

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Induktion der CYP3A4-mRNA-Bildung in den Zelllinien HepG2 und  
Colo320 durch antiretrovirale Medikamente

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ina Lieker

aus Dessau

Datum der Promotion: 12.09.2014

# Inhaltsverzeichnis

<i>Kurzzusammenfassung</i> .....	1
<i>Abstract</i> .....	3
<b>I. Einleitung</b> .....	4
<b>1.1. Cytochrom P450 3A4</b> .....	4
1.1.1. Expression und Regulation von CYP3A4 durch Kernrezeptoren .....	6
<b>1.2. Antiretrovirale Wirkstoffe</b> .....	9
1.2.1. Nukleosid-/Nukleotidanaloge Reverse-Transkriptase-Inhibitoren .....	11
1.2.2. Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren .....	12
1.2.3. Proteaseinhibitoren .....	13
1.2.4. Neue antiretrovirale Wirkstoffe .....	14
<b>1.3. Antiretrovirale Wirkstoffe und Cytochrom P450 3A4</b> .....	15
<b>II. Aufgabenstellung</b> .....	17
<b>III. Material und Methoden</b> .....	18
<b>3.1. Materialien</b> .....	18
<b>3.2. Methoden</b> .....	21
3.2.1. Zellkultur .....	21
3.2.2. Testsubstanzen .....	21
3.2.3. Inkubation der Zellen mit den Testlösungen .....	22
3.2.4. Laktatdehydrogenase (LDH)-Test .....	24
3.2.5. Extraktion zellulärer RNA aus Zellkulturen .....	24
3.2.6. Reverse-Transkriptase-Echtzeit-PCR .....	25
3.2.7. Statistische Auswertung .....	27
<b>IV. Ergebnisse</b> .....	28
<b>4.1. CYP3A4-mRNA-Gehalt in den Zellkulturen</b> .....	28
<b>4.2. Einfluss der Passagezahl auf den CYP3A4-mRNA-Gehalt</b> .....	29
<b>4.3. Rifampicin</b> .....	30
<b>4.4. Antiretrovirale Wirkstoffe</b> .....	32
4.4.1. Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) .....	32
4.4.2. Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren .....	32
4.4.3. Proteaseinhibitoren .....	35
<b>4.5. Grad der CYP3A4-Induktion in den Zellkulturen</b> .....	41
<b>V. Diskussion</b> .....	44
<b>5.1. Rifampicin als Induktor</b> .....	47

<b>5.2. Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren</b> .....	49
<b>5.3. Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren</b> .....	50
5.3.1. Delavirdin .....	50
5.3.2. Efavirenz .....	51
5.3.3. Nevirapin .....	51
<b>5.4. Proteaseinhibitoren</b> .....	52
5.4.1. Amprenavir .....	53
5.4.2. Indinavir .....	54
5.4.3. Lopinavir/Ritonavir (Kaletra®) .....	55
5.4.4. Nelfinavir .....	56
5.4.5. Ritonavir .....	57
5.4.6. Saquinavir .....	58
<b>VI. Zusammenfassung</b> .....	61
<b>6.1 Schlussfolgerung</b> .....	61
<b>6.2. Weitere Forschungsansätze</b> .....	62
<b>VII. Literatur</b> .....	63
<b>VIII. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	77
<b>IX. Anhang</b> .....	79
Eidesstattliche Versicherung .....	79
Lebenslauf .....	80
Publikationsliste .....	81
<b>X. Danksagung</b> .....	82

# Induktion der CYP3A4-mRNA-Bildung in den Zelllinien HepG2 und Colo320 durch antiretrovirale Medikamente

## *Kurzzusammenfassung*

Das primäre Ziel dieser Arbeit ist es, In-Vitro nachzuweisen, dass antiretrovirale Wirkstoffe verschiedener Substanzklassen die Bildung der CYP3A4-mRNA in den Zelllinien HepG2 und Colo320 induzieren können. Zusätzlich wurde die CYP3A4-Expression in verschiedenen Zellkulturen anhand der mRNA-Bestimmung untersucht.

Für die Versuchsreihe wurden die Zelllinien HeLa, HepG2, Caco-2, Colo320 und humanes Lebergewebe auf ihren Gehalt an CYP3A4-mRNA getestet. Die Inkubationsversuche wurden mit den Zelllinien HepG2 und Colo320 durchgeführt. Getestet wurden die antiretroviralen Substanzen Abacavir, Amprenavir, Zidovudin Didanosin, Stavudin, Saquinavir, Zalcitabin, Efavirenz, Nevirapin, Delavirdin, Indinavir, Lopinavir/Ritonavir und Nelfinavir. Als Referenzsubstanz für die Wirkung auf die CYP3A4-mRNA-Bildung wurde der bekannte CYP3A4-Induktor Rifampicin eingesetzt. Die Inkubationsversuche erfolgten auf Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten. Jede Kavität enthielt etwa eine Million Zellen. Die Zellen wurden 20 Stunden bei 37°C mit der Testsubstanz in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die gesamte RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA konvertiert. Die Quantifizierung der CYP3A4-mRNA erfolgte mittels Real-Time-PCR am LightCycler (Roche) über einen externen Standard, der in der Sequenz mit der gemessenen CYP3A4-mRNA identisch war.

Die untersuchten nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (Abacavir, Didanosin, Lamivudin, Stavudin, Zalcitabin und Zidovudin) induzierten die Bildung von CYP3A4-mRNA nicht. In der Gruppe der nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren konnte für die Substanzen Efavirenz und Delavirdin eine signifikante Induktion der CYP3A4-Expression nachgewiesen werden, nicht jedoch für Nevirapin. Für die untersuchten Proteaseinhibitoren Amprenavir, Indinavir, Nelfinavir, Ritonavir und Saquinavir konnte eine Induktion der CYP3A4-Expression in den Zelllinien HepG2 und Colo320 gezeigt werden. Die Substanzkombination des Proteaseinhibitors Kaletra® (Lopinavir/Ritonavir) führte in HepG2-Zellen nicht, jedoch in Colo320-Zellen, zur Induktion der CYP3A4-Genexpression. In den hier dargestellten Versuchen konnte gezeigt werden, dass der CYP3A4-mRNA-Gehalt in Zellen der Zelllinie HepG2 mit zunehmender Passagezahl abnimmt. Auch konnte nachgewiesen werden, dass die

Zelllinien HepG2 und Colo320 geringere Mengen an CYP3A4-mRNA als Zellen humanen Lebergewebes enthalten.

Die in dieser Arbeit dargestellten Inkubationsversuche wurden erstmalig mit den Zelllinien HepG2 und Colo320 durchgeführt. Mit dieser Arbeit gelang es zum Zeitpunkt der Experimente eine induktive Potenz für die untersuchten Proteaseinhibitoren nachzuweisen. So zeigen die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeit trotz der bekannten inhibitorischen Wirkung der Proteaseinhibitoren eine Zunahme des CYP3A4-mRNA in den Zellen und somit ein wenn auch schwach ausgeprägtes induktives Potential der Wirkstoffe. Dabei handelt es sich bei den verwendeten Zelllinien nur um Modelle, die sich auf Grund der unterschiedlichen Genmuster von humanen Leberzellen oder Darmepithelzellen unterscheiden und nicht 1:1 auf den Menschen übertragen werden können.

# Induction of CYP3A4 mRNA in the cell lines HepG2 and Colo320 by antiretroviral drugs

## *Abstract*

The primary objective of this work is to demonstrate *in vitro* that antiretroviral drugs can induce CYP3A4 mRNA in cell cultures. In addition, the CYP3A4 expression in various cell cultures was examined by determination of the CYP3A4-mRNA in these cultures. For the series of experiments, the cell lines HeLa, HepG2, Caco-2, Colo320 and human liver cells were tested for their content of CYP3A4-mRNA. The incubation experiments were carried out using the cell lines HepG2 and Colo320. We tested the antiretroviral drugs abacavir, amprenavir, zidovudine, didanosine, stavudine, saquinavir, zalcitabine, efavirenz, nevirapine, delavirdine, indinavir, lopinavir/ritonavir and nelfinavir. As a reference substance for the induction the well known CYP3A4-inducer rifampicin was used. The incubation experiments were carried out in cell culture 6-well-plates. Each well contained approximately one million cells. The Cells were treated with the test substances in various concentrations. After an incubation period of 20 hours at 37°C, the total RNA was isolated from the cells and converted to cDNA. Quantifying the CYP3A4 mRNA was carried out by using real-time PCR with the LightCycler-System (Roche). An external standard that was identical in sequence to the measured CYP3A4 mRNA was used to quantify the mRNA amount.

The investigated nucleoside reverse transcriptase inhibitors (abacavir, didanosine, lamivudine, stavudine, zalcitabine, and zidovudine) did not induce the formation of CYP3A4-mRNA in the investigated cell lines. In the group of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, a significant induction of CYP3A4 expression could be demonstrated for the substances efavirenz and delavirdine, but not for nevirapine. For the investigated protease inhibitors amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir and saquinavir induction of CYP3A4 expression in the cell lines HepG2 and Colo320 could be shown. The compound of the protease inhibitor Kaletra® (lopinavir/ritonavir) did not induce the CYP3A4 gene expression in HepG2 cells but it did in Colo320 cells. The presented experiments demonstrate that the CYP3A4-mRNA content decreases in the cells of the cell line HepG2, with increasing passage number. It was also demonstrated that the cell lines HepG2 and Colo320 contain lower amounts of CYP3A4 mRNA than cells of human liver tissue. With this study it was possible at the time of the experiments to prove an inductive power for the investigated protease inhibitors and some of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. Despite the well known inhibitory effect of protease inhibitors *in vivo*, these study present *in vitro* an increase of CYP3A4-mRNA in cell-lines.

# **I. Einleitung**

In der vorliegenden Arbeit wurden einzelne Wirkstoffe aus der Gruppe der Proteaseinhibitoren, der nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren und nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren auf ihre Fähigkeit, die CYP3A4-mRNA-Bildung zu induzieren, untersucht. Proteaseinhibitoren, nukleosidische und nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren sind antiretrovirale Wirkstoffe.

Das Cytochrom-P450-Enzymsystem spielt eine zentrale Rolle im Abbau und in der Ausscheidung körperfremder Stoffe im menschlichen Körper. Die Cytochrom-P450-Enzyme bilden eine Superfamilie, welche am Metabolismus unterschiedlichster chemischer Substanzen im menschlichen Organismus beteiligt ist. Diese Substanzen umfassen endogene Stoffe und Xenobiotika und schließen Medikamente, Karzinogene und Umweltschadstoffe ein [1]. Dabei arbeiten die Cytochrom-P450-Enzyme als „Wächter“, um schädliche Stoffe schnell aus dem Organismus zu entfernen und damit den Körper zu schützen. Eine zentrale Rolle im Arzneistoffwechsel nimmt Cytochrom P450 3A4 ein, das über 50% der aktuell klinisch eingesetzten Medikamente verstoffwechselt [2].

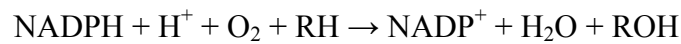
Arzneimittelinteraktionen, die auf eine Induktion oder Hemmung des Cytochrom-P450-Systems zurückzuführen sind, können zu einer schwächeren Wirkung oder einem Wirkverlust des verabreichten oder eines zusätzlich gegebenen Medikamentes führen. Als Folge kann es zu einer Schädigung des Patienten und in einigen Fällen sogar zum Tod des Patienten kommen [3]. Um diese Gefahren zu erkennen und bei der Kombination von Medikamenten zu berücksichtigen, ist es von großer Bedeutung, die Wirkung der verwendeten Substanzen auf das Cytochrom-P450-Enzymsystem zu kennen und zu erforschen.

## **1.1. Cytochrom P450 3A4**

Cytochrom P450 wurde erstmals 1964 beschrieben. Es ist ein eisenhaltiges Protein, das an Redoxreaktionen beteiligt ist. Redoxreaktionen sind chemische Reaktionen, bei denen ein Reaktionspartner Elektronen auf einen anderen Reaktionspartner überträgt.

Nach seinem Reaktionsmechanismus wird Cytochrom P450 der Gruppe der Monooxygenasen zugeordnet. Monooxygenasen sind Enzyme, die den Einbau eines Sauerstoffatoms aus O<sub>2</sub> in ihr Substrat katalysieren.

Dabei katalysiert das Cytochrom-P450-Enzymsystem eine mischfunktionelle Oxidationsreaktion, welche der Gleichung



folgt.

Dabei repräsentiert RH das oxidierbare Substrat und ROH den hydroxilierten Metaboliten [4]. Cytochrom P450 kommt ubiquitär in allen Lebewesen vor. Es ist hauptsächlich in der Leber lokalisiert, wird aber auch in den meisten Geweben gefunden [5]. Hohe Konzentrationen finden sich im Gastrointestinaltrakt und in der Lunge. In Säugetieren sind alle Cytochrom- P450-Enzyme membrangebunden. Die meisten Mitglieder der Enzymfamilie lassen sich im endoplasmatischen Retikulum nachweisen, einige wenige sind primär in den Mitochondrien lokalisiert [6].

Die Cytochrom-P450-Superfamilie besteht aus 10 Genfamilien. CYP3A4 ist Mitglied der Subfamilie 3A, zu der außerdem noch CYP3A3 [7], CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 und CYP3A43 gehören. Die Gene sind hintereinander auf dem Chromosom 7 angeordnet und entstanden vermutlich durch Genduplikationen [8]. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz beträgt innerhalb der CYP3A-Subfamilie mindestens 85% [7]. Die Unterschiede zwischen CYP3A3 und CYP3A4 sind so gering, dass sie funktionell vernachlässigt werden können und diese beiden Isoenzyme nicht mehr unterschieden werden [7].

CYP3A4 ist beim Erwachsenen quantitativ das wichtigste Cytochrom-P450-Enzym [7]. Es kommt vor allem in der Leber (95%) und im Dünndarm vor [7, 8]. Hier ist es in den präsystemischen (First-Pass-Metabolismus) und systemischen Metabolismus [7, 9] involviert. CYP3A4 ist an der Verstoffwechslung von annähernd 50% der klinisch verwendeten Wirkstoffe beteiligt und hat die größte Substratbreite aller Cytochrom-P450-Enzyme. Zu den Substraten gehören neben Arzneistoffen auch Steroide, Karzinogene, Pestizide und andere Fremdstoffe [10]. Die CYP3A4-Aktivität ist individuell unterschiedlich. Ursache hierfür sind hauptsächlich genetische Varianten des Enzymes, die zu unterschiedlicher Induzierbarkeit führen.



Tabelle 1: Die in dieser Arbeit getesteten Substrate von CYP3A4 und ihr CYP3A4-induzierendes bzw. -inhibitorisches Potenzial im menschlichen Organismus .

Wirkstoffgruppe	Substrate	Induktion	Inhibition	Referenzen
Tuberkulostatika	Rifampicin	+	-	[11-13]
Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren	Delavirdin	+	+	[9, 14]
	Efavirenz	+	+	[9, 13-15]
	Nevirapin	+	+	[9, 14, 16]
	Etravirin	+	-	[17]
Proteaseinhibitoren	Ritonavir	+	+	[18, 19]
	Indinavir	-	+	[18]
	Saquinavir	-	+	[18]
	Nelfinavir	+	+	[19]
	Amprenavir	+	+	[18, 20-24]
	Lopinavir	-	-	[25]

### 1.1.1. Expression und Regulation von CYP3A4 durch Kernrezeptoren

CYP3A4 wird besonders stark in den Hepatozyten und im Gastrointestinaltrakt exprimiert. Die Induktion von CYP3A4 erfolgt auf der Transkriptionsebene und wird hauptsächlich durch die beiden Kernrezeptoren, den Pregnan-X-Rezeptor (PXR) und den konstitutiven Androstan-Rezeptor (CAR), vermittelt [26, 27]. Eine indirekte Vermittlung durch den Glukokortikoidrezeptor wird ebenfalls diskutiert [28, 29].

Der Pregnan-X-Rezeptor wurde 1998 erstmalig beschrieben. Er ist in der Lage, eine Vielzahl von Steroiden, Steroidmetaboliten, pharmakologisch wichtigen Wirkstoffen und eine große Anzahl von Xenobiotika zu binden [30]. Der Pregnan-X-Rezeptor gehört zur Kernrezeptorfamilie der Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren, welche Rezeptoren für Steroid-, Retinoid- und Schilddrüsenhormone einschließt [31]. Die genomische Struktur des menschlichen PXR-Gens befindet sich auf dem Chromosomenabschnitt 3q13-21, besteht aus 10 Exons und 9 Introns und erstreckt sich über 30 kb genomischer DNA [32, 33]. Die Expression des Rezeptors erfolgt überwiegend in der Leber und etwas schwächer im Dünndarm [26, 34, 35].

Im Gegensatz zu den meisten anderen Kernrezeptoren, welche spezifisch für eine Hormongruppe sind, wird der PXR durch eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher Liganden aktiviert [31]. Zu den Induktoren zählen bekannte CYP3-Aktivatoren, wie z. B. Rifampicin [26, 36], und der Proteaseinhibitor Ritonavir [37]. Nach der Aktivierung durch ein Agens bindet der aktivierte Rezeptor an den entsprechenden DNA-Ort (siehe Abbildung 2) und führt zu einer Induktion der Transkription des betreffenden Gens. Zu den Zielgenen des Rezeptors gehören die CYP-Familien

CYP3A, CYP2B und CYP2C, die Glutathion-S-Transferase, das P-Glycoprotein-kodierende ABCB1-Gen und das Multidrug-Resistenz-assoziierte Protein [30].

Die promiskuitive Natur der PXR-Bindung an so viele verschiedene Xenobiotika lässt vermuten, dass PXR als ein unspezifischer Xenobiotika-Sensor arbeitet [30]. Es konnte eine erhebliche interindividuelle Variabilität der Expression nachgewiesen werden. Die Expression korrelierte mit der Expression des CYP3A4-Enzyms in der Leber und im Darm. Der Promotorbereich des CYP3A4-Gens enthält entsprechende Erkennungssequenzen für den PX- und den CA-Rezeptor [36]. Die Liganden tragen meist ein steroidales Grundgerüst und binden an Rezeptoren im Zytoplasma. Nach einer Translokation der Rezeptoren in den Zellkern erfolgt die Bildung von Dimeren mit anschließender Bindung an die DNA. CYP3A4 wird daraufhin transkribiert und das Protein translatiert.

Die Induktion durch ein systemisch verabreichtes CYP3A4-Substrat benötigt zum Erreichen des vollständigen Effekts wenige Tage bis 2-3 Wochen. Dabei ist der zeitliche Verlauf unter anderem abhängig vom induzierenden Agens und dessen Konzentration. Die Hemmung des Enzyms erfolgt meist posttranskriptionell und tritt, im Gegensatz zur Induktion, sofort auf [9].

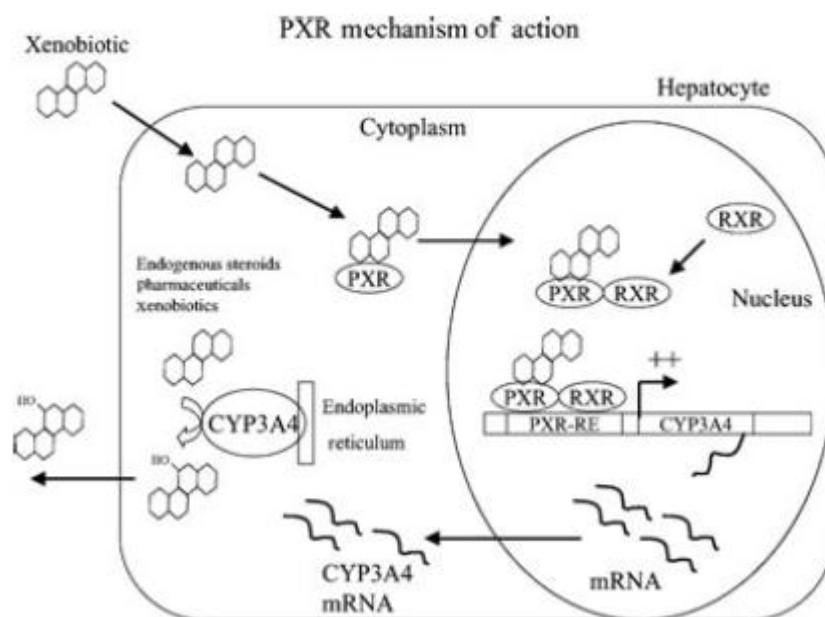


Abb. 1: Schematisches Modell der Bindung eines Xenobiotikums und Aktivierung des PX-Rezeptors, die zur CYP3A4-Induktion führt [30].

Genexpression und enzymatische Aktivität von CYP3A4 sind von erheblicher interindividueller und geschlechtsspezifischer Variabilität [38, 39]. Die Gründe für die interindividuelle Variabili-

tät sind bisher noch unklar. Als mögliche Ursache wird eine individuelle Regulation der Genexpression durch Induktionsprozesse und genetische Polymorphismen diskutiert [40]. Durch die hohe intraindividuelle Expressionsvariabilität und das breite Spektrum an Substraten, Induktoren und Inhibitoren von CYP3A4 besteht die Gefahr der Entwicklung klinisch relevanter unerwünschter Arzneimittelwechselwirkungen.

Die Verstoffwechslung antiretroviraler Substanzen erfolgt zu einem großen Teil über das Enzym Cytochrom P450 3A4. Damit sind diese Substanzen ein potentieller Ligand des PX-Rezeptors, was zu einer Induktion der CYP3A4-mRNA-Bildung führen kann. Die mit der Induktion von CYP3A4 einhergehende erhöhte Enzymaktivität kann zu einem schnelleren Wirkungsverlust eines Arzneistoffs führen. Im Extremfall werden wirksame Spiegel nach Gabe der Standarddosis nicht mehr erreicht. Bezogen auf eine antiretrovirale Therapie kann das bedeuten, dass die Virusinfektion nicht unter Kontrolle gehalten werden kann und sich evtl. Resistenzen ausbilden. Das Wissen um die induktiven Eigenschaften der einzelnen Wirkstoffe in Bezug auf CYP3A4 ist deshalb für die antiretrovirale Therapie von großer Bedeutung.

Tabelle 2: Bekannte Induktoren der CYP-Enzyme und deren Aktivierungsweg am Beispiel der in dieser Arbeit untersuchten Wirkstoffe.

Enzym	Induktor	Involvierter Rezeptor	Referenzen
CYP1A2	Ritonavir/ Lopinavir	PXR	[41]
CYP2B2	Rifampicin	PXR	[42]
CYP2B6	Rifampicin	PXR	[43]
	Ritonavir	PXR	[43]
CYP2C8	Rifampicin	CAR/ PXR	[44]
CYP2C9	Rifampicin	CAR/ PXR	[41, 44]
	Ritonavir	PXR	[41]
	Lopinavir	PXR	[41]
CYP2C19	Rifampicin	CAR/ PXR	[44]
	Ritonavir	PXR	[41]
	Lopinavir	PXR	[41]
CYP3A4	Amprenavir	PXR	[45]
	Efavirenz	PXR	[46]
	Indinavir	CAR	[47]
	Lopinavir	PXR	[48]
	Ritonavir	PXR	[41]
	Saquinavir	PXR	[45, 49]

## 1.2. Antiretrovirale Wirkstoffe

Antiretrovirale Wirkstoffe zählen zu den Virostatika und sind gegen Retroviren (Reverse Transkriptase Onkoviren) wirksam. Zu der Gruppe der humanpathogenen Retroviren gehört neben dem humanen T-lymphotropen Virus (HTLV) auch das humane Immundefizienz-Virus (HIV). Das HI-Virus ist Erreger des erworbenen Immundefizienzsyndroms (AIDS), während HTLV Erreger der adulten T-Zell-Leukämie [50] ist. Die Erbinformation der Retroviren liegt in Form einer einsträngigen Ribonukleinsäure (RNA) vor. Eine Besonderheit der Retroviren ist die Reverse Transkriptase, ein Enzym, mit dessen Hilfe aus der Virus-RNA bei Infektion der Wirtszelle eine DNA-Kopie erstellt und anschließend in das Wirtsgenom eingebaut werden kann.

Antiretrovirale Wirkstoffe hemmen die Entwicklung des Retrovirus in verschiedenen Phasen seiner Replikation. Sie werden überwiegend in der Therapie der HIV-Infektion eingesetzt. Zurzeit sind in Europa 23 antiretrovirale Wirkstoffe zur HIV-Therapie zugelassen (Stand 2014) [14, 51]. Die Reverse Transkriptase ist dabei ein attraktives Ziel in der Entwicklung antiretroviraler Wirkstoffe, da der Mensch kein entsprechendes Enzym hat [52]. Nach der Phase, in der sie in den Infektionszyklus eingreifen, unterscheidet man Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, Proteaseminhibitoren (PI), Fusionsinhibitoren, CCR5-Korezeptor-Antagonisten und Integraseinhibitoren. Die Gruppe der Reverse-Transkriptase-Inhibitoren wird nochmals in nukleosidanaloge/nukleotidanaloge Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) und nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI) unterteilt (s. Tabelle 3) [14, 53, 54].

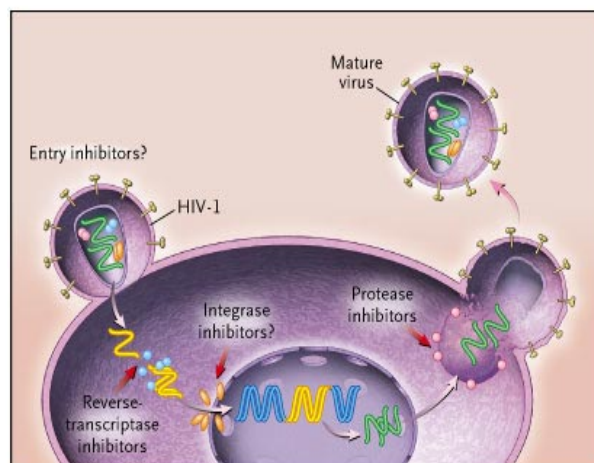


Abb. 2: Potentielle Ansatzpunkte der antiretroviralen Therapie am Beispiel des Lebenszyklus des humanen Immundefizienzvirus (HIV-1)[55].

Im Folgenden wird ausführlicher auf die in dieser Arbeit verwendeten Substanzklassen eingegangen.

Tabelle 3: International zugelassene Wirkstoffe gegen HIV mit EU-Zulassung (Stand 2014)

<b>Wirkstoff</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Zulassung durch die FDA</b>
<b>Nukleosidanaloge Reverse-Transkriptase-Inhibitoren</b>		
Abacavir	ABC	1998
Didanosin	ddI	1991
Emtricitabin	FTC	2003
Lamivudin	3TC	1995
Stavudin	D4T	1994
Zidovudin	ZDV, AZT	1987
<b>Nukleotidanaloge Reverse-Transkriptase-Inhibitoren</b>		
Tenofovir	TDF	2001
<b>Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren</b>		
Efavirenz	EFV	1998
Etravirin	ETV	2008
Nevirapin	NVP	1996
Rilpivirin	RPV	2011
<b>Proteaseinhibitoren</b>		
Atazanavir	ATV	2003
Darunavir	DRV	2006
Fosamprenavir	FAPV	2003
Indinavir	IDV	1996
Lopinavir/Ritonavir	LPV/r	2000
Nelfinavir	NFV	1997
Ritonavir	RTV	1996
Saquinavir	SQV	1995
Tipranavir	TPV	2005
<b>Fusionsinhibitoren</b>		
Enfuvirtid	T-20	2003
<b>CCR5-Korezeptor-Antagonisten</b>		
Maraviroc	MVC	2007
<b>Integraseinhibitoren</b>		
Raltegravir	RGV	2007

### 1.2.1. Nukleosid-/Nukleotidanaloge Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

Die ersten Wirkstoffe, die in der Therapie der HIV-Infektion angewendet wurden, waren NRTIs. 1987 wurde Zidovudin als erster Vertreter dieser Klasse von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen [14]. NRTIs haben die Reverse Transkriptase des Retrovirus zum Ziel und wirken als „Kettenabbrecher“ bei der viralen DNA-Replikation [14]. Als Pro-Drugs benötigen sie eine intrazelluläre Phosphorylierung zum aktiven Didesoxynukleosidtriphosphat. Dieser aktive Metabolit konkurriert mit Desoxynukleosidtriphosphat, dem natürlichen Substrat der Reverse Transkriptase, um den Einbau in die neu zu synthetisierende pro-virale DNA [9]. NRTIs ähneln in ihrer Struktur den natürlich vorkommenden Desoxyribonucleosiden. Da ihnen jedoch eine 3'-Hydroxylgruppe fehlt, verhindern sie eine Amplifikation der DNA und es kommt zum Abbruch der Virus-Replikation [9, 53]. Die acht aktuell in der antiretroviralen Therapie eingesetzten NRTIs sind Abacavir, Didanosin, Emtricitabin, Lamivudin, Stavudin, Tenofovir, Zalcitabin und Zidovudin.

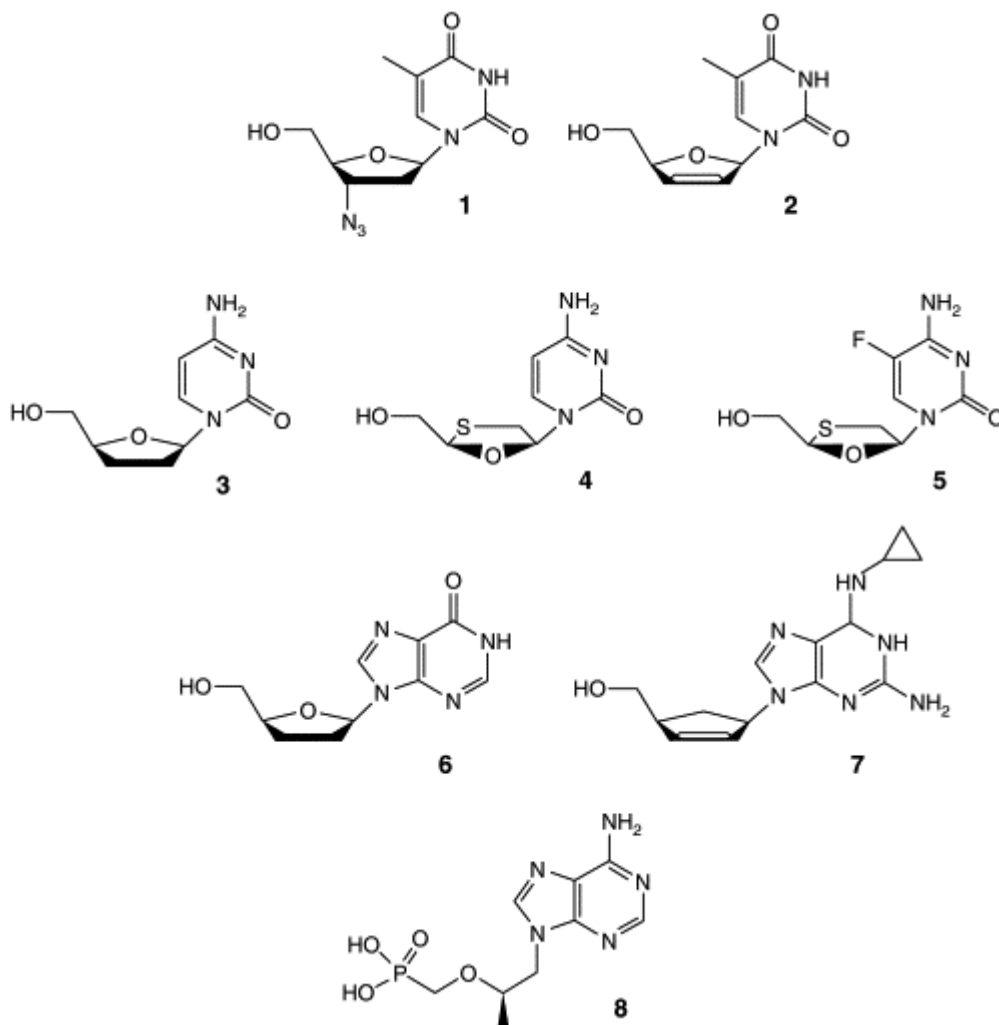


Abb. 3: Struktur der verwendeten nukleosid-/nukleotidanalogen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren: 1. Zidovudin, 2. Stavudin, 3. Zalcitabin, 4. Lamivudin, 5. Emtricitabine, 6. Didanosin, 7. Abacavir, 8. Tenofovir [52]

### 1.2.2. Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

Die in dieser Arbeit verwendeten nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren sind die Wirkstoffe Efavirenz, Nevirapin und Delavirdin. Sie sind nicht-nukleosidische-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren der ersten Generation. Neuere Vertreter dieser Substanzklasse sind die Wirkstoffe Rilpivirin und Etravirin [46].

Ansatzpunkt des Wirkmechanismus der NNRTIs ist die die Reverse-Transkriptase. Dabei sind NNRTIs Verbindungen mit unterschiedlichen aromatischen Strukturen, die nicht-kompetitiv die virale Reverse Transkriptase des HI-Virus hemmen [14]. Dies erfolgt über eine Bindung der Substanz an die hydrophobe Tasche (die nicht-nukleosidische-Inhibitor-Bindungstasche) der Reversen Transkriptase, die mit dem katalytischen Zentrum des Enzyms assoziiert ist [56]. Von den fünf Wirkstoffen dieser Stoffklasse (Efavirenz, Nevirapin, Delavirdin, Etravirine, Rilpivirin) findet Efavirenz die größte Anwendung. NNRTIs unterliegen einer Metabolisierung in der Leber und werden alle über das Cytochrom-P450-Enzymsystem verstoffwechselt [9, 14]. Sie können CYP3A4 induzieren (Nevirapin) bzw. hemmen (Delavirdin), ggf. auch beides (Efavirenz) [9, 14, 15].

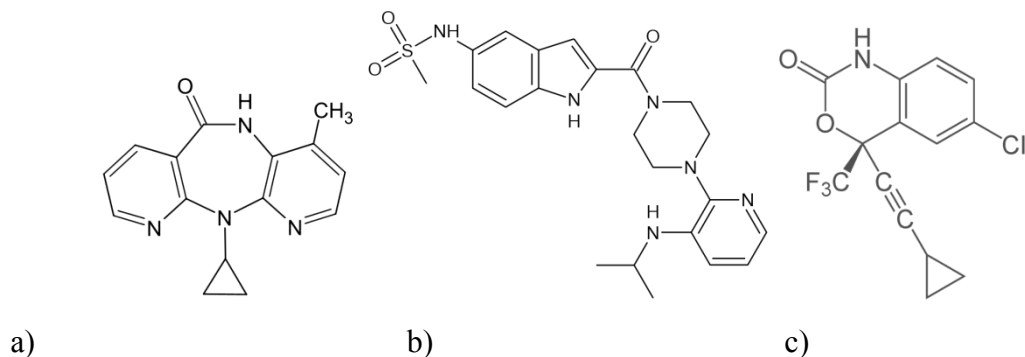


Abb. 4.: Struktur der in dieser Arbeit verwendeten nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, a: Nevirapine, b: Delavirdine, c: Efavirenz

### 1.2.3. Proteaseinhibitoren

Die Substanzklasse der Proteaseinhibitoren wurde Ende 1995 eingeführt. Damit war die Voraussetzung für die „Hochaktive antiretrovirale Therapie“ (HAART) geschaffen [14]. Zurzeit (Stand 2013) sind acht Wirkstoffe (Atazanavir, Fosamprenavir, Indinavir, Lopinavir, Nelfinavir, Ritonavir, Saquinavir, Tipranavir) zugelassen.

Die Wirkung der Proteaseinhibitoren wird durch die Hemmung der viralen Protease vermittelt und unterscheidet sich somit von den anderen bereits beschriebenen Stoffklassen. Die Protease ist für die posttranskriptionelle Spaltung der Polyproteinprodukte Pr<sup>GAG</sup> und Pr<sup>GAG-POL</sup> in funktionale Core-Proteine und Enzyme, z.B. Reverse Transkriptase, Integrase und Protease, verantwortlich [56]. Sie ist somit ein Schlüsselenzym in der Synthese von Strukturproteinen und Replikationsenzymen [9]. Proteaseinhibitoren hemmen kompetitiv die Substratbindung am aktiven Zentrum des Enzyms, wodurch die proteolytische Spaltung der Polyproteine in die funktionellen Endprodukte verhindert wird. Hieraus resultiert die Produktion von unreifen, nichtinfektiösen Viruspartikeln [56]. Dieser Vorgang läuft während oder kurz nach dem Ausknospen des Virus an der Zellmembran ab. Aufgrund ihres Wirkmechanismus können Proteaseinhibitoren im Vergleich zu den anderen Substanzklassen den viralen Replikationszyklus auch in bereits infizierten Zellen hemmen. Die Affinität zu viralen Proteasen ist höher als zu humanen Enzymen, was eine hohe Selektivität gewährleistet.

Alle Proteaseinhibitoren werden durch das Cytochrom-P450-System verstoffwechselt und inhibieren es [14, 57]. Am stärksten hemmt Ritonavir die Aktivität von CYP3A4 [53]. Die starke inhibitorische Potenz von Ritonavir macht man sich beim sogenannten Boostern zunutze, indem man niedrig dosiertes Ritonavir mit einem zweiten Proteaseinhibitor kombiniert. Durch Hemmung von CYP3A4 wird der Abbau des Wirkstoffs verlangsamt und dessen Tagesdosis kann reduziert werden [14, 53]. Das Präparat Kaletra<sup>®</sup> enthält die Wirkstoffe Lopinavir mit Ritonavir in fixer Kombination und setzt damit dieses Prinzip um [58].



### 1.2.4. Neue antiretrovirale Wirkstoffe

Nach Beginn der experimentellen Arbeit wurden weitere Wirkstoffklassen in die HIV-Therapie eingeführt, die hier der Vollständigkeit halber kurz erwähnt seien. Es handelt sich um Fusionsinhibitoren, CCR5-Korezeptor-Antagonisten und Integrase-Inhibitoren. Fusionsinhibitoren verhindern die Fusion des HI-Virus mit den CD4+-Zellen [14]. Als erster Vertreter dieser Klasse wurde Enfuviritid im März 2003 zugelassen [14]. CCR5-Korezeptor-Antagonisten blockieren einen Korezeptor der Wirtszelle, den HI-Viren zum Eindringen in die Zelle benötigen (75). Im August 2007 wurde der erste Vertreter (Maraviroc) dieser Substanzklasse von der FDA zugelassen [59]. [60]. Die Integrase-Inhibitoren hemmen ein anderes Schlüsselenzym bei der Replikation von HIV. Integrase ist ein retrovirales Enzym, das den Einbau des viralen DNA-Stranges in die Wirts-DNA katalysiert [61]. Es lässt sich nicht in humanen Zellen nachweisen [62]. Eine Hemmung des Enzyms führt zu einer Unterbrechung des Replikationszyklus des Virus. Raltegravir ist der erste zugelassene Vertreter dieser Substanzklasse.

Tabelle 4: Pharmakokinetik und Dosierung der in dieser Arbeit getesteten Wirkstoffe [63]

Wirkstoff	Plasmahalbwertszeit (h)	Bioverfügbarkeit (%)	Verteilungsvolumen in l/kg	Plasmaeiweißbindung (%)	Dosierung für KG ~60kg (mg/d)
<b>Nukleosid-/Nukleotidanaloge Reverse -Transkriptase-Inhibitoren</b>					
Abacavir	0,8-1,5	>70	0,86 ± 0,15	~50	600
Didanosin	0,5	30-40	1,08 ± 0,22	<5	400
Lamivudin	5-7	80	1,3	36	300
Stavudin	0,8-1,5	90	0,6	<5	80
Zalcitabin <sup>1</sup>	2	90	0,3-0,7	<4	2,25
Zidovudin	1,1	60	1,6 ± 0,6	30-38	500
<b>Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren</b>					
Delavirdin <sup>2</sup>	2-11	85	0,8-1	98	2100
Efavirenz	40-50	50	n.b.	>99	600
Nevirapin	45	93	1,21 ± 0,09	60	400
<b>Proteaseinhibitoren</b>					
Amprenavir <sup>3</sup>	10	90	8,2	90	2400
Indinavir	1,8	60-65	1,74	60	2400
Lopinavir	5-6	n.b.	n.b.	98-99	1600
Nelfinavir	3,5-5	70-80	2-7	98-99	2500
Ritonavir	3	65-75	0,4	98-99	1200
Saquinavir	7-12	4	10	98-99	2000

n.b. = nicht bekannt, <sup>1</sup> Vertrieb wurde 2006 eingestellt, <sup>2</sup> In Europa ist der Wirkstoff derzeit noch nicht zugelassen,

<sup>3</sup> 2008 eingestellt, durch Fosamprenavir ersetzt

### **1.3. Antiretrovirale Wirkstoffe und Cytochrom P450 3A4**

Grundlage der aktuellen Therapieempfehlungen zur Behandlung der HIV-Erkrankung ist die „Hochaktive antiretrovirale Therapie“ (HAART). Das Prinzip der HAART beruht auf der Kombination mehrerer antiretroviral wirkender Substanzen. Bei der Mehrzahl der heute gängigen Therapieregime nimmt der Patient mindestens drei, häufig auch mehr Wirkstoffe ein. Nicht selten leiden Patienten mit HIV gleichzeitig auch unter Tuberkulose oder unter einer Infektion mit Hepatitisviren, die eine zusätzliche Medikamentengabe erforderlich machen. Mit jedem Wirkstoff, der in einem Therapieregime hinzugefügt wird, vergrößert sich die Wahrscheinlichkeit einer Arzneimittelinteraktion. Die Gefahr ist umso größer, wenn die Wirkstoffe über gemeinsame Stoffwechselwege abgebaut werden.

NNRTIs und PIs nutzen mit der Verstoffwechslung über CYP3A4 das für den Arzneistoffwechsel quantitativ wichtigste Enzym. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, dass sich die Wirkstoffe gegenseitig vom aktiven Zentrum verdrängen, was über überhöhte Plasmaspiegel zu toxischen Effekten führen kann. Ein Beispiel hierfür ist die Erhöhung des Myopathierisikos bei der Kombination von Proteaseinhibitoren mit Statinen.

Ein weiterer wichtiger Mechanismus, der zu Arzneimittelinteraktionen führen kann, ist die Enzyminduktion. Die mit der Induktion einhergehende erhöhte Enzymaktivität kann zu einem schnelleren Wirkungsverlust des Arzneimittels führen. Im Extremfall werden wirksame Spiegel nach Gabe der Standarddosis nicht mehr erreicht. Bezogen auf die HIV-Therapie kann das bedeuten, dass die HIV-Infektion nicht unter Kontrolle gebracht werden kann und sich evtl. Resistenzen bilden. Die Untersuchung der Induzierbarkeit der CYP3A4-Expression ist deshalb für die antiretrovirale Therapie von immenser Bedeutung.

Tab. 5: Pharmakokinetik der in dieser Arbeit getesteten Wirkstoffe und deren Metabolisierungsweg.

n.b.: nicht bekannt

Wirkstoff	Beteiligte Enzyme	Hauptstoffwechselweg
<b>Nukleosid-/Nukleotidanalogue Reverse -Transkriptase-Inhibitoren</b>		
Abacavir	Alkoholdehydrogenase, UDP-Glukuronyltransferase	Alkoholdehydrogenase, UDP-Glukuronyltransferase
Didanosin	Xanithin-Oxidase	Xanithin-Oxidase
Lamivudin	Sulfoxidase	Sulfoxidase
Stavudin	n.b.	n.b.
Zalcitabin	CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A43, CYP3A5, CYP3A7, Deoxycytidinkinase	n.b.
Zidovudin	CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4,	Thymidinkinase, UDP- Glucuronosyltransferase 2B7
<b>Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren</b>		
Delavirdin	CYP 1A2, CYP 2C8, CYP 2C9, CYP 2C19, CYP 2D6 [64], CYP3A4 [64], CYP3A5, CYP3A7,	CYP3A4
Efavirenz	CYP2C19, CYP2C9, CYP2B6, CYP3A4, CYP1A2, CYP2D6, GST	CYP450
Nevirapin	CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5	CYP3A4
<b>Proteaseinhibitoren</b>		
Amprenavir	CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5	CYP3A4
Indinavir	CYP3A4, CYP3A7, CYP3A5, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6	CYP3A4
Lopinavir	CYP3A4, CYP2D6, CYP2C19, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9	CYP3A
Nelfinavir	CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6, CYP2C9	CYP3A, CYP2C19
Ritonavir	CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7	CYP3A, CYP2D6
Sapuinavir	CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, Cholesterol side-chain cleavage enzy- me (mitochondrial)	CYP3A4

## **II. Aufgabenstellung**

Die verfügbaren antiretroviralen Wirkstoffe zur Behandlung der HIV-Infektion reduzieren erfolgreich die Viruslast, sind aber aufgrund ihrer Metabolisierungswege mit einem hohen Potential an Arzneimittelinteraktionen belastet. Die HAART-Therapie kombiniert mehrere Wirkstoffe mit einem hohen Wechselwirkungspotential. Durch die häufigen Sekundärerkrankungen der Patienten werden zusätzlich Medikationen benötigt, die mit der HAART-bedingten Regulation der metabolisierenden Enzyme eventuell interagieren können. Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung einzelnen antiretroviralen Wirkstoffe auf die Expression des Schlüsselenzym CYP3A4 in Zellen unterschiedlicher Provenienz zu bestimmen.

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit liegt darin,

- a) In-Vitro nachzuweisen das antiretroviralen Wirkstoffen die Bildung der CYP3A4-mRNA in Zellkulturen induzieren können,
- b) das Induktionspotential der getesteten antiretroviralen Wirkstoffe auf die CYP3A4-mRNA mit dem des bekannten Induktor Rifampicin zu vergleichen,
- c) die CYP3A4-Expression in verschiedenen Zellkulturen, anhand der mRNA Bestimmung, zu untersuchen.

### III. Material und Methoden

#### 3.1. Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Wirkstoffe sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Tab. 6: Getestete Wirkstoffe/Medikamente und deren Hersteller Tabelle wurde vereinfacht

Substanz	Hersteller
Abacavir, Amprenavir, Zidovudin	Glaxo Wellcome
Didanosin, Stavudin	Bristol, Myers Squibb
Saquinavir, Zalcitabin	Roche
Efavirenz	DuPont Pharmaceuticals
Nevirapin	Boehringer Ingelheim
Delavirdin	Pharmacia & Upjohn
Indinavir	Merck
Kaletra® (Lopinavir, Ritonavir), Ritonavir	Abbot Laboratories
Nelfinavir	Agouron Pharmaceuticals
Rifampicin	Fatol

Tab. 7: Verwendete Zelllinien und deren Ursprung. Alle Zellen wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig bezogen.

Zelllinie	Gewebe	Morphologie	Ursprung
Caco-2	Kolorektales Karzinom, Darm	Epithelial	1974, Kaukasier
Colo320	Kolorektales Adenokarzinom, Darm	Epithelial	1977, 55jähriger Kaukasier
HeLa	Adenokarzinom, Zervix	Epithelial	1951, 31jährige Afro-Amerikanerin
HepG2	Hepatozelluläres Karzinom, Leber	Epithelial	1975, 15jähriger Kaukasier

Tabelle 8: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
M-MuMLV Reverse Transkriptase	Invitrogen
Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen
Taq-DNA Polymerase	Invitrogen

Tabelle 9: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Primer	Position	Sequenz	Genbank
dT(15)		5'-TTTTTTTTTTTTTTTT	
CYP3FLU	1404	5'-AgTTTCAtgTTCAcgAgAgCAAACCTC Flurescein	X12387
CYP3LCR	1380	5'-LC Red640-TgCCAATgCAGTTTCTgggTCCA PH	X12387
CYP3A4F	1375	5'-CCTTACATATACACACCCTTTGGAAG	X12387

CYP3A4R	1522	5'-GGTTGAAGAAGTCCTCCTAAGCT	X12387
---------	------	----------------------------	--------

Tabelle 10: Verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
TBE	100 mM Tris HCL, 100 mM Bor-säure, 2 mM EDTA; pH 8,3 mit NaOH eingestellt	s.u.
310 Gentic Analyzer Puffer	Enthält EDTA	Applied Biosystems
PBS Dulbecco's	Phosphatpuffer	Invitrogen

Tabelle 11: Verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Qualex Gold Agarose	Hybaid
Trizol Reagenz, RNase AWAY	Invitrogen
NuSieve-Agarosepulver	Biozym Diagnostik
GelStar-Nukleinsäure Farbstoff	Biozym Diagnostik
Trypsin/EDTA	Biochrom
Dulbecco's Modifiziertes Medium mit D-Glutamin (DMEM)	Biochrom
RPMI 1640 Zellkulturmedium, fötales Rinderserum	Biochrom
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Trypsin/EDTA-Lösung (0,5%/ 0,2%)	Biochrom
Glykogen, RNase-frei	Roche
100 bp und 1kb DNA-Marker	MBI Fermentas
dNTP-Na-Salz-Lösung	Rapidozym

Tabelle 12: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
SNAP™ Total RNA Extraction Kit	Invitrogen

Tabelle 13: Verwendete Geräte

Artikel	Hersteller
Biophotometer	Eppendorf
Elektrophoresekammern	BioRad und Pharmacia
Elektrophoresenetzgerät	Renner
LightCycler™	Roche
Megafuge 1,0R	Heraeus
Mikroskope	Leitz
Mikrowellengerät	Siemens
Sterilwerkbank Laminar	Heraeus
Brutschrank	Heraeus
Thermocycler PE9700	Applied Biosystems
Tischzentrifuge-5415C	Eppendorf

Tab. 14: Computerprogramme

Programm	Anbieter
310 Data Collection Software	Applied Biosystems
LightCycler Analysis Software	Roche
LightCycler Run Software 3.1	Roche
SPSS für Windows 14.0	SPSS

Tab. 15: Datenbanken

Datenbanken	Anbieter
Antiretrovirale Mittel und Interaktionen	<a href="http://www.hiv-druginteractions.org">http://www.hiv-druginteractions.org</a>
CYP3A4-Allele	<a href="http://www.imm.ki.se/CYPalleles/CYP3A4.htm">http://www.imm.ki.se/CYPalleles/CYP3A4.htm</a>

Tab.16: Sonstiges Zubehör

Artikel	Hersteller
Kapillaren für ABI310, 47 cm x 50 µmol	Applied Biosystems
Sterile, gefilterte Pipettenspitzen	Biozym und Greiner
Kapillaren für LightCycler	Roche
UV-Küvetten	Eppendorf
Vacutainer <sup>®</sup> cpt System	Becton Dickinson, Heidelberg
Kulturflaschen	BD Falcon
Zellkulturplatten	BD Falcon
Einfrierröhrchen 1,8 ml	Greiner
Verbrauchsmaterialien (Eppendorfgefäße, PCR-Platten, Pipettenspitzen)	

## **3.2.Methoden**

### **3.2.1. Zellkultur**

Für die Versuchsreihe wurden die Zelllinien HeLa, HepG2, Caco-2 und Colo320 verwendet. Sie sind alle onkologischen Ursprungs. Die Zelllinie HeLa entstammt einem Adenokarzinom der Zervix und entspricht in der Zellmorphologie dem Epithel der Cervix uteri. Caco-2- und Colo-Zellen wurden aus Zellen eines kolorektalen Karzinoms gewonnen und tragen zelluläre Charakteristika des Darmepithels. Die Zellkultur HepG2 besteht aus Zellen eines hepatozellulären Karzinoms und entspricht morphologisch wie funktionell weitgehend humanen Hepatozyten.

Die verwendeten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei etwa  $-170^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Versuchsreihen wurden sie unter einer Sicherheitswerkbank aufgetaut und auf Kulturgefäße mit einem Fassungsvermögen von 260 ml verteilt. Hierfür wurden etwa  $1 \times 10^7$  Zellen in 15 ml Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche gegeben. Dem Medium wurden fötales Kälberserum und die Antibiotika Penicillin und Streptomycin zugesetzt. Alle bei der Zellkultivierung benötigten Medien wurden vor Gebrauch auf  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Für die einzelnen Zelllinien wurden optimierte Wachstumsmedien verwendet. Zellen der Linien HepG2 und Colo320 erhielten als Medium RPMI 1640, Zellen der Linien HeLa und Caco-2 das Medium DME. Nach Aussaat in Zellkulturflaschen erfolgte die Kultivierung der Zellen im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  und einem  $\text{CO}_2$ -Gehalt von 5%. Eine Subkultivierung der Zellen erfolgte nach Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz. Hierfür wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung über einen Zeitraum von 7 min inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in einer Dichte von jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen/Flasche auf neue Kulturgefäße verteilt.

### **3.2.2. Testsubstanzen**

Es wurden insgesamt 15 antiretrovirale Substanzen getestet, die zur Therapie der HIV-Erkrankung zugelassen sind. Als Referenzsubstanz für die Wirkung auf die CYP3A4-mRNA-Bildung wurde der bekannte CYP3A4-Induktor Rifampicin [13] eingesetzt. Die verwendeten Wirkstoffe und deren Konzentrationen im Kulturmedium sind in Tabelle 17 angegeben. Die Wirkstoffe wurden als Reinsubstanz verwendet, mit Ausnahme von Kaletra® und Efavirenz. Diese standen in Form von Weichkapseln zur Verfügung, die die Wirkstoffe in einer galenischen Zubereitung enthielten. Die Wirkstoffe wurden in Methanol gelöst.

Jeder Wirkstoff wurde in vier verschiedenen Konzentrationen getestet. Um die Wirkungseffekte besser miteinander vergleichen zu können, wurden die für den Menschen zum Zeitpunkt der Versuche empfohlene Tagesdosen als Orientierung genommen. Zur Berechnung der Konzentrationen wurde hypothetisch die Verteilung der Wirkstoffe ausschließlich im Extrazellulärem



Raum des Menschen angenommen. Der Anteil der extrazellulären Flüssigkeit im Menschen wurde auf 20 Litern festgelegt.

### **3.2.3. Inkubation der Zellen mit den Testlösungen**

Die Testlösungen wurden in Verdünnungsreihen mit Methanol angesetzt. Die Inkubationsversuche erfolgten auf Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten. Je 100 µl der Testlösung wurden auf die Kavitäten verteilt und ca. 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, bis das Lösungsmittel vollständig verdampft war. In der Zwischenzeit wurden die Zellen aus den vorbereiteten Zellkulturflaschen geerntet, in 2,5 ml PBS pro Zellkulturflasche aufgenommen und vereint. Im Anschluss wurden je 0,5 ml dieser Lösung entnommen und auf die zu testenden Substanzen verteilt. In einem letzten Schritt wurden auf das Substanz-Zell-Gemisch pro Kavität 2 ml Medium gegeben. Jede Kavität enthielt etwa eine Million Zellen. Die Zellen wurden 20 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Platten nochmals geschwenkt, um die vollständige Verteilung der Testsubstanz im Medium zu erreichen. Während der Versuche wurde jeweils ein Kontrollansatz aus Medium und Testlösung mitgeführt und die vollständige Lösung der Substanzen im Versuchsansatz photometrisch geprüft. Bei den Inkubationsversuchen über 40 und 72 Stunden wurden die Substanzen auf separaten Platten in den entsprechenden Konzentrationen vorbereitet, mit Medium gemischt und auf die zuvor mit PBS gewaschenen adhären Zellen gegeben.

Tabelle 17: Konzentrationen der Testsubstanzen im Kulturmedium

<b>Substanz</b>	<b>Getesteter Konzentrationsbereich [µmol/l]</b>	<b>Überschlägige In-vivo-Konzentration (bei Gabe der Tagesdosis ) [µmol/l]</b>
<b>Positivkontrolle</b>		
Rifampicin	19,4-194,4	36,5
<b>Nukleosid-/Nukleotidanalogue Reverse -Transkriptase-Inhibitoren</b>		
Abacavir	23,9-238,5	47,7
Didanosin	21,2-211,7	42,3
Lamivudin	21,8-218,1	32,7
Stavudin	8,9-89,2	17,8
Zalcitabin	0,25-4,7	0,3
Zidovudin	59,9-598,7	93,6
<b>Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren</b>		
Delavirdin	57,9-579	108,6
Efavirenz	10,2-19,1	19,1
Nevirapin	60,2-601,5	75,2
<b>Proteinaseinhibitoren</b>		
Amprenavir	63,3-632,9	237,3
Indinavir	52,1-521,3	195,5
Kaletra®	6,4-25,4	63,6
Nelfinavir	48,2-428	169,5
Ritonavir	44,4-443,8	83,2
Saquinavir	11,9-268,3	268,3

### **3.2.4. Laktatdehydrogenase (LDH)-Test**

Mit dem Laktatdehydrogenase-Test wurde das zytotoxische Potential der Versuchssubstanzen geprüft. Das Verfahren basiert auf der Bestimmung der Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase (LDH). LDH wird aus zerstörten oder beschädigten Zellen freigesetzt und kann im Überstand enzymatisch nachgewiesen werden. Beim LDH-Test reduziert das bei der Umsetzung von Laktat zu Pyruvat entstandene  $\text{NADH} + \text{H}^+$  ein gelbes Tetrazolium-Salz zu einem roten Formazan-Salz, dessen Konzentration im Photometer bei einer Wellenlänge von 490 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) gemessen wird. Die Formazansalzkonzentration korreliert mit der Menge an freigesetzter LDH und ist daher direkt proportional zur Anzahl geschädigter Zellen.

In einem ersten Schritt wurden die Zellen in Mikrotiterplatten ausgesät. Die Inkubation erfolgte in DMEM mit 1% Kälberserum, um den hohen LDH-Hintergrund des Serums zu minimieren. Je 50  $\mu\text{l}$  der zellfreien Überstände wurden in eine neue Mikrotiterplatte überführt, mit 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsgemisch versetzt und lichtgeschützt über 30 min inkubiert. Die Farbentwicklung wurde durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  HCl 1N pro Kavität gestoppt und gemessen. Als Positivkontrolle dienten Zellansätze, die unter Zugabe des Detergens Triton-X-100 (1%, in Zellkulturmedium verdünnt) vollständig lysiert wurden und deren Substratumsetzung daher als maximal (100%, Positivkontrolle) eingestuft wurde. Als Negativkontrolle dienten Ansätze, die nur reines Zellkulturmedium enthielten und deshalb eine minimale (0%) LDH-Enzymaktivität im Überstand besaßen.

### **3.2.5. Extraktion zellulärer RNA aus Zellkulturen**

Nach erfolgter Inkubation wurde die gesamte RNA aus den Zellen in einem Festphasenverfahren mittels eines kommerziell erhältlichen Kits (SNAP<sup>TM</sup>, Invitrogen) isoliert. Um eine Verunreinigung der Proben zu vermeiden, wurde die Arbeitsfläche vor der Isolierung mit RNase AWAY gereinigt und für alle verwendeten Lösungen RNase-freies Wasser benutzt. Zuerst wurden die Zellen in den Multiwellplatten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die zellulären Bestandteile mittels eines im Kit enthaltenen Lysepuffers, der gleichzeitig die RNasen inaktiviert, zerstört. Das so entstandene Zelllysate wurde in mit Filtern versehene Eppendorf-Gefäße überführt und zentrifugiert. RNA und DNA wurden dabei im Filter gebunden und so von den anderen Bestandteilen getrennt. Durch Zugeben einer Waschlösung konnten in einem weiteren Schritt die im Filter zurückgehaltenen Proteine und zelluläre Reste herausgewaschen werden. Im Anschluss wurde das zurückbleibende genetische Material aus dem Filter gelöst. In einem weiteren Schritt wurde den Proben das Enzym DNase zugegeben, welches die in den Proben vorhandene DNA unspezifisch spaltet und somit zerstört. Im Anschluss wurde die DNase ausgewaschen. Zurück

blieb die RNA der Zellen, welche in RNase-freiem Wasser gelöst wurde. Zur photometrischen Bestimmung am Biophotometer (Eppendorf) wurden 50 µl RNA-Lösung entnommen und in der Küvette gegen RNase-freies Wasser als Leerwert gemessen. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde dann über die optische Dichte ( $RNA=A_{260} \times 40$  (ng/µl)) berechnet. Alle Proben wurden auf eine Konzentration von 25 ng/µl eingestellt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

### 3.2.6. Reverse-Transkriptase-Echtzeit-PCR

Für die Reverse-Transkriptase-Echtzeit-PCR wurde die extrahierte RNA mit Hilfe des Enzymes Reverse Transkriptase (M.Mlv.Rev.Tran.) in cDNA (*complementary DNA*) konvertiert. Anschließend erfolgte die exponentielle Amplifikation mittels PCR und einer EDV-unterstützten Auswertung im Echtzeitverfahren. Im Schritt der reversen Transkription erfolgte die Translation der isolierten mRNA in cDNA mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase und eines Sequenz-spezifischen Primers (dT<sub>15</sub>, siehe Tabelle 9). Hierfür wurde die isolierte RNA zu dem in Tabelle 18 beschriebenen Reaktionsgemisch gegeben. Die reverse Transkription wurde dann in einer herkömmlichen PCR-Maschine durchgeführt.

Tabelle 18: Ansatz für die reverse Transkription (Primersequenz siehe Tabelle 8)

Reagenzien	Menge [µl/Probe]
5xPuffer	4,0
DTT [0,1 mol]	2,0
dNTP [10 mmol]	1,0
Primer oligo dt (15) [10 µmolol]	2,0
BSA [1 µg/µl]	0,5
Rnas2 Inhibitor [40 U/µl]	0,2
M-Mlv Rev. Trans. [200 U/µl]	0,6
Wasser	5,7

Die Ansätze wurden 10 min bei 26°C, 60 min bei 42°C, 2 min bei 95°C inkubiert, im Anschluss erfolgte eine Kühlung auf 4°C. Die so gewonnene cDNA wurde als *Template* im Real-Time-PCR-Assay eingesetzt. Die Quantifizierung der CYP3A4-mRNA erfolgte mittels Real-Time-PCR am LightCycler (Roche). Dieses Verfahren ermöglicht eine simultane Messung des PCR-Produktes während der Amplifizierung durch Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. Dabei wird die gewonnene cDNA in einen Reaktionsansatz (siehe Tab.17) gegeben, der neben den spezifischen Primern (3A4-2, 3A7-71) auch zwei sequenzspezifische Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-(FRET) Hybridisierungssonden (CYP3AFlu, CYP3ALCR) enthält. Hierbei handelt es sich um zwei Oligonukleotide, die sich streng komplementär zur gewünschten Matrize in 3'Richtung anlagern. Diese Sonden sind mit zwei verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert, die erste am 3'Ende mit Fluoreszein (F1, 530 nm), die zweite am 5'Ende mit dem Farbstoff LightCycler-Red 640 (LC Red 640). Während der PCR lagern sich beide Sonden benachbart zueinander an die entstehende amplifizierte cDNA an. Liegen die Sonden nahe beieinander, findet ein Energietransfer statt, der als Fluoreszenz messbar ist (FRET). Auf einem Monitor wird der Verlauf der PCR anhand der gemessenen Konzentrationen graphisch dargestellt.

Tabelle 19: Reaktionsansatz der RT-PCR (Primersequenz siehe Tabelle 8)

Reagenzien	Menge [µl/Probe]
10xPuffer	0,7
MgCl <sub>2</sub> [50 mmol]	0,9
dNTPs [2 mmol]	0,7
DMSO [100%]	0,7
BSA [1 µg/µl]	0,6
Primer [10 µmolol]	0,5
Sonden [10 µmolol]	0,25
Platinum Taq [5 U/µl]	0,33
H <sub>2</sub> O	1,57

Die Ansätze wurden wie folgt inkubiert: 40 s bei 95°C, anschließend 45 Zyklen über 0 s bei 95°C sowie je 10 s bei 55°C und 72°C.

Die Quantifizierung erfolgte über einen externen Standard, der in der Sequenz mit der gemessenen CYP3A4-mRNA identisch war. Dieser wurde in einer Verdünnungsreihe aus bekannten Konzentrationen bei jeder PCR im LightCycler in separaten Kapillaren mitgeführt, nachdem er im selben Ansatz in cDNA transkribiert worden war. Die für die Quantifizierung verwendeten Standards wurden im Labor nach einer vorher von der Arbeitsgruppe etablierten Methode herge-

stellt [65]. Mit dieser Methode war es möglich, über die Menge der mittels PCR amplifizierten DNA die Menge der transkribierten CYP3A4-mRNA zu bestimmen, um damit Rückschlüsse auf das Ausmaß der CYP3A4-Genexpression in der untersuchten Probe zu ziehen.

### **3.2.7. Statistische Auswertung**

Statistische Prozeduren wurden mit Hilfe des Programms „SPSS“ (Vers. 14) durchgeführt. Neben der explorativen Datenanalyse und den Korrelationsberechnungen nach Spearman wurden der nicht-parametrische Test nach Wilcoxon zur Überprüfung zwischen Zeitpunkten (verbundene Proben) sowie der Mann-Whitney-Test für nicht parametrische und unabhängige Vergleiche von zwei Gruppen durchgeführt. Außerdem wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test zur Varianzanalyse für Rangdaten angewandt, um die induktiven Effekte der Testsubstanzen zu ermitteln. Die statistische Signifikanz wurde bei  $p \leq 0,05$  festgesetzt. Für die Expressionsuntersuchungen in der Zellkultur wurden die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) ermittelt. Diese werden durch den Quotienten aus der Standardabweichung und der Wurzel der Anzahl der Messungen ( $SD/\sqrt{n}$ ) definiert.

## IV. Ergebnisse

### 4.1. CYP3A4-mRNA-Gehalt in den Zellkulturen

In Voruntersuchen wurde die vorhandene Menge von CYP3A4-mRNA in verschiedenen Zelllinien untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Zellen humanen Lebergewebes die größte Menge an CYP3A4 exprimieren. Die humanen Lebergewebsproben stammten aus Operationspräparaten. Ebenfalls größere Mengen an CYP3A4-mRNA ließen sich mit 122 Molekülen mRNA/ng RNA in den Zellen des hepatozellulären Karzinoms nachweisen. In der Zelllinie Caco-2 (Kolonkarzinomzellen) konnte CYP3A4-mRNA nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 20: CYP3A4-mRNA-Gehalt in den einzelnen Zellkulturen

<b>Zelltyp</b>	<b>Moleküle CYP3A4-mRNA/ng RNA</b>
Caco-2, Kolonkarzinom	0
Colo320, Kolonkarzinom	25,4
HeLa, Zervixkarzinom	3,1
Lebergewebe (Operationspräparat)	3 000 000
HepG2, Leberkarzinom	122,5

Aufgrund dieser Testergebnisse entschieden wir uns, die weiteren Experimente mit Zellen der Zelllinien HepG2 und Colo320 durchzuführen, den beiden Zelllinien mit dem zweit- bzw. dritthöchsten Gehalt an CYP3A4-mRNA. Da diese Zelllinien aus Zellen des Lebergewebes und Kolongewebes entstanden sind, weisen sie eine sehr große Ähnlichkeit in Aufbau, Struktur und Funktion zu diesen auf, so dass Rückschlüsse auf die ursprünglichen Gewebe gezogen werden können.

#### **4.2. Einfluss der Passagezahl auf den CYP3A4-mRNA-Gehalt**

Vor Beginn der einzelnen Testreihen wurde geprüft, ob sich mit zunehmender Passagezahl der Gehalt an CYP3A4-mRNA in den einzelnen Zellkulturen verändert. In den HepG2-Zellen zeigte sich innerhalb weniger Passagen eine Abnahme der CYP3A4-Expression auf ca. 1% des Ausgangswertes (siehe Abbildung 5). Ließen sich nach 6 Passagen noch durchschnittlich 290 Kopien CYP3A4-mRNA/ng RNA messen, waren es nach der 10. Passage nur noch 3,3 Kopien/ng RNA. Ab Passage 11 pendelte sich der Wert auf etwa 2 Kopien/ng RNA ein. Für die weiteren Versuche wurden daher HepG2-Zellen nur noch bis zur 8. Passage verwendet. Für die Colo320-Zellen konnte eine Abnahme des CYP3A4-mRNA-Gehalt mit zunehmender Passagezahl nicht nachgewiesen werden.

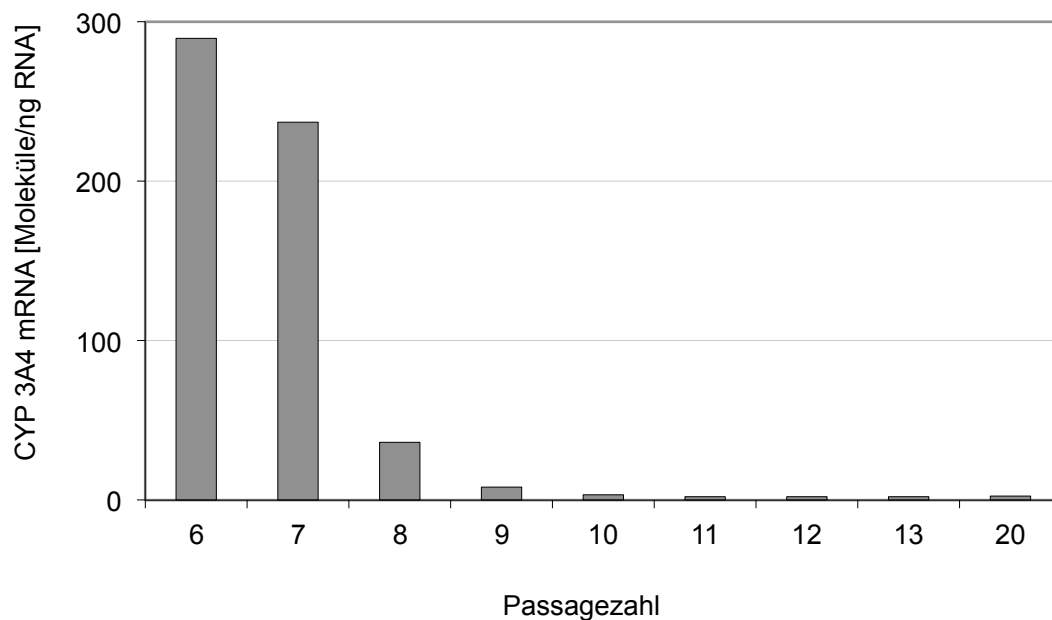


Abb. 5: CYP3A4-mRNA-Gehalt in Kulturen aus unbehandelten HepG2-Zellen mit verschiedenen Passagezahlen



### 4.3. Rifampicin

Um zu prüfen, ob sich die Zelllinien HepG2 und Colo320 als In-vitro-System zur Untersuchung der CYP3A4-Induktion eignen, wurde eine Testreihe mit dem potenten CYP3A4-Induktor Rifampicin durchgeführt. Gleichzeitig sollte bei dieser Testreihe die für die Induktion optimale Inkubationszeit ermittelt werden. Die Inkubation der HepG2-Zellen erfolgte mit drei verschiedenen Rifampicin-Konzentrationen (19,4  $\mu\text{mol/l}$ , 38,9  $\mu\text{mol/l}$ , 194,4  $\mu\text{mol/l}$ ), die der Colo320-Zelllinie mit vier verschiedenen Konzentrationen, jeweils über drei unterschiedliche Zeitspannen (20 h, 40 h und 72 h).

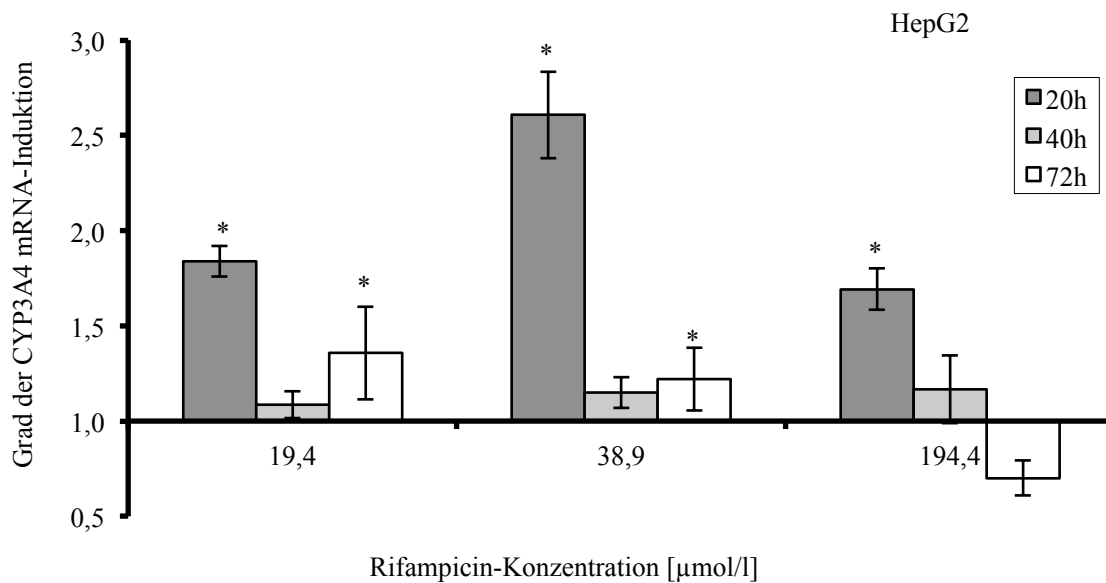


Abb. 6: CYP3A4-Expression in HepG2-Kulturen in Abhängigkeit von der Rifampicin-Konzentration nach Inkubation über 20 h, 40 h und 72 h. Dargestellt sind die Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern. Auf der y-Achse ist der jeweilige Quotient Anzahl der CYP3A4-mRNA-Moleküle unter Rifampicin/Anzahl der CYP3A4-mRNA-Moleküle ohne Rifampicin aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht. Anzahl der Versuche:6.

In den Zellen der Zelllinie HepG2 war die CYP3A4-Induktion nach 20-stündiger Inkubation mit 38,9  $\mu\text{mol/l}$  Rifampicin am höchsten ( $p = 0,038$ ). Bei dieser Zelllinie zeigte sich nach einer 40- und 70-stündigen Inkubationsdauer eine Abnahme der CYP3A4-Expression im Vergleich zur Ausgangskonzentration vor Induktion.

Die Zellen der Zelllinie Colo320 waren nach einer 20-stündigen Inkubation mit einer Rifampicin-Konzentration von 19,4  $\mu\text{mol/l}$  um den Faktor 3,1 induziert. Hierbei war  $p = 0,035$  für den Unterschied aller Gruppen nach Kruskal-Wallis-Test ablesbar. Nach 40 h und 72 h kam es dann zu einer Abnahme der CYP3A4-Expression im Vergleich zur Ausgangskonzentration. Sie sank nach 72 h konzentrationsabhängig von 164 auf 24 (SD:  $\pm 3$ ) Moleküle/ng RNA. Die Abnahme der mRNA-Konzentration war statistisch signifikant (Kruskal-Wallis-Test für alle fünf Gruppen:  $p = 0,032$ ). Ein Induktionseffekt war nicht mehr zu beobachten.

Somit konnte in diesen ersten Versuchsreihen der größte Induktionseffekt für die getesteten Wirkstoffkonzentrationen in beiden Zelllinien nach 20 Stunden nachgewiesen werden. In den HepG2 Zellen zeigt sich dabei die maximal erreichbare Induktion der CYP3A4-mRNA Bildung bei einer Konzentration von 38,9  $\mu\text{mol/l}$ . In den Versuchen mit den Colo320 Zellen wurde der stärkste Induktionseffekt mit einer Konzentration von 19,4  $\mu\text{mol/l}$  erreicht. Da dies die kleinste getestete Konzentration im Versuch ist, kann über den max. zu erreichenden Induktionseffekt keine Aussage getroffen werden. Aufgrund dieses Ergebnisses erfolgten alle weiteren Inkubationen mit verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Medikamente über 20 h.

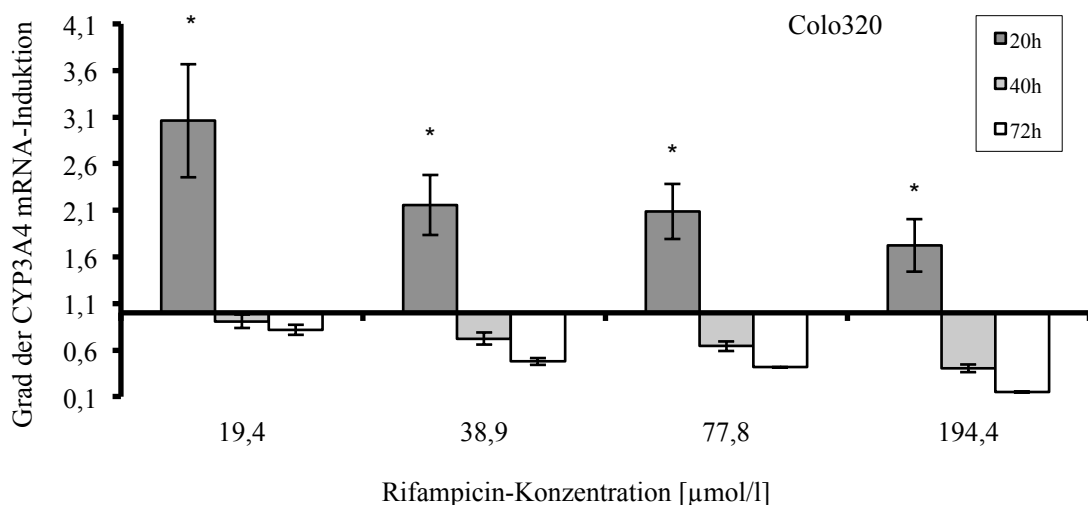


Abb.7: Konzentrationsabhängige Veränderungen in der CYP3A4-mRNA-Bildung nach mehrtägiger Behandlung mit Rifampicin in der Zelllinie Colo320. Es sind Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Auf der y-Achse ist der Quotient aus Anzahl der mRNA-Molekülen mit Induktor/Anzahl der mRNA-Moleküle ohne Induktor aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht. Anzahl der Versuche 6.

## 4.4. Antiretrovirale Wirkstoffe

### 4.4.1. Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI)

Es wurden die Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren Abacavir, Didanosin, Lamivudin, Stavudin, Zalcitabin und Zidovudin getestet. Lediglich Zalcitabin führte in beiden Zellsystemen zu einer Induktion der CYP3A4-Expression. In den Zellen der Zelllinie HepG2 zeigt sich eine maximale Induktion der CYP3A4-Expression um den Faktor 2,0 bei einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{mol/l}$  Zalcitabin. Der Faktor der Induktion ist jedoch beim Vergleich aller Gruppen nicht signifikant ( $p = 0,642$ ).

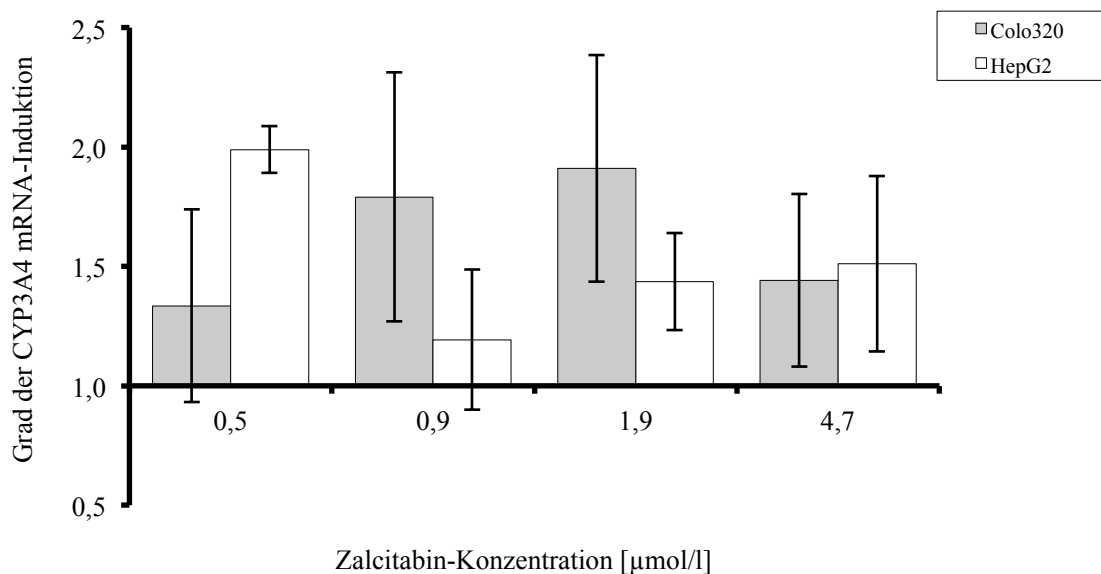


Abb. 8: CYP3A4-mRNA-Bildung in Zellen der Zelllinien HepG2 und Colo320 unter Einwirkung des NRTI Zalcitabin. Es sind die Mittelwerte der Messungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA-Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA-Moleküle ohne Testsubstanz aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht. Anzahl der Versuche: 4

In den Colo320-Zellen stieg die CYP3A4-mRNA-Konzentration von 41 ( $\pm 21$ ) auf 58 ( $\pm 24$ ) Moleküle mRNA/ng unter der Einwirkung von 1,9  $\mu\text{mol/l}$  Zalcitabin um das 1,9fache ( $p = 0,822$ ) an. Inkubationen mit den anderen NRTIs, Abacavir, Stavudin, Didanosin, Lamivudin und Zidovudin, brachten keine signifikanten Veränderungen der CYP3A4-mRNA-Bildung.

### 4.4.2. Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren

Es wurden die Substanzen Efavirenz, Delavirdin und Nevirapin dieser Substanzklasse in beiden Zellsystemen getestet. Unter der Inkubation der HepG2-Zellen mit Efavirenz zeigte sich bei ei-

ner Konzentration von 20,3  $\mu\text{mol/l}$  eine signifikante Induktion der CYP3A4-mRNA-Bildung um den Faktor 1,7 ( $p = 0,040$ ). Bei einer Substanzkonzentration von 101,6  $\mu\text{mol/l}$  kam es zu einer maximal 3,4fachen Induktion der CYP3A4-Expression ( $p = 0,029$ ). Die mRNA-Menge stieg von einer durchschnittlichen basalen Expression von 231 ( $\pm 54$ ) Molekülen mRNA/ng RNA auf 705 ( $\pm 118$ ) an.

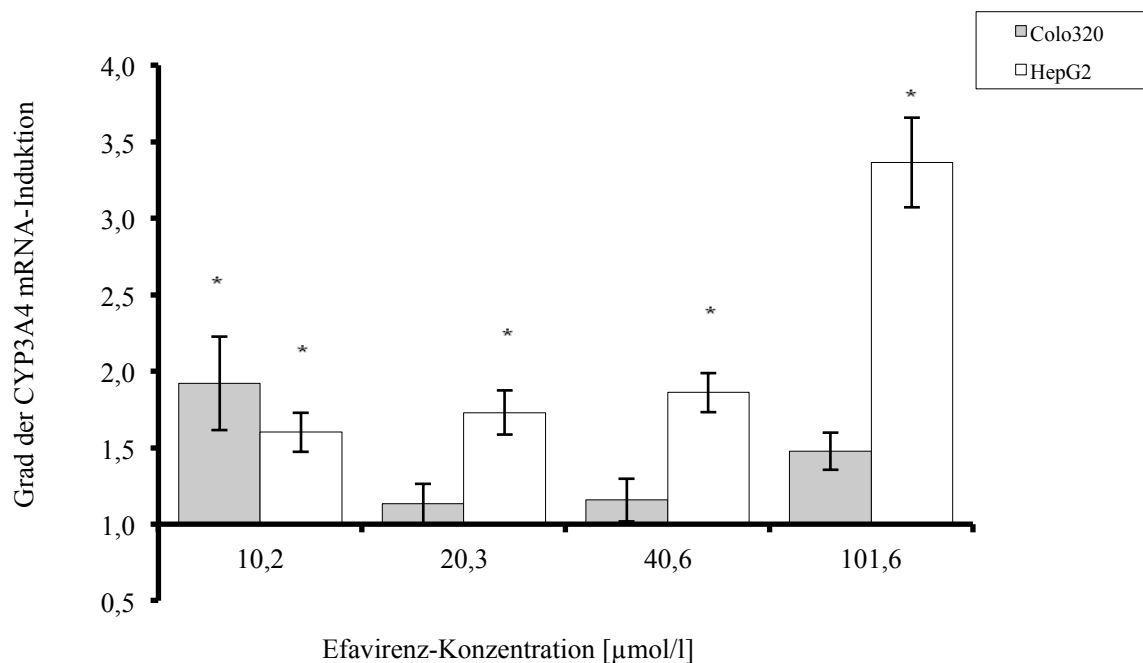


Abb. 9: CYP3A4-Expression in Zellen der Zelllinien HepG2 und Colo320 unter Einwirkung des NNRTI Efavirenz. Es sind die Mittelwerte der Messungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA-Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA-Moleküle ohne Testsubstanz aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht. Die Sternchen symbolisieren signifikante Veränderungen in der Expression nach einem Vergleich mit den Basalwerten. Anzahl der Versuche: 5

In den Colo320-Zellen induzierte Efavirenz die CYP3A4-Expression maximal um den Faktor 1,9 ( $p = 0,004$ ) nach Inkubationen mit 10,2  $\mu\text{mol/l}$  der Substanz. Die mRNA-Menge stieg von der basalen Expression von durchschnittlich 231 ( $\pm 54$ ) Molekülen mRNA/ng RNA auf 705 ( $\pm 118$ ) an.

Die Substanz Delavirdin erhöhte die CYP3A4-mRNA-Konzentrationen in den HepG2-Zellen um das 2,3fache signifikant ( $p=0,037$ ). In den Colo320-Zellen zeigte sich eine 2,8fache Erhöhung

der CYP3A4-mRNA-Konzentration nach der Inkubation mit Delavirdin, die statistisch nicht signifikant war (Vergleich aller Gruppen  $p = 0,148$ ).

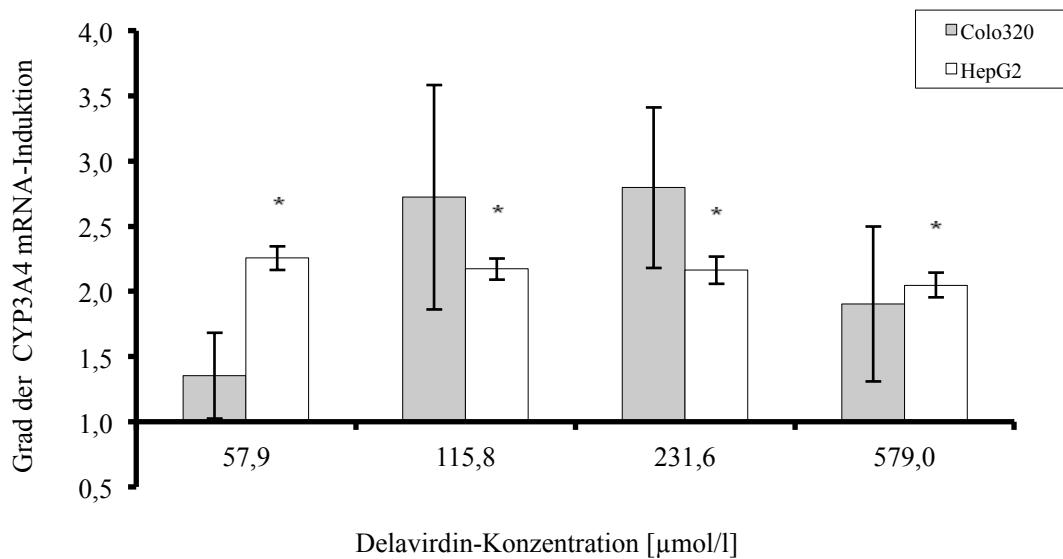


Abb. 10: CYP3A4-Expression in Zellen der Zelllinien HepG2 und Colo320 unter Einwirkung des NNRTI Delavirdin. Es sind die Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA-Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA-Moleküle ohne Testsubstanz aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht. Die Sternchen symbolisieren signifikante Veränderungen in der Expression nach einem Vergleich mit den Basalwerten. Anzahl der Versuche: 5

Als weitere Substanz dieser Stoffklasse wurde Nevirapin getestet und keine signifikanten Expressionsveränderungen von CYP3A4 in beiden Zelllinien festgestellt.

#### 4.4.3. Proteaseinhibitoren

Die in der vorliegenden Arbeit getesteten Proteaseinhibitoren waren Amprenavir, Indinavir, Kaletra® (Lopinavir/Ritonavir), Nelfinavir, Ritonavir und Saquinavir. Das Ansprechen der Zellen war unterschiedlich und wird im Folgenden für jede Substanz einzeln geschildert. Nach der Inkubation mit Amprenavir zeigte sich ein signifikanter induktiver Effekt auf die Expression von CYP3A4 in beiden untersuchten Zelltypen.

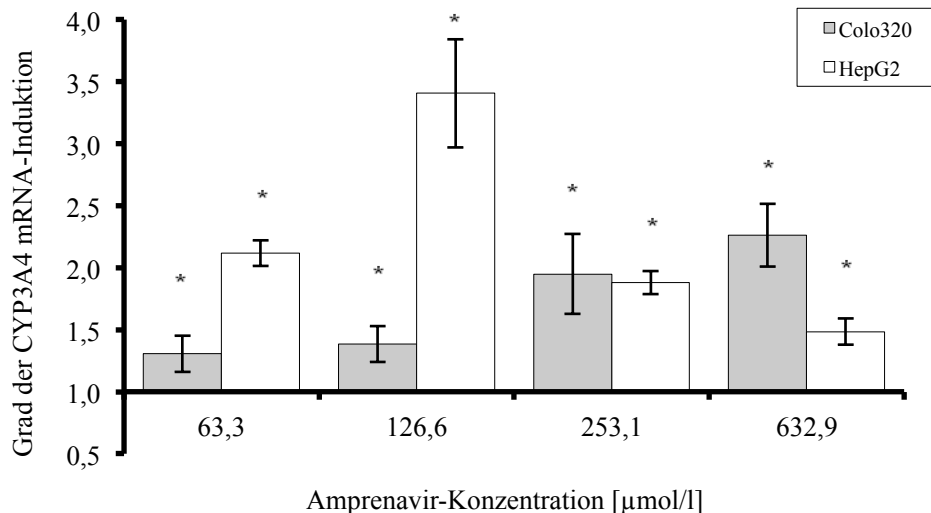


Abb. 11: CYP3A4-Expression in Zellen der Zelllinien HepG2 und Colo320 unter Einwirkung des PI Amprenavir. Es sind die Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Die Werte der Konzentration wurden logarithmiert. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA-Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA-Moleküle ohne Testsubstanz aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht. Die Sternchen symbolisieren signifikante Veränderungen in der Expression nach einem Vergleich mit dem Basalwerten. Anzahl der Versuche:6

In den HepG2-Zellen betrug der Induktionsfaktor 3,4 ( $p = 0,024$ ) nach Inkubationen mit 126,6  $\mu\text{mol/l}$  Amprenavir. Bei höheren Konzentrationen war der Effekt mit einem 1,8- bzw. 1,4fachen Anstieg der CYP3A4-mRNA-Konzentration schwächer ausgeprägt. In den Zellen der Zelllinie Colo320 stieg die mRNA-Konzentration von durchschnittlich 32 ( $\pm 10$ ) Molekülen/ng RNA auf 66 ( $\pm 23$ ) Moleküle/ng RNA, also um den Faktor 2,3 ( $p = 0,038$ ), nach Inkubation mit 632,9  $\mu\text{mol/l}$  Amprenavir signifikant an.

Der Wirkstoff Indinavir wies in den Versuchen in beiden Zelltypen induktives Potential auf. In den Versuchen mit den HepG2-Zellen zeigte sich eine Erhöhung der CYP3A4-mRNA-Konzentration nach Inkubation mit 208,5  $\mu\text{mol/l}$  um das 2,5fache ( $p = 0,034$ ). In der Zelllinie Colo320 zeigte sich bei einer Inkubation mit 104,3  $\mu\text{mol/l}$  eine Induktion der mRNA-Konzentration um das 1,9fache ( $p = 0,045$ ).

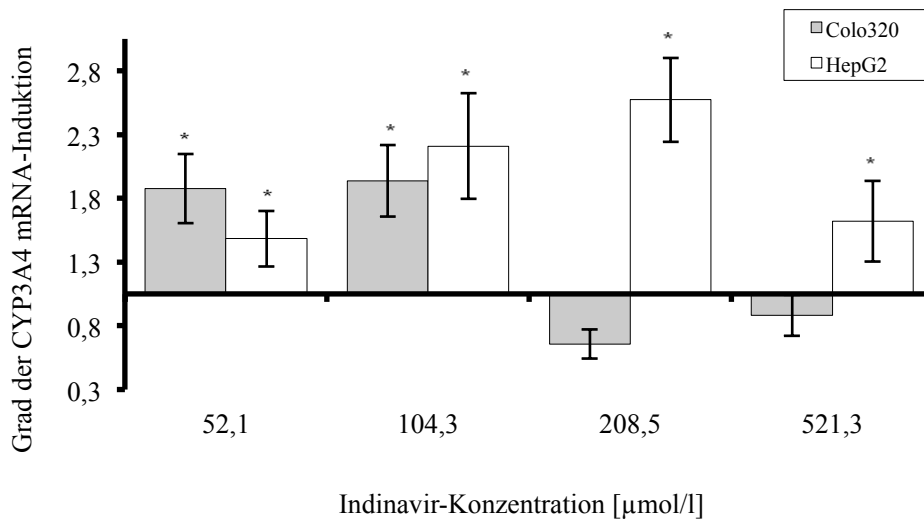


Abb. 12: CYP3A4-Expression in Zellen der Zelllinien HepG2 und Colo320 unter Einwirkung des PI Indinavir. Es sind die Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Die Werte der Konzentration wurden logarithmiert. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA-Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA-Moleküle ohne Testsubstanz aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht. Die Sternchen symbolisieren signifikante Veränderungen in der Expression nach einem Vergleich mit dem Basalwert. Anzahl der Versuche: 4.

Auch für den Proteaseinhibitor Ritonavir konnte eine Induktion der CYP3A4-Expression in beiden Zellsystemen nachgewiesen werden. In den HepG2-Zellen erfolgte dies um den Faktor 2,1 ( $p = 0,043$ ), in Zellen des Kolonkarzinomes um den Faktor 1,7 ( $p = 0,024$ ).

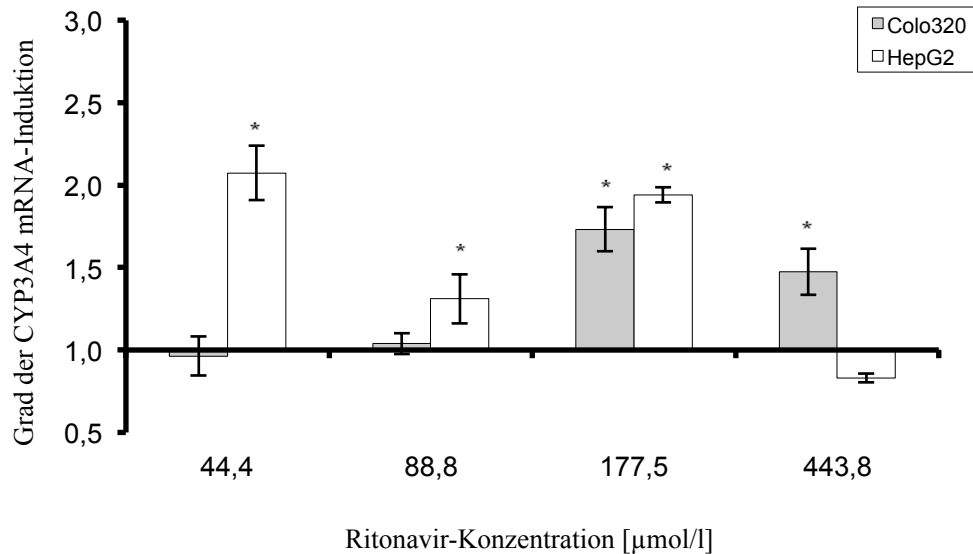


Abb. 13: CYP3A4-Expression in Zellen der Zelllinien HepG2 und Colo320 unter Einwirkung des PI Ritonavir. Es sind die Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Die Werte der Konzentration wurden logarithmiert. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA-Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA-Moleküle ohne Testsubstanz aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht. Die Sternchen symbolisieren signifikante Veränderungen in der Expression nach einem Vergleich mit dem Basalwert. Anzahl der Versuche: 5.

Für die Untersuchung der fixen Wirkstoffkombination Lopinavir/Ritonavir (Kaletra®) wurde der Inhalt der Kapsel unter sterilen Bedingungen herausgenommen und im Versuch eingesetzt. Die fixe Wirkstoffkombination Kaletra® enthält ein Gemisch aus Ritonavir: Lopinavir im Verhältnis 1:4. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf Lopinavir.

In den HepG2-Zellen konnte eine signifikante Zunahme des CYP3A4-Transkriptlevels um das 1,9fache ( $p = 0,044$ ) von  $32 (\pm 9)$  Molekülen mRNA/ng RNA auf  $55 (\pm 6)$  Moleküle mRNA/ng bei  $6,4 \mu\text{mol/l}$  gemessen werden. Bei Konzentrationen von  $12,7 \mu\text{mol/l}$  bzw.  $25,4 \mu\text{mol/l}$  war der Induktionseffekt schwächer ausgeprägt und lag bei einem Faktor von 1,5 bzw. 1,3. Es zeigte sich keine Induktion der CYP3A4-Expression in den Colo320-Zellen.

Höhere Konzentrationen der Wirkstoffkombination Kaletra® (Lopinavir/Ritonavir), erwiesen sich in unseren Versuchen als zytotoxisch. Im Zytotoxizitätstest wurden Werte von  $\geq 20\%$  in HepG2- bzw.  $> 80\%$  in Colo320-Zellen ermittelt. Bei Inkubation mit  $25,4 \mu\text{mol/l}$  Kaletra® (Lopinavir/Ritonavir), ergab der Zytotoxizitätstest bei HepG2-Zellen einen Wert von 17,1 %.



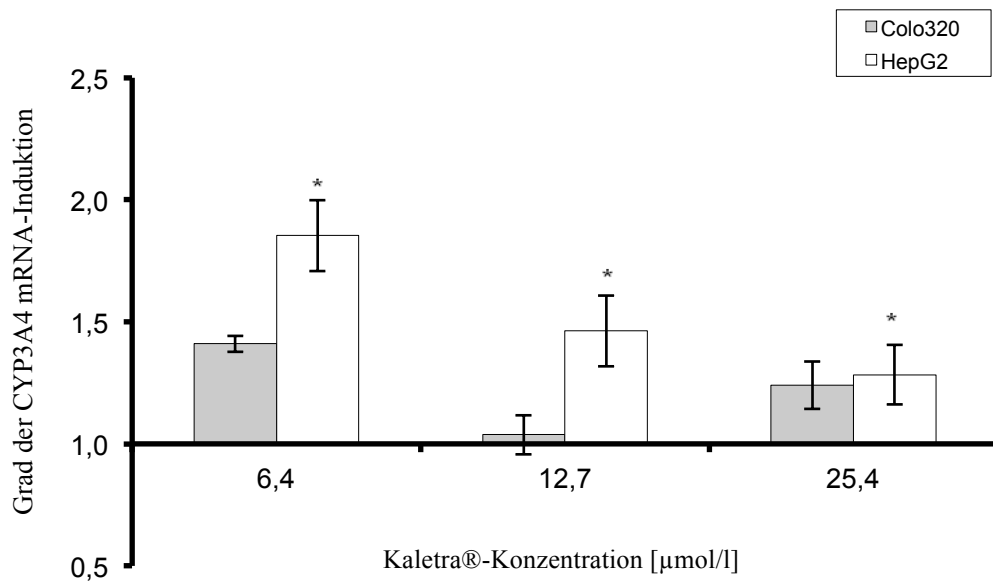


Abb. 14: CYP3A4-Expression in Zellen der Zelllinien HepG2 und Colo320 unter Einwirkung des PI Kaletra®. Die fixe Wirkstoffkombination Kaletra® enthält ein Gemisch aus Ritonavir: Lopinavir im Verhältnis 1:4. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf Lopinavir.

Es sind die Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA-Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA-Moleküle ohne Testsubstanz aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht. Die Sternchen symbolisieren signifikante Veränderungen in der Expression nach einem Vergleich mit den Basalwerten. Anzahl der Versuche:4.

Inkubation mit Nelfinavir erhöhte die Konzentration der CYP3A4-Transkripte in beiden untersuchten Zellsystemen.

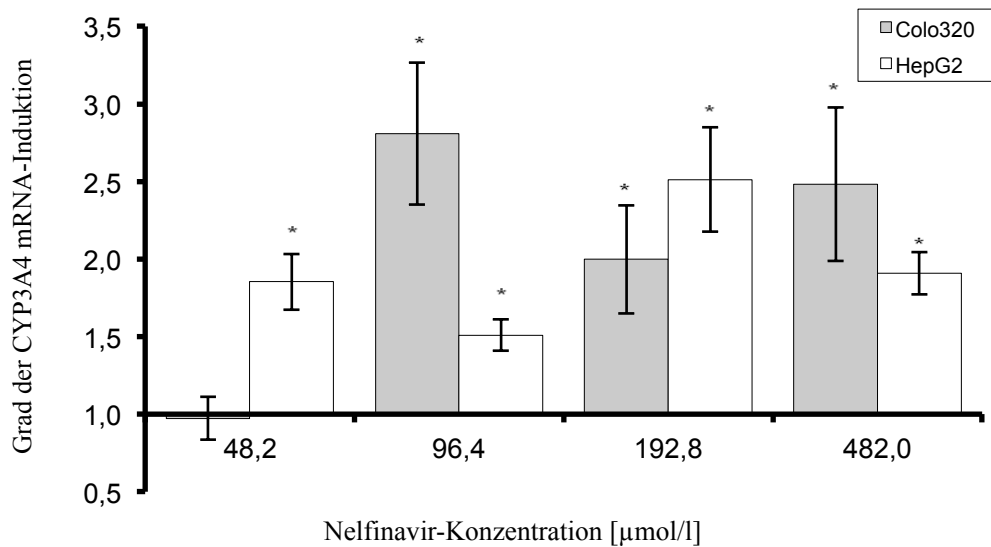


Abb. 15: CYP3A4-Expression in Zellen der Zelllinien HepG2 und Colo320 unter Einwirkung des PI Nelfinavir. Es sind die Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Die Werte der Konzentration wurden logarithmiert. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA-Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA-Moleküle ohne Testsubstanz aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht. Die Sternchen symbolisieren signifikante Veränderungen in der Expression nach einem Vergleich mit den Basalwerten. Anzahl der Versuche: 5.

In der HepG2-Zellkultur lag die maximale Induktion der CYP3A4-Expression bei einem Faktor von 2,5 ( $p = 0,026$ ). In der Colo320-Zellkultur lag die maximale Induktion der CYP3A4-Expression bei einem Faktor von 2,8 ( $p = 0,029$ ).

Als letzte Substanz dieser Wirkstoffklasse erfolgte die Inkubation der Zellen mit Saquinavir. Es wurde eine Induktion der CYP3A4-Expression um das 2,0fache ( $p = 0,032$ ) in der HepG2-Zelllinie nach Inkubation mit 23,9  $\mu\text{mol/l}$  gemessen. Bei der höheren Konzentration von 47,7  $\mu\text{mol/l}$  kam es zu einer Abnahme der CYP3A4-mRNA-Menge. Nach Inkubation mit 268,3  $\mu\text{mol/l}$  waren aufgrund des starken zytotoxischen Effektes der Substanz die HepG2-Zellen überwiegend geschädigt und vom Gefäßboden gelöst. In den Zellen der Zelllinie Colo320 ließ sich in der Versuchsreihe eine signifikante Induktion der CYP3A4-mRNA mit einem Anstieg um den Faktor 1,9 ( $p = 0,028$ ) nachweisen.

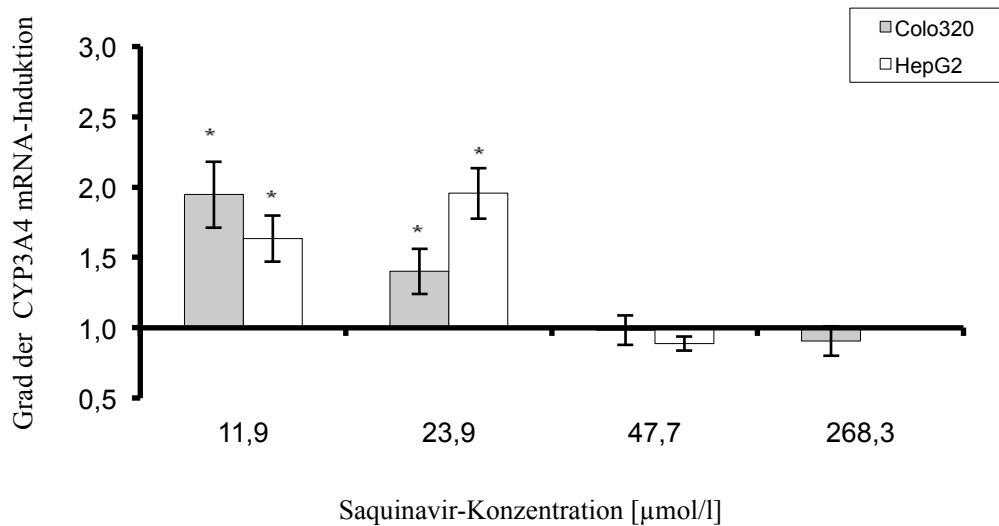


Abb. 16: CYP3A4-Expression in Zellen der Zelllinien HepG2 und Colo320 unter Einwirkung des PI Saquinavir. Es sind die Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Die Werte der Konzentration wurden logarithmiert. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA-Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA-Moleküle ohne Testsubstanz aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht. Die Sternchen symbolisieren signifikante Veränderungen in der Expression nach einem Vergleich mit den Basalwerten. Anzahl der Versuche: 8.

#### 4.5. Grad der CYP3A4-Induktion in den Zellkulturen

In den nachfolgenden Tabellen sind alle getesteten Substanzen mit ihren Konzentrationen sowie den Induktionseffekten auf CYP3A4 aufgeführt. In der Tabelle 22 sind die Ergebnisse aus den Untersuchungen an der Colo320-Zellkultur zusammengefasst, während Tabelle 21 die Daten aus der HepG2-Zellkultur enthält.

Tabelle 21: Induktionseffekt der getesteten Substanzen auf die Expression von CYP3A4 in HepG2-Zellkultur

<b>Substanz</b>	<b>Getestete Konzentration [µmol/l]</b>	<b>Konzentration bei maximaler CYP3A4-Induktion [µmol/l]</b>	<b>Max Induktion CYP3A4</b>
Rifampicin	19,4-195	38,9	2,6*
<b>Nukleosid-/Nukleotidanaloge Reverse-Transkriptase-Inhibitoren</b>			
Abacavir	23,9-239	23,9	1,5
Didanosin	21,2-212	42,3	1,2
Lamivudin	21,8-218	218	1,2
Stavudin	8,9-99	8,9	1,2
Zalcitabin	0,5-4,7	0,5	2,0
Zidovudin	59,9-599	120	1,4
<b>Nicht-nukleosidanaloge Reverse-Transkriptase-Inhibitoren</b>			
Delavirdin	57,9-579	57,9	2,2*
Efavirenz	10,2-102	102	3,2*
Nevirapin	60,2-602	241	1,4
<b>Proteaseinhibitoren</b>			
Amprenavir	63,3-633	127	3,3*
Indinavir	52,1-521	209	2,1*
Kaletra® <sup>1</sup>	6,4-25,4	6,4	1,7*
Nelfinavir	48,2-482	193	2,4*
Ritonavir	44,4-444		
Saquinavir	11,9-268	23,9	1,9*

<sup>1</sup>Bei Kaletra® beziehen sich die Konzentrationsangaben auf die Kombination Lopinavir/ Ritonavir (4:1).

\* Signifikanter Anstieg nach dem Kruskal-Wallis-Test (p<0,05)

Tabelle 22: Induktionseffekt der getesteten Substanzen auf die Expression von CYP3A4 in Colo320-Zellkultur

<b>Substanz</b>	<b>Getestete Konzentration [µmol/l]</b>	<b>Konzentration bei maximaler CYP3A4-Induktion [µmol/l]</b>	<b>Max Induktion CYP3A4</b>
Rifampicin	19,4-195	19,4	2,2*
<b>Nukleosid-/Nukleotidanaloge Reverse -Transkriptase-Inhibitoren</b>			
Abacavir	23,9-239	23,9	1,1
Didanosin	21,2-212	211,7	1,2
Lamivudin	21,8-218	43,6	1,2
Stavudin	8,9-89	89,2	1,2
Zalcitabin	0,5-4,7	1,9	1,4
Zidovudin	60-599	119,7	1,1
<b>Nicht Nukleosidanaloge Reverse -Transkriptase-Inhibitoren</b>			
Delavirdin	57,9-579	115,8	1,9
Efavirenz	10,2-102	101,6	1,9*
Nevirapin	60,2-602	0	1,0
<b>Proteaseinhibitoren</b>			
Amprenavir	63,3-633	632,9	2,3*
Indinavir	52,1-521	104,3	1,7*
Kaletra® <sup>1</sup>	6,4-25,4	6,4	1,4
Nelfinavir	48,2-482	96,4	2,5*
Ritonavir	44,4-444	177,5	1,7*
Saquinavir	11,9-477	11,9	1,4*

<sup>1</sup>Bei Kaletra® beziehen sich die Konzentrationsangaben auf die Kombination Lopinavir/ Ritonavir (4:1). \* Signifikanter Anstieg nach dem Kruskal-Wallis-Test ( $p < 0,05$ ).

Rifampicin gilt als starker Induktor der CYP3A4-Genexpression und -aktivität und eignet sich deshalb gut zum Vergleich. Die Effekte von Rifampicin auf die Expression von CYP3A4 wurden gleich 1 gesetzt und alle anderen Substanzen in Bezug zu dieser Größe ausgewertet.

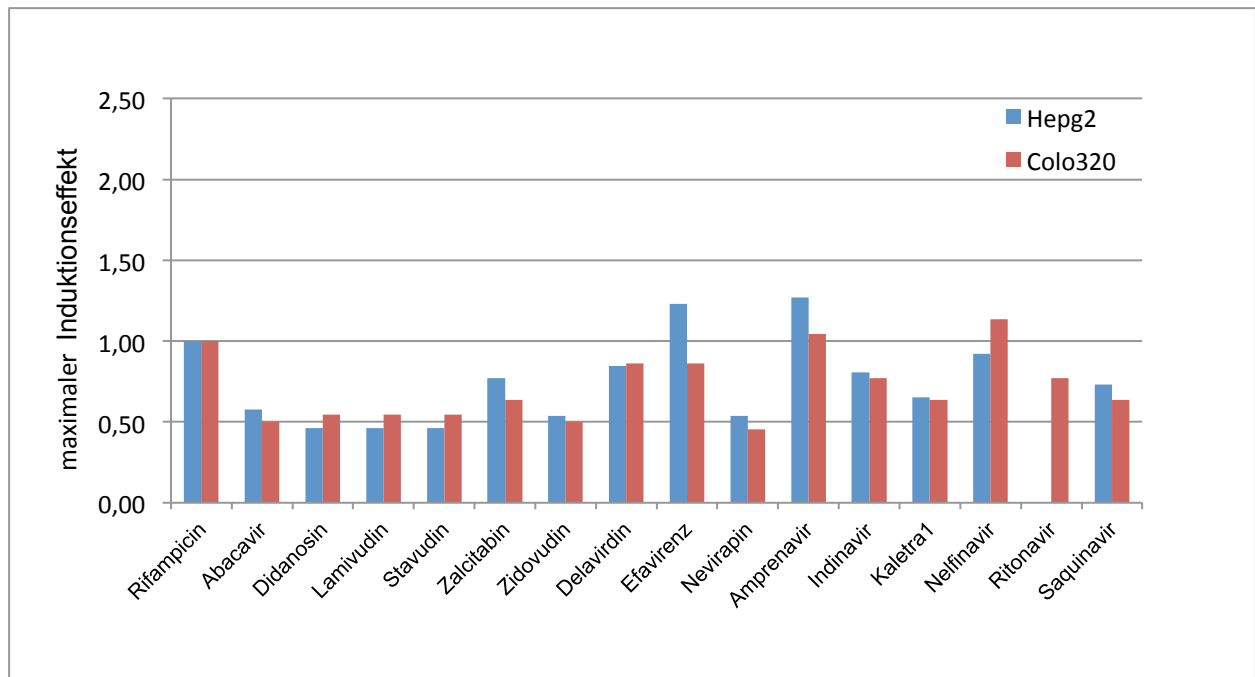


Abbildung 17: Der maximale Induktionseffekt der untersuchten Wirkstoffe auf die Expression von CYP3A4. Der Effekt von Rifampicin als Bezugsgröße wurde gleich 1 gesetzt.

Das Diagramm zeigt, dass sich die Induzierbarkeit von CYP3A4 in beiden Zelllinien nicht stark unterscheidet. Rifampicin wird als CYP3A4-Induktor von der Mehrzahl der geprüften Wirkstoffe nicht annähernd erreicht und lediglich von Delavirdin, Efavirenz, Amprenavir und Nelfinavir erreicht und ggf. um ein Geringes übertroffen.

In der Colo320-Zelllinie wurde die CYP3A4-Expression durch fünf antiretrovirale Mittel signifikant induziert: Amprenavir, Indinavir, Nelfinavir, Ritonavir und Saquinavir. In den HepG2-Zellen war das Spektrum der induzierenden Substanzen breiter, wobei neben den Induktoren der Colo320-Zellen auch Kaletra®, Amprenavir und Efavirenz die Konzentration von CYP3A4-mRNA statistisch signifikant erhöhte. Im Unterschied zu den HepG2-Zellen reagierten die Colo320-Zellen in den Versuchen empfindlicher auf höhere Dosen der Wirkstoffe.

## **V. Diskussion**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Induktion der Genexpression von CYP3A4-mRNA durch verschiedene antiretrovirale Mittel zu untersuchen. Zu Beginn der hier dargestellten Versuchsreihe wurden einzelne Zelllinien unterschiedlichen Gewebersprungs auf ihren CYP3A4-mRNA-Gehalt getestet.

Dies waren Zelllinien eines Zervixcarcinoms (HeLa), eines hepatozellulären Karzinoms (HepG2), zweier kolorektaler Karzinomzelllinien (Colo320 & CaCo), Zellen humanen Lebergewebes und Lymphozyten.

Entsprechend der Gewebeverteilung von CYP3A4 im menschlichen Körper zeigten die Zelllinien HepG2 mit 122 CYP3A4-Molekülen/ng mRNA, Colo320 mit 25 Molekülen/ng mRNA und das Lebergewebe mit 300.000 Molekülen CYP3A4/ng mRNA den höchsten CYP3A4-Gehalt. In Zellen der CaCo-Linie ließ sich kein CYP3A4 nachweisen.

Die Adenokarzinomzelllinie CaCo2 ist eine Zelllinie, die überwiegend als Modell für den Medikamententransport in Darmepithelzellen verwendet wird. Unter normalen Wachstumsbedingungen exprimieren CaCo-2-Zellen keine signifikanten Mengen an CYP3A4 [66], was sich in unseren Versuchen bestätigt.

Die aktuell am häufigsten verwendete Zelllinie in CYP3A4-Reporter-Gen-Assays ist die aus einem humanen hepatozellulären Karzinom gewonnene HepG2-Zelllinie [67]. Die HepG2-Zelllinie ist von Zellen eines humanen Leberzellkarzinom abgeleitet, kann unbegrenzt unter Standard-Kulturbedingungen kultiviert werden und besitzt einen stabileren Phänotyp als primäre Leberzellkulturen, was sie zu einem sehr beliebten menschlichen Zellebermodell macht [68]. Prozesse in diesen Zellen scheinen das Verhalten normaler Leberzellen nachzuahmen [69]. Im Vergleich zur humanen Leberzelle besitzt sie jedoch geringere Expressionslevel und Aktivitäten von vielen Xenobiotika-metabolisierenden Enzymen (Enzyme der Phase I und II der Biotransformation) [68].

Die Kombination aus HepG2-Zellen und Reverse-Transkriptase-Polymerase-Chain-Reaktion (RT-PCR) ermöglicht schnell und leicht die Evaluation des Grades der CYP3A-mRNA-Induktion [11, 70], was diesen Zelltyp für In-vitro-Versuche nutzbar macht. Westerink et al. konnten zeigen, dass die Regulation der CYP3A4-mRNA in den HepG2-Zellen über den Preg-

nane-X-Rezeptor ähnlich der Regulation der CYP3A4-mRNA in primären humanen Hepatozyten verläuft [12]. Aus diesem Grund eignet sich die HepG2-Zelllinie als Modell besonders für die Untersuchung metabolischer Prozesse humaner Hepatozyten [69].

Primär kultivierte humane Hepatozyten sind der Goldstandard für In-vitro-Untersuchungen von Metabolisierungsprozessen von Xenobiotika [71]. Die schlechte Verfügbarkeit von menschlichem Lebergewebe, die hohen Kosten, die aufwendige Isolierung, die geringe Lebensdauer und die interindividuelle Variabilität stellen ernste Beschränkungen der Verwendung solcher Zellen in In-vitro-Systemen dar [72, 73]. Als Modelle für In-Vitro-Versuche wurden deshalb verschiedene Zelllinien etabliert, die in der Verfügbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse deutlich den humanen Hepatozyten überlegen sind.

In unserer Versuchsreihe zeigte sich ein deutlicher Unterschied im CYP3A4-mRNA-Gehalt zwischen humanen Hepatozyten und HepG2-Zellen: In Zellen des Lebergewebes ließen sich 300.000 CYP3A4-Moleküle/ng RNA im Vergleich zu 122 Moleküle/ng RNA in HepG2-Zellen nachweisen. Der geringere CYP3A4-mRNA-Gehalt in HepG2-Zellen im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten wurde bereits in verschiedenen Arbeiten beschrieben. So zeigten Westerink et al., dass die Transkripte des CYP3A4-Enzyms in den HepG2-Zellen vorhanden sind, der Gehalt an CYP3A4-mRNA beträgt jedoch nur 0,1-1% des Wertes, der in primären humanen Hepatozyten gefunden wurde [12]. Auch Rodriguez-Antona et al. haben in HepG2-Zellen eine CYP3A4-mRNA-Konzentration gemessen, die < 0,25% des entsprechenden Wertes in Kulturen primärer humaner Hepatozyten entspricht [74].

Ursache für den geringen CYP3A4-mRNA Gehalt in HepG2-Zellen im Vergleich zu humanen Hepatozyten ist eine Repression von Cytochrom P450 in den HepG2-Zellen [27]. In Studien konnte gezeigt werden, dass der Phänotyp in adulten Leberzellen aus einem gewebsspezifischen Gen-Regulierungs-Programm resultiert. Dies entsteht durch Transkriptions-Regulierungs-Proteinen, den LETFs (Liver Enriched Transcription Factors) [75, 76]. Die hohen Transkriptionsraten vieler leberspezifischer Gene werden dabei nur erreicht, wenn viele LETFs an regulatorische Regionen binden und eine synergetische Transaktivierung triggern [27]. In dessen Folge kommt es zu einer vermehrten Synthese von Proteinen, die durch diese Gene kodiert werden.

In einzelnen Studien konnte nachgewiesen werden, dass verschiedene wichtige LETFs in HepG2-Zellen nur in sehr geringen Mengen vorhanden sind, was eine Down-Regulierung von Enzymen wie CYP3A4 zur Folge hat [77].



In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass es in Abhängigkeit der Passagen zu einer raschen Abnahme der Transkriptmenge von CYP3A4 kommt. Mikroskopische Untersuchungen zeigten eine homogene hepatozelluläre Organisation der Zellen im Monolayer und eine spontane Anordnung der Zellen in Pseudo-Kanälchen. Mit zunehmender Kultivierungsdauer entfernen sich die Zellen vom ursprünglichen Phänotyp, was sich auch in der geringeren CYP3A4-Expression bemerkbar machte. Die Ursache für die Abnahme der CYP-Expression ist dabei eine Down-Regulierung von CYP3A4 [74]. Diese wird vermutlich ebenfalls durch die Reduzierung von Transkriptions-Regulierungs-Proteinen verursacht.

Die zweite von uns verwendete Zelllinie, Colo320, wurde aus Zellen des kolorektalen Karzinoms entwickelt. Die höchsten Konzentrationen des Enzyms CYP3A4 im menschlichen Darm finden sich im Duodenum, mit absteigender Konzentration in Richtung Dickdarm [78]. CYP3A4 baut im Darmenterozythen einen Teil der resorbierten Stoffe ab und verhindert so deren Aufnahme in den Körper. Neben der Leber ist das Darmepithel ein wichtiger Ort für den First-Pass-Effekt. Unterstützt wird dieser Mechanismus durch das Transporterprotein P-Glykoprotein (Pgp). Hierbei handelt es sich um eine membrangebundene Pumpe, die Stoffe aus der Zelle heraus zurück in das Darmlumen transportiert. Eine funktionelle Verbindung von CYP3A4 und Pgp wird in zahlreichen Arbeiten angenommen. So zeigten Watkin et al., dass beider Substrate weitgehend übereinstimmen und Pgp bevorzugt Produkte CYP3A4-vermittelter Reaktionen aus der Zelle heraus transportiert [79].

Eine weit verbreitete Zelllinie zur Untersuchung des CYP-Pgp-Systems *in vitro* ist die Caco-Zelllinie. Jedoch zeigten die hier vorgestellten Versuche, dass sie nur geringe Mengen an CYP3A4-Transkripten enthielt und somit nicht für die anschließenden Versuche verwendet werden konnte. Die stattdessen verwendeten Zellen Colo320 sind ebenfalls enterozytären Ursprungs und dienen als Zellmodell für humane epitheliale Darmzellen. In unseren Versuchen konnte in den Colo320-Zellen ein Gehalt von 25 Molekülen CYP3A4-mRNA/ng DNA nachgewiesen werden. Zu bedenken ist jedoch, dass Kolontumorzellen mehr P-Glycoprotein exprimieren und somit die Stoffkonzentrationen der einzelnen Testsubstanzen in der Zelle nicht identisch mit denen in humanen Enterozyten sind.

### **5.1. Rifampicin als Induktor**

Rifampicin ist die am besten beschriebene Substanz mit induktiver Potenz auf die Transkription von CYP3A4 [80]. 1972 gelang es Remmer et al., in menschlichen Leberbiopaten nach der Inkubation mit Rifampicin eine Zunahme des Gehaltes an Cytochrom P450 nachzuweisen [80, 81].

Im Jahr 1992 konnte die Arbeitsgruppe um Kolars die Induzierbarkeit von CYP3A4 in humanen Enterozyten durch Rifampicin in vitro nachweisen [82]. Dabei wurden Probanden Dünndarmbiopsien vor und nach der Behandlung mit Rifampicin (300 mg/12 h) entnommen. In den gewonnenen Biopsien zeigte sich nach der 7-tägiger Behandlung mit Rifampicin eine Zunahme der CYP3A4-Konzentration [82].

Die Induzierbarkeit von CYP3A4 in humanen Leberzellen durch Rifampicin ist hinreichend bekannt [11-13, 19]. In einer Arbeit von Westerink et al. konnte eine Induktion der CYP3A4-mRNA-Bildung in HepG2-Zellen durch Rifampicin nachgewiesen werden. Nach 24-stündiger Inkubation mit Rifampicin war die CYP3A4-mRNA-Bildung bis zum 4,5fachen angestiegen [12].

Rifampicin ist aufgrund seiner gut untersuchten Eigenschaften als Induktor von CYP3A4 geeignet, die Sensitivität neuer Methoden zur Untersuchung der Induzierbarkeit der CYP3A4-Genexpression nachzuweisen. So führten z. B. Dixit et al. in den 2007 veröffentlichten Versuchen ebenfalls Rifampicin als Referenzsubstanz mit [19].

In unseren Versuchsreihen zur Induktion der CYP3A4-Expression in den Zelllinien HepG2 und Colo320 verwendeten wir ebenfalls Rifampicin als Referenzsubstanz. Die Inkubation der Zellen erfolgte über 20 h, 40 h und 72 h. Der maximale Induktionseffekt wurde in den HepG2-Zellen nach 20-stündiger Inkubation mit Rifampicin erreicht. Eine längere Inkubation führte zu einer Abnahme der CYP3A4-mRNA-Menge. HepG2-Zellen zeigten bei einer mittleren Rifampicin-Konzentration von 38 µmol/l die beste Induzierbarkeit von CYP3A4. Bei höherer Konzentration (194,4 µmol/l) war die CYP3A4-mRNA-Transkriptionsrate geringer. In der Zelllinie Colo320 war die CYP3A4-mRNA-Bildung bei der niedrigsten getesteten Rifampicinkonzentration (19,4 µmol/l) am höchsten.

Die Abnahme der CYP3A4-mRNA-Konzentration bei einer längeren Inkubation der Zellen und bei höheren Konzentrationen könnte auf eine zunehmende Zytotoxizität der Testsubstanz zurückzuführen sein, wobei die Zellen der Zelllinie Colo320 anfälliger auf hohe Rifampicindosen

zu reagieren scheinen als HepG2-Zellen. Eine zweite Hypothese wäre die Sättigung der Bindung am PX-Rezeptor. Gegen diese These spricht jedoch der Abfall der CYP3A4-mRNA-Bildung nach einer Inkubation mit höheren Rifampicin-Konzentrationen. Bei einer Sättigung müsste es zum Erreichen eines Steady-State mit einer konstanten Bildungsrate kommen.

In einer Arbeit von Tatsuhiro et al. wurde ebenfalls die Induzierbarkeit der CYP3A4-mRNA-Bildung durch Rifampicin in HepG2-Zellen nachgewiesen [11]. Die Autoren inkubierten die Zellen mit 12,15  $\mu\text{mol/l}$  Rifampicin über 4 Tage. Nach 2 Tagen war ein Niveau der CYP3A4-mRNA-Bildung erreicht, das über die restlichen 2 Tagen konstant blieb [11]. Längere Inkubation führte hier bei einem ähnlichen Versuchsaufbau nicht zu einer Abnahme der CYP3A4-mRNA-Bildung. Allerdings verwendeten Tatsuhiro et al. für ihre Induktionsversuche eine niedrigere Rifampicin-Konzentration, was möglicherweise eine Erklärung ist.

## **5.2. Nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren Abacavir, Didanosin, Lamivudin, Stavudin, Zalcitabin und Zidovudin auf ihre induktive Potenz bezüglich der Expression von CYP3A4 untersucht. Weder HepG2-Zellen noch Colo320-Zellen zeigten nach Inkubation mit den getesteten NRTIs Veränderungen der CYP3A4-mRNA-Bildung. Die genauere Betrachtung der Pharmakokinetiken dieser Wirkstoffe erklärt diese Ergebnisse.

NRTI sind Nukleosidanaloga, die in ihrer Struktur endogenen Nukleosiden ähneln. Der Einbau dieser Nukleosidanaloga als falsche RNA-Bausteine führt zur Unterbrechung der Transkription der Virus-RNA in DNA durch die Reverse Transkriptase. NRTI sind Prodrugs, die nach Aufnahme in den Körper in ihre aktive Form durch Phosphorylierung in der Zelle überführt wird. Im Anschluss erfolgt die Ausscheidung der Substanzen und ihrer Metabolite primär über die Niere [83]. Dabei werden die NRTIs überwiegend durch glomeruläre Filtration und aktive tubuläre Sekretion ausgeschieden [84]. Einige der NRTIs (Zidovudin, Stavudin) unterliegen vor ihrer renalen Elimination noch einer Glukuronidierung in der Leber, den Nieren und in der intestinalen Mukosa [84, 85]. Da NRTI keinen Einfluß auf Cytochrom P450 haben, kann es nicht zu einer Interaktion mit anderen Medikamenten, die über Cytochrom P450 verstoffwechselt werden, kommen [83].

Eine Induktion der Transkription des CYP3A4-Gens erfolgt über die beiden Kernrezeptoren CAR und PXR [29]. Diese wandern nach Bindung an ihren Liganden in den Zellkern und aktivieren durch Bindung an die Promotoreinheit des CYP3A4-Gens dessen Transkription [86, 87]. CAR und PXR sind Mitglieder der gleichen Kernrezeptor Subfamilie (NR1). Im Bereich ihrer Ligandenbindungsstelle sind sie in 40% ihrer Aminosäuresequenz identisch [29]. Zu den Liganden von CAR und PXR gehören Xenobiotika, wie z.B. Antibiotika, Statine und Glucocorticoide [88]. In der Literatur sind Nukleotide und Nukleoside nicht als Liganden von PXR und CAR beschrieben. Es ist davon auszugehen, dass die NRTI's aufgrund ihrer strukturellen Nähe zu endogenen Nukleosiden nicht in der Lage sind, eine Bindung mit den Kernrezeptoren einzugehen. Als Folge dessen kommt es nicht zu einer Aktivierung/Induktion der Kernrezeptor-vermittelten Transkription des CYP3A4-Gens.

Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen, die keine signifikante Induktion von CYP3A4 durch NRTIs zeigen. Aufgrund dieser Eigenschaft können die Wirkstoffe dieser Stoffklasse mit nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren und Proteaseinhibitoren kombiniert werden, ohne dass eine Dosisanpassung notwendig ist. Dadurch ist mit weniger Nebenwirkungen, die sich aus der Kombination mehrerer Substanzklassen ergeben, zu rechnen.

Änderungen der Plasmakonzentration der Nukleosid-Analoga sind vermutlich nicht von klinischer Relevanz, da die Medikamentenwirkung hauptsächlich von der Geschwindigkeit und dem Ausmaß der intrazellulären Phosphorylierung abhängt [63].

### **5.3. Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren**

In der Gruppe der nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren wurden die Substanzen Delavirdin, Efavirenz und Nevirapin getestet.

#### **5.3.1. Delavirdin**

Der nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitor Delavirdin ist ein Bisheteroaryl-piperazine-Derivat, das weitgehend durch CYP3A4 metabolisiert wird [89]. Die Inkubation mit Delavirdin führte zur Induktion der CYP3A4-mRNA in der Zelllinie HepG2. In Colo320-Zellen konnte keine signifikante Zunahme der CYP3A4-mRNA-Konzentration nachgewiesen werden.

Delavirdin wird überwiegend über das Enzym CYP3A4 und zu einem geringeren Teil über CYP2D6 verstoffwechselt [64].

In-vitro-Studien der vergangenen Jahre zeigten, dass Delavirdin ein Inhibitor von CYP3A4 ist [18]. So konnten Voorman et al. 1998 in Versuchen mit gepoolten Lebermikrosomen von Delavirdin-behandelten Ratten das CYP3A4-Inhibitionspotential von Delavirdin nachweisen [64]. In-vivo-Studien am Menschen bestätigten diese Ergebnisse. So wurde nach Einnahme von Delavirdin ein rapider und signifikanter Abfall der CYP3A4-Aktivität festgestellt [18].

Die CYP3A4-hemmende Eigenschaft von Delavirdin kann klinisch genutzt werden. Bei Kombination mit einem CYP3A4-Substrat, z.B. mit Amprenavir, hemmt Delavirdin dessen Abbau. Die Tagesdosis von Amprenavir kann deshalb reduziert werden [18]. Ähnliche Effekte zeigten sich in klinischen Studien bei der Kombination von Delavirdin mit den Proteaseinhibitoren Indinavir, Nelfinavir, Ritonavir und Saquinavir [90]. Dies bedeutet für den einzelnen Patienten eine geringere Anzahl einzunehmender Tabletten, was zu einer Verbesserung der Compliance führt.

Aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse muss ein induzierender Effekt von Delavirdin auf CYP3A4 diskutiert werden. Ähnlich wie Efavirenz scheint Delavirdin sowohl eine induktive als auch eine hemmende Wirkung auf CYP3A4 zu haben. Die klinische Bedeutung der induktiven Potenz von Delavirdin scheint jedoch, wie die vielen In-vivo-Ergebnisse zeigen, gering zu sein. Welche der beiden Wirkungen überwiegt, könnte von Dosis und Zeitraum der Verabreichung abhängen. Zur genaueren Untersuchung unserer Ergebnisse sind weitere Studien notwendig.

### **5.3.2. Efavirenz**

Für die Substanz Efavirenz wurde in beiden Zellsystemen (HepG2, Colo320) eine signifikante Induktion der CYP3A4-mRNA-Bildung nachgewiesen.

Efavirenz wird überwiegend über CYP2B6 und zu einem geringeren Anteil über CYP3A4 verstoffwechselt [91, 92]. Es ist in der Literatur sowohl als Induktor, als auch als Inhibitor von CYP3A4 bekannt [9, 14]. Hariparsad et al. zeigten eine bis zu 4fache Induktion der CYP3A4-Expression durch Efavirenz [13]. In-Vitro-Studien an kultivierten humanen Hepatozyten bestätigten eine Induktion von CYP3A-Enzymen durch Efavirenz [13, 21-23, 48]. Eine Induktion lässt sich auch in vivo am Menschen nachweisen, wie in verschiedenen pharmakokinetischen Studien gezeigt werden konnte [13].

### **5.3.3. Nevirapin**

Die Substanz Nevirapin führte in den Versuchen dieser Arbeit zu keiner signifikanten Veränderung der CYP3A4-mRNA-Bildung in den beiden Zelllinien. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu bereits veröffentlichten Studien. In-vitro-Versuche mit Nevirapin haben gezeigt, dass CYP3A4 und CYP2B6 für seinen Metabolismus verantwortlich sind, und zu einem geringeren Anteil auch CYP2D6 [92-94]. Nach der Metabolisierung des Wirkstoffes durch die genannten Enzyme erfolgt die Ausscheidung über die Niere.

Nevirapin ist als Induktor der Enzyme CYP3A4 und CYP2B6 bekannt [95]. Da Nevirapin auch Substrat dieser beiden Enzyme ist, induziert es seine eigene Metabolisierung [95]. Die CYP3A4-Induktion durch Nevirapin konnte in mehreren klinischen Studien nachgewiesen werden. So führten Murphy et al. eine Studie durch, in der 24 Probanden Nevirapin in Kombination mit dem Proteaseinhibitor Indinavir über 28 Tage einnahmen [96]. Die Messungen zeigten eine Reduktion der Plasmakonzentration von Indinavir. Andere Forschergruppen kombinierten Nevirapin mit dem Proteaseinhibitor Saquinavir [97]. Auch hier war die Saquinavir-Plasmakonzentration bei gleichzeitiger Verabreichung von Nevirapin niedriger. Wurden jedoch die Proteaseinhibitoren Nelfinavir und Ritonavir mit Nevirapin kombiniert, zeigte sich keine Änderung der Plasmakonzentration dieser Medikamente.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse erklären sich durch den Metabolisierungsweg der Proteaseinhibitoren. So werden Ritonavir und Nelfinavir nicht ausschließlich über CYP3A4 verstoffwechselt [84], weshalb eine Induktion des Enzymsystems im Gegensatz zu Saquinavir und Indinavir, die überwiegend durch CYP3A4 metabolisiert werden, keine Auswirkung auf die Plasmakonzentration hat.

Da Nevirapin CYP3A4 induzieren kann, ist eine Erhöhung der Dosis von Lopinavir/Ritonavir erforderlich, wenn diese zusammen mit Nevirapin verabreicht wird [96]. Es konnte gezeigt werden, dass es nach einer zweiwöchigen Gabe von Nevirapin zu einer Autoinduktion von CYP3A4 kommt, mit einem ungefähr zweifachen Anstieg der oralen Nevirapinclearance und einer Verkürzung der Halbwertszeit von 45 auf 30 h [96, 98]. Die maximale Induktion von CYP3A4 ist erst nach 2 bis 4 Wochen zu registrieren [84]. Aufgrund dieses Phänomens wird die Tagesdosis von Nevirapin während der Therapie nach zweiwöchiger Gabe von 200 mg/d auf 400 mg/d erhöht.

Eine Erklärung für den fehlenden Nachweis der Induktion von CYP3A4 in unseren Versuchen könnte die kurze Versuchszeit sein. In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Inkubation der Zellen mit Nevirapin nur über einen Zeitraum von 20 h.

Die in dieser Arbeit dargestellten Inkubationsversuche, wurden erstmals mit den Zelllinien HepG2 und Colo320 für den Wirkstoff Nevirapin durchgeführt. Ein fehlender Nachweis der Induktion der CYP3A4-mRNA kann in der Wahl der verwendeten Wirkstoffkonzentration von Nevirapin liegen, die eventuell nicht ausreicht, um die Transkription der CYP3A4-mRNA zu aktivieren. Auch handelt es sich bei den verwendeten Zelllinien nur um Modelle, die auf Grund der unterschiedlichen Genmuster sich von humanen Leberzellen oder Darmepithelzellen unterscheiden. Somit können die In-vitro-Ergebnisse nicht 1:1 auf den menschlichen Organismus übertragen werden und geben nur Hinweise auf mögliche Aktivierungsmuster.

#### **5.4. Proteaseinhibitoren**

Untersucht wurden die Proteaseinhibitoren Amprenavir, Indinavir, Kaletra®, Nelfinavir, Ritonavir und Saquinavir. Proteaseinhibitoren werden sowohl in der Leber als auch im Darm über CYP3A4 metabolisiert. Aufgrund des Metabolisierungsweges kommen sie als mögliche Induktoren von CYP3A4 in Frage. Bei allen getesteten Wirkstoffen ist eine hohe inhibitorische Potenz gegenüber CYP3A4 bekannt und in mehreren In-vivo- und In-vitro-Studien nachgewiesen [99]. Die Hemmung des Enzymkomplexes erfolgt dabei auf Proteinebene, d.h. posttranslational. Die einzelnen Proteaseinhibitoren haben in vivo eine unterschiedliche inhibitorische Wirkung. Ritonavir hat dabei die größte und Saquinavir die schwächste inhibitorische Potenz. Diese inhibitorischen Eigenschaft der PIs macht man sich z.B. in der Therapie der HIV-Infektion zu Nutze und kann somit eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit einzelner Substanzen erreichen.

In der vorliegenden Arbeit gelang es, zusätzlich zu der bekannten inhibitorischen Wirkung der Proteaseinhibitoren, induktive Eigenschaften auf die Transkription des CYP3A4-Gens sowohl in

Zellen hepatozellulären als auch enterozytischen Ursprungs nachzuweisen. Im Folgenden werden einzelne Ergebnisse dargestellt und weiter diskutiert.

#### **5.4.1. Amprenavir**

Inkubation mit Amprenavir führt zu einer Induktion der CYP3A4-mRNA-Bildung um den Faktor 2,3 in HepG2-Zellen und um den Faktor 1,8 in Colo320-Zellen. Amprenavir wird überwiegend über das Enzym CYP3A4 metabolisiert und zu einem geringeren Anteil über CYP2D6, CYP2C9 und CYP2C19 [100]. Es konnte in In-Vitro und In-Vivo Studien nachgewiesen werden, dass Amprenavir ein Ligand des PX-Rezeptors ist, der die Induktion von CYP3A4 vermittelt (siehe Tabelle 2) [45, 101]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden durch einzelne In-vitro- und In-vivo-Studien bestätigt.

Die Arbeitsgruppe um Huang et al. führte In-vivo-Untersuchungen an Leber- und Darmzellen von Ratten durch. Er konnte die Induktion der CYP3A4-mRNA-Bildung in Leberzellen von Ratten nach einer oralen Verabreichung von Amprenavir über 7 bis 14 Tage nachweisen [24]. Die AUC von Amprenavir war dabei um 51% nach 14tägiger Behandlung verringert.

In einer 2003 veröffentlichten Studie konnte die Arbeitsgruppe um Justesen et al. einen Einfluss von Amprenavir auf die Metabolisierung von Delavirdin nachweisen [23]. Die Arbeitsgruppe vermutete eine Induktion des CYP3A4-Enzyms durch Amprenavir als Ursache der Beobachtung. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Tran et al. Sie untersuchten die Pharmakokinetik von Amprenavir und Delavirdin nach Einzelgabe und in Kombination an gesunden Probanden. Es konnte eine niedrigere Delavirdin-Plasmakonzentration bei gleichzeitiger Einnahme von Amprenavir im Vergleich zur Delavirdinkonzentration bei alleiniger Einnahme festgestellt werden [22]. Da Delavirdin hauptsächlich über CYP3A4 metabolisiert wird, lassen die Ergebnisse von Tran et al. auf eine Induktion von CYP3A4 durch Amprenavir schließen.

Eine weitere Beobachtung in dieser Studie war die Tatsache, dass die orale Clearance von Amprenavir allein (ohne gleichzeitige Delavirdingabe) während der Einnahme mehrerer Dosen von Amprenavir (1451 ml/min) etwa doppelt so hoch war, als nach der Einnahme einer Einzeldosis von Amprenavir (784 ml/min). Aus diesen Ergebnissen schließen die Autoren eine mögliche Autoinduktion von Amprenavir bei der Einnahme mehrerer Dosen [22].

Die hier zitierten In-vivo-Studien deuten auf ein Induktionspotential von Amprenavir bezüglich CYP3A4 hin. In der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen, diese induktive Eigenschaft von Amprenavir in den Zellkulturen HepG2 und Colo320 nachzuweisen (siehe Tabelle 21 und 22).



### 5.4.2. Indinavir

Unsere Ergebnisse zeigen eine Induktion der CYP3A4-Expression in HepG2-Zellen um den Faktor 2,5 und in Colo320 um den Faktor 1,9. Damit gelang es erstmalig, einen induktiven Effekt von Indinavir auf die CYP3A4-mRNA-Bildung in Zellkulturen nachzuweisen.

Indinavir ist ein Proteaseinhibitor, der über CYP3A4 metabolisiert wird [102, 103]. Es gibt wenig Information über die Auswirkungen einer Indinavir-Monotherapie auf die CYP3A4-Aktivität, da die meisten Untersuchungen in Kombination mit Ritonavir durchgeführt wurden [104]. Die wenigen veröffentlichten Studien sprechen für eine überwiegend hemmende Wirkung von Indinavir auf CYP3A4.

Die ersten In-vitro-Studien zur Pharmakokinetik von Indinavir wurden in den 90-iger Jahren an humanen Lebermikrosomen durchgeführt. Koudriakova et al. inkubierten Mikrosomen aus Leber- und Darmzellen mit Indinavir und konnten eine Hemmung von CYP3A4 nachweisen [105]. In weiteren Untersuchungen konnten z.B. Chiba et al. zeigen, dass Indinavir ein kompetitiver Hemmer der Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung ist, und schlußfolgerten daraus eine Hemmung von CYP3A4 durch Indinavir [106]. Die Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung gilt als ein Marker der CYP3A-Aktivität [106]. Eine 2005 von Ernest et al. publizierte Studie an humanen Lebermikrosomen konnte ebenfalls eine Hemmung der Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung durch Indinavir nachweisen [99].

In-vivo-Studien bestätigten die In-vitro-Ergebnisse der 90-iger Jahre. Sie zeigten, dass Indinavir sowohl die AUC von Rifampicin und Rifabutin 1,7- bzw. 2fach erhöhte als auch die AUC von Nelfinavir und Clarithromycin erhöhte und die Amprenavir-Clearance halbiert [107]. Eine 2012 veröffentlichte In-vivo-Studie von Kharasch et al. an gesunden Probanden konnte ebenfalls die hemmenden Eigenschaften von Indinavir nachweisen [104]. Obwohl Indinavir eine CYP3A4-Hemmung zugeschrieben wird, wurde der tatsächliche Mechanismus nie identifiziert.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse können erstmals einen induktiven Effekt von Indinavir auf die CYP3A4-mRNA Bildung nachweisen, wobei die Inkubation der Zellen mit deutlich höheren Indinavirkonzentrationen als in den bereits veröffentlichten Arbeiten erfolgte. Somit muss eine dosisabhängige Induktion der CYP3A4-Expression diskutiert werden.

Die Induktion der CYP3A4-Expression wird in der Zelle über verschiedene Kernrezeptoren (PXR, CAR) vermittelt. Bisher war Indinavir nicht als Ligand dieser Rezeptoren bekannt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zu bestätigen.

Die in dieser Arbeit veröffentlichten Ergebnisse zeigen, dass Indinavir sowohl in den HepG2-Zellen, als auch in den Colo320-Zellen einen Einfluss auf das CYP3A4-Enzymsystem hat und somit potentiell in diesen Zellen eine Medikamenteninteraktion stattfinden kann. Ähnlich wie bei Amprenavir scheint *in vivo* das induktive Potential von Indinavir klinisch nicht relevant zu sein. Bei den in der Therapie der HIV-Erkrankung verwendeten Dosierungen von Indinavir scheint die hemmende Eigenschaft von Indinavir zu überwiegen.

#### **5.4.3. Lopinavir/Ritonavir (Kaletra®)**

Kaletra® (Lopinavir/Ritonavir) ist ein Kombinationspräparat aus zwei strukturell verwandten Proteaseinhibitoren. Aufgrund der schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften von Lopinavir wird es mit Ritonavir in einer festen Kombination verabreicht. Hierbei macht man sich die bekannten hemmenden Eigenschaften von Ritonavir auf das CYP3A4-Enzymsystem zu Nutze. *In vitro* lässt sich für die Kombination Lopinavir/Ritonavir eine 10fach höhere antiretrovirale Aktivität nachweisen [108]. *In vivo* unterliegt Lopinavir einem starken First-Pass-Metabolismus durch CYP3A4 in der Leber. Bei Kombination von Lopinavir mit niedrig dosiertem Ritonavir ist es möglich, die metabolische Inaktivierung von Lopinavir zu hemmen [108]. Im klinischen Alltag bedeutet es für den Patienten, dass er eine niedrigere Lopinavirdosis benötigt.

Da Lopinavir ausschließlich in Kombination mit Ritonavir eingesetzt wird, wurde in den hier dargestellten Versuchen diese Wirkstoffkombination verwendet.

In HepG2-Zellen zeigte die Wirkstoffkombination Lopinavir/Ritonavir bezüglich der CYP3A4-mRNA-Bildung induktive Eigenschaften (siehe Tabelle 21), welche bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurden. In Zellen der Zelllinie Colo320 konnte in dieser Arbeit keine Induktion der CYP3A4-Genexpression beobachtet werden (siehe Tabelle 22).

In den ersten Untersuchungen Ende der 90-iger Jahre ließen sich ausschließlich hemmende Eigenschaften von Lopinavir/Ritonavir nachweisen.

Eine der ersten veröffentlichten Studien zur Pharmakokinetik von Lopinavir/Ritonavir untersuchte die pharmakokinetischen Eigenschaften in isolierten humanen Lebermikrosomen. Hierbei konnte zum einen die Metabolisierung von Lopinavir/Ritonavir über die Enzyme CYP3A4 und CYP3A5 sowie die hemmende Wirkung von Lopinavir/Ritonavir auf das CYP3A-Enzymsystem nachgewiesen werden [109], wobei Lopinavir/Ritonavir deutlich schwächer als Ritonavir allein war. In diesen Untersuchungen wurde angenommen, dass die Hemmung von CYP3A4 vor allem auf den Ritonaviranteil in Lopinavir/Ritonavir zurückzuführen ist.

Weitere *In-vitro*-Studien mit ähnlichen Ergebnissen folgten. 2010 gelang es der Arbeitsgruppe von Svärd et al., die Fähigkeit von Lopinavir zur Induktion der PXR-vermittelten CYP3A4-

Promotoraktivität in transfizierten HepG2-Zellen nachzuweisen [110]. Dafür wurden die vorher mit CYP3A4-transfizierten HepG2-Zellen 48 h mit Lopinavir inkubiert. In diesen Versuchen wurde Lopinavir nicht in Kombination mit Ritonavir eingesetzt [110]. Die Ergebnisse von Svärd et al. bestätigen die induktiven Fähigkeiten von Lopinavir und zeigen, dass Lopinavir ein Ligand des PX-Rezeptors ist.

Die pharmakokinetischen Eigenschaften von Lopinavir/Ritonavir sind in verschiedenen In-vivo-Studien an gesunden Probanden und an HIV-infizierten Erwachsenen untersucht worden. In diesen Studien bestätigte sich das inhibitorische Potential von Lopinavir/Ritonavir. Neuere Studien deuten jedoch auf zusätzliche induktive Eigenschaften von Lopinavir/Ritonavir hin. In einer 2006 an gesunden Probanden durchgeführten Studie von Yeh et al. konnte eine Induktion verschiedener Cytochrome nachgewiesen werden. So zeigte sich nach einer 10-tägigen Therapie der Probanden mit Lopinavir/Ritonavir eine Zunahme der CYP1A2-Aktivität um 43%, der CYP2C9-Aktivität um 29% und der CYP2C19-Aktivität um 100%. Die hepatische Enzymaktivität von CYP3 sank dabei um 77% [41]. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte in dieser Studie unter der Verwendung eines Phänotypisierungs-Biomarkercocktails [41].

Diese Ergebnisse bestätigten die 2004 von Lim et al. bei gesunden Probanden nachgewiesene Induktion von CYP2C9 [111]. Wie einzelne Untersuchungen zeigten, ist Lopinavir/Ritonavir ein Ligand des PX-Rezeptors. Die induktive Eigenschaft von Lopinavir/Ritonavir auf CYPs wird wahrscheinlich über den PX-Rezeptor vermittelt. Ein Nachweis einer induktiven Wirkung von Lopinavir/Ritonavir auf das CYP3A4-Enzym ist noch nicht veröffentlicht worden.

Die vorliegende Arbeit betrachtet erstmalig die Wirkung von Lopinavir/Ritonavir auf die CYP3A4-mRNA-Bildung. Es gelang der Nachweis einer Induktion der CYP3A4-Expression durch Lopinavir/Ritonavir in den HepG2-Zellen. Nachdem in vitro eine Induktion der Enzyme CYP2C19, CYP2C9 und CYP1A2 bereits bekannt ist und die Induktion der PXR-Promotoraktivität durch Lopinavir bereits in einzelnen Arbeiten nachgewiesen ist, muss aufgrund unserer Ergebnisse auch von einer Induktion der CYP3A4-Expression auf molekularer Ebene durch Lopinavir/Ritonavir ausgegangen werden. In-vivo-Studien zeigten einen ausschließlich hemmenden Effekt von Lopinavir/Ritonavir. Somit ist davon auszugehen, dass die inhibitorischen Eigenschaften von Lopinavir/Ritonavir in vivo überwiegen und das induktive Potential auf molekularer Ebene überlagert wird.

#### **5.4.4. Nelfinavir**

Unter Inkubation der beiden verwendeten Zelllinien mit dem Wirkstoff Nelfinavir konnte ein gleichsinniges Verhalten der HepG2- und Colo320-Zellen in Bezug auf die Induktion der Expression von CYP3A4 nachgewiesen werden. So zeigte sich in den Zellen der Zelllinie HepG2

eine Induktion der CYP3A4-mRNA-Bildung um den Faktor 2,4, während der Grad der Induktion in den Colo320-Zellen 2,5 betrug (siehe Tabelle 21 und 22).

Nelfinavir ist ein Inhibitor von Cytochrom P450. In vielen In-vitro- und In-vivo-Studien konnte dies gezeigt werden [112]. Unsere Experimente kommen zu dem Ergebnis, dass Nelfinavir auch ein induktives Potential hat. Eine signifikante Induktion der CYP3A4-Expression trat dabei sowohl in den HepG2-Zellen als auch in den Colo320-Zellen auf. Diese Ergebnisse stützen die bereits von Huang et al. im Tiermodell nachgewiesene CYP3A4-Induktion durch Nelfinavir [24]. Die Arbeitsgruppe um Huang konnte die Induktion der CYP3A4-Transkription in Leberzellen von Ratten nachweisen, die Nelfinavir über 7 bis 14 Tage oral aufgenommen hatten [24]. In den Zellen des Gastrointestinaltraktes zeigte sich dagegen keine Induktion der CYP3A4-mRNA-Bildung [24]. Huang schlussfolgerte aus seinen Ergebnissen, dass die CYP3A4-Expression in Leber und Darm der Ratte nicht miteinander korrelieren [24].

#### **5.4.5. Ritonavir**

Ritonavir ist ein CYP3A4-Inhibitor. In dieser Arbeit gelang der Nachweis, dass Ritonavir zusätzlich eine Induktion auf das CYP3A4-System hervorruft. Unsere Ergebnisse zeigen eine Induktion der CYP3A4-mRNA-Bildung um das 2,1fache in HepG2-Zellen und um das 1,7fache in Colo320-Zellen. Ritonavir gehört zu einer Medikamentenklasse, bei der aufgrund einer komplexen Medikamenteninteraktionen sowohl eine Hemmung, als auch eine Induktion verschiedener verstoffwechselnder Enzyme beobachtet werden konnte [3]. Halladay et al. konnte 2012 eine konzentrationsabhängige Zunahme der CYP3A4-mRNA in kryokonservierten Hepatozyten nach Inkubation in 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M und 5  $\mu$ M Ritonavir nachweisen [3].

Die Ergebnisse unserer Arbeit werden weiter durch die 2007 veröffentlichten Versuche von Dixit et al. gestützt. Die Arbeitsgruppe untersuchte die Wirkung von Ritonavir und Nelfinavir auf die CYP3A4-Expression an humanen Lebermikrosomen [19]. Als Kontrolle wurde Rifampicin mitgeführt. Dabei gelang es, eine Induktion der Transkription von CYP3A4 durch Ritonavir und Nelfinavir nachzuweisen [19]. Außer CYP3A4 wurde auch die Induzierbarkeit von CYP2B6, CYP2C8, CYP2C19, CYP1A2 und CYP2D6 untersucht.

Erste Hinweise auf eine mögliche Induktion des CYP3A4-Systems durch Ritonavir in vivo wurden 1997 durch Hsu et al. veröffentlicht [113]. In einer zwei Wochen dauernden Studie verabreichte er verschiedenen Testpersonen Ritonavir in unterschiedlichen Dosierungen (200-500 mg/12 h) [113]. Während der Testphase nahm die Ritonavir-Plasmakonzentration dosisabhängig ab, und zwar am stärksten bei der hohen Dosierungen [109, 111-113]. Nach zwei Wochen stellte

sich ein Gleichgewicht ein [113]. Aufgrund dieser Ergebnisse vermuteten Hsu et al. eine Selbstinduktion der Metabolisierung über CYP3A durch Ritonavir [113]. Sie vermutete, dass die gesteigerte Enzymsynthese auf einer durch Hemmung assoziierten Induktion beruht [114]. Neuere Daten scheinen jedoch zu belegen, dass die beobachtete Autoinduktion von Ritonavir nicht allein durch das Enzym CYP3A erfolgt, sondern eher auf die Induktion anderer Enzyme (z.B. CYP2B6 und 2C8) oder Transporter zurückzuführen ist [19, 114].

Eine Induktion des CYP3A4-Systems durch Ritonavir konnte auch in weiteren Studien nachgewiesen werden. Mehrere Studien wiesen eine durch Ritonavir verursachte Induktion des CYP3A4-Systems bei gleichzeitiger Verabreichung von Alprazolam nach. Alprazolam ist ein Triazolobenzodiazepin-Derivat und wird fast ausschließlich durch CYP3A4 verstoffwechselt [115, 116]. Frye et al. wiesen nach 12-tägiger Gabe von Ritonavir (500 mg/12 h) in Kombination mit Alprazolam einen Abfall der Ritonavir-Konzentration um 12% nach [114, 117]. Auch in dieser Versuchsreihe erfolgte eine hochdosierte Ritonavirgabe über einen längeren Zeitraum.

Die Frage, wann es zu einer Hemmung des CYP3A4-Systems durch Ritonavir oder zu einer Induktion der Transkription der mRNA kommt, ist noch nicht geklärt und erfordert weitere Untersuchungen.

Dabei ist ein möglicher Ansatzpunkt zur Klärung der Diskrepanz zwischen Induktion und Hemmung, dass die CYP3A-Hemmung sich bei kurzer Anwendung von Ritonavir durchsetzt, während CYP3A-Induktion auftritt, wenn Ritonavir einen Steady-State-Status erreicht [114]. Ebenfalls muss eine dosisabhängige Wirkung von Ritonavir diskutiert werden.

#### **5.4.6. Saquinavir**

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Inkubation von HepG2-Zellen und Colo320-Zellen mit Saquinavir zur Induktion der CYP3A4-Expression in beiden Zelllinien führt. Ähnlich wie Ritonavir ist auch Saquinavir als Hemmer der Expression von CYP3A4 bekannt. Dabei sind seine hemmenden Eigenschaften auf CYP3A4 schwächer als die von Ritonavir.

Die klinische Anwendung von Saquinavir ist durch seine schlechte Bioverfügbarkeit und die schnelle Entwicklung einer Virusresistenz limitiert [78]. Fitzsimmons et al. konnten bereits 1997 nachweisen, dass Saquinavir extensiv in Mikrosomen aus dem Dünndarmepithel verstoffwechselt wird und somit bereits im Darm einem ausgeprägtem First-Pass-Metabolismus unterliegt, was seine schlechte Bioverfügbarkeit erklärt [78]. In der Studie konnte durch gleichzeitige Gabe verschiedener Inhibitoren von CYP3A4 eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Saquinavir erreicht werden. Zusätzlich gelang der Nachweis, dass die gleichzeitige Verabreichung des starken CYP3A4-Inhibitors Indinavir zu einer besseren Bioverfügbarkeit von

Saquinavir führte [78]. Ein Nachweis einer Induktion der CYP3A4-Genexpression ist weder in vitro noch in vivo erfolgt. In der vorliegenden Arbeit gelang es erstmals, eine Induktion der CYP3A4-Expression durch Saquinavir nachzuweisen.

Betrachtet man noch einmal zusammenfassend die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse in der Gruppe der Proteaseinhibitoren, lässt sich ein induktives Potential der getesteten Substanzen auf CYP3A4 nachweisen, sowohl in Zellen hepatozellulären als auch in solchen enterozytischen Ursprungs (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: Grad der Induktion in den beschriebenen Versuchen der einzelnen PI in den verschiedenen Zellsystemen

<b>Proteaseinhibitor</b>	<b>Grad der Induktion von CYP3A4 in HepG2-Zellen</b>	<b>Grad der Induktion von CYP3A4 in Colo320</b>
Amprenavir	2,3	1,8
Indinavir	2,5	1,9
Kaletra®	1,9	-
Nelfinavir	2,5	2,8
Ritonavir	2,1	1,7
Saquinavir	2,0	1,9

In der vorliegenden Arbeit konnte für alle untersuchten Proteaseinhibitoren gezeigt werden, dass es zu einer Induktion der Expression von CYP3A4 auf genetischer Ebene kommt, obwohl die Proteaseinhibitoren eine Hemmung von CYP3A4 auf Enzymebene verursachen.

Die Hemmung des Enzymkomplexes erfolgt auf Proteinebene, d.h. posttranslational. Hierbei handelt es sich meist um eine kompetitive Hemmung durch einen Liganden am CYP3A4-Enzym. Neben der kompetitiven Hemmung konnten Lin et al. 1995 erstmals demonstrieren, dass eine Indinavir-analoge Substanz 40-60% des hepatischen Cytochrom P450 zu einem metabolischen Zwischenkomplex (metabolic intermediate complex, MIC) umwandelte und dadurch dauerhaft zu inhibieren.

Die einzelnen Proteaseinhibitoren haben dabei eine unterschiedliche inhibitorische Potenz. Dass Proteaseinhibitoren die CYP3A4-Expression in Gastrointestinalzellen induzieren, wird auch durch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Gupta et al. untermauert.

Sie testeten die Induzierbarkeit der CYP3A4-Expression durch Proteaseinhibitoren an Zellen der humanen Kolonkarzinomzelllinie LS180 [118]. Dabei zeigten ihre Daten, dass die Inkubation der Karzinomzellen mit Proteaseinhibitoren zu einer Aktivierung des PX-Rezeptors führte, welche mit einer Induktion von CYP3A4 und MDR1 korrelierte [118]. Weitere Untersuchungen an PXR-down regulierten LS180-Zellen zeigten eine signifikant geringere Induzierbarkeit von CYP3A4 durch etablierte Induktoren, wie z.B. Rifampicin [118]. Diese Daten deuten darauf hin, dass der PX-Rezeptor eine wichtige Position im Induktionsweg der CYP3A4-Expression einnimmt. CYP3A4 ist das dominante P450-Enzym sowohl in der Leber als auch in der Mukosa des Gastrointestinaltraktes [79]. Es kommt in einem großen Anteil in Zellen des Darmes vor und ist hier, wie das Beispiel Saquinavir zeigt, vor allem für den First-Pass-Metabolismus verantwortlich. Watkins et al. konnten nachweisen, dass das Cytochrom P450 in der Leber und im Darm die gleiche genetische Sequenz hat und somit genetisch gleich ist [79, 119].

Die Proteaseinhibitoren werden oral verabreicht, im Darm resorbiert und gelangen im Anschluss in die Blutbahn. Ein Großteil der Substanzen unterliegt bereits im endoplasmatischen Retikulum des Darmepithels einer ersten Verstoffwechsellung durch CYP3A4. In diesen Zellen reguliert der Transporter Pgp das Substratangebot in der Zelle. Dieser Transporter befindet sich in der Zellmembran der Darmepithelzelle. Er ist für die Ausschleusung bestimmter Stoffe aus dem Zelllumen in das Darmlumen verantwortlich. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass CYP3A4 und Pgp die gleichen Substrate binden. Auch fanden sich Hinweise darauf, dass eine hohe Affinität zwischen den Abbauprodukten des Enzymes und der Zellpumpe bestehen. In unserem Labor wurden in einem parallel laufenden Versuch die gleichen antiretroviralen Wirkstoffe und ihre Wirkung auf den Transporter getestet. Diese Ergebnisse deuten auf eine enge Zusammenarbeit dieser Systeme hin, deren Folge ein ausgeprägter First-Pass-Metabolismus sein kann.

## **VI. Zusammenfassung**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit antiretrovirale Wirkstoffe verschiedener Substanzklassen die Expression von CYP3A4 induzieren. Die Versuche wurden in den zwei etablierten HepG2- und Colo320-Zelllinien durchgeführt. Die von den einzelnen Wirkstoffen erzielte Induktion wurde mit der von Rifampicin verglichen. Die untersuchten nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (Abacavir, Didanosin, Lamivudin, Stavudin, Zalcitabin und Zidovudin) induzierten die Bildung von CYP3A4-mRNA nicht. In der Gruppe der nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren konnte für die Substanzen Efavirenz, Delavirdin eine signifikante Induktion der CYP3A4-Expression nachgewiesen werden, nicht jedoch für Nevirapin. Mit dieser Arbeit gelang es zum Zeitpunkt der Experimente erstmals, eine induktive Potenz für einige Proteaseinhibitoren nachzuweisen. Eine Induktion der CYP3A4-Expression konnte in beiden Zellsystemen für die Substanzen Amprenavir, Indinavir, Nelfinavir, Ritonavir und Saquinavir gezeigt werden. Die Substanzkombination Kaletra® (Lopinavir/Ritonavir) führte in HepG2-Zellen, nicht jedoch in Colo320-Zellen, zur Induktion der CYP3A4-Genexpression. Dieses Ergebnis erklärt sich durch die ausgeprägte Zytotoxizität von Kaletra®, für die sich Colo320-Zellen als wesentlich empfindlicher erwiesen.

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass der CYP3A4-mRNA-Gehalt in Zellen der Zelllinie HepG2 mit zunehmender Passagezahl abnimmt. Auch konnte nachgewiesen werden, dass die Zelllinien HepG2 und Colo320 geringere Mengen an CYP3A4-mRNA als Proben humanen Lebergewebes enthalten. In Zellen der Zelllinie Caco konnte in den hier dargestellten Versuchen keine CYP3A4-mRNA nachgewiesen werden.

### **6.1 Schlussfolgerung**

Die in dieser Arbeit dargestellten Inkubationsversuche wurden erstmals mit den Zelllinien HepG2 und Colo320 durchgeführt. Dabei handelt es sich bei den verwendeten Zelllinien nur um Modelle, die auf Grund der unterschiedlichen Genmuster sich von humanen Leberzellen oder Darmepithelzellen unterscheiden. Somit können die In-vitro-Ergebnisse nicht 1:1 auf den menschlichen Organismus übertragen werden und geben nur Hinweise auf mögliche Aktivierungsmuster. So zeigen die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeit trotz der bekannten inhibitorischen Wirkung der Proteaseinhibitoren eine Zunahme des CYP3A4-mRNA in den Zellen und somit ein wenn auch schwach ausgeprägtes induktives Potential der Wirkstoffe. Wie in vielen klinischen Studien jedoch bestätigt wurde, überwiegen In-vivo eindeutig die hemmenden Eigenschaften dieser Substanzklasse.



## **6.2. Weitere Forschungsansätze**

Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit sind weitere Forschungsansätze möglich. Bei den verwendeten Zelllinien HepG2 und Colo320 handelt sich um Zellmodelle, deren Enzymmuster sich nicht automatisch auf die menschliche Zelle übertragen lassen. Wie in dieser Arbeit am Beispiel der HepG2 Zelllinie nachgewiesen, zeigen sich deutlich geringere Konzentration von CYP3A4 im Vergleich zu humanen Zellen. In neueren Zellmodellen konnte der Gehalt an Cytochrom P450 Enzymen durch Einbringen von viralen Vektoren deutlich erhöht werden. Versuche mit solchen Zellmodellen machen die Ergebnisse vergleichbarer mit humanen Zellen.

Bei dem in dieser Arbeit angewendeten Versuchsmodell wurde zur Berechnung der Wirkstoffkonzentrationen eine Verteilung der Substanzen ausschließlich im extrazellulären Raum hypothetisch angenommen. Neuere Untersuchungen zeigen, dass sich die einzelnen Wirkstoffe nicht ausschließlich im extrazellulären Raum verteilen (siehe Tabelle 4). Daraus resultieren größere Verteilungsvolumina der einzelnen Medikamente, die in weiteren Versuchsmodellen berücksichtigt werden müssen, um eine bessere Vergleichbarkeit der Wirkstoffkonzentrationen mit den erreichten Konzentrationen In-vivo zu erzielen.

Bei den in dieser Arbeit getesteten Wirkstoffen handelt sich um eine Auswahl der zurzeit von den Arzneimittelbehörden zugelassenen Substanzen. Seit dem Abschluss der Versuche sind weitere Wirkstoffe zugelassen worden und befinden sich zurzeit in der klinischen Anwendung. In weiteren Versuchen ist eine Testung dieser Substanzen auf ihr Induktionspotential der CYP3A4 mRNA Bildung von großer klinischer Bedeutung, um die Arzneimittelsicherheit dieser Substanzen zu erhöhen.

## **VII. Literatur**

1. Martignoni M, de Kanter R, Grossi P, et al. An in vivo and in vitro comparison of CYP induction in rat liver and intestine using slices and quantitative RT-PCR. *Chem Biol Interact*, 2004. 151(1): p. 1-11.
2. Cheng J, Ma X, Gonzalez FJ. Pregnane X receptor- and CYP3A4-humanized mouse models and their applications. *Br J Pharmacol*. 2011 Jun;163(3):461-8.
3. Halladay JS, Wong S, Khojasteh SC, Grepper S. An 'all-inclusive' 96-well cytochrome P450 induction method: measuring enzyme activity, mRNA levels, protein levels, and cytotoxicity from one well using cryopreserved human hepatocytes. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2012 Nov-Dec;66(3):270-5.
4. Bibi Z. Retraction: Role of cytochrome P450 in drug interactions. *Nutr Metab (Lond)*. 2014 Feb 14;11(1):11.
5. Guengerich FP, Shimada T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol*. 1991 Jul-Aug;4(4):391-407.
6. Guengerich FP. Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv*. 2003 Jun;3(4):194-204.
7. Dresser GK, Spence JD, Bailey DG. Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet*. 2000 Jan; 38(1):41-57.
8. Koch I, Weil R, Wolbold R, Brockmöller J, Hustert E, Burk O, Nuessler A, Neuhaus P, Eichelbaum M, Zanger U, Wojnowski L. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos*. 2002 Oct;30(10):1108-14.
9. de Maat MM, Ekhardt GC, Huitema AD, Koks CH, Mulder JW, Beijnen JH. Drug interactions between antiretroviral drugs and comedicated agents. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(3):223-82.

10. Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999; 39:1-17.
11. Usui T, Saitoh Y, Komada F. Induction of CYP3As in HepG2 cells by several drugs. Association between induction of CYP3A4 and expression of glucocorticoid receptor. *Biol Pharm Bull.* 2003 Apr; 26(4):510-7.
12. Westerink WM, Schoonen WG. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro.* 2007 Dec;21(8):1581-91. Epub 2007 Jun 8.
13. Hariparsad N, Nallani SC, Sane RS, Buckley DJ, Buckley AR, Desai PB. Induction of CYP3A4 by efavirenz in primary human hepatocytes: comparison with rifampin and phenobarbital. *J Clin Pharmacol.* 2004 Nov;44(11):1273-81.
14. Kalkut G. Antiretroviral therapy: an update for the non-AIDS specialist. *Curr Opin Oncol.* 2005 Sep;17(5):479-84.
15. Hariparsad N, Nallani SC, Sane RS, Buckley DJ, Buckley AR, Desai PB. Induction of CYP3A4 by efavirenz in primary human hepatocytes: comparison with rifampin and phenobarbital. *J Clin Pharmacol.* 2004 Nov;44(11):1273-81.
16. Fichtenbaum CJ, Gerber JG. Interactions between antiretroviral drugs and drugs used for the therapy of the metabolic complications encountered during HIV infection. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(14):1195-211.
17. Seminari E, Castagna A, Lazzarin A. Etravirine for the treatment of HIV infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2008 Aug;6(4):427-33.
18. Tran JQ, Gerber JG, Kerr BM. Delavirdine: clinical pharmacokinetics and drug interactions. *Clin Pharmacokinet.* 2001;40(3):207-26.
19. Dixit V, Hariparsad N, Li F, Desai P, Thummel KE, Unadkat JD. Cytochrome P450 enzymes and transporters induced by anti-human immunodeficiency virus protease inhibi-

- tors in human hepatocytes: implications for predicting clinical drug interactions. *Drug Metab Dispos.* 2007 Oct;35(10):1853-9.
20. Decker CJ, Laitinen LM, Bridson GW, Raybuck SA, Tung RD, Chaturvedi PR. Metabolism of amprenavir in liver microsomes: role of CYP3A4 inhibition for drug interactions. *J Pharm Sci.* 1998 Jul;87(7):803-7.
  21. Ford SL, Chen YC, Lou Y, Borland J, Min SS, Yuen GJ, Shelton MJ. Pharmacokinetic interaction between fosamprenavir-ritonavir and rifabutin in healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Feb;52(2):534-8.
  22. Tran JQ, Petersen C, Garrett M, Hee B, Kerr BM. Pharmacokinetic interaction between amprenavir and delavirdine: evidence of induced clearance by amprenavir. *Clin Pharmacol Ther.* 2002. 72(6): p. 615-26.
  23. Justesen US, Klitgaard NA, Broesen K, Pedersen C. Pharmacokinetic interaction between amprenavir and delavirdine after multiple-dose administration in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 2003. 55(1): p. 100-6.
  24. Huang L, Wring SA, Woolley JL, Brouwer KR, Serabjit-Singh C, Polli JW. Induction of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A by HIV protease inhibitors. *Drug Metab Dispos.* 2001. 29(5): p. 754-60.
  25. Hurst M, Faulds D. Lopinavir. *Drugs.* 2000 Dec; 60(6):1371-9; discussion 1380-1.
  26. Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest.* 1998 Sep 1;102(5):1016-23.
  27. Donato MT, Jover R, Gómez-Lechón MJ. Hepatic cell lines for drug hepatotoxicity testing: limitations and strategies to upgrade their metabolic competence by gene engineering. *Curr Drug Metab.* 2013 Nov;14(9):946-68.
  28. Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Pichard-Garcia L, Daujat M, Fabre JM, Maurel P, Vilaire MJ. Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and

- constitutively activated receptor in primary human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Aug 11;274(3):707-13.
29. Moore LB, Parks DJ, Jones SA, Bledsoe RK, Consler TG, Stimmel JB, Goodwin B, Liddle C, Blanchard SG, Willson TM, Collins JL, Kliewer SA. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J Biol Chem*, 2000. 275(20): p. 15122-7.
  30. Tompkins LM, Wallace AD. Mechanisms of Cytochrom P450 Induction. *Biochem Molecular Toxicology*, 2007. 21(4): p. 176-181.
  31. Watkins RE, Maglich JM, Moore LB, Wisely GB, Noble SM, Davis-Searles PR, Lambert MH, Kliewer SA, Redinbo MR. 2.1 A crystal structure of human PXR in complex with the St. John's wort compound hyperforin. *Biochemistry*, 2003. 42(6): p. 1430-8.
  32. Hustert E, Zibat A, Presecan-Siedel E, Eiselt R, Mueller R, Fuss C, Brehm I, Brinkmann U, Eichelbaum M, Wojnowski L, Burk O. Natural protein variants of pregnane X receptor with altered transactivation activity toward CYP3A4. *Drug Metab Dispos.* 2001 Nov;29(11):1454-9.
  33. Zhang J, Kuehl P, Green ED, Touchman JW, Watkins PB, Daly A, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Wrighton SA, Hancock M, Kim RB, Strom S, Thummel K, Russell CG, Hudson JR Jr, Schuetz EG, Boguski MS. The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants. *Pharmacogenetics.* 2001 Oct;11(7):555-72.
  34. Blumberg B, Sabbagh W Jr, Juguilon H, Bolado J Jr, van Meter CM, Ong ES, Evans RM. SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev*, 1998. 12(20): p. 3195-205.
  35. Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, Asman M, Jendeberg L, Sydow-Bäckman M, Ohlsson R, Postlind H, Blomquist P, Berkenstam A. Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 13;95(21):12208-13.

36. Goodwin B, Hodgson E, Liddle C. The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Mol Pharmacol*. 1999 Dec;56(6):1329-39.
37. Dussault I, Lin M, Hollister K, Wang EH, Synold TW, Forman BM. Peptide mimetic HIV protease inhibitors are ligands for the orphan receptor SXR. *J Biol Chem*, 2001. 276(36): p. 33309-12.
38. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Jul;270(1):414-23.
39. Watkins PB. Noninvasive tests of CYP3A enzymes. *Pharmacogenetics*. 1994 Aug;4(4):171-84.
40. Ozdemir V, Kalow W, Tang BK, Paterson AD, Walker SE, Endrenyi L, Kashuba AD. Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method. *Pharmacogenetics*. 2000 Jul;10(5):373-88.
41. Yeh RF, Gaver VE, Patterson KB, Rezk NL, Baxter-Meheux F, Blake MJ, Eron JJ Jr, Klein CE, Rublein JC, Kashuba AD. Lopinavir/ritonavir induces the hepatic activity of cytochrome P450 enzymes CYP2C9, CYP2C19, and CYP1A2 but inhibits the hepatic and intestinal activity of CYP3A as measured by a phenotyping drug cocktail in healthy volunteers. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006 May;42(1):52-60.
42. Nannelli A, Chirulli V, Longo V, Gervasi PG. Expression and induction by rifampicin of CAR- and PXR-regulated CYP2B and CYP3A in liver, kidney and airways of pig. *Toxicology*, 2008. 252(1-3): p. 105-12.
43. Faucette SR, Wang H, Hamilton GA, Jolley SL, Gilbert D, Lindley C, Yan B, Negishi M, LeCluyse EL. Regulation of CYP2B6 in primary human hepatocytes by prototypical inducers. *Drug Metab Dispos*. 2004 Mar;32(3):348-58.

44. Chen Y, Goldstein JA. The transcriptional regulation of the human CYP2C genes. *Curr Drug Metab.* 2009 Jul;10(6):567-78.
45. Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol.* 2008 Oct;82(10):667-715. doi: 10.1007/s00204-008-0332-8.
46. Sharma D, Lau AJ, Sherman MA, Chang TK. Agonism of human pregnane X receptor by rilpivirine and etravirine: comparison with first generation non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 2013 Jun 1;85(11):1700-11. doi: 10.1016/j.bcp.2013.04.002.
47. Luo G, Guenther T, Gan LS, Humphreys WG. CYP3A4 induction by xenobiotics: biochemistry, experimental methods and impact on drug discovery and development. *Curr Drug Metab.* 2004 Dec;5(6):483-505.
48. Hartmann M. [www.hivinfo.de/cms/index.asp?inst=hivinfo&snr=7413&aboo=2198&t=Pharmakokinetik+und+Wechselwirkungen](http://www.hivinfo.de/cms/index.asp?inst=hivinfo&snr=7413&aboo=2198&t=Pharmakokinetik+und+Wechselwirkungen). 2013.
49. Zhou SF. Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4. *Curr Drug Metab.* 2008 May;9(4):310-22.
50. Gessain A. Human retrovirus HTLV-1: descriptive and molecular epidemiology, origin, evolution, diagnosis and associated diseases. *Bull Soc Pathol Exot.* 2011 Aug;104(3):167-80.
51. Hirschel B, Calmy A. Initial treatment for HIV infection--an embarrassment of riches. *N Engl J Med.* 2008 May 15;358(20):2170-2.
52. Ilina T, Parniak MA. Inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Adv Pharmacol.* 2008;56:121-67.
53. Piacenti FJ. An update and review of antiretroviral therapy. *Pharmacotherapy.* 2006 Aug;26(8):1111-33.

54. Hammer SM, Eron JJ Jr, Reiss P, Schooley RT, Thompson MA, Walmsley S, Cahn P, Fischl MA, Gatell JM, Hirsch MS, Jacobsen DM, Montaner JS, Richman DD, Yeni PG, Volberding PA; International AIDS Society-USA. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA*. 2008 Aug 6;300(5):555-70.
55. Kilby JM, Eron JJ. Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *N Engl J Med*. 2003 May 29;348(22):2228-38.
56. Hightower M, Kallas EG. Diagnosis, antiretroviral therapy, and emergence of resistance to antiretroviral agents in HIV-2 infection: a review. *Braz J Infect Dis*. 2003 Feb;7(1):7-15.
57. Izzedine H, Launay-Vacher V, Baumelou A, Deray G. Antiretroviral and immunosuppressive drug-drug interactions: an update. *Kidney Int*. 2004 Aug;66(2):532-41.
58. Qazi NA, Morlese JF, Pozniak AL. Lopinavir/ritonavir (ABT-378/r). *Expert Opin Pharmacother*. 2002 Mar;3(3):315-27.
59. Hunt JS, Romanelli F. Maraviroc, a CCR5 coreceptor antagonist that blocks entry of human immunodeficiency virus type 1. *Pharmacotherapy*. 2009 Mar;29(3):295-304.
60. Emmelkamp JM, Rockstroh JK. CCR5 antagonists: comparison of efficacy, side effects, pharmacokinetics and interactions--review of the literature. *Eur J Med Res*. 2007 Oct 15;12(9):409-17.
61. Delelis O, Carayon K, Saïb A, Deprez E, Mouscadet JF. Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology*. 2008 Dec 17;5:114.
62. Lataillade M, Kozal MJ. The hunt for HIV-1 integrase inhibitors. *AIDS Patient Care STDS*. 2006 Jul;20(7):489-501.
63. Barry M, Mulcahy F, Merry C, Gibbons S, Back D. Pharmacokinetics and potential interactions amongst antiretroviral agents used to treat patients with HIV infection. *Clin Pharmacokinet*. 1999 Apr;36(4):289-304.



64. Voorman RL, Maio SM, Payne NA, Zhao Z, Koeplinger KA, Wang X. Microsomal metabolism of delavirdine: evidence for mechanism-based inactivation of human cytochrome P450 3A. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998 Oct;287(1):381-8.
65. Nowakowski-Gashaw I, Mrozikiewicz PM, Roots I, Brockmöller J. Rapid quantification of CYP3A4 expression in human leukocytes by real-time reverse transcription-PCR. *Clin Chem.* 2002 Feb;48(2):366-70.
66. Hochman JH, Chiba M, Nishime J, Yamazaki M, Lin JH. Influence of P-glycoprotein on the transport and metabolism of indinavir in Caco-2 cells expressing cytochrome P-450 3A4. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Jan;292(1):310-8.
67. Harmsen S, Koster AS, Beijnen JH, Schellens JH, Meijerman I. Comparison of two immortalized human cell lines to study nuclear receptor-mediated CYP3A4 induction. *Drug Metab Dispos.* 2008 Jun;36(6):1166-71
68. Jetten MJ, Kleinjans JC, Claessen SM, Chesné C, van Delft JH. Baseline and genotoxic compound induced gene expression profiles in HepG2 and HepaRG compared to primary human hepatocytes. *Toxicol In Vitro.* 2013 Oct;27(7):2031-40
69. Javitt NB. Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *FASEB J.* 1990 Feb 1;4(2):161-8.
70. Sumida A, Fukuen S, Yamamoto I, Matsuda H, Naohara M, Azuma J. Quantitative analysis of constitutive and inducible CYPs mRNA expression in the HepG2 cell line using reverse transcription-competitive PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Jan 27;267(3):756-60.
71. Lahoz A, Vilà MR, Fabre M, Miquel JM, Rivas M, Maines J, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. An in vitro tool to assess cytochrome P450 drug biotransformation-dependent cytotoxicity in engineered HepG2 cells generated by using adenoviral vectors. *Toxicol In Vitro.* 2013 Jun;27(4):1410-5.

72. Vignati L, Turlizzi E, Monaci S, Grossi P, Kanter Rd, Monshouwer M. An in vitro approach to detect metabolite toxicity due to CYP3A4-dependent bioactivation of xenobiotics. *Toxicology*. 2005 Dec 15;216(2-3):154-67.
73. Gerets HH, Tilmant K, Gerin B, Chanteux H, Depelchin BO, Dhalluin S, Atienzar FA. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol Toxicol*. 2012 Apr;28(2):69-87.
74. Rodríguez-Antona C, Donato MT, Boobis A, Edwards RJ, Watts PS, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica*. 2002 Jun;32(6):505-20
75. Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, Pérez-Cataldo G, Castell JV, Donato MT. HepG2 cells simultaneously expressing five P450 enzymes for the screening of hepatotoxicity: identification of bioactivable drugs and the potential mechanism of toxicity involved. *Arch Toxicol*. 2013 Jun;87(6):1115-27.
76. Hashizume T, Yoshitomi S, Asahi S, Matsumura S, Chatani F, Oda H. In vitro micronucleus test in HepG2 transformants expressing a series of human cytochrome P450 isoforms with chemicals requiring metabolic activation. *Mutat Res*, 2009. 677(1-2): p. 1-7.
77. Moya M, Gómez-Lechón MJ, Castell JV, Jover R. Enhanced steatosis by nuclear receptor ligands: a study in cultured human hepatocytes and hepatoma cells with a characterized nuclear receptor expression profile. *Chem Biol Interact*. 2010 Mar 30;184(3):376-87.
78. Fitzsimmons ME, Collins JM. Selective biotransformation of the human immunodeficiency virus protease inhibitor saquinavir by human small-intestinal cytochrome P4503A4: potential contribution to high first-pass metabolism. *Drug Metab Dispos*. 1997 Feb;25(2):256-66.

79. Watkins PB, Wrighton SA, Schuetz EG, Molowa DT, Guzelian PS. Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of rats and man. *J Clin Invest.* 1987 Oct;80(4):1029-36.
80. Bolt HM. Rifampicin, a keystone inducer of drug metabolism: from Herbert Remmer's pioneering ideas to modern concepts. *Drug Metab Rev.* 2004 Oct;36(3-4):497-509.
81. Remmer H, Schoene B, and F.R. A., Induction of the unspecific microsomal hydroxylase in the human liver. *Drug Metab Dispos*, 1973. 1(1): p. 224-30.
82. Kolars JC, Schmiedlin-Ren P, Schuetz JD, Fang C, Watkins PB. Identification of rifampin-inducible P450III A4 (CYP3A4) in human small bowel enterocytes. *J Clin Invest.* 1992 Nov;90(5):1871-8.
83. Piscitelli SC, Gallicano KD. Interactions among drugs for HIV and opportunistic infections. *N Engl J Med.* 2001 Mar 29;344(13):984-96.
84. Beach JW. Chemotherapeutic agents for human immunodeficiency virus infection: mechanism of action, pharmacokinetics, metabolism, and adverse reactions. *Clin Ther.* 1998 Jan-Feb;20(1):2-25; discussion 1.
85. Piliero PJ. Pharmacokinetic properties of nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004 Sep 1;37 Suppl 1:S2-S12.
86. Goodwin B, Hodgson E, D'Costa DJ, Robertson GR, Liddle C. Transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene by the constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol.* 2002 Aug;62(2):359-65.
87. Watkins RE, Wisely GB, Moore LB, Collins JL, Lambert MH, Williams SP, Willson TM, Kliewer SA, Redinbo MR. The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity. *Science.* 2001 Jun 22; 292(5525):2329-33.
88. Mohan R, Heyman RA. Orphan nuclear receptor modulators. *Curr Top Med Chem.* 2003;3(14):1637-47.

89. Mannu J, Jenardhanan P, Mathur PP. A computational study of CYP3A4 mediated drug interaction profiles for anti-HIV drugs. *J Mol Model*. 2011 Aug;17(8):1847-54.
90. Tran JQ, Petersen C, Garrett M, Hee B, Kerr BM. Pharmacokinetic interaction between amprenavir and delavirdine: evidence of induced clearance by amprenavir. *Clin Pharmacol Ther*. 2002 Dec;72(6):615-26.
91. Ward BA, Gorski JC, Jones DR, Hall SD, Flockhart DA, Desta Z. The cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) is the main catalyst of efavirenz primary and secondary metabolism: implication for HIV/AIDS therapy and utility of efavirenz as a substrate marker of CYP2B6 catalytic activity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Jul;306(1):287-300. Epub 2003 Apr 3.
92. Ma Q, Brazeau D, Forrest A, Morse GD. Advances in pharmacogenomics of anti-retrovirals: an update. *Pharmacogenomics*. 2007 Sep;8(9):1169-78.
93. Veldkamp AI, Harris M, Montaner JS, Moyle G, Gazzard B, Youle M, Johnson M, Kwakkelstein MO, Carlier H, van Leeuwen R, Beijnen JH, Lange JM, Reiss P, Hoetelmans RM. The steady-state pharmacokinetics of efavirenz and nevirapine when used in combination in human immunodeficiency virus type 1-infected persons. *J Infect Dis*. 2001 Jul 1;184(1):37-42.
94. Haas DW, Bartlett JA, Andersen JW, Sanne I, Wilkinson GR, Hinkle J, Rousseau F, Ingram CD, Shaw A, Lederman MM, Kim RB; Adult AIDS Clinical Trials Group. Pharmacogenetics of nevirapine-associated hepatotoxicity: an Adult AIDS Clinical Trials Group collaboration. *Clin Infect Dis*. 2006 Sep 15;43(6):783-6.
95. Back D, Gibbons S, Khoo S. Pharmacokinetic drug interactions with nevirapine. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003 Sep;34 Suppl 1:S8-14.
96. Murphy RL, Sommadossi JP, Lamson M, Hall DB, Myers M, Dusek A. Antiviral effect and pharmacokinetic interaction between nevirapine and indinavir in persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis*. 1999 May;179(5):1116-23.
97. Sahai J, Salgo M., et al, Drug interaction study between saquinavir (SQV) and nevirapine (NVP). 4th Conference on Retrovirus and opportunistic Infection, Chicago, 1997.

98. Cheeseman SH, Hattox SE, McLaughlin MM, Koup RA, Andrews C, Bova CA, Pav JW, Roy T, Sullivan JL, Keirns JJ. Pharmacokinetics of nevirapine: initial single-rising-dose study in humans. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 Feb;37(2):178-82.
99. Ernest CS 2nd, Hall SD, Jones DR. Mechanism-based inactivation of CYP3A by HIV protease inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 Feb;312(2):583-91.
100. Shibata N, Gao W, Okamoto H, Kishida T, Yoshikawa Y, Takada K. In-vitro and in-vivo pharmacokinetic interactions of amprenavir, an HIV protease inhibitor, with other current HIV protease inhibitors in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2002 Feb;54(2):221-9.
101. Helsley RN, Sui Y, Ai N, Park SH, Welsh WJ, Zhou C. Pregnane X receptor mediates dyslipidemia induced by the HIV protease inhibitor amprenavir in mice. *Mol Pharmacol*. 2013 Jun;83(6):1190-9. doi: 10.1124/mol.113.085753. Epub 2013 Mar 21.
102. Chiba M, Hensleigh M, Nishime JA, Balani SK, Lin JH. Role of cytochrome P450 3A4 in human metabolism of MK-639, a potent human immunodeficiency virus protease inhibitor. *Drug Metab Dispos*. 1996 Mar;24(3):307-14.
103. Plosker GL, Noble S. Indinavir: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs*. 1999 Dec;58(6):1165-203.
104. Kharasch ED, Bedynek PS, Hoffer C, Walker A, Whittington D. Lack of indinavir effects on methadone disposition despite inhibition of hepatic and intestinal cytochrome P4503A (CYP3A). *Anesthesiology*. 2012 Feb;116(2):432-47.
105. Koudriakova T, Iatsimirskaia E, Utkin I, Gangl E, Vouros P, Storozhuk E, Orza D, Marinina J, Gerber N. Metabolism of the human immunodeficiency virus protease inhibitors indinavir and ritonavir by human intestinal microsomes and expressed cytochrome P4503A4/3A5: mechanism-based inactivation of cytochrome P4503A by ritonavir. *Drug Metab Dispos*. 1998 Jun;26(6):552-61.
106. Chiba M, Hensleigh M, Lin JH. Hepatic and intestinal metabolism of indinavir, an HIV protease inhibitor, in rat and human microsomes. Major role of CYP3A. *Biochem Pharmacol*. 1997 Apr 25;53(8):1187-95.

107. de Maat MM, Ekhart GC, Huitema AD, Koks CH, Mulder JW, Beijnen JH. Drug interactions between antiretroviral drugs and comedicated agents. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(3):223-82.
108. Cvetkovic RS, Goa KL. Lopinavir/ritonavir: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs.* 2003;63(8):769-802.
109. Kumar GN, Dykstra J, Roberts EM, Jayanti VK, Hickman D, Uchic J, Yao Y, Surber B, Thomas S, Granneman GR. Potent inhibition of the cytochrome P-450 3A-mediated human liver microsomal metabolism of a novel HIV protease inhibitor by ritonavir: A positive drug-drug interaction. *Drug Metab Dispos.* 1999 Aug;27(8):902-8.
110. Svärd J, Spiers JP, Mulcahy F, Hennessy M. Nuclear receptor-mediated induction of CYP450 by antiretrovirals: functional consequences of NR1I2 (PXR) polymorphisms and differential prevalence in whites and sub-Saharan Africans. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010 Dec 15;55(5):536-49.
111. Lim ML, Min SS, Eron JJ, Bertz RJ, Robinson M, Gaedigk A, Kashuba AD. Coadministration of lopinavir/ritonavir and phenytoin results in two-way drug interaction through cytochrome P-450 induction. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004 Aug 15;36(5):1034-40.
112. Obach RS, Walsky RL, Venkatakrishnan K, Gaman EA, Houston JB, Tremaine LM. The utility of in vitro cytochrome P450 inhibition data in the prediction of drug-drug interactions. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Jan;316(1):336-48.
113. Hsu A, Granneman GR, Witt G, Locke C, Denissen J, Molla A, Valdes J, Smith J, Erdman K, Lyons N, Niu P, Decourt JP, Fourtillan JB, Girault J, Leonard JM. Multiple-dose pharmacokinetics of ritonavir in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 May;41(5):898-905.
114. Foisy MM, Yakiwchuk EM, Hughes CA. Induction effects of ritonavir: implications for drug interactions. *Ann Pharmacother.* 2008 Jul;42(7):1048-59.

115. Greenblatt DJ, von Moltke LL, Harmatz JS, Durol AL, Daily JP, Graf JA, Mertzanis P, Hoffman JL, Shader RI. Alprazolam-ritonavir interaction: implications for product labeling. *Clin Pharmacol Ther.* 2000 Apr;67(4):335-41.
116. Khaliq Y, Gallicano K, Tisdale C, Carignan G, Cooper C, McCarthy A. Pharmacokinetic interaction between mefloquine and ritonavir in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 2001 Jun;51(6):591-600.
117. Frye R, Granneman GR, et al, Effect of ritonavir on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of alprazolam(abstract A59). presented at: 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapie, Toronto, 1997.
118. Gupta A, Mugundu GM, Desai PB, Thummel KE, Unadkat JD. Intestinal human colon adenocarcinoma cell line LS180 is an excellent model to study pregnane X receptor, but not constitutive androstane receptor, mediated CYP3A4 and multidrug resistance transporter 1 induction: studies with anti-human immunodeficiency virus protease inhibitors. *Drug Metab Dispos.* 2008 Jun;36(6):1172-80
119. Lown KS, Ghosh M, Watkins PB. Sequences of intestinal and hepatic cytochrome P450 3A4 cDNAs are identical. *Drug Metab Dispos.* 1998 Feb;26(2):185-7.

## VIII. Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Erworbenes Immunschwäche Syndrom (aquired immune deficiency syndrom)
AUC	Fläche unter der Kurve (Area under the curve)
CA	Kapsid
CAR	Constitutive Androstane Receptor
CCR5	Korezeptor Antagonisten
cDNA	Complementary Desoxyribonukleinsäure
CYP	Cytochrom P450
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphate
DTT	1,4-dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FI	Fusionsinhibitoren
GR	Glucocorticoidreceptor
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HWZ	Halbwertszeit
IN	Integrase
INI	Integrase Inhibitoren
Kb	Kilobasenpaare
LDH	Laktatdehydrogenase
MA	Matrix
MIC	metabolic intermediate complex
MDR	Gen des P-gp Transportproteins (Multidrug Resistance Protein 1)
mRNA	Boten-RNA (Messenger RNA)
MRP	Multidrug Resistance Related Protein
NC	Nucleocapsid
n.d.	nicht determiniert
NNRTI	Nicht Nukleoside Reverse Transkriptase Inhibitoren
NRTI	Nukleotid Reverse Trankriptase Inhibitoren
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)



PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
Pgp	P-Glykoprotein
PI	Proteaseinhibitor
PR	Protease
PXR	Pregnane X Receptor
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Ketten Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SXR	Steroid Xenobiotc Rezeptor

## **IX. Anhang**

### **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Ina Lieker, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Induktion der CYP3A4-mRNA-Bildung in den Zelllinien HepG2 und Colo320 durch antiretrovirale Medikamente“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum: 25.02.2014

Unterschrift

## Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

## Publikationsliste

Kadzhynov D, Slowinski T, Lieker I, Neumayer HH, Peters H. Evaluation of acid-base control, electrolyte balance, and filter patency of a prismaflex-based regional citrate anticoagulation protocol for pre-dilution continuous veno-venous hemodiafiltration. *Clinical Nephrology*, 2014(1-11).

Khadzhynov D, Schelter C, Lieker I, Mika A, Staeck O, Neumayer HH, Peters H, Slowinski T. Incidence and outcome of metabolic disarrangements consistent with citrate accumulation in critically ill patients undergoing continuous venovenous hemodialysis with regional citrate anticoagulation. *J Crit Care*. 2013 Nov 11. pii: S0883-9441(13)00395-X.

Khadzhynov D, Slowinski T, Lieker I, Neumayer HH, Albrecht D, Streefkerk HJ, Rebello S, Peters H. Pharmacokinetics of aliskiren in patients with end-stage renal disease undergoing haemodialysis. *Clin Pharmacokinet*. 2012 Oct 1;51(10):661-9.

Hoher B, Armbruster FP, Stoeva S, Reichetzeder C, Grön HJ, Lieker I, Khadzhynov D, Slowinski T, Roth HJ. Measuring parathyroid hormone (PTH) in patients with oxidative stress--do we need a fourth generation parathyroid hormone assay? *PLoS One*. 2012;7(7):e40242. doi: 10.1371/journal.pone.0040242. Epub 2012 Jul 6.

Khadzhynov D, Slowinski T, Lieker I, Spies C, Puhmann B, König T, Uhrig A, Eggers K, Neumayer HH, Traunmüller F, Joukhadar C, Peters H. Plasma pharmacokinetics of daptomycin in critically ill patients with renal failure and undergoing CVVHD. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2011 Nov;49(11):656-65.

Lieker I, Khadzhynov D, Peters, Neumayer HH, Slowinski T. A Regional Citrate Anticoagulated Continuous Venovenous Hemodiafiltration Protocol with Variable Treatment Dose. (Poster, ASN 2011)

## **X. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Ivar Roots möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für seine kontinuierliche Betreuung bei der Erstellung der Dissertation danken.

Ich möchte Frau Dr. med. Gabriele Laschinski für die geduldige Betreuung und der kritischen Durchsicht der Arbeit danken. Jederzeit gewährte sie mir während dieser Arbeit sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung.

Frau Dr. Isabella Gashaw danke ich für die kreative, produktive Zusammenarbeit durch die diese Arbeit zustande gekommen ist. Ihre herzliche Aufnahme am Institut für Klinische Pharmakologie, die Einweisung in die Arbeiten mit Zellkulturen, den vielen Ratschlägen und der Durchsicht dieser Arbeit.

Dr. Jochen Wachter und Daniel Wolbergs danke ich für die vielen konstruktiven Diskussionen, die kritische Durchsicht dieser Arbeit, ihr Motivieren, ihr Verständnis und die emotionale Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre stete inhaltliche, mentale und emotionale Unterstützung während des gesamten Entstehungsprozesses dieser Arbeit.

Zum Schluss ein Dankeschön an die vielen hier nicht namentlich aufgeführten Mitarbeiter des Institutes für Klinische Pharmakologie der Charité Berlin für das sehr freundliche und angenehme Arbeitsklima.