.
- Rodriguez-Antona C** & Ingelman-Sundberg M (2006), Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer, *Oncogene*, 25(11), 1679-1691.
- Roos R**, Andersson PL, Halldin K, Håkansson H, Westerholm E, Hamers T, Hamscher G, Heikkinen P, Korkalainen M, Leslie HA, Niittynen M, Sankari S, Schmitz HJ, van der Ven LT, Viluksela M & Schrenk D (2011), Hepatic effects of a highly purified 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (PCB 180) in male and female rats, *Toxicology*, 284(1-3), 42-53.
- Rosenfeld JM**, Vargas R Jr, Xie W & Evans RM (2003), Genetic profiling defines the xenobiotic gene network controlled by the nuclear receptor pregnane X receptor, *Mol Endocrinol*, 17(7), 1268-1282.
- Ross J**, Plummer SM, Rode A, Scheer N, Bower CC, Vogel O, Henderson CJ, Wolf CR & Elcombe CR (2010), Human constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR) support the hypertrophic but not the hyperplastic response to the murine nongenotoxic hepatocarcinogens phenobarbital and chlordane *in vivo*, *Toxicol Sci*, 116, 452-466.
- Ross PK**, Woods CG, Bradford BU, Kosyk O, Gatti DM, Cunningham ML & Rusyn I (2009), Time-course comparison of xenobiotic activators of CAR and PPAR $\alpha$  in mouse liver, *Toxicol Appl Pharmacol*, 235, 199-207.
- Rossi L**, Ravera M, Repetti G & Santi L (1977), Long-term administration of DDT or phenobarbital-Na in Wistar rats, *Int J Cancer*, 19(2), 179-185.
- Ruchaud S**, Korfali N, Villa P, Kottke TJ, Dingwall C, Kaufmann SH & Earnshaw WC (2002), Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation, *EMBO J*, 21(8), 1967-1977.
- Rudraiah S**, Zhang X & Wang L (2016), Nuclear Receptors as Therapeutic Targets in Liver Disease: Are We There Yet?, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 56, 605-626.
- Ruefli AA** & Johnstone RW (2003), A role for P glycoprotein in regulating cell growth and survival, *Clin Appl Immunol Rev*, 4, 31-47.
- Ruefli AA**, Tainton KM, Darcy PK, Smyth MJ & Johnstone RW (2002), P glycoprotein inhibits caspase 8 activation but not formation of the death inducing signal complex (disc) following fas ligation, *Cell Death Differ*, 9, 1266-1272.
- Rylander L**, Strömberg U & Hagmar L (1995), Decreased birthweight among infants born to women with a high dietary intake of fish contaminated with persistent organochlorine compounds, *Scand J Work Environ Health*, 21(5), 368-375.
- Safe S** (1990), Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs), *Crit Rev Toxicol*, 21(1), 51-88.
- Safe S**, Bandiera S, Sawyer T, Robertson L, Safe L, Parkinson A, Thomas PE, Ryan DE, Reik LM, Levin W, Denomme MA & Fujita T (1985), PCBs: structure-function relationships and mechanism of action. *Environ Health Perspect*, 60, 47-56.
- Safe SH** (1994), Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment, *Crit Rev Toxicol*, 24(2), 87-149.
- Saiki RK**, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA (1988), Primer-

- directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, 239(4839), 487-491.
- Saini SP**, Mu Y, Gong H, Toma D, Uppal H, Ren S, Li S, Poloyac SM & Xie W (2005), Dual role of orphan nuclear receptor pregnane X receptor in bilirubin detoxification in mice, *Hepatology*, 41(3), 497-505.
- Saito S**, Liu XF, Kamijo K, Raziuddin R, Tatsumoto T, Okamoto I, Chen X, Lee CC, Lorenzi MV, Ohara N & Miki T (2004), Deregulation and mislocalization of the cytokinesis regulator ECT2 activate the Rho signaling pathways leading to malignant transformation, *J Biol Chem*, 279(8), 7169-7179.
- Sambrook J**, Fritsch EF & Maniatis T (1982), Molecular cloning: a laboratory manual, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York*.
- Scheer N**, Ross J, Kapelyukh Y, Rode A & Wolf CR (2010), In vivo responses of the human and murine pregnane X receptor to dexamethasone in mice, *Drug Metab Dispos*, 38(7), 1046-1053.
- Scheer N**, Ross J, Rode A, Zevnik B, Niehaves S, Faust N & Wolf CR (2008), A novel panel of mouse models to evaluate the role of human pregnane X receptor and constitutive androstane receptor in drug response, *J Clin Invest*, 118(9), 3228-3239.
- Scherer E** (1984), Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis, *Biochim Biophys Acta*, 738(4), 219-236.
- Schrenk D** (2006), Vorlesung „Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie“, Technische Universität Kaiserslautern.
- Schrenk D**, Buchmann A, Dietz K, Lipp HP, Brunner H, Sirma H, Münzel P, Hagenmaier H, Gebhardt R & Bock KW (1994), Promotion of preneoplastic foci in rat liver with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzo-p-dioxin and a defined mixture of 49 polychlorinated dibenzo-p-dioxins, *Carcinogenesis*, 15(3), 509-515.
- Schrenk D**, Schmitz HJ, Bohnenberger S, Wagner B & Wörner W (2004), Tumor promoters as inhibitors of apoptosis in rat hepatocytes, *Toxicol Lett*, 149(1-3), 43-50.
- Schuetz EG**, Schmid W, Schutz G, Brimer C, Yasuda K, Kamataki T, Bornheim L, Myles K & Cole TJ (2000), The glucocorticoid receptor is essential for induction of cytochrome P-4502B by steroids but not for drug or steroid induction of CYP3A or P-450 reductase in mouse liver, *Drug Metabolism and Disposition*, 28(3), 268-278.
- Schulte-Hermann R** (1985), Tumor promotion in the liver, *Arch Toxicol*, 57(3), 147-158.
- Schulte-Hermann R**, Bursch W, Grasl-Kraupp B, Török L, Ellinger A & Müllauer L (1995), Role of active cell death (apoptosis) in multi-stage carcinogenesis, *Toxicol Lett*, 82-83, 143-148.
- Schulte-Hermann R**, Bursch W, Kraupp-Grasl B, Oberhammer F, Wagner A & Jirtle R (1993), Cell proliferation and apoptosis in normal liver and preneoplastic foci, *Environ Health Perspect*, 101(5), 87-90.
- Schulte-Hermann R**, Timmermann-Trosiener I, Barthel G & Bursch W (1990), DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as determinants of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion, *Cancer Res*, 50(16), 5127-5135.
- Schulte-Hermann R**, Timmermann-Trosiener I & Schuppler J (1986), Facilitated expression of adaptive responses to phenobarbital in putative pre-stages of liver cancer, *Carcinogenesis*, 7(10), 1651-1655.
- Scoltock AB**, Heimlich G & Cidlowski JA (2007), Glucocorticoids inhibit the apoptotic actions of UV-C but not Fas ligand in hepatoma cells: direct evidence for a critical role of Bcl-xL, *Cell Death Differ*, 14(4), 840-850.
- Seglen PO** (1972), Preparation of Rat Liver Cells, *Experimental Cell Research*, 74, 450-454.
- Senthilkumar PK**, Klingelhutz AJ, Jacobus JA, Lehmler H, Robertson LW & Ludewig G (2011), Airborne polychlorinated biphenyls (PCBs) reduce telomerase activity and shorten telomere length in immortal human skin keratinocytes (HaCat), *Toxicol Lett*, 204(1), 64-70.

- Selby JV**, Friedman GD & Fireman BH (1989), Screening prescription drugs for possible carcinogenicity: eleven to fifteen years of follow-up, *Cancer Res*, 49(20), 5736-5747.
- Shang XZ**, Zhu H, Lin K, Tu Z, Chen J, Nelson DR & Liu C (2004), Stabilized beta-catenin promotes hepatocyte proliferation and inhibits TNFalpha-induced apoptosis, *Lab Invest*, 84, 332-341.
- Shimada T** (2006), Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons, *Drug Metab Pharmacokinet*, 21(4), 257-276.
- Shimada T**, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y & Guengerich FP (1994), Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians, *J Pharmacol Exp Ther*, 270(1), 414-423.
- Sidhu JS** & Omiecinski CJ (1995), Modulation of xenobiotic-inducible cytochrome P450 gene expression by dexamethasone in primary rat hepatocytes, *Pharmacogenetics*, 5(1), 24-36.
- Sidhu JS** & Omiecinski CJ (1997), An okadaic acid-sensitive pathway involved in the phenobarbital-mediated induction of CYP2B gene expression in primary rat hepatocyte cultures, *J Pharmacol Exp Ther*, 282(2), 1122-1129.
- Šimečková P**, Vondráček J, Andryšík Z, Zatloukalová J, Krcmár P, Kozubík A & Machala M (2009a), The 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl-enhanced degradation of connexin 43 involves both proteasomal and lysosomal activities, *Toxicol Sci*, 107(1), 9-18.
- Šimečková P**, Vondráček J, Procházková J, Kozubík A, Krcmár P & Machala M (2009b), 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) induces degradation of adherens junction proteins and inhibits beta-catenin-dependent transcription in liver epithelial cells, *Toxicology*, 260(1-3), 104-111.
- Singh Y**, Port J, Schwarz M & Braeuning A (2014), Genetic ablation of  $\beta$ -catenin inhibits the proliferative phenotype of mouse liver adenomas, *Br J Cancer*, 111(1), 132-138.
- Slee EA**, Adrain C & Martin SJ (1999), Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis, *Cell Death Differ*, 6(11), 1067-1074.
- Slee EA**, Adrain C & Martin SJ (2001), Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis, *J Biol Chem*, 276(10), 7320-7326.
- Smirlis D**, Muangmoonchai R, Edwards M, Phillips IR & Shephard EA (2001), Orphan receptor promiscuity in the induction of cytochromes p450 by xenobiotics, *J Biol Chem*, 276, 12822-12826.
- Soldatow V**, Peffer RC, Trask OJ, Cowie DE, Andersen ME, LeCluyse E & Deisenroth C (2016), Development of an in vitro high content imaging assay for quantitative assessment of CAR-dependent mouse, rat, and human primary hepatocyte proliferation, *Toxicol In Vitro*, 36, 224-237.
- Squires EJ**, Sueyoshi T & Negishi M (2004), Cytoplasmic localization of pregnane X receptor and ligand-dependent nuclear translocation in mouse liver, *J Biol Chem*, 279(47), 49307-49314.
- Staudinger JL**, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, Liu Y, Klaassen CD, Brown KK, Reinhard J, Willson TM, Koller BH & Kliewer SA (2001), The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(6), 3369-3374.
- Staudinger JL**, Madan A, Carol KM & Parkinson A (2003), Regulation of drug transporter gene expression by nuclear receptors, *Drug Metab Dispos*, 31(5), 523-527.
- Stinchcombe S**, Buchmann A, Bock KW & Schwarz M (1995), Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver, *Carcinogenesis*, 16(6), 1271-1275.
- Strathmann J**, Schwarz M, Tharappel JC, Glauert HP, Spear BT, Robertson LW, Appel KE & Buchmann A (2006), PCB 153, a non-dioxin-like tumor promoter, selects for beta-catenin (Catnb)-mutated mouse liver tumors, *Toxicol Sci*, 93(1), 34-40.
- Sueyoshi T**, Kawamoto T, Zelko I, Honkakoski P & Negishi M (1999), The repressed nuclear receptor CAR

- responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene, *J Biol Chem*, 274(10), 6043-6046.
- Sueyoshi T** & Negishi M (2001), Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 123-143.
- Sugatani J**, Kojima H, Ueda A, Kakizaki S, Yoshinari K, Gong QH, Owens IS, Negishi M & Sueyoshi T (2001), The phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR, *Hepatology*, 33(5), 1232-1238.
- Sugatani J**, Mizushima K, Osabe M, Yamakawa K, Kakizaki S, Takagi H, Mori M, Ikari A & Miwa M (2008), Transcriptional regulation of human UGT1A1 gene expression through distal and proximal promoter motifs: implication of defects in the UGT1A1 gene promoter, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 377(4-6), 597-605.
- Sui M**, Chen F, Chen Z & Fan W (2006), Glucocorticoids interfere with therapeutic efficacy of paclitaxel against human breast and ovarian xenograft tumors, *Int J Cancer*, 119, 712-717.
- Suino K**, Peng L, Reynolds R, Li Y, Cha JY, Repa JJ, Kliewer SA & Xu HE (2004), The nuclear xenobiotic receptor CAR: structural determinants of constitutive activation and heterodimerization, *Crit Rev Mol Cell*, 16(6), 893-905.
- Swales K** & Negishi M (2004), CAR, driving into the future, *Mol Endocrinol*, 18(7), 1589-1598.
- Taatjes DJ**, Sobel BE & Budd RC (2008), Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis, *Histochem Cell Biol*, 129(1), 33-43.
- Takai A**, Ohno Y, Yasumoto T & Mieskes G (1992), Estimation of the rate constants associated with the inhibitory effect of okadaic acid on type 2A protein phosphatase by time-course analysis, *Biochem J*, 287(1), 101-106.
- Takeshita A**, Taguchi M, Koibuchi N & Ozawa Y (2002), Putative role of the orphan nuclear receptor SXR (steroid and xenobiotic receptor) in the mechanism of CYP3A4 inhibition by xenobiotics, *J Biol Chem*, 277(36), 32453-32458.
- Tharappel JC**, Lee EY, Robertson LW, Spear BT & Glauert HP (2002), Regulation of cell proliferation, apoptosis, and transcription factor activities during the promotion of liver carcinogenesis by polychlorinated biphenyls, *Toxicol Appl Pharmacol*, 179(3), 172-184.
- Tharappel JC**, Spear BT & Glauert HP (2008), Effect of phenobarbital on hepatic cell proliferation and apoptosis in mice deficient in the p50 subunit of NF-kappaB, *Toxicol Appl Pharmacol*, 226(3), 338-344.
- Thompson CB** (1995), Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science*, 267(5203), 1456-1462.
- Tien ES** & Negishi M (2006), Nuclear receptors CAR and PXR in the regulation of hepatic metabolism, *Xenobiotica*, 36, 1152-1163.
- Timsit YE** & Negishi M (2007), CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors, *Steroids*, 72(3), 231-246.
- Tojima H**, Kakizaki S, Yamazaki Y, Takizawa D, Horiguchi N, Sato K & Mori M (2012), Ligand dependent hepatic gene expression profiles of nuclear receptors CAR and PXR, *Toxicol Lett*, 212(3), 288-297.
- Tolson AH** & Wang H (2010), Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR, *Adv Drug Deliv Rev*, 62(13), 1238-1249.
- Tomei LD**, Kanter P & Wenner CE (1988), Inhibition of radiation-induced apoptosis in vitro by tumor promoters, *Biochem Biophys Res Commun*, 155(1), 324-331.
- Twyman RE**, Rogers CJ & Macdonald RL (1989), Differential regulation of gamma-aminobutyric acid receptor channels by diazepam and phenobarbital. *Ann Neurol*, 25(3), 213-220.
- Ueda A**, Hamadeh HK, Webb HK, Yamamoto Y, Sueyoshi T, Afshari CA, Lehmann JM & Negishi M (2002),

- Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital, *Mol Pharmacol*, 61(1), 1-6.
- Ulbrich B & Stahlmann R (2004)**, Developmental toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs): a systematic review of experimental data, *Arch Toxicol*, 78, 252-268.
- Umannová L, Neca J, Andrysík Z, Vondráček J, Upham BL, Trosko JE, Hofmanová J, Kozubík A & Machala M (2008)**, Non-dioxin-like polychlorinated biphenyls induce a release of arachidonic acid in liver epithelial cells: a partial role of cytosolic phospholipase A(2) and extracellular signal-regulated kinases 1/2 signalling, *Toxicology*, 247(1), 55-60.
- Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, Fiedler H, Hakansson H, Hanberg A, Haws L, Rose M, Safe S, Schrenk D, Tohyama C, Tritscher A, Tuomisto J, Tysklind M, Walker N & Peterson RE (2006)**, The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds, *Toxicol Sci*, 93(2), 223-241.
- Valdiglesias V, Prego-Faraldo MV, Pásaro E, Méndez J & Laffon B (2013)**, Okadaic acid: more than a diarrhetic toxin, *Mar Drugs*, 11(11), 4328-4349.
- Vansell NR, Muppidi JR, Habeebu SM & Klaassen CD (2004)**, Promotion of thyroid tumors in rats by pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile (PCN) and polychlorinated biphenyl (PCB), *Toxicol Sci*, 81(1), 50-59.
- Vaux DL & Korsmeyer SJ (1999)**, Cell death in development, *Cell*, 96(2), 245-254.
- Viluksela M, Heikkinen P, van der Ven LT, Rendel F, Roos R, Esteban J, Korkalainen M, Lensu S, Miettinen HM, Savolainen K, Sankari S, Lilienthal H, Adamsson A, Toppari J, Herlin M, Finnilä M, Tuukkanen J, Leslie HA, Hamers T, Hamscher G, Al-Anati L, Stenius U, Dervola KS, Bogen IL, Fonnum F, Andersson PL, Schrenk D, Halldin K & Håkansson H (2014)**. Toxicological profile of ultrapure 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (PCB 180) in adult rats, *PLoS One*, 19;9(8), e104639.
- Viluksela M, van der Ven LTM, Schrenk D, Lilienthal H, Andersson PL, Halldin K & Håkansson H (2012)**, Biological and toxicological effects of non-dioxin-like PCBs, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54(1), 16.
- Vogel C & Marcotte EM (2012)**, Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses, *Nat Rev Genet*, 3(4), 227-232.
- Wahlang B, Prough RA, Falkner KC, Hardesty JE, Song M, Clair HB, Clark BJ, States JC, Arteel GE & Cave MC (2016)**, Polychlorinated Biphenyl-Xenobiotic Nuclear Receptor Interactions Regulate Energy Metabolism, Behavior, and Inflammation in Non-alcoholic-Steatohepatitis, *Toxicol Sci*, 149(2), 396-410.
- Wandel C, Böcker R, Böhler H, Browne A, Rügheimer E & Martin E (1994)**, Midazolam is metabolized by at least three different cytochrome P450 enzymes, *Br J Anaesth*, 73(5), 658-661.
- Wang H, Huang H, Li H, Teotico DG, Sinz M, Baker SD, Staudinger J, Kalpana G, Redinbo MR & Mani S (2007)**, Activated pregnenolone X-receptor is a target for ketoconazole and its analogs, *Clin Cancer Res*, 13, 2488-2495.
- Wang H, Li H, Moore LB, Johnson MD, Maglich JM, Goodwin B, Ittoop OR, Wisely B, Creech K, Parks DJ, Collins JL, Willson TM, Kalpana GV, Venkatesh M, Xie W, Cho SY, Roboz J, Redinbo M, Moore JT & Mani S (2008)**, The phytoestrogen coumestrol is a naturally occurring antagonist of the human pregnane X receptor, *Mol Endocrinol*, 22(4), 838-857.
- Wang H & Negishi M (2003)**, Transcriptional regulation of cytochrome p450 2B genes by nuclear receptors, *Curr Drug Metab*, 4(6), 515-525.
- Wang H & Tompkins LM (2008)**, CYP2B6: new insights into a historically overlooked cytochrome P450 isozyme, *Curr Drug Metab*, 9(7), 598-610.
- Wang K, Damjanov I & Wan YJ (2010)**, The protective role of pregnane X receptor in lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury, *Lab Invest*, 90(2), 257-265.

- Wang SR**, Renaud G, Infante J, Catala D & Infante R (1985), Isolation of rat hepatocytes with EDTA and their metabolic functions in primary culture, *In Vitro Cell Dev Biol*, 21(9), 526-530.
- Wanke I**, Schwarz M & Buchmann A (2004), Insulin and dexamethasone inhibit TGF-beta-induced apoptosis of hepatoma cells upstream of the caspase activation cascade, *Toxicology*, 204(2-3), 141-154.
- Waterman CL**, Currie RA, Cottrell LA, Dow J, Wright J, Waterfield CJ & Griffin JL (2010), An integrated functional genomic study of acute phenobarbital exposure in the rat, *BMC Genomics*, 11, 1-17.
- Watkins RE**, Wisely GB, Moore LB, Collins JL, Lambert MH, Williams SP, Willson TM, Kliewer SA & Redinbo MR (2001), The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity, *Science*, 292(5525), 2329-2333.
- Waxman DJ** (1999), P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR, *Arch Biochem Biophys*, 369(1), 11-23.
- Wei P**, Zhang J, Dowhan DH, Han Y & Moore DD (2002), Specific and overlapping functions of the nuclear hormone receptors CAR and PXR in xenobiotic response, *Pharmacogenomics J*, 2, 117-126.
- Wei P**, Zhang J, Egan-Hafley M, Liang S & Moore DD (2000), The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism, *Nature*, 407(6806), 920-923.
- Whysner J**, Ross PM & Williams GM (1996), Phenobarbital mechanistic data and risk assessment: enzyme induction, enhanced cell proliferation, and tumor promotion, *Pharmacol Ther*, 71(1-2), 153-191.
- Willson TM** & Kliewer SA (2002), PXR, CAR and drug metabolism, *Nat Rev Drug Discov*, 1(4), 259-266.
- Wolf BB** & Green DR (1999), Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases, *J Biol Chem*, 274(29), 20049-20052.
- Wolff MS**, Zeleniuch-Jacquotte A, Dubin N & Toniolo P (2000), Risk of breast cancer and organochlorine exposure, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9(3), 271-277.
- Wörner W** & Schrenk D (1996), Influence of liver tumor promoters on apoptosis in rat hepatocytes induced by 2-acetylaminofluorene, ultraviolet light, or transforming growth factor beta 1, *Cancer Res*, 56(6), 1272-1278.
- Wright MC** & Paine AJ (1994), Induction of the cytochrome P450 3A subfamily in rat liver correlates with the binding of inducers to a microsomal protein, *Biochem Biophys Res Commun*, 201, 973-979.
- Wright SC**, Zhong J & Larrick JW (1994), Inhibition of apoptosis as a mechanism of tumor promotion, *FASEB J*, 8(9), 654-660.
- Wrighton SA** & Stevens JC (1992), The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism, *Crit Rev Toxicol*, 22(1), 1-21.
- Wu CC** & Bratton SB (2013), Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species, *Antioxid Redox Signal*, 19(6), 546-558.
- Wu W**, Chaudhuri S, Brickley DR, Pang D, Karrison T & Conzen SD (2004), Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells, *Cancer Res*, 64(5), 1757-1764.
- Wudtiwai B**, Sripanidkulchai B, Kongtawelert P & Banjerdpongchai R (2011), Methoxyflavone derivatives modulate the effect of TRAIL-induced apoptosis in human leukemic cell lines, *J Hematol Oncol*, 4, 52.
- Xie W**, Barwick JL, Simon CM, Pierce AM, Safe S, Blumberg B, Guzelian PS & Evans RM (2000), Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR, *Genes Dev*, 14, 3014-3023.
- Xie W**, Radominska-Pandya A, Shi Y, Simon CM, Nelson MC, Ong ES, Waxman DJ & Evans RM (2001), An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids, *Proc Natl Acad Sci*

- U S A*, 98(6), 3375-3380.
- Xu C**, Li CY & Kong AN (2005), Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics, *Arch Pharm Res*, 28(3), 249-268.
- Yamada H**, Ishii Y, Yamamoto M & Oguri K (2006), Induction of the hepatic cytochrome P450 2B subfamily by xenobiotics: research history, evolutionary aspect, relation to tumorigenesis, and mechanism, *Curr Drug Metab*, 7(4), 397-409.
- Yamada T**, Cohen SM & Lake BG (2015), The Mode of Action for Phenobarbital-Induced Rodent Liver Tumor Formation Is not Relevant for Humans: Recent Studies With Humanized Mice, *Toxicol Sci*, 147(2), 298-299.
- Yamada T**, Okuda Y, Kushida M, Sumida K, Takeuchi H, Nagahori H, Fukuda T, Lake BG, Cohen SM & Kawamura S (2014), Human hepatocytes support the hypertrophic but not the hyperplastic response to the murine nongenotoxic hepatocarcinogen sodium phenobarbital in an in vivo study using a chimeric mouse with humanized liver, *Toxicol Sci*, 142(1), 137-157.
- Yamada T**, Uwagawa S, Okuno Y, Cohen SM & Kaneko H (2009), Case study: an evaluation of the human relevance of the synthetic pyrethroid metofluthrin-induced liver tumors in rats based on mode of action, *Toxicol Sci*, 108(1), 59-68.
- Yamamoto M**, Fukuda K, Miura N, Suzuki R, Kido T & Komatsu Y (1998), Inhibition by dexamethasone of transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatoma cells: a possible association with Bcl-xL induction, *Hepatology*, 27(4), 959-966.
- Yamamoto Y**, Moore R, Flavell RA, Lu B & Negishi M (2010), Nuclear receptor CAR represses NFalpha-induced cell death by interacting with the anti-apoptotic GADD45B, *PLoS One*, 5(4), e10121.
- Yamamoto Y**, Moore R, Goldsworthy TL, Negishi M & Maronpot RR (2004), The orphan nuclear receptor constitutive active/androstane receptor is essential for liver tumor promotion by phenobarbital in mice, *Cancer Res*, 64(20), 7197-7200.
- Yamazaki M**, Suzuki H & Sugiyama Y (1996), Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics, *Pharm Res*, 13(4), 497-513.
- Yang H** & Wang H (2014), Signaling control of the constitutive androstane receptor (CAR), *Protein Cell*, 5(2), 113-123.
- Yoshimura T** (2012), Yusho: 43 years later. *Kaohsiung J Med Sci*, 28(7), 49-52.
- Yoshinari K**, Kobayashi K, Moore R, Kawamoto T & Negishi M (2003), Identification of the nuclear receptor CAR:HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital. *FEBS Lett*, 548(1-3), 17-20.
- Yoshinari K**, Tien E, Negishi M & Honkakoski P (2008), Receptor-mediated regulation of cytochromes P450. In: *Cytochromes P450: Role in the Metabolism and Toxicity of Drugs and other Xenobiotics* (edited by Ioannides C), *RSC, Cambridge*.
- Yusuf S**, Joseph P, Rangarajan S, Islam S, Mentz A, Hystad P, Brauer M, Kutty VR, Gupta R, Wielgosz A, AlHabib KF, Dans A, Lopez-Jaramillo P, Avezum A, Lanas F, Oguz A, Kruger IM, Diaz R, Yusoff K, Mony P, Chifamba J, Yeates K, Kelishadi R, Yusufali A, Khatib R, Rahman O, Zatonska K, Iqbal R, Wei L, Bo H, Rosengren A, Kaur M, Mohan V, Lear SA, Teo KK, Leong D, O'Donnell M, McKee M & Dagenais G (2020), Modifiable risk factors, cardiovascular disease, and mortality in 155 722 individuals from 21 high-income, middle-income, and low-income countries (PURE): a prospective cohort study, *Lancet*, 395(10226), 795-808.
- Zaman S**, Wang R & Gandhi V (2014), Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma*, 55(9), 1980-1992.
- Zeiger M**, Haag R, Höckel J, Schrenk D & Schmitz HJ (2001), Inducing effects of dioxin-like polychlorinated

biphenyls on CYP1A in the human hepatoblastoma cell line HepG2, the rat hepatoma cell line H4IIE, and rat primary hepatocytes: comparison of relative potencies, *Toxicol Sci*, 63(1), 65-73.

**Zelko I** & Negishi M (2000), Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes, *Biochem Biophys Res Commun*, 277(1), 1-6.

**Zhang JH** & Xu M (2000), DNA fragmentation in apoptosis, *Cell Res*, 10(3), 205-211.

**Zhao B**, Xie GJ, Li RF, Chen Q & Zhang XQ (2015), Dexamethasone protects normal human liver cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand by upregulating the expression of P-glycoproteins, *Mol Med Rep*, 12(6), 8093-8100.

**Zhou J**, Liu M, Zhai Y & Xie W (2008), The antiapoptotic role of pregnane X receptor in human colon cancer cells, *Mol Endocrinol*, 22(4), 868-880.

**Zong WX** & Thompson CB (2006), Necrotic death as a cell fate, *Genes Dev*, 20(1), 1-15.

**Zucchini N**, de Sousa G, Bailly-Maitre B, Gugenheim J, Bars R, Lemaire G & Rahmani R (2005), Regulation of Bcl-2 and Bcl-xL anti-apoptotic protein expression by nuclear receptor PXR in primary cultures of human and rat hepatocytes, *Biochim Biophys Acta*, 1745(1), 48-58.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation

**„Rolle der nukleären Rezeptoren CAR und PXR bei der Induktion fremdstoff-metabolisierender Enzyme sowie der Hemmung der UV-induzierten Apoptose durch nicht-dioxinartige PCBs“**

eigenständig verfasst und nur die in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben sowie die Ergebnisse beteiligter Mitarbeiter bzw. anderer Autoren klar gekennzeichnet zu haben. Ich habe weder die Dissertation oder Teile der Dissertation als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht noch ein Promotionsverfahren bei einer anderen Hochschule beantragt oder eröffnet. Die Promotionsordnung des Fachbereichs Chemie der Universität Kaiserslautern vom 07. Oktober 1999 ist mir bekannt.

Die vorliegende Dissertation stellt eine thematische Fortführung der von mir zuvor angefertigten Diplomarbeit dar, insofern wurden in Diplomarbeit und Dissertation analoge Versuchsdurchführungen im Teil „4.2 Methoden“ in der vorliegenden Dissertation der Vollständigkeit halber erneut wiedergegeben.

Einige bereits in der Diplomarbeit durchgeführte Experimente zur mRNA-Induktion von CYP2B1 wurden in der vorliegenden Dissertation unter verbesserten experimentellen Perfusionsbedingungen in unabhängigen Experimenten erneut durchgeführt, um die Vergleichbarkeit mit den weiteren während der Promotion erzielten Ergebnissen zu gewährleisten.

Bestandteile dieser Dissertation wurden bereits während der Promotion und vor der Erstellung dieser Arbeit auf Kongressen oder in Printmedien veröffentlicht (siehe Lebenslauf „Veröffentlichungen“).

München, den 31.07.2020

---

Maike Wolf

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk für die Überlassung des spannenden Themas, die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis sowie für die stetige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft. Von ganzem Herzen danke ich Ihnen außerdem für die vielen Freiheiten und Entwicklungsmöglichkeiten während der Durchführung der Dissertation sowie für Ihre Geduld, die nicht selbstverständlich sind.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Jun.-Prof. Dr. Alexander Cartus für die gute, diskussionsreiche und freundschaftliche Zusammenarbeit während der Dissertation sowie für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken.

Herrn Prof. Dr. Sitzmann danke ich herzlich für die bereitwillige Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Zudem danke ich dem gesamten Arbeitskreis für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und die unzähligen erheiternden Augenblicke. Insbesondere Melanie, Monika, Kevin, Alex, Robert, Jens, Helena, Chrissie, Sylke, Martin, Tom, Anastasia, Kerstin und Lucas.

Meiner Familie, Maria & Werner und meinen Freunden danke ich für ihre immerwährende Unterstützung und vor allem für die spannenden, schönen und witzigen Momente, ohne die das Leben nur halb so schön wäre.

Und Michael... DANKE! Schön, dass es dich gibt.

*... Danke!*

---

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name Maike Wolf (geb. Gähns)

## Berufspraxis

05/2017 – heute Group Leader Cell Toxicology, Eurofins BioPharma Product Testing Munich GmbH, München

12/2015 – 04/2017 Study Director *in vitro* Pharmacology/Toxicology, Eurofins BioPharma Product Testing Munich GmbH, München

01/2014 – 11/2015 Project Manager, BSL Bioservice GmbH, München

06/2010 – 06/2013 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Lebensmittelchemie und Toxikologie von Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk, Technische Universität Kaiserslautern

## Hochschulbildung

06/2010 – 06/2013 Promotion in der Arbeitsgruppe Lebensmittelchemie und Toxikologie von Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk, Technische Universität Kaiserslautern  
Titel der Arbeit: „Rolle der nukleären Rezeptoren CAR und PXR bei der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme sowie der Hemmung der UV-induzierten Apoptose durch nicht-dioxinartige PCBs“

10/2009 – 03/2010 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Lebensmittelchemie und Toxikologie von Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk, Technische Universität Kaiserslautern  
Titel der Arbeit: „Induktion von CYP2B1 in primären Hepatozyten der Ratte unter Verwendung einer Kollagenase-freien Leberperfusion“

10/2005 – 03/2010 Studium der Biophysik an der Technischen Universität Kaiserslautern

## Weiterbildung

seit 2011 Weiterbildung zum Fachtoxikologen der DGPT  
Absolvierte Kurse: Molekulare Zelltoxikologie (Neuherberg, 2011), Lebensmitteltoxikologie (Kaiserslautern, 2011), Grundlagen der Organtoxikologie und -pathologie II (Erfurt, 2012), Fremdstoffmetabolismus/Toxikokinetik (Dortmund, 2012), Versuchstierkunde I

(Erfurt, 2012), Klinische Toxikologie (Homburg, 2013), Grundlagen der Organtoxikologie und -pathologie I (Erfurt, 2013), Versuchstierkunde II (Jena, 2013), Chemische Kanzerogenese und Mutagenese (Neuherberg, 2014), Grundlagen der Epidemiologie (Bochum, 2015), Risk Assessment (Berlin, 2016), Regulatorische Toxikologie (Hannover, 2016), Fremdstoffallergie/Immuntoxikologie (Potsdam, 2018), Reproduktionstoxikologie (Berlin, 2018), Expositionsermittlung und -bewertung (Dortmund, 2019)

### **Veröffentlichungen**

Gährs M, Roos R, Andersson PL und Schrenk D (2015)

Role of the nuclear xenobiotic receptors CAR and PXR in induction of cytochromes P450 by non-dioxinlike polychlorinated biphenyls in cultured rat hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272(1), 77-85.

Gährs M, Roos R, Andersson PL und Schrenk D (2013)

Posterpräsentation: „Role of nuclear xenobiotic receptors CAR and PXR in induction of cytochromes P450 by ND-L-PCBs in cultured rat hepatocytes“. *79. Jahrestagung der DGPT*, Halle (Saale).

Gährs M und Schrenk D (2011)

Posterpräsentation: „Structure-activity relationship for induction of cytochromes P450 by non-dioxinlike polychlorinated biphenyls“. *50th Annual Meeting of the Society of Toxicology*, Washington D. C.

Chopra M, Gährs M, Haben M, Michels C und Schrenk D (2010)

Inhibition of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin depends on protein biosynthesis. *Cell Biology and Toxicology*, 26(4), 391-401.