

**Toxicogenomics:
Genexpressionsanalysen zur Charakterisierung
und Identifizierung genotoxischer Verbindungen**

Kathleen Böhme

DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin Kathleen Böhme

aus Leipzig

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema:
Toxicogenomics:
**Genexpressionsanalysen zur Charakterisierung
und Identifizierung genotoxischer Verbindungen**

Gutachter:
Prof. Dr. Gabriele Petersen
PD Dr. Stefan Otto Müller

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Des Weiteren erkläre ich hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich bedanken. Vorangehend danke ich meinen beiden Betreuern Frau Prof. Dr. Gabriele Petersen und Herrn PD Dr. Stefan O. Müller. Einen herzlichen Dank an Frau Dr. Petersen für die externe Betreuung und Begutachtung der Arbeit sowie für das entgegengebrachte Vertrauen. Ein außerordentliches Dankeschön möchte ich Herrn PD Dr. Stefan O. Müller für die kompetente Unterstützung während der gesamten Arbeit zukommen lassen. Danke für das Engagement, die zahlreichen Diskussion und konstruktiven Ratschläge für die praktische und schriftliche Arbeit. Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Philip Hewitt bedanken. Er stand stets für Fragen und Diskussionen zur Verfügung und gab wertvolle Anregungen für die tägliche Arbeit.

Ein besonderes Dankeschön gilt zudem Yasmin Dietz, die während ihrer Diplomarbeit mit viel Geduld das HepG2-Zellkultursystem mit metabolischer Aktivierung etabliert hat. Außerdem trug sie ganz entscheidend zur Optimierung des P53-Testsystems bei und unterstützte mich im Labor tatkräftig bei den P53- und Microarraystudien mit den progenotoxischen Verbindungen. Des Weiteren möchte ich Gregor Tuschl für die zur Verfügung gestellten TLDA-Daten der humanen Hepatozytenkulturen für den Vergleich mit den HepG2-Zellen danken.

Ein weiteres Dankeschön möchte ich an dieser Stelle an Christina S. Schmitt richten. Danke, für die unzähligen Meinungs austausche und die zahlreichen wertvollen Ratschläge während der Datenanalyse und experimentellen Planung. Ferner haben deine technischen Tipps den Laboralltag an vielen Stellen ganz erheblich erleichtert. Abgesehen davon trugen die vielen Aufmunterungen, Gespräche und fachlichen Diskussionen mit Christina, Yasmin und meinen anderen (teils ehemaligen) Kollegen Birthe Lauer, Tobias Fuchs, Germaine Truisi, Alexandra Sposny, Corina Tuschl, Jens Hrach, Gregor Tuschl und Julia Pieh zu einer hervorragenden Arbeitsatmosphäre bei, die diese Zeit für mich unvergesslich macht.

Den anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe möchte ich für die freundliche Aufnahme und die Hilfsbereitschaft danken. Insbesondere möchte ich dabei Margret Kling, für ihre stetige Hilfe bei labortechnischen, methodischen und organisatorischen Fragen herzlich danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit bedanken. Ihr habt mich immer ermutigt, dass zu tun, was ich für richtig hielt. Ein herzliches Dankeschön gilt zudem meinen Großeltern für die moralische Unterstützung während meiner Promotion. Abschließend möchte ich mich noch bei meinem Freund Dirk für die unverzichtbare IT-Unterstützung und ganz besonders für die unendliche Geduld und die fortwährende Motivation in anstrengenden Zeiten bedanken.

Zusammenfassung

Die toxikologische Charakterisierung genotoxischer Verbindungen spielt sowohl in der Arzneimittelentwicklung als auch bei der Risikobewertung von Chemikalien eine bedeutende Rolle. Die *in vitro*-Testsysteme der derzeitigen Standardbatterie, insbesondere die Tests an Säugerzellen, sind hoch sensitiv, besitzen aber eine geringe Spezifität. Die hohe Rate an generierten falsch positiven Resultaten erschwert nicht nur die Interpretation der Ergebnisse, sondern auch die Extrapolation bezüglich der Gefährdung für den Menschen. Diese Schwierigkeiten der derzeitigen Teststrategie für genotoxische Substanzen, aber auch ökonomische und tierschutzbedingte Aspekte, indizieren die Entwicklung neuer spezifischer *in vitro*-Systeme.

Das Ziel dieser Arbeit war es ein neues genomicsbasiertes *in vitro*-Testsystem für die Identifizierung mutagener und promutagener Verbindungen zu entwickeln. Im ersten Teil der Arbeit wurden HepG2-Zellen nach Behandlung mit den mutagenen Testsubstanzen Etoposid (ETO), Actinomycin D (ACT) und Methylmethansulfonat (MMS) über 6 h, 24 h und 48 h mit Illumina *HumanRef-8 BeadChip* Arrays profiliert. Für die Testsubstanzen konnten 66 unidirektional regulierte Gene identifiziert werden, welche in Signalwege, wie P53-abhängige Apoptose, Chromatinumbauprozesse und oxidativen Stress, involviert waren.

Aufgrund der signifikanten P53-vermittelten DNA-Schadensantwort wurde im zweiten Teil der Arbeit die Bestimmung des Tumorsuppressors P53 als putativer Genotoxizitätsmarker evaluiert. P53 spielt als Transkriptionsfaktor eine Schlüsselrolle in der Regulation von Zellüberleben und Zelltod infolge von Stresssignalen, wie zum Beispiel nach einer Schädigung der DNA durch mutagene Verbindungen. Die Quantifizierung von aktiviertem P53 erfolgte im Kernextrakt von HepG2-Zellen nach Behandlung mit den mutagenen Substanzen für 24 h bzw. 48 h mit Hilfe eines ELISA-basierten Transkriptionsfaktorfunktionstests. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Induktion von P53 bei allen untersuchten Mutagenen.

Im nächsten Teil der Arbeit sollte das entwickelte Testsystem auf progenotoxische Substanzen erweitert werden. Die Testung von Promutagenen stellte eine besondere Herausforderung dar, da die benötigte metabolische Aktivierung *in vitro* nachgestellt

werden muss. Deshalb wurden die HepG2-Zellen vor den P53- und Genexpressionsstudien in Bezug auf ihre fremdstoffmetabolisierende Kompetenz charakterisiert. Dabei wurden insgesamt 45 Gene, die funktionell in den xenobiotischen Metabolismus eingebunden sind, untersucht und die Aktivität ausgewählter Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYP), welche für die Metabolisierung von Prokanzerogenen von Bedeutung sind, bestimmt. Die Resultate zeigten, dass die verwendete Zelllinie über eine begrenzte metabolische Kapazität verfügt. Zur Ergänzung des zellulären Metabolismus wurde ein kombiniertes Zellkultursystem mit Rattenleber-S9-Fractionen als System zur metabolischen Aktivierung (MAS) etabliert. Während Cyclophosphamid (CPA) nur in Anwesenheit von S9 einen Anstieg an aktiviertem P53 zeigte, konnte für 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracen (DMBA) und Aflatoxin B₁ (AFB₁) auch ohne MAS eine Induktion von P53 nachgewiesen werden. Um die metabolische Aktivierung dieser beiden Substanzen durch die HepG2-Zellen selbst zu bestätigen, wurden spezifische CYP-Enzyminhibitionstests durchgeführt. Diese Studien ergaben, dass eine Inhibition von zellulärem CYP3A4 oder CYP1A/1B1 zu einer verminderten AFB₁- bzw. DMBA-vermittelten P53-Induktion führt. Dies indiziert, dass HepG2 die Fähigkeit besitzen, diese Substanzen CYP1A/1B1/3A4-abhängig zu metabolisieren.

Nach den P53-Studien wurden globale Genexpressionsprofile mit Illumina *BeadChips* nach Behandlung der HepG2-Zellen mit den ausgewählten progenotoxischen Verbindungen (CPA, AFB₁, DMBA und Diethylnitrosamin (DEN)) angefertigt. Die statistische Analyse zeigte, dass für die progenotoxischen Verbindungen erst nach 48 h signifikante Veränderungen im Genexpressionsprofil detektierbar waren. Sowohl die zeitliche Verschiebung im Vergleich zu den genotoxischen Substanzen, als auch das Deregulationsprofil mit und ohne MAS korrelieren mit den vorangegangenen P53-Experimenten. CPA zeigte erneut ausschließlich in Anwesenheit des MAS signifikante Deregulationen der 88 Gene, welche als gemeinsam reguliert durch alle Testsubstanzen gefunden worden. Dagegen konnte für AFB₁, DMBA und DEN bereits ohne MAS die gleiche Regulationstendenz wie mit MAS festgestellt werden.

Neben der Evaluierung von Gemeinsamkeiten in den Genexpressionssignaturen dieser Verbindungen lag der Hauptschwerpunkt auf der Erstellung eines computerbasierten Klassifikationsmodells, welches auch die mutagenen Verbindungen mit einem direkten Wirkmechanismus (ACT, ETO, MMS) einschließt. Für das Modell wurde ein Trainingsdatensatz aus den (pro-)genotoxischen Substanzen sowie den beiden

Negativkontrollen THEO und MET zusammengestellt. DEN wurde als „unbekannte“ Testsubstanz aus dem Datensatz ausgegliedert. Ein ANOVA-basiertes Ranking in Verbindung mit dem Support-Vektormaschinen (SVM)-Algorithmus mit dem Trainingsdatensatz ergab die beste Klassifikationsrate unter Verwendung der 91 top-rangierten Gene. Eine k -fache Kreuzvalidierung, welche anschließend zur Evaluierung der Prädiktivität des Klassifikationsmodells eingesetzt wurde, zeigte, dass alle als genotoxisch annotierten Substanzen auch korrekt eingeordnet worden. Mit dem erstellten Klassifikationsmodell wurde dann DEN als Testsubstanz untersucht. Das Nitrosamin wurde ohne die Zugabe von S9 als nicht-genotoxisch, in Anwesenheit eines metabolischen Aktivierungssystems hingegen als genotoxisch eingestuft. Insbesondere diese Daten bekräftigen die Verwendung von Genexpressionsmustern für das Screening genotoxischer Substanzen. DEN konnte in P53-Studien auch unter Zugabe von S9 keine signifikante Erhöhung an aktiviertem P53 bewirken, wurde aber anhand der Genexpressionsveränderungen nach metabolischer Aktivierung korrekt als genotoxisch eingestuft.

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass (pro-)mutagene Verbindungen charakteristische Genexpressionsveränderungen in HepG2-Zellen induzieren. Die evaluierten 91 putativen Markergene können für die Identifizierung des genotoxischen Potentials unbekannter Substanzen herangezogen werden. Zudem konnte anhand der P53-Experimente gezeigt werden, dass mit Hilfe der Genexpressionsprofile neue Marker für genotoxische Substanzen entdeckt werden können, die ein schnelleres Screening ermöglichen.

Abstract

Toxicological characterization of genotoxic substances plays an important role during pharmaceutical development and chemical hazard assessment. Despite having a high sensitivity, the genotoxicity tests of the standard *in vitro* battery for compound assessment, especially those using mammalian cells, are characterized by low specificity. This high rate of false positive results complicates any interpretation and extrapolation to human hazard. These difficulties in the current genotoxicity testing strategy, as well as economic and animal welfare aspects, indicate the importance for the development of new *in vitro* tools.

The aim of this study was to develop a new genomics-based test system for the identification of mutagens and promutagens *in vitro*. Gene expression profiles of the mutagenic test compounds etoposide (ETO), actinomycin D (ACT) and methyl methanesulfonate (MMS) were determined in HepG2 cells after 6 h, 24 h and 48 h of treatment using Illumina *HumanRef-8 BeadChip* arrays. Expression analysis revealed 66 unidirectionally regulated genes with functions in P53-dependent apoptotic signaling, chromatin remodeling and oxidative stress pathways.

Significant regulation of P53-mediated DNA damage response genes prompted further evaluation of P53, as a putative marker for genotoxicity. The tumor suppressor protein P53 plays an important role in the transcriptional regulation of genes controlling cell survival and death after various stress signals, such as DNA damage by mutagenic compounds. Activated P53 levels were quantified in nuclear extracts of HepG2 cells using an ELISA-based transcription factor assay. A significant P53 induction was detected after 24 h and 48 h treatment in response to all mutagens tested.

Subsequently, the current project aimed to extend the test system to progenotoxic compounds. Testing promutagens is a challenge because metabolic activation has to be reproduced *in vitro*. Hence, prior to the investigation of promutagenic compounds, HepG2 cells were characterized regarding their metabolic competency. The expression of 45 genes involved in xenobiotic metabolism and the activity of selected Cytochrome-P450 (CYP) enzymes were analyzed. The characterization results indicated that the cell line has a limited metabolic capacity prompting the application of a co-treatment with

rat liver S9, used as a metabolic activation system (MAS) for the promutagen studies. While cyclophosphamide (CPA) showed an elevation of activated P53 in the presence of S9 only, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and aflatoxin B₁ (AFB1) responded in the absence of the MAS. To confirm the HepG2-dependent metabolic activation of DMBA and AFB1, specific CYP inhibition studies were performed. These studies revealed that inhibition of CYP3A4 or CYP1A/1B suppressed the AFB1- and DMBA-mediated P53 response, respectively, indicating that HepG2 cells are capable to metabolize these compounds in a CYP1A/1B/3A4-dependent manner.

Global gene expression profiling was performed in HepG2 cells treated with selected progenotoxic compounds (CPA, AFB1, CPA, DMBA and N-Nitrosodiethylamine (DEN)) using Illumina *BeadChip* arrays. Statistical analysis revealed significant gene expression changes of the progenotoxic compounds after 48 h of treatment exclusively. This time shift as well as the regulation profiles with and without the MAS were well correlated with the P53 data. In accordance with the P53 studies CPA showed a deregulation of the 88 genes with overlapping expression changes for all test compounds in the presence of S9 only. However, AFB1, DMBA and DEN responded also without the MAS as seen in previous P53 assays.

Beside the identification of common gene regulations for the progenotoxic test group, the work was focused on the development of a computer-based classification model, including also compounds which cause DNA-damage via a direct mode of action (ACT, ETO, MMS). For building the model a training data set was built out of the (pro-) genotoxic group and theophylline and metformin as negative controls. DEN was used as an “unknown” test compound and therefore, excluded from the training set. The best classification was achieved using the 91 top-scored genes, which were identified by gene Ranking with an ANOVA for group separation followed by support vector machine (SVM) algorithm for classifier calculation. The predictivity was evaluated by *k*-fold cross validation, showing an appropriate group allocation according to the specified annotation. Thereafter, the classifier built from the training set was then used to predict the toxicity of DEN. DEN was classified as non genotoxic without S9 and genotoxic in the presence of the MAS. In particular, these data support the use of gene expression patterns for screening genotoxicants. This was highlighted by the fact that DEN was not able to induce P53 significantly but was classified correctly as genotoxic after metabolic activation by means of its gene expression signature.

In summary, the results of the thesis demonstrated that (pro-)mutagenic compounds induced characteristic gene expression patterns in HepG2 cells. The 91 putative marker genes found may be used in the future for the identification of the genotoxic potential of unknown compounds. Furthermore, the P53 experiments confirmed the suitability of gene expression profiling for the discovery of novel markers for genotoxic compounds, allowing a more rapid screening of these substances.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	29
1.1	Toxicogenomics- eine neue Methode in der Toxikologie.....	31
1.2	Genotoxische Verbindungen und Krebsentstehung.....	35
1.2.1	Grundlagen zur Genotoxizität und chemischen Kanzerogenese.....	35
1.2.2	Klassifizierung von Kanzerogenen.....	41
1.2.4	Die Rolle des Fremdstoffmetabolismus bei der Krebsentstehung.....	46
1.2.4.1	Die Leber als zentrales Organ des Fremdstoffmetabolismus.....	46
1.2.4.2	Phasen des Fremdstoffmetabolismus.....	48
1.2.4.3	Cytochrom-P450-Monooxygenasen.....	49
1.2.4.4	CYP-abhängige Metabolisierung von Prokanzerogenen.....	51
1.3	Testung auf Genotoxizität und Kanzerogenität und Risikobewertung von Substanzen dieser Klassen.....	58
1.3.1	Standardtestverfahren zur Prüfung auf Mutagenität (Genotoxizität).....	58
1.3.1.1	Regulatorische Aspekte der Arzneimittel- und Chemikalienzulassung.....	58
1.3.1.2	Genmutationstest in Bakterien (Ames-Test).....	60
1.3.1.3	Säugerzellmutationstests <i>in vitro</i>	63
1.3.1.4	Chromosomenaberrationstests <i>in vivo</i>	64
1.3.2	Kanzerogenitätstestung.....	65
1.3.3	Genotoxizitäts- und Kanzerogenitätsdaten der Testsubstanzen.....	66
1.3.4	Risikobewertung von kanzerogenen Substanzen.....	68
1.3.5	Toxicogenomics als neue Methode zur Identifizierung von genotoxischen und kanzerogenen Verbindungen.....	72
1.4	Zielstellung der Arbeit.....	75
2	Material und Methoden.....	77
2.1	Verwendete Materialien.....	79
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	79
2.1.2	Zelllinien.....	82
2.1.3	Gebrauchsmaterialien.....	82
2.2	Geräte.....	83
2.3	Software.....	85
2.4	Zellbiologische Methoden.....	85
2.4.1	HepG2-Zellkultivierung.....	85

2.4.2	Substanzbehandlung.....	87
2.5	Molekularbiologische Methoden.....	90
2.5.1	RNA-Isolierung aus permanenten Zelllinien.....	90
2.5.2	Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren.....	91
2.5.2.1	Konzentrationsbestimmungen mit dem NanoDrop.....	91
2.5.2.2	Qualitätskontrolle mit dem Agilent Bioanalyzer.....	92
2.5.3	Real-time PCR.....	97
2.5.3.1	cDNA-Synthese.....	97
2.5.3.2	TaqMan™ low density arrays (TLDA)s.....	98
2.5.4	Illumina.....	105
2.5.4.1	Illumina-Technologie.....	105
2.5.4.2	cRNA-Synthese.....	106
2.5.4.3	Hybridisierungsprozess.....	109
2.6	Funktionelle Tests/ Biochemische Methoden.....	110
2.6.1	Cytochrom-P450-Aktivitätsbestimmung.....	110
2.6.1.1	Bestimmung der CYP1A-Aktivität mit dem EROD-Test.....	110
2.6.1.2	Bestimmung der CYP3A4-Aktivität.....	113
2.6.2	Zellviabilitätsbestimmung.....	114
2.6.3	P53-Proteinbestimmung.....	115
2.6.3.1	Gewinnung des Kernextraktes.....	117
2.6.3.2	Durchführung des Trans AM p53 Tests.....	118
2.6.4	Bradford-Proteinbestimmung.....	120
2.7	Datenanalysemethoden.....	121
2.7.1	Allgemeine Einleitung und Herausforderungen der statistischen Datenanalyse für Omics-Daten.....	121
2.7.2	Qualitätskontrolle der Microarrays.....	123
2.7.3	Normalisierung der Microarraydaten.....	124
2.7.4	Globale Datenbetrachtung.....	125
2.7.4.1	Hauptkomponentenanalyse.....	125
2.7.5	Student's T-Test.....	126
2.7.6	ANOVA.....	128
2.7.7	Fehler beim statistischen Testen und Probleme des multiplen Testens.....	129
2.7.8	K-Means.....	131
2.7.9	Maschinelles Lernen (<i>Supervised Learning</i>).....	132
2.7.9.1	Klassifikationsalgorithmen beim maschinellen Lernen.....	132

2.7.9.2	Kreuzvalidierungsmethode	134
2.7.9.3	Ermittlung von Rangordnungen (<i>Ranking</i> -Verfahren)	135
3	Ergebnisse und Diskussion	137
3.1	Untersuchung genotoxischer Verbindungen <i>in vitro</i>	139
3.1.1	Genexpressionsanalysen mit genotoxischen Verbindungen	139
3.1.1.1	Globale Datenbetrachtung	139
3.1.1.2	Putative Markergene für genotoxische Verbindungen.....	141
3.1.2	P53 als Marker für einen induzierten DNA-Schaden	146
3.2	Etablierung eines kombinierten Systems aus HepG2 und einem MAS	151
3.2.1	Charakterisierung der HepG2-Zelllinie bezüglich ihrer metabolischen Kapazität	153
3.2.1.1	Genexpressionsanalysen fremdstoffmetabolisierender Komponenten- basale Expression in HepG2 und humanen Hepatozytenkulturen	153
3.2.1.2	Genexpression fremdstoffmetabolisierender Komponenten nach Induktion .	162
3.2.1.3	CYP1A-Aktivitätsuntersuchungen	169
3.2.1.4	CYP3A4-Aktivitätsuntersuchungen	170
3.2.1.5	Zusammenfassung zur Charakterisierung der metabolischen Kapazität der HepG2-Zellen	172
3.2.2	Zellviabilitätsuntersuchungen mit den progenotoxischen Modellsubstanzen	175
3.2.3	P53-Induktion durch progenotoxische Substanzen.....	178
3.2.4	Einfluss der Inhibition der HepG2-CYP-Aktivität auf die genotoxische Wirkung der Prokanzerogene AFB1 und DMBA	183
3.3	Genexpressionsanalysen mit progenotoxischen Verbindungen.....	188
3.3.1	Globale Datenanalyse	188
3.3.2	Genexpressionsmuster von progenotoxischen Substanzen.....	190
3.4	Vergleichende Analyse genotoxischer und progenotoxischer Verbindungen.....	194
3.4.1	Klassifikationsmodell	194
3.4.2	Klassifizierung von DEN.....	201
3.4.2	Gene des Klassifikationsmodells.....	205
3.4.3	Modulation der unmittelbaren Prozesse infolge des substanzinduzierten DNA-Schadens	208

3.4.4	Selektion weiterer potentieller Markergene mit Hilfe des Klassifikationsmodells.....	212
4	Schlußfolgerung und Ausblick	217
4.1	Evaluierung von putativen Markergenen und Entwicklung neuer Screeningsysteme zur Prüfung auf Genotoxizität	219
4.2	Einsatz globaler Genexpressionsanalysen in der Genotoxizitäts- und Kanzerogenitätstestung.....	222
4.3	Prävalidierung und Weiterentwicklung der neuen Testsysteme	223
4.4	Tierschutzaspekte und Beitrag zur Risikobewertung	226
5	Literaturverzeichnis	229
6	Publikationen.....	261
7	Anhang	265

Abkürzungsverzeichnis¹

Abb.	Abbildung
ABI	Applied Biosystems
Acetyl-CoA	Coenzym A
ACT	Actinomycin D
AFB1	Aflatoxin B ₁
AhR	Arylhydrocarbonrezeptor
ALARA-Prinzip	<i>As Low As Reasonably Achievable</i> -Prinzip
AP	apurinisch/ apyrimidinisch
ATP	Adenosintriphosphat
BaP	Benzo(a)pyren
BER	Basen-Exzisionsreparatur
BH-q-Wert	<i>False Discovery Rate</i> nach Benjamini und Hochberg
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
CA	Chromosomenaberrationstest
CAR	konstitutiver Androstanrezeptor
CAS-Nummer	<i>Chemical Abstract Services</i> -Nummer
CITCO	6-(4-Chlorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazol-5-carbaldehyd O-(3,4-dichlorobenzyl)oxim
C _t	Schwellenwertzyklus (<i>Threshold Cycle</i>)

¹ Gensymbole mit den zugehörigen Gennamen sind jeweils im Text bzw. in den Datentabellen im Anhang und nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt. Abgesehen von den Gennamen sind englische Begriffe und Begriffe zu denen es keine angemessene deutsche Übersetzung gibt oder diese nicht gebräuchlich ist, in der gesamten Arbeit kursiv hervorgehoben. Gensymbole sind entsprechend der HGNC-Richtlinie (Guidelines for Human Gene Nomenclature: www.gene.names.org/guidelines) für humane Gene in Großbuchstaben (z.B. MYC) und der Richtlinie für Ratten- und Mäusegene (Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat: www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene) in Kleinbuchstaben, aber groß beginnend (z.B. Myc) dargestellt. Bei generellen Signalwegbeschreibungen wurden die gebräuchlichen Symbolschreibweisen (z.B. Myc) verwendet.

CYP	Cytochrom-P450-Monooxygenase
DEN	Diethylnitrosamin
DMBA	7,12-Diemthylbenz[a]anthracen
DMN	Dimethylnitrosamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DTT	Dithiothreitol
ECETOC	<i>European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals</i>
ECHA	<i>European Chemicals Agency</i>
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
EEMS	<i>European Environmental Mutagen Society</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
etc.	et cetera (lat.: und so weiter)
ETO	Etoposid
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor
GLP	Gute Laborpraxis
GR	Glukokortikoidrezeptor
GST	Glutathion-S-Transferase
HH	humane Primärhepatozyten
HPRT	Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyltransferase
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC-TST	<i>5th International Congress of Turkish Society of Toxicology</i>

IQ	2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin
ITF	<i>Innovation Task Force</i>
LDA	lineare Diskriminanzanalyse
LNT-Modell	<i>Linear-No-Threshold-Modell</i>
LOWESS	<i>Locally Weighted Polynomial Regression</i>
LXR	Leber-X-Rezeptor
3-MC	3-Methylocholanthren
MLA	Maus-Lymphoma-Test (<i>Mouse Lymphoma Assay</i>)
MMS	Methylmethansulfonat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NATB	N-Nitrosoanatabin
α -NF	α -Naphthoflavon
β -NF	β -Naphthoflavon
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i>
NOEL	<i>No Observed Effect Level</i>
NNK	4-(Methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
NNAL	4-(Methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol
NNN	N ⁹ -Nitrosornikotin
NRC	<i>National Research Council</i>
nt	Nukleotide
OATP	Organischer Anionentransporter
OCT	Organischer Kationentransporter
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
P53	Protein 53 kD
PAK	Polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff
PB	Phenobarbital
PBREM	<i>Phenobarbital response enhancer modules</i>

PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>Principal Component Analysis</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PhIP	2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridin
PPAR	Peroxisomen-proliferierende Substanzen aktivierten Rezeptoren
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
PXRRE	<i>PXR response element</i>
REACH	Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (<i>Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of chemical substances</i>)
RIF	Rifampicin
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
rpm	Umdrehungen pro Minute
SHE Test	Syrischer Hamsterembryo-Transformationstest
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLDA	Spärliche LDA (<i>Sparse Linear Discriminant Analysis</i>)
SULT	Sulfotransferase
SVM	Supportvektormaschine
Tab.	Tabelle
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethylrhodamin
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin
TCPOBOP	1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen
TFT	Trifluorothymidin
T _H -Zellen	T-Helfer-Zellen
tk	Thymidinkinase
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TSCA	<i>Toxic Substances Control Act</i>

UDP	Uridindiphosphat
UDPGA	Uridindiphosphoglukuronsäure
UGT	UDP-Glukuronosyltransferasen
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VP-16	Etoposid
v/v	Volumenprozent
w/o	ohne
XPRT	Xanthin-Guaninphosphoribosyltransferase
XRE	<i>Xenobiotic response elements</i>

1 Einleitung

1.1 Toxicogenomics- eine neue Methode in der Toxikologie

„Toxikologie ist im Allgemeinen die Lehre von Schadwirkungen chemischer Stoffe auf Lebewesen“ [1]. Diese Schadwirkungen sind gesundheitliche Folgen der Exposition mit chemischen Stoffen und hängen von der Art des Stoffes, der Dosis/ Konzentration, der Einwirkungsart (Kontaktort/ Aufnahmeweg) und der Einwirkungszeit ab. Die Aufgabe der Toxikologie ist es, die Art und das Ausmaß der Schadwirkungen zu erfassen, zugrunde liegende Mechanismen aufzuklären und eine Risikoabschätzung für die Exposition von Mensch und Umwelt durchzuführen. Die Ableitung von Schutz- und Vorsorgemaßnahmen sowie die Erkennung und Behandlung fällt ebenfalls in das toxikologische Aufgabenspektrum. Anwendungsgebiete der Toxikologie sind die Prüfung von neuen Arzneimitteln in der Entwicklung, Festlegung von Maßnahmen zum Arbeitsschutz im Bereich der Gewerbetoxikologie und Aufklärung schädlicher Einflüsse von Umweltchemikalien auf dem Gebiet der Ökotoxikologie. Die klassische Toxikologie bedient sich dazu tierexperimentellen Prüfungen und nutzt auch Beobachtungen am Menschen. Endpunkte solcher Untersuchungen reichen von allgemeinen Veränderungen des (Gesundheits-)zustandes, pathologischen Organveränderungen, chemisch-klinischen Parametern bis hin zur Letalität [1]. Diese Analysen geben Aufschluss über mögliche Krankheitszustände, erlauben eine Ableitung des bestehenden Risikos und geben Aufschluss über den Mechanismus der schädlichen Wirkung. Allerdings werden die komplexen zellulären Wechselwirkungen auf molekularer Ebene damit nicht erfasst. Zudem sind die Tierstudien zeit- und ressourcenintensiv, wodurch die Herausforderungen der heutigen Zeit, wie zum Beispiel die Untersuchung verschiedener Lebensstadien, vielfältiger Gesundheitsauswirkungen, vieler nicht getesteter Chemikalien und chemischer Gemische, nicht (ausreichend) adressiert werden [2]. Begrenzungen solcher klassischen toxikologischen Methoden werden auch häufig für Stoffe mit Besonderheiten im Wirkungsprofil (z.B. nicht-lineare Dosis-Wirkungsbeziehungen, Spezies-abhängige Wirkunterschiede) deutlich [3-5]. Außerdem erhöhen Bedenken der ethischen Vertretbarkeit von Tierversuchen den Druck auf die Entwicklung neuer toxikologischer Untersuchungsmethoden.

Enorme Fortschritte innerhalb der letzten beiden Jahrzehnte im Bereich der molekularen Genetik als Konsequenz des humanen Genomprojektes sowie auf den Gebieten der Computer- und Chiptechnologie und der bioinformatischen Analysesysteme ermöglichten die Entwicklung einer Reihe von neuen Technologien [6]. Es entstand ein neuer

Forschungsansatz, die „Systembiologie“ oder auch „integrative Biologie“, deren Ziel die dynamische Untersuchung des Verhaltens aller Komponenten eines Systems ist und damit dem klassischen reduktionistischen Ansatz, bei dem das System in Einzelkomponenten betrachtet wird, gegenüber steht. Die so genannten „Omics“-Methoden sind eine Vorgehensweise der Systembiologie und basieren auf der Messung globaler Veränderungen in einem zellulären System oder Gewebe auf den Ebenen der Gene (Genomics), Proteine (Proteomics) oder Stoffwechselmetabolite (Metabolomics). Die gewonnenen globalen Messwerte sollen zur Ableitung von molekularen Mechanismen und Entdeckung neuer systemcharakterisierender „Biomarker“ dienen. Die Omics-Methoden sind auch zu einer hoffnungsvollen neuen Subdisziplin der Toxikologie geworden (Abb. 1.1) [6].

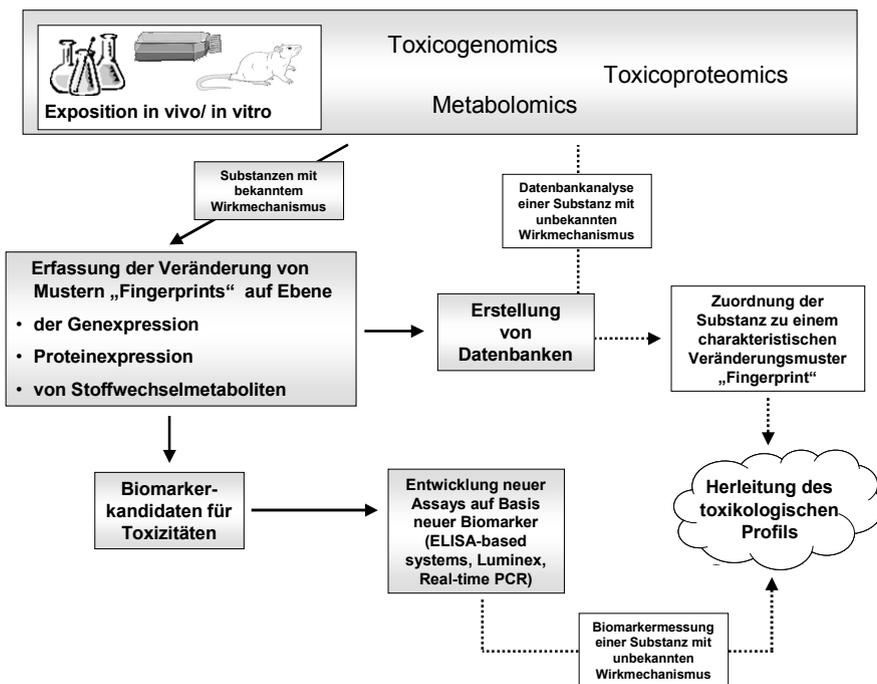


Abbildung 1.1: Übersicht über den Arbeitsablauf zur Integration von Omics-Technologien in die toxikologische Praxis. [Abb. modifiziert nach 7]

Diese neuen Methoden sollen zu einer Verbesserung der Risikoabschätzung von Substanzen beitragen, indem durch mechanistische Erkenntnisse eine verbesserte Spezies-, *in vitro*- zu *in vivo*-Extrapolation oder Erklärung der erhöhten Anfälligkeit bestimmter Subpopulationen, ermöglicht werden kann [6]. Zu den Leitmotiven der modernen Toxizitätstestung gehören möglichst präzise Informationen für die Risikoabschätzung, wobei die Reduktion von Tierversuchen und die Minimierung des Aufwandes an Kosten und Zeit für die Substanztestung sowie die behördliche Prüfung im Vordergrund stehen sollen [6]. Fabre und seine Mitarbeiter zeigten beispielhaft die Nützlichkeit des Einsatzes von Toxicogenomics in der Entwicklung und Selektion sowie in der präklinischen Sicherheitstestung von neuen Medikamentenkandidaten, um den gesamten Prozess der Medikamentenforschung und -entwicklung zu verbessern [8]. Dabei steht als Hauptziel die schnelle, kostenreduzierte Entwicklung von aktiven und möglichst nebenwirkungsfreien Medikamenten im Vordergrund. Toxicogenomics soll dazu dienen, Substanzen mit negativen Eigenschaften früh herauszufiltern und nicht-invasive Marker für die Nutzung in späteren klinischen Studien zu finden [8].

Toxicogenomics kann man als die Untersuchung der Beziehung zwischen der Struktur und der Aktivität des Genoms und adversen biologischen Effekten von exogen zugeführten Fremdstoffen definieren [9]. Das Grundkonzept, welches hinter der Toxicogenomicsanalyse steht, ist das Entdecken der Wirkungsweise/ des Wirkungsmechanismus (Englisch: MoA- *mode of action*) über den eine Substanz einen bestimmten adversen (bzw. toxischen) Effekt hervorruft [6]. Dabei gilt es, die molekularen Ereignisse, den Toxizitätsstoffwechsel- bzw. die Toxizitätssignalwege, welche durch einen exogenen Stressor angesprochen werden, aufzuklären. Neben der Identifizierung solcher charakteristischer molekularer Signalwege, so genannter Schlüsselereignisse, sollen aus Tier- und *in vitro*-Studien neue Biomarker (biologische Marker einer Exposition und genereller toxischer Effekte) und/ oder Bioindikatoren (spezifische biologische Marker eines Krankheitsereignisses, die dem Targetgewebe entstammen und eine direkte Konsequenz des gestörten Toxizitätspaths sind) gewonnen werden. Auf Basis dieser Informationen können neue quantitative *in vitro*-Tests entwickelt und die Daten aus diesen Tests gemeinsam mit traditionellen Daten (Pharmakokinetik, Histopathologie) zur Erstellung prädiktiver quantitativer biologischer Aktivitätsbeziehungen genutzt werden [6].

Das Interesse an Toxicogenomics ist dabei bei Weitem nicht nur industriell geprägt, sondern auch öffentliche Institutionen sehen diese Technologie als zukunftssträchtiges Instrument. 2004 reagierte die *United States Food and Drug Administration* (FDA) auf den rückläufigen Trend in der Medikamententwicklung mit dem *White Paper* [10]. Der negative Trend äußerte sich in steigenden Kosten und erhöhter Dauer für den Entwicklungsprozess von Medikamenten sowie späten Fehlschlägen, oft in klinischen Phasen, aufgrund unzureichender Sicherheit und Effektivität. Mit dem *White Paper* thematisiert die FDA die Ursachen des Problems und fordert zur Integration von neuen Technologien, wie Genomics, in den Entwicklungsprozess auf. Mit einer 2005 veröffentlichten Richtlinie (*FDA's Pharmacogenomics Data Submissions Guidance*) über die Einreichung von Pharmacogenomics-Daten versucht die FDA die Verwendung solcher Daten für die Praxis voranzutreiben [11]. Die Europäische Arzneimittelagentur EMA rief eine Innovationsprojektgruppe die ITF (*Innovation Task Force*) ins Leben, welche die Expertise für den Einsatz und Umgang mit neuen Technologien innerhalb der EMA erweitern soll und als regulatorische Beratung und Informationszentrum zur Verfügung steht [12]. Im Jahr 2007 wurde durch die Veröffentlichung des Reports *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy* durch das *National Research Council* (NRC) einen weiteren Impuls zur Entwicklung und Implementierung neuer toxikologischer Technologien gegeben [2]. Außerdem wurden in den letzten Jahren einige vielversprechende Projekte ins Leben gerufen, welche Toxicogenomics und andere Omics-Technologien auf den Prüfstand stellten und deren Eignung als neue Methoden in den Bereichen der Medizin und Chemikalienbewertung evaluierten. Zu diesen Projekten/Initiativen gehörten unter anderem die *EU Innovative Medicines Initiative* (2008) in Europa, das BMBF-Projekt „Konditionierung und Einsatz hepatischer *in vitro*-Systeme zur Identifizierung von Leber-Karzinogenen mittels Toxicogenomics-Methoden“ (2007) in Deutschland oder das *National Toxicology Program* (2004) als Beispiel für die USA.

Neben dem Einsatz von Toxicogenomics in der Medikamententwicklung, erhofft man sich durch die gewonnenen Daten zum Wirkmechanismus der untersuchten Substanzen einen Nutzen in der Sicherheits- und Risikobewertung von Chemikalien [13-15]. Die Rolle von Toxicogenomics in der Risikobewertung erlangte mit der Erlassung der neuen EU-Chemikalienverordnung REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*/Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung von Chemikalien) am 1. Juni 2007 einen erneuten Bedeutungsaufschwung [16]. Das Ziel von REACH ist die Verbesserung des Schutzes der menschlichen Gesundheit und Umwelt

und soll durch erweiterte Sicherheitsinformationen und eine bessere Charakterisierung von Chemikalien, welche im Maßstab von über 1 Tonne pro Jahr produziert werden, erreicht werden. Schätzungen zu Folge müssen von etwa 100,000 existierenden Substanzen 30,000 bezüglich ihrer Sicherheit getestet und bei der Europäischen Agentur für chemische Stoffe (ECHA) registriert werden [16]. Neben der Anwendung von klassischen tierversuchs-basierten GLP konformen Standardtestmethoden der Toxikologie bietet REACH die Möglichkeit neue innovative Ersatzmethoden zum Tierversuch, wie z.B. Omics-Verfahren *in vitro*, einzusetzen [17]. Der Einsatz solcher Ersatzmethoden spielt eine sehr große Rolle, da der Tierverbrauch für REACH mit Standardtoxizitätstests auf 7,5-45 Millionen Tiere (vorwiegend Nager) geschätzt wird [17]. Eine Reduktion der Menge an Versuchstieren ist aus ethischen Gründen im Sinne des 3R-Prinzips, aber auch vom finanziellen Aspekt betrachtet, anzustreben. Das 3R-Prinzip wurde 1959 von William Russel und Rex Burch begründet [18] und ist zu einem zentralen Leitsatz der modernen Forschung geworden. 3R leitet sich von den englischen Worten *Reduce*, *Refine* und *Replace* ab [18]. Dies besagt, dass wenn Tierversuche nötig sind, dann sollten so wenig Tiere wie möglich (*Reduce*: Reduzieren von Versuchstierzahlen) unter geringster Belastung (*Refine*: Verfeinern der Versuche) eingesetzt werden. Unnötige Tierversuche sollen gänzlich vermieden (*Replace*: Ersetzen von Tierversuchen) werden [18]. Die Anwendung neuer Technologien, wie Toxicogenomics, kann nicht nur im Rahmen der Risikobewertung von Chemikalien, sondern auch in der pharmazeutischen Industrie zu einer verbesserten Umsetzung des 3R-Prinzips beitragen. Eine bessere Selektion von potentiellen Medikamentkandidaten in der Entwicklung ist gemäß des 3R-Prinzips, weil Tiere erst später zum Einsatz kommen, die Kandidaten nicht so negative Eigenschaften haben sollten (Verfeinern der Versuche) und schlechte Kandidaten gar nicht erst getestet werden (Tierzahlreduktion).

1.2 Genotoxische Verbindungen und Krebsentstehung

1.2.1 Grundlagen zur Genotoxizität und chemischen Kanzerogenese

Jedes Jahr sterben weltweit ungefähr 7,9 Millionen Menschen an Krebs, davon 211.500 in Deutschland [19]. Damit ist Krebs die zweithäufigste Todesursache. Eine der häufigsten Krebsarten ist Lungenkrebs, für den im Tabakrauch enthaltene Chemikalien als einer der Hauptrisikofaktoren angesehen werden [19]. Dass Chemikalien einen

entscheidenden Beitrag zur Krebsentstehung leisten können, entdeckte man schon sehr früh anhand der Analysen von epidemiologischen Studien. Paracelsus beschrieb bereits 1567 die so genannte *Wasting Disease* von Bergleuten und mutmaßte einen Zusammenhang zur Exposition mit Erzen, wie z.B. Realgar (Rubinschwefel) [20]. Eine ähnliche Beobachtung machte man auch im Erzgebirge in Sachsen. Die Vielzahl an Lungenkrebsfällen stand im Verdacht durch Arsen verursacht zu sein, wenn man auch später herausfand, dass die radioaktiven Zerfallsprodukte des Radons die Hauptursache darstellen. Der erste experimentelle Beweis, dass Chemikalien Krebs auslösen können, wurde jedoch erst im 20. Jahrhundert erbracht. Der japanische Pathologe Katsusaburo Yamagiwa und sein Assistent Koichi Ichikawa waren die Ersten, die im Jahr 1915 die Entstehung maligner epithelialer Tumoren durch die Applikation von Steinkohlenteer auf die Ohren von Kaninchen hervorrufen konnten und somit den Grundstein für die experimentelle Krebsforschung legten [20].

Genotoxizität lässt sich als eine generelle Bezeichnung für letale, toxische und vererbare Effekte auf karyotisches und extra-karyotisches Material in Keimzellen und somatischen Zellen definieren [21]. Eine genotoxische bzw. mutagene Verbindung muss deshalb nicht automatisch zur Krebsentstehung führen [1]. Die Tumorentwicklung verläuft in einem mehrstufigen Prozess (Stufenmodell der Kanzerogenese) und erst wenn weitere Kontroll- und Reparatursysteme der Zelle versagen, kommt es zur malignen Entartung. Jedoch stellen mutagene Veränderungen in der DNA, welche sich infolge eines irreparablen DNA-Schadens manifestieren können, den initialen Schritt in der Tumorentstehung dar (Abb. 1.2). Zudem sind bösartige Tumoren stets monoklonal, d.h. sie entwickeln sich aus einer einzigen entarteten Zelle. In der nächsten Phase des Stufenmodells der Kanzerogenese, der Promotionsphase, kommt es zur präferentiellen Vermehrung initiiert Zellen, da diese stärker auf bestimmte Substanzen, so genannte Tumorpromotoren, reagieren als normale Zellen. Bei ausreichend hoher Dosierung kann ein Initiator allerdings auch ohne die Wirkung eines Tumorpromotors einen Tumor erzeugen. Man bezeichnet solche Kanzerogene als „komplette Kanzerogene“. In der dritten Phase, der Progressionsphase, kommt es zur Zunahme der Malignität des Tumors. Die Progression beinhaltet ein zunehmend autonomes Wachstum des Tumors, Neubildung von Blutgefäßen und Entwicklung der Metastasierungsfähigkeit [1].

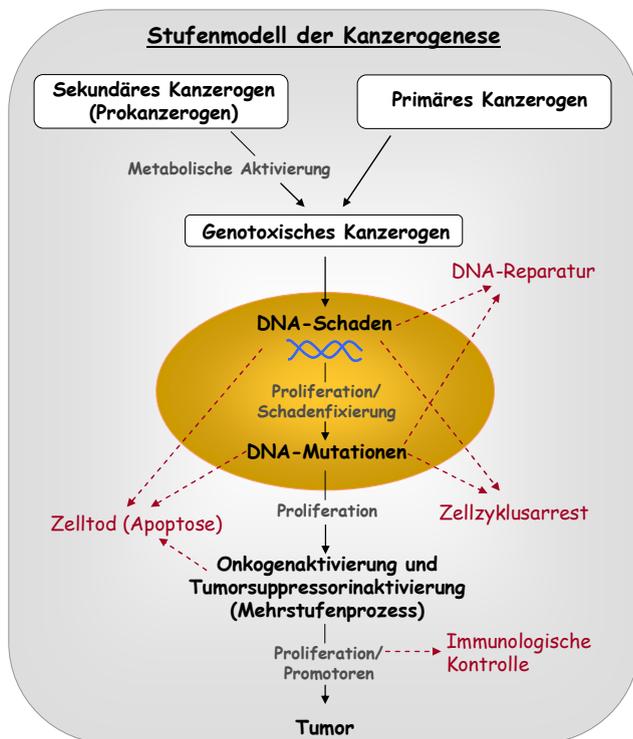


Abbildung 1.2:
Stufenmodell der
chemischen
Kanzerogenese.
[Abb. modifiziert
nach 22]

Der DNA-schädigenden Wirkung liegt häufig eine Alkylierung der DNA-Basen durch elektrophile Strukturen in den genotoxischen Verbindungen zugrunde [23]. Abbildung 1.3 zeigt potentiell reaktive Stellen in den DNA-Basen für den Angriff elektrophiler, aber auch nukleophiler Substanzen. Reaktive Zentren elektrophiler Verbindungen sind die Stickstoff- und Sauerstoffatome in den DNA-Basen oder Hydroxylgruppen des Zucker-Phosphatrückrats [1]. Dabei reagieren analog dem Prinzip der „harten und weichen Säuren und Basen“, harte Elektrophile bevorzugt mit harten Nucleophilen und weiche Elektrophile mit weichen Nucleophilen [1]. Besonders bevorzugt wird die Base Guanin von elektrophilen Spezies angegriffen [24]. Generell hängt die attackierte Position der DNA-Base von der DNA-Sequenz, der Größe und Reaktivität des Reaktionspartners sowie von elektrostatischen und sterischen Faktoren ab. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe reagieren beispielsweise bevorzugt mit dem exozyklischen N² von Guaninbasen, während Mykotoxine, wie Aflatoxin B₁ (AFB₁), bevorzugt die N⁷-Position angreifen. Neben den elektrophilen Angriffen gibt es auch nukleophile Verbindungen, die mit den DNA-Basen reagieren können. Zum

Beispiel greifen aromatische Amine bevorzugt nukleophil die C⁸-Position des Guanin an [24].

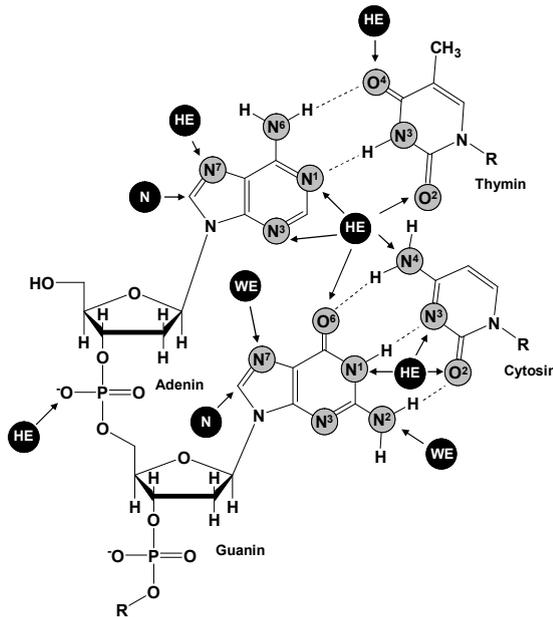


Abbildung 1.3: Angriffspunkte für die Bildung kovalenter Bindungen zwischen Elektrophilen, Nucleophilen und DNA-Basen.

HE = hartes Elektrophil,
WE = Weiches Elektrophil,
N = Nucleophil.

[Abb. modifiziert nach 1, 24]

Die Alkylierung der Phosphatgruppen in der DNA begünstigt die hydrolytische Spaltung der Zucker-Phosphatbindung eines Nucleotids, wodurch es zur Entstehung von DNA-Strangbrüchen kommen kann [1]. Hingegen kann die Alkylierung der DNA-Basen einerseits zu einer Störung der Ausbildung der korrekten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Basen und somit zur Fehlpaarung und zum Einbau fehlerhafter Nucleotide bei der nächsten Replikation führen [24]. Auf diese Weise können so genannte Transversionen entstehen [1]. Andererseits erleichtern Basenalkylierungen die Abspaltung von Basen vom Zucker-Phosphatrückgrat über die Spaltung der N-glykosidischen Bindungen. Diese Stellen, an denen eine Base vom Zucker-Phosphatrückgrat abgespalten wurde, werden AP (apurinische/ apyrimidinische)-Läsionen genannt. Werden die AP-Läsionen unzureichend repariert, kann das zum Einbau fehlerhafter Nucleotide oder ebenfalls zu Strangbrüchen führen. Während Einzelstrangbrüche meistens gut repariert werden können, kommt es bei Doppelstrangbrüchen häufig zu Deletionen und Translokationen und somit zur Entstehung von

Mutationen. Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen ist problematisch, da die Zelle, aufgrund der Schädigung beider Stränge, keine unmodifizierte Vorlage zur Verfügung hat. Doppelstrangbrüche entstehen außerdem häufig bei der Reparatur einer weiteren Art von DNA-Schäden, den Quervernetzungen (*Crosslinks*). Diese werden durch die Reaktion von bifunktionellen Elektrophilen (Lost- oder Cis-Platin-Derivate) gebildet. *Crosslinks* können zwischen Proteinen (z.B. Histonen) und DNA, den beiden DNA-Strängen einer Helix (*interstrand-crosslink*) oder zwei Basen eines Stranges (*intra-strand-crosslink*) entstehen [1].

DNA-Schäden können schließlich zu einer Hemmung der Replikation und Transkription und somit der Zellteilung und Proteinsynthese führen [1]. Allerdings führen nur wenige Mutationen zu solchen schwerwiegenden Beeinträchtigungen, da die Zelle eine Reihe von Schutzmechanismen besitzt. Eine Möglichkeit ist es, den Schaden durch verschiedene Reparaturmöglichkeiten zu reparieren. Die Art der Reparatur hängt von der Art der Schädigung ab [1]. Direkte Reparaturmechanismen sind z.B. Alkylierungen, wie die O⁶-Methylierung am Guanosin, die durch das Enzym O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase repariert wird [25]. Ein weiteres Beispiel ist das Aufspalten von UV-verursachten Pyridindimeren durch das Enzym Photolyase. Häufiger werden falsch eingebaute Basen oder Nukleotide in einer Reihe von enzymatischen Schritten einfach ausgetauscht (Basen-/ Nukleotidexzisionsreparatur). Doppelstrangbrüche können über homologe Rekombinationsprozesse repariert werden, wenn bereits ein Schwesterchromatid des gebrochenen Chromosoms gebildet wurde. Entsteht der Bruch jedoch früher, gibt es nur die Möglichkeit der NHEJ-Reparatur (*Non-homologous end joining*), welche jedoch sehr ineffektiv ist und häufig zu Deletionen führt [25].

Viele Mutationen führen nicht zu Beeinträchtigungen, da nur ein kleiner Bruchteil des Genoms transkriptionell aktiv ist. Problematisch sind jedoch Mutationen in wachstumsregulierenden Genen, den so genannten Onkogenen (wachstumsfördernde Gene) oder Tumorsuppressorgenen (zellteilungskontrollierende Gene) [1]. Beide Typen von Genen nehmen in normalen Zellen wichtige Funktionen in der Regulation von Proliferations-, Differenzierungs- und Zellteilungsprozessen wahr. Außerdem sind diese Gene für die Regulation der Schadensreparatur essentiell, da für die Reparatur der Zellzyklus vorerst gestoppt werden muss, bis der Schaden repariert ist [1]. Eines der bekanntesten Gene der DNA-Schadensreparatur ist das p53-Tumorsuppressorgen [26]. Es codiert für einen Transkriptionsfaktor, welcher eine Vielzahl von protektiven Genen der Zelle kontrolliert, die bei Stresssituationen eine Rolle spielen. Zu diesen Genen gehören nicht nur solche aus der DNA-Schadensreparatur, sondern auch Gene, die Apoptose

induzieren und den Zellzyklus kontrollieren [26]. Im inaktivierten Zustand liegt p53 als Protein ständig in der Zelle vor und wird durch Stressoren, wie Anoxie, ungenügendes Vorhandensein von Nukleotiden für die DNA-Synthese, unpassende oder übermäßige Onkogenaktivierung oder ein DNA-Schaden, aktiviert [27]. Vermutlich erkennen bestimmte Kinasen, wie ATM (Ataxia-telangiectasia mutated), ATR (Ataxia-telangiectasia and Rad3 related) oder JNK (c-Jun N-terminal kinase), die beschädigten Stellen in der DNA und aktivieren so genannte Checkpointkinasen (Chks). Die aktivierte Checkpointkinase 2 (Chk2) oder auch die initial aktivierten Kinasen selbst phosphorylieren anschließend p53. Durch die Phosphorylierungen an den Resten Serin 15, 20, 33 oder Threonin 18 wird P53 stabilisiert und eine weitere Ubiquitinylierung durch die E3-Ubiquitin-Ligase Mdm2 (transformed 3T3 cell double minute 2) verhindert. Neben der Inhibition des proteosomalen Abbaus von p53 durch Phosphorylierung ist auch die Stabilisierung des p53 durch die Inhibition der Mdm2-Expression oder des Mdm2 selbst beschrieben worden. Das stabilisierte p53 wandert anschließend in den Zellkern und aktiviert die Transkription seiner Zielgene [27].

Die p53 Zielgene spielen nach einem DNA-Schaden bzw. an den so genannten Kontrollpunkten im Zellzyklus eine entscheidende Rolle. Zu diesen Kontrollpunkten gehören der G₁/S-, der S-Phasen- und der G₂/M-Kontrollpunkt [28]. An diesen Stellen im Zellzyklus muss sichergestellt werden, dass alle Abläufe vor und während der DNA-Verdopplung korrekt verlaufen sind, bevor die eigentliche Zellteilung (Mitose) eingeleitet wird [29]. Kommt es zu Fehlern, wie z.B. einem DNA-Strangbruch während der Reparatur, ist es die Aufgabe der Kontrollpunktproteine den Zellzyklus anzuhalten oder zu verzögern, die DNA-Reparaturmaschinerie zu aktivieren und nach behobenem Schaden die Zellzyklusprogression einzuleiten. Kann der Schaden nicht behoben werden, muss der programmierte Zelltod eingeleitet werden, um die Entstehung von mutierten/ entarteten Zellen zu verhindern [29].

Kommt es zum funktionellen Ausfall eines Tumorsuppressorgens, wie p53, so hat dies fatale Folgen. Mutationen/ Deletionen im p53-Gen sind die am häufigsten vorgefundenen Veränderungen in humanen Tumoren und wurden z.B. für das erblich bedingte Li-Fraumeni-Syndrom beschrieben [26, 29]. Des Weiteren führen Mutationen in DNA-Reparaturgenen zu Erkrankungen, wie z.B. Xeroderma Pigmentosum [30]. Patienten mit diesem Defekt in der Nucleotid-Exzisions- bzw. Postreplikationsreparatur entwickeln Hauttumoren mit einer besonders hohen Frequenz [30].

Neben der funktionellen Beeinträchtigung von Tumorsuppressoren, hat die Überexpression oder Fehlregulation von Onkogenen schwerwiegende Auswirkungen [28]. Beispiele sind die Überexpression oder verstärkte Aktivität von Wachstumsfaktorrezeptoren, Proteinkinasen oder Transkriptionsfaktoren. Erb-B (Erythroblastic leukemia viral oncogene), ein EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), wurde in ungefähr 30 % der Brusttumoren aufgrund einer Genamplifikation als überexprimiert gefunden. Bcr-Abl (Break point cluster region- Abelson murine leukemia viral oncogene) ist ein chimäres Proteinfusionsprodukt, welches durch eine Translokation zwischen Chromosom 9 und 22 entsteht. Durch die Fusion wird die Tyrosinkinase c-Abl konstitutiv aktiviert, was zur Entstehung der chronischen myeloischen Leukämie führt. Die Ursache liegt vermutlich in der übermäßigen Aktivierung verschiedener Wachstumsfaktoren [28].

Die angeführten Beispiele und Mechanismen zeigen, wie DNA-Veränderungen, welche ursprünglich durch genotoxische Chemikalien hervorgerufen werden, über die unangemessene Expression von Onkogenen oder funktionelle Beeinträchtigung von Tumorsuppressorgenen zu einer Störung der normalen Balance von Zellteilung und Zelltod und letztendlich zur Entwicklung von Krebs führen können.

1.2.2 Klassifizierung von Kanzerogenen

Chemische Kanzerogene können aufgrund ihrer Wirkungen in die beiden Gruppen der genotoxischen Kanzerogene und epigenetischen, nicht-genotoxischen Substanzen unterteilt werden [22, 23]. Genotoxische Kanzerogene führen zu Veränderungen an der DNA, indem sie kovalente Bindungen mit der DNA eingehen oder reaktive Stoffwechselintermediate der Verbindung erbgutschädigend wirken. Bei den Verbindungen, welche erst nach metabolischer Aktivierung genotoxisch wirken spricht man auch von indirekt-wirkenden genotoxischen Verbindungen oder Prokanzerogenen. Beispiele für Prokanzerogene sind aromatische Amine, Nitrosamide, Nitrosamine, Mykotoxine, halogenierte Kohlenwasserstoffe und Nitroverbindungen [22, 23]. Der Mechanismus der Aktivierung dieser Substanzen ist im Abschnitt 1.2.4.4 näher erläutert.

Direkte genotoxische Kanzerogene sind meist organisch-synthetische oder natürlich vorkommende Stoffe [31, 32]. Beispiele sind Verbindungen mit alkylierender Wirkung

unter anderem Methansulfonsäureester, Stickstoff- und Schwefelostverbindungen. Methylmethansulfonat (MMS), ein Methansulfonsäureester, alkyliert Guanin in der DNA am N⁷ oder Adenin am N³ über einen S_N2-Mechanismus (Abb.1.4). O⁶-alkylierte Produkte spielen beim MMS nur eine sehr geringe Rolle [31, 32]. Die alkylierten Produkte sind sensitiv gegenüber einer nukleophilen Abspaltung der Base vom Zuckerphosphatrückgrat. MMS bewirkt über diesen Mechanismus die Entstehung von Doppelstrangbrüchen und führt zum Erliegen der Replikationsmaschinerie [32].

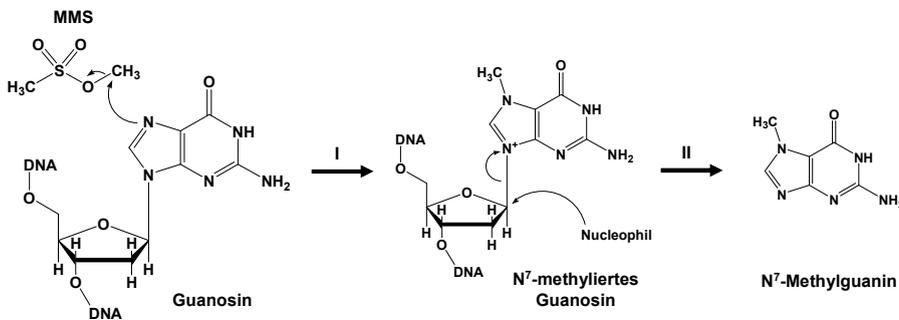


Abbildung 1.4: Mechanismus der DNA-Alkylierung durch Methylmethansulfonat (MMS). MMS alkyliert Guanosin der DNA am N⁷ oder N³ und führt zur Entstehung von Methylguanosin [31, 32]. Die Methylierung des Guanosin begünstigt die Spaltung der N-glykosidischen Bindung durch ein nukleophiles Reagenz und kann somit zu AP-Läsionen führen [32].

Andere Mechanismen von direkten genotoxischen Verbindungen sind Beeinträchtigung der DNA-Replikation und Transkription durch interkalierende Eigenschaften oder Hemmung von Enzymen, die essentiell für diese Prozesse sind. Actinomycin D (ACT), ein Peptid-Antibiotikum und Zytostatikum in der Krebstherapie, das vom grampositiven Bakterium *Streptomyces parvulus* gebildet wird, lagert sich über die Phenoxazin-Einheit im Molekül spezifisch in Guanin-Cytosin-reiche Bereiche der DNA ein (Abb. 1.5) [33]. Somit verhindert ACT das Entwinden und Öffnen der beiden DNA-Stränge und die Anlagerung der RNA-Polymerase für die Transkription [34]. In höheren Dosierungen hemmt ACT auch die DNA-Replikation und inhibiert die Aktivität von Topoisomerasen [35-37].

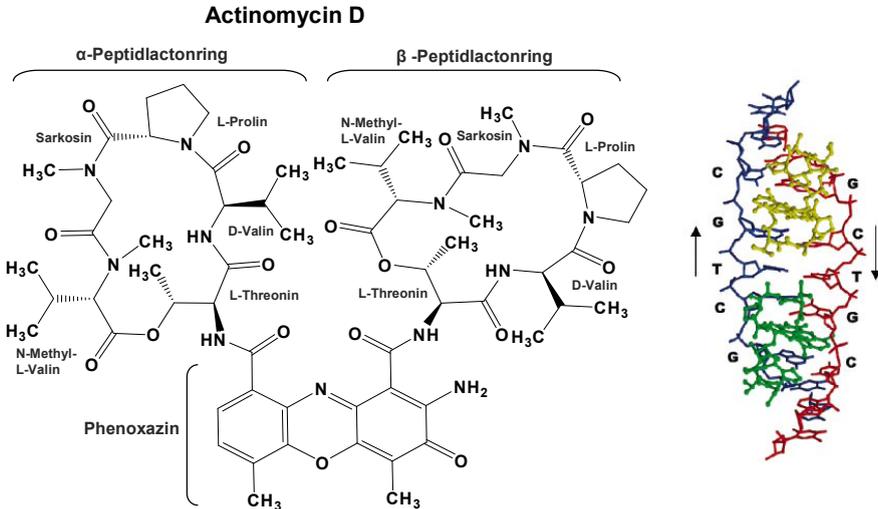


Abbildung 1.5: Struktur des Actinomycin D und Interkalation in GC-reiche Regionen der DNA. Actinomycin D besteht aus zwei Peptidolactonringsystemen, welche über eine Phenoxazineinheit miteinander verbunden sind. Die rechte Abbildung zeigt ein Kugel-Stab-Modell der DNA komplexiert mit zwei Actinomycin D-Molekülen (gelb und grün) mit Blick von der kleinen Furche. Der Phenoxazonring bindet zwischen den beiden GpC-Einheiten, so dass die zyklischen Pentapeptidomänen in der kleinen Furche liegen. [Abb. modifiziert nach 33]

Im Gegensatz zum ACT hemmt Etoposid (ETO), ein Glycosidderivat aus der Wurzel des amerikanischen Maiapfels (*Podophyllum peltatum*), spezifisch die Topoisomerase II und unterdrückt so die Zellteilung (s. Abb. 1.6) [38, 39]. Topoisomerasen sorgen dafür, die Spannung, die bei der Aufwindung der DNA für die Replikation und Transkription entsteht, zu lösen [25]. Typ II-Topoisomerasen führen dazu ATP-abhängig Super-spiralisierungen in die DNA ein. Durch die Hemmung der Topoisomerasen kann es zu Strangbrüchen in der DNA kommen [25]. Die Entstehung von Doppelstrangbrüchen wird als Hauptmechanismus für die ETO-vermittelte Genotoxizität angesehen [40]. ETO wird, wie auch ACT, als Zytostatikum in der Krebstherapie eingesetzt [38].

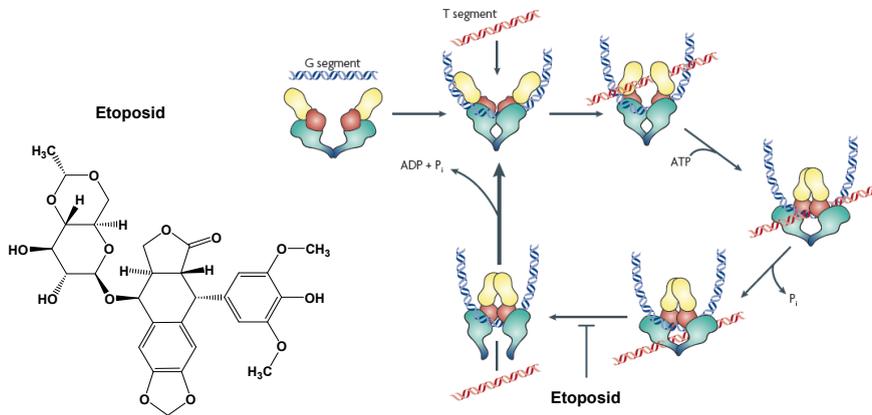


Abbildung 1.6: Struktur und Wirkungsmechanismus von Etoposid (ETO). Das Glycosid-derivat ETO hemmt den katalytischen Zyklus von Typ II-Topoisomerasen nachdem die DNA bereits aufgespalten, aber noch nicht wieder ligiert ist. Dadurch generiert ETO einen DNA-Schaden und führt zur Beeinträchtigung von Transkription und DNA-Replikation. [Abb. modifiziert nach 41]

Im Gegensatz zu den genotoxischen Kanzerogenen, führen epigenetische/ nicht-genotoxische Kanzerogene indirekt zur neoplastischen Transformation oder fördern die Tumorentwicklung von bereits initiierten Zellen [23]. Der Mechanismus beruht nicht primär auf einer DNA-schädigenden Wirkung, sondern auf der Auslösung von Entzündungen und der Begünstigung proliferationsfördernder Ereignisse [22, 23]. Epigenetische Kanzerogene sind synthetische Pestizide (DDT), Lebensmittelzusatzstoffe, Infektionserreger (Hepatitis B-Virus), Hormone (17 β -Estradiol, Diethylstilbestrol) oder Medikamente [22, 23]. Die genauen Mechanismen der epigenetischen Kanzerogene sind bis heute nicht bekannt. Einerseits kann es durch zytotoxische Substanzwirkung zur Schädigung von Zellen und zu ihrem Untergang kommen. Die nach chronischer Gewebeschädigung in Gang gesetzten regenerativen Wachstumsprozesse erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass DNA-Schäden als Mutationen etabliert werden und begünstigen daraufhin die Entstehung von Karzinomen. Andererseits können Chemikalien durch die Modulation wachstumsregulierender oder apoptotischer Signalwege tumorpromovierend wirken [22]. Auch epigenetische Mechanismen, wie Veränderungen von Chromatinstrukturen, welche zu einer veränderten Expression von

Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen führen kann, scheinen eine entscheidende Rolle in der Tumorentwicklung zu spielen [24].

Eine Beispielsubstanz für eine nicht-genotoxische tumorpromovierende Substanz ist der Tabakinhaltsstoff Nikotin. West und seine Mitarbeiter zeigten, dass Nikotin durch die Bindung an Acetylcholinrezeptoren zur Phosphorylierung und Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) führt [42]. Akt phosphoryliert unter anderem zellzyklusregulatorische Proteine, wie Cyclin D1 sowie proapoptotische Proteine (z.B. Bad) [43]. Zellzyklusprogression und Apoptoseinhibition sind die Folge des Akt-Signaling [43]. Durch die Akt-vermittelte verringerte Sensitivität auf apoptotische Stimuli, werden bereits initiierte Zellen nicht mehr eliminiert und bleiben damit im Gewebe erhalten [42]. Außerdem begünstigt die erhöhte Proliferation die Etablierung von Mutationen in der DNA der betroffenen Zelle und somit deren Transformation zur Tumorzelle [42].

Ein anderer tumorpromovierender Mechanismus wird unter anderem im Zusammenhang mit dem erhöhten Krebsrisiko durch Alkoholkonsum diskutiert. Ethanol selbst ist nicht-genotoxisch und zeigte sich im Tierversuch bei chronischer Verabreichung als nicht-kanzerogen. Allerdings wirkt Ethanol unter bestimmten Bedingungen kokanzerogen und tumorpromovierend [44]. Acetaldehyd, ein Metabolit des Ethanol, kann mit DNA-Basen und Proteinen Addukte bilden, welche zur Produktion von Autoantikörpern durch die Aktivierung einer B-Zell-abhängigen Immunantwort führen können [45]. Immunkomplexe führen anschließend zur Rekrutierung von Makrophagen (z.B. Kupffer-Zellen in der Leber), welche entscheidend am Entzündungsgeschehen beteiligt sind. Durch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies kommt es zur Schädigung des umliegenden Gewebes und Induktion regenerativer Zellproliferation. Reaktive Sauerstoffspezies werden zudem durch den mikrosomalen Metabolismus von Ethanol gebildet [45]. Außerdem induziert Ethanol die CYP2E1 Expression in der Leber und kann somit die Aktivierung genotoxischer Kanzerogene (z.B. Nitrosamine) begünstigen [44]. Ein weiterer nicht-genotoxischer Mechanismus des Ethanols wird in der Beeinträchtigung der Vitamin-A/ Retinolsäuresynthese gesehen. Retinolsäure wird unter anderem über die Alkoholdehydrogenase und Aldehyddehydrogenase aus Retinol synthetisiert. Chronischer Alkoholkonsum führt dadurch zur verringerten Retinolabsorption, zum verstärkten Abbau von Retinol in der Leber und zur Mobilisation von Retinol aus der Leber in andere Organe. Die erhöhte CYP2E1-Aktivität führt zudem zum verstärkten Abbau von Retinolsäure in der Leber. Durch diese Prozesse kommt es zu einer Herunterregulation der Retinolsäurerezeptoren und zur verstärkten Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1, welcher eine Vielzahl von proliferationsfördernden

Genen reguliert. Das führt zur Hyperproliferation und begünstigt so die maligne Transformation. Des Weiteren soll ein durch Hypomethylierung vermittelter Expressionsanstieg in Onkogenen über eine Hemmung der Folsäure-/ Pyridoxalphosphatsynthese durch Ethanol zur tumorpromovierenden Wirkung beitragen [44]. Der komplexe Mechanismus der Kanzerogenität von Ethanol zeigt, dass die Wirkungsweise der Gruppe der nicht-genotoxischen Kanzerogene extrem vielfältig und substanzspezifisch verschieden sein kann.

1.2.4 Die Rolle des Fremdstoffmetabolismus bei der Krebsentstehung

1.2.4.1 Die Leber als zentrales Organ des Fremdstoffmetabolismus

Die Leber ist das zentrale Organ des Stoffwechsels und ist maßgeblich an der Umwandlung und Ausscheidung von Fremdstoffen (Xenobiotika) beteiligt (Abb. 1.7) [46]. Sie kommt über das aus dem Gastrointestinaltrakt abfließende Pfortaderblut als erstes Organ mit resorbierten Fremdstoffen in Kontakt. Außerdem werden Stoffwechselprodukte zum Abbau über die Leberarterie, welche sauerstoffreiches Blut führt, in die Leber transportiert. Die menschliche Leber besteht aus vier Leberlappen, rechter und linker Leberlappen, quadratus und caudatus, welche in weitere Untereinheiten (Lobuli, Läppchen) unterteilt sind. Bei Ratten und Mäusen werden die Leberlappen rechts, links, median und caudatus unterschieden, wobei alle Leberlappen, bis auf den linken noch einmal in zwei weitere Untereinheiten untergliedert werden [46]. Das portalvenöse und arterielle Blut, welches die Fremdstoffe bzw. Stoffwechselprodukte zum Abbau enthält, vereinigt sich in den als Sinusoiden bezeichneten feinen Leberkapillaren, welche die balkenförmig angeordneten Leberparenchymzellen (Hepatozyten) umgeben [22]. Die Kapillarwand der Sinusoide besteht einerseits aus den Endothelzellen, welche durch die gefensterterte Anordnung den Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten ermöglichen und andererseits aus den Kupffer'schen Sternzellen, Pittzellen und Itozellen. Die Kupffer- und Pittzellen sind bei der Immunabwehr von Bedeutung, wogegen die Itozellen Vitamin A und Fette speichern und an der Synthese der extrazellulären Matrix beteiligt sind [22].

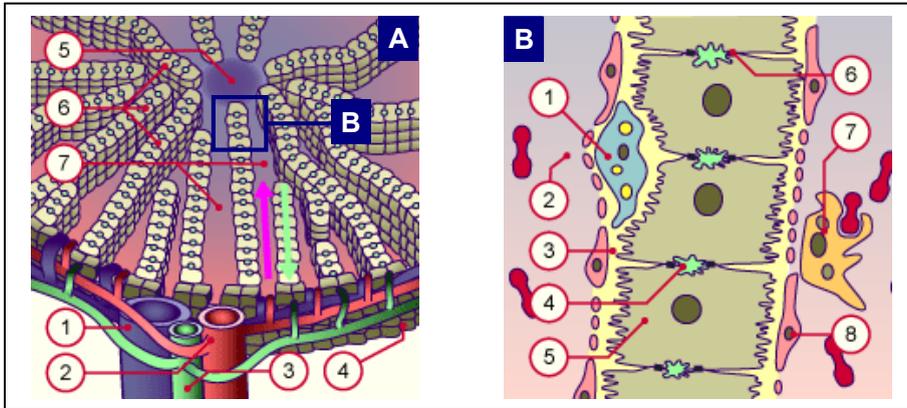


Abbildung 1.7: Feinbau der Leber. **A** Querschnitt durch ein Leberläppchen. Das Blut fließt von der Peripherie über die Sinusoide in die Zentralvene (Pfeil violett), während die Galle in umgekehrter Richtung fließt (Pfeil grün). Legende: 1 Äste der Vena portae, 2 Äste der Arteria hepatica, 3 Gallengang, 4 Grenzplatte, 5 Zentralvene, 6 Leberbalken, 7 Sinusoide. **B** Vergrößerter Ausschnitt eines Leberbalkenabschnittes mit umgebenden Sinusoiden. Legende: 1 Itozellen mit Fettvakuolen, 2 sinusoidaler Raum, 3 Disse'scher Raum, 4 Gallenkanälchen, 5 Hepatozyt, 6 Tight Junction, 7 Kupffer-Zellen, 8 Endothel [47].

Die parenchymalen Leberzellen (Hepatozyten) stellen mit 60 % den größten Anteil der hepatischen Zellen dar [46]. Das Leberparenchym ist bezüglich der enzymatischen Aktivitäten und Sauerstoffsättigung jedoch nicht einheitlich strukturiert. Die periportalen (gefäßnahen) Hepatozyten sind sauerstoffgesättigt und weisen hohe Aktivitäten an Glucose-6-Phosphatase, der an der Zellatmung beteiligten Enzyme Cytochromoxidase und Succinatdehydrogenase sowie von Enzymen des Harnstoffzyklus (z.B. Carbamoylphosphat-Synthetase) auf. Bevorzugte Stoffwechselwege sind außerdem die Glykogensynthese und -speicherung sowie die Aufnahme von Gallensäuren. Im Gegensatz dazu finden sich in der sauerstoffärmeren zentrilobulären Zone hohe Enzymaktivitäten glykolytischer Enzyme (z.B. Lactatdehydrogenase), Glutaminsynthetase und von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus [46].

Die Hepatozyten selbst besitzen eine polygonale Form und sind polarisiert [48]. Die basolaterale Seite wird durch die Lympflüssigkeit des Disse'schen Raums umgeben und zeichnet sich durch eine Mikrovilli-Oberfläche aus. Diese Oberfläche ist spezialisiert zur Aufnahme von Stoffen aus dem sinusoidalen Raum und enthält eine Vielzahl an Transportern. OATP (Organischer Anionentransporter) spielt zum Beispiel bei der Aufnahme von Xenobiotika in die Hepatozyten eine Rolle. Hingegen wird die

basolaterale Aufnahme von Gallensalzen über NTCP (Natrium-Taurocholat-Cotransporter) realisiert [48]. Die kanalikuläre Membran grenzt dagegen an den Gallengang und an benachbarte Hepatozyten [49]. Zur Exkretion von Substanzen in den Gallengang enthält die kanalikuläre Membran ebenfalls spezifische Transportsysteme für Gallensalze, Lipide (MDR2: Multidrug resistance 2 P-glycoprotein), organische Kationen (MDR3: Multidrug resistance 3 P-glycoprotein) und organische Anionentransporter (cMOAT: Multispecific organic anion transporter) [49].

1.2.4.2 Phasen des Fremdstoffmetabolismus

Die Metabolisierung von Fremdstoffen kann grundlegend in drei Phasen unterteilt werden [1]. Alle drei Phasen des Fremdstoffmetabolismus haben dabei einen entscheidenden Einfluss auf die Toxizität von Substanzen, da sie sowohl zur Toxifizierung als auch Detoxifizierung führen können [50-52]. In der Phase I, der so genannten Funktionalisierung, werden lipophile Stoffe in Oxidations-, Reduktions- oder Hydrolysereaktionen in polare Verbindungen umgewandelt bzw. polare Gruppen freigelegt [1]. Diese Reaktionen werden von Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen, Flavin-abhängigen Monooxygenasen, Monoaminoxidasen, Cyclooxygenasen, Dihydrodioldehydrogenasen, DT-Diaphorase, Epoxidhydrolasen, Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen katalysiert. Die polaren Produkte werden in der Phase II des Fremdstoffmetabolismus von Glutathion-, UDP-Glukuronosyl-, Sulfo-, Acetyl- und Methyltransferasen mit polaren endogenen Molekülen konjugiert, um eine ausreichende Hydrophilität für die Ausscheidung der Substanzen zu erreichen. Konjugationspartner sind unter anderem Glutathion, Sulfate, Glukuronide und Acetate. In der dritten Phase werden die Substanzen aktiv aus der Zelle transportiert und anschließend über das renale oder biliäre System ausgeschieden. Der Transport aus den Hepatozyten erfolgt über Membrantransportproteine, welche aus den Klassen der Anionen-, Kationen oder ABC-Transporter stammen. Zu den bekanntesten Transportern gehören der organische Anionentransporter OATC und die ABC-Transporter MDR (Multiple Drug Resistance Protein) oder MRP (Multidrug Resistance-Related Protein). Die zuletzt genannten beiden Transportproteine wurden aufgrund von Zytostatikaresistenzen von Tumorzellen identifiziert. Beide besitzen sechs Transmembranhelices und transportieren ihre

Substrate unter Verbrauch von ATP. MDR und MRP werden nicht nur in der Leber, sondern auch in Darm-, Leber- und Nierengewebe exprimiert [1].

1.2.4.3 Cytochrom-P450-Monooxygenasen

Die zentralen Enzyme des Phase I-Metabolismus sind Cytochrom-P450 (CYP)-Enzyme. Diese sind mischfunktionelle Oxygenasen, welche hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum von Leberzellen und in Darmgewebe aber auch in anderen Organen, wie Lunge, Niere, Hodengewebe, Gehirn etc., exprimiert werden [53]. Die durch diese Enzymfamilie katalysierten Hydroxylierungsreaktionen spielen nicht nur im normalen Stoffwechselgeschehen z.B. bei der Synthese von Steroidhormonen und Gallensäuren, sondern auch bei der Entgiftung von Xenobiotika (Phase I-Metabolismus) eine große Rolle [54]. Das Einführen von Hydroxylgruppen führt zu einer Erhöhung der Wasserlöslichkeit von Verbindungen und erleichtert somit ihre Ausscheidung [54]. Neben den klassischen Hydroxylierungsreaktionen katalysieren CYP-Enzyme aber auch Dealkylierungsreaktionen, oxidative Spaltung von C-C-Bindungen, Hydroxylierungsreaktionen an Aromaten, Epoxidierungsreaktionen, Dehydrogenierungs- und Deaminierungsreaktionen [55].

Die CYP-Enzyme kommen ubiquitär vor und haben sich in der Evolution aus einem gemeinsamen Vorläufergen entwickelt [1]. Deshalb kann die Einteilung anhand der Sequenzhomologie dieser Enzyme in Genfamilien (Homologie > 40 %) und Subfamilien (Homologie > 55 %) erfolgen [1]. 57 CYP-Enzyme sind für den Menschen bisher bekannt. Für den Xenobiotika-Metabolismus spielen vor allem die Familien 1, 2 und 3 eine Rolle [53, 55]. Entdeckt wurden die CYP-Enzyme erstmals in Mikrosomenproben von Säugern, aufgrund ihrer Fähigkeit mit Kohlenstoffmonoxid Komplexe zu bilden, die zu einer Verschiebung der Hauptabsorptionsbande (Soretbande) zu 450 nm führen [55]. Diese Beobachtung führte zur Namensgebung der Enzyme, wobei das „P“ für Pigment und die 450 für die Absorption bei 450 nm steht [55]. Die charakteristische Funktionsweise begründet sich in der Struktur des aktiven Zentrums dieser Proteine. Das aktive Zentrum wird durch ein Eisen (III)-Ion, welches an den vier äquatorialen Positionen durch ein Protoporphyrin IX (Häm b) komplexiert ist, gebildet. Die axiale Position des Eisen (III)-Ions verbindet die Häm-Einheit mit dem Proteinrückgrat über einen Cysteinrest, während die zweite axiale Position im nicht-aktiven Zustand mit

einem leicht austauschbaren Wassermolekül besetzt ist [55]. Nach der Bindung eines lipophilen Substratmoleküls an das aktive Zentrum des Enzyms erfolgt die Hydroxylierung des Substrates in einer komplexen Reaktionsfolge, die als katalytischer Zyklus der CYP-Enzyme bezeichnet wird (Abb. 1.8) [54].

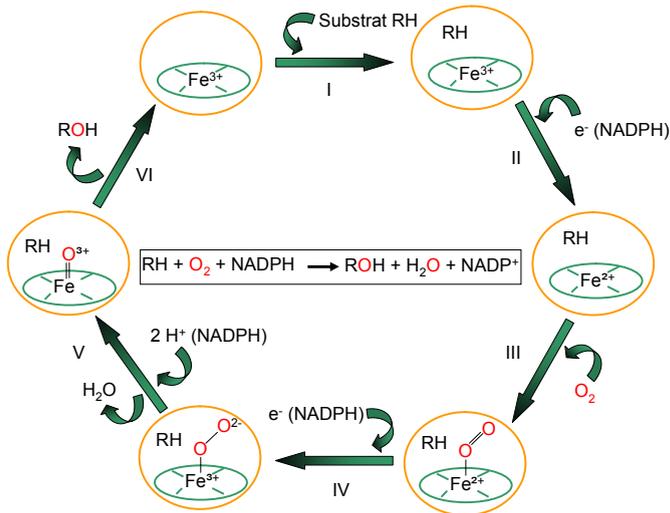


Abbildung 1.8: Cytochrom-P450 Mechanismus. (I) Bindung des Substrats im aktiven Zentrum des Enzyms (orange). Anschließend wird das Eisen der Hämgruppe im Enzym durch Übertragung eines Elektrons, welches vom NADPH stammt, von der Ferri- (Fe^{3+}) zur Ferroform (Fe^{2+}) reduziert (II). Nach der Bindung von molekularem Sauerstoff an die Hämgruppe (III) folgt die Aufnahme eines zweiten Elektrons (IV) und daraufhin die Spaltung der O-O-Bindung unter Freisetzung von Wasser (V). (VI) Das verbleibende Sauerstoffatom bildet ein hochreaktives $\text{Fe}=\text{O}$, welches zur Abspaltung eines Wasserstoffatoms aus dem Substrat führt. Das entstandene instabile Substratradikal übernimmt dann die Eisen-gebundene OH-Gruppe. Das Eisenatom liegt nach dieser Reaktion wieder in der Ferriform vor. [Abb. modifiziert nach 54]

Die Expression der CYP-Enzyme erfolgt entweder konstitutiv oder kann durch bestimmte Substanzen (z.B. Arzneistoffe oder Verbindungen in Nahrungs- und Genussmitteln) induziert oder gehemmt werden [1]. Zu den induzierbaren humanen CYP-Enzymen gehören CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 und CYP3A4 [53]. Dagegen ist beispielsweise CYP2D6 nicht induzierbar. Die Induzierbarkeit der CYP-Enzyme beruht auf der transkriptionellen Aktivierung, welche zu einem Anstieg der mRNA-Konzentration und schließlich im CYP-Protein führt. Die transkriptionelle Regulation geschieht hauptsächlich über nukleäre Rezeptoren z.B.

Pregnan-X-Rezeptor, konstitutiver Androstanrezeptor, Glucocorticoidrezeptor und Vitamin-D-Rezeptor für die Induktion von CYP3A und CYP2B Isoformen oder der Arylhydrocarbon-Rezeptor für CYP1A Isoformen. Häufig verwendete CYP-Induktoren sind Dexamethason, Phenobarbital (PB), β -Naphthoflavon (β -NF), Isoniazid, 3-Methylchonthren (3-MC), oder Rifampicin (RIF). Ein anderer Mechanismus der Induktion wurde für CYP2E1 gefunden. Dieses wird durch Protein stabilisierung und nicht auf transkriptioneller Ebene reguliert [53].

Die Induktion der CYP-Enzyme durch exogene Substanzen auf Basis der Transkription und Proteinsynthese ist in der Regel ein relativ langer Prozess, welcher Tage dauern kann [53]. Hingegen erfolgt die Inhibition meist sofort oder innerhalb weniger Stunden. Inhibitoren, wie z.B. Ketokonazol (KETO) für CYP3A4, sind meist selbst Substrate für die CYP-Enzyme, die sie blockieren. Allerdings beeinflussen nicht nur Induktions- und Inhibitionsprozesse den Metabolismus von Xenobiotika. CYP Genpolymorphismen innerhalb einer Spezies, sowie vorangehend schon diskutierte Speziesunterschiede in den CYP-Gensequenzen spielen eine entscheidende Rolle bei der Umsetzung von Fremdstoffen. Polymorphismen können einen Verlust der Aktivierbarkeit oder die Synthese nicht-aktiver CYP-Proteine verursachen. Beim Menschen sind einige Polymorphismen bekannt, welche in einer unterschiedlichen Toxizität oder Wirksamkeit von Arzneistoffen resultieren [53].

1.2.4.4 CYP-abhängige Metabolisierung von Prokanzerogenen

Aufgrund ihrer Funktionsweise sind CYP-Enzyme Schlüsselenzyme in der Krebsentstehung und Krebs therapie. Diese Enzyme vermitteln die metabolische Aktivierung einer Vielzahl von Prokanzerogenen und sind in die Aktivierung und Inaktivierung vieler Krebsmedikamente involviert [56]. Die entstehenden Zwischenprodukte der CYP-Reaktionen sind auch Substrate für Phase II-Enzyme, welche diese in inaktive, polare, leicht ausscheidbare Stoffe umsetzen sollen. Die bedeutendsten CYP-Enzyme für die Metabolisierung von Prokanzerogenen sind CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2E1 und CYP3A4/ 5/ 7. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über diese CYP-Enzyme mit Beispielen für Prokanzerogene, welche durch diese Enzyme aktiviert werden [56].

Tabelle 1.1: CYP-abhängiger Metabolismus verschiedener Prokanzerogene

Legende: Aflatoxin B₁ (AFB1), Benzo[a]pyren (BaP), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridin (PhIP), Diethylnitrosamin (DEN), Diethylnitrosamin (DMN), 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin (IQ), 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA), 4-(Methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK), 4-(Methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL), N9-Nitrososnormikotin (NNN), N-Nitrosoanatabin (NATB). [Tabelle modifiziert nach 56]

Enzym	Aktivierete Prokanzerogene
CYP1A1	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe z.B. BaP, Dimethylbenz[a]anthracen, PhIP
CYP1A2	Aryl- und Heterozyklische Amine z.B. DMN, DEN, 4-Aminobiphenyl, 2-Acetyl-aminofluoren, PhIP, IQ, AFB1
CYP1B1	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe z.B. BaP, Dimethylbenz[a]anthracen, Benz[a]anthracen, DMBA, 3-Methylcholanthren, Estradiol
CYP2A6	Aktivierung von N-Nitrosaminen aus Tabak z.B. NNK, NNAL, NNN, NATB, DEN und AFB1, 1,3-Butadien, 2,6-Dichlorbenzonitril
CYP2B6	AFB1 und NNK
CYP2E1	Niedrig molekulare toxische Stoffe und vermutete krebserregende Substanzen z.B. Benzen, Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform, Styren, Vinylchlorid, Vinylbromid, DMN, NNK
CYP3A4/ 5/ 7	Diverse Kanzerogene z.B. AFB1, Aflatoxin G ₁ , BaP, Naphtalen, NNN, 1-Nitropyren, 6-Aminochrysen, Estradiol, Senecionin, Sterigmatocystin

In Abhängigkeit von der Struktur der Prokanzerogene unterscheidet sich die Aktivierung zum ultimalen genotoxischen Metaboliten. Eine der bekanntesten Klassen von progenotoxischen Verbindungen sind die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAKs) [1]. PAKs entstehen hauptsächlich durch die unvollständige Verbrennung von organischen Materialien und bei der Pyrolyse von Kohlenhydraten, Amino- und Fettsäuren. Des Weiteren sind PAKs im Zigarettenrauch und in geräucherten Lebensmitteln zu finden. Das krebserzeugende Potential dieser Verbindungen ist seit über einem Jahrhundert bekannt und beruht auf der Interaktion von gebildeten Metaboliten mit der DNA [1]. Dabei sind nur solche Substanzen krebserregend, die aufgrund eines gewinkelten (angulären) Benzolrings eine Einbuchtung („Bay-Region“) im Molekül besitzen [57]. Die Bay-Region erschwert sterisch die Entgiftung der Phase I-Metaboliten durch Phase II-Enzyme [57]. Eine höhere DNA-Reaktivität im Vergleich zu den Phenanthren-artigen Verbindungen weisen jedoch PAKs mit einem Benzo[c]phenanthren-Strukturelement („Fjord-Region“) auf [58].

Vertreter der PAKs sind unter anderem Naphtalin, Phenanthren, Benzo[a]pyren und 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA).

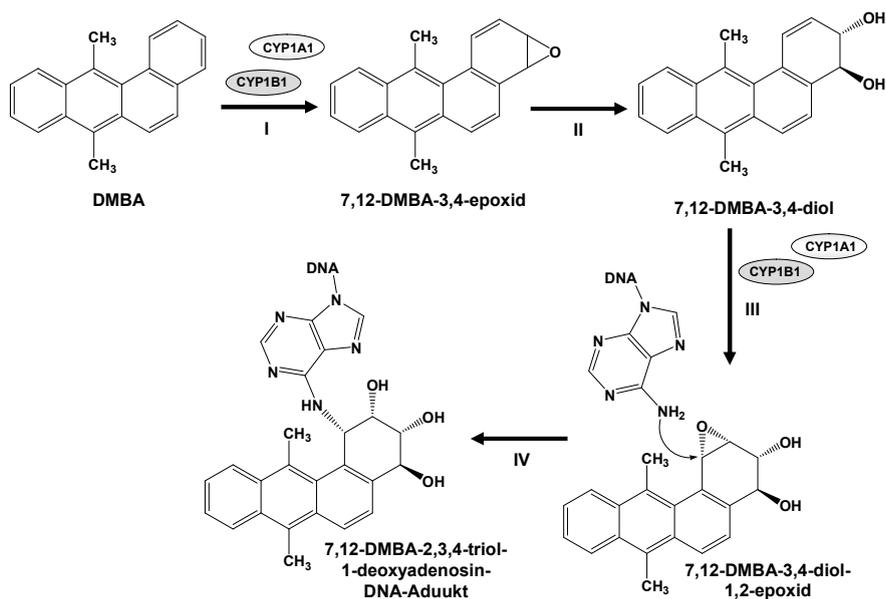


Abbildung 1.9: Cytochrom-P450-abhängige Metabolisierung von 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA). [Abb. modifiziert nach 59]

Im Gegensatz zu anderen PAKs, wie Benzo[a]pyren, kommt DMBA nicht in der Natur vor [60]. DMBA wird vom Boden und Sediment stark absorbiert und freigesetztes DMBA wird durch Photolyse- und Photooxidationsprozesse abgebaut [60]. Die Metabolisierung von DMBA (Abb. 1.9) erfolgt, wie die anderer PAKs, durch enzymatische Hydroxylierung durch die Enzyme CYP1A1 oder CYP1B1 (Abb. 1.9/I), wobei letzteres das Hauptenzym für die Bildung des endgültigen kanzerogenen Metaboliten darstellt [61]. Das gebildete 7,12-DMBA-1,2-Epoxid ist ein DNA-reaktives Zwischenprodukt, welches normalerweise von der Epoxidhydrolase zum 3,4-DMBA-diol umgesetzt wird (Abb. 1.9/II) [59]. DMBA besitzt allerdings noch eine gut zugängliche Doppelbindung, welche als Angriffspunkt für eine zweite CYP-abhängige Hydroxylierungsreaktion dient (Abb. 1.9/III). Das entstandene 7,12-DMBA-1,2-diol-

3,4-epoxid ist das ultimale Kanzerogen und kann mit Desoxyadenosin und Desoxyguanosin in der DNA Addukte bilden (Abb. 1.9/ IV) [59].

Neben PAKs werden auch Naturstoffe, wie AFB₁, zu einem DNA-reaktiven Epoxid metabolisch aktiviert [1]. AFB₁ ist ein Toxin, produziert vom Schimmelpilz *Aspergillus flavus*. Aflatoxin-bildende Schimmelpilze können bei feuchtwarmer Lagerung auf verschiedenen Lebensmitteln, vor allem Nüssen, Getreide und Mohn entstehen [1]. Eines der Hauptzielorgane des potenten Kanzerogens AFB₁ ist die Leber [62]. AFB₁ induziert in der Leber zelltyp-spezifische Tumoren ausgehend von parenchymalen und Gallengangepithelzellen [62]. Allerdings existieren starke Speziesunterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber AFB₁-vermittelten Bildung von Lebertumoren [1]. Während Ratten sehr sensitiv sind, haben Mäuse ein bestimmtes Glutathion-S-Transferase-Isoenzym, welches den aktiven Metaboliten, das AFB₁-Epoxid, effektiv entgiftet [1]. Allerdings sind Ratten in diesem Fall eher für den Menschen prädiktiv, da beide Spezies im Gegensatz zur Maus schlechte Konjugatoren sind [62]. Das AFB₁-8,9-Epoxid, entsteht durch Epoxidierung des Hydroxylierungsproduktes der Enzyme CYP1A2 und CYP3A4 (Abb. 1.10/I). Das hochreaktive AFB₁-Epoxid führt zur Alkylierung der DNA am N⁷ von Guaninbasen (Abb. 1.10/ II). Durch spontane Hydrolyse kann das AFB₁-Guanin-Addukt leicht vom Zuckerphosphatrückgrat abgespalten werden (Abb. 1.10/ III) und zu AP-Läsionen führen. Die Folgen sind G→T-Transversionen und C→T-Transitionen. G→T-Transversionen in der dritten Position des Codon 249 (AGG) des p53 Tumorsuppressorgens wurden in der Hälfte aller hepatozellulären Karzinome von Menschen, welche mit AFB₁ exponiert waren, gefunden. C→T-Transitionen wurden bei in hepatozellulären Karzinomen von Ratten im Codon 12 des RAS-Onkogens gefunden [62]. Des Weiteren kommt es durch die AFB₁-DNA-Addukte aufgrund der flachen Struktur des AFB₁ zu einer Verzerrung der DNA-Helix, was eine fehlerhafte oder behinderte Replikation nach sich zieht [32].

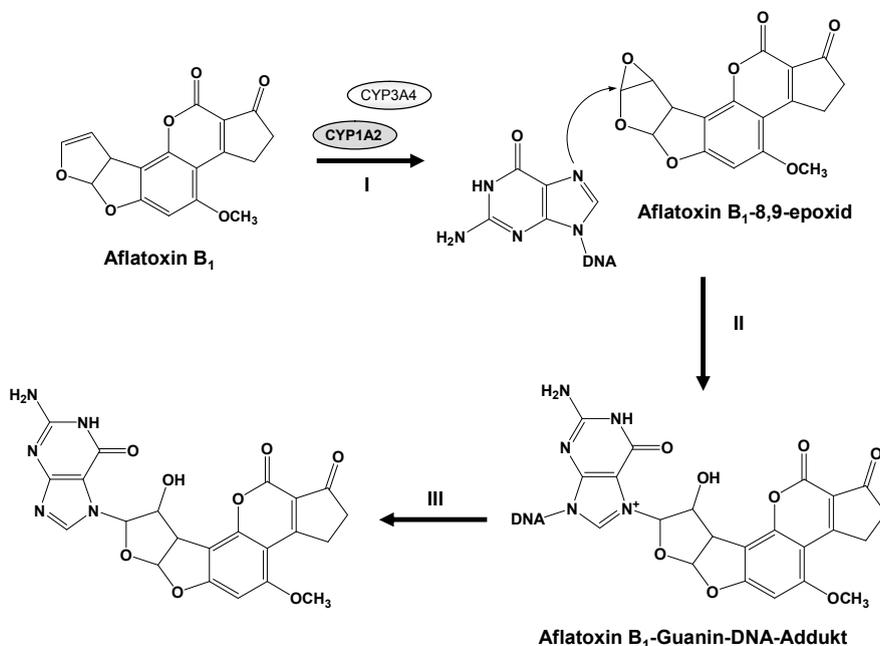


Abbildung 1.10: Metabolische Aktivierung und DNA-Reaktivität des Aflatoxin B₁. [Abb. modifiziert nach 52]

Eine andere Klasse von Prokanzerogenen sind alkylierende Verbindungen, zu welchen die *Lost* (Senfgas)-Verbindungen (Stickstoff- und Schwefellose) gehören [1]. Der Name *Lost* von den Erfindern des Senfgases Lommel und Steinkopf. *Lost*-Verbindungen sind als chemische Kampfstoffe bekannt [1]. Sie werden aber auch in der Krebstherapie als Zytostatika eingesetzt. Beispiele sind Cyclophosphamid (Endoxan[®]) und dessen Derivate (Ifosamid, Melphalan) [63]. Cyclophosphamid (CPA) kann von einer Vielzahl von CYP-Enzymen hydroxyliert werden (Abb. 1.11/ I) [63]. Eines der Hauptenzyme ist wahrscheinlich CYP2B6 [64]. Das entstehende 4-Hydroxy-CPA tautomerisiert anschließend zum Aldophosphamid (Abb. 1.11/ II) und bildet dann durch Abspaltung von Acrolein das Phosphoramidsenfgas (Abb. 1.11/ III) [65]. Das Phosphoramidsenfgas zerfällt spontan oder Phosphoramidase-katalysiert in ein Stickstofflost-Derivat, Ammoniak und ein Hydrogenphosphation (Abb. 1.11/ IV). Das Stickstofflost reagiert in einer intramolekularen S_N1-Reaktion durch Angriff des Stickstoffatoms auf das Chlor-gebundene Kohlenstoffatom zum Aziridiniumion (Abb. 1.11/ V). Im nächsten Schritt (Abb. 1.11/ VI) kommt es zum nukleophilen Angriff auf das stark

gespannte Aziridiniumion durch N⁷ des Guanins der DNA. Das führt zur Bildung von N⁷-alkylierten DNA-CPA-Produkten. Reagiert der zweite Teil des CPA-Moleküls mit einem weiteren Guanin kann es zu Quervernetzungen in der DNA kommen [66].

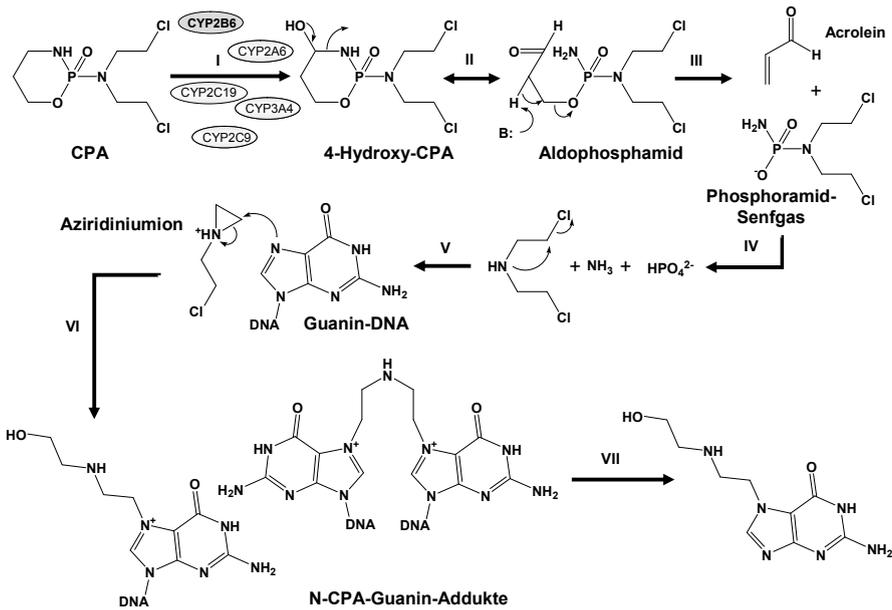


Abbildung 1.11: Metabolische Aktivierung von Cyclophosphamid (CPA) und Mechanismus der DNA-Schädigung durch das Senfgas (Lost)-Zwischenprodukt.

[Abb. modifiziert nach 56, 65]

Neben den PAKs, Naturstoffen und alkylierenden Verbindungen gehören auch die Nitrosamine zu den prokanzerogenen Substanzen [1]. Nitrosamine findet man in vielen Nahrungs- und Genussmitteln (gepökeltes Fleisch, alkoholische Getränke und Tabak). N-Nitrosoverbindungen können zudem im Magen aus sekundären Aminen der Nahrung und Nitrit gebildet werden [1]. Diethylnitrosamin (DEN), ein Vertreter dieser Substanzklasse, wird durch CYP2E1 und CYP2A6 enzymatisch in Alpha-Stellung hydroxyliert (Abb. 1.12/ I) [67-69]. Nach Abspaltung von Acetaldehyd (Abb. 1.12/ II) tautomerisiert das entstandene N-Nitrosoethylamin zum 1-Ethyl-2-hydroxydiazen (Abb. 1.12/ III) [70, 71]. In einem zweistufigen Prozess erfolgt anschließend die Eliminierung von Wasser (Abb. 1.12/ IV) und Stickstoff (Abb. 1.12/ V) unter Bildung eines Carbeniumions. Das Carbeniumion kann DNA-Basen durch elektrophilen Angriff

alkylieren [70, 71]. Abbildung 1.12/ VI zeigt den elektrophilen Angriff des Carbeniumions auf den Sauerstoff im Guanin unter Entstehung eines O⁶-alkylierten Produktes [71]. Neben Guanosin-Addukten wurden auch Thyminaddukte beschrieben. O⁴-Ethylthymidin wird dabei als Hauptaddukt für die Induktion von Lebertumoren angesehen [72].

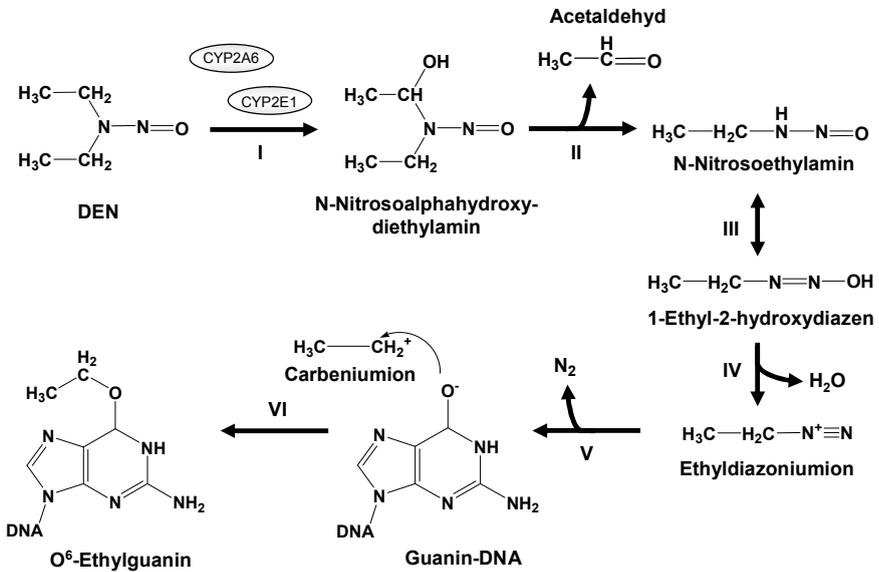


Abbildung 1.12: Metabolische Aktivierung des Prokanzerogens Diethylnitrosamin (DEN) und DNA-Reaktivität des gebildeten Carbeniumions. [Abb. modifiziert nach 70, 71]

1.3 Testung auf Genotoxizität und Kanzerogenität und Risikobewertung von Substanzen dieser Klassen

1.3.1 Standardtestverfahren zur Prüfung auf Mutagenität (Genotoxizität)

1.3.1.1 Regulatorische Aspekte der Arzneimittel- und Chemikalienzulassung

Aufgrund der hohen Inzidenz von Krebserkrankungen, der schlechten Heilbarkeit und des bösartigen Krankheitsverlaufes, haben krebserzeugende Substanzen einen besonderen Stellenwert bei der Bestimmung toxischer Wirkungen von Chemikalien und ihrer toxikologischen Bewertung [1]. Die Identifizierung, Klassifizierung und Risikobewertung von Kanzerogenen spielt deshalb für die Arzneimittelentwicklung, als auch für die Zulassung von Chemikalien eine bedeutende Rolle. Bei der Testung wird zwischen Mutagenitäts-(Genotoxizitäts-) und Kanzerogenitätstests unterschieden. Die Genotoxizitätstestung für die Zulassung von Arzneimitteln wird durch die EMA-Richtlinien ICHS2A/ B von 1998 reguliert. Im Jahr 2008 wurde allerdings eine neue international harmonisierte Richtlinie, die ICH S2 (R1), entworfen, welche künftig die anderen beiden Richtlinien ersetzen soll [73]. Aufgrund der Vielfalt an genotoxischen Agenzien und Wirkungsmechanismen ist es notwendig eine Batterie von *in vitro*- und *in vivo*-Tests durchzuführen, deren Ergebnisse komplementär bei der Dateninterpretation zusammenfließen sollen [73].

Die vorgeschlagene Standardbatterie nach ICH S2 (R1) setzt sich prinzipiell aus zwei Teilen zusammen:

1. Mutagenitätstestung durch einen Rückmutationstests in Bakterien
2. Genotoxizitätstestung in Säugerzellen *in vitro* und/ oder *in vivo*

Für die genaue Teststrategie werden zwei verschiedene Möglichkeiten angegeben:

Option 1

1. Ein Genmutationstest in Bakterien
2. Ein Test auf DNA-schädigende Wirkung in Säugerzellen *in vitro*: Entweder ein Test mit zytogenetischer Untersuchung von Chromosomenschäden (Mikrokern-test oder Metaphasechromosomenaberrationstest) oder ein Maus-Lymphoma tk Genmutationstest

3. Ein *in vivo*-Test auf Chromosomenschäden in hämatopoetischen Zellen von Nagern (Chromosomenaberrationstest in der Metaphase oder Mikrokerntest)

Option 2

1. Ein Genmutationstest in Bakterien
2. Ein *in vivo*-Test auf Genotoxizität mit zwei verschiedenen Geweben (normalerweise Mikrokerntest an hämatopoetischen Zellen von Nagern und ein anderer *in vivo*-Test)

Im Sinne des 3R-Prinzips sollten die *in vivo*-Studien der Testbatterie wenn möglich mit in die Routinetoxizitätsstudien mit wiederholter Gabe (*Repeated-dose toxicity studies*) integriert werden [73]. Außerdem entfällt die Notwendigkeit von Positivkontrollen *in vivo* [73]. Protokolle zur Durchführung der Tests sind in den zum Teil schon international harmonisierten Richtlinien der OECD (*OECD Guidelines*) festgeschrieben. Die *Guidelines* zur Genotoxizitäts- und Kanzerogenitätstestung befinden sich in Sektion 4 der Richtlinien für die Chemikaliertestung der OECD [74]. Zudem werden in der ICH S2 (R1) spezifische Aspekte, welche bei der Testung zu beachten sind, angeführt. Beispielsweise wird die vorgeschriebene Testdosis von 5 mg/ Platte für die bakterielle Mutationstestung und 1 mM für Säugerzelltests *in vitro* angegeben. Für zytotoxische Substanzen muss diese entsprechend der Vorgaben in der Richtlinie verringert werden. Des Weiteren enthält die ICH S2 (R1) Hinweise für die Interpretation der Testresultate und für mögliche weiterführende Studien [73].

Im Gegensatz zur Zulassung von Arzneistoffen, wird die Testung für die Zulassung von Chemikalien innerhalb der EU durch die REACH-Verordnung reguliert. Die Mutagenitätstestung unter REACH hängt dabei, wie auch die anderen toxikologischen Tests, von der entsprechenden Produktions- bzw. Importmenge der Substanzen ab. Beispielsweise würde für Substanzen mit einem Produktions-/ Importvolumen von ≥ 1 Tonne aber < 10 Tonnen pro Jahr ein negatives Ergebnis aus einem Mutagenitätstest in Bakterien ausreichen [75]. Ein Produktions-/ Importvolumen von ≥ 10 Tonnen pro Jahr oder ein positives Ergebnis für die 1-10 t Kategorie würden hingegen zusätzliche Studien erfordern [75].

1.3.1.2 Genmutationstest in Bakterien (Ames-Test)

In den frühen 1970ern begann Bruce Ames mit der Mutagenitätstestung einer Reihe von bekannten Kanzerogenen mithilfe des reversen Mutationstests in *Salmonella typhimurium* [76]. Dieser Test wurde später als Ames-Test weltbekannt [76]. Das Testprinzip (Abb. 1.13) basiert darauf, dass Bakterienstämme (*Salmonella typhimurium* oder *Escherichia coli*) mit einer Mutation in einem Gen, welches für eine essentielle Aminosäure codiert, verwendet werden [77]. *S. typhimurium* besitzen diese Mutation im Histidigen und *E. coli* im Genlocus Tryptophan [77].

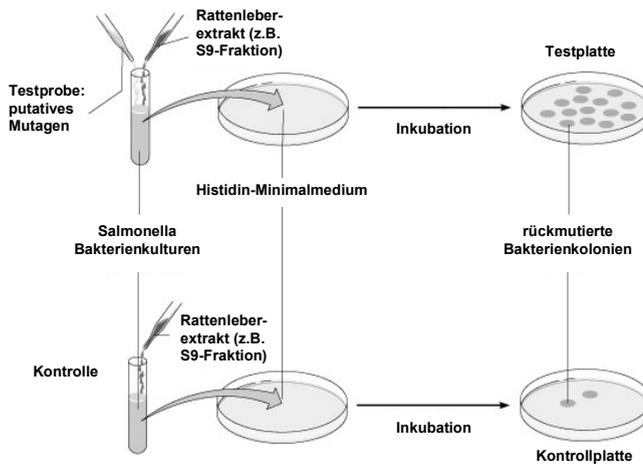


Abbildung 1.13:
Rückmutationstest in Bakterien zur Mutagenitätstestung.

Für die Testung werden zwei verschiedene *Salmonella* Bakterienkulturen, welche die Fähigkeit zur Histidinsynthese verloren haben, angesetzt. Die Testprobe bekommt zusätzlich zum Rattenleberextrakt zur metabolischen Aktivierung die mutagene Testsubstanz zugesetzt. Zur Kontrollprobe werden ausschließlich der

Rattenleberextrakt und das Lösungsmittel der Substanz zugegeben. Beide Probenansätze werden anschließend auf einem Histidin-Minimalagar ausplattiert und über einen definierten Zeitraum von 2-3 Tagen bei 37 °C inkubiert. Nur Bakterien, welche eine Rückmutation im Histidigen erfahren und somit selbst wieder die essentielle Aminosäure Histidin produzieren, können auf dem Minimalagar wachsen. Nach der Inkubationsphase wird die Kolonienzahl zwischen der Testplatte und der Kontrollplatte verglichen. Während die Kontrolle nur einige spontane rückmutierte Kolonien zeigt, kann bei der mutagenen Testsubstanz ein Anstieg in der Kolonienzahl verzeichnet werden. Die Kolonienzahl korreliert dabei mit der verwendeten Konzentration der mutagenen Testsubstanz. [Abb. modifiziert nach 78]

Mutagene Agenzien können eine Rückmutation in diesen Genen verursachen und somit die Fähigkeit der Bakterien zur Produktion der entsprechenden essentiellen Aminosäure wieder herstellen [77]. Rückmutierte Bakterien können infolgedessen auf einem

speziellen Minimalagar wachsen. Die Kolonienzahl auf dem Minimalagar wird nach 2-3 Tagen ermittelt und gibt Aufschluss über die genotoxische Aktivität einer Substanz. Mit dem Rückmutationstest in Bakterien können Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen von einem oder mehreren Basenpaaren erfasst werden [77]. Für den Genmutationstest in Bakterien gibt es zum Beispiel spezielle Vorgaben für die zu verwendenden *S. typhimurium* oder *E. coli* Stämme, um möglichst ein großes Spektrum an verschiedenen Basensubstitutionen und Leserasterpunktmutationen (*frameshift point mutations*) sowie quervernetzende Agenzien zu erfassen. Die vorgeschriebene Testkombination umfasst fünf verschiedene Teststämme [77]:

1. *S. typhimurium* TA1535 und
2. *S. typhimurium* TA1537 oder TA97 oder TA97a und
3. *S. typhimurium* TA98 und
4. *S. typhimurium* TA100 und
5. *E. coli* WP2 uvrA oder *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) oder *S. typhimurium* TA102.

Die Stämme unter 1-4 besitzen GC-Basenpaare an der primären Rückmutationsstelle und können deshalb nicht bestimmte oxidierende Mutagene, quervernetzende Agenzien und Hydrazine erfassen. Deshalb muss zusätzlich einer der unter 5 angegebenen Stämme, welche AT Basenpaare an der primären Rückmutationsstelle haben, getestet werden [77].

Limitationen des Rückmutationstests in Bakterien sind für bakterizide Substanzen (Antibiotika) oder Stoffe, die spezifisch auf die Säugerzellreplikation wirken, bekannt [77]. Des Weiteren sind die Bakterien nicht in der Lage progenotoxische Substanzen metabolisch zu aktivieren. Deshalb müssen die Bakterien bei der Testung von unbekannt Substanzen zusätzlich in Kombination mit einem metabolischen Aktivierungssystem getestet werden. Als typische Positivkontrollen werden im Ames-Test mit metabolischer Aktivierung DMBA, CPA und Benzo[a]pyren verwendet. Hingegen dienen 2-Nitrofluoren, Natriumazid, 9-Aminoacridin und Mitomycin C als Kontrollsubstanzen im Ames-Test ohne metabolisches Aktivierungssystem [77].

Zur metabolischen Aktivierung können entweder die subzelluläre S9-Fraktion oder auch die mikrosomale Fraktion herangezogen werden. Beide Fraktionen werden durch differentielle Zentrifugation von Leberhomogenaten hergestellt. Die S9-Fraktion wird durch 20-minütige Zentrifugation von Leberhomogenaten in einem geeigneten Puffer

bei 9000 x g gewonnen und enthält neben der mikrosomalen Fraktion noch das Zytosol [79]. Durch erneute Zentrifugation der S9-Fraktion bei 100.000 x g für 60 min, lässt sich die zytosolische von der mikrosomalen Fraktion trennen. Mikrosomen sind sphärische Partikel, die in lebenden Zellen nicht vorkommen, sich aber aus endoplasmatischen Retikulum in Homogenaten bilden [79]. Die mikrosomale Fraktion enthält Ribosomen und hydroxylierende Enzyme, wie z.B. CYP-Monooxygenasen, aber auch Enzyme wie Uridinglukuronosyltransferasen (UGTs), Glucose-6-Phosphatase, Nukleosiddiphosphatasen und NADPH-abhängige Lipidhydroxylasen [80, 81]. Hingegen sind in der zytosolischen Fraktion, welche in der S9-Fraktion noch enthalten ist, zusätzlich Enzyme des Phase II-Fremdstoffmetabolismus, wie N-Acetyltransferasen, Glutathion-S-Transferasen, Sulfotransferasen sowie Enzyme der Glykolyse wie Glucose-6-phosphatdehydrogenase, aber auch Malatenzym, Enzyme des Zitratzyklus und Lactatdehydrogenase, vorhanden [80, 81]. Allerdings müssen für die katalytische Aktivität der Enzyme NADPH oder ein NADPH-regenerierendes System als Energiequelle und für Phase II-Enzyme Kofaktoren, wie Uridindiphosphoglukuronsäure, Acetyl-CoA, DTT und Glutathion exogen zugeführt werden [81].

Für die Genotoxizitätstestung wird vorwiegend S9 von Ratten, welche zuvor mit CYP-Induktoren behandelt worden, verwendet. Eine solche Behandlung führt zu einer erhöhten Konzentration an bestimmten CYP-Enzymen. Höhere CYP-Konzentrationen ermöglichen es, geringere Mengen des metabolischen Aktivierungssystems einzusetzen und eine effektivere Aktivierung von Substanzen zu gewährleisten. Lange Zeit wurde Aroclor 1254, ein Gemisch aus polychlorierten Biphenylen (PCBs), für die Induktion verwendet. Aroclor induziert ein breites Spektrum an CYP-Enzymen, welches die Familien A bis E einschließt und einer Kombinationsbehandlung von 3-MC und PB ähnelt [82]. Polychlorierte Biphenyle wurden unter dem Handelsnamen Aroclor von 1929 bis 1970 in großen Mengen zur Anwendung als dielektrische Flüssigkeiten in Kondensatoren und Transformatoren, für Schmieröle, als hydraulische Flüssigkeiten sowie als Zusatzstoffe für Farben, Pestizide, Durchlagpapier, Dichtungsmittel und Plastikmaterialien produziert [83]. Aufgrund weitreichender toxischer Effekte und der Persistenz wurde die Produktion der PCBs im Jahr 1976 in den USA durch die TSCA (*Toxic Substances Control Act*)-Verordnung und später im Jahr 2001 dann auch in Europa durch die Stockholmer Konvention (*Stockholm convention on persistent organic pollutants*) gestoppt [83, 84]. Wegen dem Produktionsverbot von Aroclor müssen künftig Alternativen gefunden werden. Bereits 1992 kam ein britischer Arbeitsausschuss zu dem Schluss, dass ein Gemisch aus β -NF und PB ein ähnliches Spektrum an CYP-

Enzymen induziert wie Aroclor und somit eine gute Alternative zu diesem darstellt [85]. Außerdem sind die durch β -NF/ PB-induzierten Enzyme CYP2B1/ 2 und CYP1A für die Metabolisierung vieler progentoxischer Stoffe verantwortlich [85].

1.3.1.3 Säugerzellmutationstests *in vitro*

Nach dem Rückmutationstest in Bakterien, sieht die nächste Stufe der Mutagenitätstestbatterie für Option 1 einen Mutationstest an Säugerzellen *in vitro* vor. Dabei kann entweder ein Test auf Chromosomenaberration in Säugerzellen oder der Maus-Lymphoma tk Test durchgeführt werden [86]. Für den Maus-Lymphoma-Test wird die Zelllinie L5178Y verwendet, welche eine homo- oder heterozygote Mutation im Thymidinkinase (tk)-Locus tragen. Für den Test werden die Zellen mit dem Thymidinanalogon Trifluorothymidin (TFT) inkubiert. Zellen mit aktiver Thymidinkinase sind sensitiv gegenüber TFT und werden im Wachstum und Metabolismus gehemmt, während Thymidinkinase-defiziente Zellen auch in Gegenwart von TFT wachsen können. Dem Maus-Lymphoma ähnliche Tests sind der HPRT und XPRT Test. Für diese beiden Tests werden CHO, AS52 oder V79 Zellen des chinesischen Goldhamsters oder TK6 (humane lymphoblastoide) Zellen verwendet. Als Endpunkte werden Mutationen Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyltransferase (HPRT)- bzw. Xanthin-Guaninphosphoribosyltransferase (XPRT)-Locus bestimmt. Die Zellen werden dabei anhand der Resistenz gegenüber 6-Thioguanin bzw. 8-Azaguanin selektiert. Während das Thymidinkinasegen und XPRT autosomal lokalisiert sind, liegt der HPRT-Locus auf dem X-Chromosom. Dadurch werden durch die verschiedenen Tests unterschiedliche genetische Veränderungen erfasst Auch bei diesen Tests ist es erforderlich mit und ohne metabolisches Aktivierungssystem zu testen, um auch prokanzerogene Substanzen zu erfassen. Die Behandlungszeit mit der Testsubstanz beträgt 3-6 h [86].

Die zweite Testoption, ein Chromosomenaberrationstest *in vitro*, wird durch die OECD-Richtlinie 473 beschrieben [87]. Durch einen solchen Test sollen strukturelle Veränderungen an Chromosomen erfasst werden. Polyploidie von Chromosomen oder Chromosomenaberrationen spielen bei verschiedenen genetisch bedingten Krankheiten z.B. Trisomie 21 eine Rolle. Deshalb ist es wichtig die chromosomenschädigende Wirkung von Substanzen zu untersuchen. Für einen solchen Test können alle Zelllinien verwendet werden, die einen stabilen Karyotyp (Chromosomeneigenschaften) und eine

möglichst geringe bzw. stabile chromosomale Mutationsfrequenz aufweisen. Häufig verwendete Zellen sind Fibroblasten des chinesischen Goldhamsters und periphere Blutzellen von Säugetieren. Die Zellen werden für den Test für 3-6 h mit der Testsubstanz mit und ohne metabolisches Aktivierungssystem behandelt und nach definierten Zeitintervallen mit Colchizin in der Metaphase arretiert. Die Arretierung sollte etwa nach einem 1,5-fachen Zellzyklus erfolgen. Danach werden die Zellen geerntet, gefärbt und mikroskopisch auf Chromosomenschäden untersucht [87].

1.3.1.4 Chromosomenaberrationstests *in vivo*

Neben der Testung *in vitro* gehört ein *in vivo*-Test auf Chromosomenschäden in hämatopoetischen Zellen von Nagern zur Standardtestbatterie. Durchgeführte Standardtests sind der Mikrokerntest oder ein Chromosomenaberrationstest in der Metaphase [88, 89]. Die Testung *in vivo* zielt vor allem darauf ab, den Metabolismus, die Pharmakokinetik einer Substanz und DNA-Reparaturprozesse mit abzudecken, was *in vitro* nicht oder nur sehr begrenzt möglich ist. Allerdings müssen Spezies-spezifische Unterschiede bei der Interpretation und Abschätzung des Risikos für den Menschen beachtet werden, da für die *in vivo*-Testung Nager als Modellspezies herangezogen werden [88, 89].

Beim Mikrokerntest werden Schädigungen der Testsubstanz auf Chromosomen und den mitotischen Apparat durch die Analyse der Mikrokernformation in Erythrozyten aus Nagerknochenmark oder in peripheren Blutzellen von Nagern bestimmt [88]. Während der Reifung von Erythroblasten zu polychromatischen Erythrozyten im Knochenmark stoßen diese ihren Hauptzellkern ab. Kommt es durch den Einfluss von mutagenen Substanzen zu Chromosomenbrüchen (klastogene Wirkung) oder zum Verlust ganzer Chromosomen (aneugene Wirkung), so können diese in Form von Mikrokernen im Zytoplasma zurückbleiben. Ein Anstieg in der Zahl an Mikrokernen gegenüber der Kontrolle ist ein Indiz für die chromosomenschädigende Wirkung einer Substanz. Für den Mikrokerntest werden die Nager mit der Testsubstanz behandelt und an geeigneten Zeitpunkten Blutproben aus der Schwanzvene entnommen bzw. das Tier getötet und das Knochenmark aus den Femora oder Tibiae isoliert. Für die Analyse von Knochenmark werden in der Regel zwei Zeitpunkte gewählt, wobei der erste Zeitpunkt mindestens 24 h nach der Behandlung aber unter 48 h liegen sollte. Das Behandlungsregime und die Zeitpunkte der Probenentnahme richten sich nach der jeweiligen Testsubstanz. Die

Dosis sollte entweder bei mindestens 2000 mg/ kg für Behandlungen bis 14 Tage und 1.000 mg/ kg für Behandlungen über 14 Tage liegen. Bei toxischen Substanzen oder Substanzen, die bei diesen Dosierungen bereits Letalität hervorrufen, müssen die Dosierungen entsprechend verringert werden. Als Positivsubstanzen können z.B. Ethylmethansulfonat, Mitomycin C oder CPA mitgeführt werden. Allerdings sollen künftig, wie vorangehend schon erwähnt, aus Tierschutzgründen die Positivkontrolliere eingespart werden. Die Färbung der Präparate kann mit Farbstoffen, wie Giemsa oder speziellen DNA-Farbstoffen wie z.B. Hoechst oder Acridinorange, erfolgen. Zur Auswertung werden mindestens 200 Erythrozyten bei Knochenmarksproben und 1.000 bei Blutproben ausgezählt [88].

Neben dem Mikrokerntest *in vivo* kann auch ein Chromosomenaberrationstest *in vivo* im Rahmen der Standardtestbatterie durchgeführt werden. Für diesen Test werden ebenfalls routinemäßig Nager genutzt [89]. Diese werden zusätzlich zu der Behandlung mit der Testsubstanz noch mit einem Spindelgift, wie Colchizin, welches zur Metaphasearretierung führt, vor der Tötung für 3-5 h behandelt. Anschließend werden Knochenmarkausstriche angefertigt, gefärbt und auf Chromosomenschäden untersucht. Die empfohlenen Positivkontrollen, die Dosierungen der Testsubstanz und Tiergruppenstärken von mindestens 5 Tieren entsprechen den Vorgaben zum Mikrokerntest *in vivo*. Für die Auswertung müssen mindestens 100 Zellen auf Chromosomenschäden untersucht und eine Zytotoxizitätsauszählung in mindestens 1.000 Zellen durchgeführt werden [89].

1.3.2 Kanzerogenitätstestung

Während in Mutagenitätsstudien lediglich das mutagene Potenzial von Substanzen evaluiert wird, kann mit Kanzerogenitätsstudien die krebserzeugende Wirkung sowie potentielle Zielorgane und die Art der induzierten Tumoren nachgewiesen werden [1]. Zudem werden in Kanzerogenitätsstudien nicht nur genotoxische, sondern auch nicht-genotoxische Kanzerogene erfasst. In der Regel werden für die Langzeitkanzerogenitätsstudien Nager als Modellspezies genutzt. Die Testdauer umfasst gewöhnlich zwei Jahre und somit fast die gesamte Lebenszeit des Nagers. Es sollten sowohl männliche als auch weibliche Tiere eingesetzt werden. Die Gruppenstärken sollten pro Geschlecht mindestens 50 Tiere pro Gruppe betragen, um eine valide statistische

Auswertung zu ermöglichen [1]. Eine typische 2-Jahres-Kanzerogenitätsstudie an Nagern benötigt etwa 800 Tiere und kostet zwischen 1,5 und 3 Millionen Euro [90]. Neben der Verwendung von Nagern, können unter bestimmten Umständen, wenn z.B. der Metabolismus in den Nagerspezies nachgewiesenermaßen nicht relevant für den Menschen ist, auch andere Nicht-Nagerspezies zur Kanzerogenitätstestung verwendet werden [91].

Folgende Ziele stehen hinter der Kanzerogenitätstestung im Versuchstier [1, 91]:

1. Erhöhte Inzidenz von (spontan) auftretenden Tumoren im Vergleich zur Kontrolle bzw. erhöhte Tumoranzahl pro Tier und Testkollektiv im Vergleich zu den Kontrollgruppen
2. Testung ob die Zeit des Auftretens von Spontantumoren im Vergleich zur Kontrolle verkürzt ist
3. Identifizierung von Zielorganen der Tumorbildung
4. Charakterisierung der Beziehung zwischen Tumorbildung und Substanzdosis
5. Ermittlung des NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) oder einer Referenzdosis
6. Extrapolation zu niedrigen humanrelevanten Expositionen
7. Aufdecken von Hinweisen zur vermuteten Wirkungsweise der Substanz

Die untersuchten Endpunkte der Kanzerogenitätsstudien umfassen neben der abschließenden histopathologischen Untersuchung auch Parameter wie Körpergewicht, Futteraufnahme, klinische und hämatologische Analysen [91].

1.3.3 Genotoxizitäts- und Kanzerogenitätsdaten der Testsubstanzen

Die Ergebnisse aus den Standardtestungen für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Modellsubstanzen sind in Tabelle 1.2 zusammengestellt.

Tabelle 1.2: Genotoxizitäts- und Kanzerogenitätsdaten von ausgewählten Modells-substanzen.

IARC Gruppierungen: Gruppe 1- humane Kanzerogene, Gruppe 2A- wahrscheinlich kanzerogen für den Menschen, Gruppe 2B- möglicherweise kanzerogen für den Menschen, Gruppe 3- nicht als humanes Kanzerogen klassifizierbar, Gruppe 4- möglicherweise nicht kanzerogen im Menschen. Legende: AFB1 = Aflatoxin B₁, DMBA = 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen, DEN = Diethylnitrosamin, CPA = Cyclophosphamid, ACT = Actinomycin D, ETO = Etoposid, MMS = Methylmethansulfonat, MA = metabolische Aktivierung.

	CAS		Genotoxizität		Kanzergenität
	Nummer	MA	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	
AFB1	1162-65-8	+	(+) Ames [92]; (+) MN [93]; (+) CA [94]	(+) MN [95], (+) CA [96]	IARC Gruppe 1 Kanzergen [92, 97]
DMBA	57-97-6	+	(+) Ames [98]; (+) MLA [99]; (+) MN [100]; (+) CA [94]	(+) MN [101]	Nicht IARC klassifiziert, kanzerogen in Ratten und Mäusen [92, 102]
DEN	55-18-5	+	(+) Ames [103-105], (+) MLA [106], (+) MNT [93],	(+) MN [107], (+) CA [108]	Wahrscheinlich kanzerogen für den Menschen, IARC, Gruppe 2A [97]
CPA	50-18-0	+	(+) Ames [98]; (+) MLA[99]; (+) MN [100, 109]; (+) CA [94]	(+) CA [110]; (+) MN [111]	IARC Gruppe 1 Kanzergen [97]
ACT	50-76-0	-	(+/-) Ames [112, 113]; (+) MLA [99]; (+) MN [114]; (+) CA [94]	(+) MN [112]	Nicht als humanes Kanzergen klassifizierbar, IARC Gruppe 3 [92, 97]
ETO	33419-42-0	-	(-) Ames [115]; (+) MLA [116]; (+) MN [114]; (+) CA [117]	(+) MN [118]; (+) CA [118]	IARC Gruppe 1 Kanzergen [97]
MMS	66-27-3	-	(+) Ames [98]; (+) MLA [99]; (+) MN [100]; (+) CA [94]	(+) MN [119]	Wahrscheinlich kanzerogen für den Menschen, IARC, Gruppe 2A [92, 97]

1.3.4 Risikobewertung von kanzerogenen Substanzen

Die Klassifizierung und Risikobewertung von kanzerogenen Substanzen, insbesondere genotoxischen Verbindungen, wird bis heute weltweit kontrovers diskutiert [120]. Die konservative Annahme war für lange Zeit, dass es für genotoxische Kanzerogene keine Schwellenwerte (*Thresholds*) gibt [62]. Ein nicht vorhandener Schwellenwert in Dosis-Wirkungsbeziehungen bedeutet, dass eine lineare Extrapolation des Risikos auf die Nulldosis angesetzt werden muss [62]. Die Problematik des „kein-Schwellenwert“-Prinzips ist eine Konsequenz der Teststrategie für Kanzerogene mit Hilfe von Langzeitversuchen an Nagern [1]. Durch die begrenzte Anzahl an Versuchstieren kann nur ein geringer Dosisbereich abgedeckt werden. Dieser wird zur Kompensation der geringen Tierzahl (50-60 Tiere pro Gruppe) um einige Größenordnungen höher gewählt, als der tatsächlich relevante Bereich für die Exposition des Menschen liegt. Die Folgen dieses Versuchdesigns sind, dass die Tierversuche im Niedrigdosisbereich keine für die Bewertung des Risikos relevanten Daten liefern und der Niedrigdosisbereich somit extrapoliert werden muss (Abb. 1.14) [1]. Selbst unter Erweiterung des Dosisbereichs auf niedrige Dosierungen bleibt das statistische Problem der niedrigen Tierzahl bestehen. Die Problematik zeigt eine bekannte Dosis-Wirkungsstudie von Peto *et al.* mit 4080 Wistarratten, welche mit DEN in 15 verschiedenen Dosierungen behandelt worden [121]. In den vier niedrigsten Dosisgruppen konnte keine Tumorbildung beobachtet werden [121]. Dennoch schließt dieses Ergebnis die Unsicherheit, dass niedrige Dosierungen kanzerogen wirken, nicht aus. Bei 60 Tieren pro Gruppe ist es schwierig unter 0,5 % an Tieren mit Tumoren zu detektieren, da $60 \times 0,5 \% / 100 \% = 0,3$ Tiere ergibt [120]. Das Ergebnis entspricht demzufolge dem Ergebnis von keinen beobachteten Tumoren. Um eine ausreichende statistische Prüfung vorzunehmen, müsste man die Anzahl der Tiere pro Gruppe 10- bis 100-fach höher wählen [120]. Dieses Detektionsproblem lässt somit keine genaue Aussage zum Verlauf der Dosis-Wirkungskurve zu. Würde man die experimentellen Daten einfach extrapolieren, würde ein Schwellenwert existieren (Kurvenverlauf Schwellenwert Abb. 1.14). Verläuft die Kurve in Wirklichkeit nach den anderen drei Beispielverläufen (supralinear, linear, sublinear), würde jedoch kein Schwellenwert existieren (Abb. 1.14).

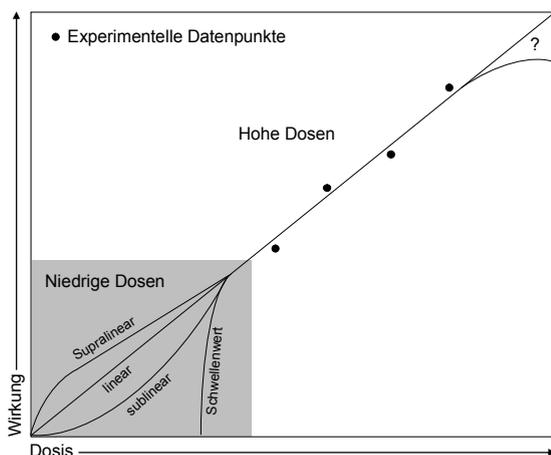


Abbildung 1.14: Problematik der Dosis-Extrapolation von Daten aus Kanzerogenitätsstudien an Nagern. Aufgrund des experimentellen Designs, lässt sich der reale Kurvenverlauf im Niedrigdosisbereich (grau), der für die menschliche Exposition relevant ist, nicht ermitteln. Die Grafik zeigt verschiedene mögliche Kurvenverläufe für die Extrapolation der Daten. [Abb. modifiziert nach 1]

In der Schwellenwertdiskussion gibt es außerdem berechtigte Argumentationen, dass Prozesse, wie metabolische (In-)aktivierung, DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle, Apoptose oder die Immunsystem-vermittelte Kontrolle für die Existenz von Schwellenwerten sprechen [62]. Solche Mechanismen könnten im Niedrigdosisbereich ausreichend sein, um die Tumorbildung zu unterbinden. Allerdings kann nicht davon ausgegangen werden, dass solche Mechanismen 100 % protektiv wirken. Deshalb führte man den Begriff „praktischer Schwellenwert“ ein und grenzt ihn vom „perfekten Schwellenwert“ ab. Eine solche Argumentation erfordert allerdings eine mechanistische Untersuchung von Substanzen. Außerdem müssen Unterschiede zwischen verschiedenen genotoxischen Substanzen mit betrachtet werden. So können bei der Expression von Enzymvarianten für die DNA-Reparatur oder den Metabolismus von Substanzen Speziesunterschiede eine große Rolle spielen. Beispielsweise würde das Fehlen eines bestimmten CYP-Isoenzym beim Nager dazu führen, das ein humanes Kanzerogen nicht erkannt wird oder im umgekehrten Fall das Risiko überwertet wird [62].

Die Notwendigkeit der Fallbetrachtung und Unterklassifizierung der genotoxischen Kanzerogene ist mittlerweile in Fachkreisen akzeptiert. In verschiedenen Kongressen, wie dem Salzburger Symposium im Jahr 1998 der ECETOC/ EEMS Gesellschaften, der Eurotox im Jahr 2002 in Budapest und des IC-TST Kongresses in Antalya im Jahr

2003, wurde über die praktische Umsetzung einer solchen fallbasierten Risikoabschätzung debattiert. Im Jahr 2004 stellte dann die Europäische Akademie zur Erforschung von Folgen wissenschaftlich-technischer Entwicklungen (Bad Neuenahr-Ahrweiler) einen neuen Ansatz zur Bewertung und Klassifizierung von Kanzerogenen vor (Abb. 1.15) [120, 122].

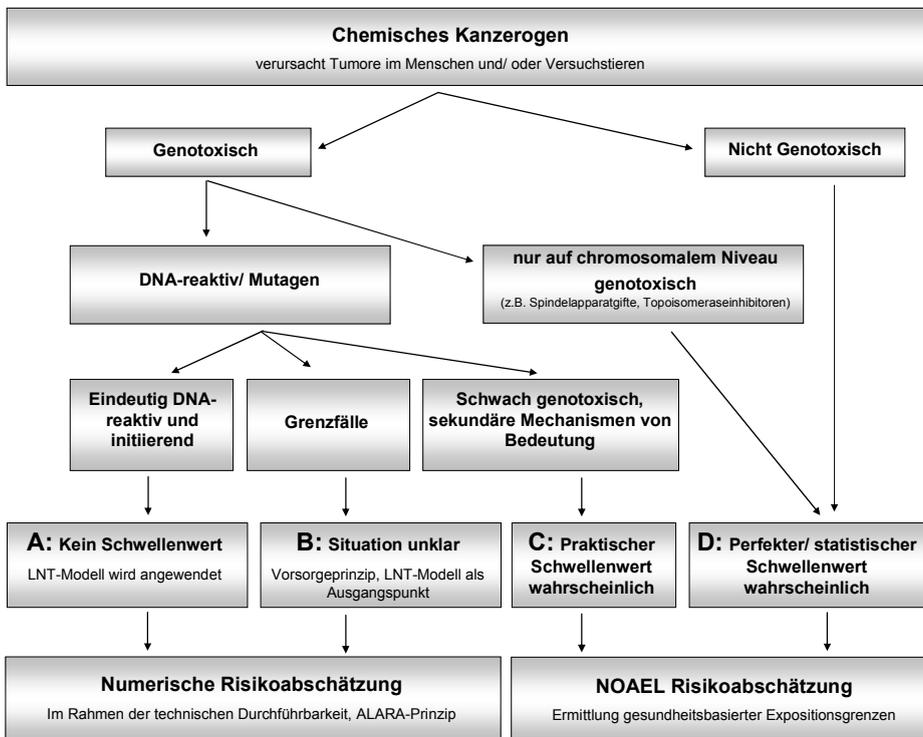


Abbildung 1.15: Vorschlag zur Vorgehensweise für die Risikobewertung und Kategorisierung von Kanzerogenen. Das gezeigte Flussdiagramm ist ein Vorschlag zur modernen Risikobewertung von Streffer *et al.* (2004). Nach dieser „neuen“ Vorgehensweise werden Kanzerogene in vier verschiedene Gruppen unterteilt und in Abhängigkeit von der Gruppenzuordnung entweder nach dem klassischen NOAEL-Prinzip oder mittels numerischer Risikoabschätzung bewertet. Abkürzungen: *Linear-No-Threshold* (LNT), *No Observed Adverse Effect Level* (NOAEL). [Abb. modifiziert nach 120, 122]

Streffer *et al.* schlugen die Unterscheidung von vier verschiedenen Kategorien bei der Risikobewertung vor [122]. Das gesamte Konzept basiert zunächst auf einer Unterscheidung von genotoxischen und nicht-genotoxischen Kanzerogenen [120]. Geno-

toxische Kanzerogene werden zudem weiter unterteilt in DNA-reaktive, mutagene Substanzen und Substanzen, welche nur auf chromosomaler Ebene genotoxisch wirken. Letztere werden gemeinsam mit den nicht-genotoxischen Kanzerogenen in die Gruppe D eingeordnet. Substanzen der Gruppe D haben einen so genannten perfekten Schwellenwert und werden in der Risikobewertung nach dem NOAEL-Prinzip behandelt. Das NOAEL-Prinzip bedeutet, dass eine Konzentration, bei der kein adverser Effekt beobachtet werden konnte, aus Dosis-Wirkungsstudien ermittelt wird. Unter Einbeziehung von Unsicherheitsfaktoren (Division des NOAEL durch den Unsicherheitsfaktor) wird dann eine sichere Expositions-dosis für den Menschen abgeleitet [120].

DNA-reaktive, mutagene Verbindungen werden für die Bewertung erneut unterteilt in eindeutig DNA-reaktive und initiierende Substanzen (Gruppe A), Grenzfälle (Gruppe B) und schwach genotoxische Substanzen mit sekundären Mechanismen (Gruppe C) [120]. Gruppe A sind typische genotoxische Kanzerogene, welche keinen Schwellenwert besitzen. Für die Risikobewertung im Niedrigdosisbereich wird hier das LNT (*Linear-no-threshold*)-Prinzip angewendet. Es wird also von einer linearen Extrapolation der Dosis-Wirkungskurve, welche keinen Schwellenwert liefert, ausgegangen. Die behördliche Regulation erfolgt nach dem ALARA-Prinzip. ALARA bedeutet *as low as reasonably achievable*, das heißt die Exposition sollte so gering wie möglich im Rahmen von technischen Möglichkeiten und soziopolitischen Betrachtungen sein. Die Gruppe B wird aufgrund des Fehlens fundierter Daten zur Unterstützung der Existenz eines Schwellenwertes, wie die Gruppe A, nach dem LNT/ALARA-Prinzip eingestuft und reguliert. Hingegen gibt es für genotoxische Substanzen der Gruppe C genügend Hinweise für die Existenz eines praktischen Schwellenwertes durch mechanistische und/oder toxikokinetische Untersuchungen. Deshalb werden diese Substanzen, wie auch Substanzen der Gruppe D, in der Risikobewertung nach dem NOAEL-basierten System behandelt [120].

Beispiele für die einzelnen Gruppen zeigt Tabelle 1.3. ETO kann aufgrund seiner ausschließlich auf chromosomalem Niveau genotoxischen Wirkung der Gruppe D zugeordnet werden [120]. Hingegen ist AFB1 ein typisches Kanzerogen der Gruppe A mit einem linearen Verlauf der Dosis-Wirkungskurven im Niedrigdosisbereich. DEN wurde aufgrund von verschiedenen tierexperimentellen Daten ebenfalls der Gruppe A zugeordnet. Allerdings zeigte DEN in Abhängigkeit vom Administrationsschema unterschiedliche Verläufe der Dosis-Wirkungskurve. Generell wurde eine lineare Beziehung für die kontinuierliche lebenslange Exposition und eine nicht-lineare Beziehung mit praktischem Schwellenwert bei 1 mmol DEN/kg bei wöchentlicher und

somit unterbrochener Behandlung anhand vorhandener Daten im Niedrigdosisbereich von DEN postuliert. Während die linearen Daten in Lebenszeitstudien gut mit der DNA-Adduktformation korrelieren, spielen wahrscheinlich zytotoxische und proliferative Prozesse bei unterbrochener Kurzzeiteexposition für die Bildung von Lebertumoren eine Rolle. Trotz der Annahme, dass die unterbrochene Exposition beim Menschen eher relevant ist, wurde DEN aufgrund verbleibender Unsicherheiten und der proliferationsfördernden Wirkung in die Gruppe A eingeordnet [62, 120].

Tabelle 1.3: Beispielsubstanzen für die vier verschiedenen Risikogruppen von Kanzerogenen. [Tabelle modifiziert nach 120]

Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
Ionisierende Strahlung	Acrylnitril	Formaldehyd	Tumorpromotoren (TCDD)
Vinylchlorid	Acrylamid	Vinylacetat	Spindelgifte (Paclitaxel)
4-Aminobiphenyl	Arsen		Topoisomerase II-Toxine (Etoposid)
Diethylnitrosamin			Hormone
Acetaminofluoren			
Aflatoxin B ₁			
NNK			

1.3.5 Toxicogenomics als neue Methode zur Identifizierung von genotoxischen und kanzerogenen Verbindungen

Das neue Konzept der Risikobewertung von Kanzerogenen basiert auf der mechanistischen Einstufung von genotoxischen Substanzen. Eine solche mechanistische Bewertung ist zudem bedeutend, da die bisherige Standardbatterie für genotoxische Verbindungen sich durch eine hohe Sensitivität, insbesondere für die Tests mit Säugerzellen, aber geringe Spezifität auszeichnet [123, 124]. Die Analysen von Kirkland *et al.* zeigten, dass 75-95 % unter den getesteten nicht-kanzerogenen Substanzen in mindestens einem von drei der Standardtests (Ames, Maus-Lymphoma, Mikrokerntest oder Chromosomenaberration *in vitro*) ein positives Resultat anzeigten [123, 124]. Außerdem zeigten Erhebungen von Snyder und Green, dass 50 % der nicht-kanzerogenen pharmazeutischen Substanzen mindestens ein positives Resultat in der

Standardtestbatterie für Genotoxizität aufwiesen [125]. Des Weiteren ergab sich aus der Analyse von Datenbanken, dass 50 % der Verbindungen in Kanzerogenitätsstudien in mindestens einer Spezies oder einem Geschlecht positiv sind [126]. Diese hohe Inzidenz und andere Untersuchungen werfen Zweifel an der Relevanz dieser Ergebnisse für den Menschen auf [127]. Mechanismusbasierte Tests könnten künftig bei der Identifizierung von falsch-positiven Resultaten der Standardtestbatterie oder zur Erklärung von Befunden innerhalb der Kanzerogenitätsstudien behilflich sein. Allerdings sind mechanistische Daten aus klassischen Toxizitätsstudien und der Standardtestbatterie für genotoxische Substanzen nur begrenzt oder überhaupt nicht erfassbar. Deshalb sind für die mechanistische Untersuchung neue Technologien gefragt, welche die erforderlichen Daten für die „moderne Risikobetrachtung“ liefern können. Bereits im Jahr 2002 konnten Hamadeh und Mitarbeiter zeigen, dass die Genexpressionsprofile in Rattenleberproben charakteristisch für die jeweilige Chemikalienklasse, mit der die Ratten behandelt worden, sind [128]. Sie konnten dabei die Profile von verschiedenen Peroxisomenproliferatoren von denen mit enzyminduzierenden Eigenschaften abgrenzen [128]. Ellinger-Ziegelbauer *et al.* zeigten später, dass die genotoxischen Hepatokanzerogene Dimethylnitrosamin, 2-Nitrofluoren, AFB1 und NNK in Ratten, die über 14 Tage behandelt worden, übereinstimmende Signaturen bezüglich der Regulation von Genen der DNA-Schadensantwort, Detoxifikation und Zellproliferation besitzen [129]. Außerdem konnten histopathologische Besonderheiten in Form von Nekrosen und Entzündung für Dimethylnitrosamin und AFB1 auch auf Genexpressionsebene nachgewiesen werden [129]. In darauffolgenden Studien identifizierten Ellinger-Ziegelbauer *et al.* charakteristische Unterschiede zu nicht-genotoxischen Kanzerogenen [130] und stellten anhand einer Vielzahl von genotoxischen und nicht-genotoxischen Hepatokanzerogenen sowie Nicht-Hepatokanzerogenen ein Klassifikationsmodell auf [131]. Für das Klassifikationsmodell wurden verschiedene *Ranking*-Algorithmen (SVM, ANOVA, Recursive feature Elimination) miteinander verglichen und unbekannte Substanzen konnten mit einer Genauigkeit von 75-88 % richtig klassifiziert werden. Diese Analysen zeigten, dass es möglich ist das kanzerogene Potential von Substanzen mittels Toxicogenomics bereits mit einer Kurzzeit-*in vivo*-Studie an Nagern vorherzusagen [131]. Die Arbeiten von Ellinger-Ziegelbauer *et al.* werden durch die Resultate anderer Arbeiten gestützt. Nakayama *et al.* und Iida *et al.* wiesen nach, dass man nach Behandlung von Nagern mit verschiedenen Kanzerogenen und Nicht-Kanzerogenen schon nach 2-4 Wochen repräsentative Genexpressionsveränderungen erhält [132, 133].

Neben der Omics-basierten Prädiktion *in vivo* gibt es auch schon einige Publikationen mit permanenten Zelllinien. Harris *et al.* zeigten, dass von 31.000 untersuchten Genen 2974 Gene in HepG2 basal exprimiert waren [134]. Von diesen Genen waren 29 % in primären humanen Hepatozyten (serumfreie Kollagen-Monolayerkulturen) von allen drei getesteten Donoren basal exprimiert, 40 % zeigten eine teilweise Übereinstimmung zwischen beiden Zellsystemen und 31 % waren charakteristisch für die HepG2-Zelllinie [134]. Die relativ hohe Übereinstimmung zwischen primären Hepatozyten und HepG2 sprechen grundsätzlich für die Verwendung im mechanistischen Screening. Hingegen spiegelt der Anteil spezifisch exprimierter Gene wahrscheinlich den transformierten Phänotyp der Zelllinie wider und ist in der Leber (*in vivo*) vermutlich nicht exprimiert [134]. Neben den Unterschieden zur *in vivo*-Situation aufgrund des transformierten Phänotyps der Zelllinien, müssen auch Diskrepanzen zwischen den Hepatozytenkulturen im Vergleich zur gesamten Leber immer berücksichtigt und in die Interpretation der Daten kritisch mit einbezogen werden [135]. Obwohl primäre Hepatozytenkulturen als derzeitiger „Gold-Standard“ hepatischer *in vitro*-Systeme gelten, unterscheiden sich die Morphologie sowie Gen- und Proteinexpressionsmuster in Abhängigkeit von der Kultivierung zum Teil beträchtlich von der Situation *in vivo* [134, 136, 137].

In einer anderen *in vitro*-Studie von Ellinger-Ziegelbauer *et al.* wurde die Eignung von Genexpressionsanalysen in TK6-Zellen zur Identifizierung DNA-reaktiver Verbindungen evaluiert [138]. Die verwendeten 47 Gene wurden anhand bereits publizierter Daten zusammengestellt und ihre Expression 20 h nach einer 4-stündigen Behandlung in neun verschiedenen Laboratorien untersucht. Die gewonnenen Daten waren zwischen den verschiedenen Laboratorien vergleichbar und ließen eine Unterscheidung DNA-schädigender Verbindungen von Spindelgiften und Substanzen, die aufgrund von Zytotoxizität zu Chromosomenbrüchen führen, zu [138]. Im Jahr 2006 wurde dann ein großes Projekt, das carcinoGENOMICS Projekt, zur Entwicklung von Alternativen *in vitro* für Nagerkanzerogenitätstest ins Leben gerufen [90]. An diesem 5-jährigen Projekt sind 20 verschiedene Gruppen aus verschiedenen Forschungseinrichtungen von Universitäten, der Industrie bis hin zu regulatorischen Institutionen beteiligt [90].

Diese Vielzahl an Studien *in vivo* und *in vitro* zeigt den Trend zur Nutzung von Toxicogenomics auf. Die Methode stellt ein zukunftssträchtiges Instrument in der Testung von genotoxischen/ kanzerogenen Substanzen auf Basis des zugrunde liegenden Wirkmechanismus dar.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Mit Hilfe von toxikogenomischen Untersuchungen sollten in dieser Arbeit neue Ansätze für die Identifizierung und Charakterisierung von genotoxischen Substanzen entwickelt werden. Ziel des ersten Teils der Arbeit war es, *in vitro* Genexpressionsprofile genotoxischer Modellsubstanzen mit einem direkten DNA-schädigenden Wirkungsmechanismus (ACT, ETO und MMS) zu erstellen. Als zelluläres Modellsystem wurde dazu die Hepatomzelllinie HepG2 gewählt. Anhand der globalen Genexpressionsveränderungen sollten potentielle Übereinstimmungen in der Regulation bestimmter Gene, welche charakteristisch für den Wirkmechanismus dieser Modellsubstanzen sind, aufgedeckt werden. Solche repräsentativen Genregulationen, „Markergene“, könnten künftig zur Identifizierung von genotoxischen Verbindungen herangezogen werden.

Da der überwiegende Teil genotoxischer Substanzen jedoch keinen direkten DNA-schädigenden Mechanismus besitzt, sondern erst nach metabolischer Aktivierung eine solche Wirkung entfaltet, sollte das System auf diese progenotoxischen Verbindungen erweitert werden. Deshalb war der nächste Fokus der Arbeit die Etablierung eines kombinierten Systems aus HepG2 und einem metabolischen Aktivierungssystem. Nach der Etablierung des Systems und funktioneller Prüfung mit den Modellsubstanzen CPA, DMBA, AFB1 und DEN wurden erneut Genexpressionsstudien durchgeführt. Die gefundenen Genexpressionsprofile galt es anschließend mit den für die genotoxischen Substanzen gewonnenen Profilen abzugleichen und prädiktive Gene für die beiden Substanzklassen zu evaluieren.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.1: Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten

Name	Hersteller	Firmensitz
Biotin-16-UTP, 10 mM	PerkinElmer Life and Analytical Sciences	Waltham, USA
Cy3-Streptavidin	Amersham Biosciences/ GE Healthcare	Buckinghamshire, England
DEPC Wasser	Ambion/ Applied Biosystems	Austin, USA
E1BC Puffer	Illumina Inc.	San Diego, USA
Ethanol Lichrosolv®	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
High Temperature Wash buffer	Illumina Inc.	San Diego, USA
HybE1 Puffer	Illumina Inc.	San Diego, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Nuklease freies Wasser	Ambion	Austin, USA
Propanol	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2.2: Substanzen und Lösungsmittel für Genotoxizitätsexperimente

Name	Hersteller	Firmensitz
Actinomycin D	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Aflatoxin B ₁	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Cyclophosphamid Monohydrat	Calbiochem/ Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
7,12-Dimethylbenz[a]antracen (DMBA)	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Dimethylnitrosamin	Supelco/ Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Etoposid	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ketokonazol	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
3-Methylcholanthren	Fluka/ Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Metformin (1,1-Dimethylbiguanid)	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Methylmethansulfonatester (MMS)	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland

Name	Hersteller	Firmensitz
α -Naphthoflavon	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Phenobarbital Natriumsalz	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Rifampicin	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Theophyllin	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland

Tabelle 2.3: Zellkultivierungsreagenzien und Reagenzien für die metabolische Aktivierung

Name	Hersteller	Firmensitz
CASY [®] Ton	Schärfe System GmbH	Reutlingen Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
DMEM F12 (1:1), mit Glutamin, 15 mM HEPES, Glucose und Phenolrot	Gibco/ Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	Hyclone/ Perbio	Logan, USA
Gentamicin 50mg/ ml	Gibco/ Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Mikrosomen (Isoniazid induziert) Lot 0510064	Tebu-bio	Offenbach, Deutschland
Mikrosomen (β -Naphthoflavon, Phenobarbital induziert) Lot 0310131	Tebu-bio	Offenbach, Deutschland
β -Nicotinamidadeninucleotid-2'-phosphat tetranatriumsalzhydrat, reduzierte Form (NADPH)	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Natrium-Pyruvat 100 mM	Gibco/ Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
PBS Dulbeccos w/o Ca, Mg	Gibco/ Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Penicillin (10 kU/ ml)-Streptomycin (10 mg/ ml) Lösung	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
S9 (induziert mit β -Naphthoflavon/ Phenobarbital) Lot 0310129	Tebu-bio	Offenbach, Deutschland
Trypsin/ EDTA-Lösung	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland

Tabelle 2.4: Kits und Reagenzien für biochemische Tests

Name	Hersteller	Firmensitz
Agencourt® RNAClean™	Agencourt/ Beckman Coulter	Beverly, USA
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega	Madison USA
Coomassie Brilliant Blue G250	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Ethanol Lichrosolv®	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
7-Ethoxy-3H-phenoxazin-3-on (Resorufinethylether)	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on (Resorufin)	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit	Ambion/ Applied Biosystems	Austin, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
RNase-free DNase Set	Qiagen	Hilden, Deutschland
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Nuclear Extract Kit	Active Motif	Rixensart, Belgien
Phosphorsäure (85 %)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
qPCR Mastermix Plus	Eurogentec	Seraing, Belgien
Salicylamid	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Schreddersäulchen, QIAshredder	Qiagen	Hilden, Deutschland
TaqMan® Low Density Array, Custom panels	Applied Biosystems	Darmstadt, Deutschland
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	Applied Biosystems	Darmstadt, Deutschland
TransAM™ p53 Transcription Factor Assay Kit	Active Motif	Rixensart, Belgien
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Applied Science	Mannheim, Deutschland

2.1.2 Zelllinien

Die verwendete humane Hepatomzelllinie HepG2 (ATCC Bestellnummer: HB-8065, Lot. 3129867) wurde von ATCC (Manassas, USA) bezogen [139].

2.1.3 Gebrauchsmaterialien

Tabelle 2.5: Gebrauchsmaterialien

Name	Hersteller	Firmensitz
Kombitips plus, 2, 2,5, 5, 10 ml Eppendorf	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
PCR Reaktionsgefäße 0,2 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipetten, serologisch, 2, 5, 10, 25, 50 ml	Nunc (Thermo Fisher Scientific)	Langenselbold, Deutschland
Pipettenspitzen, unsteril, 200-300 µl	Brand	Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen, RNase-frei, steril, 10REACH, 20P, 100E, 200, 1000E	MolecularBioProducts	San Diego, USA
Reaktionsgefäße, Safe-Lock Tubes, RNase-frei, 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Reaktionsröhrchen, Cellstar, Plastik, 15 ml	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsröhrchen, Falcon tubes, Plastik, 50 ml (steril)	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
Rundbodenplatten 96-Well	Bilatec AG	Viernheim, Deutschland
Thermospri [®] nt PCR-Platten, 96- Well	Bilatec AG	Viernheim, Deutschland
6-Well Platte, Multiwell [™] 6- Well, steril	Becton Dickinson Labware	Franklin Lakes, USA
24-Well Platte, Cellstar, steril	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
96-Well Platten, steril, schwarz mit transparenten Boden	Becton Dickinson Labware	Franklin Lakes, USA

Name	Hersteller	Firmensitz
96-Well Platte, transparent, steril	Becton Dickinson Labware	Franklin Lakes, USA
96-Well Platte, transparent, ELISA Microplates	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
96-Well Platte, steril, weiß mit transparentem Boden	Becton Dickinson Labware	Franklin Lakes, USA
96-Well Platte, weiß, für luminometrische Tests	Nunc (Thermo Fisher Scientific)	Langensfeld, Deutschland
Zellkulturflaschen, Cellstar, T75	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen, Cellstar, T175	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber, steril	Corning Inc.	New York, USA

2.2 Geräte

Tabelle 2.6: Geräte

Name	Hersteller	Firmensitz
AbiPrism 7900 HT Sequence Detection System	Applied Biosciences	Darmstadt, Deutschland
Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Agilent Bioanalyzer Priming Station	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
BeadChip [®] Hyb Cartridge (Hybridisierungskammer)	Illumina Inc.	San Diego, USA
Brutschranke Hera cell	Heraeus GmbH	Hanau, Deutschland
CASY TTC Zellzählssystem	Schärfe System GmbH	Reutlingen Deutschland
Chemiluminometer Lumistar Galaxy	BMG Lab Technologies	Offenburg, Deutschland
Edelstahlkugeln	Qiagen	Hilden, Deutschland
Hybridisierungsöfen	Illumina Inc.	San Diego, USA
Illumina BeadArray Reader	Illumina Inc.	San Diego, USA
Illumina Sentrix [®] HumanRef-8 V2 BeadChip Arrays	Illumina Inc.	San Diego, USA
Hybex [™] Microarray Incubation	SciGene	Sunnyvale, USA

Name	Hersteller	Firmensitz
System		
Mikroplattenspektrophotometer MWG Discovery HT-R	AVISO	Jena, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitswerkbänke Herasafe	Heraeus GmbH	Hanau, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss	Jena, Deutschland
Mikrozentrifuge 5415R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Multifuge [®] 3S-R	Heraeus (Thermo Fisher Scientific)	Langenselbold, Deutschland
Mehrkanalpipetten 10-300µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
NanoDrop ND-1000,	NanoDrop Technologies	Wilmington, USA
Pipetten 2-1000µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipetten 2-1000µl	Gilson	Middleton, USA
Pipettierhilfe Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, Deutschland
pH-Meter 766 Calimatic	Knick GmbH & Co. KG	Berlin, Deutschland
QIAcube	Qiagen	Hilden, Deutschland
Reinstwasseraufbereitungsgerät Pure Lab Plus	ELGA	Celle, Deutschland
Schüttler Titramax [®] 101	Heidolph Instruments	Schwabach, Deutschland
Schüttler Phero-shaker	BIOTEC-FISCHER GmbH	Reiskirchen, Deutschland
Spektralphotometer Polarion	Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim, Deutschland
Sterilbank Hera [®] safe	Thermo Fisher Scientific (Heraeus)	Waltham, USA
Theonyx Liquid Performer	AVISO	Jena, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Thermocycler, Mastercycler gradient	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Thermocycler, Primus 96 advanced	PEQLab GmbH	Erlangen, Deutschland
Tissue Lyzer	Qiagen	Hilden, Deutschland
Vacuubrand Absaugpumpe BVC 01	Vacuubrand GmbH & CoKG	Wertheim, Deutschland
Vakuumkonzentrator (Concentrator 5301)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Versiegelungsgerät (TLDA)	Applied Biosciences	Darmstadt, Deutschland
Vortexer für Agilent-Chips	IKA [®] Werke GmbH	Staufen, Deutschland

Name	Hersteller	Firmensitz
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries	Bohemia, USA
Waage Navigator	Ohaus	Giessen, Deutschland
Waage Sartorius BP211D	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Wasserbad Julabo SW22	Julabo GmbH	Seelbach, Deutschland

2.3 Software

Tabelle 2.7: Software zur Datenanalyse

Name	Hersteller	Firmensitz
ABI PRISM [®] SDS 2.1	Applied Biosystems	Darmstadt, Deutschland
BeadScan	Illumina Inc.	San Diego, USA
BeadStudio 3.2	Illumina Inc.	San Diego, USA
ChemDraw [®] Ultra 8.0	Cambridge Soft Corporation	Cambridge, USA
2100 Expert software	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Expressionist [®] Analyst Pro Version 5.3.2	Genedata AG	Basel, Schweiz
GeneGo's MetaCore [™] Version 5.3	GeneGo	St. Joseph, USA
OriginLab Version 7.0	OriginLab	Northampton, USA
ToxWiz Version 2.3	Cambridge Cell Networks	Cambridge, UK

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 HepG2 Zellkultivierung

Für die Untersuchungen wurde als *in vitro*-System die humane Hepatomzelllinie HepG2 verwendet. Die HepG2-Zellen wurden erstmals im Jahr 1979 aus einem primären Hepatoblastom eines 11-jährigen argentinischen Jungen isoliert. Im Gegensatz zu Primärhepatozyten behalten die HepG2 in Kultur ihre Teilungsaktivität bei. Mit HepG2-Zellen konnten bereits für verschiedene Substanzklassen, z.B. für PAKs sowie aromatische und

heterozyklische Amine positive Resultate in Genotoxizitätstests (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT)-Test, Schwesterchromatidenaustausch, Mikronukleustest), verzeichnet werden [140].

Die Kultivierung der adhärenenten HepG2-Zellen erfolgte routinemäßig in DMEM-F12 Medium mit L-Glutamin und 15 mM HEPES versetzt mit 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Penicillin (10 IU/ml)-Streptomycinlösung (10 mg/ml), 0,1 % (v/v) Gentamicin (50 mg/ml) und 1 mM Natriumpyruvat bei 37 °C und 5 % CO₂ in Zellkulturflaschen. Nach dem Erreichen einer 80-100 %igen Konfluenz des Zellrasens wurden die Zellen passagiert oder für die Experimente ausgesät. Dazu wurden die Zellen einmal mit 10 ml warmen PBS und anschließend für 1 min mit Trypsin-EDTA versetzt. Nach dem Absaugen der Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ solange weiter inkubiert, bis sie sich von der Flaschenoberfläche lösten. Die Zellen wurden dann abgeklopft, im warmen Medium aufgenommen und in entsprechenden Verdünnungen in eine neue Zellkulturflasche oder Aussaatplatten überführt. Das Trypsin-EDTA- und Kulturmediumvolumen richtete sich nach den verwendeten Zellkulturflaschen und Platten (Tab. 2.8). Die optimalen Zellzahlen für die Aussaat wurden anhand der Wachstumsgeschwindigkeiten der entsprechenden Zellcharge festgelegt.

Zur Bestimmung der Zellzahl zur Aussaat für die Experimente wurden 20 µl der Zellsuspension in 10 ml Casy[®] ton resuspendiert und mit dem Casy TTC Zellzählsystem vermessen. Das Casy-Prinzip basiert auf der Messung von Widerständen von Zellen anhand ihrer Membranintegrität. Für die Messung wurden die Zellen in einer speziellen isotonen Elektrolytlösung, dem CASY[®] ton, suspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Präzisionsmesspore definierter Größe und Form gesaugt. Während der Messung wurde ein Niederspannungsfeld an die Kapillarstrecke angelegt. Intakte Zellen können dabei als Isolatoren betrachtet werden und verdrängen eine definierte Menge der Elektrolytlösung, die einen elektrischen Widerstand darstellt. Die Widerstandsänderung ist ein Maß für das Volumen der Zellen. Tote Zellen, deren Membranintegrität bereits zusammengebrochen ist, werden über die Größe ihres Zellkerns erfasst. Die Auswertung des Messsignals erfolgte anschließend mit einem Pulsflächenanalyseverfahren [141].

Tabelle 2.8: Zellzahl, Kulturmedium- und Trypsinvolumen für die Kultivierung/Aussaat und Behandlung von HepG2-Zellen

Kultur- gefäß	Wachstums- fläche	Zellzahl	Mediumfüll- volumen Aussaat/ Behandlung	Trypsin- volumen	Anwendung
T75 Flasche	75 cm ²	-	10 ml/ -	1 ml	Routinekultur
T175 Flasche	175 cm ²	-	20 ml/ -	2 ml	Routinekultur
96-Well	0,32-0,6 cm ²	0,04- 0,08x10 ⁶	0.2 ml/ 0.1 ml	-	Zellviabilitäts- und enzymatische Tests
6-Well	9,5 cm ²	0,75- 3x10 ⁶	2 ml/ 1 ml	-	Genexpressions- analysen, p53- Proteinbestimmung

2.4.2 Substanzbehandlung

Die Zellen wurden, wie unter 2.4.1 beschrieben, in den entsprechenden Zellkulturgefäßen für die jeweilige Anwendung ausgebracht und vor Beginn der Behandlung für mindestens 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Die Substanzen für die Versuche mit den genotoxischen Verbindungen (Tab. 2.9) wurden in DMSO gelöst und 200-fach verdünnt im Behandlungsmedium eingesetzt, um eine DMSO-Konzentration von 0.5 % (v/v) nicht zu überschreiten. DMSO sollte in geringen Konzentrationen eingesetzt werden, da höhere DMSO-Konzentrationen zytotoxische Effekte haben können und der Einfluss auf die Genexpression durch DMSO möglichst gering gehalten werden soll. Die Behandlung der Zellen erfolgte täglich. Die Genexpressionsexperimente wurden dreimal unter Verwendung von verschiedenen Zellpassagen zwischen Passage 3 und 25 wiederholt.

Die Behandlung für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von CYP-Enzymen und die Genexpressionsanalysen zur Charakterisierung der Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus in HepG2-Zellen erfolgte täglich über einen Zeitraum von drei Tagen. Die Substanzen (Induktoren) (Tab. 2.9) wurden für die Experimente in DMSO gelöst und 1.000-fach verdünnt im Behandlungsmedium eingesetzt, um eine DMSO-Konzentration von 0.1 % (v/v) nicht zu überschreiten. DMSO-Konzentrationen sollten

im Allgemeinen $\leq 0.2\%$ (v/v) betragen, da höhere Konzentrationen einen inhibitorischen Einfluss auf CYP-Enzyme haben können. Außerdem sollen lösungsmittelvermittelte Genexpressionsveränderungen möglichst gering gehalten werden. Als Induktoren, werden Stoffe bezeichnet, welche die Expression eines CYP-Enzyms steigern können (siehe Abschnitt 1.2.4.3). Diese Stoffe induzieren meist die Expression der CYP-Enzyme, von denen sie selbst metabolisiert werden. Als Induktoren wurden RIF, 3-MC und PB ausgewählt. RIF induziert effektiv CYP-Enzyme der 2C Familie (CYP2C8, CYP2C19, CYP2C9) sowie CYP3A4. PB induziert ebenfalls die Expression einer Reihe von CYP-Enzymen, wie z.B. CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9 und CYP3A4. 3-MC ist hingegen als Induktor für CYP1A2 geeignet. Die verwendeten Induktoren und die eingesetzten Konzentrationen orientierten sich an den Empfehlungen der Richtlinie für die Industrie im *Appendix C-3 In vitro Evaluation of CYP Induction* [142]. Zusätzlich wurden Zellviabilitätstests mit verschiedenen Konzentrationen der Induktoren durchgeführt, um einen Einfluss auf die Zellviabilität bei den verwendeten Dosierungen auszuschließen. Jedes Experiment wurde dreimal unter Verwendung von verschiedenen Zellpassagen zwischen Passage 3 und 25 durchgeführt.

Tabelle 2.9: Übersicht und Kategorisierung der verwendeten Substanzen

Genotoxische Verbindungen	Progenotoxische Verbindungen	Negativ-substanzen	CYP-Induktoren	CYP-Inhibitoren
Actinomycin D (ACT)	Cyclophosphamid (CPA)	Theophyllin (THEO)	Rifampicin (RIF)	Ketokonazol (KETO)
Methylmethan-sulfonat (MMS)	7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA)	Metformin (MET)	Phenobarbital (PB)	α -Naphthoflavon (α -NF)
Etoposid (ETO)	Diethylnitrosamin (DEN)		3-Methylcholanthren (3-MC)	
	Aflatoxin B ₁ (AFB1)			

Die Behandlung der HepG2-Zellen mit den progenotoxischen Verbindungen erforderte die Kokultivierung der Zellen mit einem System zur metabolischen Aktivierung (MAS) der Substanzen. Als MAS wurden S9 oder Mikrosomen eingesetzt. Dazu wurden 0,3 ml pro ml des Behandlungsmediums mit S9- oder Mikrosomenmix ersetzt. Die Zusammensetzung des S9- bzw. Mikrosomenmix ist in Tabelle 2.10 aufgeführt. Der verwendete Phosphatpuffer mit pH 7,4 (0,2 M) wurde durch Mischen von einer 0,4 M Dinatrium-

hydrogenphosphat-Heptahydratlösung mit einer 0,4 M Natriumdihydrogenphosphat-Monohydratlösung im Verhältnis 1:5 und anschließender Zugabe von sterilem Wasser im Verhältnis 1:2 hergestellt.

Die Substanzen für die Versuche wurden in Abhängigkeit von ihrer Löslichkeit entweder in Zellkulturmedium (CPA, DEN) oder DMSO (DMBA, AFB1) gelöst. Die in Kulturmedium gelösten Substanzen wurden 10- bis 100-fach in das Behandlungsmedium verdünnt und 0,2 % (v/v) DMSO zugesetzt, um ein einheitliches Behandlungsschema mit den DMSO-gelösten Substanzen zu erreichen. Die in DMSO gelösten Substanzen wurden 500-fach verdünnt eingesetzt, um eine DMSO-Konzentration von 0,2 % (v/v) nicht zu überschreiten. Aufgrund der begrenzten Löslichkeit der Substanzen musste auf 0,2 % (v/v) statt 0,1 % (v/v) DMSO, wie für die Charakterisierung des Fremdstoffmetabolismus eingesetzt wurde, ausgewichen werden. Die Zellen wurden über 6 h mit dem Substanz-MAS-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde das Behandlungsmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit Zellkulturmedium gewaschen und frisches Zellkulturmedium ohne Substanz zugegeben. Die Zellen wurden bis zum jeweiligen Test oder der nächsten Behandlung für weitere 18 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für Behandlungszeitpunkte von mehr als 24 h wurde die vorangehend beschriebene Prozedur mit 6 h Behandlungszeit und 18 h Erholungsphase täglich wiederholt.

Tabelle 2.10: Zusammensetzung des S9-Mix und Konzentrationen der Komponenten im Behandlungsmedium

Reagenz	Eingesetzte Menge pro 1 ml Mix	Endkonzentration im Behandlungsmedium
MgCl ₂ (0,4 M)/ KCl-Lösung (1,64 M)	0,02 ml	2,4 mM/ 9,8 mM
NADPH (0,1 M in 0,2 M Phosphatpuffer)	0,12 ml	3,6 mM
Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7,4)	0,50 ml	37,2 mM
steriles Wasser	ad 1,00 ml	-
S9 oder Mikrosomen	S9: 2500 pmol CYP oder 2,8 mg Protein Mikrosomen: 2000 pmol CYP	S9: 750 pmol CYP/ ml oder 0,84 mg Protein/ ml Mikrosomen: 600 pmol CYP/ ml

Für die Substanzen DMBA und AFB1 konnte bei höheren Konzentrationen bereits ohne Zugabe des MAS eine P53-Induktion detektiert werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine metabolische Aktivierung durch fremdstoffmetabolisierende Enzyme der HepG2-Zellen hin. Um die Hypothese zu stützen, wurden die HepG2-Zellen mit spezifischen Inhibitoren (Tab. 2.9) zur Reprimierung der CYP-Enzymaktivität behandelt.

Die HepG2-Zellen wurden für die Inhibitionsversuche 30 min mit dem entsprechenden Inhibitor vorinkubiert. Als Lösungsmittel für die Substanzen wurde DMSO verwendet. Der Inhibitor wurde 0,1 %ig (v/v) im Behandlungsmedium eingesetzt. Danach wurde das Behandlungsmedium abgesaugt und durch ein Behandlungsmedium mit der genotoxischen Substanz (1:1.000 verdünnt im Behandlungsmedium) und dem Inhibitor (1:1.000) ausgetauscht. Als Kontrolle wurde 0,2 % (v/v) DMSO (Lösungsmittelkontrolle) sowie die Inhibitoren allein eingesetzt. Um den DMSO-Gehalt immer konstant bei 0,2 % (v/v) zu halten, wurde bei der Vorinkubation und den Kontrollen 0,1 % (v/v) DMSO zugesetzt. Die Behandlungszeit mit den genotoxischen Substanzen betrug 6 h. Danach wurde das Medium abgesaugt und einmal mit frischem Medium gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen in Medium mit Inhibitor aber ohne genotoxische Substanz für weitere 18 h inkubiert. Die Behandlungsprozedur wurde am nächsten Tag wiederholt bis die Zellen nach 48 h (beginnend ab dem Zeitpunkt der ersten Behandlung am Tag eins) geerntet wurden.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolierung aus permanenten Zelllinien

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus permanenten Zelllinien wurde mit Hilfe des *RNeasy Mini* Kits einschließlich eines DNase-Verdau nach den Angaben des Herstellers Qiagen durchgeführt [143]. Zur Gewinnung der Zellysate wurde das Zellkultur- bzw. Behandlungsmedium nach Ende der Behandlungszeit abgenommen und die Zellen mit 800 µl PBS pro Well (Loch) gewaschen. Anschließend wurden die adhärenen Zellen in 350 µl *RLT Lysepuffer* (versetzt mit 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol) mit einem Zellschaber von der Oberfläche abgelöst. Das Lysat wurde zur Homogenisierung auf eine *Shreddersäule* pipettiert und für 3 min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Der Durchfluss wurde bis zur weiteren Aufbereitung bei -80 °C eingefroren.

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurden die tiefgefrorenen Proben aufgetaut und für 15 min bei 37 °C im Thermoblock äquilibriert, um ein vollständiges Lösen der im Puffer enthaltenen Salze zu gewährleisten. Anschließend wurden die Lysate für 3 min bei maximaler Drehzahl zentrifugiert und der Überstand des Durchflusses in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Proben mit 350 µl 70 %igem Ethanol versetzt, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und auf eine RNA-bindende Säule pipettiert. Nach Zentrifugation bei 10.000 rpm für 30 s wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit 350 µl *RWI-Puffer* gewaschen. Um verbleibende Reste von genomischer DNA zu entfernen wurden 80 µl eines Gemisches aus 10 µl DNase I und 70 µl *RDD-Puffer* auf die Säule gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Säule erst mit 350 µl *RWI-Puffer* und dann mit 500 µl *RPE-Puffer* bei 10.000 rpm für 30 s gewaschen. Ein zweiter *RPE*-Waschschritt unter Zentrifugation bei 10.000 rpm für 2 min wurde zum Trocknen der Silicagel-Membran durchgeführt. Nach einer zusätzlichen Trocknungszentrifugation für 1 min bei maximaler Drehzahl mit einem neuen Säulenauffanggefäß wurden die Proben mit 30-50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA-Proben bei -80 °C gelagert.

2.5.2 Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren

2.5.2.1 Konzentrationsbestimmungen mit dem NanoDrop

Zur Bestimmung der Konzentration von RNA, cRNA und cDNA wurde das NanoDrop Spektrophotometer verwendet. Für die Messung wurde 1 µl der Probe auf die Probenvorrichtung, welche ein Glasfaserkabel enthält, pipettiert. Durch Schließen des Gerätes gelangt das im Deckel eingesetzte Glasfaserkabel ebenfalls mit der Flüssigkeitsoberfläche in Kontakt, wodurch eine Flüssigkeitsbrücke zwischen beiden Glasfaserkabeln entsteht. Eine Xenon-Blitzlampe erzeugt Licht, dessen Durchtritt durch die Probe von einem Silizium-CCD Chip detektiert wird. Das Resultat ist ein UV-Vis Spektrum im Bereich von 220-750 nm. Zur Berechnung der Konzentration wurde die Absorption bei 260 nm zugrunde gelegt. Eine OD = 1 entspricht dabei 33 µg/ml RNA, 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml einzelsträngiger DNA. Der Quotient der Absorption bei A₂₆₀ nm/ A₂₈₀ nm ist ein Qualitätsparameter und gibt Aufschluss über Verunreinigungen mit Proteinen oder aromatischen Verbindungen, wie Phenol,

welche bei 280 nm ein Absorptionsmaximum zeigen. Der Quotient sollte für reine RNA ungefähr zwischen 1.8 und 2.0 liegen, kann jedoch in Abhängigkeit von der Nukleotidzusammensetzung und dem pH-Wert der Lösung variieren [144].

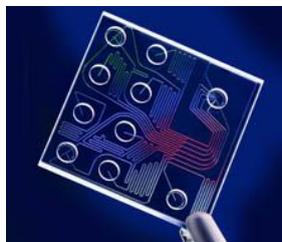
2.5.2.2 Qualitätskontrolle mit dem Agilent Bioanalyzer

Zur Kontrolle der Qualität der RNA und cRNA sowie zur Bestimmung der Konzentration von cDNA wurde die *Lab-on-a-Chip*-Technologie von Agilent Technologies verwendet. Mit dem Agilent Bioanalyzer können mit Hilfe spezieller Chip-Systeme Nucleinsäuren elektrophoretisch vermessen werden. Agilent Technologies bietet daneben auch Chips für die Proteinanalyse sowie durchflusszytometrische Tests mit Zellen an. Das Messprinzip (Abb. 2.1) basiert auf der Mikrofluidik-Technik, das heißt der Steuerung winziger Flüssigkeitsmengen in miniaturisierten Systemen. Das Innere eines Chips besteht aus Systemen winziger geschlossener Kanäle und Wells, die in einen Glas- oder Kunststoff-Mikrochip geätzt sind. Durch Druck oder elektrokinetische Kräfte strömen die Proben kontrolliert durch die vorgegebenen Kanäle. Im Separationskanal werden die Probenbestandteile dann für die nachfolgende Detektion aufgetrennt. Die Detektion erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes, welcher gemeinsam mit der Gelmatrix in die Kanäle appliziert wurde [145].

A RNA Nano LabChip



B Kern eines LabChip



C Prinzip des Lab-on-a-Chip Systems

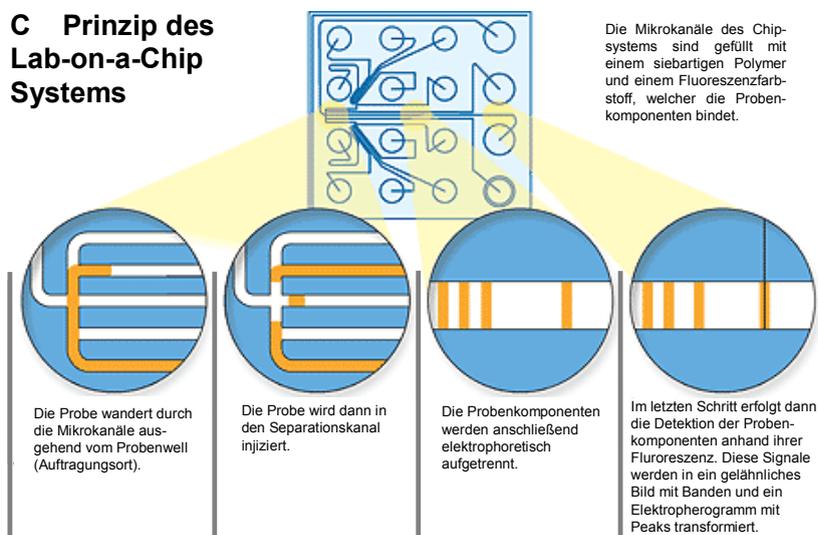


Abbildung 2.1: Das Lab-on-a-Chip-Prinzip. Die Abbildung zeigt einen RNA Nano Lab-Chip (A) und seinen inneren Aufbau mit dem Kanalsystem (B). Das Messprinzip (C) basiert auf einer elektrophoretischen Auftrennung der Proben und dem Nachweis mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes. [Abb. modifiziert nach 145, 146, 147]

Die gemessenen Fluoreszenzsignale wurden anschließend mit der 2100 Expert Software in ein Elektropherogramm und gelähnliches Bild transformiert. Zudem wurden Qualitätsparameter und die Konzentrationen der Proben mit dieser Software berechnet. Die Konzentrationen werden mit Hilfe der Fläche unter dem Elektropherogramm der Probe im Vergleich zur Fläche der entsprechenden RNA-Leiter (Abb. 2.2) mit bekannter Konzentration kalkuliert.

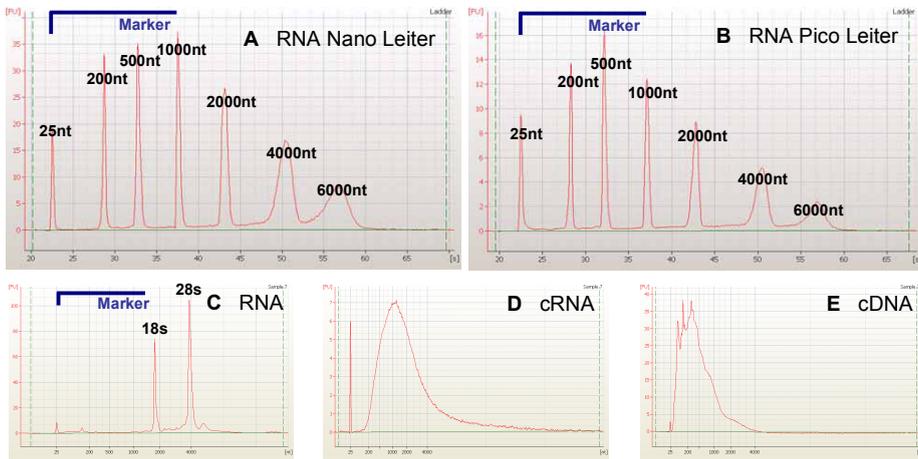


Abbildung 2.2: Elektropherogramme von Gesamt-RNA (C), cRNA (D), cDNA (E) und den zugehörigen RNA-Leitern (A/B) aufgenommen mit dem Agilent Bioanalyzer.

Die Messung der RNA und cRNA erfolgte mit den *Agilent RNA 6000 Nano Chips* und dem zugehörigen *Agilent RNA 6000 Nano Kit*. Der qualitative Bereich des Systems liegt bei 25-500 ng/µl RNA-Konzentration der Probe. Mit den *Agilent RNA 6000 Nano Chips* können 12 Proben gleichzeitig analysiert werden. Alle im Kit enthaltenen Reagenzien wurden zunächst auf Raumtemperatur äquilibriert, bevor mit dem Protokoll begonnen wurde. Danach wurden 550 µl der *Agilent RNA 6000 Nano Gelmatrix* in ein Zentrifugationsfiltrerröhrchen mit Auffanggefäß pipettiert und für 10 min bei 1.500 x g zentrifugiert. Das gefilterte Gel wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und kann bei Einhaltung der Lagerungstemperatur von 4 °C bis zu einem Monat lang verwendet werden. Vom gefilterten Gel wurden 65 µl mit 1 µl RNA 6000 Nano Farbstoffkonzentrat, welches vorher durch Vortexen sorgfältig gemischt und anschließend herunterzentrifugiert wurde, vermischt. Das Gel-Farbstoffgemisch wurde für 10 min bei Raumtemperatur mit 13.000 x g zentrifugiert. Ein *Agilent RNA Nano Chip* wurde in die Vorbereitungsrichtung (*Priming Station*) eingelegt und 9 µl des Gel-Farbstoffgemisches in das untere der drei mit „G“ gekennzeichneten Wells pipettiert. Danach wurde die Vorrichtung für 30 s geschlossen, um das Gel-Farbstoffgemisch in den Kapillaren des Chips zu verteilen. Danach wurden jeweils 9 µl in die beiden oberen Gelwells verteilt. Anschließend wurden 5 µl *RNA 6000 Nano Marker* in jedes Probenwell und das Well für die Leiter pipettiert. Die Proben und die RNA-Leiter wurden für 2 min bei 70 °C denaturiert, bevor 1 µl in das jeweilige Well aufgetragen

wurde. Der Chip wurde danach für 60 s bei 2.400 rpm gevortext, bevor die Messung im Agilent Bioanalyzer gestartet wurde [148].

Das Elektropherogramm der Gesamt-RNA zeigt zwei Peaks der ribosomalen RNA-Untereinheiten 18s und 28s bei ca. 1800 nt bzw. 3800 nt (Abb. 2.2C). Als Qualitätsparameter dient bei der Gesamt-RNA die so genannte RNA-Integritätsnummer (RIN), welche Hinweise auf mögliche Degradation der RNA-Probe widerspiegelt. Ein zweiter Qualitätsparameter, der ebenfalls von der 2100 Expert Software automatisch für jede Probe kalkuliert wird, ist das Verhältnis der ribosomalen RNAs 28s zu 18s. Hoch qualitative RNA sollte etwa ein Verhältnis der beiden rRNAs von 2,0 oder größer aufweisen. Mit zunehmender Degradation sinkt das Verhältnis der beiden rRNAs ab. Allerdings ist es schwierig einen festen Grenzwert für die Qualität der RNA festzulegen, da das 28s/ 18s-Verhältnis oft eine große Variabilität in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration der RNA zeigt. Die RIN erwies sich dagegen als gut reproduzierbarer Parameter, da der verwendete Algorithmus zu ihrer Berechnung das gesamte Elektropherogramm mit einbezieht [149, 150]. Die RIN kann Werte von 1 bis 10 einnehmen, wobei 1 „am meisten degradiert“ und 10 „am intaktesten“ bedeutet. Zur Entwicklung der RIN wurden 1.300 RNA-Proben aus verschiedenen Geweben vom Menschen, der Ratte und der Maus mit verschiedener Qualität von Fachleuten untersucht und einer RIN zugeordnet. Die Elektropherogramme wurden anschließend mit Hilfe von bioinformatischen neuronalen Netzwerken, welche adaptive, fehler-tolerante Lernsysteme darstellen, analysiert. Solche Netzwerke erlauben es kritische Eigenschaften aus den Elektropherogrammen zu extrahieren (z.B. Signalflächen, -intensitäten oder -verhältnisse) und wurden genutzt um einen Algorithmus zur Berechnung der RIN aufzustellen. Abbildung 2.3 zeigt Beispiele für RNA-Proben mit unterschiedlicher Qualität und die zugeordnete RIN [149, 150].

Die RIN erlaubt es anhand von experimentellen Erfahrungen Grenzwerte festzulegen, welche als Minimum für nachfolgenden Applikationen, wie real-time-PCR oder Microarrays, gelten. Für die Microarrayexperimente in dieser Arbeit sollte die RNA möglichst eine RIN größer oder gleich 7 besitzen. Dieser Wert ist ein Erfahrungswert und wurde willkürlich festgelegt.

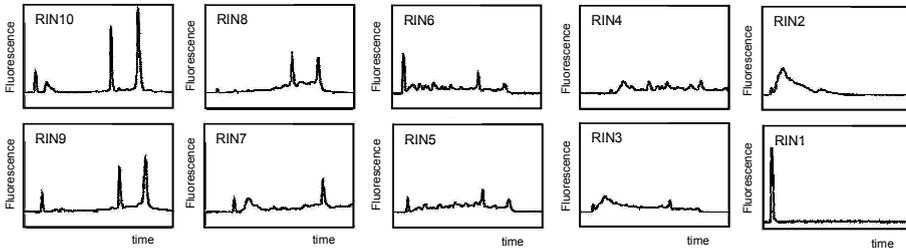


Abbildung 2.3: RNA Integritätskategorien. Die Abbildung zeigt die verschiedenen RNA-Integritätskategorien von 1 (vollständig degradiert) bis 10 (intakt) mit den entsprechenden Beispielelektropherogrammen. Mit abnehmender Qualität kommt es zu einer Verschiebung zu kürzeren Fragmentgrößen. [Abb. modifiziert nach 150]

Im Gegensatz zur Gesamt-RNA wurden zur Überprüfung der Qualität der biotinylierten cRNA andere Parameter verwendet. cRNA ist aufgrund der Synthese und Amplifikationsprozedur eine Mischung aus Fragmenten verschiedener Länge und zeigt sich im Elektropherogramm als ein breites Spektrum im Bereich von 250–5500 nt mit einem Peak bei ungefähr 1.000–1.500 nt (Abb. 2.2D).

Für die Messung der cDNA wurden Agilent *RNA 6000 Pico* Chips in Kombination mit dem *Agilent RNA 6000 Pico* Kit verwendet. Der Kit erlaubt die Quantifizierung einzelsträngiger Nukleinsäuren im Bereich von 250–5000 pg/µl. Die *Agilent RNA 6000 Pico* Chips erlauben es, 11 Proben gleichzeitig zu untersuchen. Alle im Kit enthaltenen Reagenzien wurden auf Raumtemperatur äquilibrieren gelassen, bevor mit dem Protokoll begonnen wurde. Anschließend wurden 550 µl der *Agilent RNA 6000 Pico* Gelmatrix in ein Zentrifugationsfiltrerröhrchen mit Auffanggefäß pipettiert und für 10 min bei 1.500 x g zentrifugiert. Vom gefilterten Gel wurden 65 µl mit 1 µl *RNA 6000 Pico* Farbstoffkonzentrat, welches vorher durch Vortexen sorgfältig gemischt und anschließend herunterzentrifugiert wurde, vermischt. Das Gel-Farbstoffgemisch wurde für 10 min bei Raumtemperatur mit 13.000 x g zentrifugiert. Ein *Agilent RNA Pico* Chip wurde in die Vorbereitungsvorrichtung (*Priming Station*) eingelegt und 9 µl des Gel-Farbstoffgemisches in das untere der drei mit „G“ gekennzeichneten Wells pipettiert. Danach wurde die Vorrichtung für 30 s geschlossen, um das Gel-Farbstoffgemisch in den Kapillaren des Chips zu verteilen. Danach wurden jeweils 9 µl in die beiden oberen Gelwells verteilt. Anschließend wurden zuerst 9 µl *RNA 6000 Pico* Konditionierungslösung in das entsprechende Well und dann 5 µl *RNA 6000 Pico* Marker in jedes Probenwell und das Well für die Leiter pipettiert. Die RNA-Leiter wurde mit Nuklease-

freiem Wasser 1:5 verdünnt und denaturiert (2 min bei 70 °C) eingesetzt, 1 µl der RNA-Leiter und der Proben in das jeweilige Well aufgetragen und der Chip danach für 60 s bei 2.400 rpm gevortext. Die Messung erfolgte anschließend mit dem Agilent Bioanalyzer [151]. Das entstehende Elektropherogramm der cDNA ist ein breites Spektrum im Bereich von 50 nt bis 4000 nt mit einem Maximum bei etwa 100 nt bis 500 nt (Abb. 2.2E).

2.5.3 Real-time PCR

2.5.3.1 cDNA-Synthese

Von der aus den Zellen isolierten Gesamt-RNA wurden 2-5 µg in der reversen Transkription mit dem *Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* unter Nutzung von hexameren Zufallsprimern (*Random hexamer primers*) und einer rekombinanten reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese spezielle Reverse Transkriptase ist thermostabil und hochsensitiv und besitzt eine RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität sowie die Fähigkeit zum Entwinden von Nukleinsäuren. Zudem hat das Enzym eine intrinsische RNase-Aktivität, welche den Abbau der RNA in RNA:DNA-Hybriden vermittelt. Aufgrund der RNase-Aktivität entfällt ein zusätzlicher RNase H-Verdauschnitt. Die Verwendung von Zufallsprimern erlaubt es, alle RNA-Sequenzen in cDNA umzuschreiben, auch wenn kein Poly(A)-Ende mehr vorhanden ist [152]. Tabelle 2.11 enthält die für die Reaktion verwendeten Reagenzien und Volumina. Die PCR wurde in 0,2 ml Eppendorf-Gefäßen angesetzt und im Thermocycler wie folgt inkubiert: 10 min bei 25 °C und 1 h bei 50 °C zur Synthese der cDNA, 5 min bei 85 °C zur Inaktivierung der reversen Transkriptasereaktion und Abkühlen auf 4 °C. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.11: Ansatz für die cDNA-Synthese

Reagenz	Volumen pro Reaktion in μl
RNA-Probe	11,0
Random hexamer Primer	2,0
5x RT Reaktionspuffer	4,0
RNase Inhibitor	0,5
dNTPs	2,0
Reverse Transkriptase	0,5
Gesamtvolumen	20,0

2.5.3.2 TaqMan™ low density arrays (TLDAs)

Zur Charakterisierung der HepG2-Zellen bezüglich ihrer Expression an fremdstoffmetabolisierenden Enzymen, Transkriptionsfaktoren und Transportern wurden 45 ausgewählte Gene mit Hilfe von *TaqMan™ low density arrays* (TLDAs) untersucht. Tabelle 2.12 gibt eine Übersicht über die individuell angefertigte TLDA-Karte „Human DME“ mit den untersuchten 41 Ziel- und 3 Referenzgenen (*Housekeeper*).

Tabelle 2.12: Genbeschreibungen der Gene der TLDA-Karte „Human DME“

Die Kodierung von Applied Biosystems (ABI) besteht aus dem Symbol für die Spezies (Hs = Homo sapiens), einer 8-stelligen Nummer von ABI für den Test und einem Kürzel mit Informationen zur Sonde: s = Primer und Sonde binden innerhalb eines Exons, genomische DNA wird deshalb detektiert; m = Sonde hybridisiert über eine Exon-Exon-Grenze hinweg, keine Detektion von genomischer DNA; g = mit diesem Test könnte auch genomische DNA detektiert werden; mH = dieser Test ist für ein Transkript, das zu einer Genfamilie mit hoher Sequenzhomologie gehört. Der Test ist jedoch speziell entwickelt, dass das entsprechende Transkript mit einer C_T -Differenz von 10-15 Einheiten bzw. einer 1.000-30.000-fach höheren Sensitivität als das naheste Homolog detektiert wird. Die Zahlen hinter dem Buchstaben für die Sondencodierung geben das Exon an, innerhalb dem die Sonde bindet, z.B. 1 = Sonde bindet innerhalb von Exon 1.

Gensymbol	Genname	ABI-Kodierung	RefSeq-ID
<i>Housekeeper</i>			
18S	18S rRNA	Hs99999901_s1	NR_003286.2
B2M	beta-2-microglobulin	Hs99999907_m1	NM_004048.2
PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	Hs99999904_m1	NM_021130.3

Gensymbol	Genname	ABI-Kodierung	RefSeq-ID
CYP-Enzyme (Phase I)			
CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	Hs00153120_m1	NM_000499.3
CYP1A2	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2	Hs00167927_m1	NM_000761.3
CYP2A6	cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 6	Hs00868409_s1	NM_000762.5
CYP2B6	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6	Hs00167937_g1	NM_000767.4
CYP2C18	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 18	Hs01595322_mH	NM_000772.2/ NM_001128925.1
CYP2C19	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19	Hs00426380_m1	NM_000769.1
CYP2C8	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8	Hs00258314_m1	NM_000770.3
CYP2C9	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9	Hs00426397_m1	NM_000771.3
CYP2D6	cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6	Hs00164385_m1	NM_000106.4
CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	Hs00559368_m1	NM_000773.3
CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	Hs00430021_m1	NM_017460.3
CYP3A5	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5	Hs00241417_m1	NM_000777.2
CYP3A7	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 7	Hs00426361_m1	NM_000765.2
Phase II-Enzyme			
GSTA1	glutathione S-transferase A1	Hs00275575_m1	NM_145740.3
GSTP1	glutathione S-transferase pi	Hs00168310_m1	NM_000852.3
SULT1A1, 1A2, 1A3, 1A4	sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 2	Hs00236900_m1	NM_001055.2, NM_001054.2/ NM_177528.1, NM_003166.3/ NM_177552.2, NM_001017389.1/ NM_001017390.1
UGT1A9, 1A5, 1A10, 1A4, 1A3, 1A7, 1A8, 1A1, 1A6	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A10	Hs00166592_m1	NM_021027.2, NM_019078.1, NM_019075.2, NM_007120.2, NM_019093.2, NM_019077.2, NM_019076.4, NM_000463.2, NM_001072.3/ NM_205862.1
UGT1A6	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A6	Hs01592477_m1	NM_001072.3/ NM_205862.1
UGT2B7	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B7	Hs00426592_m1	NM_001074.2
Nukleäre Rezeptoren/ Transkriptionsfaktoren			
AHR	aryl hydrocarbon receptor	Hs00169233_m1	NM_001621.3
HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	Hs00230853_m1	NM_000457.3/ NM_001030003.1/ NM_001030004.1/ NM_175914.3/ NM_178849.1/ NM_178850.1

Gensymbol	Genname	ABI-Kodierung	RefSeq-ID
NR0B2 (SHP)	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2	Hs00222677_m1	NM_021969.2
NR1H2 (LXRB)	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2	Hs00173195_m1	NM_007121.4
NR1H3 (LXRA)	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	Hs00172885_m1	NM_001130101.1/ NM_001130102.1/ NM_005693.2
NR1H4 (FXR)	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	Hs00231968_m1	NM_005123.2
NR1I2 (BXR, PXR)	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2	Hs00243666_m1	NM_003889.3/ NM_022002.2/ NM_033013.2
NR1I3 (CAR)	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3 (constitutive androstane receptor)	Hs00231959_m1	NM_001077469.1 (Isoform 6), 14 weitere Isoformen werden von diesem Genlocus erfasst
NR2F2 (COUPTFB)	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	Hs00819630_m1	NM_021005.2
NR3C1 (GR)	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	Hs00230818_m1	NM_000176.2/ NM_001018074.1/ NM_001018075.1/ NM_001018076.1/ NM_001018077.1/ NM_001020825.1/ NM_001024094.1
Transporter			
ABCB11 (BSEP)	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11	Hs00184824_m1	NM_003742.2
ABCB1 (MDR1)	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	Hs00184491_m1	NM_000927.3
ABCB4 (MDR2/3)	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	Hs00240956_m1	NM_000443.3/ NM_018849.2/ NM_018850.2
ABCC1 (MRP1)	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	Hs00219905_m1	NM_004996.3/ NM_019862.2/ NM_019898.2/ NM_019899.2/ NM_019900.2
ABCC2 (cMOAT, MRP2)	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	Hs00166123_m1	NM_000392.3
ABCC3 (cMOAT2, MRP3)	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	Hs00358656_m1	NM_001144070.1/ NM_003786.3
SLC10A1 (NTCP)	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1	Hs00161820_m1	NM_003049.2
SLC22A1 (OCT1)	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1	Hs00427550_m1	NM_003057.2/ NM_153187.1
SLCO1A2 (OATPA)	solute carrier organic anion transporter family, member 1A2	Hs00366488_m1	NM_021094.3/ NM_134431.3
SLCO1B1 (LST1, OATP2)	solute carrier organic anion transporter family, member 1B1	Hs00272374_m1	NM_006446.3
SLCO1B3 (LST3, OATP8)	solute carrier organic anion transporter family, member 1B3	Hs00251986_m1	NM_019844.2
SLCO2B1 (OATPB)	solute carrier organic anion transporter family, member 2B1	Hs00200670_m1	NM_007256.2

TLDAs sind eine Weiterentwicklung der *TaqMan*TM Assays von Applied Biosystems. Eine TLDA-Karte enthält 384-Wellen und 8 Probenkanäle, die es erlauben bis zu 48 Gene pro Probe parallel zu bestimmen. Der Vorteil in der Verwendung von TLDAs im Vergleich zu den einfachen *TaqMan*TM Tests liegt im viel geringeren Arbeitsaufwand, da die Sonde und Primer für jedes Gen bereits als Lyophilisate in den Wells vorliegen. Über ein spezielles Kanalsystem wird eine Probe nach dem Auftragen auf die 48 verschiedenen Wells verteilt.

Das Prinzip der TLDAs entspricht einer real-time-PCR mit einer *TaqMan*TM Sonde. Die Idee einer solchen fluorogenen Sonde wurde im Jahr 1993 von Lee und seinen Mitarbeitern erstmals umgesetzt [153]. Eine *TaqMan*TM Sonde ist komplementär zur Sequenz des Zieltranskripts und sollte eine Länge von 20-30 Nukleotiden besitzen, um eine ausreichende Spezifität zu gewährleisten. Die Sonde enthält am 5'-Ende einen fluorogenen Reporter (Fluoreszeinderivat) und am 3'-Ende einen Quencherfarbstoff (Rhodaminderivat). Als Quencher wird standardmäßig FAM (6-Carboxy-Fluorescein) und als Reportermolekül TAMRA (6-Carboxy-Tetramethylrhodamin) verwendet. Die Bindung an das Oligonukleotid hält Reporter und Quencher in räumlicher Nähe, so dass bei Anregung einer intakten Sonde bei 488 nm die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt wird. Während der PCR hybridisiert die Sonde zunächst an die Matrize. Bei der Amplifikation durch die Taq-Polymerase kommt es durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität zur Zersetzung der Sonde und somit zur Trennung des Reporters vom Quencher. Damit wird der FET zwischen Reporter und Quencher unterbrochen und die Detektion eines Fluoreszenzsignals möglich. Mit der Akkumulation des PCR-Produktes steigt die Fluoreszenz mit jedem PCR-Zyklus an [154, 155]. Einen Überblick über die Reaktionsfolge gibt Abbildung 2.4.

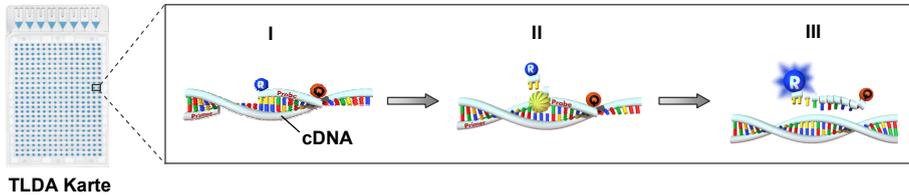


Abbildung 2.4: *TaqMan™ low density arrays* und das *TaqMan™ PCR-Prinzip*. Die Abbildung zeigt schematisch die Reaktion, welche in den Mikrowells einer TLDA-Karte stattfindet: **I** Anlagerung der beiden PCR Primer (Forward und Reverse) und der sequenz-spezifischen TaqMan™-Sonde an die spezifische Target-cDNA der Probe. **II** Primerverlängerung durch die Taq DNA-Polymerase (gelb) unter Hydrolyse der fluorogenen Sonde. **III** Synthese des PCR Produktes und Separation von Reporter und Quencher. Das detektierte Fluoreszenzsignal wächst in Anhängigkeit der freigesetzten Reportermoleküle an. [Abb. modifiziert nach 155, 156]

Da einige CYP-Enzyme erst nach Induktion exprimiert werden, wurden die Zellen für die TLDA-Experimente mit den Induktoren PB, 3-MC und RIF, wie unter 2.4.1/ 2.4.2 beschrieben, ausgesät und behandelt. Die RNA wurde mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* isoliert (siehe Abschnitt 2.5.1.1) und in cDNA revers transkribiert (siehe Abschnitt 2.5.3.1). In jeden Probenkanal der TLDA-Karten wurden 100 µl einer Suspension aus 100 ng cDNA-Probe (resuspendiert in 50 µl Nuklease-freiem Wasser) und 50 µl *TaqMan® Universal PCR Mastermix* appliziert. Die Karten wurden anschließend in eine spezielle Halterung gesetzt und zweimal für je 1 min bei 1200xg zentrifugiert, um die Probe gleichmäßig über die 48 Wells eines Probenkanals zu verteilen. Danach wurden die Kanäle mit einem speziellen Gerät versiegelt und die Probenreservoirs abgetrennt. Die PCR-Reaktion und fluorimetrische Detektion wurden anschließend im ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt/ Deutschland) durchgeführt.

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen gefahren:

2 min bei 50 °C zur Initiation der Reaktion

10 min bei 94,5 °C zur Aktivierung der Taq Polymerase

30 s bei 97 °C zur Denaturierung

1 min bei 59,7 °C zur Anlagerung und Elongation

} 45 Zyklen

Die Auswertung der Daten und Berechnung der C_t -Werte erfolgte mit der ABI Prism 7900HT SDS Software 2.1. Für die Analyse wurden dazu die gemessenen Intensitäten des Fluoreszenzsignals gegen die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen. Anschließend wurden die Kurven analysiert und für jede Kurve (entspricht einem Gen) ein C_t -Wert ermittelt. Dieser C_t -Wert (Threshold-Cycle = Schwellenwertzyklus) gibt die Zyklenzahl an, die bis zur Erreichung des Schwellenwertes nötig sind. Der Schwellenwert entspricht dabei dem Mittelpunkt des exponentiellen Anstiegsbereiches der aufgetragenen Kurven. Je größer die Ausgangskopienzahl eines Gens ist, desto eher wird der Schwellenwertzyklus erreicht und umso kleiner ist der C_t -Wert für das Gen.

Die Genregulationen wurden anschließend mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode von Livak und Schmittgen berechnet. Bei dieser Methode wird die Regulation eines Gens (R) bezogen auf das entsprechende Gen der Lösungsmittelkontrollprobe und einen *Housekeeper* z.B. Cyclophilin A (PPIA) berechnet [157]:

$$R = \frac{E_{T \text{ arg etgen}}^{\Delta C_t(\text{Kontrolle-Pr obe})}}{E_{\text{Housekeeper}}^{\Delta C_t(\text{Kontrolle-Pr obe})}} = \frac{E_{T \text{ arg et}}^{C_t \text{ Kontrolle}}}{E_{\text{Housekeeper}}^{C_t \text{ Kontrolle}}} \left. \vphantom{\frac{E_{T \text{ arg et}}^{C_t \text{ Kontrolle}}}{E_{\text{Housekeeper}}^{C_t \text{ Kontrolle}}}} \right\} \text{Term 1 (Kontrolle)}$$

$$\frac{E_{T \text{ arg et}}^{C_t \text{ Probe}}}{E_{\text{Housekeeper}}^{C_t \text{ Probe}}} \left. \vphantom{\frac{E_{T \text{ arg et}}^{C_t \text{ Probe}}}{E_{\text{Housekeeper}}^{C_t \text{ Probe}}}} \right\} \text{Term 2 (behandelte Probe)}$$

Formel 2.1: Berechnung der Genregulation nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

R	Regulation eines Gens
E	reale Effizienz
C_t	Schwellenwertzyklus
ΔC_t	Differenz der C_t -Werte von Kontrolle und Probe

Die Variable E steht für die Effizienz mit der die Amplifikation während der PCR erfolgt. Theoretisch erfolgt in der exponentiellen Phase eine Verdoppelung der Kopienzahl ($E = 2$) in jedem PCR-Zyklus. Dieser Wert wird in der Realität jedoch nicht immer erreicht und muss deshalb vor dem Versuch für jedes Gen einer TLDA-Karte ermittelt werden. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe mit cDNA bekannter Konzentration hergestellt: 0,1 ng, 0,5 ng, 1 ng, 5 ng, 10 ng, 50 ng, 100 ng, 500 ng pro 100 μ l Probenansatz (50 μ l Probe und 50 μ l *TaqMan*[®] *Universal PCR Mastermix*). Die cDNA wurde durch reverse Transkription von Gesamt-RNA aus unbehandelten HepG2-Zellkulturproben gewonnen. Zur Auswertung wurden die C_t -Werte gegen den

Logarithmus der cDNA-Konzentrationen aufgetragen und der Anstieg der Geraden (m) ermittelt. Die reale Effizienz E wurde anschließend aus der Zehnerpotenz des negativen Kehrwertes des Geradenanstiegs nach Formel 2.2 berechnet. Diese ermittelte reale Effizienz wurde zur Berechnung der Genregulationen mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode herangezogen. Die ermittelten Effizienzwerte sind in Anhang 3 zusammengestellt.

$$E = 10^{\frac{-1}{m}}$$

Formel 2.2: Berechnung der realen Effizienzen für die Gene der TLDA-Experimente anhand der cDNA-Eichkurven.

E reale Effizienz
m Anstieg der Eichkurve

Zur Prüfung auf statistische Signifikanz wurde der Student's T-Test verwendet (siehe Abschnitt 2.7.5). Dazu wurden die auf den *Housekeeper* normalisierten Werte der Effizienzen (E) potenziert mit dem entsprechenden C_t -Wert der behandelten Proben (Term 2) gegen die Kontrollen (Term 1) getestet (siehe Formel 2.1).

Für den Vergleich der Basalexpression von HepG2 mit humanen Hepatozytenkulturen wurden die ausschließlich mit dem Lösungsmittel (DMSO) behandelten Proben herangezogen. Die Daten der humanen Hepatozytenkulturen sind interne bereits publizierte Daten [158]. Die Leberproben stammen von Biopsien männlicher Patienten und wurden, wie von Richert *et al.* beschrieben, in einer Monolayerkultur ausplattiert [158]. Analog der $\Delta\Delta C_t$ -Methode wurde die Regulation in HepG2 im Vergleich zu den humanen Hepatozyten nach Formel 2.3 berechnet:

$$R = \frac{\frac{E_{T\ arg\ et}^{C_{t\ Kontrolle}}}{E_{Housekeeper}^{C_{t\ Kontrolle}}}}{\frac{E_{T\ arg\ et}^{C_{t\ Kontrolle}}}{E_{Housekeeper}^{C_{t\ Kontrolle}}}} \left. \vphantom{\frac{E_{T\ arg\ et}^{C_{t\ Kontrolle}}}{E_{Housekeeper}^{C_{t\ Kontrolle}}}} \right\} \text{Term 1 (humane Hepatozyten)}$$

$$\left. \vphantom{\frac{E_{T\ arg\ et}^{C_{t\ Kontrolle}}}{E_{Housekeeper}^{C_{t\ Kontrolle}}}} \right\} \text{Term 2 (HepG2)}$$

Formel 2.3: Berechnung der relativen Basalexpression von HepG2 im Vergleich zu humanen Hepatozyten.

R Regulation eines Gens in humanen Hepatozytenkulturen im Vergleich zu HepG2
E reale Effizienz
 C_t Schwellenwertzyklus

2.5.4 Illumina

2.5.4.1 Illumina-Technologie

Die amerikanische Firma Illumina brachte im Jahr 2005 eine neue, kostengünstige Technologie für die globale Genexpressionsanalyse auf den Markt [159]. Die so genannte *Illumina Sentrix[®] BeadChip*-Technik unterscheidet sich von den Affymetrix-Microarrays, welche als Gold-Standard in der Genomanalyse gelten, in der Art der Oligonukleotide und wie diese auf die Chipoberfläche aufgebracht sind. Illumina nutzt im Vergleich zum Affymetrix kurze 50-Basen große Oligonukleotidsequenzen, welche mit einer 29-Basen-Adressequenz verbunden sind und mittels Standardoligonukleotidsynthese hergestellt werden (Abb. 2.5A) [160]. Die genspezifischen Sequenzen der Oligonukleotide wurden anhand der NCBI Referenzsequenz- (*National Center for Biotechnology Information Reference Sequence*) Datenbank ausgewählt. Dabei wurde ein spezieller mehrstufiger Algorithmus benutzt, der Parameter, wie Ungleichheit zu anderen Gensequenzen, die Abwesenheit repetitiver genomischer Sequenzen, Selbstkomplementarität und die Schmelztemperatur mit einbezieht [161, 162]. Die Oligonukleotide werden nach ihrer Synthese kovalent an 3 µm große Silikakugeln (*Beads*) gebunden. Jeder Kugeltyp enthält dabei mehr als 10^8 Kopien einer spezifischen Oligonukleotidsequenz für ein Transkript und ist ungefähr 30-mal auf jedem Probenfeld vertreten [163]. Diese hohe Anzahl an Oligonukleotiden pro *Bead* und die 30-fache Präsenz stellen interne technische Replikate dar und tragen auf diese Weise zur Stabilität und einer guten Reproduzierbarkeit des Systems bei. Ein weiterer Unterschied zu den Affymetrix-Microarrays ist die randomisierte Anordnung der einzelnen *Beads* über das Probenfeld in Löcher (Wells), die in die Oberfläche eingätzt worden (Abb. 2.5B) [164]. Die willkürliche Anordnung macht es notwendig, jedes Probenfeld einem Dekodierungsverfahren zu unterziehen, um die Positionen der Transkripte/ *Beads* zu identifizieren. Dafür entwickelte Illumina einen hocheffizienten Dekodierungsalgorithmus, welcher auf einer sequenziellen Hybridisierungs- und Rehybridisierungsfolge zu der Adressequenz aufbaut [165].

Für die Versuche mit den HepG2-Zellen wurde der *Illumina Sentrix[®] HumanRef-8 V2 BeadChip* verwendet. Abbildung 2.5C enthält einen Überblick über die Anzahl der Transkriptvarianten und Gene auf dem Chip. Ein großer Vorteil dieser Illumina-Chips ist es, dass bis zu acht Proben gleichzeitig auf einem Chip gemessen werden können.

Das ermöglicht einen hohen Durchsatz und trägt aufgrund des geringeren Arbeitsaufwands zu einem günstigeren Kostenverhältnis im Vergleich zu Affymetrix bei.

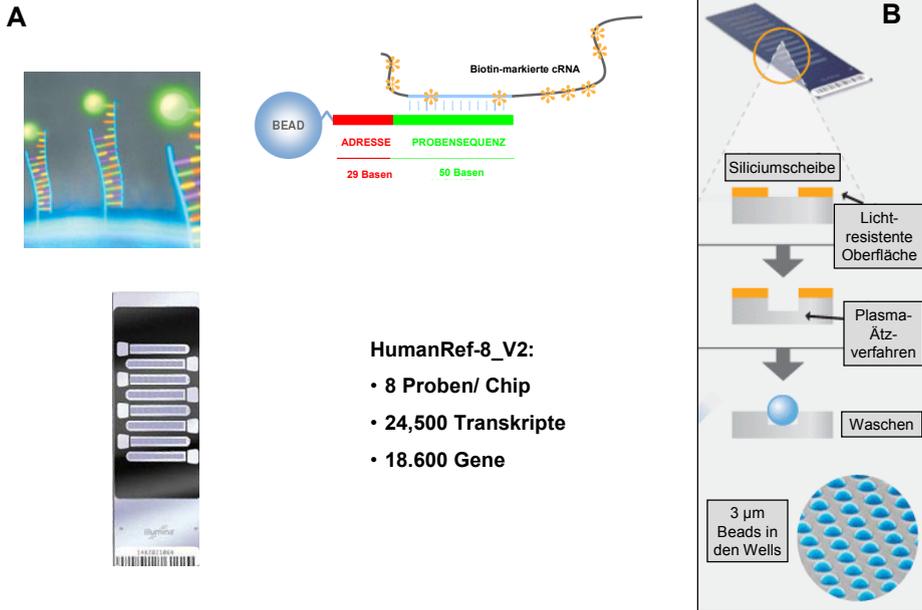


Abbildung 2.5: Aufbau (A) und Herstellungsverfahren (B) der Illumina Sentrix® BeadChips.
[Abb. modifiziert nach 159, 161]

2.5.4.2 cRNA-Synthese

Vor der Hybridisierung der Proben auf den Genchip ist es notwendig, die RNA innerhalb der Probe so zu modifizieren, dass gebundene RNA-Moleküle auf dem Chip detektiert werden können. Dazu wurde die mRNA in einem mehrstufigen Prozess unter Verwendung des MessageAmp™ II aRNA Amplification Kit in Biotin-markierte cRNA umgeschrieben (Abb. 2.6).

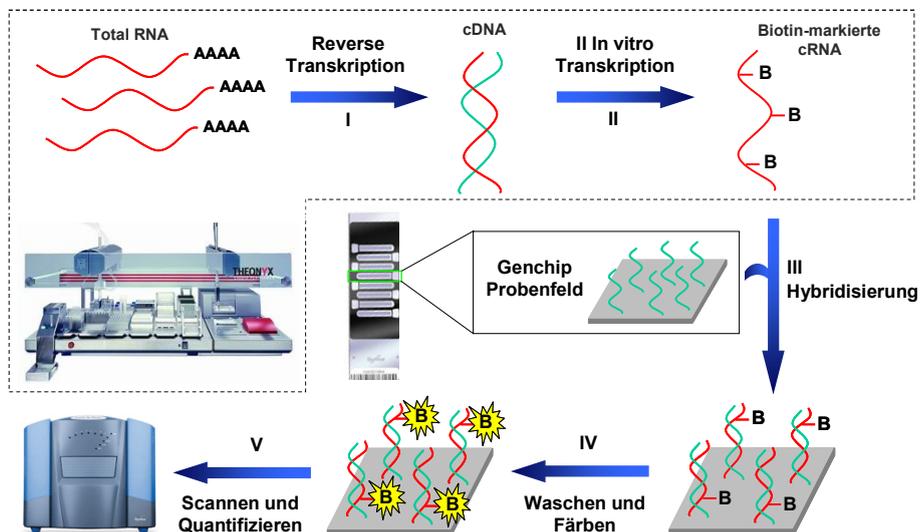


Abbildung 2.6: Probenvorbereitung und Hybridisierung der Illumina *BeadChips*.

Zur Optimierung und Standardisierung der Prozedur wurde diese in einem automatischen Verfahren mit dem *Theonyx Liquid Performer*-Roboter und mit angepassten Volumina durchgeführt (Tab. 2.13). 500 ng Gesamt-RNA wurden in eine ThermoSprintplatte vorgelegt, in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet und in den Roboter gestellt. Alle Reaktionsmischungen für die verschiedenen Syntheseschritte wurden ebenfalls im Voraus zusammen pipettiert und auf den Roboter geladen. Alle Pipettierschritte, außer denen für die Aufreinigung, wurden unter Kühlung der Platte bei 4 °C durchgeführt. Die enzymhaltigen Reaktionsmischungen wurden ebenfalls auf Kühlpositionen des Roboters aufbewahrt. Für die reverse Transkription zur Synthese des ersten cDNA-Stranges von der mRNA-Probe wurden vom Roboter 5 µl des Erststrangreaktionsgemisches (Tab. 2.13) zu jeder RNA-Probe pipettiert und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Anschließend wurde die Platte in einem im Robotersystem integrierten Thermocycler für 2 h bei 42 °C inkubiert. Nach der Reaktion wurden 20 µl des Zweitstrangreaktionsgemisches (Tab. 2.13) zugegeben und für weitere 2 h bei 16 °C im Thermocycler die Synthese der doppelsträngigen cDNA durchgeführt.

Die Aufreinigung der cDNA erfolgte mit magnetischen *Beads* (*Agencourt*[®] *RNAClean*[™]) durch den *Theonyx*. Dazu wurden 88 µl der *Bead*-Suspension zu jeder

Probe pipettiert und anschließend die gesamte Probe in eine Rundbodenplatte überführt. Die Reaktion wurde zur Bindung der cDNA an die *Beads* für 5 min bei Raumtemperatur belassen. Danach erfolgte die 10-minütige Separation der *Beads* auf einer Ringmagnetplatte. Dabei ordnen sich die *Beads* kreisförmig entlang des magnetischen Feldes an und erlauben somit die Trennung der cDNA-gebundenen *Beads* von der restlichen Probe. Diese wird einfach mittig aus dem Well heraus pipettiert. Die Probe wurde dann dreimal mit 200 µl Ethanol für jeweils 25 s gewaschen. Nach dem dritten Waschschritt wurde das Ethanol möglichst vollständig entfernt und die *Beads* für 15 min getrocknet. Die Platte verblieb während des gesamten Waschvorganges auf der Ringmagnetplatte und wurde erst nach dem Trocknen auf den Schüttler im Theonyx überführt. Nach Zugabe von 30 µl Nuklease-freiem Wasser, wurde die cDNA unter Schütteln bei 1500 rpm für 2 min von den *Beads* gelöst. Nach weiteren 3 min Inkubation ohne Schütteln wurden die *Beads* auf dem Magnetseparator für 10 min separiert. Die im Wasser gelöste cDNA wurde in eine neue ThermoSprintplatte überführt und für 5 h bei 50 °C im Thermocycler mit geöffnetem Deckel eingetrocknet. Danach wurde die Platte zurück auf die Kühlposition überführt und 10 µl des *in vitro*-Transkriptions (IVT)-gemisches (Tab. 2.13) hinzu pipettiert.

Tabelle 2.13: Reaktionsgemische für die cRNA-Synthese

Erststrangreaktionsgemisch		Zweitstrangreaktionsgemisch		IVT-Reaktionsgemisch	
Reagenz	Volumen in µl/ Probe	Reagenz	Volumen in µl/ Probe	Reagenz	Volumen in µl/ Probe
Erststrangpuffer (10x)	0,50	Zweitstrangpuffer (10x)	2,50	Reaktionspuffer (10x)	1,00
-	-	-	-	ATP	1,00
-	-	-	-	GTP	1,00
T7 Primer	0,25	-	-	CTP	1,00
dNTPs	1,00	dNTPs	1,00	UTP	0,50
Nuklease-freies Wasser	2,75	Nuklease-freies Wasser	15,75	Nuklease-freies Wasser	0,75
RNase Inhibitor	0,25	RNase H	0,25	Biotin-UTP	3,75
Reverse Transkriptase	0,25	DNA Polymerase	0,50	T7 Enzym	1,00
Gesamt-volumen	5,00	Gesamt-volumen	20,00	Gesamt-volumen	10,00

Die Reaktion zur Synthese der Biotin-markierten cRNA wurde für 16 h bei 37 °C im Thermocycler durchgeführt. Der Einbau von Biotin in den neuen cRNA-Strang wird

über spezielle biotinylierte UTP-Nukleotide, welche dem Reaktionsgemisch zugesetzt werden, gewährleistet. Nach der cRNA-Synthese werden die Proben mit 10 μ l Nuklease-freiem Wasser eingestellt und mit 88 μ l *Bead*-Suspension versetzt. Die Aufreinigung der cRNA erfolgte analog der für die cDNA. Die Trocknungszeit nach dem Ethanolwaschvorgang wurde jedoch auf 30 min erhöht, um sicherzustellen, dass keine Ethanolreste in der Probe zurückbleiben. Die Elution der cRNA erfolgte in 40 μ l unter 5 min Schütteln bei 1500 rpm. Die cRNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.5.4.3 Hybridisierungsprozess

Für die Hybridisierung wurden 750 ng cRNA in 5 μ l Nuklease-freiem Wasser eingestellt und für 10 min zum Resuspendieren der cRNA bei Raumtemperatur belassen. Die Puffer *GEX-HYB* und *GEX-HCB* wurden für 10 min bei 58 °C erwärmt, um die darin enthaltenen Salze vollständig zu lösen. Anschließend wurden die Puffer wieder auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Danach wurden 10 μ l des Hybridisierungspuffers *GEX-HYB* zu jeder cRNA-Probe pipettiert und die Proben bei 65 °C für 5 min zur Denaturierung in den Thermocycler gestellt. Währenddessen wurde in die Reservoirs der Hybridisierungskammer 200 μ l des *GEX-HCB*-Puffers gegeben, welcher für eine humide Atmosphäre während der Hybridisierung sorgt. Nachdem die cRNA-Proben kurz vorsichtig gevortext und herunterzentrifugiert worden waren, wurden 15 μ l Probe auf den *BeadChip* pipettiert. Die Chips wurden in die Hybridisierungskammer gesetzt und für 20 h bei 58 °C und einer Schwenkgeschwindigkeit von 5 im Hybridisierungsöfen inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit folgte der Wasch- und Färbeprozess der Chips. Die Herstellung der dafür notwendigen Puffer ist in Tabelle 2.14 zusammengestellt. Zunächst wurden die Chips aus der Hybridisierungskammer entfernt und sofort in eine Schale mit 250 ml *EIBC*-Puffer gelegt. Die Schutzfolie, welche die Probenauftragung ermöglichte, wurde unter der Flüssigkeitsoberfläche vom Chip entfernt und die Chips in einer neuen Schale mit *EIBC*-Puffer gesammelt. Im nächsten Schritt wurden die Chips 10 min in ein auf 55 °C vorgeheiztes Bad (Heizblock) mit *High-Temperature*-Waschpuffer gegeben. Eine Benetzung der Chipoberfläche wurde bei diesem und den folgenden Waschschrritten in *EIBC*-Puffer und Ethanol durch 10-maliges Auf- und

Abheben des Tragegestells erreicht. Anschließend erfolgte ein 5 min Waschschrift in einer Schale mit 250 ml frischem *EIBC*-Puffer auf einem Orbitalschüttler mit der höchstmöglichen Geschwindigkeit ohne dass es zum Herausschwappen von Pufferlösung kommt. Danach wurden die Chips in eine weitere Schale mit 250 ml 100 %igem Ethanol überführt und für weitere 10 min geschüttelt. Nachdem ein weiterer Waschschrift in 250 ml frischem *EIBC*-Puffer für 2 min unter Schütteln durchgeführt worden war, wurden die Chips in 4 ml *Block EI*-Puffer in einer Plastikeinwegwanne für 10 min bei einer Geschwindigkeit von 5 im Hybridisierungsöfen bei 22 °C geschwenkt. Anschließend wurden die Chips in eine neue Plastikeinwegwanne mit 2 ml *Block EI*-Puffer mit Streptavidin-Cy3 gelegt und erneut für 10 min geschwenkt. Nach dem Färbeschritt erfolgte ein letzter Waschschrift in 250 ml frischem *EIBC*-Puffer für 5 min auf dem Orbitalschüttler. Die Chips wurden schließlich bei 275 x g und Raumtemperatur zum Trocknen zentrifugiert. Das Scannen der Chips erfolgte mit dem Illumina Bead Array Reader bei 532 nm mit einer Auflösung von 0,8 µm.

Tabelle 2.14: Puffer für den Hybridisierungsprozess

Puffer	Zusammensetzung
<i>EIBC</i>	- 1 L DEPC Wasser - 3 ml <i>EIBC</i> -Stammlösung
<i>High Temperature</i> -Waschpuffer	- 450 ml DEPC Wasser - 50 ml <i>High Temperature</i> -Waschpufferstammlösung
<i>Block EI</i> -Puffer mit Streptavidin-Cy3	- 2 ml <i>Block EI</i> -Puffer - 2 µl Streptavidin-Cy3-Stammlösung (1 mg/ ml)

2.6 Funktionelle Tests/ Biochemische Methoden

2.6.1 Cytochrom-P450-Aktivitätsbestimmung

2.6.1.1 Bestimmung der CYP1A-Aktivität mit dem EROD-Test

Die direkte fluorimetrische Messung der O-Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin zu 7-Hydroxyresorufin durch das Enzym 7-Ethoxyresorufindeethylase (EROD), eine Cytochrom-P450-Monooxygenase der 1A-Familie, ist eine sehr empfindliche und spezifische Methode zur Bestimmung der CYP1A-Aktivität [166]. Bei dieser Reaktion wird

das Fluoreszenzsignal des gebildeten 7-Hydroxyresorufins in einem definierten Zeitraum zur Berechnung der CYP1A-Aktivität genutzt. Das Reaktionsprinzip ist in Abbildung 2.7 dargestellt. Der Zusatz von Salicylamid zum Reaktionsansatz verhindert, dass das 7-Hydroxyresorufin durch Konjugationsenzyme zu einem nicht-fluoreszierenden Sulfat umgewandelt und dadurch ein geringerer Umsatz gemessen wird [167].

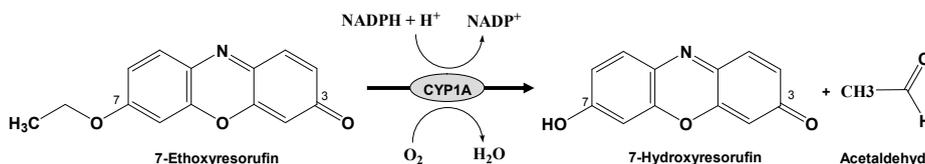


Abbildung 2.7: Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin durch CYP1A.

Die Aussaat und Behandlung der Zellen erfolgte in schwarzen 96-Well-Zellkulturplatten mit durchsichtigem Boden (siehe Abschnitt 2.4.3). Die Behandlung der Zellen wurde täglich über 72 h mit verschiedenen Induktoren der CYP-Expression durchgeführt. Zum Ende der Behandlungszeit wurden die Zellen mit 100 µl Zellkulturmedium gewaschen und 50 µl einer 1 %igen (v/v) Salicylamidarbeitslösung in jedes Well gegeben. Die 1 %ige (v/v) Salicylamidarbeitslösung wurde durch Verdünnen einer 0,3 M Salicylamidstammlösung (in Aceton als Lösungsmittel) mit 1 x PBS hergestellt. Nach 10 min Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden 50 µl einer 10 µM Ethoxyresorufinsubstratlösung zu jedem Well pipettiert und die Messung gestartet. Die Herstellung der 10 µM Ethoxyresorufinsubstratlösung erfolgte durch Verdünnen einer 1 mM 7-Ethoxy-3H-phenoxazin-3-one-Stammlösung (in DMSO) mit 1 x PBS. Die Messung wurde bei 37 °C mit einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 595 nm bei 80-facher Verstärkung und unter kreisförmigem Schütteln für 10 s vor Beginn der Messung im Tecan Polarion Mikroplattenfluorometer durchgeführt. Die Gesamtdauer der Messung betrug 20 min mit Messintervallen im Abstand von 1 min. Für die Berechnung der Aktivität müssen die Messwerte zunächst auf die vorhandene Zellzahl im Well normalisiert werden. Zur Bestimmung der Zellviabilität, als Maß für die Anzahl bzw. Aktivität der Zellen, wurde der *CellTiter-Glo*[®]-Test (Promega) im Anschluss an die EROD-Messung durchgeführt. Dazu wurden die Lösungen aus den Wells abgesaugt und ein Gemisch aus 50 µl

CellTiter-Glo[®]-Reagenz und 50 µl Zellkulturmedium zu jedem Well gegeben. Die Durchführung der Messung ist unter 2.6.2 beschrieben.

Zur Quantifizierung des bei der Reaktion gebildeten 7-Hydroxyresorufin wurde eine Eichkurve mit 7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one (Resorufin) als Standard erstellt. Dafür wurde eine 10 mM Stammlösung des 7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one in DMSO hergestellt. Aus der Stammlösung wurden zwei verschiedene Verdünnungsreihen in 1 x PBS hergestellt. Die erste Verdünnungsreihe umfasst die Konzentrationen 1 pmol/ ml, 2,5 pmol/ ml, 10 pmol/ ml, 25 pmol/ ml, 50 pmol/ ml und 100 pmol/ ml. Die zweite Verdünnungsreihe schließt 50 pmol/ ml, 100 pmol/ ml, 500 pmol/ ml und 1.000 pmol/ ml ein. Für die Erstellung der Eichkurven wurden 50 µl einer 1 %igen (v/v) Salicylamidarbeitslösung in jedes Well einer schwarzen Zellkulturplatte gegeben und für 10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 50 µl der jeweiligen Resorufinverdünnung oder 1 x PBS als Hintergrundwert zu jedem Well pipettiert. Die Messung erfolgte im Tecan Polarion mit den oben angeführten Messeinstellungen. Für beide Eichkurven wurde der Anstieg in RFU/ (pmol/ ml) ermittelt.

Die Berechnung der Aktivitätsrate *A* in pmol/ (ml x min x RLU) wurde wie folgt durchgeführt:

$$A = \frac{FI}{F \times t \times ZV}$$

Formel 2.4: Berechnung der CYP1A-Aktivitätsrate.

A	CYP1A-Aktivitätsrate
FI	gemessene Fluoreszenz in RFU
F	Steigung der Eichkurve in RFU/ (pmol/ ml)
t	Zeit in min
ZV	Zellviabilität in RLU

Die Induktion der CYP1A-Aktivität wurde anschließend wie folgt berechnet:

$$\text{Induktion} = \frac{\text{Aktivitätsrate}_{\text{+Induktor}}}{\text{Aktivitätsrate}_{\text{Kontrolle}}}$$

Formel 2.5: Berechnung der CYP1A-Induktion.

Dabei wurde die berechnete Aktivitätsrate des CYP1A der Zellen, welche mit dem Induktor behandelt wurden, auf die Aktivitätsrate des CYP1A in den Zellen, behandelt mit dem Lösungsmittel DMSO als Kontrolle, bezogen.

2.6.1.2 Bestimmung der CYP3A4-Aktivität

Für die Bestimmung der CYP3A4-Aktivität in HepG2-Zellen nach täglicher Behandlung mit verschiedenen Induktoren für 72 h wurde der Promega *P450-Glo*TM-Test verwendet [168]. Die Zellen wurden dafür in weißen Zellkulturplatten mit durchsichtigem Boden ausgebracht. Der *P450-Glo*TM-Test ermöglicht es basale CYP-Aktivitäten oder Veränderungen (Induktion oder Inhibition) der CYP-Aktivitäten durch Behandlung der Zellen mit entsprechenden Substanzen zu messen. Dafür wird ein luminogenes Substrat in das Zellkulturmedium gegeben und mit den Zellen inkubiert. Intrazelluläre CYP-Enzyme setzen das Substrat in D-Luziferin um, welches aus den Zellen heraus in das Medium diffundiert. Dort kann es durch Zugabe von Luziferase, welche D-Luziferin unter ATP-Verbrauch und Lichtemission (Lumineszenz) in Oxylyziferin umsetzt, detektiert werden (Abb. 2.8). Das entstehende Lumineszenzsignal ist dabei proportional zur CYP-Enzymaktivität [168].

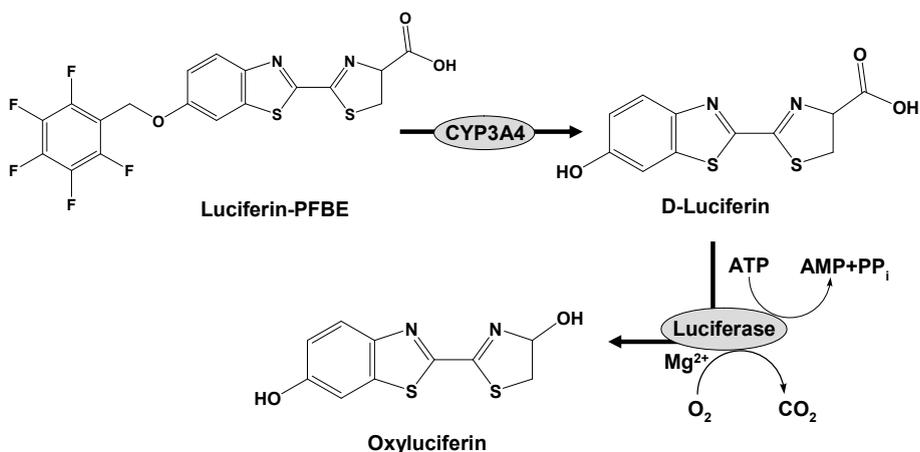


Abbildung 2.8: Reaktionsschema des *CYP450 Glo*TM-Tests für die Bestimmung der CYP3A4-Aktivität in Zellen. [Abb. modifiziert nach 169]

Nach dem Ende der Induktionsbehandlungszeit wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen einmal mit 0,1 ml frischem Medium gewaschen, um Substanzreste zu entfernen, die die Testreaktion stören könnten. Anschließend wurden 60 µl einer 50 µM Luziferin-PFBE-Substratlösung (Luciferin-6'-Pentafluorobenzylether oder 4,5-dihydro-2-(6-(perfluorobenzyl oxy) benzo [d] thiazol-2-yl) thiazol-4-Carbonsäure) in jedes Well pipettiert und für 3 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Luziferin-PFBE ist ein speziell entwickeltes CYP3A4-Substrat, welches auch in Gegenwart von DMSO (bis 0.25 % (v/v)) effektiv umgesetzt wird. Danach wurden 60 µl Luziferin-Detektionsreagenz, welches die Luziferase und die benötigten Kofaktoren, wie ATP und Mg^{2+} , enthält, zu den Zellen gegeben. Das Detektionsreagenz stoppt die Reaktion und sorgt für die Bildung eines stabilen Lumineszenzsignals. Die Platte wird dann zur Lyse der Zellen kurz auf einem Plattenschüttler geschüttelt und anschließend sofort im Luminometer (Lumistar) vermessen [168].

Für die Berechnung der CYP3A4-Aktivität wurden die gemessenen Lumineszenzwerte zunächst auf die vorhandene Zellzahl im Well normalisiert. Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde der *CellTiter-Glo*[®]-Test (Promega) im Anschluss an die CYP3A4-Messung durchgeführt. Dazu wurden die Lösungen aus den Wells abgesaugt und ein Gemisch aus 50 µl *CellTiter-Glo*[®]-Reagenz und 50 µl Zellkulturmedium zu jedem Well gegeben. Die Durchführung der Messung ist unter 2.6.2 beschrieben.

2.6.2 Zellviabilitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde der *CellTiter-Glo*[®] Kit von Promega eingesetzt [170]. Dieser Test basiert auf der Quantifizierung von ATP, welches als Maß für die metabolische Aktivität und somit Vitalität von Zellen herangezogen werden kann. Für die Reaktion werden Luziferase und das Luziferasesubstrat D-Luziferin zu den Zellproben gegeben. Luziferase setzt D-Luziferin unter ATP-Verbrauch und Lichtemission (Lumineszenz) in Oxyluziferin um (Abb. 2.9). Das entstehende Lumineszenzsignal ist dabei proportional zum ATP-Gehalt der Probe [170].

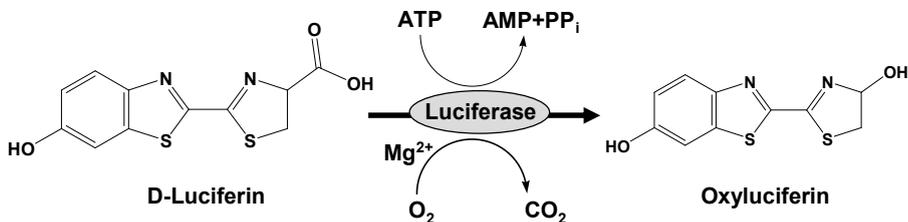


Abbildung 2.9: Luciferase-Nachweisreaktion des *CellTiter-Glo*[®] Tests zur Bestimmung der Zellviabilität. [Abb. modifiziert nach 170]

Die Zellen wurden für die Messung in weißen Mikrotiterplatten ausgesät und behandelt (siehe Abschnitt 2.4). Das *CellTiter-Glo*[®] Substrat wurde in 10 ml des im Kit enthaltenen Puffers gelöst. Von diesem Substrat wurden 100 μ l zu den Zellen, welche sich in 100 μ l Kulturmedium befinden, hinzu pipettiert. Um die Zellen zu lysieren, wurde die Platte für 2 min auf einem Plattenschüttler mit 600 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Platte für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Entstehung eines stabilen Lumineszenzsignals zu gewährleisten. Die Messung wurde dann im Luminometer durchgeführt.

2.6.3 P53 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Aktivierung des Tumorsuppressorproteins P53 infolge der Behandlung mit genotoxischen Substanzen wurde der *TransAM*[™] P53 Transkriptionsfaktortest von ActiveMotif genutzt [171]. Dieser Test basiert auf einem ELISA mit hoher Spezifität und Sensitivität und bietet zudem im Vergleich zu konventionellen Methoden, wie Western blot oder EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*), den Vorteil eines hohen Probendurchsatzes [171]. Eine Übersicht über den gesamten Ablauf des *TransAM*[™] P53 gibt Abbildung 2.10.

Im Testkit enthalten ist eine 96-Well-Platte, auf welcher ein Oligonukleotid immobilisiert ist. Dieses Oligonukleotid enthält die Konsensussequenz für die P53 Bindung (5'-GGACATGCCCGGCATGTCC-3') [171]. Das P53 besteht aus einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne, einer stark konservierten Kerndomäne für die

DNA-Bindung, einer Oligomerisierungsdomäne und einer regulatorischen Domäne am C-Terminus [172]. Tetrameres P53 bindet über die Kerndomäne spezifisch an eine Konsensussequenz, die aus zwei palindromischen 10 bp großen Motiven mit der Sequenz 5'-RRRCWWGYYY-3' (R = Purin, Y = Pyrimidin, W = Adenin oder Thymin) besteht, welche durch 0 bis 13bp getrennt voneinander liegen [173]. Durch das Tetramer wird P53 stabilisiert und die DNA-Bindungsaktivität erhöht [171].

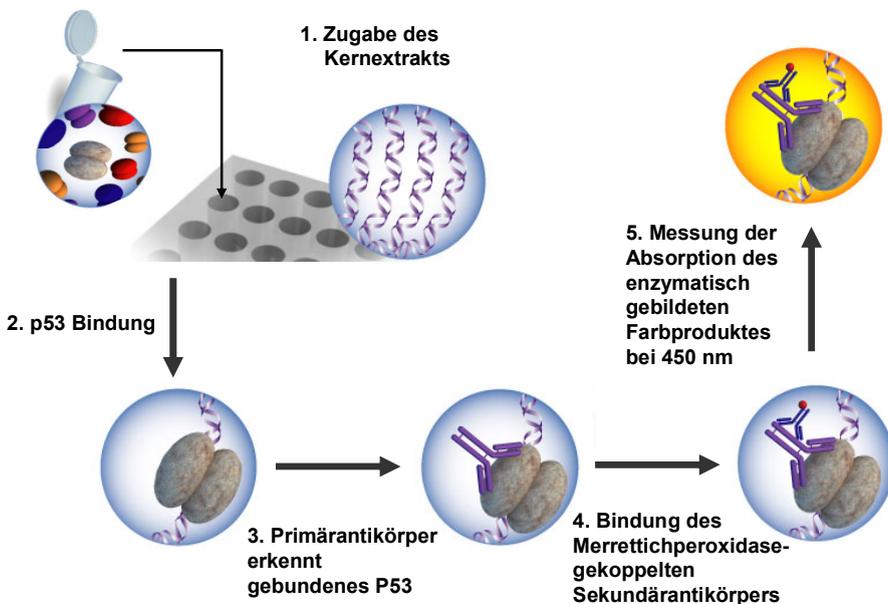


Abbildung 2.10: Prinzip des *TransAM™* P53 ELISA. [Abb. modifiziert nach 174]

Zur Bestimmung des P53 in den Zellproben wurde zunächst die Kernproteinfraktion isoliert (Abb. 2.10/ 1). Enthält der Kernextrakt aktiviertes P53, so bindet das P53 an das in den 96-Well-Platten immobilisierte Oligonukleotid (Abb. 2.10/ 2) [171]. Der im Kit eingesetzte Primärantikörper erkennt anschließend ein Epitop des P53-Proteins (Abb. 2.10/ 3), welches nach der Bindung an das Oligonukleotid zugänglich wird. Durch Zugabe eines sekundären Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörpers gegen den Primärantikörper (Abb. 2.10/ 4) wird ein kolorimetrischer Nachweis ermöglicht [171]. Als Substrat für die Peroxidase-reaktion dient 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in

der Entwicklungslösung. TMB wird in Gegenwart von Wasserstoffperoxid zu einem löslichen blauen Produkt umgesetzt. Die TMB-Reaktion wird anschließend durch Zugabe von 2 M H_2SO_4 gestoppt (Stopplösung) und die Absorption der gelb umgeschlagenen Lösung spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen (Abb. 2.10/ 5) [175].

2.6.3.1 Gewinnung des Kernextraktes

Zur Gewinnung der Kernproteine wurde der *Nuclear Extract Kit* von ActiveMotif verwendet [176]. Die benötigten Puffer und Reagenzien wurden, wie in Tabelle 2.15 beschrieben, hergestellt.

Tabelle 2.15: Herstellung der Reagenzien für die Gewinnung des Kernextraktes

Reagenz	Komponenten	Volumen pro Well in μl
PBS/ Phosphatase Inhibitor-Puffer	10xPBS	400
	Destilliertes Wasser	3400
	Phosphatase Inhibitoren	200
Lysepuffer	DTT (10 mM)	10
	Lysepuffer AM1	89
	Proteaseinhibitor-Cocktail	1
Hypotonischer Puffer	10xHypotonischer Puffer	50
	Destilliertes Wasser	450

Von den im 6-Well behandelten HepG2-Zellen (siehe Abschnitt 2.4) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2,5 ml eiskaltem PBS/ Phosphataseinhibitor-Puffer gewaschen. Die Aufnahme der Zellen in eiskaltem Puffer und die Zugabe von Phosphataseinhibitoren wurde vorgenommen, um weitere Proteinmodifikationen (Expression, Proteolyse, Dephosphorylierung, etc.) zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen in 1,5 ml eiskaltem PBS/ Phosphataseinhibitor-Puffer mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und für 5 min bei 800 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 μl hypotonischem Puffer durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Zellen wurden für

15 min auf Eis inkubiert. Durch den hypotonischen Puffer wird erreicht, dass die Zellmembran anschwillt und durchlässig wird. Danach wurde 25 µl Detergenz zu jeder Probe gegeben und für 10 s auf höchster Stufe gevortext. Das Detergenz führt dazu, dass die zytoplasmatischen Proteine durch die Zellmembran in den Überstand übergehen. Die folgende Zentrifugation für 30 s bei 14.000 x g und 4 °C wurde durchgeführt, um die Zellkerne zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und die Kernfraktion in 50-100 µl Lysepuffer durch Auf- und Abpipettieren gelöst. Zur vollständigen Lyse der Kernfraktion wurden die Proben für 30 min auf Eis bei 150 rpm geschüttelt. Die Proben wurden dann für 30 s auf höchster Stufe gevortext und 10 min bei 4 °C und 14.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Der Proteingehalt der Proben wurde mittels Bradford bestimmt (siehe Abschnitt 2.7.4). Dazu wurden die Proben je nach Proteingehalt 1:2 bis 1:4 verdünnt in Lysepuffer gemessen.

2.6.3.2 Durchführung des *Trans AM P53* Tests

Die Kernextraktproben wurden nach der Proteinbestimmung auf 0,06-0,6 µg Protein/ µl für den *TransAMTM P53* eingestellt. Die benötigten Puffer und Reagenzien für den Test wurden, wie in Tabelle 2.16 aufgeführt, hergestellt. In jedes Well der mit dem Kit mitgelieferten 96-Well-Platte wurden 40 µl des Bindungspuffer pipettiert. Anschließend wurden 10 µl der verdünnten Proben zu jedem Well gegeben. Als Positivkontrolle wurden 10 µl (0,05 µg/ µl) eines mit Wasserstoffperoxid behandelten MCF-7-Extrakts in ein zusätzliches Well pipettiert. Ein weiteres Well mit 10 µl Lysepuffer diene als Hintergrundwert. Die Reaktion wurde für 1 h bei leichtem Schütteln mit 100 rpm auf einem Plattenschüttler zur Bindung des P53 an das Oligonukleotid inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand in den Wells durch Abkippen verworfen und die Flüssigkeitsreste durch vorsichtiges Abklopfen auf einem Papiertuch entfernt. Danach wurde die Platte gleichermaßen dreimal mit 1xWaschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl verdünntem P53-Antikörper (1:1.000 in 1xAntikörperbindungspuffer) in jedes Well. Die Bindung des Primäantikörpers wurde für 1 h bei Raumtemperatur (ohne Schütteln) durchgeführt. Danach wurde der Überstand, wie vorangehend beschrieben, verworfen, die Platte dreimal mit 1xWaschpuffer gewaschen

und 100 µl des verdünnten Sekundärantikörpers (1:1.000 in 1xAntikörperbindungspuffer) hinzu pipettiert. Die Inkubation wurde 1 h bei Raumtemperatur ohne Schütteln durchgeführt. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Platte viermal mit 1 x Waschpuffer gewaschen. Zu jedem Well wurden 100 µl Entwicklungslösung pipettiert und für 2-10 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Die optimale Entwicklungszeit hängt von der Charge des P53-Antikörpers ab und wird im Datenblatt zu jedem Kit angegeben. Die Farbreaktion wurde anschließend durch Zugabe von 100 µl Stopplösung abgebrochen und die Absorption bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge bei 650 nm gemessen. Die Referenzwellenlänge entspricht der Absorption des TMB ohne die Umsetzung mit H₂SO₄ und sollte deshalb gering sein. Zur Auswertung wurde von allen Messwerten der Hintergrundwert, welcher im Well mit ausschließlich Lysepuffer gemessen wurde, abgezogen und die Proben auf den Proteingehalt normalisiert. Die Normalisierung auf Absorption/ µg Protein ermöglicht es, die verschiedenen Proben untereinander zu vergleichen.

Tabelle 2.16: Herstellung der Puffer für den *TransAM™ P53*

Reagenz	Komponenten	Volumen pro Well in µl
Bindungspuffer	DTT (1M)	0,040
	Poly[d(l-C)]	0,400
	Bindungspuffer AM5	39,560
Lysepuffer	DTT (1M)	0,009
	Proteaseinhibitor-Cocktail	0,107
	Lysepuffer AM2	9,884
1xWaschpuffer	Destilliertes Wasser	1800
	10x Waschpuffer AM2	200
1xAntikörperbindungspuffer	Destilliertes Wasser	180
	10x Antikörperbindungspuffer AM2	20
Entwicklungslösung	fertig zur Verwendung	100
Stopplösung	fertig zur Verwendung	100

2.6.4 Bradford-Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung nach Bradford ist eine sehr sensitive Methode, die auf der Wechselwirkung von Proteinen mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 beruht [177]. Dieser bildet in saurer Lösung sowohl mit basischen (vor allem Arginin) und aromatischen Aminosäuren von Proteinen Komplexe [178]. Es gibt drei verschiedene Formen in denen der Farbstoff vorkommt: eine kationische rote Form, eine neutrale grüne Form und eine anionische blaue Form [178]. Unter sauren Bedingungen ist vorwiegend die rote kationische Form mit einem Absorptionsmaximum von 470 nm zu finden [179]. Durch die Bindung der Proteine an den Farbstoff wird dieser in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert und es verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 470 nm auf 495 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann photometrisch gemessen werden und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung [179]. Allerdings ist das Ausmaß der Farbreaktion vom Proteintyp abhängig, weshalb zur genauen Quantifizierung eine Eichgerade mit dem entsprechenden Protein in bekannten Konzentrationen erforderlich ist [180]. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Gemischen, von denen kein Standard zur Verfügung steht, werden Standardproteine, wie z.B. Rinderserumalbumin oder Rindergammaglobulin, verwendet [180].

Die Herstellung des Bradford-Reagenz für die Messung erfolgte durch das Lösen von 100 mg Coomassie-Brillant-Blau G250 in 250 ml Ethanol und anschließender Zugabe von 100 ml 85 %ige Phosphorsäure. Für die Durchführung der Messung wurden 10 µl von jeder Probe bzw. vom Lysepuffer als Hintergrundwert in eine transparente Mikrotiterplatte pipettiert. Alle Proben wurden in vier Replikaten vermessen. Zu jeder Probe wurden 200 µl Bradford-Reagenz hinzu pipettiert und für 5-10 min unter leichtem Schütteln (150 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Absorptionsmessung bei 595 nm im Plattenphotometer durchgeführt. Zur Quantifizierung der Proteinproben wurde vorher eine Eichkurve mit einem Proteinstandard aufgenommen. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe aus einer 2 mg/ml Rinderserumalbuminstammlösung hergestellt. Die Rinderserumalbuminstammlösung wurde in destilliertem Wasser angesetzt. Hingegen wurden die nachfolgenden Verdünnungen von 100, 250, 400 und 500 µg/ml im Lysepuffer aus dem Nuclear Extract Kit (ActiveMotif) hergestellt. Als Nullwert für die Verdünnungsreihe diente reiner Lysepuffer. Die Messung erfolgte, wie für die Probenmessung vorangehend beschrieben.

2.7 Datenanalysemethoden

2.7.1 Allgemeine Einleitung und Herausforderungen der statistischen Datenanalyse für Omics-Daten

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen basieren generell darauf, dass eine Deregulation der behandelten Proben gegenüber den entsprechenden Kontrollproben kalkuliert wurde. Ermittelt man nun eine Deregulation nach Behandlung mit einer bestimmten Substanz, bleibt jedoch die Frage ob das Ergebnis vielleicht nur das Resultat eines experimentellen Fehlers oder reinen Zufalls ist. Deshalb ist es notwendig, das Experiment mehrfach unter gleichen Bedingungen zu wiederholen und die „Signifikanz“ mit Hilfe von statistischen Methoden anhand der Varianz der verschiedenen experimentellen Replikate zu ermitteln. Für eine solche Testung unterscheidet man parametrische und nicht-parametrische Tests. Parametrische Tests, zu denen der Student's T-Test, Regressions- und Varianzanalysen (ANOVA) gehören, stellen bestimmte Voraussetzungen an die Daten. Voraussetzungen sind die Unabhängigkeit der Beobachtungen und die Normalverteilung (auch als Gauss'sche Glockenkurve bekannt), das heißt die symmetrische, glockenförmige, eingipfelige Verteilung der Daten. Die meisten natürlich vorkommenden Merkmale sind normalverteilt. Die Normalverteilung lässt sich anhand eines Histogramms durch Bestimmung von Mittelwert, Median, Wölbung und Schiefe ab einem Stichprobenumfang von etwa 30 ermitteln. Schief verteilte Daten, zum Beispiel aufgrund der Existenz einer unteren oder oberen Grenze, lassen sich zudem häufig durch eine logarithmische oder potenzierende Transformation in eine Normalverteilung bringen. Kann man eine Normalverteilung der Daten nicht prüfen, können nicht-parametrische Tests (Rangsummentests), die auf der Analyse der Ränge von Daten basieren und somit auch für diskrete Merkmale geeignet sind, genutzt werden. Der Nachteil dieser Tests ist die geringe *Power*, da die Information der Daten nur unvollständig genutzt wird. Mit der *Power* ist die Fähigkeit des Tests, ein real signifikantes Ergebnis auch als signifikant zu klassifizieren, gemeint.

Bei Laborversuchen besteht das generelle Problem, dass viele Messungen, z.B. bei sehr teuren und aufwändigen Tests, wie Microarrays, nicht ausreichend oft wiederholt werden können, um eine solide statistische Auswertung durchzuführen. Zur statistischen Auswertung im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene parametrische Tests verwendet, da bei diesen geringen Stichprobenumfängen nicht-parametrische Tests

wegen der zu geringen *Power* nur begrenzt geeignet sind. Zudem wurde aufgrund des zentralen Grenzwertsatzes, dass die Summen von unabhängigen Zufallsvariablen normalverteilt sind [181] und unter der Annahme, dass die auf die Laborexperimente wirkenden Einflussfaktoren sich eher additiv als potenzierend verhalten, von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen. Zufällige Faktoren, die vom Menschen nicht beeinflussbar sind, verhalten sich in der Regel normalverteilt, da die einwirkenden Faktoren dann additiv aufeinander wirken. Neben dieser Annahme wurden die Rohdaten der Genexpressionsdaten vor der statistischen Testung logarithmisch transformiert. Diese Transformation wird wegen der meist asymmetrischen Verteilung der Daten genutzt, um wie vorangehend schon genannt die Daten in eine Normalverteilung zu transformieren sowie um die statistische Auswertung mit Relativdatensätzen durchführen zu können [182]. Li *et al.* konnten für Genexpressionsanalysen zeigen, dass die logarithmische Transformation der Daten keinen Einfluss auf die top-rangierten Gene im T-Test hat. Außerdem zeigten Giles und Kipling, dass die Abweichung von der Normalverteilung für die meisten Probensätze von Affymetrixdaten gering ist [183]. Des Weiteren sind die Methoden T-Test und ANOVA robust gegenüber moderaten Abweichungen von der Normalverteilung [184]. Alle diese Annahmen sprechen für die Verwendung von parametrischen Tests zum Zweck der statistischen Analyse der Daten.

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit relevanten statistischen Methoden noch näher erläutert. Zudem wird auf Besonderheiten in der Analyse von Microarraydaten näher eingegangen. Dazu gehören die Qualitätskontrolle der enormen Datenmengen sowie die Normalisierung der Daten, um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Chips und Experimenten zu gewährleisten. Des Weiteren werden Methoden zur Visualisierung der Daten und der Analyse von Datenzusammenhängen angesprochen. Die statistische Analyse der Microarraydaten wurde mit der Software Expressionist[®] Analyst von Genedata (Basel/ Schweiz) durchgeführt. Der letzte Teil der Datenanalyse bestand dann in der biologischen Interpretation, welche mit verschiedenen Softwaresystemen (ToxWiz von Cambridge Cell Networks (Cambridge, UK) und Metacore von GeneGo (St. Joseph, USA)) und Datenbanken (NCBI/ NCBI AceView) [185, 186] durchgeführt wurde.

2.7.2 Qualitätskontrolle der Microarrays

Die Überprüfung der Qualität der Illumina-Microarrays erfolgte mit der BeadStudio Software von Illumina. Zur Überprüfung der Laborprozesse der cRNA-Synthese, der Hybridisierung bis hin zur Generierung des Fluoreszenzsignals gibt es von Illumina sechs verschiedene Kontrollen auf den *BeadChips*. Die erste Kontrolle stellen 14 verschiedene Sonden für *Housekeeper* dar. Dabei werden zwei verschiedene Oligonukleotidsonden für je einen *Housekeeper* eingesetzt. Die von Illumina gewählten *Housekeeper* sind speziesspezifisch charakteristisch und sollten für die verwendete Spezies immer exprimiert werden. Die nächsten drei Kontrollen sind zur Qualitätskontrolle des Hybridisierungsprozesses vorhanden. Dazu gehören eine Cy3, eine hoch-stringente und eine niedrig-stringente Hybridisierungskontrolle. Die Cy3-Kontrolle besteht aus sechs verschiedenen Oligonukleotidproben auf dem Chip und den korrespondierenden Cy3-markierten Oligonukleotiden, welche über den *HybE1*-Puffer in die Reaktion eingebracht werden. Damit liefern die Cy3-Kontrollen bei erfolgreicher Hybridisierung unabhängig von der RNA-Probenqualität und dem Präparationsprozess der Proben ein Signal. Die niedrig-stringente Kontrolle entspricht der Cy3-Kontrolle, besitzt aber zwei Fehlpaarungsstellen in der Oligonukleotidsequenz auf dem Chip. Außerdem setzt sie sich nur aus vier verschiedenen Proben zusammen. Bei optimaler Hybridisierung liefern diese Proben nur ein schwaches Signal. Im Gegensatz dazu liefert die hoch-stringente Kontrolle, aufgrund des hohen GC-Gehaltes im Oligonukleotid ein sehr starkes Signal. Die fünfte Kontrolle ist die Biotinkontrolle, welche aus zwei Proben besteht. Diese Biotin-markierten Oligonukleotide gelangen über den *HybE1*-Puffer in die Reaktion und zeigen den Erfolg der sekundären Färbereaktion mit dem Cy3-Farbstoff an. Die sechste Kontrolle besteht aus 20 verschiedenen Oligonukleotiden mit randomisierter Sequenz, welche keinen Partner im Genom der jeweiligen Spezies besitzt. Diese Kontrolle dient als Negativkontrolle und definiert den Hintergrund des Systems. Sie zeigt damit auch unspezifische Bindungen des Farbstoffs oder Kreuzreaktionen bei der Hybridisierung an. Anhand dieser Kontrolle wird im BeadStudio die Detektionsgrenze für die Genexpression des Experiments festgelegt [187].

Neben einer zusammenfassenden Darstellung der Kontrollen erlaubt es die BeadStudio Software durch verschiedene Möglichkeiten die Daten zu visualisieren (*Log-Log-Plots*, Histogramme, *Box-Plot*-Analysen), um experimentelle Ausreißer zu identifizieren.

Arrays, welche die Qualitätsmerkmale nicht erfüllten, wurden aus der Analyse entfernt bzw. erneut hybridisiert.

2.7.3 Normalisierung der Microarraydaten

Zum Vergleich von Genexpressionsdaten, welche unter verschiedenen Bedingungen (z.B. verschiedene Zeitpunkte, Technologien, Experimenten oder Gewebe) gewonnen wurden, ist es notwendig, die Daten auch vergleichbar zu machen [188]. Dazu werden die Daten mit speziellen Algorithmen normalisiert. Systematische Fehler, die zu Abweichungen in der Signalintensität verschiedener Arrays führen, können durch eine normalisierende Transformation ausgeglichen werden [184]. Solche Unterschiede in der Signalintensität zwischen verschiedenen Arrays können aus verschiedenen Gründen, wie unterschiedliche Protokolle, Einsatzmengen der mRNA, Scannereinstellungen, Hybridisierungen oder cRNA-Synthesekits, zustande kommen. Unter den Normalisierungsmethoden werden lineare und nicht-lineare Methoden unterschieden. Zu den linearen Methoden gehören Mittelwert- bzw. Median-Normalisierungen, bei denen alle Intensitäten um den entsprechenden Wert korrigiert werden. Des Weiteren können Referenzgene (*Housekeeper*), die gleiche Expressionswerte zwischen verschiedenen Arrays aufweisen sollten, als Normalisierungsausgangspunkt genutzt werden. Dabei wird jeweils der Abweichungsfaktor zwischen den verschiedenen Arrays errechnet und die Genintensitäten um diesen Faktor korrigiert [188]. Solche Methoden bieten sich an, wenn sich im *Log-Log-Plot* der Intensitäten zwischen verschiedenen *Arrays* eine Verschiebung der Datenwolke parallel zur Mittellinie zeigt. Für Datensätze, welche einen nicht-linearen Verlauf (häufig bananenförmig) im *Log-Log-Plot* (bananenförmiger Verlauf) zeigen, werden nicht-lineare Methoden genutzt. Zu diesen Methoden gehören zum Beispiel die LOWESS-, Quantil- und Cubic Spline-Normalisierung.

LOWESS (*Locally Weighted Polynomial Regression*) unterteilt die Daten in eine Anzahl von überlappenden Intervallen und passt eine Funktion ähnlich einer exponentiellen Normalisierung aber in polynomischer Form an [188]. Nachteile der LOWESS-Normalisierung sind, dass sie nicht einfach in einer mathematischen Formel darstellbar und durch die komplizierte Berechnung sehr zeitintensiv ist. Dieser Nachteil kann heute allerdings durch effektive Computersoftware aufgefangen werden. Ein anderer Nachteil ist, dass LOWESS anfällig gegenüber Hintergrundrauschen und Ausreißern ist. Des-

wegen sollten Ausreißer vorher aus dem Datensatz entfernt werden [188]. Die Software Expressionist[®] Analyst bietet zur Datennormalisierung mit LOWESS einen modifizierten Algorithmus von Cleveland an [189]. Dabei werden die Daten gegen ein Referenzexperiment normalisiert. Werden mehrere Daten ausgewählt, so wird ein gemitteltes Referenzexperiment verwendet.

2.7.4 Globale Datenbetrachtung

2.7.4.1 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (*Principal component analysis*, PCA) ist eine Visualisierungsmöglichkeit für umfangreiche Datensätze, wie Microarraydaten [188]. Das Ziel der Analyse ist es den multidimensionalen Datensatz auf wenige bedeutende Dimensionen zu reduzieren, wobei der Informationsverlust möglichst minimal sein soll. Jedes Experiment und jedes Gen repräsentieren in einem Microarraydatensatz jeweils eine Dimension. Hat man beispielsweise zehn verschiedene Experimente, in welchen 20.000 Gene gemessen wurden, so wäre die Darstellung einer Datenwolke aus den zehn Experimentpunkten im 20.000-dimensionalen Raum. Für die Hauptkomponentenanalyse werden die Dimensionen als bedeutende Dimensionen angesehen, welche zwischen den Daten stark variieren. Anderen Dimensionen mit einer geringen Varianz innerhalb des Datensatzes werden vernachlässigt. Bei der Hauptkomponentenanalyse werden statistische Eigenschaften erster Ordnung der Daten (Varianz) genutzt, um die Daten in einem neuen Koordinatensystem mit einigen wenigen Dimensionen darzustellen. Häufig werden zwei- oder dreidimensionale Darstellungen genutzt. Die Richtungen der neuen Achsen im Koordinatensystem sind Eigenvektoren der Korrelationsmatrix der Daten und stehen senkrecht aufeinander. Wird die Hauptkomponentenanalyse anhand von Genen verschiedener Experimente durchgeführt, dann werden im Graph die einzelnen Experimente jeweils als Punkt dargestellt. Wird die Analyse hingegen mit einem bestimmten Experiment durchgeführt, dann wird jedes Gen im Graph als ein Datenpunkt dargestellt. Die Hauptkomponentenanalyse kann somit einen in den Daten vorhandenen Trend wiedergeben, aber auch Ausreißer aufzeigen oder dazu genutzt werden, Gene mit niedriger Variabilität zwischen verschiedenen Experimenten herauszufiltern [188].

2.7.5 Student's T-Test

Der T-Test wurde 1908 von William Sealy Gosset, einem Chemiker der Guinness Brauerei in Dublin, für die Qualitätskontrolle des Brauprozesses eingeführt [188]. Da die Guinness Brauerei Gosset nicht erlaubte unter seinem Namen zu publizieren, schrieb er alle seine Veröffentlichungen unter dem Künstlernamen „Student“, wodurch der T-Test als Student's T-Test weltbekannt wurde. Der T-Test ist eine Form der Hypothesentestung und wird zur Kalkulation der Wahrscheinlichkeit, dass die beobachteten Werte gefunden wurden, obwohl die Nullhypothese gilt, angewendet. Die Nullhypothese besagt, dass sich der Mittelwert zwischen den beiden Verteilungen (Kontrolle und behandelten Proben) nicht unterscheidet. Zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit werden der Mittelwert und die Varianz der Proben verwendet. Die zugrunde liegende Wahrscheinlichkeitsverteilung wird t-Verteilung genannt und hängt von der Anzahl der Freiheitsgrade ab. Die Anzahl der Freiheitsgrade berechnet sich aus der Anzahl n an unabhängigen Messungen minus der Anzahl an in die Berechnung einfließenden Parametern [188]. Die Berechnungen des t-Wertes für zwei normalverteilte Stichproben mit gleichen Varianzen wurden wie folgt vorgenommen [190]:

$$t = \sqrt{n} \frac{d}{s_d}$$

Formel 2.6: Berechnung des t-Wertes für zwei verbundene Stichproben.

d	Mittelwert der Differenzen vor und nach der Behandlung
sd	Stichprobenstandardabweichung der Differenzen vor und nach der Behandlung
n	Stichprobenumfang

Die Anzahl der Freiheitsgrade für die Berechnung des p-Wertes beträgt für verbundene Stichproben $n-1$.

$$t = \frac{(\bar{x} - \bar{y})}{s \times \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m}}}$$

Formel 2.7: Berechnung des t-Wertes für zwei unverbundene Stichproben.

\bar{x}	Mittelwert der Stichprobe 1
\bar{y}	Mittelwert der Stichprobe 2
n	Stichprobenumfang der Stichprobe 1
m	Stichprobenumfang der Stichprobe 2
s	gepoolte Standardabweichung

$$s = \sqrt{\frac{(n-1) \times s_x^2 + (m-1) \times s_y^2}{n+m-2}}$$

Formel 2.8: Berechnung des gepoolten Standardabweichung für die Berechnung des t-Wertes für zwei unverbundene Stichproben.

s_x^2	Varianz der Stichprobe 1
s_y^2	Varianz der Stichprobe 2
n	Stichprobenumfang der Stichprobe 1
m	Stichprobenumfang der Stichprobe 2

Die Anzahl der Freiheitsgrade für die Ermittlung des p-Wertes errechnet sich bei zwei unverbundenen Stichproben aus $n+m-2$ [190]. Anhand der ermittelten t-Werte und mit Hilfe der Freiheitsgrade kann aus der t-Verteilung mit Hilfe von Tabellen oder geeigneter Statistik-Software die Wahrscheinlichkeit (p-Wert), dass die Nullhypothese gilt, ermittelt werden. Ein kleiner p-Wert sagt somit aus, dass die Wahrscheinlichkeit, dass die Mittelwerte der beiden Verteilungen übereinstimmen (Nullhypothese) sehr gering ist und somit die Alternativhypothese angenommen werden kann [190]. Dazu wird ein bestimmtes Signifikanzniveau festgelegt. Häufig wird aus historischen Gründen 0,05 als Signifikanzniveau in der Statistik verwendet, d.h. bei einem p-Wert von 0,05 hat man eine 5 %ige Irrtumswahrscheinlichkeit die Nullhypothese fälschlicherweise abgelehnt zu haben .

2.7.6 ANOVA

Im Gegensatz zum T-Test erlaubt es die Varianzanalyse ANOVA, mehrere verschiedene Gruppen oder Bedingungen parallel zu testen [188]. Im einfachsten Fall von zwei Proben entspricht die ANOVA dem T-Test. Man unterscheidet bei der ANOVA zwischen unifaktorieller und mehrfaktorieller Varianzanalyse, die sich in der Anzahl der einfließenden Faktoren in die Analyse unterscheiden. Eine einfache ANOVA basiert darauf, dass die Variabilität zwischen den verschiedenen Testgruppen mit der Variabilität innerhalb der Testgruppe verglichen wird. Die Voraussetzungen für die ANOVA sind, wie für den T-Test, Varianzhomogenität und die Normalverteilung der Daten. Die zugrunde liegende Wahrscheinlichkeitsverteilung ist die F-Verteilung [188].

Das mathematische Prinzip hinter einer einfaktoriellen ANOVA ist die Zerlegung der Quadratsumme der Gesamtvarianz (SS_{Total}), d.h. der Quadratsumme aller Differenzen der individuellen Beobachtungen vom globalen Mittelwert [188]:

$$SS_{\text{Total}} = SS_{\text{Fehler}} + SS_{\text{Kond.}}$$

Formel 2.9: Zerlegung der Quadratsumme für die Gesamtvariabilität als Grundprinzip der ANOVA.

SS_{Fehler} ist dabei die Quadratsumme der Varianz innerhalb der Gruppen [188]. Sie sollte im Prinzip gering sein, da jegliche Abweichungen zwischen den Replikaten einer Gruppe durch experimentelle Fehler zustande kommen. Deshalb wird diese Varianzquadratsumme als SS_{Fehler} bezeichnet. Die $SS_{\text{Kond.}}$ steht für die Varianz der Gruppen um den globalen Mittelwert (Varianz zwischen den Gruppen) und charakterisiert die Varianz einer bestimmten Kondition/ Bedingung (oder Behandlung). Mit Hilfe der entsprechenden Freiheitsgrade können dann die mittleren Fehlerquadrate für SS_{Fehler} und $SS_{\text{Kond.}}$ berechnet werden [188]:

$$(A) \quad MS_F = \frac{SS_{Fehler}}{N - k}$$

$$(B) \quad MS_{Kond.} = \frac{SS_{Kond.}}{k - 1}$$

Formel 2.10: Berechnung der mittleren Fehlerquadrate für die Variabilität innerhalb der Gruppen (A) und zwischen den Gruppen (B) zur Berechnung des F-Wertes bei der ANOVA.

k	Anzahl an verschiedenen Bedingungen
N	Gesamtanzahl an Messungen im Datensatz
SS _{Fehler}	Quadratsumme der Varianz innerhalb der Gruppen
SS _{Kond.}	Quadratsumme der Varianz zwischen den Gruppen

$$F = \frac{MS_{Kond.}}{MS_F}$$

Formel 2.11: Berechnung des F-Wertes bei der einfaktoriellen Varianzanalyse.

SS _{Kond.}	Quadratsumme der Varianz zwischen den Gruppen
MS _F	mittlere Fehlerquadrate für die Variabilität innerhalb der Gruppen

Anhand des F-Wertes und mit den Freiheitsgraden $k-1$ und $N-k$ kann anschließend der p-Wert ermittelt werden [188]. Dieses Grundprinzip gilt auch für die mehrfaktorielle Varianzanalyse, bei der verschiedene Faktoren gleichzeitig, z.B. Behandlung und Zeitverlauf, untersucht werden können. Die Varianzanalyse wurde in dieser Arbeit genutzt, um die genotoxischen Behandlungsgruppen in verschiedenen Dosierungen gegen die nicht-genotoxischen Kontrollen zu vergleichen. Die Berechnungen erfolgten mit der Software Expressionist[®] Analyst von Genedata (Basel/ Schweiz).

2.7.7 Fehler beim statistischen Testen und Probleme des multiplen Testens

Bei der statistischen Hypothesentestung gibt es zwei verschiedene Fehlerarten, α - und β -Fehler [188, 190]. Der α -Fehler bedeutet, dass man die Nullhypothese fälschlicherweise ablehnt, obwohl sie gilt. Dieser Fehler ist mit dem p-Wert kalkulierbar. Im Gegensatz dazu, tritt der β -Fehler unter der Alternativhypothese auf, d.h. man nimmt fälschlicherweise die Nullhypothese an, obwohl sie nicht gilt. Dieser Fehler ist nicht kalkulierbar und ist vor allem bei kleinen Stichprobenumfängen groß [188, 190].

Tabelle 2.17: Fehlerarten beim statistischen Testen.

Die Tabelle gibt einen Überblick über mögliche Fehler beim statistischen Testen und bezeichnet die aufgeschlüsselten Ausgänge mit entsprechenden Variablen. G = Anzahl der Hypothesen (z.B. Gene auf dem Microarray), R = Testergebnis (als signifikant deklarierte Gene durch den Test), G_0 = Anzahl wahre Nullhypothesen, G_1 = Anzahl wahre Alternativhypothesen, B/G_0 = Falsch-Positiv-Rate, $1-(B/G_0)$ = Spezifität (Richtig-Negativ-Rate), D/G_1 = Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate), C/G_1 = Falsch-Negativ-Rate [Tabelle modifiziert nach 188, 190]

		Testentscheidung		
		Nullhypothese	Alternativhypothese	
Realität	Nullhypothese ist richtig	(A) Richtige Entscheidung $1-\alpha$	(B) Falsche Entscheidung α (Fehler 1.Art)	G_0
	Alternativhypothese ist richtig	(C) Falsche Entscheidung β (Fehler 2.Art)	(D) Richtige Entscheidung $1-\beta$	G_1
		$G-R$	R	G

Ein weiteres Problem, auf welches man vor allem bei der Testung von tausenden Hypothesen parallel bei der Analyse von Microarraydaten stößt, ist es, dass der Fehler 1. Art (α -Fehler) sehr groß werden kann [188]. Bei 1.000 Tests und einem Signifikanzlevel von 0,05 sind schon 50 falsch positive Ergebnisse wahrscheinlich. Die Wahrscheinlichkeit, dass wenigstens ein p-Wert kleiner ist als α konvergiert für unabhängige Tests mit steigendem k nach $1-(1-\alpha)^k$. Nimmt man zum Beispiel ein α von 0,01 an und testet 1.000-mal, dann ist die Wahrscheinlichkeit mindestens ein signifikantes Ergebnis zu bekommen schon 0.9999568. Die individuellen p-Werte reichen deshalb allein nicht aus, um die falsch-positiven Ergebnisse zu kontrollieren [188].

Eine Möglichkeit zur Kontrolle ist die Adjustierung von p-Werten. Viele dieser Methoden sind allerdings zu konservativ für Microarrays und können zu einer niedrigen Sensitivität führen [191]. Eine bessere Möglichkeit ist die so genannte *False Discovery Rate* (FDR). Definiert ist die FDR als der erwartete Anteil an falsch-positiven (Fehlern 1. Art) unter den als signifikant deklarierten Resultaten [191]. Folgendes Beispiel soll das Problem des multiplen Testens illustrieren: Angenommen von 10.000 (G) untersuchten Genen sind 9.500 (G_0) in Wirklichkeit nicht dereguliert und 500 (G_1) sind dereguliert. Die Hypothesentestung liefert nun als Ergebnis 875 (R) signifikant deregulierte Gene (siehe Tab. 2.17 für die Buchstabenbezeichnungen). Nimmt man an, dass davon nur 400 Gene (D) auch in Wirklichkeit exprimiert und 475 (B) falsch-positiv sind, dann ist die Falsch-Positiv-Rate $475 (B)/9.500 (G_0) = 5 \%$, d.h. der Anteil an

falsch-positiven Genen, an den in Wirklichkeit nicht deregulierten Genen. Das wiederum bedeutet, dass der Test eine Richtig-Negativ-Rate (Spezifität) von 95 % besitzt. Auch die Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate) des Tests ist für das folgende Beispiel hoch: 400 (D) von 500 (G_1) Genen wurden richtig erkannt, was 80 % entspricht. Betrachtet man nun aber die FDR: 475 (B, falsch-positiv identifizierte Gene)/ 875 (R, vom Test als signifikant deklarierte Gene) = 54 %, d.h. in diesem Fall sind 54 % der als signifikant durch den Test gefundenen Gene fingiert. Dieses Beispiel zeigt, dass wenn nur die Signifikanz mit dem p-Wert, also die Falsch-Positiv-Rate kontrolliert wird, trotzdem eine hohe Rate an falsch-signifikanten (gefundenen/*discovered*) Genen existieren kann und das trotz einer adäquaten Power des Tests. Der Grund dafür liegt eben an der großen Anzahl an getesteten Hypothesen (im Beispiel 10.000 Gene) und dem nur geringen Anteil an deregulierten Genen im Vergleich zur Gesamtanzahl der untersuchten Gene. Durch Reduktion des p-Wertes kann auch die FDR minimiert werden, allerdings hängt diese aber immer vom Anteil der Gene ab, die auch in Wirklichkeit reguliert sind. Der p-Wert ist also nur ein indirekter Weg zur Kontrolle der FDR, besser ist es, die FDR selbst als Kriterium zu verwenden [191]. Deshalb wurde bei der Analyse der Microarraydaten in der vorliegenden Arbeit die FDR von Benjamini und Hochberg als Signifikanzkriterium anstelle des p-Wertes verwendet [192].

2.7.8 K-Means

Das *K-Means Clustering* gehört zu den nichtüberwachten (*unsupervised*) statistischen Lernverfahren. Das Ziel einer *K-Means Cluster*-Analyse ist es M verschiedene Datenpunkte (Gene) in N Dimensionen in eine Anzahl von k *Clustern* einzuteilen, so dass die Summe der Quadrate minimal wird [193]. Vor der Analyse wird festgelegt, in wie viele verschiedene *Cluster* man den Datensatz einteilen möchte. Zuerst werden dann alle Gene zufällig auf die k *Cluster* verteilt und die Distanz jedes Gens zu jedem der k *Cluster*-Zentren berechnet. Wenn für ein Gen dabei eine niedrigere Distanz zu einem anderen *Cluster*-Zentrum errechnet wird, als zu dem ursprünglich zugeordneten *Cluster*-Zentrum, wird es neu dem anderen *Cluster*-Zentrum zugeordnet. Sind alle Gene zugeordnet, werden die Distanzen erneut berechnet. Nach einigen Iterationen wird es keine Veränderungen in den Zuordnungen mehr geben und der

Algorithmus stoppt [184]. Mit der Software Expressionist[®] Analyst ist es zudem möglich, die optimale Anzahl an k berechnen zu lassen. Das *K-Means Clustering* wurde in dieser Arbeit verwendet, um Gene, welche mittels ANOVA als statistisch signifikant reguliert gefunden wurden, in verschiedene Gruppen (z.B. hoch- und herunterreguliert) einzuteilen und den Verlauf der Deregulation zwischen den verschiedenen Kontroll- und Behandlungsgruppen näher zu analysieren.

2.7.9 Maschinelles Lernen (*Supervised Learning*)

Die Extraktion nützlicher Informationen aus den massiven Datenmengen bei Omicsstudien ist eine der größten Herausforderungen der modernen Bioinformatik. Maschinelles Lernen (Überwachtes Lernen oder engl. *Supervised Learning*) heißt, mittels Computerprogrammierung ein bestimmtes Leistungskriterium in Form von Parametern eines mathematischen Modells anhand von Beispieldaten aus der Vergangenheit zu optimieren [194]. Das wiederum bedeutet, dass mit Hilfe des Computerprogramms gewisse Muster oder Gesetzmäßigkeiten aus den Lerndaten abgeleitet werden, welche prädiktiv für die Beurteilung unbekannter Daten sein können. Darin liegt zudem der Unterschied zwischen überwachtem und unüberwachtem Lernen. Während das Ziel beim überwachten Lernen das Erlernen der Abbildung von Ein- auf bekannte Ausgabewerte ist, sind die Ausgabewerte beim unüberwachten Lernen nicht bekannt. Für die Erstellung mathematischer Modelle im Rahmen des maschinellen Lernens werden statistische Theorien mit effizienten Algorithmen verarbeitet. Die verschiedenen maschinellen Lernalgorithmen unterscheiden sich entweder in den vorausgesetzten Modellen, den verwendeten Verlustmaßen oder in der eingesetzten Optimierungsprozedur [194].

2.7.9.1 Klassifikationsalgorithmen beim maschinellen Lernen

Die in dieser Arbeit verwendeten Klassifikationsalgorithmen waren *K-Nearest Neighbours*, *Sparse Linear Discriminant Analysis* und die Supportvektormaschinen. Das Nächste-Nachbarn- (*K-Nearest Neighbour*)-Modell ist ein Klassifikationsverfahren,

bei dem die Zuordnung einer Probe zur jeweiligen Klasse aufgrund der Betrachtung der Annotation der k nächsten Nachbarproben vorgenommen wird [194].

Hingegen basiert die lineare Diskriminanzanalyse (LDA) auf der Konstruktion einer Hyperebene zwischen den Datengruppen. Die Hyperebene wird dabei durch eine lineare Diskriminanzfunktion beschrieben [194]. Im Allgemeinen werden die Daten bestehend aus k Gruppen bei der LDA versucht im niedrig-dimensionalen Raum anhand der am besten diskriminierenden Komponenten mit höchstens $k-1$ zu trennen [195]. Die diskriminierenden Komponenten sind dabei diejenigen orthogonal zueinander stehenden Komponenten, bei welchen die Varianz zwischen den Klassen maximal und innerhalb der Klassen minimal ist. Allerdings ist die einfache LDA oft nicht geeignet, wenn die Anzahl der Prädiktionsvariablen zu groß, im Vergleich zur Anzahl der Beobachtungen ist, wie es bei Omics-Analysen vorkommt. Außerdem ist es bei Omics-Analysen wichtig, die essentiellen Merkmale des Datensatzes zu selektieren. Das kann durch die Verwendung einer speziellen Modifikation der LDA, der so genannten spärlichen LDA (*Sparse Linear Discriminant Analysis*, SLDA), erreicht werden. Diese beschränkt sich auf nur wenige Merkmale, welche für die Trennung von zwei oder mehr Klassen notwendig sind. Da die Merkmalsselektion, die Dimensionsreduktion und die anschließende Klassifizierung in einer Analyse vereint sind, ist die SLDA schneller als traditionelle LDA-Methoden [195].

Die so genannten Supportvektormaschinen (SVMs) basieren auf der Präprozessierung der Daten, um ein charakteristisches Muster in einer hohen Dimension darzustellen und anhand dessen eine Trennung durch Berechnung einer Hyperebene vornehmen zu können (Abb. 2.11) [196]. Das Ziel bei den SVMs ist es, eine klassenseparierende Hyperebene mit maximaler Breite zu ermitteln, da erwartet wird, dass je breiter die Trennebene, umso besser auch die Generalisierung des Klassifikators ist. Die Hyperebene wird aufgrund von Stützvektoren definiert. Diese werden durch die Trainingsproben mit gleichem Abstand zur Trennebene verkörpert. Diese Proben sind einerseits die am schwierigsten zu klassifizierenden Proben, aber andererseits auch diejenigen, die die informativsten Muster für die Klassifizierung liefern.

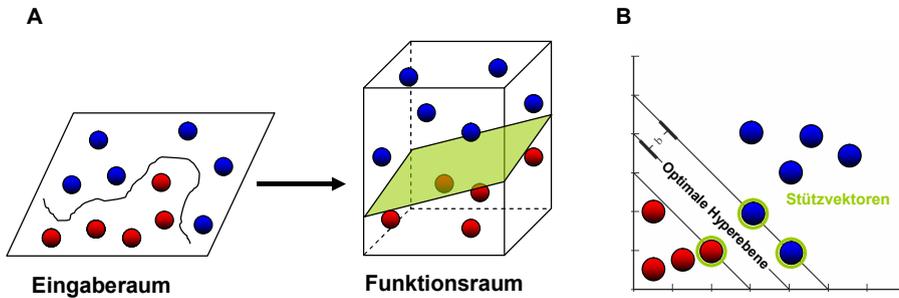


Abbildung 2.11: Prinzip der Supportvektormaschinen. (A) Die Daten des Eingaberaums werden für die Trennung entsprechend hochdimensional verarbeitet in einem Funktionsraum dargestellt. (B) Drei Stützvektoren (grün) bestimmen die Lage und Breite der separierenden Hyperebene. [Abb. modifiziert nach 196]

2.7.9.2 Kreuzvalidierungsmethode

Um die verschiedenen Klassifikationsalgorithmen miteinander zu vergleichen und die Güte der Klassifikatoren einschätzen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine k -fache Kreuzvalidierung herangezogen. Das Prinzip dieser Methode ist es, den Datensatz in k verschiedene Teile zu zerlegen und jeden Teil jeweils bei der Erstellung des Klassifikators herauszulassen [196]. Der ausgelassene Teil wird anschließend als Testdatensatz genutzt und die Fehlerrate bei der Einordnung des Testdatensatzes kalkuliert. Die Fehlerraten der verschiedenen Teiltestungen werden zu einer Gesamtfehlerrate zusammengefasst.

Die *leave-one-out*-Kreuzvalidierung ist ein Sonderfall der k -fachen Kreuzvalidierung, bei welcher immer eine Beobachtung herausgenommen wird [196]. Ambroise *et al.* konnten jedoch zeigen, dass für die Selektion von Genen innerhalb von Microarraystudien eine k -fache Kreuzvalidierung mit $k = 10$ gegenüber der *leave-one-out*-Methode zu bevorzugen ist [197]. Deshalb wurde in dieser Arbeit auf eine 10-fache Kreuzvalidierung zurückgegriffen.

2.7.9.3 Ermittlung von Rangordnungen (*Ranking-Verfahren*)

Neben der Erstellung eines Klassifikators ist es entscheidend, die Gene, mit der meisten Information bezüglich der Klassentrennung herauszufinden [198]. Außerdem kann generell angenommen werden, dass ein Satz von Genen existiert, bei welchem die Missklassifikationsrate minimal ist. Dafür wird einerseits ein Minimum an Genen für eine hinreichende Klassentrennung benötigt, andererseits führt die Verwendung zu vieler Gene durch den hohen Hintergrund meist zu einer reduzierten Trennschärfe (Abb. 2.12).

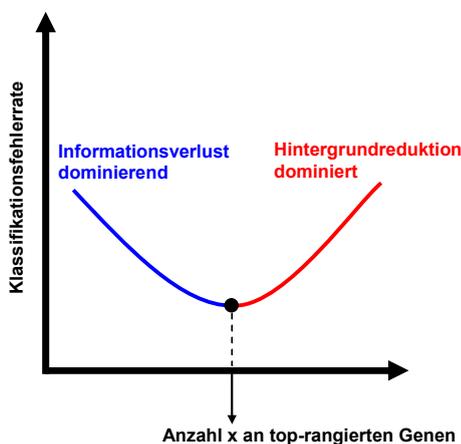


Abbildung 2.12:
Selektion der informativsten Gene
für die Klassifikation mittels
Ranking.

[Abb. modifiziert nach 198]

Zur Extraktion der informativsten Gene wurde in dieser Arbeit ein *Ranking-Verfahren* genutzt. Als *Ranking-Methode* wurde eine ANOVA herangezogen. Diese vergleicht, wie unter 2.7.6 bereits beschrieben, die Varianzen zwischen den Gruppen der Experimente mit den Varianzen innerhalb der Gruppen. Beim *Ranking* werden die Gene demzufolge nach ihrem ANOVA p-Wert sortiert. Anschließend wird die Missklassifikationsrate mit Hilfe einer *k*-fachen Kreuzvalidierung für verschiedene Untergruppen an Genen, beginnend mit dem gesamten Datensatz, gefolgt von der sukzessiven Auslassung weiterer Gene, berechnet [198]. Eine skizzierte Darstellung der erhaltenen Kurven gibt Abbildung 2.12. Zum Vergleich mehrerer Klassifikationsalgorithmen können diese parallel getestet und anhand ihrer Kurvenverläufe vergleichend betrachtet werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Untersuchung genotoxischer Verbindungen *in vitro*

3.1.1 Genexpressionsanalysen mit genotoxischen Verbindungen

3.1.1.1 Globale Datenbetrachtung

Das Hauptziel der Microarraystudie mit den genotoxischen Verbindungen ACT, MMS und ETO war es, Gemeinsamkeiten im Genexpressionsprofil zu finden und diese von den Kontrollen abzugrenzen. Solche Übereinstimmungen im Profil könnten künftig zur Identifikation und Charakterisierung von Verbindungen mit unbekanntem Wirkmechanismus bezüglich ihrer Genotoxizität dienen. Vor der Analyse der Gemeinsamkeiten dieser Verbindungsklasse wurde jedoch eine globale Betrachtung des Datensatzes vorgenommen. Dazu wurden die Daten mittels Hauptkomponentenanalyse anhand von drei Hauptmerkmalen des Genexpressionsmusters aufgetrennt (Abb. 3.1).

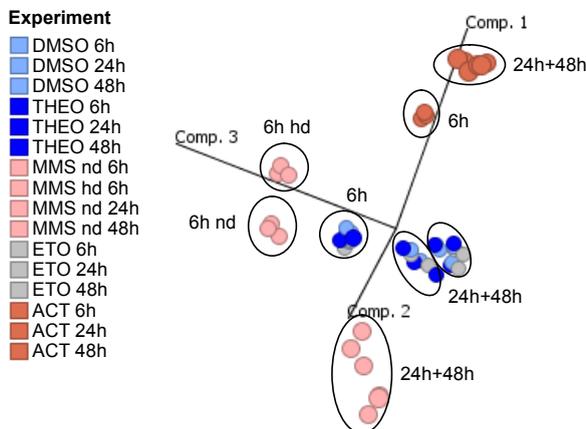


Abbildung 3.1: Hauptkomponentenanalyse (PCA) des globalen Datensatzes aus den Microarrayexperimenten mit genotoxischen Verbindungen. Die PCA zeigt den Datensatz im dreidimensionalen Raum aufgetrennt nach drei Haupteigenschaften innerhalb der Genregulationen des Datensatzes. Für die Illumina-Microarrayanalysen wurden HepG2-Zellen mit den genotoxischen Substanzen Methylmethansulfonat (MMS), Eto-

posid (ETO) und Actinomycin D (ACT) behandelt. DMSO (0,5 % v/v) diente als Lösungsmittelkontrolle und Theophyllin (THEO) als Negativsubstanz. Die verwendeten Behandlungskonzentrationen lagen bei 500 μM (niedrige Dosis = nd) und 2 mM (hohe Dosis = hd) für MMS, 500 nM für ETO, 250 nM für ACT und 100 μM für THEO. Die Behandlung erfolgte täglich und die Zellen wurden nach 6 h, 24 h und 48 h geerntet bevor die Genexpressionsänderungen quantifiziert worden. Die Rohdaten wurden vor der Hauptkomponentenanalyse mit der LOWESS-Regression normalisiert. [Abb. modifiziert nach Gene-data's Expressionist[®] Analyst, Basel/ Schweiz]

Innerhalb der PCA-Komponente 3 ordnen sich die drei verschiedenen Zeitpunkte 6 h, 24 h und 48 h der Kontrollen DMSO und Theophyllin (THEO) sowie die genotoxische Substanz ETO an. Dabei ist der frühe Zeitpunkt deutlich von den beiden späteren Zeitpunkten abgrenzbar. Außerdem befinden sich entlang dieser Komponente die 6 h Behandlungen von MMS in beiden Dosierungen. Im Gegensatz dazu konnte ACT schon ab dem 6 h Zeitpunkt separat entlang der Komponente 1 aufgetrennt werden. Dies zeigt, dass in der verwendeten Konzentration von 250 nM bereits nach 6 h starke Genexpressionsveränderungen zu verzeichnen waren. Trotz alledem konnte der 6 h Zeitpunkt klar von den beiden späteren Zeitpunkten abgegrenzt werden. Im Gegensatz dazu schienen die Genexpressionsveränderungen zwischen 24 h und 48 h relativ konstant zu bleiben, da eine Auftrennung dieser beiden Zeitpunkte für ACT nicht beobachtet werden konnte.

Ein ähnliches Bild, wie für ACT, wurde für die DNA-methylierende Substanz MMS in der niedrigen Dosis (nd) von 500 μ M erhalten. Die Behandlungen 24 h und 48 h waren gemeinsam entlang der Komponente 2 beobachtet worden. Für die hohe Dosierung (hd) des MMS von 2 mM konnte aufgrund starker zytotoxischer Effekte keine RNA für die Microarrayanalyse nach 24 h und 48 h gewonnen werden. Die 6 h Behandlungen in der nd und hd des MMS clustern, wie auch ETO, THEO und DMSO, entlang der Komponente 3. Allerdings konnten die MMS-Behandlungen innerhalb dieser Komponente klar von denen der anderen Proben abgegrenzt werden. Die Hauptkomponentenanalyse zeigt damit für MMS sowie ACT, die stärksten Veränderungen im Genexpressionsprofil unter den verwendeten Konzentrationen und Substanzen auf. Dennoch ist für beide Substanzen der frühe Zeitpunkt den Kontrollen noch ähnlicher als die späten Zeitpunkte, was einen klaren Zeitverlauf der zunehmenden Genexpressionsveränderungen widerspiegelt.

Im Gegensatz zu MMS und ACT konnte ETO in der Konzentration von 500 nM im globalen Profil noch nicht von den Kontrollen DMSO und THEO abgetrennt werden. Eine Begründung für die Beobachtung könnte die im Vergleich zu ACT und MMS geringere Dosierung sein, die sich anhand des Zytotoxizitätsstatus beobachten ließ. Während ETO optisch keine Zytotoxizität zeigte, konnte für ACT und MMS vor allem bei den späten Zeitpunkten mikroskopisch zytotoxische Effekte beobachtet werden. Neben zytotoxischen Aspekten müssen allerdings auch die starken Expressionsveränderungen von ACT und MMS mit in die Betrachtung einbezogen werden. Durch diese starken Veränderungen können die schwächeren Veränderungen durch ETO nicht in den drei Komponenten aufgetrennt werden. Die Hauptkomponentenanalyse kann

deshalb lediglich einen Überblick über den Datensatz geben. Tiefgreifende Aussagen sind anhand dieser Darstellung nicht möglich. Sie erfordern eine weiterführende statistische Analyse und funktionelle Interpretation der Daten (siehe folgenden Abschnitt 3.1.1.2).

3.1.1.2 Putative Markergene für genotoxische Verbindungen

Um gemeinsam regulierte Gene der genotoxischen Testsubstanzen zu finden, wurden die Substanzen zunächst in zwei Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 enthielt die Kontrollen DMSO und THEO. Hingegen umfasste Gruppe 2 die genotoxischen Verbindungen ETO, ACT und MMS. Diese Gruppen wurden mit einer Varianzanalyse (ANOVA) auf Unterschiede untersucht. Dabei wurden Gene, welche einen p-Wert und einen BH-q-Wert² von kleiner als 0,01 aufwiesen, gruppiert. Dieser Gensatz wurde weiterhin kondensiert, indem nur Gene, welche gegenüber der DMSO-Kontrolle eine Deregulation von $\geq 1,5$ -fach zeigten, ausgewählt worden. Einer der limitierenden Faktoren war ETO, da diese Substanz im Vergleich zu den anderen Substanzen vor allem bei den früheren Zeitpunkten 6 h und 24 h noch relativ wenige Gen-expressionsveränderungen über 1,5-fach im Vergleich zur Kontrolle zeigte. Deshalb wurde das Kriterium, dass alle drei Substanzen wenigstens nach 48-stündiger Behandlung eine 1,5-fache Deregulation gegenüber der Kontrolle aufweisen sollten, gewählt. Der zentrale Gensatz, welcher diese Kriterien der Signifikanz und Deregulation erfüllte, beinhaltete 66 Gene. Von diesen 66 Genen waren 45 Gene hochreguliert und 21 herunterreguliert. Diese Gene wurden mit der Datenbank von GeneGo's Metacore und der NCBI AceView Genbank [186] funktionell gruppiert. Das Resultat ist in Abbildung 3.2 als Gen-Funktions-Darstellung gezeigt. Die Deregulationswerte sind in Anhang 9 aufgeführt.

²False discovery rate nach Benjamini und Hochberg [192]

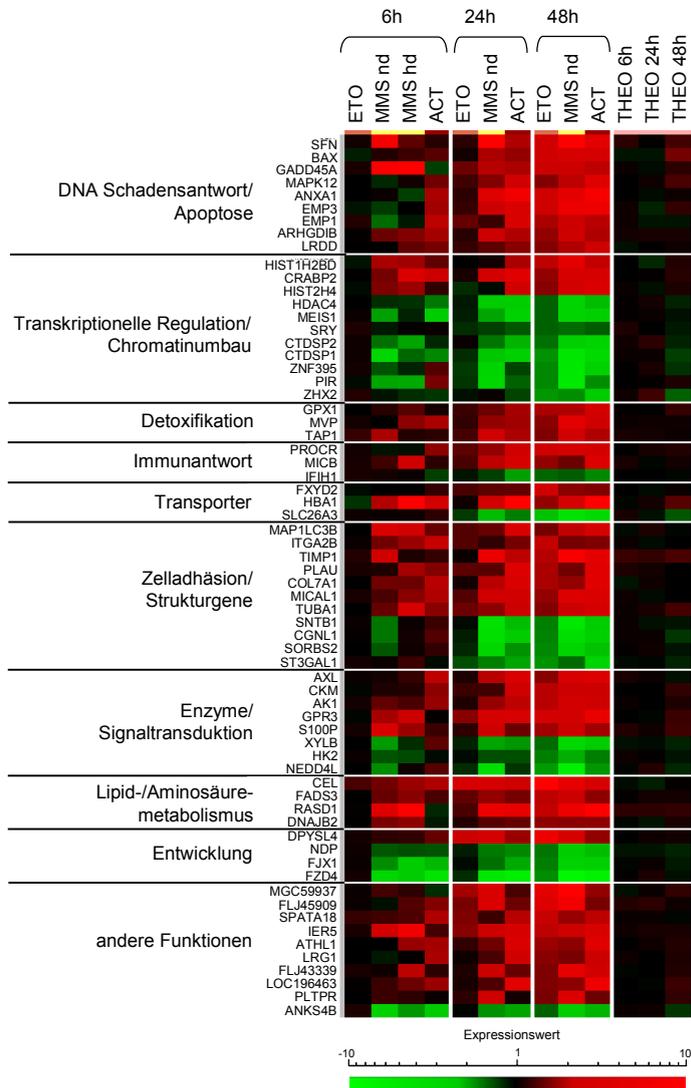


Abbildung 3.2: Gen-Funktions-Darstellung der putativen Markergene für genotoxische Verbindungen in HepG2-Zellen. Die Darstellung zeigt die Genregulation und Funktion der Gene, welche nach 48 h bei den getesteten genotoxischen Verbindungen Actinomycin D (ACT), Methylmethansulfonat (MMS) und Etoposid (ETO) signifikant (ANOVA p-/ BH-q-Wert < 0,01) mehr als 1,5-fach hoch- (rot) bzw. herunterreguliert (grün) waren. Die verwendeten Behandlungskonzentrationen lagen für ETO bei 500 nM, für MMS bei 500 µM (niedrige Dosis = nd) und 2 mM (hohe Dosis = hd) und für ACT bei 250 nM. 100 µM Theophyllin (THEO) diente als Negativkontrolle. Die Behandlung erfolgte täglich über 6 h, 24 h und 48 h bevor die Genexpressionsveränderungen mittels Illumina-Microarrays untersucht worden. [Abb. modifiziert nach Genedata's Expressionist[®] Analyst, Basel/ Schweiz]

Die erste Funktionsgruppe enthält Gene, die als charakteristische Gene innerhalb der Antwort auf einen DNA-Schaden bekannt sind. Eine Vielzahl dieser Gene sind in die P53-Signalkaskade involviert und wurden bei allen genotoxischen Substanzen nach 48 h hochreguliert gefunden (Abb. 3.2). Das Tumorsuppressorgen P53 wird, wie einleitend schon beschrieben (siehe Abschnitt 1.2.1), nach einer DNA-Schädigung aktiviert und vermittelt die Transkription einer Reihe von regulatorischen Genen des Zellzyklus und der DNA-Reparatur. Eines der P53 Targetgene, das durch alle genotoxischen Substanzen stark hochreguliert wurde, ist Stratifin (SFN)³, auch bekannt als 14-3-3 σ . 14-3-3 σ wurde in vielen Krebsarten als unterexprimiert gefunden, was einerseits auf Mutationen im Gen selbst und andererseits auf Mutationen des transkriptionellen Aktivators P53 zurückgeführt werden kann [199]. Wird 14-3-3 σ nach einem DNA-Schaden P53-abhängig exprimiert, inhibiert es durch Bindung an Cdc25 (cell division cycle 25 homolog) den Kernimport dieses Zellzyklusregulators. Cdc25 würde in aktiver Form, ohne den Inhibitor 14-3-3 σ , die Cyclin-abhängige Kinase Cdk1 aktivatorisch dephosphorylieren und somit die Komplexierung von Cdk1 mit Cyclin B und dadurch die Mitoseprogression vermitteln. Die Hochregulation des 14-3-3 σ führt somit zum Zellzyklusarrest in der G₂-Phase [200]. Neben der Interaktion mit Cdc25 innerhalb der G₂-Kontrollpunktregulation sind weitere zellzyklusregulatorische Signalwege des 14-3-3 σ beschrieben worden. 14-3-3 σ inhibiert die Proteinkinase B (PKB/ AKT) und stabilisiert auf diese Weise den Tumorsuppressor p27 (Kip1) [201]. P27 inhibiert wiederum die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK2 sowie CDK4 und CDK6 und verhindert somit deren Komplexierung mit Cyclin E (CDK2) bzw. Cyclin D (CDK4, CDK6), wodurch letztendlich der G₁-Arrest ausgelöst wird [201].

Neben dem 14-3-3 σ spielt auch ein anderes P53-Targetgen, das GADD45 α (growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha/ GADD45A), eine entscheidende Rolle für den Zellzyklusarrest nach einem DNA-Schaden. GADD45 α war nach 48h bei allen drei genotoxischen Substanzen hochreguliert (Abb. 3.2). GADD45 α inhibiert Cdk1 und Cyclin B und bewirkt somit den Arrest in der G₂-Phase des Zellzyklus [202]. GADD45 α spielt allerdings nicht nur während des Zellzyklus- und Wachstumsarrestes nach einem DNA-Schaden eine Rolle, sondern auch bei DNA-Reparaturprozessen.

³Die Gensymbole der in dieser Arbeit verwendeten Genexpressionsplattformen (Illumina und TLDA) sind immer zusätzlich in Klammern aufgeführt, insofern sie nicht mit den im Text verwendeten gebräuchlichsten Genbezeichnungen bzw. Trivialnamen übereinstimmen.

GADD45 α kann veränderte DNA-Stellen oder acetylierte Histone erkennen und erleichtert die Zugänglichkeit der geschädigten Stellen unter anderem durch die Destabilisierung der DNA-Histon-Wechselwirkung [203]. Dadurch können Topoisomerasen ihre relaxierende Funktion ausüben, welche für die Verhinderung von DNA-Strangbrüchen entscheidend ist [203]. Außerdem ist die verbesserte DNA-Zugänglichkeit wichtig für den Angriff von DNA-Reparaturenzymen. GADD45 α interagiert auch selbst mit Komponenten der DNA-Reparatur, wie PCNA (Proliferating cell nuclear antigen), welches in die Nukleotidexzisionsreparatur involviert ist [204].

Unter den putativen Markergenen der Funktionsgruppe 1 wurden zudem einige proapoptische Gene bei allen Substanzen hochreguliert gefunden (Abb. 3.2). BAX (Bcl-2-associated X protein) ist ein Mitglied der Bcl-2-Familie Gruppe 2, welche zu den apoptoseregulierenden Proteinen gehören [205]. BAX kann ein Heterodimer mit BCL-2 bilden und interagiert mit einem Ionenkanal, dem VDAC (Voltage dependent anion channel) in der mitochondrialen Membran. BAX löst auf diese Weise einen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials aus und fördert die Freisetzung von Cytochrom c [206]. Freigesetztes Cytochrom c bindet im Zytoplasma APAF-1 (Apoptotic peptidase activating factor 1) und führt zu dessen Oligomerisierung [205]. Die Bindung von Pro-Caspase 9 führt zur Bildung des so genannten Apoptosomkomplexes. Die aktivierte Caspase 9 aktiviert dann Caspase 3 durch proteolytische Spaltung. Caspase 3 aktiviert schließlich CAD (Caspase activated DNase) im Zellkern, welches für den Abbau des Chromatins verantwortlich ist [205].

Ein weiteres Gen, das nach Behandlung mit genotoxischen Substanzen hochreguliert war, ist Annexin 1 (ANXA1). Annexin 1 gehört zur Familie der Ca²⁺-abhängigen Phospholipid-bindenden Proteine und wurde ursprünglich als endogener Mediator der antiinflammatorischen Wirkung von Glukokortikoiden entdeckt [207]. Obwohl die genauen Mechanismen noch nicht richtig klar sind, gibt es mittlerweile zahlreiche Publikationen, die eine proapoptische Funktion des antiinflammatorischen Annexin 1 zeigen konnten [207].

Ebenfalls hochreguliert war LRDD (Leucin-rich and death domain containing), welches bekannt dafür ist, dass es mit anderen Proteinen, die ebenfalls *Death*-Domänen enthalten, interagiert [208]. LRDD fungiert wahrscheinlich als Adapter für FADD (Fas associated protein with death domain) und MADD (MAP-Kinase death domain containing) Proteine [208]. Für das Maushomolog von LRDD konnte eine p53-

abhängige Regulation nachgewiesen werden. Deshalb wird vermutet, dass LRDD eine Rolle bei der p53-vermittelten Apoptoseantwort spielt [209].

Abgesehen von LRDD war auch RhoGDI2 (Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta/ ARHGDI2) bei allen genotoxischen Substanzen hochreguliert. RhoGDI2 gehört zur Familie der Rho GDIs, welche eine Rolle bei der Translokation von Rho GTPasen zwischen Membran und Zytoplasma spielen [210]. In ruhenden Zellen liegen die Rho-Proteine an die GDIs gebunden vor und die GDIs verhindern einen GTP/ GDP-Austausch und dadurch die Aktivität der Rho GTPasen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass GDIs Targets von apoptotischen Proteasen (Caspasen) sind und deshalb möglicherweise eine Rolle im programmierten Zelltod spielen [210].

Neben der Aktivierung einer Vielzahl von Komponenten der DNA-Schadensantwort, wurden Gene mit Funktionen in der transkriptionellen Regulation und Entwicklungsprozessen herunterreguliert gefunden. FJX1 (four jointed box 1) ist ein homologes Gen zum four jointed in *Drosophila* und wurde als nachgeschaltetes Target von Notch gefunden [211]. Der Notch-Signalweg spielt unter anderem bei der Zellentwicklung in der Leber, Hepatoblastendifferenzierung und Gallengangentwicklung eine wesentliche Rolle [212]. Die genaue Funktion von FJX1 im menschlichen Organismus ist bisher nicht bekannt. Das *Drosophila* Homolog four jointed ist an der Entwicklung der Extremitäten und Augen beteiligt [211]. Fjx1 scheint zudem in Mäusen eine Rolle in der Entwicklung des Nervensystems, multipler Organe und der Beine zu spielen [211].

Zwei weitere Gene der Funktionsgruppe Entwicklung, welche durch alle drei genotoxischen Verbindungen nach 48 h herunterreguliert waren, sind Norrin (NDP) und Frizzled Homolog 4 (FZD4). Norrin ist ein ungewöhnlicher Frizzled-Ligand, welcher nicht zur WNT-Familie gehört, aber dennoch selektiv an den Frizzled-Rezeptorsubtyp 4 (FZD4) bindet und die WNT-Signalkaskade aktiviert [213]. Der WNT-Signalweg führt normalerweise durch Bindung von WNT Liganden (sezernierten Wachstumsfaktoren) an den Frizzled-Transmembranrezeptor unter Mitwirkung des LRP (Low-density lipoprotein receptor related protein) als Korezeptor über die Hyperphosphorylierung von Dishevelled zur Inhibition der Glycogensynthase-Kinase 3 (GSK3). Dadurch wird der APC-vermittelte Abbau von β -Catenin verhindert, welches wiederum im Zellkern die LEF/ TCF (lymphoid enhancer factor/ T-cell factor)-abhängige Transkription von wachstumsregulatorischen Genen (z.B. Myc oder Cyclin D1) stimuliert [213]. Die Suppression des c-Myc Genproduktes durch ACT und ETO konnte in dieser Arbeit

ebenfalls beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Herunterregulation von FJX1, NDP und FZD4 durch die mutagenen Substanzen spiegelt damit eine Störung/ negative Regulation der Zellentwicklung bzw. Zelldifferenzierung wider.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Ergebnisse dieses Studienteils demonstrieren, dass eine Aktivierung von verschiedenen Prozessen, wie Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Apoptose, infolge der verursachten Schädigung der DNA durch die getesteten mutagenen Verbindungen, verzeichnet werden konnte. Gleichzeitig waren transkriptionelle sowie entwicklungsbezogene Vorgänge stark heruntergefahren. Außerdem waren Gene, involviert in Entgiftungs-, Transport- und Immunsystemvermittelte Prozesse, metabolische Vorgänge, Entwicklung, Zellstruktur und Adhäsion, infolge der Exposition mit den Mutagenen dereguliert. Zehn der 66 putativen Markergene für diese Verbindungsklasse mussten in die Kategorie weitere Funktionen eingeordnet werden, da diese funktionell noch wenig erforscht sind.

3.1.2 P53 als Marker für einen induzierten DNA-Schaden

Unter den mittels Microarrays identifizierten putativen Markergenen für genotoxische Verbindungen (siehe Abschnitt 3.2.1.2) war eine Vielzahl von Genen hochreguliert, die in den P53-Signalweg involviert sind. Eine Hochregulation der P53-mRNA selbst konnte nicht detektiert werden. Das steht jedoch in Übereinstimmung mit anderen Publikationen, welche die Regulation der P53-Aktivität ausschließlich auf Proteinebene ohne Veränderungen der mRNA-Expressionslevel beschreiben [214]. Zur Verifikation der Microarrayergebnisse wurde deshalb der Nachweis der Aktivierung des P53-Proteins nach Behandlung der HepG2-Zellen mit den genotoxischen Verbindungen mit Hilfe eines Transkriptionsfaktor-ELISAs durchgeführt. Bei diesem Test wurde die Bindung von aktiven P53 an ein Oligonukleotid mit der entsprechenden Konsensussequenz immunchemisch nachgewiesen. Das Ergebnis des P53-Transkriptionsfaktortests ist in Abbildung 3.3 dargestellt (P53-Induktionswerte siehe Anhang 1). Während die Negativkontrolle THEO keine erhöhte P53-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle zeigte, konnte bei den genotoxischen Substanzen MMS, ETO und ACT sowohl nach 24- als auch 48-stündiger Behandlung eine signifikante Erhöhung

(Student's T-Test p-Wert < 0,05) an aktivem P53 gegenüber der Lösungsmittelkontrolle detektiert werden. Die stärkste Induktion zeigte ACT bei 250 nM nach 48 h mit einer 21,3-fachen Deregulation. Dagegen lagen die P53-Induktionswerte für MMS und ETO nach 48 h nur bei 5,9 und 4,0.

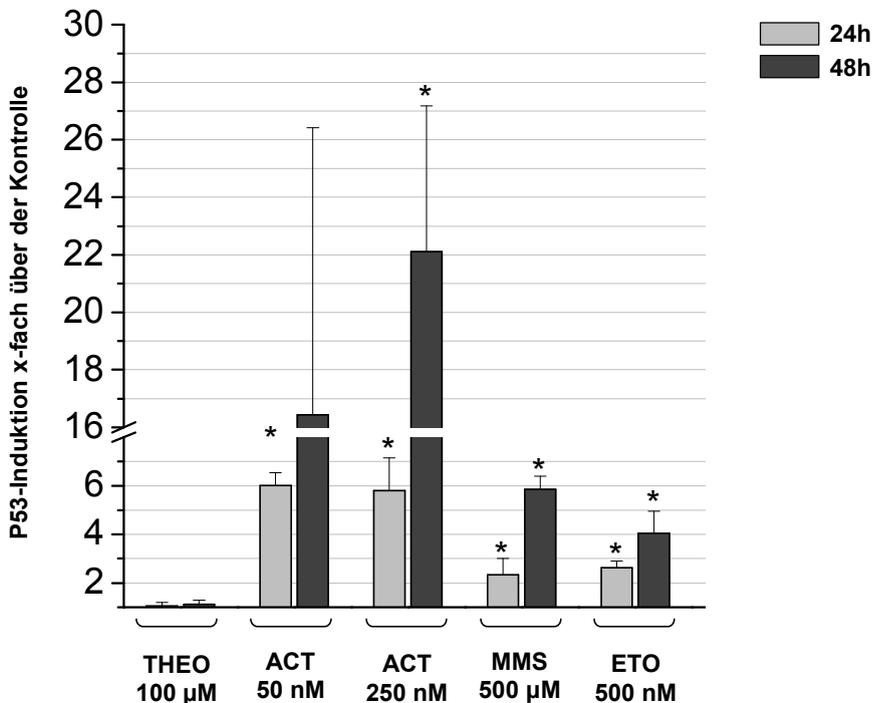


Abbildung 3.3: P53-Induktion in HepG2-Zellen nach Behandlung mit genotoxischen Verbindungen und Kontrollverbindungen. Die HepG2-Zellen wurden täglich entweder mit den genotoxischen Substanzen Actinomycin D (ACT), Methylmethansulfonat (MMS) und Etoposid (ETO) sowie der Kontrollverbindung Theophyllin (THEO) behandelt. Die P53-Induktion wurde 24 h (hellgrau) und 48 h (dunkelgrau) nach Beginn der ersten Behandlung mit dem *TransAM*TM P53 Transkriptionsfaktortest (ActiveMotif) gemessen. Die dargestellten Daten sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten mit Zellpassagen zwischen 3 und 25 (siehe Anhang 1). *Signifikanz im Student's T-Test (zweiseitig, gepaart), p-Wert < 0,05

Die p53-Induktion durch die Testsubstanzen MMS, ETO und ACT wurde bereits in früheren Publikationen beschrieben. Eine MMS- und ETO-vermittelte P53-Akkumulation, verbunden mit dem Auslösen des apoptotischen Zelltods über den mitochondrialen Signalweg, konnte von Brantley-Finley *et al.* bereits gezeigt werden [215]. Dabei wurde eine Schlüsselrolle für das mitochondriale permeabilisationsfördernde Protein BAX bei der Einleitung der Apoptose beschrieben [215]. Eine erhöhte Genexpression von BAX war auch in dieser Studie durch alle drei getesteten genotoxischen Verbindungen zu beobachten (siehe Abschnitt 3.1.1.2/ Abb. 3.4). Außerdem scheint der ETO-induzierte Zelltod direkt von der Funktion des p53 abzuhängen, weil die Inhibition von P53 selbst oder von nachgeschalteten Targets der Apoptoseregulation Zellen vor dem durch diesen Topoisomeraseblocker verursachten Zelltod schützt [215]. Des Weiteren ist bekannt, dass die Funktionen des p53 in der Basenexzisionsreparatur (BER) alkylierter DNA-Basen, die durch Agenzien, wie MMS, entstehen können, durch direkte Wechselwirkung mit den BER-Proteinen 5'-AP-Endonuklease und β -Polymerase vermittelt werden [216]. In Übereinstimmung mit diesen Arbeiten, waren das Gen AP-Endonuklease 2 (APEX2) nach 24 h und 48 h Behandlung mit MMS sowie die β -Polymerase (POLB) nach 48 h MMS Behandlung deutlich hochreguliert (Abb. 3.4).

In der vorliegenden Studie wurde die stärkste P53-Induktion durch die DNA-interkalierende Substanz ACT bestimmt. Obwohl für ACT auch eine inhibierende Wechselwirkung mit Topoisomerasen in hohen Dosierungen beschrieben wurde, wird die Inhibition der RNA-Polymerase II als der bestimmende Faktor der p53-Akkumulation vermutet [217]. Ljungman *et al.* konnten zeigen, dass die Dosis, die für die p53-Induktion benötigt wird, gut mit der für die Inhibition der mRNA-Synthese erforderlichen Dosis korreliert. Zudem deutete die relativ niedrige Rate an Strangbrüchen sogar in hohen ACT-Dosierungen auf einen untergeordneten Einfluss der Topoisomeraseinhibition für die p53-Anreicherung hin [217]. Der postulierte Mechanismus der p53-Aktivierung wird in einer sensorischen Wirkung der durch die ACT-Interkalation behinderten RNA-Polymerase II oder der mit dieser assoziierten Transkriptionsfaktoren gesehen [218]. Innerhalb dieser Arbeit konnte eine Herunterregulation der Gene für die RNA-Polymerase II sowie die Topoisomerase II durch ACT beobachtet werden (Abb. 3.4). Abgesehen vom Einfluss der RNA-Polymerase II-Inhibition für die P53-Aktivierung durch ACT scheint der Verlust der Mdm2-Funktion eine wesentliche Rolle zu spielen. Dies belegen Studien von Lents *et al.*, die zeigten, dass eine kürzlich entdeckte Spleißvariante des Mdm2, bezeichnet als Mdm2⁺¹⁰⁸, durch ACT stark induzierbar ist [219]. Mdm2⁺¹⁰⁸ fehlt die kritische P53-regulierende Domäne,

wodurch es zu einer Entkoppelung der p53-Mdm2-Rückkoppelungsregulation und somit zu einer massiven p53-Anreicherung kommt. Die Aktivierung von Mdm2⁺¹⁰⁸ könnte somit einen neuen Mechanismus, über welchen geschädigte Zellen eine sofortige p53-Antwort einleiten, darstellen [219]. Innerhalb dieser Arbeit konnte auf Genexpressionsebene jedoch keine wesentliche Aktivierung von HDM2 (dem humanen Homolog von Mdm2) detektiert werden (Abb. 3.4). Allerdings sind die verwendeten Sonden auf den Genchips gegen den Wildtyp von HDM2 und nicht gegen die verschiedenen Spleißvarianten gerichtet und sind deshalb für die nach einem DNA-Schaden induzierten Spleißvarianten auch nicht repräsentativ.

Ähnliche Ergebnisse wurden für APAK (ATM and P53-associated KZNF protein) erhalten, welches sich in seiner Regulation ebenfalls nicht beträchtlich von den Kontrollproben unterschied (Abb. 3.4). Kürzlich wurde ein neuartiger Regulationsmechanismus für p53 durch MMS publiziert, welcher über den negativen P53-Regulator APAK vermittelt wird [220]. Dieser spielt möglicherweise auch für die ETO-vermittelte p53-Induktion eine Rolle. Nach der Exposition der Zellen mit diesen DNA-schädigenden Agenzien, wird APAK von ATM-Kinasen phosphoryliert und dissoziiert daraufhin vom p53 ab, was zu dessen Aktivierung und damit verbundener Apoptose-induktion führt [220]. Die Deregulationswerte der Illumina-Microarrayanalysen für die in diesem Abschnitt diskutierten Gene sind in Anhang 2 zusammengestellt.

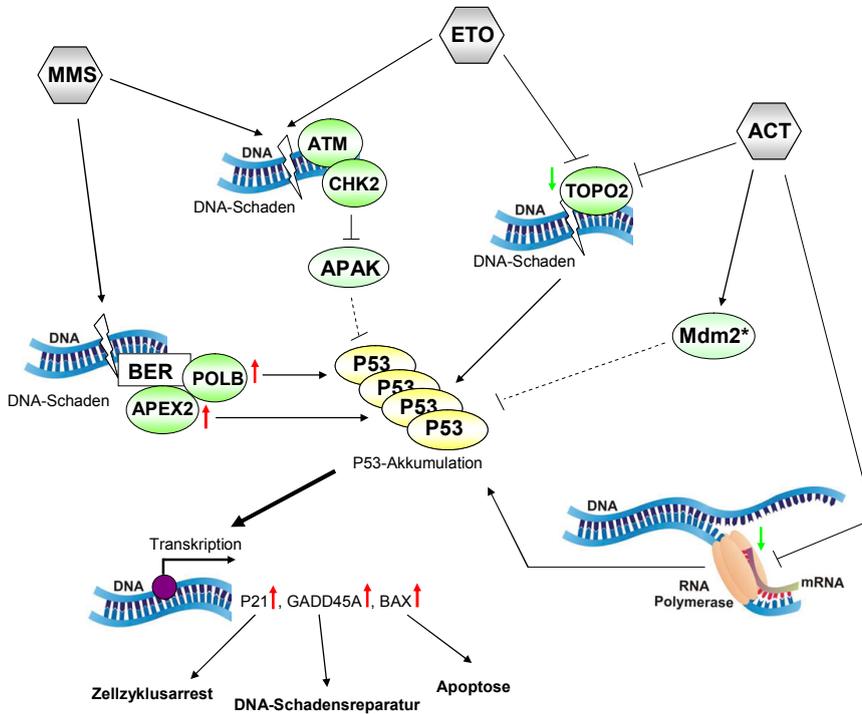


Abbildung 3.4: Potentielle Mechanismen der P53-Induktion durch genotoxische Verbindungen. Die Akkumulation von P53 infolge eines Methylmethansulfonat (MMS)-induzierten DNA-Schadens führt wahrscheinlich über Komponenten der Basenexzisionsreparatur (BER) bzw. über die Inhibition von des P53-Inhibitor APAK durch ATM- und *Checkpoint*-Kinasen, welche durch die Schädigung aktiviert werden. Der zuletzt genannte Mechanismus wird neben der Topoisomerase II (TOPO2)-Inhibition auch für die Etoposid (ETO)-vermittelte P53-Induktion postuliert. Die P53-Anreicherung durch Actinomycin D (ACT) wird hingegen vorwiegend über die Inhibition der RNA-Polymerase II realisiert. Zusätzlich spielt wahrscheinlich auch die Inhibition der TOPO2 sowie die Expression einer nicht-funktionellen Mdm2-Variante für die P53-Aktivierung eine Rolle. Die Pfeile indizieren die Regulation der entsprechenden Gene in den Illumina-Microarraystudien (rot = Hochregulation $\geq 1,5$ und grün = Herunterregulation $\leq -1,5$) (siehe Anhang 2).

3.2 Etablierung eines kombinierten Systems aus HepG2 und einem MAS

Die Genexpressionsanalysen mit den genotoxischen Verbindungen haben gezeigt, dass HepG2-Zellen eine charakteristische Antwort in Form der Veränderungen der Genexpression für diese Verbindungsklasse zeigen. Eine Vielzahl von genotoxischen Verbindungen ist jedoch nicht *per se* aktiv, sondern wird erst durch die Umsetzung von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen zur finalen DNA-reaktiven Verbindung. HepG2-Zellen sind Hepatomzellkulturen und deshalb mit der typischen dreidimensionalen Struktur der Leber mit ihren vielen verschiedenen Zelltypen und morphologischen Besonderheiten nicht vergleichbar. Zudem sind diese Tumorzellen entartet und entsprechen somit auch funktionell nicht mehr den Hepatozyten der Leber, welche fremdstoffmetabolisierende Enzyme und Transportsysteme enthalten. Allerdings können residuale Aktivitäten fremdstoffmetabolisierender Enzyme in den HepG2-Zellen vorhanden sein. Aufgrund unterschiedlicher Publikationen diesbezüglich und möglicher Unterschiede zwischen verschiedenen Chargen bzw. Kulturbedingungen der HepG2 wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Charakterisierung der HepG2-Zelllinie bezüglich ihrer fremdstoffmetabolisierenden Kapazität angefertigt. Neben der Untersuchung der Genexpression wurden von ausgewählten CYP-Enzymen, deren erhöhte Genexpression nachgewiesen werden konnte, Aktivitätstests durchgeführt. Anhand der Informationen über die metabolische Aktivität der Zelllinie kann später ein geeignetes Kombinationssystem als Ergänzung zur metabolischen Aktivierung entwickelt werden.

Um mit *in vitro*-Systemen auch progenotoxische Substanzen erfassen zu können, werden Substanzen in der Standardgenotoxizitätstestbatterie mit Leberhomogenatfraktionen, meist S9-Leberfraktionen, entweder präinkubiert oder gemeinsam mit der Substanz in das Kulturmedium der Zellen gegeben. Zur Erweiterung des in dieser Arbeit entwickelten Systems zur Charakterisierung von genotoxischen Substanzen auf Basis von Genexpressionsveränderungen in den HepG2-Zellen, sollte im nächsten Teil der Arbeit ein kombiniertes Kultursystem von HepG2 mit einem System zur metabolischen Aktivierung (MAS) entwickelt werden. Ein solches System erfordert die Abstimmung der Bedingungen, wie pH-Wert und Ionenkonzentrationen für die Aktivität der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme und den Wachstumsbedingungen

der HepG2-Zellen. Zur metabolischen Aktivierung sind prinzipiell sowohl S9- als auch Mikrosomenfraktionen von verschiedenen Spezies denkbar. In der Standardtestung wird in der Regel induzierter S9 von Ratten eingesetzt. Die Behandlung mit Induktoren führt zur Steigerung der Aktivitäten fremdstoffmetabolisierender Enzyme und kann somit die metabolische Aktivierung verbessern. Die höheren Enzymaktivitäten haben zudem den Vorteil, dass weniger des MAS verwendet werden muss und somit zytotoxische Effekte durch das MAS selbst reduziert werden können. Durch die Verwendung spezifischer Induktoren und mit Hilfe der Daten aus der Charakterisierung der HepG2-Zellen bezüglich ihrer fremdstoffmetabolisierenden Kompetenz konnte ein optimales System zur Aktivierung der progenotoxischen Substanzen entwickelt werden, dass auf die Zelllinie abgestimmt ist. Neben der Verwendung geeigneter Induktoren, mussten dabei auch die Bedingungen des Reaktionsmediums sowie die optimale Behandlungszeit der HepG2-Zellen mit dem Substanz/ S9-Gemisch bestimmt werden, um zytotoxische Effekte durch das MAS möglichst gering zu halten. Solche zytotoxischen Effekte können unter anderem durch reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS), welche durch die CYP-Enzyme im MAS aufgrund der ungekoppelten Oxidation von NADPH gebildet werden, verursacht werden [221]. ROS können zelluläre Strukturen, wie Nukleinsäuren, Proteine und Lipide (Membranen), schädigen. Dieser oxidative Stress kann letztendlich zum apoptotischen Zelltod führen [222].

Für die Evaluierung der optimalen Parameter des Systems wurde der P53-Transkriptionsfaktor test genutzt und Zytotoxizitätsstudien mit dem MAS, den Substanzen und Kombinationen aus MAS und Substanz durchgeführt [Diplomarbeit Yasmin Dietz, Universität Mainz, 223]. Als optimale Behandlungszeit der Zellen mit dem MAS/ Substanz-Gemisch ergab sich eine Zeit von 6 h. Die dabei verwendete Konzentration des MAS lag für S9 bei 0,84 mg Protein/ ml Behandlungsmedium (das entspricht 900 pmol CYP-Gehalt/ ml Behandlungsmedium) und für Mikrosomen bei 600 pmol CYP-Gehalt/ ml Behandlungsmedium. In diesem Konzentrationsbereich konnten für die 6-stündige Behandlungszeit, auch bei wiederholter Behandlung der Zellen 18 h nach Ende der letzten Behandlung, zytotoxische Effekte mit Hilfe von Zellviabilitätstests ausgeschlossen werden. Ein Behandlungsschema von 6 h täglich mit wiederholter Behandlung 18 h nach Ende der letzten Behandlung und einer erneuten Erholungsphase von 18 h bis zur Messung erwies sich als notwendig, um eine Erhöhung des P53-Proteins gegenüber der Kontrolle in den progenotoxischen Behandlungen messen zu können. Als progenotoxische Modellsubstanz für die Parameteroptimierung wurde CPA, eine häufig verwendete Positivsubstanz der Standardtestbatterie,

verwendet. Für CPA konnte sowohl mit β -NF/ PB-induziertem S9 als auch β -NF/ PB-induzierten Mikrosomen als MAS in den oben genannten Konzentrationen eine vergleichbare Induktion von P53 gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden [Diplomarbeit Yasmin Dietz, Universität Mainz, 223]. Da Mikrosomen und S9 eine vergleichbare Funktionalität zeigten, wurde aus Kosten- und Praktikabilitätsgründen für alle weiteren Versuche im Rahmen dieser Arbeit nur noch β -NF/ PB-induzierter S9 verwendet. Im Rahmen der Etablierung des Systems wurden neben CPA noch weitere bekannte Prokanzerogene, wie AFB1, DMBA und DEN, getestet. Die Ergebnisse der P53-Studien mit den optimierten Parametern und Behandlungsbedingungen sind in der vorliegenden Arbeit in Abschnitt 3.2.2 zusammengestellt und diskutiert.

3.2.1 Charakterisierung der HepG2-Zelllinie bezüglich ihrer metabolischen Kapazität

3.2.1.1 Genexpressionsanalysen fremdstoffmetabolisierender Komponenten - basale Expression in HepG2 und humanen Hepatozytenkulturen

Im ersten Teil der Etablierung des HepG2-MAS-System wurde eine Charakterisierung der Zelllinie HepG2 bezüglich der Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus durchgeführt, um das MAS auf die Zelllinie abstimmen zu können. Für diese Studien wurde die TLDA-Karte „Human DME“ angefertigt. Diese Karte enthält 41 verschiedene Gene und 3 Referenzgene (*Housekeeper*) (Kartendesign siehe Abschnitt 2.5.3.2). Von diesen Genen sind 13 CYP-Enzyme (Phase I), 6 Transferasen (Phase II), 10 nukleäre Rezeptoren/ Transkriptionsfaktoren und 12 Ionenporter. Um ein Bezugssystem für die Genexpression der Zelllinie HepG2 zu haben, wurden die Daten mit internen, bereits publizierten Daten von primären humanen Hepatozytenmonolayerkulturen verglichen [158, 224]. Primäre Hepatozytenkulturen sind, wie einleitend bereits erwähnt, das derzeitige Referenzsystem hepatischer *in vitro*-Systeme für toxikologische und pharmakologische Untersuchungen insbesondere für Biotransformations-, Arzneimittel-Interaktions- oder Hepatotoxizitätsstudien, da sie eine hohe Ähnlichkeit zur Leber (*in vivo*-Situation) aufweisen [81, 137]. Die Basalexpression der HepG2-Zellen ist in Abbildung 3.5 im Vergleich zu den humanen Hepatozyten von drei verschiedenen Donoren gezeigt. Die Deregulationswerte sind tabellarisch in Anhang 4 zusammengestellt.

Basalexpression von Genen des Phase I-Fremdstoffmetabolismus

Mit Ausnahme von CYP2D6 und CYP1A1 waren alle untersuchten CYP-Enzyme in Primärhepatozyten bei mindestens zwei der drei Spender stärker exprimiert als in HepG2. Während CYP1A1 eine etwa gleich starke Basalexpression in HepG2 und humane Hepatozyten zeigte, war CYP2D6 stärker in HepG2 exprimiert. CYP2C8/ 9/ 18 und 19 sowie CYP4A11/ 22 waren in HepG2-Zellen nicht detektierbar. Hingegen konnte bei allen humanen Spendern eine dem mittelstark exprimierten *Housekeeper* PPIA ähnliche bis geringfügig schwächere Regulation gemessen werden.

Expression von Genen der Phase II des Fremdstoffmetabolismus

Bei den Phase II-Enzymen waren die Glutathion-S-Transferase GST π 1 (GSTP1) und die Sulfotransferasen SULT1A1-4 in HepG2 stärker exprimiert als in den humanen Hepatozyten von Donor 1 und 2. Donor 3 zeigte für die SULT1A2 eine ähnliche Expression wie HepG2. Hingegen konnte die GST π 1 bei Donor 3 gar nicht detektiert werden. Die GST α 1 (GSTA1) war bei den humanen Hepatozyten aller Donoren stärker exprimiert als in HepG2. Während die GST π 1 zur π -Unterkategorie der Klasse der löslichen GSTs gehört, ist die GST α 1 zu den membrangebundenen Formen der GSTs der α -Klasse zuzuordnen und wird stark in der humanen Leber exprimiert [225, 226]. Die humanen zytosolischen GSTs werden im Allgemeinen in vier verschiedene Hauptklassen α , μ , π und θ unterteilt und katalysieren die Detoxifikation einer Vielzahl von elektrophilen Substanzen. Dabei spielen die GSTs zum Beispiel bei der Metabolisierung von Kanzerogenen (z.B. AFB1 und PAKs, wie Benzo[a]pyren) eine bedeutende Rolle [225, 227]. Des Weiteren sind die GSTs der Klasse α in den Bilirubin- und Gallensäurestoffwechsel eingebunden und besitzen eine schützende Funktion der Zellen gegenüber oxidativem Stress [228, 229].

Weiterhin wurde die Expression von verschiedenen Uridinglukuronosyltransferasen (UGTs) untersucht. Die UGT1A1/ 3-10 und 1A6 war bei den humanen Hepatozyten sehr viel stärker exprimiert als in HepG2. Der UGT1A-Genlocus codiert für neun verschiedene UGT-Subvarianten (1 und 3-10), welche unterschiedliche Spleißvarianten darstellen, die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden [230]. Die UGT1A1 ist zum Beispiel spezialisiert auf Bilirubin, einfache Phenole, Flavone und Steroide während die UGT1A6 phenolische oder planare Verbindungen als Substrate bevorzugt [230]. Ähnlich zu den UGT1A-Enzymen ließ sich auch eine erhöhte Expression für die

UGT2B7 in humanen Hepatozyten von Donor 1 und 2 verzeichnen, die jedoch sehr viel schwächer war als für die beiden anderen UGTs. Die UGT2B7 ist eine der bedeutendsten humanen UGT-Isoformen und spielt bei der Konjugation von Fremdstoffen und endogenen Verbindungen, zu welchen zum Beispiel verschiedene Estrogenmetabolite aber auch kanzerogene Metabolite von PAKs gehören, eine Rolle [230].

Basale Expression von Genen, die für transkriptionsvermittelnde Faktoren codieren

In der Gruppe der Transkriptionsfaktoren und nukleären Rezeptoren, welche die transkriptionelle Expression verschiedener CYP-Enzyme regulieren, war nur CAR in humanen Hepatozyten aller Donoren sehr viel stärker exprimiert als in HepG2. CAR bindet als Homo- oder Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) an so genannte PBREM (*Phenobarbital response enhancer modules*)-Elemente innerhalb der Promotorregion der Zielgene, die an Prozessen des Fremdstoffmetabolismus und der Ausscheidung von Bilirubin beteiligt sind [231, 232]. Zu den Zielgenen des CAR gehören unter anderem CYP-Enzyme der 2B- und 3A-Familie, aber auch CYP2C8 und CYP2C9 sowie Phase II-Enzyme, wie UGT1A1 [231, 233-236]. Im Gegensatz zu anderen Kernrezeptoren ist nur CAR auch ohne Ligandenanwesenheit (konstitutiv) aktiv [236]. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsstudien konnte für CAR eine starke konstitutive Expression der CAR-mRNA in allen drei Donoren der humanen Hepatozyten nachgewiesen werden, nicht jedoch für die weiteren untersuchten Kernrezeptoren (Abb. 3.5). Allerdings kann CAR zusätzlich zu der beschriebenen konstitutiven Expression durch Agonisten oder inverse Agonisten reguliert werden. Solche Liganden bewirken eine Translokation des CAR-Proteins in den Zellkern, wo es aktivatorisch oder inhibitorisch die Regulation der Zielgene beeinflussen kann. Liganden für CAR sind neben dem klassischen Induktor PB, Steroide (Androstane), Retinolsäuren, Clotrimazol, Chlorpromazin oder Kohlenwasserstoffe (CITCO, TCPOBOP) [237]. Die sehr schwache konstitutive Expression des Rezeptors in HepG2 könnte mit der schwachen Expression für CYB2B6 in HepG2 gegenüber den humanen Hepatozyten korrelieren. Des Weiteren waren die CAR-regulierten CYP-Enzyme CYP2C8 und 2C9 in HepG2 überhaupt nicht detektierbar. Hingegen zeigten diese CYP-Enzyme in den CAR-positiven humanen Hepatozyten sogar dem *Housekeeper* PPIA vergleichbar starke Expressionen.

Neben einer starken Basalexpression des CAR in humanen Hepatozyten, wurde auch eine geringfügig stärkere Expression in mindestens zwei der drei Spender für den Farnesoid-X-Rezeptor (FXR), den Pregnan-X-Rezeptor (PXR) und den Leber-X-Rezeptor (LXR β / LXR β) beobachtet. Der PXR agiert als heterodimerer Transkriptionsfaktor mit RXR in ähnlicher Weise wie CAR [236]. Deshalb ist auch das Spektrum der Zielgene mit dem von CAR vergleichbar [233, 234, 236]. Als Hauptzielgene des PXR werden jedoch CYP-Enzyme der 3A-Familie angesehen [238]. Außerdem reguliert der PXR die Expression der UGT1A1, welche in die Metabolisierung von Bilirubin involviert ist. Damit ist der PXR gemeinsam mit CAR ein wichtiger Regulator der Bilirubin-Balance [232]. Liganden, die den PXR aktivieren, sind unter anderem Dexamethason, RIF, Pregnenolon-16- α -Carbonitril [238]. Im Gegensatz zu PXR und CAR ist der FXR ein Rezeptor für Gallensäure und führt nach Aktivierung zu einer Inhibition der hepatischen Gallensäuresynthese und zu einem verstärkten Transport von Gallensäuren aus dem intestinalen Lumen in die Leber [236]. Außerdem reguliert der FXR die Transkription von CYP7A [236]. Die Leber-X-Rezeptoren (LXRs) sind ein weiterer Vertreter der Kernrezeptorfamilie und funktionell in den Cholesterollowerstand und -transport sowie in den Glucosestoffwechsel und Entzündungsprozesse eingebunden [239].

Im Unterschied zum FXR, PXR und LXR β waren der AhR (Arylhydrocarbonrezeptor, AHR), HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4 alpha, HNF4A), COUP-TF β (chicken ovalbumin upstream promotor transcription faktor II, COUPTFB) und der Glukokortikoidrezeptor (GR) in HepG2 und humanen Hepatozyten des Donor 1 und 2 ähnlich stark exprimiert. Donor 3 wich im Allgemeinen stärker von den anderen beiden Donoren ab, was sich bei der Gruppe der Kernrezeptoren/ Transkriptionsfaktoren besonders deutlich zeigte. Der AhR ist der einzige untersuchte Rezeptor, der nicht zur Kernrezeptorfamilie, sondern zur Gruppe der basischen Helix-Schleife-Helix Per-Arnt-Sim Gensuperfamilie, gehört [236]. Liganden des AhR sind polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, wie Dioxin oder 3-MC. Nach Bindung des Rezeptors kommt es zur Translokation des Ligand-Rezeptorkomplexes in den Zellkern und nach Heterodimerisierung mit ARNT (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) zur Aktivierung der Expression von CYP1A-Genen über die Bindung an XREs (*Xenobiotic response elements*) in deren Promotorregion [236].

HNF4 α ist ein in der Leber exprimierter Transkriptionsfaktor, welcher die Expression leberspezifischer Gene für den Glucose-, Harnstoff-, Cholesterol- und Fettsäuremetabolismus sowie für Blutgerinnungsfaktoren und Gene, die während der Entwicklung der Leber eine Rolle spielen, kontrolliert [240]. HNF4 α braucht keinen exogenen Liganden, da es wahrscheinlich konstitutiv an endogene Fettsäuren gebunden vorliegt. Es bindet die DNA als Homodimer und vermittelt die konstitutive Expression vieler CYP-Enzyme [56]. Kamiyama *et al.* konnten mittels *siRNA-Knockdown*⁴ die Bedeutung von HNF4 α für die Expression einer Reihe von CYP-Enzymen (CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4), Phase II-Enzymen (UGT1A1, UGT1A9 und SULT2A1), Transportern (ABCB1, ABCB11, ABCC2, OATP1B1 und OCT1) sowie der Kernrezeptoren PXR und CAR zeigen [242]. Rodriguez-Antona *et al.* konnten hohe Level an HNF4 α in HepG2 nachweisen [56], was im Einklang mit den in dieser Arbeit ermittelten Daten steht. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des HNF4 α in allen drei Donoren der humanen Hepatozyten ähnlich stark exprimiert war, wie in HepG2. Dass viele CYP-Enzyme in HepG2 dennoch weniger stark exprimiert sind oder nicht detektiert werden konnten, könnte daran liegen, dass Koaktivatoren für HNF4 α fehlen. Martinez-Jimenez *et al.* demonstrierten, dass HepG2 nur sehr niedrige Expressionslevel der HNF4 α -Koaktivatoren SRC1 und PGC1 α aufweisen [240]. Die Transfektion von SRC1 in HepG2 verursachte eine signifikante Transaktivierung des HNF4-regulierten CYP2C9 Promoters [243]. Diese Daten indizieren, dass von HepG2-Zellen exprimiertes HNF4 α auch funktionell aktiv ist und die verminderte Aktivität wahrscheinlich aufgrund der fehlenden Kofaktoren zustande kommt [243].

Der GR und COUP-TF β gehören zur Familie der Kernrezeptoren und sind ebenfalls als transkriptionelle Regulatoren aktiv [244]. Beide sind in Prozesse, wie Glucose-, Fettsäure-, Cholesterol- und Xenobiotikametabolismus, involviert. GR und COUP-TF β stimulieren zum Beispiel gemeinsam die Gluconeogenese in der Leber über die Hochregulation der Transkription der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase. COUP-TF β selbst supprimiert zudem die transkriptionelle Aktivität anderer nukleärer Rezeptoren,

⁴siRNAs (small interfering RNAs) sind kleine RNAs die von der RNase III (Dicer) aus längeren doppelsträngigen RNAs generiert werden. Synthetisch hergestellte, 21-23 nt lange siRNAs werden in der Molekularbiologie als Technik zur Verringerung der Expression von spezifischen Zielgenen (*Knockdown*) eingesetzt [241].

wie des Retinolsäure-, Thyroidhormon-, Vitamin D-Rezeptors, HNF4 aber auch von Peroxisomen-proliferierende Substanzen aktivierten Rezeptoren (PPARs) [244]. Der Mechanismus der Repression der COUP-TFs verläuft vermutlich entweder über eine Konkurrenz mit der DNA-Bindungsstelle, einer Konkurrenz mit dem universellen Partner RXR für die Heterodimerisierung, eine aktive Repression per se oder eine Transrepression durch direkte Bindung an die Ligandenbindungsdomäne nukleärer Rezeptoren [243]. Eine Hochregulation der COUP-TFs in Hepatomzelllinien wird als ein möglicher Mechanismus der verminderten/ fehlenden CYP-Expression angesehen [243]. Allerdings waren die gefundenen Expressionslevel in HepG2 in vorangegangenen Studien ähnlich denen von kultivierten Hepatozyten [243], was sich im Rahmen dieser Arbeit bestätigen ließ. Der GR beeinflusst ähnlich dem COUP-TF β die transkriptionelle Aktivität anderer Rezeptoren und reguliert dadurch indirekt die Expression vieler CYP-Enzyme [245]. Pacussi *et al.* konnten zeigen, dass Dexamethason, ein gut untersuchter Ligand des GR, die Expression der nukleären Rezeptoren PXR und RXR induziert und dadurch die CYP3A4-Induktion in Gegenwart von PXR-Agonisten steigern kann [246]. Das einzige CYP-Enzym, welches direkt durch den GR induziert wird, ist CYP3A5 [247].

Zu den Transkriptionsfaktoren, welche bei HepG2 stärker exprimiert waren als in humanen Hepatozyten, gehörten die Gene des Leber-X-Rezeptor LXR α und SHP (Short heterodimer partner, NR0B2). SHP ist ein unkonventioneller Orphanrezeptor, dem die typische DNA-Bindungsdomäne fehlt [248]. SHP inhibiert die Kernhormonrezeptor-vermittelte Transaktivierung unter anderem über die Konkurrenz mit Koaktivatoren [248, 249]. Eine Hochregulation des SHP könnte ebenfalls ein Mechanismus sein, der in der HepG2 zu einer verminderten/ fehlenden Expression einiger CYP-Enzyme im Vergleich zu primären Hepatozyten beiträgt.

Expression von Genen für hepatozytäre Transporter

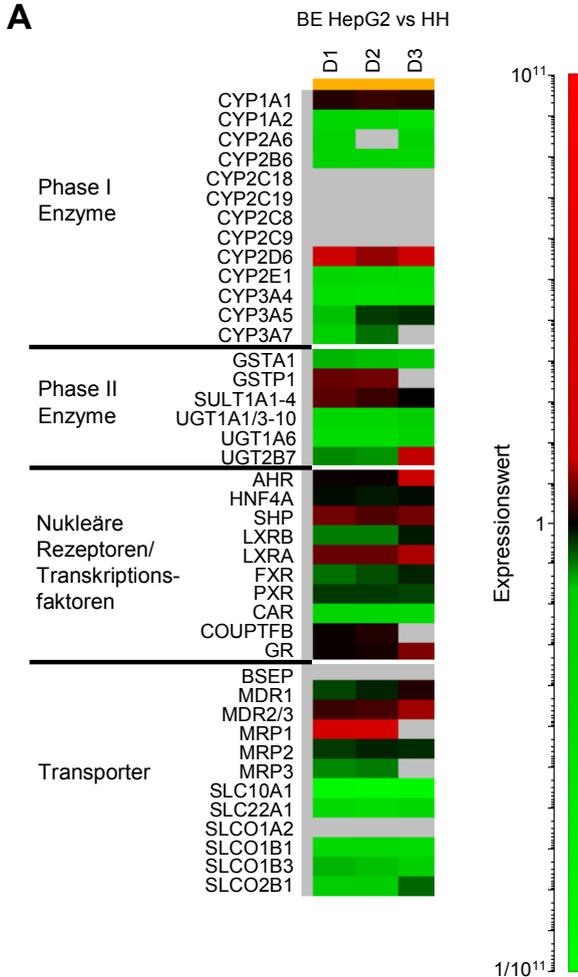
Die letzte Gruppe der untersuchten Gene umfasste verschiedene hepatozytäre Transporter. Die organischen Anionentransporter (OATPs) SLCO1A2 (OATPA), 1B1 (OATP2), 1B3 (OATP8) und 2B1 (OATPB) sowie der organische Kationentransporter (OCT) SLC22A1 (OCT1) und der Kotransporter SLC10A1 (NTCP) waren über alle Donoren der humanen Hepatozyten hinweg stärker exprimiert als in HepG2-Zellen.

SLCO1A2 (OATPA) konnte in HepG2 gar nicht detektiert werden. SLCO1A2 vermittelt den natriumunabhängigen Transport von organischen Anionen in die Leberzellen und hat Gallensäuren und steroidale Verbindungen als natürliche Substrate [250]. Zur gleichen Gruppe von Transportern gehören auch SLCO1B1, 1B3 und 2B1, welche sich jedoch im Substratspektrum unterscheiden. SLCO1B1 transportiert 17 β -Glukuronosyl-estradiol, Thyroidhormone und Medikamente, wie Statine, aus dem Blut in die Hepatozyten [250]. SLCO1B1 ist in der hepatischen sinusoidalen Membran lokalisiert und wird bevorzugt in Hepatozyten der mittleren Zone bis hin zu den perivenös gelegenen Zellen exprimiert [236]. Im Gegensatz zu den SLCOs ist SLC22A1 ein polyspezifischer Kationentransporter für viele endogene kationische Verbindungen, wie biogene Amine (Neurotransmitter) aber auch eine Vielzahl von Xenobiotika [251]. SLC10A1 ist ebenfalls ein Kationentransporter und in die basolaterale Membran der Hepatozyten integriert [252]. SLC10A1 vermittelt die natriumabhängige Aufnahme von konjugierten Gallensäuren aus dem portalen Blut und ist somit in die enterohepatische Gallensäurezirkulation involviert [252].

Im Gegensatz zu den meisten der untersuchten Anionen- und Kationentransporter waren die ABC-Transporter MRP2 (ABCC2), MRP3 (ABCC3) und MDR1 (ABCB1) bei Donor 2 und 3 ähnlich stark exprimiert wie in HepG2. MRP2 und MRP3 gehören, wie auch MRP1 (ABCC1), zur MRP-Familie der ABC-Transportproteine [252]. MRP2 kommt in der kanalikulären Hepatozytenmembran vor und nimmt Funktionen, wie den biliären Transport und die Exkretion von Glutathion, wahr [252]. MRP3 ist ein basolateraler Effluxtransporter, der für die biliäre und intestinale Exkretion organischer Anionen, aber auch einer Reihe von anionischen Medikamenten, wie ETO oder Methotrexat, verantwortlich ist [236, 253]. MDR1 gehört hingegen zur MDR-Subfamilie der ABC-Transporter und katalysiert den ATP-abhängigen Transport einer Vielzahl von Substraten aus den Hepatozyten [252]. Exprimiert wird MDR1 nicht nur in der Leber, sondern auch in intestinalem Gewebe [236]. Lokalisiert auf der apikalen Seite von intestinalen Enterozyten, vermittelt MDR1 den Efflux von Xenobiotika (z.B. der Krebsmedikamente ETO, Doxorubicin und Vinblastin), Lipiden und Steroiden in das Darmlumen, bevor die Stoffe in die portale oder systemische Zirkulation gelangen [236, 254].

Die Transporter MRP1 (ABCC1) und MDR2/3 (ABCB4) zeigten in HepG2 eine stärkere Expression als in humanen Hepatozyten. Zu den Substraten von MRP1 gehören

neben Glukuroniden, oxidiertem Glutathion und Leukotrienen auch Fremdstoffe, wie AFB1 und Glutathion-Konjugate von alkylierenden Krebsmedikamenten (VP-16 (ETO)- Glukuronid) [51]. MDR2/3 gehört, wie auch MDR1, und BSEP zur MDR/ TAP-Subfamilie und ist vermutlich am Transport von Phospholipiden aus den Hepatozyten in die Galle beteiligt [255]. Der Transporter BSEP (ABCB11), eine Gallensäureexportpumpe, war in Donor 1 und 3, aber nicht in Donor 2 und HepG2 detektierbar.



B

Gensymbol	HepG2	HH D1	HH D2	HH D3
CYP2C18	n.d.	++	++	++
CYP2C19	n.d.	++	+	+
CYP2C8	n.d.	++	++	+
CYP2C9	n.d.	++	++	+
BSEP	n.d.	+	+	+
SLCO1A2	n.d.	+	n.d.	+

Abbildung 3.5: Basale Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus in HepG2 im Vergleich zu humanen Hepatozyten (HH).

Die Expression von Genen, involviert in verschiedene Phasen des Fremdstoffmetabolismus, wurde mit *TaqMan*TM low density arrays gemessen. (A) Regulation der Gene in HepG2 bezogen auf die Expression in HH. Als Bezugs-gen für die Berechnung der Deregulationswerte wurde der *Housekeeper* PPIA verwendet. Zum Vergleich wurden interne bereits publizierte HH-Daten herangezogen [158, 224]. Hochregulierte Gene in HepG2 gegenüber HH (≥ 10) sind in rot und geringer regulierte Gene (≤ -10) in grün dargestellt. (B) Genregulation in HH von Genen, welche bei HepG2 nicht detektiert (n.d.) werden konnten. Die Expressionswerte für die HH ähnlich oder etwas schwächer als das Referenzgen PPIA sind mit ++ (dunkelgrün) gekennzeichnet. Hingegen bedeutet + (hellgrün) eine schwächere Expression gegenüber dem Referenzgen. Die Expressionswerte sind in Anhang 4 zusammengefasst. (Analyt, Genedata AG,

gestellt. [Abb. modifiziert nach Genedata's Expressionist[®] Basel/ Schweiz]

3.2.1.2 Genexpression fremdstoffmetabolisierender Komponenten nach Induktion

Viele fremdstoffmetabolisierende Enzyme und Transporter werden basal nur gering exprimiert, können aber durch bestimmte Induktoren in ihrer Expression aktiviert werden. Deshalb wurde nicht nur die basale Expression der TLDA-„Human DME“-Gene, sondern auch die Expression dieser Gene nach Behandlung der Zellen mit den Induktoren PB, RIF und 3-MC untersucht (Abb. 3.6). Das Barbitursäurederivat PB wird als Arzneimittel zur Behandlung von Epilepsie und zur prä- oder postoperativen Sedation eingesetzt. PB und Derivate induzieren CYP-Enzyme der Familien CYP3A und CYP2B, insbesondere CYP2B1 und CYP2B2 [256]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PB UDP-Glukuronosyltransferasen und verschiedene Glutathion-S-transferasen induziert [257, 258]. Das PBREM-Element im Promotorbereich des CYP2B-Genlocus vermittelt die PB-abhängige Expression von CYP2B-Genen. PB bewirkt wahrscheinlich eine Translokation des nukleären Rezeptors CAR in den Zellkern, wo dieser als Heterodimer mit RXR an PBREM bindet und die Expression der CYP2B-Gene stimuliert [259]. Im Gegensatz zum PB bindet 3-MC an den Ah-Rezeptor und vermittelt, wie im Abschnitt 3.2.1.1 bereits angesprochen, die Transkription von CYP1A-Genen. Das Antibiotikum RIF wirkt über die Aktivierung der nukleären Rezeptoren PXR bzw. RXR, welche als heterodimere Transkriptionsfaktoren die CYP3A-Expression vermitteln [246, 260]. Die Bindung von PXR im Promoterbereich von CYP3A-Genen wird durch das PXRRE (*PXR response element*) vermittelt [236]. Die bedeutendsten CYP3A-Isoformen für den Menschen sind CYP3A4 und CYP3A5. Diese Isoformen sind die häufigsten in der menschlichen Leber exprimierten bzw. induzierten CYP-Enzyme und sind an der Metabolisierung einer Vielzahl von Medikamenten beteiligt [53]. Allerdings gibt es bei der CYP3A-Familie auch starke Speziesunterschiede. Die CYP3A11-Isoform der Maus weist die höchste Homologie zum CYP3A4/ 5 des Menschen auf. Im Gegensatz dazu ist die Ratte keine optimale Modellspezies, da die beiden in der Leber vorkommenden Isoformen CYP3A1 und CYP3A2 ein zum humanen CYP3A4 teilweise verschiedenes Substratspektrum besitzen. Außerdem sind sie durch RIF nicht induzierbar [53].

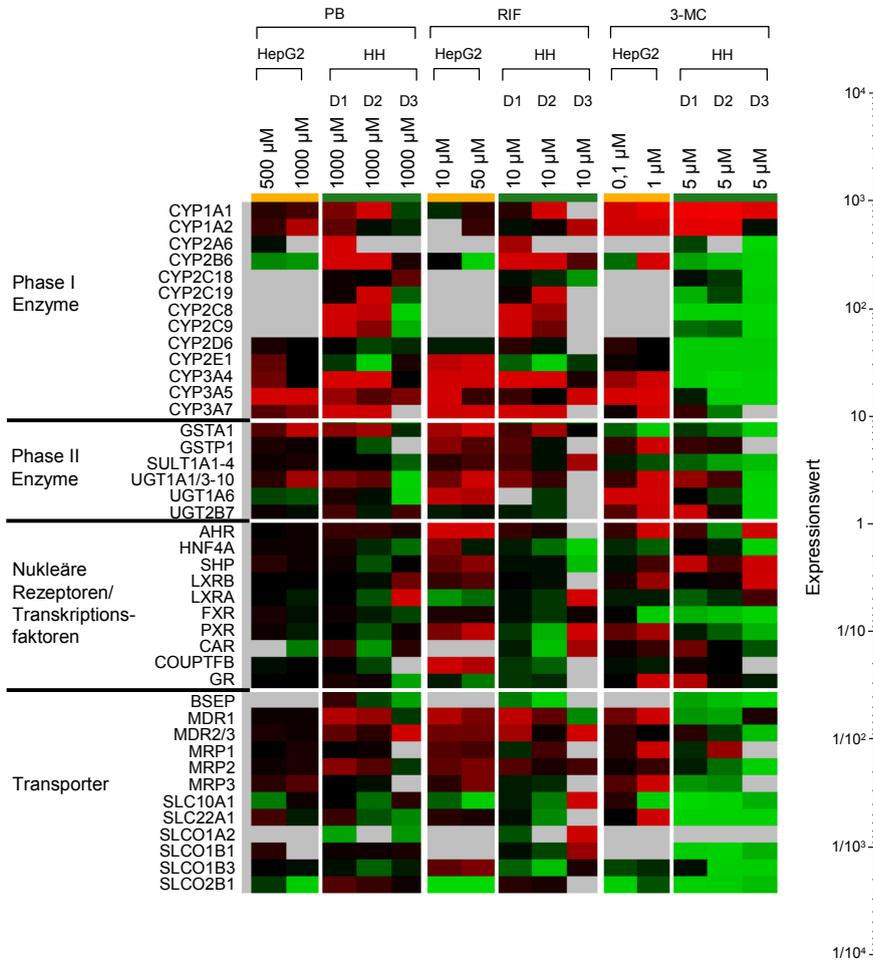


Abbildung 3.6: Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus in HepG2 und humanen Hepatozyten (HH) nach Behandlung mit verschiedenen Induktoren. Die Expression von Genen, involviert in verschiedene Phasen des Fremdstoffmetabolismus, wurde mittels TLDA-Karten gemessen. Die HepG2-Zellen und HH der Donoren (D) 1-3 wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Induktoren Phenobarbital (PB), 3-Methylcholanthren (3-MC) und Rifampicin (RIF) täglich über 72 h behandelt. Die HH-Daten für den Vergleich stammen von Kollagen-Monolayerkulturen und sind intern bereits publizierte Daten [158, 224]. Hochregulierte Gene ($\geq 1,5$ -fach) sind in rot und herunterregulierte Gene ($\leq -1,5$ -fach) in grün dargestellt. Die Deregulationswerte sind in Anhang 5 (HepG2-Zellen) und Anhang 6 (HH) zusammengestellt. [Abb. modifiziert nach Genedata's Expressionist[®] Analyst, Genedata AG, Basel/ Schweiz]

Induktion von CYP-Enzymen (Phase I)

Die Gene CYP1A1 und CYP1A2 wurden sowohl in HepG2 als auch in humanen Hepatozyten am stärksten durch 3-MC induziert. CYP1A1 war in HepG2-Zellen signifikant um das 4,8-Fache durch 0,1 μM 3-MC und um das 156-Fache durch 1 μM 3-MC hochreguliert. In den humanen Hepatozyten lagen die Regulationen für die drei Donoren zwischen 80- und 1.500-fach bei einer Konzentration von 5 μM 3-MC. CYP1A2 war in HepG2-Zellen und bei den humanen Hepatozyten in Donor 1 und Donor 3 ebenfalls hochreguliert. Die Regulation war für HepG2-Zellen nicht signifikant, da nur zwei der drei Passagen eine 10-20-fache (0,1 μM 3-MC) bzw. 40-50-fache (1 μM 3-MC) Hochregulation zeigten. Für Donor 1 der humanen Hepatozyten konnte eine Deregulation von 116 und für Donor 2 von 161 ermittelt werden. Aufgrund der unterschiedlichen 3-MC-Konzentrationen sind die Deregulationswerte zwischen HepG2 und humanen Hepatozyten jedoch nicht direkt vergleichbar.

Mit den anderen beiden Induktoren PB und RIF konnten vor allem in humanen Hepatozyten die Expression einiger Gene gesteigert werden. CYP2B6 war nach Behandlung mit PB und RIF in zwei der drei Donoren stark hochreguliert gefunden worden. Dagegen war CYP2B6 bei den beiden Induktoren in HepG2 ähnlich der Kontrolle bzw. stark herunterreguliert. Das nicht nur CAR, sondern auch PXR an das PBREM im Promotorbereich von CYP2B-Genen binden kann, wurde bereits in einigen Publikationen gezeigt [236]. Außerdem ist bekannt, dass PXR-Aktivatoren, wie RIF, in humanen Hepatozyten CYP2B6 induzieren können [261]. Des Weiteren wurde ein neues distales Promotorelement, das XRE (Xenobiotic response element), im Promoter von CYP2B6 entdeckt und gezeigt, dass CAR und PXR dieses Element binden können [261]. Die fehlende Induktion von CYP2B6 in HepG2 könnte mit der schwachen basalen Expression von CAR in HepG2 zusammenhängen. Vor allem CAR war in den humanen Hepatozyten sehr viel stärker exprimiert gefunden worden (siehe Abschnitt 3.2.1.1.1). Mit Ausnahme von Donor 3 (RIF) ließ sich die Expression von CAR und PXR in humanen Hepatozyten allerdings nach Induktorbehandlung nicht steigern. Hingegen waren die PXR-Level in HepG2 nach Behandlung mit 3-MC und RIF erhöht, obwohl keine gesteigerte Expression des Targetgens CYP2B6 beobachtet wurde. Zudem konnten, die PXR-regulierten Gene der CYP2C-Familie in HepG2 gar nicht detektiert werden. Eine mögliche Ursache für die Aktivierung der Transkription der erwähnten CYP-Enzyme könnten fehlende Kofaktoren sein. Die fehlende Bildung von funktionellem PXR ist als Ursache eher unwahrscheinlich, da zum Beispiel CYP3A

mit dem PXR-Agonisten RIF induzierbar war. Im Gegensatz zu den HepG2 waren CYP2C8 und CYP2C9 in humanen Hepatozyten bei Donor 1 und 2 nach PB- und RIF-Behandlung leicht bis stark hochreguliert. Lediglich Donor 3 zeigte eine Herunter- bzw. gar keine Regulation für die CYP2C-Gene. Eine CAR- und PXR-vermittelte Regulation von CYP2C wurde bereits von Chen und Goldstein beschrieben [262].

CYP2D6 gehört zu den CYP-Enzymen, welche konstitutiv exprimiert werden und nicht induzierbar sind. Das bestätigen die Daten in dieser Arbeit, da die Expression des CYP2D6-Gens weder in HepG2 noch in humanen Hepatozyten durch die drei verwendeten Induktoren gesteigert werden konnte. Die Basalexpressionsdaten zeigten bezüglich der konstitutiven Expression eine sehr viel stärkere Expression in HepG2 (13- bis 145-fach) als in humanen Hepatozyten.

CYP2E1 ist ebenfalls dafür bekannt, dass es nicht auf transkriptioneller Ebene reguliert wird. Dieses CYP wird vorwiegend substratabhängig auf Proteinebene stabilisiert [263]. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen, konnte bei keinem der drei Spender eine Induktion des CYP2E1 auf mRNA-Ebene detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach RIF-Behandlung in den HepG2 eine 3- bzw. 4-fache Erhöhung der CYP2E1 mRNA. Inwieweit diese Erhöhung reproduzierbar ist und sich auch auf Proteinebene manifestiert, müsste jedoch mit weiteren Versuchen überprüft werden.

Die Gene der CYP3A-Familie waren bei den humanen Hepatozyten durch die Induktoren PB und RIF hochreguliert. CYP3A4 war bei Donor 1 und 2 nach PB-Behandlung um das 25-fache induziert. Eine ebenfalls starke Induktion ließ sich bei RIF mit Deregelationswerten von 21 bis 35 beobachten. CYP3A5 war bei allen drei Donoren nach PB-Behandlung 1,6- bis 2,4-fach hochreguliert. CYP3A7 war bei den Donoren 1 und 2 durch PB und RIF 3- bis 6-fach erhöht gefunden worden. RIF ist dafür bekannt, die Transkription von CYP3A-Genen PXR-vermittelt zu stimulieren [236], was die Beobachtungen, dass die stärksten Induktionen nach RIF-Behandlung auftraten, bestätigt. In HepG2 wurden ebenfalls nach RIF-Behandlung die stärksten Induktionen für CYP3A4 detektiert. Die ermittelten Deregelationswerte lagen bei 7,4 für 10 μM RIF und 6,9 für 50 μM RIF und wurden mittels Student's T-Test als signifikant ($p\text{-Wert} < 0,05$) bewertet. Durch Behandlung mit PB konnte lediglich in der Konzentration von 500 μM eine Erhöhung der CYP3A4 mRNA detektiert werden. Außerdem zeigte sich auch nach 3-MC-Behandlung ein Anstieg des CYP3A4. CYP3A5 und CYP3A7 waren ebenfalls bei allen drei Induktoren hochreguliert, wobei nur für

CYP3A7 nach RIF-Behandlung eine statistische Signifikanz (p -Wert $< 0,05$) für beide Behandlungskonzentrationen ermittelt werden konnte.

Deregulation von Phase II-Enzymen

Im nächsten Teil wurde die Veränderung von Phase II-Enzymen nach Behandlung der HepG2 Zellen und humanen Hepatozyten mit den drei verschiedenen Induktoren untersucht. Die Glutathion-S-Transferase GSTA1 war in HepG2-Zellen nach Behandlung mit PB und RIF signifikant hochreguliert. In humanen Hepatozyten konnte bei PB für Donor 1 und Donor 2 ebenfalls ein Anstieg festgestellt werden. Die zweite untersuchte Glutathion-S-Transferase, die GSTP1, war in humanen Hepatozyten bei keinem der verwendeten Induktoren konsistent hochreguliert. Dagegen zeigten HepG2-Zellen nach Behandlung mit 1 μ M 3-MC und 10 μ M sowie 50 μ M RIF eine Erhöhung der GSTP1, die jedoch nicht signifikant war. Der RIF- bzw. PB-vermittelte Einfluss auf die Regulation der untersuchten Glutathion-S-Transferasen lässt auf eine PXR- bzw. CAR-abhängige Regulation dieser Phase II-Enzyme schließen. Eine Induktion der GSTA1-mRNA-Level durch CAR- und PXR-Agonisten konnte *in vivo* bereits gezeigt werden [264]. Hingegen konnte in der Studie von Knight *et al.* auch keine signifikante Erhöhung der GSTP1-mRNA-Spiegel verzeichnet werden [264].

Für das nächste untersuchte Enzym, die Sulfotransferase 1A1-4, konnte keine konsistente Hochregulation in HepG2 oder humanen Hepatozyten festgestellt werden. Aus der Literatur ist eigentlich eine AhR- bzw. PXR-Agonisten-vermittelte Induktion von Sulfotransferasen der Klasse 1A bekannt [265]. Diese konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Des Weiteren wurden verschiedene UDP-Glukuronosyltransferasen auf Veränderungen ihrer Expressionslevel untersucht. Die UGT2B7 zeigte lediglich nach 3-MC-Behandlung in HepG2 und bei Donor 1 der humanen Hepatozyten eine leichte aber nicht signifikante Erhöhung. Hingegen konnte für die UGT1A6 eine starke Induktion um das 5- bis 9-fache in HepG2 für 3-MC gezeigt werden. Eine durch AhR-Agonisten hervorgerufene Induktion der UGT1A6 in HepG2 ist bereits aus anderen Studien bekannt [265]. Westerink und Mitarbeiter zeigten allerdings, dass 3-MC zu einer stärkeren Erhöhung der UGT1A1-Genexpression im Vergleich zu UGT1A6 führt [266]. Die verwendeten Konzentrationen waren in der Westerink-Studie jedoch um ein bis

zwei Zehnerpotenzen höher als in dieser Arbeit und sind deshalb nicht direkt vergleichbar [266]. Dennoch konnte auch für die UGT1A1 eine starke Deregulation von 7,6 bei 1 μM 3-MC ermittelt werden. Gleichzeitig zeigte sich auch bei RIF, sowohl für die UGT1A1, als auch für die UGT1A6, eine deutliche Erhöhung der mRNA-Level. Die UGT1A1 war zudem in HepG2 nach Behandlung mit 1.000 μM PB signifikant hochreguliert. Eine Induktion der beiden Enzyme in HepG2 durch PXR-/CAR-Agonisten konnte bereits von Westerink *et al.* gezeigt werden [266]. Diese Daten deuten darauf hin, dass verschiedene nukleäre Rezeptoren (PXR, CAR und AHR) eine Rolle in der Regulation der UGTs in HepG2 spielen könnten. In Übereinstimmung mit den HepG2-Daten konnte auch für die humanen Hepatozyten eine Erhöhung der UGT1A1-Expression nach Behandlung mit PB und 3-MC für Donor 1 und Donor 2 festgestellt werden. Auf RIF sprach jedoch lediglich Donor 1 an. Die ermittelten Deregulationswerte waren jedoch sehr viel schwächer als in HepG2 (Faktoren 1,5-2,4). Zudem konnte für die UGT1A6 überhaupt keine Hochregulation in den humanen Hepatozyten ermittelt werden. Betrachtet man vergleichend die basale Expression in beiden Zellkultursystemen, so konnte eine sehr viel stärkere Expression der UGTs in humanen Hepatozyten gegenüber HepG2 festgestellt werden. Die höhere Basalexpression in humanen Hepatozyten gegenüber HepG2 beobachteten auch Westerink und Mitarbeiter [266]. Zudem war auch die Proteinaktivität der UGTs in humanen Hepatozyten deutlich höher als in HepG2 [266]. Die fehlende Induzierbarkeit der UGTs in humanen Hepatozyten könnte zum Beispiel mit dem Verlust von transkriptions-vermittelnden Kofaktoren während der Kultivierung zusammenhängen. Ein solcher Verlust, aufgrund der Kultivierung, könnte dadurch bedingt sein, dass die Basalexpression im Rahmen dieser Arbeit in den Kontrollen der Induktionsexperimente erst nach 72 h ermittelt wurde und nicht direkt in frisch ausplattierten Kulturen. Dass sich das Expressionsmuster bezüglich der metabolischen Komponenten im Verlauf der Kultivierung von primären Hepatozyten deutlich verändert und auch stark von der Art der Kultivierung abhängt, konnte in vorangegangenen Publikationen bereits gezeigt werden [136, 137].

Induktion der Expression von nukleären Transkriptionsfaktoren

Im nächsten Teil der Genexpressionsanalysen fremdstoffmetabolisierender Komponenten wurden nukleäre Rezeptoren/ Transkriptionsfaktoren auf ihre Induzierbarkeit untersucht. Dabei konnte keine konsistente Induktion für die drei Donoren der humanen Hepatozyten gefunden werden. Lediglich SHP zeigte nach Behandlung mit 3-MC für

Donor 1 und Donor 3 einen Anstieg um den Faktor 3. Ein komplett anderes Bild zeigte sich für die Zelllinie HepG2. In HepG2 konnte für den AhR eine signifikante Erhöhung nach Behandlung mit 3-MC bzw. RIF festgestellt werden. Des Weiteren war in den gleichen Behandlungen der PXR bis zu 2,9-fach erhöht. Ein signifikanter Anstieg der mRNA-Level konnte zudem nach Exposition der Zellen mit RIF für COUPTF β , PPAR β/δ und PPAR γ gemessen werden. Ebenfalls signifikant erhöht zeigte sich der GR mit einer Deregulation von 3,8. Eine Besonderheit bei den HepG2 war, wie vorangehend schon erwähnt, dass CAR in den meisten Proben überhaupt nicht zu detektieren war.

Inwieweit die für die Zelllinie ermittelten Induktionen der genannten nukleären Rezeptoren möglicherweise einer positiven Feedback-Regulation entsprechen [267] oder durch koregulatorische Eigenschaften der Transkriptionsfaktoren zustande kommen, müsste jedoch in weiteren Experimenten abgeklärt werden. Des Weiteren müssen die Genexpressionslevel nicht zwangsläufig mit der Proteinexpression korrelieren, so dass möglicherweise in den humanen Hepatozyten trotzdem funktionelle Transkriptionsfaktoren exprimiert werden, auch wenn keine erhöhte Genexpression zu detektieren war. Diese Vermutung stützt sich auf der Induzierbarkeit einer Vielzahl von CYP-Enzymen, da diese unter der transkriptionellen Regulation der untersuchten Rezeptoren stehen.

Induktion von Transporter-codierenden Genen

Bei den Expressionsuntersuchungen von Genen, die für Transporter codieren, konnte vor allem mit dem PXR-Agonisten RIF für viele der getesteten Gene eine deutliche Steigerung der mRNA-Level verzeichnet werden. In HepG2 konnte eine Induktion aller ABC-Transporter, mit Ausnahme von BSEP, durch RIF detektiert werden. BSEP (ABCB11) konnte in HepG2 nicht detektiert werden. Zudem war in humanen Hepatozyten trotz basaler Expression keine Induktion mit den verwendeten Substanzen möglich. Dagegen konnte jedoch mit RIF sowie mit PB eine Induktion der meisten untersuchten ABC-Transporter in humanen Hepatozyten erreicht werden. Dabei zeigten Donor 1 und Donor 2 erneut eine größere Übereinstimmung im Vergleich zu Donor 3. Bei letztem Donor waren viele der Transporter gar nicht detektierbar oder wiesen eine abweichende Regulation zu den anderen beiden Donoren auf. So konnte zum Beispiel bei Donor 3 eine RIF-vermittelte Erhöhung der Expression von SLC10A1, SLCO1B1

sowie SLCO1A2 verzeichnet werden. Bei den anderen beiden Donoren konnte keine Erhöhung der untersuchten Kationen- bzw. Anionentransporter gemessen werden. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den HepG2 für die SLC-Transporter. Dabei wurde lediglich für SLCO1B3 und SLC22A1 bei RIF bzw. 3-MC eine Hochregulation beobachtet. Während 3-MC in den humanen Hepatozyten keine induktiven Effekte aufzeigte, konnte in der Zelllinie eine Hochregulation der Transporter ABCB1, ABCC1 und ABCC3 detektiert werden. Ein weiterer Unterschied zwischen den humanen Hepatozyten und den HepG2 war, dass PB in der Zelllinie keine konsistente Induktion für alle Transporter zeigte. Eine Ursache dafür könnte die fehlende CAR-Expression in den HepG2-Zellen sein. Die durch CAR-Agonisten-vermittelte Expression von Transportern ist unter anderem für ABCC2 (MRP2) bekannt [236]. Eine solche PB- und somit vermutlich CAR-vermittelte Hochregulation des ABCC2 wurde für die humanen Hepatozyten beobachtet. Des Weiteren wurde bereits beschrieben, dass der PXR eine Rolle in der Regulation der Expression hepatischer Transportsysteme spielt. Vorangegangene Studien zeigten, dass die Aktivierung des PXR für die Induktion von Transportern, wie SLCO1B1 (OATP2), ABCC2 (MRP2) oder auch ABCC3 (MRP3), von Bedeutung ist [236]. Diese Beobachtungen entsprechen den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Resultaten für diese Transporter, sowohl in humanen Hepatozyten als auch für die Zelllinie HepG2.

3.2.1.3 CYP1A-Aktivitätsuntersuchungen

Nachdem für die HepG2-Zellen eine starke Erhöhung der CYP1A-Genexpression nach Behandlung der Zellen mit dem AhR-Agonisten 3-MC in denen TLDA-Experimenten gemessenen werden konnte, sollte im weiteren Verlauf der Arbeit überprüft werden, ob auch eine erhöhte Aktivität des Proteinproduktes nachgewiesen werden kann. Dazu wurde ein so genannter EROD-Test durchgeführt. Die Zellen wurden über drei Tage täglich mit dem Induktor 3-MC behandelt und anschließend mit Ethoxyresorufin inkubiert. Der Umsatz dieses CYP1A-Substrates wurde über 20 min fluorimetrisch verfolgt und anschließend die Aktivitätsrate bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle nach Normalisierung auf die Zellviabilität bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.7 gezeigt. 3-MC verursachte eine starke, statistisch signifikante Erhöhung der CYP1A-Aktivität in den getesteten Konzentrationen von 0,1 μM und 1 μM . Die Deregu-

lationswerte lagen dabei für 0,1 μM 3-MC bei 48,4 und für 1 μM des Induktors bei 138. Diese Daten zeigten, dass HepG2-Zellen funktionell aktives CYP1A exprimieren und die Aktivität substratabhängig induzierbar ist.

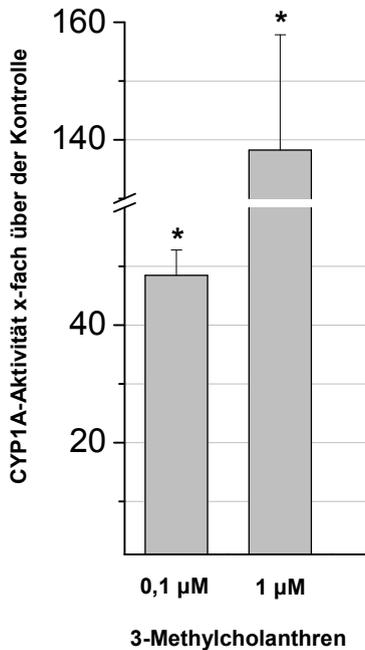


Abbildung 3.7: Induktion der CYP1A-Aktivität durch 3-Methylcholanthren (3-MC). Die CYP1A-Aktivität wurde nach täglicher Behandlung der HepG2-Zellen mit dem CYP1A-Induktor 3-MC über 72 h mit dem EROD-Test bestimmt. Bei diesem Test wird der Umsatz des CYP1A-Substrates Ethoxyresorufin zeitabhängig gemessen wurde. Die Aktivitätswerte wurden auf die Zellviabilität normalisiert und anschließend die Induktion gegenüber der Kontrolle ermittelt. Die Mittelwerte \pm Standardabweichung der biologischen Replikate wurden für die verwendeten Konzentrationen des 3-MC aufgetragen. *Signifikanz im Student's T-Test (zweiseitig, gepaart), p-Wert < 0,05

3.2.1.4 CYP3A4-Aktivitätsuntersuchungen

Neben dem CYP1A fiel bei den Genexpressionsanalysen die Induzierbarkeit einer weiteren CYP-Enzymfamilie, welche CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7 umfasst, auf. CYP3A4 spielt bei der Metabolisierung von verschiedenen progentoxischen Verbindungen eine bedeutende Rolle. Für die Untersuchung CYP3A4-Proteinaktivität wurde ein lumineszenzbasierter Test der Firma Promega (*P450-Glo*TM) eingesetzt. Wie für den EROD-Test wurden die Zellen täglich über drei Tage mit den entsprechenden

Induktoren behandelt. Für die Messung wurden die Zellen über drei Stunden mit einem spezifischen CYP3A4-Substrat inkubiert und anschließend dessen Umsetzung lumino-metrisch gemessen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 3.8 dargestellt. In den Genexpressionsstudien war CYP3A4 nach Behandlung mit RIF in den Konzentrationen 10 μM und 50 μM um den Faktor 8,3 bzw. 9,4 hochreguliert (Abb. 3.6). In Übereinstimmung mit den beobachteten Genexpressionsveränderungen konnte eine erhöhte Aktivität des CYP3A4 Enzyms gegenüber der Kontrolle nach Behandlung mit dem PXR-Agonisten RIF verzeichnet werden (Abb. 3.8). Die Deregulation lag dabei bei 2,2 für die niedrige RIF-Konzentration bzw. 3,8 für die hohe Konzentration. Letztere war zudem statistisch signifikant dereguliert gegenüber der Kontrolle.

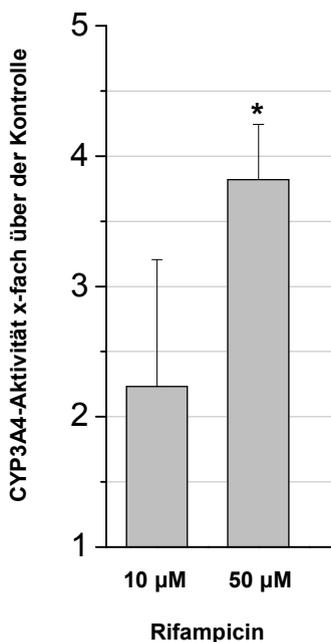


Abbildung 3.8: Induktion der CYP3A4-Aktivität durch Rifampicin (RIF) in HepG2. Die Zellen wurden täglich über einen Zeitraum von 72 h mit dem Induktor behandelt. Die Messung der CYP3A4-Aktivität erfolgte anschließend mit dem *CYP3A4-Glo*TM-Test von Promega. Die Aktivitätswerte wurden auf die Zellviabilität normalisiert und anschließend die Induktion gegenüber der Lösungsmittelkontrolle ermittelt. Die Mittelwerte \pm Standardabweichung der biologischen Replikate wurden gegen die verwendeten Induktorkonzentrationen aufgetragen. *Signifikanz im Student's T-Test (zweiseitig, gepaart), p-Wert < 0,05.

Des Weiteren wurden auch 3-MC und PB getestet, da sich auf Genexpressionsebene teilweise eine Induktion für CYP3A4 gezeigt hatte. Die Proteinaktivität lag jedoch im Bereich der Lösungsmittelkontrolle (Daten nicht gezeigt). Diese Daten zeigen, dass erhöhte Genexpressionslevel nicht zwangsläufig mit dem Proteinlevel korrelieren

müssen. Ursachen können ein frühzeitiger Abbau der mRNA, eine unvollständige Translation in Protein, keine funktionelle Proteinfaltung oder auch ein frühzeitiger Abbau des Proteins sein.

3.2.1.5 Zusammenfassung zur Charakterisierung der metabolischen Kapazität der HepG2-Zellen

Die Ergebnisse der Charakterisierung der HepG2-Zelllinie demonstrieren, dass ein Teil der untersuchten fremdstoffmetabolisierenden Komponenten noch nachzuweisen und auch funktionell aktiv war. Für CYP1A1 konnten in HepG2-Zellen vergleichbare Expressionswerte mit humanen Hepatozytenkulturen gemessen werden. Zudem war eine Steigerung der Aktiviäts- und Genexpressionslevel dieses Enzyms mit einem typischen AhR-Agonisten, dem 3-MC, beobachtet worden. Des Weiteren konnte auch für CYP3A4 eine Induzierbarkeit mit einem typischen PXR-Agonisten, dem RIF, bestätigt werden. Die basale CYP3A4-Aktivität war allerdings deutlich geringer als in humanen Hepatozyten. Eine Induktion der CYP-Enzyme 1A und 3A durch Behandlung mit den Induktoren 3-MC und RIF ist in HepG2-Zellen bereits beschrieben worden [81, 268]. Im Vergleich zu humanen Hepatozyten waren die Konzentrationen jedoch meist gering [81, 268].

Neben den Enzymen CYP1A und CYP3A4 konnte auch für CYP2D6 eine im Vergleich zu den humanen Hepatozyten hohe Basalexpression detektiert werden. Eine schwache Expression und begrenzte Induzierbarkeit wurde für CYP2B6 und CYP2E1 nachgewiesen. Außerdem konnten Enzyme der Familie CYP2C in HepG2 nicht detektiert werden. Ähnliche Erkenntnisse wurden bereits von Westerink *et al.* veröffentlicht [268]. Westerink *et al.* konnten in dieser Studie ebenfalls moderate Expressionen der CYP-Enzyme 1A1, 1A2, 2B6, 2D6, 2E1 und 3A4 detektieren. Schwache Basalexpressionen wurden hingegen, wie auch in dieser Arbeit, für CYP2A6, CYP2C9 und CYP2C19 gemessen. Das bestätigt die Vermutung im Rahmen dieser Arbeit, dass die CAR-vermittelte CYP-Regulation in HepG2 gestört ist. Des Weiteren konnten auch Westerink *et al.* keine 3-MC- oder RIF-abhängige Induktion des CYP2B6 für Induktorkonzentrationen bis 1 μM (3-MC) bzw. 10 μM (RIF) nachweisen [268].

Abgesehen von der fehlenden Expression des CAR-Rezeptors spielen wahrscheinlich noch andere Mechanismen für die fehlende oder geringe Expression vieler CYP-Enzyme in HepG2 eine Rolle. Dabei besitzen verschiedene Lebertranskriptionsfaktoren wie HNF4 α , HNF3 α , HNF3 γ , HNF1 α , C/EBP α und C/EBP β einen entscheidenden Einfluss innerhalb der Regulation der Expression typischer hepatischer Gene [243]. Mit Ausnahme von HNF4 α , welches in dieser Arbeit in Übereinstimmung mit anderen Publikationen eine vergleichbare Basalexpression in HepG2 und humanen Hepatozyten zeigte, sind diese transkriptionellen Faktoren in den meisten Hepatomzelllinien nur sehr schwach exprimiert [243]. Publikationen belegen, dass die funktionelle Wiederherstellung einzelner Faktoren, wie z.B. HNF3 γ oder C/EBP α , eine Wideraktivierung verschiedener CYP-Enzyme der Familien 2 und 3 bewirkt. Allerdings zeigten diese Studien auch, dass die Wiederherstellung einzelner Faktoren nicht ausreicht, um die globale CYP-Expression in Hepatomzelllinien zu erhöhen. Dadurch zeigt sich das komplexe Zusammenspiel mehrerer Transkriptionsfaktoren für die Regulation fremdstoffmetabolisierender Komponenten [243]. Andere mögliche Mechanismen für die fehlende bzw. verminderte CYP-Expression in HepG2 sind das Fehlen von Koaktivatoren oder die Überexpression von Korepressoren (siehe 3.2.1.1, Basalexpression von Transkriptionsfaktoren/ Kernrezeptoren). Außerdem sind möglicherweise epigenetische Prozesse (DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung) für die Repression der CYP-Enzyme verantwortlich [243]. Das zeigen Studien von Castell und seinen Mitarbeitern, in denen die Überexpression von HNF3 γ nur in Gegenwart eines Histondeacetylaseinhibitors zu einer Transaktivierung der endogenen CYP2C8- und CYP2C19-Gene führte [243].

Bei den Phase II-Enzymen waren die UGTs in HepG2, trotz einer geringeren Basalexpression im Vergleich zu den humanen Hepatozyten, induzierbar. Ebenfalls induzierbar zeigten sich die getesteten GSTs. Die Expression der untersuchten Sulfotransferase war dagegen weder in HepG2 noch in humanen Hepatozyten durch Behandlung mit induktiven Substanzen steigerbar. Die basale Expression war in HepG2 sogar stärker als in humanen Hepatozyten. Westerink *et al.* konnten ebenfalls eine schwache Basalexpression und Basalaktivität der UGTs in HepG2-Zellen im Vergleich zu humanen Hepatozyten detektieren [266]. Die Sulfotransferasen zeigten bei Westerink *et al.* in Übereinstimmung mit den Daten dieser Arbeit ebenfalls hohe, mit den humanen Hepatozyten vergleichbare Expressionslevel. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit waren die untersuchten Sulfotransferasen bei Westerink *et al.* jedoch induzierbar.

Allerdings konnten die besten Induktionen mit anderen AhR-Agonisten (Indirubin, Indigo) bzw. PXR/ CAR-Agonisten (CITCO, T0901317), welche in dieser Arbeit nicht verwendet wurden, erreicht werden. Die Ergebnisse der Studien im Rahmen dieser Arbeit demonstrieren zusammen mit den bereits publizierten Daten von Westerink *et al.*, dass HepG2 einen relativ vollständigen Phase II-Metabolismus, mit Ausnahme der UGT, im Vergleich zu humanen Hepatozyten besitzen [266].

Abgesehen von dem Phase I- und Phase II-Metabolismus wurden Transportsysteme in HepG2-Zellen untersucht. Während die untersuchten ABC-Transporter in humanen Hepatozyten und HepG2 eine vergleichbare Basalexpression zeigten und auch auf Induktoren ansprachen, war die Induzierbarkeit der Anionen- und Kationentransporter begrenzt. Zudem war die basale Expression dieser Transporter in HH sehr viel stärker als in HepG2.

Die Ergebnisse der HepG2-Charakterisierung zeigten, dass HepG2 noch eine begrenzte Metabolisierungsfähigkeit (Phase I-Metabolismus) besitzen. Die Eignung von HepG2-Zellen per se als System für Biotransformationsstudien bleibt, wie schon in vorangegangenen Studien gefunden, zweifelhaft. Eine Studie von Vickers *et al.*, in welcher die Biotransformation von Cyclosporin A in HepG2-Zellen zu humanen Leberschnitten und Mikrosomen verglichen wurde, zeigte, dass HepG2-Zellen als Modell für diese Substanz nicht geeignet sind. HepG2-Zellen waren lediglich in der Lage, einen der drei Metaboliten des Cyclosporin A zu bilden [269]. Die Studien von Wilkening *et al.* bestätigen, dass die HepG2-abhängige Metabolisierung substanzspezifisch ist [270]. Während alle Testkanzerogene positive Resultate im Comet-Test mit primären Hepatozyten lieferten, konnte nur eine der Verbindungen positiv in HepG2-Zellen getestet werden. Aktivitätstests im Rahmen der Studie belegten eine starke Induktion im EROD (CYP1A), aber nicht für ECOD (CYP2B6, CYP2E1 und CYP1A2) [270]. Andere Studien konnten wiederum zeigen, dass spezielle Kulturbedingungen, wie die Kultivierung in Earle's Medium, eine Aktivitätssteigerung der Enzyme CYP1A und CYP2B bewirkt [81, 271]. Hewitt und Hewitt zeigten, dass die Aktivität von Phase I- und II-Enzymen zwischen HepG2-Zellen verschiedener Chargen und in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen variiert [272].

Die Charakterisierungsdaten verdeutlichen somit zusammen mit den bisherigen Veröffentlichungen, dass die Zelllinie allein sicherlich nicht geeignet ist, um das ganze Spektrum an progenerotoxischen Verbindungen abzubilden. Zudem könnte die Funktionalität der Phase II-Enzyme bei begrenztem Phase I-Metabolismus zu einer Unterschätzung der (Geno-)Toxizität vieler Substanzen führen. Die Problematik könnte zusätzlich durch die in HepG2 vorhandenen induzierbaren Transportsysteme (MRPs, MDRs) gestützt werden. Diese sind am Efflux vieler Krebsmedikamente (z.B. ETO) aber auch kanzerogener Substanzen, wie AFB1, aus den Hepatozyten und damit an deren Entgiftung maßgeblich beteiligt [273, 274]. Für ein Toxizitätsscreening ist es daher wichtig, den Phase I-Metabolismus der Zelllinie zu komplementieren, um einerseits ein breites Substratspektrum zu erfassen und andererseits das natürliche Gleichgewicht des Phase I-Metabolismus im Vergleich zu den Entgiftungsmechanismen (Phase II und Transportsysteme) widerzuspiegeln. Einleitend wurde bereits beschrieben, welche CYP-Enzyme bei der Metabolisierung verschiedenster Prokanzerogene eine Rolle spielen. Bei der Auswahl eines MAS war es nun wichtig, dass Enzyme, wie CYP2B, CYP2C sowie CYP2E, enthalten sind, da sich in der Charakterisierung nur eine begrenzte bzw. fehlende Expression dieser Enzyme gezeigt hatte. Bei Verwendung von S9 oder Mikrosomen von Ratten bieten sich somit PB-, β -NF- oder Isoniazid-induzierte Leberfraktionen an.

3.2.2 Zellviabilitätsuntersuchungen mit den progenerotoxischen Modellsubstanzen

Zur Dosisfindung für die P53-Studien wurden zunächst Zellviabilitätsexperimente mit verschiedenen Dosierungen von progenerotoxischen Modellsubstanzen durchgeführt. Als Modellsubstanzen wurden, wie einleitend schon erwähnt, die Verbindungen CPA, AFB1, DMBA und DEN verwendet. Zur metabolischen Aktivierung der Substanzen wurde PB/ β -NF-induzierter S9 von Ratten eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.9 dargestellt.

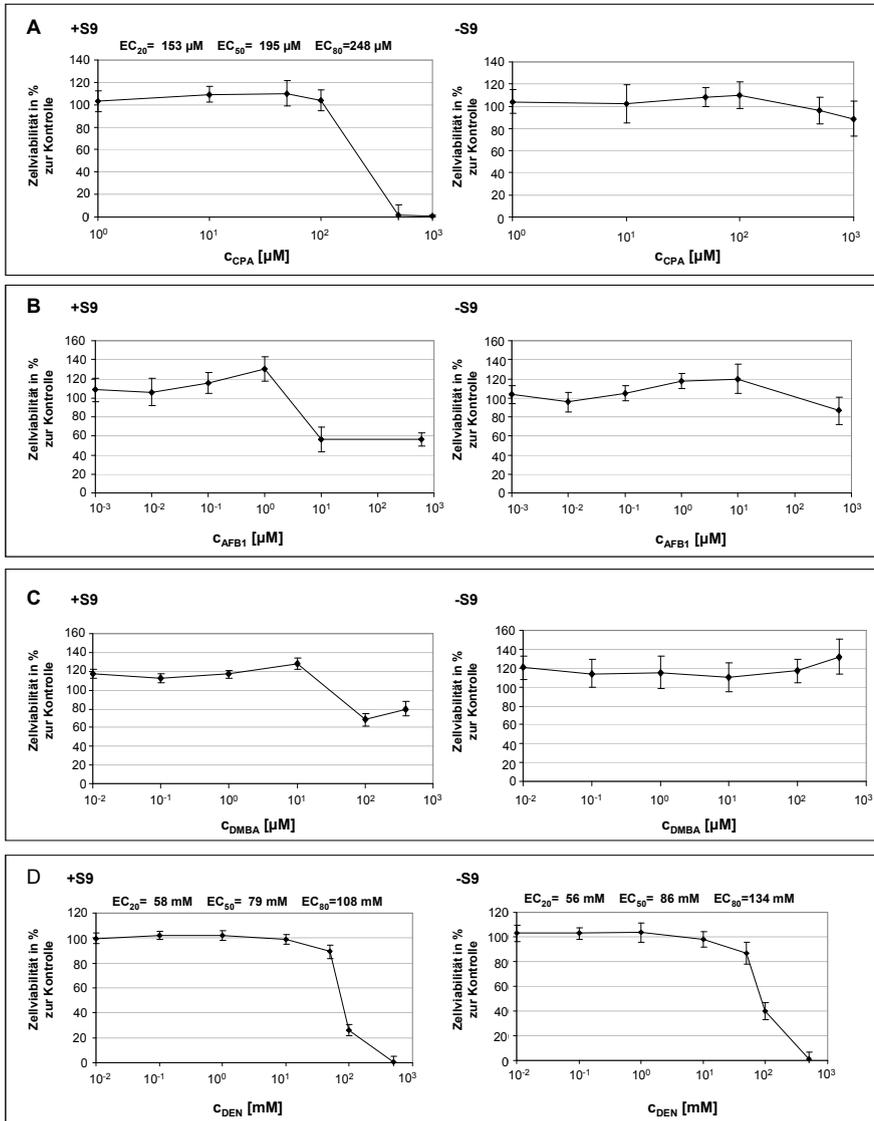


Abbildung 3.9: Zellviabilitätsuntersuchungen in HepG2-Zellen mit verschiedenen progenotoxischen Verbindungen. Die HepG2-Zellen wurden für die Experimente mit verschiedenen Konzentrationen der progenotoxischen Substanzen Cyclophosphamid (CPA) (A), Aflatoxin B₁ (AFB₁) (B), 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA) (C) oder Diethylnitrosamin (DEN) (D) mit und ohne metabolisches Aktivierungssystem (MAS: Phenobarbital/ β -Naphthoflavon-induzierter S9) täglich für 6 h behandelt. Die Zellviabilität wurde 48 h nach Beginn der ersten Behandlung mit dem *CellTiter-Glo*[®]-Test von Promega bestimmt. Die dargestellten Daten sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung in % gegenüber der DMSO-Kontrolle aus vier verschiedenen technischen Replikaten.

CPA wurde in einem Konzentrationsbereich von 1 μM bis 1 mM getestet. Ein Einfluss auf die Zellviabilität zeigte sich ausschließlich bei Zugabe von S9. Der ermittelte EC_{50} lag bei 195 μM und gibt an, dass bei dieser Konzentration nur noch 50 % der ursprünglichen Zellvitalität zu detektieren war. Ohne metabolische Aktivierung konnte durch die Behandlung mit CPA keine zytotoxische Wirkung auf die HepG2-Zellen bis zu einer Konzentration von 1 mM festgestellt werden. Für die P53-Experimente wurden daraufhin Konzentrationen bis 75 mM ausgewählt. Diese liegen auch für die Behandlungen mit MAS im nicht zytotoxischen Bereich.

Für AFB1 zeigte sich bei dem Zellviabilitätskurven, dass AFB1 ohne MAS bis zu einer Konzentration von 600 μM ebenfalls keinen Einfluss auf die Zellviabilität hat. Nachdem jedoch AFB1 gemeinsam mit S9 zu den HepG2 gegeben wurde, war ab 10 μM eine deutliche Verringerung der Zellviabilität auf 56 % im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Eine Steigerung der Konzentration auf bis zu 600 μM brachte jedoch keinen weiteren Verlust der Zellviabilität mit sich. Höhere Konzentrationen konnten aufgrund der schlechten Löslichkeit des AFB1 nicht getestet werden. Deswegen war es auch nicht möglich eine EC_{50} -Ermittlung durchzuführen. Für die P53-Experimente wurde AFB1 bis zu einer Konzentration von 10 μM eingesetzt. Aufgrund des untypischen Verlaufs der Dosis-Wirkungskurve mit gleichbleibender Zellviabilität von 10 μM bis 600 μM wurden Konzentrationen bis in den zytotoxischen Bereich hinein untersucht. Zusätzlich wurden aber auch Konzentrationen unter 1 μM , welche sich als nicht zytotoxisch erwiesen haben, getestet.

Die Zellviabilitätskurven für DMBA wiesen einen ähnlichen Verlauf, wie die des AFB1 auf. Bis zu einer Konzentration von 10 μM konnte mit S9 keine zellviabilitätsverringende Wirkung gemessen werden. Ab 100 μM fiel die Zellviabilität auf etwa 68 % im Vergleich zur Kontrolle ab und blieb bis zu einer Konzentration von 400 μM konstant. Ohne Zugabe eines MAS konnte jedoch auch für DMBA keine zytotoxische Wirkung auf die HepG2-Zellen verzeichnet werden. Im P53 wurden, wie auch für AFB1, Konzentrationen im nicht zytotoxischen Bereich, das heißt bis 10 μM , aber auch Konzentrationen im Bereich beginnender Zytotoxizität (bis 100 μM) eingesetzt.

Für das Nitrosamin DEN war sowohl mit als auch ohne MAS eine Zellviabilitätskurve mit sigmoidalem Verlauf detektiert worden. Allerdings stimmten die Kurvenverläufe mit und ohne MAS nahezu überein. Der EC_{50} lag sowohl mit als auch ohne S9 bei ungefähr 80 mM. Diese Studien zeigten, dass DEN über 10 mM auch ohne metabolische Aktivierung zytotoxisch auf die HepG2-Zellen wirkt. Da die Zugabe des

MAS, nicht wie bei den anderen Substanzen eine Verringerung der Zellviabilität verursachte, ist es fragwürdig, ob eine metabolische Aktivierung stattgefunden hat. Neben dem PB/ β -NF-induzierten S9 wurden deshalb auch Isoniazid-induzierte Mikrosomen getestet, um zu untersuchen, ob eine CYP2E1-vermittelten Metabolisierung eine Rolle spielt [Diplomarbeit Yasmin Dietz, Universität Mainz, 223]. Allerdings ergaben sich auch mit diesem MAS die gleichen Zellviabilitätskurven, wie mit und ohne PB/ β -NF-induzierten S9. Trotz dieser Ergebnisse wurde DEN in den P53-Studien und auch später bei den Genexpressionsexperimenten mitgeführt. Der verwendete Konzentrationsbereich reichte mit bis zu 75 mM an den EC_{50} heran. Die niedrigeren Konzentrationen von 25 mM und 50 mM lagen noch in einem Bereich mit einer Zellviabilität von größer 90 % (unterhalb des EC_{20} -Wertes) und demzufolge in einem Bereich mit vergleichbarer Zellviabilität zur Kontrolle.

3.2.3 P53-Induktion durch progenotoxische Substanzen

Nachdem für die genotoxischen Substanzen eine Aktivierung des P53 im Rahmen der Antwort auf den induzierten DNA-Schaden festgestellt werden konnte, sollte für die progenotoxischen Verbindungen die P53-Bestimmung zur Etablierung des kombinierten Systems aus HepG2 und MAS sowie zur Dosisfindung für die nachfolgenden Genexpressionsanalysen genutzt werden. Als Kontrollen wurden die Negativsubstanzen Metformin (MET), THEO und KETO sowie ACT als Positivkontrolle in jedem P53-Test mitgeführt. Abbildung 3.10 zeigt die P53-Induktion nach der Behandlung mit den angeführten Kontrollverbindungen (Induktionswerte siehe Anhang 7).

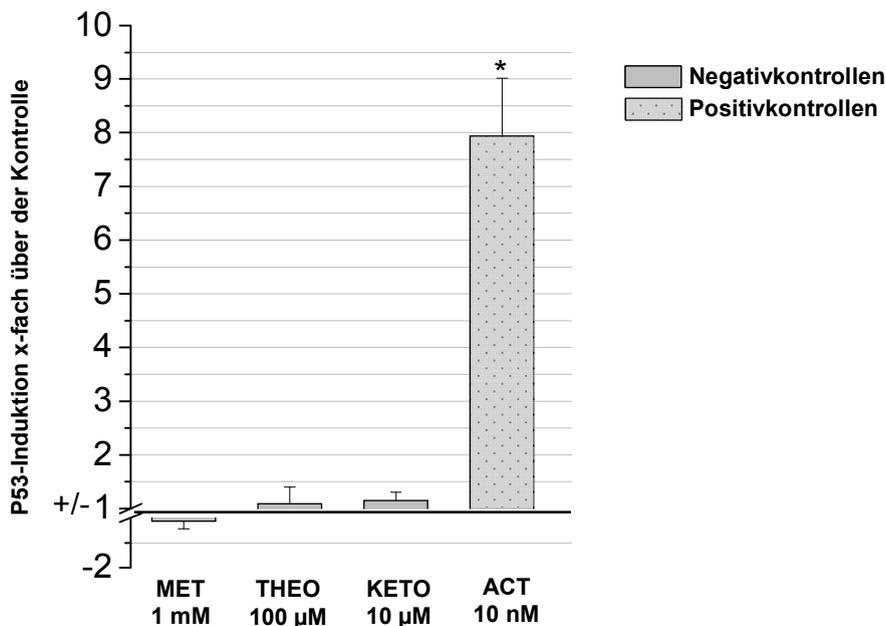


Abbildung 3.10: P53-Induktion in HepG2-Zellen durch Kontrollverbindungen. Die HepG2-Zellen wurden täglich entweder mit den nicht-genotoxischen Substanzen Metformin (MET), Theophyllin (THEO) und Ketokonazol (KETO) oder dem genotoxischen Actinomycin D (ACT) behandelt. Die P53-Induktion wurde 48 h nach Beginn der ersten Behandlung mit dem *TransAM™ P53* Transkriptionsfaktortest (ActiveMotif) gemessen. Für die Positivkontrolle Actinomycin konnte ein starker signifikanter Anstieg an aktivem P53-Protein gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (0,2 % DMSO) verzeichnet werden. Hingegen zeigten alle anderen nicht-genotoxischen Testsubstanzen keine P53-Aktivierung. Die dargestellten Daten sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten mit Zellpassagen zwischen 3 und 25 (siehe Anhang 7). *Signifikanz im Student's T-Test (zweiseitig, gepaart), p-Wert < 0,05

Als erste progenotoxische Testsubstanz wurde CPA getestet. Die Ergebnisse der P53-Bestimmung sind in Abbildung 3.11A dargestellt. Eine Erhöhung an aktivem P53 konnte lediglich in Gegenwart des metabolischen Aktivierungssystems (S9) festgestellt werden. Ohne Zugabe der S9-Fraktion lag die gemessene P53-Induktion im Bereich der Lösungsmittelkontrolle. Wie einleitend bereits erwähnt, spielen eine Reihe von CYP-Enzymen bei der metabolischen Aktivierung von CPA eine Rolle. Insbesondere CYP-Enzyme der Familie 2, wie zum Beispiel CYP2B6, CYP2A6, CYP2C19 aber auch CYP2C9, sind an der Bildung des DNA-reaktiven Phosphoramidsenfgases beteiligt [63, 64]. Bis auf CYP2B6 konnten alle dieser genannten CYP-Enzyme auf

Genexpressionsebene im Rahmen der Charakterisierung überhaupt nicht detektiert werden. CYP2B6 zeigte zudem eine sehr schwache Expression gegenüber den humanen Hepatozytenkulturen. Außerdem ließ sich die Expression durch die Behandlung mit verschiedenen CYP-Induktoren nicht steigern. Aufgrund der fehlenden Enzymaktivität für die CYP-Enzyme 2C8/ 9/ 18/ 19 und der eingeschränkten Expression des CYP2B6 sowie der fehlenden Expression des CAR, welcher die Expression dieser CYP-Isoenzyme reguliert [234-236], sind die HepG2-Zellen wahrscheinlich nicht in der Lage den DNA-reaktiven Metaboliten des CPA zu bilden. Die beobachtete P53-Aktivierung nach Zugabe von S9, welcher mit PB/ β -NF induziert wurde und somit erhöhte Konzentrationen der benötigten CYP2-Enzyme enthält, deutet als Surrogat für einen induzierten DNA-Schaden auf eine metabolische Umsetzung des CPAs unter Bildung des mutagenen Senfgaszwischenproduktes hin.

Im Gegensatz zum CPA konnte für DEN bis zu einer Testkonzentration von 75 mM weder mit noch ohne MAS eine Aktivierung des P53 verzeichnet werden (Abb. 3.11B). Für die Metabolisierung von DEN sind die Enzyme CYP2E1 und CYP2A6 verantwortlich [67-69]. Beide Enzyme wurden im Rahmen der Charakterisierung der HepG2-Zellen im Vergleich zu humanen Hepatozyten als sehr schwach basal exprimiert gefunden. CYP2A6 mRNA konnte sogar in den meisten Proben überhaupt nicht detektiert werden. Da vor allem CYP2E1 bei der Aktivierung einer Reihe von Nitrosaminen eine Rolle spielt [69], wurde neben dem β NF/ PB-induzierten S9 auch noch ein Isoniazid-induzierter Mikrosomenmix als MAS getestet. Jedoch konnte auch mit diesem System zur metabolischen Aktivierung keine Erhöhung des aktivierten P53 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da in den P53-Studien keine Induktion und auch in den Zytotoxizitätsstudien keine erhöhte Zytotoxizität der Proben mit MAS gegenüber denen ohne MAS infolge der Exposition mit dem Nitrosamin detektiert werden konnten, scheint eine Aktivierung des DEN mit dem entwickelten Zell-MAS-System eher fragwürdig.

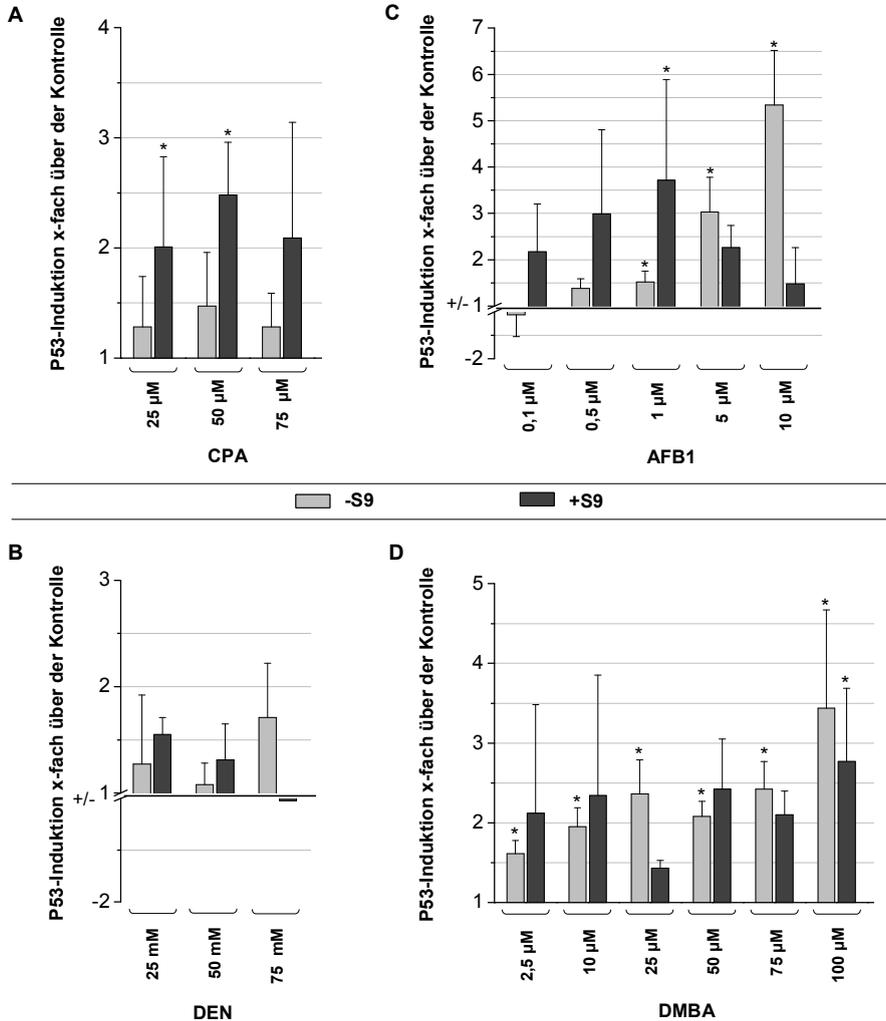


Abbildung 3.11: P53-Induktion in HepG2-Zellen nach Behandlung mit Cyclophosphamid (CPA) (A), Diethylnitrosamin (DEN) (B), Aflatoxin B₁ (AFB1) (C), und 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA) (D). Die HepG2-Zellen wurden mit den progentoxischen Substanzen mit (dunkelgraue Balken) und ohne (hellgraue Balken) metabolisches Aktivierungssystem (MAS: Phenobarbital/ β -Naphthoflavon-induzierter S9) täglich für 6 h behandelt. Die P53-Induktion wurde 48 h nach Beginn der ersten Behandlung bestimmt. Die dargestellten Daten sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten mit Zellpassagen zwischen 3 und 25 (siehe Anhang 7). *Signifikanz im Student's T-Test (zweiseitig, gepaart), p-Wert < 0,05

Die nächste Testsubstanz, AFB1, zeigte ein abweichendes P53-Induktionsprofil im Vergleich zur ersten Testsubstanz CPA. Die Untersuchungen des AFB1 ließen feststellen, dass es bei ausreichend hohen Konzentrationen des Mutagens auch ohne Zugabe des MAS zu einer Aktivierung des P53 kommt (Abb. 3.11C). Bis zu einer Konzentration von 1 μM war die detektierte P53-Induktion ohne MAS allerdings äußerst gering. In diesem Konzentrationsbereich ließ sich die Aktivierung des P53 durch Zugabe des S9 erheblich steigern. Hingegen bewirkte die Zugabe des MAS ab einer Konzentration von 5 μM eine Steigerung der Zytotoxizität (siehe Abschnitt 3.2.2) und führte dadurch zu einem verringerten P53 Signal. Hingegen zeigten die Proben, behandelt mit 5 μM und 10 μM AFB1, eine 3- bis 5-fache Induktion, wenn kein MAS zugegeben wurde. Diese Daten deuten darauf hin, dass die HepG2-Zellen in der Lage sind, AFB1 selbst zu metabolisieren, wenn die Substanzen ausreichend hoch dosiert wird.

Ein ähnliches P53-Induktionsprofil, wie das des AFB1, konnte für die letzte Testsubstanz, DMBA, beobachtet werden. DMBA zeigte ebenfalls eine induktive Wirkung auf das zelluläre P53 ohne dass ein MAS verwendet wurde (Abb. 3.11D). Mit steigenden Konzentrationen wuchs auch das P53-Signal auf das bis zu 3,4-fache gegenüber der Kontrolle an. Diese Ergebnisse deuten, wie auch die vom AFB1, auf eine metabolische Aktivität der Zelllinie selbst hin. Des Weiteren führte die Zugabe von S9 nicht zu einer Steigerung der P53-Antwort, sondern lediglich zu einer erhöhten Varianz der Messwerte der biologischen Replikate. Da für DMBA in den Zytotoxizitätstests ab 10 μM ein Abfall der Zellviabilität nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 3.2.2), ist es möglich, dass auch hier zytotoxische Effekte eine Rolle spielen und sich deshalb keine Steigerung der P53-Aktivität mit dem MAS erzielen lässt.

Die innerhalb der P53-Studien gewonnenen Resultate spiegeln die Erkenntnisse früherer Studien wider. Kürzlich zeigten Wilkening *et al.*, dass eine DNA-schädigende Wirkung für Benzo[a]pyren in HepG2-Zellen mit dem Comet-Test nachweisbar ist [270]. Hingegen konnte für andere Promutagene, wie DEN oder PhIP, mit dem gleichen Test kein positives Resultat erzielt werden [270]. Des Weiteren bestätigen die Arbeiten von Westerink und seinen Mitarbeitern, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten [275]. Westerink *et al.* demonstrierten, dass AFB1 und DMBA eine deutliche Aktivierung eines P53-Reportergens in Abwesenheit eines metabolischen Aktivierungssystems in HepG2 verursachen. Abgesehen davon, konnten sie für CPA nur nach

Zugabe von S9 zu den Zellen eine Reporterageninduktion erzielen [275]. Yang *et al.* konnten ebenfalls zeigen, dass die P53-Induktion in NCTC 929-Zellen charakteristisch für genotoxische und progenerotoxische Substanzen ist [276, 277]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit, stellten Yang *et al.* fest, dass die P53-Aktivierung durch Promutagene im Vergleich zu unmittelbaren Mutagenen erst zu späteren Zeitpunkten detektiert werden kann [277]. Eine Limitation des von Yang *et al.* genutzten Zellsystems scheint jedoch die metabolische Aktivierung zu sein, da die eingesetzten Testkonzentrationen sehr viel höher waren als in dem HepG2-MAS-System in der vorliegenden Arbeit. AFB1 hatte bei Yang *et al.* bis zu einer Dosis von 5 µg/ml, was einer Konzentration von 16 µM im Behandlungsmedium entspricht, keinen Effekt auf die P53-Induktion in NCTC-Zellen [277]. Dagegen konnte mit dem HepG2-MAS-Modell ab einer AFB1-Konzentration von 1 µM ohne MAS und 0,1 µM mit MAS eine signifikante P53-Antwort detektiert werden. Obwohl ein absoluter Vergleich der beiden Systeme aufgrund der verschiedenen Behandlungsschemata und Zeitpunkte nicht möglich ist, zeigen diese Daten, dass es wichtig, den optimalen Messzeitpunkt für jedes System zu finden, um falsch negative Resultate zu vermeiden.

3.2.4 Einfluss der Inhibition der HepG2-CYP-Aktivität auf die genotoxische Wirkung der Prokanzerogene AFB1 und DMBA

Im Rahmen der P53-Induktionsstudien konnte für AFB1 und DMBA auch ohne metabolische Aktivierung eine Erhöhung an aktivem P53 nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung wären residuale CYP-Enzymaktivitäten der HepG2-Zellen selbst. Die HepG2-Zellen könnten somit auch ohne Zugabe des metabolischen Aktivierungssystems die Substanzen in die genotoxischen Epoxidverbindungen umsetzen und dadurch die P53-Akkumulation auslösen. Um die Hypothese zu bestätigen, sollte versucht werden, die metabolische Umsetzung und dadurch verursachte P53-Induktion durch DMBA und AFB1 mittels Zugabe von spezifischen CYP-Inhibitoren zu verringern. Anhand der Charakterisierungsstudien konnte gezeigt werden, dass HepG2-Zellen eine Restaktivität und Induzierbarkeit für die Enzyme CYP1A1/2 und CYP3A4 besitzen. Daraufhin wurden die CYP-Inhibitoren α -Naphthoflavon (α -NF) und KETO ausgesucht. α -NF ist ein potenter und spezifischer Inhibitor für CYP1A und CYP1B [278, 279]. Hingegen wurde KETO als reversibler Inhibitor für CYP3A4

beschrieben [280]. Vor den P53-Studien wurden Zellviabilitätstests mit den beiden CYP-Inhibitoren durchgeführt, um zytotoxische Wirkungen durch die Inhibitoren selbst auszuschließen (Abb. 3.12). Es konnte für keine der beiden Verbindungen eine zytotoxische Wirkung im getesteten Konzentrationsbereich von 0,1 μM bis 10 μM nachgewiesen werden.

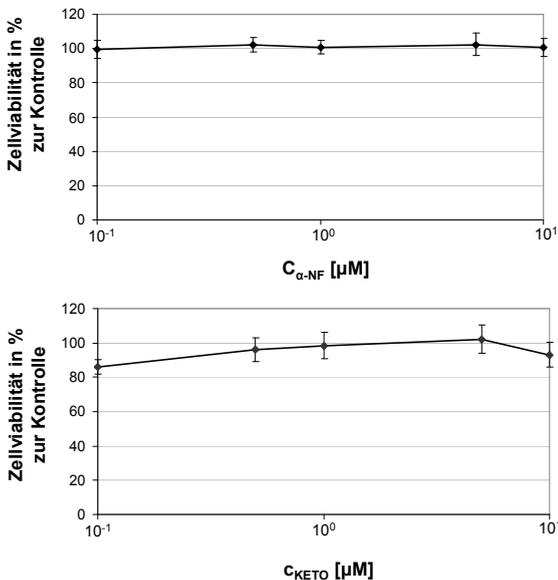


Abbildung 3.12: HepG2-Zellviabilität nach Behandlung mit den Cytochrom-P450-(CYP)-Inhibitoren α -Naphthoflavon (α -NF) und Ketokonazol (KETO). Die Zellen wurden für die Experimente mit den CYP-Inhibitoren α -NF und KETO täglich über 48 h behandelt. Die Messung der Zellviabilität erfolgte lumino-metrisch mit dem *CellTiter-Glo*[®]-Test von Promega. Die Mittelwerte der Zellviabilität \pm Standardabweichung wurden aus den vier technischen Replikaten ermittelt und sind prozentual zur Lösungsmittelkontrolle (0,2 % DMSO) dargestellt.

Auf Basis der Zytotoxizitätsdaten und vorangegangener Publikationen wurden die Inhibitor dosierungen 1 μM , 5 μM und 10 μM für die P53-Inhibitionsexperimente ausgewählt [142, 281, 282]. Die Behandlung der Zellen erfolgte täglich über insgesamt 48 h in Kombination mit einer 30-minütigen Präinkubation mit dem entsprechenden Inhibitor bzw. Lösungsmittel für die Kontrollen vor der 6 h-Behandlung mit den Prokanzerogenen in Gegenwart oder Abwesenheit der Inhibitoren. Als Kontrollen wurden die HepG2-Zellen mit den Inhibitoren alleine behandelt, um zu zeigen, dass diese selbst keinen Einfluss auf die P53-Aktivierung besitzen (Anhang 8). Für beide Inhibitoren konnten im Konzentrationsbereich von 1 μM bis 10 μM ausschließlich P53-Induktionswerte im Bereich der DMSO-Lösungsmittelkontrolle nachgewiesen werden (Anhang 8).

Die Ergebnisse der Inhibitionsstudien mit AFB1 und DMBA sind in Abbildung 3.13 dargestellt (Induktionswerte siehe Anhang 8). Für AFB1 konnte mit KETO eine deutliche Verringerung der P53-Induktion nach der 48-stündigen Behandlungsperiode nachgewiesen werden (Abb. 3.13A). Für die KETO-Konzentrationen von 1 μM bis 10 μM konnte eine vollständige Inhibition der durch 5 μM AFB1 induzierten P53-Antwort ermittelt werden. In der hohen Dosierung von AFB1 (10 μM) konnte zudem ein klarer dosisabhängiger Anstieg der Inhibition durch KETO beobachtet werden. Im Gegensatz zum KETO verursachte $\alpha\text{-NF}$ lediglich in Kombination mit der niedrigen AFB1-Dosis von 5 μM eine geringfügige aber nicht signifikante Reduktion der P53-Aktivität. Bei einer AFB1-Konzentration von 10 μM , konnte keine Verringerung des P53-Signals im Vergleich zum AFB1 allein detektiert werden.

Im Gegensatz zum AFB1 wurde für DMBA mit $\alpha\text{-NF}$ eine beträchtliche Inhibition der P53-Aktivierung unter Verwendung von Konzentrationen größer oder gleich 1 μM erreicht. KETO bewirkte ebenfalls eine Verminderung des aktivierten P53 im Vergleich zu den Behandlungen mit DMBA allein. Allerdings konnten erst ab einer Konzentration von 5 μM KETO inhibitorische Effekte detektiert werden. Bei einer Konzentration von 10 μM KETO wurde dann eine vollständige Inhibition der DMBA-vermittelten P53-Aktivierung festgestellt.

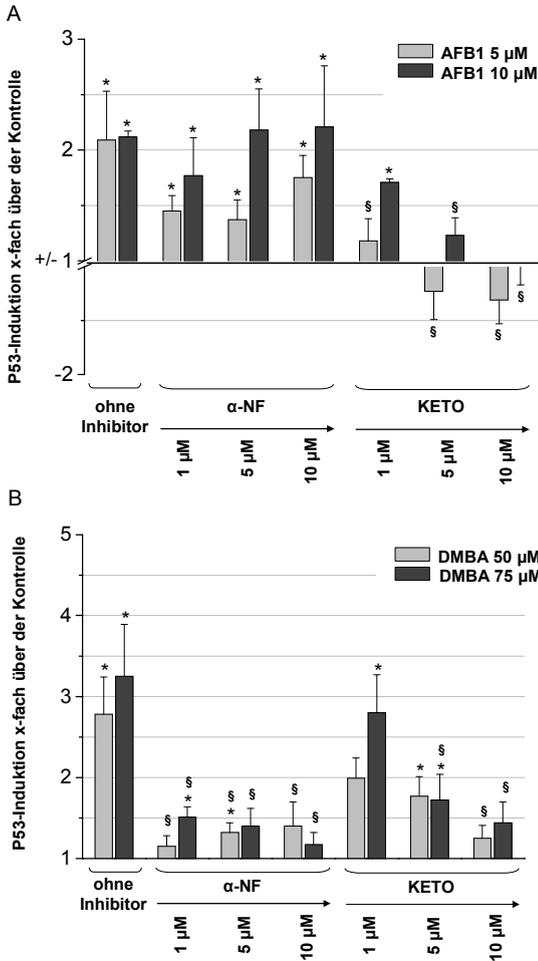


Abbildung 3.13: P53-Induktion in HepG2-Zellen nach Behandlung mit Aflatoxin B₁ (AFB1) und 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA) in Kombination mit verschiedenen Cytochrom-P450 (CYP)-Inhibitoren. Die Zellen wurden mit AFB1 (A) oder DMBA (B) in Kombination mit den CYP-Inhibitoren α -Naphthoflavin (α -NF) oder Ketokonazol (KETO) behandelt. Vor den Behandlungen mit den Prokanzerogenen wurden die Zellen mit dem jeweiligen Inhibitor für 30 min vorinkubiert. Die Behandlung mit AFB1 und DMBA mit und ohne Inhibitor wurde anschließend über 6 h durchgeführt. Danach wurden die Zellen gewaschen und das Behandlungsmedium durch ein Medium, das ausschließlich den Inhibitor oder das Lösungsmittel (DMSO, 0,2 %) enthielt, ersetzt. Die Behandlungsprozedur wurde täglich wiederholt und die P53-Induktion 48 h nach Beginn der ersten Behandlung gemessen. Die dargestellten Daten sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten mit Zellpassagen zwischen 3 und

25 (siehe Anhang 8). *Signifikanz im Student's T-Test (zweiseitig, gepaart) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle, p-Wert < 0,05. § Signifikanz der Behandlungen AFB1/DMBA mit Inhibitor gegenüber der entsprechenden Behandlung mit den Prokanzerogenen ohne Inhibitor zum Level $\alpha = 0,05$ in einer ANOVA mit posthoc Tukey Test.

Die signifikante P53-Induktion durch DMBA in Abwesenheit eines metabolischen Aktivierungssystems könnte damit erklärt werden, dass CYP1A1 noch eine beträchtliche Expression in HepG2-Zellen aufwies, die sogar mit der in humanen Hepatozyten vergleichbar war. Außerdem konnte für CYP1A1 eine starke Induktion durch 3-MC erreicht werden (siehe Abschnitt 3.2.1). CYP1A1 ist eng verwandt mit CYP1B1, welches vermutlich eines der Hauptenzyme in der metabolischen Aktivierung von

DMBA ist [61]. Frühere Publikationen belegen, dass α -NF ein potenter und selektiver Inhibitor beider Enzyme ist [278, 279]. Die vollständige Suppression der DMBA-vermittelten P53-Aktivierung durch α -NF indiziert die Verhinderung der Bildung des DNA-reaktiven Metaboliten.

Mit KETO konnte zwar ebenfalls eine Reduktion des aktivierten P53 im Vergleich zu den DMBA Behandlungen ohne Inhibitor beobachtet werden, allerdings waren höhere Inhibitorkonzentrationen nötig, um die DMBA-induzierte P53-Akkumulation zu unterdrücken. Obwohl KETO in niedriger Dosierung als potenter und selektiver Inhibitor von CYP3A4 bekannt ist, verursachen hohe Dosierungen, die für die vollständige Inhibition von CYP3A4 zu etwa 95 % eingesetzt werden müssen, auch eine Inhibition anderer CYP-Enzyme, wie CYP1B1, CYP2B6 und CYP2C8/9/19, zu 20-60 % [283]. Diese dosisabhängige Selektivität kann gemeinsam mit der Kreuzreaktivität in hohen Dosierungen des KETO die reduzierte P53-Antwort bei steigenden Inhibitorkonzentrationen erklären.

Die wichtigsten Enzyme, welche die metabolische Umsetzung von AFB1 vermitteln, sind CYP3A4 und CYP1A2 [52]. Im Rahmen der Charakterisierungsexperimente konnte für CYP3A4 eine induzierbare Expression nachgewiesen werden, welche im Einklang mit bereits publizierten Daten steht [268]. Allerdings waren die gefundenen Basalexpressionslevel des CYP3A4 in den HepG2-Zellen generell geringer als in Hepatozyten. Andererseits stellten Hewitt und Hewitt fest, dass die Umsatzraten von CYP3A4-abhängigen Substraten in HepG2-Zellen mit den von humanen Hepatozyten vergleichbar waren [272]. Ein beträchtlicher Einfluss von CYP3A4 für die AFB1-Epoxidbildung könnte für die durch KETO inhibierte P53-Induktion in Abwesenheit eines metabolischen Aktivierungssystems verantwortlich gemacht werden. Im Gegensatz zum DMBA, bei welchem nur hohe KETO-Dosierungen eine P53-Reduktion vermutlich aufgrund von unspezifischen CYP-Kreuzreaktivitäten, verursachten, konnte für AFB1 bereits in niedrigen Dosierungen eine verminderte P53-Induktion nachgewiesen werden. Andererseits führte die Kombinationsbehandlung mit α -NF nicht zu einer signifikanten Verringerung der P53-Antwort. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Veröffentlichungen unterstreichen diese Daten, dass CYP3A4 wahrscheinlich die Schlüsselrolle für die metabolische Aktivierung von AFB1 spielt [284].

3.3 Genexpressionsanalysen mit progenotoxischen Verbindungen

3.3.1 Globale Datenanalyse

Im nächsten Teil der Arbeit wurden Genexpressionsanalysen mit den progenotoxischen Verbindungen AFB1, DMBA, DEN und CPA durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden THEO und MET eingesetzt. Die Auswahl der Dosierungen und Zeitpunkte orientierte sich an den vorangegangenen P53- und Zellviabilitätsuntersuchungen (siehe Abschnitt 3.2.2/ 3.2.3). Nach einer globalen Normalisierung auf einen gemeinsamen Median der Intensitätswerte von 100 wurden die Daten mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA) eingehender betrachtet (Abb. 3.14). Dabei konnte festgestellt werden, dass die verschiedenen Experimente (Zellpassagen) keinen wesentlichen Einfluss auf die globale Datenverteilung hatten (Abb. 3.14A). Als Haupttrennungsmerkmale des Datensatzes konnten die verschiedenen Zeitpunkte (24 h und 48 h) sowie das MAS identifiziert werden (Abb. 3.14B/ C). Den größten Effekt schien dabei das MAS (Abb. 3.14C) zu besitzen, da zwei gut getrennte Datenwolken der Proben mit S9 und ohne S9 sichtbar waren. Eine klare Trennung der verschiedenen Testsubstanzen bzw. der genotoxischen und nicht-genotoxischen Behandlungsgruppen konnte im globalen Datenprofil aufgrund der überlagernden Effekte des MAS nicht detektiert werden. Außerdem wurden die verwendeten Dosierungen und Zeitpunkte so gewählt, dass sie möglichst im nicht-zytotoxischen Bereich lagen. Damit sollte eine beginnende DNA-Schadensantwort induziert werden, ohne die Zellen bereits zu töten. In den Abschnitten 3.1.1.2 und 3.2 wurde bereits beschrieben, dass die P53-Aktivierung meist mit einer Induktion des apoptotischen Zelltods einher geht. Sind diese Prozesse bereits weit fortgeschritten und ein Großteil der Zellen bereits tödlich beschädigt, können diese möglicherweise wenig spezifischen zytotoxischen Ereignisse die charakteristische genotoxische Antwort überlagern und somit eine gute Klassifizierung der Substanzen erschweren. Umgekehrt sind sehr schwache Veränderungen der Genexpression bezogen auf das Gesamtprofil durch die technisch begrenzte Replikatanzahl statistisch schwierig zu erfassen. Deswegen mussten auch die Grenzwerte für die FDR (*False Discovery Rate*) in der folgenden statistischen Auswertung entsprechend angepasst werden.

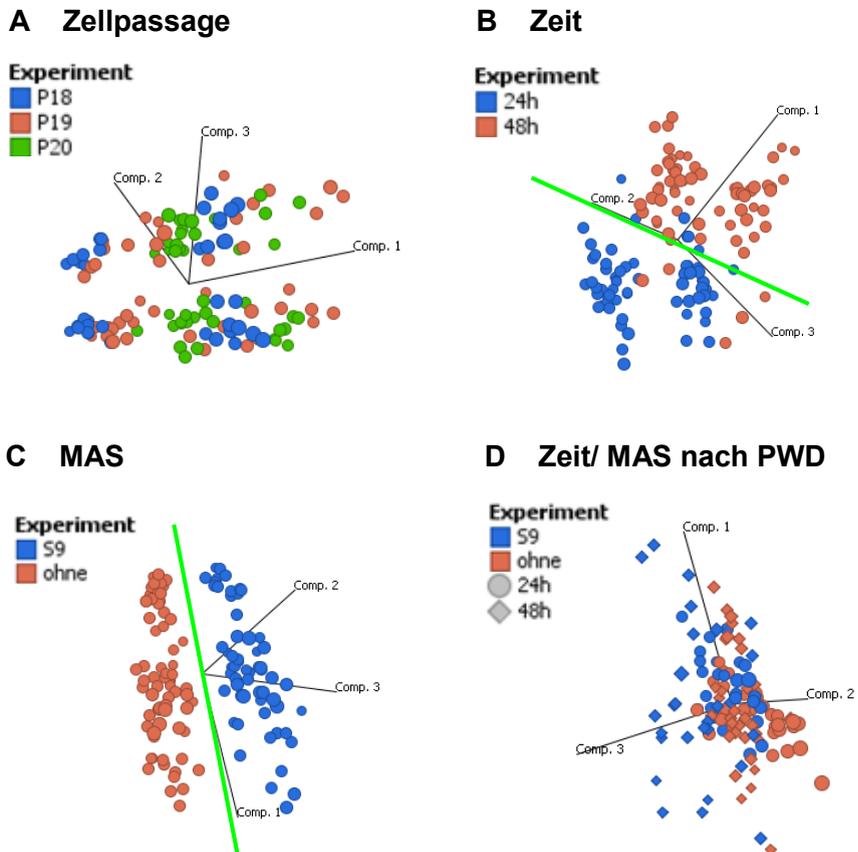


Abbildung 3.14: Hauptkomponentenanalyse des globalen Genexpressionsdatensatzes mit progentoxischen Verbindungen. Die HepG2-Zellen wurden mit den progentoxischen Verbindungen 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen, Diethylnitrosamin, Cyclophosphamid und Aflatoxin B₁ sowie Theophyllin und Metformin als Kontrollen für 24h und 48h mit und ohne metabolisches Aktivierungssystem (MAS: Phenobarbital/ β -Naphthoflavon-induzierter Rattenleber S9) behandelt. Die Experimente wurden mit drei verschiedenen Zellpassagen wiederholt und die Genexpressionsveränderungen mit Illumina *Human Ref-8 BeadChip* Arrays erfasst. Die Daten wurden vor der Hauptkomponentenanalyse auf einen gemeinsamen Median von 100 (Intensitätswert) normalisiert. Dargestellt ist der Einfluss der verschiedenen Zellpassagen (A), Behandlungszeiten (B) und des metabolischen Aktivierungssystems (C) auf die Datenverteilung. (D) Zeit- und MAS-abhängige Datenverteilung nach *Pointwise Division* (PWD)-Normalisierung, d.h. der einzelnen Proben auf die jeweilige S9-/ DMSO-Kontrolle des gleichen Experimentes/ der gleichen Zellpassage. [Abb. Modifiziert nach Genedata's Expressionist[®] Analyst, Genedata AG, Basel/ Schweiz]

Eine weitere Herausforderung für die Datenanalyse stellt die Verwendung des MAS dar. Bereits an den Lösungsmittelkontrollen mit und ohne S9 ließ sich, wie bereits genannt, ein beträchtlicher Einfluss des MAS erkennen. Um die Substanzeffekte herauszuarbeiten, mussten die Daten um den Effekt des MAS korrigiert werden. Deshalb wurde zusätzlich mit einer so genannten *Pointwise Division*-Normalisierungsmethode gearbeitet. Durch Division jeder Probe auf die jeweilige S9-/ DMSO-Kontrolle des gleichen Experimentes (gleiche Zellpassage) wurden auf diese Weise substanzspezifische Relativwerte generiert (Abb. 3.14/ D). Im späteren Verlauf (siehe Abb. 3.16/ 3.4.1) konnte gezeigt werden, dass durch die „MAS-Korrektur“ eine Trennung der genotoxischen von den nicht-genotoxischen Proben möglich wird.

3.3.2 Genexpressionsmuster von progenotoxischen Substanzen

Zur Evaluierung spezifischer Genexpressionsmuster der progenotoxischen Testsubstanzen wurde eine ANOVA der Proben des 48 h-Behandlungszeitpunktes mit dem Trenneffekt MAS durchgeführt, da die genotoxischen Effekte nach metabolischer Aktivierung auftreten sollten. Die Auswahl des 48 h-Zeitpunktes erfolgte auf Basis von statistischen Einzeltestungen, welche zeigten, dass nach 24 h in nahezu allen Proben keine wesentlichen Genexpressionsveränderungen auftraten (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe der Varianzanalyse konnten 808 Gene, welche einen p-Wert $< 0,01$ (bzw. BH-q-Wert $< 0,3$) aufwiesen, selektiert werden. Auf Basis von vorangegangenen statistischen Analysen (paarweise T-Tests mit den Median-normalisierten Ausgangsdaten), den p53-Studien sowie einer K-Means Clusteranalyse mit den ANOVA-Genen wurde eine Experimentgruppe „positive genotoxische Behandlungen“ definiert. Diese Gruppe beinhaltet die Experimente, welche moderate bis starke Genexpressionsveränderungen aufwiesen: AFB1 1 $\mu\text{M}+\text{S9}$ und 10 $\mu\text{M}-\text{S9}$, DEN 25 mM/ 50 mM+S9, CPA 25 $\mu\text{M}/ 50 \mu\text{M}+\text{S9}$ und DMBA 10 $\mu\text{M}+\text{S9}$. Anschließend wurden die 808 ANOVA-Gene nach einem Deregulationsgrenzwert von 1,5 gefiltert. Für 88 Gene konnte eine Deregulation von $\geq 1,5$ -fach oder $\leq -1,5$ -fach in über 40 % der Proben der Gruppe „positive genotoxische Behandlungen“ nachgewiesen werden (Abb. 3.15A). Diese 88 vorwiegend hochregulierten Gene können somit als charakteristisch für die verwendeten progenotoxischen Substanzen angesehen werden. Während die 88 Gene beim CPA ohne MAS fast ausschließlich Regulationen vergleichbar der Kontrolle zeigten, konnte beim

AFB1 und auch für DMBA und DEN eine tendenziell ähnliche Regulation, wie in den Proben ohne S9, detektiert werden. Diese Beobachtungen bestätigen die vorangegangenen P53-/CYP-Inhibitionsstudien, welche die metabolische Umsetzung von AFB1 und DMBA durch die HepG2-Zellen selbst schlussfolgern ließen. Die beiden verwendeten Negativkontrollen MET und THEO zeigten mit und ohne MAS erwartungsgemäß keine bzw. kaum Deregulationen der 88 Gene. Eine Übersicht über die Deregulationswerte der 88 gefundenen Gene ist im Anhang 10 zusammengestellt.

Die funktionelle Einordnung dieser Gene in acht verschiedene Kategorien wurde mit der Metacore und ToxWiz Datenbank vorgenommen (Abb. 3.15B). Die größte Funktionsgruppe stellten mit 29 % die Gene, die an zellulären Prozessen, wie Proliferation, Differenzierung und Entwicklung, beteiligt sind, dar. Beispiele sind die zellzyklusregulierenden Gene Cyclin D1 (CCND1), G0S2 (G0/ G1 switch 2) und FSD1 (Fibronectin type III and SPRY domain containing 1), aber auch Gene mit Funktionen in der Gewebeumstrukturierung, wie die Matrix Metalloproteinase 7 (MMP7), der Hyaluronrezeptorligand CD44 oder HPLN4 (Hyaluronan and proteoglycan link protein 4). Die nächste große funktionelle Gruppe umfasste 15 % der durch die progenerotoxischen Substanzen regulierten Gene. Die Gene dieser Gruppe vermitteln als Komponenten verschiedener Signaltransduktionswege die Kommunikation zwischen Zellen. AMRH2 (Anti-Müllerian hormone receptor, type II) fungiert als Rezeptor im TGF β -Signalweg, während das G-Protein GNA15 (Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 15 (Gq class)) als Transduktor einer Vielzahl von membranständigen Signalkomponenten agiert. Weitere Gene, die in die G-Proteinsignaltransduktion involviert sind, sind der G-Protein-gekoppelte Rezeptor GPR110 oder das regulatorische Gen RGS16 (Regulator of G-protein signalling 16). Neben den Genen der Signaltransduktionskaskaden konnte eine ausgeprägte Immun- und Entzündungsantwort festgestellt werden. Insgesamt 13 % der signifikant regulierten Gene konnte diesem Bereich zugeordnet werden. Hochreguliert waren Gene, wie der Interleukin-1-Rezeptor (IL1R2), NMI (N-Myc and STAT interactor), ein Koaktivator für Myc- und STAT-Transkriptionsfaktoren, aber auch Gene der Antigenpräsentation und -prozessierung. Zur gefundenen Funktionsgruppe Antigenpräsentation/ -prozessierung gehörten, wie zum Beispiel PROCR (Protein C receptor), MR1 (Major histocompatibility complex, class I-related) oder die G-Antigene GAGE4 und GAGE12I.

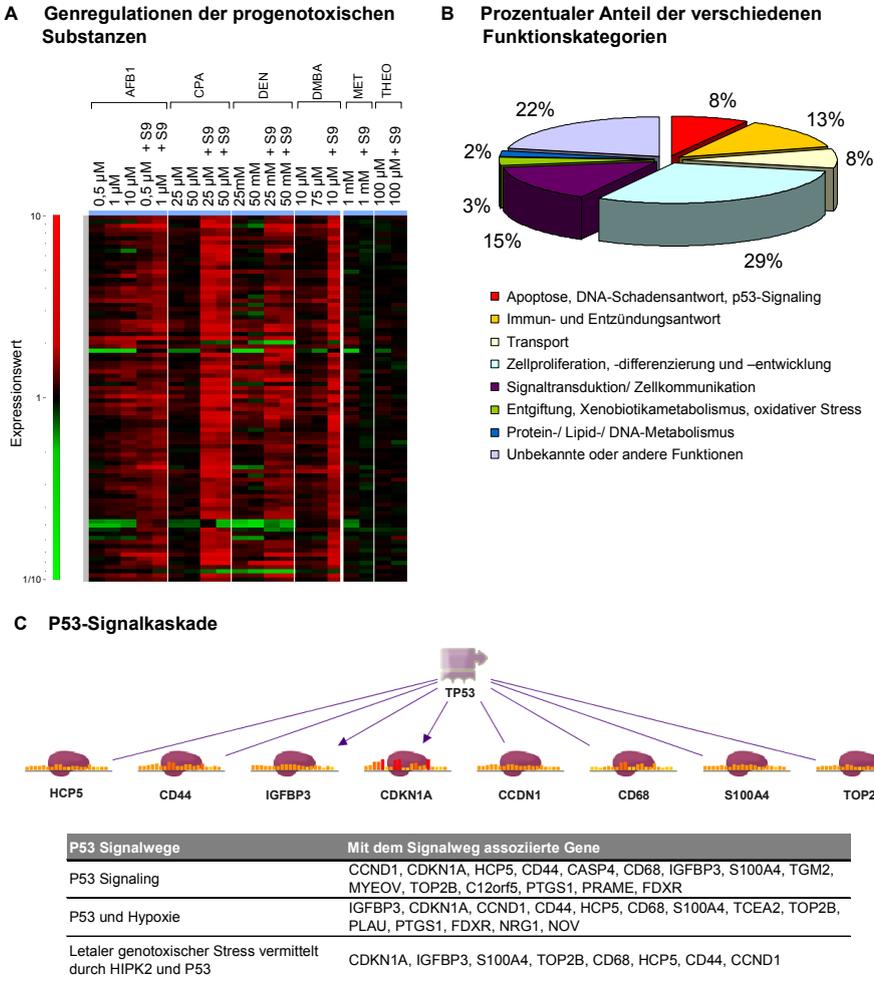


Abbildung 3.15: Charakteristische Genregulationen der progenotoxischen Verbindungen und Einteilung dieser Gene in verschiedene Funktionskategorien. Die HepG2-Zellen wurden mit 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracen (DMBA), Diethylnitrosamin (DEN), Cyclophosphamid (CPA) und Aflatoxin B₁ (AFB1) sowie den Kontrollen Theophyllin (THEO) und Metformin (MET) für 48 h mit und ohne metabolisches Aktivierungssystem (β -Naphthoflavon/ Phenobarbital-induzierter S9) behandelt. Die Experimente wurden mit drei verschiedenen Zellpassagen unabhängig voneinander wiederholt und die Genexpressionsveränderungen mit Illumina *Human Ref-8 BeadChip* Arrays quantifiziert. **(A)** *HeatMap* der relativen Expressionswerte von 88 Genen aus einer ANOVA (p -Wert $< 0,01$ / BH-q-Wert $< 0,3$) mit anschließendem Filtern (Deregulationsgrenzwert 1,5 in mindestens 40 % der Proben mit einer positiven genetoxischen Antwort) ermittelt gegenüber den jeweiligen Lösungsmittelkontrollen +/-S9. Hochregulierte Gene sind in rot ($\geq 1,5$ -fach) und herunterregulierte Gene in grün ($\leq -1,5$ -fach) dargestellt. Die Einteilung des Regulationsbalkens entspricht einer logarithmischen Skalierung. **(B)** Einordnung der Gene nach

Funktionen mit Hilfe der Datenbanken von MetaCore™ (GeneGo, St. Joseph/ USA) und ToxWiz (Cambridge Cell Networks, Cambridge/ UK). (C) Deregulierte Gene, welche direkt mit der Funktion des P53-Transkriptionsfaktors assoziiert werden und tabellarische Zusammenstellung von deregulierten Gene innerhalb der gesamten P53-Signalkaskade. Die Regulationsbalken zeigen die Deregulationswerte in den verschiedenen Behandlungen in der analogen Reihenfolge wie in der *HeatMap*-Beschriftung. [Abb. modifiziert nach Genedata's Expressionist® Analyst (A) und ToxWiz (C)]

In Übereinstimmung mit den genotoxischen Substanzen konnte zudem eine ausgeprägte DNA-Schadensantwort festgestellt werden. Ungefähr 8 % der putativen Markergene für progenerotoxische Substanzen gehören zu dieser Funktionsgruppe. Ähnlich zu den genotoxischen Substanzen scheint P53 eine bedeutende Rolle in der Vermittlung der DNA-Schadensantwort zu spielen, da sowohl einige direkt mit der Funktion des P53 assoziierte Gene identifiziert werden konnten, als auch eine Vielzahl von deregulierten Gene innerhalb der gesamten P53-Signalkaskade gefunden worden (Abb. 3.15C). Eine ausführliche Diskussion der DNA-Schadensantwort der progenerotoxischen Substanzen ist gemeinsam mit den genotoxischen Substanzen im Rahmen des Klassifikationsmodells unter 3.4.2-4 zu finden. Trotz der zum Teil unterschiedlichen Rangfolge der Gene in Abhängigkeit von der Analyse und dem Betrachtungsschwerpunkt, waren die betroffenen toxikologischen Signalwege für beide Substanzgruppen nahezu identisch.

3.4 Vergleichende Analyse genotoxischer und progenotoxischer Verbindungen

3.4.1 Klassifikationsmodell

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die Genexpressionsprofile genotoxischer und progenotoxischer Verbindungen separat interpretiert. Im folgenden Abschnitt wurde nun eine Gesamtanalyse der beiden mechanistischen Klassen durchgeführt. Diese hatte das Ziel, überlappende Gene zwischen den beiden Klassen zu definieren. Dazu fanden Methoden des maschinellen Lernens Verwendung (siehe Abschnitt 2.7.9). Um die beiden verschiedenen Datensätze miteinander vergleichen zu können, wurden die relativen Deregulationswerte für die Erstellung eines Klassifikationsmodells herangezogen. Für die Evaluierung eines geeigneten Modells wurden die Proben, welche zuvor in der statistischen Analyse eine angemessene Antwort zeigten, zusammengestellt. Bei diesen Proben handelt es sich um die Proben der Zeitpunkte 24 h und 48 h des Datensatzes der genotoxischen Verbindungen sowie die Proben des 48 h Behandlungszeitpunktes der progenotoxischen Verbindungen (Tab. 3.1). Diese Proben dienten als Trainingsgruppe für die Klassifikatorermittlung. Der 6 h-Zeitpunkt der genotoxischen Verbindungsklasse sowie der 24 h-Zeitpunkt der Promutagene wurden aufgrund fehlender Responsivität von den Analysen ausgeschlossen. Vor den Klassifikationsanalysen wurden die Proben anhand der Ergebnisse der P53-Studien und der statistischen Genexpressionsanalyse der Einzelproben (Daten sind nicht gezeigt) in genotoxisch und nicht-genotoxisch kategorisiert (Tab. 3.1). Dabei wurden CPA –S9 sowie AFB1 0,5 μM –S9 und DMBA 10 μM –S9 aufgrund der extrem schwachen Genexpressionsantwort (ermittelt durch gepaarte T-Testung gegen die jeweiligen Kontrollen/ Daten nicht gezeigt) als nicht-genotoxisch eingestuft. THEO, MET und die S9-Kontrolle wurden ebenfalls der Kontrollgruppe (nicht-genotoxisch) zugeordnet. DEN wurde aufgrund der fehlenden P53-Antwort und somit fragwürdigen Annotationszuordnung aus dem Datensatz ausgegliedert und anschließend als unbekannte Trainingssubstanz zum Testen des erstellten Klassifikationsmodells verwendet.

Tabelle 3.1: Kategorisierung des Trainingsdatensatzes für das Klassifikationsmodell basierend auf den Daten der P53- und Genexpressionsstudien.

Substanz	Dosis	Zeitpunkt	MAS	Verbindungsklasse	Kategorisierung
THEO	100 µM	24h	-	nicht-genotoxisch	nicht-genotoxisch
THEO	100 µM	48h	-	nicht-genotoxisch	nicht-genotoxisch
MMS	500 µM	24h	-	genotoxisch	genotoxisch
MMS	500 µM	48h	-	genotoxisch	genotoxisch
ACT	250 nM	24h	-	genotoxisch	genotoxisch
ACT	250 nM	48h	-	genotoxisch	genotoxisch
ETO	500 nM	24h	-	genotoxisch	genotoxisch
ETO	500 nM	48h	-	genotoxisch	genotoxisch
CPA	25 µM	48h	-	progenotoxisch	nicht-genotoxisch
CPA	25 µM	48h	+	progenotoxisch	genotoxisch
CPA	50 µM	48h	-	progenotoxisch	nicht-genotoxisch
CPA	50 µM	48h	+	progenotoxisch	genotoxisch
AFB1	0,5 µM	48h	-	progenotoxisch	nicht-genotoxisch
AFB1	10 µM	48h	-	progenotoxisch	genotoxisch
AFB1	0.5 µM	48h	+	progenotoxisch	genotoxisch
AFB1	1 µM	48h	-	progenotoxisch	genotoxisch
AFB1	1 µM	48h	+	progenotoxisch	genotoxisch
DMBA	10 µM	48h	-	progenotoxisch	nicht-genotoxisch
DMBA	75 µM	48h	-	progenotoxisch	genotoxisch
DMBA	10 µM	48h	+	progenotoxisch	genotoxisch
MET	1 mM	48h	+	nicht-genotoxisch	nicht-genotoxisch
MET	1 mM	48h	-	nicht-genotoxisch	nicht-genotoxisch
THEO	100 µM	48h	-	nicht-genotoxisch	nicht-genotoxisch
THEO	100 µM	48h	+	nicht-genotoxisch	nicht-genotoxisch
S9-Kontrolle	0,2 % DMSO	48h	+	nicht-genotoxisch	nicht-genotoxisch

Vor der Erstellung des Klassifikationsmodells wurde die Probenverteilung mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse betrachtet (Abb. 3.16). Abbildung 3.16A zeigt, dass ACT und MMS deutlich separat vom Rest der Proben clustern. Eine Begründung dafür könnte die starke Genexpressionsantwort unter den verwendeten relativ hohen Dosierungen und die bereits moderate Zytotoxizität, vor allem nach 48 h Behandlung, sein. Um die Cluster genotoxisch und nicht-genotoxisch besser auflösen zu können,

wurde eine zweite Hauptkomponentenanalyse ohne diese beiden Substanzen durchgeführt (Abb. 3.16B). Die dabei erhaltene Probenverteilung im dreidimensionalen Raum zeigt zwei separate Bereiche für die genotoxischen und nicht-genotoxischen Proben. Es sollte demzufolge mit einem Klassifikationsmodell gut möglich sein, beide Verbindungsklassen voneinander zu unterscheiden.

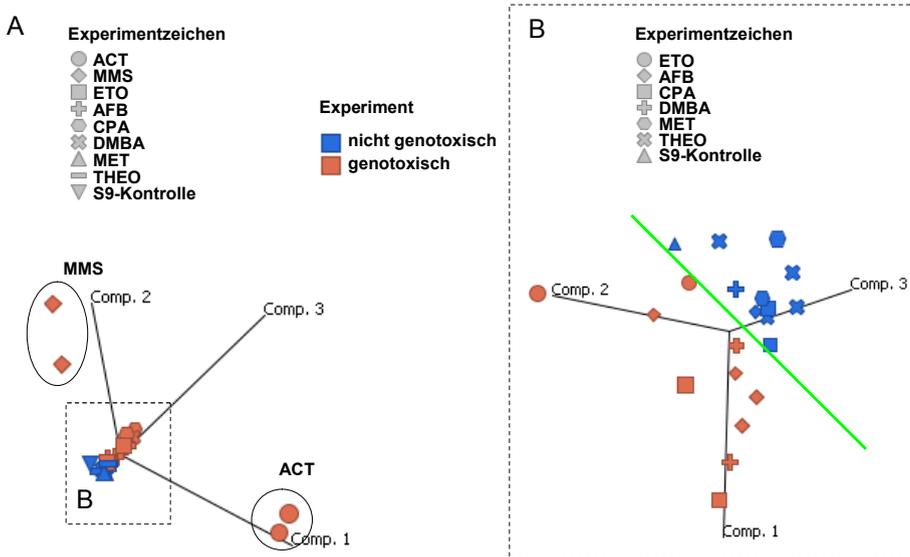


Abbildung 3.16: Hauptkomponentenanalyse des globalen Datensatzes der Trainingsproben.

Für die Hauptkomponentenanalyse wurden speziell selektierte Proben der Genexpressionsdatensätze genotoxischer und progenotoxischer Verbindungen herangezogen: Repräsentativ für die genotoxischen Verbindungen wurden die Proben Actinomycin D (ACT, 250 nM), Methylmethansulfonat (MMS, 2 mM) und Etoposid (ETO 500 nM) zu den Behandlungszeitpunkte 24 h und 48 h verwendet. Hingegen wurde von den progenotoxischen Proben nur der 48 h-Zeitpunkt von 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA, 10 μ M +/-S9 und 75 μ M -S9), Cyclophosphamid (CPA, 25 μ M und 50 μ M +/-S9) und Aflatoxin B1 (AFB1, 0,5 μ M und 1 μ M +/-S9 und 10 μ M -S9) mit einbezogen. Dabei wurden jedoch CPA -S9 sowie AFB1 0,5 μ M -S9 und DMBA 10 μ M -S9 aufgrund der extrem schwachen Genexpressionsantwort als nicht-genotoxisch eingestuft. Theophyllin (THEO), Metformin (MET) und die S9-Kontrolle wurden ebenfalls der Kontrollgruppe (nicht-genotoxisch) zugeordnet. Die Illumina-Daten wurden vor der Hauptkomponentenanalyse Median normalisiert und die Mittelwerte der Deregulationswerte für die drei verschiedenen Zellpassagen der einzelnen Behandlungsgruppen gegen die jeweiligen Kontrollgruppen gebildet. Für die statistische Datenanalyse wurde die Software Expressionist[®] Analyst von Genedata (Basel/ Schweiz) verwendet. **(A)** Hauptkomponentenanalyse mit der gesamten Trainingsgruppe. **(B)** Die Hauptkomponentenanalyse ohne die Proben ACT und MMS zeigt, dass eine Separation (grüne imaginäre Trennlinie) zwischen genotoxischen und nicht-genotoxischen Proben im dreidimensionalen Raum möglich ist.

Zur Evaluierung eines geeigneten Algorithmus für das Klassifikationsmodell wurde zunächst ein Ranking mit der Trainingsgruppe auf Basis des globalen Datensatzes durchgeführt (siehe Abschnitt 2.7.9.3). Abbildung 44 zeigt das Ergebnis des Ranking auf Basis einer ANOVA mit drei verschiedenen Klassifikationsalgorithmen (*Support Vector Machine*, *Sparse Linear Discriminant Analysis* und *K Nearest Neighbours*). Die Güte der Algorithmen wurde mit einer k -fachen Kreuzvalidierung ermittelt. Die niedrigsten Missklassifikationsraten ergaben sich unter Verwendung der Support-Vektormaschinen (SVM)-Methode. Bereits mit 11 Genen konnte eine Klassentrennung mit dem SVM-Klassifikator mit einer Missklassifikationsrate von nur 7,1 % erreicht werden. Unter Verwendung von 91 Genen war die beobachtete Missklassifikationsrate minimal und lag bei nur 4,7 %.

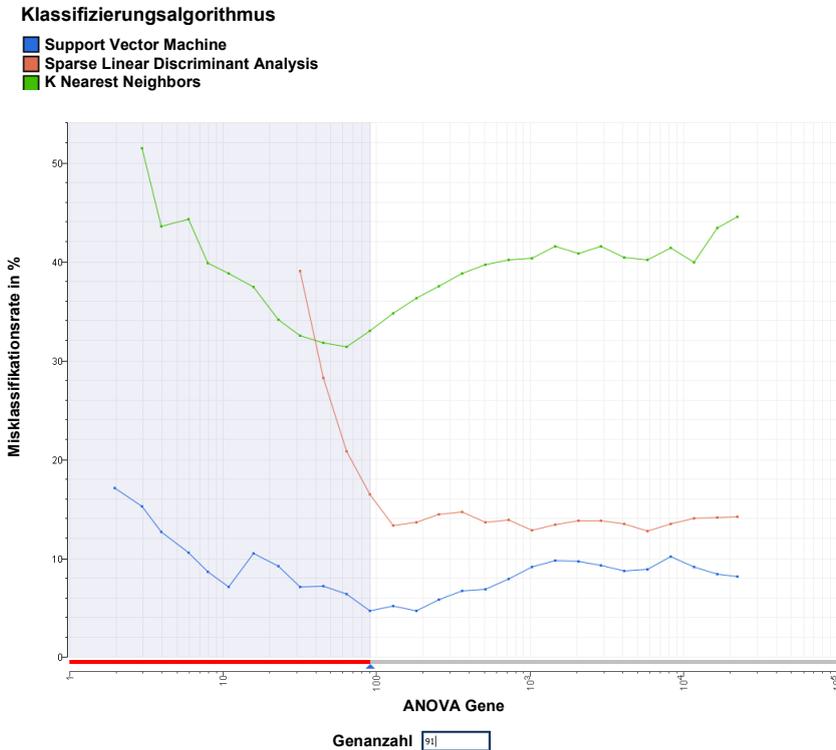


Abbildung 3.17: Ranking mit dem Trainingsdatensatz zur Evaluierung eines zweckmäßigen Klassifikationsalgorithmus und der am besten geeigneten Gene für die Substanzklassifizierung. Für das Ranking wurde eine Trainingsgruppe mit speziell selektierten Proben der Genexpressionsdatensätze genotoxischer und progenotoxische Verbindungen herangezogen: Repräsentativ für die genotoxischen Verbindungen wurden die Proben Actinomycin D, Methylmethansulfonat und Etoposid zu den Behandlungszeitpunkte 24 h und 48 h verwendet. Hingegen wurde von den progenotoxischen Proben nur der 48 h-Zeitpunkt von 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracen (DMBA), Cyclophosphamid (CPA) und Aflatoxin B₁ (AFB₁) mit einbezogen. Dabei wurden jedoch CPA –S9 sowie AFB₁ 0,5 µM –S9 und DMBA 10 µM –S9 aufgrund der extrem schwachen Genexpressionsantwort als nicht-genotoxisch eingestuft. Theophyllin, Metformin und die S9-Kontrolle wurden ebenfalls der Kontrollgruppe (nicht-genotoxisch) zugeordnet. Als Rankingmethode wurde die ANOVA verwendet und diese in Kombination mit drei verschiedenen Klassifikationsalgorithmen (*Support Vector Machine* (SVM, blau), *K Nearest Neighbours* (KNN, grün) und *Sparse Linear Discriminant Analysis* (rot)) getestet. Für die SVM-Methode wurde ein linearer Kernel und ein Penalty-Faktor von 10 gewählt. Bei der KNN-Methode wurde als Distanzmaß eine positive Korrelation und ein $k=4$ festgelegt. Zur Berechnung der Missklassifikationsrate in Abhängigkeit von der Anzahl der einbezogenen Gene wurde eine k -fache Kreuzvalidierung ($k=10$, 50 Wiederholungen) herangezogen. Die besten Missklassifikationsraten konnten mit Hilfe der SVM-Methode generiert werden, wobei die niedrigste Rate von 4,7 % unter Verwendung von 91 Genen erzielt wurde. Das Ranking wurde mit Hilfe der Software Expressionist[®] Analyst von Genedata (Basel/ Schweiz) durchgeführt.

Aufgrund des besten Ergebnisses mit der SVM-Methode im Ranking wurde dieser Algorithmus für das finale Klassifikationsmodell favorisiert. Das Ergebnis der k -fachen Kreuzvalidierung ($k = 10, 50$ Wiederholungen) für die Klassifizierung mit dem SVM-Algorithmus ist in Abbildung 3.18 dargestellt. Wenn für die Erstellung des Klassifikationsmodells alle Gene verwendet werden, liegt die Misklassifikationsrate bei 8,2 % (Abb. 3.18A). Bei den falsch klassifizierten Proben handelt es sich um ETO (24 h) und DMBA –S9 (48 h). Das schwache Farbschema zeigt, dass die Zuordnung dieser Proben generell nicht eindeutig zu der einen oder anderen Klasse war. Beide Proben zeigten in der statistischen Einzelanalyse (Daten nicht gezeigt) geringere Genexpressionsveränderungen gegenüber der Kontrolle im Vergleich zu den anderen genotoxischen Proben. Diese Tatsache kann die Schwierigkeiten bei der Klassifizierung dieser Proben erklären. Der starke Hintergrund bei globalen Datensätzen, der dadurch zustande kommt, dass immer nur ein geringer Teil an Genen differentiell exprimiert wird, erschwert die Zuordnung zu der richtigen Substanzklasse. Das Klassifikationsmodell lässt sich verbessern, wenn man nur die 91 höchstrangierten Gene für die Berechnung des Klassifikators verwendet (Abb. 3.18B). Alle Proben werden dann korrekt klassifiziert und die Missklassifikationsrate sinkt auf 0,25 %.

Experimentannotation

- genotoxisch
- nicht genotoxisch

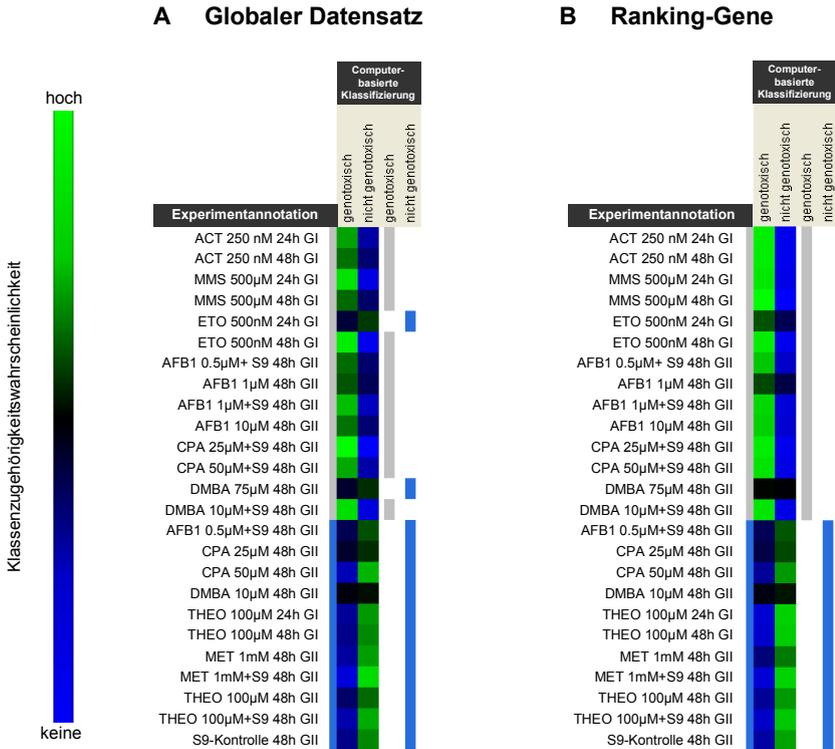


Abbildung 3.18: Kreuzvalidierung zur Ermittlung der Prädiktivität des SVM-Klassifikators. Zur Beurteilung der Prädiktivität des SVM-Klassifikators wurde mit dem Trainingsdatensatz, bestehend aus speziell selektierten Proben der Genexpressionsdatensätze genotoxischer und progenotoxischer Verbindungen, eine Kreuzvalidierung unter Verwendung aller 24,500 Transkripte bzw. 18,600 Gene (A) oder der 91 höchstrangierten Gene aus dem Ranking (B) durchgeführt. Für die Erstellung des Klassifikators wurden die Illumina-Expressionsdaten Median normalisiert und die Mittelwerte der Deregulationswerte für die drei verschiedenen Zellpassagen der einzelnen Behandlungsgruppen gegen die jeweiligen Kontrollgruppen gebildet. Auf Basis der auf diesem Weg erhaltenen relativen Deregulationswerte wurde mit dem Support-Vektor-maschinenalgorithmus (linearer Kernel, Penalty-Faktor von 10) ein Klassifikator berechnet und mit einer k-fachen Kreuzvalidierung ($k = 10, 50$ Wiederholungen) die Missklassifikationsrate in Abhängigkeit von der Anzahl der einbezogenen Gene bestimmt. Unter Verwendung des globalen Datensatzes lag die Missklassifikationsrate bei 8,2 % (A), während sie für die Erstellung des Klassifikators mit den 91 toprangierten Genen aus dem Ranking bei nur 0,25 % lag (B). [Abb. modifiziert nach Expressionist[®] Analyst von Genedata, Basel/ Schweiz]

3.4.2 Klassifizierung von DEN

Mit Hilfe des mit dem Trainingsdatensatz erstellten Klassifikationsmodells wurde im nächsten Teil der Arbeit DEN als „unbekannte“ Substanz getestet. DEN wurde anhand des Modells mit metabolischer Aktivierung als genotoxisch, ohne S9 hingegen als nicht-genotoxisch eingestuft (Abb. 46).

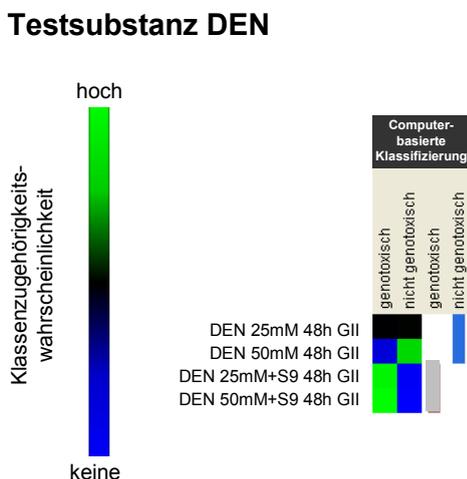


Abbildung 3.19: Klassifizierung von Diethylnitrosamin (DEN). Klassifizierung von Diethylnitrosamin (DEN) als „unbekannte“ Testsubstanz mit dem Klassifikator, der mit den 91 höchstrangierten Genen aus dem Ranking auf Basis eines Supportvektormaschinenalgorithmus erstellt wurde. [Abb. modifiziert nach Expressionist[®] Analyst von Genedata, Basel/ Schweiz]

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den P53-Resultaten für DEN, da auch unter Zugabe eines MAS keine P53-Induktion detektiert werden konnte (siehe Abschnitt 3.2.3). Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse der Genexpressionsanalysen und P53-Studien wurde die DEN-vermittelte Genexpressionsantwort noch einmal genauer untersucht. Infolge der statistischen Analyse wurden 145 Gene (ANOVA gegen die Negativkontrollen MET und THEO, BH-q-Wert < 0,01), die in mindestens 40 % der 48 h-DEN-Proben über 1,5-fach dereguliert waren, selektiert (Abb. 3.20). Von diesen Genen waren infolge der Behandlung mit dem Nitrosamin 88 hoch- und 57 herunterreguliert (Abb. 3.20).

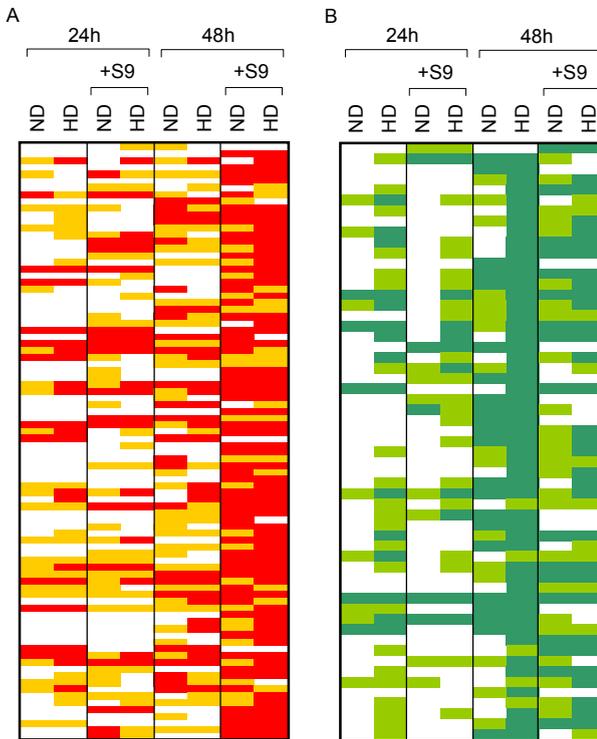


Abbildung 3.20: Deregulierte Gene in HepG2 nach Exposition mit Diethylnitrosamin (DEN). Nach Behandlung der HepG2-Zellen mit DEN in den Dosierungen 25 mM (ND = niedrige Dosis) und 50 mM (HD = hohe Dosis) über 24h und 48h konnten mittels ANOVA (BH-q-Wert < 0,01) und einem anschließendem Filtern (Deregulationsgrenzwert von 1,5-fach in mindestens 40 % der 48 h-DEN-Behandlungen) 145 Gene selektiert werden. (A) 88 Gene waren hoch- und 57 (B) herunterreguliert. Zur metabolischen Aktivierung wurde Phenobarbital/ β -Naphthoflavon-induzierter Ratten-S9 eingesetzt. Die Farbskala beinhaltet die Gene mit einer Deregulation $\geq 1,5$ -fach (rot), $\geq 1,3$ -fach (orange), $\leq -1,5$ -fach (dunkelgrün), $\leq -1,3$ -fach (hellgrün).

Die 145 Gene wurden mit ToxWiz von Cambridge Cell Networks (Cambridge, UK) funktionell genauer betrachtet (Tab. 3.2). Die generellen toxikologischen Signalwege spiegeln die zelluläre Stresssituation nach Behandlung mit dem Kanzerogen DEN wider, da die betroffenen Gene an Prozessen, wie der Beseitigung von Superoxidradikalen, letaler genotoxischer Stress und dem xenobiotischen Metabolismus, beteiligt waren (Daten nicht gezeigt). Das Hauptaugenmerk der funktionellen Analyse lag jedoch auf der Untersuchung der typischen Prozesse innerhalb der DNA-Schadensantwort, um eine mögliche Begründung für die Diskrepanz zwischen den P53-Studien und den Microarrayanalysen zu finden. Deshalb wurden die Prozesse, welche die Erkennung des DNA-Schadens, die Aktivierung der Kontrollpunkte (Checkpoints) innerhalb der Zellzykluskontrolle und die Einleitung des programmierten Zelltods umfassen, detailliert analysiert. Tabelle 3.2 zeigt die diesbezüglich gefundenen Signalwege und die darin enthaltenen Gene, welche nach der Exposition mit DEN dereguliert gefunden worden.

Tabelle 3.2: Veränderte Signalwege infolge der Exposition mit DEN in HepG2-Zellen und die mit diesen Signalwegen assoziierten, deregulierten Gene.

Signalweg	Mit dem Signalweg assoziierte Moleküle	
Generelle und toxikologische Signalwege assoziiert mit...	Hochregulierte Gene	Herunterregulierte Gene
Apoptose		
T-Zell-Apoptose blockierende Neuropeptide	TUBA1, HMGA2, CALCB, NOV, RAPGEF3, SYTL4, RRAS, S100A16, TGM2, HSPA1A, PLAU, S100A3, S100A2, RASD1, HBA1, HSPH1, TNNT2, SH2D2A, IGFBP1, IGFBP4, IL1R2, S100A6, CAV3, ITGA3, S100A4, TUBB3, SUL12B1, PROC1, PLA2G2A, CLDN16, LY96, VIM, IGFBP3, CD44	PLCB1, CEBPA, PRKCE, ESPN, MLPH, FOXJ1, PRSS3, AFP, SFRS5, PRSS2, SREBF1, ITIH2
IGF-1R, antiapoptotisch und BAD Phosphorylierung	RRAS, IGFBP3, PLAU, DUSP5, KRT17, IGFBP1, CD44, ARHGAP29, RASD1, RAPGEF3, IGFBP4, NOV, IGFBP5	SREBF1, PRKCE, NRIP1, RHOU, AFP, PLCB1
Todesrezeptor vermittelte Apoptoseinduktion	TNFRSF21, VIM, TNFRSF12A, HSPA1A, HMGA2, TGM2, PLAU	PRKCE, SREBF1, MLPH, ACTG2, NRIP1
Mikrovaskuläre Endothelzellapoptose induziert durch Thrombospondin	CD44, IGFBP5, TUBA1, TGM2	CEBPA, SREBF1, NRIP1
PTEN Funktion während dem Zellzyklusarrest und Apoptose	CD44, LAMA3, RRAS, DUSP5, ITGA3, KRT17, NOV, ARHGAP29, PLAU, IGFBP3	SREBF1, PRKCE, RHOU, FOXJ1
Mitochondrien in der Apoptose	HSPA1A, RRAS, CD44, TGM2, VIM, IGFBP3	SREBF1
Apoptose via Granzym A	HSPA1A, S100A4	SREBF1, NRIP1
Regulation der Apoptose via nikotinischen Acetylcholinrezeptoren	CD44, ARHGAP29, NOV, IGFBP3	PRKCE, NRIP1, FOXJ1, SREBF1
Myocyte enhancer factor 2 in der T-Zell-Apoptose	SDPR, CD44	NRIP1, CITED4, CAPN9, PLCB1, P8, ASCL1, PRKCE
DNA Fragmentierung und Homöostase während der Apoptose	TGM2	SREBF1
P53		
P53 und Hypoxie	IGFBP3, HSPA1A, CD44, IGFBP5, ITGA3, S100A4, HSPA2, IGFBP4, ARHGAP29, IGFBP1, PLAU, HMGA2, NOV	NRIP1, CITED4, P8, ASCL1, CABLES1, PRKCE, CEBPA, NAT1, SREBF1
P53 Signaling	HSPA1A, CD44, HMGA2, IGFBP3, S100A4, TGM2, RRAS, MYEOV, IGFBP4	CEBPA, CABLES1, NAT1, HIST1H4H, PRKCE
Lethaler genotoxischer Stress vermittelt durch HIPK2 und P53	IGFBP3, S100A4, HSPA1A, CD44	CABLES1, NAT1
dem induzierten DNA-Schaden		
RB Tumorsuppressoraktivität infolge eines DNA-Schadens	CD44, HMGA2, IGFBP3, TGM2, S100A4, HSPA1A	CEBPA, CABLES1, NRIP1, NAT1
DNA-Schadensantwort	HSPA1A, CD44, IGFBP3, SDPR, RRAS, ARHGAP29, S100A4, TGM2, NOV	PLCB1, PRKCE, SREBF1, CABLES1, GBP1, NAT1
BRCA1 und DNA-Reparatur	HSPA1A, CD44	
Cdc25 Antwort infolge eines DNA-Schadens	HMGA2, CD44	NRIP1
DNA Fragmentierung und Homöostase während der Apoptose	TGM2	
der Zellzykluskontrolle		
Zellzyklusregulation durch BTG Proteine	IGFBP3, TGM2, FGFBP1, MYEOV, S100A4, HSPA1A, CD44	CABLES1, NAT1
Ras & Rho Signaling im Zellzyklus (G1->S)	HMGA2, CD44, RRAS, TGM2, PLAU, DUSP5, TUBA1, NOV, ARHGAP29, S100A4, MYEOV, HSPA1A, IGFBP3	PRKCE, CEBPA, SREBF1, PLCB1, RHOU, CABLES1
PTEN Funktion während dem Zellzyklusarrest und Apoptose	CD44, LAMA3, RRAS, DUSP5, ITGA3, KRT17, NOV, ARHGAP29, PLAU, IGFBP3	SREBF1, PRKCE, RHOU, FOXJ1
G1/S Checkpoint im Zellzyklus	CD44, HMGA2, NOV, S100A4, IGFBP3, TGM2, MYEOV, HSPA1A	CEBPA, CABLES1, NRIP1, NAT1, PRKCE
Estrogen-responsive protein im Zellzyklus und Brusttumorstadium	IGFBP3, S100A4, HSPA1A, HBA1, CD44	GREB1, CABLES1, NRIP1, CEBPA, APOC3, NAT1
G2/M Checkpoint im Zellzyklus	CD44, HMGA2, TUBA1, TUBB, S100A4, IGFBP3, HSPA1A	NRIP1, CITED4, P8, ASCL1, CABLES1, NAT1, CEBPA, PRKCE
P27 Phosphorylierung im Zellzyklus	HSPA1A, TGM2, CD44, HMGA2, NOV	CEBPA, CABLES1
Zellzyklusregulation durch plk3	IGFBP3, S100A4, HSPA1A, CD44	NRIP1, CABLES1, NAT1

Eine Überlegung war, dass die Diskrepanz zwischen den P53-Studien und den Genexpressionsdaten möglicherweise darauf beruht, dass die Zellen über einen anderen, P53-unabhängigen, Mechanismus auf den durch das Nitrosamin induzierten DNA-Schaden reagieren. Allerdings sprechen die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen eher gegen diese Vermutung, da einige typische Gengruppen um den Tumorsuppressor P53 identifiziert werden konnten (Tab. 3.2). Die in diesen Gruppen enthaltenen Gene konnten zudem in vielen anderen Signalwegen, wie der Zellzykluskontrolle, der Apoptose sowie der DNA-Schadensantwort, wieder gefunden werden (Tab. 3.2). Es wurden zwar auch P53-unabhängige Signalwege für die Einleitung der Apoptose, unter anderem über den TNFR (Tumor necrosis factor receptor)-Caspase 8/ 10-Caspase 3-Signalweg sowie über den mitochondrialen Signalweg gefunden, diesen konnte jedoch keine bevorzugte Gewichtung gegenüber den P53-abhängigen Signalwegen zugeordnet werden.

Aufgrund dieser Daten, ist die beobachtete Diskrepanz zwischen den beiden Testsystemen wahrscheinlich viel mehr mit einer unzureichenden metabolischen Aktivierung des DENs, welche bei den P53-Studien bereits angesprochen wurde, zu begründen. Diese These kann von den Genexpressionsdaten ebenfalls gestützt werden. Bei der Betrachtung der Regulation der 145 durch DEN induzierten Gene, konnte festgestellt werden, dass insbesondere bei den hochregulierten Genen, die meisten Gene zwar in Gegenwart des MAS (S9) am stärksten dereguliert waren, die Regulations-tendenz war jedoch ohne S9 meist die gleiche (Abb. 3.20). Da die HepG2-Zellen die beiden für die metabolische Umsetzung des Nitrosamins entscheidenden Enzyme, CYP2A6 und CYP2E1, nicht ausreichend exprimieren, ist eine Aktivierung durch die Zelllinie selbst unwahrscheinlich. Das bedeutet, die Zugabe des MAS kann das Nitrosamin zum Teil aktivieren, jedoch reicht die Aktivierung in diesem Fall vermutlich nicht aus, um eine ausreichend starke P53-Akkumulation zu induzieren, die mit dem *TransAM™ P53*-Test detektiert werden kann. Hingegen konnten mithilfe der Genexpressionsanalysen die schwachen Veränderungen zwischen den Proben mit und ohne MAS detektiert werden. Außerdem zeigte sich, dass diese Veränderungen ausreichend sind, um DEN mit S9 korrekt als genotoxisches Kanzerogen einzuordnen. In Zukunft müsste versucht werden, das System weiter zu optimieren, so dass auch mit dem *TransAM™ P53* positive Resultate gewonnen werden können. Die Genexpressionsdaten suggerieren, dass es prinzipiell möglich sein müsste P53 auch für diese Substanzklasse als Marker zu verwenden, wenn man die Bildung des aktiven, DNA-reaktiven Metaboliten und die Exposition der Zellen mit diesem steigern kann. Eine

Möglichkeit wäre, die Substanz mit dem S9 zu präinkubieren, um eine höhere Konzentration des aktiven Metaboliten zu erhalten, ohne die Zellen stärker zu belasten. Des Weiteren sollte versucht werden, eine bessere Durchmischung des dispersen Systems aus dem Nitrosamin und dem Zellkulturmedium mit MAS zu gewährleisten, um das System weiter zu verbessern. Das könnte z.B. durch die Verwendung eines geeigneten Lösungsvermittlers erreicht werden.

Die Problematik des Screenings von Nitrosaminen in HepG2-Zellen ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben worden. Obwohl die DNA-Reaktivität und Kanzerogenität *in vivo* für diese Verbindungsklasse erwiesen ist (die meisten Nitrosamine sind in die IARC Gruppen 2A und 2B als potentielle Humankarzinogene eingestuft), konnten mit verschiedenen Endpunkten, wie Mikrokerntest oder alkalischer DNA-Elutionstest, in HepG2 meist nur negative Resultate oder nur bei hohen Konzentrationen positive Resultate gewonnen werden [285]. Diese Studien bestätigen gemeinsam mit den Ergebnissen dieser Arbeit die relative Unempfindlichkeit der HepG2-Zellen gegenüber den Nitrosaminen. Diese könnte auch dadurch zu Stande kommen, dass HepG2-Zellen einen noch relativ ausgeprägten Phase II-Metabolismus besitzen und die Substanzen deshalb möglicherweise effektiv entgiften können. Die Phase II-Biotransformation von Nitrosaminen erfolgt durch Konjugation mit Glutathion, Aminosäuren, Glukuron- oder Schwefelsäure [286]. Eine typische Konjugationsreaktion der Nitrosamine zu Glukuroniden wird durch UGT-Enzyme katalysiert [286, 287]. Obwohl die Basalexpression dieser Enzyme in HepG2-Zellen sehr schwach im Vergleich zu den primären humanen Hepatozyten war, konnte eine beträchtliche Induktion der untersuchten UGT1A-Enzyme mit RIF und 3-MC nachgewiesen werden. Des Weiteren waren die Transporter MRP1 und MRP2 partiell durch die beiden Induktoren verstärkt exprimiert worden. Beide Transporter sind vermutlich an der Exkretion von Nitrosaminen beteiligt [288].

3.4.2 Gene des Klassifikationsmodells

Die mit Hilfe des Klassifikationsmodells evaluierten 91 putativen Markergene für (pro-)genotoxische Verbindungen sind in Abbildung 3.21 dargestellt (Deregulationswerte siehe Anhang 11). Die funktionelle Einordnung der Gene zeigte in Übereinstimmung mit den Einzelbetrachtungen der beiden Substanzklassen, dass eine Vielzahl der von den Substanzen gemeinsam deregulierten Gene in proliferative und

generelle metabolische Prozesse involviert sind. Außerdem konnten gemeinsam regulierte Gene der ausgeprägten DNA-Schadensantwort ermittelt werden. Bei der tiefergehenden Analyse wurde auf die Signalnetzwerke DNA-Schadensregulation und Zellzykluskontrolle besonders eingegangen, da diese die spezifische Antwort auf die Schädigung der DNA und somit den Wirkmechanismus der Substanzen ist (siehe Abschnitt 3.4.2). Hingegen werden Veränderungen, wie beispielsweise im Metabolismus, vermutlich eher sekundär durch die induzierte Stresssituation in den Zellen verursacht. Hier müssten künftig sicherlich noch weiterführende Studien durchgeführt werden, um spezifische Marker der Genotoxine von allgemeinen stressinduzierten Genregulationen abgrenzen zu können. Obwohl es wahrscheinlich schwierig ist aus den zuletzt genannten Signalwegen einzelne Gene („putative Marker“) herauszugreifen, spiegeln sie in der Gesamtheit der 91 Gene eine charakteristische Antwort auf die genotoxischen Verbindungen wider und eignen sich daher als Gensatz durchaus für ein Screeningsystem.

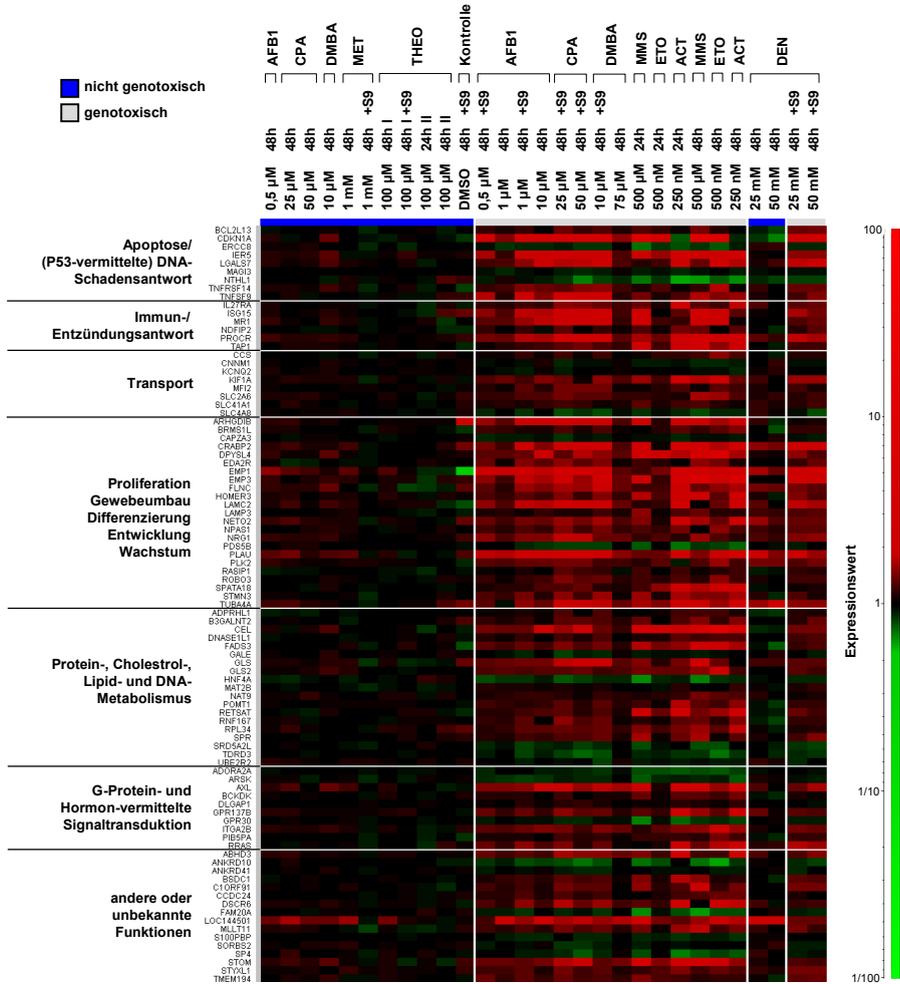


Abbildung 3.21: Gen-Funktions-Darstellung der putativen Markergene für genotoxische und progenotoxische Verbindungen in HepG2-Zellen. Die Darstellung zeigt die Genregulation gegenüber den entsprechenden Lösungsmittel-/ S9-Kontrollen und Funktion der 91 putativen Markergene, welche mit Hilfe des Rankings ermittelt worden. Der Farbbalken indiziert in blau die nicht-genotoxischen Proben und in grau die genotoxischen Proben des Klassifikationsmodells. Hochregulierte Gene ($\geq 1,5$ -fach) sind in rot und herunterregulierte Gene ($\leq -1,5$ -fach) in grün dargestellt. Die Analyse der Illumina-Microarraydaten erfolgte mit der Software Expressionist[®] Analyst von Genedata (Basel/ Schweiz). Legende: Theophyllin (THEO), Metformin (MET), Actinomycin D (ACT), Methylmethansulfonat (MMS), Etoposid (ETO), Aflatoxin B1 (AFB1), 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA), Cyclophosphamid (CPA), Diethylnitrosamin (DEN).

3.4.3 Modulation der unmittelbaren Prozesse infolge des substanzinduzierten DNA-Schadens

Zur Erforschung des Zusammenspiels der Gene der DNA-Schadensantwort wurde eine Netzwerkanalyse mit der Software ToxWiz von Cambridge Cell Networks (Cambridge, UK) durchgeführt. Abbildung 3.22 zeigt einen Ausschnitt aus dem Netzwerk der DNA-Schadensantwort mit Bezug auf ausgewählte Regulationen durch die Testsubstanzen. Als Hauptmodulatoren konnten die drei verschiedenen Transkriptionsfaktoren P53, STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) und SP1/3/4 identifiziert werden. Obwohl diese selbst nicht hochreguliert waren, konnten entscheidende Zielgene dieser transkriptionellen Regulatoren gefunden werden. Am Beispiel P53 wurde vorangehend bereits beschrieben, dass der Transkriptionsfaktor selbst nur auf Proteinebene ohne Veränderungen der Genexpressionslevel reguliert wird. STAT1 liegt ebenfalls im Zytoplasma von ruhenden Zellen vor und wird durch bestimmte Signale, wie Interferone, durch Phosphorylierung aktiviert [289]. Die regulatorische Aktivität des SP1-Transkriptionsfaktors wird ebenfalls entscheidend vom Phosphorylierungsstatus des Proteins bestimmt [290].

Der Mechanismus der P53-vermittelten Regulation von verschiedenen Prozessen, wie Zellzyklus, Apoptose und DNA-Schadensreparatur, wurde bereits ausführlich diskutiert (siehe Abschnitt 3.1.1/2). STAT1 spielt eine essentielle Rolle in der Vermittlung von Interferonsignalen und somit in der angeborenen Immunantwort sowie der Regulation des Zellwachstums und programmierten Zelltods [291]. Aufgrund der hohen Anfälligkeit Stat1-defizienter Mäuse gegenüber chemikalieninduzierten Tumoren ist STAT1 vermutlich ähnlich dem P53 ein wichtiger Tumorsuppressor. STAT1 vermittelt wahrscheinlich die Induktion des Zellzyklusarrestes und der Apoptose nach genotoxischem Stress. Der postulierte Mechanismus der Wachstumsinhibition der Zellen durch STAT1 verläuft über die ATM-NBS1-SMC1- und die ATM-Chk2-Cdc25-Signalkaskaden (siehe Abschnitt 1.2.1/3.1.1.2), welche eine schnelle Inhibition der DNA-Synthese nach einer Schädigung der DNA bewirken. Des Weiteren beschrieben Townsend *et al.*, dass STAT1 direkt mit p53 interagieren kann und dadurch koaktivatorisch die p53-vermittelten transkriptionellen Effekte und p53-induzierte Apoptose moduliert. Außerdem ist STAT1 als negativer Regulator des p53-Inhibitors Mdm2 beschrieben worden [291]. Neben der koregulatorischen Wirkung von STAT1 zu

p53 gehören viele weitere Apoptose- und Zellzyklusregulatoren, wie Fas, Fas ligand und die CDK-Inhibitoren p21 und p27, zu den Zielgenen [291]. Unter den 91 Genen reguliert durch die (pro-)genotoxischen Substanzen war zudem auch der IL27RA (Interleukin 27-Rezeptor, alpha; auch TCCR/ WSX1) hochreguliert (Abb. 49/ A). IL27, Ligand dieses Rezeptors, wird eine Beteiligung bei der Inhibition der Immunantwort und Typ 1-T-Helfer-(T_{H1}-)Zelldifferenzierung sowie antiangiogenetische und antiproliferative (antitumor) Eigenschaften zugeschrieben [292]. Durch die Bindung von IL27 an den Rezeptorkomplex IL27R/ Glycoprotein 130 kommt es zur Phosphorylierung des Rezeptors durch assoziierte Kinasen (Januskinasen) [293]. Anschließend kann STAT1 über seine SH2 (Src Homology 2)-Domänen an die phosphorylierten Stellen binden und selbst durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert werden. STAT1 kann dann in den Zellkern gelangen und dort die Transkription der Zielgene anschalten [293]. Zwei weitere mit der Funktion des STAT1 assoziierte Gene, die in den Analysen dieser Arbeit hochreguliert waren, sind ISG15 (interferon-stimulated gene 15 kDa) und TAP1 (transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B) (Abb. 49/ A). TAP1 ist ein Transporter der TAP/ MDR-Familie, welcher für die Beladung von MHC I innerhalb der Antigenpräsentation verantwortlich ist. Die Herunterregulation von TAP1 in Tumorzellen wird als ein möglicher Mechanismus der malignen Transformation durch Verhinderung einer Immunreaktion gegen die entarteten Zellen postuliert [294]. Eine Fehlregulation des zweiten Genproduktes ISG15 kann ebenfalls zur Tumorpromotion beitragen [295]. Allerdings ist derzeit noch nicht klar ob ISG15 eher tumor-supprimierend oder promovierend wirkt. Neben den Funktionen in der angeborenen Immunantwort nach Induktion durch STAT1 wurde ISG15 auch als Targetgen des p53-Transkriptionsfaktors entdeckt [296].

Neben P53 und STAT1 konnte eine weitere Familie von transkriptionellen Regulatoren, die Cystein/ Histidin-Zinkfinger Transkriptionsfaktoren SP, aufgrund der Assoziation mit der Expression der 91 Gene aus dem Klassifikationsmodell gefunden werden (Abb. 49/ B). Derzeit sind vier Mitglieder der SP-Familie bekannt: SP1, SP2, SP3 und SP4 [297]. Während SP3 und SP4 ubiquitär exprimiert werden, ist SP4 vorwiegend im Gehirn zu finden. SP3 und SP4 binden mit ähnlichen Affinitäten an die gleichen Konsensussequenzen in der DNA wie SP1. Allerdings fungiert SP3 wahrscheinlich als kompetitiver Repressor der SP1-vermittelten Transkription [297]. SP1 selbst ist an der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie Zellzyklus, hormonelle Aktivierung, Apoptose und Angiogenese, beteiligt [298]. Aktiviert wird SP1 durch eine

Reihe von Zellzyklusregulatoren, wie CDK4, RAD51, E2F-DP1, CDKN1A oder STAT3 [298]. Des Weiteren wurde entdeckt, dass SP1 von DNA-PK und ATM nach einem DNA-Schaden mit einer H2AX vergleichbaren Kinetik aktivatorisch phosphoryliert werden kann [299]. Die Funktion von SP1 ist zudem stark vom P53-Status der Zellen abhängig. Es konnte gezeigt werden, dass der SP1-induzierte apoptotische Zelltod nur in Gegenwart von P53 ausgelöst werden kann [300]. Abgesehen von der proapoptischen Funktion von SP1 sind auch wachstumsstimulatorische Eigenschaften beschrieben worden. Eines der Zielgene von SP1 ist c-Myc, welches die Zellzyklusprogression und gemeinsam mit SP1 die hTERT (humane Telomerase reverse Transkriptase) reguliert. Diese spielt wiederum eine wesentliche Rolle in der Kanzerogenese. MYC war im Rahmen dieser Arbeit durch die genotoxischen Kanzerogene ACT, ETO und teilweise MMS herunterreguliert (Daten nicht gezeigt).

EGR1, ein weiterer Transkriptionsfaktor mit Funktionen in der Zellproliferation und Differenzierung [297], der in das SP1/3-Netzwerk innerhalb der DNA-Schadensantwort involviert ist, wurde ebenfalls als dereguliert durch einige Testsubstanzen gefunden. Da jedoch lediglich MMS, DEN, AFB und teilweise CPA eine Hochregulation zeigten, gehört EGR1 nicht zu den 91 putativen Markern des Klassifikationsmodells (Daten nicht gezeigt). Eine Induktion des EGR1 durch verschiedene DNA-schädigende Substanzen wurde bereits beschrieben [301]. EGR1 ist zudem an der Aktivierung von P53 beteiligt und inhibiert gleichzeitig den PI3K/ Akt-Signalweg durch Hochregulation des Tumorsuppressors PTEN [302, 303]. Obwohl eine Wechselwirkung zwischen HOMER3 und EGR1 vermutet wird, ist die genaue Funktion dieser Interaktion noch unklar. HOMER3 wurde in dieser Arbeit als putativer Marker innerhalb des Klassifikationsmodells identifiziert (Abb. 3.22B).

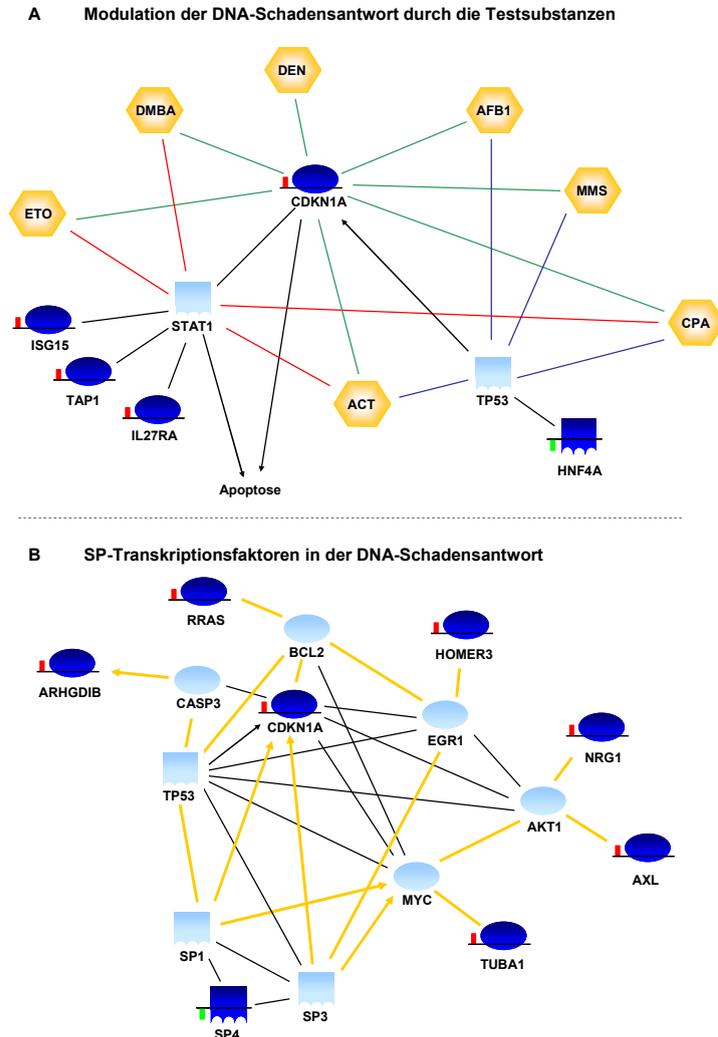


Abbildung 3.22: Ausgewählte Netzwerke der Modulation der DNA-Schadensantwort durch die (pro-)genotoxischen Testsubstanzen. (A) Wechselwirkung der genotoxischen (ACT, ETO und MMS) und progenotoxischen Testsubstanzen (AFB1, DMBA, DEN, CPA) mit den verschiedenen Komponenten der DNA-Schadensantwort. **(B)** Regulatorisches Netzwerk der durch SP-Transkriptionsfaktoren vermittelten DNA-Schadensantwort. Die hervorgehobenen Komponenten zeigen die Gene aus den Illumina-Microarrayanalysen in HepG2-Zellen mit den dazugehörigen generellen Regulationstendenzen aus dem Klassifikationsmodell. Rot = hochreguliert, grün = herunterreguliert. Legende: Actinomycin D (ACT), Methylmethansulfonat (MMS), Etoposid (ETO), Aflatoxin B1 (AFB1), 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA), Cyclophosphamid (CPA), Diethylnitrosamin (DEN). [Abb. modifiziert nach Cambridge Cell Network's ToxWiz, Cambridge/ UK]

Drei weitere durch die genotoxischen Testsubstanzen hochregulierte Gene im SP-Netzwerk waren RhoGDI2 (ARHGDI2), AXL und Neuregulin 1 (NRG1). Die Funktionen des Rho-GTPase Inhibitors RhoGDI2 in Zusammenhang mit einem DNA-Schaden und Apoptose wurden bereits in 3.1.1.2 beschrieben. AXL, eine Rezeptor-tyrosinkinase, und NRG1 haben normalerweise eine stimulatorische Wirkung auf das Zellwachstum, die über die AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene) vermittelt werden [304-306]. Allerdings wurde für NRG1 auch eine inhibitorische Wirkung in Abhängigkeit von der zellulären Situation beschrieben [304]. Die AKT1 konnte in den Microarrayanalysen in dieser Arbeit allerdings nicht verändert vorgefunden werden (Daten nicht gezeigt). Dies indiziert einen anderen Mechanismus, über den die beiden Gene in die Regulation des Zellwachstums infolge der Exposition mit den genotoxischen Substanzen eingreifen.

3.4.4 Selektion weiterer potentieller Markergene mit Hilfe des Klassifikationsmodells

Neben den vorangehend beschriebenen Genen der DNA-Schadensreparatur, die potentielle Marker für die (pro-)genotoxischen Verbindungen darstellen, wurde nach weiteren charakteristischen Genregulationen gesucht. Unter den 91 Genen, welche mit Hilfe des Klassifikationsmodells gefunden worden, konnten 8 Gene mit konsistenten Regulationen im Bereich von 1,5- bis 10-fach höher im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle in den als genotoxisch annotierten Proben gefunden werden (Tab. 3.3). IER5 (immediate early response 5), Galectin 7 (lectin, galactoside-binding, soluble, 7/ LGALS7) und CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A/ p21/ Cip1) sind Gene mit Funktionen innerhalb von spezifischen Prozessen infolge des entstandenen DNA-Schadens. Hingegen sind EMP3 (epithelial membrane protein 3), CRABP2 (cellular retinoic acid binding protein 2), EMP1 (epithelial membrane protein 1) und PLAU (plasminogen activator, urokinase) funktionell an der proliferativen Regulation sowie an Vorgängen, wie Wachstum und Differenzierung, beteiligt. PROCR (protein C receptor, endothelial/ EPCR)) moduliert als ein typischer Mediator entzündliche und immunchemische Prozesse.

Tabelle 3.3: Deregulation ausgewählter Gene mit konsistenten Regulationen infolge der Behandlung mit (pro-)genotoxischen Modellschubstanzen.

Die Tabelle zeigt die Deregulation von ausgewählten Genen aus dem Klassifikationsmodell auf Basis der Illumina-Microarraydaten. Diese acht Gene zeigten in HepG2-Zellen nach 48 h eine signifikante Induktion ($FC \geq 1,5$ (orange unterlegt) in mind. 80 % der responsiven Proben/„Gruppe positiv genotoxische Behandlungen“) infolge der Behandlung mit den verschiedenen (pro-)genotoxischen Modellschubstanzen. Die dargestellten Daten sind die Mittelwerte der Deregulationswerte gegenüber den entsprechenden S9-/ Lösungsmittelkontrollen aus drei verschiedenen Experimenten mit Zellpassagen zwischen 3 und 25. Legende: Actinomycin D (ACT), Methylmethansulfonat (MMS), Etoposid (ETO), Aflatoxin B₁ (AFB1), 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA), Cyclophosphamid (CPA), Diethylnitrosamin (DEN). *Signifikanz im Student's T-Test $p < 0,05$

Symbol	CPA				DMBA		
	25 μM	50 μM	+ S9 25 μM	+ S9 50 μM	10 μM	75 μM	+ S9 10 μM
CDKN1A	-1,07	1,03	3,04*	3,35*	1,36	1,50*	3,18*
CRABP2	1,23	1,11	2,05*	2,01*	1,10	1,27	2,31*
EMP1	1,31	1,24	2,84*	2,85*	1,11	1,31	1,93*
EMP3	1,03	1,08	2,06	1,60	1,18	1,38*	2,61*
IER5	1,11	1,15	2,15	1,81*	1,30*	1,26*	1,83*
LGALS7	1,07	1,11	1,68*	1,73*	1,25*	1,26	1,93*
PLAU	1,39	1,15	2,74*	3,20*	1,29*	1,53*	2,13*
PROCR	1,13	1,14	2,19*	2,09*	1,18	1,32*	2,26*
Symbol	AFB1						
	0,5 μM	1 μM	10 μM	+ S9 0,5 μM	+ S9 1 μM		
CDKN1A	1,13	1,48	2,56*	2,43	3,14*		
CRABP2	1,14	1,22	1,47*	1,41	1,79		
EMP1	1,54	1,79*	1,78*	1,98*	2,06*		
EMP3	1,16*	1,23	1,61*	1,50	1,77		
IER5	1,12*	1,19	1,92*	1,66	1,88*		
LGALS7	1,14	1,29*	2,02*	1,23	1,50*		
PLAU	1,33	1,71*	2,09*	1,74*	2,08*		
PROCR	1,22*	1,34	1,64*	1,44	1,69		
Symbol	DEN				ETO	ACT	MMS
	25 mM	50 mM	+ S9 25 mM	+ S9 50 mM	500 nM	250 nM	500 μM
CDKN1A	-1,19	-1,48*	1,95*	2,20*	6,89*	-1,15	9,30*
CRABP2	1,54*	1,40	2,09*	1,80*	1,67*	2,82*	2,80*
EMP1	1,61*	1,37	1,84*	2,09*	1,81*	1,91*	2,15*
EMP3	1,04	1,02	2,26*	2,03*	2,22*	5,68*	5,59*
IER5	1,06	1,03	1,50*	1,51	1,95*	3,07*	2,19*
LGALS7	1,11	1,23*	1,77	1,97*	2,76*	1,69*	1,35
PLAU	1,86*	1,44	1,84	1,59*	1,84*	3,69*	1,46
PROCR	1,30	1,20	1,76*	1,63*	2,20*	2,58*	2,87*

Kürzlich konnte bereits die Induktion von IER5 sowie PROCR infolge ionisierender Bestrahlung festgestellt werden [307, 308]. Eine siRNA-basierte Supprimierung von IER5 bewirkte zudem in Hela-Zellen eine Verstärkung des strahlungsinduzierten G₂/M-Arrestes der Zellen. Diese Daten belegen, dass IER5 eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus spielt [307]. Galectin 7 ist ein proapoptotisches Protein, das vermutlich über die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase JNK und der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien zur Auslösung des Zelltodes führt [309]. Die Expression von Galectin 7 steht zudem, wie auch die des CDKN1A (p21), unter Kontrolle von P53 [310, 311]. CDKN1A bindet und inhibiert nach dessen Aktivierung Cdk2/Cyclin E (Cyclin-dependent kinase 2/Cyclin E)-Komplexe und verhindert so die aktivatorische Phosphorylierung von Rb (Retinoblastoma) [29]. Dadurch wird die Rb-E2F-vermittelte Transkription S-Phase-promovierender Gene unterbunden, was zum Stopp des Zellzyklus während der G₁-Phase führt [29].

EMP1 induziert ebenfalls eine Verlängerung der G₁-Phase und eine verkürzte S-Phase und wurde in verschiedenen Tumoren überexprimiert gefunden [312]. Außerdem konnte bei transienter Expression des EMP1 eine spezifische Inhibition der Zellproliferation nachgewiesen werden. In NIH3T3-Zellen konnte zudem nach Überexpression ein apoptoseähnlicher Phänotyp beobachtet werden [312]. EMP3 gehört, wie EMP1, zur Genfamilie der peripheren 22-kDa Myelinproteine (PMP22 oder auch als TMP-Genfamilie bekannt) [313]. Es wird postuliert, dass EMP3 eine Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation und Zellproliferation spielt. Alaminos *et al.* konnten zudem zeigen, dass das Einbringen von EMP3 in defiziente Krebszellen das Tumorwachstum und die Kolonieformation hemmt. Diese Studien indizieren die Funktion von EMP3 als Tumorsuppressor [313]. Eine zytoprotektive Wirkung von EMP3 konnte zudem durch Li und seine Mitarbeiter in HepG2-Zellen nachgewiesen werden [314].

CRABP2 codiert für ein kleines (15-kDa) Protein mit einer Lipocalindomäne für die Bindung an Retinolsäure (RA) [315]. Dadurch transloziert RA in den Nukleus, wo sie über den RAR die Transkription einer Vielzahl von Genen kontrolliert. Die Targetgene regulieren wiederum Prozesse, wie Entwicklung, Embryogenese, Differenzierung und Apoptose. CRABP2 vermittelt dabei vermutlich hauptsächlich die antiproliferativen Effekte des RAR-Signalwegs. Die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion durch CRABP2 konnte in MCF-7-Zellen und in einer Keratinozytenzelllinie nachgewiesen werden [315].

Im Gegensatz zu den vorangehend genannten proapoptischen Genen stimulieren PROCR und PLAU vorwiegend das Zellüberleben [316]. Der antikoagulativ und antiinflammatorisch wirkende PROCR stammt aus der MHC-I Familie und wird normalerweise auf Endothelzellen der Aorta und von anderen großen Arterien exprimiert [316]. Die zellwachstumsfördernde Wirkung von PLAU wird vermutlich über die Aktivierung der MAPK (p38)-Signalkaskade nach Bindung von PLAU an den uPAR realisiert [317]. Neben den proliferationsfördernden Eigenschaften wirkt PLAU über die Aktivierung des RAS-ERK- bzw. PI3K-Akt-Signalweges antiapoptisch. Des Weiteren wird eine funktionelle Verbindung von antiapoptischen Bcl-2-Familienmitgliedern sowie dem Fas (TNF-/ Todes-)-Rezeptorsignalweg bei der PLAU-vermittelten Apoptosuppression diskutiert [317].

Die Analyse der in diesem Abschnitt diskutierten Gene, welche besonders stark von den genotoxischen Testsubstanzen induziert waren, zeigte, dass sie in die komplexe Regulation von Zelltod und –überleben eingreifen. Dazu gehörte die Regulation des Zellzyklus, der Zellproliferation und der Apoptose. Die überwiegende Hochregulation proapoptischer und antiproliferativer Gene im Vergleich zu wenigen Genen mit antiapoptischen Eigenschaften deutet auf eine Induktion des programmierten Zelltodes infolge des substanzinduzierten DNA-Schadens hin. Die acht selektierten Gene sowie die im vorigen Abschnitt (siehe Abschnitt 3.4.2) diskutierten transkriptionellen Regulatoren der DNA-Schadensantwort stellen damit potentielle Kandidaten für die Entwicklung eines neuen Screeningsystems für (pro-)genotoxische Verbindungen dar.

4 Schlußfolgerung und Ausblick

4.1 Evaluierung von putativen Markergenen und Entwicklung neuer Screeningsysteme zur Prüfung auf Genotoxizität

Wie einleitend bereits erwähnt, nimmt die Charakterisierung krebserregender Substanzen einen besonderen Stellenwert bei der Bestimmung toxischer Wirkungen von Chemikalien und Arzneimitteln ein. Da die Mehrheit der Kanzerogene aufgrund ihrer genotoxischen (DNA-reaktiven/ mutagenen) Wirkung Tumoren induzieren, ist die Genotoxizitätstestung ein entscheidender Bestandteil während der pharmazeutischen Entwicklung sowie bei der Beurteilung des Gefährdungspotentials von Chemikalien. Dabei ist die Mutagenität ein Surrogatmarker für das Risiko der direkten Entstehung somatischer Krebsarten aber auch der indirekten Krebsentstehung durch Keimzellmutationen, welche dann über Generationen weitergegeben werden. Scanner and Dybing konnten eine generelle Korrelation der mutagenen und kanzerogenen Potenzen von Substanzen entlang der log-log Skala feststellen [318]. Die Testsysteme der Standardtestbatterie für genotoxische Substanzen (Rückmutation in Bakterien und Evaluierung von Chromosomenschäden in Säugerzellen *in vitro* und/ oder *in vivo*) sind sehr sensitiv bezüglich der Erkennung des genotoxischen Potentials von Substanzen, besitzen aber eine niedrige Spezifität. Diese geringe Spezifität und die damit verbundene hohe Rate an falsch positiven Resultaten erschwert die Extrapolation zur Abschätzung der Gefährdung für den Menschen erheblich. Deshalb ist die Entwicklung neuer spezifischerer Testsysteme von großer Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuer genomicsbasierter Ansatz zur Identifizierung von mutagenen und promutagenen Verbindungen *in vitro* entwickelt. Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass mutagene und promutagene Verbindungen charakteristische Genexpressionsveränderungen in HepG2-Zellen induzieren. Die evaluierten 91 putativen Markergene, welche an Prozessen, wie der DNA-Schadensantwort, Regulation der Zellproliferation und Apoptose sowie Vermittlung einer Entzündungsantwort, beteiligt waren, können für die Identifizierung des genotoxischen Potentials unbekannter Substanzen herangezogen werden. Zudem konnte anhand der P53-Experimente gezeigt werden, dass mit Hilfe der Genexpressionsprofile neue Marker für genotoxische Substanzen entdeckt werden können, die ein schnelleres Screening ermöglichen. Die Aktivierung von P53 durch mutagene und promutagene Substanzen,

welche durch die Regulation einer Vielzahl von P53-Targetgenen in den Microarraystudien indiziert worden war, konnte in den durchgeführten P53-Studien zweifelsfrei bestätigt werden. Andere Publikationen stützen die potentielle Verwendung von P53 als Genotoxizitätsmarker. Westerink *et al.* demonstrierten, dass die Analyse von P53 ein hochspezifischer und sensitiver Marker für das Screening genotoxischer Substanzen ist [275]. Im Rahmen der Untersuchung von 62 ECVAM⁵ Substanzen konnte die beste Prädiktivität für den P53-Luziferase-Reportergetests mit einer Spezifität von 85 % und einer Sensitivität von 93 % nachgewiesen werden. Eine weiterführende Validierungsstudie mit 192 Verbindungen zeigte zudem die hohe Korrelation des entwickelten P53-Reportergetests mit vorhandenen Mutagenitätsdaten und Klastogenitätsstudien *in vivo* [275]. Des Weiteren zeigten Studien von Yang, Duerksen-Hughes und Mitarbeitern, dass die Detektion von zellulärem P53 in NCTC 929-Zellen zur Diskriminierung von genotoxischen und nicht-genotoxischen Substanzen genutzt werden kann [276, 277]. In diesen Studien wurde die P53-Aktivierung infolge der Exposition mit verschiedenen (Pro-)mutagenen, epigenetischen nicht-DNA reaktiven Mutagenen und Nicht-Kanzerogenen gemessen und mit bereits vorhandenen Genotoxizitätsdaten verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Detektion von P53 bezüglich der Prädiktion eine ähnliche Genauigkeit, wie andere Mutagenitätstests (Salmonella und SHE Test) zulässt und eine gute Korrelation zu vorhandenen *in vivo*-Daten aufweist [276].

Neue, mit Hilfe von Omics-Analysen evaluierte Marker könnten zum Design von Screeningsystemen mit einem höheren Durchsatz sowie geringerem Zeit- und Kostenaufwand, wie zum Beispiel High Content Imaging (HCI)- oder *TaqMan*TM *low density array* (TLDA)-Testsystemen, genutzt werden. TLDA-Analysen könnten beispielsweise für ein Screening und die mechanistische Charakterisierung genotoxischer Verbindung unter Verwendung der 91 evaluierten Marker angewendet werden. Allerdings ist ein solches System nur für einen geringen Durchsatz an Testsubstanzen geeignet. Hingegen erlaubt die HCI-Technologie die Analyse einiger

⁵ Das *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) wurde 1991 mit dem Zweck des Schutzes von Versuchstieren durch Unterstützung der Entwicklung, Validierung Akzeptanz von Methoden, die Tierversuche reduzieren, verbessern oder ersetzen (3R-Prinzip) können, gegründet [319].

ausgewählter Endpunkte (Proteine) durch Kombination von immunchemischen Nachweisen mit automatisierter Mikroskopie und optimierten Bildgebungsverfahren [320]. Die HCI-Technologie bietet somit einen Screeningansatz mit mittlerem Durchsatz, wobei aber dennoch die biologische Komplexität und molekulare Wechselwirkungen mit in die Untersuchungen eingeschlossen bleiben. Auf diese Weise könnten verschiedene genotoxische Endpunkte (z.B. Proteinmarker, Reportergenaktivierung oder Mikrokerne) bei gleichzeitiger Erfassung von Parametern, wie der Zellviabilität/ Zytotoxizität, dem mitochondrialen Status oder der Zellzahl, untersucht werden. Als potentielle Marker könnten unter anderem die in dieser Arbeit gefundenen Gene IER5, CDKN1A, EMP1, EMP3, CRABP2, PROCR, Galectin 7 oder PLAU herangezogen werden (siehe Abschnitt 3.4.2). Außerdem könnte neben dem vorangehend bereits erwähnten P53 künftig auch die Eignung der transkriptionellen Regulatoren STAT1 oder SP1/3 als Genotoxizitätsmarker überprüft werden.

Allerdings müsste in künftigen Studien die Spezifität dieser putativen Genotoxizitätsmarker abgeklärt werden. Obwohl für viele dieser Gene bekannt ist, dass Sie funktionell in die Antwort auf einen DNA-Schaden eingebunden sind (unter anderem CDKN1A, P53, STAT1, Galectin 7, IER5) (siehe 3.4.3/ 3.4.4), gibt es auch andere Signale, die zur Aktivierung dieser Komponenten führen können. Beispielsweise kann P53 durch Nährstoffmangel oder Hypoxie [321] und STAT1 durch hyperosmotischen Stress, erhöhte zelluläre Glucosespiegel, Hypoxie oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [322] aktiviert werden. Trotz der potentiellen anderen Stresssignale spielt die Aktivierung von P53 durch genotoxischen Stress eine integrale Rolle, da P53 bereits auf geringe DNA-Schädigungen extrem sensitiv reagiert [321]. Außerdem kann die Kombination mehrerer Gene, die mit Hilfe der Microarrayanalysen nach (pro-)genotoxischer Behandlung dereguliert waren, die charakteristische Antwort dieser Substanzen widerspiegeln. Für die Verwendung der diskutierten Gene als putative Genotoxizitätsmarker spricht zudem, dass diese im Rahmen dieser Arbeit bereits bei Behandlungen mit den (pro-)genotoxischen Substanzen im Bereich nicht-zytotoxischer Dosierungen dereguliert waren. Dagegen zeigten die Kontrollsubstanzen Metformin und Theophyllin keine Deregulationen dieser Gene. Dennoch sollten künftig neben weiteren genotoxischen Substanzen, auch (nicht-genotoxische) hepatotoxische sowie weitere Negativsubstanzen getestet werden. Insbesondere durch den Vergleich der Genexpressionsantwort mit hepatotoxischen Substanzen könnten wichtige Informationen darüber gewonnen werden, wie repräsentativ diese Gene bezogen auf Genotoxizität sind. Abgesehen davon muss jedoch immer berücksichtigt werden, dass

solche „Marker“ für das zelluläre System (hier HepG2-Zellen) charakteristisch sind und nicht direkt auf andere Zell- oder *in vivo*-Systeme übertragen werden können.

4.2 Einsatz globaler Genexpressionsanalysen in der Genotoxizitäts- und Kanzerogenitätstestung

Abgesehen von der Auswahl gezielter Marker und der Entwicklung von Screening-systemen mit mittlerem Durchsatz, könnten globale Expressionsprofile in HepG2 künftig auch begleitend zur Standard-*in vitro*-Testbatterie eingesetzt werden. Solche globalen Profilierungen könnten bei Verbindungen mit nicht eindeutigen Ergebnissen („Grenzfälle“ mit widersprüchlichen Testergebnissen) in der Standard-*in vitro*-Testbatterie angewendet werden. Die dadurch erstellten mechanistischen Profile könnten in solchen Fällen helfen, eine Entscheidung zur Zuordnung der Substanzen zu treffen.

Zusätzlich zu den Analysen *in vitro* wäre es denkbar, Genomics *in vivo* zur Genotoxizitätstestung einzusetzen. Ohne zusätzlichen Tieraufwand könnten Genexpressionsmuster im Knochenmark oder der Leber von Nagern aus Mikrokern-teststudien auf spezifische Veränderungen untersucht und zur mechanistischen Substanzcharakterisierung und eindeutigen Identifizierung von (Pro-)Mutagenen herangezogen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Knochenmarksproben von CPA behandelten Ratten bereits profiliert (Daten nicht gezeigt). Es wurde ein charakteristisches Muster, das sich zweifelsfrei von den Kontrollen unterschied und die Veränderungen in den hämatopoietischen Zellen nach einem DNA-Schaden widerspiegelt, gefunden. Allerdings konnten anhand der Daten dieser einen Substanz keine allgemeingültigen Rückschlüsse für die Eignung solcher globalen Profilierungen für die Genotoxizitätstestung gezogen werden. Dafür müssten künftig Studien mit weiteren Modellsubstanzen gemacht werden, um eine genotoxische Antwort zweifelsfrei von einer Stressantwort im Hintergrund oder generell einer zytotoxischen Reaktion abzugrenzen. Dennoch wäre es eine Möglichkeit die derzeitige Standardtestbatterie weiter zu verbessern. Über die Genotoxizitätstestung hinaus wurden bereits Studien, in welchen die Eignung von Genomics in der Kanzerogenitätstestung erforscht wurde, publiziert [131]. Besonderes Potential wird

hierbei in der Identifizierung und Bewertung von Kanzerogenen mit einem nicht-genotoxischen Wirkmechanismus gesehen.

Im Allgemeinen sind die Vorteile der Omics-Testung *in vitro* gegenüber der *in vivo* vor allem in der Stabilität der untersuchten Parameter zu sehen. Während molekulare Effekte *in vivo* besser nachgebildet werden können, werden *in vitro*-Systeme nicht von individuellen Unterschieden der Testorganismen beeinflusst und können leichter zu Screeningsystemen mit mittlerem bis hohem Durchsatz ausgebaut werden. Somit ist die *in vitro*-Testung nicht nur aus Tierschutzgründen, sondern auch aus wirtschaftlichen Aspekten im Sinne der Kostenreduktion interessant. Eine Hauptlimitation der humanen Zelllinien ist jedoch die begrenzte metabolische Kompetenz (siehe Diskussion verschiedener zellulärer Systeme unter 4.3).

4.3 Prävalidierung und Weiterentwicklung der neuen Testsysteme

Um das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte *in vitro*-Testmodell weiter zu verbessern und die Marker zu validieren ist es unerlässlich noch weitere Substanzen zu testen. Als potentielle Validierungssubstanzen könnten die von der ECVAM empfohlenen 62 Verbindungen für die Validierung bzw. Optimierung neuer Genotoxizitätstests *in vitro* verwendet werden. Der Verbindungsdatensatz besteht aus 20 DNA-reaktiven Genotoxinen („Richtig-Positive“), 23 nicht mutagenen Verbindungen („Richtig-Negative“) und 19 nicht DNA-reaktiven Substanzen, die aber positive Resultate im Test auf Maus-Lymphoma tk Mutationen oder Chromosomenabberationen zeigten [109]. Für eine breiter angelegte Validierungsstudie könnte zudem der Testdatensatz, vorgeschlagen von Westerink *et al.*, bestehend aus 192 Substanzen genutzt werden [275]. Eine solche Validierungsstudie ermöglicht es die Prädiktivität der im Rahmen dieser Arbeit vorgeschlagenen *in vitro*-Testsysteme, welche Parameter, wie Sensitivität und Spezifität einschließt, zu ermitteln. Der Aufbau einer Datenbank für den künftigen Abgleich mit unbekanntem Substanzen ist dabei ebenfalls von besonderer Bedeutung. Hat man Expressionsprofile von genügend Substanzen zur Verfügung, könnte mit Hilfe spezieller bioinformatischer Systeme, wie neuronaler Netzwerke, ein optimales Klassifikationsmodell erstellen und somit die Sensitivität und Spezifität des bestehenden Systems weiter verbessert werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verwendeten HepG2-Zellen in der Lage sind, Verbindungen CYP1A/1B1- und 3A4-abhängig selbst zu metabolisieren. Insbesondere spielt CYP3A4 eine bedeutende Rolle in der Biotransformation vieler Xenobiotika. Ungefähr 50 % der in der Klinik angewendeten Medikamente sowie eine Vielzahl von Prokanzerogenen, wie z.B. AFB1, Benzo[a]pyren, Naphthalen, 1-Nitropyren oder 6-Aminochrysen, werden durch CYP3A4 metabolisiert [53, 56]. Auch die CYP-Enzyme 1A1/2 und 1B1 sind wesentlich an der metabolischen Aktivierung von Prokanzerogenen der Klassen polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Aryl- und Heterozyklischen Amine und Benz[a]anthracen beteiligt. Durch die endogene Aktivität der genannten CYP-Enzyme in HepG2 kann bereits ohne Zugabe eines metabolischen Aktivierungssystems ein breites Spektrum an genotoxischen Substanzen erfasst werden. Das ist ein erheblicher Vorteil von HepG2 zum Beispiel gegenüber den TK6-Zellen, die im GreenScreen⁶ eingesetzt werden, und spricht damit für die Verwendung von HepG2-Zellen im Genotoxizitätsscreening.

Trotzdem reicht die fremdstoffmetabolisierende Aktivität der Zelllinie nicht aus um alle Verbindungsklassen an progentoxischen Substanzen abzudecken. Deshalb wurde ein kombiniertes System aus HepG2 und einem metabolischen Aktivierungssystem (Rattenleber-S9-Homogenate) entwickelt und die Funktionalität bestätigt. Zur besseren Übertragbarkeit der Resultate für die Abschätzung der humanen Gefährdung könnte das System mit humanen Mikrosomenfraktionen anstatt des Ratten-S9 kombiniert werden. Allerdings sind humane MAS sehr teuer, was die Verwendung für große Screeningversuche einschränkt. Problematisch für die Etablierung eines solchen Systems sind außerdem die niedrigen Aktivitätsspiegel der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme im Vergleich zum induzierten Ratten-S9-Mix oder Rattenmikrosomen. Eine andere Möglichkeit wäre deshalb der Einsatz anderer metabolisch kompetenter Zellen für die Genotoxizitätstestung. Obwohl primäre humane Hepatozyten aufgrund ihres metabolischen Profils das derzeitige *in vitro*-Referenzmodell für Arzneimittel-metabolismus- und CYP-Induktionsstudien sind [243], eignen sie sich wegen dem Verlust der Proliferationsfähigkeit in Kultur der adulten differenzierten Hepatozyten nicht für Genotoxizitätsuntersuchungen. Außerdem sind humane Hepatozyten nur begrenzt verfügbar und Spenderunterschiede können sowohl bei den humanen Hepatozyten als auch Chargenunterschiede bei den humanen Mikrosomen eine

⁶ Der GreenScreen ist ein neuer *in vitro*-Genotoxizitätstest, der auf der Messung eines Gadd45 α -Reportergens in TK6-Zellen basiert [323, 324].

natürliche Variabilität bewirken [243], was die Standardisierung solcher Systeme zusätzlich erschwert. Die große Variabilität zwischen den verschiedenen Donoren wurde in dieser Arbeit innerhalb der vergleichenden Charakterisierungsstudien von HepG2 und humanen Hepatozyten bereits deutlich. Um das Problem der begrenzten Proliferation zu umgehen, entwickelte die Firma Medicyte zwei verschiedene Technologien, bei denen die Proliferationsfähigkeit primärer Zellen *in vitro* durch gezielte genetische Veränderung oder den Zusatz spezifischer rekombinanter Proteinfaktoren zum Zellkulturmedium wieder hergestellt wird [325]. Neben solchen primären Hepatozyten in Kombination mit der Medicyte Technologie wäre die Verwendung von HepaRG Zellen für die Entwicklung eines neuen Genotoxizitätstestsystems eine weitere Alternative. HepaRG ist eine neuartige Hepatomzelllinie, die einerseits die Fähigkeit zur Proliferation besitzt und andererseits nach Konfluenz einen hepatozytenähnlichen Differenzierungsstatus aufweist [243, 326]. HepaRG exprimieren eine Vielzahl an CYP-Enzymen (CYP1A2, 3A4, 7A1, 2D6 2E1), nukleären Faktoren (AhR, PXR, CAR, PPAR α) und Phase II-Enzymen (UGT1A1, GSTA1, GSTA4) [243, 326]. Allerdings sind die Aktivitäten der CYP-Enzyme in der Regel geringer als in humanen Hepatozyten mit Ausnahme von CYP3A4 und 7A1 [326], was die Nutzung der Zelllinie per se für das Genotoxizitätsscreening möglicherweise einschränken könnte.

Abgesehen von der Testung weiterer Substanzen in HepG2-Zellen oder der Evaluierung der Eignung anderer zellulärer Systeme sollten künftig Studien gemacht werden, die die fehlende (P53-Studien)/ schwache (Genexpressionsanalysen) Responsivität des Nitrosamins DEN *in vitro* erklären können. Um die Ursache abzuklären, könnte versucht werden in künftigen Studien Genexpressionsprofile nach einem siRNA-*Knockdown* des P53 aufzuzeichnen. Würde das Nitrosamin dennoch richtig klassifiziert werden, deutet das auf P53-unabhängige Mechanismen hin, welche die Nitrosamin-induzierte Genotoxizitätsantwort vermitteln. Des Weiteren könnte durch die Verwendung von HepG2-Zellen, die CYP2E1 und/oder CYP2A6 überexprimieren [327], herausgefunden werden, ob eine unzureichende metabolische Aktivierung durch das exogene MAS die Ursache für die schwache Antwort der Nitrosamine ist. Außerdem könnte man versuchen, die für die Detoxifizierung des Nitrosamins wichtigen Phase II-Enzyme zu blockieren und zu analysieren, ob sich die Genotoxizitätsantwort dadurch verstärken lässt. Allerdings wäre eine solche Blockade des Phase II-Metabolismus der Nitrosamine lediglich zur Ursachenforschung sinnvoll. Hingegen könnten die vorangehend

erwähnten HepG2-Zellen mit Überexpression bestimmter CYP-Enzyme möglicherweise als zelluläres System für die Testung auf Genotoxizität eingesetzt werden.

4.4 Tierschutzaspekte und Beitrag zur Risikobewertung

Das Leitbild der modernen Toxikologie ist zudem an der Entwicklung versuchstierfreier (*in vitro*) Methoden gemäß dem 3R-Prinzip ausgerichtet. Die derzeitigen *in vitro* Methoden ersetzen Tierversuche nicht vollständig, können jedoch langfristig dazu beitragen, die Anzahl von Tierversuchen zu reduzieren. Obwohl die heutigen *in vitro* Methoden ein Screening auf bestimmte Gefährdungseigenschaften der Testsubstanzen ermöglichen, bleibt die Ableitung von *in vivo*-Dosiswirkungsbeziehungen und NOELs (*No observed effect level*) eine der Hauptlimitationen für den vollständigen Ersatz der *in vivo*-Testung [328]. Problematisch für eine solche Extrapolation ist die Erfassung der Komplexität und aller potenziellen Einflussfaktoren [328]. Eine besondere Herausforderung für die Etablierung neuer tierversuchsfreier Testmethoden ergab sich zudem, wie einleitend bereits beschrieben, mit dem in Kraft treten der neuen EU-Chemikaliengesetzgebung REACH (2007), welche durch die Sicherheitsprüfung von etwa 30.000 Alt-Chemikalien einen immensen Tierverbrauch fordern würde [16]. Die Testung auf mutagene Eigenschaften von Verbindungen ist dabei ein wesentlicher Bestandteil innerhalb des REACH-Programms.

Mit den beiden in dieser Arbeit vorgestellten *in vitro*-Testsystemen (P53 und das omics-basierte Klassifikationsmodell) können Alt-Chemikalien im Sinne des REACH-Programms aber auch neue Chemikalien und Medikamente auf Genotoxizität getestet werden. Hervorzuheben ist, dass Folgestudien zur Interpretation der zum Teil widersprüchlichen Resultate der Standardbatterie gänzlich vermieden werden können, was dem 3R Prinzip besonders Rechnung trägt, da hier meist Studien an Tieren durchgeführt werden müssen. Des Weiteren kann das Leiden von Tieren während der Versuche erheblich minimiert werden, indem Substanzen mit stark (geno-)toxischem Potential schon im Vorfeld elimiert werden und nur die Substanzen mit negativen Ergebnissen *in vitro* in die Studien gelangen. Eine massive Einsparung von Versuchstieren ergibt sich durch die frühzeitige Eliminierung von genotoxischen Substanzen während der Medikamenten-/ Chemikalienentwicklung für die Kanzerogenitätsstudien an Nagern. Für eine solche Lebenszeitstudie sind nach der OECD-Richtlinie 451 für

jede Dosis-Gruppe und der gleichzeitigen Kontroll-Gruppe jeweils mindestens 50 Tiere beiderlei Geschlechts erforderlich (siehe Abschnitt 1.3.2) [91]. Unter Annahme von beispielsweise zwei verschiedenen Dosierungen in einer Kanzerogenitätsstudie könnten pro ausselektierter Substanz mindestens 600 Tiere eingespart werden. Zudem kann, wie vorangehend bereits erwähnt, das Leiden der Tiere durch die Präselektion deutlich reduziert werden.

Abgesehen von der Reduktion der Versuchstiere können die entwickelten Testsysteme einen nicht minder bedeutenden Beitrag für die Risikobewertung leisten. Die Messung einer Vielzahl von Endpunkten, wie es bei den globalen Profilierungen der Fall ist, liefert nicht nur wichtige Informationen zum Wirkmechanismus der genotoxischen Testsubstanzen, sondern kann durch die multiple Analyse auch zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität innerhalb des Screenings beitragen. Mithilfe von mechanistischen Studien können zudem neue Toxizitätssignalwege identifiziert und daraufhin angepasste *in vitro*-Testsysteme entwickelt werden, wie es in der Vision und Strategie des NRC für die Toxizitätstestung im 21. Jahrhundert gefordert wird [2]. Aufgrund der einleitend beschriebenen Problematik der Existenz/ Abwesenheit von Schwellenwerten für krebserregende Verbindungen sind mechanistische Daten zusätzlich zu den klassischen Toxizitätsdaten für die Risikobewertung dieser Substanzen von enormer Bedeutung. Sie dienen dazu, eine konkrete Kategorisierung der Genotoxine vornehmen und möglicherweise einen Grenzwert definieren oder ausschließen zu können.

5 Literaturverzeichnis

-
- [1] W. Forth, D. Henschler and W. Rummel (2001). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer Verlag, München/ Jena.
- [2] N.R.C. Committee on Toxicity Testing and Assessment of Environmental Agents (2007). *Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*. The National Academies Press, Washington, D.C..
- [3] E.J. Calabrese (2004). Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine. *EMBO Rep* **5**, S37-S40.
- [4] F.J. Gonzalez and Y.M. Shah (2008). PPARalpha: mechanism of species differences and hepatocarcinogenesis of peroxisome proliferators. *Toxicology* **246**, 2-8.
- [5] M.P. Holsapple and K.B. Wallace (2008). Dose response considerations in risk assessment--an overview of recent ILSI activities. *Toxicol Lett* **180**, 85-92.
- [6] S.W. Edwards and R.J. Preston (2008). Systems biology and mode of action based risk assessment. *Toxicol Sci* **106**, 312-318.
- [7] A. Oberemm and U. Gundert-Remy (2003). Toxicogenomics: Der Einsatz von Genexpressionsanalysen für die Risikobewertung von Chemikalien. *Mitteilungen der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie* **1**, keine Angabe.
- [8] N. Fabre, I. Anglade and J.A. Vericat (2009). Application of toxicogenomic tools in the drug research and development process. *Toxicol Lett* **186**, 13-17.
- [9] M.J. Aardema and J.T. MacGregor (2002). Toxicology and genetic toxicology in the new era of "toxicogenomics": impact of "-omics" technologies. *Mutat Res* **499**, 13-25.
- [10] FDA (2004). Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products. Stand: 18.06.2009.
<http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/SpecialTopics/CriticalPathInitiative/CriticalPathOpportunitiesReports/ucm113411.pdf>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [11] FDA (2005). Guidance for Industry Pharmacogenomic Data Submissions. Stand: 15.07.2009.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm079849.pdf>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [12] EMA (2009). Innovation Task Force. Stand: 23.07.2009.
<http://www.emea.europa.eu/htms/human/mes/itf.htm>.
Abgerufen am: 21.05.2010.

- [13] N.R.C. Committee on Improving Risk Analysis Approaches Used by the U.S. EPA (2009). *Science and Decisions: Advancing Risk Assessment*. The National Academies Press, Washington, D.C..
- [14] M.L. Cunningham, M.S. Bogdanffy, T.R. Zacharewski and R.N. Hines (2003). Workshop overview: use of genomic data in risk assessment. *Toxicol Sci* **73**, 209-215.
- [15] A. Oberemm, L. Onyon and U. Gundert-Remy (2005). How can toxicogenomics inform risk assessment? *Toxicol Appl Pharmacol* **207**, 592-598.
- [16] European Commission (2007). REACH in brief. Stand: 17.07.2009. http://www.ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/pdf/2007_02_reach_in_brief.pdf. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [17] J.G. Hengstler, H. Foth, R. Kahl, P.J. Kramer, W. Lilienblum, T. Schulz and H. Schweinfurth (2006). The REACH concept and its impact on toxicological sciences. *Toxicology* **220**, 232-239.
- [18] Stiftung Forschung 3R (1996). Die Bedeutung der 3"R" nach Russel & Burch. Stand: 30.01.2008. <http://www.forschung3r.ch/de/publications/bu7.html>. Abgerufen am: 24.07.2009.
- [19] Deutsche Krebshilfe e.V. (2007). Stand: März 2010. <http://www.krebshilfe.de/krebszahlen.html>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [20] A. Luch (2005). Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* **5**, 113-125.
- [21] L.B. Ehrenberg, P. Brookes, H. Druckrey, B. Lagerlof, J. Litwin and G. Williams (1973). The relation of cancer induction and genetic damage. In *Evaluation of genetic risks of environmental chemicals; report of a symposium held at Skokloster* (C. Ramel, Ed.), pp. 15-16. Royal Swedish Academy of Sciences Stockholm.
- [22] H. Marquardt and S.G. Schaefer (2004). *Lehrbuch der Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- [23] G.M. Williams (2001). Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology* **166**, 3-10.
- [24] U.A. Boelsterli (2007). *Mechanistic Toxicology*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- [25] J.D. Watson, T.A. Baker, S.P. Bell, A. Gann, M. Lewine and R. Losick (2003). *Molecular Biology of the Gene*. Addison-Wesley Longman, Amsterdam.

-
- [26] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter and L. Jaenicke (2004). *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [27] M. Ashcroft and K.H. Vousden (1999). Regulation of p53 stability. *Oncogene* **18**, 7637-7643.
- [28] J.S. Bertram (2000). The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* **21**, 167-223.
- [29] J. Bartek and J. Lukas (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 738-747.
- [30] H. van Steeg and K.H. Kraemer (1999). Xeroderma pigmentosum and the role of UV-induced DNA damage in skin cancer. *Mol Med Today* **5**, 86-94.
- [31] W.E. Glaab, K.R. Tindall and T.R. Skopek (1999). Specificity of mutations induced by methyl methanesulfonate in mismatch repair-deficient human cancer cell lines. *Mutat Res* **427**, 67-78.
- [32] B.E. Tropp (2007). *Molecular Biology- Genes to Proteins*. Jones & Bartlett Publishers, Sudbury.
- [33] M.H. Hou, H. Robinson, Y.G. Gao and A.H. Wang (2002). Crystal structure of actinomycin D bound to the CTG triplet repeat sequences linked to neurological diseases. *Nucleic Acids Res* **30**, 4910-4917.
- [34] H.M. Sobell (1985). Actinomycin and DNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 5328-5331.
- [35] A.L. Guy and J.H. Taylor (1978). Actinomycin D inhibits initiation of DNA replication in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**, 6088-6092.
- [36] K. Wassermann, J. Markovits, C. Jaxel, G. Capranico, K.W. Kohn and Y. Pommier (1990). Effects of morpholinyl doxorubicins, doxorubicin, and actinomycin D on mammalian DNA topoisomerases I and II. *Mol Pharmacol* **38**, 38-45.
- [37] M.H. Wu and B.Y. Yung (1994). Cell cycle phase-dependent cytotoxicity of actinomycin D in HeLa cells. *Eur J Pharmacol* **270**, 203-212.
- [38] K.R. Hande (1998). Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* **34**, 1514-1521.
- [39] J.A. Sinkule (1984). Etoposide: a semisynthetic epipodophyllotoxin. Chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, adverse effects and use as an antineoplastic agent. *Pharmacotherapy* **4**, 61-73.

- [40] N.O. Karpinich, M. Tafani, R.J. Rothman, M.A. Russo and J.L. Farber (2002). The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c. *J Biol Chem* **277**, 16547-16552.
- [41] J.L. Nitiss (2009). Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **9**, 338-350.
- [42] K.A. West, J. Brognard, A.S. Clark, I.R. Linnoila, X. Yang, S.M. Swain, C. Harris, S. Belinsky and P.A. Dennis (2003). Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J Clin Invest* **111**, 81-90.
- [43] A. Toker (2000). Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Mol Pharmacol* **57**, 652-658.
- [44] G. Poschl and H.K. Seitz (2004). Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol* **39**, 155-165.
- [45] E. Albano (2006). Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc* **65**, 278-290.
- [46] D.E. Malarkey, K. Johnson, L. Ryan, G. Boorman and R.R. Maronpot (2005). New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol* **33**, 27-34.
- [47] Universitäten Fribourg, Lausanne und Bern (2005). Online Embryologiekurs für Studierende der Medizin- Kapitel 19.7 Leber, Gallenblase bzw. -wege. Stand: 20.02.2009.
<http://www.embryology.ch/allemand/sdigestive/leber02.html>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [48] G.J. Diaz (2000). Basolateral and canalicular transport of xenobiotics in the hepatocyte: A review. *Cytotechnology* **34**, 225-235.
- [49] P. Makowski and S. Pikula (1997). Participation of the multispecific organic anion transporter in hepatobiliary excretion of glutathione S-conjugates, drugs and other xenobiotics. *Pol J Pharmacol* **49**, 387-394.
- [50] D.C. Dahlin, G.T. Miwa, A.Y. Lu and S.D. Nelson (1984). N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 1327-1331.
- [51] D.R. Hipfner, R.G. Deeley and S.P. Cole (1999). Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 359-376.

- [52] T.W. Kensler, G.S. Qian, J.G. Chen and J.D. Groopman (2003). Translational strategies for cancer prevention in liver. *Nat Rev Cancer* **3**, 321-329.
- [53] M. Martignoni, G.M. Groothuis and R. de Kanter (2006). Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2**, 875-894.
- [54] J.M. Berg, J.L. Tymoczko and L. Stryer (2003). *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [55] A.W. Munro, H.M. Girvan and K.J. McLean (2007). Variations on a (t)heme-novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. *Nat Prod Rep* **24**, 585-609.
- [56] C. Rodriguez-Antona and M. Ingelman-Sundberg (2006). Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* **25**, 1679-1691.
- [57] W. Xue and D. Warshawsky (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol* **206**, 73-93.
- [58] V.J. Melendez-Colon, A. Luch, A. Seidel and W.M. Baird (2000). Formation of stable DNA adducts and apurinic sites upon metabolic activation of bay and fjord region polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell cultures. *Chem Res Toxicol* **13**, 10-17.
- [59] S.C. Cheng, A.S. Prakash, M.A. Pigott, B.D. Hilton, J.M. Roman, H.M. Lee, R.G. Harvey and A. Dipple (1988). Characterization of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-adenine nucleoside adducts. *Chem Res Toxicol* **1**, 216-221.
- [60] Spectrum Laboratories, Inc. (2003). Chemical Fact Sheet 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene. Stand: keine Angabe.
<http://www.speclab.com/compound/c57976.htm>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [61] J. Buters, L. Quintanilla-Martinez, W. Schober, V.J. Soballa, J. Hintermair, T. Wolff, F.J. Gonzalez and H. Greim (2003). CYP1B1 determines susceptibility to low doses of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced ovarian cancers in mice: correlation of CYP1B1-mediated DNA adducts with carcinogenicity. *Carcinogenesis* **24**, 327-334.
- [62] J.G. Hengstler, M.S. Bogdanffy, H.M. Bolt and F. Oesch (2003). Challenging dogma: thresholds for genotoxic carcinogens? The case of vinyl acetate. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**, 485-520.

- [63] P. Roy, L.J. Yu, C.L. Crespi and D.J. Waxman (1999). Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug Metab Dispos* **27**, 655-666.
- [64] H.J. Xie, U. Yasar, S. Lundgren, L. Griskevicius, Y. Terelius, M. Hassan and A. Rane (2003). Role of polymorphic human CYP2B6 in cyclophosphamide bioactivation. *Pharmacogenomics J* **3**, 53-61.
- [65] V. Stearns, B. Schneider, N.L. Henry, D.F. Hayes and D.A. Flockhart (2006). Breast cancer treatment and ovarian failure: risk factors and emerging genetic determinants. *Nat Rev Cancer* **6**, 886-893.
- [66] Q. Dong, D. Barsky, M.E. Colvin, C.F. Melius, S.M. Ludeman, J.F. Moravek, O.M. Colvin, D.D. Bigner, P. Modrich and H.S. Friedman (1995). A structural basis for a phosphoramidate mustard-induced DNA interstrand cross-link at 5'-d(GAC). *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 12170-12174.
- [67] T. Kamataki, K. Fujita, K. Nakayama, Y. Yamazaki, M. Miyamoto and N. Ariyoshi (2002). Role of human cytochrome P450 (CYP) in the metabolic activation of nitrosamine derivatives: application of genetically engineered *Salmonella* expressing human CYP. *Drug Metab Rev* **34**, 667-676.
- [68] J.S. Kang, H. Wanibuchi, K. Morimura, F.J. Gonzalez and S. Fukushima (2007). Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo. *Cancer Res* **67**, 11141-11146.
- [69] H. Yamazaki, Y. Inui, C.H. Yun, F.P. Guengerich and T. Shimada (1992). Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis* **13**, 1789-1794.
- [70] Bernd Jastorff (2000). Struktur-Wirkungsdenken in der Chemie - eine Chance für mehr Nachhaltigkeit, Kapitel 7: Industriechemikalien am Modell "Aromaten". Stand: keine Angabe.
<http://www.uft.uni-bremen.de/chemie/SAR-Buch/kapitel7.htm>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [71] D. Jourd'heuil, D. Kang and M.B. Grisham (1997). Interactions between superoxide and nitric oxide: implications in DNA damage and mutagenesis. *Front Biosci* **2**, d189-196.

- [72] J.A. Boucheron, F.C. Richardson, P.H. Morgan and J.A. Swenberg (1987). Molecular dosimetry of O4-ethyldeoxythymidine in rats continuously exposed to diethylnitrosamine. *Cancer Res* **47**, 1577-1581.
- [73] EMA (2008). ICH Topic S2 (R1) Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Stand: März 2008. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ich/12664208en.pdf>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [74] OECD (2010). Homepage der OECD. Stand: keine Angabe. www.oecd.org/ Abgerufen am: 21.05.2010.
- [75] National Center for Scientific Research (CNRS) (2007). Integrated testing strategy for mutagenicity under REACH. Stand: keine Angabe. http://www.prc.cnrs-gif.fr/reach/diagrams_en/testing_strategy_muta_en.pdf. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [76] B.N. Ames, J. McCann and E. Yamasaki (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* **31**, 347-364.
- [77] OECD (1997). OECD Guideline for testing chemicals 471: Bacterial Reverse Mutation Test.
- [78] Qui, W. (Hunter College of the City of New York) (2007). Biological lectures: Ames Test. Stand: Mai 2007. http://diverge.hunter.cuny.edu/~weigang/Images/08-22_amestest_1.jpg. Abgerufen am: 03.10.2009.
- [79] (2007). SIS Homepage- IUPAC Glossary of Terms Used in Toxicology Stand: 11.03.2009. <http://sis.nlm.nih.gov/enviro/iupacglossary/frontmatter.html>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [80] H.P. Kleber, D. Schlee and W. Schöpp (1997). *Biochemisches Praktikum. Methoden für Studium, Praxis, Forschung* Gustav Fischer Verlag, Jena.
- [81] E.F. Brandon, C.D. Raap, I. Meijerman, J.H. Beijnen and J.H. Schellens (2003). An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol* **189**, 233-246.

- [82] S. Safe, S. Bandiera, T. Sawyer, L. Robertson, L. Safe, A. Parkinson, P.E. Thomas, D.E. Ryan, L.M. Reik, W. Levin and et al. (1985). PCBs: structure-function relationships and mechanism of action. *Environ Health Perspect* **60**, 47-56.
- [83] L.W. Robertson and L.G. Hansen (2001). *PCBs- Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects*. The University Press of Kentucky, Lexington.
- [84] K. Davies (2006). Strategies for eliminating and reducing persistent bioaccumulative toxic substances: common approaches, emerging trends, and level of success. *J Environ Health* **69**, 9-15, 36, 38.
- [85] B.M. Elliott, R.D. Combes, C.R. Elcombe, D.G. Gatehouse, G.G. Gibson, J.M. Mackay and R.C. Wolf (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in vitro genotoxicity assays. *Mutagenesis* **7**, 175-177.
- [86] OECD (1997). OECD Guideline for testing chemicals 476: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test.
- [87] OECD (1997). OECD Guideline for testing chemicals 473: In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test.
- [88] OECD (1997). OECD Guideline for testing chemicals 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test.
- [89] OECD (1997). OECD Guideline for testing chemicals 475: Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test.
- [90] M. Vinken, T. Doktorova, H. Ellinger-Ziegelbauer, H.J. Ahr, E. Lock, P. Carmichael, E. Roggen, J. van Delft, J. Kleinjans, J. Castell, R. Bort, T. Donato, M. Ryan, R. Corvi, H. Keun, T. Ebbels, T. Athersuch, S.A. Sansone, P. Rocca-Serra, R. Stierum, P. Jennings, W. Pfaller, H. Gmuender, T. Vanhaecke and V. Rogiers (2008). The carcinoGENOMICS project: critical selection of model compounds for the development of omics-based in vitro carcinogenicity screening assays. *Mutat Res* **659**, 202-210.
- [91] OECD (2009). OECD Guideline for testing chemicals 451: Carcinogenicity Studies.
- [92] Gold, L.S. (2004). The carcinogenic potency project. Stand: keine Angabe. <http://potency.berkeley.edu/cpdb.html>. Abgerufen am: 21.05.2010.

- [93] C. Crofton-Sleigh, A. Doherty, S. Ellard, E.M. Parry and S. Venitt (1993). Micronucleus assays using cytochalasin-blocked MCL-5 cells, a proprietary human cell line expressing five human cytochromes P-450 and microsomal epoxide hydrolase. *Mutagenesis* **8**, 363-372.
- [94] M. Ishidate, Jr., M.C. Harnois and T. Sofuni (1988). A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures. *Mutat Res* **195**, 151-213.
- [95] E. Madle, G. Tiedemann, S. Madle, A. Ott and G. Kaufmann (1986). Comparison of S9 mix and hepatocytes as external metabolizing systems in mammalian cell cultures: cytogenetic effects of 7,12-dimethylbenzanthracene and aflatoxin B1. *Environ Mutagen* **8**, 423-437.
- [96] L. Fabry and M. Roberfroid (1981). Mutagenicity of aflatoxin B1: observations in vivo and their relation to in vitro activation. *Toxicol Lett* **7**, 245-250.
- [97] IARC (2010). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Stand: 2010. <http://monographs.iarc.fr/>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [98] E. Zeiger, G. Erexson, K. Mortelmans and A. Thilagar (1997). Genetic toxicity studies of 1,2,3,4-tetrahydro-9-acridinamine (tacrine). *Mutat Res* **393**, 189-197.
- [99] A.D. Mitchell, A.E. Auletta, D. Clive, P.E. Kirby, M.M. Moore and B.C. Myhr (1997). The L5178Y/tk+/- mouse lymphoma specific gene and chromosomal mutation assay a phase III report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* **394**, 177-303.
- [100] T. Matsushima, M. Hayashi, A. Matsuoka, M. Ishidate, Jr., K.F. Miura, H. Shimizu, Y. Suzuki, K. Morimoto, H. Ogura, K. Mure, K. Koshi and T. Sofuni (1999). Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis* **14**, 569-580.
- [101] K.H. Mavournin, D.H. Blakey, M.C. Cimino, M.F. Salamone and J.A. Heddle (1990). The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* **239**, 29-80.
- [102] K. Ninomiya, H. Kawaguchi, M. Souda, S. Taguchi, M. Funato, Y. Umekita and H. Yoshida (2007). Effects of neonatally administered diethylstilbestrol on induction of mammary carcinomas induced by 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene in female rats. *Toxicol Pathol* **35**, 813-818.

- [103] C.A. Aiub, J.L. Mazzei, L.F. Pinto and I. Felzenszwalb (2006). Evaluation of nitroreductase and acetyltransferase participation in N-nitrosodiethylamine genotoxicity. *Chem Biol Interact* **161**, 146-154.
- [104] C.A. Aiub, L.F. Pinto and I. Felzenszwalb (2003). N-Nitrosodiethylamine mutagenicity at low concentrations. *Toxicol Lett* **145**, 36-45.
- [105] M. Zielenska and J.B. Guttenplan (1987). Effects of UV repair, error-prone repair and critical site of mutation on mutagenesis induced by N-nitrosamines. *Mutat Res* **180**, 11-20.
- [106] D. Clive, R. McCuen, J.F. Spector, C. Piper and K.H. Mavournin (1983). Specific gene mutations in L5178Y cells in culture. *Mutat Res* **115**, 225-251.
- [107] H. Suzuki, T. Shirotori and M. Hayashi (2004). A liver micronucleus assay using young rats exposed to diethylnitrosamine: methodological establishment and evaluation. *Cytogenet Genome Res* **104**, 299-303.
- [108] R. Basak, B.K. Saha and M. Chatterjee (2000). Inhibition of diethyl-nitrosamine-induced rat liver chromosomal aberrations and DNA-strand breaks by synergistic supplementation of vanadium and 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D(3). *Biochim Biophys Acta* **1502**, 273-282.
- [109] D. Kirkland, P. Kasper, L. Muller, R. Corvi and G. Speit (2008). Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests: a follow-up to an ECVAM workshop. *Mutat Res* **653**, 99-108.
- [110] E. Selvakumar, C. Prahalathan, P. Varalakshmi, P. Kumarasamy and R. Saravanan (2006). Modification of cyclophosphamide-induced clastogenesis and apoptosis in rats by alpha-lipoic acid. *Mutat Res* **606**, 85-91.
- [111] J.A. Heddle, M. Hite, B. Kirkhart, K. Mavournin, J.T. MacGregor, G.W. Newell and M.F. Salamone (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* **123**, 61-118.
- [112] H. Mozdarani and A.H. Saberi (1994). Induction of cytogenetic adaptive response of mouse bone marrow cells to radiation by therapeutic doses of bleomycin sulfate and actinomycin D as assayed by the micronucleus test. *Cancer Lett* **78**, 141-150.
- [113] A.T. Natarajan and G. Obe (1986). How do in vivo mammalian assays compare to in vitro assays in their ability to detect mutagens? *Mutat Res* **167**, 189-201.

- [114] M.L. Garriott, J.B. Phelps and W.P. Hoffman (2002). A protocol for the in vitro micronucleus test. I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutat Res* **517**, 123-134.
- [115] R.S. Gupta, A. Bromke, D.W. Bryant, R. Gupta, B. Singh and D.R. McCalla (1987). Etoposide (VP16) and teniposide (VM26): novel anticancer drugs, strongly mutagenic in mammalian but not prokaryotic test systems. *Mutagenesis* **2**, 179-186.
- [116] G. Boos and H. Stopper (2000). Genotoxicity of several clinically used topoisomerase II inhibitors. *Toxicol Lett* **116**, 7-16.
- [117] A.P. Guimaraes, F.L. Dias, R.S. Cardoso, S.N. Kronka and E.T. Sakamoto-Hojo (2003). Chromosomal aberrations induced by 5-azacytidine combined with VP-16 (etoposide) in CHO-K1 and XRS-5 cell lines. *Teratog Carcinog Mutagen Suppl* **1**, 171-186.
- [118] R.C. Choudhury, A.K. Palo and P. Sahu (2004). Cytogenetic risk assessment of etoposide from mouse bone marrow. *J Appl Toxicol* **24**, 115-122.
- [119] H. Suzuki, N. Ikeda, K. Kobayashi, Y. Terashima, Y. Shimada, T. Suzuki, T. Hagiwara, S. Hatakeyama, K. Nagaoka, J. Yoshida, Y. Saito, J. Tanaka and M. Hayashi (2005). Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats. A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Mutat Res* **583**, 133-145.
- [120] H.M. Bolt, H. Foth, J.G. Hengstler and G.H. Degen (2004). Carcinogenicity categorization of chemicals-new aspects to be considered in a European perspective. *Toxicol Lett* **151**, 29-41.
- [121] R. Peto, R. Gray, P. Brantom and P. Grasso (1991). Effects on 4080 rats of chronic ingestion of N-nitrosodiethylamine or N-nitrosodimethylamine: a detailed dose-response study. *Cancer Res* **51**, 6415-6451.
- [122] C. Streffer (2004). *Low Dose Exposures in the Environment- Dose-Effect Relations and Risk Evaluation*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

- [123] D. Kirkland, M. Aardema, L. Henderson and L. Muller (2005). Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutat Res* **584**, 1-256.
- [124] D. Kirkland, M. Aardema, L. Muller and H. Makoto (2006). Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens II. Further analysis of mammalian cell results, relative predictivity and tumour profiles. *Mutat Res* **608**, 29-42.
- [125] R.D. Snyder and J.W. Green (2001). A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. *Mutat Res* **488**, 151-169.
- [126] J.S. MacDonald (2004). Human carcinogenic risk evaluation, part IV: assessment of human risk of cancer from chemical exposure using a global weight-of-evidence approach. *Toxicol Sci* **82**, 3-8.
- [127] H. Ellinger-Ziegelbauer, J. Aubrecht, J.C. Kleinjans and H.J. Ahr (2009). Application of toxicogenomics to study mechanisms of genotoxicity and carcinogenicity. *Toxicol Lett* **186**, 36-44.
- [128] H.K. Hamadeh, P.R. Bushel, S. Jayadev, K. Martin, O. DiSorbo, S. Sieber, L. Bennett, R. Tennant, R. Stoll, J.C. Barrett, K. Blanchard, R.S. Paules and C.A. Afshari (2002). Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles. *Toxicol Sci* **67**, 219-231.
- [129] H. Ellinger-Ziegelbauer, B. Stuart, B. Wahle, W. Bomann and H.J. Ahr (2004). Characteristic expression profiles induced by genotoxic carcinogens in rat liver. *Toxicol Sci* **77**, 19-34.
- [130] H. Ellinger-Ziegelbauer, B. Stuart, B. Wahle, W. Bomann and H.J. Ahr (2005). Comparison of the expression profiles induced by genotoxic and nongenotoxic carcinogens in rat liver. *Mutat Res* **575**, 61-84.
- [131] H. Ellinger-Ziegelbauer, H. Gmuender, A. Bandenburg and H.J. Ahr (2008). Prediction of a carcinogenic potential of rat hepatocarcinogens using toxicogenomics analysis of short-term in vivo studies. *Mutat Res* **637**, 23-39.
- [132] M. Iida, C.H. Anna, W.M. Holliday, J.B. Collins, M.L. Cunningham, R.C. Sills and T.R. Devereux (2005). Unique patterns of gene expression changes in liver after treatment of mice for 2 weeks with different known carcinogens and non-carcinogens. *Carcinogenesis* **26**, 689-699.

- [133] K. Nakayama, Y. Kawano, Y. Kawakami, N. Moriwaki, M. Sekijima, M. Otsuka, Y. Yakabe, H. Miyaura, K. Saito, K. Sumida and T. Shirai (2006). Differences in gene expression profiles in the liver between carcinogenic and non-carcinogenic isomers of compounds given to rats in a 28-day repeat-dose toxicity study. *Toxicol Appl Pharmacol* **217**, 299-307.
- [134] A.J. Harris, S.L. Dial and D.A. Casciano (2004). Comparison of basal gene expression profiles and effects of hepatocarcinogens on gene expression in cultured primary human hepatocytes and HepG2 cells. *Mutat Res* **549**, 79-99.
- [135] F. Boess, M. Kamber, S. Romer, R. Gasser, D. Muller, S. Albertini and L. Suter (2003). Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices compared to the in vivo liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of in vitro systems. *Toxicol Sci* **73**, 386-402.
- [136] G. Tuschl, J. Hrach, Y. Walter, P.G. Hewitt and S.O. Mueller (2009). Serum-free collagen sandwich cultures of adult rat hepatocytes maintain liver-like properties long term: a valuable model for in vitro toxicity and drug-drug interaction studies. *Chem Biol Interact* **181**, 124-137.
- [137] G. Tuschl and S.O. Mueller (2006). Effects of cell culture conditions on primary rat hepatocytes-cell morphology and differential gene expression. *Toxicology* **218**, 205-215.
- [138] H. Ellinger-Ziegelbauer, J.M. Fostel, C. Aruga, D. Bauer, E. Boitier, S. Deng, D. Dickinson, A.C. Le Fevre, A.J. Fornace, Jr., O. Grenet, Y. Gu, J.C. Hoflack, M. Shiiyama, R. Smith, R.D. Snyder, C. Spire, G. Tanaka and J. Aubrecht (2009). Characterization and interlaboratory comparison of a gene expression signature for differentiating genotoxic mechanisms. *Toxicol Sci* **110**, 341-352.
- [139] ATCC (2009). HepG2 product description. Stand: keine Angabe. www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HB-8065&Template=cellBiology.
Abgerufen am: 21.05.2010.
- [140] S. Knasmuller, W. Parzefall, R. Sanyal, S. Ecker, C. Schwab, M. Uhl, V. Mersch-Sundermann, G. Williamson, G. Hietsch, T. Langer, F. Darroudi and A.T. Natarajan (1998). Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutat Res* **402**, 185-202.
- [141] S.S. GmbH (2003). Bedienungshandbuch CASY Cell Counter + Analyser System Modell TTC

- [142] FDA (2006). Guidance for Industry: Drug Interaction Studies- Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling. Stand: September 2006.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072101.pdf>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [143] Qiagen (2006). RNeasy Mini Handbuch.
- [144] Thermo Scientific (2008). NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual. Stand: Juli 2008. <http://www.nanodrop.com/Library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>. Abgerufen am: 22.09.2009.
- [145] Agilent Technologies (2010). Lab-on-a-Chip Products Stand: keine Angaben. <http://www.chem.agilent.com/de-DE/Products/instruments/lab-on-a-chip/Pages/default.aspx>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [146] ESD Journal Homepage- Steve Fowler (2009). Lab-on-a-Chip. Stand: keine Angabe. <http://www.esdjournal.com/articles/labchip/Lab.htm>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [147] The University of Queensland- IMB Microarray Facility (2010). RNA Quality Information. Stand: 21.04.2010. <http://microarray.imb.uq.edu.au/rna-quality-information>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [148] Agilent Technologies (2006). Agilent RNA Nano Kit Guide. Stand: 11.08.2006. http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G2938-90034_KitRNA6000Nano_ebook.pdf. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [149] O. Mueller, S. Lightfoot, and A. Schroeder. (2010). Agilent Technologies Broschüre: "RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control". Stand: keine Angabe.
http://www.chem.agilent.com/en-us/Search/Library/_layouts/Agilent/PrimaryDocumentViewer.aspx?whid=37507. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [150] A. Schroeder, O. Mueller, S. Stocker, R. Salowsky, M. Leiber, M. Gassmann, S. Lightfoot, W. Menzel, M. Granzow and T. Ragg (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7, 3.
- [151] Agilent Technologies (2008). Agilent RNA Pico Kit Guide. Stand: 28.04.2008. http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G2938-90046_RNA6000Pico_print.pdf. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [152] Roche (2007). Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit Manual.

- [153] L.G. Lee, C.R. Connell and W. Bloch (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* **21**, 3761-3766.
- [154] Applied Biosystems (2010). Homepage Applied Biosystems. Stand: keine Angabe. www.appliedbiosystems.com. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [155] T.A. Schild (Applied Biosystems) (2010). 7700 SDS Workshop- Einführung in die Real-Time TaqMan™ PCR-Technologie. Stand: keine Angaben. <http://www.core-facility.uni-freiburg.de/lc480/lc480obj/sdsman>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [156] Innovations Issue 2 (2007). New TaqMan® Gene Signature Panels. Stand: keine Angabe. http://www.mckinneychicago.com/extranet/abiinnovations/02/new_products.html. Abgerufen am: 09.09.2009.
- [157] K.J. Livak and T.D. Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
- [158] L. Richert, G. Tuschl, C. Abadie, N. Blanchard, D. Pekthong, G. Manton, J.C. Weber and S.O. Mueller (2009). Use of mRNA expression to detect the induction of drug metabolising enzymes in rat and human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **235**, 86-96.
- [159] Illumina, Inc. (2010). Homepage Illumina. Stand: 2010. <http://www.illumina.com/>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [160] M. Barnes, J. Freudenberg, S. Thompson, B. Aronow and P. Pavlidis (2005). Experimental comparison and cross-validation of the Affymetrix and Illumina gene expression analysis platforms. *Nucleic Acids Res* **33**, 5914-5923.
- [161] Illumina, Inc. (2006). Human-6 v2 and HumanRef-8 v2 Expression BeadChips. Stand: 23.12.2006. <http://www.switchtoi.com/pdf/GXHuman6-8v2Datasheet.pdf>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [162] Illumina, Inc. (2006). RatRef-12 Expression BeadChip. Stand: 20.11.2006. <http://www.switchtoi.com/pdf/GXRatRef-12DataSheet.pdf>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [163] K. Kuhn, S.C. Baker, E. Chudin, M.H. Lieu, S. Oeser, H. Bennett, P. Rigault, D. Barker, T.K. McDaniel and M.S. Chee (2004). A novel, high-performance random array platform for quantitative gene expression profiling. *Genome Res* **14**, 2347-2356.

- [164] F.J. Steemers and K.L. Gunderson (2005). Illumina, Inc. *Pharmacogenomics* **6**, 777-782.
- [165] K.L. Gunderson, S. Kruglyak, M.S. Graige, F. Garcia, B.G. Kermani, C. Zhao, D. Che, T. Dickinson, E. Wickham, J. Bierle, D. Doucet, M. Milewski, R. Yang, C. Siegmund, J. Haas, L. Zhou, A. Oliphant, J.B. Fan, S. Barnard and M.S. Chee (2004). Decoding randomly ordered DNA arrays. *Genome Res* **14**, 870-877.
- [166] M.D. Burke, S. Thompson, C.R. Elcombe, J. Halpert, T. Haaparanta and R.T. Mayer (1985). Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem Pharmacol* **34**, 3337-3345.
- [167] J. Lubinski, O.P. Flint and S.K. Durham (1994). In vivo and in vitro studies of rat liver cytochrome P450 induction. II: In vitro induction by phenobarbital and 3-methylcholanthrene measured in an automated 24-well plate assay for cytochrome P450-dependent activity (pentoxyresorufin O-depentylase and ethoxyresorufin O-deethylase). *In vitro Toxicology* **7**, 13-23.
- [168] Promega (2009). Technical Bulletin P450-Glo™ Assays. Stand: Dezember 2009. <http://www.promega.com/tbs/tb325/tb325.pdf>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [169] Promega (2009). P450 Glo™ Technical Bulletin.
- [170] Promega (2009). CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Technical Bulletin.
- [171] ActiveMotif (2009). TransAM™ p53 Transcription Factor Assay Kits Manual.
- [172] A.L. Okorokov and E.V. Orlova (2009). Structural biology of the p53 tumour suppressor. *Curr Opin Struct Biol* **19**, 197-202.
- [173] W.S. el-Deiry, S.E. Kern, J.A. Pietenpol, K.W. Kinzler and B. Vogelstein (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* **1**, 45-49.
- [174] ActiveMotif (2009). Homepage Active Motif- TransAM™ Transcription Factor ELISAs. Stand: keine Angabe.
www.activemotif.com/de/catalog/180/transam-transcription-factor-elisas.html. Abgerufen am: 22.09.2009.
- [175] Sigma-Aldrich (2010). 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Product description Stand: 2010. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=860336|ALDRICH&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC. Abgerufen am: 21.05.2010.

- [176] ActiveMotif (2009). Nuclear Extract Kit Manual.
- [177] M.M. Bradford (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- [178] S.J. Compton and C.G. Jones (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* **151**, 369-374.
- [179] J.J. Sedmak and S.E. Grossberg (1977). A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem* **79**, 544-552.
- [180] Bio-Rad (2010). Quick Start™ Bradford Protein Assay Instruction Manual. Stand: keine Angabe.
http://www3.bio-rad.com/cmc_upload/Literature/55685/4110065A.pdf.
Abgerufen am: 21.05.2010.
- [181] W. Timischl (2000). *Biostatistik: Eine Einführung für Biologen und Mediziner* Springer, Wien.
- [182] W. Li, Y.J. Suh, and J. Zhang (2006). Does Logarithm Transformation of Microarray Data Affect Ranking Order of Differentially Expressed Genes? Stand: keine Angabe. http://embc2006.njit.edu/pdf/1153_Li.pdf. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [183] P.J. Giles and D. Kipling (2003). Normality of oligonucleotide microarray data and implications for parametric statistical analyses. *Bioinformatics* **19**, 2254-2262.
- [184] S. Knudsen (2004). *Guide to Analysis of DNA Microarray Data*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [185] NCBI (2009). Entrez Gene Datenbank, NCBI. Stand: keine Angabe. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [186] NCBI (2010). Ace View Gendatenbank. Stand: Juli 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/index.html>. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [187] Illumina (2004). BeadStation 500X Gene Expression System Manual.
- [188] S. Draghici (2003). *Data Analysis Tools for DNA Microarrays* Chapman and Hall/CRC Boca Raton.
- [189] W. Cleveland (1979). Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J Amer Stat Assoc* **74**, 829-836.
- [190] M. Rudolf and W. Kuhlisch (2008). *Biostatistik- Eine Einführung für Biowissenschaftler*. Pearson Studium, München.

- [191] Y. Pawitan, S. Michiels, S. Koscielny, A. Gusnanto and A. Ploner (2005). False discovery rate, sensitivity and sample size for microarray studies. *Bioinformatics* **21**, 3017-3024.
- [192] Y. Benjamini, D. Drai, G. Elmer, N. Kafkafi and I. Golani (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* **125**, 279-284.
- [193] J.A. Hartigan and M.A. Wong (1979). A K-Means Clustering Algorithm. *Appl Stat* **28**, 100-108.
- [194] E. Alpaydin (2008). *Maschinelles Lernen*. Oldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH, München.
- [195] Clemmensen *et al.* (2008). Sparse Discriminant Analysis. Stand: keine Angabe. http://www-stat.stanford.edu/~hastie/Papers/sda_line.pdf. Abgerufen am: 21.05.2010.
- [196] P. Larranaga, B. Calvo, R. Santana, C. Bielza, J. Galdiano, I. Inza, J.A. Lozano, R. Armananzas, G. Santafe, A. Perez and V. Robles (2006). Machine learning in bioinformatics. *Brief Bioinform* **7**, 86-112.
- [197] C. Ambrose and G.J. McLachlan (2002). Selection bias in gene extraction on the basis of microarray gene-expression data. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 6562-6566.
- [198] Genedata (2005). Expressionist[®] Analyst Application Note Classification.
- [199] A. Benzinger, N. Muster, H.B. Koch, J.R. Yates, 3rd and H. Hermeking (2005). Targeted proteomic analysis of 14-3-3 sigma, a p53 effector commonly silenced in cancer. *Mol Cell Proteomics* **4**, 785-795.
- [200] C.G. Takizawa and D.O. Morgan (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 658-665.
- [201] H. Yang, Y. Zhang, R. Zhao, Y.Y. Wen, K. Fournier, H.B. Wu, H.Y. Yang, J. Diaz, C. Laronga and M.H. Lee (2006). Negative cell cycle regulator 14-3-3sigma stabilizes p27 Kip1 by inhibiting the activity of PKB/Akt. *Oncogene* **25**, 4585-4594.
- [202] M. Vairapandi, A.G. Balliet, B. Hoffman and D.A. Liebermann (2002). GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *J Cell Physiol* **192**, 327-338.

- [203] F. Carrier, P.T. Georgel, P. Pourquier, M. Blake, H.U. Kontny, M.J. Antinore, M. Gariboldi, T.G. Myers, J.N. Weinstein, Y. Pommier and A.J. Fornace, Jr. (1999). Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin. *Mol Cell Biol* **19**, 1673-1685.
- [204] D.A. Liebermann and B. Hoffman (2008). Gadd45 in stress signaling. *J Mol Signal* **3**, 15.
- [205] S.H. Kaufmann and M.O. Hengartner (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* **11**, 526-534.
- [206] C.P. Baines, R.A. Kaiser, T. Sheiko, W.J. Craigen and J.D. Molkentin (2007). Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* **9**, 550-555.
- [207] M. Perretti and E. Solito (2004). Annexin I and neutrophil apoptosis. *Biochem Soc Trans* **32**, 507-510.
- [208] J.B. Telliez, K.M. Bean and L.L. Lin (2000). LRDD, a novel leucine rich repeat and death domain containing protein. *Biochim Biophys Acta* **1478**, 280-288.
- [209] Y. Lin, W. Ma and S. Benchimol (2000). Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nat Genet* **26**, 122-127.
- [210] L. Van Aelst and C. D'Souza-Schorey (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* **11**, 2295-2322.
- [211] R. Rock, A.C. Heinrich, N. Schumacher and M. Gessler (2005). Fjx1: a notch-inducible secreted ligand with specific binding sites in developing mouse embryos and adult brain. *Dev Dyn* **234**, 602-612.
- [212] Y. Zong, A. Panikkar, J. Xu, A. Antoniou, P. Raynaud, F. Lemaigre and B.Z. Stanger (2009). Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development* **136**, 1727-1739.
- [213] K. Planutis, M. Planutiene, M.P. Moyer, A.V. Nguyen, C.A. Perez and R.F. Holcombe (2007). Regulation of norrin receptor frizzled-4 by Wnt2 in colon-derived cells. *BMC Cell Biol* **8**, 12.
- [214] M.H. Kubbutat and K.H. Vousden (1998). Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. *Mol Med Today* **4**, 250-256.
- [215] C. Brantley-Finley, C.S. Lyle, L. Du, M.E. Goodwin, T. Hall, D. Szwedo, G.P. Kaushal and T.C. Chambers (2003). The JNK, ERK and p53 pathways play distinct roles in apoptosis mediated by the antitumor agents vinblastine, doxorubicin, and etoposide. *Biochem Pharmacol* **66**, 459-469.

- [216] Y.R. Seo and H.J. Jung (2004). The potential roles of p53 tumor suppressor in nucleotide excision repair (NER) and base excision repair (BER). *Exp Mol Med* **36**, 505-509.
- [217] M. Ljungman, F. Zhang, F. Chen, A.J. Rainbow and B.C. McKay (1999). Inhibition of RNA polymerase II as a trigger for the p53 response. *Oncogene* **18**, 583-592.
- [218] M. Ljungman, H.M. O'Hagan and M.T. Paulsen (2001). Induction of ser15 and lys382 modifications of p53 by blockage of transcription elongation. *Oncogene* **20**, 5964-5971.
- [219] N.H. Lents, L.W. Wheeler, J.J. Baldassare and B.D. Dynlacht (2008). Identification and characterization of a novel Mdm2 splice variant acutely induced by the chemotherapeutic agents adriamycin and actinomycin D. *Cell Cycle* **7**, 1580-1586.
- [220] S. Wang, C. Tian, T. Xiao, G. Xing, F. He, L. Zhang and H. Chen (2010). Differential regulation of Apak by various DNA damage signals. *Mol Cell Biochem* **333**, 181-187.
- [221] M. Dostalek, K.D. Hardy, G.L. Milne, J.D. Morrow, C. Chen, F.J. Gonzalez, J. Gu, X. Ding, D.A. Johnson, J.A. Johnson, M.V. Martin and F.P. Guengerich (2008). Development of oxidative stress by cytochrome P450 induction in rodents is selective for barbiturates and related to loss of pyridine nucleotide-dependent protective systems. *J Biol Chem* **283**, 17147-17157.
- [222] T.M. Buttke and P.A. Sandstrom (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* **15**, 7-10.
- [223] Y. Dietz (2009). *Diplomarbeit: Nachweis der Genotoxizität in vitro- Die Rolle der metabolischen Aktivierung*. Universität Mainz.
- [224] L. Richert, G. Tuschl, C. Viollon-Abadie, N. Blanchard, A. Bonet, B. Heyd, N. Halkic, E. Wimmer, H. Dolgos and S.O. Mueller (2008). Species differences in the response of liver drug-metabolizing enzymes to (S)-4-O-tolylsulfanyl-2-(4-trifluoromethyl-phenoxy)-butyric acid (EMD 392949) in vivo and in vitro. *Drug Metab Dispos* **36**, 702-714.
- [225] J.D. Hayes and D.J. Pulford (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **30**, 445-600.
- [226] T.P. Mulder, D.A. Court and W.H. Peters (1999). Variability of glutathione S-transferase alpha in human liver and plasma. *Clin Chem* **45**, 355-359.

- [227] B. Ketterer, J.M. Harris, G. Talaska, D.J. Meyer, S.E. Pemble, J.B. Taylor, N.P. Lang and F.F. Kadlubar (1992). The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environ Health Perspect* **98**, 87-94.
- [228] H. Raza, M.A. Robin, J.K. Fang and N.G. Avadhani (2002). Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem J* **366**, 45-55.
- [229] S.N. Silva, A.P. Azevedo, V. Teixeira, J.E. Pina, J. Rueff and J.F. Gaspar (2009). The role of GSTA2 polymorphisms and haplotypes in breast cancer susceptibility: a case-control study in the Portuguese population. *Oncol Rep* **22**, 593-598.
- [230] C.D. King, G.R. Rios, M.D. Green and T.R. Tephly (2000). UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab* **1**, 143-161.
- [231] C. Frank, M.M. Gonzalez, C. Oinonen, T.W. Dunlop and C. Carlberg (2003). Characterization of DNA complexes formed by the nuclear receptor constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* **278**, 43299-43310.
- [232] J. Zhang, W. Huang, M. Qatanani, R.M. Evans and D.D. Moore (2004). The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity. *J Biol Chem* **279**, 49517-49522.
- [233] Y. Chen, G. Kissling, M. Negishi and J.A. Goldstein (2005). The nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor cross-talk with hepatic nuclear factor 4alpha to synergistically activate the human CYP2C9 promoter. *J Pharmacol Exp Ther* **314**, 1125-1133.
- [234] S.S. Ferguson, Y. Chen, E.L. LeCluyse, M. Negishi and J.A. Goldstein (2005). Human CYP2C8 is transcriptionally regulated by the nuclear receptors constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, glucocorticoid receptor, and hepatic nuclear factor 4alpha. *Mol Pharmacol* **68**, 747-757.
- [235] H. Wang and M. Negishi (2003). Transcriptional regulation of cytochrome p450 2B genes by nuclear receptors. *Curr Drug Metab* **4**, 515-525.
- [236] C. Xu, C.Y. Li and A.N. Kong (2005). Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* **28**, 249-268.
- [237] Y.E. Timsit and M. Negishi (2007). CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. *Steroids* **72**, 231-246.
- [238] S.A. Kliewer, B. Goodwin and T.M. Willson (2002). The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev* **23**, 687-702.

- [239] L.F. Michael, J.M. Schkeryantz and T.P. Burris (2005). The pharmacology of LXR. *Mini Rev Med Chem* **5**, 729-740.
- [240] C.P. Martinez-Jimenez, J.V. Castell, M.J. Gomez-Lechon and R. Jover (2006). Transcriptional activation of CYP2C9, CYP1A1, and CYP1A2 by hepatocyte nuclear factor 4alpha requires coactivators peroxisomal proliferator activated receptor-gamma coactivator 1alpha and steroid receptor coactivator 1. *Mol Pharmacol* **70**, 1681-1692.
- [241] I. Bantounas, L.A. Phylactou and J.B. Uney (2004). RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *J Mol Endocrinol* **33**, 545-557.
- [242] Y. Kamiyama, T. Matsubara, K. Yoshinari, K. Nagata, H. Kamimura and Y. Yamazoe (2007). Role of human hepatocyte nuclear factor 4alpha in the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters in human hepatocytes assessed by use of small interfering RNA. *Drug Metab Pharmacokinet* **22**, 287-298.
- [243] J.V. Castell, R. Jover, C.P. Martinez-Jimenez and M.J. Gomez-Lechon (2006). Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2**, 183-212.
- [244] M.U. De Martino, N. Bhattacharyya, S. Alesci, T. Ichijo, G.P. Chrousos and T. Kino (2004). The glucocorticoid receptor and the orphan nuclear receptor chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II interact with and mutually affect each other's transcriptional activities: implications for intermediary metabolism. *Mol Endocrinol* **18**, 820-833.
- [245] P. Honkakoski and M. Negishi (2000). Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J* **347**, 321-337.
- [246] J.M. Pascussi, L. Drocourt, J.M. Fabre, P. Maurel and M.J. Vilarem (2000). Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor-alpha expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators. *Mol Pharmacol* **58**, 361-372.
- [247] J.D. Schuetz, E.G. Schuetz, J.V. Thottassery, P.S. Guzelian, S. Strom and D. Sun (1996). Identification of a novel dexamethasone responsive enhancer in the human CYP3A5 gene and its activation in human and rat liver cells. *Mol Pharmacol* **49**, 63-72.

- [248] S. Fang, J. Miao, L. Xiang, B. Ponugoti, E. Treuter and J.K. Kemper (2007). Coordinated recruitment of histone methyltransferase G9a and other chromatin-modifying enzymes in SHP-mediated regulation of hepatic bile acid metabolism. *Mol Cell Biol* **27**, 1407-1424.
- [249] Y.K. Lee, H. Dell, D.H. Dowhan, M. Hadzopoulou-Cladaras and D.D. Moore (2000). The orphan nuclear receptor SHP inhibits hepatocyte nuclear factor 4 and retinoid X receptor transactivation: two mechanisms for repression. *Mol Cell Biol* **20**, 187-195.
- [250] R.B. Kim (2003). Organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporter family and drug disposition. *Eur J Clin Invest* **33 Suppl 2**, 1-5.
- [251] J.W. Jonker and A.H. Schinkel (2004). Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther* **308**, 2-9.
- [252] M. Trauner and J.L. Boyer (2003). Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* **83**, 633-671.
- [253] P. Borst, C. de Wolf and K. van de Wetering (2007). Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflugers Arch* **453**, 661-673.
- [254] M. Dean, A. Rzhetsky and R. Allikmets (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* **11**, 1156-1166.
- [255] A. van Helvoort, A.J. Smith, H. Sprong, I. Fritzsche, A.H. Schinkel, P. Borst and G. van Meer (1996). MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* **87**, 507-517.
- [256] P. Czekaj (2000). Phenobarbital-induced expression of cytochrome P450 genes. *Acta Biochim Pol* **47**, 1093-1105.
- [257] K.W. Bock and B.S. Bock-Hennig (1987). Differential induction of human liver UDP-glucuronosyltransferase activities by phenobarbital-type inducers. *Biochem Pharmacol* **36**, 4137-4143.
- [258] S. Hendrich, S.K. Krueger, H.W. Chen and L. Cook (1991). Phenobarbital increases rat hepatic prostaglandin F2 alpha, glutathione S-transferase activity and oxidative stress. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **42**, 45-50.
- [259] T. Kawamoto, T. Sueyoshi, I. Zelko, R. Moore, K. Washburn and M. Negishi (1999). Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol* **19**, 6318-6322.

- [260] J. Cheng, X. Ma, K.W. Krausz, J.R. Idle and F.J. Gonzalez (2009). Rifampicin-activated human pregnane X receptor and CYP3A4 induction enhance acetaminophen-induced toxicity. *Drug Metab Dispos* **37**, 1611-1621.
- [261] H. Wang, S. Faucette, T. Sueyoshi, R. Moore, S. Ferguson, M. Negishi and E.L. LeCluyse (2003). A novel distal enhancer module regulated by pregnane X receptor/constitutive androstane receptor is essential for the maximal induction of CYP2B6 gene expression. *J Biol Chem* **278**, 14146-14152.
- [262] Y. Chen and J.A. Goldstein (2009). The transcriptional regulation of the human CYP2C genes. *Curr Drug Metab* **10**, 567-578.
- [263] F.J. Gonzalez (2007). The 2006 Bernard B. Brodie Award Lecture. Cyp2e1. *Drug Metab Dispos* **35**, 1-8.
- [264] T.R. Knight, S. Choudhuri and C.D. Klaassen (2008). Induction of hepatic glutathione S-transferases in male mice by prototypes of various classes of microsomal enzyme inducers. *Toxicol Sci* **106**, 329-338.
- [265] W.G. Schoonen, W.M. Westerink and G.J. Horbach (2009). High-throughput screening for analysis of in vitro toxicity. *EXS* **99**, 401-452.
- [266] W.M. Westerink and W.G. Schoonen (2007). Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* **21**, 1592-1602.
- [267] J.A. Pitt, L. Feng, B.D. Abbott, J. Schmid, R.E. Batt, T.G. Costich, S.T. Koury and D.P. Bofinger (2001). Expression of AhR and ARNT mRNA in cultured human endometrial explants exposed to TCDD. *Toxicol Sci* **62**, 289-298.
- [268] W.M. Westerink and W.G. Schoonen (2007). Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* **21**, 1581-1591.
- [269] A.E. Vickers, V. Fischer, S. Connors, R.L. Fisher, J.P. Baldeck, G. Maurer and K. Brendel (1992). Cyclosporin A metabolism in human liver, kidney, and intestine slices. Comparison to rat and dog slices and human cell lines. *Drug Metab Dispos* **20**, 802-809.
- [270] S. Wilkening, F. Stahl and A. Bader (2003). Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos* **31**, 1035-1042.
- [271] H. Doostdar, S.J. Duthie, M.D. Burke, W.T. Melvin and M.H. Grant (1988). The influence of culture medium composition on drug metabolising enzyme activities of the human liver derived Hep G2 cell line. *FEBS Lett* **241**, 15-18.

- [272] N.J. Hewitt and P. Hewitt (2004). Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines. *Xenobiotica* **34**, 243-256.
- [273] P. Borst, R. Evers, M. Kool and J. Wijnholds (2000). A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1295-1302.
- [274] D.W. Loe, R.K. Stewart, T.E. Massey, R.G. Deeley and S.P. Cole (1997). ATP-dependent transport of aflatoxin B1 and its glutathione conjugates by the product of the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Mol Pharmacol* **51**, 1034-1041.
- [275] W.M. Westerink, J.C. Stevenson, G.J. Horbach and W.G. Schoonen (2010). The development of RAD51C, Cystatin A, p53 and Nrf2 luciferase-reporter assays in metabolically competent HepG2 cells for the assessment of mechanism-based genotoxicity and of oxidative stress in the early research phase of drug development. *Mutat Res* **696**, 21-40.
- [276] P.J. Duerksen-Hughes, J. Yang and O. Ozcan (1999). p53 induction as a genotoxic test for twenty-five chemicals undergoing in vivo carcinogenicity testing. *Environ Health Perspect* **107**, 805-812.
- [277] J. Yang and P. Duerksen-Hughes (1998). A new approach to identifying genotoxic carcinogens: p53 induction as an indicator of genotoxic damage. *Carcinogenesis* **19**, 1117-1125.
- [278] A.P. Koley, J.T. Buters, R.C. Robinson, A. Markowitz and F.K. Friedman (1997). Differential mechanisms of cytochrome P450 inhibition and activation by alpha-naphthoflavone. *J Biol Chem* **272**, 3149-3152.
- [279] M.T. Schellenberger, N. Grova, S. Willieme, S. Farinelle, E.J. Prodhomme and C.P. Muller (2009). Modulation of benzo[a]pyrene induced immunotoxicity in mice actively immunized with a B[a]P-diphtheria toxoid conjugate. *Toxicol Appl Pharmacol* **240**, 37-45.
- [280] O. Pelkonen, J. Maenpaa, P. Taavitsainen, A. Rautio and H. Raunio (1998). Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* **28**, 1203-1253.
- [281] M. Pirlich, C. Muller, G. Sandig, M. Jakstadt, N. Sitte, H. Lochs and T. Grune (2002). Increased proteolysis after single-dose exposure with hepatotoxins in HepG2 cells. *Free Radic Biol Med* **33**, 283-291.

- [282] M. Santostefano, M. Merchant, L. Arellano, V. Morrison, M.S. Denison and S. Safe (1993). alpha-Naphthoflavone-induced CYP1A1 gene expression and cytosolic aryl hydrocarbon receptor transformation. *Mol Pharmacol* **43**, 200-206.
- [283] S.F. Zhou (2008). Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4. *Curr Drug Metab* **9**, 310-322.
- [284] Y.F. Ueng, T. Shimada, H. Yamazaki and F.P. Guengerich (1995). Oxidation of aflatoxin B1 by bacterial recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chem Res Toxicol* **8**, 218-225.
- [285] S. Knasmuller, V. Mersch-Sundermann, S. Kevekordes, F. Darroudi, W.W. Huber, C. Hoelzl, J. Bichler and B.J. Majer (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology* **198**, 315-328.
- [286] K. Rostkowska, K. Zwierz, A. Rozanski, J. Moniuszko-Jakoniuk and A. Roszczenko (1998). Formation and Metabolism of N-Nitrosamines. *Pol J Environ Stud* **7**, 321-325.
- [287] K. Wiench, E. Frei, P. Schroth and M. Wiessler (1992). 1-C-glucuronidation of N-nitrosodiethylamine and N-nitrosomethyl-n-pentylamine in vivo and in primary hepatocytes from rats pretreated with inducers. *Carcinogenesis* **13**, 867-872.
- [288] E.M. Leslie, K. Ito, P. Upadhyaya, S.S. Hecht, R.G. Deeley and S.P. Cole (2001). Transport of the beta -O-glucuronide conjugate of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) by the multidrug resistance protein 1 (MRP1). Requirement for glutathione or a non-sulfur-containing analog. *J Biol Chem* **276**, 27846-27854.
- [289] N.C. Reich (2007). STAT dynamics. *Cytokine Growth Factor Rev* **18**, 511-518.
- [290] S. Chu and T.J. Ferro (2005). Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation. *Gene* **348**, 1-11.
- [291] P.A. Townsend, M.S. Cragg, S.M. Davidson, J. McCormick, S. Barry, K.M. Lawrence, R.A. Knight, M. Hubank, P.L. Chen, D.S. Latchman and A. Stephanou (2005). STAT-1 facilitates the ATM activated checkpoint pathway following DNA damage. *J Cell Sci* **118**, 1629-1639.

- [292] T. Yoshimoto, N. Morishima, I. Mizoguchi, M. Shimizu, H. Nagai, S. Oniki, M. Oka, C. Nishigori and J. Mizuguchi (2008). Antiproliferative activity of IL-27 on melanoma. *J Immunol* **180**, 6527-6535.
- [293] S. Pflanz, L. Hibbert, J. Mattson, R. Rosales, E. Vaisberg, J.F. Bazan, J.H. Phillips, T.K. McClanahan, R. de Waal Malefyt and R.A. Kastelein (2004). WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* **172**, 2225-2231.
- [294] F.V. Cromme, J. Airey, M.T. Heemels, H.L. Ploegh, P.J. Keating, P.L. Stern, C.J. Meijer and J.M. Walboomers (1994). Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J Exp Med* **179**, 335-340.
- [295] J.B. Andersen and B.A. Hassel (2006). The interferon regulated ubiquitin-like protein, ISG15, in tumorigenesis: friend or foe? *Cytokine Growth Factor Rev* **17**, 411-421.
- [296] Y.J. Jeon, H.M. Yoo and C.H. Chung (2010). ISG15 and immune diseases. *Biochim Biophys Acta* **1802**, 485-496.
- [297] G. Krikun, F. Schatz, N. Mackman, S. Guller, R. Demopoulos and C.J. Lockwood (2000). Regulation of tissue factor gene expression in human endometrium by transcription factors Sp1 and Sp3. *Mol Endocrinol* **14**, 393-400.
- [298] A. Tapias, C.J. Ciudad, I.B. Roninson and V. Noe (2008). Regulation of Sp1 by cell cycle related proteins. *Cell Cycle* **7**, 2856-2867.
- [299] B.A. Olofsson, C.M. Kelly, J. Kim, S.M. Hornsby and J. Azizkhan-Clifford (2007). Phosphorylation of Sp1 in response to DNA damage by ataxia telangiectasia-mutated kinase. *Mol Cancer Res* **5**, 1319-1330.
- [300] J.Y. Chuang, C.H. Wu, M.D. Lai, W.C. Chang and J.J. Hung (2009). Overexpression of Sp1 leads to p53-dependent apoptosis in cancer cells. *Int J Cancer* **125**, 2066-2076.
- [301] A. Quinones, K.U. Dobberstein and N.G. Rainov (2003). The egr-1 gene is induced by DNA-damaging agents and non-genotoxic drugs in both normal and neoplastic human cells. *Life Sci* **72**, 2975-2992.
- [302] A. Kronen-Herzig, S. Mittal, K. Yule, H. Liang, C. English, R. Urcis, T. Soni, E.D. Adamson and D. Mercola (2005). Early growth response 1 acts as a tumor suppressor in vivo and in vitro via regulation of p53. *Cancer Res* **65**, 5133-5143.

- [303] K. Tsugawa, M.K. Jones, T. Akahoshi, W.S. Moon, Y. Maehara, M. Hashizume, I.J. Sarfeh and A.S. Tarnawski (2003). Abnormal PTEN expression in portal hypertensive gastric mucosa: a key to impaired PI 3-kinase/Akt activation and delayed injury healing? *FASEB J* **17**, 2316-2318.
- [304] Y.L. Chua, Y. Ito, J.C. Pole, S. Newman, S.F. Chin, R.C. Stein, I.O. Ellis, C. Caldas, M.J. O'Hare, A. Murrell and P.A. Edwards (2009). The NRG1 gene is frequently silenced by methylation in breast cancers and is a strong candidate for the 8p tumour suppressor gene. *Oncogene* **28**, 4041-4052.
- [305] Y. Li, G.I. Tennekoon, M. Birnbaum, M.A. Marchionni and J.L. Rutkowski (2001). Neuregulin signaling through a PI3K/Akt/Bad pathway in Schwann cell survival. *Mol Cell Neurosci* **17**, 761-767.
- [306] M.G. Melaragno, M.E. Cavet, C. Yan, L.K. Tai, Z.G. Jin, J. Haendeler and B.C. Berk (2004). Gas6 inhibits apoptosis in vascular smooth muscle: role of Axl kinase and Akt. *J Mol Cell Cardiol* **37**, 881-887.
- [307] K.K. Ding, Z.F. Shang, C. Hao, Q.Z. Xu, J.J. Shen, C.J. Yang, Y.H. Xie, C. Qiao, Y. Wang, L.L. Xu and P.K. Zhou (2009). Induced expression of the IER5 gene by gamma-ray irradiation and its involvement in cell cycle checkpoint control and survival. *Radiat Environ Biophys* **48**, 205-213.
- [308] Q.Y. Xu, Y. Gao, Y. Liu, W.Z. Yang and X.Y. Xu (2008). Identification of differential gene expression profiles of radioresistant lung cancer cell line established by fractionated ionizing radiation in vitro. *Chin Med J (Engl)* **121**, 1830-1837.
- [309] I. Kuwabara, Y. Kuwabara, R.Y. Yang, M. Schuler, D.R. Green, B.L. Zuraw, D.K. Hsu and F.T. Liu (2002). Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release. *J Biol Chem* **277**, 3487-3497.
- [310] F. Bernerd, A. Sarasin and T. Magnaldo (1999). Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11329-11334.
- [311] E.A. Facher, M.J. Becich, A. Deka and J.C. Law (1997). Association between human cancer and two polymorphisms occurring together in the p21Waf1/Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Cancer* **79**, 2424-2429.

- [312] H.T. Wang, J.P. Kong, F. Ding, X.Q. Wang, M.R. Wang, L.X. Liu, M. Wu and Z.H. Liu (2003). Analysis of gene expression profile induced by EMP-1 in esophageal cancer cells using cDNA Microarray. *World J Gastroenterol* **9**, 392-398.
- [313] M. Alaminos, V. Davalos, S. Roperio, F. Setien, M.F. Paz, M. Herranz, M.F. Fraga, J. Mora, N.K. Cheung, W.L. Gerald and M. Esteller (2005). EMP3, a myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma. *Cancer Res* **65**, 2565-2571.
- [314] Z. Li, S. Srivastava, X. Yang, S. Mittal, P. Norton, J. Resau, B. Haab and C. Chan (2007). A hierarchical approach employing metabolic and gene expression profiles to identify the pathways that confer cytotoxicity in HepG2 cells. *BMC Syst Biol* **1**, 21.
- [315] M.F. Calmon, R.V. Rodrigues, C.M. Kaneto, R.P. Moura, S.D. Silva, L.D. Mota, D.G. Pinheiro, C. Torres, A.F. de Carvalho, P.M. Cury, F.D. Nunes, I.N. Nishimoto, F.A. Soares, A.M. da Silva, L.P. Kowalski, H. Brentani, C.F. Zanelli, W.A. Silva, Jr., P. Rahal, E.H. Tajara, D.M. Carraro, A.A. Camargo and S.R. Valentini (2009). Epigenetic silencing of CRABP2 and MX1 in head and neck tumors. *Neoplasia* **11**, 1329-1339.
- [316] E. Bretschneider, B. Uzonyi, A.A. Weber, J.W. Fischer, R. Pape, K. Lotzer and K. Schror (2007). Human vascular smooth muscle cells express functionally active endothelial cell protein C receptor. *Circ Res* **100**, 255-262.
- [317] D. Alfano, P. Franco, I. Vocca, N. Gambi, V. Pisa, A. Mancini, M. Caputi, M.V. Carriero, I. Iaccarino and M.P. Stoppelli (2005). The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis. *Thromb Haemost* **93**, 205-211.
- [318] T. Sanner and E. Dybing (2005). Comparison of carcinogenic and in vivo genotoxic potency estimates. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **96**, 131-139.
- [319] ECVAM (2010). Homepage des ECVAM. Stand: keine Angabe. <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu/>. Abgerufen am: 31.05.2010.
- [320] J. Low, S. Huang, W. Blosser, M. Dowless, J. Burch, B. Neubauer and L. Stancato (2008). High-content imaging characterization of cell cycle therapeutics through in vitro and in vivo subpopulation analysis. *Mol Cancer Ther* **7**, 2455-2463.

- [321] K.H. Vousden and D.P. Lane (2007). p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 275-283.
- [322] A.C. Dudley, D. Thomas, J. Best and A. Jenkins (2004). The STATs in cell stress-type responses. *Cell Commun Signal* **2**, 8.
- [323] P.W. Hastwell, L.-L. Chai, K.J. Roberts, T.W. Webster, J.S. Harvey, R.W. Rees and R.M. Walmsley (2006). High-specificity and high-sensitivity genotoxicity assessment in a human cell line: Validation of the GreenScreen HC ADD45a-GFP genotoxicity assay. *Mutat Res* **607**, 160-175.
- [324] N. Billinton, P.W. Hastwell, D. Beerens, L. Birrell, P. Ellis, S. Maskell, T.W. Webster, S. Windebank, F. Woestenborghs, A.M. Lynch, A.D. Scott, D.J. Tweats, J. van Gompel, R.W. Rees and R.M. Walmsley (2008). Interlaboratory assessment of the GreenScreen HC GADD45a-GFP genotoxicity screening assay: an enabling study for independent validation as an alternative method. *Mutat Res* **653**, 23-33.
- [325] Medicyte GmbH (2009). UPCYTE[®] CELLS AS A NEW AND PROMISING TOOL FOR METABOLIC AND TOXICITY PROFILING. Stand: keine Angabe.
http://www.medicyte.de/images/downloads/pdf/Poster_Medicyte_70x100_V2.pdf. Abgerufen am: 26.05.2010.
- [326] K.P. Kanebratt and T.B. Andersson (2008). Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab Dispos* **36**, 1444-1452.
- [327] S. Yoshitomi, K. Ikemoto, J. Takahashi, H. Miki, M. Namba and S. Asahi (2001). Establishment of the transformants expressing human cytochrome P450 subtypes in HepG2, and their applications on drug metabolism and toxicology. *Toxicol In Vitro* **15**, 245-256.
- [328] H.M. Bolt and J.G. Hengstler (2008). Most cited articles in the Archives of Toxicology: the debate about possibilities and limitations of in vitro toxicity tests and replacement of in vivo studies. *Arch Toxicol* **82**, 881-883.

6 Publikationen

Artikel

K. Boehme, Y. Dietz, P. Hewitt and S.O. Mueller (2010). Activation of P53 in human hepatoma cells as surrogate to detect mutagens and promutagens *in vitro*. Eingereicht zur Veröffentlichung.

K. Boehme, S. Simon, und S.O. Mueller (2009). Gene expression profiling in Ishikawa cells: A fingerprint for estrogen active compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* **236**, 85-96.

S. Simon, K. Boehme, S.U. Schmidt und S.O. Mueller (2008). Characterization of Estrogen-Active Compounds and Estrogenic Signaling by Global Gene Expression Profiling *In Vitro*. *Toxicogenomics*. Wiley, Chichester, West Sussex/ United Kingdom.

Poster

K. Boehme, Y. Dietz, P.G. Hewitt and S.O. Mueller (2009). A novel *in vitro* system for the toxicological evaluation of genotoxic compounds. Eurotox-Kongress Dresden. Abstract/ Tagungshandbuch. Auszeichnung: "Gerhard-Zbinden Young Scientist Award" for drug-orientated toxicological research verliehen auf dem 46. EUROTOX Kongress 2009 vom 13.-16.09.2009 in Dresden für den besten Posterbeitrag.

K. Boehme, S. Simon and S.O. Mueller (2008). Gene expression signatures of endocrine active compounds in human endometrial cancer cells. DGPT-Tagung Mainz. Abstract/ Tagungshandbuch.

Vorträge

K. Boehme, Y. Dietz, S.O. Mueller, P.G. Hewitt (2010). Novel *in vitro* system for the toxicological evaluation of genotoxic compounds. Bruxelles, Predictive Human Toxicity and ADME/ Tox Studies Conference.

7 Anhang

Anhang 1: P53-Induktion durch genotoxische Verbindungen

Die HepG2-Zellen wurden täglich entweder mit den genotoxischen Substanzen Actinomycin D, Methylmethansulfonat und Etoposid sowie der Kontrollverbindung Theophyllin behandelt. Die P53-Induktion wurde 24 h und 48 h nach Beginn der ersten Behandlung mit dem TransAM™ Transkriptionsfaktortest (ActiveMotif) gemessen. Die dargestellten Daten sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (Stabw) aus drei verschiedenen Experimenten mit Zellpassagen zwischen 3 und 25. *Signifikanz im Student's T-Test (zweiseitig, gepaart), p-Wert < 0,05

Testsubstanz	Konzentration [μ M]	Zeitpunkt [h]	P53- Induktion	Stabw	p-Wert
Theophyllin	100	24	1,06	0,14	5,45E-01*
		48	1,11	0,18	4,05E-01*
Actinomycin D	0,05	24	6,01	0,53	4,92E-05*
	0,25		5,80	1,34	8,89E-03*
	0,05	48	16,43	9,99	1,32E-01*
	0,25		22,10	5,08	4,82E-02*
Methylmethan- sulfonat	500	24	2,33	0,67	1,78E-02*
		48	5,85	0,54	5,35E-03*
Etoposid	0,5	24	2,63	0,28	1,18E-03*
		48	4,05	0,91	2,37E-02*

Anhang 2: Deregulationen von Genen der P53-Signalkaskade

Regulation von Genen der P53-Signalkaskade nach Exposition mit den genotoxischen Verbindungen Actinomycin D, Methylmethansulfonat und Etoposid in HepG2-Zellen. Die Genexpressionsveränderungen wurden mit Illumina *HumanRef-8 BeadChip Arrays* quantifiziert und die Deregulationswerte gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (0,5 % (v/v) DMSO) ermittelt. Die dargestellten Daten sind die Mittelwerte aus drei verschiedenen Experimenten mit Zellpassagen von 3 bis 25. Rot= hochregulierte Gene $\geq 1,5$; Grün= herunterregulierte Gene $\leq -1,5$. *Signifikanz im Student's T-Test (zweiseitig, gepaart), p-Wert $< 0,05$.

RefSeq	Symbol	GeneName	Synonymy	Methylmethansulfonat						Actinomycin D					
				500 µM			500 µM			250 nM			500 nM		
				6h	24h	48h	6h	24h	48h	6h	24h	48h	6h	24h	48h
NM_004324.3	BAX	BCL2-associated X protein	Bax zeta	1,10	1,22	1,81*	2,88	1,34*	1,67*	2,70*	-1,18	1,05	2,25*		
NM_002690.1	POLB	polymerase (DNA directed), beta	MGC125976	1,17	1,30	1,30*	1,76*	1,01	1,32*	1,80*	1,08	1,08	1,25		
		APEX nuclease (apurinic/apyrimidinic endonuclease) 2, nuclear gene encoding mitochondrial protein	XTH2; APEXL2; APE2	-1,22	-1,10	1,55*	2,06*	-2,17*	-3,45*	-2,78*	1,04	1,08	1,20*		
NM_001067.2	TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha	TOP2; TP2A	-2,38*	-1,69*	-1,49*	-3,23*	-1,45*	-4,35*	-8,33*	1,11	1,28	1,38*		
		RplIL5; POLRA; POLR2; RPB1; MGC75453; polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A, 220kDa	RplIL5; POLRA; POLR2; RPB1; MGC75453; hsrPB1; RPOL2; RPBh1; RPO2; hRPB220	1,27*	1,62*	1,06	-1,11	-1,61*	-3,23*	-5,88*	-1,01	1,29	1,07		
NM_000937.2	POLR2A	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide B, 140kDa	RPB2; hsrRPB2; hRPB140; POL2RB	1,04	1,07	-1,01	1,34*	-1,27	-2,86*	-2,56*	1,07	-1,06	1,00		
		polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide C, 33kDa, transcript variant gamma	RPB31; hsrRPB3; RPB3; hRPB33	1,57	1,43*	1,26	1,19	1,09	-1,32	-1,82	1,13	-1,15	-1,30		
NM_004805.2	POLR2D	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide D	HSRPB4; RBP4; HSRBP4	1,18*	-1,96*	1,70*	1,81*	-1,43*	-1,61*	-1,61*	1,00	1,15	1,23*		
NM_006232.2	POLR2H	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide H	RPB17; hsrPB8; RPABC3; RP88	-1,09	-1,15	1,24	1,17	-1,25	-2,70*	-3,03*	1,11	-1,05	-1,02		
NM_002392.2	MDM2	Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse), transcript variant MDM2	hdm2; HDMX; MGC71221	1,60*	-1,04	1,37	1,25	-1,15	1,06	1,16	1,08	1,06	1,17		
NM_144689.3	ZNF420	zinc finger protein 420	FLJ32191; APAK	1,14	1,02	-1,06	1,19*	1,00	-1,23*	-1,25*	1,07	-1,06	-1,16		

Anhang 3: Ermittelte Effizienzen der Gene der TLDA-Karte „Human DME“

Für die Ermittlung der Effizienzen wurde eine cDNA-Verdünnungsreihe (0,1 ng, 0,5 ng, 1 ng, 5 ng, 10 ng, 50 ng, 100 ng, 500 ng) von unbehandelten HepG2-Zellproben mittels TLDA-Technologie gemessen. Zur Auswertung wurden die C_t -Werte gegen den Logarithmus der cDNA-Konzentrationen aufgetragen und der Anstieg der Geraden ermittelt. Die reale Effizienz entspricht der Zehnerpotenz des negativen Kehrwertes des Geradenanstiegs.

Gensymbol	Effizienz	Gensymbol	Effizienz	Gensymbol	Effizienz
Housekeeping-Gene					
18S	1,95	GSTA1	1,97	Transporter	2,00
B2M	1,90	GSTP1	1,89	ABC11 (BSEP)	1,91
PPIA	1,89	SULT1A1	1,88	ABC14 (MDR1)	1,86
Phase I Enzyme					
CYP1A1	2,07	UGT1A9	2,17	ABCC1 (MRP1)	1,76
CYP1A2	2,00	UGT1A6	2,00	ABCC2 (cMOAT, MRP2)	1,95
CYP2A6	2,00	UGT2B7	1,88	ABCC3 (cMOAT2, MRP3)	1,88
Transkriptionsfaktoren					
CYP2B6	2,00	AHR	1,94	SLC10A1 (NTCP)	3,36
CYP2C18	2,00	HNF4A	2,04	SLC22A1 (OCT1)	2,16
CYP2C19	2,00	NR0B2 (SHP)	1,98	SLCO1A2 (OATPA)	2,00
CYP2C8	2,00	NR1H2 (LXRB)	2,03	SLCO1B1 (LST1, OATP2)	2,00
CYP2C9	2,00	NR1H3 (LXRA)	1,87	SLCO1B3 (LST3, OATP8)	1,89
CYP2D6	1,57	NR1H4 (FXR)	1,98	SLCO2B1 (OATPB)	2,00
CYP2E1	2,00	NR1I2 (BXR, PXR)	1,79		
CYP3A4	2,00	NR1I3 (CAR)	2,00		
CYP3A5	1,69	NR2F2 (COUPTFB)	1,90		
CYP3A7	2,05	NR3C1 (GR)	1,88		

Anhang 4: Basale Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus in HepG2 im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten

Die Expression von Genen, welche für Enzyme, Transporter oder Transkriptionsfaktoren des Fremdstoffmetabolismus codieren, wurde mit der TLDA-Karte „Human DME“ gemessen. Für den Vergleich der Basalexpression in HepG2 wurden die Daten der Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1% (v/v)) der HepG2-Zellproben und von humanen Hepatozytenkulturen aus den Induktionsstudien nach täglicher Behandlung über 72 h herangezogen. Die Berechnung der Deregulationswerte erfolgte durch Bezug über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode ermittelten Effizienz-korrigierten C_T -Werte normalisiert auf den Housekeeper PPIA der HepG2-Zellen auf die HH-Proben. Dabei wurden die Mittelwerte aus drei verschiedenen Experimenten für die HepG2-Zellen der Berechnung zugrunde gelegt und gegen die drei verschiedenen Donoren einzeln die relative Basalexpression berechnet. Ein Deregulationswert ≥ 1 zeigt eine stärkere Regulation des entsprechenden Gens in HepG2 und ein Wert ≤ -1 eine stärkere Deregulation in den Hepatozyten.

Gensymbol	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Gensymbol	Donor 1	Donor 2	Donor 3
Phase I Enzyme							
CYP1A1	1,82	3,15	2,67	Transkriptionsfaktoren			
CYP1A2	-5023,03	-6441,24	-443773,04	NR0B2 (SHP)	8,56	4,32	7,60
CYP2A6	-304,47	n.d. in HH D2	-1010,92	NR1H2 (LXRB)	-10,13	-10,73	-1,69
CYP2B6	-450,70	-1193,05	-6259,95	NR1H3 (LXRA)	6,53	7,18	23,90
CYP2C18	n.d. in HepG2	n.d. in HepG2	n.d. in HepG2	NR1H4 (FXR)	-7,97	-4,85	-2,18
CYP2C19	n.d. in HepG2	n.d. in HepG2	n.d. in HepG2	NR1I2 (BXR, FXR)	-2,82	-3,11	-3,79
CYP2C8	n.d. in HepG2	n.d. in HepG2	n.d. in HepG2	NR1I3 (CAR)	-1411,04	-3108,03	-9345,02
CYP2C9	n.d. in HepG2	n.d. in HepG2	n.d. in HepG2	NR2F2 (COUPTFB)	1,49	2,14	n.d. in HH D3
CYP2D6	39,66	13,89	144,63	NR3C1 (GR)	1,31	1,79	9,67
Transporter							
CYP2E1	-3911,77	-12511,28	-83300,91	ABCB11 (BSEP)	n.d. in HepG2	n.d. in HepG2	n.d. in HepG2
CYP3A4	-216724,17	-379796,29	-294350,64	ABCB1 (MDR1)	-3,55	-1,93	2,11
CYP3A5	-30,42	-3,05	-2,30	ABCB4 (MDR2/3)	3,30	3,79	19,77
CYP3A7	-194,85	-8,73	n.d. in HH D3	ABCC1 (MRP1)	507,81	2037,87	n.d. in HH D3
Phase II Enzyme							
GSTA1	-29,01	-30,64	-50,57	ABCC2 (cMOAT, MRP2)	-2,86	-2,04	-2,35
GSTP1	7,28	8,86	n.d. in HH D3	ABCC3 (cMOAT2, MRP3)	-11,16	-10,43	n.d. in HH D3
SULT1A1-4	5,54	3,23	1,22	SLC10A1 (NTCP)	<-10 ⁶	<-10 ⁶	<-10 ⁶
UGT1A1/3-10	-3704,20	-3004,90	-81,73	SLC22A1 (OCTP1)	-11629,29	-52564,12	-3001,75
UGT1A6	-57667,40	-54143,61	-1118,91	SLCO1A2 (OATPA)	n.d. in HepG2	n.d.	n.d. in HepG2
UGT2B7	-11,55	-14,78	32,13	SLCO1B1 (LST1, OATP2)	-8732,40	-5937,92	-18475,25
Transkriptionsfaktoren							
AHR	1,42	1,48	44,69	SLCO1B3 (LST3, OATP8)	-26,89	-30,87	-152,20
HNF4A	-1,38	-1,64	-1,45	SLCO2B1 (OATPB)	-81,75	-77,25	-6,15

Anhang 5: Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus in HepG2 nach Induktion

Die Expression von Genen, welche für Enzyme, Transporter oder Transkriptionsfaktoren des Fremdstoffmetabolismus codieren, wurde mit der TLDA-Karte „Human DME“ in HepG2-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen CYP-Induktoren gemessen. Die Zellen wurden täglich mit jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen der Induktoren Phenobarbital, 3-Methylcholanthren und Rifampicin über 72 h behandelt. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der Deregulation (FC= Fold change) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle \pm Standardabweichung (Stabw). Die Deregulationswerte wurden mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode bezogen auf den Housekeeper PPIA berechnet. * Statistische Signifikanz im Student's T-Test, p-Wert $\leq 0,05$

Gensymbol	Phenobarbital						3-Methylcholanthren						Rifampicin					
	500 µM		1000 µM		0,1 µM		1 µM		10 µM		50 µM		10 µM		50 µM		50 µM	
	FC	Stabw	FC	Stabw	FC	Stabw	FC	Stabw	FC	Stabw	FC	Stabw	FC	Stabw	FC	Stabw	FC	Stabw
Phase I Enzyme																		
CYP1A1	1,32	1,1	1,45	1,14	4,80*	1,46	155,00*	1,26	-1,28	1,71	1,31	1,18						
CYP1A2	1,41	33	2,71	7,62	6,67	14,1	6,64	10,64	n.d.	n.d.	1,35	4,23						
CYP2A6	-1,09	2,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.						
CYP2B6	-2,21	1,59	-2,24	5,7	-1,83	1,91	12,67*	2,08	1,03	1,17	-4,74	5,11						
CYP2C18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.						
CYP2C19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.						
CYP2C8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.						
CYP2C9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.						
CYP2D6	1,19	1,27	-1,04	1,52	1,26	1,13	1,04	2,25	-1,23	1,39	-1,23	1,33						
CYP2E1	1,67	1,68	1,06	1,35	1,14	4,29	1,06	1,97	2,92	1,77	3,48	1,94						
CYP3A4	1,88	1,89	1,03	1,54	2,31*	2,32	4,55	3,15	7,40*	1,77	6,93*	2,51						
CYP3A5	8,15	5,08	9,76	5,09	10,75	5,26	28,01*	7,08	8,49	4,08	1,39	1,04						
CYP3A7	1,62	1,14	1,96	1,33	1,08	1,14	6,9	1,25	4,18*	1,18	8,12*	1,13						
Phase II Enzyme																		
GSTA1	1,65*	1,11	2,82*	1,06	-1,74	1,62	-3,39	1,47	2,44	1,24	5,48*	1,11						
GSTP1	1,19	1,39	1,08	1,44	1,34	1,41	3,15	1,61	2,16	1,16	1,63	1,67						
SULT1A1-4	1,09	1,21	1,22	1,25	-1,19	1,37	-1,55	1,49	1,33	1,41	1,46	1,19						
UGT1A1/3-10	1,29	1,12	2,48*	1,16	1,35*	1,46	7,30*	1,42	1,82*	1,12	4,30*	1,37						
UGT1A6	-1,45	1,61	-1,55	1,12	5,02*	1,21	7,63	2,52	2,87	3,37	2,67	1,93						
UGT2B7	1,11	1,33	-1,13	1,31	1,61	1,08	3,2	1,33	-1,16	1,44	-1,1	1,19						
Transkriptionsfaktoren																		
AHR	1,07	1,22	1,13	1,17	1,43	1,1	4,85*	1,71	7,38*	1,23	4,88*	1,13						
HNF4A	1,12	1,38	1,08	1,45	-1,28	1,4	-1,69	2,06	1,99	2,12	-1,24	4,32						

Gensymbol	Phenobarbital												3-Methylcholanthren						Rifampicin					
	500 µM			1000 µM			0,1 µM			1 µM			10 µM			50 µM								
	FC	Stabw	FC	Stabw	FC	Stabw	FC	Stabw	FC	Stabw	FC	Stabw	FC	Stabw	FC	Stabw	FC	Stabw						
Transkriptionsfaktoren																								
NR0B2 (SHP)	1,28	1,34	1,14	1,42	-1,11	1,63	1,53	1,29	1,78	1,81	2,08	1,48												
NR1H2 (LXRβ)	-1,06	1,12	-1,01	1,35	1,22	1,3	2,35	1,54	1,35	1,99	1,66	1,22												
NR1H3 (LXRA)	-1,05	1,21	-1,17	1,18	-1,17	1,19	-1,23	1,45	-2,23	1,88	-1,84	1,11												
NR1H4 (FXR)	1,18	1,36	-1,09	1,02	-1,03	1,09	-3,63	1,79	1,17	1,19	1,18	1,15												
NR1I2 (BXR, PXR)	1,12	1,36	-1,17	1,36	1,67	1,22	2,52	1,86	1,92	2,16	2,76*	1,4												
NR1I3 (CAR)	n.d.	n.d.	-2,01	6,15	1,1	1,09	1,34*	1,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.												
NR2F2 (COUPTFB)	-1,08	1,22	-1,05	1,15	-1,14	1,1	-1,2	1,44	3,68*	1,03	2,61*	1,14												
NR3C1 (GR)	1,01	1,15	-1,06	1,08	-1,06	1,08	3,74*	1,29	-1,2	1,2	-1,94	1,12												
Transporter																								
ABCB11 (BSEP)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.												
ABCB1 (MDR1)	1,08	1,43	1,09	1,19	1,89	1,17	3,1	1,59	2,71*	1,1	2,05	1,2												
ABCB4 (MDR2/3)	1,17	1,35	1,12	1,19	1,33	1,23	1,07	1,43	1,83*	1,19	1,84	1,28												
ABCC1 (MRP1)	1,06	1,21	1,18	1,09	1,32	1,19	3,49*	1,53	1,58	1,2	1,5	1,25												
ABCC2 (cMOAT, MRP2)	1,12	1,26	1,22	1,04	1,13	1,04	1,38	1,25	1,78*	1,09	2,05*	1,09												
ABCC3 (cMOAT2, MRP3)	1,3	1,21	1,66	1,22	1,61	1,46	3,50*	1,51	1,28	1,28	1,97	1,2												
SLC10A1 (NTCP)	-2,06	3,5	1,11	3,1	1,32	2,08	-3,46	1,91	-1,71	2,12	-3,63	2,54												
SLC22A1 (OCTP1)	1,45	1,26	-1,2	2,5	1,01	1,16	4,18	1,48	1,28	3,52	1,19	1,78												
SLCO1A2 (OATPA)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.												
SLCO1B1 (LST1, OATP2)	1,31	5,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.												
SLCO1B3 (LST3, OATP8)	-1,03	2,26	-1,15	1,69	-1,5	1,05	-1,25	1,28	1,68	1,29	2	1,92												
SLCO2B1 (OATPB)	-1,38	2,47	-2,99	2,47	-4,46*	2,18	-1,65	13,97	-27,29*	3,6	-26,40*	2,08												

Anhang 6: Expression von Genen des Fremdstoffmetabolismus in humanen Hepatozytenkulturen (HH) nach Induktion

Die Expression von Genen, welche für Enzyme, Transporter oder regulatorische Transkriptionsfaktoren des Fremdstoffmetabolismus codieren, wurde mit der TLDA-Karte „Human DME“ in humanen Hepatozyten (Monolayerkulturen) von drei verschiedenen Donoren nach Behandlung über 72 h mit verschiedenen CYP-Induktoren (Phenobarbital, 3-Methylcholanthren und Rifampicin) gemessen. Die Daten sind interne bereits publizierte Daten [158]. Die Tabelle zeigt die Werte der Deregulation gegenüber der Lösungsmittelkontrolle, welche mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode bezogen auf den Housekeeper PPIA berechnet wurden.

Gensymbol	Phenobarbital 1000 µM			3-Methylcholanthren 5 µM			Rifampicin 10 µM		
	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 1	Donor 2	Donor 3
Phase I Enzyme									
CYP1A1	1,99	6,19	-1,45	641,67	1476,42	80,46	1,27	9,29	n.d.
CYP1A2	1,74	-1,09	-1,31	115,67	160,50	-1,09	-1,07	1,12	2,73
CYP2A6	9,89	n.d.	n.d.	-1,47	n.d.	-13,30	2,43	n.d.	n.d.
CYP2B6	12,94	13,42	1,17	-2,52	-2,87	-4,28	8,63	7,38	1,64
CYP2C18	1,10	-1,01	1,78	-1,12	-1,42	-5,45	-1,09	-1,29	-2,25
CYP2C19	1,14	3,90	-1,73	-2,69	-1,47	-3,34	1,08	3,25	n.d.
CYP2C8	6,57	2,89	-4,02	-5,43	-5,41	-12,99	4,43	2,33	n.d.
CYP2C9	2,98	2,17	-2,60	-1,84	-1,80	-7,45	3,11	1,87	n.d.
CYP2D6	-1,00	-1,51	-1,29	-3,61	-3,01	-3,34	1,25	-1,14	n.d.
CYP2E1	-1,38	-3,96	1,19	-3,76	-2,99	-3,13	-1,73	-4,23	-1,41
CYP3A4	24,93	25,87	-1,04	-3,47	-21,23	-6,29	35,06	21,00	1,22
CYP3A5	2,37	1,59	2,00	-1,24	-4,10	-6,66	1,41	1,01	4,05
CYP3A7	4,29	3,08	n.d.	1,34	-2,03	n.d.	6,43	3,95	n.d.
Phase II Enzyme									
GSTA1	2,16	2,52	-1,30	-1,41	-2,05	-5,29	1,44	2,40	-1,05
GSTP1	-1,01	-1,61	n.d.	1,40	1,30	n.d.	1,57	-1,09	n.d.
SULT1A1-4	1,06	-1,03	-1,76	-1,68	-2,53	-2,78	1,44	-1,08	2,45
UGT1A1/3-10	2,01	1,77	-4,75	2,35	1,50	-6,00	1,98	1,36	n.d.
UGT1A6	1,16	-1,11	-3,43	-1,01	-1,45	-10,86	1,00	-1,42	n.d.
UGT2B7	1,46	-1,17	1,46	3,38	1,20	-8,70	-1,16	-1,43	n.d.
Transkriptionsfaktoren									
AHR	1,36	1,34	1,21	1,50	-2,08	4,15	1,40	1,16	n.d.
HNF4A	1,19	-1,26	-1,89	-1,00	-1,16	-5,23	-1,18	-1,87	-5,93

Gensymbol	Phenobarbital 1000 µM			3-Methylcholanthren 5 µM			Rifampicin 10 µM		
	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor 1	Donor 2	Donor 3
Transkriptionsfaktoren									
NR0B2 (SHP)	1,14	-1,61	-1,00	2,82	1,47	3,09	-1,14	-1,08	-2,84
NR1H2 (LXRB)	1,02	-1,07	1,88	1,04	1,13	4,61	1,05	-1,15	n.d.
NR1H3 (LXRA)	-1,02	-1,61	6,41	-1,68	-1,28	1,46	-1,12	-1,43	6,43
NR1H4 (FXR)	1,09	-1,23	-1,46	-2,69	-2,95	-7,78	-1,12	-1,41	1,11
NR1I2 (BXR, PXR)	-1,05	-1,56	1,09	-1,24	-1,74	-2,62	-1,42	-2,70	6,79
NR1I3 (CAR)	1,50	-2,28	1,27	1,88	1,02	-1,65	-1,24	-2,95	2,45
NR2F2 (COUPTFB)	-1,00	-1,48	n.d.	1,14	-1,05	n.d.	-1,42	-1,73	n.d.
NR3C1 (GR)	1,21	1,09	-2,44	2,70	1,10	-1,22	-1,38	-1,29	n.d.
Transporter									
ABCB11 (BSEP)	1,34	-1,49	-2,41	-2,57	-2,82	-8,94	-1,95	-6,42	1,00
ABCB1 (MDR1)	2,58	2,23	-1,35	-2,25	-2,47	1,22	2,91	1,68	-2,14
ABCB4 (MDR2/3)	1,74	1,27	4,00	1,26	-1,41	-2,94	2,52	1,12	7,87
ABCC1 (MRP1)	1,05	1,08	n.d.	-1,31	2,32	n.d.	-1,26	1,49	n.d.
ABCC2 (cMOAT,MRP2)	2,08	1,62	-1,41	-1,17	-1,83	-5,10	1,60	1,16	1,46
ABCC3 (cMOAT2,MRP3)	-1,01	-1,11	n.d.	-2,23	-2,08	n.d.	-1,21	-1,34	n.d.
SLC10A1 (NTCP)	-1,02	-1,89	1,33	-27,86	-11,21	-2,62	-1,18	-1,96	4,46
SLC22A1 (OCTP1)	1,41	-1,57	-2,16	-8,25	-8,29	-6,63	-1,09	-2,15	n.d.
SLCO1A2 (OATPA)	-2,47	n.d.	-2,27	n.d.	n.d.	n.d.	-1,65	n.d.	3,69
SLCO1B1 (LST1, OATP2)	1,14	1,08	1,23	-3,81	-7,69	-2,67	-1,08	-1,48	2,31
SLCO1B3 (LST3, OATP8)	-1,14	-1,69	-1,21	-1,14	-4,15	-3,52	-1,72	-2,79	1,24
SLCO2B1 (OATPB)	1,56	1,36	1,09	-5,21	-3,92	-2,78	1,29	1,23	n.d.

Anhang 7: P53-Induktion durch progenotoxische Verbindungen und Kontrollverbindungen.

Die HepG2-Zellen wurden entweder mit den nicht genotoxischen Substanzen Metformin, Theophyllin und Ketokonazol, dem genotoxischen Actinomycin D oder den progenotoxischen Verbindungen Cyclophosphamid, Diethylnitrosamin, Aflatoxin B₁ und 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen in den angegebenen Konzentrationen (Konz.) behandelt. Die Behandlung mit den progenotoxischen Verbindungen erfolgte täglich für 6 h mit 18 h Erholungsphase in Gegenwart und Abwesenheit eines metabolischen Aktivierungssystems (MAS: Phenobarbital/ β -Naphthoflavon-induzierter S9), wogegen mit den Referenzverbindungen täglich kontinuierlich behandelt wurde. Die P53-Induktion wurde 48 h nach Beginn der ersten Behandlung mit dem TransAM™ Transkriptionsfaktortest (ActiveMotif) gemessen. Die dargestellten Daten sind die Mittelwerte (FC=Fold change) \pm Standardabweichung (Stabw) aus drei verschiedenen Experimenten mit Zellpassagen zwischen 3 und 25. *Signifikanz im Studen's T-Test (zweiseitig, gepaart), p-Wert < 0,05

Testsubstanz	Konz. [µM]	MAS	FC	Stabw	p-Wert	Testsubstanz	Konz. [µM]	MAS	FC	Stabw	p-Wert
Referenzverbindungen											
Metformin	1000	-	-1,07	0,15	6,66E-01	Ketokonazol	10	-	1,15	0,15	5,84E-01
Theophyllin	100	-	1,09	0,31	7,63E-01	Actinomycin D	0,01	-	7,94	1,08	4,21E-04*
Progenotoxische Verbindungen											
Cyclophosphamid	25	-	1,28	0,46	4,17E-01	Aflatoxin B ₁	0,1	-	-1,06	0,47	9,91E-01
		+ S9	2,01	0,82	2,02E-02*			+ S9	2,17	1,03	5,92E-02
	50	-	1,47	0,49	2,08E-01		0,5	-	1,38	0,21	7,17E-02
		+ S9	2,48	0,48	2,43E-02*			+ S9	2,99	1,82	7,28E-02
	75	-	1,28	0,31	2,74E-01		1	-	1,52	0,23	4,21E-02*
		+ S9	2,09	1,05	3,20E-01			+ S9	3,72	2,17	3,23E-02*
7,12-Dimethylbenz[<i>a</i>]anthracen	2,5	-	1,61	0,17	1,21E-02*	5	-	3,03	0,75	1,73E-02*	
		+ S9	2,12	1,36	1,80E-01		+ S9	2,26	0,48	5,92E-02	
	10	-	1,95	0,24	2,81E-02*	10	-	5,34	1,18	1,03E-02*	
		+ S9	2,34	1,51	1,39E-01		+ S9	1,48	0,78	4,05E-01	
7,12-Dimethylbenz[<i>a</i>]anthracen	25	-	2,36	0,43	1,24E-02*	25	-	1,27	0,65	4,63E-01	
		+ S9	1,43	0,10	1,38E-01		+ S9	1,55	0,16	1,35E-01	
	50	-	2,08	0,19	3,12E-04*	Diethylnitrosamin	50	-	1,08	0,20	3,82E-01
		+ S9	2,42	0,63	1,84E-01			+ S9	1,31	0,34	3,58E-01
	75	-	2,42	0,35	2,41E-02*		75	-	1,71	0,51	4,31E-01
		+ S9	2,10	0,30	2,70E-01			+ S9	-1,02	0,00	4,25E-01
100	-	3,44	1,23	5,67E-02							
	+ S9	2,77	0,92	8,18E-02							

Anhang 8: P53-Induktion durch Aflatoxin B₁ und 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen in HepG2-Zellen nach Inhibition zellulärer CYP-Enzyme mit α -Naphthoflavin und Ketokonazol.

Die Zellen wurden mit Aflatoxin B₁ und 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen in Kombination mit den Cytochrom-P450 (CYP)-Inhibitoren α -Naphthoflavin (α NF) oder Ketokonazol (KETO) behandelt. Vor den Behandlungen mit den Prokanzerogenen wurden die Zellen mit dem jeweiligen Inhibitor für 30 min vorinkubiert. Die Behandlung mit Aflatoxin B₁ und 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen mit und ohne Inhibitor wurde anschließend über 6 h durchgeführt. Danach wurden die Zellen gewaschen und das Behandlungsmedium durch ein Medium, das ausschließlich den Inhibitor oder das Lösungsmittel (DMSO 0,2 % (v/v)) enthielt, ersetzt. Die Behandlungsprozedur wurde täglich wiederholt und die P53-Induktion 48 h nach Beginn der ersten Behandlung gemessen. Die dargestellten Daten sind die Mittelwerte (FC = Fold change) \pm Standardabweichung (Stabw) aus drei verschiedenen Experimenten mit Zellpassagen zwischen 3 und 25. *Signifikanz im Student's T-Test (zweiseitig, gepaart) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle, p-Wert < 0,05. § Signifikanz der Prokanzerogenbehandlungen mit Inhibitor gegenüber den entsprechenden Behandlungen ohne Inhibitor zum Level $\alpha=0,05$ in einer ANOVA mit posthoc Tukey Test.

Testsubstanz	Konzentration [µM]	Inhibitor	Inhibitor- konzentration [µM]	FC	Stabw	p-Wert T-Test	ANOVA/Tukey (Signifikanz zu α=0,05)	
Aflatoxin B ₁	5	-	-	2,09	0,44	4,82E-02*	-	
	10	-	-	2,12	0,05	1,46E-03*	-	
	5	αNF	1	1,45	1,45	0,14	4,29E-02*	nein
			5	1,37	1,37	0,18	5,07E-02	nein
			10	1,75	1,75	0,20	3,98E-02*	nein
	10	αNF	1	1,77	1,77	0,34	3,46E-02*	nein
			5	2,18	2,18	0,37	2,14E-02*	nein
			10	2,21	2,21	0,55	4,12E-02*	nein
	5	KETO	1	1,18	1,18	0,20	2,38E-01	ja
			5	-1,23	-1,23	0,26	2,56E-01	ja
10			-1,31	-1,31	0,22	1,14E-01	ja	
1			1,71	1,71	0,03	2,49E-03*	nein	
10	KETO	5	1,23	1,23	0,16	1,35E-01	ja	
		10	-1,00	-1,00	0,17	9,37E-01	ja	
50	-	-	2,78	0,46	6,97E-03*	-		
75	-	-	3,25	0,64	1,98E-02*	-		
7,12-Dimethylbenz[a]anthracen	50	αNF	1	1,15	0,13	1,81E-01	ja	
			5	1,32	0,12	2,90E-02*	ja	
			10	1,40	0,30	1,12E-01	ja	
	75	αNF	1	1,51	0,13	1,29E-02*	ja	
			5	1,40	0,22	7,47E-02	ja	
			10	1,17	0,15	1,53E-01	ja	
50	KETO	1	1,99	0,25	1,48E-01	nein		
		5	1,77	0,24	3,54E-02*	nein		
		10	1,25	0,16	1,16E-01	ja		
		1	2,80	0,47	1,21E-02*	nein		
75	KETO	5	1,72	0,32	3,54E-02*	ja		
		10	1,44	0,26	7,97E-02	ja		
1	-	-	-1,17	0,12	1,26E-01	-		
5	-	-	-1,24	0,15	9,05E-02	-		
10	-	-	-1,06	0,18	6,26E-01	-		
1	-	-	-1,24	0,14	8,44E-02	-		
5	-	-	-1,23	0,13	9,77E-02	-		
10	-	-	-1,30	0,14	3,83E-02*	-		

Anhang 9: Deregelationswerte und Statistik der putativen Markergene für genotoxische Verbindungen.

Die tabellarisch gelisteten Gene waren nach 48 h bei den drei getesteten genotoxischen Verbindungen Actinomycin D, Methylmethansulfonat und Etoposid signifikant (ANOVA p-Wert $\leq 0,01$) $\geq 1,5$ -fach hoch- beziehungsweise herunterreguliert. Die Behandlung mit den Testsubstanzen in den aufgeführten Dosierungen erfolgte täglich, die Zellen wurden nach 6 h, 24 h und 48 h geerntet und die Genexpressionsveränderungen mit Illumina *HumanRef-8 BeadChips* quantifiziert. Die dargestellten Daten sind die Mittelwerte relativ zu den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen aus drei verschiedenen Experimenten mit Zellpassagen zwischen 3 und 25.

RefSeq	Symbol	Funktion	Genname	Methylmethansulfonat				Etoposid			Actinomycin D			Theophyllin		ANOVA		
				500 µM		2 mM		500 µM		500 nM		250 nM		100 µM		p-Wert	BH-q-Wert	
				6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h					
NM_006142.3	SFN	DNA-Schadensantwort/ Apoptose	stratifin (SFN).	7,03	1,36	19,20	19,46	1,04	1,15	2,38	1,12	1,85	4,17	1,15	-1,01	1,26	4,95E-05	2,47E-03
NM_004324.3	BAX		BCL2-associated X protein (BAX), transcript variant beta.	1,09	1,22	1,81	2,89	-1,18	1,05	2,25	1,34	1,68	2,72	-1,14	-1,13	1,49	2,89E-07	1,03E-04
NM_001924.2	GADD45A		growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A).	8,44	9,97	1,93	2,13	1,07	1,45	2,10	-1,32	1,81	1,97	1,01	-1,08	1,13	1,23E-04	4,34E-03
NM_002969.3	MAPK12		mitogen-activated protein kinase 12 (MAPK12).	-1,22	1,04	1,58	1,96	-1,04	1,23	1,58	1,47	2,44	3,72	-1,03	1,03	1,26	1,59E-04	5,15E-03
NM_000700.1	ANXA1		annexin A1 (ANXA1).	1,01	-1,34	3,63	4,41	-1,03	1,13	2,44	1,83	6,47	7,41	-1,05	-1,08	1,03	3,08E-06	4,07E-04
NM_001425.1	EMP3		epithelial membrane protein 3 (EMP3).	-1,31	-1,02	2,06	5,60	-1,13	1,19	2,22	1,75	3,15	5,71	1,02	-1,19	1,15	5,65E-06	5,93E-04
NM_001423.1	EMP1		epithelial membrane protein 1 (EMP1).	-1,57	-1,15	1,21	2,16	1,11	1,42	1,81	1,97	3,08	1,93	1,02	-1,13	-1,12	1,39E-04	4,70E-03
NM_001175.4	ARHGDI5		Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta (ARHGDI5).	1,44	1,59	2,14	2,23	-1,02	1,13	1,65	1,79	1,86	1,86	1,05	1,06	1,06	6,02E-08	3,75E-05
NM_018494.3	LRDD		leucine-rich repeats and death domain containing (LRDD), transcript variant 2.	-1,03	1,39	1,37	1,86	-1,04	1,19	1,58	1,51	1,62	2,19	-1,11	-1,02	1,03	2,32E-08	1,99E-05
NM_138720.1	HIST1H2BD		histone 1, H2bd (HIST1H2BD), transcript variant 2.	1,81	1,75	1,03	4,31	-1,14	-1,05	1,96	1,39	1,83	2,01	-1,02	-1,21	1,10	8,53E-05	3,45E-03
NM_001878.2	CRABP2	cellular retinoic acid binding protein 2 (CRABP2).	1,49	3,16	2,57	2,81	-1,03	1,06	1,67	2,12	3,85	2,85	-1,04	-1,00	1,13	1,18E-07	5,42E-05	
NM_003548.2	HIST2H4	histone 2, H4 (HIST2H4).	1,54	1,73	-1,08	2,53	-1,09	-1,23	1,61	1,16	2,30	3,21	-1,00	-1,10	1,07	1,05E-04	3,92E-03	
NM_006037.2	HDAC4	histone deacetylase 4 (HDAC4).	-1,23	-1,25	-2,24	-2,86	-1,03	-1,15	-1,50	-1,65	-2,28	-2,14	-1,02	1,03	-1,18	1,05E-05	8,78E-04	
NM_002398.2	MEIS1	Meis1, myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog (mouse) (MEIS1).	-1,91	-1,20	-1,93	-2,90	1,01	-1,17	-1,51	-2,27	-2,56	-2,52	-1,02	1,01	-1,11	2,57E-08	2,11E-05	
NM_003140.1	SRY	sex determining region Y (SRY).	-1,14	-1,02	-1,33	-1,57	1,08	-1,23	-1,52	1,01	-1,45	-1,47	1,09	-1,04	-1,16	4,13E-06	4,75E-04	
NM_005730.2	CTDSP2	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 2 (C	-1,59	-1,93	-1,62	-2,45	1,03	-1,00	-1,59	-1,22	-2,05	-2,88	1,03	1,13	-1,20	4,76E-08	3,27E-05	
NM_021198.1	CTDSP1	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 1 (C	-3,12	-1,52	-2,21	-4,90	1,02	-1,23	-1,80	-1,75	-2,44	-3,36	-1,00	1,01	-1,32	2,23E-08	1,99E-05	
NM_018660.2	ZNF395	zinc finger protein 395 (ZNF395).	-1,41	-1,19	-2,83	-5,06	1,05	-1,30	-1,73	1,32	-1,35	-2,56	-1,05	1,07	-1,26	7,23E-05	3,12E-03	
NM_001018109.1	PIR	pirin (iron-binding nuclear protein) (PIR), transcript variant 2.	-1,93	-1,97	-3,15	-5,45	-1,08	-1,27	-1,73	1,52	-1,49	-1,78	-1,05	-1,01	1,09	5,64E-05	2,64E-03	
NM_014943.3	ZHX2	zinc fingers and homeoboxes 2 (ZHX2).	-1,13	-1,22	-1,00	-1,76	1,11	-1,11	-1,83	-1,27	-1,36	-2,25	1,02	1,23	-1,50	1,04E-04	3,92E-03	
NM_201397.1	GPX1	glutathione peroxidase 1 (GPX1), transcript variant 2.	1,11	1,34	1,44	1,86	-1,05	1,20	1,83	1,03	1,81	2,67	-1,02	-1,05	1,18	1,68E-07	7,04E-05	
NM_005115.3	MVP	major vault protein (MVP), transcript variant 2.	-1,03	1,63	1,67	3,95	1,05	1,15	1,60	1,83	1,77	2,42	1,00	1,02	1,03	1,08E-05	9,04E-04	
NM_000593.5	TAP1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP) (TAP1).	1,82	1,10	2,31	2,46	1,19	1,24	1,54	1,14	1,83	1,87	1,06	1,04	1,00	3,32E-08	2,44E-05	
NM_006404.3	PROCR	protein C receptor, endothelial (EPCR) (PROCR).	-1,12	-1,10	1,66	2,88	1,04	1,37	2,20	1,64	2,36	2,61	-1,03	1,06	1,10	1,29E-05	9,97E-04	
NM_005931.2	MICB	MHC class I polypeptide-related sequence B (MICB).	1,22	2,35	1,95	1,45	1,07	1,28	1,67	1,15	2,79	3,47	1,06	-1,07	1,05	1,93E-07	7,64E-05	
NM_022168.2	IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1).	1,04	1,01	-1,32	-1,47	1,06	-1,13	-1,53	-1,33	-1,91	-1,73	-1,05	-1,03	-1,06	2,11E-04	6,18E-03	
NM_001680.3	FXYD2	FXYD domain containing ion transport regulator 2 (FXYD2), transcript variant a.	-1,06	-1,02	1,36	1,61	-1,08	1,27	2,40	1,16	1,40	1,56	-1,05	-1,09	1,00	1,01E-05	8,62E-04	
NM_000558.3	HBA1	hemoglobin, alpha 1 (HBA1).	1,89	18,98	2,49	2,69	-1,26	1,02	1,67	2,47	16,93	35,40	-1,07	1,04	1,35	9,24E-05	3,62E-03	
NM_000111.1	SLC26A3	solute carrier family 26, member 3 (SLC26A3).	1,01	1,03	-2,12	-4,48	1,03	-1,31	-2,16	1,14	-1,68	-3,38	1,07	-1,10	-1,45	8,71E-05	3,48E-03	
NM_022818.3	MAP1LC3B	microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta (MAP1LC3B).	3,24	2,30	1,43	1,99	-1,04	1,32	1,51	1,42	3,03	2,83	-1,08	1,08	-1,07	1,03E-07	4,84E-05	
NM_000419.2	ITGA2B	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41B) (ITGA2B).	1,48	1,72	1,16	1,50	1,01	1,31	2,01	2,03	1,50	1,56	1,00	-1,08	-1,03	1,67E-06	2,77E-04	
NM_003254.2	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP1).	2,41	1,08	5,20	7,97	1,11	1,00	1,89	1,19	1,97	4,35	1,20	1,16	1,26	7,76E-05	3,24E-03	
NM_002658.2	PLAU	plasminogen activator, urokinase (PLAU).	1,08	1,80	1,35	1,47	1,07	1,37	1,84	1,57	3,55	3,72	1,08	1,04	-1,04	2,91E-06	3,89E-04	
NM_000094.2	COL7A1	collagen, type VII, alpha 1 (epidermolysis bullosa, dystrophic, dominant and recessive) (CC	1,48	1,45	1,93	1,66	-1,04	1,03	1,82	1,91	3,09	3,79	-1,12	1,02	-1,03	4,50E-06	5,03E-04	
NM_022765.2	MICAL1	microtubule associated monoxigenase, calponin and LIM domain containing 1 (MICAL1).	1,27	1,60	2,39	3,39	1,06	1,32	1,65	1,85	2,29	3,11	1,03	-1,09	-1,06	3,29E-10	3,38E-06	
NM_006000.1	TUBA1	tubulin, alpha 1 (testis specific) (TUBA1).	1,42	2,80	1,65	2,07	-1,05	1,44	1,59	1,61	2,11	2,88	1,01	1,06	1,25	8,01E-06	7,48E-04	
NM_021021.2	SNTB1	syntrophin, beta 1 (dystrophin-associated protein A1, 59kDa, basic component 1) (SNTB1)	-1,63	1,01	-4,19	-5,26	1,01	-1,08	-1,67	1,20	-2,12	-2,28	1,01	-1,10	-1,13	1,18E-04	4,22E-03	
NM_032866.3	CGNL1	cingulin-like 1 (CGNL1).	-1,62	1,04	-3,96	-3,69	-1,01	-1,17	-1,71	1,32	-2,23	-2,53	1,00	-1,00	-1,27	1,08E-04	4,00E-03	
NM_003603.4	SORBS2	sorbin and SH3 domain containing 2 (SORBS2), transcript variant 1.	-1,45	1,03	-3,03	-2,90	-1,03	-1,22	-1,73	1,17	-1,81	-2,15	-1,01	1,03	-1,12	1,04E-06	2,29E-04	
NM_173344.1	ST3GAL1	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1 (ST3GAL1), transcript variant 2.	1,00	1,21	-1,68	-1,56	1,04	-1,40	-1,81	-1,08	-1,95	-2,74	-1,10	-1,07	-1,19	3,59E-04	8,79E-03	
NM_001699.3	AXL	AXL receptor tyrosine kinase (AXL), transcript variant 2.	1,05	1,18	1,93	2,98	-1,00	1,08	1,60	1,98	2,99	3,32	1,06	1,01	-1,10	1,80E-06	2,87E-04	
NM_001824.2	CKM	creatine kinase, muscle (CKM).	1,08	1,10	1,24	2,08	-1,07	1,21	1,94	1,64	2,25	2,13	-1,02	-1,05	1,16	2,65E-04	7,22E-03	
NM_000476.1	AK1	adenylate kinase 1 (AK1).	1,38	1,26	1,71	2,54	1,05	1,07	1,91	1,71	1,96	2,22	1,01	-1,03	1,09	8,75E-08	4,62E-05	
NM_005281.2	GPR3	G protein-coupled receptor 3 (GPR3).	1,78	2,09	2,73	2,48	-1,08	1,60	2,51	-1,01	2,99	5,22	-1,03	-1,08	1,21	1,63E-08	1,98E-05	
NM_005980.2	S100P	S100 calcium binding protein P (S100P).	3,05	1,72	2,20	2,10	1,04	1,14	1,76	1,20	1,45	1,77	1,10	1,02	1,23	6,99E-06	6,82E-04	
NM_005108.2	XYLB	xylulokinase homolog (H. influenzae) (XYLB).	-1,88	-1,24	-1,92	-3,27	-1,03	-1,18	-1,55	1,37	-1,84	-2,29	-1,10	-1,09	-1,18	3,01E-04	7,88E-03	
NM_000189.4	HK2	hexokinase 2 (HK2).	-1,42	-1,39	-1,40	-2,00	1,01	-1,09	-1,68	-1,08	-1,40	-1,67	1,02	-1,02	-1,14	4,48E-06	5,03E-04	
NM_015277.2	NEDD4L	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like (NEDD4L).	-1,75	1,03	-3,76	-6,45	-1,03	-1,24	-1,85	1,34	-1,28	-1,82	-1,07	1,11	-1,21	3,81E-04	9,10E-03	
NM_001807.2	CEL	carboxyl ester lipase (bile salt-stimulated lipase) (CEL).	1,46	1,73	2,78	4,51	1,26	2,78	11,64	1,85	2,17	2,84	-1,09	-1,16	-1,01	1,06E-08	1,49E-05	
NM_021727.3	FADS3	fatty acid desaturase 3 (FADS3).	1,42	1,61	1,67	2,12	-1,05	1,39	1,95	1,28	1,50	1,63	-1,01	1,04	1,04	3,22E-11	6,63E-07	
NM_016084.3	RASD1	RAS, dexamethasone-induced 1 (RASD1).	3,58	12,45	5,47	5,47	-1,02	1,27	2,00	-1,20	4,59	10,21	1,15	1,14	1,16	3,69E-06	4,47E-04	
NM_006736.4	DNAJB2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 2 (DNAJB2).	1,53	1,63	1,34	1,62	-1,04	1,10	1,65	-1,15	1,41	1,63	-1,07	-1,12	1,06	2,91E-07	1,03E-04	
NM_006426.1	DPYSL4	dihydropyrimidinase-like 4 (DPYSL4).	1,15	1,17	2,70	2,91	1,03	2,12	5,65	1,41	1,71	1,66	-1,04	1,03	1,04	1,34E-06	2,66E-04	
NM_000266.1	NDP	Norrie disease (pseudoglioma) (NDP).	-1,46	-1,41	-1,63	-2,29	1,02	-1,18	-1,61	-1,42	-1,72	-2,13	-1,12	-1,12	-1,19	1,09E-08	1,49E-05	
NM_014344.2	FJX1	four jointed box 1 (Drosophila) (FJX1).	-1,78	-2,30	-1,60	-2,62	1,00	-1,08	-1,68	-2,07	-1,99	-2,46	-1,07	1,01	-1,14	4,89E-09	1,26E-05	
NM_012193.2	FZD4	frizzled homolog 4 (Drosophila) (FZD4).	-3,04	-2,27	-5,15	-8,46	1,04	-1,24	-1,78	-4,64	-6,33	-7,02	-1,01	1,07	-1,10	5,51E-09	1,26E-05	
NM_199001.1	MGC59937	Similar to RIKEN cDNA 2310002J15 gene (MGC59937).	1,25	1,14	3,06	9,58	1,01	1,79	4,36									

Anhang 10: Putative Markergene für progenotoxische Substanzen

Die Tabelle beinhaltet die Deregulationswerte der 88 Gene, die durch die progenotoxischen Verbindungen in HepG2-Zellen statistisch signifikant dereguliert waren. Die HepG2-Zellen wurden mit 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA), Diethylnitrosamin, Cyclophosphamid und Aflatoxin B₁ sowie den Kontrollen Theophyllin und Metformin für täglich 6 h mit 18 h Erholungszeit über insgesamt 48 h mit und ohne metabolisches Aktivierungssystem (MAS: Phenobarbital/ β -Naphthoflavon-induzierter S9) behandelt. Die 88 Gene wurden aus Illumina-Microarraystudien mittels ANOVA (p-Wert<0,01/ BH-q-Wert<0,3) mit anschließendem Filtern (Deregulationsgrenzwert 1,5) selektiert. Die dargestellten Daten sind die Mittelwerte relativ zu den entsprechenden Lösungsmittel-/S9-Kontrollen aus drei verschiedenen Experimenten mit Zellpassagen zwischen 3 und 25.

RefSeq	Symbol	Funktion	Genname	Aflatoxin B ₁					Cyclophosphamid					Diethylnitrosamin					DMBA			Metformin		Theophyllin		ANOVA	
				48h					48h					48h					48h			48h		48h		P-Wert	BH-q-Wert
				0,5 µM	1 µM	10 µM	+S9	+S9	0,5 µM	1 µM	25 µM	50 µM	25 µM	50 µM	25 mM	50 mM	50 mM	10 µM	75 µM	10 µM	1 mM	+S9	-	+S9	-		
NM_020375.1	C12orf5	Apoptose/ (P53-vermittelte) DNA-Schadensantwort	chromosome 12 open reading frame 5 (C12orf5)	1,16	1,22	1,33	1,42	1,56	1,14	1,14	1,63	1,73	1,14	1,04	1,31	1,59	1,09	1,22	1,72	1,01	1,01	1,12	1,15	7,07E-03	2,54E-01		
NM_033306.2	CASP4		caspace 4, apoptosis-related cysteine peptidase (CASP4), transcript variant gamma	0,92	0,92	0,86	1,40	1,66	1,02	1,02	1,95	1,71	1,08	0,85	1,41	1,39	1,01	1,07	1,87	0,96	0,89	0,95	1,04	3,02E-03	2,16E-01		
NM_078467.1	CDKN1A		cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A), transcript variant 2	1,13	1,48	2,56	2,43	3,14	0,94	1,03	3,04	3,35	0,84	0,68	1,95	2,20	1,36	1,50	3,18	1,02	0,95	0,91	1,07	8,91E-03	2,70E-01		
NM_002038.2	G1P3		interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-6-16) (G1P3), transcript variant 1	1,18	1,33	1,40	1,47	1,65	1,20	1,22	1,45	1,61	1,15	1,03	1,71	1,98	1,19	1,28	1,55	1,03	1,01	0,92	0,95	8,02E-04	1,56E-01		
NM_007350.2	PHLDA1	Immun-/Entzündungsantwort	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 (PHLDA1)	1,07	1,29	1,27	1,25	1,38	1,17	1,10	1,43	1,51	1,09	1,08	1,52	1,54	1,25	1,25	1,53	1,10	1,00	1,13	1,04	6,51E-03	2,47E-01		
NM_198951.1	TGM2		transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase) (TGM2), transcript variant 2	0,99	1,06	0,98	1,16	1,40	1,09	1,08	1,95	1,93	1,24	1,31	1,32	1,34	1,06	1,17	1,94	1,05	0,97	0,94	1,01	1,09E-04	1,05E-01		
NM_033285.2	TP53INP1		tumor protein p53 inducible nuclear protein 1 (TP53INP1)	1,04	1,19	1,36	1,27	1,38	1,13	1,05	1,69	1,53	1,00	0,95	1,12	1,18	1,09	1,05	1,54	1,05	0,88	1,10	0,99	6,34E-03	2,47E-01		
NM_198053.1	CD247		CD247 molecule (CD247), transcript variant 1	1,01	1,02	1,19	1,28	1,44	0,99	1,05	2,00	1,86	1,23	1,23	1,40	1,49	1,04	1,07	1,73	0,93	0,96	0,89	1,01	2,11E-04	1,23E-01		
NM_001251.1	CD68		CD68 antigen (CD68)	0,98	0,90	0,67	1,11	1,37	1,07	1,03	2,20	2,56	0,99	0,90	1,76	1,93	0,98	1,04	1,91	1,04	0,86	0,92	0,99	3,30E-03	2,17E-01		
NM_001477.1	GAGE12I		G antigen 12I (GAGE12I)	1,07	1,02	1,11	1,09	1,26	1,08	1,02	1,80	2,06	1,06	1,01	1,30	1,09	1,07	1,02	1,52	1,15	0,93	1,01	1,08	3,73E-03	2,20E-01		
NM_001474.1	GAGE4		G antigen 4 (GAGE4)	1,03	1,02	1,06	1,14	1,38	1,05	0,95	1,70	1,95	0,94	0,92	1,27	1,09	0,99	1,03	1,58	1,01	0,90	0,99	1,11	4,58E-03	2,29E-01		
NM_006674.2	HCP5		HLA complex P5 (HCP5)	1,04	1,20	1,19	1,32	1,59	1,06	1,12	1,80	1,67	1,02	0,95	1,29	1,28	1,06	1,12	1,76	1,07	0,95	1,02	1,02	1,70E-03	1,92E-01		
NM_006435.1	IFITM2		interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D) (IFITM2)	1,00	1,12	1,08	1,37	1,53	0,96	1,00	1,56	1,30	0,99	0,99	1,12	0,95	0,97	1,04	1,71	1,01	0,98	0,94	0,90	3,21E-03	2,17E-01		
NM_173343.1	IL1R2		interleukin 1 receptor, type II (IL1R2), transcript variant 2	0,96	1,00	1,31	1,53	1,83	1,08	1,02	2,02	1,89	1,41	1,51	1,33	1,37	1,17	1,25	1,89	0,80	1,00	1,03	1,03	2,82E-03	2,13E-01		
NM_001531.1	MR1		major histocompatibility complex, class I-related (MR1)	1,17	1,29	1,73	1,30	1,57	1,05	0,98	1,84	1,90	0,97	0,97	1,27	1,34	1,18	1,20	2,01	1,09	0,95	1,01	1,01	9,94E-03	2,74E-01		
NM_004688.1	NMI		N-myc (and STAT) interactor (NMI)	1,03	0,97	1,00	1,30	1,37	1,03	1,04	1,76	1,61	1,16	0,95	1,21	1,34	1,02	1,05	1,67	0,97	0,99	1,02	1,06	3,26E-03	2,17E-01		
NM_206956.1	PRAME		preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME), transcript variant 5	1,03	1,13	1,22	1,21	1,45	1,09	1,03	1,79	1,64	1,13	1,09	1,38	1,36	1,06	1,04	1,70	1,02	1,04	0,99	1,07	6,56E-03	2,47E-01		
NM_006404.3	PROCR		protein C receptor, endothelial (EPCR) (PROCR)	1,22	1,34	1,64	1,44	1,69	1,13	1,14	2,19	2,09	1,30	1,20	1,76	1,63	1,18	1,32	2,26	1,12	0,99	1,06	1,01	2,10E-03	1,92E-01		
NM_000350.1	ABCA4		ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4 (ABCA4)	1,13	1,29	1,50	1,39	1,45	1,04	1,10	1,84	1,67	1,13	1,00	1,24	1,15	1,23	1,24	1,71	1,12	0,94	1,06	1,03	4,45E-03	2,27E-01		
NM_004070.2	CLCNKA		chloride channel Ka (CLCNKA)	1,23	1,31	1,35	1,49	1,62	1,02	1,19	1,97	1,59	1,01	0,79	1,51	1,28	1,14	1,20	2,28	1,10	0,98	1,03	1,03	3,84E-03	2,22E-01		
NM_006580.2	CLDN16		claudin 16 (CLDN16)	1,43	1,60	1,69	1,64	1,55	1,01	1,15	1,82	1,45	1,45	1,26	1,52	1,43	1,37	1,67	1,44	1,14	0,94	1,00	0,99	3,39E-03	2,17E-01		
NM_152672.3	OSTalpha	organic solute transporter alpha (OSTalpha)	1,07	1,05	1,12	1,32	1,59	1,01	1,05	1,66	1,35	0,90	0,78	1,18	1,13	1,11	1,13	2,02	1,07	0,99	1,01	1,19	2,21E-03	1,94E-01			
NM_016609.3	SLC22A17	solute carrier family 22, member 17 (SLC22A17), transcript variant 2	1,12	1,16	1,38	1,26	1,47	1,18	1,13	1,77	1,56	1,44	1,29	1,54	1,40	1,13	1,19	1,74	1,21	0,92	1,06	0,92	5,22E-03	2,38E-01			
NM_021194.2	SLC30A1	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1 (SLC30A1)	0,94	1,05	1,07	1,39	1,50	1,07	1,00	1,89	1,79	0,85	0,73	1,51	1,50	1,04	1,11	1,70	0,93	0,99	1,06	1,10	7,91E-04	1,56E-01			
NM_001001850.1	STX19	syntaxin 19 (STX19)	1,07	1,11	1,03	1,26	1,52	1,08	1,11	1,96	1,68	1,06	0,90	1,35	1,50	0,95	1,01	1,83	1,13	0,87	1,05	1,00	6,47E-03	2,47E-01			
NM_053056.1	CCND1	cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1) (CCND1)	1,21	1,31	1,61	1,65	1,66	1,30	1,16	1,77	1,74	1,39	1,32	1,22	1,47	1,20	1,37	1,46	1,10	0,91	1,12	1,08	8,01E-03	2,63E-01			
NM_001001390.1	CD44	CD44 molecule (Indian blood group) (CD44), transcript variant 3	1,22	1,30	1,44	1,68	1,92	1,37	1,18	2,38	2,13	1,29	1,27	1,87	1,75	1,22	1,54	2,08	1,07	0,90	1,18	1,10	8,75E-04	1,57E-01			
NM_001878.2	CRABP2	cellular retinoic acid binding protein 2 (CRABP2)	1,14	1,22	1,47	1,41	1,79	1,23	1,11	2,05	2,01	1,54	1,40	2,09	1,80	1,10	1,27	2,31	1,20	0,96	0,99	1,00	2,43E-03	2,02E-01			
NM_005618.2	DLL1	delta-like 1 (Drosophila) (DLL1)	1,01	1,11	1,10	1,20	1,40	1,01	1,02	1,75	1,70	0,99	0,88	1,24	1,24	1,11	1,08	1,66	1,05	0,98	1,06	1,01	1,13E-03	1,71E-01			
NM_001423.1	EMP1	epithelial membrane protein 1 (EMP1)	1,54	1,79	1,78	1,98	2,06	1,31	1,24	2,84	2,85	1,61	1,37	1,84	2,09	1,11	1,31	1,93	1,31	1,05	1,28	1,04	2,62E-04	1,24E-01			
NM_001454.2	FOXJ1	forkhead box J1 (FOXJ1)	1,46	1,61	1,63	1,06	1,06	1,07	1,11	0,79	0,73	1,12	0,64	0,40	0,46	1,02	1,16	0,78	1,45	0,94	1,11	0,98	1,54E-03	1,87E-01			
NM_024333.1	FSD1	fibronectin type III and SPRY domain containing 1 (FSD1)	1,26	1,38	1,73	1,39	1,56	1,17	1,23	1,49	1,37	1,52	1,43	1,47	1,40	1,22	1,28	1,54	1,11	0,99	1,03	1,07	8,28E-03	2,65E-01			
NM_015714.2	G0S2	G0/G1switch 2 (G0S2)	0,32	0,39	0,30	1,01	1,05	0,67	0,66	1,33	1,07	0,26	0,25	2,15	2,16	0,88	0,64	1,02	0,44	0,99	0,72	1,09	5,39E-03	2,38E-01			
NM_023002.1	HAPLN4	hyaluronan and proteoglycan link protein 4 (HAPLN4)	1,02	1,10	1,18	1,33	1,61	1,08	1,01	1,93	1,98	1,24	1,24	1,46	1,80	1,01	1,10	2,12	1,03	0,97	1,04	1,13	3,93E-03	2,22E-01			
NM_000558.3	HBA1	hemoglobin, alpha 1 (HBA1)	1,05	0,99	1,12	1,06	1,22	1,02	0,99	1,35	1,54	1,21	1,28	2,24	1,73	1,04	1,04	1,48	1,04	1,07	0,93	1,04	1,71E-03	1,92E-01			
NM_016257.2	HPCAL4	hippocalcin like 4 (HPCAL4)	1,17	1,20	1,31	1,28	1,39	1,05	1,07	1,62	1,65	1,47	1,34	1,58	1,39	1,09	1,10	1,59	1,11	0,97	0,98	0,91	1,71E-04	1,20E-01			
NM_003641.2	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27) (IFITM1)	1,17	1,26	1,42	1,45	1,64	1,03	1,11	2,25	2,08	1,11	0,91	1,35	0,95	1,16	1,24	2,07	1,10	1,02	0,99	0,86	3,36E-03	2,17E-01			
NM_001013398.1	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), transcript variant 1	1,47	1,59	1,50	1,23	1,30	1,18	1,19	1,73	1,64	1,71	1,70	1,53	1,26	0,97	1,14	1,41	1,29	0,86	1,20	0,95	7,78E-04	1,56E-01			
NM_000422.1	KRT17	keratin 17 (KRT17)	1,11	1,17	1,47	1,10	1,17	1,13	1,08	1,36	1,52	1,55	1,65	1,57	1,55	1,15	1,18	1,48	1,23	0,98	1,02	0,97	2,22E-03	1,94E-01			
NM_002317.3	LOX	lysyl oxidase (LOX)	1,08	1,35	1,30	1,26	1,32	1,26	1,08	2,10	1,99	1,35	1,55	2,53	1,98	1,15	1,35	1,88	1,22	0,92	1,02	1,02	1,47E-03	1,84E-01			
NM_002423.3	MMP7	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine) (MMP7)	0,96	0,92	1,05	1,32	1,50	1,02	0,94	1,83	1,85	0,84	0,83	1,12	1,10	1,00	0,94	2,39	1,03	0,96	1,01	1,07	3,13E-05	9,07E-02			
NM_002514.2	NOV	nephroblastoma overexpressed gene (NOV)	1,39	1,43	1,54	1,27	1,43	1,37	1,20	2,06	2,63	1,56	1,36	1,79	2,22	1,18	1,37	1,92	1,32	0,97	1,25	1,01	5,56E-03	2,39E-01			
NM_013961.1	NRG1	neuregulin 1 (NRG1), transcript variant GGF	1,19	1,24	1,45	1,49	1,46	1,13	1,12	1,74	1,78	1,28	1,20	1,44	1,53	1,18	1,35	1,35	1,06	0,98	1,02	1,02	1,21E-03	1,77E-01			
NM_002658.2	PLAU	plasminogen activator, urokinase (PLAU)	1,33	1,71	2,09	1,74	2,08	1,39	1,15	2,74	3,20	1,86	1,44	1,84	1,59	1,29	1,53	2,13	1,32	0,94	1,14	0,90	8,32E-03	2,65E-01			
NM_080591.1	PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) (PTGS1), transcript variant 2	1,05	1,08	1,24	1,51	1,69	1,14	1,11	2,63	1,99	1,12	0,88	1,55	2,01	1,10	1,26	2,80	1,11	0,96	1,09	1,07	8,45E-03	2,68E-01			
NM_006105.3	RAPGEF3	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3 (RAPGEF3)	1,31	1,52	1,																						

RefSeq	Symbol	Funktion	Genname	Aflatoxin B ₁					Cyclophosphamid				Diethylnitrosamin				DMBA			Metformin		Theophyllin		ANOVA	
				48h					48h				48h				48h			48h		48h		P-Wert	BH-q-Wert
				-	-	-	+S9	+S9	-	-	+S9	+S9	-	-	+S9	+S9	-	-	+S9	-	+S9	-	+S9		
0,5 µM	1 µM	10 µM	0,5 µM	1 µM	25 µM	50 µM	25 µM	50 µM	25 mM	50 mM	25 mM	50 mM	10 µM	75 µM	10 µM	1 mM	1 mM	100 µM	100 µM						
NM_020547.1	AMHR2		anti-Mullerian hormone receptor, type II (AMHR2)	1,03	0,97	1,19	1,30	1,48	0,98	0,98	2,04	1,90	0,93	0,85	1,19	1,04	1,06	1,03	1,93	1,02	1,04	1,02	1,02	1,17E-03	1,74E-01
NM_194284.1	CLDN23		claudin 23 (CLDN23)	1,03	1,19	1,29	1,35	1,55	1,10	1,07	1,67	1,57	1,17	1,05	1,32	1,37	1,15	1,21	1,58	1,04	0,96	1,06	1,07	8,38E-03	2,66E-01
NM_000775.2	CYP2J2		cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2 (CYP2J2)	1,09	1,26	1,23	1,39	1,51	1,08	1,08	1,77	1,58	1,26	1,12	1,30	1,29	1,20	1,23	1,68	1,03	0,91	1,03	1,03	5,95E-04	1,44E-01
NM_001458.2	FLNC		filamin C, gamma (actin binding protein 280) (FLNC)	1,17	1,12	1,44	1,32	1,55	1,15	1,15	1,61	1,56	1,42	1,38	1,39	1,29	1,37	1,34	1,83	1,02	0,88	1,08	0,82	5,98E-04	1,44E-01
NM_013281.2	FLRT3		fibronectin leucine rich transmembrane protein 3 (FLRT3), transcript variant 1	1,10	1,24	1,25	1,37	1,48	1,02	1,03	1,42	1,35	1,05	1,09	1,54	1,61	1,03	1,14	1,59	1,05	0,91	1,11	0,93	4,96E-04	1,44E-01
NM_002068.1	GNA15		guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 15 (Gq class) (GNA15)	1,04	1,12	1,30	1,20	1,26	0,94	0,94	1,68	1,67	1,03	1,08	1,45	1,44	1,08	1,04	1,87	1,04	1,03	0,99	0,98	1,90E-03	1,92E-01
NM_153840.2	GPR110		G protein-coupled receptor 110 (GPR110), transcript variant 1	1,17	1,31	1,55	1,33	1,56	1,03	1,04	1,81	1,85	1,10	1,11	1,23	1,25	1,13	1,25	1,75	1,09	1,07	1,07	1,03	7,73E-03	2,61E-01
NM_001013005.1	HERC6		hect domain and RLD 6 (HERC6), transcript variant 4	1,06	1,18	1,27	1,29	1,40	0,98	1,03	1,85	1,74	1,03	1,04	1,28	1,17	0,98	1,04	1,66	1,03	0,99	1,05	0,99	1,95E-03	1,92E-01
NM_003866.1	INPP4B		inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, 105kDa (INPP4B)	0,93	1,02	1,18	1,42	1,68	1,05	1,03	1,90	1,87	1,07	0,97	1,54	1,43	1,04	1,10	1,60	0,93	1,03	0,99	1,06	5,84E-03	2,41E-01
NM_002928.2	RGS16		regulator of G-protein signalling 16 (RGS16)	0,93	1,24	1,42	2,11	3,26	0,89	1,02	2,72	2,22	0,64	0,69	1,32	1,28	1,45	1,27	3,47	1,12	0,83	1,00	1,01	1,05E-03	1,71E-01
NM_004657.4	SDPR		serum deprivation response (phosphatidylserine binding protein) (SDPR)	1,23	1,36	1,41	1,36	1,57	1,30	1,23	2,00	1,86	1,37	1,41	1,42	1,61	1,59	1,74	1,80	1,10	0,97	1,14	1,09	2,34E-04	1,23E-01
NM_018421.2	TBC1D2		TBC1 domain family, member 2 (TBC1D2)	0,96	1,10	1,31	1,29	1,45	1,14	1,04	2,34	1,98	1,00	0,79	1,15	1,32	0,99	1,06	1,70	1,03	0,89	1,07	0,99	8,11E-03	2,64E-01
NM_006086.2	TUBB3		tubulin, beta 3 (TUBB3)	1,12	1,16	1,07	1,15	1,42	1,07	1,15	1,48	1,66	1,33	1,42	1,45	1,52	1,11	1,15	1,53	1,01	1,10	1,01	1,26	8,03E-03	2,63E-01
NM_178820.3	FBXO27		F-box protein 27 (FBXO27)	1,13	1,25	1,27	1,27	1,41	1,10	1,08	1,72	1,57	1,21	0,97	1,61	1,52	1,21	1,36	1,54	1,10	0,88	1,11	0,97	6,77E-03	2,51E-01
NM_024417.1	FDXR		ferredoxin reductase (FDXR), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1	1,11	1,38	1,53	1,35	1,52	0,95	1,07	1,69	1,67	1,03	0,87	1,40	1,39	1,14	1,25	1,54	1,03	0,84	1,01	0,97	9,36E-03	2,73E-01
NM_003275.1	TMOD1		tropomodulin 1 (TMOD1)	1,00	1,10	1,28	1,51	1,57	1,02	1,08	1,71	1,56	1,03	1,02	1,16	1,29	1,15	1,15	1,40	0,96	0,99	1,00	0,97	2,93E-03	2,14E-01
NM_000505.2	F12	Metabolismus (Proteine, DNA)	coagulation factor XII (Hageman factor) (F12)	1,05	1,03	1,04	1,37	1,58	1,12	1,14	1,72	1,51	1,31	1,27	1,50	1,47	0,97	1,19	1,61	1,08	1,00	0,96	0,99	2,71E-03	2,08E-01
NM_002526.1	NT5E		5'-nucleotidase, ecto (CD73) (NT5E)	1,18	1,21	1,26	1,29	1,43	1,12	1,05	1,96	1,81	1,16	1,02	1,17	1,33	1,16	1,22	1,53	1,07	0,97	1,06	1,01	9,07E-04	1,60E-01
NM_173567.2	ABHD7		abhydrolase domain containing 7 (ABHD7)	1,13	1,17	1,21	1,32	1,48	1,15	1,00	1,76	1,68	1,20	1,04	1,30	1,26	1,09	1,19	1,73	1,03	0,98	1,14	1,09	3,73E-03	2,20E-01
NM_207380.1	C15orf52		chromosome 15 open reading frame 52 (C15orf52)	1,08	1,17	1,22	1,16	1,36	1,01	1,20	1,51	1,49	1,09	1,25	1,37	1,60	1,18	1,26	1,62	1,08	0,91	1,00	0,93	6,07E-03	2,44E-01
NM_015463.1	C2orf32		chromosome 2 open reading frame 32 (C2orf32)	1,09	1,23	1,17	1,31	1,41	1,18	1,12	1,88	1,77	1,11	1,06	1,71	1,66	1,08	1,17	1,76	1,20	0,94	1,10	0,96	1,34E-04	1,13E-01
NM_024046.2	CAMKV		CaM kinase-like vesicle-associated (CAMKV)	1,06	1,05	1,18	1,34	1,36	1,05	1,02	1,86	1,88	1,18	1,22	1,67	1,70	1,06	1,12	1,63	0,98	0,94	1,04	1,00	7,13E-06	4,01E-02
NM_016452.1	CAPN9		calpain 9 (CAPN9), transcript variant 2	0,64	0,61	0,64	1,27	1,15	0,79	0,76	0,99	0,56	0,55	0,37	0,66	0,59	1,07	1,07	1,25	0,71	0,99	0,98	1,03	7,16E-03	2,54E-01
NM_016452.1	CAPN9		calpain 9 (CAPN9), transcript variant 2	0,54	0,55	0,64	1,37	1,21	0,76	0,75	1,05	0,56	0,46	0,29	0,70	0,58	1,01	1,05	1,28	0,65	1,05	0,94	1,03	9,15E-03	2,72E-01
NM_001275.2	CHGA		chromogranin A (parathyroid secretory protein 1) (CHGA)	0,85	0,85	1,11	1,44	1,44	0,97	0,93	1,85	1,42	0,85	0,90	0,65	0,73	1,24	1,22	1,51	0,87	0,82	0,87	0,88	8,20E-04	1,57E-01
NM_001017436.1	CT45-4		cancer/testis antigen CT45-4 (CT45-4)	1,02	0,95	1,09	1,11	1,27	0,98	1,06	1,72	1,75	1,18	1,14	1,10	0,95	1,01	0,98	1,75	0,99	0,95	0,94	0,94	7,74E-04	1,56E-01
NM_153690.4	FAM43A		family with sequence similarity 43, member A (FAM43A)	0,79	0,87	0,76	1,26	1,61	0,93	0,99	1,73	1,62	0,63	0,60	1,01	1,15	0,95	0,86	1,75	0,90	1,06	0,97	1,35	8,36E-04	1,57E-01
NM_153756.1	FNDC5		fibronectin type III domain containing 5 (FNDC5)	1,16	1,23	1,36	1,45	1,64	1,06	1,06	1,76	1,69	1,35	1,27	1,50	1,47	1,09	1,18	1,93	1,15	0,93	1,07	0,93	2,44E-04	1,23E-01
NM_021996.3	GBGT1		globoside alpha-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (GBGT1)	0,99	1,07	1,12	1,13	1,28	0,99	1,10	1,68	1,61	1,10	1,21	1,50	1,51	1,09	1,08	1,69	1,13	0,94	1,03	1,01	1,22E-03	1,78E-01
NM_014905.2	GLS		glutaminase (GLS)	1,09	1,36	1,40	1,33	1,39	1,10	1,04	1,76	1,94	1,22	1,23	1,33	1,29	1,13	1,34	1,91	1,12	0,85	1,09	0,90	1,89E-03	1,92E-01
NM_138768.2	MYEOV		myeloma overexpressed (in a subset of t(11;14) positive multiple myelomas) (MYEOV)	1,12	1,23	1,88	2,20	2,34	1,26	1,12	3,50	3,32	1,22	1,16	1,99	2,34	1,42	1,59	2,09	1,05	0,97	1,04	1,08	3,69E-03	2,20E-01
NM_024938.2	PCNXL2		pecanex-like 2 (Drosophila) (PCNXL2), transcript variant 2	0,94	1,03	1,19	1,55	1,80	1,03	1,02	2,27	2,25	1,08	1,01	1,13	1,27	1,07	1,04	1,95	1,01	0,95	0,92	0,99	4,83E-04	1,44E-01
NM_002638.2	PI3		peptidase inhibitor 3, skin-derived (SKALP) (PI3)	1,03	1,06	1,43	1,32	1,73	0,94	0,99	4,23	4,69	1,20	2,42	3,73	4,19	1,22	1,28	2,42	0,93	0,85	1,01	0,82	1,46E-03	1,84E-01
NM_012232.2	PTRF		polymerase I and transcript release factor (PTRF)	1,08	1,28	1,28	1,22	1,32	1,19	1,08	1,38	1,29	1,30	1,32	1,54	1,56	1,11	1,25	1,56	1,13	0,94	1,16	1,06	5,68E-03	2,39E-01
NM_001017430.1	RBM3		RNA binding motif (RNP1, RRM) protein 3 (RBM3), transcript variant 2	0,99	1,00	0,97	0,99	0,87	0,94	0,89	0,72	0,55	0,64	0,54	0,45	0,47	0,89	0,92	0,81	0,94	0,89	1,01	1,03	6,37E-05	1,04E-01
NM_080388.1	S100A16		S100 calcium binding protein A16 (S100A16)	1,32	1,42	1,62	1,32	1,61	1,18	1,03	2,02	1,76	1,32	1,34	1,89	2,30	1,14	1,21	1,87	1,18	0,99	1,11	1,02	4,74E-03	2,31E-01
NM_181598.2	SPG3A		spastic paraplegia 3A (autosomal dominant) (SPG3A), transcript variant 2	1,00	1,23	1,24	1,29	1,38	1,03	1,04	1,52	1,51	0,96	0,94	1,24	1,37	1,04	1,04	1,58	1,06	0,93	1,01	1,05	9,78E-03	2,74E-01

Anhang 11: Gene des Klassifikationsmodells für mutagene und promutagene Substanzen

Die Tabelle beinhaltet die Deregulationswerte und Rankingstatistik der 91 putativen Markergene für die getesteten genotoxischen und progenotoxischen Verbindungen (Klassifikationsmodell). Die HepG2-Zellen wurden mit 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA), Diethylnitrosamin, Cyclophosphamid und Aflatoxin B₁ sowie den Kontrollen Theophyllin und Metformin für täglich 6 h mit 18 h Erholungszeit über insgesamt 48 h mit und ohne metabolisches Aktivierungssystem (MAS: Phenobarbital/ β -Naphthoflavon-induzierter S9) behandelt. Dagegen erfolgte die Behandlung mit den direkt genotoxischen Verbindungen kontinuierlich über 24 h und 48 h bei täglichem Wechsel des Substanzmediums. Die 91 Gene wurden mithilfe eines *Ranking*-Verfahrens auf Basis einer ANOVA für die Ermittlung der Rangfolgen in Kombination mit dem Supportvektormaschinenalgorithmus als Klassifizierungsmethode ermittelt. Die dargestellten Daten sind die Mittelwerte der Genregulationen relativ zu den entsprechenden Lösungsmittel-/S9-Kontrollen aus drei verschiedenen Experimenten mit Zellpassagen zwischen 3 und 25. ¹Versuchsteil progenotoxische Verbindungen, ²Versuchsteil genotoxische Verbindungen, ³Rangnummer des ANOVA-*Rankings*, ⁴Generelle Regulations-tendenz in den (pro-)genotoxischen Proben.

RefSeq	Symbol	Funktion	Genname	Cyclophosphamid ¹		Aflatoxin B ₁ ¹				DMBA ¹		Diethylnitrosamin ¹				Metformin ¹		Theophyllin ¹		DMSO ¹	Theophyllin ²		MMS ²		Actinomycin D ²		Etoposid ²		Rang ³	Regulation ⁴				
				48h		48h				48h		48h				48h		48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h										
				-	-	+S9	+S9	-	-	-	+S9	+S9	-	-	+S9	-	-	+S9	+S9	-	+S9	+S9	-	-	-	-	-	-			-	-	-	-
NM_016545.3	IER5		immediate early response 5 (IER5)	1,11	1,15	2,15	1,81	1,12	1,19	1,92	1,66	1,88	1,30	1,26	1,83	1,06	1,03	1,50	1,51	-1,04	-1,05	1,04	1,16	1,10	1,06	2,13	2,19	2,84	3,07	1,60	1,95	2	hoch	
NM_003811.2	TNFSF9		tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9 (TNFSF9)	1,08	-1,05	2,58	2,13	1,01	1,12	1,47	1,69	2,07	1,02	1,15	1,88	1,11	1,02	1,24	1,45	1,02	-1,05	1,05	-1,05	1,18	-1,06	1,17	1,39	1,67	1,25	1,59	1,10	1,46	19	hoch
NM_020965.2	MAGI3		membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 3 (MAGI3), transcript variant 1	1,03	1,02	-1,10	-1,13	-1,01	-1,12	-1,02	-1,05	-1,06	-1,00	1,04	-1,10	-1,06	-1,01	-1,07	-1,04	-1,00	1,02	-1,02	1,00	1,02	1,01	1,00	-1,10	-1,05	-1,14	-1,09	-1,05	-1,02	21	herunter
NM_015367.2	BCL2L13		BCL2-like 13 (apoptosis facilitator) (BCL2L13), nuclear gene encoding mitochondrial protein	1,02	1,00	1,35	1,19	-1,06	1,10	1,01	1,19	1,18	1,05	1,10	1,29	-1,08	-1,23	1,36	1,40	-1,03	-1,14	1,02	-1,02	-1,02	1,07	-1,09	1,26	1,40	1,07	-1,02	1,19	1,15	25	hoch
NM_002307.1	LGALS7		lectin, galactoside-binding, soluble, 7 (galectin 7) (LGALS7)	1,07	1,11	1,68	1,73	1,14	1,29	2,02	1,23	1,50	1,25	1,26	1,93	1,11	1,23	1,77	1,97	1,09	1,05	-1,01	1,09	-1,01	-1,10	1,01	1,13	1,35	1,89	1,69	1,21	2,76	29	hoch
NM_001007234.1	ERCC8		excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 8 (ERCC8), transcript variant 3	1,06	1,11	-1,10	-1,18	1,04	-1,17	-1,15	-1,04	-1,12	1,01	-1,02	-1,16	1,12	1,17	-1,14	-1,13	1,01	-1,15	1,00	-1,12	1,01	-1,02	-1,01	-1,43	-1,19	-1,26	-1,10	-1,16	-1,31	51	herunter
NM_002528.4	NTHL1		nth endonuclease III-like 1 (E. coli) (NTHL1)	1,00	-1,01	-1,19	-1,48	1,03	1,09	-1,09	-1,08	-1,07	-1,10	-1,15	-1,20	-1,13	-1,21	-1,23	-1,24	1,09	-1,07	1,06	-1,00	1,17	-1,04	1,27	-1,41	-1,59	-1,64	-1,53	-1,19	-1,32	60	herunter
NM_078467.1	CDKN1A		cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A), transcript variant 2	-1,07	1,03	3,04	3,35	1,13	1,48	2,56	2,43	3,14	1,36	1,50	3,18	-1,19	-1,48	1,95	2,20	1,02	-1,05	-1,10	1,07	-1,17	1,03	-1,04	7,38	9,30	-1,29	-1,15	3,09	6,89	66	hoch
NM_003820.2	TNFRSF14		tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpesvirus entry mediator) (TNFRSF14)	1,09	1,05	1,32	1,48	1,08	1,24	1,38	1,20	1,49	1,21	1,23	1,54	1,16	-1,03	1,34	1,34	1,11	-1,15	1,03	1,08	-1,20	-1,08	1,01	1,10	1,16	1,05	1,06	1,25	1,71	68	hoch
NM_006404.3	PROCR		protein C receptor, endothelial (EPCR) (PROCR)	1,13	1,14	2,19	2,09	1,22	1,34	1,64	1,44	1,69	1,18	1,32	2,26	1,30	1,20	1,76	1,63	1,12	-1,01	1,06	1,01	1,17	1,06	1,09	1,66	2,87	2,36	2,58	1,37	2,20	4	hoch
NM_001531.1	MR1		major histocompatibility complex, class I-related (MR1)	1,05	-1,02	1,84	1,90	1,17	1,29	1,73	1,30	1,57	1,18	1,20	2,01	-1,03	-1,03	1,27	1,34	1,09	-1,05	1,01	1,01	1,01	1,10	-1,19	2,11	1,94	1,17	1,05	1,20	1,87	18	hoch
NM_004843.2	IL27RA		interleukin 27 receptor, alpha (IL27RA)	1,02	-1,01	1,49	1,45	1,08	1,14	1,18	1,17	1,23	1,04	1,24	1,36	1,27	1,03	1,33	1,34	1,06	-1,06	1,01	-1,02	-1,10	-1,15	1,10	1,37	1,29	2,08	1,78	1,08	1,20	22	hoch
NM_005101.1	ISG15		ISG15 ubiquitin-like modifier (ISG15)	-1,01	1,04	1,86	1,86	1,08	1,27	1,70	1,53	1,74	1,14	1,23	2,24	1,06	-1,02	1,61	1,42	1,05	-1,02	1,00	-1,04	1,37	-1,15	1,27	2,10	3,22	1,30	1,30	1,01	2,01	48	hoch
NM_019080.1	NDFIP2		Nedd4 family interacting protein 2 (NDFIP2)	1,03	-1,06	1,33	1,03	-1,03	1,03	-1,07	1,19	1,17	-1,04	1,04	1,20	-1,02	-1,14	1,15	1,31	-1,01	-1,07	1,03	1,04	-1,12	1,03	-1,14	1,27	1,34	1,39	1,30	1,06	1,01	84	hoch
NM_000593.5	TAP1		transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP) (TAP1)	1,09	1,08	1,32	1,41	-1,01	1,12	1,23	1,04	1,18	1,08	1,17	1,27	-1,04	-1,10	1,24	1,22	1,07	-1,07	1,04	1,01	-1,13	1,04	1,00	2,30	2,45	1,85	1,90	1,24	1,54	87	hoch
NM_004321.4	KIF1A		kinesin family member 1A (KIF1A)	1,15	1,08	1,34	1,05	1,07	1,36	1,46	1,26	1,21	1,11	1,29	1,51	1,23	1,02	1,56	1,55	1,11	-1,15	1,08	1,02	-1,07	-1,04	1,08	1,57	1,67	1,92	1,34	1,24	1,90	11	hoch
NM_004858.1	SLC4A8		solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 8 (SLC4A8)	-1,01	1,04	-1,26	-1,19	1,04	1,04	1,03	-1,12	-1,18	1,06	-1,06	-1,25	1,18	1,06	-1,06	-1,27	1,08	-1,04	1,01	-1,07	1,09	-1,01	-1,06	-1,16	-1,26	-1,12	-1,13	-1,07	-1,13	46	herunter
NM_033316.2	MF12		antigen p97 (melanoma associated) identified by monoclonal antibodies 133.2 and 96.5 (MF12), transcript variant 2	-1,00	1,02	1,40	1,41	1,04	1,07	1,14	1,15	1,34	1,02	1,06	1,41	1,11	1,03	1,23	1,11	1,04	1,07	1,03	1,05	1,05	1,01	-1,06	1,06	1,04	1,26	1,20	1,15	1,32	49	hoch
NM_017585.2	SLC2A6		solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6 (SLC2A6)	1,08	1,15	1,41	1,31	1,10	1,17	1,28	1,17	1,27	1,07	1,18	1,31	1,11	1,17	1,15	1,21	1,02	-1,01	1,09	1,03	1,19	-1,09	1,06	1,18	1,63	1,08	1,27	1,13	1,57	56	hoch
NM_020348.1	CNNM1		cyclin M1 (CNNM1)	1,01	1,02	-1,12	-1,07	1,04	-1,03	1,08	-1,06	-1,05	1,10	1,05	-1,07	1,03	1,17	-1,04	-1,06	1,07	1,01	1,04	-1,01	1,07	1,04	-1,01	-1,11	-1,15	-1,04	-1,11	-1,11	-1,13	61	hoch
NM_005125.1	CCS		copper chaperone for superoxide dismutase (CCS)	-1,02	-1,01	1,24	1,07	-1,02	1,04	1,06	1,07	1,18	-1,05	1,03	1,21	1,01	-1,11	1,12	1,12	1,02	-1,08	1,02	1,07	1,01	-1,11	1,08	1,06	1,23	1,16	1,26	1,18	1,51	64	hoch
NM_173854.4	SLC41A1		solute carrier family 41, member 1 (SLC41A1)	1,15	1,06	1,23	1,16	1,00	1,12	1,16	1,10	1,09	1,03	1,10	1,06	1,17	1,11	1,15	1,21	-1,06	-1,02	1,06	1,02	1,15	-1,05	-1,00	1,30	1,24	1,24	1,05	1,09	1,15	85	hoch
NM_004518.2	KCNQ2		potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2 (KCNQ2), transcript variant 3	1,03	1,06	-1,10	1,00	1,08	-1,04	1,07	-1,00	-1,08	1,11	1,06	-1,02	1,05	1,12	-1,03	-1,01	1,03	1,00	1,01	1,07	1,06	1,04	1,01	-1,02	-1,06	-1,04	-1,12	-1,00	-1,07	90	hoch
NM_015894.2	STMN3		stathmin-like 3 (STMN3)	1,07	1,01	1,52	1,22	1,07	1,17	1,12	1,27	1,40	-1,02	1,07	1,58	1,13	-1,14	1,28	1,09	1,05	-1,15	1,02	-1,00	-1,03	1,02	1,09	1,58	1,44	1,60	1,65	1,11	1,45	7	hoch
NM_022370.2	ROBO3		roundabout, axon guidance receptor, homolog 3 (Drosophila) (ROBO3)	1,01	1,01	1,48	1,31	-1,00	1,05	1,23	1,16	1,18	1,09	1,14	1,36	1,10	1,03	1,22	1,23	1,07	-1,02	-1,07	1,04	1,06	-1,04	1,08	1,24	1,13	1,26	1,23	1,14	1,51	9	hoch
NM_021783.2	EDA2R		ectodysplasin A2 receptor (EDA2R)	-1,12	-1,08	1,51	1,31	1,05	1,06	1,31	1,34	1,45	1,03	1,05	1,44	-1,01	1,03	1,17	1,35	-1,07	-1,04	-1,03	1,01	-1,01	1,08	1,04	1,23	1,50	1,03	1,10	1,16	1,43	10	hoch
NM_002658.2	PLAU		plasminogen activator, urokinase (PLAU)	1,39	1,15	2,74	3,20	1,33	1,71	2,09	1,74	2,08	1,29	1,53	2,13	1,86	1,44	1,84	1,59	1,32	-1,06	1,14	-1,11	1,28	1,04	-1,04	1,34	1,46	3,53	3,69	1,37	1,84	14	hoch
NM_002517.2	NPAS1		neuronal PAS domain protein 1 (NPAS1)	-1,00	1,09	1,45	1,24	1,02	1,15	1,19	1,22	1,26	1,13	1,18	1,41	1,22	1,13	1,32	1,33	1,11	1,03	-1,05	1,04	1,03	-1,01	1,09	1,26	-1,02	1,39	1,26	1,20	1,50	15	hoch
NM_001423.1	EMP1		epithelial membrane protein 1 (EMP1)	1,31	1,24	2,84	2,85	1,54	1,79	1,78	1,98	2,06	1,11	1,31	1,93	1,61	1,37	1,84	2,09	1,31	1,05	1,28	1,04	-1,86	-1,14	-1,13	1,21	2,15	3,05	1,91	1,42	1,81	17	hoch
NM_001458.2	FLNC		filamin C, gamma (actin binding protein 280) (FLNC)	1,15	1,15	1,61	1,56	1,17	1,12	1,44	1,32	1,55	1,37	1,34	1,83	1,42	1,38	1,39	1,29	1,02	-1,13	1,08	-1,23	1,32	-1,18	-1,08	1,24	1,37	1,79	1,66	1,21	1,54	24	hoch
NM_033328.2	CAPZA3		capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 3 (CAPZA3)	-1,06	1,07	-1,20	-1,06	1,03	-1,10	-1,04	-1,15	-1,08	1,06	1,00	-1,10	-1,01	1,08	-1,05	-1,11	1,02	1,02	-1,06	-1,02	1,07	1,01	1,00	-1,07	-1,04	-1,12	-1,10	-1,06	-1,05	26	herunter
NM_017805.2	RASIP1		Ras interacting protein 1 (RASIP1)	-1,04	-1,05	1,29	1,24	-1,09	1,02	1,04	1,06	1,10	1,00	-1,05	1,17	-1,08	-1,04	1,20	1,14	1,01	1,02	-1,04	-1,07	-1,07	-1,16	-1,01	1,22	1,06	1,23	1,24	1,00	1,14	28	hoch
NM_00662																																		

RefSeq	Symbol	Funktion	Genname	Cyclophosphamid ¹		Aflatoxin B ₁ ¹				DMBA ¹		Diethylnitrosamin ¹				Metformin ¹		Theophyllin ¹		DMSO ¹	Theophyllin ²		MMS ²		Actinomycin D ²		Etoposid ²		Rang ³	Regulation ⁴					
				48h		48h				48h		48h				48h		48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h											
				-	-	+S9	+S9	-	-	-	+S9	+S9	-	-	+S9	-	-	+S9	+S9	-	+S9	+S9	-	-	-	-	-	-			-	-	-	-	
NM_013267.2	GLS2		glutaminase 2 (liver, mitochondrial) (GLS2), nuclear gene encoding mitochondrial protein	1,05	1,08	1,32	1,37	1,06	1,32	1,31	1,27	1,25	1,22	1,27	1,21	1,03	1,01	1,33	1,21	1,12	1,03	1,03	-1,05	1,01	-1,01	1,03	1,40	1,49	1,36	1,22	1,36	1,81	1	hoch	
NM_021727.3	FADS3		fatty acid desaturase 3 (FADS3)	1,01	-1,00	1,45	1,26	1,01	1,21	1,22	1,30	1,34	1,03	1,14	1,42	-1,04	-1,33	1,19	1,28	1,09	-1,10	1,00	1,15	-1,26	1,04	1,04	1,67	2,10	1,49	1,62	1,39	1,95	6	hoch	
NM_006730.2	DNASE1L1		deoxyribonuclease I-like 1 (DNASE1L1), transcript variant 1	1,01	-1,02	1,24	1,10	-1,04	1,06	1,03	1,15	1,17	-1,04	1,02	1,25	1,01	-1,03	1,24	1,24	-1,04	1,01	1,00	1,07	-1,05	1,03	1,09	1,10	1,21	1,31	1,28	1,08	1,27	20	hoch	
NM_007171.2	POMT1		protein-O-mannosyltransferase 1 (POMT1)	1,01	-1,01	1,33	1,13	1,05	1,20	1,19	1,23	1,15	1,06	1,12	1,30	-1,05	-1,18	1,16	1,16	1,07	1,04	1,05	1,06	-1,07	-1,01	-1,00	1,20	1,33	1,72	1,51	1,06	1,21	23	hoch	
NM_014905.2	GLS		glutaminase (GLS)	1,10	1,04	1,76	1,94	1,09	1,36	1,40	1,33	1,39	1,13	1,34	1,91	1,22	1,23	1,33	1,29	1,12	-1,17	1,09	-1,12	1,37	-1,11	-1,06	1,44	2,08	1,42	1,03	1,15	1,38	30	hoch	
NM_017811.3	UBE2R2		ubiquitin-conjugating enzyme E2R 2 (UBE2R2)	1,09	1,07	-1,07	-1,01	1,12	1,02	1,03	-1,00	-1,09	1,02	1,10	-1,21	1,19	1,11	-1,12	-1,04	1,08	1,09	1,07	-1,02	1,08	1,10	1,03	-1,08	-1,07	-1,09	-1,10	-1,06	-1,10	32	herunter	
NM_030794.1	TDRD3		tudor domain containing 3 (TDRD3)	-1,02	-1,06	-1,23	-1,35	-1,02	-1,04	-1,10	-1,10	-1,20	1,00	-1,01	-1,27	-1,02	-1,12	-1,15	-1,17	-1,01	-1,03	1,02	-1,04	-1,02	-1,01	-1,03	-1,12	-1,18	-1,20	-1,17	-1,10	-1,39	33	herunter	
NM_199162.1	ADPRHL1		ADP-ribosylhydrolase like 1 (ADPRHL1), transcript variant 2	-1,04	-1,09	1,29	1,02	-1,10	1,04	1,05	1,04	1,10	1,02	1,02	1,24	-1,14	-1,18	1,14	1,11	-1,04	-1,02	-1,02	-1,02	1,02	-1,03	1,01	1,03	1,24	1,22	1,10	1,04	1,24	42	hoch	
NM_033625.1	RPL34		ribosomal protein L34 (RPL34), transcript variant 2	1,19	1,06	1,38	1,31	1,07	1,16	1,30	1,15	1,33	1,03	1,16	1,35	1,05	-1,09	1,09	1,12	1,03	-1,07	1,12	1,08	1,30	-1,03	1,21	1,44	1,56	1,43	1,78	1,21	1,31	43	hoch	
NM_001030004.1	HNF4A		hepatocyte nuclear factor 4, alpha (HNF4A), transcript variant 6	-1,15	-1,07	-1,30	-1,21	-1,08	-1,16	-1,10	-1,26	-1,19	-1,01	-1,12	-1,14	-1,07	1,01	-1,14	-1,14	-1,08	1,00	-1,05	-1,03	-1,02	1,16	1,08	-1,54	-1,44	-1,08	-1,16	-1,14	-1,18	57	herunter	
NM_003124.3	SPR		sepiapterin reductase (7,8-dihydrobiopterin:NADP+ oxidoreductase) (SPR)	1,03	-1,04	1,26	1,29	-1,02	1,10	1,17	1,15	1,21	-1,02	1,09	1,37	1,11	-1,02	1,24	1,45	1,00	-1,03	-1,01	1,08	1,12	1,01	1,08	1,66	1,60	1,37	1,29	1,07	1,04	59	hoch	
NM_015528.1	RNF167		ring finger protein 167 (RNF167)	1,10	-1,07	1,49	1,28	1,05	1,16	-1,03	1,19	1,30	-1,03	1,07	1,37	-1,09	-1,23	1,19	1,20	1,01	1,02	-1,04	1,05	-1,01	1,06	1,07	1,14	1,38	1,30	1,46	1,04	1,13	62	hoch	
NM_017750.2	RETSAT		retinol saturase (all-trans-retinol 13,14-reductase) (RETSAT)	-1,04	-1,10	1,31	1,15	-1,02	1,12	1,26	1,14	1,20	1,09	1,11	1,25	-1,06	-1,11	1,38	1,23	1,03	-1,01	-1,02	1,11	-1,13	1,08	-1,07	1,83	1,39	2,61	1,90	1,34	1,58	67	hoch	
NM_152490.1	B3GALNT2		beta-1,3-N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (B3GALNT2)	1,04	1,00	1,30	1,32	-1,02	1,08	1,07	1,16	1,18	1,01	1,13	1,25	1,02	1,02	1,13	1,37	-1,09	-1,01	1,00	1,02	1,26	-1,01	1,09	1,35	1,45	1,26	1,48	1,03	1,17	70	hoch	
NM_024592.1	SRD5A2L		steroid 5 alpha-reductase 2-like (SRD5A2L)	1,05	1,00	-1,11	-1,22	-1,01	-1,05	-1,15	-1,13	-1,20	1,01	-1,02	-1,12	-1,04	-1,11	-1,16	-1,23	-1,05	-1,11	1,01	-1,01	1,03	1,10	1,01	-1,26	-1,27	-1,01	-1,04	-1,04	-1,25	72	hoch	
NM_001008216.1	GALE		UDP-galactose-4-epimerase (GALE), transcript variant 2	-1,04	-1,00	-1,21	-1,10	1,06	-1,05	-1,02	1,01	-1,12	1,12	1,04	-1,14	1,01	1,15	-1,01	-1,08	-1,01	1,01	1,05	-1,01	1,07	-1,03	1,09	-1,11	-1,08	-1,07	-1,03	-1,05	-1,06	79	hoch	
NM_001807.2	CEL		carboxyl ester lipase (bile salt-stimulated lipase) (CEL)	-1,04	1,08	1,55	2,17	1,10	1,34	2,09	1,42	1,38	1,26	1,16	1,39	-1,12	-1,10	1,43	1,41	1,11	-1,03	1,00	-1,02	1,05	-1,10	-1,16	-1,01	2,77	4,50	2,16	2,82	2,77	11,61	80	hoch
NM_182796.1	MAT2B		methionine adenosyltransferase II, beta (MAT2B), transcript variant 2	-1,04	-1,03	1,09	1,06	1,01	1,08	1,04	1,15	1,10	-1,01	1,00	1,11	1,06	-1,04	1,11	1,19	-1,05	-1,12	-1,06	-1,01	-1,03	-1,09	-1,04	-1,02	-1,03	1,15	1,17	-1,05	-1,02	82	hoch	
NM_015654.3	NAT9		N-acetyltransferase 9 (GCN5-related, putative) (NAT9)	1,04	1,16	1,12	1,07	1,04	1,14	1,17	1,11	1,19	1,05	1,13	1,16	1,13	1,01	1,06	1,08	1,03	1,02	1,09	1,09	1,02	-1,04	1,09	1,11	1,39	1,17	1,26	1,12	1,32	86	hoch	
NM_000419.2	ITGA2B		integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41b) (ITGA2B)	1,08	1,09	1,43	1,24	1,13	1,27	1,44	1,29	1,37	1,16	1,35	1,48	1,08	-1,03	1,41	1,34	1,10	-1,06	1,09	-1,03	1,12	-1,08	-1,04	1,15	1,49	1,49	1,55	1,31	2,00	5	hoch	
NM_014422.2	PIB5PA		phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate 5-phosphatase, A (PIB5PA), transcript variant 1	1,01	-1,01	1,22	1,15	-1,02	1,08	1,01	1,08	1,10	1,04	1,05	1,18	-1,07	-1,14	1,16	1,17	1,02	-1,08	-1,03	1,01	-1,18	-1,11	-1,00	1,18	1,14	1,19	1,21	1,19	1,40	8	hoch	
NM_001699.3	AXL		AXL receptor tyrosine kinase (AXL), transcript variant 2	1,26	1,03	1,90	1,59	1,15	1,48	1,81	1,49	1,49	1,38	1,65	1,74	1,28	1,01	1,38	1,66	1,20	1,03	1,13	-1,01	-1,07	1,01	-1,10	1,92	2,97	2,97	3,30	1,08	1,59	16	hoch	
NM_003272.1	GPR137B		G protein-coupled receptor 137B (GPR137B)	1,14	1,07	1,50	1,33	1,14	1,18	1,18	1,37	1,37	1,05	1,14	1,37	1,34	1,04	1,30	1,27	1,07	1,05	1,11	1,12	-1,07	-1,02	-1,03	1,33	1,55	2,09	1,96	1,17	1,33	31	hoch	
NM_000675.3	ADORA2A		adenosine A2a receptor (ADORA2A)	-1,01	1,02	-1,09	-1,12	-1,04	-1,03	-1,09	-1,14	-1,03	-1,02	-1,06	-1,18	-1,07	-1,01	-1,04	-1,06	-1,02	-1,04	-1,02	-1,05	1,00	-1,07	1,03	-1,28	-1,26	-1,33	-1,23	-1,25	-1,33	34	herunter	
NM_001003809.1	DLGAP1		discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 1 (DLGAP1), transcript variant beta	-1,02	-1,02	1,15	1,17	-1,02	-1,00	1,04	1,05	1,12	-1,02	1,01	1,10	1,02	-1,03	1,00	-1,05	1,01	1,04	1,03	1,00	-1,03	1,05	1,00	1,07	1,08	1,15	1,16	1,04	1,07	50	hoch	
NM_198150.1	ARSK		arylsulfatase K (ARSK)	1,06	-1,10	-1,09	-1,13	1,05	-1,16	-1,19	-1,14	-1,22	-1,02	1,00	-1,15	1,09	1,05	-1,08	-1,10	1,06	-1,15	-1,03	-1,10	1,05	1,06	-1,03	-1,31	-1,15	-1,08	-1,32	-1,14	-1,08	69	herunter	
NM_006270.2	RRAS		related RAS viral (r-ras) oncogene homolog (RRAS)	-1,05	1,05	1,45	1,15	1,03	1,19	1,26	1,36	1,51	1,03	1,06	1,37	1,13	1,17	1,69	1,55	1,04	-1,09	-1,01	1,02	1,05	-1,13	1,19	1,02	1,38	1,88	2,18	1,09	1,70	75	hoch	
NM_005881.1	BCKDK		branched chain ketoacid dehydrogenase kinase (BCKDK)	1,03	1,07	1,24	1,00	1,05	1,15	1,02	1,13	1,15	-1,00	1,09	1,11	-1,04	-1,15	1,11	1,05	-1,00	-1,05	1,09	-1,01	1,09	-1,06	-1,02	1,34	1,33	1,29	1,40	1,06	1,20	81	hoch	
NM_001505.1	GPR30		G protein-coupled receptor 30 (GPR30), transcript variant 2	1,07	1,01	-1,14	-1,15	-1,03	1,01	-1,07	-1,09	-1,07	1,03	-1,05	-1,07	1,03	1,05	-1,11	-1,08	1,04	-1,04	1,01	1,02	1,02	-1,05	1,03	-1,46	-1,18	-1,36	-1,21	-1,06	-1,14	83	herunter	
NM_015257.1	TMEM194		transmembrane protein 194 (TMEM194)	1,11	1,04	1,38	1,23	1,03	1,18	1,18	1,36	1,30	1,18	1,20	1,26	1,05	-1,13	1,33	1,37	-1,07	-1,07	1,10	1,05	-1,05	1,03	1,02	1,45	1,16	1,24	1,16	1,25	1,19	3	hoch	
NM_016086.2	STYXL1		serine/threonine/tyrosine interacting-like 1 (STYXL1)	1,06	1,11	1,43	1,21	1,06	1,22	1,11	1,21	1,30	1,00	1,09	1,33	1,17	1,08	1,40	1,40	1,16	1,06	1,10	1,06	1,17	1,07	1,00	1,18	1,21	1,45	1,26	1,24	1,35	12	hoch	
NM_006818.3	MLLT11		myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 11 (MLLT11)	1,13	1,09	1,40	1,26	1,08	1,15	1,15	1,22	1,28	1,03	1,14	1,35	1,20	-1,01	1,39	1,17	-1,04	-1,20	1,05	-1,08	1,13	-1,14	-1,07	1,42	1,73	1,55	1,42	1,06	1,21	13	hoch	
NM_017664.2	ANKRD10		ankyrin repeat domain 10 (ANKRD10)	1,10	1,03	-1,29	-1,42	1,00	-1,10	-1,23	-1,18	-1,25	-1,03	-1,01	-1,28	1,05	-1,03	-1,15	-1,20	-1,03	-1,00	1,04	1,00	-1,09	1,00	-1,11	-1,39	-1,39	1,00	-1,17	-1,25	-1,62	27	herunter	
NM_018045.4	BSDC1		BSD domain containing 1 (BSDC1)	1,02	1,05	1,29	1,24	-1,04	1,17	1,13	1,11	1,23	-1,00	1,07	1,26	1,00	-1,12	1,31	1,26	1,03	-1,01	1,06	1,02	-1,02	1,03	-1,07	1,44	1,53	1,72	1,14	1,10	1,09	38	hoch	
NM_003603.4	SORBS2		sorbin and SH3 domain containing 2 (SORBS2), transcript variant 1	1,01	1,08	-1,16	-1,17	1,06	-1,03	1,05	-1,09	-1,06	1,10	-1,04	-1,10	1,04	1,17	-1,08	-1,11	1,14	1,01	1,06	1,03	1,10											