



Leberorgankultursysteme: Bewertung anhand der Genexpression

Karim Sultan¹, Jörg Hartung², Ernesto G. Bade¹

¹Abt. Zellbiologie-Tumorbiologie, Fakultät für Biologie der Universität, D-Konstanz, ²Institut für Tierhygiene und Tierschutz, Tierärztliche Hochschule, D-Hannover

Zusammenfassung

Die Leber erfüllt ihre vielfältigen lebenswichtigen Funktionen durch die komplexe Verflechtung der Hepatozyten mit den "Littoral-Zellen" und der Extrazellulärmatrix des Organs. In vitro Systeme der Leber basieren auf Kulturen von Einzelzellen, welche enzymatisch aus der essentiellen Organstruktur gewonnen werden. Die Präzisionsschnitt-Technik ermöglicht es dagegen, Organschnitte (Slices) mit intakter Organstruktur unter standardisierten Bedingungen in Kultur zu bringen. Studien mit diesem System beschränkten sich bisher jedoch auf pharmakologische Kurzzeitversuche, unter Verwendung von allgemeinen zellulären Viabilitätskriterien. Die mangelhafte leberspezifische Validierung verhinderte die Verbreitung und Akzeptanz dieser Organkulturen als Tierversuchsalternative. In dieser Arbeit wurde die Regulation der Genexpression als geeignetes Viabilitätskriterium gewählt, denn im Gegensatz zu den herkömmlichen Parametern beinhaltet die Genexpression eine Kaskade verschiedener räumlich und zeitlich koordinierter Prozesse. Die hormonelle Regulation der Leber-Slices wurde als Vergleich herangezogen und bewies die Überlegenheit des neu entwickelten Interphasen-Systems über ein Perfusions-System. In unserem wirtschaftlichen und einfach zu handhabenden Interphasen-System konnte die leberspezifische Genexpression in Langzeitkulturen durch Dexamethason, cAMP und Endotoxin in vivo-ähnlich moduliert werden.

Summary: Liver organ systems; valuation by gene expression
The multitude of vital functions of the liver is largely dependent on the complex interaction of hepatocytes with "littoral-cells" and the liver-specific extracellular matrix. In vitro systems used to study the liver are almost exclusively based on the culture of single cells obtained by enzymatic disruption of the essential organ structure. In contrast, the slicing technique enables a standardized organ culture, while retaining the intact organ structure. However, previous experiments using this system have been restricted to short-term pharmacological studies and have used general cellular parameters to assess viability. The lack of liver specific validation has hindered the acceptance and application of this organ culture as an alternative to in vivo experiments. In this work we chose the regulation of liver-specific gene expression as an adequate viability criterion because, in contrast to the commonly used general cell physiology parameters, gene expression includes a cascade of differentially coordinated processes. Using hormonal responsiveness of precision-cut liver slices as a basis for comparison, the new developed interphase system was found to be superior to a perfusion system. With the application of this economical and easy-to-handle interphase system, the control of liver-specific gene expression by dexamethasone, cAMP and endotoxin in long-term cultures was found to be modulated in a manner similar to in vivo conditions.

Keywords: organ culture, precision-cut liver slices, culture systems, gene expression, dexamethasone, LPS

1 Einleitung

Die Leber vollbringt eine Vielzahl sehr unterschiedlicher Aufgaben zur Erhaltung der Vitalität des Organismus: zentrale Steuerung des Stoffwechsels, Metabolismus von Fremdstoffen (Xenobiotika), sowie endokrine und hämostatische Regelung. Obwohl 65% der Zellen der Leber Hepatozyten sind, dürfen die Leistungen des Organs jedoch nicht einfach nur als metabolische Leistung dieser Zellen betrachtet werden. Die komplexen Funktionen sind vielmehr das Resultat der Interaktion der verschiedenen Zelltypen, aus denen sich das Organ zusammensetzt (Rojkind et al., 1988). Nicht-Hepatozyten, u.a. Kupffersche Sternzellen, Sinusoidal-, Endothelial-, Ito- und Pit-Zellen (alle unter

dem Sammelbegriff Littoralzellen (Bade, 1967) zusammengefaßt) und gelegentlich auch die Gallengangs-Epithelzellen, erfüllen eine essentielle, aber bisher nur teilweise geklärte Rolle in dieser funktionellen Vielfalt (Loreal et al., 1993, Deaciuc et al., 1994).

Trotz der Vielfalt an *in vitro* Systemen der Leber ist bisher keines in der Lage gewesen, die Komplexität des Organbaus nachzuahmen und die differenzierten Leberfunktionen über einen längeren Zeitraum zu erhalten. Im Gegensatz zu Zellkulturen besitzen Organkulturen den Vorteil der Beibehaltung der Organstruktur, jedoch bisher den Nachteil des schnellen Viabilitätsverlusts, häufig innerhalb von wenigen Stunden. Die unzureichende Versorgung der Organfragmente mit

Nährstoffen und Sauerstoff stellt eine wesentliche Limitierung von Organkulturen dar. Zudem können Organfragmente gleicher Größe und Gewichte aufgrund von ungleichmäßiger Stärke unterschiedliche Viabilitäten aufweisen, was eine Standardisierung von Organkulturen erschwert.

Die Krumdieck-Technik (Krumdieck et al., 1980) ermöglicht es, Organfragmente gleichmäßig in einer Gewebestärke von 200-300 µm zu schneiden, welche 10 bis 15 Zellschichten entspricht, wodurch eine passive Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen möglich ist. Bei gleicher Schnittstärke erlauben Größe und Gewicht der Präzisionsorganschnitte den Vergleich zwischen mehreren Kulturen, wodurch die Standardisierungsproblematik entscheidend verbessert wurde. Dieses Organkultursystem wur-

de von einer relativ kleinen Gruppe von Wissenschaftlern hauptsächlich in pharmakologischen Studien eingesetzt und konnte sich auf diesem Gebiet als nützliche Tierversuchsalternative behaupten.

Dieses *in vitro* System erfüllt aber auch einige Voraussetzungen für einen Einsatz zur Analyse zellbiologischer und pathologischer Fragestellungen, besonders in der Grundlagenforschung. Abgesehen von der zeitlichen Limitierung auf 8 Stunden (Goethals und Roberfroid, 1995), besteht eine mangelhafte leberspezifische Validierung dieses Systems. Die bisher angewendeten Viabilitätskriterien wie intrazellulärer Kaliumgehalt, ATP-Gehalt, allgemeiner Proteinsynthese oder das MTT-Reduktionspotential reflektieren nicht die vielfältigen spezifischen Funktionen der Leber. Aus Mangel an leberspezifischen Daten wurde dieses System weiterhin von ECVAM nicht empfohlen (Blaauboer et al., 1994).

Erst eine kürzlich erschienene Arbeit (Lake et al., 1996) befaßt sich mit leberspezifischen Funktionen (Phase I Isoenzyme) in einer Langzeitkultur (3 Tage) von Leberschnitten, ohne eine Vorbehandlung der Tiere zu benötigen, wie in der vorangegangenen Arbeit aus demselben Labor (Lake et al., 1993). Im Gegensatz zu einer Organentnahme bedeutet eine Vorbehandlung der Tiere vor der Organentnahme einen Tierversuch. Diese Vorgehensweise bietet keine sinnvolle Tierversuchsalternative für Studien, welche größere Tierzahlen benötigen oder Vorbehandlungen mit Testsubstanzen wie etwa LPS (Luster et al., 1994) erfordern, um schließlich in Leberorgankulturen brauchbare Ergebnisse erzielen zu können.

Die Qualität der Viabilitätsparameter hängt von der Komplexität der dazu erforderlichen Zellreaktionen ab. Viele dieser Parameter konzentrieren sich auf einen einzigen Prozess. Der für die Zellkultur etablierte kolorimetrische Viabilitätstest nach Mosmann (1983) findet heute breite Anwendung, denn er ist kostengünstig und einfach und eignet sich somit für routinemäßige Toxizitätsstudien großer Probenzahlen. Dagegen beinhaltet die Genexpression, wenn sie an deren Ergebnis, einem spezifischen Proteinprodukt (*de novo* Synthese), analysiert wird, eine Reihe von Schritten, die nicht nur die unterschiedlichsten Enzyme beanspruchen, sondern auch zeitlich und räumlich koor-

diniert in der Zelle ablaufen müssen. Dieses Kriterium beinhaltet daher die einfachen, kurzfristigen Viabilitätsverfahren als Grundvoraussetzung. Ein tabellarischer Überblick über die Einstufung von Viabilitätskriterien wird in der untenstehenden Tabelle gegeben.

Tabelle: Überblick zur Einstufung von Viabilitätskriterien

Zytotoxische Effekte
– Zelltod (Cell survival)
– Verlust von zytoplasmatischen Enzymen (LDH, GOT)
– Veränderung / Hemmung der Zellvermehrung
– Morphologische Charakterisierung
Metabolische Effekte
– Energiehaushalt
– Proteinsynthese
– Fremdstoff- (Xenobiotika-)Metabolismus
Genexpression
1. Rezeptoraktivierung und Signaltransduktion
2. Transkription
3. RNA-Prozessierung
4. Translation
5. Proteinmodifikation (einschließlich Sekretionskontrolle)

Die Physiologie der Leberzellen wird letztendlich auf molekularer Ebene kontrolliert, denn die organspezifische Expression der meisten Gene der Leber wird auf Transkriptionsebene reguliert (Friedman, 1988). Die Induktion des Enzyms TAT (Tyrosin-Aminotransferase, E.C. 2.6.1.5.) durch Glukokortikoide wurde durch die Arbeiten von Tomkins et al. (1969) zum Modellsystem für die hormonelle Kontrolle der Genexpression in Säugetierzellen. Dieses Hepatozyten-spezifische glukoneogenetische Enzym (Thompson, 1989) besitzt ein Molekulargewicht von 53000 Dalton (Hargrove et al., 1980), eine relativ kurze Halbwertszeit von 2 Stunden (Ernst et al., 1979) und unterliegt zirkadianen Schwankungen (Hardeland et al., 1973). Die hormonell kontrollier-

te Induktion durch Glukokortikoide und Glukagon bzw. die Modulation durch den intrazellulären Vermittler cAMP führt zu einer schnellen Steigerung der Enzymaktivität, wobei die Wirkung von Dexamethason und cAMP nach unterschiedlichen Mechanismen abläuft (Schmid et al., 1987).

Die Einwirkung von Endotoxin (LPS) führt zu einer drastischen Veränderung der Genexpression der Leber (Baumann und Gauldie, 1994). Neben der Produktion von Akutphase-Proteinen treten aber auch noch reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Zwischenprodukte auf (Laskin, 1997). Stickstoffoxid ist ein hochreaktives Stickstoffradikal mit einer Vielzahl an Funktionen, u.a. als Vasodilatator, Neurotransmitter, sowie protektiven aber auch toxischen Effekten (de Vera et al., 1995). NO wird zellspezifisch durch drei NOS (*Nitric oxide synthase*) Isoenzyme synthetisiert: NOS-1 (neuronale NOS), NOS-2 (Makrophagen NOS, induzierbare NOS, i-NOS) und NOS-3 (endotheliale NOS). NOS-1 und NOS-3 werden konstitutiv exprimiert, während die Expression von i-NOS im Zusammenhang mit Infektionen und Entzündungen steht. Nach neueren Erkenntnissen können sowohl Viren, Protozoen, Mykobakterien, Helminthen als auch Tumorzellen als Induktionssignale wirken (Nathan et al., 1994). Die Bedeutung der NO-Produktion durch hepatische i-NOS in pathologischen Prozessen konnte bis heute nicht vollständig geklärt werden (Milbourne et al., 1995).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Langzeitkulturen von Präzisions-Leberschnitten zu etablieren und anhand der leberspezifischen Genexpression über 1-3 Tage auf eine breite Anwendbarkeit zu untersuchen. Dazu werden unterschiedliche Kultivierungssysteme mit Präzisionsorganschnitten adulter Leber geprüft. Für die Anlage von Organkulturen muß allerdings noch immer jeweils ein Tier geopfert werden. Zur Verbesserung der Verbrauchsbilanz und um das System gleichzeitig auch für einen breiteren Anwendungskreis zugänglich zu machen, wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich Bedingungen erarbeitet, welche die Verhältnisse der Materialgewinnung von Schlachtieren und auch aus chirurgischen Interventionen berücksichtigen.

2 Tiere, Material und Methoden

2.1 Präparation von Präzisions-Leberschnitten

Die Organkulturen wurden mit Lebern aus 4-6 Monate (300-400 g KGW) alten männlichen Lewis Ratten etabliert. Die Tiere werden mit einer CO_2 -Lethalnarkose getötet und die Leber in eisgekühlten PBS überführt. Die großen Leberlappen werden jeweils zu einem Block zurechtgeschnitten aus dem mit einem *Tissue-Slicer* (Science Services, München) bis zu 20 Präzisionsschnitte mit einer Fläche von 1,5x2 cm angefertigt werden. Die Slices werden in gekühltem, serumhaltigen L-15 Medium aufbewahrt, in auf 37°C vorgewärmtes Medium aufgenommen und in das Kultivierungssystem eingesetzt.

2.2 Kultivierungs-Systeme

Es wurden zwei Systeme benutzt, einmal ein kommerziell erhältliches Perfusionssystem (Minuth-System) und ein selbst entwickeltes System SSOCS (*Static-Stirred Organ Culture System*). Das Minuth-Perfusionssystem besteht aus autoklavierbaren Kunststoffkammern mit einem Leitungssystem aus Silikonschläuchen und Luerverschlüssen. Die Perfusionsgeschwindigkeit wird durch eine Peristaltikpumpe reguliert und die Temperierung durch eine Wärmeplatte. Die 6 mm Ø kleinen Leberschnitte werden durch zwei „Siebmembranen“ in dem Ringverschluß (8-9 mm Ø) in vertikaler Lage positioniert, so daß das durchströmende Medium die Leberschnitte perfundiert / perifundiert.

Das selbst entwickelte System SSOCS basiert auf dem Prinzip, Organfragmente in der Interphase zwischen Medium und Luft zu kultivieren (Trowell, 1959). Der Unterschied zu herkömmlichen Versionen besteht darin, daß das Medium in Bewegung ist und das Medium-Organfragment-Verhältnis weit zugunsten des Mediums liegt. Kristallisierschalen, Glaspetrischalen, Netzmembranen, Magnetrührstäbe und ein Multimagnetprüher kennzeichnen das System. Die Kultivierungsbehälter werden durch Autoklavieren sterilisiert. Abb. 1 zeigt den Aufbau des Systems, in dem die Proben statisch in der Luft-Medium Interphase untergebracht sind, aber dynamisch vom Medium versorgt werden. Der Multi-Magnetprüher sorgt durch einen Rührmodus für den Wechsel zwischen einer schubweisen Überflutung der Organ-

fragmente mit Medium und Kontakt der Leberschnitte mit der Luftphase. Der Multimagnetprüher kann bis zu 15 Behälter aufnehmen mit je zwei 3 cm² großen Organschnitten. Die gesamte Apparatur ist in einem auf 37°C eingestellten Brutschrank untergebracht.

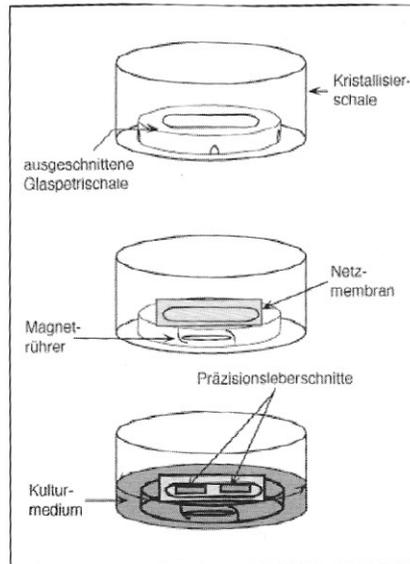


Abb. 1: Aufbau des Kultivierungssystems SSOCS.

Die Viabilität der Langzeitkultur wurde in beiden Kultivierungssystemen erst nach einer 24 h langen Vorinkubation in serumhaltigen Medium, Leibovitz-15 + 10% FKS + 4 mM L- Glutamin + 15 mM Hepes, bewertet. Die Induktionsversuche erfolgten unter serumfreien Bedingungen während des zweiten und dritten Kultivierungstages.

2.3 Biochemische Methoden

Die Präzisionsleberschnitte wurden zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten im Perfusionssystem auf ihr MTT-Reduktionspotential nach Fischer et al. (1995) getestet. Die Schnitte werden in 1% MTT-haltigem Medium für 30 und 60 min lang in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Farbstoffextraktion erfolgt in 0,5 ml DMSO pro Slice über Nacht und die optische Dichte wird bei 570 nm gemessen. Zur Bestimmung des Proteingehaltes werden die Leberschnitte nach Chiappelli et al. (1979) aufbereitet und anschließend nach Bradford (1976) bestimmt. Der Proteinstandard wird mit BSA (Bovine Serum Albumin, Pierce) ermittelt. Die Aktivität des TAT Enzyms wird nach der Methode

von Granner und Tomkins (1970) bestimmt. Die Leberschnitte werden in 0,14 M KCl (8 Volumen/Gewicht) bei 4°C homogenisiert und 30 min. lang bei 30.000 g zentrifugiert. Der Überstand dient sowohl der Enzym- als auch der Proteinbestimmung.

2.4 SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Immunoblot

Die Organschnitte werden in reduzierenden Sample Buffer (SB) (8 Volumen/Gewicht) auf Eis homogenisiert, 10 min bei 90°C gekocht und bei -20°C aufbewahrt. Die Mediumproben werden bei 4000 g 30 min lang bei 4°C zentrifugiert und der Überstand wird mit vierfachen Volumen an kaltem (-20°C) Azeton bei -20°C über Nacht gefällt (Zoller et al., 1996). Der Azetonüberstand wird nach erneuter Zentrifugation dekantiert, und die Pellets werden in reduzierendem SB aufgelöst, 10 min bei 90°C gekocht und bei -20°C aufbewahrt, oder direkt für die PAGE-Gelelektrophorese verwendet.

Die SDS-PAGE nach Laemmli (1970) wird in 5-15% Gradientengelen bei 50-80 Volt über Nacht ausgeführt. Elektrotansfer auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher&Schuell) erfolgt für 2 h bei 80 Volt in einer Hoefer Apparatur (TE 52). Zur Kontrolle des Transfervorgangs werden die Proteine auf der Membran reversibel mit Ponceau-S-Lösung (Serva 33427) nach Harlow und Lane (1988) gefärbt und zwecks Dokumentation der aufgetragenen Proteinmengen photokopiert. Die Membranen werden 1,5 h bei Raumtemperatur in TBS-t mit 5% Trockenmilch blockiert, anschließend werden die Membranen 1 h mit dem primären Antikörper (polyklonaler anti-TAT (von G. Schütz, DKFZ, Heidelberg) 1:2000, anti-GST-alpha (Biotrin, Dublin) 1:5000, monoklonaler anti-i-NOS (*Transduction Laboratories*, Lexington) 1:1000 verdünnt) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgt die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Peroxidase konjugierte anti-Kaninchen oder anti-Maus von Amersham, 1:2000 bis 1:5000 verdünnt) für 1 h. Zur Detektion wurde das ECL-System nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.5 Histologische und Immunhistologische Verfahren

Die Leberschnitte werden in Bouin-Lösung fixiert und anschließend in Paraplast

eingebettet. Nach Entparaffinierung werden die 5 µm Präparate durch eine zweimalige Mikrowellenbehandlung für 5 min in 10 mM Zitratpuffer, pH 6,0 mit 580 Watt erhitzt. Nach der Inaktivierung der endogenen Peroxidasen durch 3,0% Wasserstoffperoxid folgt eine 2 h Blockierung in PBS mit 5% Trockenmilchpulver und 2% BSA. Der primäre Antikörper wird in der Blockierlösung verdünnt (polyklonale anti-Laminin und anti-GST-P, Biotrin, Dublin), mit Natriumazid (Endkonzentration 0,02%) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer inkubiert. Nach mehreren Waschschritten in PBS wird der Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper für 1 h eingesetzt. Die Detektion erfolgt mit dem Chromogen DAB (Sigma) und die Kernfärbung mit Harris Hämatoxylin. Die PAS-Reaktion wurde nach Hotchkiss und McManus (Burck, 1988) ausgeführt.

2.6 Auswertung

Die statistische Auswertung der MTT- und TAT-Enzymbestimmungen beschränkt sich auf die Ermittlung des Mittelwertes. Die Ergebnisse wurden in zwei bzw. drei unabhängigen Versuchen wiederholt. Das Testsystem – Induktion von TAT durch Glukokortikoide – war aus *in vivo* Versuchen etabliert und konnte unmittelbar für die Feststellung des viablen Zeitraumes eingesetzt werden. Nach Ermittlung dieser Zeitspanne wurden neue Versuche weiter anhand von Immunoblots beurteilt. Immunoblots bieten gegenüber Enzymbestimmungen den Vorteil der Dauerhaftigkeit der Dokumentation und der Darstellung der biochemischen Eigenschaften des verantwortlichen Proteins (Mono- oder Oligomer, usw.). Aufgrund der Probenprozessierung können unterschiedliche Antigene aus ein und derselben Probe durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Eigenschaften der eingesetzten Kultivierungssysteme

Der Einsatz der Organschnitte (6 mm Durchmesser) unter sterilen Bedingungen in den Ringverschluß des Perfusionssystems erwies sich in unseren Händen als zeitintensiv. Der pH des Mediums alkalierte bereits nach 18 h auf 7,8-8,2; diesen Prozeß konnten auch Hepes-Zusätze (20 oder 50 mM) nicht verhindern.

Im selbst entwickelten SSOC-System können Größe und Zahl der eingesetzten Präzisionsschnitte an die Fragestellung und Auswertungsmethode bequem angepaßt werden. Innerhalb von Minuten werden die Organschnitte in bis zu 20 Kultivierungseinheiten eingesetzt. Je nach Versuchsverlauf können einzelne Proben steril und einfach entnommen oder umgesetzt werden. Der pH Wert bleibt auch in serumfreien Medien über 72 h stabil.

3.2 Auswertung der Perfusionskulturen mit dem MTT-Test

Verglichen mit der Ausgangssituation (0 h Perfusion) nehmen das MTT-Reduktionspotential und der Proteingehalt der Leberschnitte in der Perfusionskultur täglich um etwa 25% ab (Abb. 2). Diese relativen Daten beziehen sich auf die einzelnen *Slices*; wenn aber das MTT-Potential den Proteingehalt der *Slices* berücksichtigt, kann die spezifische Aktivität ermittelt werden. Abb. 2 zeigt, daß während der gesamten Inkubationsdauer ein gleichmäßiges spezifisches MTT-Reduktionspotential vorhanden ist. Dieser stabile Grundwert ist um etwa 25 bis 40% höher als die Ausgangssituation.

3.3 Glukokortikoid induzierte TAT-Expression

In vivo führt eine Dexamethasonbehandlung (3 mg/KGW) innerhalb von 6 h zu einem fünffachen Anstieg der Enzymaktivität von TAT in der Leber. In beiden *in vitro* Systemen fällt die TAT-Aktivität während des ersten Tages auf etwa die Hälfte ihrer Ausgangswerte ab und steigt

in den zweiten 24 h auf einem *in vivo*-nahen Wert, der auch am dritten Tag erhalten bleibt. Nach 24 h Vorinkubation führt die Hormonbehandlung mit Dexamethason (50 µM) für 6 h im Perfusionssystem zu keiner Veränderung und im SSOC-System zu einer Verdopplung der TAT-Aktivität. Diese Aktivitätssteigerung in SSOCS erreicht nach 24 h das vierfache der Kontrolle. Die gleichzeitige Zugabe von Cycloheximid (8 µg/ml) hemmt die Aktivitätszunahme und zeigt somit, daß die Aktivitätssteigerung in SSOCS auf Neusynthese (Induktion) des Enzyms zurückzuführen ist. Im Perfusionssystem steigt die Enzymaktivität nach 24 h Dex Behandlung auf den 1,7 fachen Kontrollwert. Bei diesem Ergebnis wurde auf den Induktionsbeweis durch Hemmung mit Cycloheximid verzichtet.

Mit Hilfe der TAT-Induktion wurden Viabilität und Leistung der beiden untersuchten Inkubationssysteme für Leberschnittkulturen verglichen. Die längere Hormonbehandlung (24 h) verdeutlicht die Überlegenheit des dynamischen Interphasen-Systems (SSOCS) mit einer fast 2,5 fachen stärkeren Induzierbarkeit von TAT in den Leberorgankulturen als im kommerziell erhältlichen System. Diese Induktionsstärke ist mit der *in vivo* Reaktion vergleichbar und relativiert die Aktivitätssteigerung im Perfusionssystem (Abb. 3).

Die Glukokortikoidbehandlung der Leberschnitte am dritten Tag der Kultur (1. Tag mit Serum, 2. und 3. Tag serumfrei) führt zu einer 1,8 fachen Induktion von TAT nach 24 h Behandlungszeit (Abb. 4), die wiederum durch Cycloheximid hemmbar ist. Interessanterweise führt eine

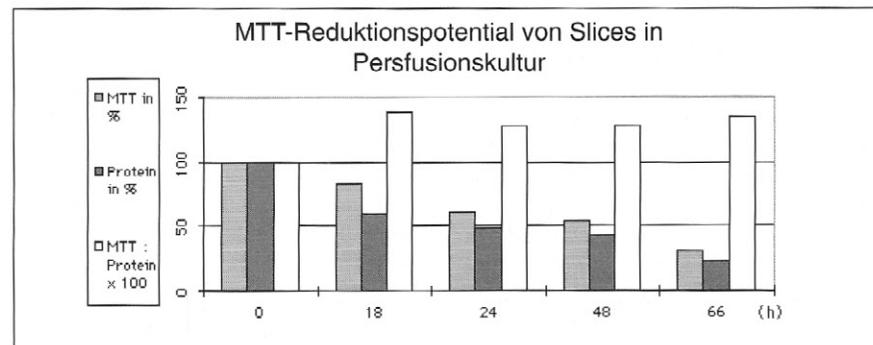


Abb. 2: Standardisierung des MTT-Reduktionspotentials durch den Gesamtproteingehalt der 6 mm Ø Leberschnitte. Sechs *Slices* wurden in einer Perfusionskammer inkubiert und für jeweils einen Kultivierungszeitpunkt (18, 24, 48 oder 66 h) ausgewertet. Den Ausgangspunkt stellen nicht inkubierte Leberschnitte dar (MTT: 6,7=100%; Proteingehalt 0,69 mg=100%). Die Resultate setzen sich aus zwei unabhängigen Versuchen zusammen.

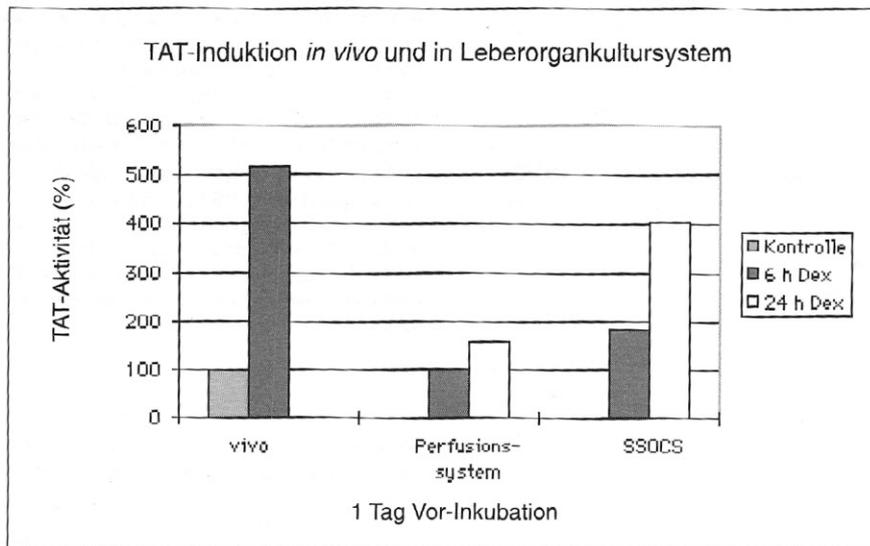


Abb. 3: Vergleich der TAT Expression *in vivo* und in Langzeitkulturen von Leberschnitten, inkubiert in verschiedenen Systemen. Die Hormonbehandlung wurde in beiden Systemen erst nach 24 h Vorinkubation begonnen. Die Enzymaktivität wurde 6 und 24 h nach Dexamethasonzugabe (50 μ M) gemessen. Die Daten beziehen sich auf die spezifische Aktivität von TAT unbehandelter adulter Rattenlebern (25,83 μ mol/min/mg Protein=100%).

kurze (6 h) Dex Behandlung zu Beginn des zweiten Tages zu einer schnellen (6 h) und deutlichen (4 fach) zweiten Induzierbarkeit am dritten Tag, die der vierfachen TAT-Induktion am zweiten Tag entspricht.

3.4 Einsatz der TAT-Genexpression als Routine-Viabilitätsmarker

Diese Induktion wurde zusätzlich durch die Modulation des 53 kDa Proteins, welches mit einem spezifischen Antikörper gegen TAT nachgewiesen wurde, bestätigt. Die durch Immunoblot nachgewiesene TAT-Induktion durch Glukokortikoide (Sultan et al., 1996) wurde als Standardmethode zur Bestimmung der Viabilität der Leberschnitte eingesetzt. Abb. 5 zeigt die Modulation von TAT in Leberschnitten kultiviert im SSOC-System unter serumfreien Bedingungen mit den angegebenen Zusätzen (EGF, cAMP, Tunicamycin, LPS) nach einer eintägigen Vorinkubation. Die Wirkungen werden mit der Glukokortikoid-vermittelten TAT-Induktion (K, Dex, Dex/Chx) verglichen. Die dargestellte Übersicht besteht aus drei unabhängigen Versuchen und den entsprechenden Kontrollen (K). Die cAMP vermittelte TAT-Induktion (Schmid et al., 1987) ist damit auch im SSOC-System nachgewiesen. Die Zugabe von LPS in Anwesenheit von Dex führt zu einer Induktion, wie sie bei alleiniger Dex Zuga-

be entsteht, insofern kann eine toxische LPS-Wirkung bei der gewählten LPS-Konzentration ausgeschlossen werden.

3.5 LPS vermittelte i-NOS-Genexpression

Trotz der eintägigen Vorkultivierung von Präzisionsleberschnitten im SSOC-System sind die Organkulturen am zweiten Tag in der Lage, auf Endotoxin in einer

leberspezifischen Weise zu reagieren. Die massive Induktion von i-NOS ist ein Beispiel für die drastischen Veränderungen der Genexpression der Leber, bedingt durch die Einwirkung von LPS. Die Neusynthese des Proteins kann im SSOC-System nicht nur durch den allgemeinen Translationsinhibitor Cycloheximid erzielt werden, sondern auch durch Dexamethason (Abb. 6).

3.6 Regulation des Zytotoxizitätsmarkers GST-alpha

Der Zytotoxizitätsmarker GST-alpha gilt als empfindlicher Indikator für frühe Leberschädigungen (Redl et al., 1995). Aus diesen Gründen wurde der Nachweis des Proteins im Medium von Leberschnittkulturen, welche Tunicamycin, LPS, Cycloheximid oder cAMP ausgesetzt waren, durchgeführt. Das Ergebnis ist im Immunoblot (Abb. 7) dargestellt. Sowohl Tunicamycin als auch die LPS-Behandlung führen zu einem Anstieg an GST-alpha im Medium. Die LPS-induzierte Freisetzung wird aufgrund der Hemmung durch Cycloheximid von *de novo* Synthese abhängig sein. Die zusätzliche Inhibition durch Dexamethason zeigt, daß die LPS-bedingte Leberreaktion in diesem SSOC-System ähnlich wie *in vivo* regulierbar ist. Dieser Befund validiert den Einsatz des SSOC-Systems für komplexere Toxizitätsstudien bis zu diesem späten Zeitpunkt von 48

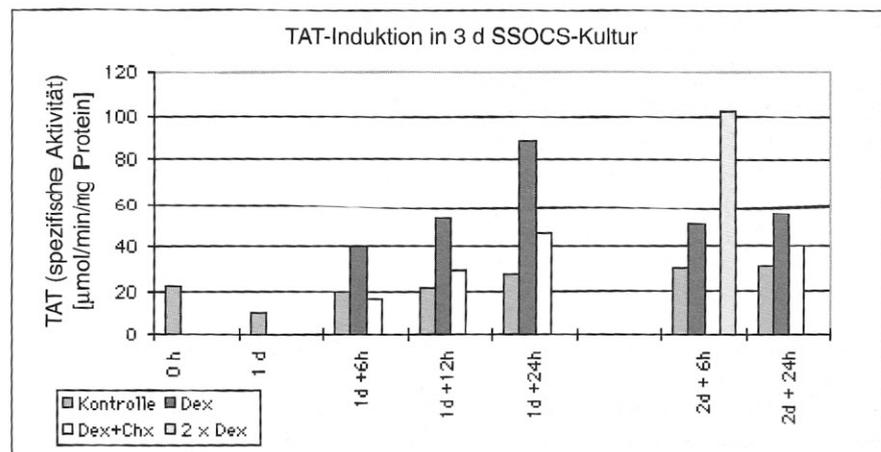


Abb. 4: Induktion von TAT durch Glukokortikoide in Leberschnitten während des zweiten und dritten Tages in serumfreier Kultur.

Die Enzymaktivität wurde 6, 12 und 24 h am 2. und 6 und 24 h am 3. Kultivierungstag nach Dexamethasonzugabe (50 μ M) gemessen. Zusätzlich wurde Cycloheximid (8 μ g/ml) gleichzeitig mit Dexamethason zugegeben. Alle Behandlungen wurden nach einer 24 h bzw. 48 h Vorinkubation begonnen. Zusätzlich wurde nach der 24-stündigen, serumhaltigen Vorinkubation eine kurze (6 h) Dex Behandlung, gefolgt von einer 18 h Hormon- und serumfreien Phase, eine erneute zweite 6 h Dex Behandlung angeschlossen. Die Resultate setzen sich aus drei unabhängigen Versuchen zusammen

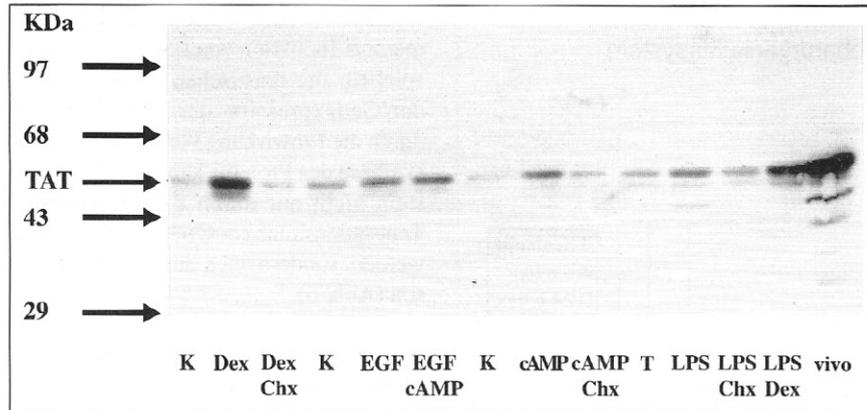


Abb. 5: TAT-Immunoblots als Routine-Viabilitätskontrolle für Langzeitkulturen von Leberschnitten im SSOC-System.

Nach 24 h Vorinkubation in serumhaltigem Medium (10% FKS) wurden die Testsubstanzen Dex (50 μ M), Chx (8 μ g/ml), EGF (100 ng/ml), cAMP (500 μ M), Tunicamycin (T) (5 μ g/ml) und LPS (20 μ g/ml) unter serumfreien Bedingungen zugegeben und weitere 24 h inkubiert. Als Kontrolle (K) dienten unbehandelte Schnitte. Die Resultate repräsentieren drei unabhängige Versuche.

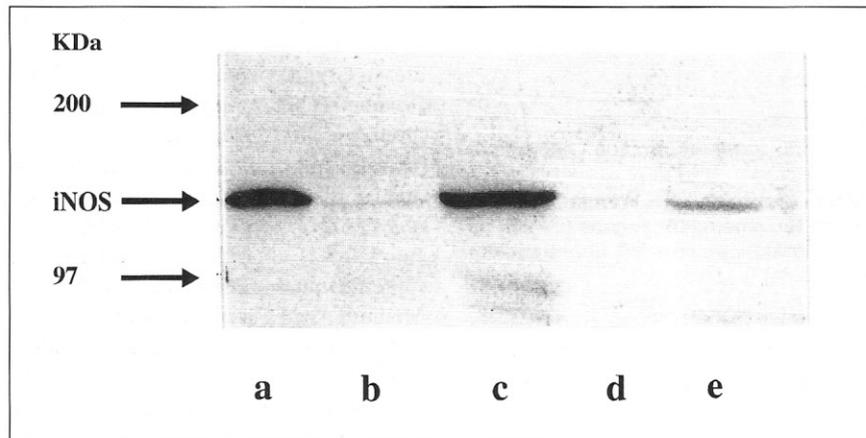


Abb. 6: Expression von i-NOS in Leberschnitten aus Langzeitkulturen im SSOC-System.

(a) Positiv-Kontrolle (130 kDa i-NOS) von induzierten Makrophagen (Transduction Laboratories).
 (b) 48 h kultivierte Leberschnitte ohne Zusätze (Kontrolle).
 (c) 24 h lang mit LPS (20 μ g/ml) behandelte Schnitte nach einer eintägigen Vorinkubation.
 (d) wie (c) jedoch mit Chx (8 μ g/ml).
 (e) wie (c) jedoch mit Dex (50 μ M).

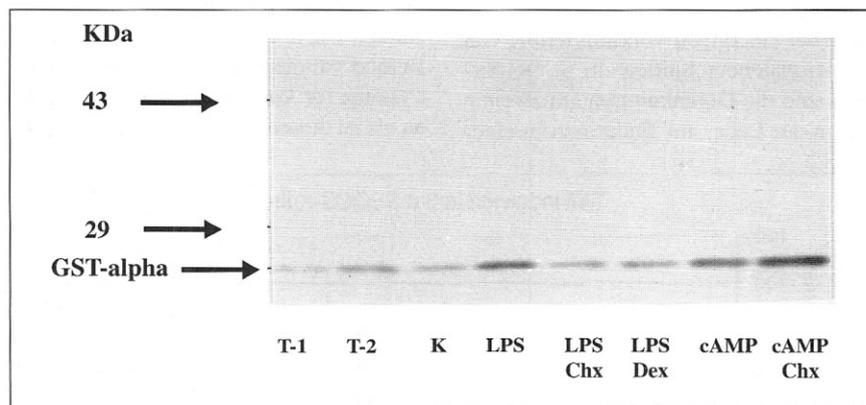


Abb. 7: Nachweis von GST-alpha im Medium von Leberschnittkulturen im SSOC-System durch Immunoblot.

Nach 24 h Vorinkubation in serumhaltigem Medium (10% FKS) wurden die Testsubstanzen unter serumfreien Bedingungen zugegeben und weitere 24 h inkubiert. T-1 und T-2 repräsentieren unterschiedliche Konzentrationen von Tunicamycin (T-1: 2,5 bzw. T-2: 5 μ g/ml). Die Konzentrationen der übrigen Zusätze sind: Chx (8 μ g/ml), cAMP (500 μ M), LPS (20 μ g/ml) und Dex (50 μ M).

Stunden. Der deutliche Anstieg an GST-alpha im Medium cAMP behandelter Leberschnitte und die fehlende Inhibition durch Cycloheximid deuten auf die posttranslationale Wirkung von cAMP auf bereits synthetisierte Proteine, vermutlich durch Stimulation der Sekretion.

3.7 Histologische und Immunhistologische Befunde

Bei der histologischen Auswertung mehrerer unabhängiger SSOCs-Langzeitkul-

turen fielen leberuntypische Zellstrukturen auf (Abb. 8). Die PAS-Färbung (A, D) zeigt stark positive Zellmembranen der Zellen des Glissonschen Dreiecks und von diesen, lumenbildenden Zellgruppen. Diese Zellgruppierungen treten gehäuft in den Periportalfeldern auf (D), sind aber auch mitten im Leberläppchen zu finden (A). Mit einem spezifischen Laminin-Antikörper, der unter anderem die Endothelzellen darstellt, wurden diese Strukturen nicht gefärbt (B, E), so daß es sich bei diesen

lumenbildenden Zellgruppen nicht um Kapillarstrukturen handelt. Ein spezifischer Antikörper gegen das Gluthathion-S-Transferase-P (GST-P) Antigen, der in der gesunden adulten Leber die Gallengangszellen darstellt (Parola et al., 1993), ergab eine stark positive Färbung dieser lumenbildenden Zellstrukturen (Abb. 8, C, F). Diese Ergebnisse und die kubische Epithelform der Zellen könnten durch Aktivierung von Stammzellen der Leber (*oval cells*) erklärt werden.

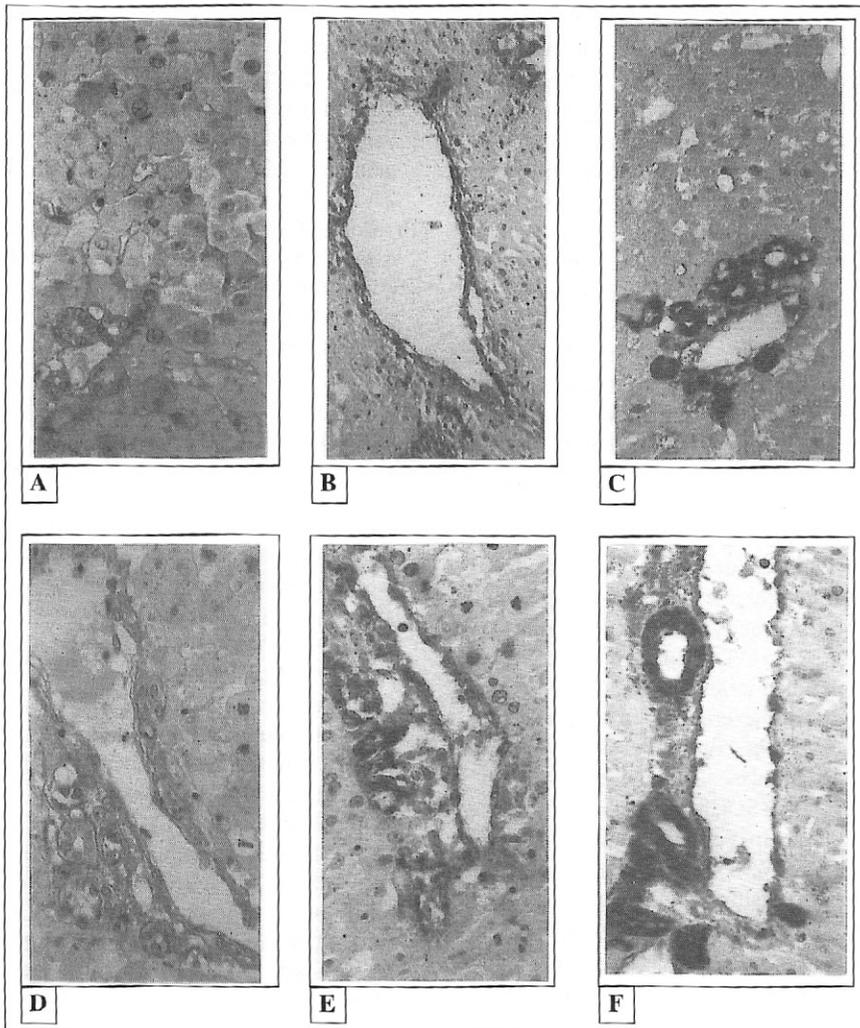


Abb. 8: Histologische und immunhistologische Befunde in Langzeitorgan-kulturen der Leber.
PAS-Färbungen (A, D) und Immunhistologie: anti-Laminin (B, E) und anti-GST-p (C, F) von Leberschnitten nach Langzeitkultivierung im SSOC-System.

4 Diskussion

Ursprünglich wurde in dem Perfusionssystem die Viabilität der Organkultur anhand des MTT-Reduktionspotentials überprüft. Die Standardisierung des MTT-Tests anhand des Proteingehaltes der Leberschnitte zeigte, daß bis zum dritten Tag ein konstantes Reduktionspotential erhalten bleibt. Das könnte daran liegen, daß für die MTT-Reduktion allgemeine extra-mitochondriale Faktoren verantwortlich sind (Berridge und Tan, 1993), welche stabile Eigenschaften, gegebenenfalls auch nach dem Zelltod, besitzen, im Gegensatz zur Annahme, daß mitochondriale Enzyme wie die Succinatdehydrogenase für die MTT-Reduktion verantwortlich sind (Fry et al., 1995). Die erhobenen Befunde weisen darauf hin, daß der MTT-Test eher zur

Erfassung der Zellzahl als der Viabilität geeignet ist.

Die widersprüchlichen Ergebnisse mit dem MTT-Test führten zur Beurteilung der Viabilität anhand der Hormon-induzierten Genexpression. Im Perfusionssystem wurde eine geringfügige Erhöhung der TAT-Aktivität durch Glukokortikoide erzielt. Das anschließend selbstentwickelte Inkubationssystem (SSOCS) ermöglicht dagegen eine *in vivo* ähnliche TAT-Induktion durch Glukokortikoide (Sultan et al., 1996). Mit anderen bekannten TAT-Induktoren, wie z.B. cAMP, wurde auch eine durch Immunoblot nachgewiesene TAT-Induktion erzielt. Im Vergleich zu den Untersuchungen von Hart et al. (1983), der einen Serumzusatz von 50% benutzte, um eine 1,7 fache TAT-Induktion zu erzielen, wird im SSOC-System unter serumfreien

Bedingungen eine vierfache Induktion durch Glukokortikoide erreicht. Es erscheint sinnvoll, dieses System für weitere Untersuchungen von endokrinen oder auch antihormonellen Regelmechanismen einzusetzen.

Zusätzlich zu der hormonell induzierten Genexpression wurde die Reaktionsfähigkeit des SSOC-Systems auf Endotoxine untersucht. Im Gegensatz zu den Hepatozyten-Primärkulturen, die eine Kombination von LPS und Zytokinen (Cocktail-Mix) benötigen oder aus zuvor mit LPS behandelten Tieren isoliert werden (de Vera, 1995), um NOS-II induzieren zu können (Morris und Billiar, 1994), ist es im SSOC-System möglich, durch den alleinigen Endotoxinzusatz eine *in vivo*-ähnliche Kaskade auszulösen. Diese Induktion ist sowohl durch Cycloheximid als auch durch Dexamethason hemmbar. Damit ist der Nachweis erbracht, daß es sich einerseits um eine echte Induktion (*de novo* Synthese) handelt, und darüber hinaus, daß diese Induktion durch das Glukokortikoid wie *in vivo* negativ reguliert werden kann.

Obwohl der Einsatz von Leberschnitten immer noch vorwiegend auf pharmakologische Fragestellungen beschränkt wird und sich in Kurzzeitkulturen als „Screening“-System bewährt hat (Li, 1994; Goethals und Roberfroid, 1995), zeigen die vorliegenden Resultate die Eignung des Systems für komplexe Langzeituntersuchungen in der Grundlagenforschung, wie z.B. zellbiologische Regelmechanismen. Die Regulation der Genexpression durch Steroidhormone, cAMP oder Endotoxin wurde anhand der neusynthetisierten Proteine nachgewiesen und kann nun in ihren einzelnen Reaktionen spezifisch untersucht werden. Der Einsatz von molekularbiologischen Methoden zum Nachweis der beteiligten Komponenten (z.B. mRNA) der Genexpression wurde bereits erfolgreich demonstriert (unveröffentlichte Ergebnisse).

Die histologische Auswertung der SSOCS Organkulturen zeigte ein gehäuftes Auftreten von kleinen gallengangähnlichen Strukturen. Nach zwei Tagen in Kultur können in den Portalfeldern mehrere lumenbildende mehrzellige Strukturen gezeigt werden. Diese auch mitten im Leberparenchym beobachteten Zellstrukturen wurden immunhistologisch mit einem GST-P Antikörper spezifisch gefärbt.

Da dieses Protein nur in den Gallengangsepithelzellen der normalen Leber nachzuweisen ist (Parola et al., 1993) und die Häufung dieser Beobachtung einen Schnittartefakt weitestgehend ausschließt, könnte es sich um eine Neubildung von Gallengängen handeln. Zu dieser Neubildung sind nur Leber-Stammzellen fähig, die sich entweder zu Hepatozyten oder zu Gallengangszellen entwickeln (Reid et al., 1988). Eine Aktivierung dieser Stammzellen, auch *oval cells* genannt, eröffnet ein neues Untersuchungsgebiet für dieses System, da die üblichen Systeme entweder Tierversuche in Form von chemisch induzierter Kanzerogenese oder durch Hepatektomie verursachte Leberregeneration benötigen (Reid et al., 1988).

Die Abkopplung der Leber vom Zirkulationssystem muß *in vitro* durch das Inkubationssystem ausgeglichen werden. Die Trowell-Technik (Trowell, 1959) führte zur Etablierung der sog. Luft-Medium Interphasen Kultur. Eine weiterentwickelte Version stellt die Benutzung von Membraneinlagen in Multiwellplatten dar, die in einem Wasserbad mit Schüttelbewegung untergebracht werden (Dogterom, 1993).

Die kontinuierliche Zu- und Abfuhr von Medium stellt im Perfusionssystem einen Vorteil dar, der in allen anderen Systemen, wie z.B. DOCS (Fischer et al., 1995) oder das Trowell-System (1959) nicht stattfinden kann. Dieser Perfusionsvorgang wurde in SSOCS durch die schubweise Umspülung von Medium durch den Magnetrührer ersetzt. Gleichzeitig stellt das überschüssige Mediumvolumen ein Reservoir dar, über das auch während einer 48-stündigen Inkubation die Organkulturen ständig mit nahezu unverbrauchtem Medium versorgt werden. Die Bestandteile von SSOCS sind allgemein erhältliche Laborausstattungen und im Falle von Verschleiß kostengünstig und schnell ersetzbar. Die Kosten für eine Kultivierungseinheit betragen etwa 5 bis 7 DM, die einer Perfusionskammer etwa 700 DM.

Die Entwicklung von Alternativen zum Tierversuch richtete sich nach den von Russell und Burch (1959) geforderten drei R, *Replacement, Reduction und Refinement*. Die Validierungsfrage von Alternativsystemen wurde im ursprünglichen Postulat noch nicht berücksichtigt, deshalb wurde von Gad (1994) ein viertes "R" (*Responsibility*) zugefügt: die Verantwort-

ung des Experimentators, sein System kritisch zu beurteilen. Die Vielfalt an einsetzbaren Viabilitätsparametern kann zu einer Validierung durch allgemeine Zellfunktionen führen, wodurch die organspezifische Funktionalität des Systems nicht charakterisiert wird (Skett et al., 1995; Blaauboer et al., 1994). Die Verbreitung neuer Systeme kann aber entscheidend verbessert werden, wenn komplexere Kriterien wie die Genexpression zur Validierung herangezogen werden. Das vierte R sollte den Experimentator auch veranlassen, einen Vergleich zur Situation *in vivo* durchzuführen. Die Ergebnisse von Sultan et al. (1996) beschreiben den direkten Vergleich der *in vivo* Reaktion mit der Langzeitkultur von SSOCS. *In vivo* wird nach sechs Stunden eine fünffache Induktion erreicht, die auch mit den Resultaten von Chesnokov et al. (1990) übereinstimmen. Diese TAT-Induktion kommt der vierfachen Induktion nach 24 h am zweiten Kultivierungstag am nächsten. Erst dieser direkte Vergleich relativiert sowohl die Ergebnisse der Induzierbarkeit am 3. Tag von SSOCS als auch die gesamten Resultate im Perfusionssystem, denn eine zeitliche Verzögerung kann bei ähnlicher Reaktionsfähigkeit *in vitro* noch akzeptiert werden. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten SSOC-System ist es möglich, über eine Zeitspanne von 48 h spezifische Leberfunktionen zu untersuchen und *in vivo* ähnlich zu modulieren.

Literatur

- Bade, E. G. (1967). Biological and ultrastructural aspects of early stages in liver regeneration. In H. Teir and T. Rytömaa (eds.), *Control of cellular growth in adult organisms* (260-269). London: Academic Press.
- Baumann, H. and Gauldie, J. (1994). The acute phase response. *Immunology Today*, 15(2), 74-80.
- Berridge, M. V. and Tan, A. S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 303(2), 474-482.
- Blaauboer, B. J., Boobis, A. R., Castell, J. V., Coecke, S., Groothuis, G. M. M., Guillouzo, A., Hall, T. J., Hawksworth, G. M., Lorenzon, G., Miltenburger, H. G., Rogiers, V., Skett, P., Villa, P. and Wiebel, F. J. (1994). The practical applicability of hepatocyte cultures in routine testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 1. *ATLA* 22, 231-241.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Burck, H.-C. (1988). *Histologische Technik* (6. ed.). New York: Thieme Verlag Stuttgart.
- Chesnokov, V. N., Gadzhiev, V. G., Tevs, N. R., Zelenin, S. M., Leont'eva, G. I. and Mertvetsov, N. P. (1990). Tissue-specific hormonal regulation of the level of tyrosine aminotransferase mRNA in rats. *Biokhimiia*, 55(1), 59-64.
- Chiappelli, F., Vasil, A. and Haggerty, D. F. (1979). The protein concentration of crude cell and tissue extracts as estimated by the method of dye binding: comparison with the Lowry method. *Analytical Biochemistry* 94, 160-165.
- de Vera, M. E., Geller, D. A. and Billiar, T. R. (1995). Hepatic inducible nitric oxide synthase: regulation and function. *Biochem. Soc. Trans.* 23(4), 1008-1013.
- Deaciuc, I. V., Bagby, G. J., Niesman, M. R., Skrepnik, N. and Spitzer, J. J. (1994). Modulation of hepatic sinusoidal endothelial cell function by Kupffer cells: an example of intercellular communication in the liver. *Hepatology*, 19(2), 464-70.
- Dogterom, P. (1993). Development of a simple incubation system for metabolism studies with precision-cut liver slices. *Drug Metab. Dispos.* 21(4), 699-704.
- Ernest, M. J. and Feigelson, P. (1979). Multihormonal control of tyrosine aminotransferase in isolated liver cells. In J. D. Baxter and G. G. Rousseau (eds.), *Glucocorticoid hormone action* (1. ed., Vol. 12, 219-241). Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
- Fisher, R. L., Shaughnessy, R. P., Jenkins, P. M., Austin, M. L., Roth, G. L., Gandolfi, A. J. and Brendel, K. (1995). Dynamic organ culture is superior to multiwell plate culture for maintaining precision-cut tissue slices: optimization of tissue slice culture. *Toxicol. Methods* 5(2), 99-113.
- Friedman, J. M. and Krauter, K. (1988). Hepatic gene expression and mRNA metabolism. In I. M. Arias, W. B. Jako-

- by, H. Popper, D. Schachter and D. A. Shafritz (eds.), *The liver: biology and pathobiology* (second ed., Vol. 4, 71-82). New York: Raven Press.
- Fry, J. R. and Hammond, A. H. (1993). Assessment of the functional integrity of hepatocytes: a brief review. *ATLA* 21, 324-329.
- Gad, S. C. (1994). *In vitro toxicology*. New York: Raven Press.
- Goethals, F. and Roberfroid, M. (1995). Alternatives in testing for hepatotoxicity. In C. L. Galli, A. M. Goldberg and M. Marinovich (eds.), *Modulation of cellular responses in toxicity* (265-281). Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
- Granner, D. K. and Tomkins, G. M. (1970). Tyrosine aminotransferase (rat liver). *Methods in Enzymology*, 17A, 633-637.
- Hardeland, R., Hohmann, D. and Rensing, L. (1973). The rhythmic organization of rodent liver - a review. *J. interdiscipl. Cycle Res.*, 4(2), 89-118.
- Hargrove, J. L., Diesterhaft, M., Noguchi, T. and Granner, D. K. (1980). Identification of native tyrosine aminotransferase and an explanation for the multiple forms. *J. Biol. Chem.* 255(1), 71-78.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988). *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hart, A., Mattheyse, F. J. and Balinsky, J. B. (1983). An organ culture of postnatal rat liver slices. *In Vitro* 19(11), 841-852.
- Krumdieck, C. L., Dos Santos, J. E. and Ho, K.-J. (1980). A new instrument for the rapid preparation of tissue slices. *Analytical Biochemistry*, 104, 118-123.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(259), 680-685.
- Lake, B. G., Beamand, J. A., Japenga, A. C., Renwick, A., Davies, S. and Price, R. J. (1993). Induction of Cytochrome P-450 dependent enzyme activities in cultured rat liver slices. *Food and Chemical Toxicology*, 31(5), 377-386.
- Lake, B. G., Charzat, C., Tredger, J. M., Renwick, A. B., Beamand, J. A. and Price, R. J. (1996). Induction of cytochrome p450 isoenzymes in cultured precision-cut rat and human liver slices. *Xenobiotica*, 26(3), 297-306.
- Laskin, D. L. (1997). Role of hepatic macrophages in inflammation and tissue injury. In Vidal-Vanaclocha (ed.), *Functional heterogeneity of liver tissue*, (1. ed., Vol. 37, 161-176). Austin Texas: R.C.Landes Company.
- Li, A. P. (1994). Primary hepatocyte culture as an in vitro toxicological system of the liver. In S. C. Gad (ed.), *In vitro toxicology*, (1. ed., Vol. 10, 195-220). New York: Raven Press.
- Loreal, O., Levavasseur, F., Fromaget, C., Gros, D., Guillouzo, A. and Clement, B. (1993). Cooperation of Ito cells and hepatocytes in the deposition of an extracellular matrix in vitro. *American Journal of Pathology*, 143(2), 538-544.
- Milbourne, E. A. and Bygrave, F. L. (1995). Does nitric oxide play a role in liver function? *Cell Signal*, 7(4), 313-318.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Nathan, C. and Xie, Q. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell*, 78, 915-918.
- Parola, M., Biocca, M. E., Leonarduzzi, G., Albano, E., Dianzani, M. U., Gilmore, K. S., Meyer, D. J., Ketterer, B., Slater, T. F. and Cheeseman, K. H. (1993). Constitutive and inducible profile of glutathione S-transferase subunits in biliary epithelial cells and hepatocytes isolated from rat liver. *Biochem. J.* 291(Pt 2), 641-647.
- Redl, H., Schlag, G., Paul, E. and Davies, J. (1995). Plasma Glutathione-S-Transferase as an early marker of posttraumatic hepatic injury in non-human primates. *Shock*, 3, 395-397.
- Reid, L. M., Abreu, S. L. and Montgomery, K. (1988). Extracellular matrix and hormonal regulation of synthesis and abundance of messenger RNAs in cultured liver cells. In I. M. Arias, W. B. Jakoby, H. Popper, D. Schachter and D. A. Shafritz (Eds.), *The liver: biology and pathobiology* (second ed., Vol. 39, 717-737). New York: Raven Press.
- Rojkind, M. and Greenwel, P. (1988). The liver as a bioecological system. In I. M. Arias, W. B. Jakoby, H. Popper, D. Schachter and D. A. Shafritz (Eds.), *The liver: biology and pathobiology*, (second ed., Vol. 73, 1269-1285). New York: Raven Press.
- Russel, W. M. S. and Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen and Co.
- Schmid, E., Schmid, W., Jantzen, M., Mayer, D., Jastorff, B. and Schütz, G. (1987). Transcription activation of the tyrosine aminotransferase gene by glucocorticoids and cAMP in primary hepatocytes. *Eur. J. Biochem.*, 165, 499-506.
- Skett, P., Tyson, C., Guillouzo, A. and Maier, P. (1995). Report on the international workshop on the use of human in vitro liver preparations to study drug metabolism in drug development - held at utrecht, the netherlands, 6-8 september, 1994. *Biochem Pharmacol*, 50(2), 280-285.
- Smith, P. F., Krack, G., McKee, R. L., Johnson, D. G., Gandolfi, A. J., Hruby, V. J., Krumdieck, C. L. and Brendel, K. (1986). Maintenance of adult rat liver slices in dynamic organ culture. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 22(12), 706-712.
- Sultan, K., Hartung, J. and Bade, E. G. (1996). Hormone- and endotoxin-modulated gene expression of a long-term organ culture system of adult rat liver. *FEBS Letters*, 394(1), 51-54.
- Thompson, E. B., Gadson, P., Wasner, G. and Simons Jr., S. (1989). Differential regulation of tyrosine aminotransferase by glucocorticoids: transcriptional and post-transcriptional control. In A. K. Roy and J. H. Clark (Eds.), *Gene regulation by steroid hormones* (63-76). New York: Springer Verlag.
- Tomkins, G. M., Gelehrter, T. D., Granner, D., Martin, D., Samuels, H. H. and Thompson, E. B. (1969). Control of specific gene expression in higher organisms. *Science* 166, 1474-1480.
- Trowell, D. A. (1959). The culture of mature organs in a synthetic medium. *Exp. Cell Res.*, 16, 118-147.
- Zoller, J., Bauhofer, A., Crabb, J., Seebacher, T., Geimer, P., Schramke, H. and Bade, E. G. (1996). Constitutive migration and expression of three protease systems define in vitro the malignant phenotype of ha-ras transformed rat liver epithelial cells. *Int. J. Oncol.*, 8(2), 337-342.

Korrespondenzadresse

Dr. med. vet. Karim Sultan
 Abt. Zellbiologie-Tumorbiologie
 Fakultät für Biologie
 Universität Konstanz
 Postfach 5560-M600
 D-78434 Konstanz
 Tel.: +49-7531-88-3638
 E-mail: karim.sultan@uni-konstanz.de