

# **INAUGURAL-DISSERTATION**

**Zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen-  
Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg**

Vorgelegt von  
Diplombiologe Jürgen Beigel  
aus: Wittighausen

Tag der mündlichen Prüfung:

# **Gen- und Proteinexpressionsanalysen an primären Rattenhepatozyten**

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Braunbeck  
(Institut für Zoologie, Abt. Morphologie/Ökologie, Universität Heidelberg)  
Prof. Dr. Jan G. Hengstler  
(Molekulare und Forensische Toxikologie, Universität Leipzig)

## Inhaltsverzeichnis

|  |     |
|--|-----|
| Inhaltsverzeichnis .....   | i   |
| Abbildungsverzeichnis .....  | iii |
| Tabellenverzeichnis .....  | vi  |
| Abkürzungsverzeichnis .....  | vii |
| Zusammenfassung .....  | ix  |
| Summary .....  | xi  |
| 1. Einleitung .....  | 1   |
| 1.1 Hepatotoxizität.....   | 1   |
| 1.2 Fremdstoffmetabolismus.....                                      | 2   |
| 1.3 Primäre Hepatozyten als <i>In vitro</i> -Testsystem .....        | 3   |
| 1.4 Acetaminophen als Modellsubstanz .....                           | 4   |
| 1.5 Toxikologie und neue „-omics“-Methoden.....                      | 5   |
| 1.5.1 Genomics-Methoden.....   | 6   |
| 1.5.1.1 Microarrays .....  | 6   |
| 1.5.1.2 Quantitative Real-Time PCR.....                              | 7   |
| 1.5.2 Proteomics-Methoden .....                                      | 7   |
| 1.5.2.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....                      | 8   |
| 1.5.2.2 SELDI ProteinChip®-Technologie .....                         | 8   |
| 1.6 Ziele der Arbeit.....  | 9   |
| 2. Material .....  | 10  |
| 2.1 Chemikalien.....   | 10  |
| 2.2 Zellkulturmedien und Zusätze.....                                | 11  |
| 2.3 Kits und Microarray-Komponenten.....                             | 11  |
| 2.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien .....                           | 12  |
| 2.5 Software .....   | 13  |
| 3. Methoden.....   | 14  |
| 3.1 Isolation von Rattenhepatozyten .....                            | 14  |
| 3.2 Zellzahlbestimmung und Vitalitätstests .....                     | 15  |
| 3.3 Cytotoxizitätsbestimmung.....                                    | 15  |
| 3.3.1 WST-1-Assay .....  | 15  |
| 3.3.2 CellTiter-Glo™ Luminiscent Cell Viability Test.....            | 16  |
| 3.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen.....                  | 17  |
| 3.5 Qualitätskontrolle und Quantifizierung der RNA .....             | 17  |
| 3.6 TaqMan®-Real-Time PCR .....                                      | 18  |
| 3.7 Microarrays .....  | 20  |
| 3.7.1 Low-Density MWG-Chips.....                                     | 20  |
| 3.7.2 High-Density Affymetrix GeneChips® .....                       | 22  |
| 3.8 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....                          | 26  |
| 3.9 SELDI ProteinChip®-Technologie .....                             | 31  |
| 3.10 Western-Blot.....   | 33  |
| 3.11 Biochemische Aktivitätstests .....                              | 33  |
| 3.11.1 Bestimmung von Katalase-Aktivitäten .....                     | 33  |
| 3.11.2 Bestimmung von Cytochrom-P450-Monooxygenase-Aktivitäten ..... | 34  |
| 4. Ergebnisse .....  | 35  |
| 4.1 Primäre Rattenhepatozyten auf Collagen-Monolayerkultur .....     | 35  |
| 4.2 Zellvitalität .....  | 37  |
| 4.3 Qualitätskontrolle und Quantität der eingesetzten RNA.....       | 37  |
| 4.4 Auswertung von Low-Density MWG-Chip-Daten .....                  | 38  |
| 4.5 Auswertung von High-Density Affymetrix GeneChip®-Daten.....      | 41  |

---

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 4.6    | Direkter Vergleich der Anzahl regulierter Gene zwischen Low-Density MWG-Chips und High-Density Affymetrix GeneChips® .....                   | 45  |
| 4.7    | Auswertung der quantitativen TaqMan®-RT-PCR-Daten .....  | 47  |
| 4.8    | Direkter Vergleich von Genexpressionsdaten aus der TaqMan®-Real-Time PCR, Low-Density MWG-Chips und High-Density Affymetrix GeneChips® ..... | 48  |
| 4.9    | Auswertung der 2D-Gelelektrophorese .....  | 53  |
| 4.10   | Western-Blot für Katalase .....  | 57  |
| 4.11   | Auswertung von SELDI ProteinChip®-Daten .....  | 58  |
| 4.12   | Ergebnisse der Katalase-Aktivitätsmessungen .....  | 61  |
| 4.13   | Cytochrom-P450-Monooxygenasen-Aktivitätsmessungen .....  | 61  |
| 4.14   | Direkter Vergleich zwischen Genexpression aus Affymetrix-Daten und Proteinexpression aus 2D-Gelen .....                                      | 63  |
| 4.15   | Cytotoxizitätstests .....  | 67  |
| 4.16   | Auswertung der Acetaminophen-Experimente auf Genomics-Ebene .....  | 68  |
| 4.17   | Auswertung der Acetaminophen-Experimente auf Proteomics-Ebene .....  | 69  |
| 4.17.1 | Auswertung von 2D-PAGE-Daten .....   | 69  |
| 4.17.2 | Auswertung von SELDI ProteinChip®-Daten .....  | 72  |
| 4.18   | Auswirkungen des Enzymwechsels von Collagenase D zu Liberase Blendzyme bei der Leberperfusion .....  | 73  |
| 4.18.1 | Auswertung der Affymetrix GeneChip®-Daten .....  | 73  |
| 4.18.2 | Auswertung der SELDI ProteinChip®-Daten .....  | 74  |
| 5.     | Diskussion .....   | 76  |
| 5.1    | Methodische Ergebnisse .....   | 76  |
| 5.1.1  | Qualität und Quantität der verwendeten RNA-Proben und Proteinlysate .....  | 76  |
| 5.1.2  | Quantitative Real-Time PCR .....   | 76  |
| 5.1.3  | Low-Density MWG-Chips .....  | 77  |
| 5.1.4  | High-Density Affymetrix GeneChips® .....   | 77  |
| 5.1.5  | Direkter Vergleich der beiden eingesetzten Microarray-Systeme .....  | 78  |
| 5.1.6  | 2D-Gelelektrophorese .....   | 79  |
| 5.1.7  | SELDI ProteinChip®-Daten .....   | 80  |
| 5.2    | Experimentelle Ergebnisse .....  | 80  |
| 5.2.1  | Auswahl der Modellsubstanz .....   | 80  |
| 5.2.2  | Auswertung des Zeitkurvenexperimentes .....  | 81  |
| 5.2.3  | Biologische Relevanz der Expressionsdaten .....  | 81  |
| 5.2.4  | Acetaminophen-Daten .....  | 86  |
| 5.2.5  | Unterschiede zwischen Collagenase D und Liberase Blendzyme perfundierten Hepatozyten .....   | 88  |
| 5.3    | Ausblick .....   | 89  |
| 6.     | Literatur .....  | 91  |
| 7.     | Danksagung .....   | 103 |
| 8.     | Publikationen .....  | 104 |
| 9.     | Anhang .....   | 105 |

---

## Abbildungsverzeichnis

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Abb. 1.1:  | Acetaminophenmetabolismus .....   | 4  |
| Abb. 1.2:  | Prinzip einer geplanten Datenbank aus Genexpressionsprofilen mit bekannten toxischen Stoffgruppen zur Toxizitätsvorhersage .....  | 6  |
| Abb. 3.1:  | Prinzip des WST-1-Cytotoxizitätsassays .....  | 16 |
| Abb. 3.2:  | Prinzip des CellTiter-Glo™ Luminiscent Cell Viability Test .....  | 17 |
| Abb. 3.3:  | Schematischer Ablauf der TaqMan®-PCR-Reaktion .....   | 18 |
| Abb. 3.4:  | Darstellung eines TaqMan®-PCR-Laufes mit zu untersuchendem Gen (rechte Kurven) und Housekeeper (linke Kurven) .....   | 20 |
| Abb. 3.5:  | Schematischer Ablauf einer kompetitiven Hybridisierung .....  | 21 |
| Abb. 3.6:  | Darstellung des Perfect-Match- (PM) und Mismatch-Systems (MM) .....   | 23 |
| Abb. 3.7:  | Schematische Darstellung eines Affymetrix Microarray-Experiments .....  | 25 |
| Abb. 3.8:  | Fehlfarbenabbildung zweier 2D-Gel-Replikate (Gel 1 = blau, Gel 2 = orange) vor (A) und nach (B) berechneter Überlagerung .....  | 30 |
| Abb. 3.9:  | Aus drei Probengruppen (Referenz, [0,5 mM] und [2 mM] Acetaminophen) berechnete Match-Matrix .....  | 30 |
| Abb. 3.10: | Experimentelles Prinzip des SELDI-TOF-MS-Systems .....  | 32 |
| Abb. 4.1:  | Schema der mit primären Rattenhepatozyten durchgeführten Gen- (blau), Proteinexpressionsanalysen (rot) und Aktivitätsmessungen (grün) .....   | 35 |
| Abb. 4.2:  | Makroskopisches Bild der mit Gimsa-Lösung angefärbten primären Rattenhepatozyten .....  | 36 |
| Abb. 4.3:  | Mikroskopisches Bild der mit Gimsa-Lösung angefärbten primären Rattenhepatozyten .....  | 36 |
| Abb. 4.4:  | Bestimmung der Zellvitalität von primären Hepatozyten mittels WST-1-Test über einen Zeitraum von 14 d .....   | 37 |
| Abb. 4.5:  | Exemplarische Gel-Ansicht mittels Agilent-Chip für Marker (1 + 14), RNA (2 - 4), doppelsträngige cDNA (5 - 7), einzelsträngige cRNA (8 - 10) sowie fragmentierte einzelsträngige cRNA (11 - 13) ..... | 37 |
| Abb. 4.6:  | Auswertung der reprimierten Gene aus den Zeitkurvenversuchen mit primären Rattenhepatozyten auf Low-Density MWG-Chips .....   | 38 |
| Abb. 4.7:  | Auswertung der induzierten Gene aus den Zeitkurvenversuchen mit primären Rattenhepatozyten auf Low-Density MWG-Chips .....  | 39 |
| Abb. 4.8:  | Im Zeitverlauf in primären Rattenhepatozyten regulierte Cytochrom P450-Monooxygenasen auf Low-Density MWG-Chips .....   | 40 |
| Abb. 4.9:  | Expressionsveränderungen der auf den Low-Density Chips aufgebrachten Housekeeping-Gene: 18S rRNA, Cyclophilin A, GAPDH und $\beta$ -Actin .....   | 40 |
| Abb. 4.10: | Boxplots der Gene aus dem Zeitkurvenversuch mit primären Rattenhepatozyten auf Affymetrix GeneChips® .....  | 41 |
| Abb. 4.11: | Auswertung der induzierten Gene aus den Zeitkurvenversuchen mit primären Rattenhepatozyten auf Affymetrix GeneChips® .....  | 42 |
| Abb. 4.12: | Auswertung der reprimierten Gene aus den Zeitkurvenversuchen mit primären Rattenhepatozyten auf Affymetrix GeneChips® .....   | 43 |
| Abb. 4.13: | Expressionswerte der differentiell exprimierten Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus den Zeitkurvenexperimenten (0 - 120 h) auf Affymetrix GeneChips® .....  | 43 |
| Abb. 4.14: | Clusteranalyse mit differentiell exprimierten Genen aus den in Zeitkurvenversuchen eingesetzten Affymetrix GeneChips® .....   | 44 |
| Abb. 4.15: | Anzahl der auf den Affymetrix GeneChips® in den Zeitkurvenversuchen mit primären Rattenhepatozyten detektierten Gene .....  | 45 |

|  |    |
|--|----|
| Abb. 4.16: Direkter Vergleich der Anzahl regulierter Gene zwischen dem High-Density Affymetrix GeneChip <sup>®</sup> und dem Low-Density MWG-Chip .....          | 45 |
| Abb. 4.17: Real-Time RT-PCR Zeitkurvenergebnisse mit primären Rattenhepatozyten für CYP 3A1 .....  | 47 |
| Abb. 4.18: Genexpressionsänderung in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten für Metallothionin 1 .....  | 48 |
| Abb. 4.19: Genexpressionsänderung in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten für CYP 1A2 .....   | 49 |
| Abb. 4.20: Genexpressionsänderung in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten für Sulfotransferase (Östrogen bevorzugend).....                                  | 49 |
| Abb. 4.21: Genexpressionsänderung in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten für Katalase .....  | 50 |
| Abb. 4.22: Genexpressionsänderung in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten für LPS-Binding-Protein.....  | 50 |
| Abb. 4.23: Genexpressionsänderung in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten für Clusterin .....   | 51 |
| Abb. 4.24: Genexpressionsänderung in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten für $\beta$ -Actin .....  | 52 |
| Abb. 4.25: Genexpressionsänderung in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten für Annexin 5 .....   | 52 |
| Abb. 4.26: Optischer Vergleich zweier 2D-Gele aus primären Rattenhepatozyten nach A: 0 h und B: 120 h .....  | 53 |
| Abb. 4.27: In 2D-Gele induzierte Proteine aus dem Zeitkurvenversuch mit primären Rattenhepatozyten .....   | 54 |
| Abb. 4.28: Anzahl induzierter Proteine pro Zeitwert aus dem Zeitkurvenversuch in 2D-Gele mit primären Rattenhepatozyten .....                                    | 54 |
| Abb. 4.29: In 2D-Gele reprimierte Proteine aus dem Zeitkurvenversuch mit primären Rattenhepatozyten .....  | 55 |
| Abb. 4.30: Anzahl reprimierter Proteine pro Zeitwert aus dem Zeitkurvenversuch in 2D-Gele mit primären Rattenhepatozyten .....                                   | 55 |
| Abb. 4.31: Proteinexpression für Senescence Maker Protein 30 (SMP30) .....   | 57 |
| Abb. 4.32: Western-Blot für Katalase aus Zeitkurvenversuchen (0 - 120 h) mit primären Rattenhepatozyten .....  | 57 |
| Abb. 4.33: Umgerechnete Proteinmengen der Zeitkurvenversuche mit primären Rattenhepatozyten aus der Western-Blot-Analyse für Katalase .....                      | 58 |
| Abb. 4.34: Peak-Spektren aus SELDI-TOF-MS-Analysen der Zeitkurvenversuche mit primären Rattenhepatozyten auf CM10-Chips .....                                    | 58 |
| Abb. 4.35: 2D-HEAT-Map für SELDI-TOF-MS-Ergebnisse aus Zeitkurvenversuchen mit prim. Rattenhepatozyten zur Darstellung differentiell exprimierter Proteine ..... | 59 |
| Abb. 4.36: Anzahl differentiell exprimierter Proteine durch SELDI-TOF-MS-Analysen aus Zeitkurvenversuchen mit primären Rattenhepatozyten.....                    | 59 |
| Abb. 4.37: Principal Component Analysis aus SELDI-TOF-MS-Ergebnissen der Zeitkurvenversuche mit primären Rattenhepatozyten .....                                 | 60 |
| Abb. 4.38: Katalase-Aktivitätsmessungen an primären Rattenhepatozyten.....   | 61 |
| Abb. 4.39: Durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen der Familien CYP 1A und 2B umgesetzte BROD-Einheiten in primären Rattenhepatozyten .....                          | 61 |
| Abb. 4.40: Durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen der Familie CYP 1A umgesetzte EROD-Einheiten in primären Rattenhepatozyten .....                                  | 62 |
| Abb. 4.41: Durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen der Familie CYP 2B umgesetzte MROD-Einheiten in primären Rattenhepatozyten .....                                  | 62 |

---

|  |    |
|--|----|
| Abb. 4.42: Direkter Vergleich von Gen- und Proteinexpressionsänderungen in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten aus Affymetrix GeneChips <sup>®</sup> und 2D-Gelen. (SMP30, 3HAO, DOPD, F16P).....                              | 63 |
| Abb. 4.43: Direkter Vergleich von Gen- und Proteinexpressionsänderungen in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten aus Affymetrix GeneChips <sup>®</sup> und 2D-Gelen. (COMT, SOUX, TTHY, EST).....                                | 64 |
| Abb. 4.44: Direkter Vergleich von Gen- und Proteinexpressionsänderungen in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten aus Affymetrix GeneChips <sup>®</sup> und 2D-Gelen. (CAT, SODC, GPX, PDX2).....                                 | 64 |
| Abb. 4.45: Direkter Vergleich von Gen- und Proteinexpressionsänderungen in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten aus Affymetrix GeneChips <sup>®</sup> und 2D-Gelen. (MDHC, PH4H, PEPB, FPPS).....                               | 65 |
| Abb. 4.46: Direkter Vergleich von Gen- und Proteinexpressionsänderungen in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten aus Affymetrix GeneChips <sup>®</sup> und 2D-Gelen. (ODPB, HSP60, GRP75, MUP).....                              | 65 |
| Abb. 4.47: Direkter Vergleich von Gen- und Proteinexpressionsänderungen in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten aus Affymetrix GeneChips <sup>®</sup> und 2D-Gelen. (ADK, MTL, RSP4, ACTB).....                                 | 66 |
| Abb. 4.48: LC <sub>50</sub> -Bestimmung von Acetaminophen nach 24 und 48 h mit WST-1 an primären Rattenhepatozyten.....  | 67 |
| Abb. 4.49: LC <sub>50</sub> -Bestimmung von Acetaminophen nach 24 und 48 h mit dem CellTiter-Glo <sup>™</sup> Luminiscent Cell Viability Test an primären Rattenhepatozyten.....   | 67 |
| Abb. 4.50: Anzahl regulierter Gene auf Affymetrix GeneChips <sup>®</sup> aus Acetaminophen dosierten [2 mM] primären Rattenhepatozyten.....  | 68 |
| Abb. 4.51: Anzahl regulierter Gene auf Affymetrix GeneChips <sup>®</sup> aus Acetaminophen dosierten [0,5 mM] primären Rattenhepatozyten.....  | 69 |
| Abb. 4.52: Exemplarisches 2D-Gel mit allen induzierten und reprimierten Proteinen aus Acetaminophen [2 mM] behandelten primären Rattenhepatozyten nach 72 h.....   | 70 |
| Abb. 4.53: Anzahl induzierter und reprimierter Proteine aus 2D-Gelen aus Acetaminophen [2 mM] behandelten primären Rattenhepatozyten.....  | 70 |
| Abb. 4.54: Exemplarisches 2D-Gel mit allen induzierten Proteinen aus Acetaminophen [0,5 mM] behandelten primären Rattenhepatozyten nach 72 h.....  | 70 |
| Abb. 4.55: Anzahl induzierter und reprimierter Proteine aus 2D-Gelen aus Acetaminophen [0,5 mM] behandelten primären Rattenhepatozyten.....  | 70 |
| Abb. 4.56: Principal Component Analyse der im SELDI-TOF-MS regulierten Proteine aus Acetaminophen behandelten primären Rattenhepatozyten.....  | 72 |
| Abb. 4.57: Anzahl differentiell durch zwei unterschiedliche Enzyme (Collagenase D bzw. Liberase Blendzyme) exprimierter Gene.....  | 73 |
| Abb. 4.58: Auf Affymetrix GeneChips <sup>®</sup> differentiell exprimierte Gene in Kontrollgruppen mit unterschiedlicher Perfusionslösung.....   | 73 |
| Abb. 4.59: Principal Component Analysis der SELDI-TOF-MS-Ergebnisse aller differentiell durch zwei unterschiedliche Enzyme (Collagenase D bzw. Liberase Blendzyme) exprimierter Gene zu Kontrollzeitpunkten (2, 6, 24 und 72 h)..... | 74 |
| Abb. 4.60: HEAT-Maps der SELDI-TOF-MS-Ergebnisse zur Darstellung differentiell exprimierter Proteine in Kontrollgruppen durch unterschiedliche Perfusionslösungen.....   | 75 |

---

## Tabellenverzeichnis

|            |   |     |
|------------|---|-----|
| Tab. 2.1:  | Liste der verwendeten Chemikalien.....  | 10  |
| Tab. 2.2:  | Liste der verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze .....  | 11  |
| Tab. 2.3:  | Liste der verwendeten Kits und Microarray-Komponenten .....   | 11  |
| Tab. 2.4:  | Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien.....   | 12  |
| Tab. 2.5:  | Liste der verwendeten Software.....   | 13  |
| Tab. 3.1:  | Perfusionspuffer zur Isolation von Rattenhepatozyten .....  | 14  |
| Tab. 3.2:  | Präperfusionslösung (PP1) zur Isolation von Rattenhepatozyten.....  | 15  |
| Tab. 3.3:  | Collagenaselösung (PP2) zur Isolation von Rattenhepatozyten .....   | 15  |
| Tab. 3.4:  | Waschpuffer zur Isolation von Rattenhepatozyten .....   | 15  |
| Tab. 3.5:  | Trypanblau-Lösung für Zellzahlbestimmung und Vitalitätstests.....   | 15  |
| Tab. 3.6:  | Standardpipettierprotokoll für cDNA-Synthese .....  | 19  |
| Tab. 3.7:  | Standard Thermo-Cycler Programm für cDNA-Synthesen.....   | 19  |
| Tab. 3.8:  | Standard Pipettierprotokoll für TaqMan <sup>®</sup> -RT-PCR.....  | 19  |
| Tab. 3.9:  | Standardprotokoll für TaqMan <sup>®</sup> -RT-PCR Lauf.....   | 19  |
| Tab. 3.10: | Standard Pipettierprotokoll für den FairPlay <sup>™</sup> Microarray Labeling Kit .....   | 21  |
| Tab. 3.11: | Hybridisierungscocktail für Affymetrix GeneChips <sup>®</sup> .....   | 24  |
| Tab. 3.12: | Nichtstringenter Waschpuffer (Wash A) für GeneChips <sup>®</sup> -Hybridisierungen .....  | 24  |
| Tab. 3.13: | Stringenter Waschpuffer (Wash B) für GeneChips <sup>®</sup> -Hybridisierungen .....   | 24  |
| Tab. 3.14: | MES-Färbepuffer für GeneChips <sup>®</sup> -Färbeschritte.....  | 24  |
| Tab. 3.15: | Färbelösung I + III für GeneChips <sup>®</sup> -Färbeschritte.....  | 25  |
| Tab. 3.16: | Färbelösung II für GeneChips <sup>®</sup> -Färbeschritte .....  | 25  |
| Tab. 3.17: | Lysispuffer I zur Proteinisolation aus Säugerzellen.....  | 26  |
| Tab. 3.18: | Lysispuffer II zur Proteinisolation aus Säugerzellen .....  | 26  |
| Tab. 3.19: | Puffer zur Rehydrierung von IPG-Gelstreifen.....  | 27  |
| Tab. 3.20: | Angelegtes Spannungsprogramm für die 1. Dimension der 2D-PAGE .....   | 27  |
| Tab. 3.21: | Basislösung für Äquilibrierungspuffer .....   | 28  |
| Tab. 3.22: | Äquilibrierungspuffer I für IPG-Gelstreifen.....  | 28  |
| Tab. 3.23: | Äquilibrierungspuffer II für IPG-Gelstreifen .....  | 28  |
| Tab. 3.24: | Acrylamidlösung zum Gießen der 2D-Page (für 14 Gele).....   | 28  |
| Tab. 3.25: | Agaroselösung zum Fixieren der IPG-Gelstreifen.....   | 28  |
| Tab. 3.26: | Anodenpuffer für die 2. Dimension der 2D-PAGE .....   | 29  |
| Tab. 3.27: | Kathodenpuffer für die 2. Dimension der 2D-PAGE.....  | 29  |
| Tab. 3.28: | Angelegtes Spannungsprogramm für die 2. Dimension der 2D-PAGE .....   | 29  |
| Tab. 3.29: | Färbeprotokoll für Ruthenium-Färbungen von 2D-Gelen.....  | 29  |
| Tab. 3.30: | Bindepuffer für SELDI-TOF-MS.....   | 33  |
| Tab. 3.31: | Präaktivierungspuffer für SELDI-TOF-MS .....  | 33  |
| Tab. 3.32: | Reaktionspuffer für Katalasemessungen .....   | 34  |
| Tab. 3.33: | Eingesetzte Resorufinether zur Bestimmung der AROD-Aktivitäten .....  | 34  |
| Tab. 4.1:  | Liste der in Abb. 4.16 gleichsinnig regulierten Gene.....   | 46  |
| Tab. 4.2:  | Liste der in Abb. 4.16 entgegengesetzt regulierten Gene.....  | 47  |
| Tab. 4.3:  | Liste der in Abb. 4.27 und 4.29 identifizierten Protein-Spots .....   | 56  |
| Tab. 4.4:  | An primären Rattenhepatozyten gemessene LC <sub>50</sub> -Cytotoxizitätswerte für Acetaminophen nach 24 und 48 h mit dem WST-1-Test und dem CellTiter-Glo <sup>™</sup> Luminiscent Cell Viability Test (n = 5)..... | 68  |
| Tab. 9.1:  | Sequenzen der eingesetzten TaqMan <sup>®</sup> -Sonden und Primer .....   | 105 |
| Tab. 9.2:  | Gensonden des MWG Low-Density Microarray .....  | 106 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| 2D-PAGE                         | 2-Dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese            |
| °C                              | Grad Celsius  |
| A                               | Absorption  |
| AA                              | Acrylamid   |
| Abb.                            | Abbildung   |
| APS                             | Ammoniumpersulfat   |
| AROD                            | Alkoxyresorufin-O-Dealkylase                              |
| ATP                             | Adenosin-Triphosphat                                      |
| BROD                            | Benzyloxyresorufin-O-Debenzylase                          |
| BSA                             | Rinderserum Albumin                                       |
| CaCl <sub>2</sub>               | Calciumchlorid  |
| cDNA                            | Copy-Desoxyribonucleinsäure                               |
| CHAPS                           | Cholamidopropyl-dimethylammonio-1-propansulfonat          |
| Cox2                            | Cyclooxygenase 2  |
| cRNA                            | Copy-Ribonucleinsäure                                     |
| C <sub>T</sub>                  | Threshold-Cycle   |
| CYP                             | Cytochrom-P450-Monooxygenase                              |
| DMEM                            | Dulbecco's modified Eagle's Medium                        |
| DMSO                            | Dimethylsulfoxid  |
| DNA                             | Desoxyribonucleinsäure                                    |
| dNTP                            | Deoxynukleosid-Triphosphat                                |
| DTT                             | Dithiothreitol  |
| dUTP                            | 2'-Deoxyuridine 5'-Triphosphate                           |
| EAM                             | Energieabsorbierende Matrix                               |
| EDTA                            | Ethylendiamintetraessigsäure                              |
| EROD                            | Ethoxyresorufin-O-Deethylase                              |
| EtOH                            | Ethanol   |
| EU                              | Europäische Union   |
| EVCAM                           | European Centre for the Validation of Alternative Methods |
| Ext                             | Extinktion  |
| FAM                             | 6-Carboxy-Fluorescein                                     |
| FCS                             | Fötale Kälberserum  |
| FRET                            | Fluorescence Resonance Energy Transfer                    |
| g                               | Gramm   |
| GSH                             | Gluthation  |
| GSSG                            | Oxidiertes Glutathion                                     |
| h                               | Stunde  |
| H <sub>2</sub> O                | Wasser  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   | Wasserstoffperoxid  |
| HCl                             | Salzsäure   |
| HEPES                           | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure           |
| HPLC                            | High Performance Liquid Chromatography                    |
| i.p.                            | Intraperitoneal   |
| IEF                             | Isoelektrische Fokussierung                               |
| IPG                             | Immobilisierter pH-Gradient                               |
| IVT                             | <i>In vitro</i> -Transkription                            |
| KCl                             | Kaliumchlorid   |
| kDa                             | Kilo-Dalton   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Kaliumdihydrogenphosphat                                  |

---

|                    |   |
|--------------------|---|
| L                  | Liter   |
| LC <sub>50</sub>   | Lethal Concentration 50   |
| MALDI              | Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization                                 |
| MES                | 2-Morpholinethansulfat  |
| MgCl               | Magnesiumchlorid  |
| MgSO <sub>4</sub>  | Magnesiumsulfat   |
| min                | Minute  |
| MM                 | Mismatch  |
| mRNA               | Messenger Ribonucleinsäure  |
| MROD               | Methoxyresorufin-O-Demethylase  |
| NaCl               | Natriumchlorid  |
| NADH               | Nicotinamidadenindinucleotid  |
| NaHCO <sub>3</sub> | Natriumhydrogenkarbonat   |
| NAPQI              | <i>N</i> -Acetyl- <i>p</i> -Benzochinonimin                                 |
| OD                 | Optische Dichteeinheit  |
| Oligo-dt           | Oligo-deoxythymidin   |
| PBS                | Phosphate buffered saline   |
| pI                 | Isoelektrischer Punkt   |
| PM                 | Perfect Match   |
| PP1                | Präperfusions-Lösung  |
| PP2                | Collagenase-Lösung  |
| RNA                | Ribonucleinsäure  |
| rpm                | Rounds per minute   |
| RT <sub>M</sub>    | Raumtemperatur  |
| RT-PCR             | Real-Time Polymerase Chain Reaction   |
| SAPe               | Streptavidin-Phycoerythrin Dye  |
| SDS                | Natriumdodecylsulfat  |
| sek                | Sekunde   |
| SELDI              | Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation                                |
| SNP                | Single Nucleotide Polymorphism  |
| Tab.               | Tabelle   |
| TAMRA              | 6-Carboxyl-tetramethyl-rhodamin   |
| Taq                | <i>Thermophilus aquaticus</i>   |
| TE                 | TRIS-EDTA   |
| TEMED              | N,N,N',N'-Tetramethylendiamin   |
| TOF-MS             | Time Of Flight-Massenspektrometrie  |
| Tris               | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan   |
| U                  | Unit (Enzymaktivitätseinheit)   |
| UV                 | Ultraviolet   |
| WST-1              | 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolium]-1,3-benzen-disulfat |

---

## Zusammenfassung

Tiermodelle sind in der pharmazeutischen Forschung eine teure und oftmals ineffiziente Methode, um Sicherheitsrisiken für den Menschen aus den gewonnenen toxikologischen Daten abzuleiten. Daher spielen, besonders in der frühen Phase der Arzneimittelforschung und -entwicklung, *In vitro*-Systeme wie primäre Rattenhepatozyten und die verstärkt aufkommenden Genomics- und Proteomics-Technologien eine immer bedeutendere Rolle in der toxikologischen Forschung.

Ein erstes Ziel dieser Arbeit war, dieses *In vitro*-System als potentiellen Ersatz für traditionelle *In vivo*-Experimente zu charakterisieren. Da bereits bekannt war, dass primäre Rattenhepatozyten in Kultur an Aktivität verlieren (z.B. Xenobiotika metabolisierende Enzyme), wurde die Auswirkung der Kulturdauer auf die Genexpression mittels eines Low-Density- und eines High-Density-Microarray-Systems untersucht. Die Analyse der Proteinexpression wurde durch 2D-Gelelektrophorese und SELDI-TOF (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight) durchgeführt. Das zweite Ziel war eine Validierungsstudie des beschriebenen Zellsystems. Hierzu wurden Zellen mit dem bekannten Hepatotoxin Acetaminophen behandelt und dosisabhängige Gen- und Proteinexpressionsveränderungen ermittelt.

In der durchgeführten Zeitserie kam es, insbesondere nach 24 h, zu einer deutlichen Repression von wichtigen, in den Xenobiotika-Metabolismus involvierten Phase-I- und Phase-II-Enzymen (z.B. P450-Monooxygenasen, Glutathion-S-Transferasen, Sulfotransferasen) und antioxidativ wirkenden Enzymen (z.B. Katalase, Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase). Bei den induzierten Enzymen handelte es sich vielfach um Akute-Phase-Enzyme (z.B.  $\alpha$ -2-Makroglobulin, LPS-Binding-Protein, Ferritin, Serinproteinase-Inhibitor B, Haptoglobin), deren Regulation auf eine Stressantwort durch die Perfusion zurückzuführen war. Parallel dazu kam es durch proliferierende Zelltypen (vorwiegend Fibroblasten und Epithelzellen) und dedifferenzierende Hepatozyten in den Kulturen zu einem Ansteigen der Expression von Strukturgenen (z.B.  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Tubulin, Vimentin).

Der *In vivo*-Effekt eines Enzymwechsels während der Leberperfusion von Collagenase D zu Liberase Blendzyme führte zu signifikanten Veränderungen sowohl in der Gen- als auch der Proteinexpression und konnte durch alle angewandten Technologien detektiert werden. Diese Ergebnisse verdeutlichten das enorme Potential der durchgeführten Genomics- und Proteomics-Methoden.

Die Behandlung mit Acetaminophen führte auf der Ebene der Genexpression zu deutlichen Veränderungen. Auf der Proteinexpressionsebene wurde ebenfalls ein Anstieg sowohl an induzierten als auch reprimierten Proteinen nach der Acetaminophen-Dosierung detektiert. Zusätzlich konnte hier ein erwarteter dosisabhängiger Effekt erkannt werden. Übereinstimmende Veränderungen mit der Zeitserie konnten dagegen weder in der Gen- noch in der Proteinexpression festgestellt werden. Die im Zeitverlauf massiv auftretenden Veränderungen in den primären Hepatozyten ohne Behandlung lassen darauf schließen, dass durch Acetaminophen hervorgerufene Effekte zum größten Teil überlagert wurden.

Wenngleich es nach nur einer getesteten Substanz verfrüht erscheint abschließende Aussagen über das Zellkultursystem zu machen, können doch einige Rückschlüsse gezogen werden. Zum Einen stimmten die Ergebnisse aus den beiden eingesetzten Microarray-Systemen und der quantitativen Real-Time PCR überein. Dadurch validierten sich die Resultate der analysierten Plattformen gegenseitig. Zum Anderen kam es bei der Mehrzahl der identifizierten Proteine ebenfalls zu einer hohen Korrelation zwischen Gen- und Proteinexpression.

---

Hierbei auftretende grundlegende Unterschiede lassen auf posttranskriptionelle Regulationsmechanismen schließen.

Als Fazit lässt sich sagen, dass die potentiellen Einsatzmöglichkeiten und Vorteile der getesteten Methoden die Nachteile überwiegen. Allerdings ist es wichtig, diese Methoden nicht in Konkurrenz zueinander, sondern einander ergänzend einzusetzen, um ein möglichst umfassendes Bild auftretender Zelltoxizität auf molekularer Ebene zu erhalten. Primäre Rattenhepatozyten erscheinen unter den getesteten Kulturbedingungen für Gen- und Proteinexpressionsanalysen bis maximal 24 h als sinnvoll. Für mittel- bis langfristige Toxizitätsstudien ist die weitere Entwicklung brauchbarer Zellkultursysteme dringend erforderlich, um ihre Vorteile Schnelligkeit, Kosten und hohe Sensitivität zur Vorhersage möglicher Arzneimitteltoxizität einzusetzen.

## Summary

The use of animal models in pharmaceutical research is a costly and sometimes inefficient method of generating toxicity data and hence predicting human safety. Therefore, *in vitro* test systems, such as primary rat hepatocytes and the developing genomics and proteomics technologies are playing an increasingly important role in toxicological research. These are having a greater potential impact in the early phases of drug discovery and development.

The primary aim of the study reported here was to characterize an *in vitro* primary cell system as a potential substitute for traditional *in vivo* toxicology experiments. It is well known that primary hepatocytes lose function whilst in culture (e.g., drug metabolising enzyme activity). Consequently, the effect of cell culture duration was investigated using both low-density and high-density microarray gene expression systems and proteomics tools, such as 2D-gel electrophoresis and SELDI-TOF (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight). A second major aim was a “proof-of-concept” study using the characterized cell system. For this purpose, analysis of the dose dependent gene and protein expression changes were carried out on cells which were treated with the model hepatotoxicant acetaminophen.

In time series experiments, especially after 24 h, a significant down-regulation of many important Phase I- and Phase II-enzymes (e.g., cytochrome P450s, glutathione-S-transferases, sulfotransferases) involved in xenobiotic metabolism, and antioxidative enzymes (e.g., catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase) was observed. Acute-phase-response enzymes were frequently up-regulated (e.g., LPS binding protein,  $\alpha$ -2-macroglobulin, ferritin, serine proteinase inhibitor B, haptoglobin), which is likely to be a result of cellular stress caused by the cell isolation procedure (perfusion) itself. A parallel observation was the increased expression of several structural genes (e.g.,  $\beta$ -actin,  $\alpha$ -tubulin, vimentin), possibly caused by other proliferating cell types in the culture, such as fibroblasts or alternatively by hepatocyte dedifferentiation.

The *in vivo* effect of an enzyme change during the liver perfusion from Collagenase D to Liberase Blendzyme was a significant change in gene and protein expression and could be detected by all applications platforms. This reflects the enormous potential of these genomic and proteomic methods.

Acetaminophen treatment was also found to cause significant changes on the gene expression. At the protein level, an increase in the number of up- and down-regulated proteins was also detected after acetaminophen exposure. Additionally, an expected dose-dependent increase in regulated proteins could be seen. No overlapping changes with the time series could be detected, neither at the gene expression nor at the protein expression level. However, it seems that the substantial variations seen in untreated cells through the time series masked many effects caused by acetaminophen, and only a few significantly regulated genes and proteins were observed.

Although it is challenging to make definitive deductions on the cell system after only one tested substance, several conclusions can still be drawn. Firstly the methodologies of microarray analysis and quantitative Real-Time PCR concur, which automatically validates results obtained by both platforms. Secondly, the clear correlation between gene and protein expression for the majority of identified proteins suggests that those with significant differences may have posttranscriptional regulation mechanisms.

In conclusion, the potential applications and advantages outweigh the disadvantages of the individual methods tested. It is also important to use them in a complementary way, to gain a

---

comprehensive picture of the molecular events occurring during cellular toxicity. Rat primary hepatocytes are a suitable model, under the culture conditions tested here, for gene and protein expression profiling for time points no longer than 24 h. For medium- to long-term toxicology studies beyond this time point, further development of suitable cell culture systems is urgently required to enable the faster, cheaper and more sensitive prediction of potential chronic drug toxicity.

---

# 1. Einleitung

## 1.1 Hepatotoxizität

Als Hepatotoxizität bezeichnet man Wirkungen von Medikamenten oder anderen chemischen Substanzen, die Leberschäden auslösen. Der genaue molekulare Mechanismus ist in den meisten Fällen nur ungenügend bekannt. Die mit zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen auftretende Hepatotoxizität ist zu einem relevanten klinischen Problem geworden. So entfallen im Zeitraum von 1997 bis 2002 mehr als 50 % aller akuten Leberschäden in den USA auf medikamenteninduzierte Hepatotoxizität. Dabei werden 40 % dieser Fälle durch den unsachgemäßen Gebrauch von Acetaminophen verursacht [1]. Da die Metabolismuswege einer Substanz, Arzneimittelnebenwirkungen und -interferenzen in der Toxikologie zur Risikofolgenabschätzung eine bedeutende Rolle spielen, ist die Leber als zentrales Fremdstoffverstoffwechselndes Organ von großem Interesse. Xenobiotika, die in die Blutbahn gelangen, werden bei der Passage durch die Leber potentiell metabolisiert. Der Angriffspunkt einer toxischen Wirkung kann auf die Leber beschränkt sein, sich zusätzlich aber auch auf andere Organe oder global auf den Gesamtorganismus beziehen. Substanzen, die bei der Leberpassage bereits in unveränderter Form toxisch wirken, nennt man primär hepatotoxisch. Latent hepatotoxisch wirkende Substanzen entwickeln ihre Lebertoxizität dagegen sekundär nach ihrer Metabolisierung; ein Prozess der für neu entwickelte Xenobiotika nicht immer exakt vorhergesagt werden kann.

Leberschäden, die während der präklinischen oder klinischen Entwicklung einer Substanz auftreten, bedeuten in der Regel das Ende eines potentiellen Arzneimittels. Da aber bis zur Zulassung eines neuen Medikamentes selten mehr als einige Tausend Patienten längere Zeit mit dem Wirkstoff behandelt werden, kommt es häufig erst nach der Markteinführung zum Erkennen der hepatotoxischen Nebenwirkungen. Aus diesen Gründen stellt die Hepatotoxizität den Hauptgrund bei der Einstellung neuer Medikamente vor (31 %) und nach der Markteinführung (18 %) dieser Präparate dar [2]. Man kann dabei eine direkte toxische Wirkung von einer idiosynkratischen hepatotoxischen Wirkung unterscheiden. Einige wenige Substanzen (z.B. Acetaminophen) zeigen eine dosisabhängige, vorhersehbare Hepatotoxizität. Diese Substanzen bewirken in den meisten Fällen innerhalb weniger Stunden oder Tage einen Effekt und sind das Ergebnis einer direkten Toxizität des Medikamentes oder einer seiner Metaboliten auf die Hepatozyten und führen zumeist zu Nekrosen.

Die Mehrzahl der medikamenteninduzierten Leberschäden entsteht durch Substanzen, die nur in einer kleinen Gruppe von Patienten (0,1 - 0,001 %) auftritt. Kennzeichnend für diese idiosynkratische Reaktionen ist, dass sie mit mittelfristigen (z.B. Phenytoin) [3] bis langfristigen (z.B. Isoniazid) [4] Latenzzeiten zu symptomatischen Leberschäden führen. Die Frage, warum nur ein kleiner Teil der Patienten trotz Einhaltung der therapeutischen Dosis durch ein Medikament Probleme bekommt, ist multifaktoriell und noch nicht im Detail geklärt. Die schädigende Wirkung dieser Substanzen auf die Leber ist weder vorhersehbar noch dosisabhängig. Das Alter und Geschlecht [5] des Patienten, genetische Konstellation und Umweltfaktoren können zur Erklärung der großen interindividuellen Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber hepatotoxischen Nebenwirkungen von Medikamenten herangezogen werden. Aus dem symptomatischen Erscheinungsbild einer Lebererkrankung lassen sich Aussagen darüber ableiten, welche intrazelluläre Organellen betroffen sind. Die medikamenteninduzierte Hepatotoxizität kann sich in unterschiedlichen histomorphologischen Befunden manifestieren. Allerdings zeigen eine Substanz, bzw. ganze Substanzgruppen generell ein charakteristisches klinisches und pathologisches Erscheinungsbild, einschließlich einer substanztypischen Latenzzeit. Typische Symptome für hepatotoxische Wirkungen einer Substanz können eine akute Hepatitis, Cholestase, Steatose oder Zirrhose

---

sein. Hinzu kommen unterschiedlichste Mischsymptome der genannten Erkrankungen. Es sind bisher mehrere molekulare Mechanismen bekannt, die die Leber primär betreffen und dadurch einen Leberschaden hervorrufen.

Häufig sind Arzneimittel kleine organische Moleküle und deswegen unfähig eine Immunabwehr des Körpers direkt hervorzurufen. Viele hepatozelluläre Reaktionen über das Cytochrom-P450-System führen aber zu Veränderungen der Substanz. Es entstehen Metaboliten, die nun kovalent an DNA oder Proteine zu binden vermögen und damit funktionsunfähige Enzyme erzeugen können. Zusätzlich können diese entstandenen körperfremden Medikament-Protein-Verbindungen nun groß genug sein, um als potentiell Ziel von der Immunabwehr des Körpers erkannt zu werden. Gelangen diese gebildeten Verbindungen an die Außenseite der Hepatozyten, so ziehen sie eine vielschichtige Immunabwehr über Cytokine und T-Zellen nach sich [6]. Andere Medikamente wiederum aktivieren apoptotische Pfade, indem sie über den Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) intrazelluläre Caspase-Kaskaden aktivieren, die durch Abbau von Chromatin im Zellkern den programmierten Zelltod auslösen [7]. Über die Behinderung der  $\beta$ -Oxidation und den negativen Einfluss auf Proteine der Atmungskette kann die Funktion der Mitochondrien und somit die Energieproduktion der Zelle beeinträchtigt werden. Durch eine Verminderung der Funktion der Atmungskette kommt es vermehrt zu reaktiven Sauerstoffradikalen, die direkt die mitochondriale DNA schädigen können. Außerdem können durch Einwirkung von Medikamenten auf die  $\beta$ -Oxidation vorliegende Fettsäuren nicht mehr ausreichend metabolisiert werden, was eine Anreicherung von Lactat und Triglyceriden und damit die Verfettung der Leber zur Folge hat [8]. Medikamente, die über eine Inaktivierung von Ionenpumpen und anderen Transportproteinen den Gallenfluss behindern, können zu Cholestase führen [9]. Hier sind zum Teil auch genetisch bedingte Defekte bekannt. So können Polymorphismen im Multidrug-Resistance-Associated-Protein 3 (MRP3) in Verbindung mit östrogenhaltigen Arzneimitteln eine Cholestase hervorrufen. Grundsätzlich können aber auch multifaktorielle Formen von Leberschäden auftreten, wenn z.B. ein Ausfall von canaliculären Pumpen mit anderen intrazellulären Prozessen dazu führt, dass sich Gallensäuren ansammeln und sich so sekundäre Schäden an den Hepatozyten ausbilden.

## 1.2 Fremdstoffmetabolismus

Die Leber ist eines der größten Organe des Organismus. Die meisten der heute bekannten Stoffwechselreaktionen laufen in ihr ab. Als zentrales Stoffwechselorgan hilft sie bei der Deckung des Energiebedarfs des Körpers. Eine der Hauptaufgaben – besonders der Hepatozyten – ist den Körper vor Vergiftungen zu schützen und die Anreicherung von schädlichen und unerwünschten Fremdstoffen zu verhindern. Der größte Teil dieser Xenobiotika ist lipophil und damit in der Lage, Zellmembranen einem Konzentrationsgefälle folgend zu passieren. Da der Organismus Fremdstoffe hauptsächlich in wasserlöslicher Form über die Niere ausscheiden kann, ist es notwendig, dem Körper zugeführte Fremdstoffe aus einer lipidlöslichen Form in wasserlösliche Metabolite umzuwandeln [10]. Diesen Vorgang nennt man Biotransformation. Für die meisten Fremdstoffe läuft die Biotransformation in zwei Schritten ab. In der Phase-I-Reaktion werden sie durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse chemisch funktionalisiert. Ein wichtiger Bestandteil der Phase-I-Reaktionen sind die Monoxygenasen der Cytochrom-P450-Gruppe. Säugetiere besitzen mindestens 17 Cytochrom-P450-Genfamilien, die aus ca. 60 individuellen Cytochrom-P450-Genen bestehen [11, 12]. Im zweiten Schritt der Biotransformation (Phase-II-Reaktionen) kommt es zu einer Konjugation der in Phase-I eingeführten funktionellen Gruppen mit polaren Verbindungen (z.B. Glucuronsäure, Sulfate, Glutathion) [13]. Durch den Einbau hydrophiler Reste sind die entstandenen Metabolite nun wasserlöslich und können über die Niere ausgeschieden werden.

---

Bei einigen Substraten (z.B. Acetaminophen) kann es neben der Entgiftungsreaktion jedoch zu einem entgegen gesetzten Effekt (Giftung) kommen. Eine vormals ungiftige Substanz wird durch die Biotransformation in chemisch reaktive Metabolite umgesetzt, die toxisch wirken können (vgl. Abb. 1.1).

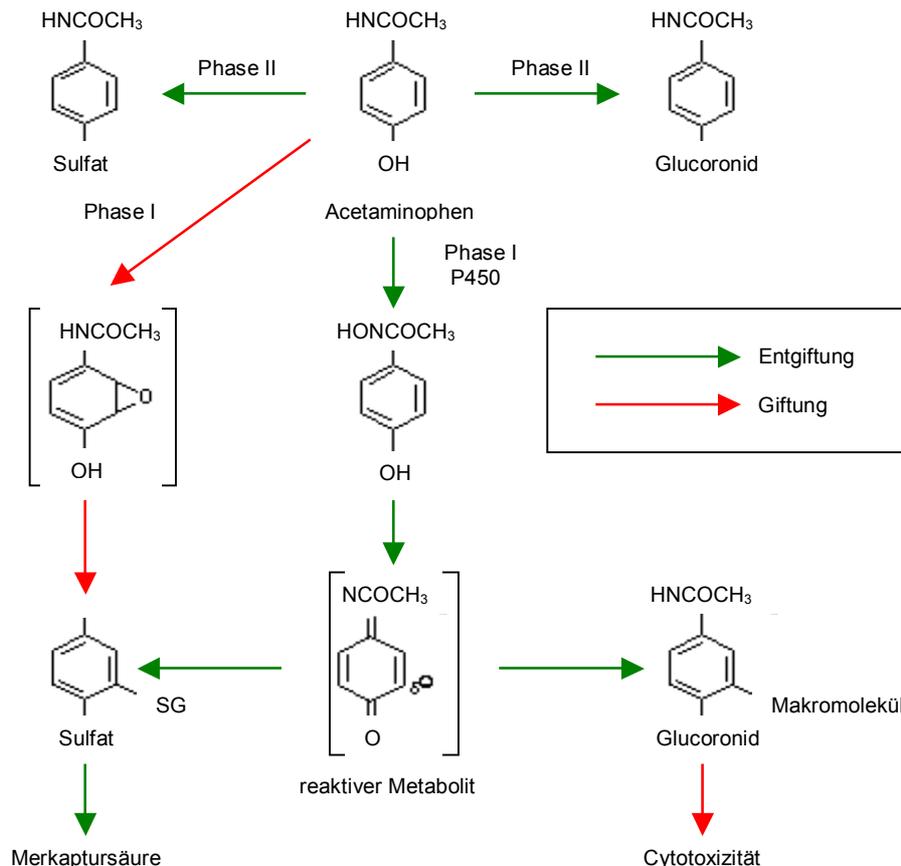
### 1.3 Primäre Hepatozyten als *In vitro*-Testsystem

Die Untersuchung der Metabolismuswege und der potentiellen Toxizität von Xenobiotika wird in der frühen Phase der toxikologischen Forschung an Tieren (*in vivo*) oder aber *in vitro* erforscht. Die Mehrzahl der Toxizitäts- und Metabolismusstudien wird derzeit *in vivo* durchgeführt. Vorteil der *In vivo*-Versuche ist die Beurteilung einer Fremdstoffwirkung auf den Gesamtorganismus, während Zellkulturen zumeist nur ein monofaktorielles System darstellen, das verschiedene physiologische Interaktionen nicht berücksichtigt. Um mit der Vielzahl an neuen Substanzen, die von der pharmazeutischen Industrie getestet werden müssen, Schritt zu halten und gleichzeitig die Anzahl an Tierversuchen möglichst einzuschränken, werden zur Untersuchung von Stoffwechselfvorgängen immer häufiger *In vitro*-Methoden herangezogen. Eine Möglichkeit hierzu ist der Einsatz von kultivierten primären Hepatozyten (Leberparenchymzellen). Hepatozyten sind komplexe, differenzierte Zellen, die über 60 % der Leberzellmasse ausmachen. Neben der für die Toxikologie wichtigen Aufgabe der Detoxifikation von Fremdstoffen (Phase-I- und Phase-II-Reaktionen) laufen in ihnen auch ein Großteil des Lipid- und Cholesterolfstoffwechsels, die Harnstoffregulation sowie die Produktion von Plasmaproteinen ab [14].

Mit der Entwicklung von geeigneten Methoden zur Hepatozytenisolierung [15, 16] wurde in einer Reihe von unterschiedlichen Anwendungen gezeigt, dass primäre Hepatozyten ein brauchbares *In vitro*-Modell für die Xenobiotika-Testung sind. Um Toxizität vorherzusagen, wurden neben Genexpressionsanalysen [14, 17] auch Versuche zu Metabolismus [18 - 20], oxidativem Stress [21, 22] und Apoptose-Induktion [23 - 27] an primären Rattenhepatozyten durchgeführt. Der Einsatz von primären Hepatozyten hat gegenüber *In vivo*-Versuchen einige Vorteile. Neben einer experimentellen Zeit- und Kostenersparnis ermöglicht es die Verringerung der Anzahl an benötigten Versuchstieren, da mit den aus einer Leberperfusion gewonnen Zellen mehrere Tests unter konstanten Bedingungen zeitgleich und kontrolliert durchgeführt werden können. Durch die einfache Applikation der Testsubstanzen mit dem Kulturmedium wird zum Einen nur eine geringe Substanzmenge benötigt, was vor allem in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung von Vorteil ist. Außerdem ermöglicht dies einen erhöhten Durchsatz an Testsubstanzen. Zudem kann ein direkter biologischer Vergleich angestellt werden, da parallel auch unterschiedliche Konzentrationen und Zeitpunkte betrachtet werden können. Ein entscheidender Nachteil dieser Methode ist die zunehmende Dedifferenzierung der primären Hepatozyten mit anhaltender Kultivierungsdauer. Durch die Anpassung an die neuen Umgebungsbedingungen kommt es zu Veränderungen des Phänotyps, die sich morphologisch in einem „Abflachen“ der sonst kubischen Zellen und dem Ausbilden von Zell-Zell-Kontakten äußert. Mit der Zeit kommt es auch zu einem zunehmenden Verlust metabolischer Funktionen und damit auch zu einem veränderten Reaktionsprofil der Hepatozyten auf eine Substanzgabe. So ist zum Beispiel seit langem bekannt, dass einige für die Biotransformation wichtigen Cytochrom-P450-Monooxygenasen auf der mRNA-Ebene schon nach wenigen Stunden nur noch schwach exprimiert werden [28].

## 1.4 Acetaminophen als Modellsubstanz

Acetaminophen (*N*-acetyl-*p*-aminophenol) – oder im deutschsprachigen Raum besser bekannt unter seinem Handelsnamen Paracetamol (Amerika: Tylenol; Asien: Panadol) – ist ein weltweit gebräuchliches Analgetikum und Antipyretikum, welches als wirkende Substanz in zahlreichen rezeptfreien Medikamenten enthalten ist. Seine Wirkung beruht auf einer Herabsetzung der Cyclooxygenase 2 (COX-2), die bei der Produktion der für Entzündungsreaktionen verantwortlichen Prostaglandine eine große Rolle spielt. Bei korrekter, vorsichtiger Dosierung treten wenig Nebenwirkungen auf (selten allergische Reaktionen).



**Abb. 1.1:** Acetaminophenmetabolismus. Acetaminophen wird zu einem großen Teil über Glucuronidierung und Sulfatierung entgiftet (Phase-II-Reaktionen). Ein relativ geringer Teil wird allerdings über Phase-I-Reaktionen in den reaktiven Metabolit *N*-Acetyl-*p*-Benzochinonimin (NAPQI) umgewandelt, der seine toxische Wirkung über Bindung an zelluläre Makromoleküle ausübt. Durch die Bindung von NAPQI an Glutathion kommt es zur Entgiftung. Nach Abspaltung der Glycyl- und Glutamyreste und anschließender *N*-Acetylierung des Cysteinkonjugates kann Acetaminophen als Merkaptursäure renal ausgeschieden werden.

Bei Überdosierung [150 mg/kg Körpergewicht] kann Acetaminophen jedoch tödlich wirken, indem es die Leber irreparabel schädigt und zu einem fulminanten Leberversagen führt. In pharmakologischen Dosen wird Acetaminophen in der Leber durch Glucuronidierung (ca. 60 %) und Sulfatierung (ca. 30 %) eliminiert und zu ca. 5 % unverändert ausgeschieden [29]. Ein relativ kleiner Teil wird durch das Cytochrom-P450-System (CYP 2E1, 1A2 und 3A4) metabolisiert, wobei der reaktive Metabolit *N*-Acetyl-*p*-Benzochinonimin (NAPQI) entsteht [30]. Die Entgiftung von NAPQI erfolgt über Glutathion und anschließende renale Eliminierung.

rung [31]. Bei einer Überdosierung von Acetaminophen kommt es zu einer Sättigung der Glukuronidierung und Sulfatierung und dadurch zu einer verstärkten Bildung von NAPQI durch das Cytochrom-P450-System. Die erhöhte NAPQI-Konzentration führt zu einem vollständigen Glutathionverbrauch; überschüssiges NAPQI kann nun an hepatische Proteine und Enzyme binden und sorgt so für die toxische Wirkung von Acetaminophen [32] (Abb. 1.1). Ein erhöhtes Risiko für Hepatotoxizität besteht zusätzlich bei allen Zuständen mit Glutathionmangel (z.B. Leberzirrhose durch chronischen Alkoholismus). Die Hepatotoxizität von Acetaminophen ist sehr gut charakterisiert [33]. Zahlreiche Studien geben Hinweise darauf, dass es bei Überdosierung oxidativen Stress [34, 35] in der Zelle erzeugt, zu Transkriptionsveränderungen führt [36, 37] und mit der Induktion von proinflammatorischen [38, 39] und apoptotischen [40] Signalwegen in Verbindung gebracht werden kann. Trotzdem ist der exakte Mechanismus der Acetaminophen-Toxizität und aller seiner involvierten Reaktionswege noch nicht genau bekannt.

## 1.5 Toxikologie und neue „-omics“-Methoden

Das Ziel der Toxikologie ist es, Mensch und Umwelt vor toxischen Substanzen zu schützen. Die gebräuchlichen Testmethoden beruhen hauptsächlich auf Langzeitstudien an Tieren. Die vollständige toxikologische Untersuchung einer pharmazeutischen Substanz kostet zwischen 2 und 4 Mio. US\$ und dauert mehrere Jahre [41]. Es ist verständlich, dass pharmazeutische Unternehmen diesen hohen Zeit- und Kostenaufwand reduzieren wollen, um ihre Neuentwicklungen auf Sicherheit zu testen. Ein weiterer, auch unter meinungs- und gesellschaftspolitischen Gesichtspunkten wichtiger Ansatz, ist das Anliegen, Tierversuche in der toxikologischen Forschung auf ein Minimum zu reduzieren. Bereits 1959 wurde der Begriff des 3R-Konzeptes geprägt [42] und Überlegungen dazu angestellt, in wieweit man in der Arzneimittelentwicklung auf Tierversuche verzichten kann (Replacement). Wenn dies durch geeignete Alternativmethoden nicht möglich ist, sollten diese zumindest in der durchgeführten Anzahl vermindert werden (Reduction). Ganz allgemein sollten die Haltungs- und Versuchsbedingungen für Tiere verbessert werden, um zu einer Optimierung der Aussagen von Tierversuchen zu gelangen (Refinement). Von der EU wurde 1991 eigens hierzu eine Behörde gegründet: das Europäische Zentrum für die Validierung von Alternativmethoden (ECVAM). Diese hat zur Aufgabe, Forschung an Alternativmethoden zu fördern bzw. zu koordinieren und bei der Erarbeitung von neuen Richtlinien für die Testentwicklung maßgeblich mitzuwirken. Am Ziel steht letztendlich eine zentrale Koordinierungsstelle, um experimentelle Daten zu validieren und schließlich die Akzeptanz in der Industrie und den behördlichen Kontrollstellen für die Zulassung einer alternativen Testmethode zu erreichen.

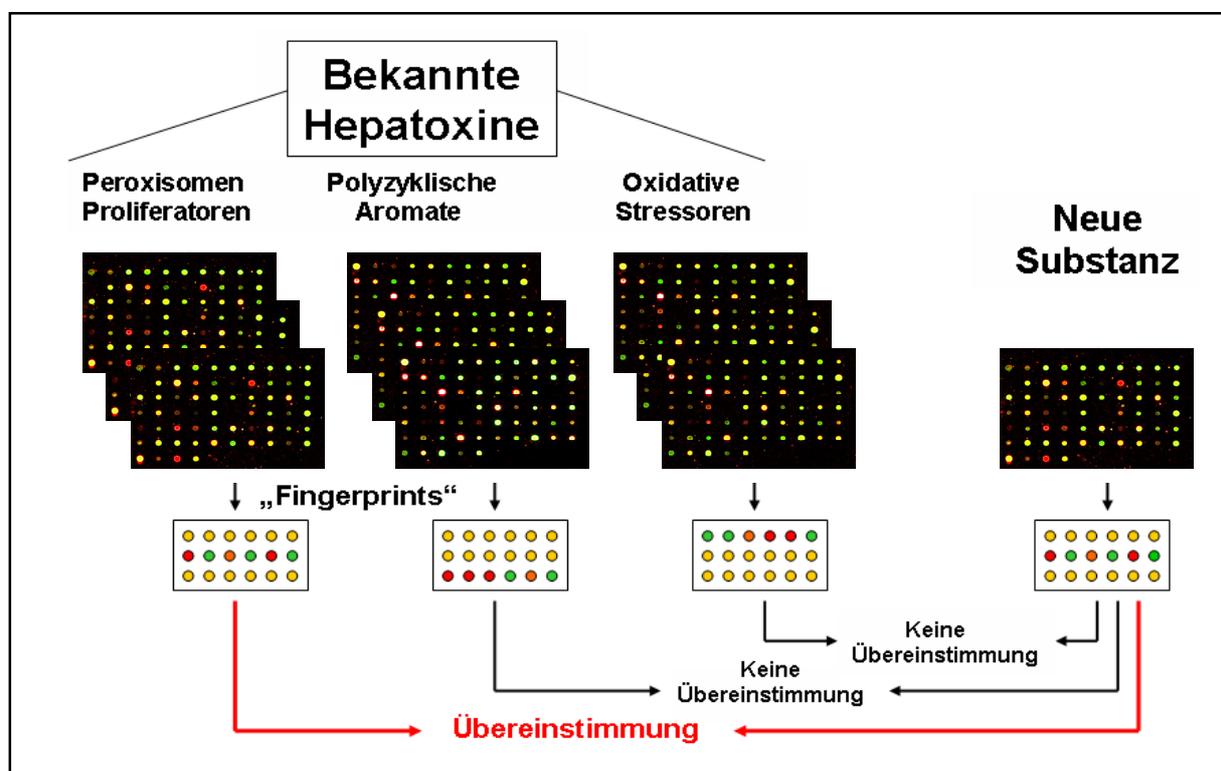
Auch unter der Maßgabe eines EU-Weißbuches, der so genannten REACH-Verordnung (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals) [43], das die Risikobeurteilung und das Risikomanagement von auf dem Markt befindlichen Altstoffen (ca. 30.000) fordert und bis 2012 eine zentrale Erfassung und Prüfung auf Umweltverträglichkeit verlangt, ist es ziemlich unrealistisch, dies mit den heute gängigen Testmethoden zu bewerkstelligen. Abhilfe verspricht man sich durch die Analyse von Gen- und Proteinexpressionsveränderungen nach Substanzgabe, die den Langzeiteffekt einer Substanz in Kurzzeit-Assays vorhersagen sollen. Mit der Annahme, dass Substanzen ähnliche Gen- oder Proteinexpressionsveränderungen aufweisen, wenn sie über gleiche Mechanismen toxisch wirken und zu gleichen Endpunkten führen, erhofft man sich, toxisch induzierte Expressionsveränderungen als sensitive und spezifische Indikatoren für Wirkmechanismen zu identifizieren [44]. In Tierversuchen kann dies bereits auf Genexpressionsebene mit Erfolg nachgewiesen werden [45 - 49]. Diese Experimente unterscheiden sich jedoch hinsichtlich Aufbau und Anzahl der Gene auf den Microarrays und den getesteten Substanzen. Dennoch kann aus diesen Versuchen erkannt

werden, welches Potential Toxicogenomics-Methoden bezüglich der Voraussagekraft von Substanzeigenschaften haben.

## 1.5.1 Genomics-Methoden

### 1.5.1.1 Microarrays

Der technische Fortschritt und die Erfolge im Bereich der Genom-Sequenzierung [50] brachten in den letzten Jahren einen großen Schub in den so genannten „omics“-Technologien. Durch die Verfügbarkeit tausender Gensequenzen ist man in der Lage, mit dem Einsatz von Microarrays eine große Anzahl von Genexpressionsveränderungen parallel zu untersuchen [51, 52]. Microarrays werden bereits in vielfältigen Fragestellungen in Medizin und Forschung eingesetzt, so z.B. erfolgreich bei der Diagnostik verschiedenster Krebsarten in der Onkologie [53 - 55] und bei Organ- und Gewebeveränderungen, die auf Unterschiede in Physiologie, Pathologie sowie auf Umwelteinflüsse zurückzuführen sind [56 - 58]. Auf dem Gebiet der prädiktiven und mechanistischen Toxikologie wird diese Methode genutzt, um einen direkten Vergleich der Genexpression zwischen behandelten und unbehandelten Proben zu erzielen, um dadurch wiederum Substanzen charakterisieren zu können, oder um einen Hinweis auf den toxischen Wirkungsmechanismus zu erhalten. So sollen durch bekannte toxische Substanzen erstellte Genexpressionsveränderungen in einer Datenbank gespeichert werden. Durch einen Vergleich des Musters einer neuen Substanz mit denen aus der Datenbank soll durch Übereinstimmungen auf das toxische Potential dieser neuen Substanz geschlossen und sie dadurch klassifiziert werden (Abb. 1.2).



**Abb. 1.2:** Prinzip einer geplanten Datenbank aus Genexpressionsprofilen mit bekannten toxischen Stoffgruppen zur Toxizitätsvorhersage. Mittels Genexpressionsprofilen werden von toxischen Stoffgruppen so genannte „Fingerprints“ erstellt. Für eine Stoffgruppe typische Muster sollen mit den Profilen neuer Substanzen verglichen werden, um diese neuen Substanzen damit klassifizieren und charakterisieren und somit eine Aussage über deren toxisches Profil machen zu können.

Das Verständnis dieser Genexpressionsmuster (Fingerprints) ist wichtig, um das zu testende System vollständig zu verstehen, denn die Genexpression wird durch Substanzgabe entweder direkt oder indirekt verändert. Die Wirkungsweise chemischer Substanzen ist sehr unterschiedlich, einige zerstören zelluläre Bestandteile (cytotoxisch) oder die DNA (genotoxisch) und zeigen dadurch veränderte Genexpression vor allem im Bereich der Reparaturgene der Zelle. Substanzen hingegen, die direkt auf das endokrine System oder die Zellteilung wirken, indem sie z.B. Einfluss auf Gene der Signaltransduktionskaskaden nehmen, zeigen wieder ein unterschiedlich verändertes Genexpressionsmuster der Zellen, da hauptsächlich Veränderungen im Bereich von Proliferation, Apoptose, Nekrose und Zelldifferenzierung auftreten. Ein weiterer Bereich in der Toxikologie, in der Microarrays eingesetzt werden können, ist die Bestimmung von toxikologischen Schwellenwertkonzentrationen [59], die auf die klassische Weise nur bedingt ermittelt werden können.

### 1.5.1.2 Quantitative Real-Time PCR

Eine weitere, technisch ausgereifte Methode zur exakten Quantifizierung spezifischer mRNA stellt die Real-Time RT-PCR dar. Grundlage ist die Mitte der achtziger Jahre entwickelte Polymerase Kettenreaktion (PCR), eine durch spezifische Primer definierte enzymatische *In vitro*-Replikation mit nahezu exponentieller Amplifikation einer DNA-Zielsequenz [60]. Bei der herkömmlichen PCR erfolgt eine semi-quantitative Auswertung in der Regel nach Beendigung der Reaktionszyklen. Dabei kann es bedingt durch die hohe PCR-Zyklenzahl sowie dem Verbrauch von Cofaktoren und einer verringerter Aktivität der DNA-Polymerase zu einer Sättigung der Reaktion kommen. Bei der TaqMan<sup>®</sup>-PCR hingegen sind Amplifikation und Nachweis der PCR-Produkte simultan in einem Reaktionsgefäß möglich. Somit kann nicht nur eine Endpunktquantifizierung wie bei der ursprünglichen PCR erfolgen, sondern auch eine „Real-Time“-Quantifizierung, die während der exponentiellen Amplifikationsphase der eingesetzten Nukleinsäuren bestimmt wird [61]. Dieser Vorteil macht die Real-Time PCR einerseits zu einem exakten Werkzeug im diagnostischen Bereich zum Nachweis von Pathogenen und andererseits zu einer wertvollen Validierungsmethode von Genexpressionswerten aus Microarray-Daten. In leicht veränderter Form kann das TaqMan<sup>®</sup>-PCR-System auch zur Sequenzanalyse oder zur Detektion von Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) eingesetzt werden.

### 1.5.2 Proteomics-Methoden

Schon seit langem ist bekannt, dass Änderungen des Transkriptomtes auch die Proteinexpression und -funktion beeinflussen. Da alleine von der mRNA-Ebene aus keine quantitative Aussage bezüglich der Proteinexpression gemacht werden kann, kommen vermehrt neue Methoden der Proteinanalytik zum Tragen und rücken die Proteomics-Applikationen immer mehr in den Blickpunkt der Forschung. Nach seiner Einführung 1994 [62] fand der Begriff des Proteoms als Proteinäquivalent zum Genom sehr schnell Einzug in die Forschung und die Bezeichnung „Proteomics“ dient heute als Überbegriff für alle Protein-Analysen. Als Proteom bezeichnet man die Gesamtheit aller Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt unter definierten Bedingungen vom Genom einer Zelle oder eines Organismus exprimiert werden [63]. Diese Definition zeigt deutlich den Unterschied zum Genom, das genau definierbar ist und im Vergleich mit dem Proteom eher statisch wirkt, da zwar durch äußere Einflüsse auch Veränderungen im Genom vorkommen, diese aber vergleichsweise gering ausfallen zu den vielen Änderungen, die im Proteom auftreten können. Der direkte Vergleich muss deswegen mit dem Transkriptom, also den vom Genom exprimierten Genen vorgenommen werden. Das Proteom ändert sich in Abhängigkeit von

---

Umwelteinflüssen wie Temperatur, Stressfaktoren, Interaktionen mit anderen Zellen oder durch Einwirkungen eines Medikamentes sehr schnell und spiegelt den momentanen Status einer Zelle wieder. So ist dann auch nur der Vergleich mit einer geeigneten Referenz sinnvoll, bei der möglichst viele äußere Parameter konstant gehalten werden und nur einer oder wenige geändert werden. Unterschiede in den Proteinstereotypen erlauben dann eine Aussage über die Auswirkung des geänderten Parameters. Besonders geeignet sind hierzu *In vitro*-Modelle, da bis auf die Substanzgabe alle anderen Parameter genau kontrolliert werden können. Ebenso wie die Toxicogenomics-Anwendungen zielen Toxicoproteomics-Ansätze auf zwei gleiche, sich teilweise überlappende Gebiete: zum Einen die Vorhersage der Toxizität neuer Substanzen aufgrund von Expressionsmustervergleichen mit bekannten toxischen Substanzen und zum Anderen auf die Gewinnung von Erkenntnissen über den toxischen Wirkungsmechanismen einer Substanz [64].

### 1.5.2.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zurzeit gebräuchlichste Methode zur Proteomforschung ist die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-PAGE) [65, 66]. Es handelt sich hierbei um eine hochauflösende Trennmethode, bei der tausende von Proteinen aus komplexen Gemischen in einer ersten Dimension anhand ihres isoelektrischen Punktes und anschließend in der zweiten Dimension über ihr Molekulargewicht aufgetrennt werden. Der eigentliche Durchbruch dieser Methode erfolgte Ende der achtziger Jahre, als es mit Hilfe der Massenspektrometrie möglich wurde, die aufgetrennten Proteine in hohem Durchsatz zu identifizieren. Zusammen mit dem enormen Fortschritt in der Automatisierung auf dem Gebiet der Genomanalyse stehen damit die nötigen Sequenzdaten für die Proteinidentifizierung ausreichend zur Verfügung.

### 1.5.2.2 SELDI ProteinChip®-Technologie

Ein zweiter Proteomics-Ansatz ist die SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation) ProteinChip®-Technologie, bei dem Proteine alleine durch ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften an verschiedenen gewählten affinen Chip-Oberflächen binden. Nach dem Entfernen von unspezifischen Proteinen durch einfache Waschschrirte werden die Proteine mittels TOF-MS (Time Of Flight-Massenspektrometrie) charakterisiert. Jeder Analyse geht also eine Fraktionierung der Probe voraus, deren Selektivität sich aus der verwendeten Oberfläche des Chips ergibt. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass für die Identifizierung gefundener Peaks ein sehr hoher technischer und finanzieller Aufwand betrieben werden muss. In einigen publizierten Studien konnten anhand der Peak-Spektren Biomarker gefunden werden [67, 68]. Auch für die Identifizierung weiterer Biomarker aus toxikologischer Sicht verspricht man sich viel von dieser Technik. Im Vergleich zu den üblichen Proteomics-Methoden werden nur geringe Mengen Protein als Ausgangsmaterial benötigt. Daher eignet sich die Methode besonders für die Analyse von Mikrodisektionen. Ein besonderer Vorteil der Proteomics-Methoden ist, dass viele Proteine im Gegensatz zu DNA oder RNA auch in den Körperflüssigkeiten vorkommen. Gerade im humanen Bereich können dadurch SELDI-TOF-MS-Experimente sehr viel einfacher und schneller mit Blut- oder Urinproben durchgeführt werden, ohne vorher eine aufwendige und gefährliche Biopsie vornehmen zu müssen.

## 1.6 Ziele der Arbeit

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Eignung des *In vitro*-Testsystems primäre Rattenhepatozyten auf Collagen-Monolayer-Basis zur Prädiktion von toxischen Effekten zu beurteilen. Hierzu stand in einem ersten Schritt die Testung molekularer Methoden, um damit globale Expressionsanalysen sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene zu erlangen.

Zur Bestimmung der Aussagekraft und Reproduzierbarkeit der Genexpressionsprofile wurden zwei unterschiedliche Microarray-Systeme verwendet. Zusätzlich sollte dadurch das Potential eines aus toxikologisch relevanten Genen bestehenden Low-Density Microarrays im Vergleich zu einem genomweiten High-Density Microarray analysiert werden. Die potentiellen Einsatzmöglichkeiten von Low-Density Microarrays für spezielle Fragestellungen sind aus Kostengründen überlegenswert und sollten in den durchgeführten Versuchsreihen etabliert werden.

Auf der Ebene der Proteinanalyse sollten ebenfalls zwei unterschiedliche Methoden, die 2D-Gelelektrophorese und das SELDI ProteinChip<sup>®</sup>-System, hinsichtlich der Eignung zur Bestimmung der Proteinexpression unter toxikologischen Fragestellungen überprüft werden. Die aus der Analyse der Daten ermittelte Korrelation zwischen Gen- und Proteinexpression sowie beobachtete Differenzen in den Regulationsmechanismen sollten eine Aussage über die Zuverlässigkeit und Interpretationsmöglichkeiten der eingesetzten Analysemethoden ergeben.

Um das Zellkultursystem primäre Rattenhepatozyten zu charakterisieren, wurde in einem ersten Ansatz eine unbehandelte Zeitserie mit den angeführten Methoden analysiert. In einem zweiten Schritt sollten durch die Behandlung der Zellen mit bekannten toxischen Substanzen die daraus resultierenden veränderten Gen- und Proteinexpressionsprofile ermittelt und damit eine Expressionsdatenbank aufgebaut werden. Letztendlich sollten die detektierten spezifischen Expressionsunterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Proben dazu genutzt werden, die getesteten Substanzen zu charakterisieren und dadurch einen Hinweis auf den toxischen Wirkungsmechanismus der jeweiligen Substanz zu finden. Das Muster einer in der Entwicklungsphase befindlichen Substanz wird dabei mit den in der Datenbank gespeicherten Ergebnissen der bekannten Modellsubstanzen verglichen. Durch Übereinstimmungen der Expressionsprofile sollte auf das toxische Potential dieser neuen Substanz geschlossen werden und ihre Klassifikation erfolgen.

---

## 2. Material

Die benötigten Chemikalien (Tab. 2.1), Zellkulturmedium und Zusätze (Tab. 2.2), Kits und Microarray-Komponenten (Tab. 2.3), Geräte und Verbrauchsmaterialien (Tab. 2.4) sowie eingesetzte Software (Tab. 2.5) werden im Folgenden aufgeführt und im weiteren Verlauf nicht mehr näher beschrieben.

### 2.1 Chemikalien

**Tab. 2.1:** Liste der verwendeten Chemikalien.

| <b>Reagenzien</b>             | <b>Hersteller</b>          |
|-------------------------------|----------------------------|
| Ammoniumbicarbonat            | Merck KGaA, Darmstadt      |
| Ammoniumpersulfat             | Merck KGaA, Darmstadt      |
| Benzyloxy-Resorufin           | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| BSA                           | Merck KGaA, Darmstadt      |
| CHAPS                         | Merck KGaA, Darmstadt      |
| Chloroform                    | Merck KGaA, Darmstadt      |
| Collagen (Rattenschwanz)      | Roche, Mannheim            |
| Collagenase D                 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Coomassie Brilliant Blue G250 | Serva, Heidelberg          |
| DEPC-Wasser                   | Ambion, Huntingdon, UK     |
| D-Glukose                     | Merck KGaA, Darmstadt      |
| DMSO                          | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| DTT                           | Invitrogen, Karlsruhe      |
| EDTA                          | Ambion, Huntingdon, UK     |
| EGTA                          | Fluka, Buchs, CH           |
| Essigsäure                    | Invitrogen, Karlsruhe      |
| Ethanol absolut               | Merck KGaA, Darmstadt      |
| Ethoxy-Resorufin              | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Glycin                        | Merck KGaA, Darmstadt      |
| Harnstoff                     | Merck KGaA, Darmstadt      |
| HEPES                         | Merck KGaA, Darmstadt      |
| Imidazol                      | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Iodacetamid                   | Merck KGaA, Darmstadt      |
| Kaliumchlorid                 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Kaliumchlorid                 | Merck KGaA, Darmstadt      |
| Kaliumdihydrogensulfat        | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Liberase Blendzyme            | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Magnesiumsulfat               | Merck KGaA, Darmstadt      |
| MES                           | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Methanol                      | Merck KGaA, Darmstadt      |
| Natriumacetat                 | Merck KGaA, Darmstadt      |
| Natriumchlorid                | Merck KGaA, Darmstadt      |
| Natriumhydrogencarbonat       | Merck KGaA, Darmstadt      |
| Natriumhydroxid               | Merck KGaA, Darmstadt      |
| Pentoxy-Resorufin             | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Polyacrylamid                 | Merck KGaA, Darmstadt      |
| Saccharose                    | Merck KGaA, Darmstadt      |

→ Fortsetzung **Tab. 2.1**: Liste der verwendeten Chemikalien.

| <b>Reagenzien</b>                   | <b>Hersteller</b>          |
|-------------------------------------|----------------------------|
| Salzsäure                           | Merck KGaA, Darmstadt      |
| SDS                                 | Merck KGaA, Darmstadt      |
| SDS-Tris-Glycin (10x), pH 8,8       | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Sinapinsäure                        | Chiphergen, Fremont, USA   |
| β-Mercaptoethanol                   | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Taurin                              | Merck KGaA, Darmstadt      |
| TE-Buffer                           | Ambion, Huntingdon, UK     |
| TEMED                               | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Thioharnstoff                       | Merck KGaA, Darmstadt      |
| Titanoxysulfat Schwefelsäure-Lösung | Fluka, Buchs, CH           |
| Trichloressigsäure                  | Merck KGaA, Darmstadt      |
| TRIS                                | Ambion, Huntingdon, UK     |
| Triton X-100                        | Serva, Heidelberg          |
| Trypanblau-Lösung                   | Invitrogen, Karlsruhe      |
| Tween-20                            | Merck KGaA, Darmstadt      |
| Wasserstoffperoxid                  | Merck KGaA, Darmstadt      |
| WST-1                               | Roche, Mannheim            |
| Zimtsäure                           | Chiphergen, Fremont, USA   |

## 2.2 Zellkulturmedien und Zusätze

**Tab. 2.2**: Liste der verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze.

| <b>Reagenzien</b>               | <b>Hersteller</b>          |
|---------------------------------|----------------------------|
| DMEM:Ham 12 (1:1), mit Glutamin | Invitrogen, Karlsruhe      |
| Gentamycin                      | Invitrogen, Karlsruhe      |
| PBS-Buffer                      | Invitrogen, Karlsruhe      |
| Penicillin [10000 U/ml]         | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Streptomycin [10 mg/ml]         | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

## 2.3 Kits und Microarray-Komponenten

**Tab. 2.3**: Liste der verwendeten Kits und Microarray-Komponenten.

| <b>Reagenzien</b>                                | <b>Hersteller</b>                    |
|--|--------------------------------------|
| Anti-Streptavidin-Antikörper                     | Vector Laboratories, Burlingame, USA |
| Assay-on-Demand <sup>®</sup> Gene Expression Kit | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| DNA 7500 Assay Kit                               | Agilent Technologies, Waldbronn      |
| dUTP Cy3/C5                                      | Amersham, Buckinghamshire, UK        |
| ECL-Detection Kit                                | Amersham, Buckinghamshire, UK        |
| Enzo RNA Transcriptional Labeling Kit            | Affymetrix, Santa Clara, USA         |
| Eukaryotic Hybridization Control Kit             | Affymetrix, Santa Clara, USA         |
| Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit                | Affymetrix, Santa Clara, USA         |
| Eukaryotische 18S rRNA                           | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| FairPlay <sup>™</sup> Microarray Labeling Kit    | Stratagene, La Jolla, USA            |
| GeneChips <sup>®</sup> Rat-230A (15973 Gene)     | Affymetrix, Santa Clara, USA         |

→ Fortsetzung **Tab. 2.3:** Liste der verwendeten Kits und Microarray-Komponenten.

| <b>Reagenzien</b>                     | <b>Hersteller</b>                    |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Hybridisierungspuffer (RiboHybe™)     | Ventana, Illkirch, F                 |
| Kontroll-Oligo B2                     | Affymetrix, Santa Clara, USA         |
| Low-Density Microarrays (248 Gene)    | MWG-Biotech, Ebersberg               |
| Phycoerythrin Streptavidin Dye (SAPE) | Molecular Probes, Leiden, NL         |
| Primer und Sonden für TaqMan®-RT-PCR  | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| Protease Inhibitorcocktail III        | Roche, Mannheim                      |
| Reference RNA                         | Stratagene, La Jolla, USA            |
| RNA 6000 Nano Assay Kit               | Agilent Technologies, Waldbronn      |
| RNeasy Mini/Midi Kit                  | Qiagen, Hilden                       |
| Sample Cleanup Module Kit             | Affymetrix, Santa Clara, USA         |
| SuperScript™ cDNA Synthesis Kit       | Invitrogen, Karlsruhe                |
| T7-Oligo-dT <sub>24</sub> Primer      | Qiagen, Hilden                       |

## 2.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tab. 2.4:** Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien.

| <b>Geräte</b>                         | <b>Hersteller</b>                      |
|---------------------------------------|--|
| ABI Prism 7000 Sequence Detection     | Applied Biosystems, Foster City, USA   |
| Agilent Bioanalyzer 2100              | Agilent Technologies, Waldbronn        |
| Autoklav                              | H&P Labortechnik, Oberschleißheim      |
| Braunüle MT                           | Braun, Melsungen                       |
| Brutschrank                           | Kendro Laboratory, Hanau               |
| EttanDalt II GelCaster                | Amersham, Buckinghamshire, UK          |
| Fluidic Station 450                   | Affymetrix, Santa Clara, USA           |
| Fluoreszenzscanner (Molecular Imager) | BIORAD, München                        |
| Glaswaren                             | Schott Glas, Mainz                     |
| Heizblock Thermo Stat Plus            | Eppendorf, Hamburg                     |
| HP GeneArray™ Scanner                 | Affymetrix, Santa Clara, USA           |
| Hybridisierstation                    | Ventana, Illkirch, F                   |
| Magnetheizrührer                      | IKA, Staufen                           |
| Microtiterplatten (96-Well, 6-Well)   | Nalge Nunc, Rochester, USA             |
| Mikroskop                             | Zeiss, Jena                            |
| NanoDrop ND-1000                      | NanoDrop Technologies, Wilmington, USA |
| Nitrozellulosemembran                 | Schleicher & Schuell, Dassel           |
| OP-Besteck                            | Braun, Melsungen                       |
| pH-Meter                              | Knick, Berlin                          |
| Peristaltische Pumpe (313S)           | Watson-Marlow, Birmingham, UK          |
| Petrischalen TC (100 mm, 60 mm)       | Greiner-Bio One, Frickenhausen         |
| Pipettierhilfe                        | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt,     |
| Plastikröhrchen 15/50 ml              | Greiner-Bio One, Frickenhausen         |
| Reaktionsgefäße (0,2/1,5/2 ml)        | Eppendorf, Hamburg                     |
| Scanner Axon 4000B                    | Axon Technologies, Union City, USA     |
| Spektrophotometer (TM3000)            | Bio-Rad, Hercules, USA                 |
| Speed-Vac (Concentrator 5301)         | Eppendorf, Hamburg                     |
| Sterile Werkbank                      | Kendro Laboratory, Hanau               |

→ Fortsetzung **Tab. 2.4:** Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien.

| <b>Geräte</b>                  | <b>Hersteller</b>                   |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| Sterilfilter (0,2 µM)          | Nalge Nunc, Rochester, USA          |
| Thermocycler                   | Eppendorf, Hamburg                  |
| Tischzentrifuge 5415           | Eppendorf, Hamburg                  |
| Ultra TURRAX                   | IKA, Staufen                        |
| Vakuumpumpe                    | Vacuubrand, Wertheim                |
| Vortex                         | Scientific Industries, Bohemia, USA |
| Waagen                         | Sartorius, Göttingen                |
| Wasserbad                      | Lauda GmbH & Co. KG, Lauda          |
| Whatmanpapier                  | Schleicher & Schuell, Dassel        |
| Zählkammer (Neubauer improved) | Marienfeld, Lauda                   |
| Zellschaber (25 cm, steril)    | Greiner-Bio One, Frickenhausen      |
| Zentrifugen                    | Kendro Laboratory, Hanau            |

## 2.5 Software

**Tab. 2.5:** Liste der verwendeten Software.

| <b>Software</b>                          | <b>Hersteller</b>                    |
|--|--------------------------------------|
| ABI Prism 7000 SDS                       | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| Bio Sizing                               | Agilent Technologies, Waldbronn      |
| Expressionist                            | Genedata, Basel, CH                  |
| GeneChip <sup>®</sup> Operating Software | Affymetrix, Santa Clara, USA         |
| GenePix <sup>™</sup>                     | Axon Technologies, Union City, USA   |
| KC4                                      | Bio-Tek Instruments, Vermont, USA    |
| Microsoft Office                         | Microsoft, Redmond, USA              |
| Primer Express <sup>®</sup> Software     | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| ProteomeWeaver                           | Definiens, München                   |
| Origin                                   | OriginLab, Northampton, USA          |

### 3. Methoden

#### 3.1 Isolation von Rattenhepatozyten

Für die Rattenleber-Perfusion (Aktenzeichen der behördlichen Genehmigung: v54-19c20/15 [DA4/Anz271E]) wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 200 - 300 g verwendet. Die Tiere wurden unter Einhaltung des gängigen Tierschutzgesetzes in einem klimatisierten Raum unter 12 h Tag-Nacht-Zyklus gehalten und hatten *ad libitum* Trockenfutter und Trinkwasser. Zur Gewinnung der Hepatozyten wurde die durch Seglen etablierte, zweistufige Leberperfusion (*in situ*) angewandt [15, 16]. Alle verwendeten Geräte (OP-Besteck, Glasgefäße etc.) wurden vorher autoklaviert und die Perfusionslösungen PP1 und PP2 sterilfiltriert, um eine Kontamination der Zellen möglichst gering zu halten.

##### Durchführung:

Die Ratten wurden durch eine i.p.-Injektion Narcoren (0,1 ml pro 100 g Körpergewicht) narkotisiert. Nach Überprüfung der Reaktionsunfähigkeit wurde mit der Perfusion begonnen. Die Leber wurde durch Öffnen der Bauchseite freigelegt und die Pfortader (Vena portae) mit einer Braunnüle angestochen, die durch ein Pumpen- und Schlauchsystem mit den Perfusionslösungen verbunden war. Um ein Herausrutschen der Braunnüle zu verhindern, wurde sie mit einer Ligatur um die Pfortader fixiert. Durch die Öffnung der unteren Hohlvene (Vena cava inferior) wurde der Ablauf des Blutes und der Perfusionslösungen ermöglicht. Um eine vollständige Entblutung der Leber zu erhalten, wurde im ersten Schritt die Leber für 2 min bei einem Fluss von 50 ml/min mit der Perfusionslösung PP1 (Tab. 3.1 und 3.2) gespült. Nach erfolgter Entblutung, wobei sich die Leber von dunkelrot zu hellbraun verfärbt, wurde der Fluss der Lösung auf 40 ml/min gesenkt und für weitere 3 min perfundiert, um eine vollständige Komplexierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch das EGTA zu erhalten und die Auflösung der Desmosomen zu ermöglichen. Die in der PP2-Lösung (Tab. 3.1 und 3.3) enthaltene Collagenase bewirkte im zweiten Schritt durch das Auflösen der extrazellulären Matrix die Freisetzung der Hepatozyten aus dem Leberparenchym. Hierzu wurde die Leber mit der PP2-Lösung bei einem Fluss von 45 ml/min durchspült. Nach 5 - 7 min zeigte das Auftreten von netzartigen Oberflächenstrukturen auf der Leber, dass die Perfusion beendet werden konnte. Die Leber konnte nun entnommen und in Waschpuffer (Tab. 3.1 und 3.4) überführt werden. Mit einer Pinzette wurde die Leberkapsel geöffnet. In der so gewonnenen Zellsuspension konnten durch mehrere Waschschrte über Kompressen und 200  $\mu\text{m}$ - bzw. 100  $\mu\text{m}$  Siebgewebe die Zellen vereinzelt werden. In jeweils nachfolgenden Schritten wurden tote Zellen durch zentrifugieren mit 500 rpm bei 4 °C für 2 min abgetrennt und entfernt. Im letzten Schritt wurden die Zellen in 50 ml Waschpuffer resuspendiert.

**Tab. 3.1:** Perfusionspuffer zur Isolation von Rattenhepatozyten.

| Menge  | Reagenzien                           |
|--------|--------------------------------------|
| 6,30 g | NaCl                                 |
| 0,32 g | KCl                                  |
| 0,27 g | MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O |
| 0,15 g | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      |
| 1,81 g | NaHCO <sub>3</sub>                   |
| 3,58 g | HEPES                                |
| 1,50 g | D-Glukose                            |

Mit Aqua bidest. auf 1 L auffüllen.

**Tab. 3.2:** Präperfusionslösung (PP1) zur Isolation von Rattenhepatozyten.

| Menge   | Reagenzien |
|---|------------|
| 0,038 g   | EGTA       |
| Zu 1 L Perfusionspuffer geben, pH 7,2 einstellen, sterilfiltrieren. |            |

**Tab. 3.3:** Collagenaselösung (PP2) zur Isolation von Rattenhepatozyten.

| Menge  | Reagenzien                           |
|--|--------------------------------------|
| 0,58 g   | CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O |
| Zu 1 L Perfusionspuffer geben, pH 7,2 einstellen, sterilfiltrieren.          |                                      |
| 0,5 mg/ml Collagenase D (alternativ Liberase Blendzyme) in 300 ml PP2 lösen. |                                      |

**Tab. 3.4:** Waschpuffer zur Isolation von Rattenhepatozyten.

| Menge   | Reagenzien                           |
|---|--------------------------------------|
| 0,58 g  | CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O |
| 20,00 g   | BSA                                  |
| Zu 1 L Perfusionspuffer geben, pH 7,2 einstellen, sterilfiltrieren. |                                      |

## 3.2 Zellzahlbestimmung und Vitalitätstests

Die Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität wurde mit Hilfe von Trypanblau durchgeführt. Tote Zellen hatten eine für Trypanblau durchlässige Zellmembran und färbten sich deswegen blau. Die Anzahl angefärbter Zellen im Verhältnis zu nicht-angefärbten Zellen wurde in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt und damit auch die Gesamtzahl an Zellen berechnet. Hierzu wurden 50 µl der Zellsuspension mit 1 ml Trypanblau-Lösung (Tab. 3.5) versetzt und 1 min bei Raumtemperatur (RT<sub>M</sub>) inkubiert. Anschließend wurden jeweils drei Felder mit 16 Kleinstquadraten ausgezählt. Die Hepatozyten aus den Leberperfusionen wurden nur für weitergehende Versuche benutzt, wenn die Vitalität der Zellen mindestens 80 % betrug.

**Tab. 3.5:** Trypanblau-Lösung für Zellzahlbestimmung und Vitalitätstests.

| Menge  | Reagenzien                |
|--------|---------------------------|
| 500 µl | Trypanblau-Lösung (0,5 %) |
| 500 µl | Waschpuffer               |

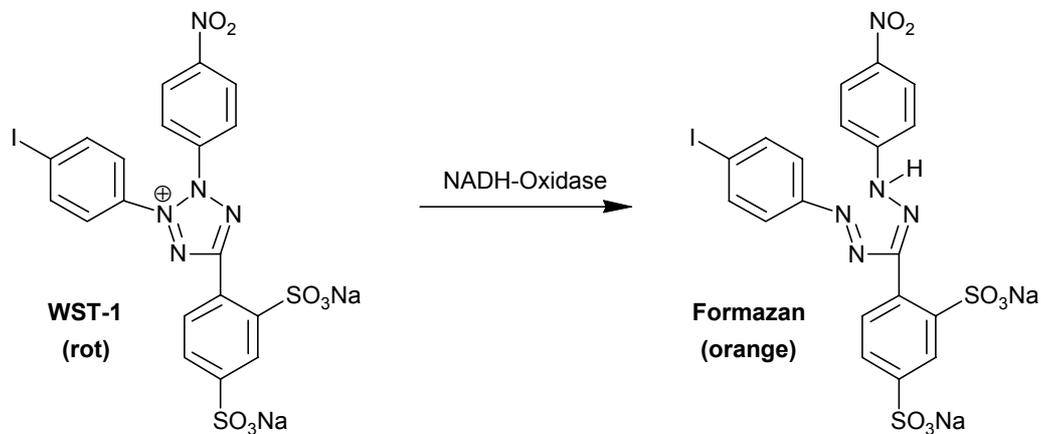
## 3.3 Cytotoxizitätsbestimmung

Zur Überprüfung des cytotoxischen Potentials von Acetaminophen sowie zur Bestimmung eines validen LC<sub>50</sub>-Wertes wurden zwei verschiedene Tests angewandt. Davon ausgehend wurde die zu verwendende Dosis ermittelt, mit der die primären Hepatozyten inkubiert wurden.

### 3.3.1 WST-1-Assay

Dieser Test basiert auf der Reduktion des Tetrazoliums Salzes WST-1 zu Formazan [69] (Abb. 3.1). Die Farbreaktion wird durch auf der Außenseite der Zellmembranen sitzende NADH-

Oxidasen vermittelt. Die gemessene Farbstoffänderung korreliert direkt mit der Zahl der lebenden, stoffwechselaktiven Zellen.



**Abb. 3.1:** Prinzip des WST-1-Cytotoxizitätsassays. WST-1 wird durch NADH-Oxidasen zu Formazan reduziert. Die dabei auftretende Farbreaktion von rot zu orange wird photometrisch detektiert und korreliert direkt mit der Anzahl der lebenden Zellen.

### Durchführung:

Nach Absaugen des Mediums aus den 96-Well-Platten wurden 100  $\mu\text{l}$  Medium und 10  $\mu\text{l}$  WST-1-Lösung pro Well zu den Zellen gegeben und die Platten für 3 h im Brutschrank inkubiert. Die Messung erfolgte nach 1 min Schütteln bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge: 650 nm) im Photometer.

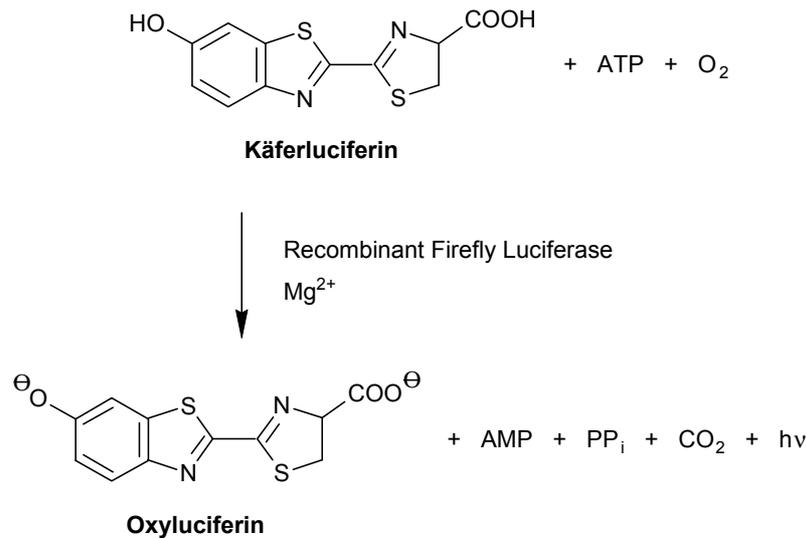
### 3.3.2 CellTiter-Glo™ Luminiscent Cell Viability Test

Dieser Test ermittelt das von lebenden Zellen gebildete ATP (Abb. 3.2). Durch Lysieren der Hepatozyten wird dabei ein entstehendes Lumineszenz-Signal, welches proportional zur freigesetzten ATP-Menge und damit zur Zahl der lebenden Zellen ist, gemessen.

### Durchführung:

100  $\mu\text{l}$  CellTiter-Glo™-Lösung wurden pro Well der 96-Well-Platten pipettiert, dann 2 min bei  $RT_M$  und mittlerer Intensität geschüttelt und anschließend 10 min bei  $RT_M$  inkubiert. Die eingesetzten Lösungen wurden in eine lichtundurchlässige Mikrotiterplatte überführt, um Streulumineszenz zu verhindern. Danach wurde die entstehende Lumineszenz gemessen.

Die Cytotoxizitätstests wurden für beide Methoden nach 24 bzw. 48 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Acetaminophen ([0,01 mg/ml] bis [100 mg/ml]) durchgeführt. Jede Konzentration Acetaminophen wurde in acht Replikaten gemessen. Als Nullwert dienten jeweils unbehandelte Zellen und als Hintergrundkontrolle Medium ohne Zellen. Die Berechnung der  $LC_{50}$ -Werte für Acetaminophen erfolgte durch nicht-lineare Regression (sigmoidale Kurve) mit dem Origin-Programm. Dazu wurden die gemessenen Absorptionen gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen und der  $LC_{50}$ -Wert im Vergleich zur Kontrolle ermittelt.



**Abb. 3.2:** Prinzip des CellTiter-Glo™ Luminiscent Cell Viability Test. Das von den Zellen mittels der Luciferase-Enzymreaktion erzeugte Lumineszenzsignal gibt Aufschluss über die Anzahl lebender Zellen.

### 3.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen

Alle Arbeitsschritte wurden wie vom Hersteller für den RNeasy®-Kit im Handbuch beschrieben durchgeführt. Nach dem Abschaben aus den Petrischalen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Zum Homogenisieren der mit 600 µl RLT-Puffer versetzten Zellpellets wurde der Ansatz für 2 min bei max. Geschwindigkeit durch eine QIAshredder®-Säule zentrifugiert. Dem Homogenat wurden 600 µl Ethanol (70 %) zugegeben, bevor die Lösung auf eine RNeasy®-Säule pipettiert wurde. Nach den vorgeschriebenen Waschschritten mit RW1- und RPE-Puffer wurde die RNA in 30 ml RNase-freiem Wasser eluiert.

### 3.5 Qualitätskontrolle und Quantifizierung der RNA

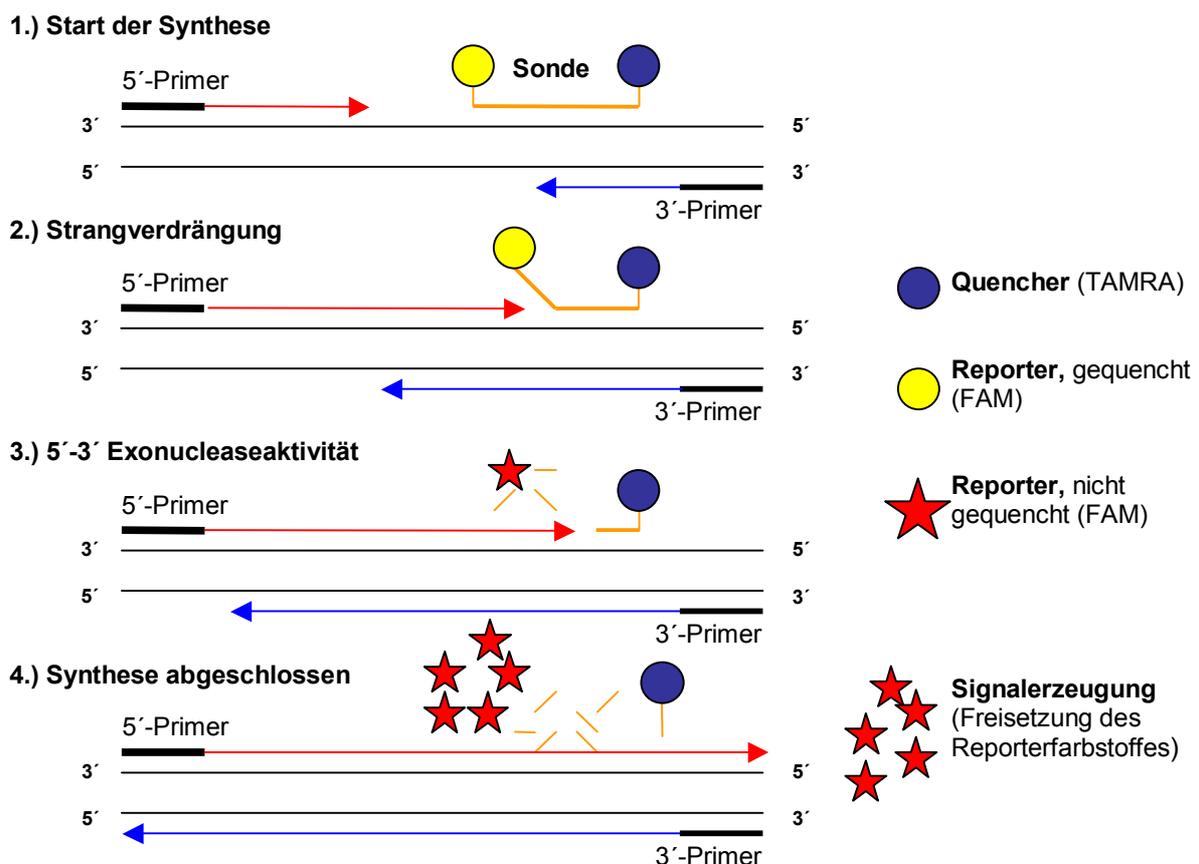
Die RNA-Konzentration wurde sowohl photometrisch als auch mit dem Lab-on-a-Chip-System bestimmt.

Für die photometrische Bestimmung wurde eine 1:100-Verdünnung der RNA hergestellt und in einem UV-Spektrophotometer bei den Wellenlängen 260 nm (RNA) und 280 nm (Protein) vermessen. Das Verhältnis der beiden Werte sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Konzentration wurde mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten berechnet.

Bei der RNA-Konzentrationsbestimmung mittels Lab-on-a-Chip-System wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Der Vorteil dieser Methode gegenüber einer photometrischen Bestimmung war, dass zusätzlich ein Gelbild generiert wurde, auf dem man bereits eine vorhandene Degradierung der RNA feststellen konnte. Neben der RNA war es mit diesem System ebenfalls möglich, die bei Microarray-Experimenten benötigten doppelsträngige cDNA sowie cRNA zu detektieren.

### 3.6 TaqMan<sup>®</sup>-Real-Time PCR

Während bei Microarray-Experimenten eine möglichst große Anzahl an Genen untersucht wird, eignet sich die quantitative TaqMan<sup>®</sup>-RT-PCR als Verfahren, um das Expressionsverhalten einiger weniger Gene sehr präzise zu untersuchen [61]. Die TaqMan<sup>®</sup>-RT-PCR beruht auf dem Prinzip der 5'-Nuklease-Aktivität der eingesetzten Polymerasen [70]. Neben den normalen Primern für eine PCR enthält der Ansatz eine sequenzspezifische Oligonukleotid-Sonde, die mit einem fluorogenen Reporterfarbstoff (FAM oder VIC) am 5'-Ende und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (TAMRA) ausgestattet ist. Solange die Sonde intakt ist, wird durch das FRET-Prinzip (Fluorescence Resonance Energy Transfer) die Fluoreszenzenergie des Reporterfarbstoffes auf den Quencher übertragen und dadurch eine stattfindende Fluoreszenzemission verhindert. Kommt es nach der Anlagerung an eine komplementäre Zielsequenz durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase zu einer räumlichen Trennung von Quencher und Reporter, kann ein Signal detektiert werden (Abb. 3.3). Dieser Vorgang wiederholt sich nun bei jedem Zyklus. Dadurch ist während der exponentiellen Phase der PCR die gemessene Zunahme der Fluoreszenz direkt proportional zum entstandenen Amplifikat. Dieses ist wiederum proportional zur eingesetzten Template-Menge. Durch den Einsatz eines passiven Referenzfarbstoffes können Fehler, die z.B. durch Pipettierfehler entstehen, ausgeglichen werden. Die Liste der eingesetzten Primer und Sonden ist in Tab. 10.1 (Anhang) aufgeführt.



**Abb. 3.3:** Schematischer Ablauf der TaqMan<sup>®</sup>-PCR-Reaktion (verändert nach den Betriebsunterlagen für den ABI Prism 7000 SDS). Durch die *Taq*-Polymerase kommt es zu einer Strangverlängerung an den eingesetzten Primern. Trifft die *Taq*-Polymerase auf die Sonde, wird durch ihre 5'-Exonuklease-Aktivität der Reporterfarbstoff von der Sonde abgespalten und ein Signal kann detektiert werden.

**Durchführung:**

Die cDNA-Synthesen wurden nach dem Schema in Tab. 3.6 pipettiert.

**Tab. 3.6:** Standardpipettierprotokoll für cDNA-Synthese.

| Menge   | Reagenzien                |
|---------|---------------------------|
| 3,85 µl | RNA (200 ng)              |
| 1,0 µl  | 10x RT buffer             |
| 2,2 µl  | 25 mM MgCl                |
| 2,0 µl  | 10 mM dNTP-Mix            |
| 0,5 µl  | 50 µM Random Hexamer      |
| 0,2 µl  | RNase Inhibitor (20 U/µl) |
| 0,25 µl | MultiScribe RT (50 U/µl)  |

Die cDNA-Synthese wurde im Thermo-Cycler nach in Tab. 3.7 aufgezeigtem Programm hergestellt.

**Tab. 3.7:** Standard Thermo-Cycler Programm für cDNA-Synthesen.

| Schritt               | Temperatur | Zeit   |
|-----------------------|------------|--------|
| Inkubation            | 25 °C      | 10 min |
| Reverse Transkription | 48 °C      | 30 min |
| Inaktivierung         | 95 °C      | 5 min  |

Die TaqMan<sup>®</sup>-PCR wurde mit dem ABI Prism<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System nach in Tab. 3.8 und 3.9 aufgezeigtem Schema durchgeführt.

**Tab. 3.8:** Standard Pipettierprotokoll für TaqMan<sup>®</sup>-RT-PCR.

| Menge    | Reagenzien                                       |
|----------|--|
| 1,25 µl  | TaqMan <sup>®</sup> -Gene Expression Assay (20x) |
| 11,25 µl | cDNA (10 ng) + H <sub>2</sub> O                  |
| 12,50 µl | TaqMan <sup>®</sup> -PCR Master Mix (2x)         |

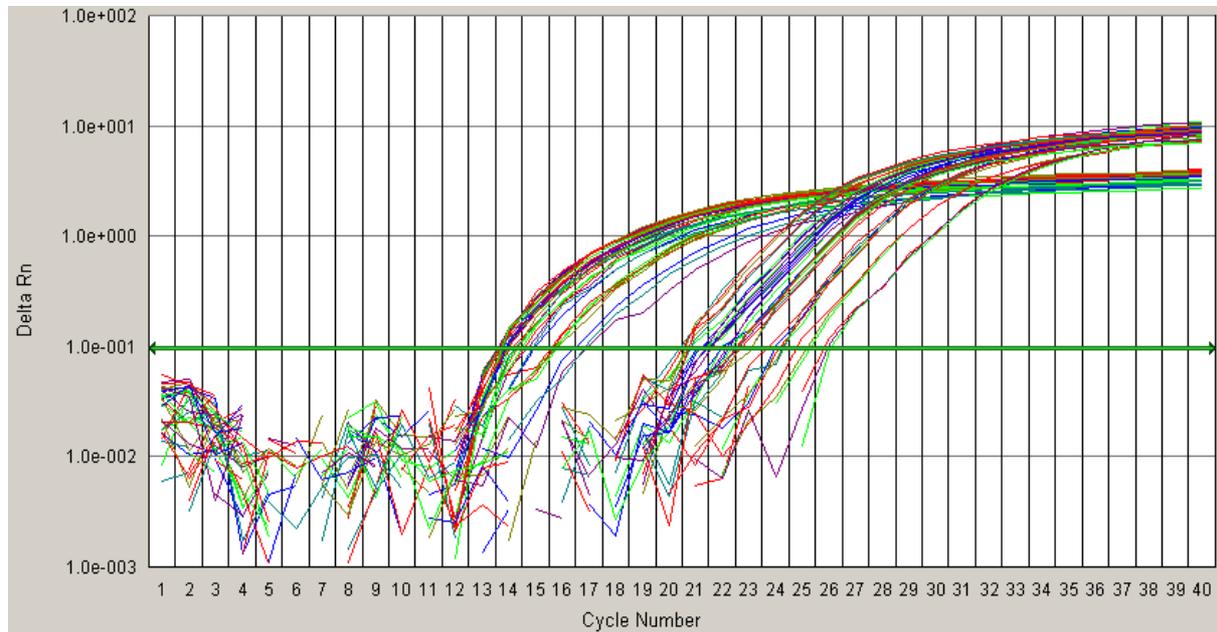
**Tab. 3.9:** Standardprotokoll für TaqMan<sup>®</sup>-RT-PCR Lauf.

| Schritt                            | Temperatur | Zeit   | Zyklenzahl |
|------------------------------------|------------|--------|------------|
| Carry-over-Verdau                  | 50 °C      | 2 min  | 1x         |
| Aktivierung <i>Taq</i> -Polymerase | 95 °C      | 10 min | 1x         |
| Denaturierung cDNA                 | 95 °C      | 15 sec | 40x        |
| Annealing und Elongation           | 60 °C      | 60 sec | 40x        |

**Datenanalyse TaqMan<sup>®</sup>-RT-PCR**

Bei der Analyse der Daten (Abb. 3.4) setzte man zuerst einen Schwellenwert ( $C_T$ -Wert) fest, bei dem sich alle PCR-Reaktionen in der exponentiellen Phase befinden. Um die vorgelegte cDNA-Konzentration zu bestimmen, wurde die Zykluszahl ermittelt, bei der das für die entsprechende Probe entstandene Fluoreszenzsignal den festgelegten  $C_T$ -Wert schneidet. Je niedriger der  $C_T$ -Wert, desto mehr Zielsequenz lag in der entsprechenden Probe vor. Bei

jedem PCR-Ansatz wurden auch die  $C_T$ -Werte für eine Referenz-Standardkurve (20 ng, 10 ng, 5 ng, 2,5 ng RNA) bestimmt. Die Menge der eingesetzten cDNA aus unbekanntem Proben konnte nun anhand der gemessenen  $C_T$ -Werte und der aus der Standardkurve erstellten Geradengleichung berechnet werden.



**Abb. 3.4:** Darstellung eines TaqMan<sup>®</sup>-PCR-Laufes mit zu untersuchendem Gen (rechte Kurven) und Housekeeper (linke Kurven). Ein Ansteigen der Kurven bedeutet die Amplifizierung der Zielsequenz mit gleichzeitiger Freisetzung des Reporterfarbstoffes. Je niedriger der  $C_T$ -Wert (Schnittpunkt der grünen Linie mit der jeweiligen Kurve), desto mehr Zielsequenz ist in den Proben vorhanden.

## 3.7 Microarrays

### 3.7.1 Low-Density MWG-Chips

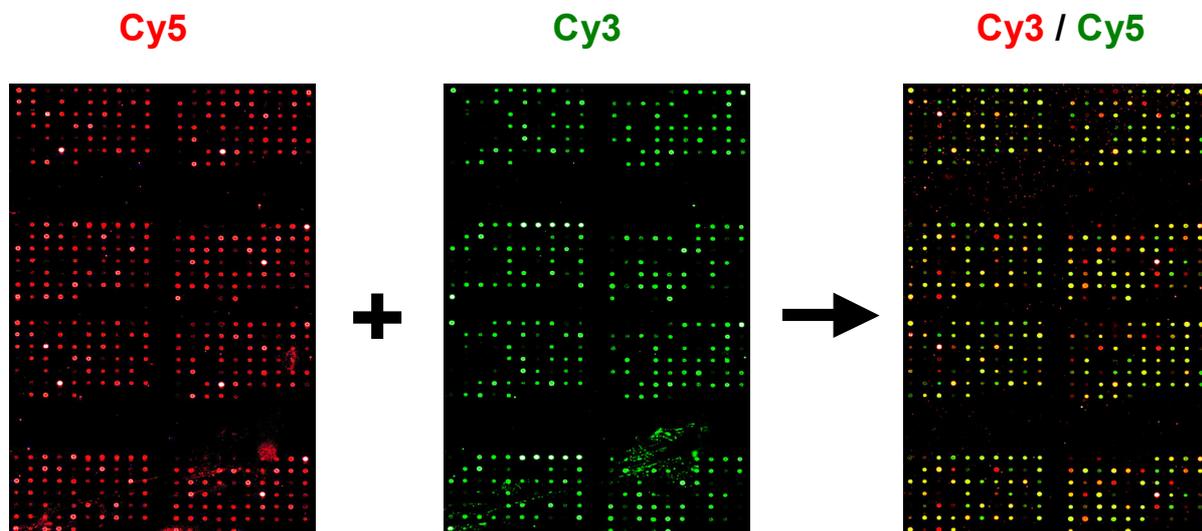
Bei dieser Art Microarrays wurden durch die so genannte kompetitive Hybridisierung zwei unterschiedlich markierte RNA-Proben gemeinsam auf einen Microarray aufgebracht (Abb. 3.5). Für diese Versuche wurde ein Array entwickelt, der 248 toxikologisch relevante Oligonukleotid-Sequenzen (Tab. 10.2, Anhang) mit einer Länge von 50 Basen enthielt. Die Sonden für diese Art von Chips wurden vorher komplett synthetisiert und dann in einem Druckvorgang ähnlichen Verfahren in Duplikaten auf die Glasobjektträger gespottet. Die Markierung durch Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte bei dem von uns verwendeten indirekten Labeling in einem zweistufigen Prozess. Im ersten Schritt wurde durch die Reverse Transkriptase RNA in cDNA umgeschrieben, wobei Aminoallyl-markiertes dUTP inkorporiert wurde. Anschließend kam es durch die Zugabe von monoreaktivem Fluoreszenzfarbstoff-NHS-Ester, der an die Amino-Gruppe des Aminoallyl-dUTP binden kann, zur eigentlichen Markierung. Da die Proben mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen (Cy3/Cy5) markiert wurden, konnten sie anschließend gemeinsam auf den Chip hybridisiert werden. Durch das Überlagern der einzelnen gemessenen Wellenlängen für die Fluoreszenzfarbstoffe entstand ein Falschfarbenbild, das analysiert werden konnte.

**Durchführung:**

20 µg zu untersuchende Total- bzw. Referenz-RNA wurden mit 1 µl Oligo-dT<sub>(12-18)</sub> und Rnase-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Um Sekundärstrukturen zu zerstören, wurde der Mix für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend für das Annealing des Primers auf Eis abgekühlt. Folgender Standardansatz (Tab. 3.10) wurde nach dem Protokoll des FairPlay™ Microarray Labeling Kit 1 h bei 48 °C inkubiert.

**Tab. 3.10:** Standard Pipettierprotokoll für den FairPlay™ Microarray Labeling Kit.

| Menge  | Reagenzien            |
|--------|-----------------------|
| 2,0 µl | 10x Reaktionspuffer   |
| 1,0 µl | 20x dNTP Mix          |
| 1,5 µl | 0,1 M DTT             |
| 0,5 µl | RNase Inhibitor       |
| 2,0 µl | Reverse Transkriptase |



**Abb. 3.5:** Schematischer Ablauf einer kompetitiven Hybridisierung. Zwei zu untersuchende mRNA-Proben werden im Verlauf der cDNA-Synthese entweder mit Cy3 (grün) oder Cy5 (rot) markiert. Beide Proben werden dann parallel auf einen Microarray hybridisiert und binden an die Oligo-Sonden. Anschließend werden die Chips mit den für die beiden Farbstoffe entsprechenden Wellenlängen eingescannt und ein Falschfarbenbild generiert. Für die Analyse der Genexpression wird ein Bild aus der Überlagerung der beiden Wellenlängen erstellt. Gelbe Spots bedeuten eine einheitliche Expression des Gens. Detektiert man jedoch ein rotes bzw. grünes Signal, deutet dies auf eine stärkere Expression des Gens in der entsprechend markierten Probe hin.

Zur Degradation der RNA wurde der Ansatz zunächst mit 10 µl 1N NaOH versetzt, dann 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend mit 10 µl 1N HCl neutralisiert. Anschließend wurden 4 µl 3 M Natriumacetat sowie Ethanol (95 %) zugegeben, um nicht gebundene Nukleotide und Pufferkomponenten durch Fällung zu entfernen. Die luftgetrocknete cDNA wurde anschließend in 5 µl Bindepuffer gelöst und ein Aliquot des monoreaktiven Farbstoffesters (Cy3 bzw. Cy5) zugegeben. Diese Kupplungsreaktion wurde für 1 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Der Ansatz wurde über Mini-Säulen aufgereinigt und nach dem Eluieren direkt zur Hybridisierung eingesetzt.

### Hybridisierung der Chips

Für die kompetitive Hybridisierung wurden die behandelten und mit Cy5-markierten Proben mit der Cy3-markierten Referenz-RNA vereinigt und in 300 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen. Dieser Ansatz wurde nun auf den Chip gegeben und 12 h in einer automatischen Hybridisierstation inkubiert, in welcher neben einer gleichmäßigen Verteilung des Hybridisierungscocktails auf dem Chip auch mehrere Waschschriffe stattfanden. Der Vorteil dieser Hybridisierstation lag vor allem in einer besseren Reproduzierbarkeit der Daten, da alle Chips genau die gleiche Behandlung hinsichtlich Pufferwechsel, Temperatur und Inkubationszeiten erfuhren.

### Waschen der Chips

Nach Abschluss der Hybridisierung wurden die Chips je 5 min in Waschpuffer 1 (2x SSC, 0,1 % SDS), Waschpuffer 2 (1x SSC) sowie Waschpuffer 3 (0,2x SSC) geschwenkt, um nicht ausreichend komplementäre und nicht gebundene Targets zu entfernen. Durch den abnehmenden Salzgehalt in den Puffern kam es zu einer höheren Stringenz. Das enthaltene SDS diente zur Destabilisierung von Heterodimeren, damit sich falsch gepaarte Stränge schneller voneinander lösten.

### Scannen der Chips

Die Hybridisierungssignale auf den Objektträgern wurden mit dem konfokalen Scanner Genepix™ 4000b ermittelt. Der Scanner erstellte für jeden der beiden Farbstoffe ein separates 16-bit-Bild im TIFF-Format, indem er mit zwei Helium-Neon-Lasern bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm (Cy5) bzw. 543 nm (Cy3) die Farbstoffe anregte und bei einer Emissionswellenlänge von 670 nm (Cy5) bzw. 570 nm (Cy3) die erzeugten Signale detektierte. Photomultiplerverstärkung und Laserleistung wurden so gewählt, dass das Verhältnis der Signalintensitäten für beide Farbstoffe über den ganzen Chip gemessen 1:1 betrug und der Sättigungswert des Scanners nicht überschritten wurde.

### Datenanalyse

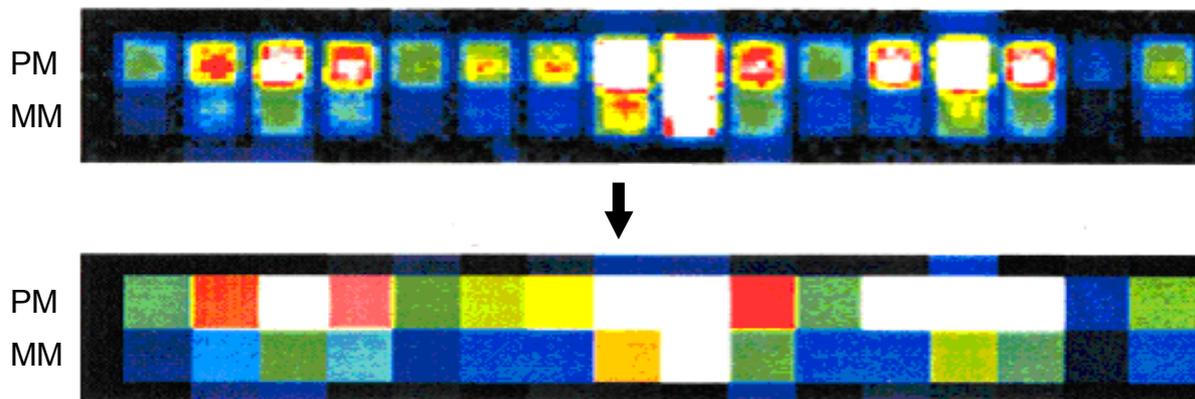
Für die spätere Datenanalyse erstellte die GenePix™-Software ein Falschfarbenbild, in dem die beiden Wellenlängen überlagert wurden, sowie einen Datensatz, der für jeden Spot auf dem Chip seine Position, Signalintensität (Mittelwert und Median), die Standardabweichung der Signalintensität und den lokalen Hintergrund  $\pm$  Standardabweichung enthielt. Da es während Markierung, Hybridisierung und Scannen durch unterschiedliche chemische Eigenschaften der Farbstoffe zu systematischen Veränderungen der Expressionsdaten kam, wurde jeder gemessene Wert mit einem vom Programm errechneten Faktor multipliziert (Normalisierung). Dies ermöglichte zum Einen den Vergleich von Werten auf demselben Chip als auch den Vergleich unterschiedlicher Chips miteinander.

### 3.7.2 High-Density Affymetrix GeneChips®

Die bei diesen Experimenten eingesetzten Affymetrix Rat-230A GeneChips® enthalten auf einer Fläche von 1,28 cm<sup>2</sup> 15973 Gene. Bei den Affymetrix GeneChips® handelt es sich um Oligonukleotid-Microarrays, bei denen die DNA-Sequenzen durch Photolithographie und kombinatorische Chemie direkt auf die Glasoberfläche des Chips synthetisiert werden. Während bei den MWG-Chips jedes Gen mit nur einer 50 bp langen Sequenz auf dem Chip vertreten ist, befinden sich auf den Affymetrix GeneChips für jedes Gen 16 verschiedene, jeweils 25 Nukleotide lange Oligo-Paare (Probenpaar-Set, Abb. 3.6). Für jedes Set gibt es 16 Perfect-Match- (PM) und 16 Mismatch-Sequenzen (MM), wobei sich PM und MM jeweils durch eine Punktmutation an Stelle 13 des Oligos unterscheiden. Man verwendet diese große Anzahl an Sonden, um ineffektive oder falsch hybridisierte Oligonukleotide ausgleichen zu

---

können. Die dazugehörigen MM ermöglichen die Bestimmung des Hintergrundes. Bei der Berechnung der Gesamtintensität eines Probenpaares subtrahiert man den MM- vom PM-Wert. Bei der Auswahl der Oligo-Sonden wird darauf geachtet, dass diese am 3'-Ende der cDNA-Moleküle liegen, damit der Einfluss von partiell degradiertes RNA eingeschränkt wird. Es sind jedoch auch einige Kontrollgene auf dem Chip enthalten, deren Sequenzen am 5'-Ende liegen, um die Qualität der synthetisierten cRNA und die Effizienz der Reversen Transkriptase zu überprüfen.



**Abb. 3.6:** Darstellung des Perfect-Match- (PM) und Mismatch-Systems (MM). Es werden 64 Pixel pro Probenzelle berechnet (oben), aus denen für den PM und den MM je ein Intensitätswert errechnet wird. Aus der Differenz des Probenpaar-Sets bildet sich die Gesamtintensität (unten).

### Herstellung doppelsträngiger cDNA

Die Herstellung doppelsträngiger cDNA erfolgte mit dem SuperScript™ double-Stranded cDNA Synthesis Kit nach Angaben des Herstellers. Als Ausgangsmaterial dienten 20 µg Gesamt-RNA. Die Erststrangsynthese wurde mit einem Oligo-dT<sub>24</sub>-T7-Primer durchgeführt. Im Anschluss an die cDNA-Synthese wurde die doppelsträngige cDNA über eine Qiagen-Mini-Säule aufgereinigt und einer Qualitätskontrolle unterzogen.

### *In vitro*-Transkription

Die Synthese von biotinmarkierter cRNA wurde mit dem Enzo BioArray RNA Transcriptional Labeling Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. In der *In vitro*-Transkription (IVT) wurde die doppelsträngige cDNA unter Einbau von biotinmarkierten Nukleotiden wieder in RNA umgeschrieben (Abb. 3.7). Während bei den vorangegangenen Syntheseschritten die RNA immer im Verhältnis 1:1 umgeschrieben wurde, kam es hier zu einer 30- bis 100-fachen linearen Amplifikation [71, 72]. Nach erneutem Aufreinigen über eine RNeasy-Säule und Qualitätskontrolle der Proben wurden 15 µg cRNA in einem Gesamtvolumen von 40 µl mit Fragmentierungspuffer bei 95 °C für 35 min fragmentiert. Dabei entstanden cRNA-Fragmente mit einer Größe von 35 - 200 Basenpaaren, die eine wesentlich bessere Hybridisierung auf dem Chip ergaben als große Fragmente. Die erfolgreiche Fragmentierung wurde ebenfalls auf einem Lab-on-a-Chip kontrolliert.

### Hybridisierung und Färben der Chips

Fünfzehn µg cRNA wurden mit 162 µl Hybridisierungspuffer und RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 300 µl gebracht (Tab. 3.11). Davon wurden 200 µl 16 h bei 45 °C unter Rotation im Hybridisierofen auf einem Rat-230A-Chip inkubiert. Im Hybridisierungscocktail enthaltene Kontroll-Oligonukleotide hybridisierten am Rand und als kleines Kreuz in der Mitte der Chips. Sie dienten zur Orientierung bei der späteren Auswertung der Chips.

Nach dem Hybridisieren wurden die Chips in einer Waschstation (Fluidics Station 400) nach einem vorgegebenen Programm (EukGE450) mit nichtstringenten (Tab. 3.12) und stringenten (Tab. 3.13) Puffern gewaschen und zur Detektion und Verstärkung des Fluoreszenzsignals mit frisch angesetzten Färbelösungen I - III (Tab. 3.14, 3.15 und 3.16) inkubiert. Zwischen den einzelnen Färbeschritten sowie abschließend wurde der Chip mit nicht-stringentem Puffer gewaschen.

### Scannen der Affymetrix GeneChips®

Die Chips wurden direkt nach der Hybridisierung bei 570 nm (Anregungswellenlänge: 488 nm) mit einer Auflösung von 3 µm eingescannt und gespeichert. Bei dieser Auflösung wurden 64 Pixel pro Probenzelle berechnet. Die durchschnittliche Intensität einer Probenzelle wurde errechnet und diente als Ausgangswert für die spätere Analyse durch die Software.

**Tab. 3.11:** Hybridisierungscocktail für Affymetrix GeneChips®.

| Menge  | Reagenzien                        |
|--------|-----------------------------------|
| 20 µl  | fragmentierte cRNA (15 µg)        |
| 5 µl   | Kontroll-Oligonucleotid B2 (5 nM) |
| 3 µl   | Heringssperma DNA [10 mg/ml]      |
| 15 µl  | 100x Kontroll-cRNA-Cocktail       |
| 3 µl   | acetyliertes BSA [50 mg/ml]       |
| 150 µl | MES-Hybridisierungspuffer         |
| 104 µl | DEPC-H <sub>2</sub> O             |

**Tab. 3.12:** Nichtstringenter Waschpuffer (Wash A) für GeneChips®-Hybridisierungen.

| Menge  | Reagenzien  |
|--|---|
| 300 ml   | 20x SSPE (3 M NaCl, 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,02 M EDTA) |
| 1 ml   | Tween 20 (10 %)   |
| Mit DEPC-H <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen, sterilfiltrieren. |   |

**Tab. 3.13:** Stringenter Waschpuffer (Wash B) GeneChips®-Hybridisierungen.

| Menge  | Reagenzien  |
|--|---|
| 83,3 ml  | 20x SSPE (3 M NaCl, 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,02 M EDTA) |
| 5,2 ml   | 5 M NaCl  |
| 1,0 ml   | Tween 20 (10 %)   |
| Mit DEPC-H <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen, sterilfiltrieren. |   |

**Tab. 3.14:** MES-Puffer für GeneChips®-Färbeschritte.

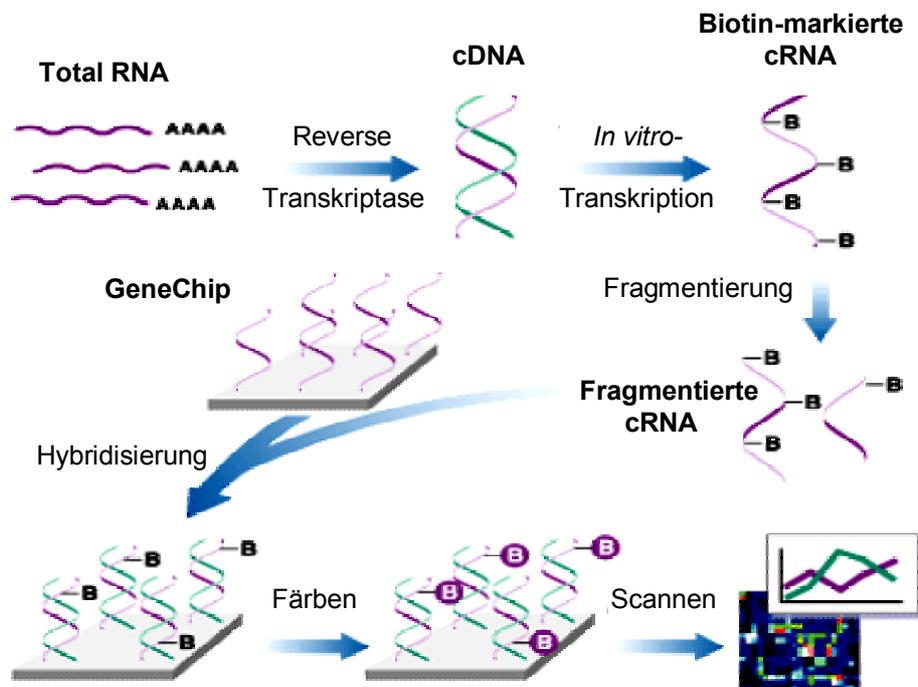
| Menge   | Reagenzien      |
|---|-----------------|
| 41,7 ml   | 12x MES         |
| 92,5 ml   | 5 M NaCl        |
| 2,5 ml  | Tween 20 (10 %) |
| Mit DEPC-H <sub>2</sub> O auf 250 ml auffüllen, sterilfiltrieren. |                 |

**Tab. 3.15:** Färbelösungen I + III für GeneChips®-Färbeschritte.

| Menge  | Reagenzien                            |
|--------|---------------------------------------|
| 540 µl | DEPC-H <sub>2</sub> O                 |
| 600 µl | 2x MES-Färbepuffer                    |
| 48 µl  | acetyliertes BSA                      |
| 12 µl  | Phycoerythrin Streptavidin Dye (SAPE) |

**Tab. 3.16:** Färbelösung II für GeneChips®-Färbeschritte.

| Menge    | Reagenzien                   |
|----------|------------------------------|
| 266,4 µl | DEPC-H <sub>2</sub> O        |
| 300,0 µl | 2x MES-Färbepuffer           |
| 24,0 µl  | acetyliertes BSA             |
| 6,0 µl   | Ziegen-IgG                   |
| 3,6 µl   | Anti-Streptavidin-Antikörper |



**Abb. 3.7:** Schematische Darstellung eines Affymetrix Microarray-Experiments (verändert nach: [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)). Um die Sonden für die Hybridisierungen zu erstellen, wird mRNA zunächst in doppelstängige cDNA umgeschrieben, um daraufhin wieder in cRNA transkribiert zu werden. Dabei kommt es neben einer 30- bis 100-fachen Amplifikation auch zu einem Einbau von Biotin. Nach erfolgter Fragmentierung werden die Sonden auf die GeneChips® hybridisiert. Nach anschließenden Färbe- und Waschschriffen können die Chips eingescannt und analysiert werden.

### Datenanalyse

Die Auswertung der Affymetrix GeneChips®-Daten erfolgte mit der Expressionist-Software. Hierzu wurde zunächst aus allen Chips eines Experimentes ein Referenz-Chip generiert, der die durchschnittlichen Expressionswerte für jeden Spot in allen verwendeten Chips beinhaltet. Ausgehend von diesem Durchschnittswert konnten besonders auffällige Bereiche auf den Chips erkannt und somit defekte Bereiche von der Analyse ausgeschlossen werden.

Anschließend wurden die Daten normalisiert und anhand auf dem Chip enthaltener Kontrollgene eine Qualitätskontrolle der einzelnen Hybridisierungen erstellt. Für die eigentliche Analyse wurden die biologischen Replikate zu Gruppen zusammengefasst und die Expressionswerte mit denen der jeweiligen Kontrollen verglichen, um regulierte Gene identifizieren zu können.

### 3.8 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Das Verfahren der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-PAGE) [65, 66] ermöglicht es, Proteine aufgrund zweier verschiedener Kriterien aufzutrennen. In der ersten Dimension wird der isoelektrische Punkt und anschließend in der zweiten Dimension das Molekulargewicht als Trennungskriterium verwendet.

#### Probenvorbereitung:

Die Zellen wurden in einem Puffersystem (Tab. 3.17 und 3.18), das die erforderlichen Bedingungen für die isoelektrische Fokussierung erfüllte, lysiert. In diesem Prozess kam es durch die Puffer zu einer Solubilisierung, Denaturierung und Reduktion der Proteine; störende Proteininteraktionen wurden dadurch ebenfalls aufgehoben.

- Zellpellets mit 125 µl Lysepuffer I, 2,5 ml Benzonase und 5 µl Inhibitorcocktail resuspendieren.
- 875 µl Lysepuffer II zugeben und 30x durch Auf- und Abpipettieren mischen.
- Proben 1 h bei RT<sub>M</sub> und 500 rpm auf dem Thermomixer inkubieren.
- 30 min bei 10 °C und 35000 rpm zentrifugieren.

#### Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt wurde photometrisch nach der Bradford-Methode bestimmt [73]. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 ändert bei Proteinbindung (Anlagerung von Cu<sup>2+</sup> an Peptidbindungen) sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm. Aus einer zuvor erstellten Eichgerade aus BSA-Lösungen wurde die Proteinkonzentration der Zelllysate ermittelt.

**Tab. 3.17:** Lysepuffer I zur Proteinisolation aus Säugerzellen.

| Menge                                 | Reagenzien       |
|---------------------------------------|------------------|
| 100 µl                                | 1 M Tris, pH 7,5 |
| 20 µl                                 | 500 mM EDTA      |
| 685 mg                                | Saccharose       |
| Mit Aqua bidest. auf 10 ml auffüllen. |                  |

**Tab. 3.18:** Lysepuffer II zur Proteinisolation aus Säugerzellen.

| Menge                                 | Reagenzien    |
|---------------------------------------|---------------|
| 6,3 g                                 | Harnstoff     |
| 2,3 g                                 | Thioharnstoff |
| 0,48 g                                | CHAPS         |
| 600 µl                                | 1 M DTT       |
| 300 µl                                | 1 M Spermin   |
| Mit Aqua bidest. auf 12 ml auffüllen. |               |

### Isoelektrische Fokussierung

Bei der isoelektrischen Fokussierung wandern die Proteine in einem angelegten Feld innerhalb einer Gelmatrix bis zu dem pH-Wert, an dem die Summen der positiv und negativ geladenen Aminosäurereste des Proteins gleich sind (isoelektrischer Punkt). Die eingesetzten Gelstreifen besitzen einen immobilisierten pH-Gradienten (IPG) [74, 75], der durch die Copolymerisierung definierter Chemikalien (Immobiline) an einer Acryl-Matrix erreicht wird.

Für die durchgeführten Versuche wurden 300 µg Protein in 100 ml Gesamtvolumen mit 400 µl Rehydrierungspuffer (Tab. 3.19) versetzt und luftblasenfrei im „Gelsarg“ verteilt. Ein Vorteil des gemeinsamen Auftragens von Proben und Rehydrierungspuffer war die bessere Auflösung der Proteine und die Möglichkeit, größere Proteinmengen aufzutrennen. Nach dem Einlegen der IPG-Gelstreifen mit dem immobilisierten pH-Gradienten (pH 4 - 7) und dem Entfernen möglicher Luftblasen zwischen IPG-Gelstreifen und Proteinlösung wurde der Aufbau mit 1 ml Siliconöl überschichtet und die 1. Dimension nach in Tab. 3.20 aufgezeigtem Protokoll durchgeführt.

### Äquilibrierung der Gelstreifen

Direkt im Anschluss an die 1. Dimension wurden die Gelstreifen äquilibriert und jeweils 15 min in 10 ml Äquilibrierungspuffer I (Tab. 3.21 und 3.22) und II (Tab. 3.21 und 3.23) inkubiert. Beide Puffer enthalten SDS, das sich an hydrophobe Regionen der Peptidketten anlagert und die Eigenladung der Proteine so überdeckt, dass dadurch alle Proteine eine konstante Nettoladung (1,4 g SDS pro g Protein) erhalten. Das im Äquilibrierungspuffer I enthaltene DTT spaltet störende Disulfidbrücken. Dadurch entstehen SH-Gruppen, die durch Iodacetamid im Äquilibrierungspuffer II alkyliert werden. Dies verhindert eine Rückbildung und ermöglicht insgesamt eine verbesserte Auftrennung der Proteine in der 2. Dimension.

**Tab. 3.19:** Puffer zur Rehydrierung von IPG-Gelstreifen.

| Menge                                 | Reagenzien    |
|---------------------------------------|---------------|
| 6,3 g                                 | Harnstoff     |
| 2,3 g                                 | Thioharnstoff |
| 0,6 g                                 | CHAPS         |
| 600 µl                                | 1 M DTT       |
| Mit Aqua bidest. auf 12 ml auffüllen. |               |
| Vor Gebrauch 90 µl Servalyte zugeben. |               |

**Tab. 3.20:** Angelegtes Spannungsprogramm für die 1. Dimension der 2D-PAGE.

| Schritt      | Einstellung | Dauer  | Spannung        | Temperatur |
|--------------|-------------|--------|-----------------|------------|
| Rehydrierung | konstant    | 12 h   | 30 V            | 22 - 25 °C |
| S2           | konstant    | 1 h    | 200 V           | 22 - 25 °C |
| S3           | konstant    | 1 h    | 500 V           | 22 - 25 °C |
| S4           | konstant    | 1 h    | 1000 V          | 22 - 25 °C |
| S5           | Gradient    | 30 min | 1000 V - 8000 V | 22 - 25 °C |
| S6           | konstant    | 5 h    | 8000 V          | 22 - 25 °C |

**Tab. 3.21:** Basislösung für Äquilibrationpuffer.

| Menge    | Reagenzien      |
|----------|-----------------|
| 31,25 ml | SDS (20 %)      |
| 125 ml   | Glycerol (60 %) |
| 90 g     | Harnstoff       |

**Tab. 3.22:** Äquilibrationpuffer I für IPG-Gelstreifen.

| Menge  | Reagenzien          |
|--------|---------------------|
| 1 g    | DTT                 |
| 125 ml | Äquilibrationlösung |

**Tab. 3.23:** Äquilibrationpuffer II für IPG-Gelstreifen.

| Menge  | Reagenzien          |
|--------|---------------------|
| 5 g    | Iodacetamid         |
| 125 ml | Äquilibrationlösung |

Um die Proteine aufgrund ihrer Molekulargewichte aufzutrennen, wurde eine SDS-Gelelektrophorese (diskontinuierliches Gel) mit den vorher fokussierten Proteinen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Tab. 3.24). Die Anwesenheit von SDS – einem starken Detergenz, dessen Anionen sich an die Hauptketten der Polypeptide binden – führt zur Ausbildung von SDS-Protein-Komplexen, deren negative Ladungen dem Molekulargewicht des Proteins in etwa proportional sind. So konnten die Proteine unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung und Konformation ihrer Größe nach im Spannungsfeld von der Kathode zur Anode hin aufgetrennt werden. Die Gele wurden mit Hilfe einer Gießapparatur nach Angaben des Herstellers hergestellt. Die IPG-Streifen wurden mit einer Pinzette vorsichtig auf die Oberfläche der auspolymerisierten SDS-Gele gelegt und mit einer angewärmten Agaroselösung (Tab. 3.25) luftblasenfrei auf dem Gel fixiert.

**Tab. 3.24:** Acrylamidlösung zum Gießen der 2D-Page (für 14 Gele).

| Menge  | Reagenzien               |
|--------|--------------------------|
| 250 ml | 1.5 M Trispuffer, pH 8,8 |
| 333 ml | AA-Lösung (30 %)         |
| 407 ml | H <sub>2</sub> O         |
| 10 ml  | SDS-Lösung (10 %)        |
| 6 ml   | APS                      |
| 500 µl | TEMED                    |

**Tab. 3.25:** Agaroselösung zum Fixieren der IPG-Gelstreifen.

| Menge                                  | Reagenzien               |
|--|--------------------------|
| 1,0 g                                  | Agarose (low melt)       |
| 12,5 ml                                | 1.5 M Trispuffer, pH 8,8 |
| 2,0 ml                                 | SDS (20 %)               |
| Mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen. |                          |

**Tab. 3.26:** Anodenpuffer für die 2. Dimension der 2D-PAGE.

| Menge                                 | Reagenzien |
|---------------------------------------|------------|
| 15,0 g                                | Tris       |
| 62,5 g                                | Taurin     |
| 12,0 ml                               | SDS (20 %) |
| Mit Aqua bidest. auf 2,5 L auffüllen. |            |

**Tab. 3.27:** Kathodenpuffer für die 2. Dimension der 2D-PAGE.

| Menge                                 | Reagenzien                  |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| 750 ml                                | 10x SDS-Tris-Glycin, pH 8,8 |
| Mit Aqua bidest. auf 7,5 L auffüllen. |                             |

Die verwendeten Anoden- und Kathodenpuffer (Tab. 3.26 und 3.27) wurde immer frisch angesetzt und die Proteine nach folgendem Programm (Tab. 3.28) aufgetrennt.

**Tab. 3.28:** Angelegtes Spannungsprogramm für die 2. Dimension der 2D-PAGE.

| Schritt | Einstellung   | Dauer  | Temperatur |
|---------|---------------|--------|------------|
| T1      | 5 Watt / Gel  | 30 min | 22 - 25 °C |
| T2      | 15 Watt / Gel | 4,5 h  | 22 - 25 °C |

### Fluoreszenzfärbung mit Ruthenium

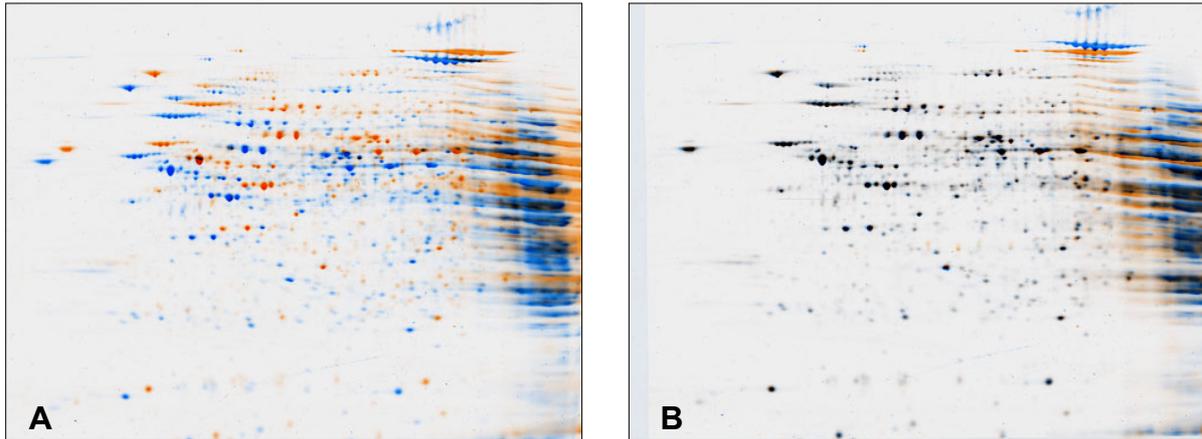
Nach der Beendigung der Auftrennung in der 2. Dimension erfolgte das Fixieren der Proteinspots in einer Essigsäure/Ethanol-Lösung und anschließendes Färben der Proteine mit Ruthenium [76] (Tab. 3.29). Der Rutheniumfarbstoff bindet nicht-kovalent elektrostatisch über hydrophobe Bindungen an Proteine und konnte mit einem Fluoreszenzscanner bei 610 nm detektiert werden. Dieser Farbstoff war zwar weniger sensitiv als die gebräuchlichen Silbernitratfärbungen, störte aber dafür nicht bei der nachfolgenden MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight - Massenspektrometrie). Zum Fixieren und Färben der Gele wurde folgendes Protokoll verwendet.

**Tab. 3.29:** Färbeprotokoll für Ruthenium-Färbungen von 2D-Gelen.

| Schritt | Lösung   | Dauer     |
|---------|--|-----------|
| 1       | Fixierlösung: Ethanol (30 %) + Eisessig (10 %) | 1 h       |
| 2       | Ethanol (20 %)                                 | 30 min    |
| 3       | bidest. H <sub>2</sub> O                       | 2x 15 min |
| 4       | Ethanol (20 %)                                 | 30 min    |
| 5       | Ethanol (20 %) + Ruthenium                     | 12 min    |
| 6       | bidest. H <sub>2</sub> O                       | 3x 10 min |

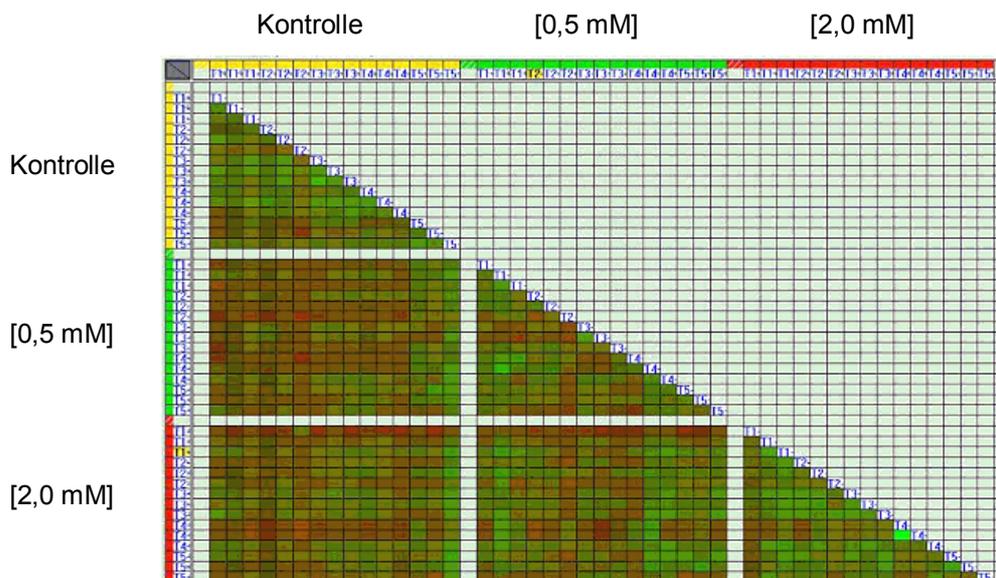
### Datenanalyse

Die Auswertung der Gele erfolgte mit der ProteomWeaver<sup>®</sup>-Software. Hierbei wurden die Gele theoretisch übereinander angeordnet und so die Spots in den einzelnen Gelen direkt miteinander verglichen (Abb. 3.8). Expressionsunterschiede der Proteine wurden anhand unterschiedlicher Spotintensitäten berechnet.



**Abb. 3.8:** Fehlfarbenabbildung zweier 2D-Gel-Replikate (Gel 1 = blau, Gel 2 = orange) vor (A) und nach (B) berechneter Überlagerung. Vor der Überlagerung der Gele sind deutlich zwei verschiedene Proben zu erkennen. Diese Unterschiede ergeben sich technisch bedingt bei der Herstellung der Gele durch unterschiedliches Laufverhalten der Proben in der Gelelektrophorese und beim Einscannen der Gele. Nach der berechneten Überlagerung erscheinen identische Spots schwarz. Sich nicht überlagernde Bereiche erscheinen weiterhin blau oder orange.

Um eine Aussage darüber zu bekommen, wie gut sich die einzelnen Replikate einer Probe oder auch alle Gele eines Experimentes überlagern lassen, wurde eine Match-Matrix erstellt. Hierbei wurde jedes Gel mit allen anderen Gelen des gleichen Experimentes verglichen und anhand einer Farbskala die Qualität der Gele zueinander dargestellt (Abb. 3.9). Ein grünes Raster bedeutete eine hohe Übereinstimmung der Gele, während rot auf schlechte Korrelation hinwies. Technische und biologische Replikate sollten untereinander eine höhere Übereinstimmung aufweisen als behandelte im Vergleich mit unbehandelte Proben.



**Abb. 3.9:** Aus drei Probengruppen (Kontrolle, [0,5 mM] und [2 mM] Acetaminophen) berechnete Match-Matrix. Jedes Gel wird dabei mit allen anderen Gelen des gleichen Experimentes verglichen. Je besser die Korrelation der Proben, desto mehr grüne Bereiche sind in der Match-Matrix vorhanden. Proben aus der gleichen Behandlungsgruppe zeigen eine entsprechend bessere Übereinstimmung als der Vergleich mit anderen Gruppen.

### **Probenpräparation für MALDI-TOF-MS**

Zur Identifizierung der regulierten Spots wurde eine MALDI-TOF-MS durchgeführt. Bei dieser Methode wurden die aus den Gelen ausgeschnittenen Proteine mittels Trypsin fragmentiert [77]. Da Trypsin spezifisch hinter den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet, konnten die entstehenden Fragmente nach einer massenspektrometrischen Analyse über „Fingerprints“ und bekannte Fragmentmuster aus einer Datenbank für Proteine aus theoretischen Verdauen in einer Datenbank identifiziert werden. Zur Vorbereitung des Trypsinverdauens wurden die Gelstücke mehrmals mit 100 µl Ammoniumbicarbonat-Lösung, danach mit einer 1:1-Mischung Ammoniumbicarbonat-Lösung und Acetonitril und abschließend in reinem Acetonitril gewaschen. Die Gelstücke wurden nun in einer Speed-Vac vollständig eingetrocknet und in einer 25 mM ammoniumbicarbonat-gepufferten Trypsinlösung (10 µg/ml) bei 37 °C unter leichtem Schütteln 12 h inkubiert. Um eine bessere Qualität der Fragmente zu erhalten, wurden die Verdauungen über ZipTips (in Pipettenspitzen integrierte Säulen zur Anreicherung der Proteine) aufgereinigt, auf einen Probenträger für die MALDI-TOF-MS aufgebracht und mit 1 µl Zimtsäure, die als Matrix diente, versetzt. Nach dem Kristallisieren wurde die eigentliche Messung und Identifizierung auf einem Massenspektrometer des Typs Voyager DE (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

### **3.9 SELDI ProteinChip®-Technologie**

Das von der Firma Ciphergen patentierte und erstmals im Jahr 1993 beschriebene ProteinChip®-System beruht auf der SELDI-TOF (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation- Time Of Flight)-Massenspektrometrie und eignet sich für eine Reihe von verschiedenen Anwendungen wie Reinigung und Identifizierung von Proteinen, die Untersuchung von Proteininteraktionen sowie kovalenter Modifikationen, aber auch, wie im vorliegenden Fall, für vergleichende Proteomanalysen zweier verschiedener Proteinproben. Bei idealen Gegebenheiten kann es sogar zur Entdeckung und Validierung neuer Biomarker führen. Durch diese Vielzahl an Anwendungsmöglichkeiten ist das ProteinChip®-System in der klinischen Forschung, der Proteinreinigung und auf nahezu allen Gebieten der Proteinanalytik einsetzbar [78].

Das komplette System ist aus drei Komponenten aufgebaut: den Arrays, dem Array-Reader und der Software zur Analyse der Daten. Das Prinzip der Arrays beruht darauf, dass bestimmte Proteine aus biologischen Proben auf den Arrays binden und sich so anreichern, während unspezifische, nicht-bindende Proteine durch optimierte Waschschriffe entfernt werden (Abb. 3.10). Der Chip selbst besteht aus einem schmalen Aluminiumstreifen, auf dem sich acht Spots mit chemisch modifizierten Oberflächen befinden. Für den Vergleich von Proteinprofilen können unterschiedliche chromatographische Arrays mit entweder hydrophoben, hydrophilen, kationen- bzw. anionenaustauschenden oder metallionenbindenden Oberflächen eingesetzt werden. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurde ausschließlich der kationenaustauschende CM10-Chip verwendet. Auf der anionischen Oberfläche der Chips, die durch Derivatisierung von Carboxylatgruppen erreicht wird, können Proben mit positiver Ladung (Lysin-, Arginin- oder Histidinreste) binden. Ein niedriger Salzgehalt und pH-Wert sind optimale Bindebedingungen für diesen Chip, während durch eine Erhöhung dieser beiden Parameter die Bindeeigenschaften für entsprechende Proteine erniedrigt werden.

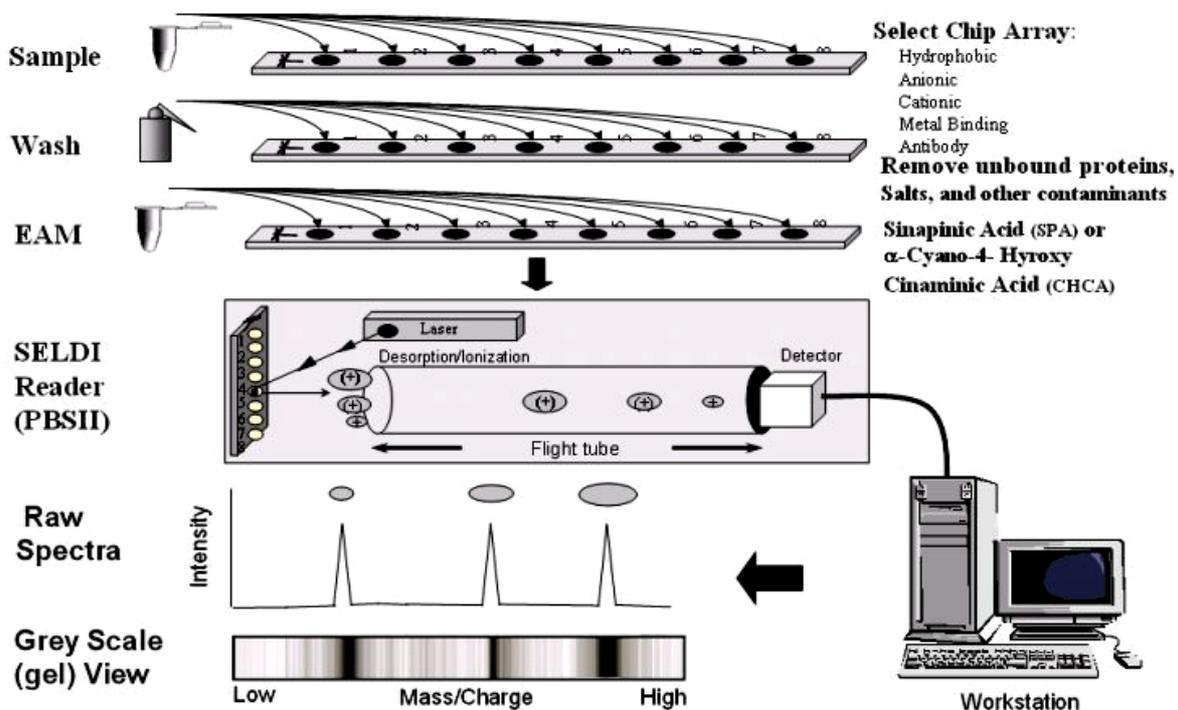
Ein Vorteil dieses Systems ist, dass eine Vielzahl von biologischen Proben (Blut, Urin, Serum, Zellaufschlüsse) ohne eine zeit- oder kostenaufwendige Vorbehandlung analysiert werden können. Nach der Bestimmung des Proteingehaltes werden alle Proben mit Bindepuffer auf eine einheitliche Konzentration gebracht und dann direkt auf den Chip aufgetragen.

Durch Zugabe einer energieabsorbierenden Matrix (Sinapinsäure) werden die Proteine beim Auskristallisieren der Matrix mit in das entstehende Kristallgitter eingebaut. Im ProteinChip<sup>®</sup>-Reader, einem Flugzeitmassenspektrometer werden die Proben durch Beschuss mit einem Stickstofflaser (337 nm) ionisiert, in einem elektrischen Feld beschleunigt und die Masse der Fragmente anhand der Flugzeit sowie der Ladung bestimmt (Abb. 3.10). Die Auswertung der erhaltenen Massenspektren erfolgt mit der ProteinChip<sup>®</sup>-Software.

### Durchführung:

Bei allen SELDI-TOF-MS-Versuchen war darauf zu achten, dass ausnahmslos mit latexfreien Handschuhen gearbeitet wurde, da Latex ein Signal im Massenspektrum verursachen hätte können. Als Proben konnten die gleichen Zelllysate wie für 2D-Gele benutzt werden.

- Die Zelllysate-Proben mit Bindepuffer (Tab. 3.30) auf eine Proteinkonzentration von 600 µg/ml einstellen.
- 50 µl Präaktivierungspuffer (Tab. 3.31) pro Spot auftragen und 10 min bei RT<sub>M</sub> inkubieren.
- Den Präaktivierungspuffer abpipettieren.
- 150 µl Probe auftragen, 1 h bei RT<sub>M</sub> und 270 rpm inkubieren.
- Chips 3x mit je 300 µl Bindepuffer für 7 min bei 270 rpm waschen.
- 1x mit 300 µl H<sub>2</sub>O waschen.
- Chips 15 - 20 min trocknen lassen.
- 2x 0,7 µl Matrix auftragen.
- Spots gut trocknen lassen und anschließend vermessen.



**Abb. 3.10:** Experimentelles Prinzip des SELDI-TOF-MS-Systems. Die Abbildung zeigt die einfache Handhabung der SELDI ProteinChip<sup>®</sup>-Technologie. Auf den spezifischen affinen Oberflächen des Chips können entsprechende Proteinproben binden. Ungebundene Proteine werden durch Waschschritte entfernt. Nach dem Auskristallisieren einer energieabsorbierenden Matrix (EAM) können die Proben im TOF-Analysator detektiert werden (Quelle: [www.evms.edu/vpc/seldi/seldiprocess/fig2.jpg](http://www.evms.edu/vpc/seldi/seldiprocess/fig2.jpg)).

**Tab. 3.30:** Bindepuffer für SELDI-TOF-MS.

| Menge  | Reagenzien    |
|--|---------------|
| 13,6 g   | Natriumacetat |
| 5,0 ml   | Triton X-100  |
| Mit Aqua bidest. auf 1 L auffüllen, pH 4,5 einstellen. |               |

**Tab. 3.31:** Präaktivierungspuffer für SELDI-TOF-MS.

| Menge                               | Reagenzien |
|-------------------------------------|------------|
| 10 ml                               | 1 M HCl    |
| mit Aqua bidest. auf 1 L auffüllen. |            |

Für die energieabsorbierende Matrix wurden 5 mg Sinapinsäure in einem Gemisch aus 200 µl Acetonitril und 200 µl Trifluoressigsäure gelöst. Die Matrix musste jeden Tag frisch angesetzt werden, da die Qualität der anschließenden massenspektrometrischen Bestimmungen sehr davon abhängt.

### 3.10 Western-Blot

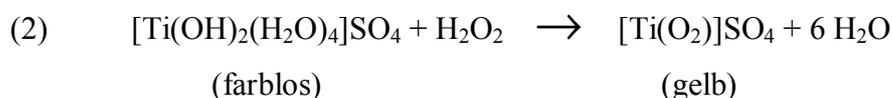
Western-Blots beruhen auf dem gleichen Prinzip wie die Auftrennung der Proteine in der 2. Dimension der 2D-PAGE. Es wurden 25 µg Zellysate mit Laemmli-Puffer versetzt, kurz aufgeköcht und in die Geltaschen der Fertiggele eingefüllt. Als Größenstandard wurde eine Tasche mit 10 µg Proteinmarker beladen. Die Elektrophorese wurde bei 20 mA und 110 V durchgeführt, bis die Farbstoffbande aus dem Gel gelaufen war.

Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden während des Blottings für 1 h bei 100 mV auf eine Nitrozellulosemembran (0,25 µm) transferiert und anschließend 1 h in Milchpulver (5 %) geblockt. Der Blot wurde nun für 1 h mit einem verdünnten (1:10000) Katalase-Antikörper inkubiert. Anschließend wurde eine immunbiologische Detektion mittels des ECL-Systems nach Angaben des Herstellers durchgeführt und Filme für 0,5 - 5 min exponiert.

### 3.11 Biochemische Aktivitätstests

#### 3.11.1 Bestimmung von Katalase-Aktivitäten

Die Methode zur Bestimmung der Katalaseaktivität beruht auf einem Redoxsystem. Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oxidiert Titandihydroxysulfat zu einem Titanoxid-Komplex, der bei 405 nm ein Absorptionsmaximum hat [79, 80]. Je höher die Katalaseaktivität, desto weniger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist vorhanden und desto farbloser bleibt die Reaktion.



**Durchführung:**

10 µl Protein [10 µg/µl] wurden in acht Replikaten in 96-Well-Platten vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe von 200 µl des Reaktionspuffers (Tab. 3.32) gestartet. Nach 3 min wurden der Mischung 100 µl entnommen, in welchen die Reaktion durch Versetzen mit 100 µl Titanoxysulfat-Schwefelsäure-Lösung gestoppt wurde. Der entstandene Farbkomplex wurde bei 405 nm gemessen und anhand folgender Gleichung die Katalaseaktivität bestimmt:

$$A = \log [(Ext_{Blank}/Ext_{Probe}) / (Reaktionszeit [min] * Proteinkonzentration [\mu g/\mu l])]$$

A: Katalaseaktivität [mmol/min/mg Protein]

Ext: Extinktionskoeffizient

**Tab. 3.32:** Reaktionspuffer für Katalasemessungen.

| Menge   | Reagenzien                         |
|---------|------------------------------------|
| 53,5 ml | 20 mM Imidazol, pH 7,0             |
| 3,0 ml  | BSA (0,1 %)                        |
| 3,0 ml  | 3 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |

### 3.11.2 Bestimmung von Cytochrom-P450-Monooxygenase-Aktivitäten

Der oxidative Metabolismus von Endo- und Xenobiotika wird durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen katalysiert. Die Isoenzyme dieser Supergenfamilie unterscheiden sich hinsichtlich Lokalisation, immunologischen bzw. spektralen Eigenschaften sowie Metabolismus von Fremdstoffen. Die direkte fluorimetrische Messung der Umsetzung von Resorufin-Ethern durch die verschiedenen Cytochrom-P450-Familien dient als Maß für die Cytochrom-P450-Monooxygenase-Aktivität. Der Zusatz des Phase-II-Inhibitors Salicylamid verhindert, dass das Resorufin zu einem nicht-fluoreszierenden Sulfat konjugiert wird und dadurch ein geringerer Umsatz gemessen wird [81, 82].

**Tab. 3.33:** Eingesetzte Resorufinether zur Bestimmung der AROD-Aktivitäten.

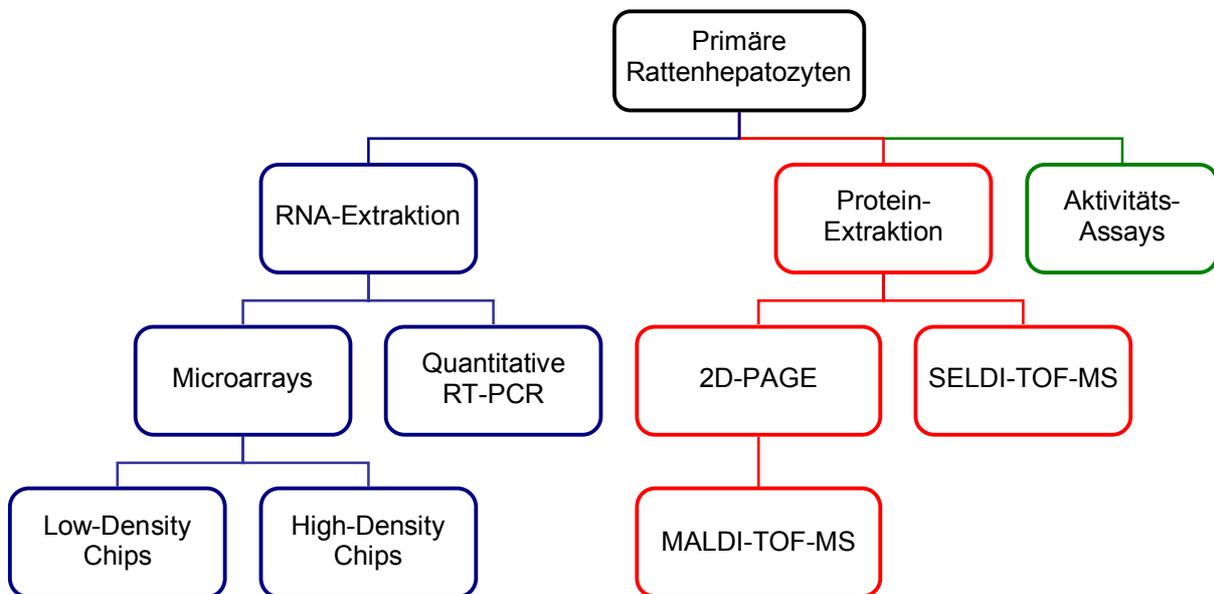
| Substrate                       | Konzentrationen               | Target-Enzyme |
|---------------------------------|-------------------------------|---------------|
| Methoxyresorufin                | 1 mM in DMSO (Endkonz. 5 µm)  | CYP 2B        |
| Ethoxyresorufin                 | 1 mM in DMSO (Endkonz. 5 µm)  | CYP 1A        |
| Benzyloxyresorufin              | 2 mM in DMSO (Endkonz. 10 µm) | CYP 1A, 2B    |
| Phase-II-Inhibitor: Salicylamid | 0,3 M in Aceton               |               |

**Durchführung:**

Es wurde eine Modifikation der ursprünglich für Mikrosomen entwickelten Methode [83] verwendet und dem 96-Well-Plattenformat angepasst. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch in PBS verdünnt (1:100). Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und 50 µl der 300 mM Salicylamid-Lösung zugegeben. Die Platte wurde für 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Danach wurden 50 µl der Substrat-Lösung (Tab. 3.33) zu den Hepatozyten pipettiert und sofort die Fluoreszenz (Anregung bei 544 nm, Emission bei 585 nm) in Abständen von 1 min über eine Dauer von 20 min erfasst. Die Enzymaktivität wurde mit Hilfe einer anschließend erfolgten Bradford-Messung auf die Proteinmenge normalisiert.

## 4. Ergebnisse

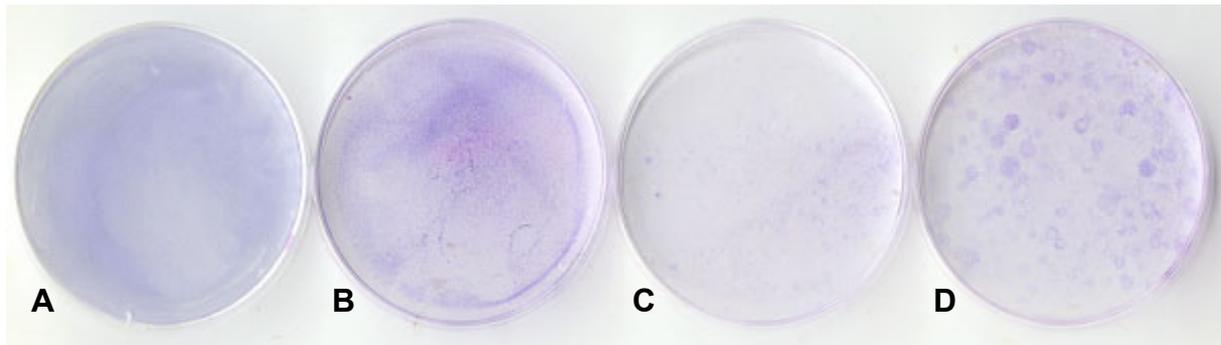
Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in drei Teile gegliedert. Der erste Teil bezieht sich hauptsächlich auf Genexpressionsanalysen primärer Rattenhepatozyten auf Collagen-Monolayerkultur mittels TaqMan<sup>®</sup>-RT-PCR sowie zwei unterschiedlichen Microarray-Ansätzen. Im zweiten Teil wird das gleiche Zellkultursystem auf Proteomics-Basis mit 2D-Gelen und SELDI ProteinChips<sup>®</sup> (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation) untersucht und, soweit möglich, ein direkter Vergleich von Gen- und Proteinexpressionsveränderungen angestellt (Abb. 4.1). Durch die Anwendung dieses breiten Spektrums an Methoden sollten die Zellen möglichst genau charakterisiert werden. Der dritte Teil der Ergebnisse beinhaltet mit Acetaminophen behandelte primäre Rattenhepatozyten und den daraus ermittelten Expressionsanalysen aus Genomics- und Proteomics-Ansätzen.



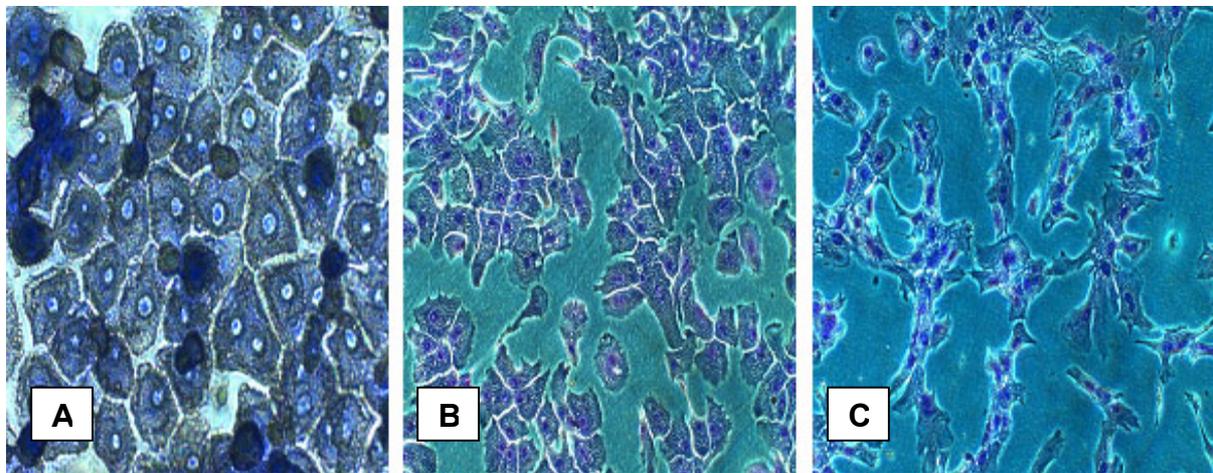
**Abb. 4.1:** Schema der mit primären Rattenhepatozyten durchgeführten Gen- (blau), Proteinexpressionsanalysen (rot) und Aktivitätsmessungen (grün). Alle Proben wurden nach der Zellernte in zwei Aliquots aufgeteilt und damit jeweils eine RNA- oder Protein-Extraktion durchgeführt. Auf der RNA-Ebene wurde die Genexpression dann mittels Microarrays und quantitativer RT-PCR analysiert. Die Proteinexpression wurde durch 2D-PAGE und anschließender MALDI-TOF-MS sowie SELDI-TOF-MS detektiert. Für einige ausgewählte Proteine wurden zusätzlich Aktivitätsmessungen durchgeführt.

### 4.1 Primäre Rattenhepatozyten auf Collagen-Monolayerkultur

Nach dem Fixieren der Zellen auf den Petrischalen und einer anschließenden Färbung mit Gimsa-Lösung war im Zeitverlauf von 0 über 72 h und 7 d bis hin zu 14 d in Kultur ein deutliches Absterben der primären Hepatozyten zu erkennen (Abb. 4.2). Die zu Beginn mit Zellen sehr dicht bewachsenen Kulturschalen wurden im Verlauf der Kultur immer lichter. Nach einer Woche waren fast alle Zellen abgestorben und kaum noch lebende Zellen auf den Platten zu sehen. Im weiteren Verlauf der Kultur wuchsen durch Kontamination mit anderen Zelltypen (vorwiegend Fibroblasten und Epithelzellen) immer mehr Kolonien mit fremden Zellen in den Platten heran. Nach zwei Wochen waren alle primären Hepatozyten abgestorben und ausschließlich andere Zellarten auf den Platten zu sehen.



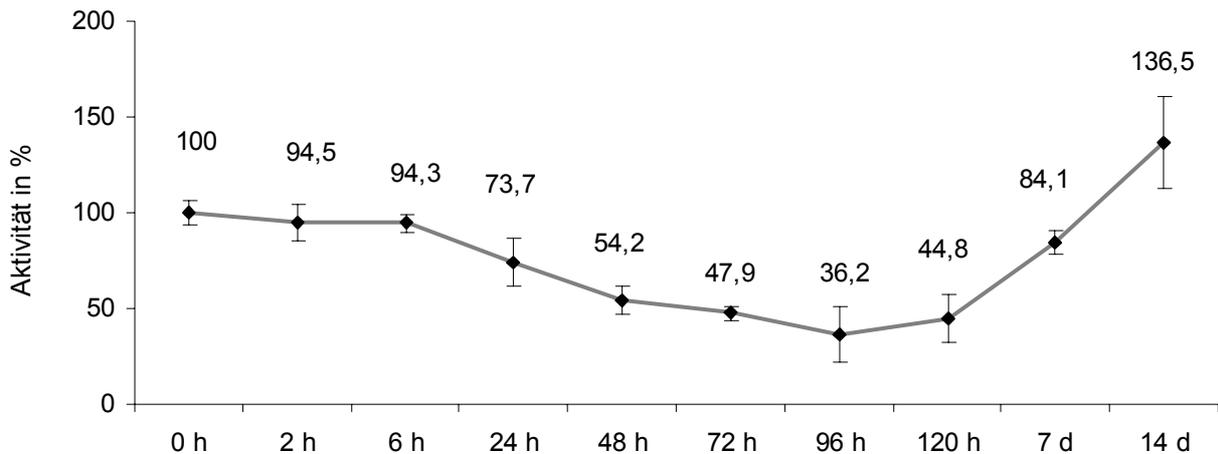
**Abb. 4.2:** Makroskopisches Bild der mit Gimsa-Lösung angefärbten primären Rattenhepatozyten. Acht Millionen Zellen wurden nach der Überprüfung der Zellvitalität auf Collagen-beschichtete Petrischalen ausplattiert. Nach den jeweiligen Zeitpunkten in Kultur (A: 0 h, B: 72 h, C: 7 d, D: 14 d) wurden die Zellen mit Methanol fixiert und anschließend mit Gimsa-Lösung angefärbt.



**Abb. 4.3:** Mikroskopisches Bild der mit Gimsa-Lösung angefärbten primären Rattenhepatozyten. Die Zellen wurden wie unter Abb. 4.2 beschrieben fixiert und angefärbt (A: 0 h, B: 48 h, C: 96 h). Vergrößerung: A: 400-fach; B und C: 200-fach.

Unter dem Mikroskop (Abb. 4.3) zeigte sich ein vergleichbares Bild. Zu Beginn der Kultur waren die Petrischalen sehr dicht bewachsen und bei einigen Zellen waren die für Hepatozyten typischen zwei Zellkerne sichtbar. Nach 48 bzw. 96 h in Kultur wurden die Platten durch Absterben der Zellen immer lichter und auch die für Hepatozyten charakteristische Morphologie änderte sich, was sich in einem typischen „Abflachen“ der sonst eher kubischen Zellen und dem Ausbilden von Zell-Zell-Kontakten äußerte. Die Zellen begannen zu dedifferenzieren [84]. Zusätzlich war nach 96 h ein deutliches Auswachsen von Fibroblasten und Epithelzellen aus Zellnestern zu erkennen.

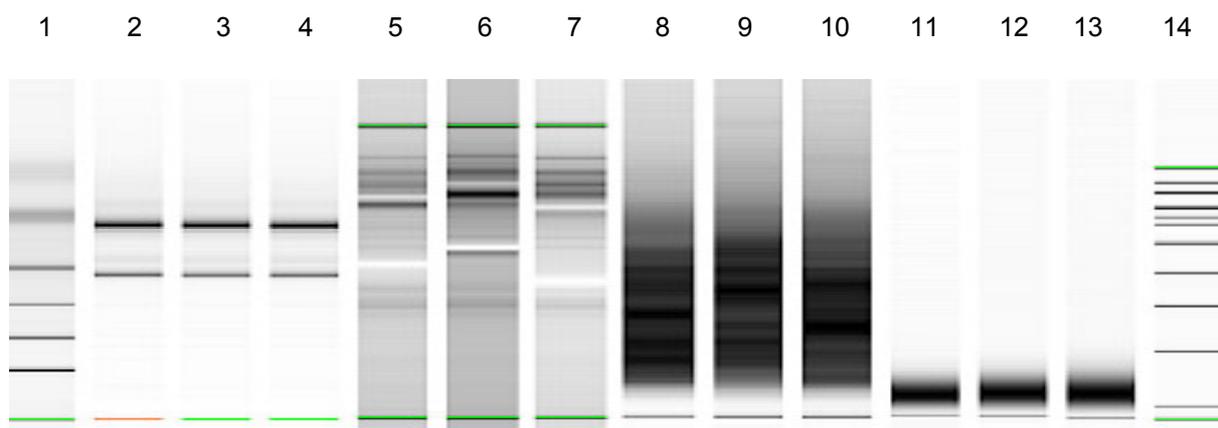
## 4.2 Zellvitalität



**Abb. 4.4:** Bestimmung der Zellvitalität von primären Hepatozyten mittels WST-1-Test über einen Zeitraum von 14 d. Jeweils 50.000 Zellen wurden pro Well auf Collagen-beschichtete 96-Well-Platten ausplattiert. Nach dem auf der x-Achse angegebenen Zeitpunkt wurde die Vitalität der Zellen mit dem WST-1-Test photometrisch bestimmt. Die berechnete Veränderung in Prozent bezieht sich auf den Wert bei 0 h (n = 5).

Im Zeitverlauf zeigte sich zuerst ein zunehmender Verlust metabolischer Funktionen. Die mit dem WST-1-Test bestimmte Vitalität der primären Rattenhepatozyten ließ im Zeitverlauf deutlich nach und sank nach 96 h auf nur noch 36,2 % seiner Anfangsaktivität. Im Anschluss daran stieg die gemessene Aktivität auf den Platten wieder und erreichte nach 14 d in Kultur Aktivitätswerte, die deutlich über den Anfangswerten lagen (Abb. 4.4). Diese Erhöhung war eine Folge des Wuchses anderer Zelltypen in den Kulturen und deckte sich mit den optisch beobachteten Veränderungen in den Petrischalen (vgl. Abb. 4.2 und 4.3).

## 4.3 Qualitätskontrolle und Quantität der eingesetzten RNA

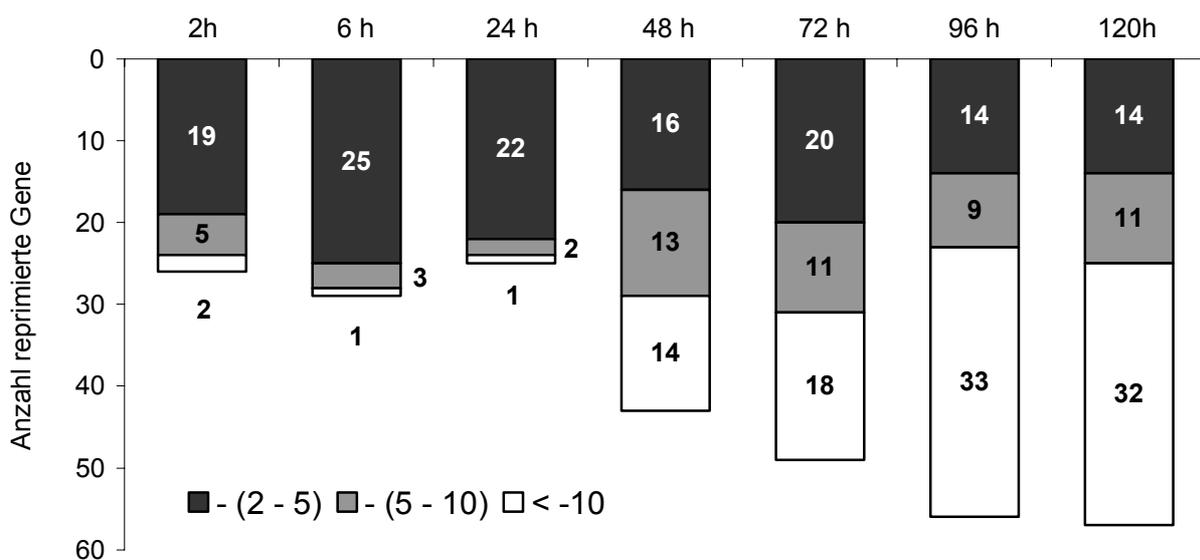


**Abb. 4.5:** Exemplarische Gel-Ansicht mittels Agilent-Chip für Marker (1 + 14), RNA (2 - 4), doppelsträngige cDNA (5 - 7), einzelsträngige cRNA (8 - 10) sowie fragmentierte einzelsträngige cRNA (11 - 13). Diese Messungen dienen zur Qualitätskontrolle und Quantitätsbestimmung der eingesetzten RNA. Die zwei deutlichen 18S- und 28S-Banden der RNA ließen auf undegradierte RNA schließen. Der optische Vergleich der synthetisierten cDNA- und cRNA-Proben diente neben der Quantitätsbestimmung dazu, Auffälligkeiten zwischen den Proben zu erkennen.

Bevor Genexpressionsversuche mit den Zellen durchgeführt wurden, musste die Qualität und Quantität der eingesetzten Proben nach so vielen Zwischenschritten wie möglich überprüft werden (Abb. 4.5). Isolierte totale RNA wurde nur für cDNA-Synthesen eingesetzt, wenn keine optische Degradierung auf den Agilent-Chips zu erkennen war und der  $A_{260}/A_{280}$ -Wert, der eine Aussage über die Kontamination der RNA mit Proteinen zulässt, über 1,8 lag. Für GeneChip<sup>®</sup>-Hybridisierungen wurde zusätzlich die doppelsträngige cDNA, nach der *In vitro*-Transkription die cRNA und vor dem Hybridisieren auch die fragmentierte cRNA optisch auf Auffälligkeiten untersucht sowie die einzusetzende Menge ermittelt. Nur wenn sowohl Qualität als auch Quantität der Proben den vorgegebenen Kriterien entsprachen, wurden die Proben für weitere Schritte verwendet.

#### 4.4 Auswertung von Low-Density MWG-Chip-Daten

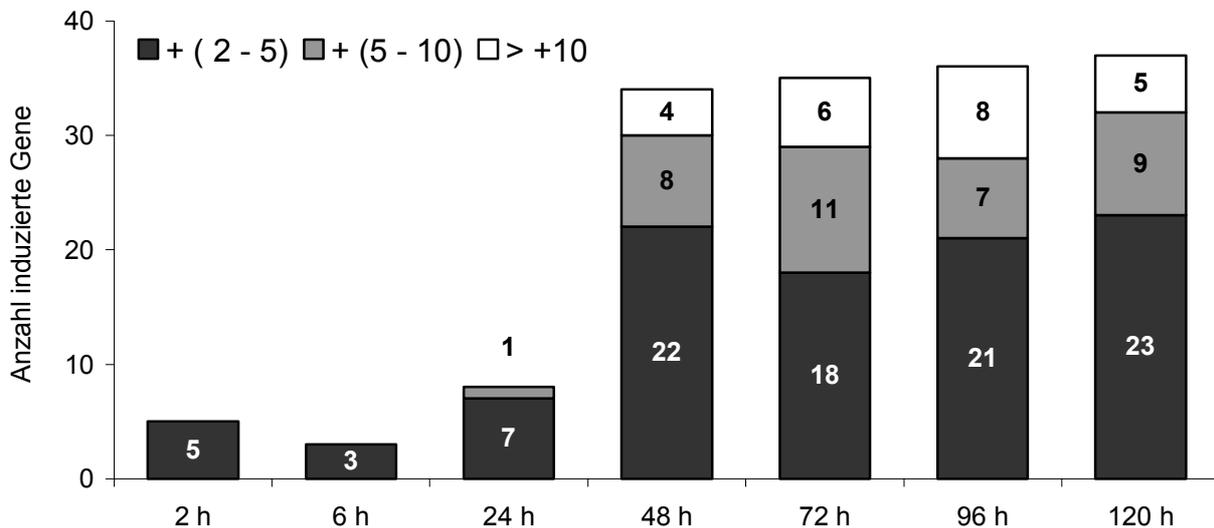
Bei der Auswertung von Microarray-Daten waren die Gene von Interesse, die deutlich mehr als 2-fach induziert oder reprimiert wurden. Abbildung 4.6 zeigt die Anzahl aller im Zeitkurvenversuch von 0 - 120 h signifikant reprimierten Gene als Balkendiagramm. Die Balkendiagramme in Abbildung 4.7 stehen dementsprechend für die Anzahl der induzierten Gene. Die variierenden Graustufungen in den beiden Diagrammen bedeuten eine unterschiedliche Stärke in der Expressionsänderung (siehe zugehörige Legenden).



**Abb. 4.6:** Auswertung der reprimierten Gene aus den Zeitkurvenversuchen mit primären Rattenhepatozyten auf Low-Density MWG-Chips. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (0 - 120 h) dargestellt, auf der y-Achse die Gesamtzahl der reprimierten Gene. Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl der pro Zeitpunkt mehr als 2-fach reprimierten Gene. Unterschiedliche Graustufungen weisen auf die in der Legende beschriebene Stärke der Regulation hin ( $n = 3$ ;  $p < 0,001$  nach t-Test).

Nach 2 h in Kultur waren bereits 26 der Gene auf dem Low-Density Chip signifikant reprimiert, davon 19 Gene 2- bis 5-fach, fünf Gene 5- bis 10-fach. Dagegen waren nur zwei Gene nach 2 h schon mehr als 10-fach reprimiert worden (Abb. 4.6). Die Anzahl und auch die Stärke der reprimierten Gene blieb 24 h etwa gleich, nach 48 h jedoch kam es zu einem Anstieg in Zahl und Stärke der Veränderungen. Nach 48 h waren 43 Gene signifikant reprimiert worden. Auffällig war auch, dass etliche Gene nun viel schwächer exprimiert wurden. Die Anzahl der mehr als 5-fach reprimierten Gene stieg auf 13 und die der mehr als

10-fach reprimierten Gene auf 14. Diese Entwicklung setzte sich über die Zeitpunkte nach 72 h und 96 h fort bis zum letzten Zeitwert nach 120 h, bei dem insgesamt 57 Gene reprimiert worden waren. Vor allem der Anstieg der mehr als 10-fach reprimierten Gene auf 33 war nun deutlich zu erkennen. Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass einige der sehr stark reprimierten Gene kaum noch zu detektieren waren, ihre Expression wurde fast eingestellt (vgl. Abb. 4.6).

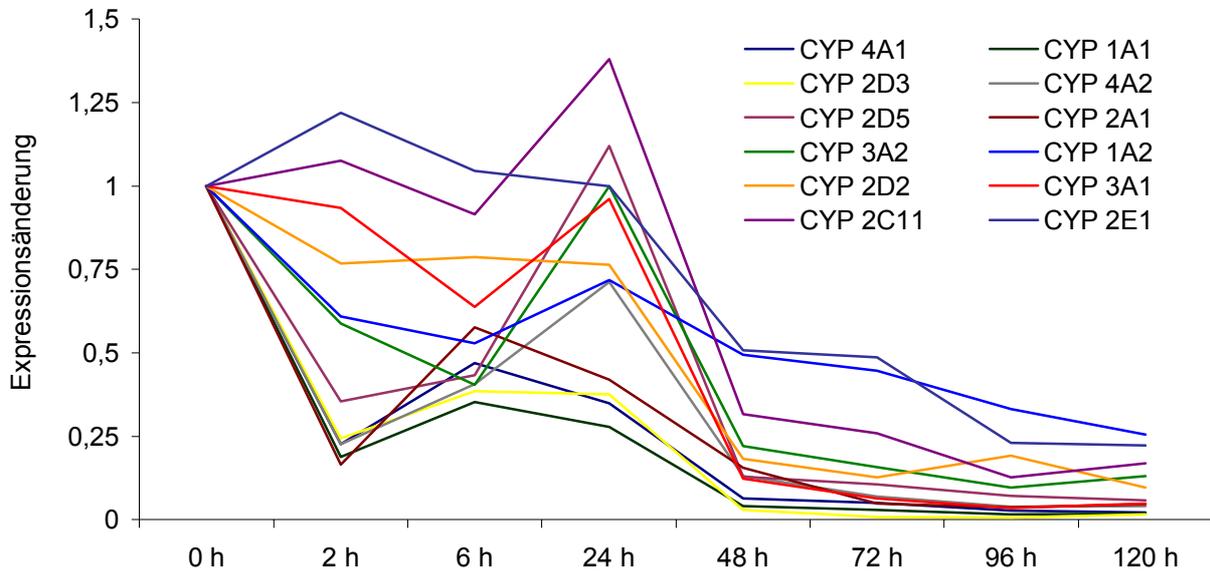


**Abb. 4.7:** Auswertung der induzierten Gene aus den Zeitkurvenversuchen mit primären Rattenhepatozyten auf Low-Density MWG-Chips. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (0 - 120 h) dargestellt, auf der y-Achse die Gesamtzahl der induzierten Gene. Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl der pro Zeitpunkt mehr als 2-fach induzierten Gene. Unterschiedliche Graustufungen weisen auf die in der Legende beschriebene Stärke der Regulation hin ( $n = 3$ ;  $p < 0,001$  nach t-Test).

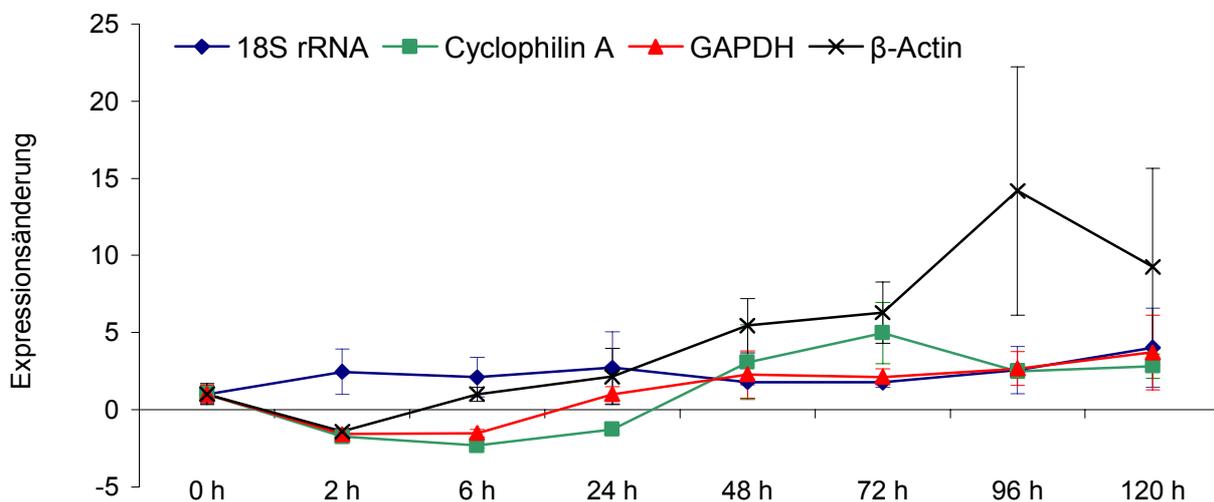
Etwas unterschiedlich verhielt es sich mit der Anzahl der induzierten Gene (Abb. 4.7). Nach 2 h waren erst fünf Gene signifikant induziert; diese Veränderung lag zudem unwesentlich über dem als 2-fach festgelegten Mindestwert einer Regulation. Ebenso wie bei den reprimierten Genen blieb die Anzahl der veränderten induzierten Gene bis 24 h nahezu gleich. Ein starker Anstieg in Zahl und Expressionsstärkeveränderung trat zwischen 24 und 48 h auf. Hier waren bereits 34 Gene signifikant induziert, davon 22 Gene mehr als 2-fach, acht Gene mehr als 5-fach und vier Gene mehr als 10-fach. Die Anzahl und die Veränderungen der induzierten Gene pendelte sich in etwa auf diesen Werten ein und stieg im Gegensatz zu den reprimierten Genen auch nach 120 h nicht weiter an. Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse ist erkennbar, dass es sich in den meisten Fällen um die gleichen Gene handelte, die im Zeitverlauf zum Einen verändert wurden und deren Expressionsänderung sich auch mit der Zeit verstärkte. Es würde den Rahmen dieser Arbeit übersteigen, auf alle ca. 100 induzierten und reprimierten Gene einzugehen, da fast jedes zweite Gen auf dem Low-Density Chip reguliert wurde.

Eine wichtige Gruppe unter den auf dem Chip regulierten Genen waren die Cytochrom-P450-Monooxygenasen. Im Folgenden (Abb. 4.8) wird noch genauer auf sie eingegangen. Von den 15 auf dem Low-Density Chip vorhandenen Cytochrom-P450-Monooxygenasen wurden im Zeitverlauf zwölf Gene signifikant reprimiert. Nach 2 h waren bis auf CYP 2C11 und CYP 2E1 alle anderen zehn Cytochrom-P450-Monooxygenasen bereits deutlich reprimiert. Nach 48 h waren alle zwölf Gene auf mindestens 50 % ihres Anfangswertes abgesunken. Einige der Expressionswerte für bestimmte Cytochrome (CYP 1A1, 2A1, 2D3, 2D5, 3A1, 4A1) waren

sogar auf unter 5 % des Anfangswertes abgefallen bzw. kaum noch messbar. Der leichte Anstieg der meisten Werte nach 24 h ist auf technische Artefakte bei einer der Hybridisierungsrunden zurückzuführen, da durch starkes Hintergrundrauschen zu hohe Expressionswerte gemessen wurden.



**Abb. 4.8:** Im Zeitverlauf in primären Rattenhepatozyten regulierte Cytochrom-P450-Monooxygenasen auf Low-Density MWG-Chips. Dargestellt ist der Expressionsverlauf für zwölf Cytochrom-P450-Monooxygenasen über einen Zeitraum von 120 h. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte dargestellt, auf der y-Achse die Stärke der Genexpressionsänderung ( $n = 3$ ).



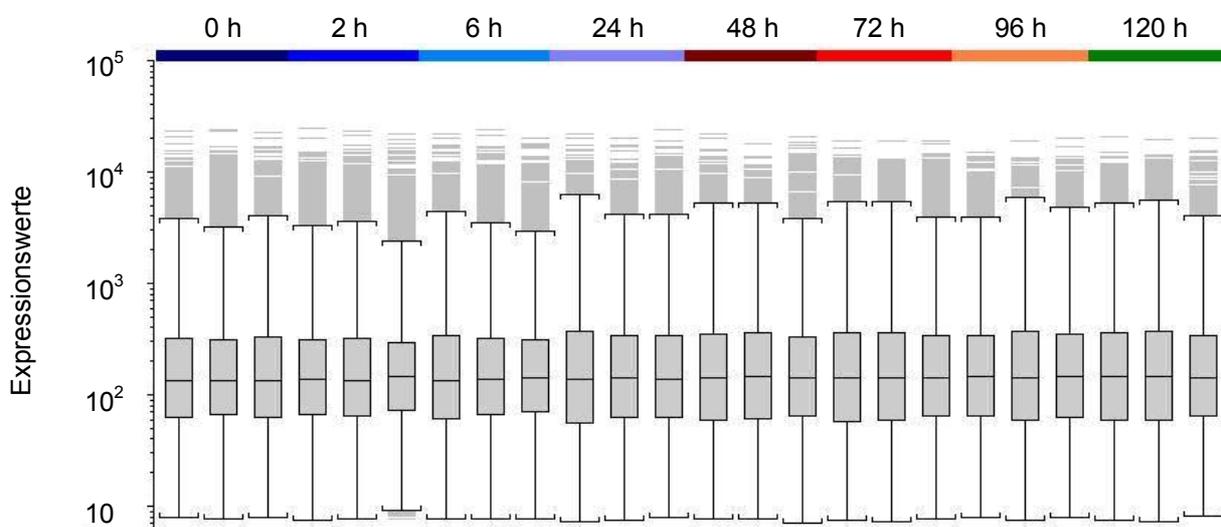
**Abb. 4.9:** Expressionsveränderungen der auf den Low-Density Chips aufgetragenen Housekeeping-Gene: 18S rRNA, Cyclophilin A, GAPDH und  $\beta$ -Actin. Dargestellt ist der Expressionsverlauf für die vier Housekeeper-Gene über einen Zeitraum von 120 h. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte dargestellt, auf der y-Achse die Stärke der Genexpressionsänderung ( $n = 3$ ).

Um Daten von verschiedenen Chips direkt miteinander vergleichen zu können, mussten die gewonnenen Daten mittels auf dem Chip enthaltener Housekeeper-Gene normalisiert werden. In dem mit den primären Rattenhepatozyten durchgeführten Zeitkurvenexperiment zeigte sich jedoch, dass die für die Normalisierung der Daten auf dem Low-Density Chip benötigten

Housekeeper (Cyclophilin A, GAPDH,  $\beta$ -Actin und 18S rRNA) beträchtlich in ihrer Expression schwankten (Abb. 4.9). Ein besonders starker Anstieg zeigte sich bei  $\beta$ -Actin nach 48 h in Kultur, als Spitzenwert wurde es nach 96 h über 14-fach höher exprimiert als zu Beginn. Die Veränderungen fielen bei den drei anderen angedachten Housekeeping-Genen nicht ganz so extrem aus. Sie befanden sich zwischen dem 0,4-fachen bei 6 h sowie dem 5-fachen nach 72 h für Cyclophilin A. GAPDH wurde zwischen 0,6-fach nach 2 h und 3,7-fachen nach 120 h reguliert. Für 18S rRNA kam es zu 1,8-fachen Veränderungen nach 2 h und zu 4-fache nach 120 h. Aufgrund dieser Beobachtungen konnte die Normalisierung der Daten nicht wie beabsichtigt mit den beschriebenen Housekeepern durchgeführt werden. Daher kam eine globale Normalisierung, bei der alle Gene auf dem Chip miteinbezogen und deren Gesamtintensität auf  $I = 1$  gesetzt wurde, zur Anwendung.

#### 4.5 Auswertung von High-Density Affymetrix GeneChip®-Daten

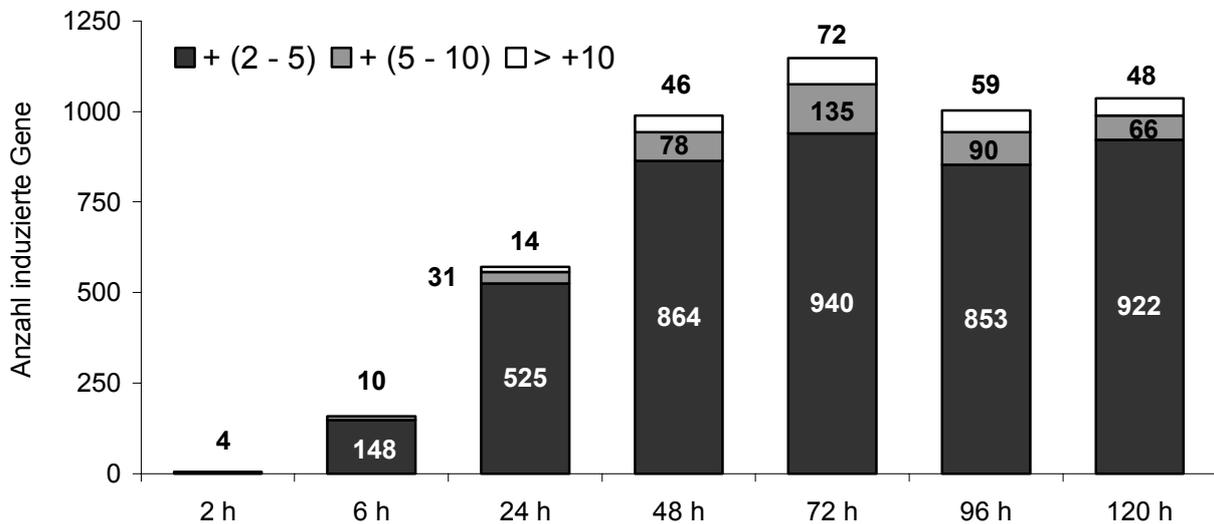
In Abb. 4.10 wird jeder Affymetrix GeneChip® aus dem Zeitkurvenexperiment nach der durchgeführten Normalisierung durch einen Boxplot repräsentiert. Der Boxplot ist eine spezielle Form des Säulendiagramms und ermöglicht eine graphisch übersichtliche Darstellung großer Datenmengen. Der Strich in der Mitte entspricht dem Medianwert, das grau unterlegte Rechteck umfasst die 25 - 75 %-Percentile. Die Querbalken außerhalb der Box repräsentieren das Minimum bzw. Maximum der Verteilung. Ausreißer, die nicht in die Verteilung mit einbezogen wurden, sind als Striche ober- oder unterhalb dieser Balken dargestellt.



**Abb. 4.10:** Boxplots der Gene aus dem Zeitkurvenversuch mit primären Rattenhepatozyten auf Affymetrix GeneChips®. Auf der x-Achse sind alle analysierten GeneChips® (je drei pro Zeitspanne) dargestellt, auf der y-Achse die gemessenen Expressionswerte für alle detektierbaren Gene. Nach der Normalisierung der Daten kam es in allen Boxplots zu einem ähnlichen Abbild.

Nach der Normalisierung hatten der Bereich der 25 - 75 %-Percentile eine annähernd gleiche Größe und die Mediane aller Chips befanden sich fast auf demselben Level. Zusätzlich waren die Varianzen sowohl zwischen den biologischen Replikaten als auch den verschiedenen Zeitpunkten sehr ähnlich. An der gestauchten Form der 25 - 75 %-Percentilbalken und den gleichmäßigen Entfernungen der Querbalken für die Extremwerte war zu erkennen, dass die Mehrheit der Gene auf dem Chip ähnliche, in einem engen Bereich liegende Expressions-

werte aufwiesen. Variierende Längen der Percentil- und Extremwertbalken, wie sie vor der Normalisierung auftraten, würden auf eine extreme Verteilung und damit schlechte Vergleichsmöglichkeit der Expressionsdaten schließen lassen. Durch diesen optischen Vergleich zeigte sich die zentrale Tendenz und die homogene Qualität der Daten aller eingesetzten GeneChips<sup>®</sup>. Die Chips aus diesem Experiment konnten also sehr gut miteinander verglichen werden, da sie von ähnlicher Qualität waren.

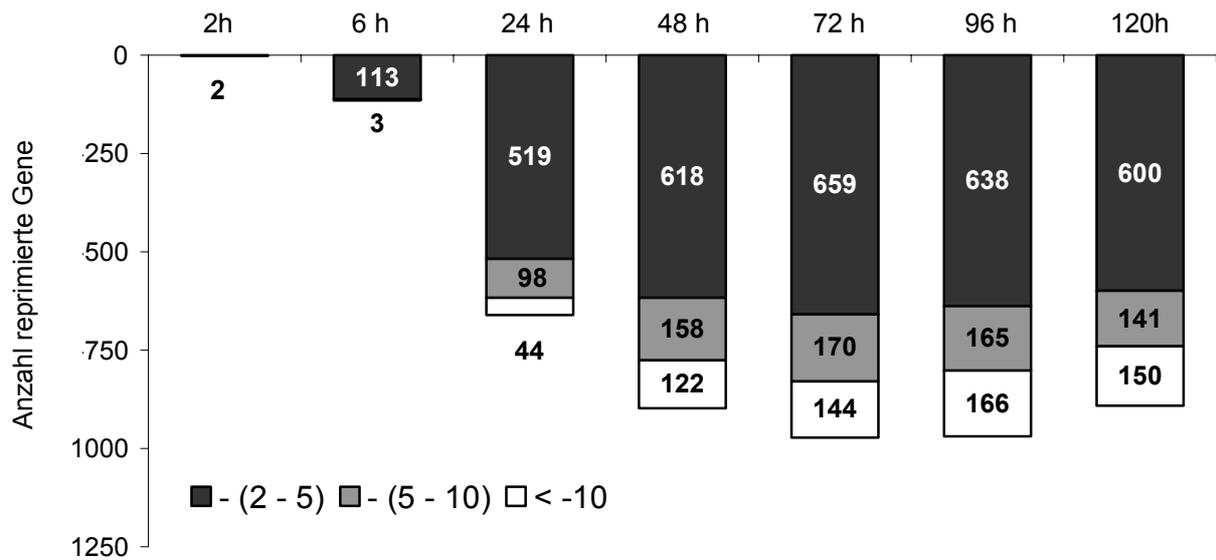


**Abb. 4.11:** Auswertung der induzierten Gene aus den Zeitkurvenversuchen mit primären Rattenhepatozyten auf Affymetrix GeneChips<sup>®</sup>. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (0 - 120 h) dargestellt, auf der y-Achse die Gesamtzahl der induzierten Gene. Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl der pro Zeitpunkt mehr als 2-fach induzierten Gene. Unterschiedliche Graustufen weisen auf die in der Legende beschriebene Stärke der Regulation hin ( $n = 3$ ;  $p < 0,001$  nach One-Way ANOVA).

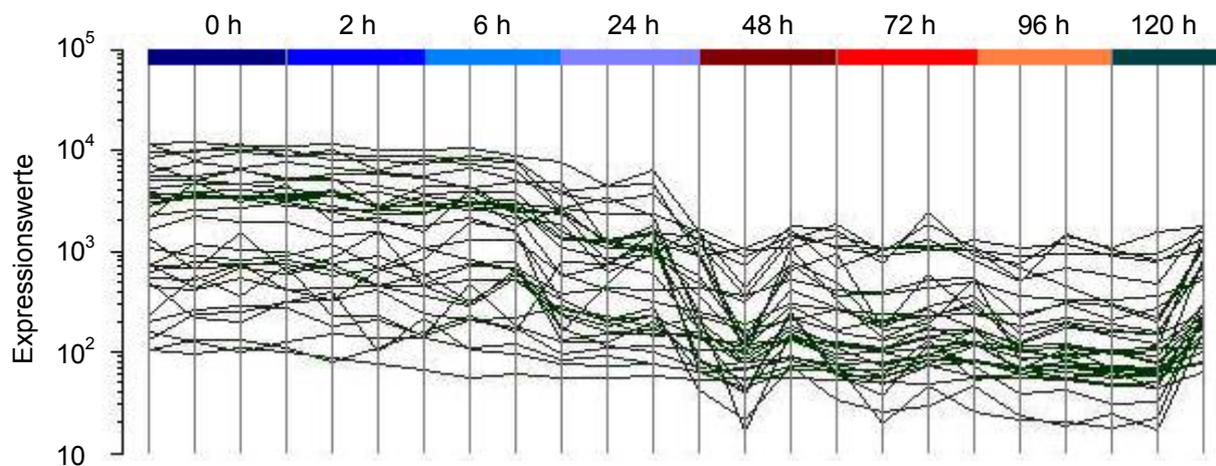
Für die aufgestellte Zeitserie von 0 - 120 h zeigte sich für die primären Rattenhepatozyten ein ähnliches Bild wie auf den Low-Density Microarrays von MWG. Zu Beginn der Kulturen waren relativ wenige Gene in ihrer Expression verändert, mit fortlaufender Zeit nahm die Zahl der regulierten Gene hingegen stetig zu. So stieg die Zahl der induzierten Gene von zwölf (2 h) auf 522 (24 h), um dann in einem großen Sprung auf 988 (48 h) anzuwachsen. Nach 72 h erreichte die Anzahl der regulierten Gene einen Maximalwert von 1147, um dann nach 96 bzw. 120 h wieder leicht auf 1002 bzw. 1036 zu fallen (Abb. 4.11).

Für die reprimierten Gene zeigte sich ein identisches Bild (Abb. 4.12). Zu Beginn der Kulturen waren nur einige wenige Gene reguliert (zwei nach 2 h). Im weiteren Zeitverlauf stieg die Anzahl der schwächer exprimierten Gene stark an, um nach 72 h mit 973 reprimierten Genen ein Maximum einzunehmen.

Grundsätzlich ließ sich feststellen, dass es sowohl bei den induzierten als auch bei den reprimierten Genen im Zeitverlauf zu einer Zunahme kam. Des Weiteren war zu beobachten, dass die Veränderungen bei den Genen über den Zeitverlauf konsistent waren und sie nicht nur in einem Zeitpunkt, sondern zumeist ab dem ersten Veränderungszeitpunkt durchgehend reguliert wurden. Dazu passend nahm bei vielen Genen auch die Stärke der Expressionsveränderung im Zeitverlauf sukzessive zu.

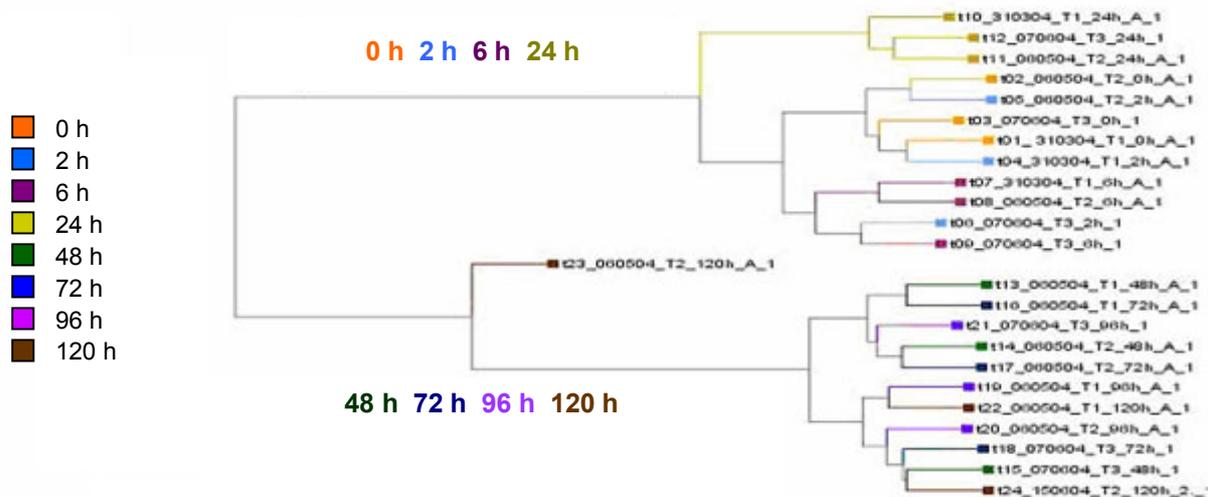


**Abb. 4.12:** Auswertung der reprimierten Gene aus den Zeitkurvenversuchen mit primären Rattenhepatozyten auf Affymetrix GeneChips<sup>®</sup>. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (0 - 120 h) dargestellt, auf der y-Achse die Gesamtzahl der reprimierten Gene. Die Zahlen in den Balken stehen für die Anzahl der pro Zeitpunkt mehr als 2-fach reprimierten Gene. Unterschiedliche Graustufen weisen auf die in der Legende beschriebene Stärke der Regulation hin (n = 3; p < 0,001 nach One-Way ANOVA).



**Abb. 4.13:** Expressionswerte der differentiell exprimierten Cytochrom-P450-Monooxygenasen aus den Zeitkurvenexperimenten (0 - 120 h) auf Affymetrix GeneChips<sup>®</sup>. Auf der x-Achse sind jeweils die drei biologischen Replikate für die acht Zeitpunkte dargestellt, auf der y-Achse die gemessenen Expressionswerte für die Cytochrom-P450-Monooxygenasen im Zeitverlauf bis 120 h.

Eine detaillierte Analyse der mehr als 2000 in den Zeitkurvenversuchen regulierten Gene würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Aus diesem Grund soll bei der Auswertung der Affymetrix GeneChips<sup>®</sup>, ebenso wie bei den Low-Density Chips, nur die Gruppe der Cytochrom-P450-Monooxygenasen näher behandelt werden. Von den 58 Cytochrom-P450-Monooxygenasen auf den High-Density GeneChips<sup>®</sup> wurden 36 signifikant und mehr als 2-fach reprimiert (Abb. 4.13). Sehr deutlich war hier auch zu erkennen, dass es zwischen 24 und 48 h zu einem besonders starken Absinken der Expressionswerte kam.



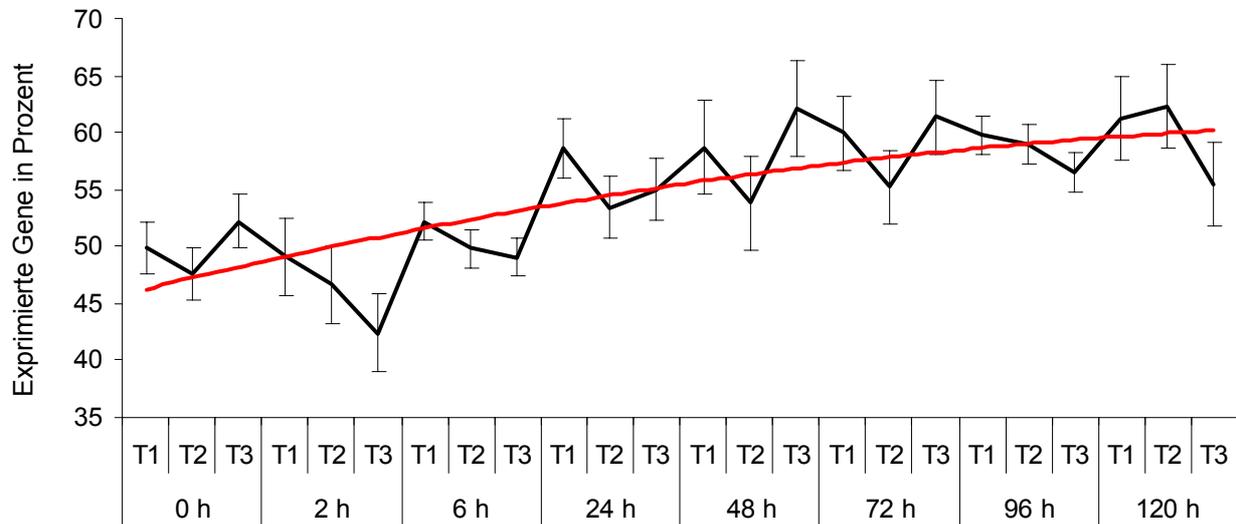
**Abb. 4.14:** Clusteranalyse mit differentiell exprimierten Genen aus den in Zeitkurvenversuchen eingesetzten Affymetrix GeneChips<sup>®</sup>. Anhand ähnlicher Expressionsprofile wurden alle 24 in der Zeitserie 0 - 120 h eingesetzten GeneChips<sup>®</sup> in Cluster eingeteilt. Die drei biologischen Replikate eines Zeitpunktes wurden mit der gleichen Farbmarkierung gekennzeichnet.

Alle differentiell exprimierten Gene wurden nun einer Clusteranalyse unterzogen (Abb. 4.14). Diese Methode wird sehr häufig bei der Auswertung von Microarray-Daten herangezogen, wenn mehr als eine experimentelle Gruppe im Vergleich zu einer Referenz untersucht wird [85]. In der Clusteranalyse werden Messwerte aufgrund ihrer Ähnlichkeit in Gruppen (engl. *cluster*) eingeteilt, was eine schnelle Interpretation der großen Datenmengen erleichtert oder teilweise sogar erst ermöglicht.

In der durchgeführten Cluster-Analyse mit allen 24 in der Zeitserie eingesetzten GeneChips<sup>®</sup> konnten die regulierten Gene und damit die Zeitpunkte in zwei große Gruppen eingeteilt werden: eine erste Gruppe von 0 - 24 h und eine zweite Gruppe von 48 - 120 h. Dieses Clustering bestätigte die vorangegangenen Ergebnisse, bei denen es zu den deutlichsten Veränderungen in den Kulturen zwischen 24 - 48 h kam. In den unteren Clusterebenen ist zudem erkennbar, dass die Triplikate der frühen Zeitpunkte ähnliche Expressionsveränderungen aufweisen. Die Unterscheidung der drei früheren Zeitpunkte 0, 2 und 6 h war nicht eindeutig möglich, da die auftretenden Veränderungen in der Anzahl und der Stärke der Genexpression zwischen diesen Zeitpunkten zu gering waren. Die Ähnlichkeit der Expressionswerte führte zu einer Überlappung der Zeitpunkte 0, 2 und 6 h. In der zweiten großen Clustergruppe mit den späteren Zeitwerten konnten die einzelnen Zeitpunkte nicht mehr in weitere Ebenen unterteilt werden. In dieser Gruppe waren die Veränderungen, die mit den GeneChips<sup>®</sup> detektiert wurden sehr heterogen. Eine Zuordnung der drei biologischen Replikate in die entsprechenden Zeitpunktgruppen konnte nicht mehr eindeutig erfolgen.

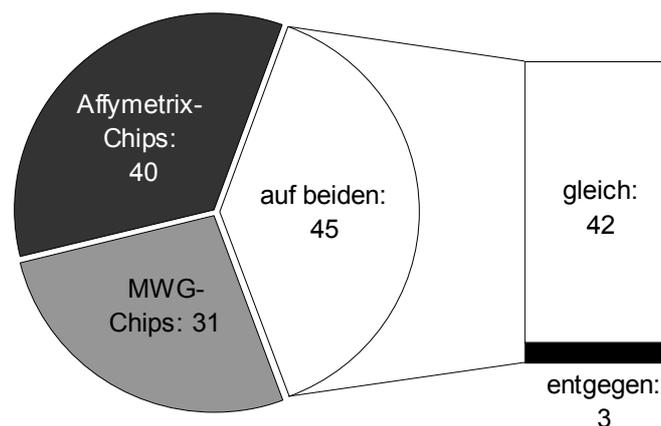
Das Affymetrix-System beruht, wie bereits erwähnt, auf den 16 Perfect-Match- sowie den dazugehörigen 16 Mismatch-Sonden und ermittelt nach dem Scannen aus den kombinierten Intensitätssignalen für diese Sonden, ob ein Gen in der hybridisierten Probe vorhanden (present) oder nicht vorhanden (absent) ist. Abbildung 4.15 zeigt die Anzahl der präsenten Gene im Zeitkurvenversuch für alle eingesetzten Proben. Neben den Schwankungen der drei einem Zeitpunkt zugehörigen biologischen Replikate ist vor allem ein Anstieg in der Präsenz im Zeitverlauf zu erkennen, der durch die berechnete polynome Trendlinie (rot) verdeutlicht wird. Im Mittel waren nach 0 h auf den Chips 49,9 % aller 15927 Gene präsent. Nach 2 h kam es zwar zu einem kleinen Abrutschen auf 46,1 %, nach 6 h sind aber bereits wieder 50,4 %

der Gene detektierbar. Dies setzte sich fort mit 55,7 % nach 24 h, 58,8 % nach 72 h und schließlich 59,7 % nach 120 h. Zum Ende der Zeitserie waren überraschenderweise 9,8 % bzw. 1561 zusätzliche Gene in den Proben präsent im Vergleich mit den Ergebnissen zu Beginn der Kultur.



**Abb. 4.15:** Anzahl der auf den Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> in den Zeitkurvenversuchen mit primären Rattenhepatozyten detektierten Gene. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (0 - 120 h) und die drei erstellten biologischen Replikate pro Zeitpunkt (T1 - T3) dargestellt, auf der y-Achse die Anzahl der detektierten Gene in Prozent.

#### 4.6 Direkter Vergleich der Anzahl regulierter Gene zwischen Low-Density MWG-Chips und High-Density Affymetrix Gene Chips<sup>®</sup>



**Abb. 4.16:** Direkter Vergleich der Anzahl regulierter Gene zwischen dem High-Density Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> und dem Low-Density MWG-Chip. Basierend auf den 230 Genen, die auf beiden Chip-Typen vorhanden sind, wurde die Anzahl der Gene, die entweder nur auf dem Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> (dunkelgrau), den MWG-Chips (grau) oder auf beiden (weiß) signifikant reguliert wurden, ermittelt. Zwischen den beiden Chip-Typen in entgegengesetzte Richtung regulierte Gene sind in dem schwarzen Balken aufgezeigt (n = 3).

**Tab. 4.1:** Liste der in Abb. 4.16 gleichsinnig regulierten Gene. Die Richtung der angegebenen Pfeile deutet auf eine Induktion (↑) bzw. auf eine Repression (↓) in beiden Chipsystemen hin.

| Gen                                    | Regulation | Accession No. |
|--|------------|---------------|
| Annexin V                              | ↑          | NM_013132     |
| Aspartataminotransferase               | ↓          | NM_012571     |
| Katalase                               | ↓          | M11670        |
| Catechol- <i>O</i> -methyltransferase  | ↓          | M60753        |
| Clusterin                              | ↑          | NM_012679     |
| C-Reactive-Protein                     | ↑          | NM_017096     |
| Cytochrom-P450 1A1                     | ↓          | NM_012540     |
| Cytochrom-P450 1A2                     | ↓          | NM_012541     |
| Cytochrom-P450 2A1                     | ↓          | NM_012692     |
| Cytochrom-P450 2B2                     | ↓          | M34452        |
| Cytochrom-P450 2C11                    | ↓          | X79081        |
| Cytochrom-P450 2D2                     | ↓          | NM_012730     |
| Cytochrom-P450 2D4                     | ↓          | AB008425      |
| Cytochrom- P450 2E1                    | ↓          | J02627        |
| Cytochrom-P450 3A1                     | ↓          | L24207        |
| Cytochrom-P450 3A2                     | ↓          | M10161        |
| β-Actin                                | ↑          | V01217        |
| Epoxidhydrolase 2                      | ↑          | NM_022936     |
| Flavin-Containing-Monooxygenase 1      | ↓          | NM_012792     |
| Flavin-Containing-Monooxygenase 2      | ↓          | AF458414      |
| γ-Glutamyltranspeptidase               | ↓          | NM_053840     |
| GAPDH                                  | ↑          | M17001        |
| Glutathionperoxidase                   | ↑          | NM_030826     |
| Glutathion-S-transferase π             | ↓          | X02904        |
| Glutathion-S-transferase Ya            | ↓          | M26874        |
| Hemeoxygenase                          | ↑          | NM_012580     |
| Lipopolysaccharide-Binding-Protein     | ↑          | NM_017208     |
| Metallothionein 1                      | ↑          | NM_138826     |
| Methioninadenosyltransferase 2         | ↓          | NM_134351     |
| Monoaminoxidase A                      | ↓          | D00688        |
| Multidrug-Resistant-Protein 2          | ↑          | NM_012833     |
| Ornithindecaboxylase                   | ↑          | NM_012615     |
| Sulfotransferase (Ostrogen)            | ↓          | U50205        |
| Sulfotransferase (Mercaptopyruvat)     | ↓          | D50564        |
| Sulfotransferase (Phenol)              | ↓          | NM_031834     |
| Sulfotransferase (Hydroxysteroid)      | ↓          | M31363        |
| Superoxiddismutase Cu/Zn               | ↓          | M25157        |
| Thioredoxin                            | ↑          | NM_053800     |
| Transferrin                            | ↑          | D38380        |
| UDP-Glucuronsyltransferase (bilirubin) | ↓          | M34007        |
| UDP-Glucuronsyltransferase (hepatic)   | ↓          | Y00156        |
| Vimentin                               | ↑          | NM_031140     |

Da in den Zeitkurvenversuchen zwei unterschiedliche Chipsysteme zum Einsatz kamen, ist es durchaus von Interesse, wie hoch die Korrelation zwischen den beiden Systemen ausfällt oder ob die Unterschiede im Aufbau der Sonden und den Herstellungsprinzipien zu großen Varianzen zwischen den Chip-Typen führen. Von den 230 Genen, die auf beiden Chips

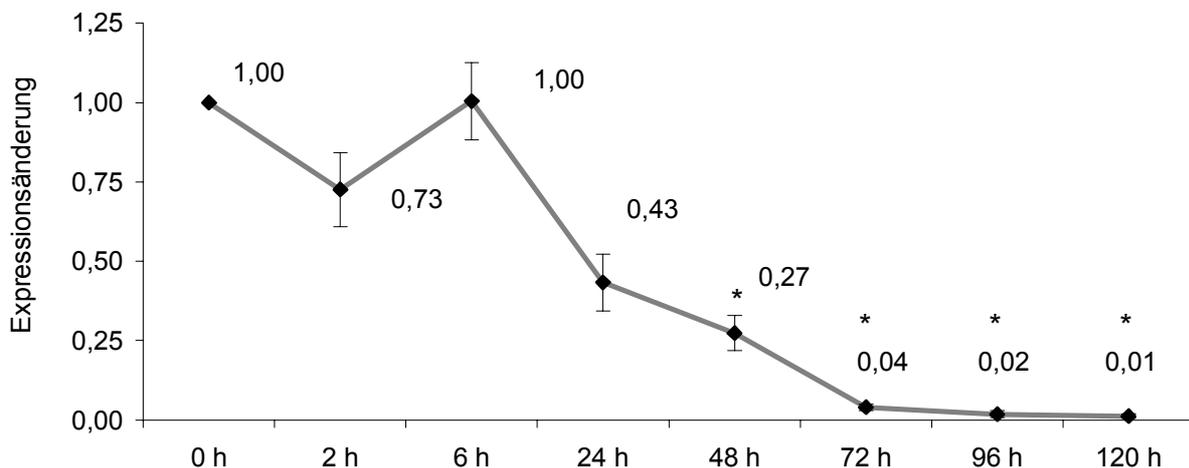
vorhanden waren, wurden 114 überhaupt nicht in ihrer Expression verändert, 40 nur auf den Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> und 31 nur auf den MWG-Chips signifikant reguliert. Die Anzahl der Gene, die auf beiden Chips reguliert wurde, beträgt 45. Davon wurden 42 Gene in die gleiche Richtung und drei in die entgegengesetzte Richtung reguliert (Abb. 4.16, Tab. 4.1, Tab. 4.2).

**Tab. 4.2:** Liste der in Abb. 4.16 entgegengesetzt regulierten Gene. Die Richtung der angegebenen Pfeile deutet auf eine Induktion (↑) bzw. auf eine Repression (↓) im jeweiligen Chipsystemen hin.

| Gen                          | High-Density GeneChip <sup>®</sup> | Low-Density MWG-Chip | Accession No. |
|------------------------------|------------------------------------|----------------------|---------------|
| Connexin-40                  | ↑                                  | ↓                    | AF021806      |
| DNA Topoisomerase 1          | ↓                                  | ↑                    | NM_022615     |
| Insulin like growth factor 2 | ↑                                  | ↓                    | NM_031511     |

#### 4.7 Auswertung der quantitativen TaqMan<sup>®</sup>-RT-PCR-Daten

Mit den aus den Zeitkurvenexperimenten gewonnen RNA-Proben wurden für folgende neun Gene TaqMan<sup>®</sup>-RT-PCR-Läufe durchgeführt: Cytochrom-P450 3A1, Cytochrom-P450 1A2, Sulfotransferase (Östrogen bevorzugend), Katalase, Metallothionin 1, Lipopolysaccharid-Binding-Protein (LPS-Binding-Protein), Clusterin,  $\beta$ -Actin sowie Annexin 5. Die Auswahl der Gene für die Durchführung der TaqMan<sup>®</sup>-RT-PCR erfolgte nach mehreren Kriterien. Neben der bereits bestehenden Verfügbarkeit der Assays im Hause sollte eine Verifizierung der Daten aus den Microarray-Experimenten erfolgen und die Korrelation zu vorhandenen Proteinexpressionsdaten ermittelt werden. Die Versuche verliefen nach einem standardisierten Protokoll, wobei pro Zeitpunkt 20 ng cDNA eingesetzt wurden, die in zwei biologischen und drei technischen Replikaten vermessen wurden.



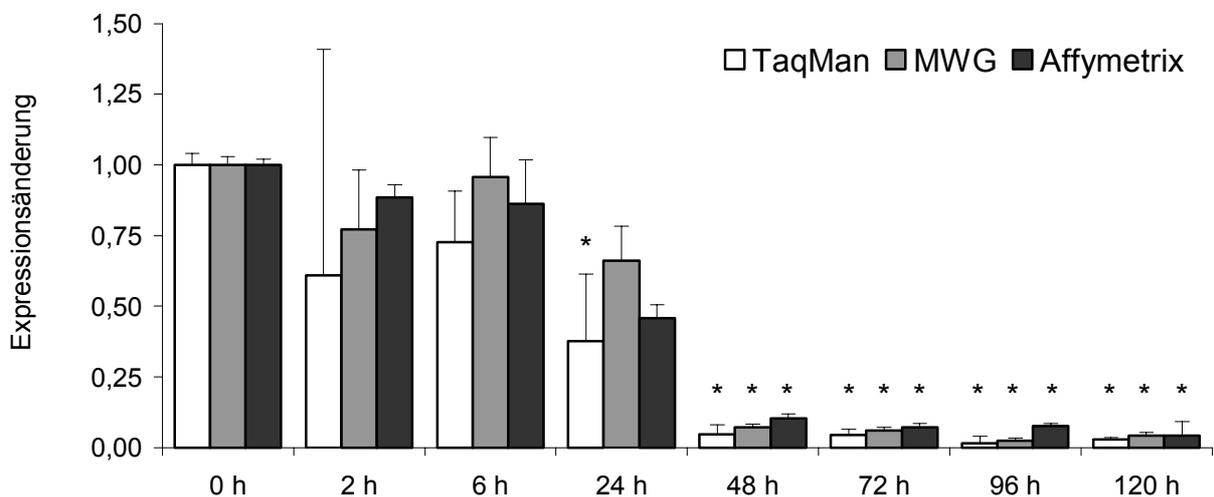
**Abb. 4.17:** Real-Time RT-PCR Zeitkurvenergebnisse mit primären Rattenhepatozyten für CYP 3A1. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (0 - 120 h) dargestellt, auf der y-Achse die Expressionsänderung für CYP 3A1 bezogen auf den Wert bei 0 h (n = 6; \*p < 0,001 nach t-Test).

Das Cytochrom-P450 3A1 zeigte in der Real-Time RT-PCR (Abb 4.17) in den ersten Stunden nach Ausplattieren der Zellen nur geringe Änderungen der Genexpression und blieb etwa 6 h stabil. Nach 24 h kam es jedoch zu einem signifikanten Abfall der Expressionswerte, der sich im weiteren Zeitverlauf fortsetzte. Nach 72 h betrug die Expression nur noch 4 % des

Anfangswertes und fiel bei 120 h auf an der Messgrenze liegende Werte (um 1 %). Die feststellbaren Schwankungen der technischen wie auch der biologischen Replikate bewegten sich in einem engen Bereich, das System zeigte dabei auch über einen weiten dynamischen Bereich hohe Genauigkeit.

#### 4.8 Direkter Vergleich von Genexpressionsdaten aus der TaqMan<sup>®</sup> Real-Time PCR, Low-Density MWG-Chips und High-Density Affymetrix GeneChips<sup>®</sup>

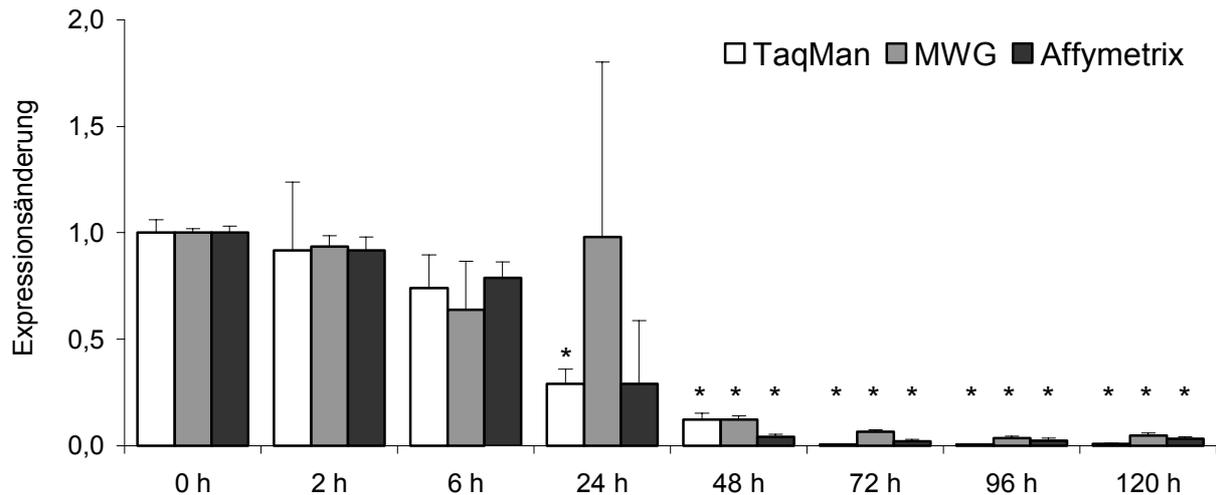
Zur Detektion unterschiedlicher Genexpression wurden drei verschiedene Ansätze durchgeführt. Zum Einen zwei Microarray-Varianten mit mehreren hundert bzw. tausend Genen sowie das TaqMan<sup>®</sup>-System zum Anderen, bei dem hingegen nur wenige ausgewählte Gene untersucht wurden. Die folgenden Diagramme zeigen den direkten Vergleich von acht Genen, die in allen drei Systemen detektiert wurden.



**Abb. 4.18:** Genexpressionsänderung in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten für Metallothionin 1. Die Genexpression wurde mittels dreier Systeme ermittelt (TaqMan<sup>®</sup>-RT-PCR, MWG-Chips, Affymetrix GeneChips<sup>®</sup>). Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (0 - 120 h) dargestellt, auf der y-Achse die Expressionsänderung für Metallothionin 1 bezogen auf den Wert bei 0 h [TaqMan<sup>®</sup> (n = 6), MWG-Chips (n = 3), Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> (n = 3); \*p < 0,001 nach t-Test].

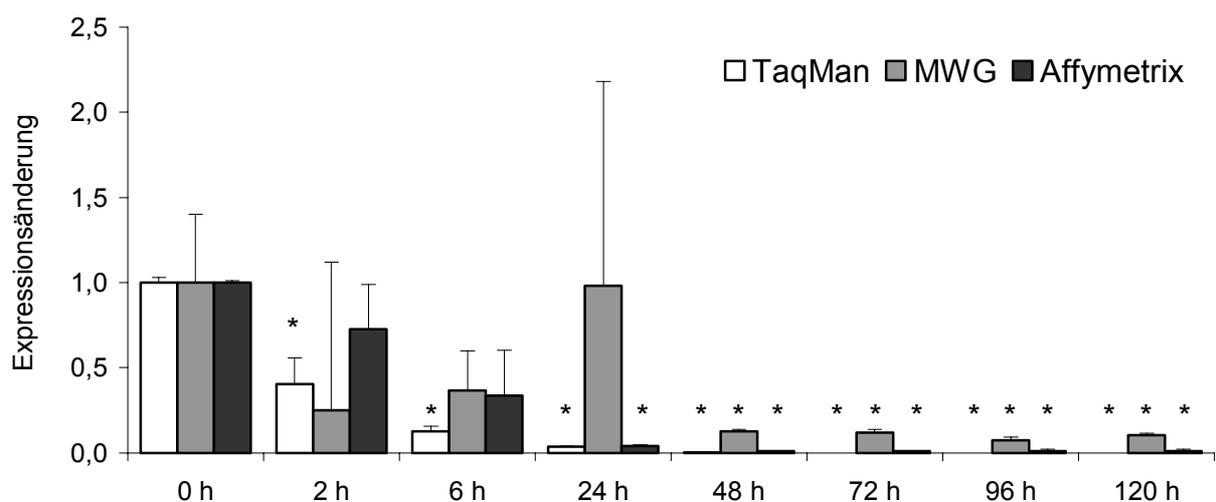
Metallothionin 1 (Abb. 4.18) wurde in den primären Rattenhepatozyten im Zeitverlauf deutlich reprimiert. Alle drei angewandten Methoden detektierten nach 48 h nur noch knapp 10 % des Anfangswertes und fielen bis 120 h noch weiter ab. Die Korrelation der Ergebnisse zwischen den drei Systemen ist dabei sehr hoch.

Auch Cytochrom-P450 1A2 (Abb. 4.19) wurde mit anhaltender Kultur immer schwächer exprimiert. Bereits nach 24 h war im Affymetrix-System und bei der Real-Time PCR ein signifikanter Abfall der Expression zu erkennen. Das MWG-Chipsystem zeigte bei diesem Zeitpunkt allerdings einen Ausreißer, der durch ein hohes Hintergrundsignal bei einem der Replikate hervorgerufen wurde. Im weiteren Verlauf fielen die Expressionswerte für CYP 1A2 in allen drei Systemen konstant weiter bis auf Werte, die unterhalb von 5 % des Referenzwertes lagen.

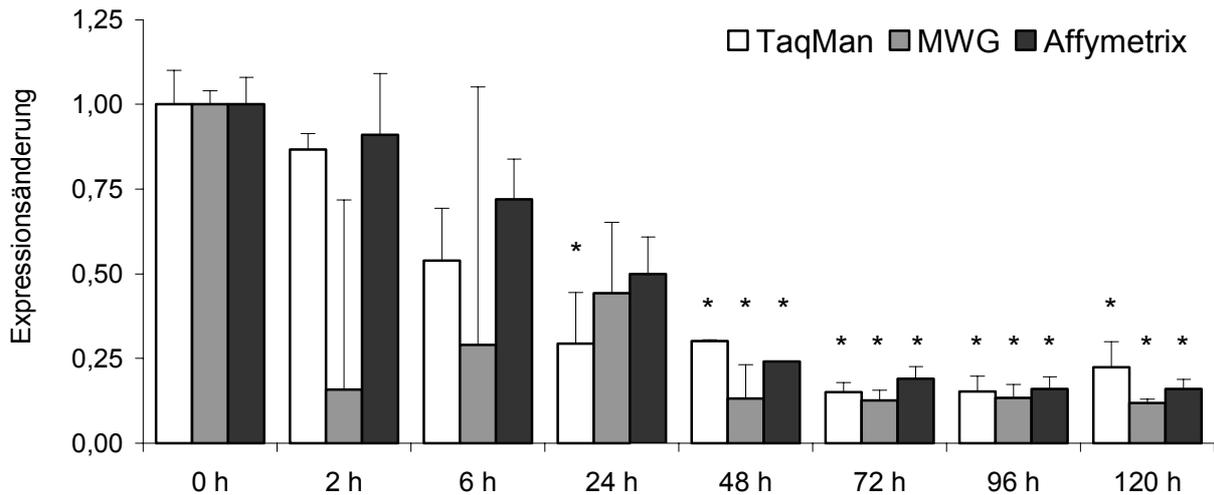


**Abb. 4.19:** Genexpressionsänderung in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten für CYP 1A2. Die Genexpression wurde mittels dreier Systeme ermittelt (TaqMan<sup>®</sup>-RT-PCR, MWG-Chips, Affymetrix GeneChips<sup>®</sup>). Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (0 - 120 h) dargestellt, auf der y-Achse die Expressionsänderung für CYP 1A2 bezogen auf den Wert bei 0 h [TaqMan<sup>®</sup> (n = 6), MWG-Chips (n = 3), Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> (n = 3)]; \*p < 0,001 nach t-Test].

Im Falle der Sulfotransferase (Abb. 4.20) zeigte sich ein noch viel steilerer Abfall der Expressionswerte als für das Cytochrom-P450 3A1. Bereits nach 6 h war die Expression auf unter 50 % ihres Ausgangswertes zurückgegangen. Diese Abnahme setzte sich fort, bis nach 48 h trotz des sehr großen dynamischen Meßbereiches der Real-Time PCR die Messgrenze unterschritten war. Die beiden Chipsysteme detektierten nach 48 h noch ein schwaches Signal, während bei der RT-PCR keine Expression mehr zu erkennen war. Als Erklärung hierfür kann sicherlich herangezogen werden, dass bei den Chipsystemen unspezifische Hintergrundsignale fast immer geringe Messwerte verursachten und es somit mit Schwierigkeiten behaftet war, diese bei schwachen Signalen einem Gen zuzuordnen.

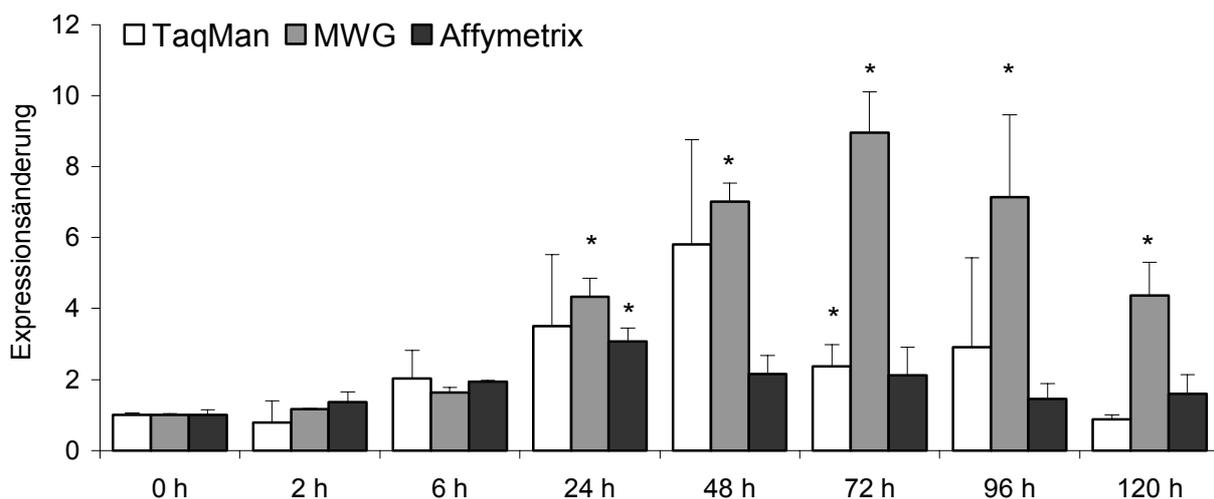


**Abb. 4.20:** Genexpressionsänderung in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten für Sulfotransferase (Östrogen bevorzugend). Die Genexpression wurde mittels dreier Systeme ermittelt (TaqMan<sup>®</sup>-RT-PCR, MWG-Chips, Affymetrix GeneChips<sup>®</sup>). Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (0 - 120 h) dargestellt, auf der y-Achse die Expressionsänderung für Sulfotransferase bezogen auf den Wert bei 0 h [TaqMan<sup>®</sup> (n = 6), MWG-Chips (n = 3), Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> (n = 3)]; \*p < 0,001 nach t-Test].



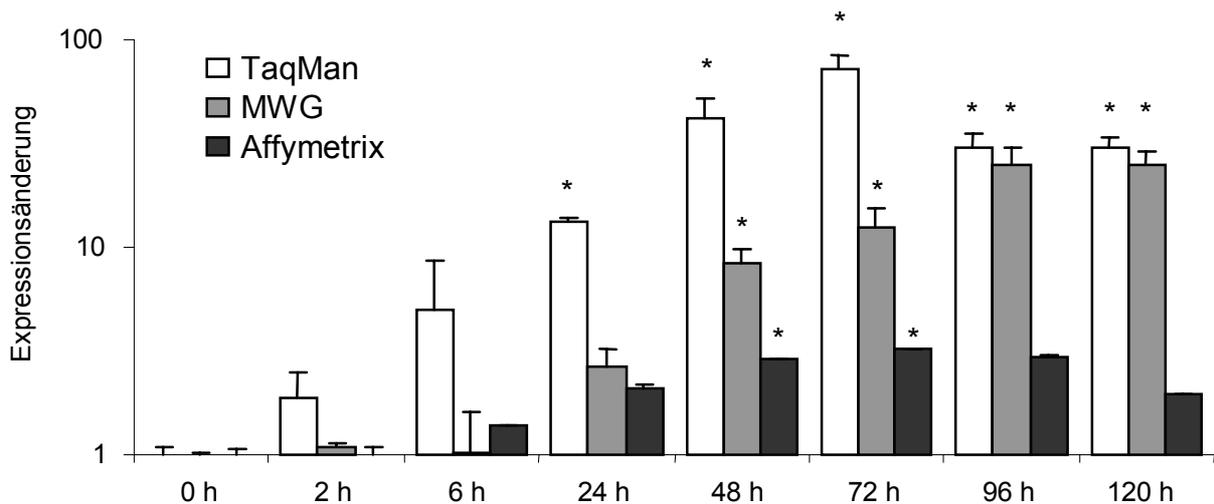
**Abb. 4.21:** Genexpressionsänderung in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten für Katalase. Die Genexpression wurde mittels dreier Systeme ermittelt (TaqMan<sup>®</sup>-RT-PCR, MWG-Chips, Affymetrix GeneChips<sup>®</sup>). Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (0 - 120 h) dargestellt, auf der y-Achse die Expressionsänderung für Katalase bezogen auf den Wert bei 0 h [TaqMan<sup>®</sup> (n = 6), MWG-Chips (n = 3), Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> (n = 3); \*p < 0,001 nach t-Test].

Die Katalase (Abb. 4.21) wurde ebenfalls im Zeitverlauf in den Zellen reprimiert. Nach 24 h war in allen drei Systemen eine signifikante, mehr als 2-fache Reduzierung der Expression messbar, welche nach 120 h auf 10 - 20 % des Anfangswertes abfiel. Das MWG-System wies erneut Unzulänglichkeiten durch mangelhafte Hybridisierungen nach 2 und 6 h auf. Im Vergleich mit dem Wert bei 0 h ließ sich eine viel stärkere Genexpressionsveränderung vermuten, als tatsächlich gegeben war. Die hohen Fehlerbalken bei diesen Zeitpunkten sind jedoch eher auf einen experimentellen Fehler zurückzuführen.



**Abb. 4.22:** Genexpressionsänderung in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten für LPS-Binding-Protein. Die Genexpression wurde mittels dreier Systeme ermittelt (TaqMan<sup>®</sup>-RT-PCR, MWG-Chips, Affymetrix GeneChips<sup>®</sup>). Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (0 - 120 h) dargestellt, auf der y-Achse die Expressionsänderung für LPS-Binding-Protein bezogen auf den Wert bei 0 h [TaqMan<sup>®</sup> (n = 6), MWG-Chips (n = 3), Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> (n = 3); \*p < 0,001 nach t-Test].

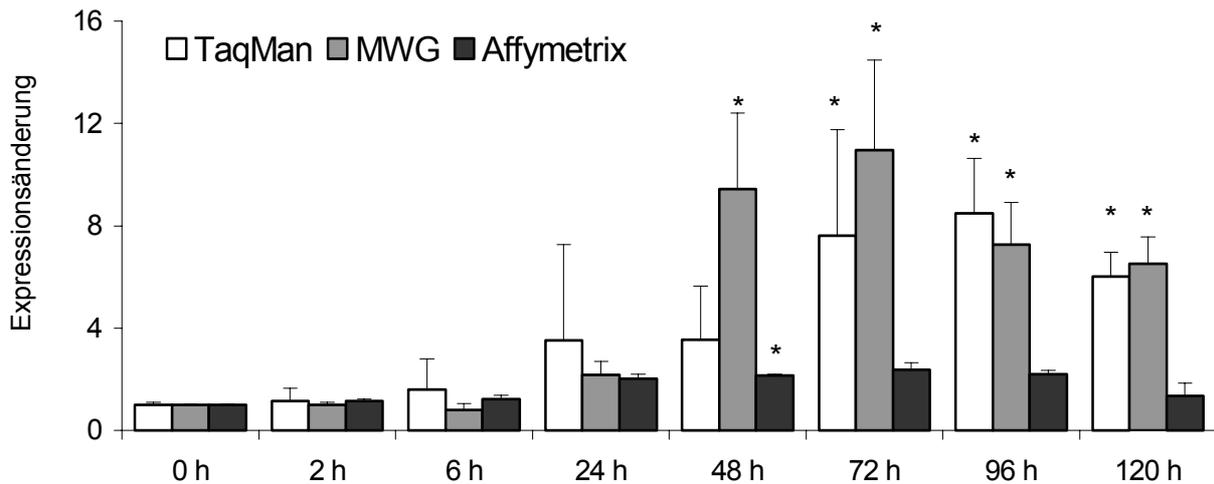
Alle bisher behandelten Gene zeigten Repressionen. Das LPS-Binding-Protein (Abb. 4.22) als Beispiel für ein in den primären Rattenhepatozyten induziertes Gen zeigte jedoch ein entgegengesetztes Verhalten. So war nach 24 h in allen drei Systemen eine signifikante 3- bis 4-fache Regulation nach oben feststellbar, die sich im TaqMan<sup>®</sup>-System bis auf 48 h und bei den Low-Density MWG-Chips sogar bis auf 72 h und eine 9-fache Erhöhung ausdehnte. Im MWG-System wurde das LPS-Binding-Protein viel stärker und auch zeitlich länger reguliert als in den beiden anderen Systemen. Allen drei Systemen war gemein, dass die Expressionswerte zuerst anstiegen, dann jedoch wieder abfielen. Die absolute Höhe und der zeitliche Ablauf dieser Expressionsänderungen stimmten dabei nicht vollständig überein.



**Abb. 4.23:** Genexpressionsänderung in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten für Clusterin. Die Genexpression wurde mittels dreier Systeme ermittelt (TaqMan<sup>®</sup>-RT-PCR, MWG-Chips, Affymetrix GeneChips<sup>®</sup>). Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (0 - 120 h) dargestellt, auf der y-Achse (logarithmische Darstellung) die Expressionsänderung für Clusterin bezogen auf den Wert bei 0 h [TaqMan<sup>®</sup> (n = 6), MWG-Chips (n = 3), Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> (n = 3); \*p < 0,001 nach t-Test].

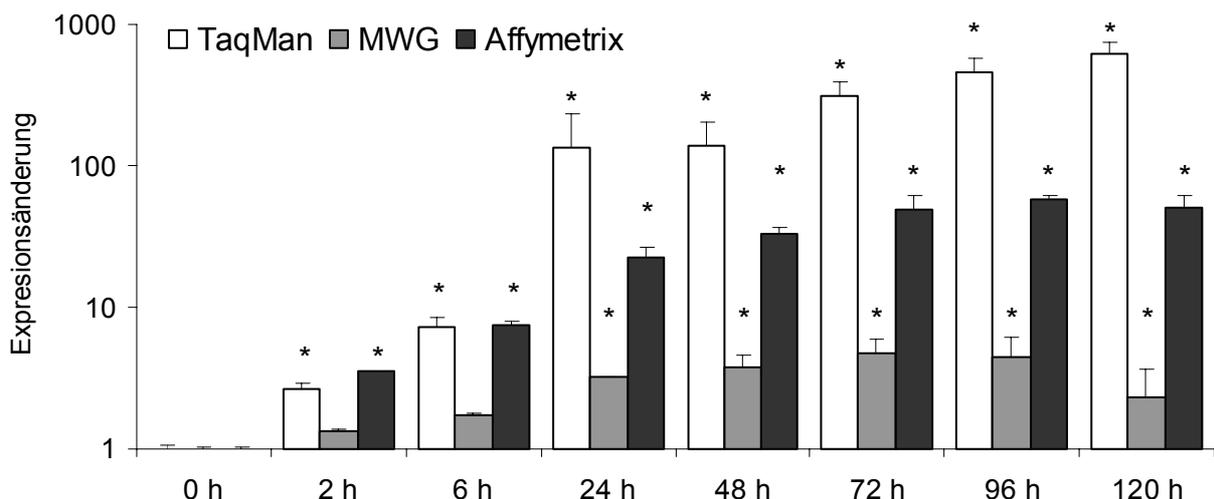
Ein ebenfalls induziertes Gen war das Clusterin (Abb. 4.23). Nach 6 h wurde es in der RT-PCR schon signifikant mehr als 5-fach induziert und stieg in diesem System bis auf Maximalwerte von über 70-fach nach 72 h, um dann wieder auf eine ca. 30-fache Regulation zu den späteren Zeitpunkten der Kultur abzufallen. Die Expressionsänderung fiel auf den Low-Density Chips geringer aus und war auch erst nach 24 h signifikant. In den beiden späten Zeitwerten nach 96 und 120 h zeigten diese beiden Systeme allerdings ähnliche Veränderungen. Die Korrelation zu den Affymetrix GeneChips war hier allerdings nicht so hoch. Zwar wurde das Clusterin auch hier ab 48 h signifikant induziert, allerdings fiel diese Regulation um etliches geringer aus (max. 3,2-fach), als in den beiden anderen Systemen.

Von besonderem Interesse waren die Ergebnisse für das  $\beta$ -Actin (Abb. 4.24). Ursprünglich sollte dieses Gen als Housekeeper zur Normalisierung der Low-Density Chips und als Standardreferenz für die RT-PCR eingesetzt werden. Allerdings wurde es in unserer Zeitreihe, durch alle drei Systeme bestätigt, induziert und eignete sich somit weder für die RT-PCR noch für die Microarrays als Standard. Wie schon bei den oben besprochenen Genen zeigte das MWG-System, gefolgt vom TaqMan<sup>®</sup>-System die höchsten und zeitlich längsten Veränderungen. Auf den Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> waren nur schwache Erhöhungen der Expression zu erkennen.



**Abb. 4.24:** Genexpressionsänderung in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten für  $\beta$ -Actin. Die Genexpression wurde mittels dreier Systeme ermittelt (TaqMan<sup>®</sup>-RT-PCR, MWG-Chips, Affymetrix GeneChips<sup>®</sup>). Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (0 - 120 h) dargestellt, auf der y-Achse die Expressionsänderung für  $\beta$ -Actin bezogen auf den Wert bei 0 h [TaqMan<sup>®</sup> (n = 6), MWG-Chips (n = 3), Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> (n = 3); \*p < 0,001 nach t-Test].

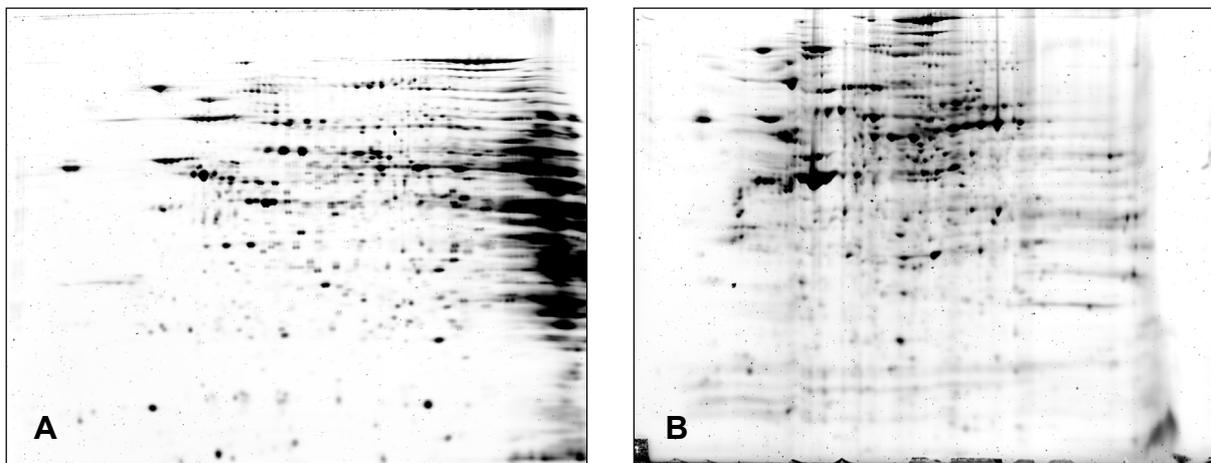
Bisher zeigten die behandelten Gene eine relativ hohe Korrelation zwischen den drei angewandten Systemen. Ein völlig anderes Bild ergab sich dagegen für Annexin 5 (Abb. 4.25). Zwar wurde Annexin 5 im Zeitverlauf bei allen drei Messmethoden signifikant induziert, doch schwankte die Regulation zwischen den einzelnen Systemen um bis zu zwei Potenzen. So wurde auf den Low-Density MWG-Chips als Maximalwert nach 96 h eine 4,7-fache Erhöhung detektiert, auf dem Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> zum selben Zeitpunkt jedoch eine 57-fache. Das TaqMan<sup>®</sup>-System ermittelte einen noch höheren Anstieg auf das 612-fache des Referenzwertes.



**Abb. 4.25:** Genexpressionsänderung in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten für Annexin 5. Die Genexpression wurde mittels dreier Systeme ermittelt (TaqMan<sup>®</sup>-RT-PCR, MWG-Chips, Affymetrix GeneChips<sup>®</sup>). Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (0 - 120 h) dargestellt, auf der y-Achse Achse (logarithmische Darstellung) die Expressionsänderung für Annexin 5 bezogen auf den Wert bei 0 h [TaqMan<sup>®</sup> (n = 6), MWG-Chips (n = 3), Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> (n = 3); \*p < 0,001 nach t-Test].

## 4.9 Auswertung der 2D-Gelelektrophorese

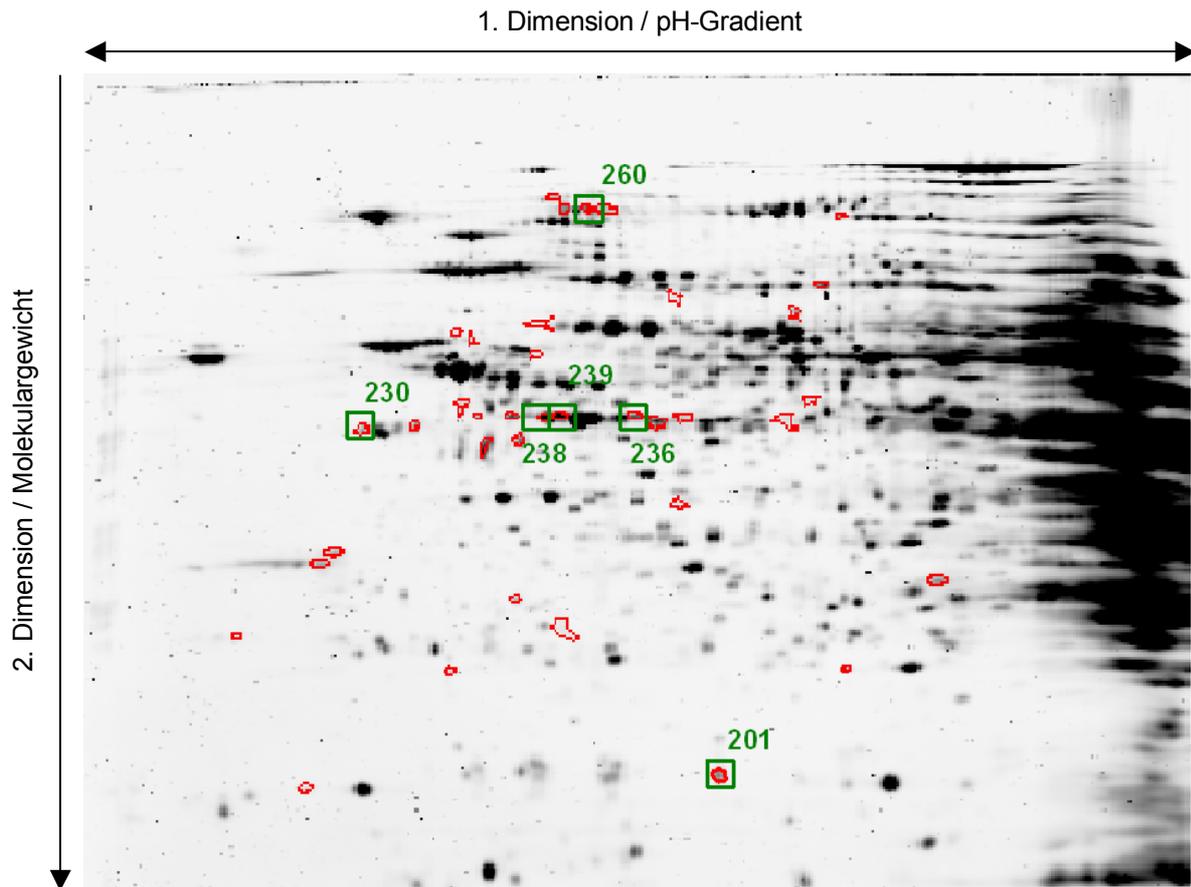
Um eine genaue Kenntnis über das Proteinmuster der unterschiedlichen Proben zu erhalten, wurden die jeweiligen Gesamtproteinlysate mittels 2D-PAGE untersucht. Es ließen sich dabei mehrere tausend Proteinspots detektieren. Zu Unwägbarkeiten führte allerdings die nachlassende Qualität der 2D-Gele zu späteren Zeitpunkten. Während auf der Genomics-Ebene die Zeitkurvenversuche über eine Spanne von 120 h durchgeführt wurden, konnten die 2D-Gele hier nicht in die Analyse mit einbezogen werden. Die abnehmende Protein-ausstattung der primären Rattenhepatozyten sowie das Auftreten von Proteinen fremder Zellen führte zu einer starken Veränderung der 2D-Gele, so dass die Auswertesoftware die Spots auf den Gelen nicht mehr eindeutig zuordnen konnte. Aus diesem Grund wurde auf die Auswertung des 120 h-Zeitwertes ganz verzichtet, da die erreichte Qualität der Gele zu einem unbefriedigenden Match-Ergebnis führte (Abb. 4.26).



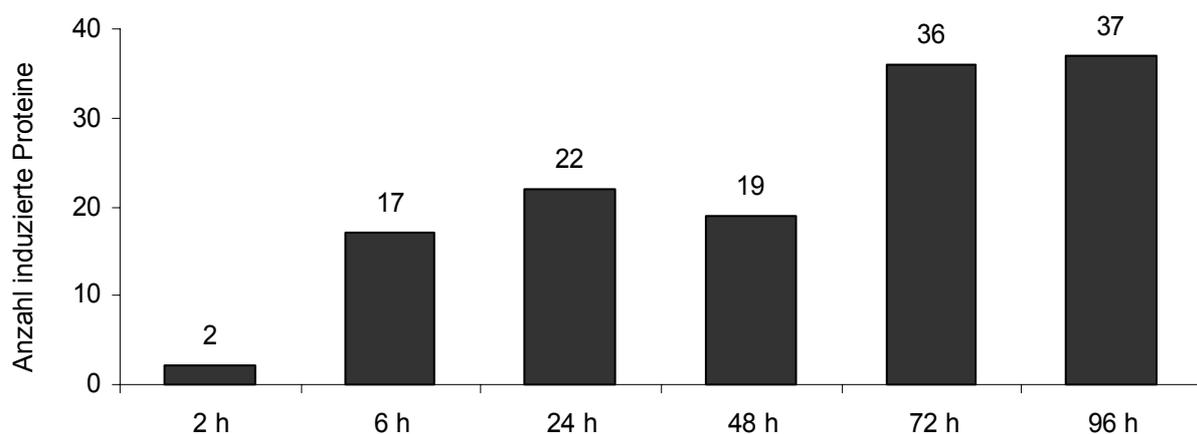
**Abb. 4.26:** Optischer Vergleich zweier 2D-Gele aus primären Rattenhepatozyten nach A: 0 h und B: 120 h. Dreihundert  $\mu$ g Proteinlysate wurden – basierend auf differentiellen pH-Werten für den isoelektrischen Punkt und die molekulare Masse – mittels 2D-PAGE aufgetrennt und mit Ruthenium angefärbt.

Die Berechnung unterschiedlicher Spotintensitäten wurde mit dem Programm Proteom-Weaver durchgeführt. Es wurden nur solche Spots als differentiell exprimiert erkannt, die sich in mindestens 10 der 15 durchgeführten Replikate unterschieden und mehr als 2-fach signifikant reguliert wurden ( $p < 0,01$  nach Mann-Whitney U-Test). Abb. 4.27 zeigt alle im Versuchsverlauf signifikant mehr als 2-fach induzierten Proteine. In Abb. 4.28 ist die Anzahl der pro Zeitpunkt regulierten Proteine nochmals deutlicher dargestellt. Im Unterschied zur Genebene gab es bereits nach 6 h einen größeren Anstieg auf 17 induzierte Proteine, deren Anzahl sich dann bis 48 h in etwa hielt, um nach 72 h (96 h) nochmals einen Schub auf 36 (37) erhöht exprimierter Proteine zu erfahren.

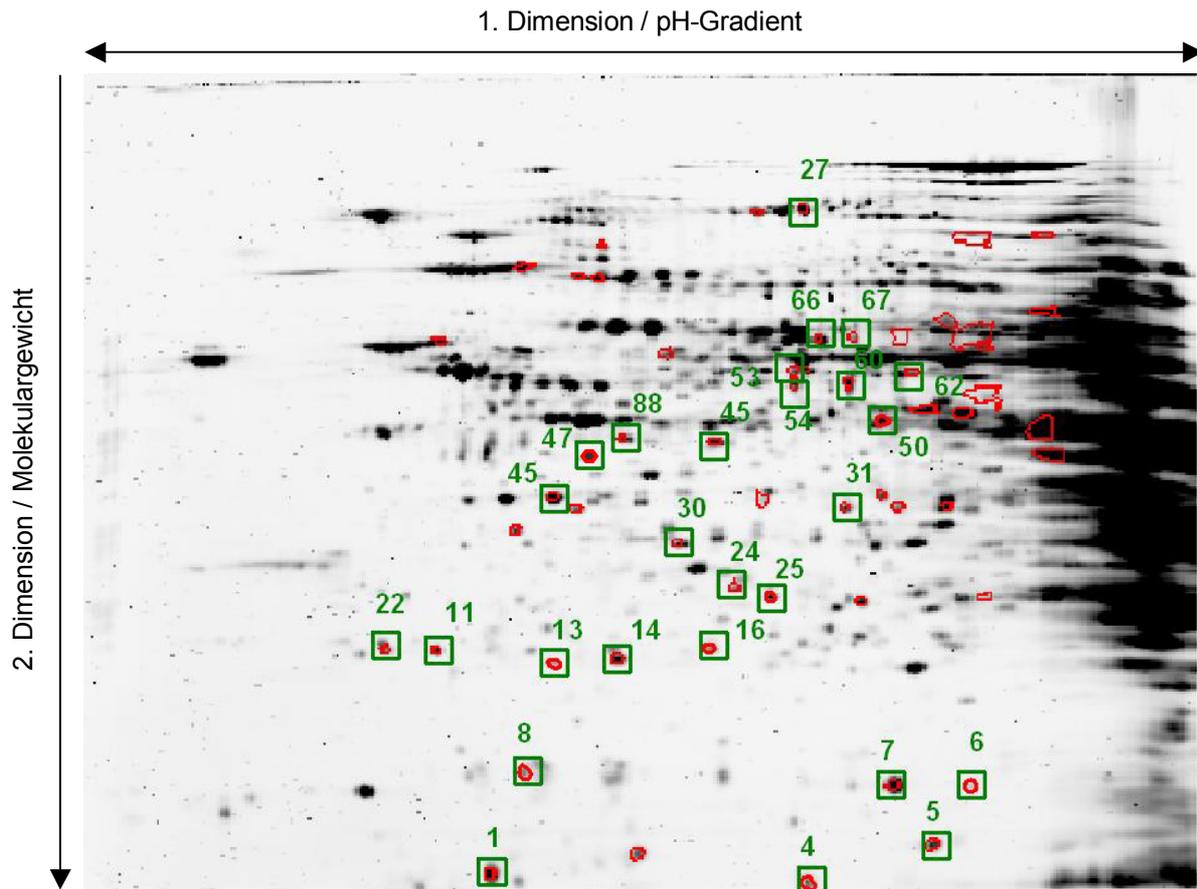
Die Anzahl der im Zeitverlauf reprimierten Proteine zeigte ein dem der Genexpression ähnliches Bild (Abb. 4.29 und 4.30). Während nach 2 und 6 h nur acht Proteine in der Expression reprimiert waren, kam es nach 24 h zu einem deutlichen Anstieg auf 36 und im weiteren Verlauf auf 51 veränderte Proteine nach 72 h.



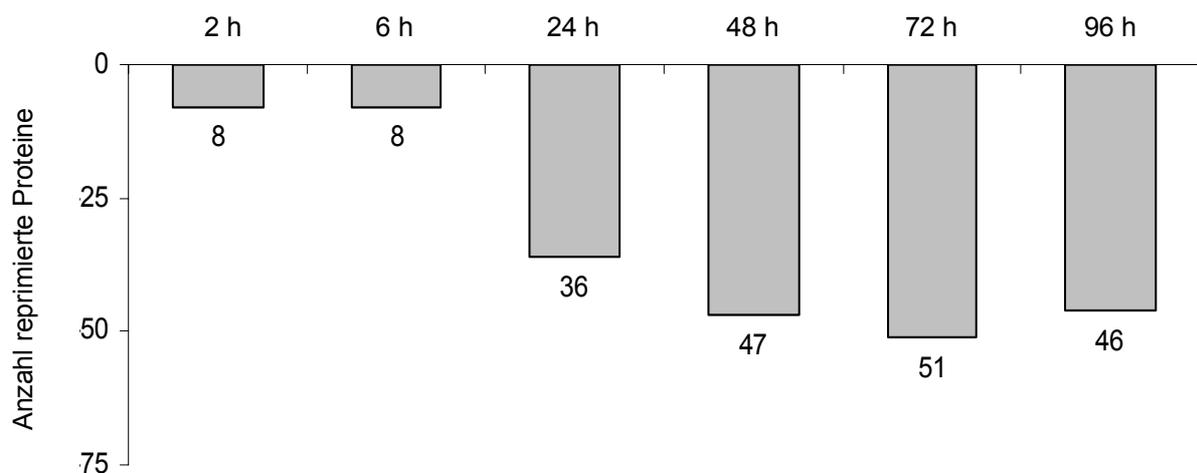
**Abb. 4.27:** In 2D-Gelen induzierte Proteine aus dem Zeitkurvenversuch mit primären Rattenhepatozyten. Dreihundert  $\mu\text{g}$  Proteinlysate wurden mittels 2D-PAGE aufgetrennt (pH 4 -7; 10 % SDS-Gel) und mit Ruthenium angefärbt. Alle in der Zeitspanne von 0 - 96 h mehr als 2-fach induzierten Proteine sind rot gekennzeichnet. Zusätzlich mittels MALDI-TOF identifizierte Proteinspots wurden mit einer Nummer (grün) versehen (vgl. Tabelle 4.1), ( $n = 15$ ;  $p < 0,01$  nach Mann-Whitney U-Test).



**Abb. 4.28:** Anzahl induzierter Proteine pro Zeitwert aus dem Zeitkurvenversuch in 2D-Gelen mit primären Rattenhepatozyten. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (2 - 96 h) dargestellt, auf der y-Achse die Gesamtzahl der mehr als 2-fach induzierten Proteine ( $n = 15$ ;  $p < 0,01$  nach Mann-Whitney U-Test).



**Abb. 4.29:** In 2D-Gelen reprimierte Proteine aus dem Zeitkurvenversuch mit primären Rattenhepatozyten. Dreihundert  $\mu\text{g}$  Proteinlysate wurden mittels der 2D-PAGE aufgetrennt (pH 4 - 7; 10 % SDS-Gel) und mit Ruthenium angefärbt. Alle in der Zeitspanne von 0 - 96 h mehr als 2-fach reprimierten Proteine sind rot gekennzeichnet. Zusätzlich mittels MALDI-TOF identifizierte Proteinspots wurden mit einer Nummer (grün) versehen (vgl. Tabelle 4.1), ( $n = 15$ ;  $p < 0,01$  nach Mann-Whitney U-Test).



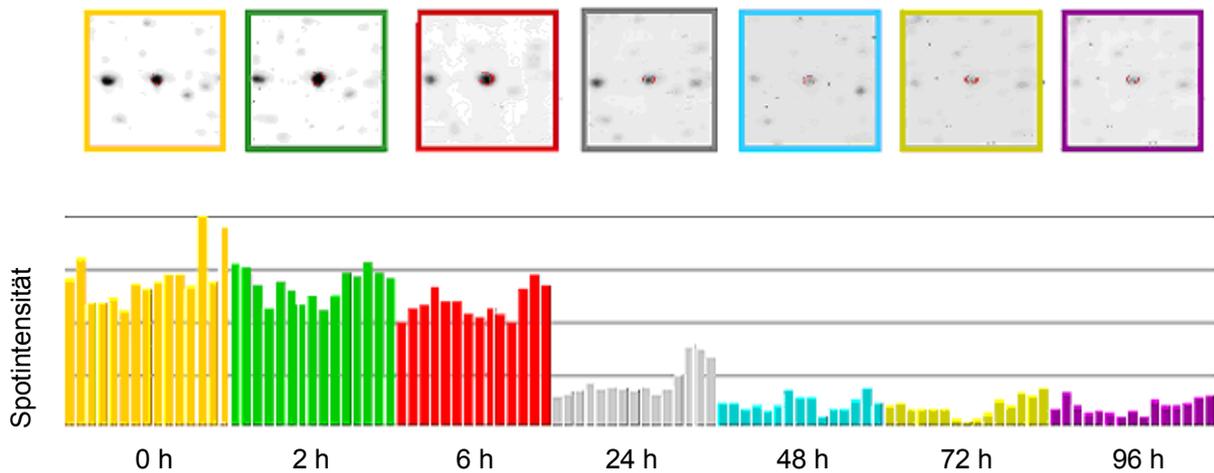
**Abb. 4.30:** Anzahl reprimierter Proteine pro Zeitwert aus dem Zeitkurvenversuch in 2D-Gelen mit primären Rattenhepatozyten. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (2 - 96 h) dargestellt, auf der y-Achse die Gesamtzahl der mehr als 2-fach reprimierten Proteine ( $n = 15$ ;  $p < 0,01$  nach Mann-Whitney U-Test).

Insgesamt konnten ca. 100 Spots manuell unter UV-Licht ausgeschnitten werden, von denen wiederum 36 Spots identifiziert werden konnten (Tab. 4.3). Für die meisten anderen per MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight-Massenspektrometrie) analysierten Spots ergaben sich widersprüchliche Proteinidentifizierungen, die hauptsächlich auf andere Organismen als Ratte hindeuteten oder die einen sehr niedrigen Wahrscheinlichkeits-Score für die Identifizierung eines bestimmten Proteins besaßen.

**Tab. 4.3:** Liste der in Abb. 4.27 und 4.29 identifizierten Protein-Spots. Die Richtung der angegebenen Pfeile deutet auf eine Induktion (↑) bzw. auf eine Repression (↓) der Proteine hin.

| Spot | Protein  |   | Abkürzung | MW (Da) | Swiss-Prot<br>Acc. No. |
|------|--|---|-----------|---------|------------------------|
| 1    | Galectin-7                                     | ↓ | LEG7      | 15154   | P97590                 |
| 4    | D-Dopachromtautomerase                         | ↓ | DODP      | 13108   | P80254                 |
| 5    | Transthyretine Precursor                       | ↓ | TTHY      | 15710   | P02767                 |
| 6    | Superoxiddismutase                             | ↓ | SODC      | 15710   | P07632                 |
| 7    | Superoxiddismutase                             | ↓ | SODC      | 15710   | P07632                 |
| 8    | Eukaryotic Translation Initiation<br>Factor 5A | ↓ | eIF5A     | 16701   | P63242                 |
| 11   | Catechol- <i>O</i> -Methyltransferase          | ↓ | COMT      | 29806   | P22734                 |
| 13   | Peroxiredoxin 2                                | ↓ | PDX2      | 21770   | P35704                 |
| 14   | Phosphatidylethanolamine-<br>Binding-Protein   | ↓ | PEBP      | 20788   | P31044                 |
| 16   | Apolipoprotein A-I Precursor                   | ↓ | ADA1      | 30126   | P04639                 |
| 22   | Catechol- <i>O</i> -Methyltransferase          | ↓ | COMT      | 31806   | P22734                 |
| 24   | Proteasome Activator Complex 2                 | ↓ | PSE2      | 26840   | Q63798                 |
| 25   | Glutathioperoxidase                            | ↓ | GPX       | 22258   | P04041                 |
| 27   | Glucose-Regulated-Protein 75                   | ↓ | GRP75     | 73844   | P48721                 |
| 30   | 3-Hydroxyanthranilat-3,4-<br>dioxygenase       | ↓ | 3HAO      | 32846   | P46953                 |
| 31   | Sulfotransferase (Östrogen)                    | ↓ | EST       | 35828   | P52844                 |
| 33   | <i>N</i> -Hydroxarylaminsulfotransferase       | ↓ | SUAC      | 35855   | P50237                 |
| 34   | Malatdehydrogenase                             | ↓ | MDHC      | 36494   | P14152                 |
| 45   | Senescence Marker Protein 30                   | ↓ | SMP30     | 33385   | Q64374                 |
| 47   | Farnesylpyrophosphatsynthase                   | ↓ | FPPS      | 41146   | P05369                 |
| 49   | Fruktose-1,6-biphosphatase                     | ↓ | F16P      | 39909   | P19112                 |
| 50   | Adenosinkinase                                 | ↓ | ADK       | 40178   | Q64640                 |
| 53   | Phenylalanin-4-hydroxylase                     | ↓ | PH4H      | 52303   | P04176                 |
| 54   | Phenylalanin-4-hydroxylase                     | ↓ | PH4H      | 52303   | P04176                 |
| 60   | Methioninadenosyltransferase                   | ↓ | MTL       | 44240   | P13444                 |
| 62   | Methioninadenosyltransferase                   | ↓ | MTL       | 44240   | P13444                 |
| 66   | Sulfitoxidase                                  | ↓ | SUOX      | 54354   | Q07116                 |
| 67   | Sulfitoxidase                                  | ↓ | SUOX      | 54354   | Q07116                 |
| 88   | Fruktose-1,6-biphosphatase                     | ↓ | F16P      | 39909   | P19112                 |
| 201  | Major Urinary Protein                          | ↑ | MUP       | 21009   | P02761                 |
| 217  | Pyruvatdehydrogenase (E1)                      | ↑ | ODPB      | 39336   | P49432                 |
| 230  | Laminin-Rezeptor                               | ↑ | RSP4      | 32693   | P38983                 |
| 236  | β-Actin  | ↑ | ACTB      | 41736   | P60711                 |
| 238  | β-Actin  | ↑ | ACTB      | 41766   | P60711                 |
| 239  | β-Actin  | ↑ | ACTB      | 41766   | P60711                 |
| 260  | 60 kDa Heat Shock Protein                      | ↑ | HSP60     | 60917   | P19226                 |

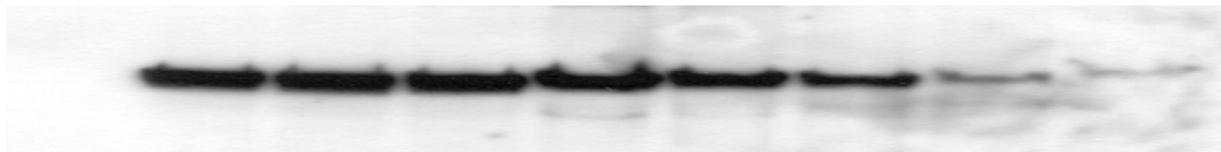
Abb. 4.31 zeigt exemplarisch die Spots für das Senescence Marker Protein 30 aus der mit den primären Rattenhepatozyten durchgeführten Zeitkurve. Eine Abnahme der Proteinexpression war im Zeitverlauf deutlich zu erkennen, allerdings war ein optischer Vergleich durchaus kompliziert, da das Auswerteprogramm die Daten normalisierte und so eventuell auftretende experimentelle Unterschiede ausglich. Die im unteren Teil der Abbildung liegenden Balkendiagramme zeigen die dazugehörige Proteinexpression nach der Normalisierung der Rohdaten. Hier ist ebenfalls der Rückgang der Expression für dieses Protein deutlich erkennbar.



**Abb. 4.31:** Proteinexpression für Senescence Marker Protein 30 (SMP30). Oben: Proteinspots aus 2D-Gelen für (SMP30) nach unterschiedlichen Zeiten in Kultur (0 - 96 h). Unten: Quantitative Analyse der entsprechenden Intensitätsstärken. Auf der y-Achse ist die jeweilige Spotintensität, auf der x-Achse die fünf biologischen und drei technischen Replikate pro Zeitpunkt aufgetragen.

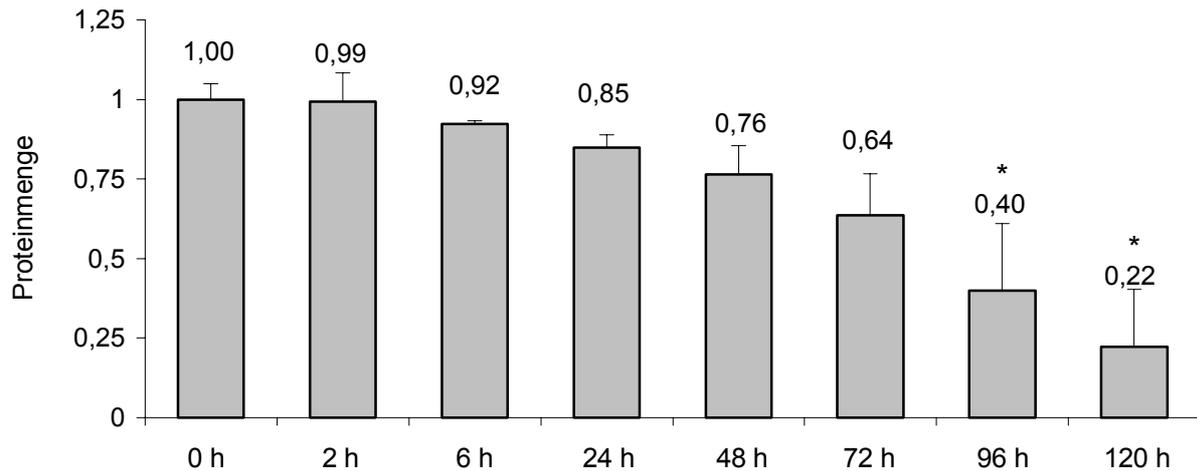
#### 4.10 Western-Blot für Katalase

Zeitpunkt: 0 h 2 h 6 h 24 h 48 h 72 h 96 h 120 h



**Abb. 4.32:** Western-Blot für Katalase aus Zeitkurvenversuchen (0 - 120 h) mit primären Rattenhepatozyten. Pro Zeitpunkt wurden 50 µg Proteinlysate in einer SDS-Page (10 %) aufgetrennt. Der monoklonale Antikörper gegen Katalase erzeugte auf dem Blot eine Bande im Bereich von 61,3 kDa (n = 4).

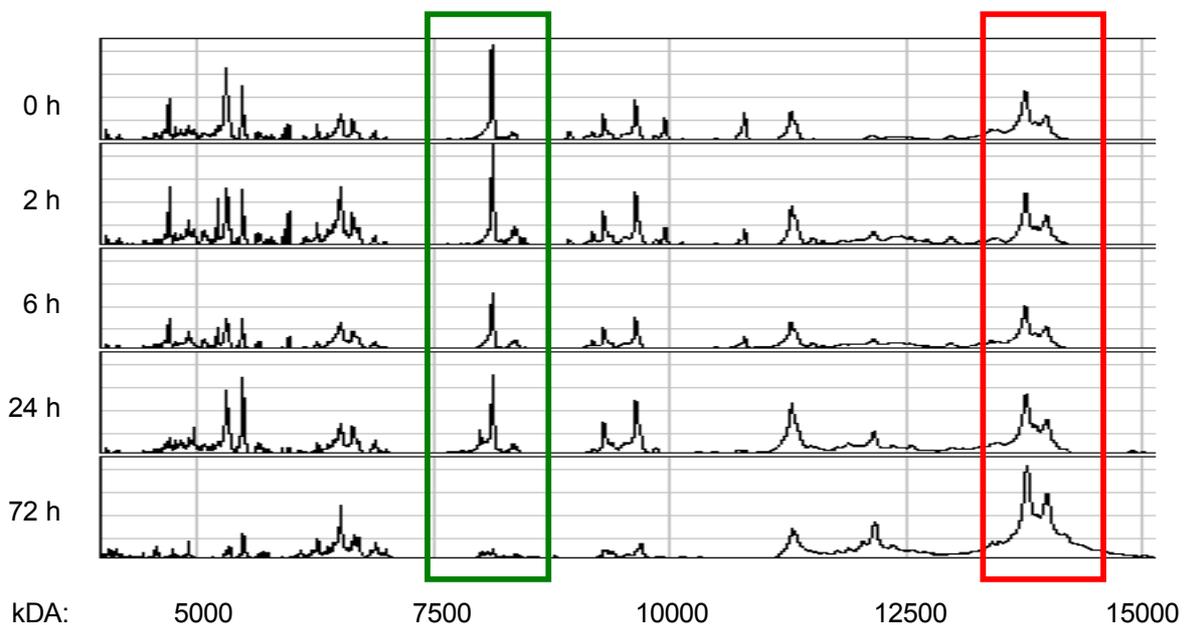
In einem für Katalase durchgeführten Western-Blot (Abb. 4.32) zeigte sich in Anlehnung an die Genexpressionswerte aus den Microarray- und den TaqMan<sup>®</sup>-Versuchen, dass im vorliegenden Zellsystem auch die Proteinexpression im Zeitverlauf reprimiert wurde. Bei der densitometrischen Auswertung des Western-Blots (Abb. 4.33) zeigte sich allerdings erst ab 96 h eine signifikant reprimierte Proteinexpression auf 40 % des Anfangswertes.



**Abb. 4.33:** Umgerechnete Proteinmengen der Zeitkurvenversuche mit primären Rattenhepatozyten aus der Western-Blot-Analyse für Katalase. Die entsprechende Bandenintensität der einzelnen Zeitpunkte (0 - 120 h) wurde densitometrisch detektiert (n = 4; \*p < 0,001 nach t-Test).

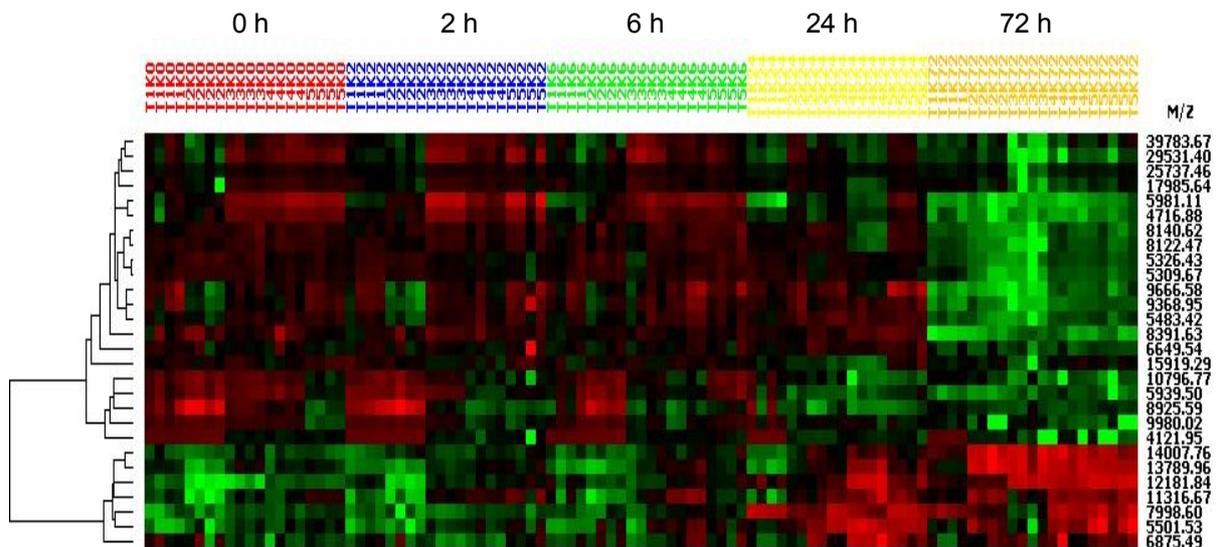
#### 4.11 Auswertung von SELDI ProteinChip®-Daten

In einem Zeitkurvenexperiment mit unbehandelten primären Rattenhepatozyten von 0 - 72 h auf SELDI ProteinChips® wurden nach 72 h 21 Proteine signifikant reprimiert und sieben Proteine signifikant induziert. Abbildung 4.34 zeigt exemplarisch je einen Peak eines im Zeitverlauf reprimierten bzw. induzierten Proteins.

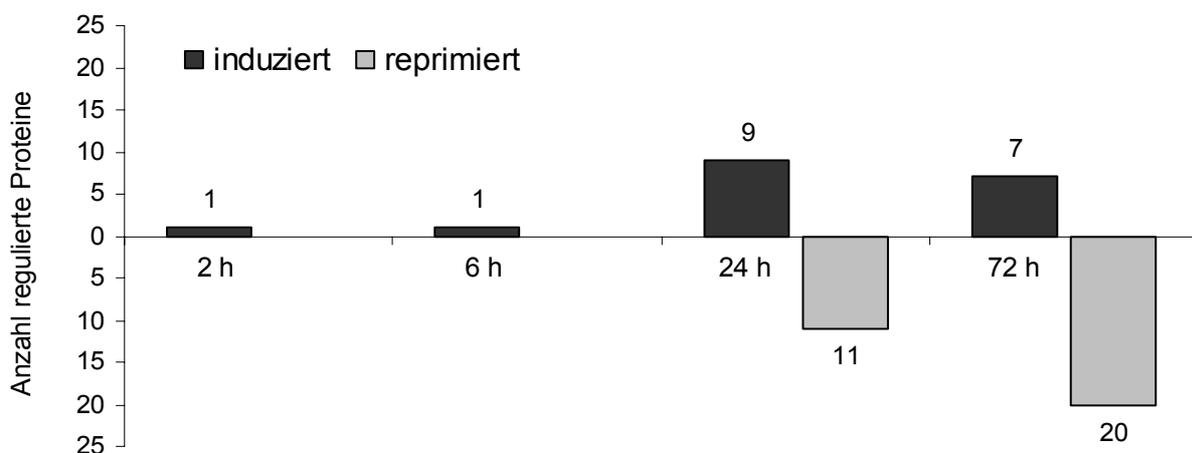


**Abb. 4.34:** Peak-Spektren aus SELDI-TOF-MS-Analysen der Zeitkurvenversuche mit primären Rattenhepatozyten auf CM10-Chips. Die fünf Spektren stehen für die einzelnen Zeitwerte von 0 - 72 h. Auf der x-Achse ist die Massen-Skala der Proteinpeaks abgebildet. Der grün (rot) umrandete Bereich steht exemplarisch für ein im Zeitverlauf reprimiertes (induziertes) Protein (n = 20; p < 0,001 nach One-Way ANOVA).

Im Zuge einer durchgeführten Clusteranalyse (Abb. 4.35) werden zuerst die Mittelwerte für die vier technischen Replikate gebildet und diese anschließend von den einzelnen Expressionsintensitäten der Peaks abgezogen. Die Visualisierung der Signalwerte erfolgte durch eine Farbcodierung, wobei jedes farbige Rechteck für einen individuellen Signalwert steht. Eine rote (grüne) Farbcodierung der Cluster zeigt an, ob eine erhöhte (erniedrigte) Peakintensität und damit Proteinexpression (induziert bzw. reprimiert) relativ zum Mittelwert für den entsprechenden Zeitpunkt auftrat.

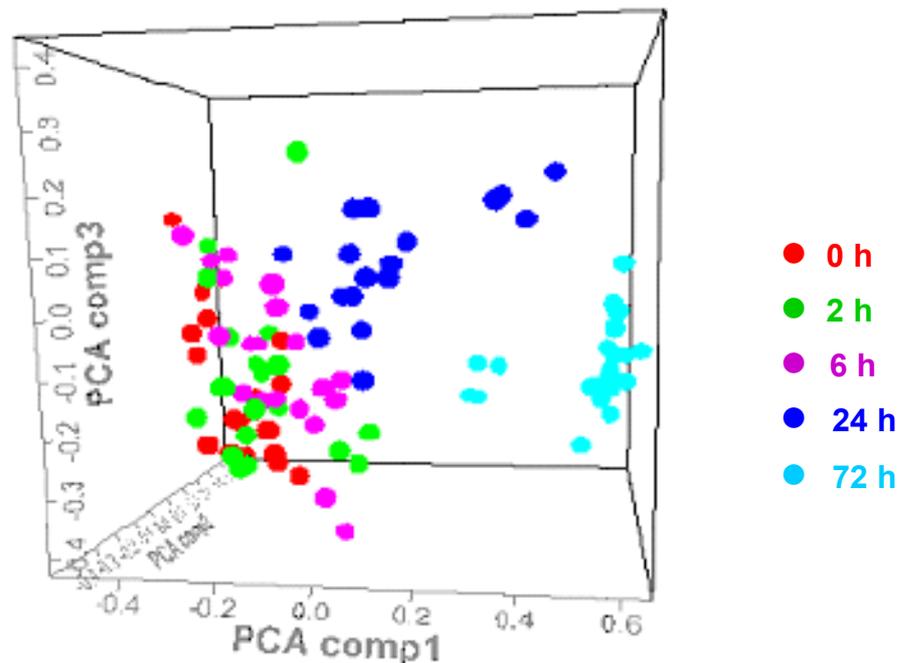


**Abb. 4.35:** 2D-HEAT-Map für SELDI-TOF-MS-Ergebnisse aus Zeitkurvenversuchen mit primären Rattenhepatozyten zur Darstellung differenziell exprimierter Proteine. In diesem 2D-Clustering korreliert jedes Rechteck in der Matrix mit einem Protein mit induzierten (rot) oder reprimierten (grün) Expressionswerten relativ zum Mittelwert. Die Zeilen repräsentieren das jeweilige Protein einschließlich der aus der Flugzeit berechneten Masse (M/Z). Die fünf Zeitpunkte (0, 2, 6, 24 und 72 h) mit den jeweils fünf biologischen (T1 - T5) und vier technischen Replikaten sind in den Spalten dargestellt ( $n = 20$ ;  $p < 0,001$  nach One-Way ANOVA).



**Abb. 4.36:** Anzahl differenziell exprimierter Proteine durch SELDI-TOF-MS-Analysen aus Zeitkurvenversuchen mit primären Rattenhepatozyten. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (2, 6, 24 und 72 h) dargestellt, auf der y-Achse die Gesamtzahl der mehr als 2-fach induzierten (dunkelgrau) bzw. reprimierten (grau) Proteine ( $n = 20$ ;  $p < 0,001$  nach One-Way ANOVA).

Die sich kaum verändernde Farbverteilung in Abbildung 4.35 zwischen den Zeitpunkten 0, 2 und 6 h macht deutlich, dass es nur minimale Veränderungen in den Zellen gab. An der 24 h-Marke ist ein Farbübergang erkennbar, der im Bereich von 72 h noch deutlicher ausgeprägt ist und auf eine veränderte Regulation des jeweiligen Proteins hinweist. In Abb. 4.36 ist die Anzahl der differentiell regulierten Proteine pro Zeitpunkt dargestellt. Während nach 2 und 6 h nur einige induzierte Proteine auftraten, wurde ab 24 h eine deutlich höhere Zahl an Proteinen sowohl induziert als auch reprimiert. Dieses Ansteigen der Proteinregulationen auf den SELDI ProteinChips<sup>®</sup> mit zunehmender Zeitdauer deckte sich mit den Resultaten aus den 2D-Gelen.

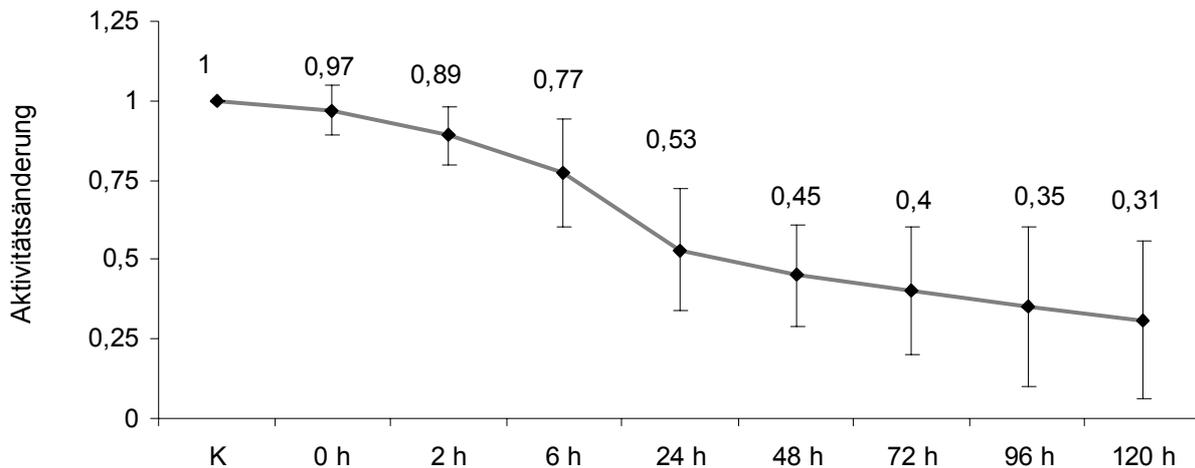


**Abb. 4.37:** Principal Component Analysis aus SELDI-TOF-MS-Ergebnissen der Zeitkurvenversuche mit primären Rattenhepatozyten. Die analysierten Zeitpunkte: 0 h (rot), 2 h (grün), 6 h (pink), 24 h (blau) und 72 h (hellblau) unterschieden sich in der differentiellen Expression signifikanter Proteine und können dadurch in Cluster eingeteilt werden. Jeder dargestellte Punkt entspricht einem regulierten Protein-Peak in der jeweiligen Gruppe ( $n = 20$ ;  $p < 0,001$  nach One-Way ANOVA).

In einer PCA (Principal Component Analysis, Abb. 4.37) konnten Veränderungen der Proteinexpression zu den einzelnen Zeitpunkten ebenfalls deutlich gemacht werden. So ließen sich der 72 und 24 h-Zeitpunkt von rechts nach links sehr gut in Gruppen einordnen. Der optisch deutlichste Unterschied trat in den SELDI-TOF-MS-Versuchen ebenso wie in bereits beschriebenen Ergebnissen anderer Methoden zwischen 24 h und späteren Zeitpunkten auf. Die Abstände zwischen den frühen Zeitpunkten fielen nicht ganz so deutlich aus, da sich die entsprechenden Cluster nicht übersichtlich in einer engen Gruppe anordneten, sondern vertikal verteilt lagen. Dennoch konnte zwischen 0, 2 und 6 h differenziert werden. Allerdings zeigten sich die Übergänge eher fließend, je näher die Werte zeitlich beieinander lagen.

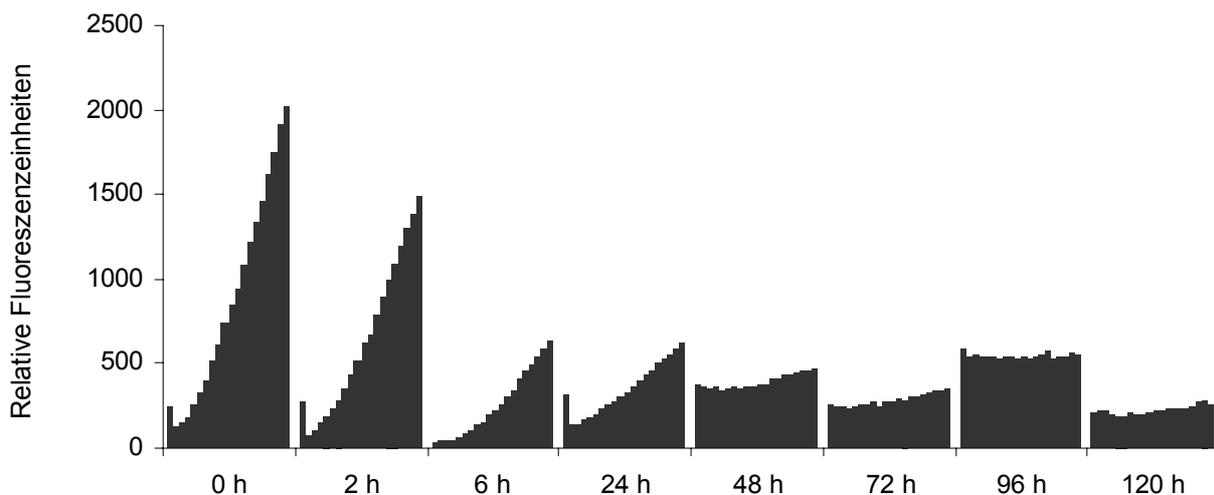
## 4.12 Ergebnisse der Katalase-Aktivitätsmessungen

In den Enzymassays für die Aktivitätsmessungen der Katalase konnten die Ergebnisse für die Gen- und Proteinexpression bestätigt werden. Nach 48 h fiel die Aktivität unter 50 % des Ausgangswertes, beim letzten Messpunkt nach 120 h waren noch 31 % Aktivität zu verzeichnen. Durch hohe Aktivitätsschwankungen der einzelnen Replikate kam es zu relativ hohen Standardfehlern, was laut durchgeführtem t-Test nicht zu einem signifikanten Absinken führte. Ungeachtet dessen war eine deutliche Abnahme-Tendenz zu erkennen (Abb. 4.38).



**Abb. 4.38:** Katalase-Aktivitätsmessungen an primären Rattenhepatozyten. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (0 - 120 h) dargestellt, auf der y-Achse die Aktivitätsänderung der Katalase bezogen auf eine Kontrolle ohne Protein (n = 4; \*p < 0,001 nach t-Test).

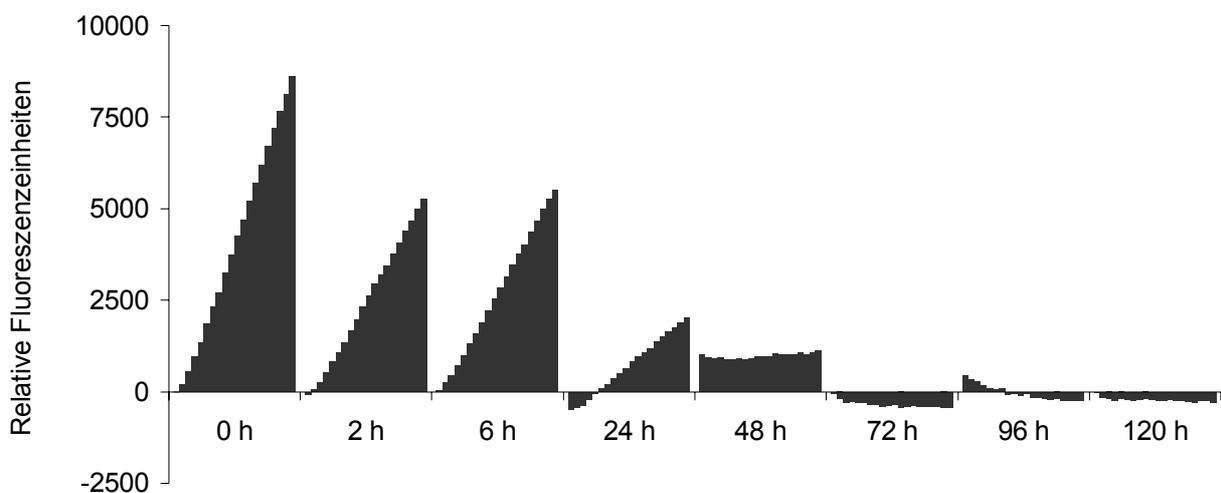
## 4.13 Cytochrom-P450-Monooxygenasen-Aktivitätsmessungen



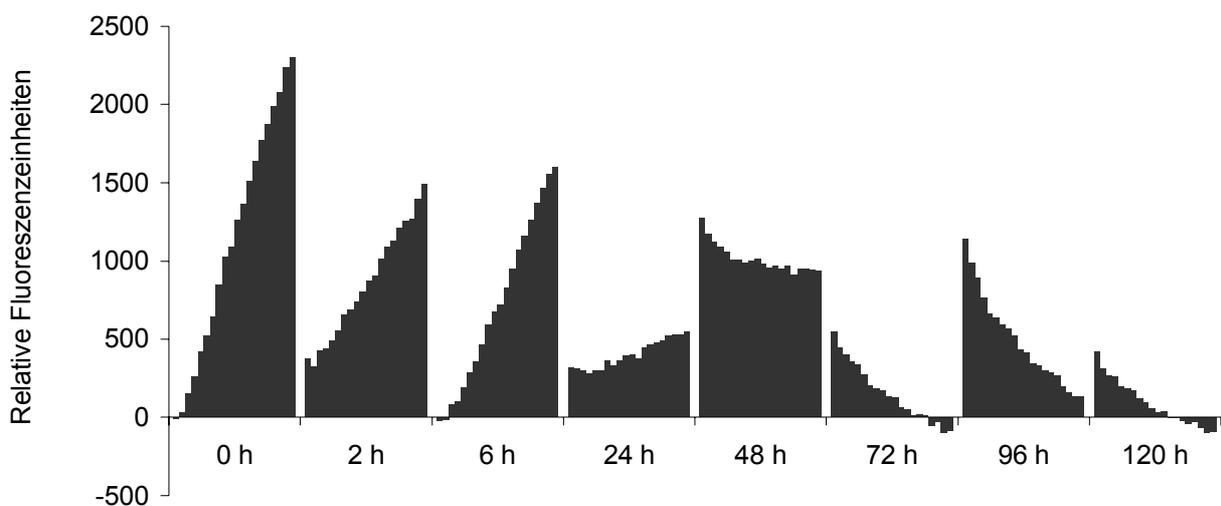
**Abb. 4.39:** Durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen der Familien CYP 1A und 2B umgesetzte BROD-Einheiten in prim. Rattenhepatozyten. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (0 - 120 h) dargestellt, auf der y-Achse die durch den Umsatz von BROD gemessenen Fluoreszenzeinheiten. Für jeden Zeitpunkt erfolgte die Messung über einen Zeitraum von 20 min jeweils alle 60 sec (n = 3).

In den Aktivitätsmessungen für Monooxygenasen der Familien CYP 1A und 2B (Abb. 4.39 - 4.41) konnten die in den Microarray-Experimenten erhaltenen Genexpressionsdaten bestätigt werden. Die Aktivität der Cytochrom-P450-Monooxygenasen wurde direkt durch den Umsatz der Substrate ermittelt. In allen drei Substratmessungen zeigte sich ein Abfall der Cytochrom-P450-Aktivität bis hin zum 24 h-Zeitpunkt.

Nach 24 h war nur noch ein sehr schwacher Umsatz der Substrate durch die Monooxygenasen feststellbar, wobei EROD (Abb. 4.40) und MROD (Abb. 4.41) sogar fallende bzw. negative Umsätze aufwiesen. Die Cytochrom-P450-Aktivität bewegte sich an der Messbarkeitsgrenze; die unvollständige Hemmung der Phase-II-Enzyme durch den Inhibitor Salicylamid bewirkte weiterhin, dass entstandenes Resorufin weiter metabolisiert wurde und somit fallende bzw. negative Werte (nach Abzug des Blanks) resultierten.

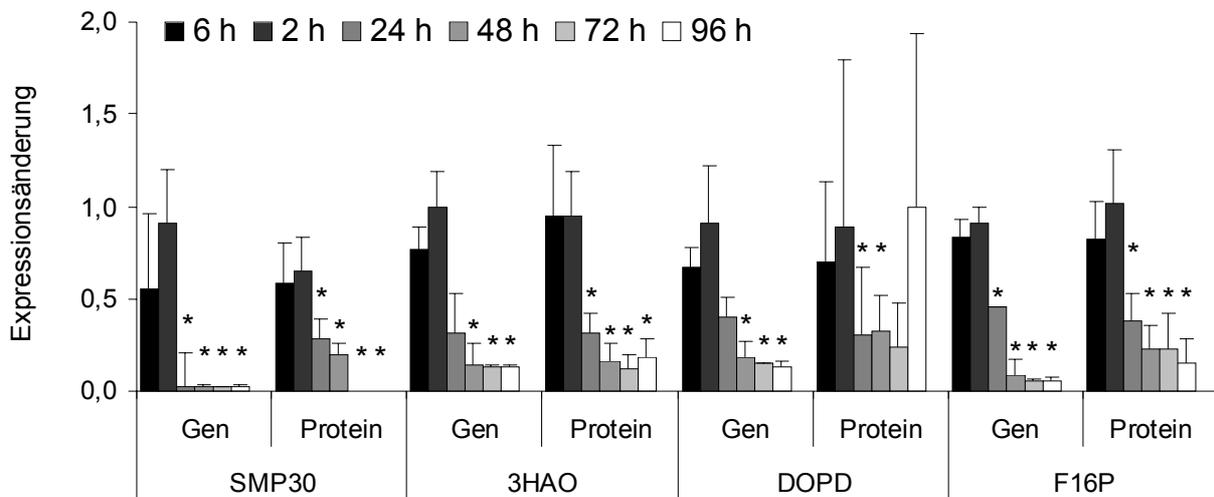


**Abb. 4.40:** Durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen der Familie CYP 1A umgesetzte EROD-Einheiten in prim. Rattenhepatozyten. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (0 -120 h) dargestellt, auf der y-Achse die durch den Umsatz von EROD gemessenen Fluoreszenzeinheiten. Für jeden Zeitpunkt erfolgte die Messung über einen Zeitraum von 20 min jeweils alle 60 sec (n = 3).



**Abb. 4.41:** Durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen der Familie CYP 2B umgesetzte MROD-Einheiten in prim. Rattenhepatozyten. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (0 -120 h) dargestellt, auf der y-Achse die durch den Umsatz von MROD gemessenen Fluoreszenzeinheiten. Für jeden Zeitpunkt erfolgte die Messung über einen Zeitraum von 20 min jeweils alle 60 sec (n = 3).

#### 4.14 Direkter Vergleich zwischen Genexpression aus Affymetrix-Daten und Proteinexpression aus 2D-Gelen

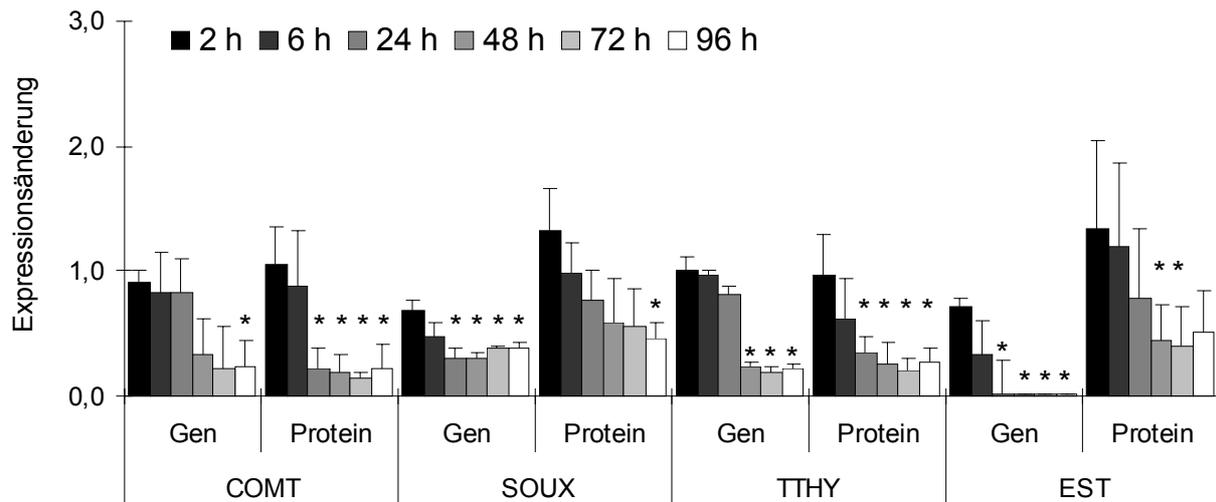


**Abb. 4.42:** Direkter Vergleich von Gen- und Proteinexpressionsänderungen in Zeitserien von primären Rattenhepatozyten aus Affymetrix GeneChips® und 2D-Gelen. SMP30 = Senescence Marker Protein 30, 3HAO = 3-Hydroxyanthranilat-3,4-Dioxygenase, DOPD = D-Dopachromtautomerase, F16P = Fruktose-1,6-bisphosphatase. Auf der x-Achse sind parallel für Gen- und Proteinexpression die Zeitwerte 2 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h sowie 96 h (abnehmende Graustufen) abgebildet. Die auf der y-Achse berechneten Expressionsänderungen beziehen sich auf die den Referenzwert bei 0 h (Affymetrix:  $n = 3$ ;  $*p < 0,001$  nach One-Way ANOVA; 2D-Gele:  $n = 15$ ;  $*p < 0,01$  nach Mann-Whitney U-Test).

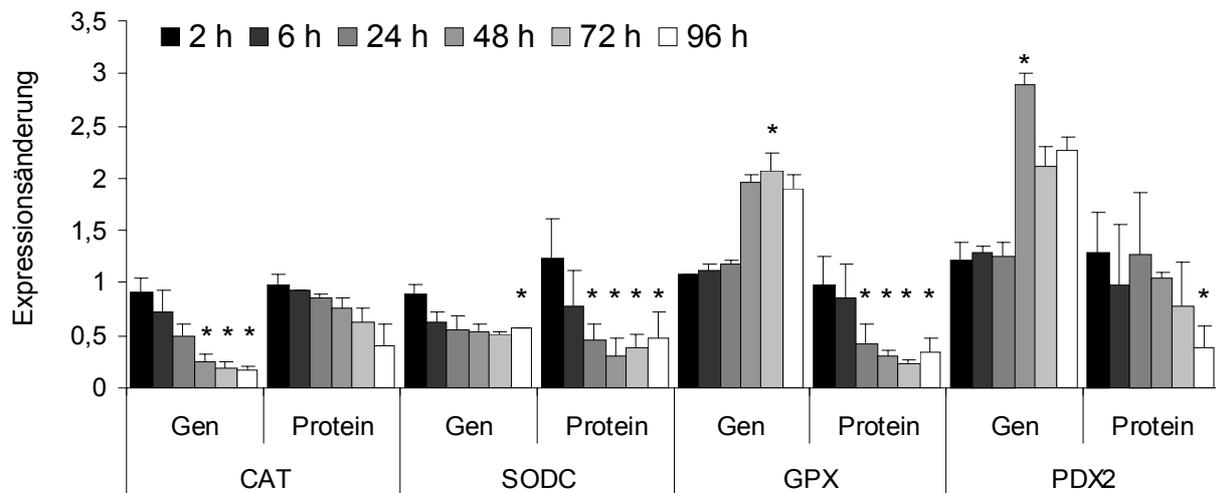
Einen besonders interessanten Teil der Auswertung stellte der direkte Vergleich von Gen- und Proteinexpressionsverläufen von identischen Proben dar. Die Abbildungen 4.42 - 4.47 zeigen das Expressionsverhalten für 24 der aus den 2D-Gelen identifizierten Proteine im rechten Bereich und jeweils links dazu für die selben Zeitpunkte das Genexpressionsverhalten für die dazu korrespondierenden Gene auf dem Affymetrix GeneChip®. Die Proteinexpressionswerte für Katalase wurden aus einem Western-Blot ermittelt. Die in den Abbildungen dargestellten Werte beziehen sich sowohl bei den Gen- als auch bei den Proteinwerten auf den 0 h-Zeitwert.

Für die Enzyme Senescence Marker Protein 30 (SMP30), 3-Hydroxyanthranilat-3,4-dioxygenase (3HAO), Fruktose-1,6-bisphosphatase (F16P) sowie D-Dopachromtautomerase (DOPD) in Abb. 4.42 zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen Gen- und Proteinexpression. So wurden alle vier Enzyme im Zeitverlauf in beiden Systemen reprimiert. Auch die Stärke der Regulation ist vergleichbar. Das auffällige Ansteigen der Proteinexpression nach 96 h im Falle von DOPD beruht höchstwahrscheinlich auf Artefakten, was durch den erheblichen Fehlerbalken in den Diagrammen erkennbar wird.

Für die in Abb. 4.43 dargestellten Enzyme Catechol-O-Methyltransferase (COMT), Sulfioxidase (SOX), Transthyretin Precursor (TTHY) und Sulfotransferase (EST) bestand ebenfalls eine hohe Korrelation zwischen Gen- und Proteinexpressionsveränderungen. Alle vier Enzyme wurden im Zeitverlauf signifikant reprimiert. Bei der Sulfioxidase und der Sulfotransferase kam es jedoch zunächst zu einem schwachen, nicht signifikanten Anstieg der Proteinexpression nach 2 und 6 h.

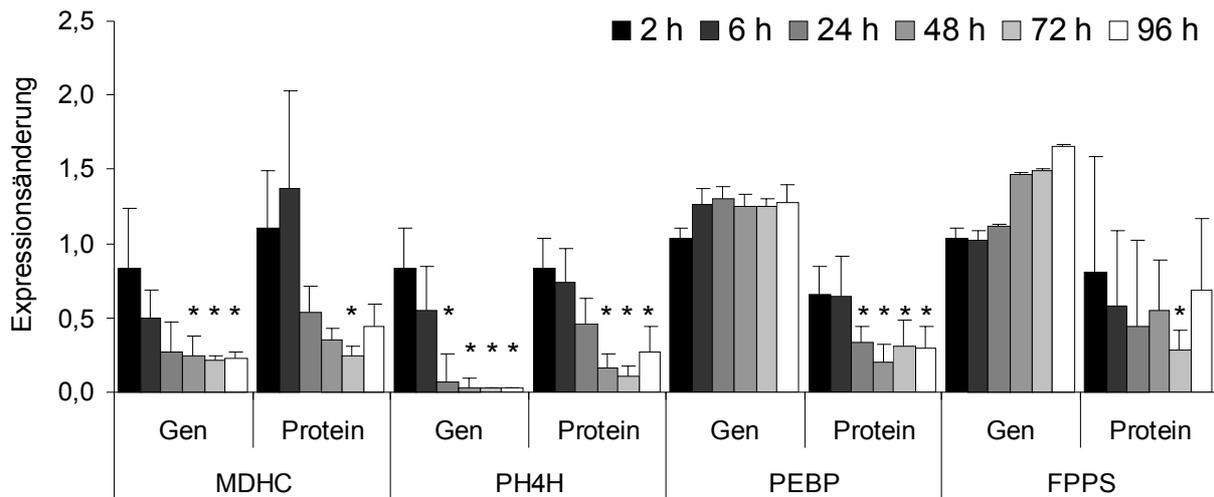


**Abb. 4.43:** Direkter Vergleich von Gen- und Proteinexpressionsänderungen in Zeitserien (0 h - 96 h) von primären Rattenhepatozyten aus Affymetrix GeneChips® und 2D-Gelen. COMT = Catechol-*O*-Methyltransferase, SOUX = Sulfitoxidase, TTHY = Transthyretin Precursor, EST = Sulfofransferase (Östrogen). Auf der x-Achse sind parallel für Gen- und Proteinexpression die Zeitwerte 2 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h sowie 96 h (abnehmende Graustufen) abgebildet. Die auf der y-Achse berechneten Expressionsänderungen beziehen sich auf den Referenzwert bei 0 h (Affymetrix: n = 3; \*p < 0,001 nach One-Way ANOVA; 2D-Gele: n = 15; \*p < 0,01 nach Mann-Whitney U-Test).



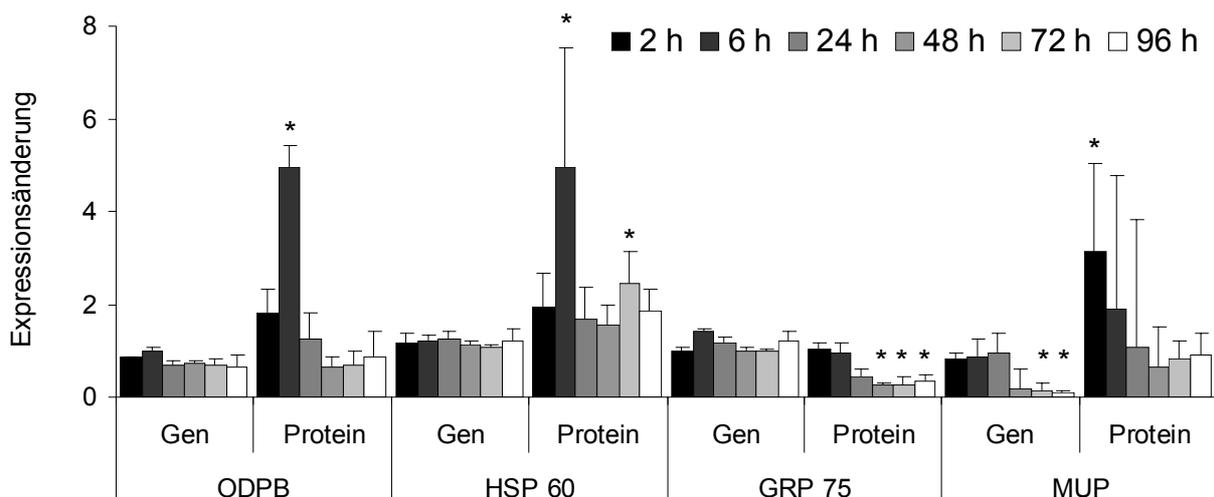
**Abb. 4.44:** Direkter Vergleich von Gen- und Proteinexpressionsänderungen in Zeitserien (0 h - 96 h) von primären Rattenhepatozyten aus Affymetrix GeneChips® und 2D-Gelen. CAT = Katalase, SODC = Superoxiddismutase, GPX = Glutathionperoxidase, PDX2 = Peroxiredoxin 2. Auf der x-Achse sind parallel für Gen- und Proteinexpression die Zeitwerte 2 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h sowie 96 h (abnehmende Graustufen) abgebildet. Die auf der y-Achse berechneten Expressionsänderungen beziehen sich auf den Referenzwert bei 0 h (Affymetrix: n = 3; \*p < 0,001 nach One-Way ANOVA; 2D-Gele: n = 15; \*p < 0,01 nach Mann-Whitney U-Test).

Bei den in Abb. 4.44 behandelten Enzymen verhielt es sich mit der Proteinexpression ähnlich wie bei den vorherigen Enzymen, sie wurden im Zeitverlauf reprimiert. Die Genexpression fiel ebenfalls bei Katalase (CAT) und Superoxiddismutase (SOD), für Glutathionperoxidase (GPX) und Peroxiredoxin 2 (PDX2) waren im Zeitverlauf hingegen ansteigende Genexpressionswerte erkennbar.



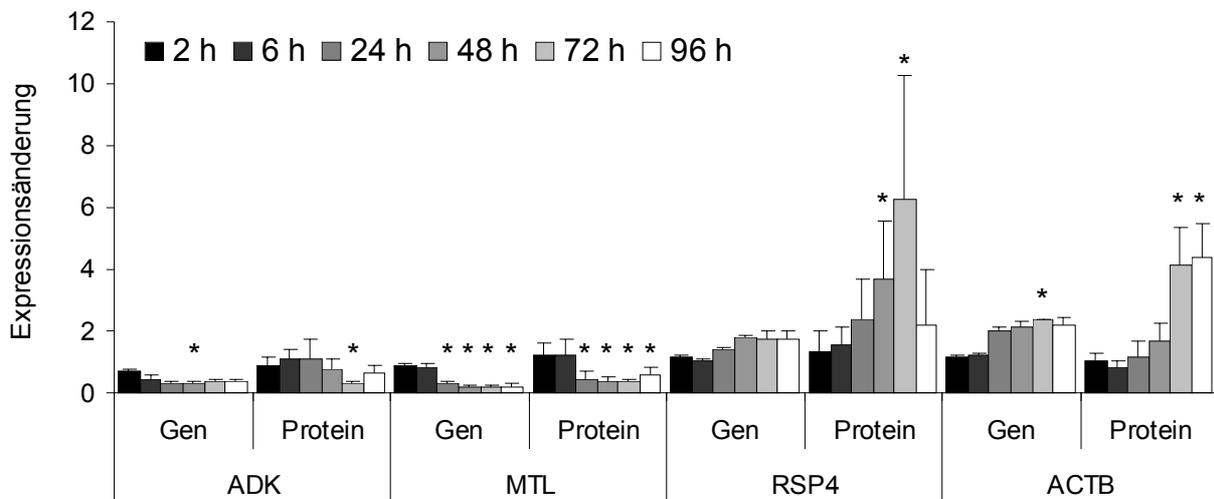
**Abb. 4.45:** Direkter Vergleich von Gen- und Proteinexpressionsänderungen in Zeitserien (0 h - 96 h) von primären Rattenhepatozyten aus Affymetrix GeneChips® und 2D-Gelen. MDHC = Malatdehydrogenase, PH4H = Phenylalanin-4-hydroxylase, PEBP = Phosphatidylethanolamin-Binding-Protein, FPPS = Farnesylpyrophosphatsynthase. Auf der x-Achse sind parallel für Gen- und Proteinexpression die Zeitwerte 2 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h sowie 96 h (abnehmende Graustufen) abgebildet. Die auf der y-Achse berechneten Expressionsänderungen beziehen sich auf den Referenzwert bei 0 h (Affymetrix: n = 3; \*p < 0,001 nach One-Way ANOVA; 2D-Gele: n = 15; \*p < 0,01 nach Mann-Whitney U-Test).

Die Malatdehydrogenase (MDHC) und die Phenylalanin-4-hydroxylase (PH4H) zeigten ebenfalls eine hohe Korrelation zwischen Gen- und Proteinexpressionsregulation: beide Enzyme wurden signifikant reprimiert. Das Phosphatidylethanolamin-Binding-Protein (PEBP) und Farnesylpyrophosphatsynthase (FPPS) dagegen wurden auf Genebene nicht auffällig reguliert. In den 2D-Gelen war allerdings eine Regulation der Proteine nach unten zu erkennen (Abb. 4.45).



**Abb. 4.46:** Direkter Vergleich von Gen- und Proteinexpressionsänderungen in Zeitserien (0 h - 96 h) von primären Rattenhepatozyten aus Affymetrix GeneChips® und 2D-Gelen. ODPB = Pyruvatdehydrogenase (E1), HSP 60 = 60 kDa Heat Shock Protein, GRP 75 = Glucose-Regulated-Protein 75, MUP = Major Urinary Protein. Auf der x-Achse sind parallel für Gen- und Proteinexpression die Zeitwerte 2 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h sowie 96 h (abnehmende Graustufen) abgebildet. Die auf der y-Achse berechneten Expressionsänderungen beziehen sich auf den Referenzwert bei 0 h (Affymetrix: n = 3; \*p < 0,001 nach One-Way ANOVA; 2D-Gele: n = 15; \*p < 0,01 nach Mann-Whitney U-Test).

Bei den ersten drei in Abb. 4.46 gezeigten Enzymen kam es auf Ebene der mRNA nicht zu signifikanten Veränderungen. Auf der Proteinebene der Pyruvatdehydrogenase (ODPB) kam es nach 6 h zu einem starken Anstieg, der sich nach 24 h jedoch wieder auf Normalwerte einpendelte. Für das Heat Shock Protein 60 (HSP 60) verhielt es sich ähnlich, der Rückgang fiel lediglich schwächer aus und die Proteinwerte blieben leicht erhöht. Für das Glucose-Regulated-Protein 75 (GRP 75) wurde im Zeitverlauf eine signifikante Regulation der Proteinwerte nach unten verzeichnet. Bei den vorliegenden Proteinen konnte so gut wie keine Korrelation zwischen auftretender Gen- und Proteinregulation gefunden werden. Dies war auch beim Major Urinary Protein (MUP) der Fall. Es wurde zwar auf Genebene signifikant reprimiert, dessen Proteinexpression dagegen nach 2 h signifikant induziert. Im Zeitverlauf pendelte sich letztere auf Werte knapp unter dem Ausgangswert ein. Es bestand keine hohe Korrelation zwischen Gen- und Proteinexpression.

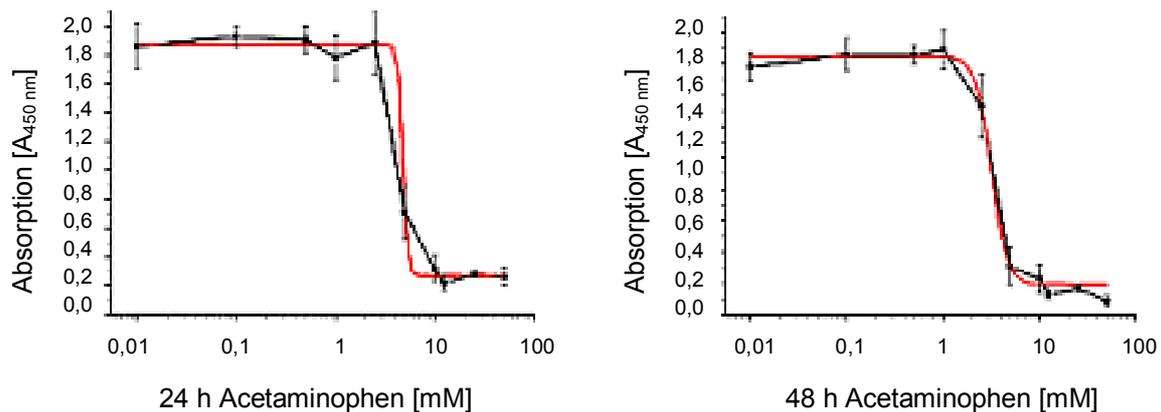


**Abb. 4.47:** Direkter Vergleich von Gen- und Proteinexpressionsänderungen in Zeitserien (0-96 h) von primären Rattenhepatozyten aus Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> und 2D-Gelen. ADK = Adenosinkinase, MTL = Methioninadenosyltransferase, RSP4 = Laminin-Rezeptor, ACTB =  $\beta$ -Actin. Auf der x-Achse sind parallel für Gen- und Proteinexpression die Zeitwerte 2 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h sowie 96 h (abnehmende Graustufen) abgebildet. Die auf der y-Achse berechneten Expressionsänderungen beziehen sich auf den Referenzwert bei 0 h (Affymetrix: n = 3; \*p < 0,001 nach One-Way ANOVA; 2D-Gele: n = 15; \*p < 0,01 nach Mann-Whitney U-Test).

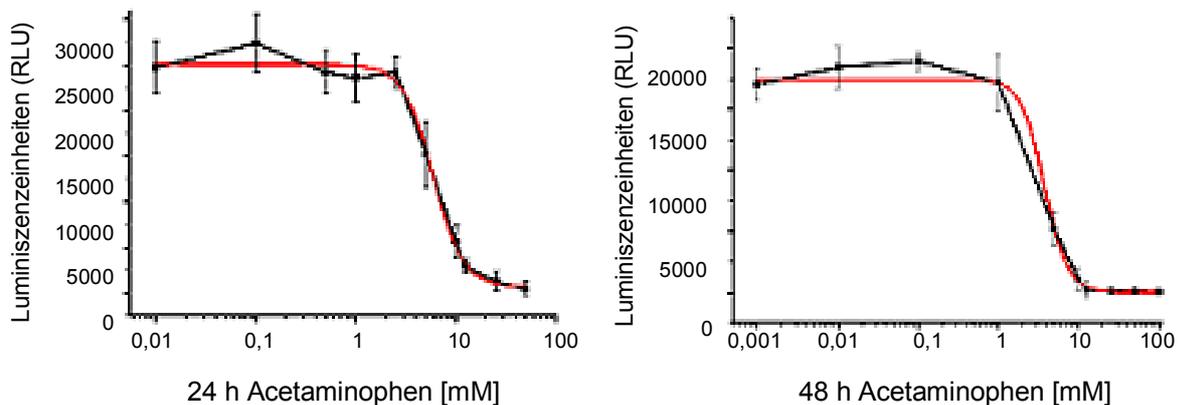
Die Adenosinkinase (ADK) und die Methioninadenosyltransferase (MTL) zeigten bei der Proteinexpression zunächst einen leichten Anstieg, bevor die Expression reprimiert wurde (Abb. 4.47). Auf der mRNA-Ebene wurden diese Enzyme dagegen sofort reprimiert. Ein ähnliches Verhalten in den Expressionswerten von mRNA und Protein zeigte  $\beta$ -Actin, (ACTB), welches in beiden Fällen signifikant induziert wurde. Die Veränderung fiel auf Proteinebene langsamer, dafür aber am Ende doppelt so stark aus als auf Genebene. Für den Laminin-Rezeptor wurde sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene eine erhöhte Expression festgestellt. Während sie aber auf Genebene nicht signifikant ausfiel, kam es auf der Proteinebene zu einer stärkeren Erhöhung, allerdings auch mit größeren Standardfehlern.

## 4.15 Cytotoxizitätstests

Die Bestimmung des  $LC_{50}$ -Wertes für Acetaminophen an primären Rattenhepatozyten auf Collagen-Monolayern wurde mit zwei verschiedenen Cytotoxizitäts-Tests (WST-1, ATP-Messung) zu zwei Zeitpunkten (24 bzw. 48 h) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden gegen den Logarithmus der eingesetzten Konzentrationen aufgetragen und der  $LC_{50}$ -Wert (entspricht dem Wendepunkt der Kurve) nach Anpassung einer sigmoidalen Kurve berechnet. Aus den ermittelten  $LC_{50}$ -Werten aus je fünf voneinander unabhängigen Experimenten wurden die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen gebildet.



**Abb. 4.48:**  $LC_{50}$ -Bestimmung von Acetaminophen nach 24 und 48 h mit WST-1 an primären Rattenhepatozyten. Auf der x-Achse sind jeweils die eingesetzten Konzentrationen an Acetaminophen (0,01 - 100 mM) dargestellt, auf der y-Achse die gemessenen Absorptionswerte. Der  $LC_{50}$ -Wert wurde durch nichtlineare Regression berechnet (n = 5).



**Abb. 4.49:**  $LC_{50}$ -Bestimmung von Acetaminophen nach 24 und 48 h mit dem CellTiter-Glo<sup>TM</sup> Luminescent Cell Viability Test an primären Rattenhepatozyten. Auf der x-Achse sind jeweils die eingesetzten Konzentrationen an Acetaminophen (24 h: 0,01 - 100 nM; 48 h: 0,001 - 100 mM) dargestellt, auf der y-Achse die gemessenen Lumineszenzeinheiten. Der  $LC_{50}$ -Wert wurde durch nichtlineare Regression berechnet (n = 5).

Nach der Berechnung ergab sich nach 24 h ein  $LC_{50}$ -Wert von  $4,33 \text{ mM} \pm 1,05 \text{ mM}$  in den mit WST-1 (Abb. 4.48, Tab. 4.4) gemessenen Zellen und  $5,82 \text{ mM} \pm 0,42 \text{ mM}$  für den CellTiter-Glo<sup>TM</sup> Luminescent Cell Viability Test (Abb. 4.49, Tab. 4.4) zur Bestimmung der ATP-Werte. Nach 48 h sank der  $LC_{50}$ -Wert in beiden Testsystemen auf  $3,17 \text{ mM} \pm 0,13 \text{ mM}$

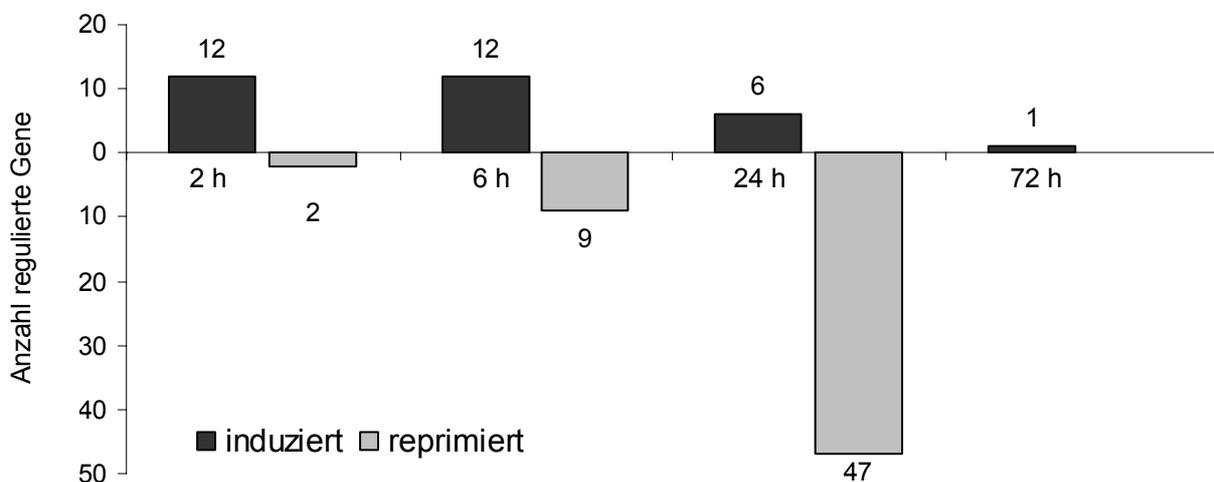
im WST-1-Test und auf  $3,74 \text{ mM} \pm 0,63 \text{ mM}$  im ATP-Test. Zu beiden Zeitpunkten ermittelte der WST-1-Test einen deutlich niedrigeren Wert als der ATP-Test (24 h: 17,9 %; 48 h: 34,4 %). Es zeigte sich ebenfalls ein eindeutiger Rückgang des cytotoxischen Wertes in beiden Systemen für Acetaminophen bei längerer Dosierung. So fiel der Wert nach 48 h im WST-1-Test um 38,3 % und im ATP-Test um 55,6 % niedriger aus als nach der 24 h-Messung.

**Tab. 4.4:** An primären Rattenhepatozyten gemessene  $LC_{50}$ -Cytotoxizitätswerte für Acetaminophen nach 24 und 48 h mit dem WST-1-Test und dem CellTiter-Glo™ Luminiscent Cell Viability Test (n = 5).

| Testmethode                                    | 24 h                       | 48 h                       |
|--|----------------------------|----------------------------|
| WST-1-Test                                     | $4,33 \pm 1,05 \text{ mM}$ | $3,17 \pm 0,13 \text{ mM}$ |
| CellTiter-Glo™ Luminiscent Cell Viability Test | $5,82 \pm 0,42 \text{ mM}$ | $3,74 \pm 0,63 \text{ mM}$ |

#### 4.16 Auwertung der Acetaminophen-Experimente auf Genomics-Ebene

Basierend auf den Ergebnissen der  $LC_{50}$ -Bestimmung wurden die primären Rattenhepatozyten mit zwei Konzentrationen unterhalb des  $LC_{50}$ -Wertes behandelt (Niedrigdosis [0,5 mM], Hochdosis [2 mM]). Im eigentlichen Dosierungsexperiment wurden primäre Rattenhepatozyten mit diesen beiden Konzentrationen an Acetaminophen zu vier Zeitpunkten (2, 6, 24 und 72 h) behandelt.

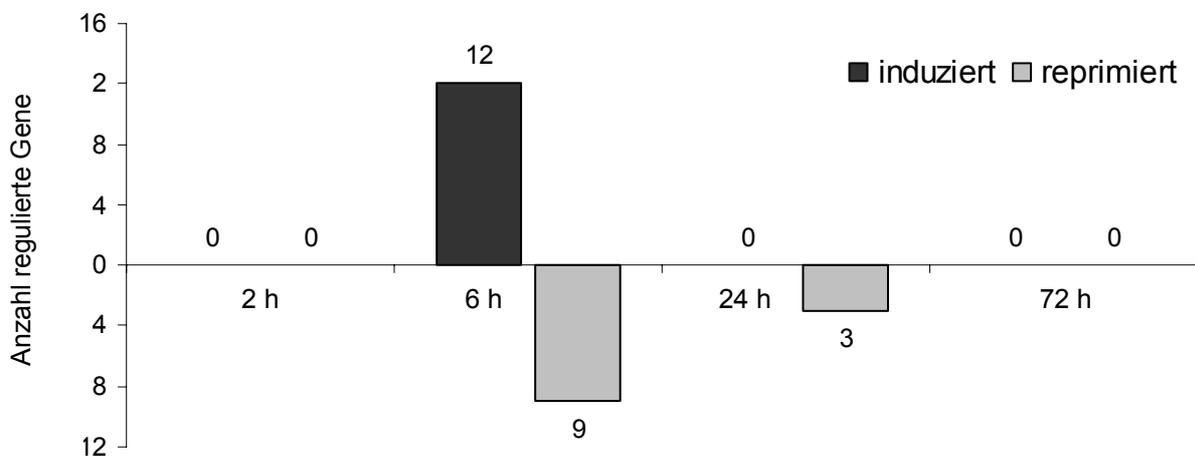


**Abb. 4.50:** Anzahl regulierter Gene auf Affymetrix GeneChips® aus Acetaminophen dosierten [2 mM] primären Rattenhepatozyten. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (2, 6, 24 und 72 h) dargestellt, auf der y-Achse die Gesamtzahl der mehr als 2-fach durch Acetaminophen induzierten (dunkelgrau) und reprimierten (grau) Gene (n = 3;  $p < 0,001$  nach One-Way ANOVA).

Die Auswertung der mit Acetaminophen dosierten Zellen zeigte inkonsistente Ergebnisse. Unter der hohen Dosis wurden nach 24 h maximal 53 Gene reguliert (Abb. 4.50), davon 47 Gene reprimiert und sechs induziert. Zu den vorausgegangenen Zeitpunkten wurden jeweils zwölf Gene induziert und zwei bzw. neun Gene reprimiert. Nach 72 h wurde nur ein einziges

verändertes Gen gefunden. Auch war die Stärke der Regulation bei den meisten Genen nur knapp über dem als signifikant geltenden 2-fachen Wert.

Bei der niedrigen Dosierung ergab sich ein weniger deutliches Bild (Abb 4.51). Abgesehen von drei schwach reprimierten Genen nach 24 h waren hier lediglich nach 6 h veränderte Gene festzustellen (zwölf Gene induziert und neun Gene reprimiert). Im Vergleich mit der hohen Dosis war erkennbar, dass es kaum Gene gab, die zu mehreren Zeitpunkten oder in beiden Dosierungen signifikant verändert wurden. So zum Beispiel JunB, das bei drei Zeitpunkten (2, 6 und 24 h) unter der hohen Dosis leicht erhöht wurde. Glutathion-S-Transferase Yb4 und Aflatoxin-B1-Aldehydreduktase wurden hingegen zu mindestens zwei Zeitpunkten und sowohl unter der niedrigen als auch der hohen Dosis schwach reprimiert. Durch die Acetaminophen-Behandlung werden durchweg Gene reguliert, die in der Zeitserie nicht signifikant verändert wurden. Der gemessenen Expressionsveränderungen sind so direkt auf Acetaminophen zurückzuführen.



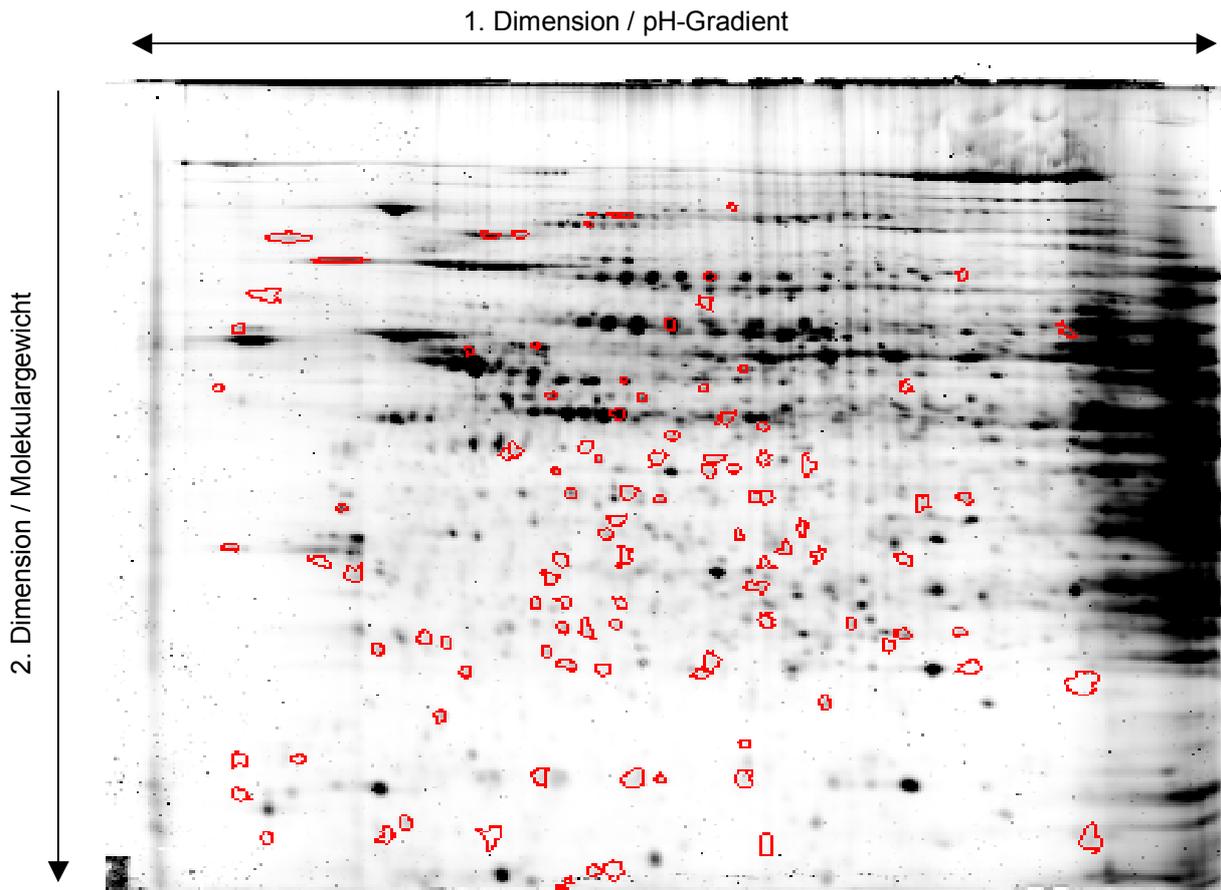
**Abb. 4.51:** Anzahl regulierter Gene auf Affymetrix GeneChips® aus Acetaminophen dosierten [0,5 mM] primären Rattenhepatozyten. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (2, 6, 24 und 72 h) dargestellt, auf der y-Achse die Gesamtzahl der mehr als 2-fach durch Acetaminophen induzierten (dunkelgrau) und reprimierten (grau) Gene ( $n = 3$ ;  $p < 0,001$  nach One-Way ANOVA).

## 4.17 Auswertung der Acetaminophen-Experimente auf Proteomics-Ebene

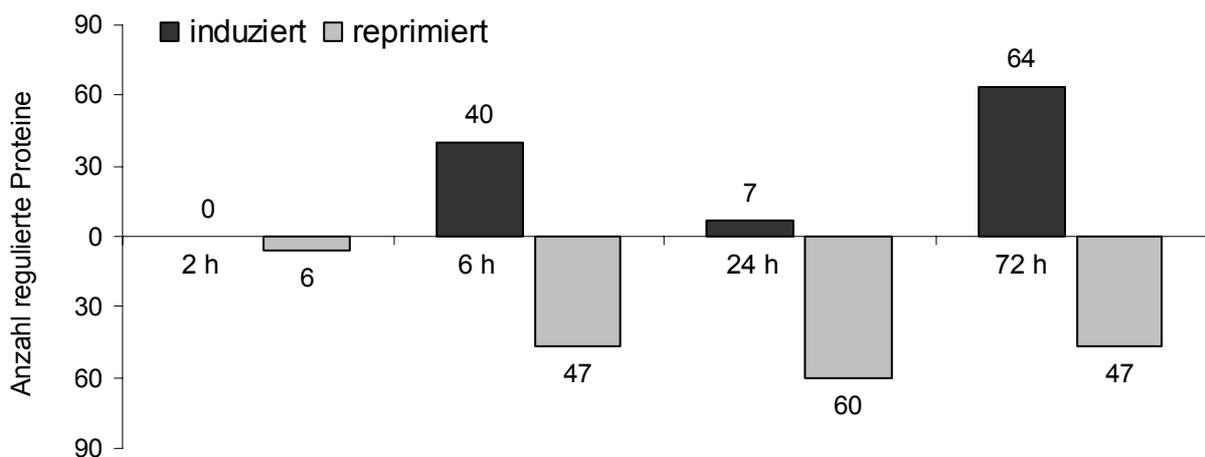
### 4.17.1 Auswertung von 2D-PAGE-Daten

Bei der Auswertung der Daten für die mit hoher Dosis Acetaminophen behandelten primären Rattenhepatozyten zeigte sich ein Anstieg von sechs nach unten regulierten Proteinen nach 2 h über 47 nach 6 h auf maximal 60 nach 24 h. Nach 72 h sank die Anzahl wieder auf 47 signifikant reprimierte Proteine. Abgesehen von einem Ausreißer nach 24 h mit lediglich sieben induzierten Proteinen erhielt man auch hier eine Zunahme an signifikant veränderten Proteinen von null nach 2 h über 40 nach 6 h bis zu 64 nach 72 h (Abb. 4.52 und 4.53).

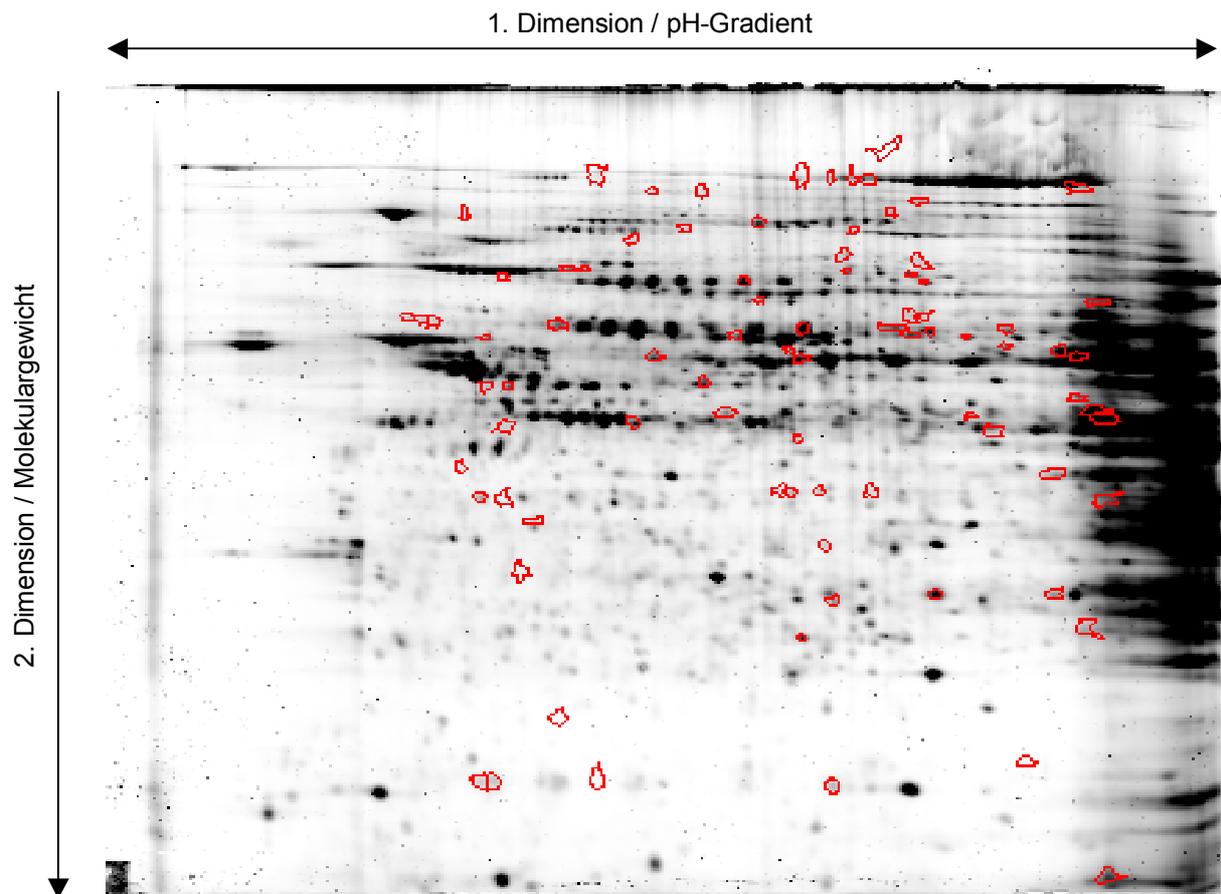
Im Vergleich zur Versuchsreihe mit hoher Dosierung an Acetaminophen wurden nach 2 h mehr Proteine sowohl signifikant nach oben (zwölf) als auch nach unten (25) reguliert (Abb 4.54 und 4.55). Nach 6 h stiegen beide Werte auf 28 an, wobei es analog zur hohen Dosierung nach 24 h zu einem Einbrechen der Anzahl nach oben regulierter Proteine auf sieben kam. Die reprimierten Proteine fielen dagegen nur leicht auf 26 ab. Die höchsten Werte sowohl für



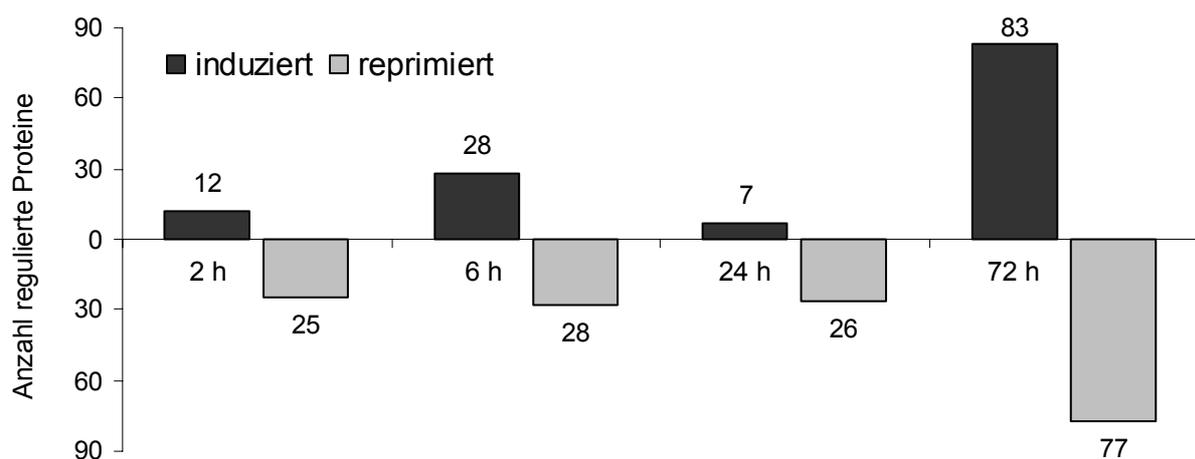
**Abb. 4.52:** Exemplarisches 2D-Gel mit allen induzierten und reprimierten Proteinen aus Acetaminophen [2 mM] behandelten primären Rattenhepatozyten nach 72 h. Dreihundert  $\mu\text{g}$  Proteinlysate wurden in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt (pH 4 - 7; 10 % SDS-Gel) und mit Ruthenium angefärbt. Durch Acetaminophen mehr als 2-fach differenziell exprimierte Proteine sind rot markiert ( $n = 15$ ;  $p < 0,01$  nach Mann-Whitney U-Test).



**Abb. 4.53:** Anzahl induzierter und reprimierter Proteine aus 2D-Gelen aus Acetaminophen [2 mM] behandelten primären Rattenhepatozyten. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (2, 6, 24 und 72 h) dargestellt, auf der y-Achse die Gesamtzahl der mehr als 2-fach durch Acetaminophen induzierten (dunkelgrau) und reprimierten (grau) Proteine ( $n = 15$ ;  $p < 0,01$  nach Mann-Whitney U-Test).



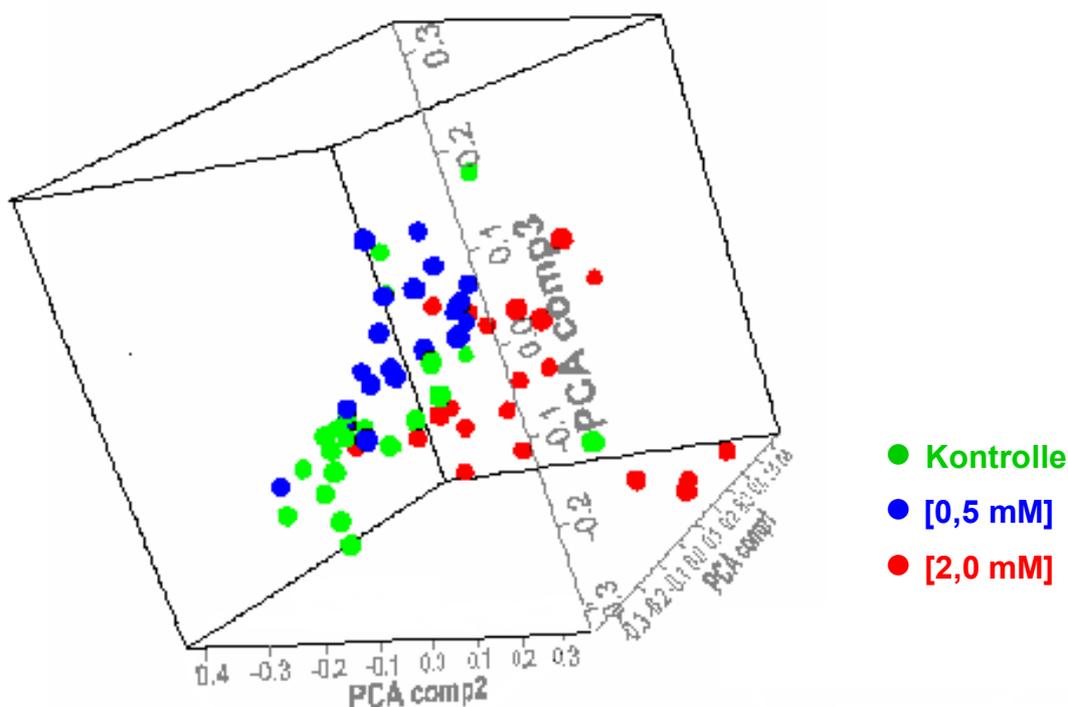
**Abb. 4.54:** Exemplarisches 2D-Gel mit allen induzierten Proteinen aus Acetaminophen [0,5 mM] behandelten primären Rattenhepatozyten nach 72 h. Dreihundert  $\mu\text{g}$  Proteinlysate wurden in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt (pH 4 - 7; 10 % SDS-Gel) und mit Ruthenium angefärbt. Durch Acetaminophen mehr als 2-fach differentiell exprimierte Proteine wurden rot markiert ( $n = 15$ ;  $p < 0,01$  nach Mann-Whitney U-Test).



**Abb. 4.55:** Anzahl induzierter und reprimierter Proteine aus 2D-Gelen aus Acetaminophen [0,5 mM] behandelten primären Rattenhepatozyten. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (2, 6, 24 und 72 h) dargestellt, auf der y-Achse die Gesamtzahl der mehr als 2-fach durch Acetaminophen induzierten (dunkelgrau) und reprimierten (grau) Proteine ( $n = 15$ ;  $p < 0,01$  nach Mann-Whitney U-Test).

induzierte als auch reprimierte Proteine gab es in der Niedrigdosis-Reihe ebenfalls nach 72 h mit 83 bzw. 77 signifikant veränderten Proteinen. Nach Auswertung der Daten war eine qualitative Aussage (Selektierung unter UV-Licht und Identifizierung der Proteine) durch zu schwache und schlecht sichtbare Spots nicht möglich. Hinsichtlich der Proteinveränderungen waren jedoch – wie oben beschrieben – quantitative Resultate realisierbar. Die regulierten Proteine aus der Acetaminophen-Behandlung konnten nicht mit den Veränderungen aus der Zeitserie in Verbindung gesetzt werden, da es sich – ebenso wie auf der Genexpressions-ebene – ausschließlich um Proteine handelte, die in der Zeitserie nicht signifikant verändert wurden.

#### 4.17.2 Auswertung von SELDI ProteinChip®-Daten



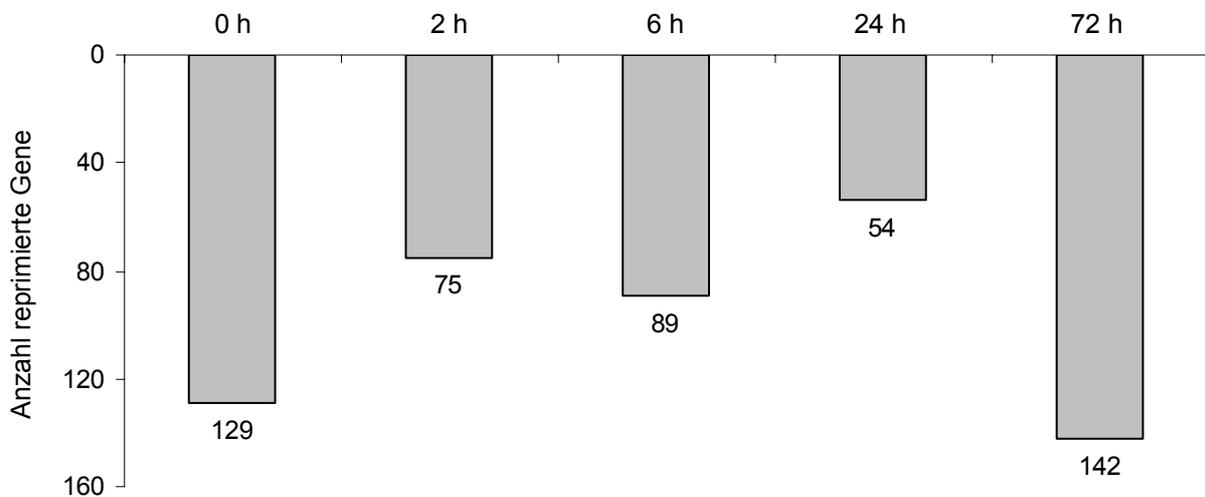
**Abb. 4.56:** Principal Component Analysis der im SELDI-TOF-MS regulierten Proteine aus Acetaminophen behandelten primären Rattenhepatozyten. Die mit drei unterschiedlichen Konzentrationen an Acetaminophen (Kontrolle = grün, 0,5 mM = blau, 2 mM = rot) behandelten primären Rattenhepatozyten unterscheiden sich in der differentiellen Expression signifikanter Proteine und können dadurch in Cluster für die entsprechenden Konzentrationen eingeteilt werden. Jeder dargestellte Punkt entspricht einem regulierten Protein-Peak in der jeweiligen Gruppe (n = 20; p < 0,001 nach One-Way ANOVA).

Auf den SELDI ProteinChips® wurden unter Berücksichtigung aller Dosen und Zeitpunkte aus dem Acetaminophen-Versuch insgesamt 21 Peaks detektiert, die sich mittels Principal Component Analysis in die drei Gruppen Kontrolle, Niedrigdosis und Hochdosis clustern ließen. Die Abgrenzung zwischen den einzelnen Clustern ist nicht sehr scharf, dennoch sind drei Bereiche erkennbar (Abb. 4.56). Mittels SELDI-TOF-MS ergaben sich somit bessere Ergebnisse als für die beiden anderen getesteten Systeme (Affymetrix GeneChips® und 2D-Gele), bei denen sich teilweise die regulierten Gene bzw. Proteine sehr inkonstant verhielten.

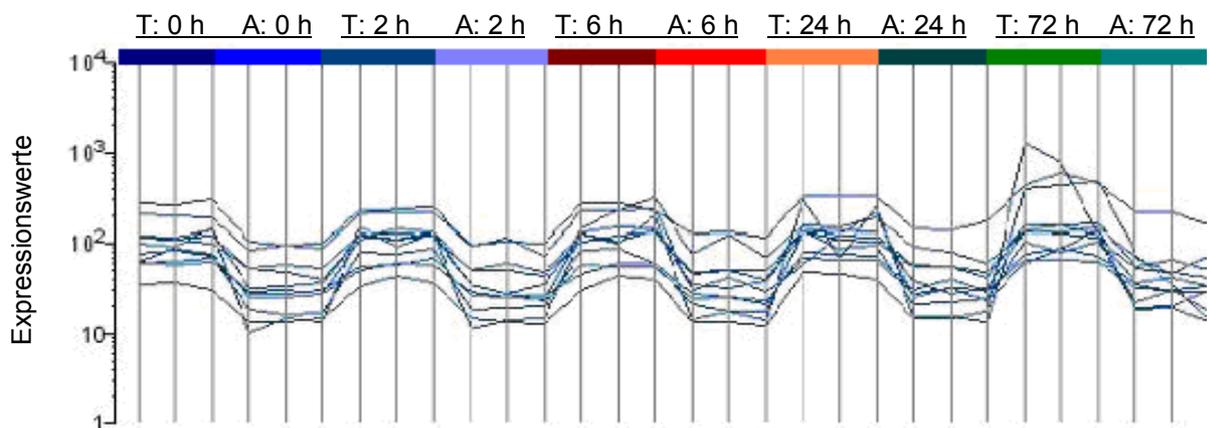
## 4.18 Auswirkungen des Enzymwechsels von Collagenase D zu Liberase Blendzyme bei der Leberperfusion

### 4.18.1 Auswertung der Affymetrix GeneChips®-Daten

In dem angestellten Vergleich der Hepatozytenzeitkurve und den Acetaminophen-Kontrollen ergab sich ein bemerkenswertes Ergebnis. Obwohl es sich beim direkten Vergleich von identischen Stundenwerten um biologische Replikate handelt, bei denen lediglich das für die Leberperfusion ursprünglich eingesetzte Enzym Collagenase D in den Acetaminophen-Versuchen durch Liberase Blendzyme ersetzt wurde, findet sich dennoch für alle Zeitpunkte eine nicht unerhebliche Anzahl an Genen in den Acetaminophen-Kontrollen niedriger exprimiert als in den Zeitkurven-Kontrollen.



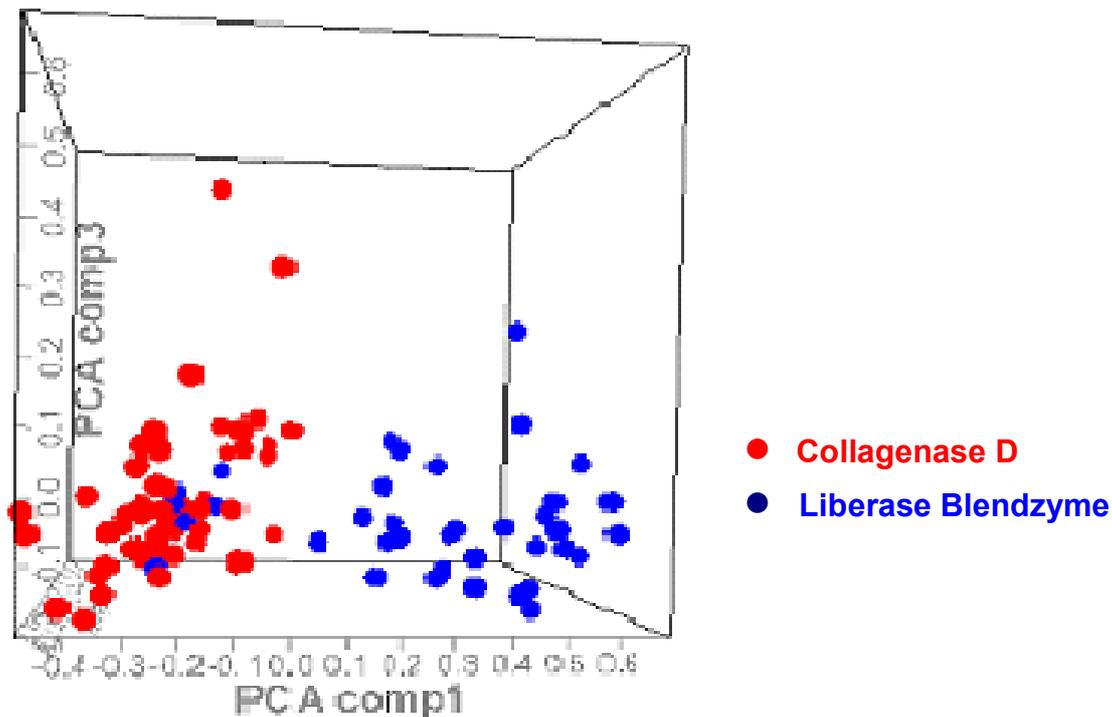
**Abb. 4.57:** Anzahl differentiell durch zwei unterschiedliche Enzyme (Collagenase D bzw. Liberase Blendzyme) exprimierter Gene. Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte (2, 6, 24 und 72 h) dargestellt, auf der y-Achse die Gesamtzahl der mehr als 2-fach durch den Enzymwechsel reprimierten Gene ( $n = 3$ ;  $p < 0,001$  nach One-Way ANOVA).



**Abb. 4.58:** Auf Affymetrix GeneChips® differentiell exprimierte Gene in Kontrollgruppen mit unterschiedlicher Perfusionslösung. Auf der x-Achse sind die Zeitpunkte 0 - 72 h jeweils für Collagenase D (T) sowie Liberase Blendzyme (A) perfundierte Tiere in drei biologischen Replikaten dargestellt. Auf der y-Achse die gemessenen Expressionswerte für elf, über alle Zeitpunkte durch den Enzymwechsel mehr als 2-fach signifikant regulierten Gene ( $n = 3$ ;  $p < 0,001$  nach One-Way ANOVA).

In Abb. 4.57 sind nach der Auswertung von Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> die Anzahl der jeweils signifikant regulierten Gene pro Zeitpunkt dargestellt. Die Anzahl der signifikant regulierten Gene schwankte zwischen den einzelnen Zeitpunkten von 54 Genen nach 24 h auf 142 als Maximum nach 72 h. Es konnten elf Gene identifiziert werden, deren Genexpression sich in allen fünf untersuchten Zeitpunkten signifikant mindestens 2-fach änderte (Abb. 4.58).

#### 4.18.2 Auswertung der SELDI ProteinChip<sup>®</sup>-Daten



**Abb. 4.59:** Principal Component Analysis der SELDI-TOF-MS-Ergebnisse aller differentiell durch zwei unterschiedliche Enzyme (Collagenase D bzw. Liberase Blendzyme) exprimierter Gene zu Kontrollzeitpunkten (2, 6, 24 und 72 h). Die mit dem jeweiligen Enzym perfundierten primären Rattenhepatozyten unterscheiden sich in der differentiellen Expression signifikanter Proteine und können dadurch in Cluster für die entsprechende Perfusionslösung eingeteilt werden. Jeder dargestellte Punkt entspricht einem regulierten Protein-Peak in der jeweiligen Gruppe (n = 8 für Collagenase D, n = 12 für Liberase Blendzyme; p < 0,001 nach One-Way ANOVA).

Abb. 4.59 soll Aufschluss darüber geben, in welchem Ausmaß ein Wechsel der Enzyme bei der Leberperfusion die Proteinexpression in primären Rattenhepatozyten beeinflusst. Wie bereits auf der Microarray-Ebene beschrieben, ließen sich Zellen, die mit verschiedenen Enzymen in der Perfusions-Lösung gewonnen wurden, in einer Principal Component Analysis aus SELDI-TOF-MS-Daten in zwei Gruppen einteilen. Zellen, die mit Collagenase D-haltiger PP2-Lösung perfundiert wurden, gruppieren sich vorzugsweise am linken Rand, während Zellen aus Perfusionen mit Liberase Blendzyme in der Lösung am rechten Bildrand clusterten.



## 5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels unterschiedlicher Methoden der Gen- und Proteinexpression zu untersuchen, ob primäre Rattenhepatozyten als Monolayer-Kulturen eine brauchbare Alternativmethode für *In vivo*-Versuche in der Toxikologie sein können. Neben einer möglichen Etablierung der unterschiedlichen Test- und Analysemethoden wurde das Zellsystem primäre Rattenhepatozyten als solches unter standardisierten Testbedingungen untersucht. Die nun folgende Diskussion der Ergebnisse geht zum Einen auf Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden ein und, soweit möglich, auch auf die Korrelation der Ergebnisse zwischen den unterschiedlichen Systemen. Abschließend werden die Resultate für das Testsystem primäre Rattenhepatozyten und die daraus folgenden Erkenntnisse diskutiert.

### 5.1 Methodische Ergebnisse

#### 5.1.1 Qualität und Quantität der verwendeten RNA-Proben und Proteinlysate

Für die Genexpressionsanalysen aus primären Rattenhepatozyten wurden jeweils drei unabhängige Zeitkurvenexperimente durchgeführt. Die aus den Zellen gewonnene RNA lag für die entsprechenden Zeitpunkte annähernd in gleicher Qualität und Quantität vor und zeigte deswegen sehr homologe Ergebnisse in der Auswertung. Zwischen den einzelnen Zeitpunkten gab es jedoch große Unterschiede in der Menge der isolierten RNA. So wurden nach 120 h in einzelnen RNA-Proben die benötigten 20 µg für die cDNA-Synthese kaum erreicht, da die Gesamtzellzahl in den Petrischalen zu stark zurückgegangen war. Die Qualität der RNA, die photometrisch durch das Nukleinsäure/Protein-Verhältnis ermittelt wurde, lag aber stets über dem für die cDNA-Synthese erforderlichen Wert von 1,8 [260/280 nm]. Es kam im Zeitverlauf ausschließlich zu einem Quantitäts-, hingegen nicht zu einem Qualitätsverlust der eingesetzten RNA. Wesentlich deutlicher wurde dieser Zeiteffekt aber auf der Proteinebene. Hier wurde ebenfalls ein massiver Rückgang der erhaltenen Proteinmenge zu den späteren Zeitpunkten beobachtet. Zusätzlich sank aber auch die Qualität der Proteinlysate. So waren mit den 120 h Proben nur noch bedingt 2D-Gele möglich, da die erforderlichen Spannungen für die 1. Dimension bei der Auftrennung der Proteine nicht mehr erreicht wurden. Die mit diesen Proben durchgeführten 2D-Gele waren qualitativ nicht hinreichend, sodass die 120 h-Werte nicht in die Analyse mit einbezogen wurden.

#### 5.1.2 Quantitative Real-Time PCR

Bei der Normalisierung von quantitativen RT-PCR-Daten mittels eines Housekeeping-Genes war davon ausgegangen worden, dass das entsprechende Gen im verwendeten System nicht reguliert wurde. In den MWG Microarray-Ergebnissen hatte sich aber bereits angedeutet, dass es für die ursprünglich als Housekeeper geplanten Gene  $\beta$ -Actin, Cyclophilin A, GAPDH und 18S rRNA [86 - 89] tatsächlich aber zu Veränderungen der Expression im verwendeten Zellsystem über den gemessenen Zeitraum von fünf Tagen kam. Ein geeigneter Housekeeper musste demnach für jeden speziellen Versuchsansatz erst ermittelt werden und der Einsatz eines universellen Housekeepers war grundsätzlich nicht möglich [90, 91]. 18S rRNA hatte sich am wenigsten schwankend in den Microarray-Experimenten gezeigt und wurde deswegen zur Normalisierung der TaqMan<sup>®</sup>-Daten herangezogen. In der praktischen Anwendung war es wichtig, dass die aus den mitgeführten Standardkurven errechneten Steigungen des Gen von Interesse und des zu normalisierenden Housekeepers nicht um mehr als  $\pm 0,2$  Einheiten abwich, um in möglichst parallel verlaufenden Steigungsgeraden die  $C_T$ -

---

Werte vergleichen zu können. Für die in dieser Arbeit verwendeten Primer- und Sondenpaare lag die Steigung der Standardkurve zwischen -3,1 und -3,5 und es wurden nur PCR-Läufe in die Berechnung mit einbezogen, wenn die Differenz nicht größer als der empfohlene Richtwert 0,2 Einheiten war. Die in den Analysen gemessenen Abweichungen zwischen den technischen Replikaten fielen im TaqMan<sup>®</sup>-System geringer aus als in den beiden Chipsystemen. Dies lässt auf eine höhere Genauigkeit der Real-Time PCR im Vergleich zu den Microarray-Systemen schließen [92, 93]. Des Weiteren war mit der Real-Time PCR die Messung über einen viel weiteren dynamischen Bereich möglich [94], was die Ergebnisse für Annexin 5 verdeutlichte. Während es bei diesem stark exprimierten Gen auf den Chips zu einer Sättigung der Signalintensitäten kam, konnten mit dem TaqMan<sup>®</sup>-System noch Differenzen weit außerhalb des Messbereichs der Microarrays festgestellt werden.

### 5.1.3 Low-Density MWG-Chips

Bei der Verwendung von genomweiten Chips für Genexpressionsanalysen lag eine Schwierigkeit darin, dass die Datenanalyse in Bezug auf toxikologische Fragestellungen aufwendig und umfangreich war, da nur einem kleinen Teil von den über 15000 Genen auf dem Affymetrix Rat230A-Chip eine toxikologische Bedeutung zugewiesen werden konnte. Abhilfe versprach man sich von speziell erstellten Low-Density Microarrays, die nur solche toxikologisch relevante Gene enthielten, von denen man sich eine Expressionsveränderung durch die Substanzgabe erhoffte. Der für die vorliegende Arbeit entwickelte Chip wurde aufgrund von Vorversuchen mit High-Density 10kb-Chips sowie den Ergebnissen aus Literaturrecherchen [14, 41, 45, 46, 95, 96] mit einer Auswahl von 248 Genen (inklusive Housekeeper und Kontrollgene) zusammengestellt. Weiterhin war auch die Auswahl der Gene auf dem Low-Density Chip von großer Bedeutung. Bei der Erstellung einer Datenbank aus Genexpressionsprofilen war es wichtig, sich nicht auf einen zu kleinen Ausschnitt des Transkriptoms festzulegen. Es bestand sonst die Gefahr, dass die eigentlich entscheidenden und signifikant regulierten Gene nicht auf dem Chip enthalten waren. Durch die geringen Informationen auf einem Low-Density Chip könnten dadurch viele der tatsächlichen Veränderungen nicht detektiert werden.

Zusätzlich traten in der Anwendung bei den Low-Density Chips Probleme mit der Normalisierung der Daten auf. Von statistischer Seite her wurde die globale Normalisierung der Daten mit weniger als 1000 Datenpunkten als kritisch betrachtet. Eine Normalisierung über Housekeeping-Gene wurde ebenfalls nicht als optimal angesehen, da alle vier für die Normalisierung angedachten Housekeeper auf dem Chip im Zeitverlauf signifikant induziert wurden. Daher kam eine globale Normalisierung, bei der die Gesamtintensität aller Gene auf dem Chip miteinbezogen wurde, zur Anwendung. Dass dieses Prinzip dennoch funktionieren kann, wurde durch das publizierte Beispiel eines Low-Density Chips mit nur 59 toxikologisch relevanten Genen bereits gezeigt [95, 97, 98]. Mit Hilfe dieses Chips wurden substanzspezifische Genexpressionsprofile aus *In vivo*-Versuchen eindeutig zugeordnet. Low-Density Chips könnten demnach eine kostengünstige Alternative zu den High-Density-Chipsystemen sein, wenn neben einer geeigneten Normalisierungsmethode die Auswahl der auf dem Chip enthaltenen Gene sorgfältig erfolgte.

### 5.1.4 High-Density Affymetrix GeneChips<sup>®</sup>

Ein Vorteil des Affymetrix-Systems sind die zahlreichen während der Markierungsprozedur möglichen Qualitätskontrollen und Quantitätsbestimmungen. Die auf den Chips enthaltenen Gene mit Sequenzen aus den 5'- und 3'-Regionen ermöglichten eine Kontrolle darüber, ob im

---

Verlauf der RNA-Präparation Degradationen auftraten. Als Maß für die Degradation diente das Verhältnis der 5'- und 3'-Werte zueinander, welches im optimalen Fall den Wert 1 annimmt. Mittels des verwendeten Auswerteprogrammes wurden die Chips anhand dieser Werte klassifiziert. Die durchschnittlichen Werte lagen im Bereich von 1,2 bis 1,8. Lag die Klassifizierung über einem Wert von 2,5, so wurde der Chip nicht in die Auswertung mit einbezogen. Das Affymetrix-System war bezüglich der Handhabung jedoch soweit ausgereift, dass es bei allen 64 hybridisierten Chips niedrigstenfalls zu einer mittleren Klassifizierung kam und somit alle produzierten Daten in die Analyse mit einfließen konnten. Dies war ein entscheidender Vorteil des Affymetrix-Systems gegenüber den Zwei-Farben-Systemen. Hier traten z.B. nicht selten große Hintergrundsignale durch Luftblasen auf. Auch technisch bedingte Varianzen bei der Herstellung der Chips, dem Markieren der Proben und dem Hybridisieren der Chips führten dazu, dass Chips komplett oder zumindest Teilbereiche aus der Auswertung herausgenommen werden mussten. Eine deutliche Verbesserung der Qualität der Zwei-Farben-Chips konnte durch den Einsatz einer automatischen Hybridisierstation erreicht werden, bei der gewährleistet wurde, dass alle Chips während der Hybridisierung den gleichen Bedingungen ausgesetzt waren.

### 5.1.5 Direkter Vergleich der beiden eingesetzten Microarray-Systeme

Ein entscheidender Unterschied zwischen den beiden Systemen lag in der Datenerhebung und -auswertung. Für letztere kamen verschiedene Software-Pakete zur Anwendung. Die gefundene Diskrepanz von 40 (31) Genen, die im Zeitkurvenexperiment auf den Affymetrix GeneChips® (MWG-Chips) als reguliert gefunden wurden, konnte durch mehrere Ursachen hervorgerufen worden sein. Zum Einen könnten komplett unterschiedliche Primersequenzen für dasselbe Gen auf den beiden Chip-Typen dazu geführt haben, dass durch Kreuzhybridisierungen [99, 100] mit ähnlichen cDNA-Sequenzen in einem System falsch positive Signale auftraten. Durch die stark divergierende Anzahl der auf dem Chip aufgebrachtene Gene, die Länge der Sondensequenzen, varierende GC-Gehalte in den Sequenzen und die unterschiedlichen Methoden der Markierung bzw. Hybridisierungsverfahren konnten die Ergebnisse der beiden Systeme nur in begrenztem Ausmaß miteinander verglichen werden [101 - 105].

Aus dem Vergleich der beiden Chip-Systeme ließ sich jedoch feststellen, dass es sich bei den in nur einem System regulierten Genen vorwiegend um schwach exprimierte oder auch nur um schwach regulierte (nur knapp über dem 2-fachen der Normalwerte) Gene handelte. Ebenso verhielt es sich mit den drei Genen, die in beiden Systemen in die entgegengesetzte Richtung reguliert wurden. Diese drei Gene wurden nur schwach exprimiert und auch nur schwach reguliert (max. 3-fach). Deswegen konnten kleinere Abweichungen in den Signalintensitäten (durch mangelhafte Hybridisierungsqualitäten) gleichfalls eine Veränderung in eine entgegengesetzte Richtung bedeuten. Gene, die eine stärkere Expressionsveränderung erfuhren (> 4-fach), wurden auf beiden Chips in die gleiche Richtung reguliert. In Anbetracht der nur bedingten Vergleichsmöglichkeiten zeigte sich dennoch eine hohe Korrelation zwischen den beiden eingesetzten Chip-Typen [106, 107]. Erwartungsgemäß kam es, vor allem wieder bei schwach exprimierten Genen, zu Unterschieden in der Stärke der Expressionsänderung. Allerdings waren die Tendenzen immer deutlich erkennbar. Durch die TaqMan®-Validierungen konnte dies für eine Reihe von Genen bestätigt werden. Da die auf dem Markt befindlichen Microarray-Systeme nur bis zu einem bestimmten Maße als ausgereift angesehen werden können, sollten weitreichende Interpretationen von komplexen Expressionsdaten sehr sorgfältig erfolgen [108]. Eine Validierung der erhaltenen Ergebnisse mittels RT-PCR, Northern-Blot oder RNase-Protection-Assay sollte deshalb grundsätzlich durchgeführt werden.

### 5.1.6 2D-Gelelektrophorese

In ihrer Expression veränderte Proteine dienen als Biomarker in der Toxikologie oder bei der Erkennung von Krankheiten [109] und lassen sich mit den heute gebräuchlichen Methoden relativ zuverlässig nachweisen [110]. Allerdings wurden umfassende Analysen im Rahmen dieser Arbeit zum Teil dadurch erschwert, dass die Proteinkonzentrationen in einem dynamischen Bereich von bis zu zehn Größenordnungen [111, 112] vorliegen können, was von den Methoden in ihrer Sensitivität nicht abgedeckt werden konnte. Die hohen Konzentrationen einiger weniger Proteine führten zu einer deutlichen Verschlechterung der Auflösung bei der Gelelektrophorese, wodurch die Signale niedriger abundanter Proteine überlagert wurden [113]. Die gebräuchlichste Methode, um komplexe Proteingemische zu analysieren, sind 2D-Gele mit anschließender Massenspektrometrie zur Identifizierung der Proteine. Allerdings waren 2D-Gele nicht für alle Anwendungen optimal. So waren relativ große Proteinmengen (300 µg) [114] und eine große Anzahl an technischen sowie biologischen Replikaten vonnöten [115], um ein aussagekräftiges Bild zu erhalten. Daneben fokussierten die 2D-Gele auch nur einen bestimmten pH-Bereich. Besonders große (> 150 kDa) und kleine (< 15 kDa) Proteine wurden auf den verwendeten Gelen nicht erfasst, hydrophobe und membranständige Proteine waren zusätzlich schwer in Lösung zu bringen [116, 117]. Da aber in der Arzneimittelforschung 80 % aller therapeutischen Substanzen [118] als bevorzugtes Zielmolekül mit Membranproteinen (z.B. Rezeptoren, Kanalproteine) interagieren [119] bleibt dies eine Herausforderung für zukünftige Analysen.

Das größte Problem der 2D-Gele war allerdings, dass durch die gängigen Färbemethoden nur sehr stark exprimierte Proteine detektiert werden konnten. Viele in der Toxikologie oder Krebsforschung wichtige Proteine werden aber nur schwach exprimiert, da sie z.B. in der Signaltransduktion nur als schwaches, aber doch extrem wichtiges Signal in Erscheinung treten. So wurden gerade diese interessanten Proteine durch die Methode der 2D-Gele nicht erfasst. Als Lösungsansatz hierbei könnte eine vorherige Fraktionierung der Proteinlysate etwa durch HPLC [120] oder Free-Flow-Elektrophorese [121] dienen, wodurch auch dem Problem der mangelnden Qualität der Proteinlysate abgeholfen wäre. Nachteil hierbei wäre jedoch erneut eine größere Anzahl an zu verarbeitenden Proben und zu analysierenden Gelen, was wiederum Auswirkungen auf die ohnehin schon mäßige Reproduzierbarkeit der 2D-PAGE nach sich zieht.

Eine weitere Problematik ergab sich beim Datenbankabgleich von in der Massenspektrometrie gefundenen Peaks. Für einen Teil der berechneten Aminosäuresequenzen lagen noch zu wenig Sequenzinformationen des Rattengenoms vor, weswegen für einige der identifizierten Spots "Human" oder "Maus" als Ursprung angegeben wurde. Diese Unzulänglichkeiten werden sich sicherlich im Laufe der Zeit durch verbesserte Datenbankeinträge verringern. Der bei der Proteinidentifizierung häufiger aufgetretene Fall, dass zwei oder sogar mehrere Spots mit unterschiedlichem pI und Molekulargewicht als identisches Protein erkannt wurden, konnte mehrere Ursachen haben. Zum Einen konnte es sich um eine modifizierte Form eines Proteins handeln, dessen Modifikationen nicht in der Massenspektrometrie erkannt wurden [122]. Durch die bereits angesprochenen unzureichenden Informationen aus den Datenbanken konnten aber auch Isoformen, die sich nur wenig unterscheiden und deren erkannte Sequenz im Massenspektrometer identisch war, als ein Protein identifiziert werden. Ein in mehrere Teile zerfallenes (auch als Folge einer Behandlung) oder teilweise proteolytisiertes Protein konnte mit mehreren Spots auf dem Gel detektiert und später als identisches Protein mit unterschiedlichem pI und Molekulargewicht vorliegen. Leider ließen sich auch experimentelle Fehler beim manuellen Ausschneiden der Spots unter UV-Licht nicht ganz ausschließen. Der Einsatz einer automatisierten Spoterkennung durch ein Robotersystem und

eine Wiederholung der Identifizierung könnten hier einen höheren Sicherheitsfaktor bewirken.

### 5.1.7 SELDI ProteinChip<sup>®</sup>-Daten

Das SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption/ Ionisation) ProteinChip<sup>®</sup>-System konnte als geeignete Ergänzung zu den 2D-Gelen eingesetzt werden. Zum Einen konnten Proteine erfasst werden, die sehr schwach exprimiert wurden. Andererseits konnten die limitierenden Massen-, pH-Wert- und Löslichkeitsprobleme auf 2D-Gelen umgangen werden. Da die Proben nicht chemisch modifiziert wurden, blieb zudem ein realistisches Bild des physiologischen Zustandes erhalten [123]. Der größte Vorteil dieser Methode bestand jedoch in der sehr geringen Menge des einzusetzenden Proteins und der relativ unkomplizierten Handhabung. So konnten differentielle Expressionsprofile zwischen behandelten und unbehandelten Zellen schnell erzeugt und direkt miteinander verglichen werden [124]. Ein erheblicher Nachteil des Systems zeigte sich allerdings bei der Identifizierung der als reguliert gefundenen Peaks [111]. Diese wäre nur unter großem technischen sowie finanziellen Aufwand realisierbar gewesen und eignet sich somit kaum für einen Hochdurchsatz. So lange es also nicht zu einer Verbesserung der Identifizierungsmöglichkeiten kommt, bleibt das System auf die Mustererkennung von induzierten und reprimierten Peaks beschränkt. Mittelfristig bleibt als Ziel, diese regulierten Proteine zu identifizieren.

## 5.2 Experimentelle Ergebnisse

### 5.2.1 Auswahl der Modells substanz

Um verlässliche Resultate aus *In vitro*-Experimenten gewährleisten zu können, musste die zu testende Substanz in der Zellkultur möglichst lange stabil und im Medium enthalten bleiben. Im Verlauf dieser Arbeit wurden zunächst mit *N*-Nitrosomorpholin (NNM) und Thioacetamid – beides bekannte Hepatotoxine [125, 126] – Versuche zur Genexpression durchgeführt. Ein Problem, welches hierbei auftrat, war die Stabilität der beiden Substanzen. Diese war temperaturabhängig und konnte bei Brutschranktemperatur (37 °C) nur über einen sehr kurzen Zeitraum aufrechterhalten werden. Bei *N*-Nitrosomorpholin kam es durch den niedrigen Siedepunkt zu einer nicht exakt ermittelbaren Verfälschung der tatsächlichen Konzentration im Medium und damit zu einer schwächeren Toxizität und veränderten Expressionsantwort. Thioacetamid wiederum zersetzte sich bei Temperaturen oberhalb 30 °C und setzte Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) frei. Bei hohen Konzentrationen an Thioacetamid kam es durch das gebildete H<sub>2</sub>S zu einer Übersäuerung des Zellkulturmediums, was einen zusätzlichen Ungenauigkeitsfaktor darstellte, der auf die Zellen Einfluss nahm und z.B. eine genaue Ermittlung des LC<sub>50</sub>-Wertes erschwerte. Erste Ergebnisse zur Genexpression waren für diese beiden Substanzen nicht hinreichend reproduzierbar. Aus diesem Grund wurden sie als Modells substanz zurückgestellt und durch Acetaminophen ersetzt.

Dessen Verwendung erschien für die Analyse der Gen- und Proteinexpression besonders geeignet, da zum Einen bereits eine Fülle an Literatur zu unterschiedlichsten Effekten von Acetaminophen im Organismus vorlag [95, 96, 127 - 130]. Zum Anderen konnte damit in zwei verschiedenen Cytotoxizitätstests ein relativ stabiler LC<sub>50</sub>-Wert ermittelt werden. Der verwendete WST-1-Test erwies sich als geringfügig sensitiver, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass in diesem Testsystem der Umsatz von WST-1 durch Enzyme in den Zellen gemessen wurde, während beim zweiten verwendeten Testsystem, der ATP-Messung, durchaus Fehler durch die ATP-Abgabe aus bereits toten Zellen ins Medium auftreten

---

konnten. Der Anstieg der cytotoxischen Wirkung im Zeitverlauf um 55,6 % im ATP-Test bzw. 38,3 % im WST-1 Test konnte durch den Ernährungsstatus der Zelle beeinflusst werden. Fasten führte *in vivo* zu einer Depletion des zellulären Glutathions und damit letztendlich zu einer gesteigerten Nekroserate in Hepatozyten [131]. Der Rückgang des LC<sub>50</sub>-Wertes nach 48 h deutete darauf hin, dass es zu einem Verbrauch des Glutathions in den Zellen kam und dessen Bedarf mit fortschreitender Zeit nicht mehr aus dem Medium gedeckt werden konnte. Das in der Phase-I-Reaktion über die *N*-Hydroxylierung entstehende reaktive NAPQI konnte dadurch akkumulieren und kovalent mit zellulären Proteinen interagieren. Dies führte zu einer erhöhten cytotoxischen Wirkung und damit zu einem Absinken des LC<sub>50</sub>-Wertes nach 48 h.

### 5.2.2 Auswertung des Zeitkurvenexperimentes

Aus der Literatur war bereits bekannt, dass es nach längeren Inkubationszeiten der primären Rattenhepatozyten zu Veränderungen auf der Gen- und Proteinebene kam [14, 132, 133]. Dies konnte in den durchgeführten Experimenten für eine Reihe von Genen und Proteinen bestätigt werden. Die hohe Anzahl an veränderten Genen ist auch auf die suboptimalen Kulturbedingungen, unter denen die primären Rattenhepatozyten für diese Versuche inkubiert wurden, zurückzuführen. Die Stärke und Anzahl gemessener Expressionsänderungen läßt jedoch nicht immer auf die daraus resultierende physiologische Bedeutung schließen. Eine nach dem Grad der Expressionsänderung erfolgte Auswahl regulierter Gene wäre jedoch eine Möglichkeit, eine überschaubare Zahl von Genen zu erreichen, welche anschließend mit anderen Methoden (z.B. RT-PCR) validiert werden könnten [134, 135].

Im Gesamtüberblick lag der Vorteil der Genexpressionsanalysen in der Identifikation beteiligter Signal- und Metabolismuswege. Durch die im durchgeführten Zeitkurvenexperiment sehr hohe Anzahl an veränderten Genen, deren Genfunktion zum Analysezeitpunkt noch nicht vollständig bekannt und deren Signalwege nicht komplett aufgedeckt waren, konnte nicht bei allen betroffenen Genen eine eindeutige Zuordnung zu einer dieser Reaktionskaskaden erfolgen. Auf der Proteinebene kam es ebenso wie in den Genexpressionsanalysen im Zeitverlauf zu einer erwarteten Zunahme an induzierten und reprimierten Proteinen. Zu den stärksten Veränderungen der Proteinexpression kam es nach 24 h Inkubationszeit. Dies war neben den Expressionsdaten aus den 2D-Gelen auch aus den SELDI-TOF-MS-Ergebnissen ersichtlich und korrelierte zeitlich sehr gut mit den Ergebnissen aus den Genexpressionsdaten.

### 5.2.3 Biologische Relevanz der Expressionsdaten

#### Antioxidative Proteine

In den nachfolgenden Abschnitten werden vorwiegend Enzyme behandelt, die sowohl in der Gen-, als auch in der Proteinexpression signifikant verändert wurden. Einige unter dieses Kriterium fallende Enzyme spielen eine bedeutende Rolle bei der Abwehr von oxidativem Stress. In normalen biologischen Prozessen werden ständig freie Radikale gebildet. Exogene Einflüsse, die zu oxidativem Stress in der Leber führen können, sind vielfach unbeabsichtigt mit der Nahrung oder bewusst als Pharmazeutika aufgenommene Substanzen, die zu Sauerstoffradikalen (O<sub>2</sub><sup>•</sup>), Hydroxyradikalen (OH<sup>•</sup>) und Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) metabolisiert werden [136]. Da nicht gebundene Elektronen danach streben, ein Elektronenpaar zu bilden, sind diese freien Radikale besonders reaktionsfreudig. Der daraus entstehende oxidative Stress erzeugt eine weite Bandbreite von zellschädigenden Effekten, wie z.B. Lipidperoxidation [137], was dann häufig zu Membranschädigungen [138], DNA-Strangbrüchen und daraus resultierend zu vielfältigen Proteinveränderungen [139] führen

---

kann. Demnach liegt oxidativer Stress vielen pathophysiologischen Reaktionen zu Grunde. Dazu gehören Entzündungsreaktionen, vorzeitige Zellerterung, Gewebeschädigungen sowie Kanzerogenese [140] und Teratogenese [141]. Das intrazelluläre Abwehrsystem gegen oxidativen Stress besteht hauptsächlich aus den antioxidativen Enzymen, zu der die Katalase, die Glutathionperoxidase, die Superoxiddismutasen, die Peroxiredoxine und die Glutathion-S-Transferasen gehören [142].

Die Katalase ist ein tetrameres Hämprotein und eines der effektivsten Enzyme des Organismus mit einer Umsatzrate von über  $2,4 \times 10^6$  Molekülen pro min [143], jedoch auch mit einer nur geringen Affinität zu seinen Substraten. Es katalysiert hauptsächlich die Reduktion von  $H_2O_2$  und Methyl- oder Ethylhydroperoxiden. Im Organismus findet sich die höchste Konzentration an Katalase in den Hepatozyten und hier hauptsächlich in den Peroxisomen.

Die Glutathionperoxidase ist neben der ebenfalls auf Genebene reprimierten Glutathionreduktase eines der zentralen Enzyme des Glutathion-Redoxzyklus und hilft bei der Abwehr von intrazellulären Peroxiden. Beide Enzyme sind vorwiegend im Cytosol von Hepatozyten und Erythrozyten lokalisiert. Die Glutathionperoxidase ist wie die Katalase ein tetrameres Protein und enthält vier Selen-Atome, die als Selenocystein im aktiven Zentrum gebunden sind. Für seine katalytische Aktivität benötigt das Enzym reduziertes Glutathion (GSH) als Coenzym für die Reduktion von Peroxiden. Die Glutathionreduktase als dimeres Protein, sorgt dafür, dass anfallendes oxidiertes Glutathion (GSSG) wieder reduziert wird [144]. Sie stellt so ein ausgeglichenes GSH/GSSG-Verhältnis sicher, welches für den Ablauf des Glutathion-Redoxzyklus notwendig ist und welches im unausgebalancierten Fall limitierend wirkt. Als Cofaktor dient bei dieser Reaktion Glutathion. Für die Eliminierung von Acetaminophen wird ebenfalls Glutathion benötigt. So kann es in der Zelle zu konkurrierenden Mechanismen kommen, die beide Glutathion benötigen. Nach seinem vollständigen Verbrauch verstärken sich so die Wirkungen. Die Katalase und die Glutathionperoxidase überschneiden sich zwar in ihrer Substratspezifität; es wird jedoch vermutet, dass die Glutathionperoxidase von größerer Bedeutung für die Abwehr von oxidativem Stress ist. Der Grund hierfür liegt höchstwahrscheinlich in der Lokalisierung der Enzyme in der Zelle. Während die Katalase vorwiegend in den Peroxisomen zu finden ist, kann die cytosolische Glutathionperoxidase durch ihre günstigere räumliche Positionierung einen besseren Kontakt zu den Oxidantien herstellen.

Die Superoxiddismutase katalysiert die Reduktion von Sauerstoffradikalen ( $O_2^{\cdot}$ ) mit einer sehr hohen Umsatzrate ( $2 \times 10^9$  Molekülen pro min). Man unterteilt die Superoxiddismutasen in drei Untergruppen, die sich hinsichtlich ihrer zentralen metallischen Verbindungen und ihrer Position innerhalb des Organismus voneinander unterscheiden. Die hier reguliert gefundene Cu/Zn-Superoxiddismutase wird ebenfalls sehr stark in der Leber exprimiert und dort vorwiegend im Cytosol gefunden [145]. Zusammen mit der Katalase und der Glutathionperoxidase bildet die Superoxiddismutase ein Enzymsystem, das die Zelle vor den Folgereaktionen durch oxidative Sauerstoffradikale und  $H_2O_2$  bewahrt. Auch kommt es zu gegenseitigen Hemmungen durch eine verminderte Aktivität der Enzyme. Erfolgt z.B. eine unzureichende Detoxifizierung von Sauerstoffradikalen durch die Superoxiddismutase, hemmen diese die Funktion von Katalase und Glutathionperoxidase [146]. Bei gesteigerter intrazellulärer  $H_2O_2$ -Konzentration durch eine verminderte Katalase-Aktivität hemmt  $H_2O_2$  wiederum die durch superoxiddismutase-vermittelte Reduktion der Sauerstoffradikale [147]. Es besteht also ein komplexes Zusammenspiel der antioxidativen Enzyme Katalase, Glutathionperoxidase und Superoxiddismutase bei der intrazellulären Abwehr von oxidativem Stress [148].

---

Die Enzymgruppe der Peroxiredoxine (PDX 1 - 6) gehört zu den Peroxidasen und reduziert neben  $H_2O_2$  eine Vielzahl von Hydroperoxiden zu Wasser und Alkohol. In einer *N*-terminalen hochkonservierten Region besitzen Peroxiredoxine ein redoxaktives Cystein, welches während der Reduktion von Peroxiden oxidiert wird [149]. Sie unterscheiden sich von den oben genannten antioxidativ wirkenden Enzymen dadurch, dass sie keine Metallionen oder prosthetische Gruppen als Redox-Cofaktoren benötigen.

Alle vier beschriebenen Gene sind bekannte antioxidativ wirkende Enzyme, die direkt an der Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffmoleküle beteiligt sind. Durch das relativ rasche Absinken dieser Enzyme auf der Proteinebene fehlte den Zellen nun ihre Hauptabwehr gegen oxidativen Stress. Aus toxikologischer Sicht war dies natürlich ein erheblicher Nachteil gegenüber einem *In vivo*-Testsystem, bei dem diese Fähigkeiten erhalten blieben.

Der scheinbare Widerspruch, dass es bei der Glutathionperoxidase und dem Peroxiredoxin 2 in der Zeitserie zu einer gesteigerten Genexpression bei einer gleichzeitig verminderten Proteinproduktion kam, ist nicht mit letzter Sicherheit zu erklären. Zum Einen konnte durch das Einwirken vielfältiger Regulationsmechanismen nicht immer von einer direkten Korrelation zwischen der Transkription und der Translation ausgegangen werden, zum Anderen konnte es im betreffenden Zellsystem durch den Zeiteffekt zu schwerwiegenden Störungen der Proteinsynthese gekommen sein, so dass die exprimierte mRNA nicht in das korrespondierende Protein umgeschrieben wurde. Durch die Leberperfusion und die anschließende Inkubation der Zellen erfolgte eine Stressantwort mit resultierender induzierter Genexpression. Die Stabilität der translatierten Proteine konnte dagegen durch die erhöhte Stresswirkung herabgesetzt worden sein und ein verstärkter Abbau der Proteine durch erhöhte Aktivität der Proteasome erfolgen.

#### **Phase-I- und Phase-II-Enzyme**

Eine in den Zeitserien sehr stark regulierte Enzymfamilie waren die Cytochrom-P450-Monooxygenasen. Diese Enzyme sind ein wichtiger Bestandteil der Phase-I-Reaktionen während der Biotransformation. Sie leiten die Funktionalisierung von körpereigenen und körperfremden Substanzen über eine Hydroxylierungsreaktion ein. Ziel dieser Hydroxylierung ist das Einbringen einer funktionellen Gruppe, die in der folgenden Phase-II-Reaktion mit gut wasserlöslichen Komponenten konjugiert wird, um sie leichter über Galle und Niere ausscheiden zu können. Mehr als 90 % der Medikamentendetoxifikation ist auf nur sechs Isoenzyme (CYP 1A2, 2B6, 2C9, 2D6, 2E1 und 3A1) zurückzuführen [150]. In den primären Hepatozyten kam es im Zeitverlauf zu einem starken Absinken der Genexpression für eine Fülle von Cytochrom (einschließlich der oben genannten), die nach 48 h teilweise kaum noch zu detektieren waren. Dies deckte sich sehr gut mit bereits publizierten Daten für die Cytochrom-P450-Expression in primären Hepatozyten [14, 28, 132, 133]. Die Annahme, dass trotz einer verringerten Genexpression die Proteinaktivität der Cytochrom-P450-Monooxygenasen nicht beeinflusst wurde, konnte in den für diese Arbeit durchgeführten Aktivitäts-Assays nicht bestätigt werden. Ein Rückgang der Aktivität korrelierte sehr gut mit den gemessenen Genexpressions-Daten.

Eine weitere, allerdings nur auf Genebene stark reprimierte Enzymgruppe, waren die Glutathion-S-Transferasen (GST), die einerseits bei der Detoxifikation eine zentrale Rolle übernehmen, andererseits als intrazelluläre Transportproteine von hydrophoben Molekülen wie Bilirubin, Häm und Steroiden wirken [151]. In der Leber sind die GST ein Bestandteil der Biotransformation und sind an der Konjugation von elektrophilen Xenobiotika-Metaboliten an das nucleophile reduzierte Glutathion beteiligt. Diese Glutathion-Konjugate werden entweder zu Merkaptursäure verstoffwechselt oder durch einen aktiven, ATP-abhängigen Transportmechanismus aus der Zelle transportiert. Man unterteilt die Vielzahl an bisher

---

gefundenen Glutathion-S-Transferasen nach ihren strukturellen Eigenschaften und ihrer Substratspezifität in neun Hauptgruppen: GST alpha, mu, pi, theta, sigma, zeta, kappa, omega und delta [152]. Im Bereich des oxidativen Stresses wirken vor allem  $\alpha$ -GST als so genannte selenunabhängige Glutathionperoxidasen bei der Reduktion von Lipidhydroperoxiden mit und schützen so die Zellen direkt vor oxidativem Stress. Neben den Cytochrom-P450-Monooxygenasen und den Glutathion-S-Transferasen wurden besonders auf dem Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> noch eine Reihe wichtiger Phase-I- und Phase-II-Enzyme in der Zeitserie stark reprimiert.

### **Alterungsproteine**

Das Senescence Marker Protein 30 (SMP30) ist ein vorwiegend in der Leber vorkommendes, Calcium bindendes Protein, das androgenunabhängig in alternden Zellen niedriger exprimiert wird [153]. Als physiologische Rolle wird für dieses Protein eine antiapoptotische Wirkung in Betracht gezogen. SMP30 kann die Zellen vor zu hohen apoptotischen Calciumionen-Konzentrationen bewahren, indem es für erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportprozesse aus der Zelle heraus sorgt. So kann an SMP30-Knock-out-Mäusen gezeigt werden, dass es durch Apoptose induzierende Substanzen (anti-FAS, TNF $\alpha$  und Actinomycin D) bei diesen Tieren verstärkt zu apoptotischen Leberschäden kommt [154]. Eine relativ neue Eigenschaft, die SMP30 zugeschrieben wird, ist die Hydrolyse-Fähigkeit für bestimmte toxische Nervenkampfstoffe (z.B. Sarin) und somit eine gesteigerte Bedeutung für die Detoxifikation von exogenen Substanzen [155]. Es wird weiterhin diskutiert, dass die SMP30-Expression durch oxidativen Stress beeinflusst wird. So kommt es z.B. nach einer Gabe von  $\text{CCl}_4$ , einem in Zellen akuten oxidativen Stress auslösenden Agens, zu einem signifikanten Rückgang der SMP30-Expression [156]. SMP30 unterdrückt aber auch die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen in Hepatozyten. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass SMP30 antioxidative Eigenschaften besitzt und die Zelle vor oxidativem Stress schützt. Eine wie in unserem Zellsystem beobachtete Reduktion der SMP30-Expression führte neben einer alterungsbedingten Verschlechterung zellulärer Funktionen auch zu einer gesteigerten Anfälligkeit gegenüber toxischen Substanzen und zu einem verringerten antiapoptotischen Schutz.

### **Glukose-Metabolismus**

Neben den Enzymen aus dem Fremdstoffmetabolismus wurden durch die Kultur der Zellen über einen längeren Zeitraum auch einige wichtige Enzyme aus dem Glukose-Stoffwechsel reprimiert. Die Fruktose 1,6-bisphosphatase ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse und Glukoneogenese [157]. Das cytosolische Enzym katalysiert die Dephosphorylierung von Fructose 1,6-bisphosphat zu Fructose-6-phosphat und unterliegt einer glukoseinduzierten Katabolitinaktivierung. Ein vergleichbarer glukoseinduzierter Inaktivierungsprozess wurde auch schon für die ebenfalls reprimierte Malatdehydrogenase beschrieben. Die vorwiegend im Cytosol vorkommende Malatdehydrogenase dient als Shuttle für Glykolyseprodukte zur Fettsäuresynthese und ist ein frühes Markerprotein für Nierentoxizität [158]. Die Pyruvatdehydrogenase ist ein weiteres reprimiertes Enzym aus dem Glukose-Stoffwechsel und katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA. Aus der Tatsache, dass diese drei Enzyme aus dem Glukose-Stoffwechsel reprimiert wurden, ließ sich der Schluss ziehen, dass es im Zeitverlauf in den primären Rattenhepatozyten zu massiven Stoffwechselproblemen kam und der Ernährungs- und damit auch der Energiezustand der Zelle nicht aufrecht erhalten werden konnte.

### **Hitzeschockproteine (HSP)**

Alle bisher diskutierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zellen unter den getesteten Kulturbedingungen extremen Stressbedingungen ausgesetzt waren. Damit könnte auch ein Ansteigen der HSP60-Proteinexpression erklärt werden. Die Hitzeschockproteine HSP60 und HSP70 gehören zu der Multigenfamilie der Chaperone, die ein Molekulargewicht zwischen

---

10 und 150 kDa aufweisen. Die allgemeinen Funktionen der Hitzeschockproteine liegen in der Unterstützung der korrekten Faltung vieler Proteine bei der Translation [159]. Neben ihrer entscheidenden Rolle in der Proteinfaltung binden und stabilisieren Chaperone instabile zelluläre Proteinkonformationen und führen sie ihrer korrekten Bestimmung zu (Transport in ein subzelluläres Kompartiment, Reparatur denaturierter Proteine, Einleitung des Abbaus von Proteinen etc.) [160]. Viele Chaperone sind zudem stressinduzierbar. Jede Situation, die für eine Zelle Stress bedeutet (Hitze, Schwankungen des pH-Wertes, Glukosemangel, etc.) ist eine Gefahr für die korrekte Funktion zellulärer Abläufe und kann zur Denaturierung oder Degradation von Proteinen führen [161]. Als Reaktion darauf werden von der Zelle vermehrt Chaperone exprimiert [162].

HSP60 ist eine vorwiegend in den Mitochondrien [163] und an der Zelloberfläche [164] vorkommende ATPase mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDA, woraus sich auch der Name des Enzyms ableitet. Seine intrazellulären Aufgaben umfassen unter anderem die ATP-abhängige Bindung spezifischer Peptidsequenzen. Im Allgemeinen werden hydrophobe Sequenzen bevorzugt, die in falsch oder ungefalteten Proteinen frei zugänglich sind. In nativem Zustand liegen diese hydrophoben Zentren zumeist im Innern der dreidimensionalen Proteinstruktur und sind damit für HSP60 nicht direkt erreichbar. Dadurch können falsch oder ungefaltete Proteine eine selektive HSP60-Bindung eingehen und eine funktionsbeeinträchtigende Wirkung oder toxische Aggregation dieser Proteine verhindert werden. Ein weiteres Chaperon, das Glucose-Regulated-Protein 75 (GRP75), ist ebenfalls essentiell an der ATP-abhängigen Proteinfaltung unter normalen und stressinduzierten Bedingungen beteiligt. Allerdings kam es in den primären Rattenhepatozyten für GRP75 zu einem gegenläufigen Effekt. Es wurde auf der Proteinebene nicht induziert, sondern schwächer exprimiert. Die sich nicht verändernde Genexpression für beide Enzyme könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Proteinexpression für diese Enzymgruppen über einen zwischengeschalteten Regulationsmechanismus gesteuert wird.

### **Strukturproteine**

In der Gruppe der im Zeitverlauf verstärkt exprimierten Gene bzw. Proteine fanden sich viele Strukturproteine wie z.B.  $\beta$ -Aktin, eines der elementaren Bausteine des Cytoskelettes. Aktin ist das „Hauptprotein“ in vielen Zellen und kann einen Großteil des gesamten Zellproteins betragen [165]. Die fadenförmigen Aktinfilamente durchziehen als dreidimensionales Netzwerk die Hepatozyten und gewährleisten die Form und Festigkeit der Zelle. Ein weiteres wichtiges Strukturprotein, das auf Genexpressionsebene induziert wurde, ist  $\alpha$ -Tubulin. Die röhrenförmigen Microtubuli bilden ebenfalls ein Netzwerk in der Zelle. Sie dienen dem zielgerichteten Transport von subzellulären Substraten und spielen eine bedeutende Rolle für die Mitosemechanismen bei der Zellteilung. Auch in der Gruppe der Intermediärfilamente, die neben Stabilisierungsaufgaben dem intrazellulären Stofftransport dienen, fanden sich stärker exprimierte Gene (z.B. Vimentin). Die Induktion dieser Gene ist zum Einen auf die sich dedifferenzierenden Hepatozyten zurückzuführen [84]. Außerdem ist davon auszugehen, dass eine Vielzahl der verstärkt exprimierten Moleküle, und hierbei besonders die gerade genannten Strukturproteine, nicht auf Veränderungen in den Hepatozyten zurückzuführen waren, sondern die im Zeitverlauf hochwachsenden anderen Zellarten (vorwiegend Fibroblasten und Epithelzellen [166]) Verursacher sein konnten. Durch ihre Fähigkeit zu proliferieren wurden hier vermehrt Strukturproteine sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene detektiert. Durch den Einsatz von verbesserten Aufreinigungsmethoden während der Leberperfusion ließe sich die Kontamination mit anderen Zellarten deutlich verringern, aber wahrscheinlich nicht vollständig vermeiden. Zusätzlich würde die Verwendung von serumfreien Kulturmedien den Proliferationseffekt stark einschränken.

Ein ebenfalls stark induziertes Enzym war Annexin 5. Die Annexine umfassen eine Multigenfamilie von  $\text{Ca}^{2+}$ - und phospholipidbindenden Proteinen [167] und spielen eine wichtige Rolle für die Proliferation und Differenzierung von Zellen. Annexin 5 kann aber auch die Phospholipase A2-Aktivität inhibieren und somit eine antiinflammatorische Wirkung ausüben [168]. Insbesondere mit der TaqMan<sup>®</sup>-Methode konnte ein starker Anstieg der Genexpression festgestellt werden. Die wichtige Aufgabe von Annexin 5 im Zellwachstum deutet darauf hin, dass die ermittelten Veränderungen sehr wahrscheinlich nicht von den Hepatozyten herrührten, sondern von anderen hochwachsenden Zelltypen ausgelöst wurden.

### **Akute-Phase-Proteine**

Eine Gruppe, deren verstärkte Expression hingegen zweifelsfrei auf die primären Hepatozyten zurückzuführen war, sind die Akute-Phase-Proteine. Bei unspezifischen akuten Schädigungen des Organismus werden von den Kupffer-Zellen Signalstoffe abgegeben, welche die Hepatozyten zur Synthese der Akute-Phase-Proteine stimulieren. Ihre Funktion liegt in der Unterbrechung proteolytischer Reaktionskaskaden, die bei ungehinderter Aktivität über längere Zeit zu schweren Schädigungen des Gesamtorganismus führen. Das auf der Proteinebene zu den frühen Zeitpunkten vermehrt exprimierte  $\alpha$ -2-Makroglobulin ist ein Protease-Inhibitor, der vornehmlich von Makrophagen synthetisiert wird und ein breites Spektrum an inhibitorischen Eigenschaften aufweist. Allerdings war diese Erhöhung auf der Genebene nicht feststellbar. Zu den späteren Zeitpunkten kam es zu einem Absinken der Werte sowohl für die Gen- als auch die Proteinexpression. Weitere, nur auf den Chips verstärkt exprimiert gefundene Akute-Phase-Proteine waren LPS-Binding-Protein [169] Ferritin, Serpin B5 und Haptoglobin [170, 171]. Deren Induktion könnte darauf zurückzuführen sein, dass in den Zellen, möglicherweise durch die Einwirkungen der Perfusion, eine Akute-Phase-Antwort ausgelöst wurde. Die Leber stellt das zentrale Organ für diese Akute-Phase-Reaktionen dar [172]. Die Synthese der beteiligten Proteine wird begleitet durch einen Abfall der ebenfalls in der Leber gebildeten Anti-Akute-Phase-Proteine, wie z.B. Proalbumin, das auf der mRNA-Ebene tatsächlich schwächer exprimiert wurde.

### **5.2.4 Acetaminophen-Daten**

Nach der Behandlung der primären Rattenhepatozyten mit Acetaminophen wurde mit dem Auffinden einheitlicher und überschneidender Genexpressionsmuster gerechnet. Zumindest einige bereits mehrfach in der Literatur beschriebene, durch Acetaminophen *in vivo* regulierte Gene [98, 127 -129, 173 - 176] hätten eine Bestätigung der Anwendungsmöglichkeiten des getesteten Zellkultursystems und der eingesetzten Methoden bedeutet. Die Auswertung der Microarray-Daten ergab jedoch kein einheitliches Induktions- oder Inhibitionsmuster in den drei biologischen Replikaten. Insgesamt wurden nur wenige regulierte Gene sowohl in der niedrigen (0,5 mM) als auch in der hohen Dosis (2 mM) gefunden. Die Stärke der Regulation lag zumeist auch nur knapp über der als Ausschlussgrenze festgesetzten 2-fachen Veränderung. Während es nach 6 h zur identischen Anzahl an induzierten und reprimierten Genen kam, konnte man zu den übrigen Zeitpunkten den Einfluss der höheren Dosis Acetaminophen auf die Zellen in einer gesteigerten Anzahl regulierter Gene erkennen. Nach 72 h kam es nur noch bei der hohen Dosis zu drei regulierten von über 15.000 Genen auf dem Chip.

Zusätzlich wurden die als reguliert gefundenen Gene zumeist nur zu einem Zeitpunkt oder bei nur einer Dosis signifikant verändert. Sich überschneidende Expressionsmuster zwischen den beiden Acetaminophen-Konzentrationen mussten allerdings nicht zwingend erfolgen. Zu berücksichtigen waren neben der biologischen Variabilität auch mögliche Niedrigdosis-Effekte (Hormesis) [177], die ein verändertes Gen- und Proteinexpressionsmuster zwischen

---

den eingesetzten Dosen erklären könnten. Der Hormesis-Effekt wurde inzwischen bei zahlreichen Untersuchungen für toxische Substanzen in niedrigen Konzentrationsbereichen festgestellt [178], wird aber aufgrund widersprüchlicher experimenteller Ergebnisse kontrovers diskutiert.

Von den in der Zeitserie mit primären Rattenhepatozyten in ihrer Expression veränderten Genen konnten etliche zu den folgenden Kategorien zugeordnet werden: antioxidative Proteine, Alterungsproteine, Hitzeschockproteine und Akute-Phase-Proteine. Daraus ließ sich ableiten, dass es in den Zellen durch die kombinatorischen Faktoren aus Leberperfusion und den anschließenden Kulturbedingungen zu Stressantworten kam. Durch die Veränderungen, die in den unbehandelten Zellen im Zeitverlauf auftraten, gerieten eine Reihe von intrazellulären Reaktionswegen ausser Kontrolle und die Genregulation verlief nicht mehr geordnet. Diese massiven, durch die Zelle nicht steuerbaren Abläufe in den absterbenden Zellen, waren so stark, dass sie die Expressionsveränderungen, die durch Acetaminophen-Behandlungen hervorgerufen wurden, überlagerten.

Eine Diskussion der durch die Behandlung regulierten Gene erwies sich als schwierig, da gerade bei einigen eindeutig signifikant und zu mehreren Zeitpunkten bzw. bei beiden Dosen regulierten Genen (Jun-B, Glutathion-S-Transferase $\gamma$ , Aflatoxin-1B-Aldehydreduktase) im Zuge eines Vergleichs mit parallel durchgeführten *In vivo*-Ringstudien (unveröffentlichte Daten) festgestellt wurde, dass diese Gene auch signifikant – allerdings in die entgegengesetzte Richtung – reguliert wurden. Die Interpretation der *In vitro*-Daten im Bezug auf toxikologische Mechanismuserkennung wurde durch diesen Umstand erschwert. Die übertragbare Prädiktivität solcher Systeme auf humane Studien blieb vorerst ebenfalls offen.

Mögliche, im Gesamtorganismus auftretende physiologische Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen wurden ebenfalls vernachlässigt. In der Leber steuern z.B. Kupffer- und Sternzellen vielfach wichtige Cofaktoren für die Biotransformation bei, die einem monofaktoriellen System fehlen [179]. Für das zweite Ziel der Dosierungsexperimente, dem Aufbau einer Datenbank zur Genexpressionsmustererkennung, hatte man auf auch einen größeren Datensatz an differenziert exprimierten Genen gehofft. Letztendlich bleibt es mit Unwägbarkeiten behaftet, nach nur einer getesteten Substanz Aussagen über das System zu machen, da die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse ein spezifisches Substanzproblem darstellen könnten. Versuche mit anderen Substanzen zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit des Systems stellen somit ein Betätigungsfeld für zukünftige Arbeiten dar [180].

Auf der Proteomics-Ebene konnten mit der SELDI-TOF-MS-Technologie unterschiedlich stark exprimierte Proteine zu jedem Zeitpunkt zwischen Kontrolle, Niedrigdosis und Hochdosis detektiert werden und es ließ sich ein eindeutiger dosis- und zeitabhängiger Effekt erkennen. Mittels der 2D-Gele wurde ebenfalls ein Anstieg an sowohl induzierten als auch reprimierten Proteinen nach der Acetaminophen-Dosierung festgestellt. Auch war ein erwarteter dosisabhängiger Effekt zu erkennen. Je höher die Dosis, desto mehr Expressionsveränderungen wurden auf der Proteinebene gefunden. Die Auswertung der Acetaminophen-Proben ergab für die durchgeführten 2D-Gele die Anzahl der veränderten Proteine. Da es sich bei den signifikant veränderten Proteinen um relativ schwach exprimierte Proteine handelte, konnten trotz einiger präparativer Gele nur wenige Protein-Spots weiter analysiert werden. Hier zeigte sich wieder die bereits angesprochene technische Limitierung der 2D-PAGE, bzw. der anschließend erfolgten MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight-Massenspektrometrie).

### 5.2.5 Unterschiede zwischen Collagenase D und Liberase Blendzyme perfundierten Hepatozyten

Im Verlauf der durchgeführten Leberperfusion wurde von Collagenase D zu einer modifizierten Form, Liberase Blendzyme, gewechselt. Diesem Wechsel wurde keine große Bedeutung zugeschrieben, da sonst alle anderen Parameter der Zellkultur konstant blieben. Um so überraschender waren die festgestellten Differenzen, die der Enzymwechsel in den Zellen hervorrief. Herkömmliche Collagenase-Präparationen sind durch den Herstellungsprozess in ihrer Qualität sehr variabel und können bis zu 30 unterschiedliche Enzyme beinhalten. Darüberhinaus weisen sie oft schwankende Konzentrationen an Endotoxinen auf [181]. Ein hoher Anteil an Endotoxinen während der Leberperfusion kann die Zellen schädigen und bis hin zur Einleitung der Apoptose führen. Durch eine Enzymaufreinigung beim Herstellungsprozess der Liberasen werden unerwünschte bakterielle Zelltrümmer und nichtenzymatische Bestandteile bis auf einen ungefährlichen Rest entfernt. Laut Hersteller wird mit diesen verbesserten Enzymen eine sehr effektive und zellschonende Art der Zellvereinzelung aus dem Gewebe erreicht, die sich in höheren Gesamtzellzahlen, Zellvitalitäten und Funktionseigenschaften der Zellen widerspiegelt [182]. In den durchgeführten Leberperfusionsen zeigte sich tatsächlich ein Anstieg der Zellvitalität von  $81,2 \pm 4,3$  % auf  $86 \pm 5,7$  % in den mit Liberase Blendzyme perfundierten Lebern. Ein Ansteigen der Gesamtzellzahl war hingegen nicht zu beobachten. Allerdings variierte die Zellzahl sehr mit dem Gewicht der eingesetzten Ratten und auch eine Berechnung auf die Zellzahl pro g Körpergewicht verbesserte die Werte nicht, da es experimentell auch zu Teilperfusionsen der Leber gekommen war.

Bei einem eher zufällig durchgeführten Vergleich der Kontrollzeitpunkte mit den unterschiedlich perfundierten Lebern auf dem SELDI ProteinChip<sup>®</sup>-System stellte sich heraus, dass es durch den Enzymwechsel zu massiven Veränderungen in der Proteinexpression kam. Hier zeigte sich die Stärke des SELDI ProteinChip<sup>®</sup>-System, das durch die Mustererkennung zwischen differentiell exprimierten Proteinen schnell auf signifikante Veränderungen hinweisen konnte. Beim anschließenden Vergleich der Genexpressionsdaten für die entsprechenden Proben auf den Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> konnten diese Unterschiede verifiziert werden. So waren zu allen fünf Zeitpunkten zwischen 0 - 72 h sowohl auf der Gene- als auch der Proteinebene signifikante Veränderungen durch den Enzymwechsel feststellbar. Auf der Genebene kam es durch Liberase Blendzyme ausschließlich zu einer Verringerung der Expression, während auf den ProteinChips<sup>®</sup> zwar auch eine größere Anzahl an Peaks reprimiert wurde, allerdings auch etliche Proteine durch den Enzymwechsel induziert wurden. Auf den Microarrays konnten elf Gene detektiert werden, die zu allen fünf Zeitpunkten signifikant verändert wurden. Bei näherer Betrachtung aller Zeitpunkte fiel auf, dass sich unter den durch Liberase Blendzyme schwächer exprimierten Genen etliche Membranproteine und Collagenasen befanden. Ein Beispiel hierfür war die Matrix-Metallproteinase 3, die als ein Mitglied der umfangreichen Enzymgruppe der Matrix-Metalloproteinasen ihre wichtige Funktion in der enzymatischen Degradierung der extrazellulären Bindegewebs-Matrixproteine besitzt [183]. Diese Aktivität ist notwendig für die Zellmigration und den allgemeinen Gewebeumbau, wie er bei der Perfusion auftritt. Eine Verringerung ihrer Expression könnte darauf hindeuten, dass durch Liberase Blendzyme die Zellen weniger stark geschädigt wurden und es dadurch zu schwächeren Reaktionen in den Zellen kam. Diese Vermutung spiegelten auch die absoluten Zahlen an schwächer exprimierten Genen und Proteinen aufgrund des Wechsels von Liberase Blendzyme zu Collagenase D wider.

### 5.3 Ausblick

Gegenstand dieser Arbeit war ein Experiment, bei dem zeit- bzw. dosisabhängige Unterschiede der Genexpression nach Substanzgabe in kultivierten Zellen mit einem vorher ermittelten  $LC_{50}$ -abhängigem Wert gemessen wurden. Der Vorteil von *In vitro*-Testsystemen liegt darin, dass sie zu einem relativ frühen Zeitpunkt der Entwicklung eingesetzt werden können, wenn erst geringe Mengen einer Substanz zur Verfügung stehen [180]. Dadurch ist frühzeitig das toxische Potential der Substanz zu erkennen. Veränderungen können so viel früher entdeckt werden als pathologisch auffällige Befunde, die teilweise erst nach erheblichen Zeitspannen sichtbar werden. Transkriptomweite Genexpressionsmuster könnten somit dazu beitragen, toxische Mechanismen einer Substanz besser zu verstehen. Hierzu ist allerdings ein genaues Verständnis des zu untersuchenden Systems nötig, was besonders bei primären Zelllinien nicht immer eindeutig gegeben ist. Zusätzlich birgt dieser Ansatz stets die Gefahr, dass bei Zugabe hoher Dosen, bei der ein Teil der Zellen abgetötet wird, die gemessenen mRNA- bzw. Proteinveränderungen eine Kombination mehrerer Faktoren sind.

Zum Einen ist die Gen- und Proteinexpression der sterbenden Zellen zu berücksichtigen, aber auch die Anpassung der überlebenden Zellen in Abhängigkeit der Behandlung und Kulturbedingungen ist zu erwähnen. Dies umfasst z.B. bei einem Medikament sowohl den gewünschten pharmakologischen Effekt als auch die normale Antwort der lebenden Zellen auf umgebende nekrotische Zellen [184]. Zusätzlich spielte die Antwort der Zellen auf die Isolierungsmethode eine bedeutende Rolle. All dies erschwerte die Interpretation der Resultate und die Erkennung eines toxischen Wirkungsmechanismus.

Ein interessantes Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen war die Änderung von Gen- und Proteinexpressionsprofilen aufgrund des Enzymwechsels für die Leberperfusion. Dadurch zeigte sich die Notwendigkeit standardisierter *In vitro*-Methoden, da bereits kleinste Veränderungen im Versuchsablauf zu signifikanten Regulationen führten. Außerdem müssen alle auf dem Chip vorhandenen Gene in ihrer Funktion genau bekannt sein. Dies ist vor allem wichtig für das eigentliche Ziel aller Anwendungen in der Toxikologie: der Übertragung von Ergebnissen auf humane Studien. Je mehr Informationen über das Genom vorliegen, desto bessere und genauere Ergebnisse sind mit den neuen Methoden zu erreichen. Wichtige biologisch relevante Informationen wie SNP's (single nucleotid polymorphism) sind gerade in der Toxikologie von entscheidender Bedeutung, da die SNP's in vielen für den Xenobiotika-Abbau wichtigen Enzymen (z.B. Cytochrom-P450-Monooxygenasen) gehäuft vorkommen und damit ihre Aktivität beeinflussen können [185, 186].

Bei der Interpretation von Genexpressionsanalysen muss außerdem generell berücksichtigt werden, dass die Expressionsdaten keine Rückschlüsse auf transkriptionelle Modifikationen zulassen. Auch ist nur bedingt eine Aussage zu gebildeten Proteinmengen und Aktivitäten der Proteine möglich [187 - 190]. In den vorliegenden Analysen war bei den meisten der aus den 2D-Gelen identifizierten Proteine und den dazu korrelierenden Genen auf den Affymetrix GeneChips® die gebildete Menge an mRNA äquivalent zur gebildeten Proteinmenge. Auch die gemessene Aktivität korrelierte für die in Aktivitäts-Assays untersuchten Gene. Es konnte grundsätzlich aber nicht ausgeschlossen werden, dass Regulationsmechanismen auf der Translationsebene oder posttranslationelle Veränderungen zu völlig anderen Proteinmengen und -aktivitäten führten, als aus der jeweiligen mRNA-Menge zu schließen war.

Ein wesentlicher Nachteil der *In vitro*-Methoden war, dass unter den gewählten Kulturbedingungen eine rapide Dedifferenzierung der Hepatozyten innerhalb von 24 - 48 h stattfand. Dadurch war die Übertragung von *In vitro*-Ergebnissen auf die *In vivo*-Situation über einen längeren Zeitraum nicht direkt umsetzbar. Dabei wäre es jedoch gerade im Hinblick auf eine

längerfristige Anwendung von Pharmaka beim Menschen dringend erforderlich, dass diese Wirkstoffe hinsichtlich ihrer toxikologischen Wirkungen über mehrere Tage überprüft werden. Die Verwendung von primären Rattenhepatozyten unter diesen Kulturbedingungen für toxikologische Testzwecke zur Ermittlung der Gen- und Proteinexpression ist dadurch auf bestimmte Fragestellungen limitiert. So ist ein Einsatz als Kurzzeit-Modell durchaus denkbar. Längere Inkubationszeiten sind durch den Einbruch von metabolisch wichtigen Enzymen der Phase-I- und Phase-II-Reaktionen in ihrer Anwendungsmöglichkeit nur eingeschränkt in Erwägung zu ziehen.

Ziel weiterführender Projekte sollte es daher sein, Kultivierungsbedingungen für Hepatozyten zu etablieren, die einer Dedifferenzierung und damit dem Verlust hepatotypischer Eigenschaften entgegenwirken. Durch die Anwendung anderer Kulturformen, wie z.B. cryopräservierten Zellen [191], der Einbettung der Zellen in eine Sandwichkultur [192] (um eine drei-dimensionale Struktur zu ermöglichen), der Cokultur mit epithalen Zelllinien [193] oder der Verwendung von Leberschnitten [194] soll die allgemeine Vitalität verbessert und verlängert werden. Die Verwendung von Bioreaktorsystemen [195] führt dagegen zu einer verbesserten zonalen Funktion der Hepatozyten, mit einhergehender erhöhter Aktivität einiger Cytochrom-P450-Monooxygenasen. Ein relativ neuer Ansatz ist die Verwendung von Hepatozyten aus Stammzellen [196], um dem *In vivo*-Status besser zu entsprechen.

Die neuen molekularen Technologien Genomics, Transcriptomics, Proteomics und neuerdings auch Metabolomics erobern immer mehr die klassischen Forschungsgebiete. Einige dieser Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit angewendet sowie auftretende Probleme und ihre Limitationen erkannt und beschrieben. Demnach müssen alle Methoden für eine standardisierte Anwendung noch optimiert werden, um das ganze Potential dieser Methoden vollständig ausschöpfen zu können. Die enorme Masse an gewonnenen Daten und Ergebnissen ist von hohem Nutzen für ein besseres Verständnis komplexer, molekularer Abläufe in den Zellen. Allerdings ist hierzu ein gutes Datenmanagement wichtig, um die großen Datenmengen handzuhaben. Letztendlich wird, zumindest in der näheren Zukunft, immer ein Vergleich mit Ergebnissen aus traditionellen Methoden nötig sein, um zu klären, ob man molekularen Befunden auch entstandene Phänotypen zuordnen kann. Nicht zuletzt steht zur abschließenden Beurteilung der *In vitro*-Systeme die Gegenüberstellung eines Kurzzeit-*In vivo*-Experimentes mit den *In vitro*-Daten noch aus.

---

## 6. Literatur

- [1] **Lee, W.M.**, Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med*, 2003. 349(5): p. 474-85.
  - [2] **Ballet, F.**, Hepatotoxicity in drug development: detection, significance and solutions. *Hepatology*, 1997. 26 Suppl 2: p. 26-36.
  - [3] **Shear, N.H., Spielberg, S.P.**, Anticonvulsant hypersensitivity syndrome. In vitro assessment of risk. *J Clin Invest*, 1988. 82(6): p. 1826-32.
  - [4] **Thompson, N.P. et al.**, Anti-tuberculosis medication and the liver: dangers and recommendations in management. *Eur Respir J*, 1995. 8(8): p. 1384-8.
  - [5] **Hunt, C.M., Westerkam, W.R., Stave, G.M.**, Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A. *Biochem Pharmacol*, 1992. 44(2): p. 275-83.
  - [6] **Robin, M.A. et al.**, Plasma membrane cytochromes P450 as neoantigens and autoimmune targets in drug-induced hepatitis. *J Hepatology*, 1997. 26 Suppl 1: p. 23-30.
  - [7] **Reed, J.C.**, Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol Med*, 2001. 7(7): p. 314-9.
  - [8] **Pessayre, D. et al.**, Mitochondria in steatohepatitis. *Semin Liver Dis*, 2001. 21(1): p. 57-59.
  - [9] **Trauner, M., Meier, P.J., Boyer, J.L.**, Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med*, 1998. 339(17): p. 1217-27.
  - [10] **Siegenthaler, W.**, Lehrbuch der Inneren Medizin. 1992: Thieme Verlag, Stuttgart.
  - [11] **Guengerich, F.P.**, Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol*, 2001. 14(6): p. 611-50.
  - [12] **Waxman, D.J.**, P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys*, 1999. 369(1): p. 11-23.
  - [13] **Eisenbrand, G., Metzler, M.**, Toxikologie für Chemiker. 1994: Thieme Verlag, Stuttgart.
  - [14] **Baker, T.K. et al.**, Temporal gene expression analysis of monolayer cultured rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol*, 2001. 14(9): p. 1218-31.
  - [15] **Seglen, P.O.**, Preparation of rat liver cells. 3. Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Exp Cell Res*, 1973. 82(2): p. 391-8.
  - [16] **Seglen, P.O.**, Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*, 1976. 13: p. 29-83.
  - [17] **Jessen, B.A. et al.**, Assessment of hepatocytes and liver slices as in vitro test systems to predict in vivo gene expression. *Toxicol Sci*, 2003. 75(1): p. 208-22.
  - [18] **Billings, R.E. et al.**, The metabolism of drugs in isolated rat hepatocytes. A comparison with in vivo drug metabolism and drug metabolism in subcellular liver fractions. *Drug Metab Dispos*, 1977. 5(6): p. 518-26.
  - [19] **Guillouzo, A. et al.**, Use of human hepatocyte cultures for drug metabolism studies. *Toxicology*, 1993. 82(1-3): p. 209-19.
  - [20] **Shull, L.R. et al.**, Application of isolated hepatocytes to studies of drug metabolism in large food animals. *Xenobiotica*, 1987. 17(3): p. 345-63.
-

- [21] **DeLeve, L.D., Wang, X.**, Role of oxidative stress and glutathione in busulfan toxicity in cultured murine hepatocytes. *Pharmacology*, 2000. 60(3): p. 143-54.
- [22] **Onderwater, R.C. et al.**, Cytotoxicity of a series of mono- and di-substituted thiourea in freshly isolated rat hepatocytes: a preliminary structure-toxicity relationship study. *Toxicology*, 1998. 125(2-3): p. 117-29.
- [23] **Rolfe, M., James, N.H., Roberts, R.A.**, Tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) suppresses apoptosis and induces DNA synthesis in rodent hepatocytes: a mediator of the hepatocarcinogenicity of peroxisome proliferators? *Carcinogenesis*, 1997. 18(11): p. 2277-80.
- [24] **Chen, M.K. et al.**, Fas-mediated induction of hepatocyte apoptosis in a neuroblastoma and hepatocyte coculture model. *J Surg Res*, 1999. 84(1): p. 82-7.
- [25] **Li, J. et al.**, Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes. *J Biol Chem*, 1999. 274(24): p. 17325-33.
- [26] **Baker, T.K. et al.**, Inhibition of gap junctional intercellular communication by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rat hepatocytes. *Carcinogenesis*, 1995. 16(10): p. 2321-6.
- [27] **Goll, V. et al.**, Comparison of the effects of various peroxisome proliferators on peroxisomal enzyme activities, DNA synthesis, and apoptosis in rat and human hepatocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999. 160(1): p. 21-32.
- [28] **Sidhu, J.S., Omiecinski, C.J.**, Modulation of xenobiotic-inducible cytochrome P450 gene expression by dexamethasone in primary rat hepatocytes. *Pharmacogenetics*, 1995. 5(1): p. 24-36.
- [29] **Vermeulen, N.P., Bessems, J.G., Van de Straat, R.**, Molecular aspects of paracetamol-induced hepatotoxicity and its mechanism-based prevention. *Drug MetabRev*, 1992. 24(3): p. 367-407.
- [30] **Dahlin, D.C. et al.**, N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 81(5): p. 1327-31.
- [31] **Miners, J.O., Drew, R., Birkett, D.J.**, Mechanism of action of paracetamol protective agents in mice in vivo. *Biochem Pharmacol*, 1984. 33(19): p. 2995-3000.
- [32] **Prescott, L.F., Critchley, J.A.**, The treatment of acetaminophen poisoning. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1983. 23: p. 87-101.
- [33] **Gibson, J.D. et al.**, Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: covalent binding versus oxidative stress. *Chem Res Toxicol*, 1996. 9(3): p. 580-5.
- [34] **Brent, J.A., Rumack, B.H.**, Role of free radicals in toxic hepatic injury. II. Are free radicals the cause of toxin-induced liver injury? *J Toxicol Clin Toxicol*, 1993. 31(1): p. 173-96.
- [35] **Adamson, G.M., Harman, A.W.**, Oxidative stress in cultured hepatocytes exposed to acetaminophen. *Biochem Pharmacol*, 1993. 45(11): p. 2289-94.
- [36] **Blazka, M.E. et al.**, Acetaminophen-induced hepatotoxicity is associated with early changes in NF-kB and NF-IL6 DNA binding activity. *J Inflamm*, 1995. 47(3): p. 138-50.
-

- [37] **Boulares, A.H. et al.**, Acetaminophen inhibits NF-kappaB activation by interfering with the oxidant signal in murine Hepa 1-6 cells. *Toxicol Sci*, 2000. 55(2): p. 370-5.
- [38] **Blazka, M.E. et al.**, Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995. 133(1): p. 43-52.
- [39] **Laskin, D.L., Pilaro, A.M., Ji, S.**, Potential role of activated macrophages in acetaminophen hepatotoxicity. II. Mechanism of macrophage accumulation and activation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1986. 86(2): p. 216-26.
- [40] **Ray, S.D., Jena, N.**, A hepatotoxic dose of acetaminophen modulates expression of BCL-2, BCL-X(L), and BCL-X(S) during apoptotic and necrotic death of mouse liver cells in vivo. *Arch Toxicol*, 2000. 73(10-11): p. 594-606.
- [41] **Thomas, R.S. et al.**, Identification of toxicologically predictive gene sets using cDNA microarrays. *Mol Pharmacol*, 2001. 60(6): p. 1189-94.
- [42] **Russell, W.M.S., Burch, R.L.**, *The Principle of Human Experimental Technique*. 1959: Methuen, London.
- [43] **EU-Kommission, KOM(2001)88**: Strategie für eine zukünftige Chemiekalienpolitik. EU-Weisbuch, 2001.
- [44] **Orphanides, G.**, Toxicogenomics: challenges and opportunities. *Toxicol Lett*, 2003. 140-141: p. 145-8.
- [45] **Bulera, S.J. et al.**, RNA expression in the early characterization of hepatotoxicants in Wistar rats by high-density DNA microarrays. *Hepatology*, 2001. 33(5): p. 1239-58.
- [46] **Hamadeh, H.K. et al.**, Prediction of compound signature using high density gene expression profiling. *Toxicol Sci*, 2002. 67(2): p. 232-40.
- [47] **Moggs, J.G., Orphanides, G.**, Genomic analysis of stress response genes. *Toxicol Lett*, 2003. 140-141: p. 149-53.
- [48] **Pennie, W.D.**, Use of cDNA microarrays to probe and understand the toxicological consequences of altered gene expression. *Toxicol Lett*, 2000. 112-113: p. 473-7.
- [49] **Waring, J.F. et al.**, Identifying toxic mechanisms using DNA microarrays: evidence that an experimental inhibitor of cell adhesion molecule expression signals through the aryl hydrocarbon nuclear receptor. *Toxicology*, 2002. 181-182: p. 537-50.
- [50] **Venter, J.C. et al.**, The sequence of the human genome. *Science*, 2001. 291(5507): p. 1304-51.
- [51] **Brown, P.O., Botstein, D.**, Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet*, 1999. 21(1 Suppl): p. 33-7.
- [52] **Schena, M.**, Genome analysis with gene expression microarrays. *Bioessays*, 1996. 18(5): p. 427-31.
- [53] **Bucca, G. et al.**, Gene expression profiling of human cancers. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. 1028: p. 28-37.
- [54] **Giordano, T.J.**, Gene expression profiling of endocrine tumors using DNA microarrays: progress and promise. *Endocr Pathol*, 2003. 14(2): p. 107-16.
- [55] **Frasor, J., et al.**, Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology*, 2003. 144(10): p. 4562-74.
-

- [56] **Alizadeh, A.A. et al.**, Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 2000. 403(6769): p. 503-11.
- [57] **Bittner, M., et al.** Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*, 2000. 406(6795): p. 536-40.
- [58] **Simmons, P.T., Portier, C.J.**, Toxicogenomics: the new frontier in risk analysis. *Carcinogenesis*, 2002. 23(6): p. 903-5.
- [59] **Farr, S., Dunn, R.T.**, 2nd, Concise review: gene expression applied to toxicology. *Toxicol Sci*, 1999. 50(1): p. 1-9.
- [60] **Saiki, R.K. et al.**, Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985. 230(4732): p. 1350-4.
- [61] **Heid, C.A. et al.**, Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 1996. 6(10): p. 986-94.
- [62] **Wilkins, M.R. et al.**, From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)*, 1996. 14(1): p. 61-5.
- [63] **Wasinger, V.C. et al.**, Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 1995. 16(7): p. 1090-4.
- [64] **Bandara, L.R., Kennedy, S.**, Toxicoproteomics -- a new preclinical tool. *Drug Discov Today*, 2002. 7(7): p. 411-8.
- [65] **O'Farrell, P.H.**, High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 1975. 250(10): p. 4007-21.
- [66] **Klose, J.**, Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*, 1975. 26(3): p. 231-43.
- [67] **Jr, G.W. et al.**, Proteinchip(R) surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI) mass spectrometry: a novel protein biochip technology for detection of prostate Cancer biomarkers in complex protein mixtures. *Prostate Cancer ProstaticDis*, 1999. 2(5/6): p. 264-76.
- [68] **von Eggeling, F. et al.**, Mass spectrometry meets chip technology: a new proteomic tool in cancer research? *Electrophoresis*, 2001. 22(14): p. 2898-902.
- [69] **Berridge M, T.A.**, Trans-plasma membrane electron transport: a cellular assay for ADH and NADPH-oxidase based on extracellular, superoxide-mediated reduction of the sulfonated tetrazolium salt WST-1. *Protoplasma*, 1998. 205: p. 74-82.
- [70] **Holland, P.M. et al.**, Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(16): p. 7276-80.
- [71] **Lipshutz, R.J. et al.**, High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet*, 1999. 21(1 Suppl): p. 20-4.
- [72] **Van Gelder, R.N. et al.**, Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(5): p. 1663-7.
- [73] **Bradford, M.M.**, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. 72: p. 248-54.
-

- [74] **Görg, A. et al.**, Gel gradient electrophoresis, isoelectric focusing and two-dimensional techniques in horizontal, ultrathin polyacrylamide layers. *J Biochem Biophys Methods*, 1980. 3(5): p. 273-84.
- [75] **Bjellqvist, B. et al.**, Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods*, 1982. 6(4): p. 317-39.
- [76] **Görg, A., Weiss, W.**, Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients. *Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods* (Ed. Thierry Rabilloud), Springer, Germany, 2000. Chapter 4: 57-106.
- [77] **Rabilloud, T., Charmont, S.**, Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients. *Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods* (Ed. Thierry Rabilloud), Springer, Germany, 2000. Chapter 5: 107-26.
- [78] **Wiesner, A., Bogumil, R.**, Das ProteinChip<sup>®</sup>-System in klinischer Forschung, in Proteinisolierung und Proteinanalytik, in LABORWELT Sonderdruck, 2002. p. 2-6.
- [79] **Baudhuin, P. et al.**, Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-aminoacid oxidase and catalase in rat-liver tissue. *Biochem J*, 1964. 92(1): p. 179-84.
- [80] **Huebl, P., Bretschneider R.**, The titanlyl sulfate method for the determination of catalase in blood, serum and urine. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 1964. 335: p. 146-55.
- [81] **Burke, M.D., Orrenius, S.**, The effect of albumin on the metabolism of ethoxyresorufin through O-deethylation and sulphate-conjugation using isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, 1978. 27(11): p. 1533-8.
- [82] **Bennett, P.N., Blackwell, E., Davies, D.S.**, Competition for sulphate during detoxification in the gut wall. *Nature*, 1975. 258(5532): p. 247-8.
- [83] **Burke, M.D., Mayer, T.**, Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of amicrosomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos*, 1974. 2(6): p. 583-8.
- [84] **DiPersio, C. M., Jackson, D. A., Zaret, K. S.**, The extracellular matrix coordinately modulates liver transcription factors and hepatocyte morphology. *Mol Cell Biol*, 1991. 11: p. 4405-14.
- [85] **Iyer, V. R. et al.**, The transcriptional program in the response of human fibroblasts serum. *Science*, 1999. 283: p. 83-7.
- [86] **Yperman, J., De Visscher, G., Holvoet, P., Flameng, W.**, Beta-actin cannot be used as a control for gene expression in ovine interstitial cells derived from heart valves. *J Heart Valve Dis*, 2004. 13: p. 848-53.
- [87] **Selvey, S. et al.**, Beta-actin an unsuitable internal control for RT-PCR. *Mol Cell Probes*, 2001. 15: p. 307-11.
- [88] **Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A., Clark, B. J.**, GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*, 2005. 21: p. 89-95.
-

- [89] **Bas, A., Forsberg, G., Hammarstrom, S., Hammarstrom, M. L.,** Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol*, 2004. 59: p. 566-73.
- [90] **Dheda, K. et al.,** Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*, 2004. 116: p. 118-9.
- [91] **Radonic, A. et al.,** Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 313: p. 856-62.
- [92] **Yuen T., Wurmbach E., Pfeffer R.L., Ebersole B.J., Sealfon S.C.,** Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res*, 2002. 15: 30(10): e48.
- [93] **Park P.J. et al.,** Current issues for DNA microarrays: platform comparison, double linear amplification, and universal RNA reference. *J Biotechnol*, 2004. 112: p. 225-45.
- [94] **Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L.,** Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 2002. 30(9): e36.
- [95] **de Longueville, F. et al.,** Use of a low-density microarray for studying gene expression patterns induced by hepatotoxicants on primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicol Sci*, 2003. 75: p. 378-92.
- [96] **Harris, A. J., Dial, S. L., Casciano, D. A.,** Comparison of basal gene expression profiles and effects of hepatocarcinogens on gene expression in cultured primary human hepatocytes and HepG2 cells. *Mutat Res*, 2004. 549: p. 79-99.
- [97] **Meneses-Lorente G. et al.,** An evaluation of a low-density DNA microarray using cytochrome P450 inducers. *Chem Res Toxicol*, 2003. 16: p. 1070-7.
- [98] **de Longueville F. et al.,** Gene expression profiling of drug metabolism and toxicology markers using a low-density DNA microarray. *Biochem Pharmacol*, 2002. 64: p. 137-49.
- [99] **Evertsz, E. M., Au-Young, J., Ruvolo, M. V., Lim, A. C., Reynolds, M. A.,** Hybridization cross-reactivity within homologous gene families on glass cDNA microarrays. *Biotechniques*, 2001. 31: p. 1182 -6.
- [100] **Li, J., Pankratz, M., Johnson, J.A.,** Differential Gene Expression Patterns Revealed by Oligonucleotide Versus Long cDNA Arrays *Toxicol Sci*, 2002. 69: p. 383-90.
- [101] **Kuo, W. P., Jensen, T. K., Butte, A. J., Ohno-Machado, L., Kohane, I. S.,** Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. *Bioinformatics*, 2002. 18: p. 405-12.
- [102] **Mecham, B. H. et al.,** Sequence-matched probes produce increased cross-platform consistency and more reproducible biological results in microarray-based gene expression measurements. *Nucleic Acids Res*, 2004. 32: p. e74.
- [103] **Tan, P.K. et al.,** Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31: p. 5676-84.
- [104] **Rogojina, A.T., Orr, W.E., Song, B.K., Geisert, E.E.,** Comparing the use of Affymetrix to spotted oligonucleotide microarrays using two retinal pigment epithelium cell lines. *Mol Vis*, 2003. 9: p. 482-96.
-

- [105] **Mah, N. et al.**, A comparison of oligonucleotide and cDNA-based microarray systems. *Physiol. Genomics*, 2004. 16: p. 361-70.
- [106] **Woo, Y. et al.**, A comparison of cDNA, oligonucleotide, and Affymetrix GeneChip gene expression microarray platforms. *J Biomol Tech*, 2004. 15: p. 276-84.
- [107] **Yauk, C.L., Berndt, M.L., Williams, A., Douglas, G.R.**, Comprehensive comparison of six microarray technologies. *Nucleic Acids Res*, 2004. 27: 32(15): e124.
- [108] **Kothapalli, R., Yoder, S. J., Mane, S., Loughran, T. P., Jr.**, Microarray results: how accurate are they? *BMC Bioinformatics*, 2002. 3: p. 22.
- [109] **Vlahou, A., Fountoulakis, M.**, Proteomic approaches in the search for disease biomarkers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005. 814: p. 11-9.
- [110] **Fountoulakis, M. et al.**, Two-dimensional database of mouse liver proteins: changes in hepatic protein levels following treatment with acetaminophen or its nontoxic regioisomer 3-acetamidophenol. *Electrophoresis*, 2000. 21: p. 2148-61.
- [111] **Wetmore, B.A., Merrick, B.A.**, Toxicoproteomics: proteomics applied to toxicology and pathology. *Toxicol Pathol*, 2004. 32: p. 619-42.
- [112] **Celis, J.E. et al.**, Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS Lett*, 2000. 480: p. 2-16.
- [113] **Gygi, S. P., Corthals, G. L., Zhang, Y., Rochon, Y., Aebersold, R.**, Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97: p. 9390-5.
- [114] **Stein, R. C., Zvelebil, M. J.**, The application of 2D gel-based proteomics methods to the study of breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2002. 7: p. 385-93.
- [115] **Haney, P. J., Draveling, C., Durski, W., Romanowich, K., Qoronfleh, M. W.**, SwellGel: a sample preparation affinity chromatography technology for high throughput proteomic applications. *Protein Expr Purif*, 2003. 28: p. 270-9.
- [116] **Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Sanchez, J. C., Bairoch, A., Hochstrasser, D. F.**, Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number. *Electrophoresis*, 1998. 19: p. 1501-5.
- [117] **Harry, J.L. et al.**, Proteomics: capacity versus utility. *Electrophoresis*, 2000. 6: p. 1071-81.
- [118] **Santoni, V., Molloy, M., Rabilloud, T.**, Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis*, 2000. 6: p. 1054-70.
- [119] **Kopec, K.K., Bozyczko-Coyne, D., Williams, M.**, Target identification and validation in drug discovery: the role of proteomics. *Biochem Pharmacol*, 2005. 69: p. 1133-9.
- [120] **Issaq, H. J., Conrads, T. P., Janini, G. M., Veenstra, T. D.**, Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides. *Electrophoresis* 2002. 23: p. 3048-61.
- [121] **Wang, Y., Hancock, W. S., Weber, G., Eckerskorn, C., Palmer-Toy, D.**, Free flow electrophoresis coupled with liquid chromatography-mass spectrometry for a proteomic study of the human cell line (K562/CR3). *J Chromatogr A*, 2004. 1053: p. 269-78.
-

- [122] **Heijne, W.H., Stierum, R.H., Slijper, M., van Bladeren, P.J., van Ommen, B.,** Toxicogenomics of bromobenzene hepatotoxicity: a combined transcriptomics and proteomics approach. *Biochem Pharmacol*, 2003. 65: p. 857-75.
- [123] **Seibert, V., Wiesner, A., Buschmann, T., Meuer, J.,** Surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI TOF-MS) and ProteinChip technology in proteomics research. *Pathol Res Pract*, 2004. 200: p. 83-94.
- [124] **Petricoin, E. F. et al.,** Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*, 2002. 359: p. 572-7.
- [125] **Jeong, J. S. et al.,** Hepatotoxin N-nitrosomorpholine-induced carcinogenesis in rat liver: ex vivo exploration of preneoplastic and neoplastic hepatocytes. *Exp Mol*, 2003. 74 (1): p. 74-83.
- [126] **Sanz, N., Diez-Fernandez, C., Andres, D., Cascales, M.,** Hepatotoxicity and aging: endogenous antioxidant systems in hepatocytes from 2-, 6-, 12-, 18- and 30-month-old rats following a necrogenic dose of thioacetamide. *Biochim Biophys Acta*, 2002. 158: p. 12-20.
- [127] **Heinloth, A. N. et al.,** Gene expression profiling of rat livers reveals indicators of potential adverse effects. *Toxicol Sci*, 2004. 80: p. 193-202.
- [128] **Reilly, T. P. et al.,** Expression profiling of acetaminophen liver toxicity in mice using microarray technology. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 282: p. 321-8.
- [129] **Gore, M. A., Morshedi, M. M., Reidhaar-Olson, J. F.,** Gene expression changes associated with cytotoxicity identified using cDNA arrays. *Funct Integr Genomics*, 2000. 1: p. 114-26.
- [130] **Ruepp, S. U., Tonge, R. P., Shaw, J., Wallis, N., Pognan, F.,** Genomics and proteomics analysis of acetaminophen toxicity in mouse liver. *Toxicol Sci*, 2002. 65: p. 135-50.
- [131] **Price, V. F., Miller, M. G., Jollow, D. J.,** Mechanisms of fasting-induced potentiation of acetaminophen hepatotoxicity in the rat. *Biochem Pharmacol*, 1987. 36: p. 427-33.
- [132] **Boess, F. et al.,** 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*, 2003. 73: p. 386-402.
- [133] **Harris, A., Shaddock, J., Delongchamp, R., Dragan, Y., Casciano, D.,** Comparison of Basal Gene Expression in Cultured Primary Rat Hepatozytes and Freshly Isolated Rat Hepatozytes. *Tox Mech. Met.* 2004. 5: p. 257-70.
- [134] **Gerhold, D. et al.,** Monitoring expression of genes involved in drug metabolism and toxicology using DNA microarrays. *Physiol Genomics*, 2001. 5: p. 161-70.
- [135] **Jenson, S.D. et al.,** Validation of cDNA microarray gene expression data obtained from linearly amplified RNA. *Mol Pathol*, 2003. 56: p. 307-12.
- [136] **Cross, C. E. et al.,** Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*, 1987. 107: p. 526-45.
- [137] **Green, E. S. et al.,** The efficacy of monohydroxamates as free radical scavenging agents compared with di- and trihydroxamates. *Biochem Pharmacol*, 1993. 45: p. 357-66.
-

- [138] Ferrali, M., Signorini, C., Ciccoli, L., Comporti, M., Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and isouramil. *Biochem J*, 1992. 285: p. 295-301.
- [139] Dean, R. T., Gieseg, S., Davies, M. J., Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochem Sci*, 1993. 18: p. 437-41.
- [140] O'Brien, M. L., Spear, B. T., Glauert, H. P., Role of oxidative stress in peroxisome proliferator-mediated carcinogenesis. *Crit Rev Toxicol*, 2005. 35: p. 61-88.
- [141] Wells, P. G. et al., Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutat Res*, 1997. 396: p. 65-78.
- [142] Heffner, J. E., Repine, J. E., Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis*, 1989. 140: p. 531-54.
- [143] Mathews, C.K., van Holde, K.E., Ahern, K.G., *Biochemistry*. 2000: Addison Wesley Longman Verlag, San Francisco.
- [144] Sampayo, J.N., Gill, M.S., Lithgow, G.J., Oxidative stress and aging--the use of superoxide dismutase/catalase mimetics to extend lifespan. *Biochem Soc Trans*, 2003. 31(6): p. 1305-7.
- [145] Fridovich, I., Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1986. 58: p. 61-97.
- [146] Blum, J., Fridovich, I., Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys*, 1985. 240: p. 500-8.
- [147] Kono, Y., Fridovich, I., Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem*, 1982. 257: p. 5751-4.
- [148] Quinlan, T., Spivack, S., Mossman, B. T., Regulation of antioxidant enzymes in lung after oxidant injury. *Environ Health Perspect*, 1994. 102 Suppl 2: p. 79-87.
- [149] Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J., Poole, L. B., Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*, 2003. 28: p. 32-40.
- [150] Linder, M. W., Prough, R.A., Valdes, R. J., Pharmacogenetics: a laboratory tool or optimizing therapeutic efficiency. *Clin Chem*, 1997. 43(2): p. 254-66.
- [151] Zucker, S. D., Goessling, W., Ransil, B. J., Gollan, J. L., Influence of glutathioneS-transferase B (ligandin) on the intermembrane transfer of bilirubin. Implications for the intracellular transport of nonsubstrate ligands in hepatocytes. *J Clin Invest*, 1995. 96: p. 1927-35.
- [152] Ketterer, B., A bird's eye view of the glutathione transferase field. *Chem Biol Interact*, 2001. 138: p. 27-42.
- [153] Ishigami, T. et al., Regulatory effects of senescence marker protein 30 on the proliferation of hepatocytes. *Pathol Int*, 2001. 51: p. 491-7.
- [154] Ishigami, A. et al., Senescence marker protein-30 knockout mouse liver is highly susceptible to tumor necrosis factor-alpha- and Fas-mediated apoptosis. *Am J Pathol*, 2002. 161: p. 1273-81.
- [155] Feng, D. et al., Senescence marker protein-30 as a novel antiaging molecule. *N Y Acad Sci*, 2004. 1019: p. 360-4.
-

- [156] **Yamaguchi, M. et al.**, Potential role of regucalcin as a specific biochemical marker of chronic liver injury with carbon tetrachloride administration in rats. *Mol Cell Biochem*, 2002. 241: p. 61-7.
- [157] **Tillmann, H., Stein, S., Liehr, T., Eschrich, K.**, Structure and chromosomal localization of the human and mouse muscle fructose-1,6-bisphosphatase genes. *Gene*, 2000. 247(1-2): p. 241-53.
- [158] **Green, J. R., Seltenmeyer, Y., Jaeggi, K. A., Widler, L.**, Renal tolerability profile of novel, potent bisphosphonates in two short-term rat models. *Pharmacol Toxicol*, 1997. 80(5): p. 225-30.
- [159] **Benjamin, I. J., McMillan, D. R.**, Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 1998. 83: p. 117-32.
- [160] **Hartl, F. U.**, Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 1996. 381: p. 571-9.
- [161] **Bierkens, J. G.**, Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicology*, 2000. 153(1-3): p. 61-72.
- [162] **Lindquist, S.**, The heat-shock response. *Annu Rev Biochem*, 1986. 55: p. 1151-91.
- [163] **Itoh, H. et al.**, Mammalian 60-kDa stress protein (chaperonin homolog). Identification, biochemical properties, and localization. *J Biol Chem*, 1995. 270: p. 13429-35.
- [164] **Soltys, B. J., Gupta, R. S.**, Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells. *Cell Biol Int*, 1997. 21: p. 315-20.
- [165] **Thome-Kromer, B. et al.**, Toward the identification of liver toxicity markers: a proteome study in human cell culture and rats. *Proteomics*, 2003. 10: p. 1835-62.
- [166] **Furukawa, K., Shimada, T., England, P., Mochizuki, Y., Williams, G.M.**, Enrichment and characterization of clonogenic epithelial cells from adult rat liver and initiation of epithelial cell strains. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1987. 23(5): p. 339-48.
- [167] **Rosengarth, A., Rosgen, J., Hinz, H. J., Gerke, V.**, A comparison of the energetics of annexin I and annexin V. *J Mol Biol*, 1999. 288: p. 1013-25.
- [168] **van Bilsen, M., Reutelingsperger, C. P., Willemsen, P. H., Reneman, R. S.**, Annexins in cardiac tissue: cellular localization and effect on phospholipase activity. *Mol Cell Biochem*, 1992. 116: p. 95-101.
- [169] **Fan, M.H. et al.**, An essential role for lipopolysaccharide-binding protein in pulmonary innate immune responses. *Shock*, 2002. 18: p. 248-54.
- [170] **Schreiber, G. et al.**, The acute phase response in the rodent. *Ann N Y Acad Sci*, 1989. 557: p. 61-85.
- [171] **Kurumiya, Y. et al.**, Differential suppression of liver-specific genes in regenerating rat liver. *J Hepatol*, 2000. 32(4): p. 636-44.
- [172] **Heinrich, P. C., Castell, J. V., Andus, T.**, Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*, 1990. 265: p. 621-36.
- [173] **Cunningham, M.J., Liang, S., Fuhrman, S., Seilhamer, J.J., Somogyi, R.**, Gene expression microarray data analysis for toxicology profiling. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. 919: p. 52-67.
-

- [174] **Tygstrup, N., Bangert, K., Ott, P., Bisgaard, H.C.**, Messenger RNA profiles in liver injury and stress: a comparison of lethal and nonlethal rat models. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 290: p. 518-25.
- [175] **Coen, M. et al.**, Integrated application of transcriptomics and metabonomics yields new insight into the toxicity due to paracetamol in the mouse. *J Pharm Biomed Anal*, 2004. 5: p. 93-105.
- [176] **Aleksunes, L.M. et al.**, Differential expression of mouse hepatic transporter genes in response to acetaminophen and carbon tetrachloride. *Toxicol Sci*, 2005. 83: p. 44-52.
- [177] **Calabrese, E.J., Baldwin, L.A.**, Applications of hormesis in toxicology, risk assessment and chemotherapeutics. *Trends Pharmacol Sci*, 2002. 23(7): p. 331-7.
- [178] **Calabrese, E.J., Blain, R.**, The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005. 202(3): p. 289-301.
- [179] **Kmiec Z.**, Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 2001. 161: p. 1-151.
- [180] **Waring, J.F., Ciurlionis, R., Jolly, R.A., Heindel, M., Ulrich, R.G.**, Microarray analysis of hepatotoxins in vitro reveals a correlation between gene expression profiles and mechanisms of toxicity. *Toxicol Lett*, 2001. 120: p. 359-68.
- [181] **Paine, A.J., Andreakos, E.**, Activation of signalling pathways during hepatocyte isolation: relevance to toxicology in vitro. *Toxicol In Vitro*, 2004. 18: p. 187-93.
- [182] **Homepage:** [www.roche.com/collagenase](http://www.roche.com/collagenase).
- [183] **Okazaki, I., Watanabe, T., Hozawa, S., Arai, M., Maruyama, K.**, Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis: with special reference to the role of matrix metalloproteinases. *J Gastroenterol Hepatol*, 2000. 15 Suppl: p. D26-32.
- [184] **Fielden, M.R., Zacharewski, T.R.**, Challenges and limitations of gene expression profiling in mechanistic and predictive toxicology. *Toxicol Sci*, 2001. 60: p. 6-10.
- [185] **Rodrigues, A.D., Rushmore, T.H.**, Cytochrome P450 pharmacogenetics in drug development: in vitro studies and clinical consequences. *Curr Drug Metab*, 2002. (3): p. 289-309.
- [186] **Rogers, J.F., Nafziger, A.N., Bertino, J.S.**, Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450-metabolized drugs. *Am J Med*, 2002. 113(9): p. 746-50.
- [187] **Anderson, L., Seilhamer, J.**, A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, 1997.18: p. 533-7.
- [188] **Fessler, M.B., Malcolm, K.C., Duncan, M.W., Worthen, G.S.**, A genomic and proteomic analysis of activation of the human neutrophil by lipopolysaccharide and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 2002. 277: p. 31291-302.
- [189] **Cham, C.M. et al.**, Gene array and protein expression profiles suggest post-transcriptional regulation during CD8+ T cell differentiation. *J Biol Chem*, 2003. 278: p. 17044-52.
- [190] **Chen, G. et al.**, Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics*, 2002. 4: p. 304-13.
-

- [191] **Hengstler, J.G. et al.**, Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitromodel for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metab Rev*, 2000. 32: p. 81-118.
- [192] **Dunn, J.C., Tompkins, R.G., Yarmush, M.L.**, Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol Prog*, 1991. 7(3): p. 237- 45.
- [193] **Donato, M.T., Gomez-Lechon, M. J., Castell, J.V.**, Drug metabolizing enzymes in rat hepatocytes co-cultured with cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1990. 26(11): p. 1057-62.
- [194] **Vickers, A.E., Fisher, R.L.**, Organ slices for the evaluation of human drug toxicity. *Chem Biol Interact*, 2004. 150(1): p. 87-96.
- [195] **Allen J.W., Khetani, S.R., Bhatia, S.N.**, In vitro zonation and toxicity in a hepatocytebioreactor. *Toxicol Sci*, 2005. 84(1): p. 110-9.
- [196] **Davila J.C. et al.**, Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicol Sci*, 2004. 79(2): p. 214-23.
-

## 7. Danksagung

Allen Mitarbeitern, Kollegen und Freunden, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit aktiv, geistig oder moralisch unterstützt haben, danke ich ganz herzlich.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Braunbeck für die Bereitschaft diese Arbeit als Gutachter zu betreuen und seine konstruktiven Hinweise zum Manuskript.

Herrn Prof. Dr. Jan Hengstler danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Herrn Dr. Peter-Jürgen Kramer danke ich für die Aufnahme in die Toxikologie der Merck KGaA und das Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Dr. Philip Hewitt danke ich ganz besonders für die tolle Betreuung in jeder Phase der Arbeit, hilfreiche Unterstützung und Ratschlägen bei wirklich allen Problemen. Thank you !

Frau Dr. Michaela Kröger möchte ich für die Gelegenheit der Durchführung der Proteomics-Methoden und die nützlichen Hinweise zum Manuskript danken.

Herrn Dr. Stefan Müller danke ich für alle Tips und Tricks rund ums Labor, den hilfreichen Anmerkungen zum Manuskript und natürlich für die Aufnahme in die „Knoll-Connection“.

Zusätzlich möchte ich allen drei Laborleitern der Molekularen Toxikologie der Merck KGaA dafür danken, dass ihre Büros für mich und meine Anliegen immer offen standen. Die unkomplizierte und freundliche Atmosphäre in der MOLTOX hat sicher ihren Teil dazu beigetragen, dass ich gerne und motiviert (jedenfalls meistens ☺) ins Labor gegangen bin.

Manuel Ammerschläger, Kerstin Fella, Suse Beyer, Stefanie Simon, Nadine Zidek, Gregor Tuschl, Jens Hrach sowie allen DiplomandInnen und PraktikantInnen danke ich für den regen Austausch von Informationen und die vielen interessanten Diskussionen und Kaffeepausen.

Kerstin nochmal ein ganz besonderer Dank für die Durchführung der MALDI-TOF-MS-Analysen.

Bei Claudia Klement, Margret Kling, Bettina von Eiff, Yvonne Walter sowie Anett Czarnotta möchte ich mich für die stetige Hilfsbereitschaft sowie technische Unterstützung, das tolle Arbeitsklima und natürlich die Notversorgung mit Kaffee und Süßigkeiten bedanken.

Ein ganz besonderer Dank an Melanie Kühnl dafür, dass sie mir mit ihrem umfangreichen Wissen über Microarrays mit Rat und Tat zur Hilfe stand.

Sonja Heinrich, Dr. Ulrike Hemmrich, Dr. Ana Teresa Maia, Dr. Cherie Blenkiron und insbesondere Dr. Andreas Biller danke ich für Anregungen und Hilfe bei den durchgeführten Korrekturen.

Achim, Andreas, Thomas, Can, Frank, Ralf und Werner danke ich für jede Menge Ablenkung neben dem Laboralltag und den ein oder anderen Umtrunk in gemütlicher Runde.

*Last but not least* möchte ich von ganzem Herzen meiner Mutter danken, die mich in jeder Hinsicht unterstützte.

**Danke ! Thank you ! Obrigado !**

*„Was hülfte es dem Menschen, wenn er die ganze Welt gewönne und nähme doch Schaden an seiner Seele ?“*

*MT<sub>16,26</sub>*

---

## 8. Publikationen

### Zeitschriften:

**Beigel J, Fella K, Klement C, Kramer PJ, Kroeger M, Hewitt PG.,** Gene And Protein Expression Analysis Of Cultured Primary Rat Hepatocytes. *Toxicology*, 2004. 202: p. 33-127 (59).

**Ammerschläger M, Beigel J, Klein KU, Müller SO.,** Characterization of the species-specificity of peroxisome proliferators in rat and human hepatocytes. *Toxicol Sci*, 2004. 78: p. 229-40.

**Le Mellay V, Houben R, Troppmair J, Hagemann C, Mazurek S, Frey U, Beigel J, Weber C, Benz R, Eigenbrodt E, Rapp UR.,** Regulation of glycolysis by Raf protein serine/threonine kinases. *Adv Enzyme Regul*, 2002. 42: p. 317-32.

### Tagungen:

**British Toxicology Society Annual Congress 2004,** Edinburgh. Gene And Protein Expression Analysis Of Cultured Primary Rat Hepatocytes. (Vortrag und Posterpräsentation)

## 9. Anhang

**Tab. 9.1:** Sequenzen der eingesetzten TaqMan<sup>®</sup>-Sonden und Primer.

| Gen                                | Sequenz   |
|------------------------------------|---|
| <b>Katalase</b>                    | Rn00560930_m1, Assay-on-Demand, Sequenz nicht öffentlich          |
| <b>β-Actin</b>                     | Rn00667869_m1, Assay-on-Demand, Sequenz nicht öffentlich          |
| <b>Annexin 5</b>                   | Rn00565571_m1, Assay-on-Demand, Sequenz nicht öffentlich          |
| <b>18S rRNA</b>                    | Endogene Kontrolle, Pre-developed-Assay, Sequenz nicht öffentlich |
| <b>Metallothionein 1</b>           |   |
| Forward Primer                     | AAATAATTTCCGGACCAACTCAGA  |
| Reverse Primer                     | TTCACATGCTCGGTAGAAAACG  |
| TaqMan <sup>®</sup> -Sonde         | 6-FAM-TCTTGCCGTACACCTCCACCCAGTTTACTAA-TAMRA                       |
| <b>LPS-Binding-Protein</b>         |   |
| Forward Primer                     | TCACTCACCCACGGAGCA  |
| Reverse Primer                     | CCCCAGCAATGTAGGAAGCA  |
| TaqMan <sup>®</sup> -Sonde         | 6-FAM-CAGGATGAAGTCTGCGACTGGGCC-TAMRA                              |
| <b>Clusterin</b>                   |   |
| Forward Primer                     | ACGGGACTCCAGACTCCAAA  |
| Reverse Primer                     | CCAGGACCATGCCATTGTC   |
| TaqMan <sup>®</sup> -Sonde         | 6-FAM-GGCCACACCATGAAGATTCTCCTGC-TAMRA                             |
| <b>CYP 3A1</b>                     |   |
| Forward Primer                     | TGGCCAGAGCCTGAGGAAT   |
| Reverse Primer                     | ATAAGGATCAATGCTGCCCTTGT   |
| TaqMan <sup>®</sup> -Sonde         | 6-FAM-TCGCCAGAAAGGTTTCAGCAAGA-TAMRA                               |
| <b>Sulfotransferase (Östrogen)</b> |   |
| Forward Primer                     | AGGGAATTGTAGGAGACTGGAAGA  |
| Reverse Primer                     | TGCTGGTAGTGCTCCTCAAATC  |
| TaqMan <sup>®</sup> -Sonde         | 6-FAM-CCACTTCCCTGAAGCCCTGAGGGA-TAMRA                              |

**Tab. 9.2:** Gensonden des MWG Low-Density Microarray (Aufstellung aus der Genliste des Microarrays entnommen).

| <b>Gen</b>                            | <b>Accession No.</b> |
|---------------------------------------|----------------------|
| 14-3-3                                | NM_019377            |
| 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase | NM_024390            |
| Waf1 (p21)                            | U24174               |
| 18S rRNA                              | M11188               |
| Activating transcription factor 3     | NM_012912            |
| Activator protein / c-Jun             | X17163               |
| Acyl-CoA dehydrogenase short chain    | NM_022512            |
| Acyl-CoA oxidase 1                    | NM_017340            |
| Adenylate-cyclase                     | NM_022600            |
| Adenylate-cyclase 2                   | NM_031007            |
| Adenylate-cyclase 3                   | NM_130779            |
| Adenylate-cyclase 4                   | NM_019285            |
| Adenylate-cyclase 6                   | NM_012821            |
| Adenylate-cyclase 8                   | NM_017142            |
| Adipocyte lipid binding protein       | U75581               |
| Aflatoxin B1 aldehyde reductase       | NM_013215            |
| Alcohol dehydrogenase 2               | X90710               |
| Aldehyde dehydrogenase 1              | NM_022407            |
| alpha 1,2-Fucosyltransferase          | NM_031236            |
| alpha 1-Antitrypsin                   | NM_022519            |
| Annexin V                             | NM_013132            |
| Apolipoprotein A1                     | X00558               |
| Apolipoprotein AII                    | NM_013112            |
| Apolipoprotein CIII                   | NM_012501            |
| Apolipoprotein E                      | NM_138828            |
| Arachidonate 12-Lipoxygenase          | NM_031010            |
| Aryl hydrocarbon receptor             | NM_013149            |
| Aspartate aminotransferase            | NM_012571            |
| ATPase alpha1                         | M28648               |
| ATPase beta F1                        | M57634               |
| Bcl-2                                 | NM_016993            |
| Bcl2 antagonist of cell death         | NM_022698            |
| Bcl2 associated X-protein             | U49729               |
| Bcl-x                                 | U72350               |
| beta-Tubulin                          | AB011679             |
| Calcineurin-B                         | D14568               |
| Calmodulin                            | M19312               |
| Calnexin                              | L18889               |
| Calrecticulum                         | X53363               |
| Carbamyl phosphate synthase           | M11710               |
| Carnitine palmitoyltransferase 1alpha | NM_031559            |
| Caspase 2                             | NM_022522            |
| Caspase 3                             | NM_012922            |
| Caspase 6                             | NM_031775            |
| Caspase 7                             | NM_022260            |
| Caspase 8                             | NM_022277            |
| Caspase 9                             | NM_031632            |

→ Fortsetzung **Tab. 9.2:** Gensonden des MWG Low-Density Microarray.

| <b>Gen</b>                       | <b>Accession No.</b> |
|----------------------------------|----------------------|
| Catalase                         | M11670               |
| Catechol-O-methyltransferase     | M60753               |
| Catenin beta                     | NM_053357            |
| Cathepsin L                      | Y00697               |
| CD44                             | U96138               |
| c-Fos                            | X06769               |
| Cholesterol 7a-hydroxylase       | X17595               |
| Cholesterol esterase             | L46791               |
| Clusterin                        | NM_012679            |
| c-MET / growth factor receptor   | Z46374               |
| c-Myc                            | Y00396               |
| Collagen Type II                 | NM_012929            |
| Collagen Type III                | M21354               |
| Connexin-40                      | AF021806             |
| Constitutive androstane receptor | NM_022941            |
| c-Raf                            | M15427               |
| C-reactive protein               | NM_017096            |
| Creatine kinase b                | M57664               |
| Cyclin B                         | L11995               |
| Cyclin D1                        | X75207               |
| Cyclin dependent kinase 4        | NM_053593            |
| Cyclin E                         | D14015               |
| Cyclin G                         | X70871               |
| Cyclooxygenase 1                 | NM_017043            |
| Cyclooxygenase 2                 | NM_017232            |
| Cyclophilin                      | M19533               |
| Cytochrom c oxidase Vb           | NM_053586            |
| Cytochrom-P450 1A1               | NM_012540            |
| Cytochrom-P450 1A2               | NM_012541            |
| Cytochrom-P450 2A1               | NM_012692            |
| Cytochrom-P450 2B2               | M34452               |
| Cytochrom-P450 2C11              | X79081               |
| Cytochrom-P450 2C12              | NM_031572            |
| Cytochrom-P450 2D2               | NM_012730            |
| Cytochrom-P450 2D3               | AB008424             |
| Cytochrom-P450 2D4               | AB008425             |
| Cytochrom-P450 2D5               | M25143               |
| Cytochrom-P450 2E1               | J02627               |
| Cytochrom-P450 3A1               | L24207               |
| Cytochrom-P450 3A2               | M10161               |
| Cytochrom-P450 4A1               | M57718               |
| Cytochrom-P450 4A2               | M57719               |
| Cytochrom-P450 4A8               | M37828               |
| cytoplasmic $\beta$ -Actin       | V01217               |
| Defender against cell death-1    | NM_138910            |
| DNA Polymerase beta              | NM_017141            |
| DNA Topoisomerase 1              | NM_022615            |
| Dynein light chain 1             | NM_053319            |

→ Fortsetzung **Tab. 9.2:** Gensonden des MWG Low-Density Microarray.

| <b>Gen</b>                             | <b>Accession No.</b> |
|--|----------------------|
| E2F3 Transkriptionfaktor 3             | U31668               |
| Early growth response 1                | NM_012551            |
| E-Cadherin                             | NM_031334            |
| EGF receptor                           | U52529               |
| Endothelin converting enzyme           | NM_053596            |
| Enoyl CoA hydratase short chain (mito) | NM_078623            |
| Epoxide hydrolase 2 cyto               | NM_022936            |
| Epoxide hydrolase1 mito                | NM_012844            |
| Erythropoietin receptor                | NM_017002            |
| Estrogen receptor 1                    | NM_012689            |
| Extracellular related kinase           | M61177               |
| Farnesol receptor                      | NM_021745            |
| Fas antigen                            | D26112               |
| Fatty acid binding protein 1           | NM_012556            |
| Fatty acid synthase                    | M76767               |
| Fetoprotein alpha                      | NM_012493            |
| Flavin containing monooxygenase 1      | NM_012792            |
| Flavin containing monooxygenase 2      | AF458414             |
| Flavin containing monooxygenase 3      | NM_053433            |
| Flavin containing monooxygenase 4      | AF458416             |
| Flavin containing monooxygenase 5      | AF458413             |
| Fos related antigen                    | NM_012953            |
| Gadd 45                                | L32591               |
| Gadd153                                | U36994               |
| Gamma-glutamyl transpeptidase          | NM_053840            |
| GAPDH                                  | M17001               |
| Glucose regulated protein 58           | NM_031580            |
| Glukose-6-phosphat dehydrogenase       | NM_017006            |
| Glukose-6-phosphatase                  | NM_013098            |
| Glutamate dehydrogenase                | NM_012570            |
| Glutathione peroxidase                 | NM_030826            |
| Glutathione reductase                  | NM_053906            |
| Glutathione S-transferase pi           | X02904               |
| Glutathione S-transferase Ya           | M26874               |
| Glutathione S-transferase Yb-1         | J03914               |
| Glutathione S-transferase Yb-3         | J02744               |
| Glutathione S-transferase Yc           | K01932               |
| Glutathione synthetase                 | L38615               |
| Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase | NM_017008            |
| Glykogen phosphorylase                 | L10668               |
| Growth hormone receptor                | J04811               |
| Heat shock protein 60                  | NM_022229            |
| Heat shock protein 70                  | NM_031971            |
| Heat shock protein 90                  | S45392               |
| Heme binding protein 23                | D30035               |
| Heme oxygenase                         | NM_012580            |
| Hepatic lipase                         | NM_012597            |
| Hepatocyte nuclear factor 4a           | NM_022180            |

→ Fortsetzung **Tab. 9.2:** Gensonden des MWG Low-Density Microarray.

| <b>Gen</b>                                   | <b>Accession No.</b> |
|--|----------------------|
| Hypoxanthine phosphoribosyltransferase       | X62085               |
| inducible Nitric oxide synthase              | NM_052799            |
| Insulin like growth factor 1                 | M15481               |
| Insulin like growth factor 2                 | NM_031511            |
| Insulin like growth factor binding protein 1 | NM_013144            |
| Insulin receptor substrate 1                 | NM_012969            |
| Insulin-like growth factor binding protein 2 | NM_013122            |
| Integrin alpha                               | NM_030994            |
| Integrin alpha5                              | S58528               |
| Integrin beta1                               | NM_017022            |
| Integrin beta3                               | S58529               |
| Intercellular adhesion molecule-1            | NM_012967            |
| Interferon inducible protein 10              | U22520               |
| Interleukin 6                                | M26744               |
| Interleukin 6 dependend binding protein      | M57235               |
| Interleukin-1 alpha                          | NM_017019            |
| Interleukin-1 beta                           | NM_031512            |
| JunB   | NM_021836            |
| Lactate dehydrogenase-B                      | NM_012595            |
| Leucine rich addic nuclear protein           | D32209               |
| Lipopolysaccharide binding protein           | NM_017208            |
| Macrophage inflammatory protein-2 alpha      | X65647               |
| Maspin                                       | NM_057108            |
| Matrix metalloproteinase 2                   | NM_031054            |
| Matrix metalloproteinase 9                   | NM_031055            |
| Membrane-type matrix metalloproteinase 1     | X83537               |
| Metallothionein 1a                           | NM_138826            |
| Metallothionein 2                            | M11794               |
| Methionine Adenosyltransferase 2             | NM_134351            |
| Mismatch repair protein 1                    | U80054               |
| Mismatch repair protein 2                    | NM_031058            |
| Mitogen activated protein kinase (p38)       | NM_031020            |
| Monoamine oxidase A                          | D00688               |
| Monoamine oxidase B                          | NM_013198            |
| Multidrug resistant protein-1                | AF257746             |
| Multidrug resistant protein-2                | NM_012833            |
| Myc associated factor x                      | NM_022210            |
| Myosin heavy chain                           | NM_053986            |
| NADH-Q-reductase                             | D86215               |
| NADPH quinone oxidoreductase-1               | NM_017000            |
| NFkappaB (p65)                               | L26267               |
| Ornithine decarboxylase                      | NM_012615            |
| Oxygen regulated protein 150                 | U41853               |
| P53-induced gene 1                           | AF036941             |
| Peroxiredoxin 3                              | NM_022540            |
| Peroxisomal 3-Ketoacyl-CoA thiolase 2        | M32801               |
| Peroxisome assembly factor 1                 | X57988               |
| Peroxisome assembly factor 2                 | D63673               |

→ Fortsetzung **Tab. 9.2:** Gensonden des MWG Low-Density Microarray.

| <b>Gen</b>                                       | <b>Accession No.</b> |
|--|----------------------|
| Phospholipase A2                                 | U07798               |
| Peroxisome proliferator activated receptor alpha | NM_013196            |
| Plasminogen activator inhibitor 1                | M24067               |
| Plasminogen activator tissue tPA                 | NM_013151            |
| Plasminogen activator urokinase uPA              | NM_134352            |
| Pregnane X receptor                              | AF151377             |
| Proliferating cell nuclear antigen               | NM_022381            |
| Proteasome RN3 subunit                           | L17127               |
| Pyruvate carboxylase                             | NM_012744            |
| Pyruvate dehydrogenase E1a                       | Z12158               |
| Redox factor 1 / Apex nuclease                   | NM_024148            |
| Reticulocalbin                                   | AJ001929             |
| Retinoblastoma                                   | D25233               |
| Retinoid X receptor alpha                        | NM_012805            |
| Sodium/bile acid cotransporter                   | NM_017047            |
| Stearyl Coa desaturase                           | J02585               |
| Stress activated protein kinase                  | L27111               |
| Stress response protein 27                       | NM_031970            |
| Sulfotransferase (DHEA)                          | NM_133616            |
| Sulfotransferase (Estrogen)                      | U50205               |
| Sulfotransferase (Mercaptopyruvate)              | D50564               |
| Sulfotransferase (Phenol)                        | NM_031834            |
| Sulfotransferase 1C2                             | NM_133547            |
| Sulfotransferase HNK-1                           | AF022729             |
| Sulfotransferase Hydroxysteroid                  | M31363               |
| Superoxid dimutase Mn                            | Y00497               |
| Superoxiddismutase Cu/Zn                         | M25157               |
| Suppressor of cytokine signaling                 | AF075382             |
| Thioredoxin                                      | NM_053800            |
| Thymidylate synthetase                           | NM_019179            |
| Tissue inhibitor of metalloproteinases 1         | NM_053819            |
| Transferrin                                      | D38380               |
| Transforming growth factor alpha                 | NM_012671            |
| Transforming growth factor beta1                 | NM_021578            |
| Transforming growth factor beta3                 | NM_013174            |
| Tubulin alpha                                    | V01227               |
| Tumor necrosis factor alpha                      | NM_012675            |
| Tumor necrosis factor beta                       | NM_080769            |
| Ubiquitin  | NM_017314            |
| UDP-glucosyltransferase                          | D83796               |
| UDP-glucosyltransferase (bilirubin)              | M34007               |
| UDP-glucosyltransferase (hepatic microsomal)     | Y00156               |
| UDP-glucosyltransferase (phenobarbital ind)      | M13506               |
| Vascular cell adhesion molecule 1                | NM_012889            |
| Vask   | X06801               |
| Very long chain acyl-CoA dehydrogenase           | NM_012891            |
| Vimentin   | NM_031140            |