

Aus dem Bundesinstitut für Risikobewertung

**Charakterisierung der Chemikalien-induzierten  
Leberschädigung  
(„Drug-Induced Liver Injury“ – DILI)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von

**Franziska Wewering**

aus Berlin

Berlin 2017

---

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2012 bis Juni 2017 unter Leitung von Prof. Dr. Dr. Andreas Luch am Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Andreas Luch

2. Gutachter: Prof. Dr. Sarah Hedtrich

Tag der Disputation: 27.09.2017

---

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Charakterisierung der Chemikalien-induzierten Leberschädigung („Drug-Induced Liver Injury“ – DILI)“ ohne Benutzung anderer als der zugelassenen Hilfsmittel selbstständig angefertigt zu haben. Alle angeführten Zitate sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder als ungenügend beurteilt.

Berlin, 2017

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Leber . . . . .	1
1.2	Chemikalien-induzierte Leberschädigung – DILI . . . . .	3
1.2.1	Ketoconazol . . . . .	7
1.2.2	<i>Ortho</i> -Anisidin . . . . .	7
1.3	<i>In-vitro</i> -Testsysteme zur Detektion von hepatotoxischen Substanzen . . . . .	9
<b>2</b>	<b>Zielstellung der Arbeit</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>12</b>
3.1	Characterization of chemical-induced sterile inflammation <i>in vitro</i> : application of the model compound ketoconazole in a human hepatic co-culture system . . . . .	12
3.2	Hepatic co-cultures <i>in vitro</i> reveal suitable to detect Nrf2-mediated oxidative stress responses on the bladder carcinogen <i>o</i> -anisidine . . . . .	26
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>35</b>
4.1	Etablierung des Kokulturmodells für die Detektion von DILI <i>in vitro</i> . . . . .	35
4.1.1	Untersuchung des DILI-induzierenden Antimykotikums Ketoconazol . . . . .	36
4.1.2	Untersuchung des leberschädigenden aromatischen Amins <i>o</i> -Anisidin und Vergleich mit <i>p</i> -Anisidin . . . . .	43
4.2	Vergleich des Kokulturmodells mit anderen <i>in-vitro</i> -Ansätzen . . . . .	44
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Ausblick</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>55</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>57</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>

*Inhaltsverzeichnis*

---

<b>11 Publikationsliste</b>	<b>73</b>
11.1 Publikationen . . . . .	73
11.2 Konferenzbeiträge . . . . .	73
11.3 Weitere Publikationen . . . . .	74
<b>12 Danksagung</b>	<b>75</b>
<b>Anhang A</b>	<b>77</b>
<b>Anhang B</b>	<b>90</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Leber

Die Leber (lat. *iecur*) ist das zentrale Stoffwechselorgan des menschlichen Körpers, das eine Vielzahl wichtiger Funktionen erfüllt: die Synthese, Transformation, Entgiftung und Speicherung von Stoffen. Wichtige Plasmaproteine wie Albumin sowie Gerinnungsfaktoren, Wachstumsfaktoren und Lipide werden hier gebildet. Als exokrine Drüse produziert und sezerniert sie außerdem die Gallenflüssigkeit. Die Metabolisierung von Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten nach deren Resorption im Darm findet in der Leber statt, um eine konstante Stoffkonzentration für die Versorgung peripherer Gewebe sicherzustellen. Endprodukte des Stoffwechsels, wie z. B. Ammoniak, oder auch Medikamente und aufgenommene Fremdstoffe (Xenobiotika) werden hier durch Biotransformation entgiftet, so dass sie über die Niere oder Galle ausgeschieden werden können. Als wichtiges Speicherorgan werden Vitamine, Glukose in Form von Glykogen, Eisen und Kupfer eingelagert (Kmiec, 2001). Darüber hinaus besitzt die Leber eine hohe Regenerationsfähigkeit. Werden bis zu 80 % geschädigt oder operativ entfernt, kann das betroffene Gewebe neu gebildet werden (Court *et al.*, 2002).

Die gesunde, menschliche Leber besitzt eine rotbraune Farbe, sitzt im rechten Oberbauch unter dem Rippenbogen und wiegt 1,5 bis 2 kg (Bley *et al.*, 2015). Sie untergliedert sich in vier Leberlappen, zwei große (*Lobus dexter* und *Lobus sinister*) und zwei kleine (*Lobus quadratus* und *Lobus caudatus*). Über die Pfortader wird sie mit Nährstoffen versorgt, während die Leberarterien die Sauerstoffversorgung sicherstellen. Beide treten über die Leberpforte ein, die gleichzeitig als Austrittsportal für die Gallengänge dient. Über diese wird die in der Leber produzierte Galle aus der Leber weggeleitet. Die Leberlappen kann man in struktur- und funktionsgleiche Leberläppchen von 1 bis 2 mm Durchmesser einteilen. Sie bestehen hauptsächlich aus Hepatozyten, die abgeleitet von einer Zentralvene entlang der sogenannten Leberzellbalken in Strängen angeordnet sind. Benachbarte Leberläppchen bilden an den Eckpunkten die sogenannten Portalfelder, in denen eine Arterie, eine Vene sowie ein Gallengang verlaufen. Diese histologisch sehr gut erkennbare Struktur wird auch als Glisson-Trias bzw. Glissonsches Dreieck bezeichnet. Zwischen den Hepatozyten kleidet

ein diskontinuierliches Endothel mit fehlender Basallamina die Kapillaren, Lebersinusoiden genannt, aus. Der dabei entstehende Spalt zwischen Hepatozyt und Endothelzellen ist nach seinem Entdecker als Disse-Raum benannt (Haubrich, 2004). In diesem mit Blutplasma gefüllten Raum findet der Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten statt. Hier sitzen auch die Ito-Zellen, die Vitamin A speichern, intralobuläre Bindegewebsfasern produzieren und pathophysiologisch an der Entstehung der Leberzirrhose beteiligt sind. Durch die Lebersinusoiden werden das Pfortaderblut sowie das Blut aus der Leberarterie durch die Leberläppchen Richtung Läppchen-Zentrum transportiert, wo es von einer Zentralvene aufgenommen wird. Diese münden schließlich in den Lebervenen (Tanaka *et al.*, 2011).

Statt dieser histologischen Klassifizierung kann auch eine funktionelle Einteilung der Leber in Azini erfolgen. Hierbei bilden die Gefäße des Glisson-Trias die mittlere Achse eines Azinus, so dass berücksichtigt wird, dass das Blut beide benachbarten Läppchen versorgen kann. Dabei kann man drei Zonen einteilen, wobei die Hepatozyten, die am nächsten zu den versorgenden Gefäßen liegen, am besten mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden und daher in Zone 1 liegen. Gradienten entlang des Azinus beeinflussen den Metabolismus und die Genexpression der Hepatozyten (Gebhardt, 1992).

Die Leber besteht zu ca. 60 % aus parenchymalen Hepatozyten und zu ca. 40 % aus nicht-parenchymalen Zellen (Godoy *et al.*, 2013). Dazu gehören 15 % Kupffer-Zellen (die leberspezifischen Makrophagen), 20 % sinusoidale Endothelzellen sowie 5 % der bereits genannten Ito-Zellen. Der Großteil der metabolischen Leistung der Leber wird von den Hepatozyten durchgeführt. Ihre polare Morphologie ermöglicht die Gallenbildung an der apikalen Seite und gleichzeitig den Stoffaustausch mit dem Blut an der basolateralen Seite.

Die Kupffer-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort, da sie als Makrophagen schnell durch die Sekretion von Zytokinen auf entzündliche Signale reagieren können. Hauptsächlich endozytieren sie Fremdpartikel und bakterielle Endotoxine, die zu ihrer Aktivierung und so zur Produktion von Signalmolekülen und Signalwegsmodulatoren führen. Dazu gehören reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Zytokine, z. B. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 (Rose *et al.*, 2016).

In der Leber als dem zentralen Organ der Biotransformation werden aufgenommene Xenobiotika chemisch so modifiziert, dass sie ausgeschieden werden können. In zwei Phasen werden zunächst bestehende funktionelle Gruppen verändert oder funktionelle Gruppen eingefügt, über die anschließend eine Konjugation mit endogenen, stark wasserlöslichen Substanzen stattfinden kann. Schließlich können die modifizierten Xenobiotika abtransportiert und ausgeschieden werden. In Phase I finden Oxidations-, Reduktions- und Hydrolysereaktionen durch Vertreter der wichtigen Enzymklasse Cytochrom-P450 (CYP450) statt, wodurch

stark reaktive Intermediate entstehen. Wenn diese nicht in einer schnellen Phase II-Reaktion entgiftet werden, ist die Leber aufgrund ihrer zentralen Rolle bei der Biotransformation besonders anfällig für Schädigungen.

### 1.2 Chemikalien-induzierte Leberschädigung – DILI

Die Chemikalien-induzierte Leberschädigung, im angloamerikanischen Raum als *Drug-induced Liver Injury* (DILI) bekannt, ist die häufigste Ursache für die Marktrücknahme bereits zugelassener Medikamente, für einen frühen Abbruch klinischer Studien (Holt & Ju, 2006) sowie für akutes Leberversagen in Europa und den USA (Reuben *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2007). Häufig ist ein Metabolit für die schädigende Wirkung verantwortlich, weshalb die Leber als Hauptorgan des Fremdstoffmetabolismus als solches auch ein wichtiger Angriffspunkt für eine Substanz-induzierte Schädigung ist.

DILI wird in zwei Formen unterschieden: intrinsisch und idiosynkratisch. Bei der intrinsischen DILI handelt es sich um einen dosisabhängigen und damit vorhersagbaren Prozess. Das am besten bekannte Beispiel ist Paracetamol, dessen therapeutische Dosis bis 4 g pro Tag bei Erwachsenen reicht, das allerdings ab 7,5 bis 10 g hepatotoxisch wirkt (Jaeschke, 2015). Davon unterschieden wird die idiosynkratische DILI, die dosisunabhängig und damit nicht vorhersagbar auftritt. Ein Beispiel ist das Inhalationsanästhetikum Halothan. Die Überlebensrate für Patienten, die an der intrinsischen Form erkrankt sind, beträgt 80 % und ist damit deutlich besser als für jene mit der idiosynkratischen Form, die nur eine Überlebensrate von 28 % haben (Chun *et al.*, 2009). In Tierstudien werden DILI-verursachende Medikamente meist nicht erkannt, da die Ausstattung an Phase I- und Phase II-Enzymen zwischen Mensch und Tier nur begrenzt vergleichbar ist. Darüber hinaus treten DILI-Fälle mit einer Inzidenz von 1:10 000 bis 1:100 000 extrem selten auf (Stirnemann *et al.*, 2010), wodurch sie auch in klinischen Studien mit einer Teilnehmerzahl von 2 000 Patienten meist unerkannt bleiben (FDA, 2009). Dennoch stellen sie aufgrund der Vielzahl DILI-auslösender Arzneistoffe sowie der häufigen Verschreibung bestimmter Stoffe ein ernstzunehmendes Risiko dar. Symptome treten bei subtoxischen Dosen auf, teilweise auch erst nach mehrwöchiger Einnahme eines Medikaments. Die molekularen Mechanismen sind bislang nur unzureichend verstanden und untersucht worden. Fest steht, dass die Metabolisierung des Medikaments sowie die Aktivierung des Immunsystems an der Entstehung von DILI beteiligt sind.

Inzwischen konnten eine Reihe von Risikofaktoren identifiziert werden. Zu den nicht-genetischen Faktoren gehört u. a. das Alter, da Veränderungen der ADME-Parameter (Adsorption, Distribution, Metabolisierung und Elimination des Stoffs) zu einer gesteigerten

DILI-Empfindlichkeit führen. Weiterhin besitzen Frauen ein höheres Risiko, idiosynkratische DILI zu entwickeln als Männer, wie durch eine höhere Prävalenz in publizierten DILI-Studien gezeigt worden ist (Lucena *et al.*, 2009). Die Tagesdosis hat einen Einfluss, so dass bei Überschreiten einer bestimmten Schwellendosis das DILI-Risiko steigt (Reese *et al.*, 2011). Eine Langzeitstudie, die zwischen 1990 und 2002 durchgeführt wurde, zeigte, dass 81 % der Lebertransplantationen auf Substanzen mit einer Aufnahmemenge von 50 mg oder mehr pro Tag zurückzuführen waren (Lammert *et al.*, 2008; de Abajo *et al.*, 2004). Patienten, die 10 mg oder weniger eines Medikaments täglich nahmen, zeigten weniger oft idiosynkratische Leberschäden (Utrecht, 1999). Zu den genetischen Risikofaktoren gehören die Ausstattung an antioxidativer Stressabwehr, an Zytokinen und Komponenten des Immunsystems sowie an Phase I- und II-Enzymen. Diese können interindividuell stark schwanken und beeinflussen die Entstehung reaktiver Metabolite. Der Beitrag von Polymorphismen in CYP450-kodierenden Genen als Risikofaktor wird dabei kontrovers diskutiert (Houry *et al.*, 2015). Einerseits wurde für einzelne CYP450-Enzyme eine Korrelation mit Leberversagen gezeigt, z. B. für CYP2D6 bei Hepatotoxizität verschiedener pharmazeutischer Mittel, u. a. Antidepressiva (Maurer *et al.*, 2004), oder für CYP2C8 bei Diclofenac-induzierter Lebertoxizität (Daly *et al.*, 2007). Andererseits wurde in einer großen, spanischen Studie kein Zusammenhang festgestellt (Pachkoria *et al.*, 2007). Liegt bereits eine andere Krankheit vor, kann auch diese das Entstehen eines Leberschadens beeinflussen. Patienten mit chronischen Leberkrankheiten entwickeln nicht zwangsläufig DILI, besitzen allerdings ein höheres Risiko für komplizierte und negative Verläufe. Die Ursache dafür liegt u. a. in dem Einfluss weiterer Medikamente auf die Expression von metabolisierenden Enzymen und Transportern (Chen *et al.*, 2015). Auch der humane Leukozyten-Antigen (HLA)-Phänotyp korreliert mit der Wahrscheinlichkeit, DILI zu entwickeln (Daly *et al.*, 2009).

Bis heute ist DILI eine Ausschlussdiagnose, da es keinen spezifischen Test gibt und Patienten eine große Bandbreite an Symptomen zeigen (Licata, 2016). Sowohl im klinischen Erscheinungsbild als auch laborchemisch und histologisch können die Symptome einer akuten oder chronischen Lebererkrankung imitiert werden, u. a. Gelbsucht, akutes Leberversagen oder Hepatitis (Fontana, 2008). Die erhöhten Serumkonzentrationen der klassischen Leberenzyme wie Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST) sowie alkalische Phosphatase (ALP) um das Drei- bis Fünffache sind weitere grundlegende Indikatoren für eine allgemeine Leberschädigung (Björnsson *et al.*, 2013). Für eine korrekte DILI-Diagnose sind daher sowohl eine ausführliche Anamnese sowie gezielte Untersuchungen entscheidend. Als Therapiemaßnahmen sollte die auslösende Substanz sofort abgesetzt werden und Substanz-abhängig ggf. *N*-Acetylcystein zur Aufstockung des detoxifizierenden Glutathions intravenös injiziert werden (Lee *et al.*, 2011).

Die molekularen Mechanismen sind bis heute nur unzureichend verstanden. Ein vorgeschlagener Mechanismus ist in Abbildung 1 dargestellt, bei dem die Zellen geschädigt werden und es schließlich zur Aktivierung des Immunsystems kommt. Die bei der Biotransformation in der Leber entstehenden, reaktiven Intermediate können auf verschiedenen Wege hepatotoxisch wirken. Sie sind oft elektrophil und binden an DNA, Proteine oder Lipide (Tailor *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2011). Diese kovalenten Addukte können Autoimmunreaktionen auslösen, indem sie als Haptene zur Bildung von Autoantikörpern oder zur Aktivierung von zytotoxischen Immunzellen führen (Shaw *et al.*, 2010; Roth & Ganey, 2011). Als weiterer möglicher Mechanismus kann Zellstress direkt durch die reaktiven Metabolite verursacht werden, indem wichtige Entgiftungsfaktoren (z. B. Glutathion) oder ATP durch Entkopplung der Elektronentransportkette in den Mitochondrien aufgebraucht werden (Utrecht, 2010). Dies führt zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die intrazellulär an der Zellmembran, den Mitochondrien, den Peroxisomen und dem endoplasmatischen Retikulum gebildet werden können. Die Bildung von ROS ist ein wichtiger Mechanismus bei der Entstehung von DILI und führt zur Aktivierung mehrerer Signalkaskaden (Pessayre *et al.*, 2012). Der Hepatozyt wird geschädigt und setzt Signalmoleküle frei, sogenannte Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs), zu denen u. a. DNA, ATP, High-Mobility Group Box-1 Protein (HMGB1) und Hitzeschockproteine (HSPs) zählen (Martin-Murphy *et al.*, 2010). Diese werden auch von nicht-parenchymalen Zellen, u. a. den Kupfer-Zellen, über Pattern Recognition Receptors erkannt, aktivieren diese, induzieren die Transkription von Zytokinen und die Rekrutierung weiterer zytotoxischer Zellen, z. B. neutrophiler Granulozyten und Monozyten. Diese Beteiligung der Immunzellen führt zu einer sogenannten sterilen Entzündung, wodurch sich der ursprüngliche Schaden ausbreitet (Jaeschke *et al.*, 2012b). Die Porenöffnung in der inneren Mitochondrienmembran ermöglicht einen unkontrollierten Strom kleiner (<1,5 kDa) Moleküle, den mitochondrialen Permeabilitätsübergang (MPT) (Rusmann *et al.*, 2009; Halestrap, 2009). Es kommt zur ATP-Depletion und schließlich zur Nekrose (Jaeschke *et al.*, 2012a).

Mausstudien haben gezeigt, dass ein Chemikalien-induzierter Leberschaden nach vorheriger Depletion der Makrophagen deutlich geringer ausfällt (Michael *et al.*, 1999). Die Zellschäden und löslichen Stressmediatoren aktivieren die Kupfer-Zellen ähnlich wie sonst z. B. bakterielle Endotoxine, was schließlich zum apoptotischen Zelltod der Hepatozyten und nicht-parenchymalen Zellen führt (Rose *et al.*, 2016). Die Faktoren, die an diesen interzellulären Signalprozessen beteiligt sind, sind jedoch noch immer weitgehend ungeklärt.

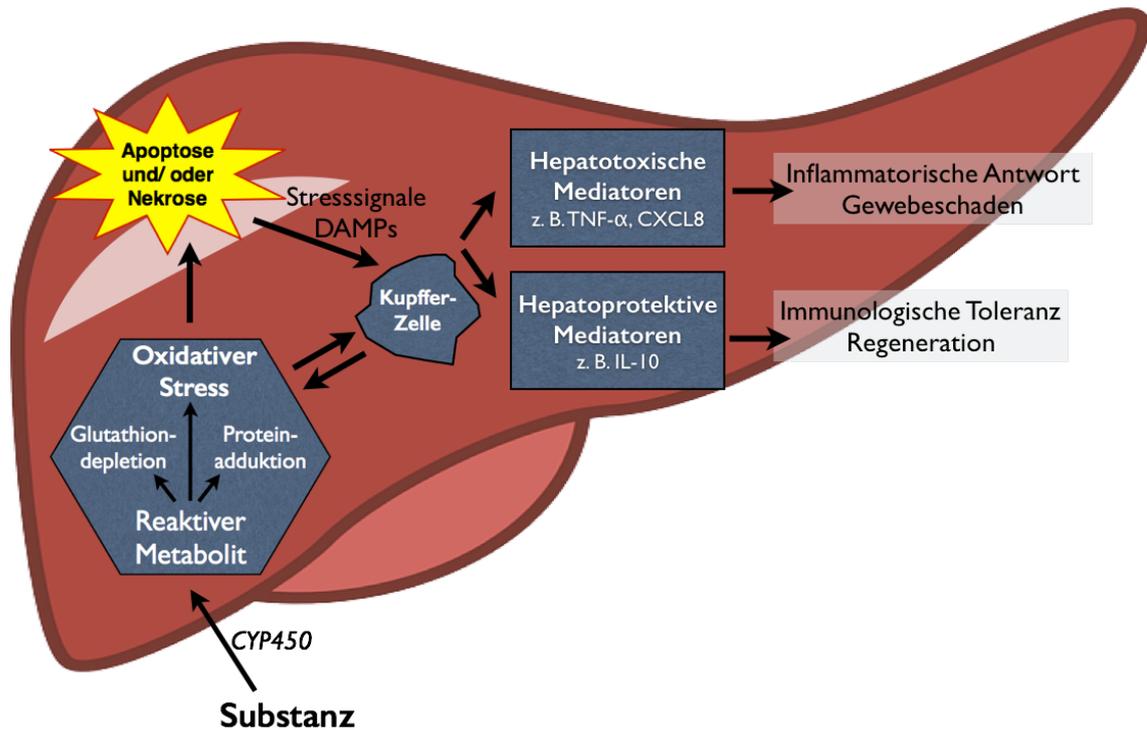


Abb. 1: Postulierter DILI-Mechanismus.

Nach Aufnahme wird die Substanz in den Hepatozyten metabolisiert. Die dabei entstehenden reaktiven Intermediate können durch unterschiedliche Mechanismen den Hepatozyten schädigen, u. a. durch oxidativen Stress. Die geschädigten Hepatozyten setzen Signalmoleküle frei, die weitere Zellen in der Leber aktivieren, auch die nicht-parenchymalen Kupfer-Zellen. Dadurch werden sowohl hepatotoxische als auch hepatoprotektive Zytokine sekretiert und weitere Immunzellen wie neutrophile Granulozyten und Monozyten in die Leber rekrutiert. Die Aktivierung der angeborenen Immunantwort führt zu einer sterilen Entzündung, die den ursprünglichen Schaden vergrößert und schließlich eine sich ausbreitende Nekrose verursachen kann (nach Holt & Ju, 2006, modifiziert).

Abkürzungen: CXC-Motiv-Chemokin 8 (CXCL8), Cytochrom-P450 Enzyme (CYPs), Damage-Associated Molecular Pattern (DAMP), Interleukin-10 (IL-10), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ).

Seit 2012 werden Informationen über mögliche Chemikalien-induzierte Leberschäden, die zugrunde liegenden Mechanismen (falls bekannt), ihre Folgen sowie belegte Fallbeispiele auf der Website LiverTox<sup>®</sup> (<http://livertox.nlm.nih.gov>) gesammelt und sind damit als hilfreiches Nachschlagewerk zugänglich. Inzwischen sind dort über 850 Substanzen aufgeführt, wobei zu den DILI-auslösenden Substanzen neben Medikamenten, meist Antibiotika, Analgetika oder nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAID), auch Nahrungsergänzungsmittel oder Heilkräuter zählen (Navarro *et al.*, 2014).

### 1.2.1 Ketoconazol

Für den Aufbau des hepatischen Kokulturmodells wurde Ketoconazol als bekannte DILI-auslösende Substanz gewählt (Gupta *et al.*, 2015). Ketoconazol wurde 1977 von Janssen Pharmaceutica als erstes Azol-Antimykotikum zur Behandlung von Pilzinfektionen vorgestellt und 1981 nach Genehmigung durch die US Food and Drug Administration (FDA) auf den Markt gebracht (Gupta *et al.*, 2015). Aufgrund seiner sehr guten Effizienz und oralen Absorption stellte es eine Alternative zu dem bis dahin verwendeten Amphotericin B gegen systemische Pilzinfektionen dar. Der Wirkmechanismus von Azolen basiert auf der Inhibition der Lanosterol-14- $\alpha$ -Demethylase, wodurch die Synthese des fungalen Zellwandbestandteils Ergosterol unterbrochen wird. Die Zellwandstruktur ändert sich, sie wird durchlässig und folglich werden sowohl Wachstum als auch Replikation des Pilzes gestört.

In der Leber wird Ketoconazol durch verschiedene Enzyme, u. a. CYP450-Enzyme und Flavin-abhängige Monooxygenasen, zu dem reaktiven *N*-Deacetyl-Ketoconazol (DAK) metabolisiert, das akkumuliert (Rodriguez & Miranda, 2000). Die auftretende Toxizität wird vermutlich durch Bindung an hepatische Proteine sowie durch Depletion des detoxifizierenden Glutathions initiiert. Auch aufgrund der sehr guten Regenerationsfähigkeit der Leber sind die lebertoxischen Effekte oft, aber nicht immer, reversibel. Aus diesem Grund sowie der geringen Exposition gegenüber oralem Ketoconazol (die FDA schätzt 609 000 Verschreibungen in den USA in 2013 (FDA, 2013)) und der daraus resultierenden geringen Inzidenz blieb Ketoconazol in Studien zur Lebertoxizität lange unerwähnt (Greenblatt, 2014). In den vergangenen Jahren vermehrten sich jedoch die Hinweise auf eine lebertoxische Wirkung (García Rodríguez *et al.*, 1999), so dass die Europäische Arzneimittel-Agentur (European Medicines Agency, EMA) 2013 eine Empfehlung veröffentlichte, in der das Nutzen-Risiko-Verhältnis bei oraler Gabe von Ketoconazol negativ bewertet wird (EMA, 2013). Auch die FDA warnt vor der Verabreichung von Ketoconazol und empfiehlt, auf Alternativen zurückzugreifen (FDA, 2013).

### 1.2.2 *Ortho*-Anisidin

Als weitere Substanz wurde *ortho*-Anisidin (*o*-Anisidin) untersucht, ein kanzerogenes, aromatisches Amin. Als chemisches Intermediat ist es ein Grundstoff in der Farbindustrie für die Herstellung von Azopigmenten, die in Kleidung, Kosmetika und Haarfarben verwendet werden. Der Nachweis von *o*-Anisidin im Urin bayerischer Kinder sowie als Hämoglobinaddukt im Blut zeigt die weite Verbreitung in der Bevölkerung (Branner *et al.*, 1998; Richter *et al.*, 2001). Der Pigmentabbau durch Bakterien kann zur Freisetzung von

*o*-Anisidin führen, das so über die Haut absorbiert werden kann (Platzek *et al.*, 2005). Eine orale Exposition ist durch die Einfärbung von Lebensmittelverpackungen möglich (McCall *et al.*, 2012) und als Bestandteil von Zigarettenrauch kann es eingeatmet werden (Stabbert *et al.*, 2003). Zusätzlich kann die Kontamination in Tattoofarben zu einer systemischen Exposition führen (Laux *et al.*, 2016). *o*-Anisidin wird in der Leber verstoffwechselt, bevor es als Karzinogen Tumore in der Blase auslöst. Während der Metabolisierung verbleibt es bei konstant hoher Dosis für mindestens 24 h in der Leber, bevor es langsam abtransportiert wird (Sapota *et al.*, 2003).

Die internationale Agentur für Krebsforschung (International Agency for Research on Cancer, IARC) hat *o*-Anisidin in Kategorie 2B eingestuft (possible human carcinogen), es ist also möglicherweise karzinogen für Menschen (IARC, 1999). Innerhalb der europäischen Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 für die Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung von Chemikalien (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals, REACH) wurde *o*-Anisidin als Karzinogen 1B (kann Krebs auslösen) und Mutagen 2 (steht unter Verdacht, genetische Defekte zu verursachen) und daher als besonders besorgniserregender Stoff (Substance of Very High Concern, SVHC) eingestuft. In den vergangenen Jahren zeigten mehrere epidemiologische Studien einen Zusammenhang zwischen der Entstehung von Blasenkrebs bei Frisören sowie Chemikararbeitern und einem häufigen Kontakt mit Azofarbstoffen (Gago-Dominguez *et al.*, 2001). Dabei besitzen Chemikararbeiter, die langsame Acetylierer sind, das ausgeprägteste Risiko für Blasenkrebs (Golka *et al.*, 2002). Die Acetylierung durch das Schlüsselenzym N-Acetyltransferase 2 (NAT2) ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt während der Biotransformation aromatischer Amine und damit während ihrer Detoxifizierung (d’Errico *et al.*, 1996).

In der Leber wird *o*-Anisidin von CYP450-Enzymen durch N-Hydroxylierung zu *N*-(2-methoxyphenyl)-hydroxylamin metabolisiert. Während der folgenden Phase II-Reaktionen können die Hydroxylamine durch Acetylierung, N-Glukuronidierung oder O-Sulfatierung detoxifiziert werden (Naiman *et al.*, 2012; d’Errico *et al.*, 1996). Aus den Metaboliten können hochreaktive Nitrenium- sowie Carbeniumionen entstehen, die in der Niere und Blase zur Bildung von ROS sowie von Addukten mit Deoxyguanosin und Proteinen führen können (Naiman *et al.*, 2012; Hobbs *et al.*, 2015; Vohr, 2012). *In-vitro*-Analysen haben gezeigt, dass *o*-Anisidin intrachromosomale Rekombinationen und Mutationen in Hefe, Bakterien und Zelllinien (aus den Eierstöcken von Hamstern und Mauslymphomen) induziert (Brennan & Schiestl, 1999; Zeiger, 1987; Galloway *et al.*, 1987; Garberg *et al.*, 1988; Wangenheim & Bolcsfoldi, 1988). Tierversuche zeigten einen Gewichtsverlust bei Mäusen und Ratten, DNA-Schäden in der Blase und einen früheren Tod (IARC, 1982, 1999; Sasaki *et al.*, 1998; National Toxicology Program, 1978a). Eine Korrelation zwischen der Entstehung idiosynkratischer DILI und Substanzen, die ein primäres aromatisches Amin enthalten,

wird vermutet (Ng & Uetrecht, 2013). Der genaue Mechanismus ist jedoch noch immer unklar und sollte daher für *o*-Anisidin genauer untersucht werden.

### 1.3 *In-vitro*-Testsysteme zur Detektion von hepatotoxischen Substanzen

Die präklinische Beurteilung der Sicherheitspharmakologie umfasst derzeit die Untersuchungen des kardiovaskulären Systems, der Atemwege und des zentralen Nervensystems, die in der internationalen regulatorischen Guideline ICH S7A/S7B (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) verankert sind (ICH Harmonized Tripartite Guideline, 2000, 2005). Eine explizite Betrachtung der Hepatotoxizität ist derzeit nicht regulatorisch vorgeschrieben, sondern wird von der EMA seit 2008 in einer Guideline empfohlen (EMA, 2008). Mit deren Hilfe sollen nicht-klinische Anzeichen für Hepatotoxizität identifiziert werden, um so die klinische Relevanz frühzeitig im Entwicklungsprozess einschätzen zu können. Für die Bewertung des DILI-Potentials einer neuen Substanz werden bis heute hauptsächlich Tierstudien durchgeführt, in denen histologische Analysen und die Bestimmung bestimmter Enzymkonzentrationen als Indikatoren für ein leberschädigendes Potential herangezogen werden. „Hy’s Law“ (nach Hyman Zimmermann) entsprechend müssen die ALT-, AST- und Gesamtbilirubin-Konzentrationen im Blut bei Leberschädigung um ein Vielfaches überschritten sein (Temple, 2006). Die Konzentrationen weiterer leberrelevanter Proteine, z. B. Albumin, Triglyceride oder Prothrombin, können als zusätzliche Indikatoren hinzugezogen werden.

Die in Tierstudien erhobenen Daten geben jedoch keine zuverlässige Information über ein mögliches DILI-Potential, da es deutliche Speziesunterschiede zum Menschen in Bezug auf die Metabolisierung und die Pharmakokinetik von Substanzen gibt. Aus diesem Grund und in Anlehnung an das 3R-Prinzip von Russell und Burch – Reduce (Reduzieren), Replace (Ersetzen), Refine (Verfeinern) -, das Maßnahmen zur Reduktion von Tierversuchen beschreibt (Russell & Burch, 1959), werden derzeit verschiedene *in-vitro*-Ansätze entwickelt.

In der frühen Entwicklungsphase neuer Medikamente wird die Entstehung reaktiver Metabolite und damit die Adduktbildung mit *in-silico*- und *in-vitro*-Assays untersucht (Prakash *et al.*, 2008; Valerio & Long, 2010). Meist wird die kovalente Bindung der reaktiven Intermediate an Leberproteine gemessen, ihre chemische Struktur analysiert oder eine mögliche CYP450-Inaktivierung betrachtet. So können auffällige Substanzen früh im Entwicklungsprozess ausgeschlossen werden und Analoga mit geringerer Neigung zur Bioaktivierung

generiert werden. Anschließend soll anhand von Einzelkulturen humaner primärer Hepatozyten oder anhand von Leberschnitten, sogenannten *precision-cut liver slices*, ein mögliches leberschädigendes Potential identifiziert werden. Der Vorteil ist die sehr gute Metabolisierung, da alle Phase I- und II-Enzyme vorhanden sind. Allerdings ist primäres Lebergewebe eine begrenzte Ressource, deren Eigenschaften stark spenderabhängig sind (Gómez-Lechón *et al.*, 2015). Daher wird auf immortalisierte, humane Zelllinien zurückgegriffen, die unbegrenzt verfügbar sind und bestimmte leberspezifische Enzyme exprimieren. Allerdings besitzen diese Zelllinien, auch die am weitesten verbreiteten HepG2-Zellen, eine sehr unterschiedliche CYP450-Enzymausstattung (Hewitt & Hewitt, 2004). Einige haben den Großteil der metabolisierenden Enzyme verloren, weshalb sie für eine erfolgreiche Substanzumsetzung zum Teil mit den benötigten Enzymen transfiziert oder mit Mikrosomen bzw. S9-Mix kombiniert werden (Choi *et al.*, 2015; Vignati *et al.*, 2005). Auch die Differenzierung von Hepatozyten aus Stammzellen, embryonalen oder induzierten pluripotenten, wird verfolgt und könnte eines Tages eine verlässliche Quelle für Zellen mit hepatischen Eigenschaften sein (Kondo *et al.*, 2014; Si-Tayeb *et al.*, 2010). Diese Einzelkulturen berücksichtigen allerdings nicht die Wechselwirkungen mit anderen Zelltypen, besonders Immunzellen, die oft zu einer Vergrößerung des ursprünglichen Leberschadens führen.

Für DILI konnte gezeigt werden, dass die von Kupffer-Zellen freigesetzten Zytokine und Chemokine die Metabolisierung durch die Hepatozyten beeinflussen und die Expression Akuter-Phase-Proteine induzieren, z. B. des C-reaktiven Proteins. Gleichzeitig unterdrücken sie Enzyme, die zur Ausscheidung von Xenobiotika und deren Metaboliten nötig sind, u. a. Uridin-5-Diphospho-Glucuronosyl-Transferase-Systeme sowie Aufnahme- und Effluxtransporter (Hoebe *et al.*, 2001; Morgan, 2009).

Diese dynamischen und komplexen zellulären Wechselwirkungen werden in Einzelkulturen nicht abgebildet. Daher werden neue Testsysteme benötigt, die die derzeit genutzten reinen Hepatozytenkulturen bei der Identifizierung der möglichen Hepatotoxizität einer neuen Substanz so früh wie möglich ergänzen. In dem hier entwickelten Kokulturmodell wird der gegenseitige Einfluss durch den Austausch von löslichen Faktoren von Hepatozyten und Immunzellen untersucht und dadurch die *in-vivo*-Bedingungen besser nachgestellt.

## 2 Zielstellung der Arbeit

Die Chemikalien-induzierte Leberschädigung (DILI) ist aufgrund ihrer geringen Prädiktivität und des schweren Verlaufs eine der häufigsten Ursachen für den Abbruch klinischer Studien und die Marktrücknahme bereits zugelassener Wirkstoffe. Daher werden dringend neue Testsysteme benötigt, anhand derer potentiell hepatotoxische Substanzen identifiziert und lebertoxische Reaktionen vorhergesagt werden können. Die vermehrten Hinweise in den letzten Jahren zeigen, dass die Aktivierung des Immunsystems auch bei nicht akut toxischen Konzentrationen zu schweren Leberschädigungen bis hin zum Leberversagen führen kann. Die bei dieser sterilen Entzündung wichtige Wechselwirkung der verschiedenen Zellpopulationen in der Leber ist derzeit noch unzureichend untersucht und wird in aktuellen Testsystemen nicht berücksichtigt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ein indirektes *in-vitro*-Kokultursystem unter Verwendung humaner Leberzelllinien sowie einer humanen Monozytenzelllinie, die in einen Makrophagen-ähnlichen Phänotyp differenziert wurde, zu entwickeln. Anhand dieses Modells sollte getestet werden, ob die Zellkommunikation von Leber- und Immunzellen durch den Austausch löslicher Faktoren zu einer verbesserten Prädiktion von Hepatotoxizität führt. Es sollten spezifische Endpunkte zur Erfassung der Toxizität untersucht und erfasst werden. Dafür wurde die für seltene, schwere Leberschäden bekannte Testsubstanz Ketoconazol verwendet sowie als negative Kontrollsubstanz Koffein. Zunächst sollte eine erfolgreiche Metabolisierung sicher gestellt werden, bevor mithilfe proteomischer Analysen Veränderungen wichtiger Signalwege in kokultivierten Zellen analysiert und mit Einzelkulturen verglichen werden sollten. In gezielten Ansätzen sollten die veränderten Signalwege genauer untersucht werden. Aus der Literatur bekannte, *in vivo* relevante Zytokine sollten anschließend auf ihre Expression und Sekretion in Einzel- und Kokulturen getestet werden, um prognostische Marker für adverse Effekte zu identifizieren. Die identifizierten Endpunkte sollten für das verbraucherrelevante, aromatische Amin *o*-Anisidin, das u. a. in Tattoofarben enthalten sein kann, getestet werden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Characterization of chemical-induced sterile inflammation *in vitro*: application of the model compound ketoconazole in a human hepatic co-culture system

Franziska Wewering, Florent Jouy, Dirk K. Wissenbach, Scarlett Gebauer, Matthias Blüher, Rolf Gebhardt, Ralph Pirow, Martin von Bergen, Stefan Kalkhof, Andreas Luch, Sebastian Zellmer

Archives of Toxicology, 2017, 91:799–810. Epub 2016 Mar 10.

DOI:10.1007/s00204-016-1686-y.

Link: <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-016-1686-y>

In dieser Publikation wurde das neu etablierte *in-vitro*-Kokulturmodell vorgestellt und anhand dieses Modells die Auswirkungen einer Ketoconazol-Behandlung untersucht. Hierfür wurden HepG2-Zellen mit THP-1-Zellen, die in einen Makrophagen-ähnlichen Phänotyp differenziert wurden, indirekt kombiniert, so dass ein Austausch löslicher Faktoren erfolgte. Dabei konnte eine Metabolisierung von Ketoconazol durch die hepatische Zelllinie gezeigt und sieben Metabolite detektiert werden. In globalen Proteom-Analysen wurden neben dem bereits beschriebenen Cholesterol-Signalweg auch eine Aktivierung der Nrf2-vermittelten oxidativen Stressantwort sowie des CXCL8-Signalwegs (CXC-Motiv-Chemokine 8, früher auch Interleukin-8) nach Ketoconazol-Behandlung in Kokulturen identifiziert. In gezielten Ansätzen konnte gezeigt werden, dass Ketoconazol durch Schädigung der Mitochondrien zur Freisetzung von ROS führt. Auf Zytokinebene konnten sowohl die hochregulierte Expression wichtiger proinflammatorischer Zytokine, u. a. TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , als auch ihre gesteigerte Sekretion in behandelten Ko-, aber nicht in Einzelkulturen nachgewiesen werden. In Kontrollversuchen einzel- und kokultivierter HepG2-Zellen mit und ohne Ketoconazol setzten behandelte, kokultivierte Zellen konzentrationsabhängig signifikant mehr CXCL8 frei als einzelkultivierte.

Anteil des Autors an dieser Publikation: Projektplanung (70 %), Projektdurchführung (80 %), Datenanalyse (90 %), Schreiben des Manuskripts (70 %)

Das Zusatzmaterial zu der auf den folgenden Seiten eingebundenen Publikation ist in Appendix A enthalten.

### **3.2 Hepatic co-cultures *in vitro* reveal suitable to detect Nrf2-mediated oxidative stress responses on the bladder carcinogen *o*-anisidine**

Franziska Wewering, Florent Jouy, Martin von Bergen, Stefan Kalkhof, Andreas Luch, Sebastian Zellmer

Toxicology in Vitro, 2017, 40:153–160.

DOI:10.1016/j.tiv.2017.01.006.

Link: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.01.006>

In dieser Publikation wurde in dem neu etablierten Kokulturmodell das verbraucherrelevante, aromatische Amin *o*-Anisidin untersucht und mit seinem Strukturisomer *p*-Anisidin verglichen. Zusätzlich wurde die hepatische Zelllinie Huh-7 als mögliche Alternative zu den HepG2-Zellen in dem Kokulturmodell getestet. Mithilfe globaler Proteom-Analysen wurde die Aktivierung antioxidativer Stressantworten nach *o*-Anisidin-Behandlung detektiert. Dies wurde in gezielten Experimenten durch eine gesteigerte ROS-Freisetzung durch *o*-, aber nicht *p*-Anisidin bestätigt. Als zugrunde liegender Mechanismus wurde eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials bereits nach dreistündiger *o*-Anisidin-Inkubation gezeigt, die nach 24 h zu einer Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration führte. Während *o*-Anisidin in kokultivierten HepG2-Zellen keine veränderte Zytokinexpression induzierte, führte es bereits in einzelkultivierten Huh-7-Zellen zu einer deutlich gesteigerten Expression proinflammatorischer Zytokine. Die Sekretion des Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) HMGB1 war nach *o*-Anisidin Behandlung in HepG2- und Huh-7-Zellen deutlich erhöht. Hier zeigte sich, dass *o*-Anisidin in der Leber über oxidativen Stress zu Schädigungen führt, die allerdings nicht auf einem immunvermittelten Mechanismus beruhen.

Anteil des Autors an dieser Publikation: Projektplanung (80%), Projektdurchführung (80%), Datenanalyse (80%), Schreiben des Manuskripts (85%)

Das Zusatzmaterial zu der auf den folgenden Seiten eingebundenen Publikation ist in Appendix B enthalten.

## 4 Diskussion

### 4.1 Etablierung des Kokulturmodells für die Detektion von DILI *in vitro*

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit ein *in-vitro*-Kokulturmodell eine verbesserte Vorhersage von *in-vivo*-Lebertoxizität ermöglicht. In einem ersten Schritt sollte daher dieses Modell mithilfe einer bekannten, leberschädigenden Substanz, dem Antimykotikum Ketoconazol, etabliert und charakterisiert werden. Anhand dieses Modells sollten die Zytokinfreisetzung und mögliche zugrunde liegende Signalwege identifiziert und näher untersucht werden. Nach erfolgreicher Identifizierung von Endpunkten sollten in einem zweiten Schritt weitere Substanzen auf ihre mögliche Lebertoxizität und deren Mechanismus untersucht werden.

Für die Entstehung von DILI gibt es vermehrt Hinweise auf eine Beteiligung des Immunsystems (Holt & Ju, 2006; Jaeschke *et al.*, 2012b). Dennoch wird die Lebertoxizität bis heute hauptsächlich an reinen Hepatozytenkulturen oder in Tierstudien untersucht. Dabei werden jedoch die komplexen Wechselwirkungen verschiedener Zelltypen in der Leber miteinander nicht berücksichtigt. Oft verwendete humane Zelllinien sind hierbei HepG2- und Huh-7-Zellen, die aus hepatozellulären Karzinomen isoliert wurden (Aden *et al.*, 1979; Nakabayashi *et al.*, 1982). In der vorliegenden Arbeit wurden daher die bekannten Leberzelllinien mit einer humanen Immunzelllinie kombiniert. Dafür wurde die aus einem Leukämiepatienten isolierte Monozytenzelllinie THP-1 in einen Makrophagen-ähnlichen Phänotyp differenziert. Sie repräsentiert daher sowohl die Kupffer-Zellen (die leberständigen Makrophagen) als auch einwandernde Makrophagen in der Leber. Zelllinien haben den Vorteil einer leichteren Handhabung, woraus eine bessere Übertragbarkeit des Modells in weitere Labore resultiert.

Am Beispiel des bekannten leberschädigenden Antimykotikums Ketoconazol wurde das Kokultursystem aufgebaut und neue Endpunkte identifiziert. So konnten *in vivo* beschriebene Mechanismen nachvollzogen und wichtige Signalmoleküle auch *in vitro* in der Kokultur detektiert werden. Der Marker HMGB1 wurde als wichtiges Signalmolekül und mögli-

cher neuer prognostischer Biomarker in behandelten *in-vitro*-Kokulturen detektiert. Im Anschluss wurden weitere Substanzen in diesem Kokultursystem auf ihr hepatotoxisches Potential untersucht – *o*- und *p*-Anisidin sowie Koffein.

#### 4.1.1 Untersuchung des DILI-induzierenden Antimykotikums Ketoconazol

Nachdem die leberschädigende Wirkung des Antimykotikums Ketoconazol in mehreren epidemiologischen Studien erkannt worden war (García Rodríguez *et al.*, 1999), wurde es in den letzten Jahren stärker gezielt *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Ketoconazol wurde durch die hepatische HepG2-Zelllinie auch *in vitro* erfolgreich verstoffwechselt. Dabei konnten im Mediumüberstand und in den Zellen sieben Metabolite identifiziert werden. Bei einem handelte es sich um den bereits beschriebenen reaktiven Metabolit *N*-Deacetyl-Ketoconazol (DAK) (Fitch *et al.*, 2009; Rodriguez & Acosta, 1997a), während die Metabolite DAK-OH, DAK-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> und KTZ-O-N-O bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden sind. Ein vorgeschlagener metabolischer Abbauweg in HepG2-Zellen ist in Abbildung S2 in Anhang A dargestellt (Seite 84). In der Leber wird Ketoconazol durch Oxidation, Spaltung der Imidazol- und Piperazinringe, O-Dealkylierung und aromatische Hydroxylierung verstoffwechselt. Die Reaktionen werden von Cytochrom-P450 (CYP450)-Enzymen und Flavin-abhängigen Monooxygenasen (FMO) katalysiert (Rodriguez *et al.*, 1999). Der durch Abspaltung der Acetylgruppe entstehende Hauptmetabolit DAK akkumuliert in der Leber und ist hauptsächlich für die toxische Wirkung von Ketoconazol verantwortlich (Rodriguez & Acosta, 1997a). Er kann durch FMOs zu weiteren reaktiven Metaboliten oxidiert werden (Rodriguez & Miranda, 2000). Hinsichtlich der Zytotoxizität lag der EC<sub>50</sub>-Wert für DAK auch in den hier verwendeten humanen HepG2-Zellen weitaus niedriger als der für Ketoconazol, was auch an primären Rattenhepatozyten gezeigt worden ist (Rodriguez & Acosta, 1997b).

Ketoconazol und seine Metabolite induzierten die Bildung von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und führten in der Kokultur zu Veränderungen von mehreren Signalwegen, u. a. des Nrf2-, CXCL8- und NFκB-Wegs. Deren Aktivierung führte in Folge zu einer induzierten Expression und Sekretion mehrerer Zytokine.

Als Teil der antioxidativen Stressantwort soll der aktivierte Nrf2-Signalweg die Zelle vor Schäden durch ROS schützen. Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) reguliert die Expression von Genen, die an der Metabolisierung, dem Transport sowie der Immunantwort beteiligt sind (Reese *et al.*, 2011). Die Deletion von Nrf2 führt im Mausmodell nach Behandlung mit DILI-induzierenden Substanzen zu einer gesteigerten Sensitivität (Liu *et al.*, 2013, 2010). Darüber hinaus wurde die starke Aktivierung des Nrf2-Signalwegs in

primären humanen Hepatozyten in einer Untersuchung von 90 leberschädigenden Substanzen gezeigt, darunter auch Ketoconazol (Herpers *et al.*, 2016). Eine Korrelation zwischen einer aktivierten Nrf2-Genexpression und einer möglichen Hepatotoxizität wird derzeit diskutiert (Reese *et al.*, 2011).

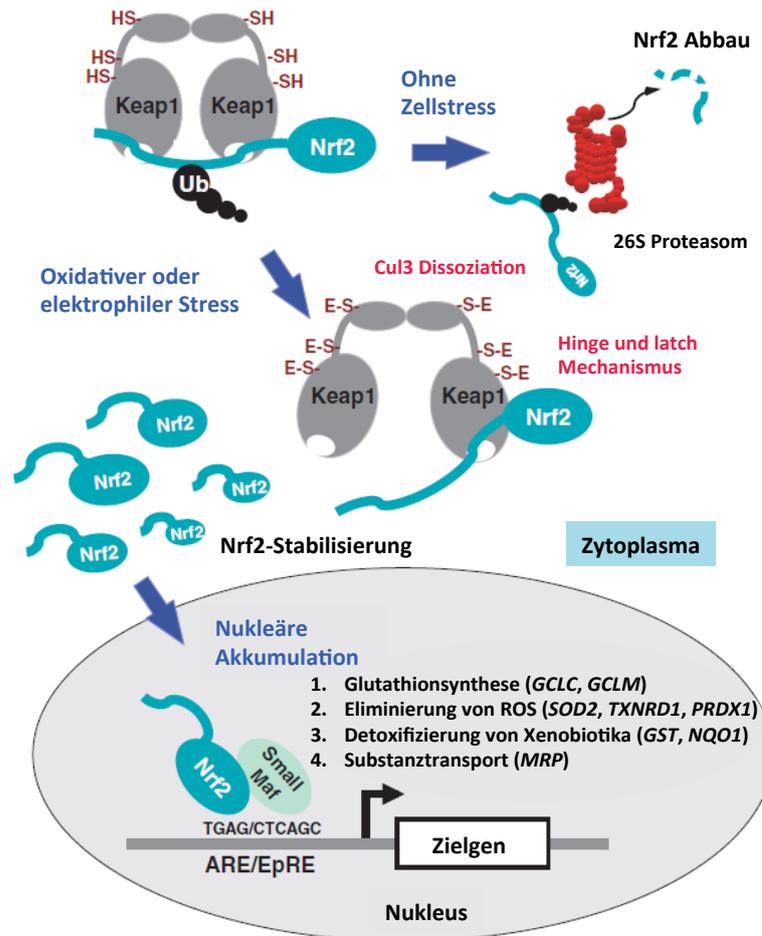


Abb. 2: Der Nrf2-Signalweg.

Der Transkriptionsfaktor Nrf2 spielt eine zentrale Rolle bei der induzierbaren Expression zytoprotektiver Gene als Antwort auf oxidativen und elektrophilen Stress. Unter stressfreien Bedingungen liegt Nrf2 im Zytoplasma gebunden an das ubiquitinylierende Protein Keap1 vor und wird konstant über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut. Bei oxidativem oder elektrophilem Stress wird Keap1 inaktiviert und Nrf2 stabilisiert. Nrf2 translokiert in den Zellkern, bindet an spezifische DNA-Motive (ARE) und führt so zur Transkription von Zielgenen. Diese können u. a. an der Glutathionsynthese, ROS-Eliminierung, Detoxifizierung und dem Substanztransport beteiligt sein (nach Taguchi *et al.*, 2011, modifiziert).  
Abkürzungen: Antioxidative Response Elements (ARE), kelchähnliches ECH-assoziiertes Protein 1 (Keap1), Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2).

Normalerweise liegt Nrf2 im Zytoplasma gebunden an sein ubiquitylierendes kelchähnliches ECH-assoziiertes Protein 1 (Keap1) inaktiv vor (siehe Abbildung 2). Bei Aktivierung der antioxidativen Stressantwort dissoziiert Nrf2 von Keap1, translokiert in den Zellkern, bindet dort an spezifische DNA-Motive (sogenannte Antioxidative Response Elements, ARE) und aktiviert die Transkription antioxidativer Enzyme (Tsuji *et al.*, 2012). In dem etablierten Modell waren mehrere Proteine, die Teil dieses Signalwegs sind, signifikant erhöht, u. a. die mitochondriale Superoxid-Dismutase 2 (SOD2). SOD2 katalysiert die Umwandlung des Superoxidanions ( $O_2^-$ ) in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Das Wasserstoffperoxid wird mithilfe des Enzyms Katalase weiter zu Sauerstoff und Wasser umgesetzt. Daher führt SOD2 zum Abbau reaktiver Sauerstoffspezies und schützt die Zelle vor direkten oxidativen Schäden. In gezielten Experimenten konnte eine konzentrationsabhängige Ketoconazol-induzierte ROS-Entstehung nachgewiesen werden. Diese ist ein zentraler Schritt bei der Entstehung von DILI.

Neben Nrf2- war der CXCL8-Signalweg ein weiterer, nach Behandlung aktivierter Signalweg in dem Kokulturmodell. Als Bestandteil der Entzündungsantwort induziert er die Chemotaxis von Immunzellen, z. B. Makrophagen und Neutrophilen, und lockt diese zum Ort des Entzündungsgeschehens (Baggiolini & Clark-Lewis, 1992). In gezielten qPCR- und ELISA-Versuchen konnte gezeigt werden, dass in kokultivierten, behandelten HepG2-Zellen CXCL8 verstärkt exprimiert und auch sezerniert wird. *In vivo* wurden im Serum von Patienten mit chronischer Leberentzündung und in DILI-Patienten signifikant erhöhte CXCL8-Level nachgewiesen (Zimmermann *et al.*, 2011; Steuerwald *et al.*, 2013). Auch Hepatozyten sind eine wichtige Quelle für Chemokine wie CXCL8, was u. a. von Wanninger *et al.* (2009) nach Adiponectin-Behandlung an primären humanen Hepatozyten gezeigt wurde. In gesunden Patienten wird die CXCL8-Konzentration bei zellulärem Stress oder durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IL-1 schnell um das 10- bis 100-fache erhöht (Hoffmann *et al.*, 2002). Diese Zytokine induzieren auch CD54 (auch als Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1, bezeichnet), das Teil des CXCL8-Signalwegs ist (Mickelson *et al.*, 1995; Roebuck & Finnegan, 1999). CD54 war in dem Kokulturmodell nach Behandlung mit 10  $\mu$ M Ketoconazol signifikant erhöht, wie die Auswertung der proteomischen Daten und der Zytokinarrays zeigte. Dieses Glykoprotein wird als Ligand von endothelialen Zellen oder Zellen des Immunsystems exprimiert und ermöglicht die Transmigration von Zellen in das Gewebe. Die von CXCL8 chemotaktisch angelockten Immunzellen infiltrieren den Entzündungsort und können zu einer Ausweitung des ursprünglichen Schadens führen. Die Transkription von CXCL8 wird u. a. von dem NF $\kappa$ B-Signalweg gesteuert, der in den behandelten Kokulturen eine veränderte Proteinexpression im Vergleich mit den Einzelkulturen aufwies.

Der NF $\kappa$ B-Signalweg umfasst mehrere Transkriptionsfaktoren, die für die Übertragung von Signalen, wie etwa Zytokinen, oxidativem Stress und bestimmten chemischen Substanzen, entscheidend sind. Dadurch werden Prozesse wie die Immun- und Entzündungsantwort, aber auch Apoptose, reguliert. Die in der Proteom-Analyse detektierten Veränderungen in den mit 10  $\mu$ M Ketoconazol inkubierten Kokulturen wurden in gezielten qPCR Versuchen näher untersucht. Mehrere Proteine des Signalwegs waren hochreguliert, z. B. der Toll-ähnliche Rezeptor 4 (Toll-like receptor 4, TLR4), der TNF Rezeptor-assoziierte Faktor 1 (Traf1) und der Colony Stimulating Factor 2 (CSF2). Der TLR4-Rezeptor wird u. a. durch Bindung von Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) aktiviert und löst so eine inflammatorische Immunantwort aus (Hoque *et al.*, 2013). In Kombination mit TLR6 führt TLR4 zur Freisetzung der Zytokine CXCL1, CXCL2 und CCL9 (Estruch *et al.*, 2013), die Zellen des Immunsystems zum Entzündungsort anlocken.

Darüber hinaus induziert das hochregulierte Zytokin CSF2 die Produktion, Differenzierung und Aktivierung von Granulozyten und Makrophagen und ist als solches ebenfalls an einer inflammatorischen Antwort beteiligt. Andere Proteine des NF $\kappa$ B-Signalwegs zeigten in der behandelten Kokultur jedoch eine verringerte Konzentration, u. a. die Stickstoffmonoxid-Synthase 2 (Nitric Oxide Synthase 2, NOS2), TLR2 und Akt1. NOS2 ist als Synthase an der Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) beteiligt, einem Signalmolekül im Körper für eine Vielzahl von Prozessen, z. B. der Gefäßdilatation, Neurotransmission oder antimikrobieller Aktivitäten (Guo *et al.*, 1995). In der Leber kann es sowohl zytotoxisch als auch zytoprotektiv wirken: bei Redoxstress verstärkt NO den hepatischen Schaden, während es unter akuten inflammatorischen Bedingungen die Apoptose in der Leber verhindert (Culotta & Koshland, 1992; Li & Billiar, 1999). Diese liegen im Kokulturmodell vor, allerdings deutet die verminderte Konzentration von NOS2 auf das Fehlen des vor dem Zelltod schützenden Faktors NO hin. Der ursprüngliche Leberschaden kann dadurch vergrößert werden (Min Hon *et al.*, 2002). Darauf weist auch die verminderte Konzentration des zweiten Proteins, Akt1, hin. Dabei handelt es sich um eine Serin-Threonin-Kinase, die am Überleben der Zelle, am Insulin-Signalweg und der Angiogenese beteiligt ist (Gonzalez & McGraw, 2009). Für den NF $\kappa$ B-Signalweg wurde im Zusammenhang mit DILI allerdings auch eine negative Korrelation in Bezug auf den Nrf2-Signalweg gezeigt. Ketoconazol führte in primären humanen Hepatozyten zu einer Nrf2-Aktivierung und einer NF $\kappa$ B-Inhibition (Herpers *et al.*, 2016). Umgekehrt beeinflusste die NF $\kappa$ B-Aktivierung jedoch nicht den Nrf2-Signalweg.

Als Folge der aktivierten Signalwege veränderte sich die Genexpression und Sekretion mehrerer Zytokine nach Behandlung mit Ketoconazol in dem Kokulturmodell, wie mithilfe von qPCR und ELISAs nachgewiesen werden konnte. So waren CXCL8, TNF- $\alpha$ , IL-10, CD54, IL-1 $\beta$ , IL-12A, IL-15, CCL3 (auch: Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ ) und CCL5 hochreguliert, während IL-5 runterreguliert wurde. Mithilfe eines *Proteome*

*Profiler Arrays* konnte im Mediumüberstand die gesteigerte Sekretion von CXCL8, TNF- $\alpha$ , CCL3 und CD54 bestätigt und darüber hinaus ein Anstieg bei MIF, GM-CSF, IL-1 $\alpha$  und Serpin E1 gezeigt werden. Die Wechselwirkungen der wichtigsten Zytokine und ihre Hauptfunktion sind zur besseren Veranschaulichung in Abbildung 3 dargestellt.

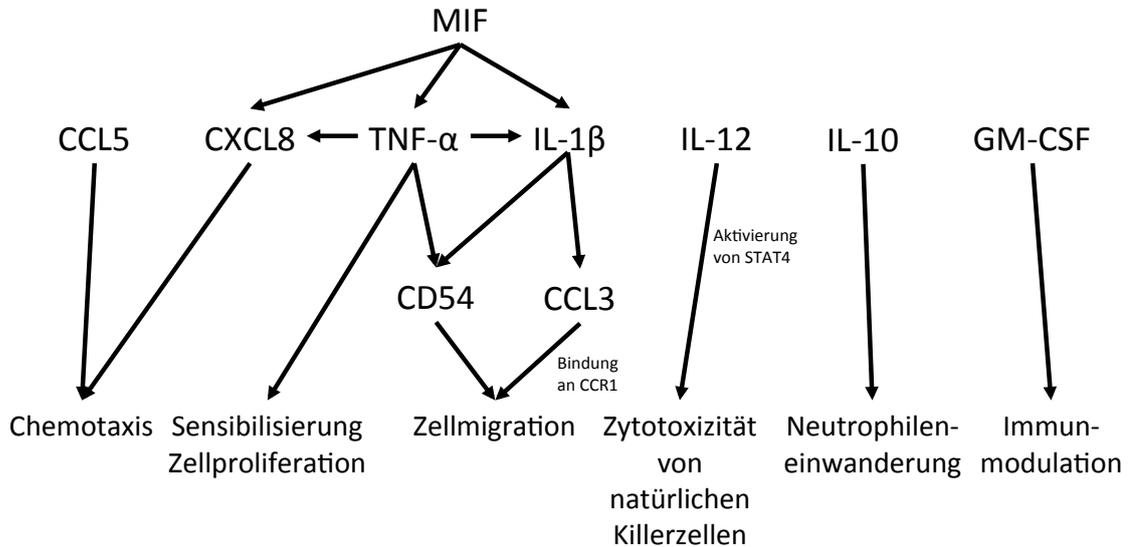


Abb. 3: Wechselwirkungen und Funktionen der in der Kokultur induzierten Zytokine.

In den mit Ketoconazol behandelten Kokulturen konnte mit qPCR- und ELISA-Analysen die veränderte Expression mehrerer Zytokine nachgewiesen werden. MIF induziert die Expression der drei wichtigen proinflammatorischen Zytokine CXCL8, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . CXCL8 und CCL5 sind wichtige chemotaktische Faktoren, während TNF- $\alpha$  weitere Zytokine induziert, z. B. CXCL8 und, genau wie IL-1 $\beta$ , CD54. Dieses kann, genau wie das ebenfalls durch IL-1 $\beta$  induzierte CCL3, zur Migration von Immunzellen in entzündetes Gewebe führen. Das ebenfalls detektierte IL-12 führt nach Aktivierung von STAT4 zur Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen. IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin und induziert die Neutrophilen-Einwanderung. Das nachgewiesene GM-CSF ist ein Immunmodulator.

Abkürzungen: CC-Chemokin Ligand 5 (CCL5), CC-Chemokin Rezeptor Typ 1 (CCR1), CXC-Motiv-Chemokin 8 (CXCL8), Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), Interleukin-10/12/1 $\beta$  (IL-10/12/1 $\beta$ ), Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor (MIF), Signal Transducer and Activator of Transcription 4 (STAT4), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ).

Bezüglich der *in-vivo*-Relevanz der nachgewiesenen Zytokine gibt es eine Vielzahl von Patienten- und Tierstudien in der Literatur. Die Konzentration des wichtigen Chemokins CXCL8 ist nach Acetaminophen (APAP)-Behandlung genauso erhöht wie die der weiteren proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Blazka *et al.*, 1995). Die erhöhte Expression dieser drei Zytokine kann durch den in behandelten Kokulturen verstärkt freigesetzten Makrophagen-migrationsinhibierenden Faktor (MIF) induziert werden, der

auch zu den proinflammatorischen Zytokinen gehört (Masson *et al.*, 2010; Baugh & Bucala, 2002; Lue *et al.*, 2002). Seine genaue Rolle bei DILI ist noch unklar, aber MIF war in Mausversuchen nach APAP- und Halothan-Behandlung erhöht (Barnes *et al.*, 2013). MIF-Knockout-Mäuse zeigten hingegen geringere Leberschäden und eine verbesserte Überlebensrate nach APAP-Behandlung im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen (Bourdi *et al.*, 2002). Daher scheint MIF ein wichtiger und früher Marker für Leberschäden zu sein (Barnes *et al.*, 2013).

Die TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Freisetzung findet sehr früh bei Leberschädigung statt (Duque & Descoteaux, 2014; Masson *et al.*, 2010). In Mäusen konnte ihre Sekretion nach APAP-Behandlung bereits nach 1 h nachgewiesen werden (Martin-Murphy *et al.*, 2010; Blazka *et al.*, 1996). Der Beitrag von TNF- $\alpha$  zu DILI wird allerdings kontrovers diskutiert. In Mäusen führte TNF- $\alpha$  bei der Tetrachlormethan (CCl<sub>4</sub>)-induzierten Leberschädigung einerseits zu einer Steigerung der Suszeptibilität (Morio *et al.*, 2001), unterstützte laut einer anderen Studie von Yamada und Fausto aber die Leberregeneration und besaß daher eine protektive Rolle (1998). Daher fördert TNF- $\alpha$  auf der einen Seite die Zellproliferation und damit die Reparatur von Zellschäden. Auf der anderen Seite ist es ein proinflammatorisches Zytokin, das direkt zytotoxisch auf Hepatozyten wirken kann (Diehl & Rai, 1996). Zusätzlich sensibilisiert es Leberzellen für DILI sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Cosgrove *et al.*, 2009; Hervers *et al.*, 2016) und induziert die Freisetzung anderer Zytokine, u. a. IL-1, CXCL8 oder CD54 (Diehl, 2000; Kaplowitz & Tsukamoto, 1996). CD54 wird auch durch das ebenfalls verstärkt exprimierte IL-1 $\beta$  induziert. Die erhöhte IL-1 $\beta$ -Expression kann zu mehreren Downstream-Effekten führen, z. B. einer verstärkten Expression von CCL3 (Lu *et al.*, 2003). Dieses induziert durch Bindung an den CCR1-Rezeptor die Zellmigration, die eine wichtige Voraussetzung für die Einwanderung von Monozyten bei DILI ist (Yuan *et al.*, 2010). IL-1 $\beta$ s verstärkte Expression wurde gemeinsam mit dem in behandelten Kokulturen ebenfalls erhöht exprimierten Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) nach Behandlung mit Ketoconazol bereits an Leberschnitten aus der Maus gezeigt (Hadi *et al.*, 2012).

GM-CSF ist ein Immunmodulator, der zirkulierende Leukozyten auf unterschiedliche Art und Weise beeinflussen kann (Shi *et al.*, 2006). Über den parakrinen Sekretionsmechanismus kann GM-CSF direkt auf Zellen in der Umgebung wirken, um so zirkulierenden Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten den Weg zum Entzündungsgeschehen zu weisen. Darüber hinaus führt es zur Reifung und Aktivierung von dendritischen Zellen und Makrophagen.

Das in der Kokultur hochregulierte CCL5 induziert, genau wie CXCL8, ebenfalls die Chemotaxis, allerdings von T-Zellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten (Sahin *et al.*, 2010). Zusätzlich wird die Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen durch das,

auch in der Kokultur verstärkt exprimierte, Zytokin IL-12 gesteigert (Wang *et al.*, 2015). Es wird *in vivo* von aktivierten Hepatozyten freigesetzt und führt zur Aktivierung von STAT4 (Signal Transducer and Activator of Transcription 4) (Wurster *et al.*, 2000). Als Transkriptionsfaktor ist STAT4 an Entzündungen und Fibrogenese beteiligt. Für IL-12 wurde gezeigt, dass es ein prognostischer Marker für das Überleben von DILI-Patienten ist (Steuerwald *et al.*, 2013).

Doch nicht nur die Expression pro-inflammatorischer Zytokine war erhöht, auch das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 war nach Ketoconazol-Behandlung in kokultivierten HepG2-Zellen stärker exprimiert. Die Freisetzung von IL-10 kann zur Neutrophilen-Einwanderung und hepatischen Proliferation führen. In Mäusen waren die IL-10-Serumlevel nach APAP-Behandlung erhöht (Bourdi *et al.*, 2002). Daher entspricht die erhöhte IL-10-Expression in der *in-vitro*-Kokultur der *in-vivo*-Situation.

Der erst kürzlich in Zusammenhang mit DILI untersuchte, mögliche Biomarker für sterile Entzündung High-Mobility Group Box-1 Protein (HMGB1) zeigte in behandelten Kokulturen einen konzentrationsabhängigen Anstieg. *In vivo* wird HMGB1 als DAMP von nekrotischen Hepatozyten freigesetzt, bindet an den RAGE-Rezeptor (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) und aktiviert so weitere Zellpopulationen (Dragomir *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Die Produktion von proinflammatorischen und zytotoxischen Mediatoren, z. B. Chemokinen und ROS, führt zum Voranschreiten der Leberschädigung (Dragomir *et al.*, 2011; Scaffidi *et al.*, 2002). In humanen Plasmaproben von Patienten mit APAP-Überdosis konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von HMGB1 ein frühes Ereignis bei einer akuten Leberschädigung darstellt (Antoine *et al.*, 2009). Daher ist HMGB1 ein vielversprechender möglicher neuer Biomarker für DILI.

Anhand des Kokultursystems von HepG2-Zellen mit differenzierten THP-1-Zellen konnten eine Vielzahl von *in vivo* beschriebenen Effekten auch *in vitro* detektiert werden. Dabei konnte die Wechselwirkung zwischen hepatischen Zellen und Immunzellen nachvollzogen werden. Im Gegensatz dazu gelang in Einzelkulturen die Detektion der zu DILI-führenden Mechanismen nicht. Der konzentrationsabhängige Anstieg von HMGB1 wurde nach Ketoconazol-Behandlung noch nicht beschrieben. Er ist jedoch ein weiteres Indiz dafür, dass HMGB1 zukünftig als Biomarker zur frühzeitigen Entdeckung von DILI dienen könnte. Die Kombination der analysierten Endpunkte – ROS-Produktion, Aktivierung von Signalwegen, Zytokinexpression und -freisetzung – erscheint daher vielversprechend für eine frühe Identifikation von hepatotoxischen Substanzen im Entwicklungsprozess.

#### 4.1.2 Untersuchung des leberschädigenden aromatischenamins *o*-Anisidin und Vergleich mit *p*-Anisidin

Nachdem das Kokulturmodell etabliert und mehrere Endpunkte identifiziert worden sind, wurde das aromatische Amin *o*-Anisidin, das in Tattoofarben vorkommen kann (Laux *et al.*, 2016), untersucht. Vergleichend wurden sein *para*-Isomer – *p*-Anisidin – sowie als Negativsubstanz Koffein analysiert. Nach Metabolisierung, die hauptsächlich in der Leber stattfindet, bilden auch primäre aromatische Amine reaktive Zwischenprodukte, u. a. Nitrenium- und Carbeniumionen (Naiman *et al.*, 2012). Dabei zeigten sich im Kokulturmodell ähnliche Wirkungen wie mit Ketoconazol: auch *o*-Anisidin induzierte die ROS-Bildung, bekannt von DILI-induzierenden Substanzen. Es führte zu einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und zur Reduktion der intrazellulären ATP-Konzentration. Die Proteom-Untersuchungen zeigten die Aktivierung von ähnlichen Signalkaskaden wie nach Ketoconazol-Behandlung, z. B. des eIF2-Signalwegs und der Nrf2-vermittelten oxidativen Stressantwort. Darüber hinaus war die Sekretion des frühen Indikators für Lebertoxizität, HMGB1, in behandelten Kokulturen, aber nicht in Einzelkulturen, signifikant erhöht. Allerdings unterschied sich die Zytokinexpression zu der von DILI-auslösenden Substanzen: proinflammatorische Zytokine wurden in kokultivierten HepG2-Zellen nach Inkubation mit *o*-Anisidin nicht hochreguliert.

Als mögliche Ursache der ROS-Entstehung wurden Veränderungen der Mitochondrien untersucht, die auch bei Leberschädigungen eine wichtige Rolle spielen (Pessayre *et al.* 2012). Die konzentrationsabhängige Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials sowie die daraus resultierende Abnahme der ATP-Konzentration sind frühe Indikatoren für Zelltod (Green & Reed, 1998) und mit einer Leberschädigung korreliert, z. B. nach APAP-Behandlung (Hanawa *et al.*, 2008). Die Inhibition der ATP-Synthese wurde bereits nach der Diclofenac-Behandlung von isolierten Rattenleber-Mitochondrien beschrieben (Syed *et al.*, 2016), während eine vermehrte mitochondriale ROS-Freisetzung nach APAP-Behandlung von Mausmitochondrien gezeigt worden ist (Hanawa *et al.*, 2008). Genau wie nach Ketoconazol-Behandlung wird nach Inkubation mit *o*-Anisidin als Schutzmechanismus gegen ROS die Nrf2-vermittelte oxidative Stressantwort aktiviert. Dies konnte anhand einer erhöhten Expression der Glutathion-S-Transferase (GST) und der Glutathion-Reduktase (GSR) gezeigt werden. Eine erhöhte GST-Expression wurde in *in-vivo*-Studien an Ratten und Mäusen mit den primären aromatischen Aminen Dapson und Aminoglutethimid gezeigt (Ng & Uetrecht, 2013). In der gleichen Studie veränderte sich zusätzlich die Expression von Proteinen des Keap1-Nrf2-ARE-Signalwegs. Dieser Signalweg war in behandelten Kokulturen stark aktiviert, während er in Einzelkulturen nicht reguliert war. Als wichtiger Signalweg der antioxidativen Stressantwort kann Nrf2 die Transkription von Proteinen induzieren, die

an der Zellredox-Homoöstase beteiligt sind, z. B. GST $\kappa$ -1 (Dinkova-Kostova *et al.*, 2015), GSR und Peroxiredoxin 1 (PRDX1) (Malik & Storey, 2009; Schmidt, 2015) (siehe auch Abbildung 2). Diese drei Enzyme waren in kokultivierten HepG2-Zellen stark hochreguliert, was die Nrf2-Aktivierung als Antwort auf den oxidativen Stress bestätigte. GST $\kappa$ -1 ist ein mitochondriales Enzym, so dass dessen Hochregulation gemeinsam mit der Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials sowie der intrazellulären ATP-Konzentration auf eine wichtige Rolle dieser Organelle bei der *o*-Anisidin-induzierten Hepatotoxizität hindeutet.

Im Gegensatz zu Ketoconazol hatte *o*-Anisidin nur wenig Einfluss auf die Zytokinexpression und -sekretion. Daher wird die *o*-Anisidin-Toxizität vermutlich nicht über einen immunvermittelten Mechanismus induziert, sondern basiert auf oxidativen Schäden. Die Analyse des zusätzlichen Endpunktes HMGB1 zeigte dessen konzentrationsabhängigen Anstieg in der Kokultur. Seine Freisetzung ist ein Anzeichen für eine Leberschädigung, ausgelöst durch oxidativen Stress nach der *o*-Anisidin-Behandlung.

Im Gegensatz zu *o*-Anisidin induziert sein Konstitutionsisomer *p*-Anisidin kein ROS. In *in-vivo*-Studien an Mäusen konnte die nicht-toxische Wirkung von *p*-Anisidin im Vergleich mit *o*-Anisidin gezeigt werden (National Toxicology Program, 1978a,b). Der Mechanismus ist jedoch bis heute ungeklärt und beruht vermutlich auf einem unterschiedlichen Metabolismus der Isomere.

Zusammengefasst zeigten die im *in-vitro*-Kokulturmodell erhobenen Daten die *in vivo* beschriebenen Effekte. Der hepatotoxische Effekt *in vivo* wird dabei durch oxidativen Stress und den daraus folgenden Schäden der hepatischen Zellen, jedoch nicht durch Entzündungsprozesse verursacht. Mit der Identifizierung beteiligter Signalwege, u. a. des eIF2-Signalwegs und der Nrf2-vermittelten oxidativen Stressantwort, konnten darüber hinaus zugrunde liegende Mechanismen aufgedeckt werden. Die nachgewiesene Sekretion von HMGB1 impliziert die schädigende Wirkung von *o*-Anisidin in der Leber und kann gleichzeitig als früher Biomarker dienen. Darüber hinaus bestätigte sich die höhere Sensitivität der Kokultur gegenüber den beobachteten Effekten in Einzelkulturen.

## **4.2 Vergleich des Kokulturmodells mit anderen *in-vitro*-Ansätzen**

Eine möglichst frühe, zuverlässige Vorhersage von Hepatotoxizität ist eines der Ziele in der Wirkstoffforschung. Dadurch könnte nicht nur die Zahl der Tierversuche vermindert, sondern auch plötzliches, schweres Leberversagen nach Markteinführung verhindert werden. Der derzeitige Goldstandard sind humane primäre Hepatozyten, gefolgt von Tierversuchen,

meist an Mäusen oder Ratten. Aufgrund der komplexen Wechselwirkungen in der Leber sowie der Speziespezifität sind beide Modelle jedoch nur unzureichend in ihrer Aussagekraft (Mazzoleni & Steimberg, 2012).

Eine 2008 von der EMA veröffentlichte Richtlinie definiert für die Untersuchung der Hepatotoxizität drei Ziele (EMA, 2008):

1. die Veränderungen und ihre Ausprägung identifizieren, u. a. hinsichtlich ihrer klinischen Pathologie und Histopathologie
2. einen NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) und einen sicheren Konzentrationsbereich bestimmen, entsprechend der Dosis oder der systemischen Exposition
3. einen Mechanismus bzw. die Pathogenese bestimmen, wenn dadurch die Vorhersage klinischer Sicherheit verbessert werden kann

Auf der Suche nach verbesserten Modellen rückte die Bedeutung von inflammatorischen Mediatoren zur Vorhersage der Hepatotoxizität von Substanzen in den Fokus. Die Beteiligung von Immunzellen an der Entstehung von Leberschäden wurde stärker erforscht (Shaw *et al.*, 2010). Als *in-vitro*-Ansatz wurden Kokulturen in mehreren Studien untersucht. Dabei muss unterschieden werden zwischen direkten Kokulturmodellen, in denen zwei verschiedene Zelltypen direkten Kontakt miteinander haben, und indirekten Kokulturmodellen, zu dem das in der vorliegenden Arbeit etablierte zählt. Dabei sind die Zellen entweder mit Inserts voneinander getrennt oder der Mediumüberstand der einen Zellen wird auf die anderen übertragen. In indirekten Kokulturen wird die Kommunikation über lösliche Faktoren zwischen den Zelllinien untersucht, die im Anschluss separat analysiert werden können. Desweiteren gibt es Modelle mit primären Zellen oder Zelllinien.

Die Kokulturen mit primären Zellen bieten den Vorteil einer sehr guten Metabolisierung der Substanzen. Jedoch sind die Ergebnisse mit primären humanen Hepatozyten (PHH) stark spenderabhängig und weisen eine höhere Variation auf. Abhängig von möglichen Vorerkrankungen können die Zellen bereits stimuliert und damit aktiviert worden sein (Li, 2007). Darüber hinaus sind PHHs eine sehr begrenzte Ressource. Die Verfügbarkeit primärer Maus- oder Rattenzellen ist größer, allerdings besitzen sie eine andere Enzymausstattung als humane Zellen, so dass die Metabolisierung und die Entstehung reaktiver Metabolite verändert sein können. Darüber hinaus besteht weiterhin das Problem, dass die Tiere für die Gewinnung der Zellen getötet werden. Dies widerspricht dem 3R-Prinzip von Russell und Burch, nach dem Tierversuche reduziert (reduce), ersetzt (replace) und für die Tiere eine geringe Belastung sowie eine bestmögliche Lebenssituation geschaffen werden sollen (refine) (Russell & Burch, 1959).

Zelllinien bieten gegenüber Primärzellen den Vorteil einer unendlichen Proliferation, so dass sie jederzeit und in großen Zahlen verfügbar sind. Zusätzlich besitzen sie einen vergleichsweise stabilen, donorunabhängigen Phänotyp (Gómez-Lechón *et al.*, 2015). Daher besteht eine sehr gute experimentelle Reproduzierbarkeit und auch die Möglichkeit von Hochdurchsatz-Screenings (High-Troughput). Außerdem sind die Modellsysteme einfach unter Laboren austauschbar (Gomez-Lechon *et al.*, 2014). HepG2-Zellen, die aus dem Hepatoblastom eines 15-jährigen Kaukasiers isoliert wurden (Aden *et al.*, 1979), sind eine stark differenzierte Zelllinie mit vielen genotypischen Eigenschaften von Leberzellen (Sassa *et al.*, 1987). Die bereits Ende der 1970er Jahre isolierten Zellen sind bis heute sehr gut charakterisiert und weit verbreitet. Als Vergleich wurde die Huh-7-Zelllinie herangezogen, die 1982 aus dem hepatozellulären Karzinom eines 57-jährigen Japaners gewonnen wurde (Nakabayashi *et al.*, 1982). Auch sie ist weit verbreitet und sehr gut charakterisiert. Da sich die Enzymexpression von Zelllinien jedoch von primären Zellen unterscheidet (Lin *et al.*, 2012) und auch abhängig von der Bezugsquelle schwanken kann (Hewitt & Hewitt, 2004), wurden die verwendeten Zellen zu Beginn der Versuche charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass HepG2- und Huh-7-Zellen Cyp1A1, Cyp2C9 sowie Cyp2E1 exprimierten (siehe Abbildung S8 in Anhang B). Huh-7 exprimierte zusätzlich noch Cyp2B6. Auf funktionaler Ebene konnte aktives Cyp1A1-Enzym durch Umsetzung des Substrats Ethoxyresorufin im EROD-Assay nachgewiesen werden. CYP1A1 metabolisiert Ketoconazol, aber auch *o*- und *p*-Anisidin. Dieses Ergebnis wurde durch den Nachweis der erfolgreichen Ketoconazol-Metabolisierung bestätigt (Wewering *et al.*, 2017). Entgegen der Publikation von Lin *et al.* ähnelte das Expressionsprofil metabolisierender Enzyme der Huh-7-Zelllinie nicht dem von primären humanen Hepatozyten (2012). Auch unterschieden sich Huh-7- und HepG2-Zellen nur geringfügig. Die EC<sub>50</sub>-Werte für *o*-Anisidin lagen bei 14.3 mM in HepG2-, 6.9 mM in Huh-7-Zellen und 13.0 mM in primären murinen Hepatozyten. Neben der Bezugsquelle spielen auch die Kultivierungsbedingungen sowie die Anzahl der Passagen eine Rolle. Die Enzymexpression kann dabei durch Zugabe von stimulierenden Faktoren, z. B. Ethanol, Phenobarbital oder Dexamethason, induziert werden (Corcos & Weiss, 1988; Pelkonen *et al.*, 2008; Prescott, 2000).

Für die Untersuchung von Substanzen, die von anderen als den nachgewiesenen CYP-Enzymen umgesetzt werden, müssten die HepG2-Zellen entweder mit dem benötigten Enzym transfiziert werden oder es müsste auf eine andere Zelllinie zurückgegriffen werden (Gómez-Lechón *et al.*, 2015). Eine mögliche Alternative stellt die erst 2002 beschriebene HepaRG-Zelllinie dar, die mehrere Leberenzyme in aktiver Form exprimiert (Gripon *et al.*, 2002; Turpeinen *et al.*, 2009). Derzeit wird sie hinsichtlich ihrer Stressantworten noch erforscht, so dass noch unklar ist, ob sich *in-vivo*-Effekte während einer sterilen Entzündung anhand von HepaRG-Zellen nachvollziehen lassen. Fest steht, dass die HepaRG-Zellen zuvor differenziert werden müssen und dabei höhere Kultivierungsansprüche besitzen als HepG2-

oder Huh-7-Zellen. Auch die Kombination mit einer weiteren Zelllinie für die Kokultur, z. B. differenzierten THP-1-Zellen, gestaltet sich dadurch besonders schwierig.

Da die Substanz-induzierte Leberschädigung *in vivo* oft die Beteiligung von Makrophagen einschließt (Michael *et al.*, 1999; Muriel & Escobar, 2003), wurde für das Kokulturmodell die humane Monozyten-Zelllinie THP-1 in einen Makrophagen-ähnlichen Phänotyp differenziert. Dies erwies sich als unerlässlich für ein aussagekräftiges Kokulturmodell. Versuche mit undifferenzierten THP-1-Zellen in Kokultur mit HepG2-Zellen zeigten nach Ketoconazol-Behandlung keinen Unterschied zu Einzelkulturen. Bei der Differenzierung wird durch Zugabe von Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) zunächst die THP-1 Zellproliferation in der G1-Phase inhibiert (Traore *et al.*, 2005). Anschließend führt die Induktion der Proteinkinase C zur Aktivierung einer Vielzahl weiterer Kinasen (siehe Abbildung 4). Dabei scheint der PI3K/AKT-Signalweg nach aktuellen Erkenntnissen während der Differenzierung signifikant aktiviert zu sein (Zeng *et al.*, 2015).

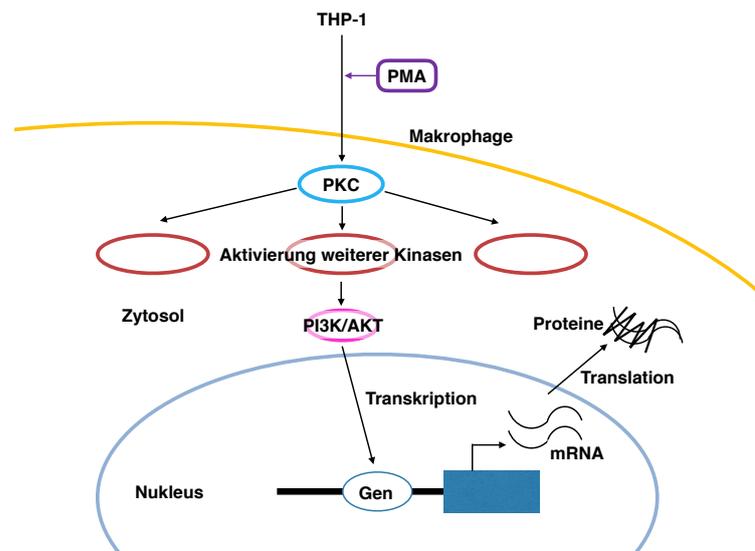


Abb. 4: Vorgeschlagener Mechanismus der PMA-induzierten Differenzierung der THP-1-Zellen.

Nach Inhibition der Zellproliferation der THP-1-Zellen induziert PMA die Proteinkinase C. Diese ist ein zentrales Schlüsselenzym in mehreren Signalwegen und aktiviert insbesondere den PI3K/AKT-Signalweg (nach Chen *et al.*, 2013, modifiziert).

Abkürzungen: messenger RNA (mRNA), Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), Proteinkinase C (PKC).

Durch den so aktivierten Signalweg adhären die THP-1-Zellen, bilden Zellfortsätze aus, ihre Proliferation wird deutlich verlangsamt und sie entwickeln eine ausgeprägte Phagozytosefähigkeit (Qin, 2012; Traore *et al.*, 2005). Die beschriebene erhöhte Expression

des Oberflächenmarkers CD40 konnte auch für die in der vorliegenden Arbeit differenzierten THP-1-Zellen bereits nach 24 h gezeigt werden (siehe Abbildung 5) (Mittar *et al.*, 2011).

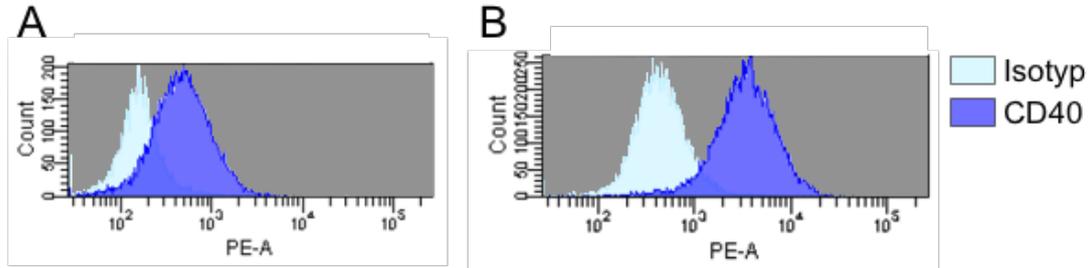


Abb. 5: FACS-Analyse der CD40-Expression auf THP-1-Zellen.

**A** Die Oberflächenfärbung und anschließende FACS-Analyse zeigten, dass undifferenzierte THP-1-Zellen CD40 nur schwach exprimieren. **B** Nach 24-stündiger Behandlung mit PMA ist die CD40-Expression deutlich erhöht.

Allein diese Differenzierung bewirkte eine erhöhte Freisetzung von Zytokinen durch die THP-1-Zellen. Dadurch wird eine inflammatorische Umgebung geschaffen, in der die Schädigung der hepatischen Zelllinie zur Auslösung einer Immunreaktion führt. Die Bedeutung des Austauschs interzellulärer Faktoren wurde bereits an anderen Kokulturmodellen gezeigt. So führte die Kombination von primären Rattenhepatozyten mit Kupffer-Zellen zu einer erhöhten NO-Konzentration in den Kupffer-Zellen und einer herunterregulierten Albumin-Expression in den Hepatozyten nach Behandlung mit Blei (Milosevic & Maier, 2000). Auch für Troglitazon konnte die Toxizität in Kokulturen gezeigt werden, während die Ergebnisse für das nicht-hepatotoxische Rosiglitazon erwartungsgemäß negativ waren (Edling *et al.*, 2009).

Wichtig bei der Entwicklung von Modellsystemen ist eine Verbesserung der Vorhersagekraft gegenüber den bisher genutzten Ansätzen, ohne falsch positive oder falsch negative Ergebnisse zu zeigen. In dem gezeigten Modell konnten für Ketoconazol, *o*- und *p*-Anisidin beschriebene *in-vivo*-Effekte nachvollzogen werden. Für ein valides Modell müssen zukünftig natürlich noch eine Vielzahl weiterer Substanzen getestet werden. Die Ergebnisse zeigen aber, dass die Wechselwirkung verschiedener Zellarten zu einer verbesserten Aussagekraft hinsichtlich der Entstehung von sterilen Entzündungen führen als ein vergleichbares Einzelkulturmodell.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, ein neues *in-vitro*-Testsystem zur besseren Charakterisierung der Substanz-induzierten Leberschädigung (DILI) zu etablieren. Nach einer initialen Schädigung der Hepatozyten kann die Aktivierung des Immunsystems den ursprünglichen Schaden vergrößern und so zu schwerem Leberversagen führen. Dieser wichtige Einfluss der Immunantwort sollte durch die Berücksichtigung in einem Kokulturmodell zu einer verbesserten Vorhersage von DILI sowie zur Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen führen. Dafür wurde eine Leberzelllinie mit einer in einen Makrophagen-ähnlichen Phänotyp differenzierten Immunzelllinie in einem indirekten Kokultursystem kombiniert, das den zellulären Austausch von Signalmolekülen erlaubte. Dadurch konnten *in vivo* beschriebene molekulare Ereignisse abgebildet werden, die zur Entstehung von Leberschäden führen.

Im ersten Teil der vorliegenden Dissertation wurde daher ein Kokulturmodell mit HepG2-Zellen als hepatische Zelllinie und differenzierten THP-1-Zellen als Makrophagen-ähnliche Immunzelllinie etabliert. Zur Überprüfung des Modells wurde die Metabolisierung des leberschädigenden Antimykotikums Ketoconazol mittels Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) untersucht. Sieben reaktive Zwischenprodukte konnten nachgewiesen werden, darunter das stark toxische *N*-Deacetyl-Ketoconazol. Anschließend wurden Veränderungen in Signalwegen in proteomischen Analysen mittels LC-MS/MS bestimmt. Dabei konnten die Inhibition der Sterol-Synthese sowie die Aktivierung des CXCL8-Signalwegs und der Nrf2-vermittelten oxidativen Stressantwort in kokultivierten HepG2-Zellen *in vitro* nachgewiesen werden. Diese Veränderungen führten wiederum zur Aktivierung der Zytokinexpression und -sekretion, die in PCR- und ELISA-Analysen gezielt analysiert wurden. Die Hinweise auf die Aktivierung des CXCL8-Signalwegs wurden durch den Nachweis der Expression und Sekretion mehrerer proinflammatorischer Zytokine, darunter neben CXCL8 auch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , bekräftigt. Zusätzlich konnte in der behandelten Kokultur eine konzentrationsabhängige Zunahme des erst seit kurzem im Zusammenhang mit steriler Entzündung gefundenen möglichen Biomarkers HMGB1 nachgewiesen werden.

In dem neu entwickelten Kokulturmodell wurde im zweiten Teil der Arbeit das aromatische Amin *o*-Anisidin, das u. a. in Tattoofarben enthalten sein kann, hinsichtlich einer

Leberschädigung sowie deren Wirkmechanismus untersucht. Als Kontrolle dienten das para-Isomer *p*-Anisidin sowie Koffein. Die Untersuchung des Proteoms zeigte nach *o*-Anisidin-Behandlung eine Aktivierung des eIF2-Signalwegs sowie der Nrf2-vermittelten oxidativen Stressantwort. Darüber hinaus konnte in anschließenden Analysen eine konzentrationsabhängige Zunahme von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nachgewiesen werden. Auffällig war die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials durch *o*-Anisidin-Behandlung. Diese korrelierte mit der Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration. Da in den *o*-Anisidin-behandelten Kokulturen keine erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine gezeigt werden konnte, ist eine Leberschädigung über einen immunvermittelten Mechanismus unwahrscheinlich. Allerdings konnte eine erhöhte HMGB1-Freisetzung nach *o*-Anisidin-Behandlung nachgewiesen werden. Dies unterstreicht die Bedeutung von HMGB1 als einen frühen Indikator für eine hepatische Schädigung. Im Gegensatz dazu induzierten weder *p*-Anisidin noch Koffein die Bildung von ROS. Koffein führte ebenfalls nicht zu Änderungen der Expression proinflammatorischer Zytokine. Die Verwendung der Huh-7-Zelllinie als mögliche Alternative zu den HepG2-Zellen zeigte bereits in Einzelkultur eine hohe Freisetzung von Zytokinen. Diese entspricht nicht beschriebenen *in-vivo*-Befunden. Die Huh-7-Zelllinie schien daher für den hier verfolgten Ansatz ungeeignet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit diesem *in-vitro*-Kokultursystem die Vorhersage toxischer Substanzen verbessert werden kann, da die Wechselwirkungen mit dem Immunsystem berücksichtigt werden können. HMGB1 scheint dabei ein neuer, möglicher Biomarker für geschädigte Hepatozyten und damit ein früher Indikator für eine Leberschädigung zu sein. Das in dieser Dissertation etablierte Kokulturmodell kann zukünftig für eine frühe Vorhersage der Hepatotoxizität von Substanzen dienen und so gleichzeitig zur Reduktion von Tierversuchen führen.

## 6 Summary

The aim of the presented PhD thesis was the development of a new *in vitro* test system which allows for a better characterization and prediction of drug-induced liver injuries (DILI). After the initial damage of hepatocytes, the activation of the immune system can aggravate this damage and lead to severe liver failure. This important interaction should be included in a co-culture system and thus lead to an improved prediction of DILI as well as reveal the underlying mechanisms. Therefore a liver cell line and an immune cell line with a macrophage-like phenotype were combined to develop an indirect co-culture system. In this system soluble signalling molecules can be exchanged and thus molecular events which have been described *in vivo* can be analyzed in detail.

In the first part of this work, a co-culture model with HepG2 cells as hepatic cell line and differentiated THP-1 cells as immune cell line was established. For the validation of the model system, the metabolism of the antifungal drug ketoconazole was analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Seven reactive metabolites were detected, including the highly toxic *N*-deacetyl ketoconazole. Afterwards changes in signalling pathways were investigated by proteome analyses via LC-MS/MS. They revealed the inhibition of the sterol synthesis and the activation of the CXCL8 pathway and the Nrf2-mediated oxidative stress response in HepG2 cells *in vitro*. These changes lead to an increase in cytokine expression and secretion which was validated in targeted PCR and ELISA analyses. The activation of the CXCL8 signalling pathway could be verified by the detection of several proinflammatory cytokines including CXCL8, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . In addition, a concentration dependent increase of HMGB1 protein could be detected in treated co-cultures which is an only recently described possible new biomarker.

In the newly established co-culture model, the aromatic amine *o*-anisidine was tested regarding its mode of action. It was compared with its para-isomer *p*-anisidine and caffeine. The proteome analysis showed the activation of the eIF2 signalling pathway and the Nrf2-mediated oxidative stress response. Targeted approaches revealed the concentration dependent generation of reactive oxygen species (ROS) in *o*-anisidine treated cell cultures. Strikingly the mitochondrial membrane became depolarized by *o*-anisidine treatment. This correlated with the observed ATP decrease. As no increased expression of proinflammatory

cytokines could be shown in treated co-cultures, a liver injury through an immune-mediated mechanism seems unlikely. The increased release of HMGB1 points towards its role as an early indicator of liver injury. In contrast to that neither *p*-anisidine nor caffeine induced the ROS generation. Caffeine did not change the expression of proinflammatory cytokines, either. Experiments using the Huh-7 cell line as a possible alternative to HepG2 showed already in single cultures the release of cytokines at high concentrations. This does not correlate with the described *in vivo* effects. Therefore the Huh-7 cell line is not suitable for the approach taken here.

These results show that the use of this *in vitro* co-culture systems can lead to an improved prediction of toxic substances. They take the interactions with the immune system into account. HMGB1 seems to be a new, possible biomarker for damaged hepatocytes and thus an early indicator of a liver injury. The co-culture model established in this PhD thesis can lead to an early prediction of a drug's hepatotoxicity and thus to a reduction of animal experiments.

## 7 Ausblick

Das hier vorgestellte Kokulturmodell stellt einen wichtigen Schritt in Richtung Reduzierung von Tierversuchen durch die gesteigerte *in-vivo*-Relevanz dar.

Die Proteom-Analysen zeigten nach Ketoconazol-Inkubation die Aktivierung mehrerer Signalwege. Der veränderte NF $\kappa$ B-Signalweg müsste in gezielten Ansätzen weiter untersucht und die Rolle einzelner Proteine genauer geklärt werden. Zusätzlich sollte eine mögliche Bedeutung der c-Jun N-terminalen Proteinkinase (JNK) näher untersucht werden, da in mehreren Studien ihre zentrale Rolle nach oxidativ entstandenen Leberschäden *in vivo* beschrieben worden ist (Hanawa *et al.*, 2008). Weitere mögliche, zu untersuchende Endpunkte sind die microRNA-122 (miR-122) und das Kaspase-gespaltene Keratin-18 (caspase-cleaved keratin-18, K18). In einer kleinen Patientenstudie konnte gezeigt werden, dass die Plasmakonzentrationen von HMGB1 sowie von miR-122 und K18 eine sehr gute Prognose für den weiteren Verlauf einer Paracetamol-induzierten Leberschädigung ermöglichen (Antoine *et al.*, 2013). Diese zwei zusätzlichen Marker sollten daher in dem etablierten Kokulturmodell auf ihre Sekretion getestet werden, um die Vorhersagekraft so möglicherweise weiter zu erhöhen.

Neben Makrophagen mehren sich die Hinweise auf die Beteiligung weiterer Immunzellen. Auch das nach Ketoconazol-Inkubation in der Kokultur erhöhte CXCL8 induziert die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten. Daher würde die Etablierung eines Kokulturmodells mit Neutrophilen weitere Möglichkeiten der *in-vitro*-Untersuchung von DILI ermöglichen. Derzeit gibt es jedoch keine geeigneten Zelllinien, so dass die Isolation von Primärzellen aus Blut notwendig wäre und damit auch sofort eine Spenderabhängigkeit der Ergebnisse besteht. Diese wäre allerdings geringer als bei primären humanen Hepatozyten, da eine Blutspende von gesunden Menschen problemlos möglich ist.

Die inflammatorische Umgebung wurde insbesondere durch die von der differenzierten THP-1-Zelllinie freigesetzten Zytokine geschaffen. Ob neben den bereits identifizierten Zytokinen noch weitere freigesetzt werden und in welcher Konzentration, die mit der Inkubationszeit sicher variiert, muss in weiteren Versuchen untersucht werden. Anschließend sollte analysiert werden, ob der unmittelbare Austausch mittels Kokultur über Inserts

notwendig ist oder bereits ein Zytokin-Cocktail für eine erhöhte sensitive Reaktion der hepatischen Zelllinie ausreicht. Neben HepG2- und Huh-7-Zellen gilt die 2002 beschriebene HepaRG-Zelllinie als vielversprechend hinsichtlich ihrer metabolischen Aktivität (Gripon *et al.*, 2002). Sie ist eine stabile Zelllinie mit unbegrenzter Teilungsfähigkeit, die *in vitro* gezielt in einen Hepatozyten-ähnlichen Phänotyp differenziert werden kann und einen Großteil der von humanen Hepatozyten bekannten CYP450-Enzyme in aktiver Form exprimiert. Die Umwandlung in reaktive Metabolite ist jedoch nur der erste Schritt der DILI-Entstehung. Ob sich diese Zelllinie auch für ein Kokulturmodell eignet, müsste weiter erforscht werden.

Es gibt also mehrere Ansatzpunkte, um das bestehende Kokulturmodell weiter für die Charakterisierung hepatotoxischer Mechanismen zu nutzen. Das so gewonnene Wissen kann in den Aufbau weiterer Modelle mit anderen beteiligten Zellarten einfließen.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkalische Phosphatase
ALT	Alanin-Aminotransferase
APAP	Acetaminophen, auch: Paracetamol
ARE	Antioxidative Response Elements
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
CCL	CC-Chemokin Ligand
CCR	CC-Chemokin Rezeptor
CSF2	Colony Stimulating Factor 2
CXCL1/2/8	C-X-C Motif Ligand 1/2/8
CYP450	Cytochrom-P450
DAK	<i>N</i> -Deacetyl-Ketoconazol
DAMP	Damage-Associated Molecular Patterns
DILI	Medikamenten-induzierte Leberschädigung (Drug-induced Liver Injury)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
eIF2	eukaryotischer Initiationsfaktor-2 (eukaryotic initiation factor-2)
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur (European Medicines Agency)
EROD	7-Ethoxyresorufin O-Deethylierung
FDA	US Food and Drug Administration
FMO	Flavin-abhängige Monooxygenasen
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor)
GSR	Glutathion-Reduktase
GST	Glutathion-S-Transferase
HLA	humanes Leukozytenantigen
HMGB1	High-Mobility Group Box-1 Protein
HSP	Hitzeschockproteine

IARC	Internationale Agentur für Krebsforschung (International Agency for Research on Cancer)
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1, auch: CD54
ICH	Internationale Konferenz zur Harmonisierung technischer Anforderungen für die Zulassung von Humanarzneimitteln (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)
IL-	Interleukin-
JNK	c-Jun N-terminale Proteinkinase
Keap1	kelchähnliches ECH-assoziiertes Protein 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)
K18	Kaspase-gespaltene Keratin-18 (caspase-cleaved keratin-18)
MIF	Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor (Macrophage Migration Inhibitory Factor)
miR-122	microRNA-122
MPT	mitochondrialer Permeabilitätsübergang (Mitochondrial Permeability Transition)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
NOS 2	Stickstoffmonoxid-Synthase 2 (Nitric Oxide Synthase 2)
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
PHH	primäre humane Hepatozyten
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PRDX1	Peroxiredoxin 1
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
REACH	Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung von Chemikalien (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
Serpin E1	Serinproteinase-Inhibitor E1
SOD2	Superoxid-Dismutase 2
SVHC	besonders besorgniserregender Stoff (Substance of Very High Concern)
TLR4	Toll-ähnlicher Rezeptor 4 (Toll-like receptor 4)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TRAF1	TNF Rezeptor-assoziiierter Faktor 1

## 9 Abbildungsverzeichnis

1	Postulierter DILI-Mechanismus . . . . .	6
2	Der Nrf2-Signalweg . . . . .	37
3	Wechselwirkungen und Funktionen der in der Kokultur induzierten Zytokine	40
4	Vorgeschlagener Mechanismus der PMA-induzierten Differenzierung der THP-1-Zellen . . . . .	47
5	FACS-Analyse der CD40-Expression auf THP-1-Zellen . . . . .	48

## 10 Literaturverzeichnis

- Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., Knowles, B.B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282: 615–616.
- Antoine, D.J., Dear, J.W., Lewis, P.S., Platt, V., Coyle, J., Masson, M., Thanacoody, R.H., Gray, A.J., Webb, D.J., Moggs, J.G., Bateman, D.N., Goldring, C.E., *et al.* (2013). Mechanistic biomarkers provide early and sensitive detection of acetaminophen-induced acute liver injury at first presentation to hospital. *Hepatology*, 58: 777–787.
- Antoine, D.J., Williams, D.P., Kipar, A., Jenkins, R.E., Regan, S.L., Sathish, J.G., Kitteringham, N.R., Park, B.K. (2009). High-mobility group box-1 protein and keratin-18, circulating serum proteins informative of acetaminophen-induced necrosis and apoptosis *in vivo*. *Toxicological Sciences*, 112: 521–531.
- Baggiolini, M., Clark-Lewis, I. (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Letters*, 307: 97–101.
- Barnes, M.A., McMullen, M.R., Roychowdhury, S., Pisano, S.G., Liu, X., Stavitsky, A.B., Bucala, R., Nagy, L.E. (2013). Macrophage migration inhibitory factor contributes to ethanol-induced liver injury by mediating cell injury, steatohepatitis and steatosis. *Hepatology*, 57: 1980–1991.
- Baugh, J.a., Bucala, R. (2002). Macrophage migration inhibitory factor. *Critical Care Medicine*, 30: S27–S35.
- Björnsson, E.S., Bergmann, O.M., Björnsson, H.K., Kvaran, R.B., Olafsson, S. (2013). Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-induced liver injury in the general population of iceland. *Gastroenterology*, 144: 1419–1425.
- Blazka, M.E., Elwell, M.R., Holladay, S.D., Wilson, R.E., Luster, M.I. (1996). Histopathology of acetaminophen-induced liver changes: role of interleukin 1 $\alpha$  and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Toxicologic Pathology*, 24: 181–189.

- Blazka, M.E., Wilmer, J.L., Holladay, S.D., Wilson, R.E., Luster, M.I. (1995). Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 133: 43–52.
- Bley, C.H., Centgraf, M., Cieslik, A., Hack, J., Hohloch, L. (2015). *I care Anatomie, Physiologie*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 1. Edition.
- Bourdi, M., Reilly, T.P., Elkahoun, A.G., George, J.W., Pohl, L.R. (2002). Macrophage migration inhibitory factor in drug-induced liver injury: a role in susceptibility and stress responsiveness. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 294: 225–230.
- Branner, B., Kutzer, C., Wickenpflug, W., Scherer, G., Heller, W.D., Richter, E. (1998). Haemoglobin adducts from aromatic amines and tobacco specific nitrosamines in pregnant smoking and non smoking women. *Biomarkers*, 3: 35–47.
- Brennan, R.J., Schiestl, R.H. (1999). The aromatic amine carcinogens *o*-toluidine and *o*-anisidine induce free radicals and intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, 430: 37–45.
- Chen, M., Suzuki, A., Borlak, J., Andrade, R.J., Lucena, M.I. (2015). Drug-induced liver injury: interactions between drug properties and host factors. *Journal of Hepatology*, 63: 503–514.
- Chen, P.Y., Yen, J.H., Kao, R.H., Chen, J.H. (2013). Down-regulation of the oncogene PTTG1 via the KLF6 tumor suppressor during induction of myeloid differentiation. *PLoS One*, 8: e71282.
- Choi, J.M., Oh, S.J., Lee, J.Y., Jeon, J.S., Ryu, C.S., Kim, Y.M., Lee, K., Kim, S.K. (2015). Prediction of drug-induced liver injury in HepG2 cells cultured with human liver microsomes. *Chemical Research in Toxicology*, 28: 872–885.
- Chun, L.J., Tong, M.J., Busuttill, R.W., Hiatt, J.R. (2009). Acetaminophen hepatotoxicity and acute liver failure. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 43: 342–349.
- Corcos, L., Weiss, M.C. (1988). Phenobarbital, dexamethasone and benzanthracene induce several cytochrome P450 mRNAs in rat hepatoma cells. *FEBS Letters*, 233: 37–40.
- Cosgrove, B.D., King, B.M., Hasan, M.A., Leonidas, G., Farazi, P.A., Hendriks, B.S., Griffith, L.G., Peter, K. (2009). Synergistic drug-cytokine induction of hepatocellular death as an *in vitro* approach for the study of inflammation-associated idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 237: 317–330.
- Court, F.G., Wemyss-Holden, S.A., Dennison, A.R., Maddern, G.J. (2002). The mystery of liver regeneration. *British Journal of Surgery*, 89: 1089–1095.

- Culotta, E., Koshland, D.E. (1992). NO news is good news. *Science*, 258: 1862–1865.
- Daly, A.K., Aithal, G.P., Leathart, J.B.S., Swainsbury, R.A., Dang, T.S., Day, C.P. (2007). Genetic susceptibility to diclofenac-induced hepatotoxicity: contribution of UGT2B7, CYP2C8, and ABCC2 genotypes. *Gastroenterology*, 132: 272–281.
- Daly, A.K., Donaldson, P.T., Bhatnagar, P., Shen, Y., Pe'er, I., Floratos, A., Daly, M.J., Goldstein, D.B., John, S., Nelson, M.R., Graham, J., Park, B.K., *et al.* (2009). HLA-B\*5701 genotype is a major determinant of drug-induced liver injury due to flucloxacillin. *Nature Genetics*, 41: 816–819.
- de Abajo, F.J., Montero, D., Madurga, M., García Rodríguez, L.A. (2004). Acute and clinically relevant drug-induced liver injury: a population based case-control study. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 58: 71–80.
- d'Errico, A., Taioli, E., Chen, X., Vineis, P. (1996). Genetic metabolic polymorphisms and the risk of cancer: a review of the literature. *Biomarkers*, 1: 149–173.
- Diehl, A.M. (2000). Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunological Reviews*, 174: 160–171.
- Diehl, A.M., Rai, R.M. (1996). Liver regeneration 3: regulation of signal transduction during liver regeneration. *FASEB Journal*, 10: 215–227.
- Dinkova-Kostova, A.T., Baird, L., Holmström, K.M., Meyer, C.J., Abramov, A.Y. (2015). The spatiotemporal regulation of the Keap1–Nrf2 pathway and its importance in cellular bioenergetics. *Biochemical Society Transactions*, 43: 602–610.
- Dragomir, A.C., Laskin, J.D., Laskin, D.L. (2011). Macrophage activation by factors released from acetaminophen-injured hepatocytes: potential role of HMGB1. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 253: 170–177.
- Duque, G.A., Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, 5: 1–12.
- Edling, Y., Sivertsson, L.K., Butura, A., Ingelman-sundberg, M., Ek, M. (2009). Increased sensitivity for troglitazone-induced cytotoxicity using a human *in vitro* co-culture model. *Toxicology in Vitro*, 23: 1387–1395.
- EMA (2008). Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity, European Medicines Agency. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500003355.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003355.pdf).

- EMA (2013). European Medicines Agency recommends suspension of marketing authorisations for oral ketoconazole, European Medicines Agency. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Press\\_release/2013/07/WC500146613.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2013/07/WC500146613.pdf).
- Estruch, M., Bancells, C., Beloki, L., Sanchez-Quesada, J.L., Ordonez-Llanos, J., Benitez, S. (2013). CD14 and TLR4 mediate cytokine release promoted by electronegative LDL in monocytes. *Atherosclerosis*, 229: 356–362.
- FDA (2009). Guidance for industry drug-induced liver injury: premarketing clinical evaluation, Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM174090.pdf>.
- FDA (2013). FDA drug safety communication: FDA limits usage of Nizoral (ketoconazole) oral tablets due to potentially fatal liver injury and risk of drug interactions and adrenal gland problems, Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/UCM362444.pdf>.
- Fitch, W.L., Tran, T., Young, M., Liu, L., Chen, Y. (2009). Revisiting the metabolism of ketoconazole using accurate mass. *Drug Metabolism Letters*, 3: 191–198.
- Fontana, R.J. (2008). Acute liver failure including acetaminophen overdose. *The Medical Clinics of North America*, 92: 761–794.
- Gago-Dominguez, M., Esteban Castelao, J., Yuan, J.M., Yu, M.C., Ross, R.K. (2001). Use of permanent hair dyes and bladder-cancer risk. *International Journal of Cancer*, 91: 575–579.
- Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S. (1987). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 10: 1–35.
- Garberg, P., Akerblom, E.L., Bolcsfoldi, G. (1988). Evaluation of a genotoxicity test measuring DNA-strand breaks in mouse lymphoma cells by alkaline unwinding and hydroxyapatite elution. *Mutation Research*, 203: 155–176.
- García Rodríguez, L.A., Duque, A., Castellsague, J., Pérez-Gutthann, S., Stricker, B.H. (1999). A cohort study on the risk of acute liver injury among users of ketoconazole and other antifungal drugs. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 48: 847–852.
- Gebhardt, R. (1992). Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacology & Therapeutics*, 53: 275–354.

- Godoy, P., Hewitt, N.J., Albrecht, U., Andersen, M.E., Ansari, N., Bhattacharya, S., Bode, J.G., Bolleyn, J., Borner, C., Böttger, J., Braeuning, A., Budinsky, R.a., *et al.* (2013). Recent advances in 2D and 3D *in vitro* systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Archives of Toxicology*, 87: 1315–1530.
- Golka, K., Prior, V., Blaszkewicz, M., Bolt, H.M. (2002). The enhanced bladder cancer susceptibility of NAT2 slow acetylators towards aromatic amines: a review considering ethnic differences. *Toxicology Letters*, 128: 229–241.
- Gomez-Lechon, M.J., Tolosa, L., Conde, I., Donato, M.T. (2014). Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 10: 1553–1568.
- Gómez-Lechón, M.J., Tolosa, L., Donato, M.T. (2015). Metabolic activation and drug-induced liver injury: *in vitro* approaches for the safety risk assessment of new drugs. *Journal of Applied Toxicology*, 36: 752–768.
- Gonzalez, E., McGraw, T.E. (2009). The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle*, 8: 2502–2508.
- Green, D.R., Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281: 1309–1312.
- Greenblatt, D.J. (2014). The ketoconazole legacy. *Clinical Pharmacology in Drug Development*, 3: 1–3.
- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., Guguen-Guillouzo, C. (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 15655–15660.
- Guo, F.H., De Raeve, H.R., Rice, T.W., Stuehr, D.J., Thunnissen, F.B., Erzurum, S.C. (1995). Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 7809–7813.
- Gupta, A.K., Daigle, D., Foley, K.A. (2015). Drug safety assessment of oral formulations of ketoconazole. *Expert Opinion on Drug Safety*, 14: 325–334.
- Hadi, M., Chen, Y., Starokozhko, V., Merema, M.T., Groothuis, G.M.M. (2012). Mouse precision-cut liver slices as an *ex vivo* model to study idiosyncratic drug-induced liver injury. *Chemical research in toxicology*, 25: 1938–1947.

- Halestrap, A.P. (2009). What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46: 821–831.
- Hanawa, N., Shinohara, M., Saberi, B., Gaarde, W.A., Han, D., Kaplowitz, N. (2008). Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 13565–13577.
- Haubrich, W.S. (2004). Disse of the space of Disse. *Gastroenterology*, 127: 1684.
- Herpers, B., Wink, S., Fredriksson, L., Di, Z., Hendriks, G., Vrieling, H., de Bont, H., van de Water, B. (2016). Activation of the Nrf2 response by intrinsic hepatotoxic drugs correlates with suppression of NF- $\kappa$ B activation and sensitizes toward TNF $\alpha$ -induced cytotoxicity. *Archives of Toxicology*, 90: 1163–1179.
- Hewitt, N.J., Hewitt, P. (2004). Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines. *Xenobiotica*, 34: 243–256.
- Hobbs, C.A., Recio, L., Streicker, M., Boyle, M.H., Tanaka, J., Shiga, A., Witt, K.L. (2015). Comet assay evaluation of six chemicals of known genotoxic potential in rats. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 786-788: 172–181.
- Hoebe, K.H., Witkamp, R.F., Fink-Gremmels, J., Van Miert, A.S., Monshouwer, M. (2001). Direct cell-to-cell contact between Kupffer cells and hepatocytes augments endotoxin-induced hepatic injury. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280: G720–G728.
- Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H., Kracht, M. (2002). Multiple control of interleukin-8 gene expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 72: 847–855.
- Holt, M.P., Ju, C. (2006). Mechanisms of drug-induced liver injury. *The AAPS Journal*, 8: E48–E54.
- Hoque, R., Farooq, A., Mehal, W.Z. (2013). Sterile inflammation in the liver and pancreas. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 28: 61–67.
- IARC (1982). IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. *World Health Organization*, 27: 63–80.
- IARC (1999). IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. *World Health Organization*, 73: 49–58.

- ICH Harmonized Tripartite Guideline (2000). Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals S7A. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm074959.pdf>.
- ICH Harmonized Tripartite Guideline (2005). The non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals S7B. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm074963.pdf>.
- Jaeschke, H. (2015). Acetaminophen: dose-dependent drug hepatotoxicity and acute liver failure in patients. *Digestive Diseases*, 33: 464–471.
- Jaeschke, H., McGill, M.R., Ramachandran, A. (2012a). Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metabolism Reviews*, 44: 88–106.
- Jaeschke, H., Williams, C.D., Ramachandran, A., Bajt, M.L. (2012b). Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity. *Liver International*, 32: 8–20.
- Kaplowitz, N., Tsukamoto, H. (1996). Oxidative stress and liver disease. *Progress in Liver Diseases*, 14: 131–159.
- Khoury, T., Rmeileh, A.A., Yosha, L., Benson, A.A., Daher, S., Mizrahi, M. (2015). Drug induced liver injury: review with a focus on genetic factors, tissue diagnosis, and treatment options. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 3: 99–108.
- Kmiec, Z. (2001). Cooperation of liver cells in health and disease. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, 161: III–XIII, 1–151.
- Kondo, Y., Yoshihashi, S., Mimori, K., Ogihara, R., Kanehama, Y., Maki, Y., Enosawa, S., Kurose, K., Iwao, T., Nakamura, K., Matsunaga, T. (2014). Selective culture method for hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 29: 407–413.
- Lammert, C., Einarsson, S., Saha, C., Niklasson, A., Bjornsson, E., Chalasani, N. (2008). Relationship between daily dose of oral medications and idiosyncratic drug-induced liver injury: search for signals. *Hepatology*, 47: 2003–2009.
- Laux, P., Tralau, T., Tentschert, J., Blume, A., Dahouk, S.A., Baumler, W., Bernstein, E., Bocca, B., Alimonti, A., Colebrook, H., de Cuyper, C., Dahne, L., *et al.* (2016). A medical-toxicological view of tattooing. *The Lancet*, 387: 395–402.

- Lee, W.M., Larson, A.M., Stravitz, R.T. (2011). AASLD position paper: the management of acute liver failure: update 2011. *Hepatology*, 55: 965–967.
- Li, A.P. (2007). Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development. *Chemico-Biological Interactions*, 168: 16–29.
- Li, J., Billiar, T.R. (1999). Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *The American Journal of Physiology*, 276: G1069–G1073.
- Licata, A. (2016). Adverse drug reactions and organ damage: the liver. *European Journal of Internal Medicine*, 28: 9–16.
- Lin, J., Schyschka, L., Mühl-Benninghaus, R., Neumann, J., Hao, L., Nussler, N., Dooley, S., Liu, L., Stöckle, U., Nussler, A.K., Ehnert, S. (2012). Comparative analysis of phase I and II enzyme activities in 5 hepatic cell lines identifies Huh-7 and HCC-T cells with the highest potential to study drug metabolism. *Archives of Toxicology*, 86: 87–95.
- Liu, F., Ichihara, S., Valentine, W.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Sheik Mohideen, S., Kitoh, J., Ichihara, G. (2010). Increased susceptibility of Nrf2-null mice to 1-bromopropane-induced hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, 115: 596–606.
- Liu, J., Wu, K.C., Lu, Y.F., Ekuase, E., Klaassen, C.D. (2013). Nrf2 protection against liver injury produced by various hepatotoxicants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013: 1–8.
- Lu, P., Nakamoto, Y., Nemoto-Sasaki, Y., Fujii, C., Wang, H., Hashii, M., Ohmoto, Y., Kaneko, S., Kobayashi, K., Maukaida, N. (2003). Potential interaction between CCR1 and its ligand, CCL3, induced by endogenously produced interleukin-1 in human hepatomas. *American Journal of Pathology*, 162: 1249–1258.
- Lucena, M.I., Andrade, R.J., Kaplowitz, N., García-Cortes, M., Fernández, M.C., Romero-Gomez, M., Bruguera, M., Hallal, H., Robles-Diaz, M., Rodriguez-González, J.F., Navarro, J.M., Salmeron, J., *et al.* (2009). Phenotypic characterization of idiosyncratic drug-induced liver injury: the influence of age and sex. *Hepatology*, 49: 2001–2009.
- Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T., Bernhagen, J. (2002). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes and Infection*, 4: 449–460.
- Malik, A.I., Storey, K.B. (2009). Activation of antioxidant defense during dehydration stress in the African clawed frog. *Gene*, 442: 99–107.

- Martin-Murphy, B.V., Holt, M.P., Ju, C. (2010). The role of damage associated molecular pattern molecules in acetaminophen-induced liver injury in mice. *Toxicology Letters*, 192: 387–394.
- Masson, M.J., Collins, L.A., Pohl, L.R. (2010). The role of cytokines in the mechanism of adverse drug reactions. *Handbook of Experimental Pharmacology*: 195–231.
- Maurer, H.H., Kraemer, T., Springer, D., Staack, R.F. (2004). Chemistry, pharmacology, toxicology, and hepatic metabolism of designer drugs of the amphetamine (ecstasy), piperazine, and pyrrolidinophenone types: a synopsis. *Therapeutic Drug Monitoring*, 26: 127–131.
- Mazzoleni, G., Steimberg, N. (2012). New models for the *in vitro* study of liver toxicity: 3D culture systems and the role of bioreactors. *The Continuum of Health Risk Assessments*: 161–194.
- McCall, E., Keegan, J., Foley, B. (2012). Primary aromatic amine migration from polyamide kitchen utensils: method development and product testing. *Food Additives & Contaminants Part A*, 29: 149–160.
- Michael, S.L., Pumford, N.R., Mayeux, P.R., Niesman, M.R., Hinson, J.A. (1999). Pre-treatment of mice with macrophage inactivators decreases acetaminophen hepatotoxicity and the formation of reactive oxygen and nitrogen species. *Hepatology*, 30: 186–195.
- Mickelson, J.K., Kukielka, G., Bravenec, J.S., Mainolfi, E., Rothlein, R., Hawkins, H.K., Kelly, J.H., Smith, C.W. (1995). Differential expression and release of CD54 induced by cytokines. *Hepatology*, 2: 866–875.
- Milosevic, N., Maier, P. (2000). Lead stimulates intercellular signalling between hepatocytes and Kupffer cells. *European Journal of Pharmacology*, 401: 317–328.
- Min Hon, W., Hoe Lee, K., Eng Khoo, H. (2002). Nitric oxide in liver diseases friend, foe, or just passerby? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 962: 275–295.
- Mittar, D., Paramban, R., McIntyre, C. (2011). Flow cytometry and high-content imaging to identify markers of monocyte-macrophage differentiation. *BD Biosciences*: 1–20.
- Morgan, E.T. (2009). Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450 – mediated drug metabolism and pharmacokinetics. *Nature*, 85: 434–438.
- Morio, L.A., Chiu, H., Sprowles, K.A., Zhou, P., Heck, D.E., Gordon, M.K., Laskin, D.L. (2001). Distinct roles of tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 172: 44–51.

- Muriel, P., Escobar, Y. (2003). Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *Journal of Applied Toxicology*, 23: 103–108.
- Naiman, K., Dracínský, M., Hodek, P., Martínková, M., Schmeiser, H.H., Frei, E., Stiborová, M. (2012). Formation, persistence, and identification of DNA adducts formed by the carcinogenic environmental pollutant *o*-anisidine in rats. *Toxicological Sciences*, 127: 348–359.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., Sato, J. (1982). Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium growth of human hepatoma cell lines with differentiated chemically defined medium. *Cancer Research*, 42: 3858–3863.
- National Toxicology Program (1978a). Bioassay of *o*-anisidine hydrochloride for possible carcinogenicity. *Technical Report Series US Department of Health and Human Services*, 89: 1–148.
- National Toxicology Program (1978b). Bioassay of *p*-anisidine hydrochloride for possible carcinogenicity. *Technical Report Series US Department of Health and Human Services*, 116: 1–115.
- Navarro, V.J., Barnhart, H., Bonkovsky, H.L., Davern, T., Fontana, R.J., Grant, L., Reddy, K.R., Seeff, L.B., Serrano, J., Sherker, A.H., Stolz, A., Talwalkar, J., *et al.* (2014). Liver injury from herbals and dietary supplements in the US drug induced liver injury network. *Hepatology*, 60: 1399–1408.
- Ng, W., Uetrecht, J. (2013). Changes in gene expression induced by aromatic amine drugs: testing the danger hypothesis. *Journal of Immunotoxicology*, 10: 178–191.
- Pachkoria, K., Lucena, M.I., Ruiz-Cabello, F., Crespo, E., Cabello, M.R., Andrade, R.J. (2007). Genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 are not related to drug-induced idiosyncratic liver injury (DILI). *British Journal of Pharmacology*, 150: 808–815.
- Park, B.K., Laverty, H., Srivastava, A., Antoine, D.J., Naisbitt, D., Williams, D.P. (2011). Drug bioactivation and protein adduct formation in the pathogenesis of drug-induced toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 192: 30–36.
- Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J., Raunio, H. (2008). Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of Toxicology*, 82: 667–715.

- Pessayre, D., Fromenty, B., Berson, A., Robin, M.A., Letteron, P., Moreau, R., Mansouri, A. (2012). Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. *Drug Metabolism Reviews*, 44: 34–87.
- Platzek, T., Krätke, R., Klein, G., Schulz, C. (2005). Cosmetic colorants. Toxicology and regulation. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 48: 76–83.
- Prakash, C., Sharma, R., Gleave, M., Nedderman, A. (2008). *In vitro* screening techniques for reactive metabolites for minimizing bioactivation potential in drug discovery. *Current Drug Metabolism*, 9: 952–964.
- Prescott, L.F. (2000). Paracetamol, alcohol and the liver. *Journal of Clinical Pharmacology*, 49: 291–301.
- Qin, Z. (2012). The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*, 221: 2–11.
- Reese, M., Sakatis, M., Ambroso, J., Harrell, A., Yang, E., Chen, L., Taylor, M., Baines, I., Zhu, L., Ayrton, A., Clarke, S. (2011). An integrated reactive metabolite evaluation approach to assess and reduce safety risk during drug discovery and development. *Chemico-Biological Interactions*, 192: 60–64.
- Reuben, A., Koch, D.G., Lee, W.M. (2010). Drug-induced acute liver failure: results of a U.S. multicenter, prospective study. *Hepatology*, 52: 2065–2076.
- Richter, E., Rösler, S., Scherer, G., Gostomzyk, J.G., Grübl, A., Krämer, U., Behrendt, H. (2001). Haemoglobin adducts from aromatic amines in children in relation to area of residence and exposure to environmental tobacco smoke. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 74: 421–428.
- Rodriguez, R.J., Acosta, D. (1997a). Metabolism of ketoconazole and deacetylated ketoconazole by rat hepatic microsomes and flavin-containing monooxygenases. *Drug Metabolism and Disposition*, 25: 772–777.
- Rodriguez, R.J., Acosta, D. (1997b). *N*-Deacetyl ketoconazole-induced hepatotoxicity culture system of rat hepatocytes. *Toxicology*, 117: 123–131.
- Rodriguez, R.J., Miranda, C.L. (2000). Isoform specificity of *N*-deacetyl ketoconazole by human and rabbit flavin-containing monooxygenases. *Drug Metabolism and Disposition*, 28: 1083–1086.
- Rodriguez, R.J., Proteau, P.J., Marquez, B.L., Hetherington, C.L., Buckholz, C.J., Connell, K.L.O. (1999). Flavin-containing monooxygenase-mediated metabolism of *N*-deacetyl ketoconazole by rat hepatic microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 27: 880–886.

- Roebuck, K.A., Finnegan, A. (1999). Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *Journal of Leukocyte Biology*, 66: 876–888.
- Rose, K.A., Holman, N.S., Green, A.M., Andersen, M.E., Lecluyse, E.L. (2016). Co-culture of hepatocytes and Kupffer cells as an *in vitro* model of inflammation and drug-induced hepatotoxicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105: 950–964.
- Roth, R.a., Ganey, P.E. (2011). Animal models of idiosyncratic drug-induced liver injury – current status. *Critical Reviews in Toxicology*, 41: 723–739.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L. (1959). The principles of humane experimental technique. London: Methuen.
- Russmann, S., Kullak-Ublick, G.a., Grattagliano, I. (2009). Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. *Current Medicinal Chemistry*, 16: 3041–3053.
- Sahin, H., Trautwein, C., Wasmuth, H.E. (2010). Functional role of chemokines in liver disease models. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 7: 682–690.
- Sapota, A., Czerski, B., Jedrzejczak, M. (2003). Tissue distribution, excretion and metabolism of *o*-anisidine in rats. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 16: 351–357.
- Sasaki, Y.F., Nishidate, E., Su, Y.Q., Matsusaka, N., Tsuda, S., Susa, N., Furukawa, Y., Ueno, S. (1998). Organ-specific genotoxicity of the potent rodent bladder carcinogens *o*-anisidine and *p*-cresidine. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 412: 155–160.
- Sassa, S., Sugita, O., Galbraith, R.A., Kappas, A. (1987). Drug metabolism by the human hepatoma cell, Hep G2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 143: 52–57.
- Scaffidi, P., Misteli, T., Bianchi, M.E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 418: 191–195.
- Schmidt, E.E. (2015). Interplay between cytosolic disulfide reductase systems and the Nrf2/Keap1 pathway. *Biochemical Society Transactions*, 43: 632–638.
- Shaw, P.J., Ganey, P.E., Roth, R.A. (2010). Idiosyncratic drug-induced liver injury and the role of inflammatory stress with an emphasis on an animal model of trovafloxacin hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, 118: 7–18.

- Shi, Y., Liu, C.H., Roberts, A.I., Das, J., Xu, G., Ren, G., Zhang, Y., Zhang, L., Yuan, Z.R., Tan, H.S.W., Das, G., Devadas, S. (2006). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Research*, 16: 126–133.
- Si-Tayeb, K., Noto, F., Nagaoka, M., Li, J. (2010). Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology*, 51: 297–305.
- Stabbert, R., Schäfer, K.H., Biefel, C., Rustemeier, K. (2003). Analysis of aromatic amines in cigarette smoke. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17: 2125–2132.
- Steuerwald, N.M., Foureau, D.M., Norton, H.J., Zhou, J., Parsons, J.C., Chalasani, N., Fontana, R.J., Watkins, P.B., Lee, W.M., Reddy, K.R., Stolz, A., Talwalkar, J., *et al.* (2013). Profiles of serum cytokines in acute drug-induced liver injury and their prognostic significance. *PLoS One*, 8: e81974.
- Stirnemann, G., Kessebohm, K., Lauterburg, B. (2010). Liver injury caused by drugs: an update. *Swiss Medical Weekly*, 140: 18–24.
- Syed, M., Skonberg, C., Honoré, S. (2016). Mitochondrial toxicity of diclofenac and its metabolites via inhibition of oxidative phosphorylation (ATP synthesis) in rat liver mitochondria: possible role in drug induced liver injury (DILI). *Toxicology in Vitro*, 31: 93–102.
- Taguchi, K., Motohashi, H., Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells*, 16: 123–140.
- Taylor, A., Faulkner, L., Naisbitt, D., Park, B. (2015). The chemical, genetic and immunological basis of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Human & Experimental Toxicology*, 34: 1310–1317.
- Tanaka, M., Itoh, T., Tanimizu, N., Miyajima, A. (2011). Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. *Journal of Biochemistry*, 149: 231–239.
- Temple, R. (2006). Hy's law: predicting serious hepatotoxicity. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 15: 241–243.
- Traore, K., Trush, M.a., George, M., Spannhake, E.W., Anderson, W., Asseffa, A. (2005). Signal transduction of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced growth inhibition of human monocytic leukemia THP-1 cells is reactive oxygen dependent. *Leukemia Research*, 29: 863–79.

- Tsuji, G., Takahara, M., Uchi, H., Matsuda, T., Chiba, T., Takeuchi, S., Yasukawa, F., Moroi, Y., Furue, M. (2012). Identification of ketoconazole as an AhR-Nrf2 activator in cultured human keratinocytes: the basis of its anti-inflammatory effect. *The Journal of Investigative Dermatology*, 132: 59–68.
- Turpeinen, M., Tolonen, A., Chesne, C., Guillouzo, A., Uusitalo, J., Pelkonen, O. (2009). Functional expression, inhibition and induction of CYP enzymes in HepaRG cells. *Toxicology in Vitro*, 23: 748–753.
- Utrecht, J. (1999). New concepts in immunology relevant to idiosyncratic drug reactions: the “danger hypothesis” and innate immune system. *Chemical Research in Toxicology*, 12: 387–395.
- Utrecht, J. (2010). *Adverse Drug Reactions*, volume 196 of *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, Heidelberg; London, 1. Edition.
- Valerio, L.G., Long, A. (2010). The *in silico* prediction of human-specific metabolites from hepatotoxic drugs. *Current Drug Discovery Technologies*, 7: 170–187.
- Vignati, L., Turlizzi, E., Monaci, S., Grossi, P., Kanter, R.D., Monshouwer, M. (2005). An *in vitro* approach to detect metabolite toxicity due to CYP3A4-dependent bioactivation of xenobiotics. *Toxicology*, 216: 154–167.
- Vohr, H.W. (2012). *Toxikologie: Band 2 - Toxikologie der Stoffe*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 1. Edition.
- Wang, X., Sun, R., Wei, H., Tian, Z. (2013). High-mobility group box 1 (HMGB1)-Toll-like receptor (TLR) 4-interleukin (IL)-23-IL-17A axis in drug-induced damage-associated lethal hepatitis: interaction of  $\gamma\delta$  T cells with macrophages. *Hepatology*, 57: 373–384.
- Wang, Y., Qu, A., Wang, H. (2015). Signal transducer and activator of transcription 4 in liver diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 11: 448–455.
- Wangenheim, J., Bolcsfoldi, G. (1988). Mouse lymphoma L5178Y thymidine kinase locus assay of 50 compounds. *Mutagenesis*, 3: 193–205.
- Wanninger, J., Neumeier, M., Weigert, J., Bauer, S., Weiss, T.S., Schaffler, A., Krempl, C., Bleyl, C., Aslanidis, C., Scholmerich, J., Buechler, C. (2009). Adiponectin-stimulated CXCL8 release in primary human hepatocytes is regulated by ERK1/ERK2, p38 MAPK, NF- $\kappa$ B, and STAT3 signaling pathways. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology*, 297: G611–G618.

- Wei, G., Bergquist, A., Broomé, U., Lindgren, S., Wallerstedt, S., Almer, S., Sangfelt, P., Danielsson, Å., Sandberg-Gertzén, H., Löf, L., Prytz, H., Björnsson, E. (2007). Acute liver failure in Sweden: etiology and outcome. *Journal of Internal Medicine*, 262: 393–401.
- Wewering, F., Jouy, F., Wissenbach, D.K., Gebauer, S., Blüher, M., Gebhardt, R., Pirow, R., von Bergen, M., Kalkhof, S., Luch, A., Zellmer, S. (2017). Characterization of chemical-induced sterile inflammation *in vitro*: application of the model compound ketoconazole in a human hepatic co-culture system. *Archives of Toxicology*, 91: 799–810.
- Wurster, A.L., Tanaka, T., Grusby, M.J. (2000). The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene*, 19: 2577–2584.
- Yamada, Y., Fausto, N. (1998). Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *The American Journal of Pathology*, 152: 1577–1589.
- Yuan, Y., Liu, J., Liu, T., He, Y., Zhang, Z., Jiang, C., Qian, Q. (2010). Chemokine CCL3 facilitates the migration of hepatoma cells by changing the concentration intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Hepatology Research*, 40: 424–431.
- Zeiger, E. (1987). Carcinogenicity of mutagens: predictive capability of the *Salmonella* mutagenesis assay for rodent carcinogenicity. *Cancer Research*, 47: 1287–1296.
- Zeng, C.W., Wang, W.T., Yu, X.B., Yang, L.J., Chen, S.H., Li, Y.Q. (2015). Pathways related to PMA-differentiated THP1 human monocytic leukemia cells revealed by RNA-Seq. *Science China Life Sciences*, 58: 1282–1287.
- Zimmermann, H.W., Seidler, S., Gassler, N., Nattermann, J., Luedde, T., Trautwein, C., Tacke, F. (2011). Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. *PLoS One*, 6: e21381.

# 11 Publikationsliste

## 11.1 Publikationen

**Wewering, F.**, Jouy, F., Wissenbach, D. K., Gebauer, S., Blüher, M., Gebhardt, R., Pirow, R., von Bergen, M., Kalkhof, S., Luch, A., Zellmer, S. (2017). Characterization of chemical-induced sterile inflammation in vitro: application of the model compound ketoconazole in a human hepatic co-culture system. *Archives of Toxicology*, 91:799–810 [Epub ahead of print 2016 Mar 10].

**Wewering, F.**, Jouy, F., Caliskan, S., von Bergen, M., Kalkhof, S., Luch, A., Zellmer, S. (2017). Hepatic co-cultures *in vitro* reveal suitable to detect Nrf2-mediated oxidative stress responses on the bladder carcinogen *o*-anisidine. *Toxicology in Vitro*, 40:153–160.

## 11.2 Konferenzbeiträge

**Wewering, F.** (2016). A human hepatic co-culture system for the analysis of cell-cell interactions in vitro. *Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Berlin, Vortrag*; Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, doi: 10.1007/s00210-016-1213-y.

**Wewering, F.**, Jouy, F., Wissenbach, D. K., Gebauer, S., von Bergen, M., Kalkhof, S., Luch, A., Zellmer, S. (2016). A human hepatic in vitro co-culture system for the analysis of DILI-related signaling. *Jahrestagung der deutschen Gesellschaft zum Studium der Leber 2016, Düsseldorf, Poster*; Z Gastroenterol, 53:A1\_6, doi: 10.1055/s-0035-1567936.

**Wewering, F.**, Jouy, F., Wissenbach, D. K., Gebauer, S., Blüher, M., von Bergen, M., Kalkhof, S., Luch, A., Zellmer, S. (2015). Establishment of an in vitro co-culture system to study signaling pathways in “drug-induced liver injury” (DILI). *Jahrestagung der Signal Transduction Society 2015, Weimar, Poster*.

**Wewering, F.**, Luch, A., Zellmer, S. (2015). An in vitro system for the identification of DILI-related signaling? *Jahrestagung der deutschen Gesellschaft zum Studium der Leber 2015, München, Poster*, Z Gastroenterol, 53:A1\_6, doi: 10.1055/s-0034-1397047.

Caliskan, S., **Wewering, F.**, Gerding, B., Luch, A., Zellmer, S. (2015). Cytotoxicity of anisidine in hepatic cell lines. *Jahrestagung der deutschen Gesellschaft zum Studium der Leber 2015, München, Poster*; Z Gastroenterol, 53:A3\_10, doi: 10.1055/s-0034-1397131.

**Wewering, F.**, Hempt, C., Luch, A., Zellmer, S. (2014). Establishment of an in vitro co-culture system to study signaling pathways in “drug-induced liver injury” (DILI). *Jahrestagung der Signal Transduction Society 2014, Weimar, Poster*.

**Rohr, F.**, Hempt, C., Luch, A., Zellmer, S. (2014). Development of an in vitro co-culture system to assess the DILI-related potential of drugs. *Jahrestagung der deutschen Gesellschaft zum Studium der Leber 2014, Tübingen, Poster*; Z Gastroenterol, 52:P\_1\_10, doi: 10.1055/s-0033-1360854

Potratz, S., **Rohr, F.**, Krüger, A., Zellmer, S., Jungnickel, H., Hengstler, J., Luch, A. (2013). Drug-induced alterations in the metabolome of primary hepatocytes. *Jahrestagung der deutschen Gesellschaft zum Studium der Leber 2013, Hannover, Poster*; Z Gastroenterol, 51:P\_2\_23, doi: 10.1055/s-0032-1331986.

### 11.3 Weitere Publikationen

Nagel, S., **Rohr, F.**, Weber, C., Kier, J., Siemers, F., Kruse, C., Danner, S., Brandenburger, M., Matthiessen, A.E. (2013). Multipotent nestin-positive stem cells reside in the stroma of human eccrine and apocrine sweat glands and can be propagated robustly in vitro. *PLoS One*, 8: e78365.

## 12 Danksagung

Prof. Dr. Dr. Andreas Luch danke ich für die Möglichkeit, meine Promotion am Bundesinstitut für Risikobewertung in der Abteilung für Chemikalien- und Produktsicherheit anfertigen zu können.

Ich danke Prof. Dr. Sarah Hedtrich für die Übernahme des 2. Gutachtens und die Vertretung dieser Arbeit im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Sebastian Zellmer, der dieses Projekt initiiert und betreut hat, immer für Diskussionen zur Verfügung stand und mich mit unerschütterlichem Optimismus stets neu motiviert hat.

Ein großes Dankeschön an Barbara Gerding, die mir eine große Hilfe im Labor war und mit der niemals Langeweile aufkam.

Dieses Projekt war auch dank sehr guter Kooperationen so erfolgreich. Daher möchte ich unseren Partnern am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung danken, besonders Martin von Bergen, Stefan Kalkhof, Florent Jouy, Dirk Wissenbach und Scarlett Gebauer. Der Arbeitsgruppe von Prof. Gebhardt der Universität Leipzig danke ich für die primären Hepatozyten und die spannende Zeit in ihrem Labor.

Vielen Dank auch an meine Zimmergenossin Sarah Potratz für Diskussionen um Wissenschaftliches und Nichtwissenschaftliches. Mit dir war die Zeit lustiger und sportlicher.

Ein besonderes Dankeschön geht an Stefanie Jeschke, die das Labor mit ihrer effizienten und kollegialen Arbeitsweise am Laufen hielt.

Ein großer Dank geht an das gesamte Team der Abteilung 7 für die gute Zusammenarbeit, das gemeinsame Suchen, Finden, Tippsgeben und -nehmen, Kaffee und Schoki bereitstellen – kurz: für die schönen Stunden innerhalb und außerhalb des Labors.

Danke auch an die Praktikanten und Studenten, mit denen ich zusammengearbeitet habe, insbesondere an Sükran, Sarah und Minh – viel Erfolg für euren weiteren Weg.

Ich danke meinen Eltern und Großeltern, die immer an mich geglaubt und mich zu jeder Zeit unterstützt haben.

Um alles aufzulisten, wofür ich Philipp danke, bräuchte ich noch mehrere Seiten. Deine unerschöpfliche Geduld und immerwährende Unterstützung sorgten dafür, dass diese Arbeit wirklich beendet wurde.

# Anhang A

Anhang A wurde aus urheberrechtlichen Gründen in der Onlineversion entfernt.  
Er ist unter folgendem Link zu finden: <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-016-1686-y>

## **Anhang B**

Anhang B wurde aus urheberrechtlichen Gründen in der Onlineversion entfernt.  
Er ist unter folgendem Link zu finden: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.01.006>