

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie an der
Universität Tübingen

**Verbesserung der metabolischen Funktion der
hepatischen Zelllinien HepG2, Huh7, HLE und AKN1
mittels 5-Azacytidin und Vitamin C**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Ehret, Lisa Viktoria

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nüssler

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Peters

Tag der Disputation: 21.03.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung.....	1
1.1. Die Leber	1
1.1.1. Anatomie.....	1
1.1.2. Biochemie und Physiologie.....	3
1.1.2.1. Allgemeine Funktionen in der Körperhomöostase.....	3
1.1.2.2. Harnstoffzyklus	5
1.1.2.3. Biotransformation	7
1.2. Epigenetik	8
1.2.1. Epigenetik in hepatozellulären Karzinomzellen.....	8
1.2.2. DNA-Demethylierung durch Epigenetik-modulierende Substanzen...	9
1.2.2.1. Vitamin C-2-Phosphat.....	9
1.2.2.2. 5-Azacytidin	10
1.3. Arzneimittelentwicklung in Deutschland	11
1.3.1. Entwicklungsphasen von Arzneimitteln.....	12
1.3.2. Präklinische Phase: Erforschung des Arzneimittelmetabolismus.....	12
1.3.2.1. Goldstandard: primärer humaner Hepatozyt.....	12
1.3.2.2. Alternativen und Forschung.....	13
1.4. Fragestellung	16
2. Material und Methoden.....	18
2.1. Materialien	18
2.2. Kultivierung von Zelllinien	21
2.2.1. AKN1 Zellen/Zelllinie.....	23
2.2.2. HLE Zellen/Zelllinie	24
2.2.3. HepG2 Zellen/Zelllinie.....	25
2.2.4. Huh7 Zellen/Zelllinie	26
2.2.5. Hepatozyten.....	28
2.3. Chromatinarray für Epigenetik-modifizierende Enzyme qRT-PCR.....	29

2.4. Allgemeiner Versuchsaufbau	30
2.4.1. Trypanblau Ausschluss-Methode.....	30
2.4.2. Resazurinkonversion	31
2.4.3. LDH-Freisetzung.....	31
2.4.4. Harnstoffproduktion.....	32
2.4.5. Phase I- und II-Aktivität.....	33
2.4.6. Albuminsekretion	35
2.4.7. SRB-Färbung.....	36
2.4.8. mRNA-Analyse	38
2.4.8.1. mRNA-Isolation mittels TriFast.....	38
2.4.8.2. mRNA-Quantifikation.....	39
2.4.8.3. mRNA-Integrität.....	39
2.4.8.4. semiquantitative RT-PCR	40
2.5. Statistik	42
3. Ergebnisse	44
3.1. Genexpression der DNA-Methyltransferasen.....	44
3.2. Mikroskopie.....	50
3.3. Resazurinkonversion.....	54
3.4. LDH-Freisetzung	55
3.5. Phase I- und II-Enzyme.....	57
3.5.1. HepG2 Zellen.....	57
3.5.2. Huh7 Zellen	61
3.5.3. HLE Zellen	65
3.5.4. AKN1 Zellen.....	69
3.6. Harnstoffproduktion.....	73
3.6.1. HepG2 Zellen.....	73
3.6.2. Huh7 Zellen	76
3.6.3. HLE Zellen	79
3.6.4. AKN1 Zellen.....	82
3.7. Albuminexpression und -sekretion	85
4. Diskussion	87
4.1. Einordnung der Ergebnisse in die Literatur.....	87

4.2. Kritik an Methodik.....	90
4.2.1. Harnstoffzyklus und Normierung mittels SRB	90
4.2.2. Phase I- und II-Aktivitätsmessung.....	92
4.2.3. LDH-Messung	93
4.2.4. Multiple Nebenbanden in der mRNA-Analyse.....	94
4.3. Referenzwert der primären humanen Hepatozyten.....	95
4.4. Epigenetisch modifizierte Zelllinien in präklinischen Studien	95
4.5. Zelllinien als Leberunterstützungssysteme	97
4.6. Azacytidin und Vitamin C als Therapie für hepatozelluläre Karzinome	100
4.7. Schlussfolgerung.....	101
5. Zusammenfassung	103
6. Literaturverzeichnis	105
7. Erklärung zum Eigenanteil.....	120

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Harnstoffzyklus in der humanen Leber mit Darstellung von NAGS	6
Abbildung 2 AKN1 Zellen in Kultur	23
Abbildung 3 HLE Zellen in Kultur.....	24
Abbildung 4 HepG2 Zellen in Kultur	25
Abbildung 5 Huh7 Zellen in Kultur	26
Abbildung 6 humane Hepatozyten am Tag der Isolation in Kultur.....	28
Abbildung 7 Beispiel für die SRB-Standardkurven anhand der Zelllinie AKN1.	37
Abbildung 8 Schema der RNA-Isolation mit TriFast	38
Abbildung 9 Ergebnisse des Chromatinarrays für Epigenetik-modifizierende Enzyme	44
Abbildung 10 Gehalt an mRNA für DNMT1, 3A und 3B in HepG2 Zellen.	45
Abbildung 11 Gehalt an mRNA für DNMT1, 3A und 3B in Huh7 Zellen	46
Abbildung 12 Gehalt an mRNA für DNMT1, 3A und 3B in HLE Zellen.....	47
Abbildung 13 Gehalt an mRNA für DNMT1, 3A und 3B in AKN1 Zellen	48
Abbildung 14 HepG2 Zellen nach 48 Stunden Stimulation.....	50
Abbildung 15 Huh7 Zellen nach 48 Stunden Stimulation	51
Abbildung 16 HLE Zellen nach 48 Stunden Stimulation	52
Abbildung 17 AKN1 Zellen nach 48 Stunden Stimulation.....	53
Abbildung 18 Resazurinkonversion in allen Zelllinien.....	54
Abbildung 19 LDH-Freisetzung in allen Zelllinien.	55
Abbildung 20 Substanzumsetzung der Phase I/II-Enzyme in HepG2 Zellen... ..	58
Abbildung 21 semiquantitative PCR für Phase I/II-Enzyme in HepG2 Zellen... ..	60
Abbildung 22 Substanzumsetzung der Phase I/II-Enzyme in Huh7 Zellen.....	62
Abbildung 23 semiquantitative PCR für Phase I/II-Enzyme in Huh7 Zellen.....	64
Abbildung 24 Substanzumsetzung der Phase I/II-Enzyme in HLE Zellen.	66
Abbildung 25 semiquantitative PCR für Phase I/II-Enzyme in HLE Zellen.	68
Abbildung 26 Substanzumsetzung der Phase I/II-Enzyme in AKN1 Zellen.....	70
Abbildung 27 semiquantitative PCR für Phase I/II-Enzyme in AKN1 Zellen.....	72
Abbildung 28 Harnstoffproduktion in HepG2 Zellen.	73
Abbildung 29 semiquantitative PCR für die Enzyme der Harnstoffproduktion in HepG2 Zellen.	75

Abbildung 30 Harnstoffproduktion in Huh7 Zellen.	76
Abbildung 31 semiquantitative PCR für die Enzyme der Harnstoffproduktion in Huh7 Zellen.	78
Abbildung 32 Harnstoffproduktion in HLE Zellen.	79
Abbildung 33 semiquantitative PCR für die Enzyme der Harnstoffproduktion in HLE Zellen.	81
Abbildung 34 Harnstoffproduktion in AKN1 Zellen.	82
Abbildung 35 semiquantitative PCR für die Enzyme der Harnstoffproduktion in AKN1 Zellen.	84
Abbildung 36 Albuminexpression und -sekretion in Huh7 Zellen.	85
Abbildung 37 semiquantitative PCR für Albuminexpression in den Zelllinien HepG2, HLE und AKN1.	86
Abbildung 38 Beispiel für die variable Auswirkung der epigenetischen Modifikation auf die Genexpression je Zellpassage anhand DNMT1 in Huh7 Zellen.	87
Abbildung 39 Beispiel für Nebenbanden in der Gelelektrophorese anhand der semiquantitativen PCR für die N-Acetylglutamat-Synthase (NAGS) in HepG2 Zellen.	94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Materialien und Geräte	18
Tabelle 2 Chemikalie oder Set	19
Tabelle 3 Angewendete Programme	21
Tabelle 4 Aktivitätsmessung ausgewählter Phase I- und II-Enzyme: Inhaltsstoffe der Reaktionslösungen und der Standardkurven.	34
Tabelle 5 Einstellungen des Plattenlesegeräts für Phase I/II-Aktivitäten	34
Tabelle 6 Verdünnungen für das „ <i>Human Albumin ELISA Quantification Set</i> “ .	35
Tabelle 7 Angewendete Primer	41

Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylumbelliferon
5-hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5-mC	5-Methylcytosin
7-EC	7-Ethoxycoumarin
7-HC	Umbelliferon(7-Hydroxycoumarin)
ABC	ATP-bindende Kasette
ACN	Acetonitril
AFP	Alpha-Fetoprotein
ALT	Alanin-Aminotransferase
ARG1	Arginase 1
ASL	Argininosuccinat-Lyase
ASS1	Argininosuccinat-Synthase 1
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
(5-)Aza	5-Azacytidin
(5-)Aza20	5-Azacytidin 20 µM
Aza10+VitC0,5	5-Azacytidin 10 µM+ Vitamin C-2-Phospat 0,5 mM
BFC	7-Benzyloxy-4(trifluoromethyl)coumarin
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CPS1	Carbamoylphosphat-Synthetase 1
CYP	Cytochtom P450
d	Tag
DBF	Dibenzylfluorescein
(dd)H ₂ O	(doppelt destilliertes) Wasser
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
Dic	Dicoumarol(3,3'-Methylene-bis(4-hydroxycoumarin)
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung
ER	endoplasmatisches Retikulum
EROD	7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase
FCS	fetales Kälberserum
FI	Fluoreszenzintensität
FL	Fluorescein
g	g-Kraft der Zentrifuge
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT2	Glukosetransporter Typ 2
GST	Gluthation-S-Transferase
h	Stunde
HCC	humanes hepatozelluläres Karzinom
HCCs	humane hepatozelluläre Karzinome
HFC	7-Hydroxy-4(trifluoromethyl)coumarin
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1
LDH	Laktatdehydrogenase
MCB	Monochlorobiman
MFC	7-Methoxy-4(trifluoromethyl)coumarin
miRNA	mikro Ribonukleinsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Replikate
N	Anzahl der Versuche
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NAD ⁺ /NADH+H ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid oxidiert/reduziert
NAGS	N-Acetylglutamat-Synthase
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NH ₃	Ammoniak
NH ₄ ⁺	Ammonium
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid

OD	optische Dichte
OTC	Ornithin-Transcarbamylase
p	Zellkulturpassage
pHH	primärer humaner Hepatozyt
pHHs	primäre humane Hepatozyten
Pro	Probenecid
qRT-PCR	quantitative real-time reverse Transkriptase PCR
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur (20-25 °C)
Sal	Salicylamid
SEM	Standardfehler
SRB	Sulforhodamin B
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TET	<i>ten-eleven-translocation</i>
TSA	Trichostatin A
UGT	UDP-Glukuronyltransferase
VitC	Vitamin C-2-Phospat
VitC1	Vitamin C-2-Phospat 1 mM

1. Einleitung

1.1. Die Leber

1.1.1. Anatomie

Die Leber (Hepar) ist das größte Stoffwechselorgan des Menschen und liegt im rechten Oberbauch direkt unter dem Zwerchfell. Sie erreicht ein Gewicht von 1500 bis 2000 Gramm. Das gesunde Organ ist weich mit rotbräunlicher Farbe. Die Leber hat eine glatte, zumeist mit Peritonealepithel überzogene Oberfläche sowie eine eigene bindegewebige Kapsel (Glisson-Kapsel). Normalerweise ist die Leber bei Erwachsenen nicht unter dem rechten Rippenbogen tastbar, allerdings ist dies noch bei einem Säugling möglich. In der Fetalzeit erfüllt die Leber außerdem eine zusätzliche Aufgabe: die Blutbildung [1].

Die Leber kann anatomisch in insgesamt vier Leberlappen eingeteilt werden: Lobus dexter, sinister, caudatus und quadratus. An der Unterseite der Leber ist die Gallenblase (Vesica fellea) eingebettet. Mit dieser sowie mit dem Zwölffingerdarm (Duodenum) ist die Leber über die Gallengänge verbunden [1].

Die Gefäßversorgung der Leber hat zwei Zuflüsse: Zum einen die Arteria hepatica communis (teilt sich in Ramus dexter und Ramus sinister in der Leber), welche sauerstoffreiches Blut, und zum anderen die Vena portae hepatis, welche sauerstoffarmes aber nährstoffreiches Blut aus dem Magen-Darm-Trakt, der Milz und dem Pankreas an die Leber liefert. Die beiden Zuflüsse vereinen sich innerhalb der kleinsten Gefäße der Leber, den Lebersinusoiden. Dieses Mischblut fließt über die Venae centrales zu den Venae hepaticae und letztendlich in die Vena cava inferior zum rechten Herzen [1].

Die Gallengänge des Menschen beginnen bereits in der Leber. Hier produzieren die Leberzellen (Hepatozyten) aus verschiedenen Stoffen gallenpflichtige Substanzen. Die Exkretion erfolgt in die kleinsten Gallengänge, die Canaliculi biliferi, welche sich nach und nach zu größeren Gallengängen

vereinen. Letztendlich gibt es jeweils einen großen Abfluss aus der rechten bzw. linken Leberhälfte, welche sich zum Ductus hepaticus communis vereinen. Hierzu fließt die in der Gallenblase gespeicherte Gallenflüssigkeit über den Ductus cysticus. Zusammen werden sie Ductus choledochus genannt und dieser führt letztendlich über die Papilla Vateri in das Duodenum. Dort fördert die Galle die Verdauung von Fetten und fettlöslichen Substanzen, ebenso werden darüber Exkretionsprodukte ausgeschieden [1].

Um die Funktion der Leber besser verstehen zu können, ist es hilfreich sich deren Mikromorphologie genauer verständlich zu machen:

Die kleinste Einheit der Leber ist klassischerweise der Lobulus hepatis, auch Zentralvenenläppchen. Man kann sich ein solches Läppchen als Hexagon vorstellen. Zentral gelegen ist die V. centralis und an den Ecken befinden sich, in etwas Bindegewebe eingebettet, die sogenannten Periportalfelder, welche die zuleitenden Gefäße und die ableitenden Gallengänge enthalten. Diese werden als Glisson-Trias beschrieben: Venae interlobulares (Äste der V. portae), Arteriae interlobulares (Äste der A. hepatica) und Ductuli interlobulares (Gallengänge) [1], [2].

Folgt man dem einfließenden Blut in das Leberläppchen, vermischen sich arterielles und venöses Blut in den Lebersinoiden. Ihre Besonderheit ist, dass ihr Epithel Lücken aufweist und keine Basalmembran hat. Somit ist dort eine gute Voraussetzung für Stoffwechselfaustausch und Interaktionen mit dem Immunsystem gegeben. Intravasal befinden sich leberspezifische Lymphozyten und natürliche Killerzellen (Killerzellen), im Endothel befinden sich Phagozyten (Kupffer-Zellen). Zwischen Endothel und Parenchymzellen existiert der sogenannte Disse-Raum, welcher Blutplasma enthält. Hier kommen Sternzellen (Ito-Zellen) vor, welche Vitamin A speichern und retikuläre Fasern synthetisieren können. Der Hepatozyt hat eine polygonale Form und ist mit seinen benachbarten Zellen über verschiedene Zellkontakte (Tight Junction, Desmosom, Nexus) verbunden. Die Hepatozyten sind in Parenchymplatten angeordnet, welche die Sinusoide begrenzen und radiär zur Zentralvene

zusammenlaufen. An der Oberfläche trägt der Hepatozyt Mikrovilli, dadurch vergrößert sich die Zelloberfläche zum Stoffaustausch. Ein Hepatozyt ist polar, das heißt, dass er eine basolaterale Membran in Richtung der Sinusoide und eine apikale Membran, welche sehr reich an ATP-abhängigen Transportern ist, in Richtung der Gallenkanälchen hat. Diese frühesten Gallenabflusswege haben noch kein eigenes Epithel und werden von der Zellmembran der Hepatozyten und deren Tight Junctions begrenzt. Erst im Verband des Portalfeldes werden die Gallenkanäle von ihrem eigenen Epithel (zunächst einschichtig kubisch, im Verlauf hochprismatisch) umgeben [1], [2].

Stoffe aus dem zufließenden Blut gelangen über die Sinusoide in den Disse-Raum und werden über Diffusion, Transporter oder Kanäle durch die Zellmembran in den Hepatozyt aufgenommen. Hier können die Stoffe verarbeitet, gespeichert oder umgewandelt werden und letztendlich wieder in die Sinusoide oder aber in die Galle abgegeben werden [1].

Hepatozyten sind sehr organellenreich und haben meist einen diploiden Zellkern mit prominenten Nukleoli. Sie enthalten viel Mitochondrien sowie glattes als auch raues endoplasmatisches Retikulum und reichlich Golgi-Apparate, welche benachbart zu Lysosomen liegen. Im Zytoplasma befinden sich sowohl freie Ribosomen, Glykogen- und Lipidablagerungen als auch Proteingranula und verschiedene Pigmente. Anhand dieser Zellorganellen wird deutlich, dass die Leber vielfältige Stoffwechselwege betreibt [1], [2].

1.1.2. Biochemie und Physiologie

1.1.2.1. Allgemeine Funktionen in der Körperhomöostase

Die Leber hat vielfältige Funktionen als exogene und endogene Drüse.

1. Glukosehaushalt: Über den insulinabhängigen GLUT2-Transporter nimmt die Leber Glukose aus dem Blut auf und speichert sie in Form von Glykogen. Sinkt der Blutzuckerspiegel ist die Leber in der Lage Glukose aus diesem Speicherstoff zu gewinnen oder durch Glukoneogenese herzustellen. Hierauf nehmen verschiedene Hormone (u.a. Glukagon, Insulin, Adrenalin, Kortikosteroide) Einfluss [2], [3].

2. Proteinhaushalt: Die Leber synthetisiert Proteine und spielt auch beim Abbau derer eine entscheidende Rolle. Im Proteinstoffwechsel entsteht Ammoniak, welches in größeren Mengen toxisch auf den Organismus wirkt. Daher wird NH_3 in der Leber unter anderem in Harnstoff verpackt und letztendlich über die Niere ausgeschieden (siehe 1.1.2.2. Harnstoffzyklus) [2], [4].
3. Synthese und Sekretion von Plasmaproteinen: Albumin, Gerinnungsfaktoren und Alpha-1-Antitrypsin spielen hier die größte Rolle sowie viele Trägerproteine und Prohormone wie Angiotensinogen [2], [3], [5].
4. Synthese und Sekretion von Gallensäuren und Lipiden: Gallensäuren werden aus Cholesterin synthetisiert und sorgen somit zum einen für die Ausscheidung von körpereigenem Cholesterin und anderen gallepflichtigen Abfallstoffen wie zum Beispiel dem Häm-Abbauprodukt Bilirubin. Zum anderen tragen sie im Darm zur Fettresorption bei. Die Gallensekretion unterliegt dem enterohepatischen Kreislauf und ist von ATP-verbrauchenden ABC-Transportern am Gallepool der Hepatozyten abhängig. Ebenso synthetisiert die Leber Lipoproteine und Triacylglycerine, welche entscheidende Rollen im Fettstoffwechsel und im Stoffwechsel von fettlöslichen Vitaminen spielen [2]–[5].
5. Metabolismus von wasserunlöslichen körpereigenen (z.B. Bilirubin, Vitamin D, Thyroxin) und körperfremden Substanzen (z.B. Medikamente, Toxine) über leberspezifische Enzyme zu wasserlöslichen Substanzen: Die Biotransformation oder Arzneimittelmetabolismus (siehe 1.1.2.3.) [2]–[5].
6. Beteiligung am Eisen- und Kupferhaushalt [3], [5], [6],
7. Synthese und Sekretion von Hormonen wie IGF-1 und Thrombopoetin [3],
8. Speicherung von Mineralien und Spurenelementen [3], [4].

Speziell diese Arbeit betreffend sind die Entgiftungsfunktionen bzw. Metabolisierungsfunktionen der Leber wichtig, daher werden die Biotransformation und der Harnstoffzyklus im Weiteren genauer betrachtet.

1.1.2.2. Harnstoffzyklus

Im Stoffwechsel von Aminosäuren werden durch Desaminierung neurotoxische Ammoniumionen (NH_4^+) freigesetzt, welche die Leber als einziges Organ mittels Einbau in Harnstoff entgiften, aber auch in Glutamin oder andere stickstoffhaltige Verbindungen (z. B. Nukleinsäuren) umwandeln kann [4].

Hierbei spielt die Verstoffwechslung mittels Harnstoffzyklus die mengenmäßig größte Rolle [4]. Ammoniak (NH_3) ist außerdem Teil eines offenen Puffersystems, dem Ammoniak-Ammonium-Puffer, welcher zum Säure-Basen-Haushalt des Menschen gehört, indem Ammonium über die Nieren ausgeschieden werden kann [4].

Der Harnstoffzyklus im erweiterten Sinn ist in Abbildung 1 dargestellt und besteht aus fünf Enzymen, wobei die beiden ersten Schritte im Mitochondrium (CPS1 und OTC) und die restlichen drei im Zytoplasma (ASS1, ASL, ARG1) stattfinden [7]. Der Zyklus beginnt mit der ATP-abhängigen Reaktion der mitochondrialen Carbamoylphosphat-Synthetase 1 (CPS1), welche als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der Harnstoffproduktion gilt und einer speziellen Regulation unterliegt [4], [8], [9]. Zum einen kann CPS1 durch Acetylierung inaktiviert werden (dies gilt auch für OTC) und zum anderen hat CPS1 einen allosterischen Aktivator mittels N-Acetylglutamat (ebenso N-Carbamylglutamat) [4], [8]–[11]. Ohne Anwesenheit von N-Acetylglutamat liegt CPS1 praktisch inaktiv vor [4]. Dieser Stoff wiederum wird durch die mitochondriale N-Acetylglutamat-Synthase (NAGS) synthetisiert, welche zum einen durch Arginin aktiviert wird und zum anderen durch ein hohes Angebot an Glutamat in der Aktivität gesteigert werden kann [4], [8]. Daher steigert sich der Umsatz des Harnstoffzyklus bei hohem Aminosäureangebot (proteinreiche Ernährung und Proteinabbau aus Muskel) sowie durch Induktion der Genexpression durch Cortisol und Glukagon in katabolen Situationen [4], [8]. Wohingegen der Harnstoffzyklus bei Azidose gebremst wird, da vermehrt Ammoniumionen (hydrophile Säure) vorliegen und die CPS1 ausschließlich NH_3 (lipophile Base) als Substrat verwendet [4], [9].

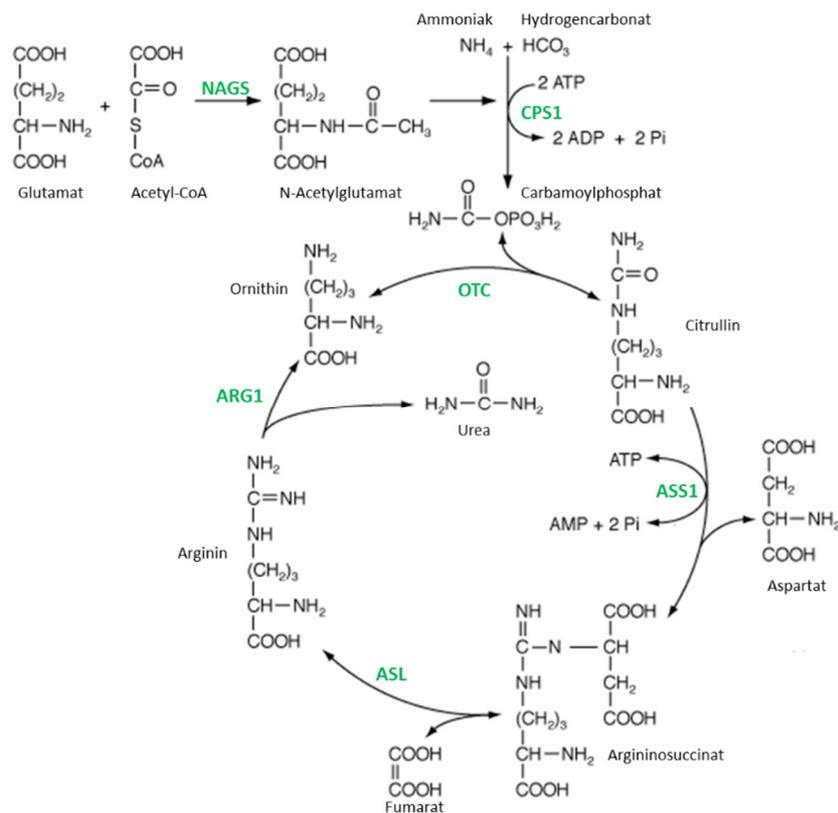


Abbildung 1 Harnstoffzyklus in der humanen Leber mit Darstellung von NAGS
 (basierend auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/Images/ureacycleweb.gif>)

Durch die zweite Reaktion im Harnstoffzyklus wird Carbamoylphosphat mit Ornithin durch die Ornithin-Transcarbamylase (OTC) in Citrullin umgewandelt [4], [8], [9]. Das entstehende Citrullin gelangt mittels des Ornithin-Citrullin-Antiporters ins Zytoplasma, wo es ATP-abhängig mit Aspartat über die Argininosuccinat-Synthase 1 (ASS1) zu Argininosuccinat wird [4], [9]. Das hierzu benötigte Aspartat entsteht mittels eines eigenen kleinen Zyklus aus Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase, Pyruvatcarboxylase und den benötigten transmitochondrialen Transportern [4]. Nach enzymatischer Abspaltung (über die Argininosuccinat-Lyase, ASL) von Fumarat, welches hauptsächlich in die Glukoneogenese eingeht, entsteht Arginin [4]. Dieses wird durch die Arginase 1 (ARG1) in das Endprodukt Harnstoff (Urea) und Ornithin hydrolysiert [4], [9]. Letzteres gelangt über den transmitochondrialen Ornithin-Citrullin-Antiporter wieder in das Mitochondrium und steht damit erneut der Ornithin-Transcarbamylase zur Verfügung [4].

1.1.2.3. Biotransformation

Die Biotransformation dient dazu schlecht ausscheidbare, lipophile Substanzen wasserlöslicher zu machen und diese dann entweder über die Galle via Stuhlgang oder über das Blut via Nieren und Urin auszuscheiden [2]–[4], [12]. Es werden verschiedene Phasen unterschieden. Phase I besteht hauptsächlich aus Oxidations- und Reduktionsreaktionen, welche zum größten Teil von Cytochrom P450-Enzymen katalysiert werden und reaktive Gruppen entstehen lassen [3], [4]. Diese Enzyme sind hauptsächlich in der Leber, genauer im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert [2], [3]. Es gibt circa 150 Unterformen mit ungleicher Spezifität und Sensitivität für ein oder mehrere Substrate [3]. Phase II besteht hauptsächlich aus Konjugationsreaktionen, welche polare Verbindungen an reaktive Gruppen binden [3], [4], [12]. Die Konjugation kann an Phase I anknüpfen oder direkt ausgeführt werden. Am bedeutendsten sind die Glukuronidierung (UDP-Glukuronyltransferase im ER), die Konjugation mit Glutathion (Glutathion-S-Transferase im Zytosol) und die Sulfatierung (Sulfotransferasen im Zytosol) [3]. Aber auch Konjugation mit Glycin, Taurin, Glutamin sowie Acetylierung und Methylierung spielen eine Rolle [3], [4]. Als Phase III wird oftmals der Transport der entstandenen Verbindung aus der Leberzelle via spezifischer Transporter in die Galle oder ins das Blut bezeichnet [4]. Den Hauptteil der Cytochrom P450-Enzyme in der humanen Leber stellen quantitativ CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C, CYP2D6, CYP2E1 und CYP3A4 dar, wobei insbesondere CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4 im Medikamentenstoffwechsel zum Einsatz kommen [13]–[16]. Kleinere Anteile von Medikamenten werden über andere CYP-Enzyme metabolisiert, wobei diesen trotzdem nicht an Signifikanz aberkannt werden kann, wie man anhand des Beispiels der Metabolisierung von Acetaminophen über CYP2E1 zu einem hepatotoxischen Zwischenprodukt sehen kann [17]. Den Hauptteil an Phase II-Enzymen bilden UGT, GST und Sulfotransferasen [16].

Besonders wichtig ist die Biotransformation im Hinblick auf die Metabolisierung von xenogenen Verbindungen wie Medikamenten. Aufgenommen durch den Darm werden die Medikamente über die Pfortader zur Leber transportiert. Hier

besteht sogleich die Möglichkeit der Aktivierung oder Inaktivierung und Ausscheidung der Stoffe: *First-Pass-Metabolismus* [12]. Die Enzymmengen und -aktivitäten der verschiedenen Phasen können individuell zum einen durch verschiedenste Stoffe (Xeno- wie Endobiotika), indem die Transkription der Enzyme im Sinne von Induktion oder Inhibition verändert wird, und zu anderem durch genetische Polymorphismen beeinflusst werden [4], [12], [18]. Eben dies hat Folgen für die Bioverfügbarkeit und Aktivität von Arzneimitteln [12]. Daher ist es nur verständlich, dass die Metabolisierung eines Arzneimittels von großer Bedeutung ist. Die Biotransformation ist Teil der Pharmakokinetik, welche kurz mit LADME (**L**iberation, **A**dsorption, **D**istribution, **M**etabolismus, **E**limination) beschrieben werden kann [12].

1.2. Epigenetik

Dieser Arbeit liegt der Gedanke zugrunde mittels Azacytidin und Vitamin C epigenetische Veränderungen in der Zelle herbeizuführen und dadurch den Zellmetabolismus zu beeinflussen. Aus diesem Grund folgt in diesem Abschnitt eine genauere Betrachtung der Epigenetik speziell in hepatozellulären Karzinomen sowie ein Einblick in die Eigenschaften von den verwendeten Substanzen 5-Azacytidin und Vitamin C-2-Phosphat.

1.2.1. Epigenetik in hepatozellulären Karzinomzellen

Epigenetische Veränderungen beinhalten Variationen in der Genexpression, denen keine Änderung der DNA-Sequenz zugrunde liegt, sondern DNA-Methylierung, Histon-Modifikation und Einflüsse durch RNA [19]. Verschiedene Alterationen der Epigenetik wurden bereits in hepatozellulären Karzinomen nachgewiesen [20]–[27]. Die Veränderungen betreffen sehr viele Zellfunktionen [23], [28]–[30]. Bereits für alle drei Phasen der Biotransformation und den Harnstoffzyklus konnten Regulationen durch epigenetische Prozesse nachgewiesen werden [29]–[34]. Den bisher größten Einblick hat man in die DNA-Methylierung. Sie spielt sowohl in der Entwicklung im Sinne von Zelldifferenzierung als auch später im Leben für verschiedenste Krankheiten eine Rolle [19], [28], [35]. Methylierung findet an den Cytosinbasen in

CpG-Dinukleotiden, welche gehäuft in sogenannten CpG-Inseln vorkommen, im Genom statt [35]–[38]. Dies geschieht durch DNA-Methyltransferasen, von welchen bisher fünf verschiedene bekannt sind, aber nur DNMT1, 3A und 3B nachgewiesenermaßen erhebliche Methyltransferaseaktivität haben (DNMT2 zeigt schwache Methylierungsaktivität *in vitro*) [23], [28], [39]. DNMT1 ist in der Lage den Methylierungsstatus der Zelle aufrechtzuerhalten [40]. Sie hat eine höhere Affinität zu hemimethylierter als zu unmethylierter DNA [41], [42]. DNMT3A und 3B sind für die *de-novo* Methylierung der DNA zuständig [40], [41]. Die Folge ist ein *Gen-Silencing* der methylierten Bezirke durch sterische Hinderung des Zugangs zu Promotoren aber auch durch Bindung von Transkriptionsrepressoren (sogenannten Methyl-bindende Domäne enthaltenden Proteinen) [23], [24], [34], [36], [38], [43]–[45]. In Krebszellen ist der globale Methylierungsstatus der Zelle verringert, jedoch sind CpG-Inseln hypermethyliert [23], [45], [46]. Sogar das Ausmaß hepatozellulärer Krebserkrankungen und deren Überlebensraten zeigen eine Korrelation mit einer Überexpression von DNA-Methyltransferasen [27], [47]. DNA-Methylierung und andere Mechanismen der epigenetischen Modifikation können gekoppelt sein [38], [45], [48].

1.2.2. DNA-Demethylierung durch Epigenetik-modulierende Substanzen

1.2.2.1. Vitamin C-2-Phosphat

Vitamin C-2-Phosphat ist als langwirksames Vitamin C-Derivat bekannt [49]. Vitamin C ist ein essentieller Stoff und muss aufgrund des Syntheseverlusts in einigen Spezies inklusive des Menschen durch die Nahrung supplementiert werden [50]. Als Antioxidans ist es an Redoxreaktionen innerhalb des Körpers beteiligt [51]. Vitamin C spielt eine Rolle in vielen verschiedenen Zellfunktionen und Mangel führt zu Skorbut, einer Krankheit, die besonders von Kollagenmangel geprägt ist [6], [51]. Vitamin C ist bereits seit vielen Jahren im Fokus der Forschung, da es die Zelldifferenzierung über Veränderung der Genexpression und viele Zellfunktionen beeinflussen kann [49], [51]–[55]. Vitamin C verstärkt über sogenannte TET-Enzyme den Umbau von 5-Methylcytosin (5-mC) zu 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC)

in der DNA [51], [53], [55]–[58]. 5-hmC kann selbst als Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren fungieren, aber auch zur Demethylierung der Cytosinbase und dadurch wiederum zur Änderungen der Genexpression führen [59]–[62]. TET-Enzyme sind eisen- und 2-oxoglutaratabhängige Dioxygenasen, wobei Vitamin C als Cofaktor zur Erhaltung des Eisenatoms dient [57], [58]. Weitere eisen- und 2-oxoglutaratabhängige Dioxygenasen, welche ebenfalls Vitamin C als Kofaktor zur Reduktion des Eisenatoms benötigen, sind Jumonji C-enthaltene Histondemethylasen, deren biochemische Funktion großteils noch unverstanden ist, allerdings konnten ihnen schon Wirkungen auf Zelldifferenzierung und -proliferation nachgewiesen werden [63], [64]. Eine weitere ursprünglich in Bakterien und kürzlich auch in Säugetieren entdeckte eisen- und ketoglutaratabhängige Dioxygenase ist die Familie der AlkB-Proteine, welche eine Rolle in der Demethylierung von DNA, RNA und Histonen spielen und somit noch weitgehend unklare Folgen auf Zelldifferenzierung und -wachstum haben [51], [65]–[68]. Chung *et al.* konnten zeigen, dass Vitamin C reproduzierbar eine große Menge an Genen, insbesondere Gene mit CpG-Inseln, welche in der Zelldifferenzierung und Reprogrammierung eine Rolle spielen, demethylieren kann [54]. Aus den oben angeführten Gründen wird Vitamin C außerdem schon lange in der Krebs- und Stammzellforschung eingesetzt [49], [52], [53], [55], [69], [70]. Vitamin C zeigt je nach Konzentration und Derivat antioxidative und zellschützende Eigenschaften, kann aber auch einen (nicht-)apoptotischen Zelltod auslösen [71].

1.2.2.2. 5-Azacytidin

5-Azacytidin ist ein Ribonukleotid und Analogon des Cytosins und wurde ursprünglich als Zytostatikum entdeckt [72]. Seit 2002 gilt Azacytidin als „*orphan drug*“ und wird für die Therapie des myelodysplastischen Syndroms, der chronisch myelomonozytären Leukämie und der akuten myeloischen Leukämie eingesetzt [73]. Es wird als Prodrug im Körper verstoffwechselt und letztendlich mehr in RNA als in DNA eingebaut [74]–[76]. Hier wirkt das eingebaute Cytosinanalogue als Inhibitor der DNA-Methyltransferasen, indem

diese kovalent gebunden werden [76]–[80]. Azanukleotide führen nachweislich zum Abbau von DNMT1 und im geringeren Ausmaß auch von DNMT3 [76], [79], [80]. Weil Azacytidin als Ribonukleotid zu einem erheblichen Teil in RNA eingebaut wird, zeigt sich auch eine Inhibition der DNMT2, welche in der Proteinbiosynthese tRNA methylieren kann [78], [81]. Die Epigenetik der Zelle wird durch passive Demethylierung und Veränderungen der Proteinbiosynthese beeinflusst [76]. Ebenso wird der Zellzyklus verändert und die Zellviabilität reduziert [56], [76], [82]. Azacytidin induziert zeit- und dosisabhängig DNA-Doppelstrangbrüche [76]. Es konnten Veränderungen der Zellmembranproteine durch Azacytidinbehandlung festgestellt werden [83]. Des Weiteren konnte eine aktiv induzierte Demethylierung durch Azacytidin mittels Aktivierung von TET2 (analog zu Vitamin C durch Bildung von 5-hmC) nachgewiesen werden [56]. Hagemann *et al.* beschrieben, dass Azacytidinbehandlung reproduzierbar die Demethylierung der gleichen Gene beeinflusst [84]. Die Arbeitsgruppe Komashko *et al.* beschrieb, dass neben DNA-Methylierung ebenso die Histon-Methylierung durch Azacytidin beeinflusst wird und Gene sowohl hoch- als auch herabreguliert werden, wobei interessanterweise zumeist Gene beeinflusst wurden, deren Promotoren bereits vor Azacytidinbehandlung demethyliert waren [85]. Azacytidin wird mittlerweile oftmals experimentell in der Stammzellforschung verwendet, unter anderem auch um die Differenzierung zu hepatozyten(ähnlichen) Zellen zu beeinflussen [33], [86]. Durch Behandlung mit Azacytidin konnte bereits eine Modifikation der Expression von verschiedenen Enzymen des Harnstoffzyklus (OTC, CPS1) in Zelllinien von hepatozellulären Karzinomen gezeigt werden [34], [87].

1.3. Arzneimittelentwicklung in Deutschland

Im Folgenden wird die Arzneimittelentwicklung, insbesondere deren präklinische Phase, beschrieben, da diese Arbeit im Rahmen des Projektes „Epigenetische Reaktivierung der Funktionalität hepatischer Zelllinien – als verfügbare Ressource für *in vitro* Toxizitätstests“ durchgeführt wurde.

1.3.1. Entwicklungsphasen von Arzneimitteln

Unter etwa 5000 bis 10000 getesteten Substanzen gibt es eine pharmakologisch aussichtsreiche Substanz, die das Potenzial hat als Arzneimittel zu fungieren [88]. In der präklinischen Phase wird der Stoff in Zellkulturen und in Tierversuchen Toxizitätstests unterzogen und sein Arzneimittelmetabolismus in biologischen Systemen erforscht [88]. Wenn sich der neue Stoff als soweit unbedenklich erweist, vergibt das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte die Zulassung zu klinischen Studien, welche sich in drei (bzw. vier) Phasen aufteilen lassen [88], [89]. Phase I wird an bis zu 100 gesunden Probanden durchgeführt, wobei bei der ersten Anwendung im menschlichen Organismus auf Verträglichkeit, Unbedenklichkeit sowie Pharmakokinetik und -dynamik geachtet wird [12], [89]. Außerdem werden Darreichungsform und Dosis determiniert [88]. Phase II wird an mehreren hundert bis zu tausenden Erkrankten durchgeführt [12], [88]. Die erwünschten und unerwünschten Arzneimittelwirkungen werden beobachtet, Dosen angepasst [12], [88]. Die Studien erfolgen in randomisierten, kontrollierten Rahmen. Phase III schließt ein Patientenkollektiv bis zu mehreren Tausenden ein, um genauere Aussagen zu Wirksamkeit und zum Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen und Wechselwirkungen treffen zu können [12], [88]. Erst darauf folgt der Antrag auf Zulassung eines Medikaments [88]. Nach der Zulassung folgt die sogenannte Phase IV, bei der vor allem über Langzeitbeobachtung Daten über selten auftretende unerwünschte Nebenwirkungen, aber auch weiterhin über Wirksamkeit, Wechselwirkungen sowie ökonomische Aspekte und die therapeutische Effizienz gesammelt werden (in Deutschland ist das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte für die Arzneimittelüberwachung zuständig) [12], [89].

1.3.2. Präklinische Phase: Erforschung des Arzneimittelmetabolismus

1.3.2.1. Goldstandard: primärer humaner Hepatozyt

Die Pharmakokinetik, insbesondere die Metabolisierung, Arzneimittelinteraktionen und Toxizität, ist präklinisch von zentraler

Bedeutung [88]–[91]. In präklinischen Studien wird versucht das Schicksal eines Medikamentes im menschlichen Körper bezüglich dessen Stabilität, seiner Metabolite und der beteiligten Enzyme, inklusive deren Kinetik und Interaktionen, zu bestimmen [90]. Der Goldstandard für die Testung des hepatischen Arzneimittelmetabolismus ist seit Jahren der primäre humane Hepatozyt (pHH) [91]–[96]. Da frische Leberzellen aber nicht immer verfügbar sind und längere Kultivierung *in vitro* zu Einbußen in enzymatischer Genexpression und Aktivität führen, wird ständig nach Alternativen gesucht [91], [92], [97]–[100]. Kryopreservierte Hepatozyten werden als Alternative oftmals verwendet, sind allerdings auch primär an verfügbare Spender gebunden [99], [101]. Ein Nachteil von primären humanen Hepatozyten (pHHs) ist die interindividuelle Enzymausstattung jeder Leber, sowie das Fehlen der physiologischen Umgebungsstrukturen [97], [99]. Enzymaktivitäten in pHHs variieren je nach Spender aufgrund von genetischen Polymorphismen und Lebensgewohnheiten (wie Medikamentenkonsum, Suchtmittel, Nahrungsgewohnheiten, Alter und Geschlecht) [12], [13], [91]. So wurde eine interindividuelle Variabilität an Medikamentenmetaboliten und deren Mengen beschrieben, welche jedoch eine gute Korrelation zwischen *In-vitro*- und *In-vivo*-Ergebnissen für jeden Patienten einzeln aufzeigte [102]. Dies zeigt erneut, dass pHHs trotz individueller Enzymausstattung die beste Möglichkeit für die Voraussage des Metabolismus im Menschen sowie deren Translation *in vivo* liefern.

1.3.2.2. Alternativen und Forschung

Etablierte Alternativen zu frischen Hepatozyten sind subzelluläre Fraktionen, wie humane Mikrosomen, welche aus Zellhomogenat durch Zentrifugation gewonnen werden können [91], [97]. Es sind Vesikel, die Fragmente von endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat mitsamt deren enzymatischer Ausstattung enthalten [103]. Sie können auch aus nicht humanen Arten nach Transfektion hergestellt werden [97], [99], [104]. Werden sie aus transfizierten Insektenzellen gewonnen, nennt man sie Supersome, welche meist nur ein CYP-Isoenzym enthalten [97]. Humane Zytosolfragmente können ebenfalls durch Zentrifugation gewonnen werden, allerdings enthalten sie nur im Zytosol

gelöste Phase II-Enzyme [97]. Eine Kombination aus beiden Ansätzen erhält man beim Einsatz von S9-Mix, welcher sowohl mikrosomale als auch zytosolische Fragmente enthält [97]. Nachteil der bisher beschriebenen Methoden ist, dass keine komplette Zelle dargestellt wird und das Hinzufügen von Kofaktoren häufig notwendig ist [97], [99]. Ein weiterer Ansatz, um die Spenderknappheit auszugleichen, ist die Immortalisierung von primären humanen Leberzellen. Dazu werden verschiedene Methoden wie Transfektion mit Virusplasmiden, Onkogenen oder Telomerase sowie Fusion mit hepatozellulären Zelllinien, aber auch Isolation aus transgenen Tieren erforscht [91], [105], [106]. Jede dieser Möglichkeiten zeigt weiterhin deutliche Unterschiede in ihren Enzymmustern im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten (pHHs) [91]. Auch Forschung für die längere Kultivierung von Hepatozyten unter Einsatz von Grundmatrix zur 3D-Kultivierung, Addition von Zusatzstoffen in Kulturmedium, sowie Kokultivierung mit nicht-parenchymalen Zellen wird betrieben [94], [96], [97]. Des Weiteren kommen verschiedene Zelllinien zur Anwendung, weil sie leicht zu kultivieren sind und stabile Charakteristika aufweisen [91], [97], [99]. Nachteil der Zelllinien wiederum sind niedrigere Aktivitätslevel und Expressionen von Enzymen als in primären Hepatozyten, Vorteil ist die erhaltene Möglichkeit zu Veränderung der Genexpression mittels Induktoren [91], [94], [95], [97], [107]. Die Testung an Leberteilstücken wird ebenfalls seit vielen Jahren durchgeführt, konnte sich bisher aber nicht kommerziell etablieren aufgrund relativ kurzer Lebensdauer, Abhängigkeit von Spendern, inadäquater Perfusion und damit ungleicher Verteilung von Substanzen sowie geschädigten Zellen an den Schnittstellen [97], [99]. Die Anwendung von komplett entnommenen und extrakorporal perfundierten Tierlebern stellt die dreidimensionale Situation *in vivo* am besten dar [97], [99]. Dieses Modell wird selten angewandt aufgrund kurzer Lebensdauer bei hohem Arbeitsaufwand, Speziesunterschieden und ethischen Bedenken [97], [99]. Es eignet sich zum Einsatz bei Fragestellungen zur Galle [97], [99]. Der Einsatz von tierischen Hepatozyten ist aufgrund von Unterschieden in Expression, Aktivität, Induktion/Inhibition von hepatischen Enzymen und daraus folgender unterschiedlicher Toxizität sowie ethischen

Bedenken keine optimale Alternative, trotzdem werden sie standardmäßig verwendet [108]–[115]. Um Speziesunterschiede und Spenderknappheit zu vermeiden und *In-vitro*- zu *In-vivo*-Korrelation zu verbessern, besteht die dauerhafte Nachfrage nach verbesserten oder innovativeren Verfahren für die präklinische Testung von Arzneimitteln. Neuere Methoden basieren auf computergestützten Analysen (*in silicio*) von Enzymen und Substraten bezüglich deren Struktur sowie Aufbau und können Aufschluss auf den Arzneimittelmetabolismus liefern [116]–[119]. Die (Re-)Programmierung von Stammzellen (aus Leberstammzellen, Stammzellen aus anderen Organen, embryonale Stammzellen) zu hepatozytenähnlichen Zellen könnte in Zukunft auch eine Alternative darstellen, war aber bisher nicht erfolgreich [120]–[125]. Des Weiteren wird auch Transfektion von Zellen mit spezifischen Genen erforscht, so konnten Nozaki *et al.* mittels Lipofektion einen Klon der Zelllinie HLE zu stabiler Produktion von CYP2E1 bringen [126]. Ebenfalls im Fokus der Forschung ist Genmanipulation, um stabile Aktivitäten von Phase I- und II-Enzymen zu erhalten [99], [127]. Goldring *et al.* konnten die Zelllinien HepG2 und Huh7 zur Expression von stabilen Mengen an CYP2E1 und GST nach Einbringung eines Doxycyclin-induzierbaren Genes bringen [128]. Neueste Studien arbeiten mit dem erst 2012 entdeckten CRISPR/Cas-System zur gezielten Genmanipulation und es konnte bereits eine Steigerung der Expression und Aktivität von CYP3A5 in Huh7 Zellen erreicht werden [129], [130]. Auch durch epigenetische Modifikation, welche die Grundlage dieser Arbeit darstellt, konnte bereits eine erhöhte Genexpression von CYP2E1 in der hepatozellulären Zelllinie HepG2 und eine erhöhte Expression von CYP3A4 in den Zelllinien HepG2 und Hepa-I erreicht werden [31], [131], [132]. Weitere Forschungen zeigen, dass leberspezifische Transkriptionsfaktoren eine Rolle für die Expression von verschiedenen Enzymen der Biotransformation spielen und bieten daher auch einen Ansatz zur Beeinflussung der Enzymmengen in Zelllinien [133], [134]. Jede bisher praktizierte Methode hat ihre Vor- und Nachteile, weiterhin treten Probleme bezüglich prädikativer Vorhersagekraft *in vivo* auf [97], [99]. Je nach Fragestellung muss man sich für eine Methode oder eine Stufentestung

entscheiden. Auch hier spielen Verfügbarkeit, Übertragbarkeit, ethische und finanzielle Aspekte eine Rolle [99].

1.4. Fragestellung

Ziel dieser Dissertation war es im Rahmen des Projektes „Epigenetische Reaktivierung der Funktionalität hepatischer Zelllinien – als verfügbare Ressource für *in vitro* Toxizitätstests“ (Förderung durch das Ministerium für Ländlichen Raum und Verbraucherschutz Baden-Württemberg / Aktenzeichen: 14-(34)-8402.43-0362E – Alternative Tiermethoden) die metabolische Funktion in verschiedenen Zelllinien so zu verbessern, dass man diese für *In-vitro*-Tests nutzen könnte. Die Arbeit beschränkt sich auf vier Zelllinien (HepG2, Huh7, HLE, AKN1), welche nachweislich geringe metabolische Aktivitäten haben. Basierend auf den Arbeiten von Sajadian *et al.* (siehe [56], [82]) sowie ersten Vorversuchen im Labor sollten folgende Punkte beantwortet werden:

1. Verifikation verschiedener DNMT-Muster mittels PCR in den vier Zelllinien (HepG2, Huh7, HLE, AKN1) plus/minus 5-Aza und/oder VitC nach Auswertung des Chromatinarrays für Epigenetik-modifizierende Enzyme von Qiagen
2. Mikroskopische Dokumentation der vier Zelllinien (HepG2, Huh7, HLE, AKN1) plus/minus 5-Aza und/oder VitC
3. Messung der Toxizität und Proliferation in den vier Zelllinien (HepG2, Huh7, HLE, AKN1) plus/minus 5-Aza und/oder VitC
4. Veränderungen der metabolischen Kapazität der Phase I- und Phase II-Enzyme in den vier Zelllinien (HepG2, Huh7, HLE, AKN1) plus/minus 5-Aza und/oder VitC
5. Untersuchungen zur Harnstoffproduktion sowie der für den Harnstoffzyklus verantwortlichen Gene in den vier Zelllinien (HepG2, Huh7, HLE, AKN1) plus/minus 5-Aza und/oder VitC
6. Detaillierte Albuminbestimmung und –expression in den vier Zelllinien (HepG2, Huh7, HLE, AKN1) plus/minus 5-Aza und/oder VitC

Die Versuche der hier aufgeführten Arbeitspakete wurden mit frisch isolierten primären Hepatozyten (pHHs) verglichen. Da die Isolation der humanen Hepatozyten aus frischer Spenderleber (mittels Perfusion durch Kollagenase) nicht von mir durchgeführt wurde, ist diese Methode (siehe [135]) hier nicht genauer beschrieben worden. Die Versuche mit den pHHs wurden analog zu den hier beschriebenen Methoden mit angepasstem Medium und Zellzahl durchgeführt und ebenfalls mittels SRB-Färbung auf die Zellzahl normiert.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

Tabelle 1 Materialien und Geräte

Material	Hersteller	Artikelnummer
0,2 ml Mikroreaktionsgefäß für PCR, verschiedene Farben	Carl Roth, Karlsruhe	CH88.1, CH89.1 CH90.1
0,5 ml Mikroreaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht	72.699
1,5 ml Mikroreaktionsgefäß, verschiedene Farben	Carl Roth, Karlsruhe	4189.1 4209.1
2 ml Mikroreaktionsgefäß	Carl Roth, Karlsruhe	CK06.1
6-Well Platte	Corning, Corning (USA)	353046
12-Well Platte	Corning, Corning (USA)	3512
24-Well Platte	Greiner bio-one, Frickenhausen	662160
96-Well Platte	Greiner bio-one, Frickenhausen	655180
Abzug Secuflow	WALDNER Laboreinrichtungen, Wangen	200/02895/300
Analysenwaage ABJ 120-4M	KERN & Sohn, Balingen	WB1140084
CO ₂ -Inkubator C-150 (37 °C, 5 % CO ₂)	Binder, Tuttlingen	9040-0078
Eismaschine AF 80	Scotsman Ice Systems (USA)	DD 8837 11 X
Falcon Tube 15 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen	188271
Falcon Tube 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht	62.547.004
Fluoreszenzmikroskop EVOS	AMG, Bothell (USA)	91-AF-4301
Gefrierschrank (-20 °C) Power Cooling Forma 900 Series	Liebherr, Bulle (Schweiz)	7081896-04
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo scientific, Waltham (USA)	827860-2521
Geldokumentationssystem Gel iX Imager	INTAS Science Imaging, Göttingen	S.-Nr. 15545
Handschuhe Peha-soft nitrile	Paul Hartmann, Heidenheim	942207
Handschuhe, purple nitrile	Kimberly Clark, Irving (USA)	52002M
Neubauer improved, Zählkammer	Marienfeld, Lauda- Königshofen	06400100
Kühlschrank/Gefrier-Kombination (+4 °C/-20 °C)	Liebherr, Bulle (Schweiz)	7081896-04
Kulturflaschen T25	Greiner bio-one, Frickenhausen	660025
Kulturflaschen T75	Corning, Corning (USA)	430641
Kulturflaschen T175	Greiner bio-one, Frickenhausen	660175
Laborwaage PCB 250-3	Kern & Sohn, Balingen	WD 110036863
Laborwaage ABJ 120-4 M	Kern & Sohn, Balingen	WB 110084
LVis-Platte	BMG Labtech, Ortenberg	0680B0001C
Mehrkanalpipette Lambda Plus, verschiedene Größen	Corning, Corning (USA)	4081, 4082 4083
Mikrowelle	Severin, Sundern	8068.0000
PCR-Gerät Arktik Thermal Cyclor	Thermo scientific, Waltham (USA)	TCA0096

PCR-Gerät Veriti 96-Well-Thermal Cycler	Applied Biosystems, Carlsberg (USA)	4375786
Pasteurpipette, verschiedene Größen	Carl Roth, Karlsruhe	4518.1, 4522.1
pH-Meter FiveEasy FE20	Mettler Toledo, Columbus (USA)	1232315296
Pipettierhilfe Rota-Filler 3000	Heathrow Scientific, Vernon Hills (USA)	HS08348
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf Sarstedt, Nümbrecht Ratiolab, Dreieich	720011, 70760 2100610
Pipetten Lambda Plus, verschiedene Größen	Corning, Corning (USA)	07- 764- (700-705)
Plattenlesegerät Fluostar Omega	BMG Labtech, Ortenberg	415-1264
Stickstoffcontainer (-200 °C) 8207	Thermo Fisher Scientific GmbH	512669-219
Spritzen 1 ml BD Plastipak 10 ml 20 ml 50 ml Injectomat	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA) BBraun, Melsungen BBraun, Melsungen Fresenius Kabi, Homburg	300026 4606108V 4606205V 9000701
Sterilfilter (Porengröße 0,22 µm)	Millipore Ltd., Tullagreen (Irland)	SLGPO33RS
Stripetten, verschiedene Größen (5 ml- 50 ml)	Corning, Corning (USA)	4487, 4101 4489, 4490
Schüttler DRS-12	LTF Labortechnik, Wasserburg	11DE090, 11DE243
Sterilbank Thermo Scientific Safe 2020	Thermo scientific, Waltham (USA)	51026934
Tischzentrifuge Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo scientific, Waltham (USA)	75003424
Umkehrmikroskop Primo Vert	Carl-Zeiss-Microimaging, München	415510-1101-000
Vortexer LSE Vortex Mixer	Corning, Corning (USA)	S1101243
Zellschaber	Corning, Corning (USA)	13312013
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16R Centrifuge	Thermo scientific, Waltham (USA)	75003629

Tabelle 2 Chemikalie oder Set

Chemikalie/Set	Firma	Artikelnummer
Acetonitril	Carl Roth, Karlsruhe	3620.1
Agarose Standard	Carl Roth, Karlsruhe	3810.4
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Carl Roth, Karlsruhe	K298.1
5-Azacytidine, >98 %	Sigma, St. Louis (USA)	A2385-100MG
7-Benzoyloxy-4(trifluoromethyl)coumarin	Sigma, St. Louis (USA)	B5057-5MG-F
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe	6943.1
Bromphenol Blau	Carl Roth, Karlsruhe	A512.1
Brij 35	Carl Roth, Karlsruhe	CN21.1
BSA (Bovines Serumalbumin)	Carl Roth, Karlsruhe	8076.4
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe	Y015.1
ddH ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe	3175.1

DEPC (Diethylenpyrocarbonat)	Carl Roth, Karlsruhe	K020.3
Dibenzylfluoresceine	Sigma, St. Louis (USA)	D7191-5MG
Dicoumarol (3,3'-Methylene-bis(4-hydroxycoumarin)	Sigma, St. Louis (USA)	M1390-5MG
DMEM high glucose (4,5 g/l) mit Glutamin	Sigma, St. Louis (USA)	D5796
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth, Karlsruhe	4720.2
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma, St. Louis (USA)	D8537
Easycoll Separating Solution (Percoll, density 1.124)	GE Healthcare, Chalfont St. Giles (UK)	17-0891-01
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe	8043.2
Essigsäure ≥ 99,0 %	VWR, Radnor, (USA)	20104.298
Ethanol (99 %) vergällt mit MEK	SAV LP, Flintsbach am Inn	K42754183
Ethidiumbromidlösung 1 % in Wasser	Carl Roth, Karlsruhe	2218.1
7-Ethoxycoumarin	Sigma, St. Louis (USA)	02644-250MG
Fetales Kalbsserum (FCS)	Invitrogen, Carlsbad (USA)	41G7141K
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo scientific, Lafayette (USA)	Lot 00283099 K1612
Fluoresceine	Sigma, St. Louis (USA)	46955-100G-F
Glutaminlösung (L-Glutamin)	PAA, Pasching (Österreich)	M11-006
Glycerol	Sigma, St. Louis (USA)	7530.1
Hepes 1 M	Sigma, St. Louis (USA)	H0887
Human Albumin ELISA Quantification Set	Bethyl Laboratories, Montgomery (USA)	E80-129
Humanes Insulin (Actrapid Flex Pen) 100 I.E./ml	Novo Nordisk A/S, Bagsværd (Dänemark)	
Hydrocortison 100 mg, Hydrocortison 250 mg	Pfizer, Puurs (Belgien)	
7-Hydroxy-4(trifluoromethylcoumarin	Sigma, St. Louis (USA)	368512-1G
Isopropanol	VWR, Radnor (USA)	20842.330
Kollagen (aus Rattenschwänzen isoliert)	selber isoliert, siehe [135]	
Kit Fluitest LDH-L	Analyticon, Berlin	2222
Luminol	Carl Roth, Karlsruhe	4203.1
L-Ascorbinsäure-2-phosphat sesquimagnesium salzhydrat	Sigma, St. Louis (USA)	A8960-5G
L-Ornithin monohydrochloride	Sigma, St. Louis (USA)	O2375-25G
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth, Karlsruhe	KK36.2
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe	8355.5
7-Methoxy-4(trifluoromethyl)coumarin	Sigma, St. Louis (USA)	T3165-100MG
4-Methylumbelliferone	Sigma, St. Louis (USA)	M1381-100G
Monochlorobimane (MCB) > 95 %	Sigma, St. Louis (USA)	69899-25MG
Natriumcarbonat	Carl Roth, Karlsruhe	P028.1
Natriumchlorid	VWR, Radnor (USA)	27.810.295
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe	6885.2
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe	T135.1
Natrium-Pyruvat-Lösung (100 mM)	Sigma, St. Louis (USA)	S8636
Natronlauge (2 M)	Carl Roth, Karlsruhe	T135.1
Nichtessentielle Aminosäuren (100x)	PAA, Pasching (Österreich)	M11-003
N-1-Naphthyl-Ethylendiamin-Dihydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe	4342.1
O-Phthalaldehyd	Sigma, St. Louis (USA)	P1378
p-Coumarinsäure	Carl Roth, Karlsruhe	9908.1
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma, St. Louis (USA)	P0781
Probenecid	Sigma, St. Louis (USA)	P8761-25G

pUC19-Marker ready-to-use	Carl Roth, Karlsruhe	X901.1
ReadyMix (KAPA2G Fast ReadyMix with Dye)	peqlab, Erlangen	KM5101
Resazurinnatriumsalz	Sigma, St. Louis (USA)	199303-1G
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden	74804
RT ² First Strand Kit (50)	Qiagen, Hilden	330404
RT ² Profiler™ PCR Array Human Epigenetic Chromatin Modification Enzymes	Qiagen, Hilden	330231 cat.no.PAHS-085Z
Salicylamide	Sigma, St. Louis (USA)	84230-50G
Salzsäure (HCl) 2 M	Carl Roth, Karlsruhe	N076.1
Schwefelsäure, konz. (H ₂ SO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe	X945.1
Sulforhodamine B sodium salt	Sigma, St. Louis (USA)	S1402-1G
TriFast (peqGold)	Peqlab, Erlangen	30-2020
TRIS-Base (Trizma)	Sigma, St. Louis (USA)	T1503
Triton X100	Carl Roth, Karlsruhe	3051.2
Trypan Blue 0.5 % 100 ml	Carl Roth, Karlsruhe	CN76.1
Trypsin/EDTA (T/E)	Sigma, St. Louis (USA)	T3924
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe	9127.1
Umbelliferone (7-Hydroxycumarin)	Sigma, St. Louis (USA)	H24003-25G
Urea	Carl Roth, Karlsruhe	3941.3
Wasserstoffperoxid (30 % H ₂ O ₂)	Carl Roth, Karlsruhe	CP26.5
Williams Medium E	Sigma, St. Louis (USA)	W1878

Tabelle 3 Angewendete Programme

Programm	Hersteller	Verwendungszweck
GraphPad Prism 5	GraphPad Prism	Erstellung von Graphen und statistische Auswertung
ImageJ	Image Processing and Analysis in Java	Bildauswertung
Microsoft Office 365	Microsoft Excel Microsoft Powerpoint Microsoft Word	Datenauswertung und- aufbereitung
Omega 1.3	BMG Labtech, Ortenberg	Messung von Absorption, Fluoreszenz und Lumineszenz in Experimenten
GeneGlobe Data Analysis Center	Qiagen (online Software)	Auswertung des „RT ² Profiler™ PCR Array Human Epigenetic Chromatin Modification Enzymes“

2.2. Kultivierung von Zelllinien

Alle hier verwendeten Zelllinien konnten unter sterilen Bedingungen gleich kultiviert und behandelt werden. Über längere Zeit war es möglich, die Zellen in einem Stickstofftank bei -200 °C gelöst in DMSO zu konservieren. Zum Auftauen der Zellen wurden 30 ml DPBS in einem Falcon-Röhrchen im Wasserbad erwärmt und das tiefgefrorene Zellpellet möglichst schnell aufgelöst. Nach dem Zentrifugieren (600 g bei 20 °C für 10 min) konnte die Mischung aus DPBS mit DMSO vom basal liegenden Zellpellet abgesaugt werden und dieses konnte mit entsprechendem Zellkulturmedium (DMEM mit

10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin) resuspendiert werden. Zunächst durften die Zellen in einer T25-Zellkulturflasche bis mindestens 70 % Konfluenz bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator wachsen. Nach spätestens 24 Stunden wurde erstmals das Medium gewechselt. Die Zellkulturen wurden regelmäßig auf deren Wachstum und Kontamination mit dem Umkehrmikroskop untersucht. Nach dem Erreichen der gewünschten Konfluenz wurden die Zellen zunächst mit DPBS gewaschen und dann mit Trypsin/EDTA circa 5 min bei 37 °C von der Zellkulturflasche gelöst. Das Enzym Trypsin wurde mittels des im Medium vorhandenen FCS abgestoppt. Die Suspension aus Zellen, DMEM und Trypsin/EDTA wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Resuspension der Zellen erfolgte mit Zellkulturmedium. So konnten die Zellkulturen in T175-Kulturflaschen überführt werden, welche je nach Zelllinie und Wachstumsstand bis zu über 40 Millionen Zellen enthalten konnten.

Alle hier verwendeten Zelllinien waren schon im Labor etabliert und mussten nur noch aus dem Stickstofftank entnommen und aufgetaut werden.

Ursprünglich wurden die Zelllinien HepG2 und HLE von ATCC (American Type Culture Collection), Huh7 von JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank) und AKN1 von Prof. Dr. Nüssler (siehe [136]) bezogen.

2.2.1. AKN1 Zellen/Zelllinie

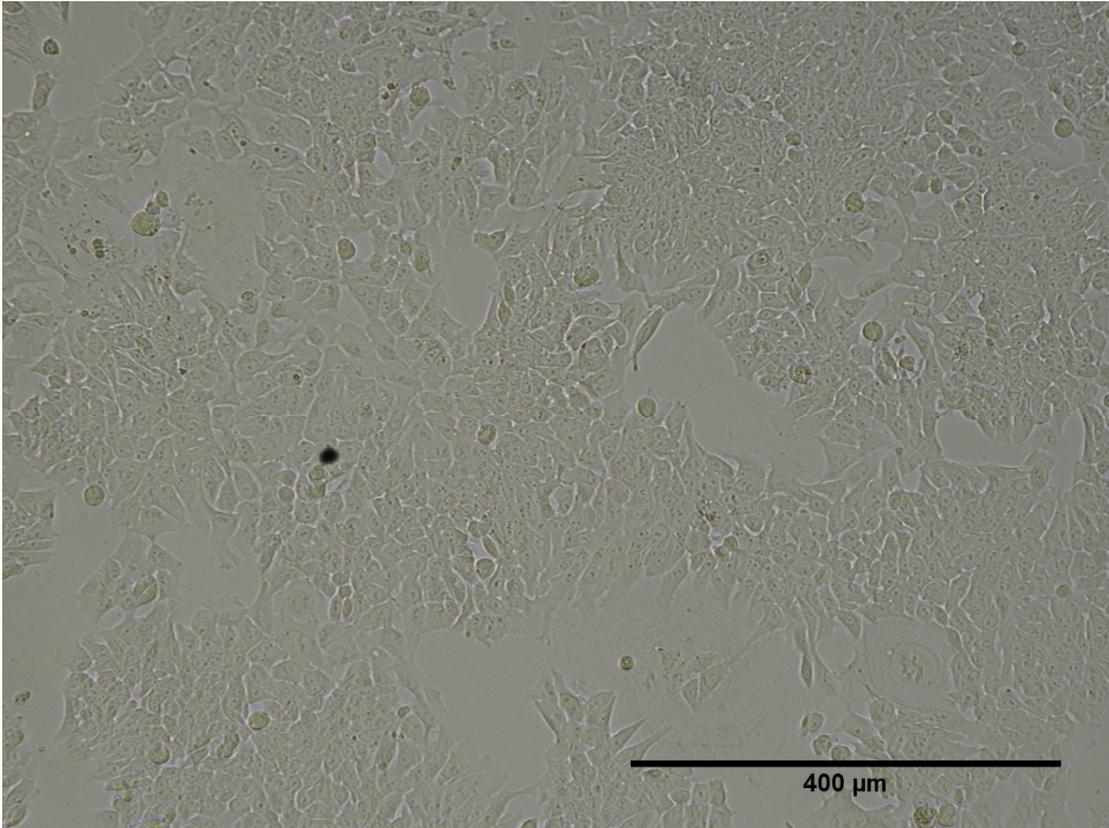


Abbildung 2 AKN1 Zellen in Kultur (Fluoreszenzmikroskop EVOS)

Die Zelllinie AKN1 wurde 1999 aus der gesunden Leber eines 10 Jahre alten Jungen isoliert [136]. Sie war eine epithelähnliche Leberzelllinie mit einer heterogenen Zellpopulation [136]. Abbildung 1 zeigt eine Aufnahme von AKN1 Zellen in Kultur. AKN1 Zellen zeigten nach ihrer Isolation sowohl Eigenschaften von Gallengangsepithel als auch von Leberzellen [136]. Es ist unklar, von welcher Art Zellen diese Zelllinie genau abstammt und ob ihre tumorösen Eigenschaften bereits *in vivo* bestanden oder erst *in vitro* entstanden sind [136]. Die Zelllinie zeigte außerdem verschiedene ausgeprägte Anomalien im Karyogramm [136]. Im Vergleich zu Hepatozyten konnte in AKN1 Zellen keine Albumin- und Faktor 8-Expression, jedoch eine gewisse Aktivität von Cytochromen der P450-Familie sowie eine Synthese von Alpha-1-Antitrypsin nachgewiesen werden [136]. Außerdem war in den Zellen Glykogen gespeichert und in etwa der Hälfte der Zellen konnte das Enzym

γ -Glutamyltransferase detektiert werden [136]. Der Gehalt an mRNA für die Argininosuccinat-Synthase war mit primären humanen Hepatozyten vergleichbar [136].

2.2.2. HLE Zellen/Zelllinie

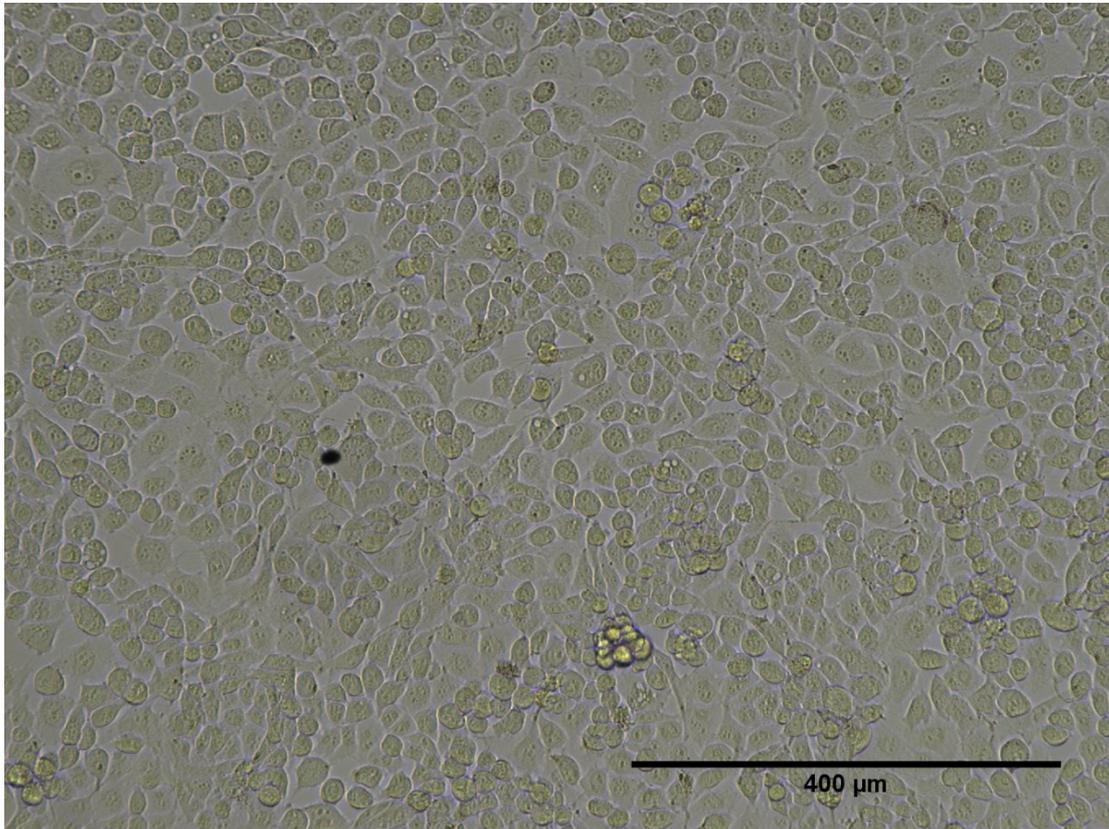


Abbildung 3 HLE Zellen in Kultur (Fluoreszenzmikroskop EVOS)

Die Zelllinie HLE wurde 1970 in Japan durch eine Obduktion aus der Leber eines 68-jährigen Patienten entnommen [137]. Die Zellen stammten aus tumorösen, weißen Knoten der Leber, welche als undifferenziertes hepatozelluläres Karzinom diagnostiziert wurden [137]. Alpha-Fetoprotein konnte als Tumormarker im Blut des Patienten detektiert werden [137]–[139]. Nach der Etablierung im Zellkulturmodell ging die Fähigkeit zur Synthese bzw. Sekretion dieses Proteins verloren; ebenso konnte keine Albuminsynthese nachgewiesen werden [137]. Eine geringe Expression von CYP2E1 konnte gezeigt werden [126]. Die Zelllinie HLE zeigte eine epithelähnliche Morphologie, eine heteroploide Chromosomenzahl und enthielt Glykogen [137]. Als

hepatocelluläre Zelllinie konnten in HLE charakteristische Veränderungen der Genexpression wie geringere Expression von Tumorsuppressorgenen und Apoptose-induzierenden Genen sowie höhere Expressionen von Genen für Zellproliferation und antiapoptotische Faktoren nachgewiesen werden [140]. Durch epigenetische Modifikation durch Azacytidin und Vitamin C konnte bereits ein Stillstand des Zellzyklus in HLE Zellen (und Huh7 Zellen) herbeigeführt werden [82].

2.2.3. HepG2 Zellen/Zelllinie

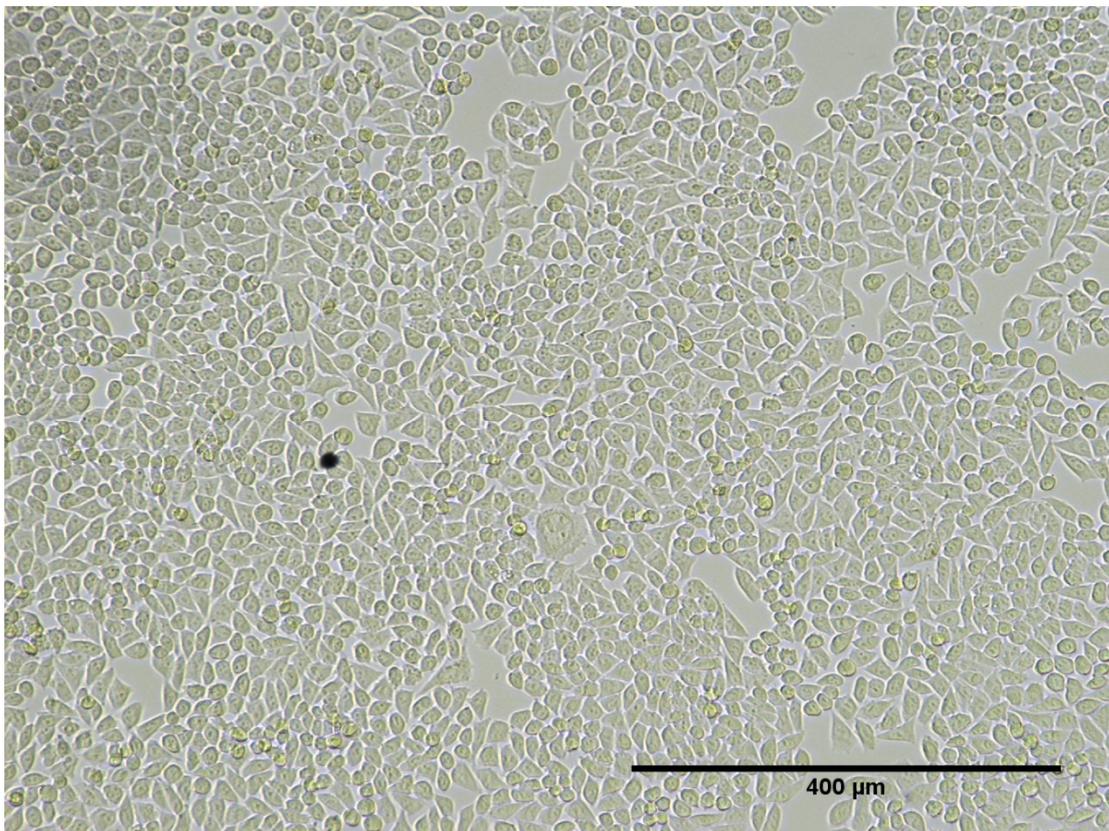


Abbildung 4 HepG2 Zellen in Kultur (Fluoreszenzmikroskop EVOS)

HepG2 Zellen wurden 1979 aus einem gut differenzierten hepatischen Tumor eines 15-jährigen, weißen Kaukasiers gewonnen [141]. Ursprünglich wurde angenommen, dass diese Zelllinie aus einem gewöhnlichen hepatocellulärem Karzinom stammt, wobei sich im Verlauf herausstellte, dass HepG2 Zellen aus einem Hepatoblastom gewonnen wurden [141], [142]. HepG2 Zellen zeigen ebenfalls eine epithelartige Morphologie und sezernieren den Tumormarker AFP [141].

Die Zelllinie produzierte wichtige Plasmaproteine wie Albumin sowie einige Cytochrom P450-Enzyme, diese allerdings in geringeren Mengen als pHHs [107], [143], [144]. Daher ist diese Zelllinie bereits im Bereich der Arzneimittelforschung im Einsatz [14], [91], [97], [99]. Genexpressionen für Enzyme der Biotransformation konnten bereits unter anderem für CYP1A1/2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2E1, UGT und GST nachgewiesen werden [145]. Enzymaktivitäten für CYP1A1, CYP1A2, UGT und GST sind ebenfalls beschrieben worden, wobei zu Aktivitäten von CYP2E1 und CYP3A4 in der Literatur unterschiedliche Angaben herrschen [144]–[147]. Ebenso konnten Alexandre *et al.* kein Protein für CYP1A1/2 trotz EROD-Aktivität sowie verminderte Enzymaktivitäten nach Konfluenz in Zellkultur nachweisen [144]. Wohingegen Westerink *et al.* für CYP2C9 trotz Genexpression keine Enzymaktivität detektieren konnten [145]. Auch bezüglich LDL-Stoffwechsel und Cholesterinsynthese zeigten HepG2 Zellen Eigenschaften von pHHs [148].

2.2.4. Huh7 Zellen/Zelllinie

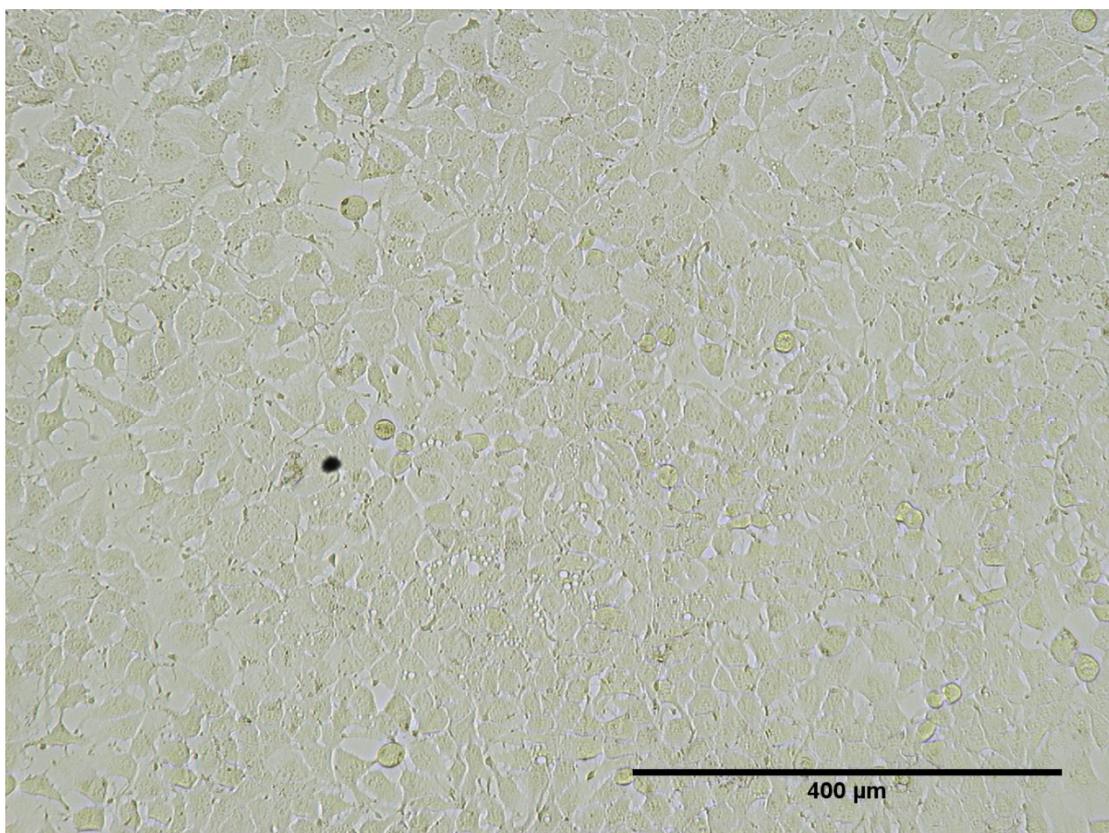


Abbildung 5 Huh7 Zellen in Kultur (Fluoreszenzmikroskop EVOS)

Die Zelllinie Huh7 wurde 1982 von einem 57-jährigen Japaner aus einem gut differenzierten hepatozellulärem Karzinom gewonnen [149]. Bereits früh konnte die Produktion von einigen Plasmaproteinen inklusive Albumin und AFP nachgewiesen werden [149]. In neueren Forschungen konnte eine geringe Expression von Cytochromen (CYP1A1/1A2/2B6/2C8/2C9/2C19/2D6/3A4/3A5) und verschiedenen Subtypen von UGT nachgewiesen werden, wobei deren Enzymaktivitäten nicht immer nachweisbar waren [92], [93]. Huh7 Zellen zeigten auch GST-Aktivität [92]. Es wurde gezeigt, dass die Enzymexpression und -aktivität mit Inkubation durch DMSO und Induktoren gesteigert werden konnte [93]. Ebenso steigerte sich die Enzymaktivität von CYP3A4 in konfluierenden Kulturen [150]. In einem Vergleich verschiedener Zelllinien konnte unter anderem Huh7 Zellen großes Potenzial zur Erforschung des Arzneimittelmetabolismus aufgrund relativ konstanter CYP-Expressionen während verschiedener Zellkulturpassagen zugeschrieben werden [92]. 2011 konnten Liu *et al.* die Expression von allen Enzymen des Harnstoffzyklus bis auf CPS1 nachweisen, wobei die Expression von CPS1 durch epigenetische Modifikation mittels Inkubation mit 5-Azacytidin gesteigert werden konnte [34].

2.2.5. Hepatozyten

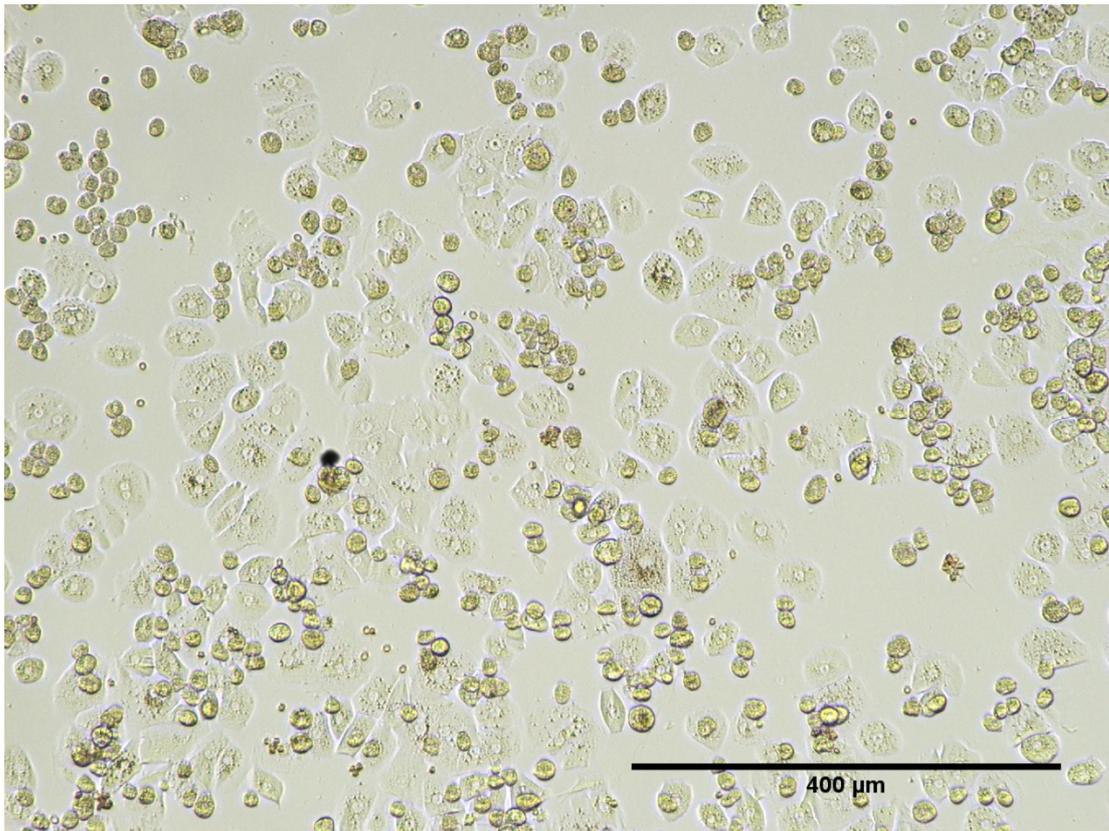


Abbildung 6 humane Hepatozyten am Tag der Isolation in Kultur

Die Aufreinigung der bereits isolierten Spenderhepatozyten begann damit, eiskaltes DPBS in das Transportgefäß zu geben und mithilfe einer Pipette das vorhandene Zellpellet zu lösen. Nachdem die Zellen in ein Falcon-Röhrchen überführt und in 30 ml DPBS suspendiert worden waren, wurde dies bei 4 °C mit 100 g für 5 min ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurde die Flüssigkeit bis auf das Zellpellet abgesaugt und dieses in einem geeigneten Volumen resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurde mittels Trypanblau Ausschluss-Methode die Gesamtzellzahl und der Anteil der lebenden Zellen errechnet. Wenn die Viabilität < 70 % betrug, war eine Aufreinigung mittels Percoll-Dichtezentrifugation notwendig. In je ein Falcon mit gutgemischtem Percoll (5 ml) und eiskaltem DPBS (15 ml) wurde vorsichtig 5 ml der Hepatozytensuspension aufgeschichtet. Dies wurde bei 4 °C mit 1300 g für 12 min zentrifugiert, wobei sich verschiedene Phasen bildeten und nur im Zellpellet lebendige Hepatozyten verblieben. Der Überstand aus Flüssigkeit und

toten Zellen wurde abgesaugt und es erfolgte eine erneute Resuspension in DPBS mit nachfolgender Zentrifugation (100g, 4 °C, 5 min) zur Reinigung. Danach wurde das Zellpellet in Hepatozytenkulturmedium (Williams Medium E, 1 % Glutamin, 100 µM Penicillin/Streptomycin, 0,8 µg/ml Hydrocortison, 15mM HEPES, 1 mM humanes Insulin, 1 mM Natrium-Pyruvat, 10 % FCS, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren) resuspendiert, die Zellen erneut mittels Trypanblau Ausschluss-Methode ausgezählt und auf vorbereitete Kollagenbeschichtete Versuchsplatten (25 000 Zellen pro Loch auf 96er Platte) gegeben.

Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, war die Ausbeute an noch intakten Leberzellen nach Isolation und Aufreinigung in frischer Kultur begrenzt (viele nicht adhären, meistens tote Zellen schwimmen im Medium).

2.3. Chromatinarray für Epigenetik-modifizierende Enzyme qRT-PCR

Um zunächst das Ausmaß der Veränderungen bezüglich der Expression von Enzymen, die auf die Epigenetik Einfluss nehmen können, in den verschiedenen Zellen zu bestimmen, wurde mRNA mittels Isolation mit TriFast für jede Zelllinie aus deren unbehandelten Zellkulturen gewonnen, quantifiziert und die Integrität kontrolliert (siehe Methoden 2.4.8.1.- 2.4.8.3). Die zu verschiedenen Passagen entnommenen Zellproben wurden zu einer Sammelprobe (N=5) für jede Linie gemischt. Die Hepatozyten-mRNA wurde ausschließlich aus verschiedenen frisch isolierten Proben ohne vorherige Kultivierung gewonnen. Die so erhaltenen Proben wurden mithilfe des „*RNeasy Lipid Tissue Mini Kit*“ von Qiagen nach dessen Anleitung weiter gereinigt [151]. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem „*RT² First Strand Kit*“, ebenfalls von Qiagen, nach Anleitung [152]. Zur Kontrolle erfolgte für alle Proben eine PCR auf das Haushaltsgen GAPDH. Es folgte nun die Durchführung des „*RT² Profiler™ PCR Array Human Epigenetic Chromatin Modification Enzymes*“ von Qiagen, auch nach dessen Anleitung [153]. Alle Proben wurden in Duplikaten dem Prozess unterzogen. Die Zielgene des „*RT² Profiler™ PCR Array Human Epigenetic Chromatin Modification Enzymes*“ von Qiagen umfassten DNA-Methyltransferasen, Histon-Acetyltransferasen und Methyltransferasen, Histon-Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Deacetylierung, SET-Domänen-Proteine,

sowie DNA- und Histon-Demethylasen [153]. Für die Zwecke dieser Doktorarbeit hatte ich mich nur auf die DNA-Methyltransferasen spezialisiert und daher finden nur diese hier weitere Erwähnung. Die Ergebnisse wurden mit Qiagen Software online ausgewertet (*GeneGlobe Data Analysis Center*) [154].

2.4. Allgemeiner Versuchsaufbau

Es gab jeweils vier Versuchsansätze:

1. nicht stimuliert (unstimuliert), d.h. Inkubation mit Medium=DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin,
2. Stimulation mit Vitamin-2-Phosphat 1 mM (VitC1),
3. Stimulation mit 5-Azacytidin 20 μ M (Aza20),
4. Stimulation mit 5-Azacytidin 10 μ M und Vitamin-2-Phosphat 0,5 mM (Aza10+VitC0,5).

Die benötigten Mengen an Vitamin-2-Phosphat und 5-Azacytidin wurden in fester Form mithilfe einer Feinwaage abgewogen, in Medium gelöst und steril filtriert. Gelöstes Azacytidin konnte bei -20 °C kurzzeitig aufbewahrt werden, wohingegen gelöstes Vitamin C stets frisch hergestellt wurde.

Die Stimulation erfolgte für 48 Stunden (Medienwechsel alle 24 Stunden).

Das Volumen pro Well betrug 100 μ l für die 96er und 2 ml für die 6er Mikrotiterplatten.

Die Anzahl der ausplattierten Zellen pro Well betrug 10.000 Zellen für 96-Well und 500.000 Zellen pro 6-Well Platten.

Jede Zelllinie wurde in drei verschiedenen Zellkulturpassagen stimuliert (HepG2: p5, p9, p12; Huh7: p4, p6, p8; HLE: p4, p6, p9; AKN1: p3, p8, p10).

2.4.1. Trypanblau Ausschluss-Methode

Zum Ausplattieren der korrekten Zellzahl wurde mittels Färbung mit Trypanblau 0,125 % (Trypan Blue 0,5 % gelöst in DPBS) die Anzahl der vitalen Zellen bestimmt. Dazu wurde nach dem Lösen, Reinigen, Zentrifugieren und Resuspendieren der Zellen in frischem Medium (siehe Methoden 2.2.) eine kleine Probe entnommen, die zu gleichen Teilen (1:1) mit Trypanblaulösung vermischt wurde. Damit wurde eine Neubauer Zählkammer befüllt und die Zellen unter dem Umkehrmikroskop *Primo Vert* ausgezählt. Hierbei wurden nur

die vitalen Zellen gezählt, welche sich im mikroskopischen Bild hell darstellten. Im Gegensatz dazu färbten sich devitale Zellen blau an. Unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors, des Volumens der Zellsuspension und dem Faktor der Zählkammer war es möglich die Gesamtzahl an lebendigen Zellen in der Zellsuspension zu errechnen und damit auch das benötigte Volumen derselben zu bestimmen, um eine gleichmäßige Anzahl an Zellen auszuplattieren [155].

2.4.2. Resazurinkonversion

Mithilfe der Resazurinkonversion können Proliferation, Viabilität und Toxizität veranschaulicht werden und es ist eine gut etablierte, kostengünstige Methode. Dieses Verfahren basiert auf der Fähigkeit von biologisch intakten Zellen Resazurin zu Resorufin zu reduzieren. Dies geschieht hauptsächlich in den Mitochondrien der Zellen, ist aber auch im Zytosol möglich. Somit können indirekt Rückschlüsse auf die Zellviabilität und -proliferation bzw. Toxizität gemacht werden [156]–[158].

Die Resazurinkonversion wurde stets auf der gleichen 96-Well Platte ausgeführt wie die LDH-Messung. Nachdem der Überstand (für die LDH-Messung) abgenommen wurde, erfolgte die einmalige Reinigung mit DPBS. Sogleich erfolgte die Zugabe der 10 %igen Resazurinmischung (Resazurin-Natrium-Salz gelöst in DPBS) und deren Inkubation für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ [158]. Die Detektion erfolgte mittels Fluoreszenz mit dem Plattenlesegerät *Fluorstar Omega* (Exzitation: 544 nm, Emission: 590-10 nm, Gain: 800 nm). Die Messung erfolgte in Quadruplikaten und als Hintergrundkontrolle dienten stets nur Resazurinreaktionsmischung enthaltende Wells.

Da die Resazurinkonversion hier nur einen Überblick über die Auswirkungen der Stimulation im Vergleich zu unbehandelten Zellen liefern sollte, wurde zu Beginn beschlossen auf eine Normierung zu verzichten.

2.4.3. LDH-Freisetzung

Die Messung der LDH-Freisetzung ist ein Parameter für den Zelluntergang bzw. Zytotoxizität und daher auch indirekt für die Zellviabilität. LDH ist ein intrazelluläres Enzym, welches durch Schädigung der Zellmembran freigesetzt wird [159]. LDH kommt in insgesamt fünf verschiedenen Isoformen im

Menschen vor, wobei unter anderem die Leber große Mengen enthält [160]. Die Laktatdehydrogenase katalysiert die Reaktion von Laktat+ NAD⁺ zu Pyruvat und NADH+ H⁺, wobei letzteres photometrisch detektierbar ist [160].

Das Experiment wurde jeweils mit dem Überstand der Zellen durchgeführt, an welchen darauffolgend die Resazurinkonversion gemessen wurde. Nach dem Ausplattieren auf eine 96-Well Platte und Stimulieren der Zellen, wurde der Überstand abgenommen. Nach Anleitung wurden 50 µl Zellüberstand mit 50 µl Reaktionsmischung des *Fluitest LDH-L Kits* vermischt und dann die Absorptionsveränderungen (bei 340 nm) im Plattenlesegerät *Floustar Omega* gemessen [160]. Die Proben wurden in Quadruplikaten gemessen. Um die LDH-Freisetzung zu quantifizieren, wurde jeweils für jeden Stimulationsansatz eine Positivkontrolle gebildet. Dazu wurden Triplikate mit 0,1 % Triton für mindestens 30 Minuten versetzt, um die maximale LDH-Ausschüttung durch Nekrose aller im Well enthaltenen Zellen zu messen. Die Ergebnisse konnten daher in Prozent zur Positivkontrolle angegeben werden.

2.4.4. Harnstoffproduktion

Die Bildung von Harnstoff gibt Auskunft über die metabolische Fähigkeit einer Zelle NH₃ zu entgiften. Die Grundlage des Mechanismus liefert der Harnstoffzyklus. Angewandt wurde eine im Labor bereits etablierte modifizierte Methode nach Jung *et al.* [161].

Nach dem Ausplattieren auf eine 96-Well Platte und Stimulieren der Zellen wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und danach für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit einer von drei verschiedenen Reaktionslösungen inkubiert. Die Messung wurde in Quadruplikaten durchgeführt.

Reaktionslösung 1 enthielt MgCl₂ 1 mM und Natriumpyruvat 1 mM gelöst in DMEM mit 1 % Penicillin/Streptomycin.

Reaktionslösung 2 enthielt zusätzlich NH₄Cl 5 mM.

Reaktionslösung 3 enthielt sowohl NH₄Cl 5 mM als auch L-Ornithin 100 mM.

Jeweils 80 µl des Zellüberstandes oder 80 µl einer Verdünnungsreihe aus Urea (Standardkurve) wurden mit 60 µl O-Phthalaldehyd-Lösung

(7,4 % konz. H₂SO₄, 0,02 % O-Phthalaldehyde und 0,03 % Brij 35 gelöst in ddH₂O) und 60 µl NED-Reagenz (22,2 % konz. H₂SO₄, 0,5 % Borsäure, 0,06 % N-(1-naphthyl)ethylenediamin-Dihydrochlorid und 0,03 % Brij 35 gelöst in ddH₂O) für weitere 90 min auf einer neuen 96-Well Platte bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert; dann erfolgte die Messung der Absorption bei 460 nm mittels dem Plattenlesegerät *FluoStar Omega* [161]. Mittels Standardkurve wurde die Harnstoffproduktion in den Wells errechnet. Die Zellen wurden mit 99 % Ethanol fixiert und mittels SRB-Färbung wurden die Ergebnisse auf die Zellzahl normiert.

2.4.5. Phase I- und II-Aktivität

Sowohl Phase I- wie auch Phase II-Reaktionen sind besonders bedeutend für den Metabolismus von exogenen wie auch endogenen Substanzen. Grundlage der Methode ist die Forschung von Donato *et al.* 2004, welche in modifizierter Form im Labor etabliert war [92], [162], [163].

Nach dem Ausplattieren auf eine 96-Well Platte und dem Stimulieren der Zellen wurde ein Teil der Zellen nach dem Waschen mit DPBS mit 99 % Ethanol für mindestens 30 min fixiert. Diese Zellen dienten später als Negativkontrolle. Die Messung selbst wurde in Triplikaten durchgeführt.

Nach dem Waschen aller Zellen enthaltenden Vertiefungen wurde jeweils 100 µl Reaktionsgemisch (siehe Tabelle 4) in jedes Well gegeben und danach sofort mithilfe des Plattenlesegeräts *Fluostar Omega* die Fluoreszenz der einzelnen Wells gemessen (siehe Tabelle 5). Dies geschah an den Zeitpunkten $t=0$ min und $t=20$ min. Diese Zeitpunkte wurden zuvor anhand einer Kinetik für jede Zelllinie in unstimuliertem Zustand festgelegt. Es wurde ein Zeitpunkt gewählt, in dem der Fluoreszenzanstieg im linearen Bereich liegt. Nach der Messung wurden die Zellen wieder mit DPBS gewaschen und mittels 99 % Ethanol für die SRB-Färbung fixiert. Diese wird benötigt, um das Ergebnis auf die Zellzahl zu normen.

Tabelle 4 Aktivitätsmessung ausgewählter Phase I- und II-Enzyme: Inhaltsstoffe der Reaktionslösungen und der Standardkurven.

Abkürzungen:

7-EC= 7-Ethoxycoumarin, Sal= Salicylamid, Pro= Probenecid, DMSO= Dimethylsulfoxid, 7-HC= Umbelliferone(7-Hydroxycoumarin), BFC= 7-Benzyloxy-4(trifluoromethyl)coumarin, ACN= Acetonitril, HFC= 7-Hydroxy-4(trifluoromethyl)coumarin, MFC= 7-Methoxy-4(trifluoromethyl)coumarin, DBF= Dibenzylfluoresceine, Dic= Dicoumarol (3,3'-Methylene-bis(4-hydroxycoumarin), FL= Fouresceine, MCB= Monochlorobimane (MCB) > 95 %, 4-MU= 4-Methylumbelliferone

	Reaktionsgemisch			Standardkurve		
	Substrat von Phase I	Inhibitor von Phase II	Konzentration Lösungsmittel	Produkt von Phase I bzw. II	Konzentration Lösungsmittel	
CYP 1A1/1A2	7-EC 25 µM	Sal 1,5 mM Pro 2 mM	2,6 % DMSO	7-HC 2 µM	0,2 % DMSO	gelöst in DMEM
CYP 3A4	BFC 5 µM	Sal 1,5 mM Pro 2 mM	0,19 % ACN 2,4 % DMSO	HFC 25 µM	0,2 % ACN	
CYP 2E1	MFC 2 µM	Sal 1,5 mM Pro 2 mM	0,19 % ACN 2,4 % DMSO	HFC 25 µM	0,2 % ACN	
CYP 2C9	DBF 5 µM	Dic 0,01 mM	0,3 % DMSO	FL 5 µM	0,2 % DMSO	
		Substrat von Phase II				
GST	-	MCB 50 µM	0,25 % DMSO	-	-	
UGT	-	4-MU 6,25 µM	0,2 % DMSO	4-MU 6,25 µM	0,2 % DMSO	

Tabelle 5 Einstellungen des Plattenlesegeräts für Phase I/II-Aktivitäten

	Exzitation	Emission	Gain
CYP1A1/2 GST UGT	355 nm	460 nm	400
CYP3A4 CYP2E1	355 nm	520 nm	500
CYP2C9	485 nm	520 nm	600

Die Standardkurven zur Errechnung der Enzymaktivitäten wurden anhand von Verdünnungsreihen aus den jeweiligen Produkten der Substrate (siehe Tabelle 4) erstellt, wobei bei der Verstoffwechslung von 4-MU der Abbau des Substrates (bzw. der Fluoreszenz) gemessen wurde und daher die Standardkurve anhand des Substrats berechnet wurde. Mittels dieser Kurven konnten die gemessenen Fluoreszenzwerte in umgesetzte Stoffmenge pro min

umgerechnet werden. Ausnahme bildet die Aktivitätsmessung der GST, da MBF selbst kein fluoreszierendes Substrat ist, sondern erst nach enzymatischer Konjugation mit Glutathion ein fluoreszierendes Produkt gebildet wird [164], [165]. Daher wurde hier die Angabe der Aktivität in Fluoreszenzintensität/min/1 Millionen Zellen angegeben.

2.4.6. Albuminsekretion

Nach dem Ausplattieren auf eine 96-Well Platte und Stimulieren der Zellen wurde der Überstand der jeweiligen Triplikate abgenommen und zunächst tiefgefroren bei -20 °C gelagert. Nachdem alle Proben so gesammelt wurden, wurde der Überstand von den Triplikaten aufgetaut und gepoolt, sodass vier Proben (unstimuliert, VitC1, Aza20, Aza10+VitC0,5) je Zellpassage und insgesamt 12 Proben (vier Proben mal drei Zellpassagen) pro Zelllinie entstanden sind. Mithilfe des „*Human Albumin ELISA Quantification Sets*“ wurde zunächst bestimmt in welcher Verdünnung die Proben gemessen werden mussten (siehe Tabelle 6). Alle Proben wurden stets in Duplikaten gemessen. Je nach Zelltyp ergaben sich verschiedene Verdünnungen. Aufgrund der Versuchsanordnung konnte keine Albuminsekretion in pHHs im gleichen Versuch mitgemessen werden. Daher wurde auf Vergleichswerte von pHHs verzichtet, zumal die Albuminsekretion keine Rolle für *In-vitro*-Arzneimitteltests spielt und hier nur als allgemeiner Marker für die Synthesefunktion betrachtet wurde.

Tabelle 6 Verdünnungen für das „*Human Albumin ELISA Quantification Set*“

Zelltyp	Verdünnung
Huh7	1:50
HLE HepG2 AKN1	keine

Die Messung erfolgte nach leicht modifizierter Anleitung des Herstellers des „*Human Albumin ELISA Quantification Sets*“ [166]. Der erste Schritt bestand darin, eine 96-Well Platte mit dem primären Antikörper zu beschichten. Dazu wurden je 100 µl Antikörper-Beschichtungspuffer-Mischung (1:100, Beschichtungspuffer= 50 mM NaHCO₃ und 50 mM Na₂CO₃ in ddH₂O

bei pH 9,6) in jedes Well pipettiert und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Darauf folgte eine gründliche Reinigung durch fünfmaliges Waschen mit 0,05 % Tween 20 in TBS-Puffer (500 mM TRIS und 140 mM NaCl in ddH₂O mit NaOH/HCl auf pH 8,0). Für 30 min bei RT wurde nun 200 µl Blocklösung (1 % BSA in TBS-Puffer) in jedes Well gegeben, woraufhin nochmals eine fünfmalige Reinigung erfolgte.

Erst dann wurden die Proben (in Proben-Konjugat-Puffer= 1 % BSA und 0,05 % Tween 20 in TBS-Puffer bei pH 8,0) bzw. der Standard (Verdünnungsreihe mit *Human Reference Serum* in Proben-Konjugat-Puffer) mit 100 µl in den vorbereiteten Wells für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach einem weiteren fünfmaligen Reinigen wurde bei einer erneuten Inkubation für 1 Stunde bei RT der sekundäre Antikörper (1 µl in 7,5 ml Proben-Konjugat-Puffer) mit 100 µl pro Well hinzugegeben. Nach einer letzten Reinigung wurden 100 µl einer unmittelbar davor zusammengemischten Lumineszenzlösung (10 µl Luminol (250 mM in DMSO), 4,4 µl p-Coumarin (90 mM in DMSO) in 1 ml 100 mM TRIS-Puffer (pH 8,5) und 1,6 µl 30 % Wasserstoffperoxid-Lösung in 1 ml 100 mM TRIS-Puffer) auf die Wells gegeben und es erfolgte sofort eine Detektion mittels Plattenlesegerät. Die Ergebnisse wurden mittels SRB-Messung auf die Zellzahl genormt.

2.4.7. SRB-Färbung

Sulforhodamin B bindet an Proteine der Zelle und ermöglicht dadurch eine Bestimmung der Zellzahl.

Das etablierte Protokoll im Labor orientierte sich an der Veröffentlichung von Skehan *et al.*, welche diese Messung entwickelt haben [167].

Nach dem jeweiligen Versuch wurden die Zellen mit 99 % Ethanol für mindestens 1 h bei -20 °C an die Plastikoberfläche der Zellkulturplatten fixiert. Nach dem Entfernen des Ethanols, dem einmaligen Waschen der Platten mit Leitungswasser und Lufttrocknung wurden die Zellen mit 0,4 % SRB-Lösung (Sulforhodamin B gelöst in 1%iger Essigsäure) komplett bedeckt und unter Schütteln 30 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Nach dem Waschen mit

1%iger Essigsäure bis aller nicht gebundener Farbstoff entfernt worden war, wurde das verbliebene, gebundenes SRB mithilfe von 10 mM ungepufferter TRIS-Lösung (100 µl pro Well bei 96-Well Platte) von den Zellen gelöst. Die Inkubation für diesen Vorgang erfolgte ebenfalls unter Lichtausschluss bei RT für 10-15 min. Die Absorptionsmessung erfolgte, wenn der komplette Farbstoff wieder in Lösung gegangen war, durch das Plattenlesegerät *Fluostar Omega* bei 565 nm (Detektion SRB) und 690 nm (Detektion Hintergrundstreuung). Nach der Subtraktion dieser Messwerte voneinander erhielt man die optische Dichte der SRB-TRIS-Lösung.

Anhand der erstellten Standardkurven nach Zellzahl für die jeweilige Zelllinie (Beispiel siehe Abbildung 7) unter standardisierten Bedingungen konnte nun von der optischen Dichte auf die Zellzahl zurückgeschlossen werden (linearer Zusammenhang) [167]. Die Erstellung der Standardkurven erfolgte mehrmals für jede Zellreihe in Quadruplikaten. Die Zellen wurden mittels Trypanblau Ausschluss-Methode gezählt und nach aufsteigenden Mengen auf 96-Well Platten ausplattiert. Nach dem Anwachsen der Zellen an die Oberfläche wurde die SRB-Färbung durchgeführt.

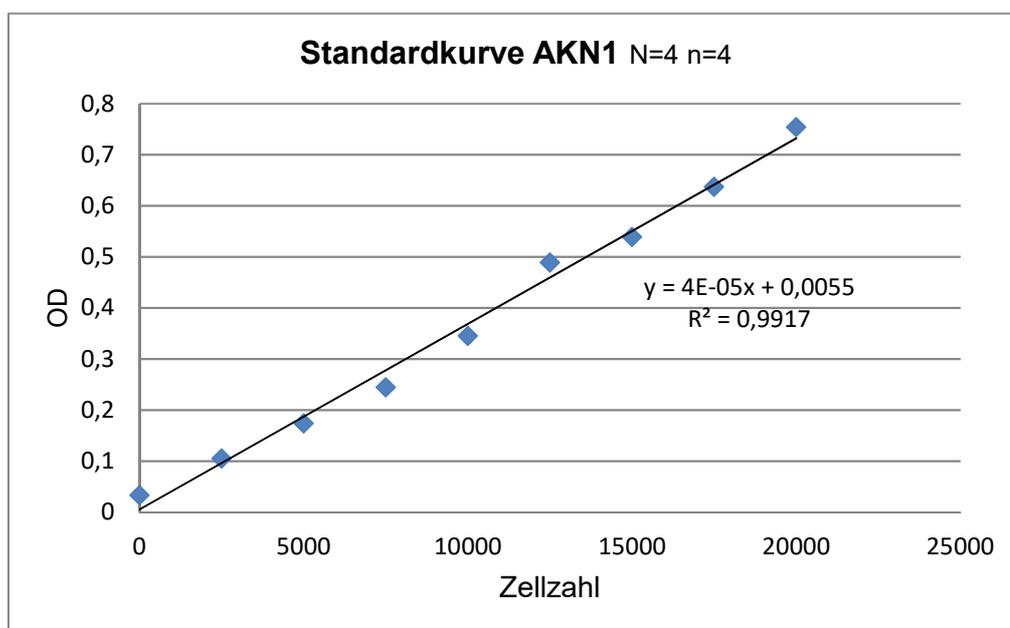


Abbildung 7 Beispiel für die SRB-Standardkurven anhand der Zelllinie AKN1.

Die y-Achse zeigt die optische Dichte, gemessen durch die Absorption der SRB-Färbung. Die x-Achse zeigt die entsprechende Zellzahl.

2.4.8. mRNA-Analyse

Dieses Verfahren dient zur Analyse der Expression verschiedener Gene und teilt sich in mehrere Teilschritte auf, die im Folgenden beschrieben werden.

2.4.8.1. mRNA-Isolation mittels TriFast

TriFast ist ein sofort einsatzbereites Reagenz, das RNA von DNA und Protein trennt und das durchgeführte Protokoll orientierte sich an Herstellerangaben [168]. Nach dem Ausplattieren auf eine 6-Well Platte in Triplikaten und Stimulieren der Zellen wurden diese mit einem Zellspatel unter Zugabe von 500 µl TriFast von der Oberfläche gelöst und mit einer Pipette wurde die Zellsuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt (in dieser Form war auch eine gekühlte Lagerung möglich). Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 100 µl Chloroform zugegeben und gut gemischt. Nach weiteren 5-10 min Inkubation bei RT wurden die Proben bei 14000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Es entstanden deutlich drei Phasen: die oberste war durchsichtig und enthielt RNA, die mittlere war sehr schmal und weiß und enthielt DNA, die unterste war die größte, rot verfärbt und enthielt sowohl Protein als auch DNA.

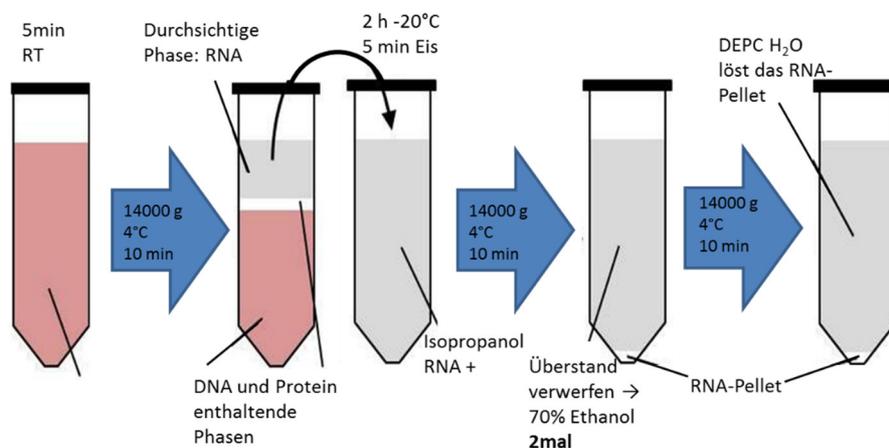


Abbildung 8 Schema der RNA-Isolation mit TriFast (basierend auf der Abbildung der *Standard Operating Procedure* des Siegfried Weller Instituts)

Die RNA enthaltende oberste Phase wurde mittels sorgfältigem Abpipettieren in ein steriles, 250 µl Isopropanol enthaltendes Reaktionsgefäß überführt und vermischt. Diese Mischung wurde bei -20 °C mindestens 2h tiefgefroren, da sich dadurch die Ausbeute an RNA erhöht. Nach erneuter 5 bis 10-minütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wie zuvor konnte nun der Überstand ganz einfach abgeschüttet werden und zurück blieb

ein relativ fest an der Wand des Reaktionsgefäßes klebendes RNA-Pellet. Zur Reinigung erfolgte direkt auf die Zugabe von 1 ml 70%igem Ethanol zu jeder Probe das Lösen des Pellets von der Wand mithilfe des Vortexers, sodass das Pellet komplett umspült wurde. Nach erneutem Zentrifugieren unter gleichen Bedingungen wurde die komplette Reinigungsprozedur wiederholt. Danach wurde das RNA-Pellet an der Luft stehen gelassen, bis der komplette Alkohol verdampft war. Je nach Größe des Pellets wurde es in einer Menge von 30-50 µl DEPC H₂O gelöst.

2.4.8.2. mRNA-Quantifikation

Die in 30-50 µl DEPC H₂O gelöste RNA-Menge wurde mittels des Plattenlesegeräts *Fluostar Omega* und einer speziellen, dazugehörigen Messplatte "*LVis Plate*" quantifiziert. Mittels drei verschiedener Absorptionmessungen bei 260 nm (RNA), 230 nm und 280 nm (Protein, Salze, Lösungsmittel etc.) konnte zweierlei bestimmt werden: 1. wieviel RNA in µg/µl enthalten war und 2. wie die Reinheit der Probe war.

2.4.8.3. mRNA-Integrität

Nach der Quantifikation der RNA folgte regelhaft die Kontrolle der Integrität. Diese beiden Tests bestätigten sich gegenseitig.

Auf ein 1,5 % Agarosegel (1,5g Agarose in 100 ml 1 M TBE-Puffer (= TRIS, Borsäure, EDTA, ddH₂O) plus 7 µl Ethidiumbromid) wurden alle Proben getrennt aufgetragen. Die Ladungsmenge für jede Probe stellte sich aus 4/5 Probe (mindestens 500 ng RNA in DEPC H₂O) und 1/5 PCR *Loading Buffer 5X* (25 mg Bromphenolblau in 5 ml TBE 10 M und 5 ml 10 % Glycerol) zusammen [169], [170]. Zur Größenbestimmung der RNA-Stücke wurde der gebrauchsfertige pUC19-Marker von Carl Roth benutzt. Nach der Elektrophorese (30 min, 90 V, 0,15 A, 14 W in 1 M TBE-Puffer) wurde das Agarosegel mit dem Geldokumentationssystem *Gel iX Imager* von *INTAS Science Imaging* unter UV-Licht fotografiert. Als helle Banden waren nun die ribosomale 18S und 28S-RNA zu sehen. Dies geschah durch die Interkalation von Ethidiumbromid in die Basenkette der RNA, indem UV-Licht die Fluoreszenz des Stoffes anregt [171]. Waren keine zwei Banden pro Probe zu

sehen, war die RNA degradiert und unbrauchbar, daher mussten solche Proben verworfen werden.

2.4.8.4. semiquantitative RT-PCR

Unter Gebrauch des „*First Strand cDNA Synthesis Kit*“ nach Anweisung wurde aus den RNA-Proben komplementäre cDNA hergestellt [172].

Zur Kontrolle der cDNA-Synthese wurde zunächst für alle Proben eine PCR auf die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, welche ein ubiquitär vorkommendes Enzym der Glykolyse in allen Lebewesen ist, durchgeführt.

Von jeder Zelllinie wurden durch alle Versuche insgesamt 36 Proben gesammelt: Jeweils drei unterschiedliche Zellpassagen mit jeweils vier verschiedenen Stimulationsansätzen in Triplikaten. Aus technischen Gründen musste die Anzahl der Proben pro Zelllinie deutlich gesenkt werden. Daher wurden die jeweiligen Triplikate zu einer Sammelprobe zusammengefügt. Somit wurden alle folgenden PCR nur noch mit 12 Proben pro Zelllinie durchgeführt.

Zum Zweck der Quantifizierung der Ergebnisse wurde erneut von den Sammelproben eine PCR für die GAPDH sowie deren Gelelektrophorese durchgeführt. Mittels des Programms *ImageJ* konnte somit nach der Auswertung ein passender Faktor für die jeweiligen Proben bestimmt werden, welcher zur semiquantitativen Analyse eines spezifischen Gens im Vergleich zum Haushaltsgen benötigt wird [173], [174].

Anschließend wurden Gene von besonderem Interesse untersucht, welche passend zu den Versuchen der metabolischen Zellaktivität festgelegt wurden (siehe Tabelle 7). Für die Biotransformation wurden repräsentative Enzyme für Phase I mit CYP3A- Familie mit Subtypen 3A4 und 3A7, CYP2C9, CYP1A- Familie mit Subtypen 1A1 und 1A2, CYP2E1 und für Phase II Subtypen GSTA1 und UGT1A6 ausgewählt. CYP3A7 wurde nicht aufgrund seiner Bedeutung für den Arzneimittelmetabolismus gewählt, sondern weil es im gleichen Gen-Cluster wie CYP3A4 liegt und in der Entwicklung vermehrt in undifferenziertem Gewebe exprimiert wird [175]–[177]. Ebenso wurden alle Gene für die Enzyme des Harnstoffzyklus inklusive NAGS, Albumin und die DNA-Methyltransferasen 1, 3A und 3B untersucht. Die genauen Charakteristika

für die verschiedenen PCR (Temperatur, Zyklen etc.) wurden anhand von primären humanen Hepatozyten festgelegt.

Im ersten Schritt erfolgte immer die PCR. Eine PCR-Probe enthielt cDNA der Sammelprobe, Vorwärts- und Rückwärtsprimer, sowie *Ready Mix (KAPA2G Fast ReadyMix with Dye)*. Es wurden je 40 ng cDNA der Zelllinien oder pHHs benutzt, wobei für die Untersuchung der Phase I und II-Enzyme aufgrund der hohen quantitativen Unterschiede auf 20 ng cDNA der pHHs bei weiterhin 40 ng cDNA der Zelllinien reduziert werden musste. Die PCR erfolgte stets für 35 Zyklen je Gen mit Ausnahme der CPS1 für 40 Zyklen.

Im zweiten Schritt folgte die Performance der Gelelektrophorese mit 1,7 % Agarosegel für 30 min in 1 M TBE-Puffer bei 90 V. Es wurde stets die gleiche Menge an PCR-Produkt als Probe geladen. Auf einem Gel befanden sich stets aus Gründen der Vergleichbarkeit alle 12 Sammelproben einer Zelllinie und als Referenz eine Sammelprobe aus 15 verschiedenen frischen Hepatozytenproben.

Die beiden letzten Schritte erfolgten mittels Geldokumentationssystem *Gel iX Imager*, *ImageJ* und *Microsoft Excel* zur Auswertung und mit *GraphPad Prism 5* zur Darstellung und Statistikerhebung.

Tabelle 7 Angewendete Primer

Zielgen	Primer vorwärts	Primer rückwärts	Amplifikat (bp)	Hybridisierungstemp. (°C)
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	GTCAGTGGTGG ACCTGACCT	AGGGGTCTACA TGGCAACTG	420	58
N-Acetylglutamat-Synthase (NAGS)	TAACGTGAACC TGCCCGCCG	GGCTGCGCAC CCGTAGCATT	224	62
Carbamoylphosphat-Synthetase 1 (CPS1)	GGCCATCCATC CTCTGTTGC	GCTAAGTCCCA GTTTCATCCA	171	62
Ornithin-Transcarbamylase (OTC)	TGGCCCCCGCT GGCTAACTT	CACGGCCCTTC AGCTGCACTT	192	62
Argininosuccinat-Synthase 1 (ASS)	ACGCCTCCAAT CCCAGACGC	CCCTCCCGCTG GGCGATTTC	350	62
Argininosuccinat-Lyase (ASL)	CCCTCAAGCGC AGTGCCAG	CTGCACCCACA AACCGGCCA	182	62
Arginase 1 (ARG)	TGAGAAAGGCT GGTCTGCTTGA GA	TGCCAAACTGT GGTCTCCGCC	245	62

DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1)	CCGTTTGGTAC ATCCCCTCC	CAGGTAGCCCT CCTCGGATA	378	62
DNA-Methyltransferase 3A (DNMT3A)	GGCGAGAGCA GAGGACGA	ATAGATCCCGG TGTTGAGCC	157	60
DNA-Methyltransferase 3B (DNMT3B)	AAGTCGAAGGT GCGTCGTG	AGGACACGGG GTTTTTCCTG	262	60
Albumin	TTTATGCCCCG GAACTCCTTT	TGTTTGGCAGA CGAAGCCTT	142	60
Cytochrom P1A1 (CYP1A1)	TTCGTCCCCTT CACCATC	CTGAATTCCAC CCGTTGC	302	55
Cytochrom P1A2 (CYP1A2)	CTCTACAGTTG GTACAGATGGC A	AGGTGTTGAGG GCATTCTGG	456	62
Cytochrom P2C9 (CYP2C9)	CTGGATGAAGG TGGCAATTT	AGATGGATAAT GCCCCAGAG	308	59
Cytochrom P2E1 (CYP2E1)	GACTGTGGCC GACCTGTT	ACACGACTGTG CCCTGGG	296	59
Cytochrom P3A4 (CYP3A4)	ATTCAGCAACA AGAACAAGGAC A	TGGTGTCTCA GGCACAGAT	314	56
Cytochrom P3A7 (CYP3A7)	AATAAGGCACC ACCCACCTA	AGAGCAAACCT CATGCCAAT	326	58
UDP-Glukuronyltransferase 1A6 (UGT1A6)	TGGTGCCTGAA GTAAATTTGCT	GCTCTGGCAGT TGATGAAGTA	210	60
Glutathion-S-Transferase alpha 1 (GSTA1)	TCTGCCCGTAT GTCCACCT	GCTCCTCGACG TAGTAGAGAAG T	185	59

2.5. Statistik

Alle Versuche wurden in der Regel mindestens dreimal durchgeführt. Die genaue Anzahl ist in den Graphiken mittels „N“ für die Anzahl der Versuche und mittels „n“ für die Anzahl der Replikate gekennzeichnet. Letztere beinhalten in der Regel drei Replikate, wobei diese für die mRNA-Analyse gepoolt werden mussten (siehe Methoden 2.4.8.4.).

Alle Statistiken wurden nach Beratung und Anleitung mittels *GraphPad Prism* erstellt. Dies beinhaltete in einfachster Form Berechnungen zu Mittelwerten, Standardfehlern und -abweichungen, Minima, Maxima mit Perzentilen und Medianen. Zum Vergleich der verschiedenen Stimulationsansätze wurde ein *one-way ANOVA* (einfache Varianzanalyse) mit Kruskal-Wallis-Test und darauffolgendem Post-hoc Test in Form von Dunn's multiplen Vergleichstest durchgeführt. Statistisch signifikante p-Werte wurden in den Grafiken mittels Sternchen ($* \leq 0,05$, $** \leq 0,01$, $*** \leq 0,001$) und den jeweils dazugehörigen Balken (┆─ zeigt die beiden berechneten Stichproben an) dargestellt. Die Ergebnisse wurden entweder in *Scatter plots*, wobei stets der Mittelwert und dessen

Standardfehler eingezeichnet sind oder in *Box plots*, in welchen Minimum, Maximum, 25. und 75. Perzentile, Median und Mittelwert eingezeichnet sind, dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Genexpression der DNA-Methyltransferasen

Mithilfe des Chromatinarrays für Epigenetik-modifizierende Enzyme von Qiagen (siehe Abbildung 9) zeigte sich eine variable Hochregulation der

DNA-Methyltransferasen 1, 3A und 3B

in allen vier getesteten Zelllinien im Vergleich zu primären Hepatozyten. Die einzige Ausnahme stellten HepG2 Zellen mit einer etwas geringeren Transkription der DNMT3A dar. Richtig deutliche Überexpression zeigte sich allerdings für AKN1 und HepG2 Zellen nur für DNMT1, für HLE Zellen zusätzlich noch für DNMT3B.

Betrachtete man die DNA-Methyltransferasen als Angriffspunkt für epigenetische Modifikation, schienen daher Huh7 Zellen das meiste Potenzial aufgrund der über 20-30fachen Erhöhung der mRNA-Level für alle drei Transferasen zu liefern.

Allerdings war die Transkription von DNMT1 in allen Zelllinien mindestens auf das 10fache (HepG2 und HLE

Zellen) aber auch bis über das 20fache (Huh7 und AKN1 Zellen) erhöht. Daher war zu hoffen, dass alle Zelllinien zumindest über Beeinflussung dieser Methyltransferase verändert werden konnten.

Als nächstes wurden die mRNA-Level für die DNA-Methyltransferasen in den verschiedenen Zellpassagen nach Stimulation in den einzelnen Zelllinien mit semiquantitativer PCR untersucht. Wobei wie unter Punkt 2.4.8.4. beschrieben vorgegangen wurde.

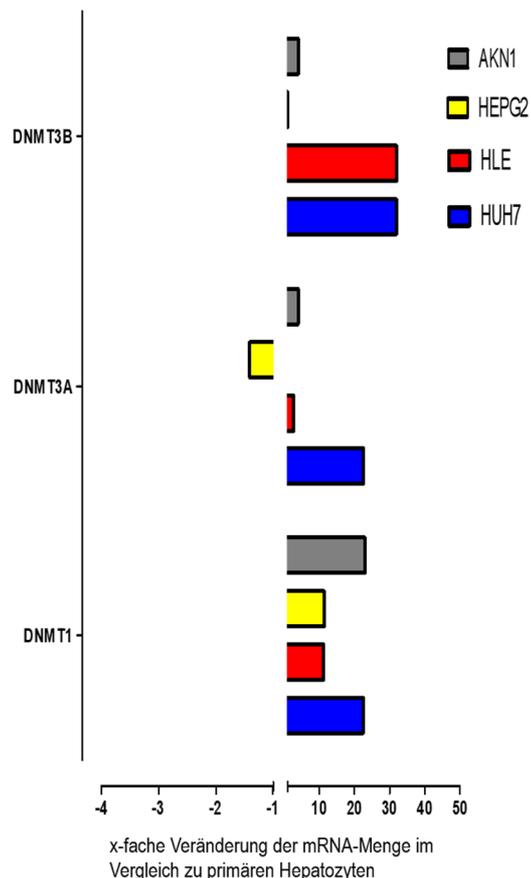


Abbildung 9 Ergebnisse des Chromatinarrays für Epigenetik-modifizierende Enzyme: Veränderungen der Genexpression von DNMT1, 3A und 3B in unbehandelten Zelllinien im Vergleich zu pHHs.

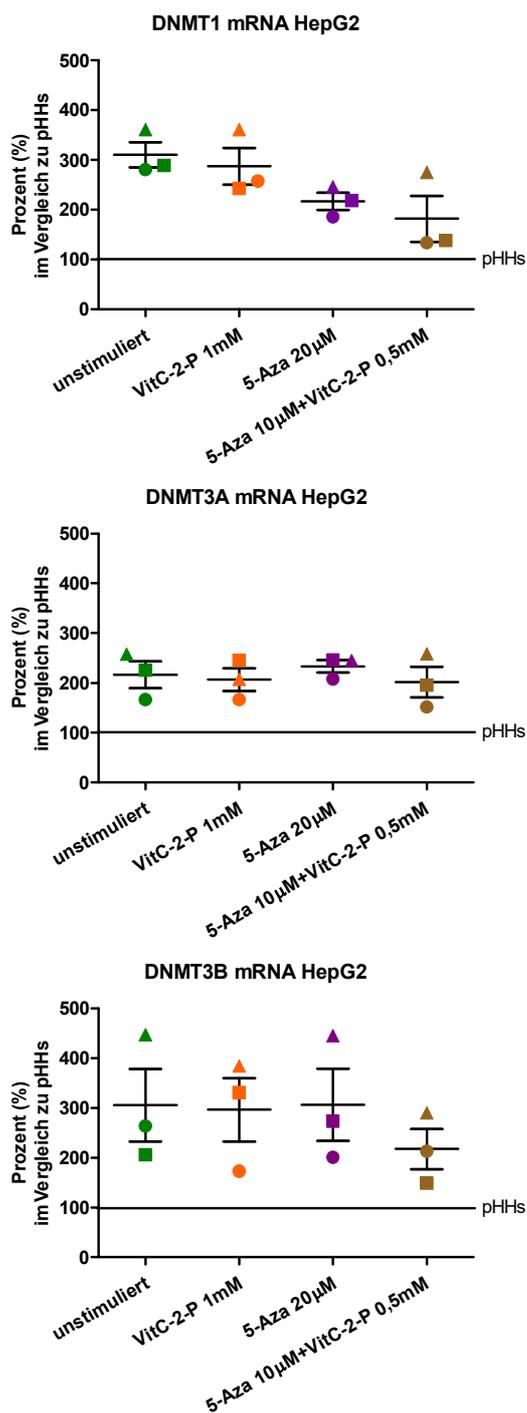


Abbildung 10 Gehalt an mRNA für DNMT1, 3A und 3B in HepG2 Zellen. Angabe in Prozent im Vergleich zu pHHs nach 48h Stimulation, Darstellung der verschiedenen Zellpassagen (Kreis=p5, Quadrat=p9, Dreieck=p12) mit MW und SEM für die verschiedenen Stimulationsansätze (N=3, n=1→Sammelprobe der Triplikate)

Zellen exprimiert wurde. Im Gegensatz zur qRT-PCR zeigte die semiquantitative PCR für DNMT3A eine zweifache und für DNMT3B und

In der Zelllinie HepG2 zeigte sich hier eine deutliche Überexpression von allen drei getesteten DNA-Methyltransferasen. DNMT1-Expression war in etwa 3fach (310 %) erhöht, aber eine Tendenz zur Verminderung des mRNA-Gehalts bei behandelten Zellen war zu erkennen. Stimulation mit Aza10+VitC0,5 erreichte mit mittleren 182 % im Vergleich zu pHHs die niedrigsten Werte. Für die DNMT3A ließ sich in der semiquantitativen PCR kein Einfluss durch Stimulation entdecken. Sie schwankte zwischen durchschnittlichen 202-233 % der Expression von pHHs. DNMT3B, ebenfalls dreimal häufiger in HepG2 Zellen als in pHHs exprimiert, zeigte eine diskrete Verminderung der Transkription nach Aza10+VitC0,5-Behandlung. Betrachtete man die einzelnen Zellpassagen getrennt, schien es so, als ob mit höheren Passagen auch mehr mRNA für die Methyltransferasen in den Zellen exprimiert wurde. Im Vergleich zum Array von Qiagen zeigte sich ein ähnliches Verteilungsmuster, wobei DNMT3A am wenigsten in HepG2

DNMT1 eine in etwa dreifache Erhöhung der Genexpression als in pHs. Durch keine der Stimulationen konnte eine normwertige Transkription

wiederhergestellt werden.

Huh7 Zellen zeigten keinen eindeutigen Einfluss der Zellstimulation auf die Transkription der DNMT1. Diese wurde konstant mehr als dreimal so häufig als in pHs exprimiert. Allerdings zeigte sich bei der Betrachtung der Zellpassagen einzeln in zwei von drei eine verminderte Transkription unter Aza20. Ebenso verhielten sich Huh7 Zellen im Hinblick auf DNMT3B, daher auch der etwas größere Standardfehler unter Aza20-Stimulation. Interessanterweise war bei beiden Enzymen die niedrigste Zellpassage diejenige, die aus dem Muster fiel. Für die Transkription der DNMT3A stellte sich, sowohl im Durchschnitt als auch in den Passagen einzeln betrachtet, sogar eine Neigung zur Erhöhung der Transkription nach Stimulation dar. Der Vergleich mit der qRT-PCR zeigte die gleiche quantitative Verteilung der DNA-Methyltransferasen, wobei DNMT3B mit Abstand am meisten überexprimiert wurde, nahezu 24fach

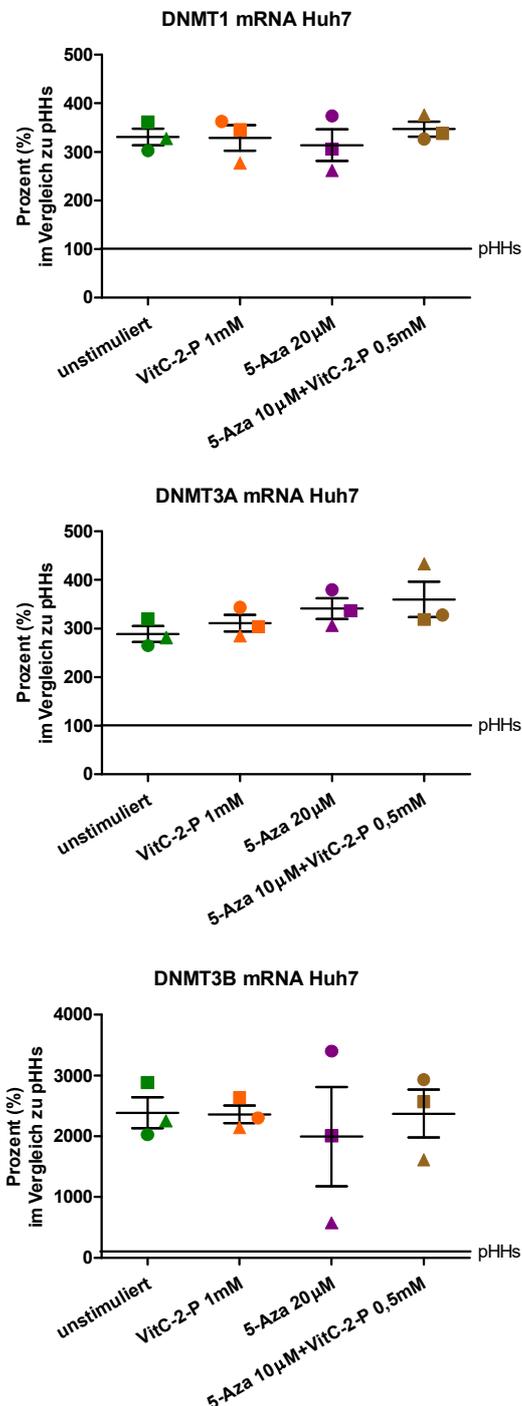


Abbildung 11 Gehalt an mRNA für DNMT1, 3A und 3B in Huh7 Zellen. Angabe in Prozent im Vergleich zu pHs nach 48 h Stimulation, Darstellung der verschiedenen Zellpassagen (Kreis=p4, Quadrat=p6, Dreieck=p8) mit MW und SEM für die verschiedenen Stimulationsansätze (N=3, n=1→Sammelprobe der Triplikate)

im Vergleich zu pHs. Durch die durchgeführte epigenetische Modifikation konnte keine annähernd normwertige Transkription der Methyltransferasen erreicht werden. Der Gehalt an mRNA in Huh7 Zellen zeigte mit zunehmender

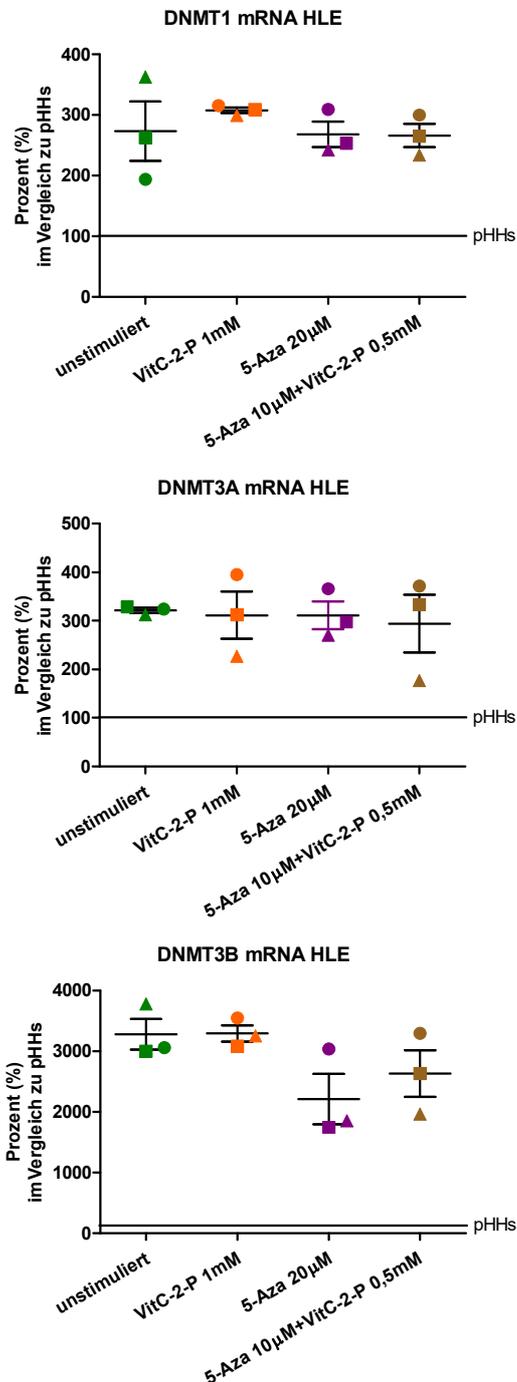


Abbildung 12 Gehalt an mRNA für DNMT1, 3A und 3B in HLE Zellen. Angabe in Prozent im Vergleich zu pHHs nach 48h Stimulation, Darstellung der verschiedenen Zellpassagen (Kreis=p4, Quadrat=p6, Dreieck=p9) mit MW und SEM für die verschiedenen Stimulationsansätze (N=3, n=1→Sammelprobe der Triplikate)

Passage keine Zu- oder Abnahme für alle Transferasen.

In der semiquantitativen PCR zeigten HLE Zellen zunächst nur eine Tendenz zur Transkriptionsverminderung von DNMT3B durch Aza20-Behandlung. Die einzelnen Zellpassagen getrennt betrachtet, wich vor allem die niedrigste Passage von den, in den anderen beiden Passagen beobachteten, Wirkungen der Stimulationen auf die Expression der DNA-Methyltransferasen ab. In zwei der drei Versuche führte Aza20-Stimulation zu einer Verminderung der mRNA für alle drei Transferasen, wohingegen in der niedrigsten Passage sogar das Gegenteil zu vermerken war. Eine Behandlung mit Vitamin C-2-Phosphat alleine oder in Kombination mit Azacytidin führte ebenfalls zu inkonstanten Ergebnissen bei allen DNA-Methyltransferasen. In der höchsten Zellpassage erniedrigten alle drei Stimulationsansätze die Transkription aller DNA-Methyltransferasen. Von der mengenmäßigen Verteilung der

Genexpressionen wurde auch hier das deutliche Vorherrschen der DNMT3B in HLE Zellen postuliert (33fache Erhöhung im Vergleich zu pHHs). Des Weiteren

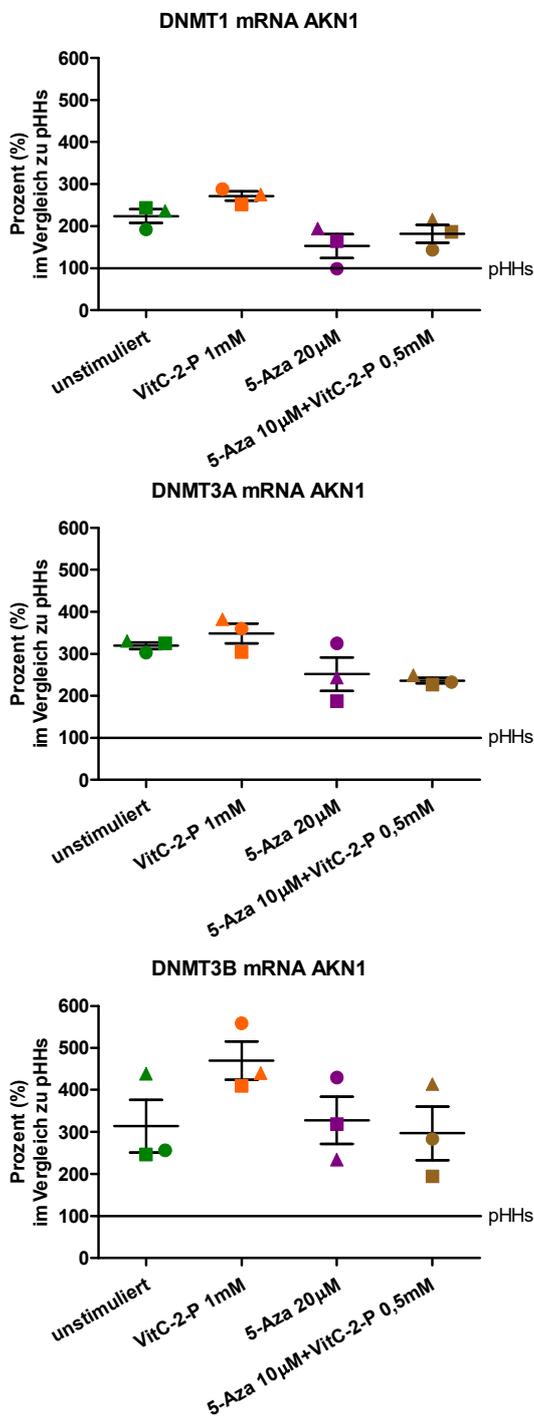


Abbildung 13 Gehalt an mRNA für DNMT1, 3A und 3B in AKN1 Zellen. Angabe in Prozent im Vergleich zu pHHs nach 48 h Stimulation, Darstellung der verschiedenen Zellpassagen (Kreis=p3, Quadrat=p8, Dreieck=p10) mit MW und SEM für die verschiedenen Stimulationsansätze (N=3, n=1→Sammelprobe der Triplikate)

zeigte sich mit Zunahme der Zellpassagen eine quantitative Zunahme an mRNA für DNMT1, jedoch nicht für die anderen zwei Transferasen. Es konnte durch Stimulation keine mit pHHs vergleichbare Transkription erreicht werden.

In der semiquantitativen PCR zeigte die Zelllinie AKN1 im Hinblick auf DNMT1-Expression eine diskrete Senkung der Transkription durch Stimulation mit Aza20 von mittleren 224 % auf 153 % von pHHs.

Geringer war dieser Effekt unter Kombinationsstimulation ausgeprägt. Wohingegen Vitamin C alleine zu einer Zunahme der Überexpression führte. Diese Auswirkungen zeigten sich in allen Zellpassagen. Die Transkription der DNMT3A wurde am meisten durch die Kombination aus Vitamin C und Azacytidin supprimiert, wohingegen die alleinige Stimulation durch Aza20 nur in zwei von drei getesteten Zellpassagen diese gewünschte Wirkung zeigte. Auch hier handelte es sich um die

niedrigste Zellpassage, in der kontroverse Ergebnisse zustande kamen. Die Wirkung der Stimulation mit VitC1 auf DNMT3A und 3B ließ sich nicht konsequent ableiten, denn eine Erhöhung zeigte sich jeweils nur in zwei von drei Zellpassagen. Die Transkription der DNMT3B zeigte eine geringe Neigung zu Suppression mittels Kombinationsstimulation und umgekehrt dazu eine minimale Erhöhung unter Aza20. Allerdings waren diese Phänomene auch hier in den Passagen inkongruent (jeweils zwei von drei Passagen). Mengenmäßig zeigten sich in der semiquantitativen PCR im Gegensatz zur qRT-PCR die DNA-Methyltransferasen in AKN1 Zellen nahezu gleichmäßig (2-3fach) erhöht. Gleichermaßen zeigte sich keine eindeutige Zu- oder Abnahme der mRNA-Menge durch die verschiedenen Zellpassagen hindurch und es konnte durch Stimulation keine normwertige Genexpression erreicht werden.

3.2. Mikroskopie

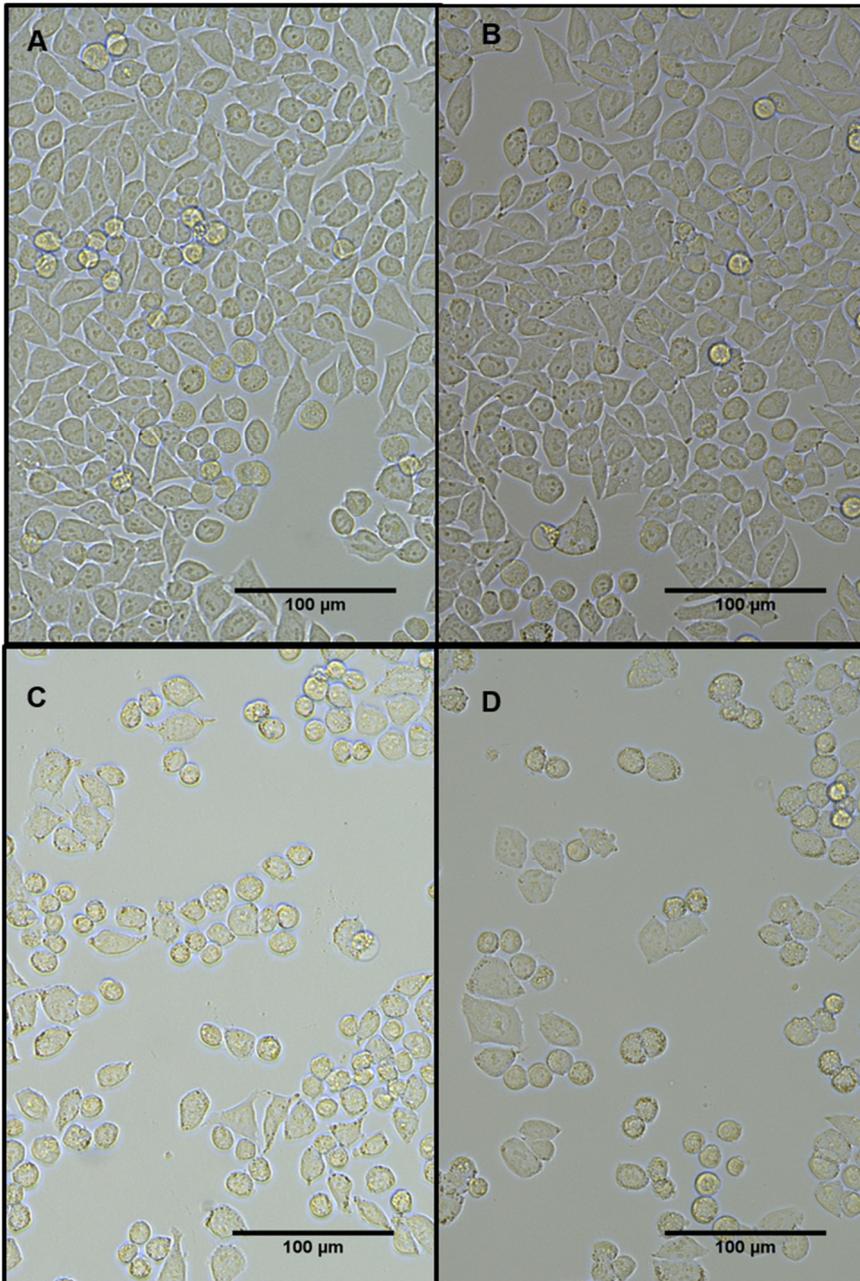


Abbildung 14 HepG2 Zellen nach 48 Stunden Stimulation
A= unstimuliert, B= Vitamin C-2-Phosphat 1 mM, C= 5-Azacytidin 20 µM,
D= 5-Azacytidin 10 µM und Vitamin C-2-Phosphat 0,5 mM
(Fluoreszenzmikroskop EVOS)

Die Zelllinie HepG2 zeigte nach Stimulation mit Vitamin C keine mikroskopischen Auffälligkeiten. Jedoch nach Inkubation mit 20 µM Azacytidin und auch mit Azacytidin in niedrigerer Dosis in Kombination mit Vitamin C zeigte sich eine deutliche Reduktion der vitalen Zellen, wobei die angewachsenen Zellen teilweise größer erschienen.

Außerdem waren viele Zellen

abgerundet mit randständigen Vakuolen und schlecht abgrenzbarem Zellkern, was ein Zeichen für Zelltod sein konnte.

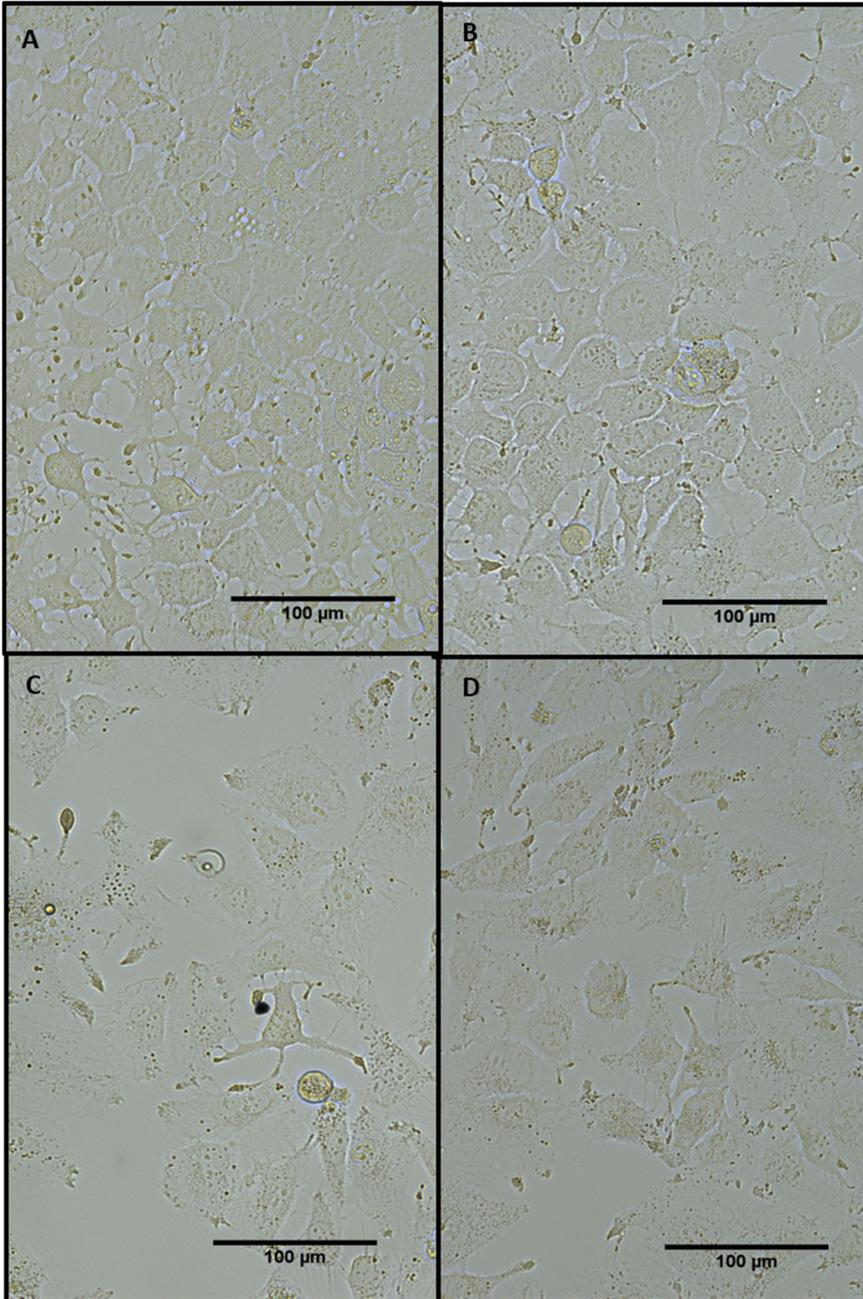


Abbildung 15 Huh7 Zellen nach 48 Stunden Stimulation
A= unstimuliert, B= Vitamin C-2-Phosphat 1 mM, C= 5-Azacytidin 20 µM,
D= 5-Azacytidin 10 µM und Vitamin C-2-Phosphat 0,5 mM
 (Fluoreszenzmikroskop EVOS)

Huh7 Zellen zeigten analog zu HepG2 Zellen ebenfalls eine verminderte Zellzahl unter der Stimulation mit Azacytidin (siehe C und D). Bei den verbliebenen Zellen zeigten sich sehr viele, kaum sichtbare, feine Zellfortsätze, welche im Vergleich zu nicht stimulierten bzw. nur mit Vitamin C behandelten Zellen vermehrt wirkten. Unter Umständen war das ein Versuch

der verbliebenen Zellen erneut Zellkontakte herzustellen. Huh7 Zellen schienen sich unter Azacytidin flächenmäßig größer auszubreiten, denn unter dem Mikroskop waren die Zellgrenzen nicht so deutlich darstellbar wie unter der alleinigen Stimulation mit Vitamin C-2-Phosphat oder wie in unbehandelten Zellen.

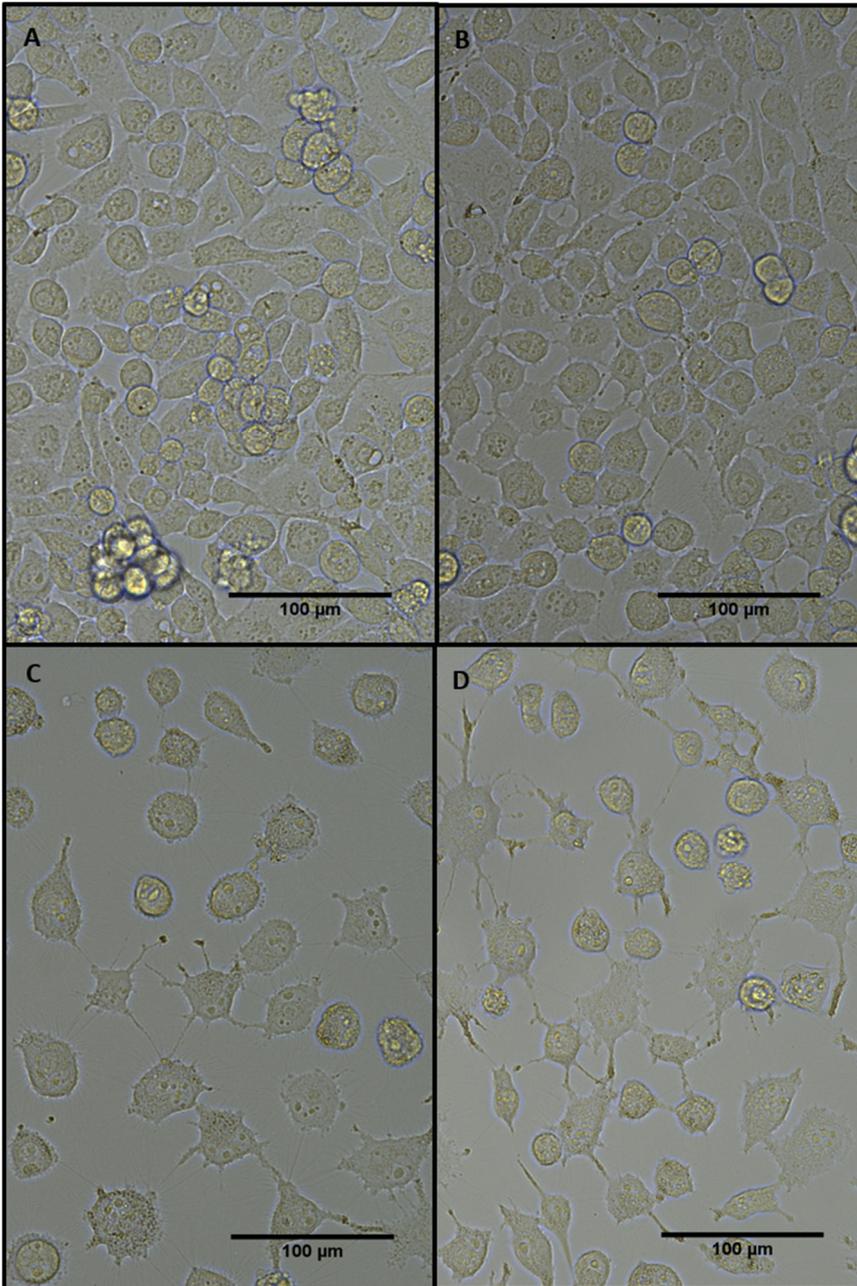


Abbildung 16 HLE Zellen nach 48 Stunden Stimulation
A= unstimuliert, **B=** Vitamin C-2-Phosphat 1 mM, **C=** 5-Azacytidin 20 µM,
D= 5-Azacytidin 10 µM und Vitamin C-2-Phosphat 0,5mM
 (Fluoreszenzmikroskop EVOS)

Die Zelllinie HLE zeigte ähnliche morphologische Auffälligkeiten wie die anderen Zelllinien. Das Wachstum der Zellen war unter Vitamin C-2-Phosphat alleine optisch nahezu identisch wie unbehandelt. Erst mit der Zugabe von Azacytidin zeigte sich eine deutlich geringere Anzahl und flächenmäßig größere Zellen mit weiten Zellfortsätzen, um Zellkontakte zu halten.

Besonders unter

Azacytidin alleine waren an einigen Membranen runde Strukturen zu erkennen, welche ein Zeichen für Apoptose sein konnten.

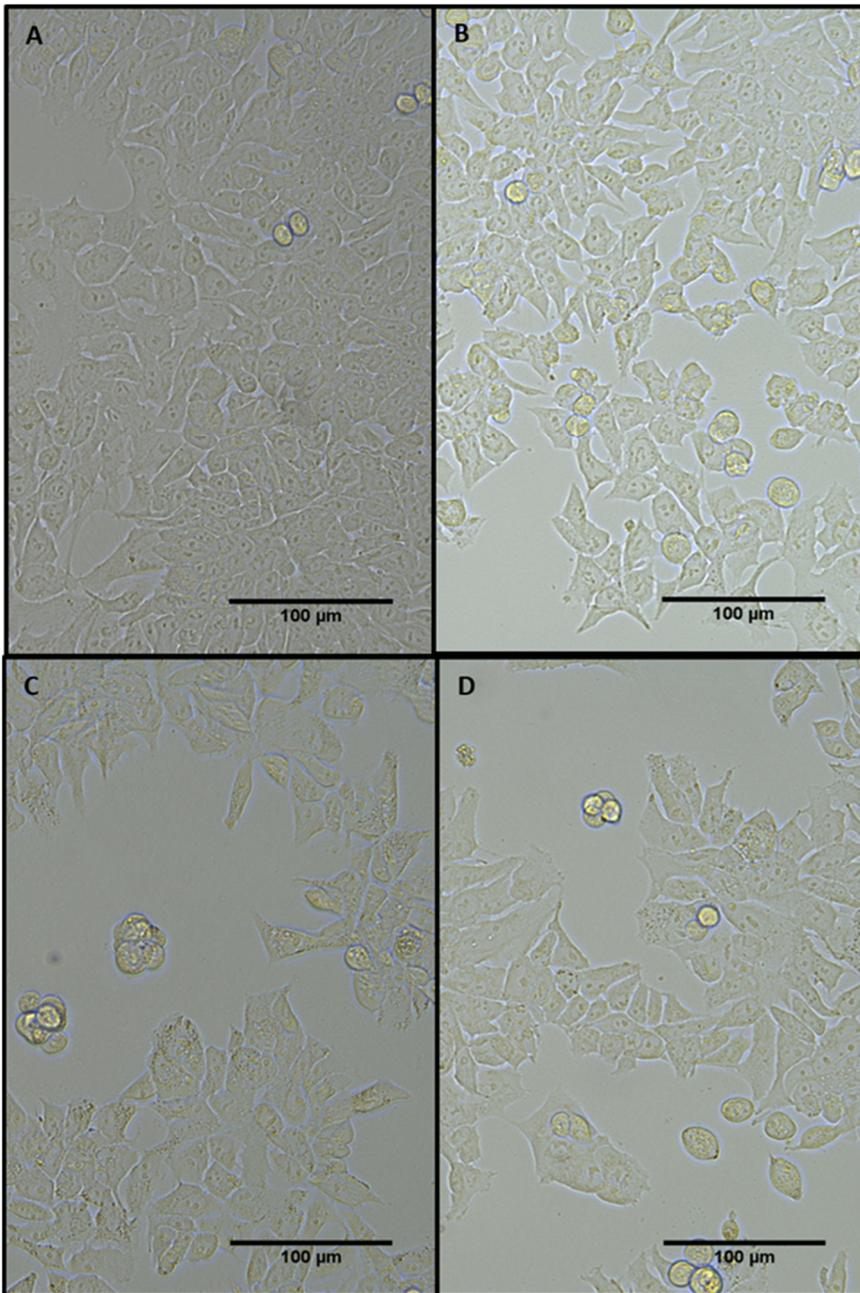


Abbildung 17 AKN1 Zellen nach 48 Stunden Stimulation
A= unstimuliert, **B=** Vitamin C-2-Phosphat 1 mM, **C=** 5-Azacytidin 20 μ M,
D= 5-Azacytidin 10 μ M und Vitamin C-2-Phosphat 0,5 mM
 (Fluoreszenzmikroskop EVOS)

Zellgrenzen schwer bis gar nicht abgrenzbar waren.

AKN1 Zellen zeigten analog zu den anderen Zelllinien unter alleiniger Inkubation mit Vitamin C-2-Phosphat geringe mikroskopische Auffälligkeiten. Unter den anderen beiden Stimulationen hingegen zeigte sich wieder eine verminderte Zellanzahl im Vergleich mit in etwa gleich großen Zellen. Die vitalen Zellen bildeten weiterhin kleine Zellverbände, in welchen die

3.3. Resazurinkonversion

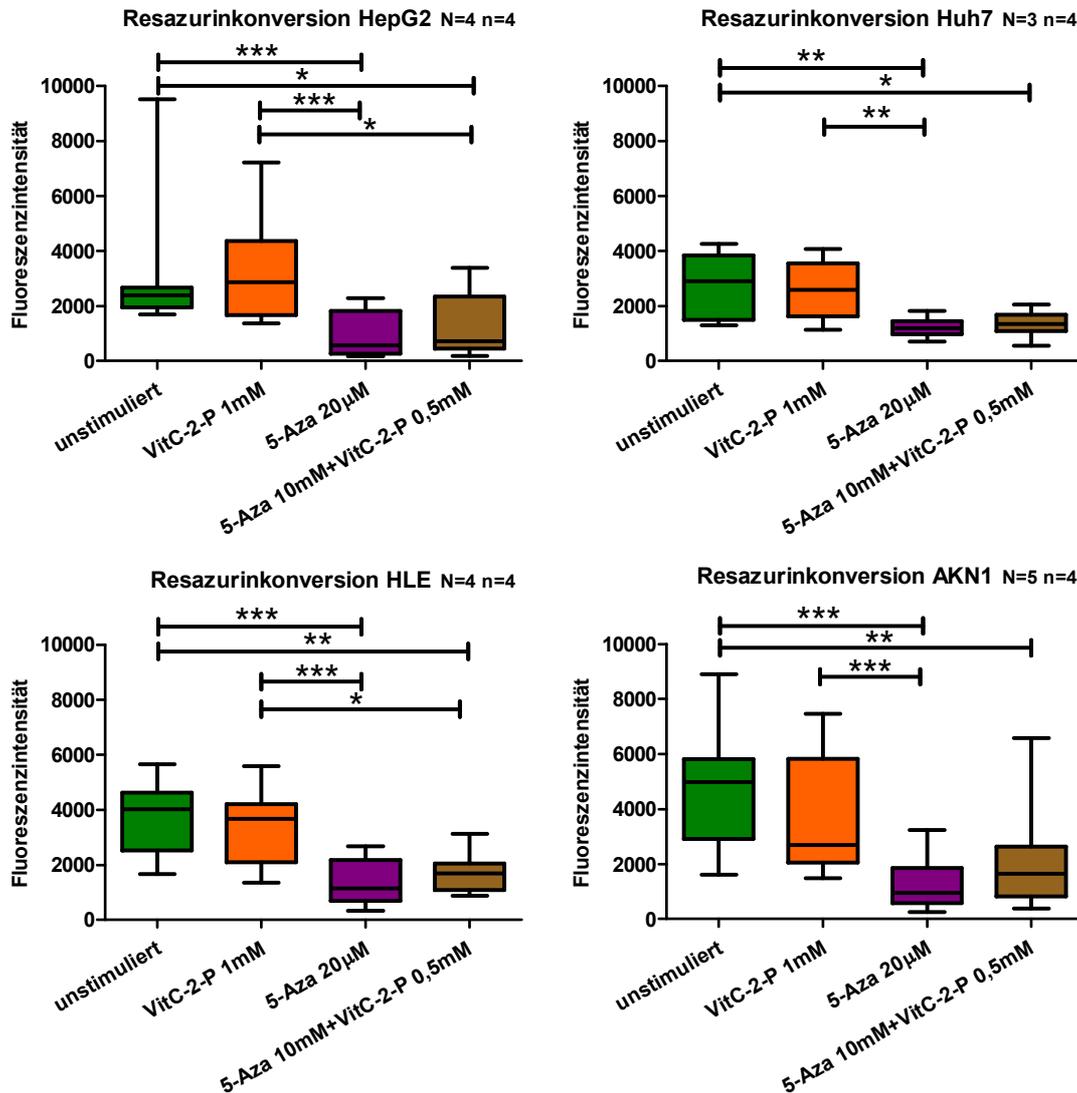


Abbildung 18 Resazurinkonversion in allen Zelllinien.

Oben links HepG2 Zellen, oben rechts Huh7 Zellen, unten links HLE Zellen, unten rechts AKN1 Zellen; Angabe der Fluoreszenzintensität für alle Stimulationsansätze nach 48 h Stimulation mit 25./75. Perzentile, Median, Minimum und Maximum, Kreuz=MW

HepG2 und Huh7 Zellen zeigten für unstimulierte sowie mit VitC1 stimulierte Zellen im Durchschnitt die nahezu gleiche Kapazität Resazurin in Resorufin umzuwandeln. HLE und AKN1 Zellen zeigten eine etwas verminderte Resazurinkonversion unter VitC1, allerdings keine statistisch relevanten Unterschiede. In allen Zelllinien zeigte sich, dass die Stimulation mit Azacytidin 20 µM am meisten die Resazurinkonversion beeinträchtigte. Dieser Effekt zeigte sich für alle Zelllinien auch für die kombinierte Stimulation mit Aza10+VitC0,5, allerdings etwas weniger ausgeprägt und dennoch auch statistisch signifikant.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass alle Zelllinien bezüglich der Resazurinkonversion und den Stimulationsansätzen sich im Muster ähnlich verhalten. Die Ergebnisse sind mit den mikroskopisch beobachteten Resultaten gut vereinbar: Verminderte Zellproliferation und damit verminderte Zellanzahl nach Aza20- und Aza10+VitC0,5-Stimulation sowie verminderte mitochondriale Aktivität im Vergleich zu unbehandelten und mit VitC1 behandelten Zellen.

3.4. LDH-Freisetzung

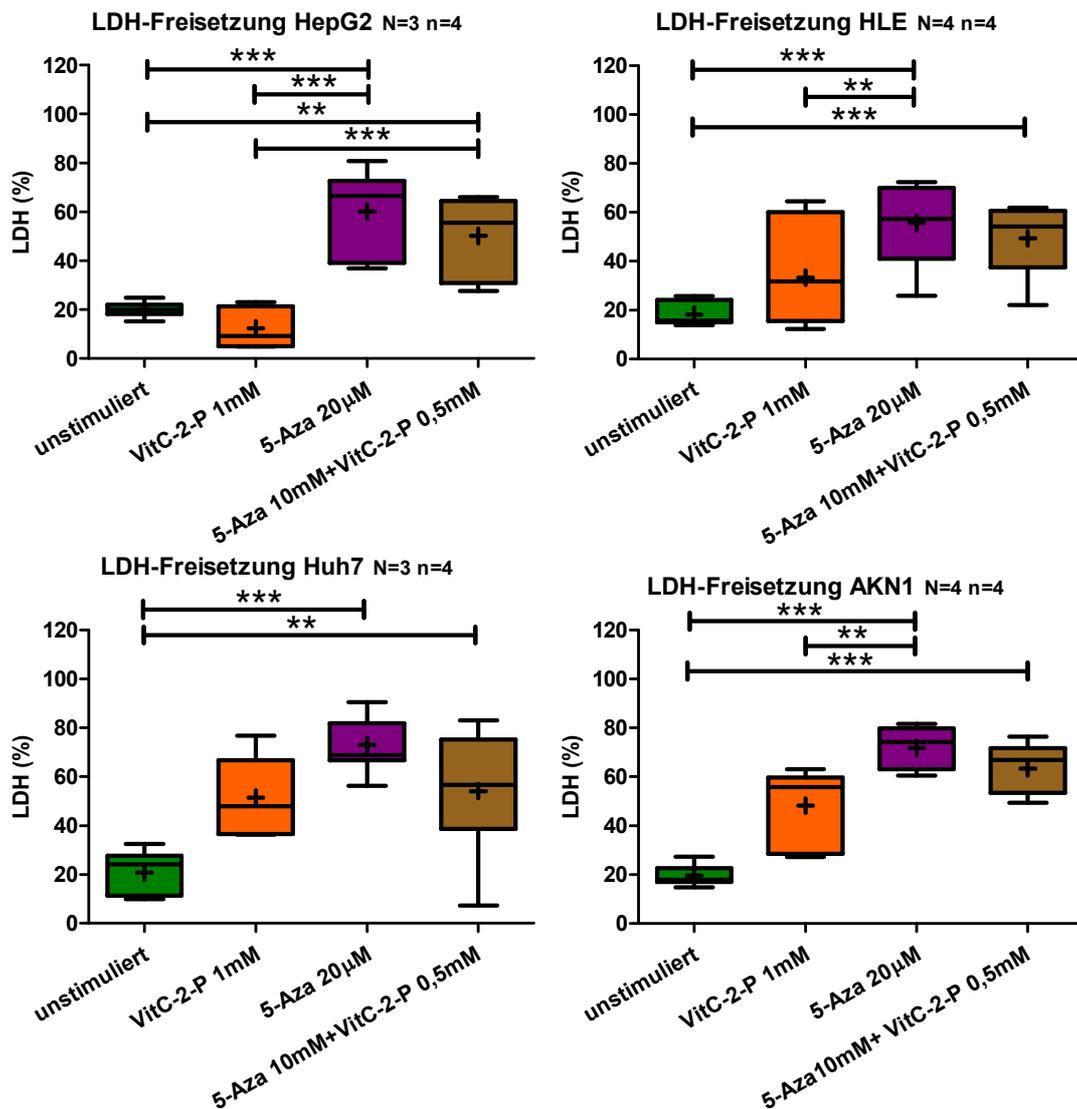


Abbildung 19 LDH-Freisetzung in allen Zelllinien.

Oben links HepG2 Zellen, oben rechts Huh7 Zellen, unten links HLE Zellen; Angabe in Prozent im Vergleich zur maximalen LDH-Freisetzung nach 48 h Stimulation für alle Stimulationsansätze mit 25./75.Perzentile, Median, Minimum und Maximum, Kreuz=MW

Das Verteilungsmuster der LDH-Freisetzung passte zu dem der Resazurinkonversion. Die niedrigsten LDH-Werte wurden in unbehandelten

Zellen gemessen. Es war zu bemerken, dass in allen Zelllinien die LDH Freisetzung selbst in unbehandelten Zellen bereits bei durchschnittlichen 20 % lag. Ausnahme war hier die Zelllinie HepG2 mit einer geringeren LDH-Ausschüttung unter VitC1-Einfluss (circa 12 %). In den anderen drei Zelllinien schien es eine höhere Ausschüttung von LDH unter VitC1 (im Durchschnitt HLE Zellen 33 %, AKN1 Zellen 48 % und Huh7 Zellen 51 %) zu geben. In allen Zelllinien waren die Unterschiede zwischen unstimulierten und mit VitC1 stimulierten Zellen statistisch nicht signifikant. Wohingegen signifikante Unterschiede unter der Simulation mit Aza20 zu unstimulierten bzw. mit VitC1 behandelten Zellen in allen Linien bestanden (Ausnahme bei letzterem in Huh7 Zellen). Die Konzentrationen an LDH unter Aza20 erreichten im Mittel zwischen 56 % (HLE Zellen) bis 73 % (Huh7 Zellen). Eine bedeutende Erhöhung der LDH-Konzentration war auch für eine Stimulation mit Aza10+VitC0,5 in allen Zelllinien zu vermerken (von durchschnittlich 49 % in HLE Zellen bis 63 % in AKN1 Zellen), wobei nur bei HepG2 Zellen auch Signifikanz im Vergleich zur VitC1-Stimulation bestand.

3.5. Phase I- und II-Enzyme

3.5.1. HepG2 Zellen

Die Zelllinie HepG2 zeigte für CYP1A1/2 (7-HC-Produktion), CYP3A4 und CYP2E1 (HFC- Produktion) keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Aktivität. Betrachtete man die einzelnen Versuche in den verschiedenen Zellpassagen mit ihren Triplikaten, fiel auf, dass oftmals nicht alle Replikate eines Stimulationsansatzes messbare Fluoreszenzunterschiede aufwiesen. Die Ergebnisse waren somit nicht regelhaft reproduzierbar, weder innerhalb der verschiedenen Passagen noch zwischen den verschiedenen Zellpassagen. Insbesondere unter Azacytidin kamen Ausreißer vor, welche den Mittelwert empfindlich beeinflussen konnten. Dies wurde anhand der Streudiagramme für CYP1A1/2, CYP3A4 und CYP2E1, bei denen lediglich maximal zwei positive Messwerte von insgesamt neun Replikaten einen deutlich über Null liegenden Mittelwert auslösten, deutlich. Daher konnte bei diesen Bedingungen auch kein statistischer Unterschied festgestellt werden.

Für die Aktivität von CYP2C9 (Fluorescein-Produktion) hingegen waren wiederholbare Ergebnisse zu messen. Es konnte eine signifikante Erhöhung der Enzymaktivität durch Stimulation mit Aza20 und auch Aza10+VitC0,5 erzielt werden, wobei die Aktivität mit Aza20 sogar deutlich über den durchschnittlichen primären Hepatozyten stieg.

Die Aktivität der GST (Fluoreszenzanstieg) schien mit Aza20 am meisten zu steigen, wobei dies ebenfalls nur in zwei von drei Zellpassagen nachweisbar war und in der dritten Passage sogar keine Aktivität gemessen wurde.

Die Aktivität der UGT (4-MU-Abbau) schien mit Behandlung durch VitC1, Aza20 und Aza10+VitC0,5 zu steigen, jedoch zeigten sich auch hier in der höchsten gemessenen Zellpassage im Gegensatz zu den beiden anderen Passagen kontroverse Ergebnisse.

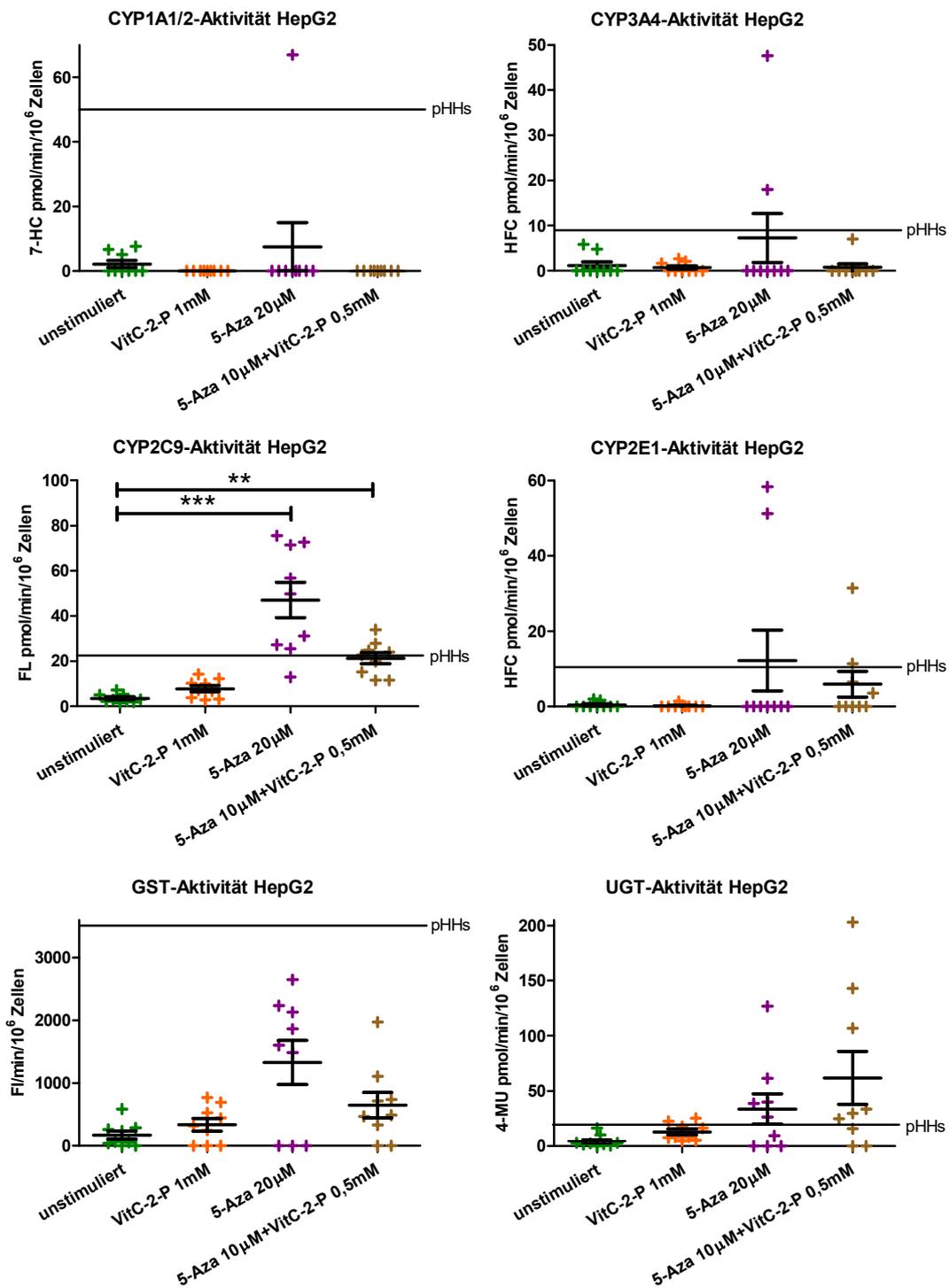


Abbildung 20 Substanzumsetzung der Phase I/III-Enzyme in HepG2 Zellen.

Angabe in pmol/min pro 10⁶ Zellen (Ausnahme: GST-Aktivität in Fluoreszenzintensität/min pro 10⁶ Zellen) für alle Stimulationsansätze nach 48 h Stimulation, Kreuz= ein Replikat, keine Aufteilung nach Zellpassagen, Angabe von MW und SEM (schwarz), (N=3, n=3)

Betrachtete man die Ergebnisse der semiquantitativen PCR zeigten HepG2 Zellen für CYP1A1 ungefähr ein Viertel der normalen Expression von primären Hepatozyten. Eine Zunahme der Expression mit VitC1, Aza20 und Aza10+VitC0,5 konnte gemessen werden, wobei maximal durchschnittlich 44,1 % der Expression von pHHs mit der Kombinationsstimulation erreicht wurden. CYP1A2 hingegen schien nur sehr gering exprimiert (circa 0,5 % im Vergleich zu pHHs). Die Expression konnte durch Aza20 bis auf maximal 1,6 % der Expression von pHHs gesteigert werden. Auch CYP2C9 wurde in HepG2 nur zu 0,8 % im Vergleich exprimiert. Unter Aza20 konnte mehr als eine Vervierfachung der Transkription auf 2,7 % hergestellt werden. Trotz alledem war, wie bereits beschrieben, in der fluorometrischen Aktivitätsmessung selbst für unbehandelte Zellen eine deutliche Enzymaktivität für CYP2C9 bzw. Fluorescein-Produktion messbar gewesen. Die Menge an mRNA für CYP2E1 konnte durch Aza20 von 3,9 % auf 8,3 % und mithilfe der Kombination aus Aza10+VitC0,5 bis auf 7,0 % von pHHs gesteigert werden. Trotzdem konnte die Enzymaktivität nicht zuverlässig in jedem Replikat nachgewiesen werden. In keiner der gemessenen Zellpassagen im unbehandelten Zustand war die Transkription von CYP3A4 in HepG2 Zellen nachweisbar. Die Expression von CYP3A4 zeigte durch Aza20 eine geringe Zunahme auf 1,1 % im Vergleich zu pHHs. Teilweise zeigten sich auf dem Elektrophoresegel insbesondere nach Aza20-Stimulation multiple Banden. CYP3A7 war in HepG2 etwas mehr vorhanden (13,1 % von pHHs). Aza20 und Aza10+VitC0,5 führten zu einer Transkriptionsminderung. GSTA1-Expression konnte in unstimulierten Zellen nicht nachgewiesen werden, allerdings konnte durch Azacytidin alleine als auch mit Kombination mit Vitamin C eine niedrige Expression nachgewiesen werden (durchschnittlich 1,3 % von pHHs nach Aza20-Stimulation). Wie beschrieben, zeigte die Aktivitätsmessung der GST aber schon in unstimulierten Zellen eine geringe Veränderung der Fluoreszenz. UGT1A6 war zu 3,8 % im Vergleich zu pHHs in HepG2 Zellen exprimiert. Es wurde eine Steigerung der Transkription durch VitC1 und Aza20 (mit Aza20 auf 12,5 % von pHHs) hingegen nicht durch die Kombination beider Substanzen erreicht. Auch dies war mit der Aktivitätsmessung mittels 4-MU-Verstoffwechslung nicht deckungsgleich.

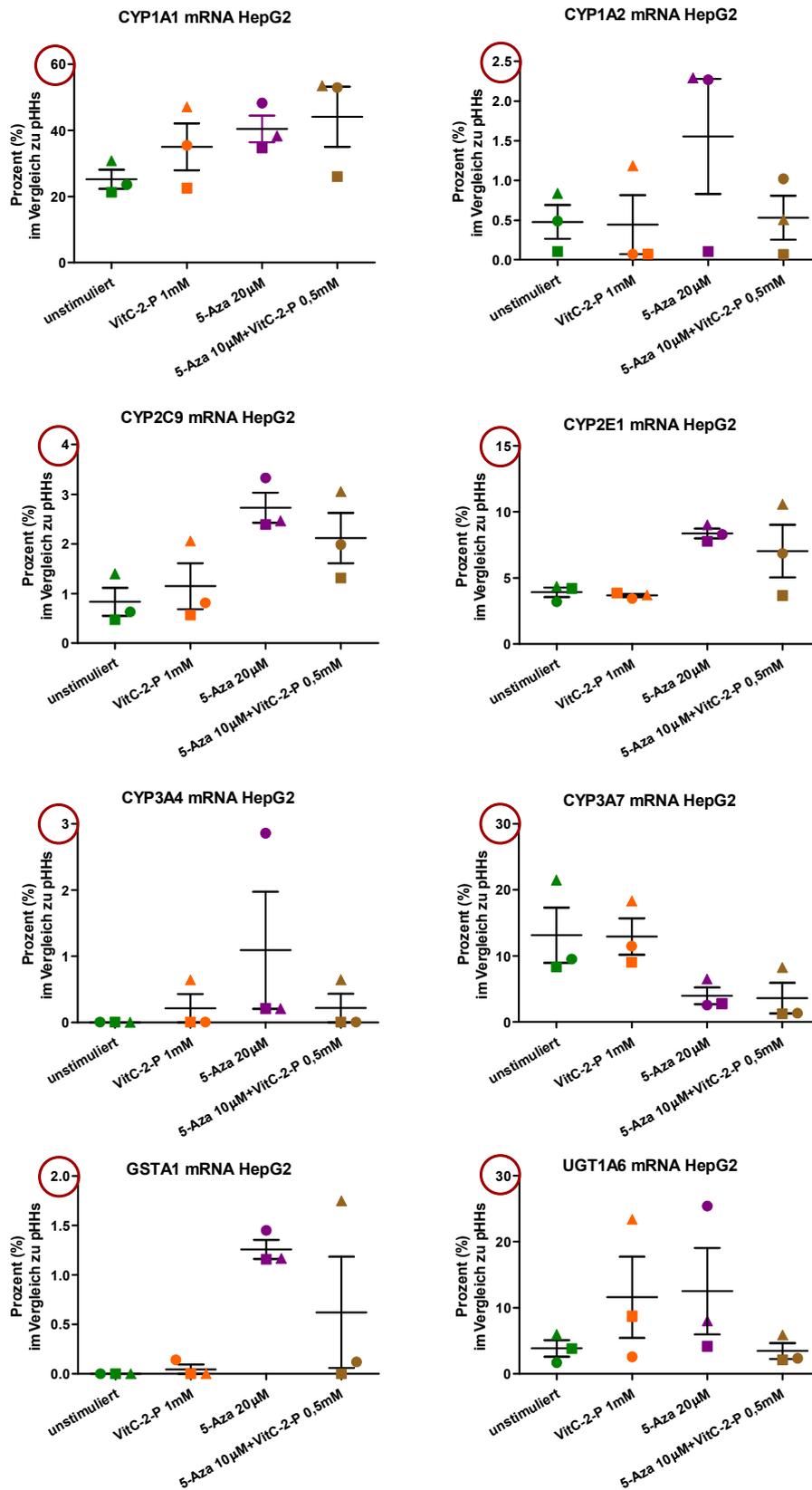


Abbildung 21 semiquantitative PCR für Phase I/II-Enzyme in HepG2 Zellen. Darstellung in Prozent im Vergleich zu pHs nach 48 h Stimulation für alle Stimulationsansätze, Darstellung der verschiedenen Zellpassagen (Kreis=p5, Quadrat=p9, Dreieck=p12) mit MW und SEM für die verschiedenen Stimulationsansätze, (N=3, n=1→Sammelprobe der Triplikate)

3.5.2. Huh7 Zellen

In der Zelllinie Huh7 zeigte sich ein Anstieg des Mittelwerts der CYP1A1/2-Aktivität (7-HC-Produktion) unter Aza20-Stimulation in allen hier betrachteten Zellpassagen, wobei gleichzeitig in einzelnen Replikaten auch Nullwerte gemessen wurden. Mithilfe aller anderen Stimulationen sowie in unstimulierten Zellen war keine Aktivität dieses Enzyms nachweisbar.

CYP3A4 und CYP2E1 (HFC-Produktion) hingegen zeigten keine deutlichen Unterschiede in Bezug auf die Enzymaktivität nach Stimulation. Es zeigten sich deutliche Variationen zwischen den Passagen mit vereinzelt positiven Messwerten und daher ließ sich kein relevantes Muster detektieren.

CYP2E1-Aktivität war nach Stimulation mit Aza10+VitC0,5 nie nachweisbar.

Die Enzymaktivität für CYP2C9 (Fluorescein-Produktion) konnte durch die Behandlung mit Aza20, aber auch mit Aza10+VitC0,5 sogar über die durchschnittlichen Aktivitätslevel primärer Hepatozyten gesteigert werden.

Wobei sich die Aktivität in den beiden niedrigeren Zellpassagen durch die Stimulation deutlich mehr beeinflussen ließ als in der höchsten gemessenen Passage.

GST-Aktivität (Fluoreszenzanstieg) zeigte sich mit Aza20 signifikant gesteigert, wohingegen mit den anderen Behandlungen keine Unterschiede erzielt werden konnten.

Die Aktivität der UGT (4-MU-Abbau) hingegen schien sich durch die Stimulation mit Aza20 zu verschlechtern. Für die Stimulation mit VitC1 und Aza10+VitC0,5 zeigten sich keine einheitlichen Ergebnisse bei teilweise sehr hoher Streuung der Messwerte.

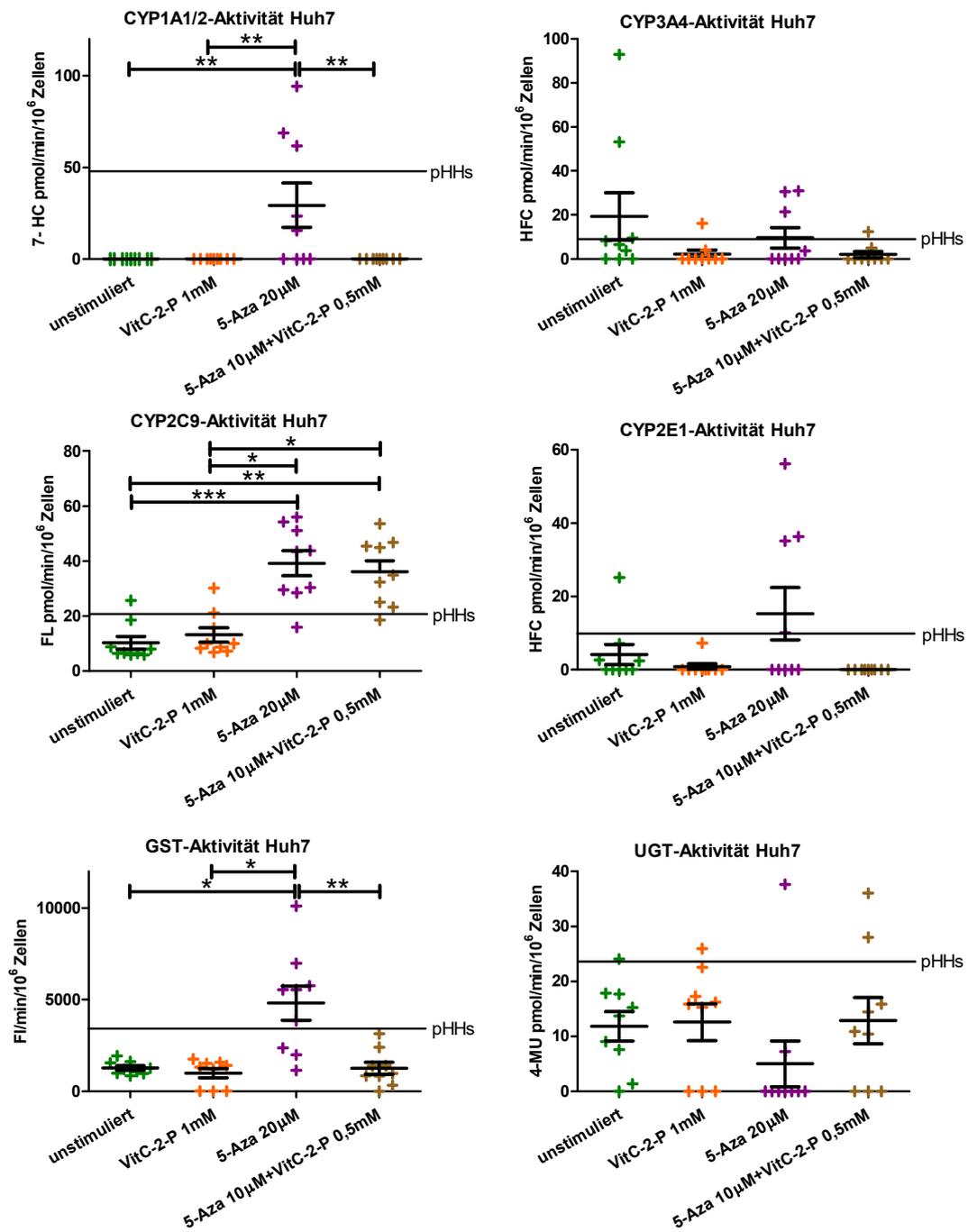


Abbildung 22 Substanzumsetzung der Phase I/II-Enzyme in Huh7 Zellen.

Angabe in pmol/min pro 10⁶ Zellen (Ausnahme: GST-Aktivität in Fluoreszenzintensität/min pro 10⁶ Zellen) für alle Stimulationsansätze nach 48h Stimulation, Kreuz= ein Replikat, keine Aufteilung nach Zellpassagen, Angabe von MW und SEM (schwarz), (N=3, n=3)

Die semiquantitative PCR zeigte, dass CYP1A1 am meisten in Huh7 Zellen transkribiert wird (im Mittel 84,1 % von pHHs). Einen geringen Einfluss im Sinne einer Transkriptionsabnahme zeigten die Behandlungen mit Aza20 und Aza10+VitC0,5, wobei sich dies nur in zwei von drei Zellpassagen zeigte. Die Expression von CYP1A2 war mit durchschnittlich 11,6 % deutlich geringer als in pHHs und wurde mit allen drei Stimulationsansätzen diskret vermindert. CYP2C9-Expression zeigte sich nach allen drei Stimulationen nicht signifikant vermehrt. Allerdings zeigte sich in den höheren Zellpassagen eine Tendenz zur Steigerung nach allen Stimulationen, wobei eine geringe Zunahme von durchschnittlichen 13,2 % unbehandelt auf 21,7 % mit Aza10+VitC0,5 beobachtet werden konnte. Die mittlere mRNA-Menge von CYP2E1 (etwa 17,5 % in Huh7 Zellen im Vergleich zu pHHs) wurde unter der Stimulation mit VitC1 vermindert, wohingegen Aza20 einen leichten Anstieg auf 22,0 % herbeiführte. Die Kombinationsstimulation zeigte ebenfalls einen geringen Transkriptionsanstieg. Sowohl die Transkription von CYP2E1 als auch CYP2C9 erreichten, auch nach Stimulation, nur weniger als ein Viertel der Expression von pHHs. Die Transkription von CYP3A4 war in unbehandelten Huh7 Zellen mit 2,4 % im Vergleich zu pHHs nur in Spuren vorhanden, wohingegen CYP3A7-Expression nahezu 25 % erreichte. Die Transkription beider Cytochrome zeigte sich durch Aza20-Stimulation in allen getesteten Zellpassagen vermindert. CYP3A4 zeigte in zwei von drei Passagen eine Suppression durch Aza10+VitC0,5 und eine Erhöhung durch VitC1, wohingegen CYP3A7 in zwei von drei Passagen für beide Stimulationen eine Verminderung der mRNA zeigte. Alle Veränderungen zeigten sich jedoch statistisch als nicht signifikant, denn die höchste Zellpassage zeigte teilweise ungleiche Ergebnisse. Die Phase II-Enzyme zeigten sich quantitativ näher an pHHs. GSTA1 zeigte mit basalen 42,4 % der normalen hepatozytären Expression keine größeren Veränderungen nach Stimulation. UGT1A1 zeigte eine deutliche Steigerung der Expression durch Aza10+VitC0,5 von durchschnittlichen 24,9 % auf 42,2 % im Vergleich zu pHHs.

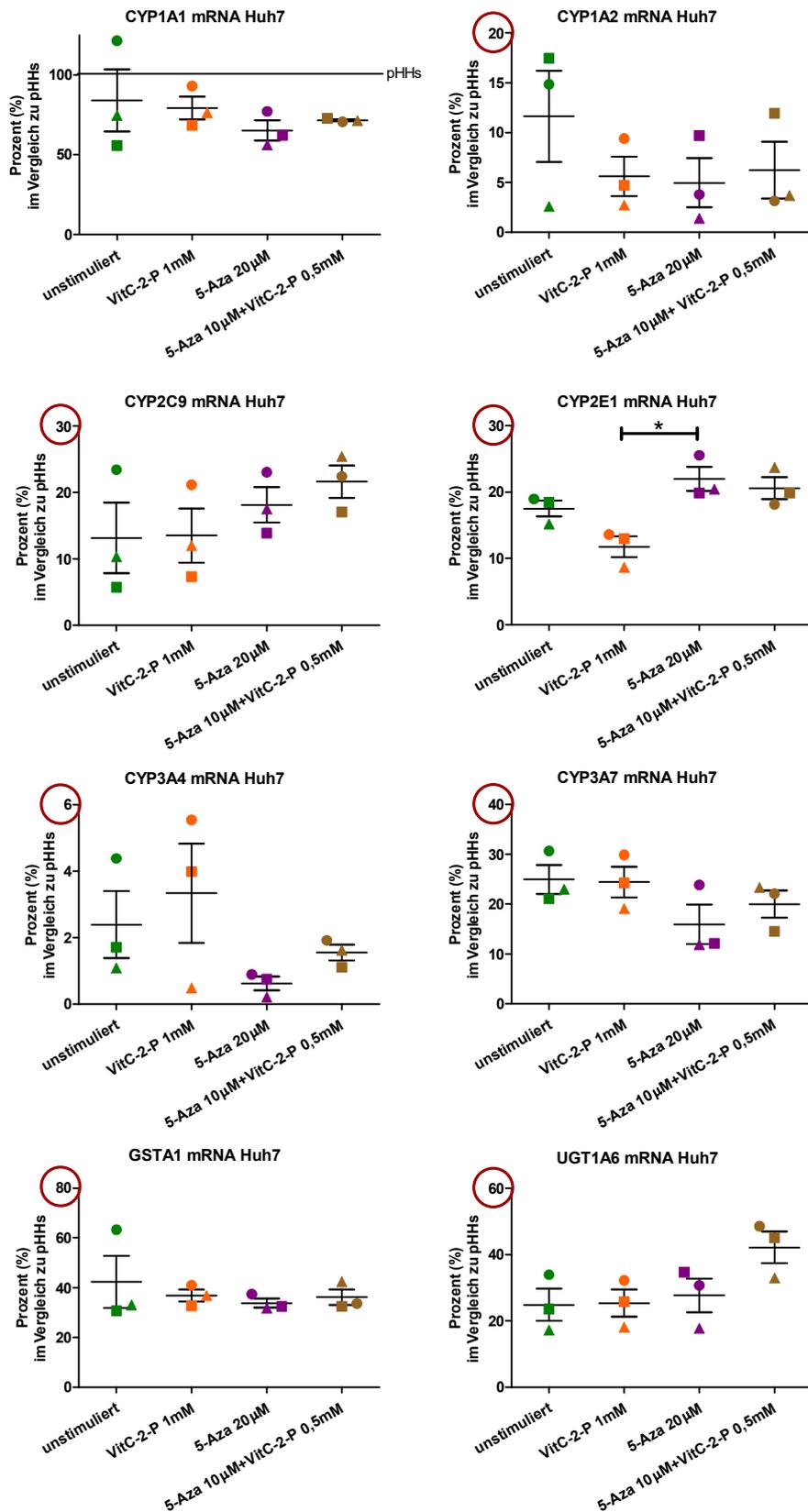


Abbildung 23 semiquantitative PCR für Phase I/II-Enzyme in Huh7 Zellen.

Darstellung in Prozent im Vergleich zu pHHs nach 48 h Stimulation für alle Stimulationsansätze, Darstellung der verschiedenen Zellpassagen (Kreis=p4, Quadrat=p6, Dreieck=p8) mit MW und SEM für die verschiedenen Stimulationsansätze, (N=3, n=1→Sammelprobe der Triplikate)

3.5.3. HLE Zellen

Die Cytochromaktivität von CYP1A1/2 (7-HC-Produktion) in HLE Zellen zeigte einen deutlichen Anstieg des Mittelwerts unter Aza20-Stimulation auf mit pHHs vergleichbare Werte. Unter Einfluss von VitC1 und Aza10+VitC0,5 konnte keine 7-HC-Produktion des Enzyms nachgewiesen werden. Im unstimulierten Zustand zeigte nur die niedrigste Passage in einem Replikat eine geringe Aktivität.

Die CYP3A4-Aktivität und CYP2E1-Aktivität (HFC-Produktion) zeigten sich uneinheitlich in den verschiedenen Passagen mit hoher Streuung bei vereinzelt positiven Messwerten und daher ohne statistische Unterschiede. Ausnahme bildete hier das gänzliche Verschwinden der HFC-Produktion nach VitC1-Stimulation in CYP2E1.

CYP2C9 (Fluorescein-Produktion) zeigte dagegen unter allen drei Stimulationsbedingungen einen Anstieg der durchschnittlichen Aktivität, wobei der größte Effekt mit Aza20 erzielt wurde und sogar über dem durchschnittlichen primären humanen Hepatozyten lag.

Die GST-Aktivität (Fluoreszenzanstieg) stieg nur durch die Stimulation mit Aza20 und blieb aber im Durchschnitt unter dem vorhandenen hepatozytären Vergleichswert.

UGT-Aktivität (4-MU-Abbau) stieg in HLE Zellen mit jeder höheren Zellpassage an. Nach Stimulation mit Aza20 war jedoch keine Enzymaktivität nachweisbar. Mit Aza10+VitC0,5 zeigte sich in zwei der drei Passagen eine deutliche Steigerung der Stoffumwandlung, wohingegen in der mittleren Passage gar keine Aktivität (d.h. eine Aktivitätsminderung) nach gleicher Stimulation nachweisbar war. VitC1-Stimulation zeigte in zwei von drei Passagen einen Abfall des 4-MU-Abbaus.

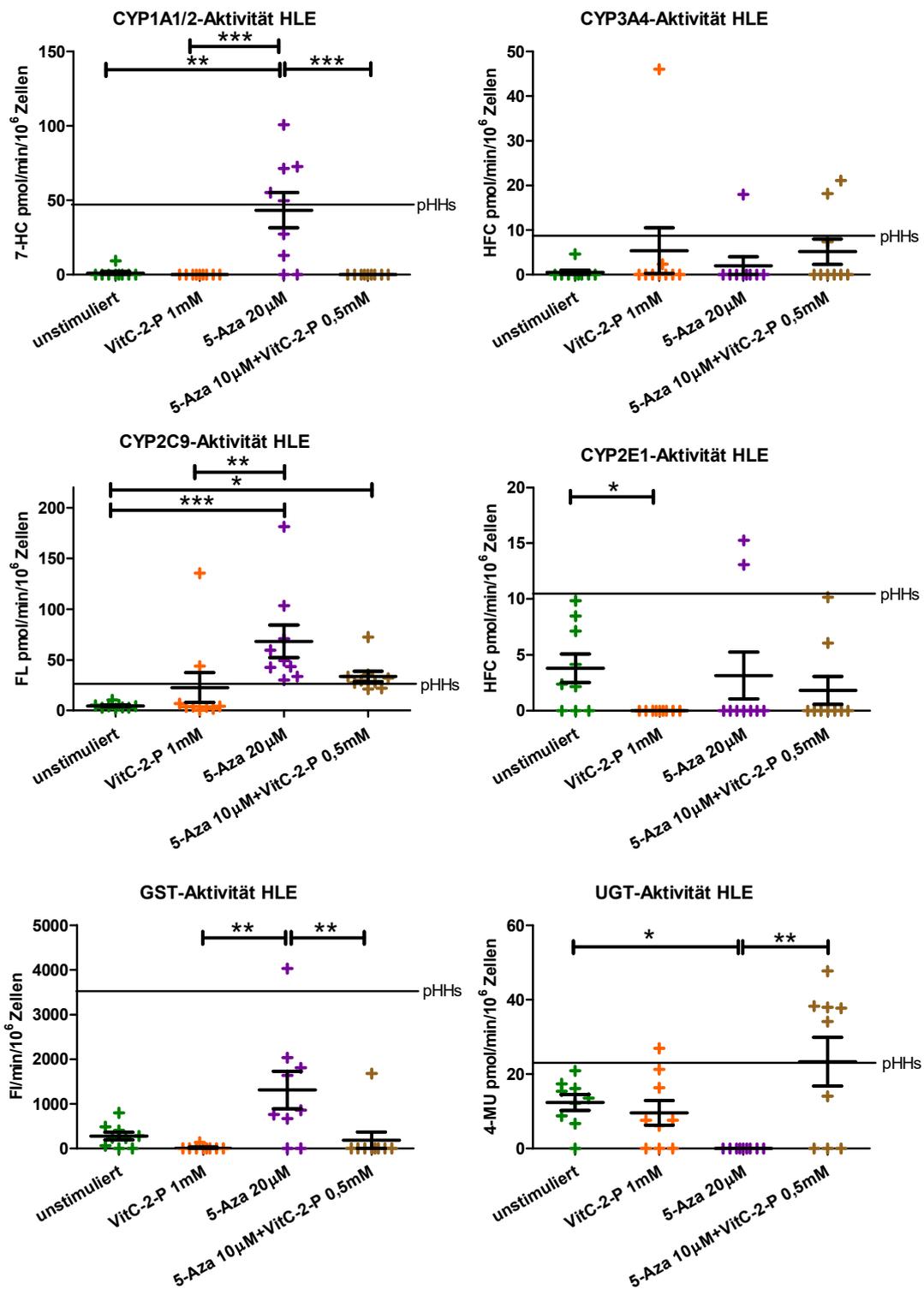


Abbildung 24 Substanzumsetzung der Phase I/II-Enzyme in HLE Zellen. Angabe in pmol/min pro 10⁶ Zellen (Ausnahme: GST-Aktivität in Fluoreszenzintensität/min pro 10⁶ Zellen) für alle Stimulationsansätze nach 48h Stimulation, Kreuz= ein Replikat, keine Aufteilung nach Zellpassagen, Angabe von MW und SEM (schwarz), (N=3, n=3)

In der semiquantitativen PCR wurde CYP1A1 im Vergleich zu pHHs durchschnittlich zu 25,5 % in der Zelllinie HLE exprimiert. Die Versuchsansätze in den beiden niedrigsten Passagen erhöhten nach jeglicher Stimulation die Transkription von CYP1A1, jedoch verhielt sich die höchste Zellpassage genau gegensätzlich und zeigte eine Reduktion des mRNA-Gehalts. Die Genexpression von CYP1A2 wiederum konnte in den beiden niedrigeren Passagen weder nach Stimulation noch unbehandelt in relevanten Mengen (maximal 1,4 % von pHHs) nachgewiesen werden. Wohingegen in der höchsten Zellpassage mRNA für CYP1A2 in geringen Mengen bereits in unbehandelten HLE Zellen nachgewiesen werden konnte und eine Transkriptionssteigerung nach allen drei Stimulationen verzeichnet wurde. Daher zeigte sich in der graphischen Darstellung hier ein hoher Standardfehler. Die Gelelektrophorese nach PCR auf CYP2C9 konnte auch nach mehreren Versuchen aufgrund von multiplen Banden, insbesondere auf Detektionshöhe, nicht zuverlässig ausgewertet werden und daher musste auf eine Darstellung verzichtet werden. Die Menge an CYP2E1-mRNA zeigte in den verschiedenen Ansätzen nahezu unverändert einen durchschnittlichen Gehalt von circa 23,5 % von denen der pHHs. Die CYP3A4- und CYP3A7-Expression zeigten sich durch alleinige Vitamin C-2-Phosphat-Stimulation geringgradig erhöht und durch Azacytidin enthaltende Stimulationen erniedrigt. In unbehandeltem Zustand lag CYP3A7 im Mittel mit circa 25,9 % im Vergleich zu pHHs mehr als CYP3A4 mit 6,1 % vor. Die Transkription der Phase II-Enzyme zeigte sich für UGT1A6 in den niedrigeren Passagen sehr gering und mit durchschnittlicher Expression von nur 5,7 % von pHHs. Allerdings war dies in der höchsten gemessenen Zellpassage anders und im Durchschnitt erhöhten daher alle drei Stimulationsbedingungen die Genexpression bis auf in etwa 18 % der basalen pHH-Konzentration unter Aza20. Die GSTA1-Expression in HLE Zellen war mit durchschnittlichen 0,2 % von pHHs fast nicht vorhanden und konnte nur in zwei der drei Passagen durch VitC1- und Aza20-Stimulation etwas gesteigert werden.

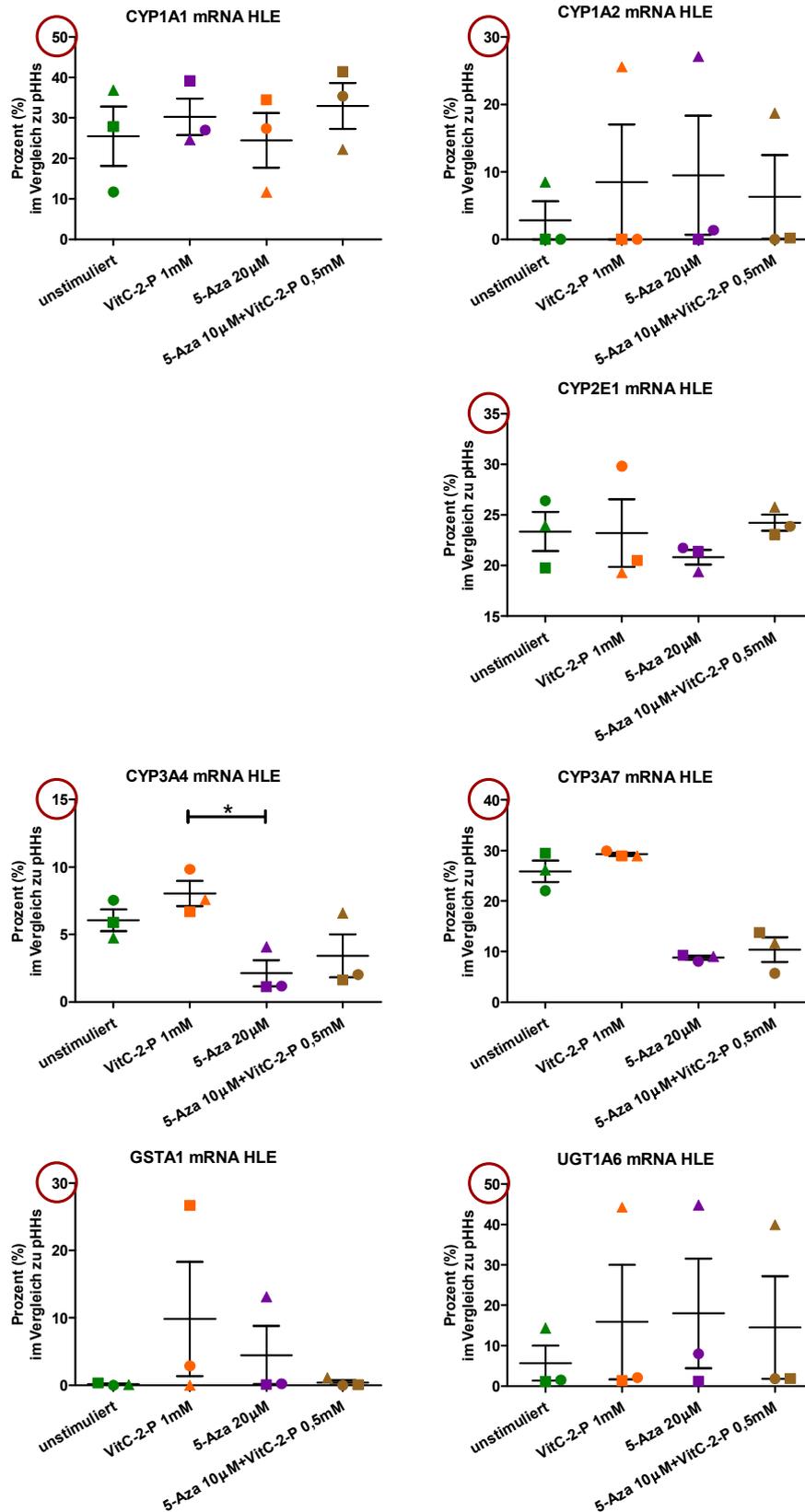


Abbildung 25 semiquantitative PCR für Phase I/II-Enzyme in HLE Zellen.

Darstellung in Prozent im Vergleich zu pHs nach 48 h Stimulation für alle Stimulationsansätze, Darstellung der verschiedenen Zellpassagen (Kreis=p4, Quadrat=p6, Dreieck=p9) mit MW und SEM für die verschiedenen Stimulationsansätze, (N=3, n=1→Sammelprobe der Triplikate)

3.5.4. AKN1 Zellen

In der Zelllinie AKN1 konnte keine Enzymaktivität von CYP1A1/2 (7-HC-Produktion) gemessen werden. Auch nach Stimulation der Zellen zeigten sich nur einmalig geringste Aktivitäten nach Aza20- sowie Aza10+VitC0,5-Stimulation (am ehesten zufällige Ausreißer).

CYP3A4-Aktivität (HFC-Produktion) war in unstimulierten AKN1 Zellen in allen drei Zellpassagen vereinzelt nachweisbar. Nach Stimulation mit Aza20 bzw. VitC1 zeigte sich nur in einer von drei Passagen eine Enzymaktivität sowie mit Aza10+VitC0,5 in nur zwei von drei Passagen eine Aktivitätserhöhung mit mehrheitlich messbaren Nullwerten.

CYP2E1-Aktivität (HFC-Produktion) zeigte sich für unbehandelte AKN1 Zellen nur in kleinsten Mengen in den beiden höheren Zellpassagen und konnte nur vereinzelt mit Aza20 oder Aza10+VitC0,5 gesteigert werden.

Die Aktivität von CYP2C9 (Fluorescein-Produktion) wiederum war durch alle Stimulationen regelhaft erhöht. Besonders durch Aza20-Behandlung aber auch durch Aza10+VitC0,5 konnten enzymatische Aktivitäten vergleichbar mit den Referenzhepatozyten erreicht werden.

Die GST-Aktivität (Fluoreszenzanstieg) war in unbehandelten AKN1 Zellen nicht nachweisbar, wohingegen Aza20 regelhaft zu einer Aktivitätszunahme führte. Für die anderen beiden Stimulationen schien dies nicht immer zu gelten. Die Kombination Aza10+VitC0,5 führte nur in zwei von drei gemessenen Passagen zu einer Erhöhung (*cave* nicht in allen Replikaten). Für VitC1 passierte dies sogar nur bei einer, daher konnte statistisch auch kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsansätzen errechnet werden.

Des Weiteren zeigten AKN1 Zellen in zwei der drei Zellpassagen, auch nach Stimulation, nahezu keine Aktivität der UGT (4-MU-Abbau). Lediglich in Passage 8 war eine deutliche Aktivität messbar, welche durch alle drei Stimulationsansätze gesteigert wurde.

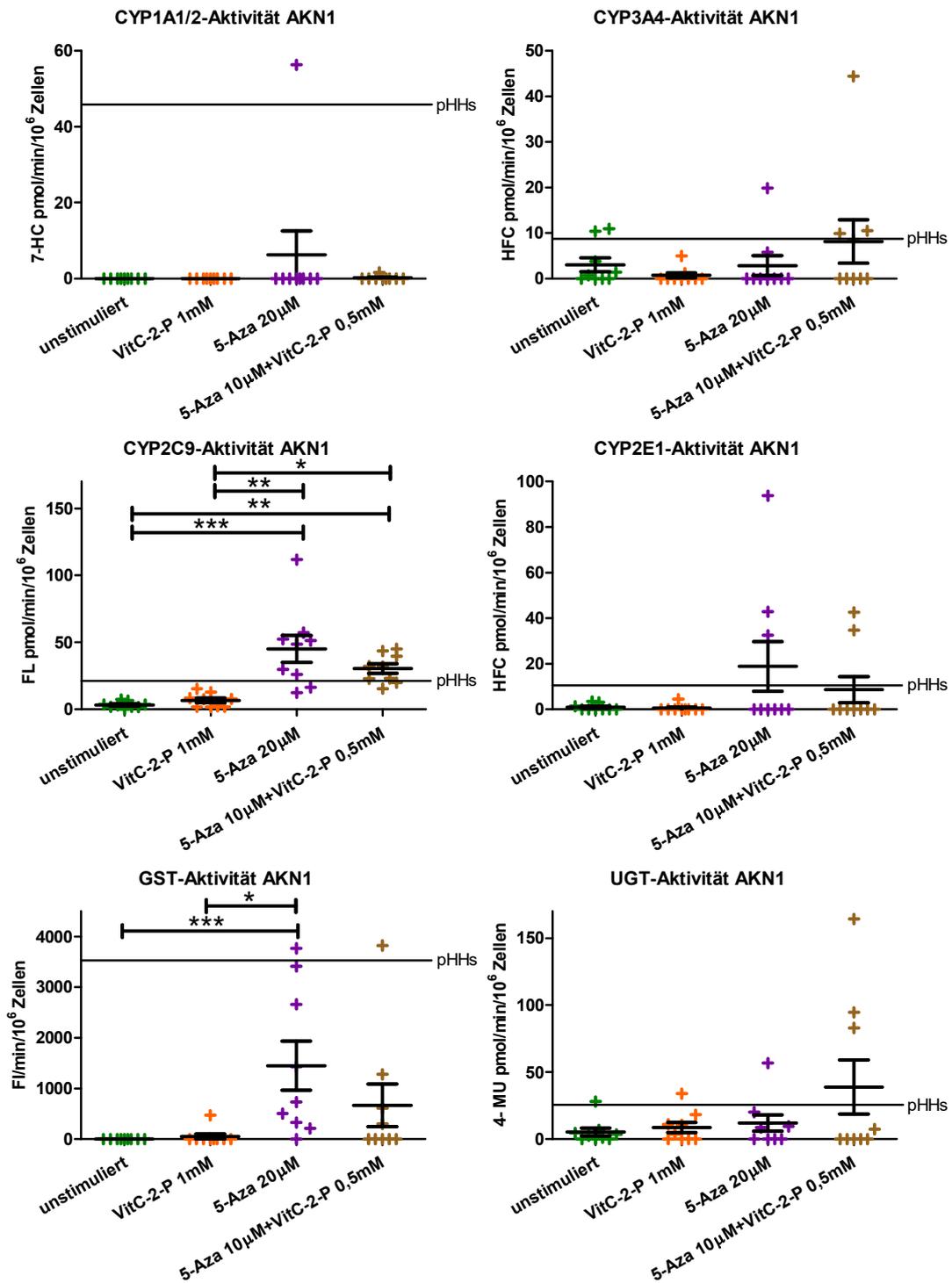


Abbildung 26 Substanzumsetzung der Phase I/II-Enzyme in AKN1 Zellen.

Angabe in pmol/min pro 10⁶ Zellen (Ausnahme: GST-Aktivität in Fluoreszenzintensität/min pro 10⁶ Zellen) für alle Stimulationsansätze nach 48 h Stimulation, Kreuz= ein Replikat, keine Aufteilung nach Zellpassagen, Angabe von MW und SEM (schwarz), (N=3, n=3)

Die semiquantitative PCR zeigte eine Erhöhung des mRNA-Gehaltes von CYP1A1 durch alle Stimulationen von unbehandelten 20,4 % auf maximal 32,5 % von basalen pHs nach VitC1-Stimulation.

CYP1A2-Expression wurde durch VitC1 sowie Aza10+VitC0,5 positiv und durch Aza20 negativ beeinflusst. Es konnte nahezu eine Vervierfachung der mRNA von 1,7 % auf 6,1 % im Durchschnitt nach Aza10+VitC0,5 gemessen werden.

Die CYP2C9-Genexpression in AKN1 Zellen lag bei etwa einem Zwanzigstel des hepatozytären Vergleichswerts und konnte durch alle Stimulationsansätze erhöht werden, jedoch nur zu einem geringen Ausmaß auf durchschnittliche 8,9 % von pHs nach Aza10+VitC0,5-Stimulation.

CYP2E1 wurde ebenfalls nur in geringen Mengen (3,1 % im Vergleich zu pHs) in AKN1 Zellen exprimiert. Die größte Steigerung konnte durch Aza20 auf 8,1 % von pHs erzielt werden. Ähnliche Werte wurden durch Aza10+VitC0,5 gemessen.

Der Nachweis von mRNA für CYP3A4 war in unbehandelten AKN1 nicht in allen Zellpassagen möglich und befand sich quantitativ im Mittel bei 0,2 % des hepatozytären Vergleichswerts. Die Stimulationen durch Vitamin C-2-Phosphat und/oder Azacytidin bewirkten nur im geringsten Ausmaß eine Änderung.

CYP3A7 hingegen wurde in unbehandelten AKN1 Zellen durchschnittlich zu 10,9 % im Vergleich zu pHs exprimiert und zeigte eine Suppression nach Aza20- und Aza10+VitC0,5-Stimulation.

Betrachtete man die Phase II-Enzyme so wurde GSTA1 auch nur in kleinsten Spuren nachgewiesen (mit und ohne Stimulation).

UGT1A6 hingegen wurde nahezu zu einem Viertel wie in gesunden Hepatozyten transkribiert und konnte durch VitC1-Inkubation auf durchschnittliche 38,5 % im Vergleich zu pHs gesteigert werden.

Interessanterweise kam es durch die Stimulation mit Azacytidin, auch in Kombination mit Vitamin C-2-Phosphat, zu einer Transkriptionsverminderung.

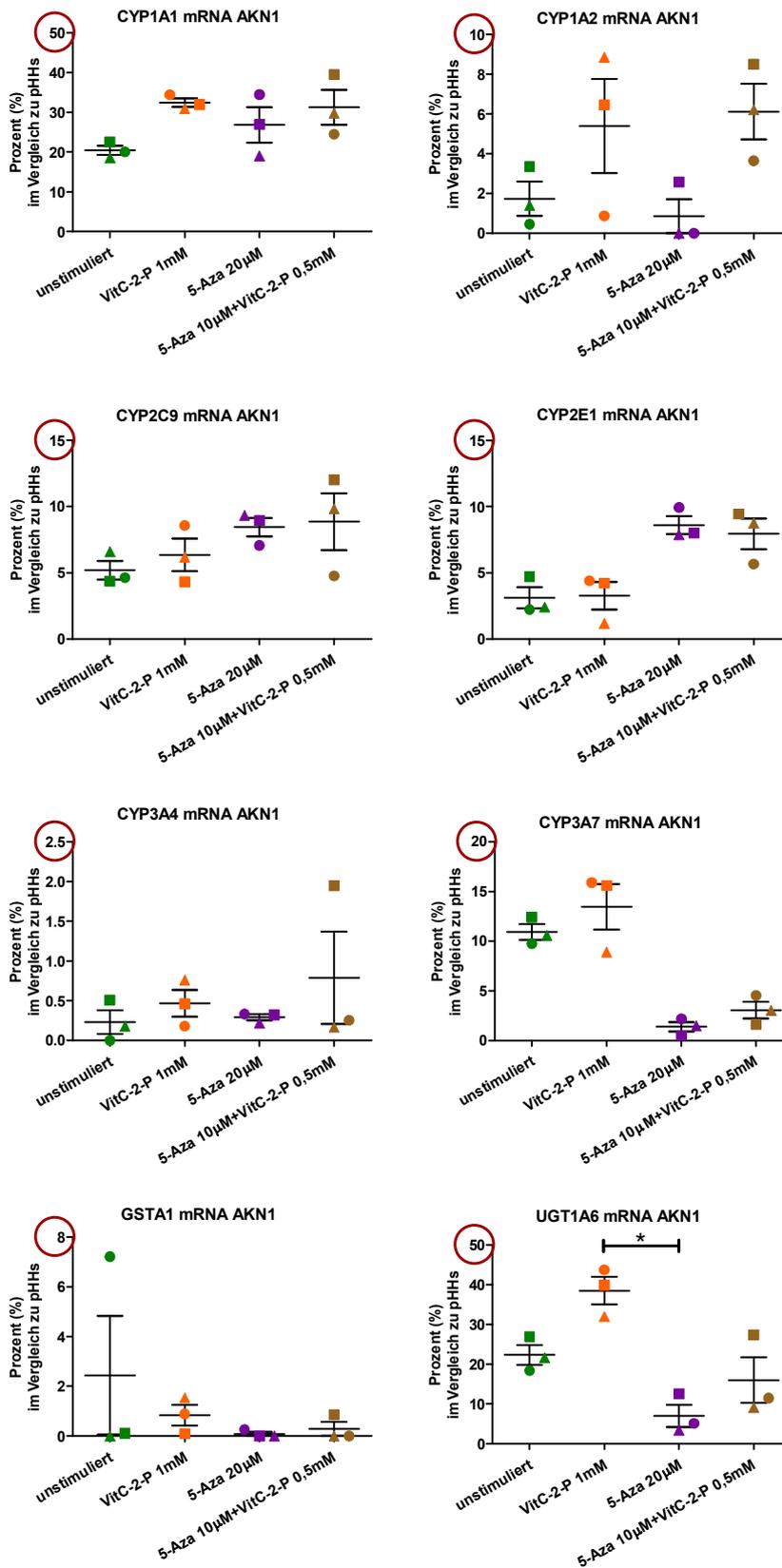


Abbildung 27 semiquantitative PCR für Phase I/II-Enzyme in AKN1 Zellen.

Darstellung in Prozent im Vergleich zu pHs nach 48 h Stimulation für alle Stimulationsansätze, Darstellung der verschiedenen Zellpassagen (Kreis=p3, Quadrat=p8, Dreieck=p10) mit MW und SEM für die verschiedenen Stimulationsansätze, (N=3, n=1→Sammelprobe der Triplikate)

3.6. Harnstoffproduktion

3.6.1. HepG2 Zellen

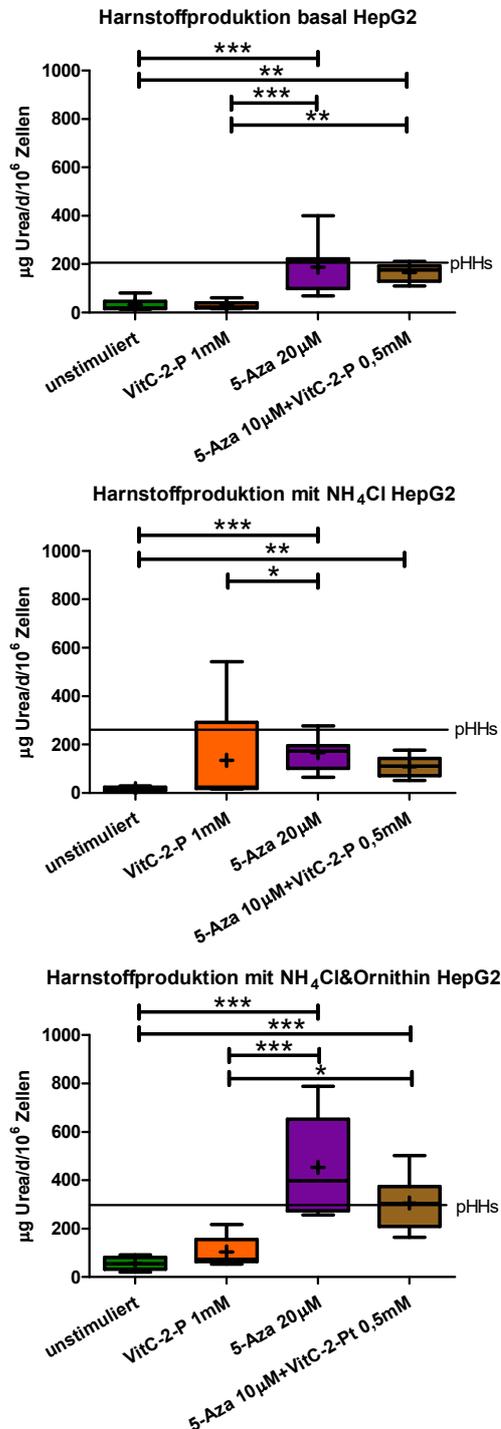


Abbildung 28 Harnstoffproduktion in HepG2 Zellen.

Angabe in µg Urea/Tag/10⁶ Zellen nach 48 h Stimulation für alle Stimulationsansätze mit 25./75. Perzentile, Median, Minimum und Maximum, Kreuz=MW, (N=3, n=4)

Die Harnstoffproduktion in HepG2 Zellen war sehr viel geringer als in frisch isolierten pHHs. Durch die 48-stündige Stimulation mit Aza20 sowie Aza10+VitC0,5 steigerte sich die durchschnittliche Harnstoffproduktion von 32 µg Urea auf 188 µg Urea bzw. 165 µg Urea pro Tag pro 1 Mio. Zellen und war damit nur minimal geringer als in pHHs. Wurde dem Inkubationsgemisch noch Ammoniumchlorid zugesetzt, so verminderte sich die Harnstoffproduktion sowohl in unstimulierten als auch in mit Azacytidin inkubierten Zellen. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine Erhöhung von Harnstoff in den mit VitC1 versetzten Zellen (bei höherer Streuung). Erfolgte die Inkubation zusätzlich auch noch mit Ornithin, dann zeigte sich eine diskret erhöhte Harnstoffherstellung in unstimulierten HepG2 Zellen (57 µg Urea/Tag/1 Mio. Zellen) und eine massiv erhöhte Produktion vor allem bei Aza20 stimulierten Zellen auf 453 µg Urea/Tag/1 Mio. Zellen, welche damit weit über dem durchschnittlichen Hepatozyten lagen.

Die semiquantitative PCR für die Enzyme des Harnstoffzyklus inklusive N-Acetylglutamat-Synthase zeigte eine Erhöhung der Expression von NAGS durch Aza20-Stimulation von mittleren 0,3 % auf 12,6 % und durch Aza10+VitC0,5 auf 9,7 % im Vergleich zu pHs. Unter VitC1-Stimulation war NAGS-Expression in keiner Zellpassage nachweisbar. Ebenso zeigte sich, dass NAGS-Transkription in einer der drei gemessenen Zellpassagen in unbehandelten HepG2 Zellen mittels semiquantitativer PCR gar nicht und in den anderen beiden auch nur in Spuren nachweisbar war. Auch für die Genexpression der CPS1 in HepG2 konnten nur sehr niedrige Level mit durchschnittlichen 3,7 % im Vergleich zu pHs gezeigt werden. Analog zeigte sich hier eine Erhöhung durch Aza20-Stimulation auf 20,4 % und durch Aza10+VitC0,5 auf 18,1 %. VitC1-Inkubation schien die Genexpression kaum zu beeinflussen.

Die OTC-Expression war sowohl in unstimulierten HepG2 Zellen als auch in allen anderen Versuchsansätzen nur mit circa 2 % von pHs vorhanden. ASS1-Expression zeigte ein ähnliches Expressionsmuster wie primäre humane Hepatozyten (105,0 %) und war durch Stimulation nur mit einer diskreten Tendenz zur Suppression zu verzeichnen (mit Aza20 82,7 %).

Die ASL-Transkription zeigte ein ähnliches Verteilungsmuster in der semiquantitativen PCR: HepG2 Zellen transkribierten unbehandelt in etwa die gleiche Menge an ASL wie pHs und die drei Stimulationsansätze führten zur Verminderung der mRNA-Level, wobei Aza20 die größte Auswirkung zeigte. Die Transkription von ARG1 war nur in Spuren in der Zelllinie HepG2 vorhanden. Selbst durch Aza20-Stimulation, welche die größte Steigerung der Expression bewirkte, wurden nur circa 0,6 % der Transkription von pHs erreicht. VitC1- und Aza10+VitC0,5-Behandlung zeigten durchschnittlich in etwa gleiche mRNA-Mengen wie unbehandelte HepG2 Zellen. Es war zu bemerken, dass ARG1-Expression nicht in allen Zellpassagen durch die semiquantitative PCR nachweisbar war, wodurch der große Standardfehler erklärt werden konnte. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Analyse der Genexpression von Enzymen der Harnstoffproduktion in HepG2 Zellen errechnet werden.

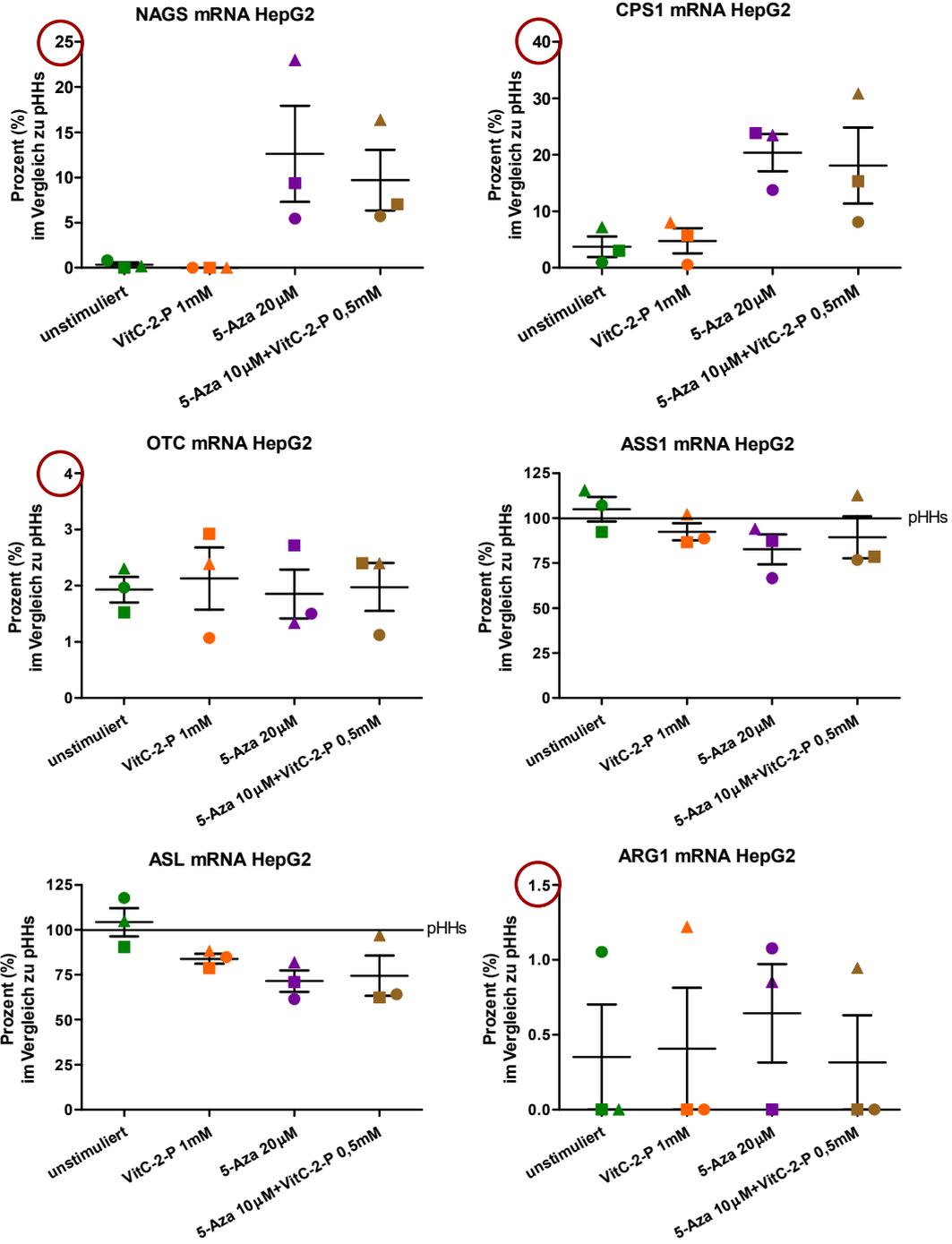


Abbildung 29 semiquantitative PCR für die Enzyme der Harnstoffproduktion in HepG2 Zellen. Darstellung in Prozent im Vergleich zu pHHs nach 48 h Stimulation für alle Stimulationsansätze, Darstellung der verschiedenen Zellpassagen (Kreis=p5, Quadrat=p9, Dreieck=p12) mit MW und SEM für die verschiedenen Stimulationsansätze, (N=3, n=1→Sammelprobe der Triplikate)

3.6.2. Huh7 Zellen

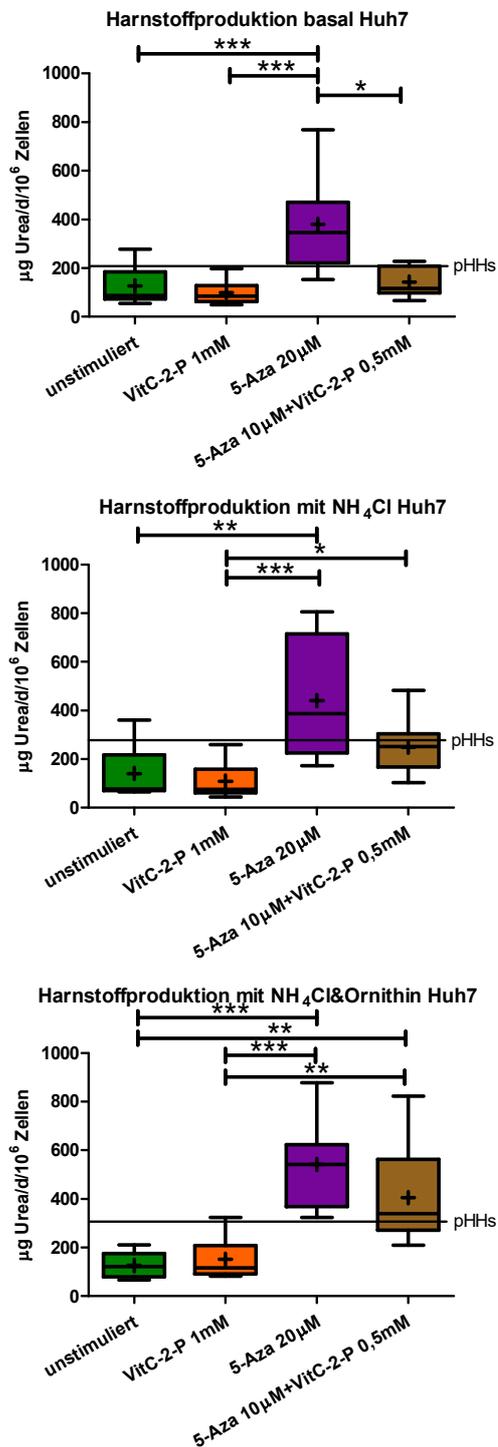


Abbildung 30 Harnstoffproduktion in Huh7 Zellen.

Angabe in µg Urea/Tag/10⁶ Zellen nach 48 h Stimulation für alle Stimulationsansätze mit 25./75. Perzentile, Median, Minimum und Maximum, Kreuz=MW, (N=3, n=4)

Die Produktion von Harnstoff zeigte sich in unbehandelten Huh7 Zellen bei durchschnittlichen

126 µg Urea/Tag/1 Mio. Zellen und lag damit etwas niedriger als in pHHs. Nach Aza20-Stimulation zeigte sich ein fast dreifacher Anstieg auf

380 µg Urea/Tag/1 Mio. Zellen, was nahezu die zweifache Menge an Harnstoff im Vergleich zu den

verwendeten Referenzhepatozyten war.

Stimulation mit VitC1 oder der Kombinationsstimulation zeigten keine signifikanten Produktionsveränderungen.

Bei der Inkubation mit zusätzlichem Ammoniumchlorid zeigte sich ebenfalls nur ein relevanter Anstieg durch

Stimulation mit Aza20 auf eine höhere Produktion mit circa

441 µg Urea/Tag/1 Mio. Zellen. Zusätzlich lieferte die Stimulation mit Aza10+Vit0,5 eine nahezu mit primären Hepatozyten vergleichbare Harnstoffproduktion.

Wurde als weiterer Zusatz Ornithin in die Inkubationsmischung gegeben, zeigte sich bei unstimulierten Huh7 Zellen

weiterhin eine durchschnittliche Produktion von

126 µg Urea/Tag/1 Mio. Zellen.

Sowohl mit Stimulation durch Aza20 als auch mit Aza10+VitC0,5 wurden hierbei

die höchsten Harnstoffkonzentrationen mit 541 µg Urea/Tag/1 Mio. Zellen bzw. 406 µg Urea/Tag/1 Mio. Zellen erreicht. Unter VitC1-Stimulation zeigten Huh7 Zellen maximal eine Herstellung von 151 µg Urea/Tag/1 Mio. Zellen nach Zusatz von NH₄Cl und Ornithin.

Die Zelllinie Huh7 zeigte in der semiquantitativen PCR für die Enzyme der Harnstoffproduktion interessanterweise relativ große Mengen an transkribierter mRNA für fast alle Enzyme: NAGS-, ASL- und ARG1-Expressionen waren mit pHHs vergleichbar (Durchschnitt unbehandelter Huh7 Zellen: NAGS 162,1 %, ASL 100,7 % und ARG1 103,9 %), wobei auch ASS1 mit 75,0 % und CPS1 mit 69,6 % noch immer über der Hälfte der hepatozytären Expression lagen. Am wenigsten exprimiert in Huh7 Zellen wurde OTC mit 26,2 %. Auffällig war, dass alle Enzyme unter den drei verschiedenen Stimulationsansätzen eher gleich oder sogar vermindert exprimiert wurden und nicht, wie nach der gemessenen Harnstoffproduktion unter Aza20 und Aza10+VitC0,5 erwartet, gesteigert exprimiert wurden. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Stimulationen für die Genexpression der Enzyme der Harnstoffproduktion in Huh7 Zellen.

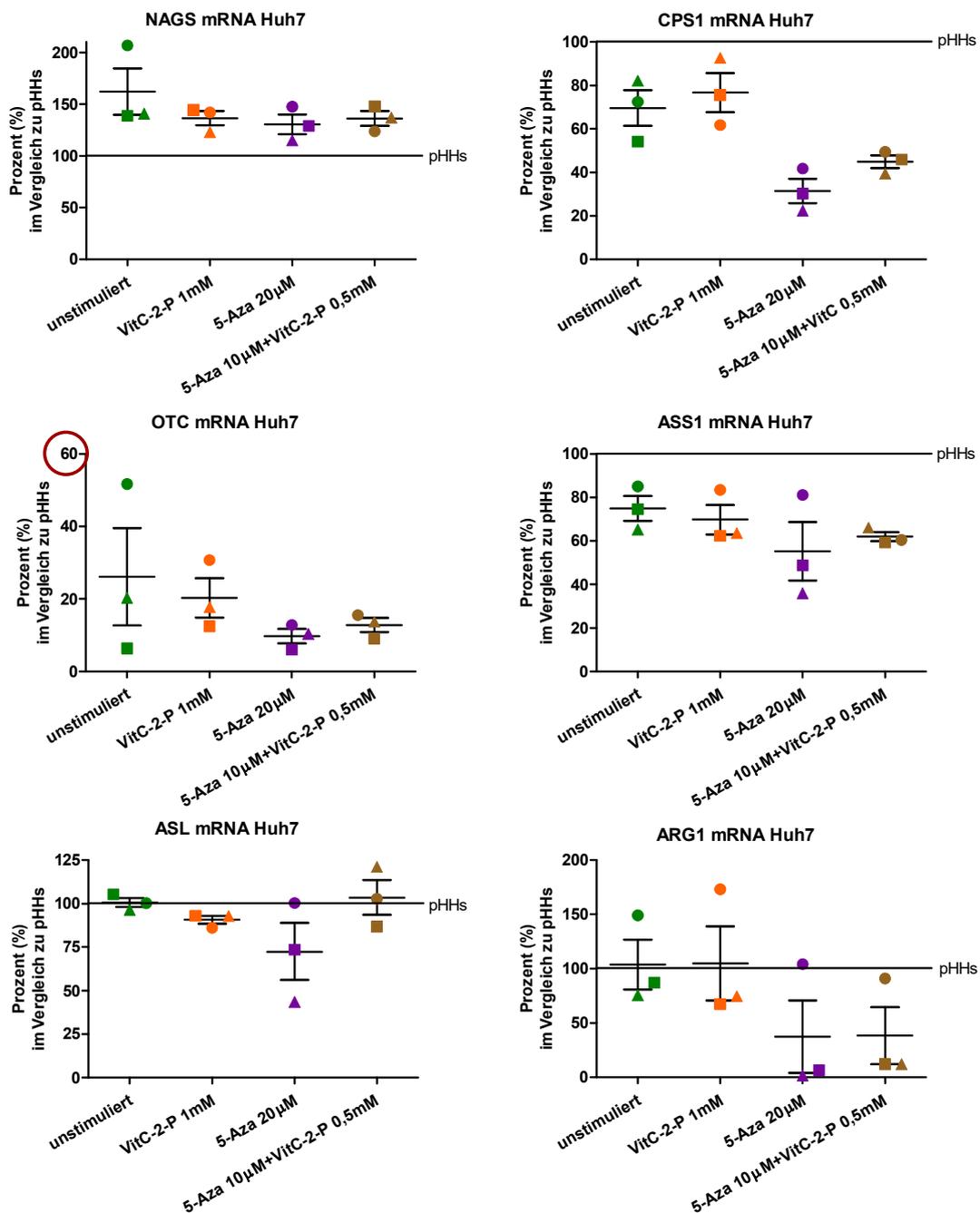


Abbildung 31 semiquantitative PCR für die Enzyme der Harnstoffproduktion in Huh7 Zellen.

Darstellung in Prozent im Vergleich zu pHs nach 48 h Stimulation für alle Stimulationsansätze, Darstellung der verschiedenen Zellpassagen (Kreis=p4, Quadrat=p6, Dreieck=p8) mit MW und SEM für die verschiedenen Stimulationsansätze, (N=3, n=1→Sammelprobe der Triplikate)

3.6.3. HLE Zellen

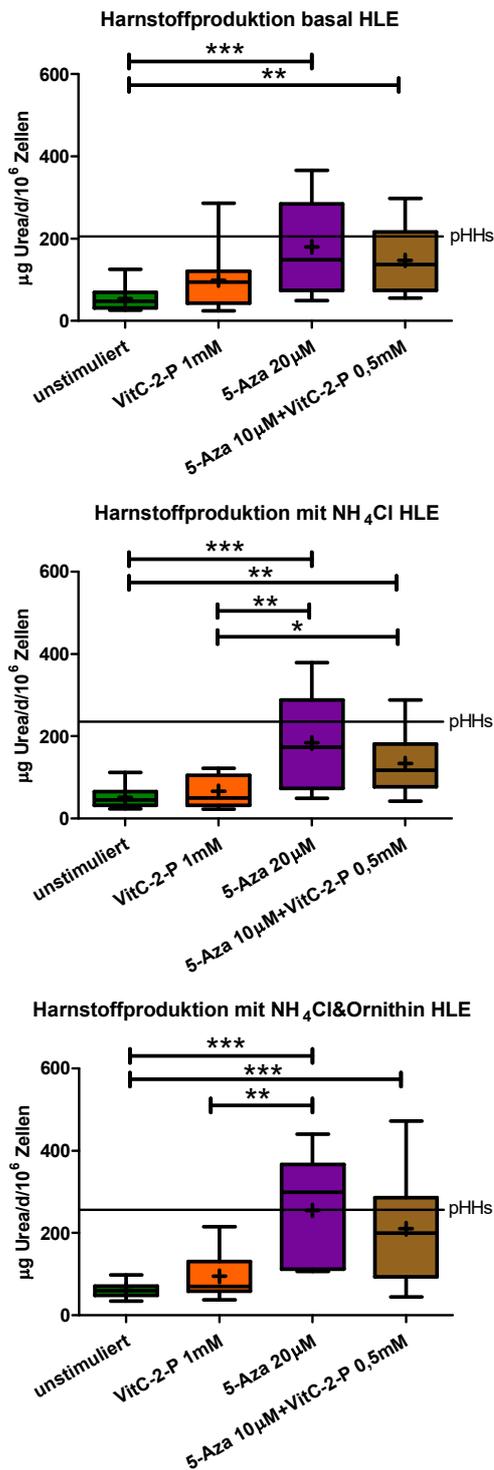


Abbildung 32 Harnstoffproduktion in HLE Zellen.

Angabe in µg Urea/Tag/10⁶ Zellen nach 48 h Stimulation für alle Stimulationsansätze mit 25./75. Perzentile, Median, Minimum und Maximum, Kreuz=MW (N=4, n=4)

Der Harnstoffzyklus war in HLE Zellen mit Abstand geringer ausgeprägt als in Hepatozyten mit einer durchschnittlichen Produktion von

54 µg Urea/Tag/1 Mio. Zellen. Dies veränderte sich durch Zugabe von NH₄Cl und Ornithin kaum, wohingegen in pHHs durch beide Zusätze die Produktion von Urea erhöht wurde.

Unabhängig von den Zusätzen im Inkubationsmedium zeigte sich, dass alle drei Stimulationen zum Anstieg der Harnstoffkonzentration führten. Am meisten ausgeprägt war diese Beobachtung auch hier unter Aza20-Stimulation. Man kann in Abbildung 32 sehen, dass nur nach Behandlung mit Aza20 die basale Harnstoffproduktion mit ihren

Maximalwerten mit pHHs vergleichbare Ergebnisse lieferte (durchschnittlich 179,6 µg Urea/Tag/1 Mio. Zellen). Auch durch den Zusatz von NH₄Cl sowie Ornithin stiegen die Harnstoffkonzentrationen auch nach 48-stündiger Stimulation nur auf Höhe der hepatozytären Vergleichswerte an.

Mit NH₄Cl stieg die Harnstoffproduktion in Gegenwart von Aza20 auf einen Mittelwert von

184,2 µg Urea/Tag/1 Mio. Zellen bzw.

254,2 µg Urea/Tag/1 Mio. Zellen mit beiden Zusätzen an.

In der semiquantitativen PCR sah man, dass HLE Zellen wichtige Enzyme für die Harnstoffproduktion nicht annähernd wie primäre humane Hepatozyten exprimierten. NAGS konnte in allen getesteten Zellpassagen zunächst nicht nachgewiesen werden. Unter Kombinationsstimulation mit Aza10+VitC0,5 wurde nur eine mittlere Expression von 5,1 % von pHHs erreicht. Ebenso wurden OTC und ARG1 nur in geringsten Mengen exprimiert (1,0 % und 0,6 % von pHHs). Die Transkription konnte für OTC nicht eindeutig durch die Stimulationen beeinflusst werden (unterschiedliche Ergebnisse in den Zellpassagen), allerdings zeigte sich für ARG1 eine Erhöhung auf 1,6 % unter Stimulation mit Aza20, bzw. 1,1 % nach Aza10+VitC0,5 im Vergleich zu pHHs. Die mRNA für ASS1 war in HLE Zellen in allen Passagen nachweisbar, jedoch in der höchsten Zellpassage mit Abstand am meisten (durchschnittlich 12,4 % von pHHs). Auswirkungen durch die Stimulationen waren nicht verlässlich bei hohem Standardfehler ableitbar. Die größte Menge an Harnstoffzyklusenzym zeigte sich für CPS1 mit 104,1 % von pHHs, aber auch ASL mit 92,0 % zeigte vergleichbare Werte mit pHHs. Erstere schien unter Azacytidin eine Transkriptionsminderung (Aza20 55,8 % und Aza10+VitC0,5 58,7 %) und Letztere nur in zwei von drei Zellpassagen eine deutliche Transkriptionsverminderung durch Azacytidin enthaltende Stimulationsmischungen zu erfahren. Statistisch fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Stimulationsansätzen.

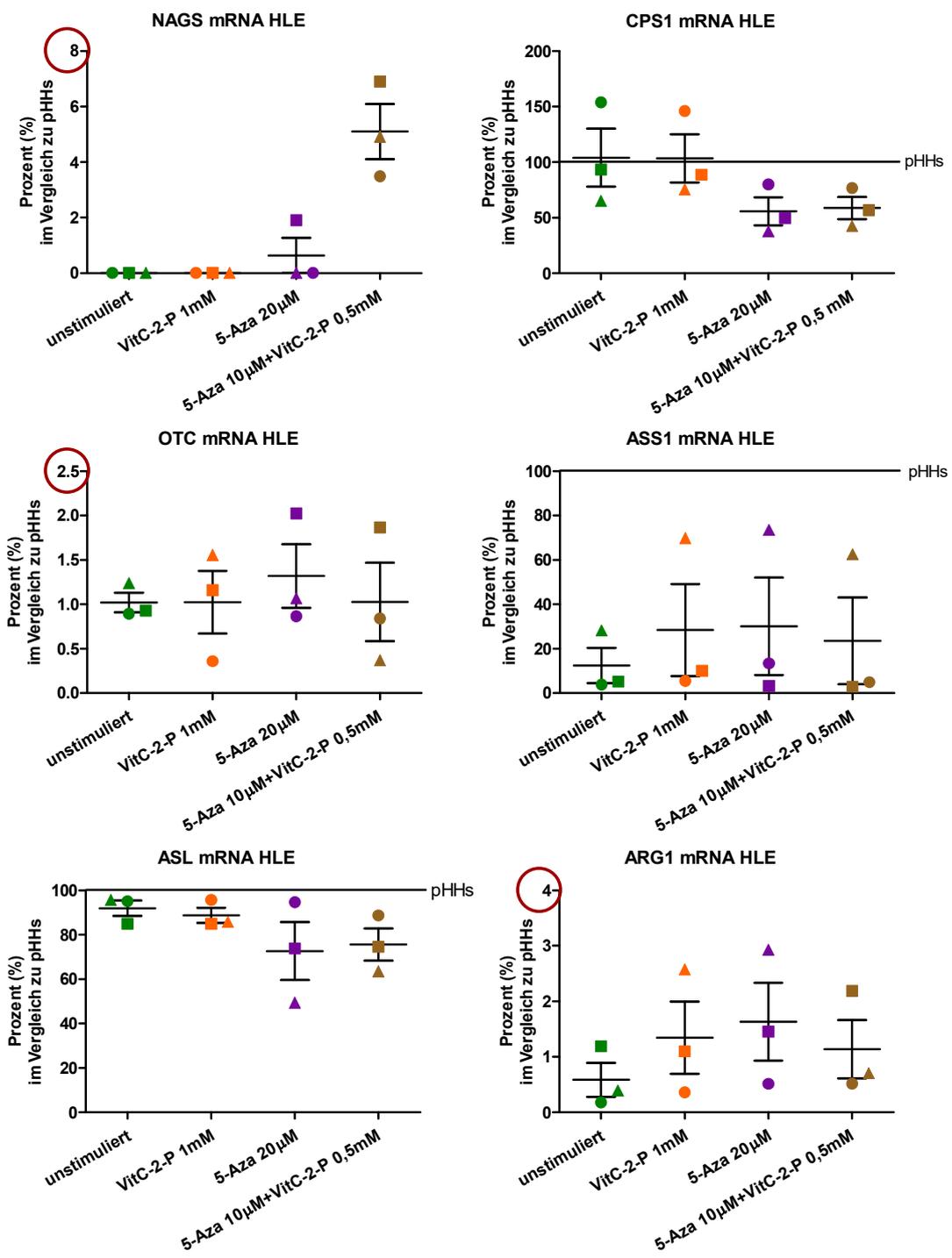


Abbildung 33 semiquantitative PCR für die Enzyme der Harnstoffproduktion in HLE Zellen. Darstellung in Prozent im Vergleich zu pHHs nach 48h Stimulation für alle Stimulationsansätze, Darstellung der verschiedenen Zellpassagen (Kreis=p4, Quadrat=p6, Dreieck=p9) mit MW und SEM für die verschiedenen Stimulationsansätze, (N=3, n=1→Sammelprobe der Triplikate)

3.6.4. AKN1 Zellen

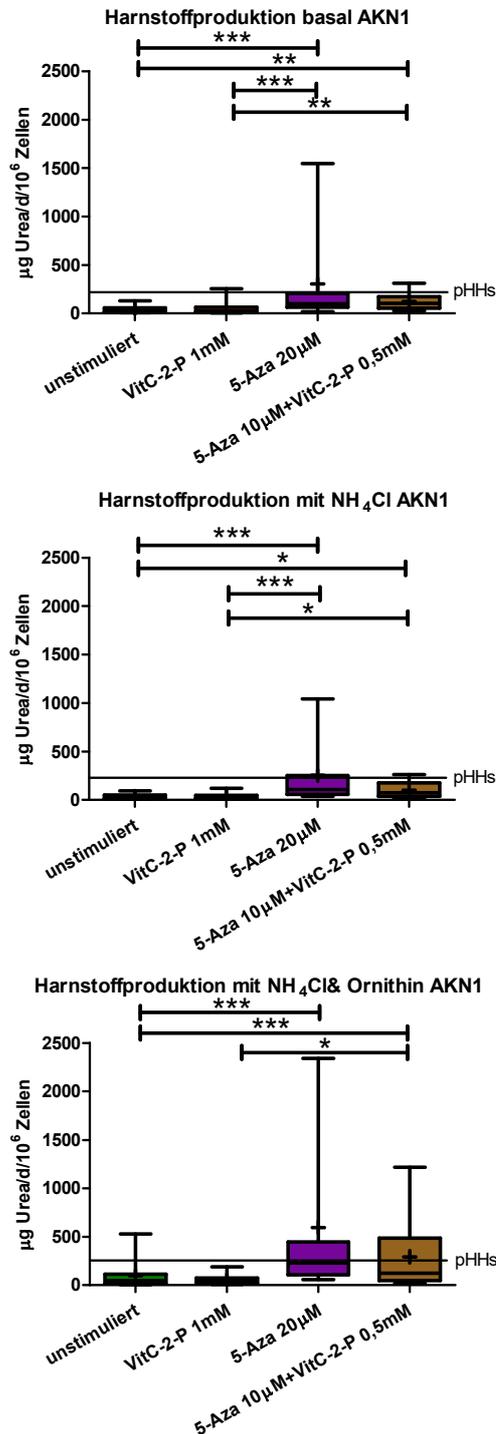


Abbildung 34 Harnstoffproduktion in AKN1 Zellen.

Angabe in µg Urea/Tag/10⁶ Zellen nach 48 h Stimulation für alle Stimulationsansätze mit 25./75.Perzentile, Median, Minimum und Maximum, Kreuz=MW (N=5, n=4)

Abbildung 34 zeigt auf den ersten Blick, dass AKN1 Zellen unbehandelt eine sehr kleine Harnstoffproduktion hatten (im Mittel 43 µg Urea/Tag/1 Mio. Zellen). Durch Zusatz von Ammoniumchlorid und Ornithin konnte dies auf 96 µg Urea/Tag/1 Mio. Zellen erhöht werden, wohingegen Ammoniumchlorid alleine nur eine leichte Veränderung bewirkte (35 µg Urea/Tag/1 Mio. Zellen). Es war deutlich, dass unter Aza20-Einfluss höhere Harnstoffkonzentrationen erreicht werden konnten. Diese waren mit frisch isolierten pHHs vergleichbar und unter Ornithinzusatz sogar im Durchschnitt sehr viel höher (596,1 µg Urea/Tag/1 Mio. Zellen), allerdings ist hier die hohe Standardabweichung zu bedenken (sehr hohe Ergebnisse in einer Zellpassage für die Stimulation mit Aza20). Die Auswirkungen von Aza10+VitC0,5-Stimulation fielen geringer aus, wobei sich mit Ornithin- und Ammoniumchloridzusatz auch eine ähnliche Harnstoffproduktion wie in pHHs erreichen ließ.

Im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten wurde in der unbehandelten Zelllinie AKN1 in absteigender Reihenfolge mengenmäßig im Durchschnitt ASL mit 155,6 %, ASS1 mit 125,7 %, CPS1 mit 16,1 %, OTC mit 1,4 %, ARG1 mit 0,09 % und NAGS mit 0 % exprimiert. ARG1-Genexpression konnte nicht in allen Zellpassagen mit der semiquantitativen PCR nachgewiesen werden (weder mit noch ohne Stimulation). NAGS-Expression konnte in unbehandelten Zellen nie und nach Aza20- bzw. Aza10+VitC0,5-Stimulation in allen Versuchen nachgewiesen werden (mit durchschnittlichen 2,9 % bzw. 4,4 % von pHHs).

CPS1 und OTC zeigten keinen gleichmäßigen Einfluss der Stimulationsansätze auf die Transkription in den drei Zellpassagen, d.h. mindestens eine Passage wich im Sinne einer Erhöhung oder Erniedrigung gegensätzlich zu den anderen ab. ASS1 und ASL hingegen neigten sogar zur Expressionsreduktion unter Stimulation. In den Ergebnissen der semiquantitativen PCR für die vorliegende Stichprobenmenge fanden sich statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsansätzen.

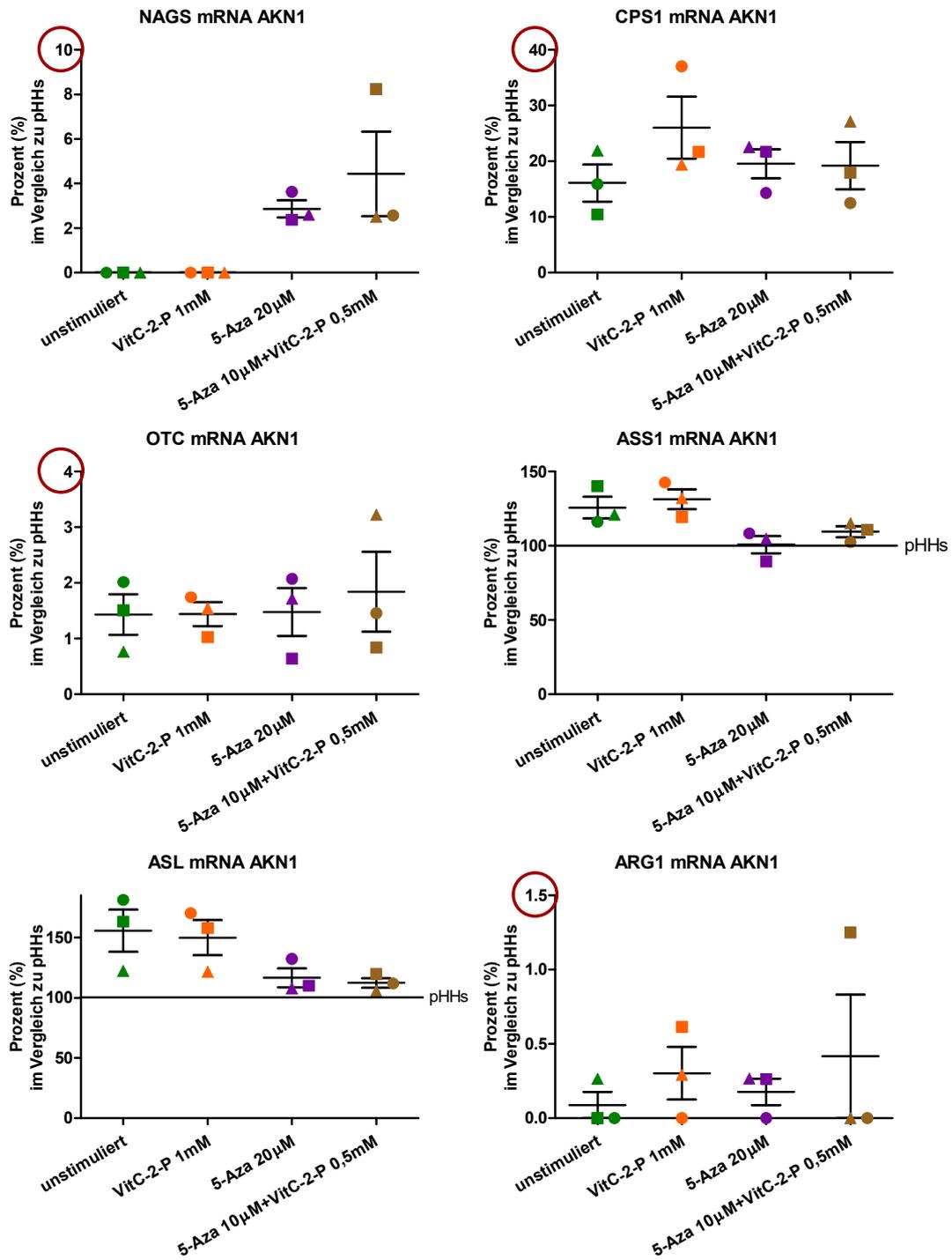


Abbildung 35 semiquantitative PCR für die Enzyme der Harnstoffproduktion in AKN1 Zellen. Darstellung in Prozent im Vergleich zu pHHs nach 48 h Stimulation für alle Stimulationsansätze, Darstellung der verschiedenen Zellpassagen (Kreis=p3, Quadrat=p8, Dreieck=p10) mit MW und SEM für die verschiedenen Stimulationsansätze, (N=3, n=1→Sammelprobe der Triplikate)

3.7. Albuminexpression und -sekretion

Die Albuminsekretion in der Zelllinie Huh7 zeigte unter allen drei Stimulationsbedingungen einen Anstieg. Unbehandelte Huh7 Zellen sezernierten 10,7 μg Albumin/Tag/1 Mio. Zellen. In aufsteigender Reihenfolge nach Produktionsdurchschnitt wurden nach Stimulation mit VitC1 16,0 μg Albumin, mit Aza20 18,3 μg Albumin und mit Aza10+VitC0,5 23,6 μg Albumin pro Tag pro 1 Millionen Zellen gemessen.

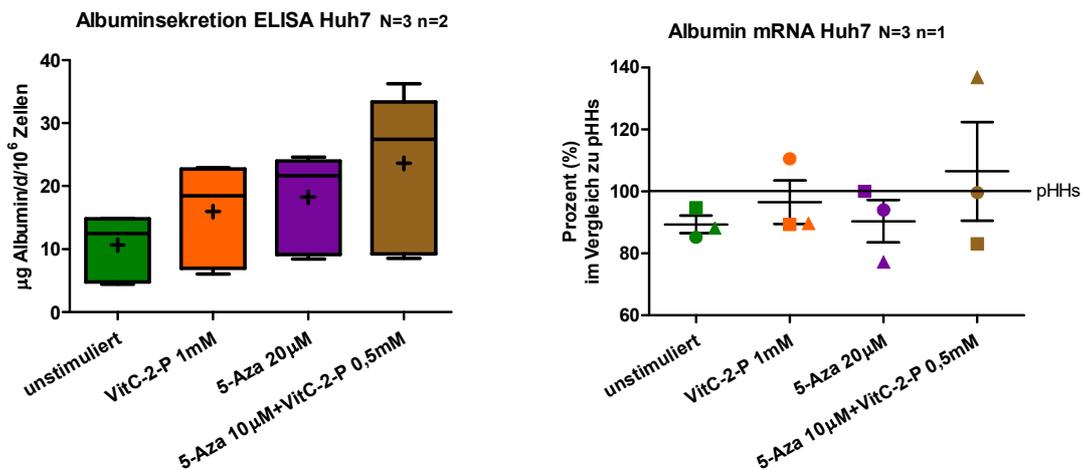


Abbildung 36 Albuminexpression und -sekretion in Huh7 Zellen.

links: Albuminsekretion nach 48 h Stimulation in μg Albumin/Tag/ 10^6 Zellen für alle Stimulationsansätze mit 25./75.Perzentile, Median, Minimum und Maximum, Kreuz=MW;

rechts: semiquantitative PCR für Albuminexpression nach 48 h Stimulation im Vergleich zu pHHs in Prozent mit Darstellung der verschiedenen Zellpassagen (Kreis=p4, Quadrat=p6, Dreieck=p8) mit MW und SEM für die verschiedenen Stimulationsansätze

Die Genexpression von Albumin in unbehandelten Huh7 Zellen betrug durchschnittlich in etwa 89,4 % von primären Hepatozyten. Durch die verschiedenen Stimulationen zeigte sich jedoch keine deutliche Tendenz zur Beeinflussung des mRNA-Gehalts (Aza10+VitC0,5 106,5 % von pHHs).

In den Zelllinien HepG2, HLE und AKN1 konnte leider weder ohne noch mit Stimulation im ELISA eine Albuminsekretion nachgewiesen werden. Durch die semiquantitative PCR konnten nur 5,1 % der Genexpression von pHHs in HepG2 Zellen sowie 7,7 % in HLE Zellen respektive 4,3 % in AKN1 Zellen dargestellt werden. Eine Transkriptionssteigerung durch VitC1 auf 8,7 %, durch Aza20 auf 17,5 % (statistisch signifikant) und durch Aza10+VitC0,5 auf 11,8 % von pHHs konnte in HepG2 Zellen gemessen werden.

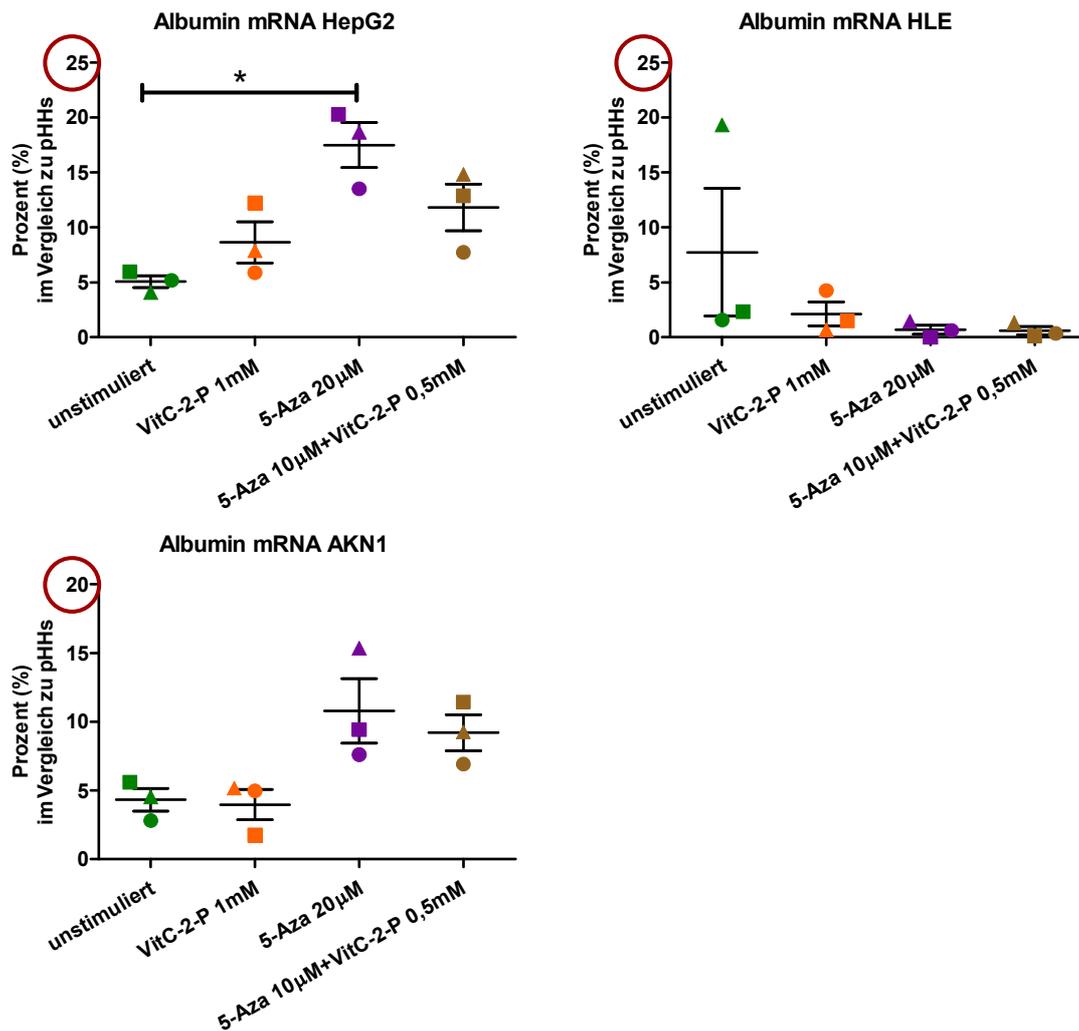


Abbildung 37 semiquantitative PCR für Albuminexpression in den Zelllinien HepG2, HLE und AKN1.

Angabe in Prozent im Vergleich zu pHHs nach 48h Stimulation mit Darstellung der verschiedenen Zellpassagen mit MW und SEM für die verschiedenen Stimulationsansätze.

Links oben: HepG2 Zellen mit Kreis=p5, Quadrat=p9, Dreieck=p12

Rechts oben: HLE Zellen mit Kreis=p4, Quadrat=p6, Dreieck=p9

Links unten: AKN1 Zellen mit Kreis=p3, Quadrat=p8, Dreieck=p10

(N=3, n=1→Sammelprobe der Triplikate)

Auch in AKN1 Zellen verstärkte sich die Expression nach Aza20- und Aza10+VitC0,5-Stimulation in allen gemessenen Zellpassagen auf mittlere 10,8% bzw. 9,2% im Vergleich zu Hepatozyten. Die Genexpression von Albumin in HLE Zellen zeigte nach allen Stimulationen eine Verminderung.

4. Diskussion

4.1. Einordnung der Ergebnisse in die Literatur

Ansatz dieser Arbeit war die veränderte Epigenetik in hepatozellulären Karzinomen und sowohl mithilfe der quantitativen real-time PCR als auch mit der semiquantitativen PCR konnte in dieser Arbeit in allen vier vorliegenden Zelllinien eine veränderte Expression der DNA-Methyltransferasen 1, 3A und 3B nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis korreliert mit den bisher publizierten Daten über epigenetische Veränderungen, insbesondere der Hypermethylierung, in HCCs [20], [21], [23], [24], [26], [27]. Obwohl für beide verwendeten epigenetischen Modifikatoren in der Literatur gezielte und reproduzierbare Genexpressionsveränderungen beschrieben wurden, konnte in dieser Arbeit durchaus eine Variabilität zwischen den verschiedenen Zellpassagen und der Auswirkung der epigenetischen Substanzen auf die

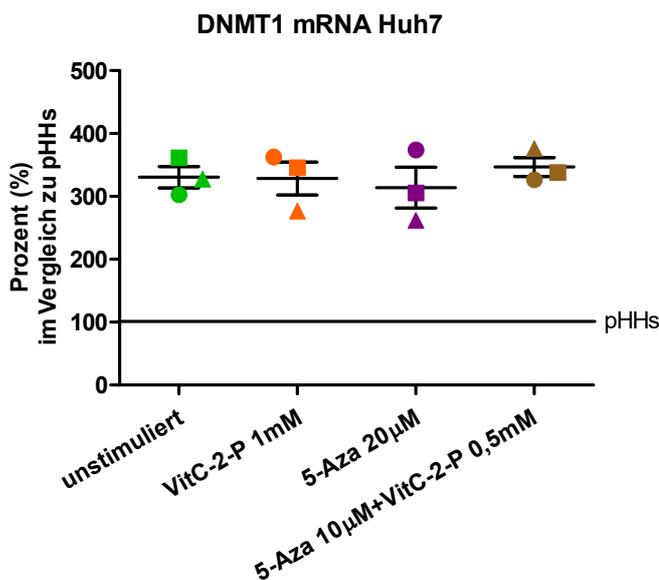


Abbildung 38 Beispiel für die variable Auswirkung der epigenetischen Modifikation auf die Genexpression je Zellpassage anhand DNMT1 in Huh7 Zellen. Angabe in Prozent im Vergleich zu pHHs nach 48 h Stimulation mit Darstellung der verschiedenen Zellpassagen (p4= Kreis, p6= Rechteck, p8= Dreieck) mit MW und SEM für die verschiedenen Stimulationsansätze.

In je zwei der drei Passagen zeigten Huh7 Zellen die gleichen Auswirkungen für die 48stündigen Stimulationen und eine der drei Passagen zeigte widersprüchliche Ergebnisse. Genexpression der DNMT1 in Huh7 nach VitC-2-P 1 mM p4↑, p6↓, p8↓; nach 5-Aza 20 µM p4↑, p6↓, p8↓; nach 5-Aza 10 µM+VitC-2-P 0,5 mM p4↑, p6↓, p8↑.

Expression aufgezeigt werden [54], [85]. Oftmals konnte man in zwei von drei getesteten Zellpassagen eine Veränderung durch die getesteten Stimulationen beobachten, welche in der dritten Passage nicht reproduziert werden konnte oder sogar im Widerspruch dazu stand (Beispiel siehe Abbildung 38). Ungeklärt bleibt der Einfluss von beiden Substanzen auf die Proteinmenge der DNA-Methyltransferasen, wobei zumindest in der Literatur für Azacytidin eine

Verminderung beschrieben wird [76], [79], [80]. Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der beiden verschiedenen PCR-Methoden entstanden dadurch, dass zum einen verschiedene Stichproben analysiert wurden und zum anderen in der unterschiedlichen Methodik, welche aufgrund der verschiedenen Analysezeitpunkte und verwendeten Haushaltsgene zu ungleichen Ergebnissen führen konnten [174].

Für eine Behandlung mit Azacytidin sind Zytotoxizität, Zellschädigung und Zellzyklusalterationen bereits bekannte Phänomene [56], [76], [178]. Die alleinige Stimulation mit Aza20 zeigte größere Auswirkungen als die Kombination von Aza10+VitC0,5 auf das mikroskopische Bild, die Zellviabilität und Toxizität. Zum einen könnte die Kombination mit Vitamin C zellschützend sein, wobei Vitamin C je nach Konzentration eher zytoprotektive (niedrige Konzentrationen) oder zellschädigende (hohe Konzentrationen) Auswirkungen haben kann [71]. Zum anderen könnte die Konzentrationsreduktion von Azacytidin dazu führen, denn konzentrationsabhängige Wirkungen von Azacytidin wurden bereits durch Sajadian *et al.* 2015 unter anderem auch in den Zelllinien Huh7 und HLE beschrieben [56]. Unter alleiniger VitC1-Behandlung wurden erhöhte LDH-Konzentrationen und leicht verminderte Resazurinkonversionen beobachtet, wobei HepG2 Zellen eine Ausnahme bildeten. Diese Zelllinie zeigte eine verminderte LDH-Ausschüttung bei nahezu gleicher Zellviabilität (Mikroskopie und Resazurinkonversion) und zeigte damit eher eine zellschützende Wirkung von Vitamin C. In der Literatur gibt es kontroverse Ergebnisse zu Vitamin C und Tumorwachstum je nach Dosis, Darreichung, Derivat und getesteter Zelllinie [52], [71], [179].

Im Gegensatz zur bestehenden Literatur konnte keine Genexpression für CYP3A4 und GSTA1 sowie keine Albuminsynthese in HepG2 Zellen nachgewiesen werden [143]–[145], [180]. In dieser Arbeit konnte aber eine CYP2C9-Aktivität im Sinne einer Fluorescein-Produktion in dieser Zelllinie gezeigt werden, wobei in der Literatur durch Lumineszenzanalysen bisher keine Aktivität dieses Enzyms in HepG2 Zellen beschrieben wurde [145].

Auch konnte im Widerspruch zur Literatur keine CYP1A-Aktivität im Sinne einer 7-HC-Produktion in unbehandelten Huh7 Zellen nachgewiesen werden [92]. Wie nach der Entdeckung von HLE Zellen bereits beschrieben, kann auch in dieser Arbeit keine Albuminsynthese gemessen werden [137]. Nach der Etablierung der Zelllinie AKN1 postulierten Nussler *et al.* die Abwesenheit von Albumin (Immunhistochemie und mRNA-Analyse) sowie hohe Mengen an ASS1 in dieser Zelllinie [136]. In dieser Arbeit konnte jedoch eine in Spuren vorhandene Transkription von Albumin in AKN1 Zellen weiterhin ohne messbare Albuminsekretion beschrieben werden. Das Vorhandensein von ASS1 in hohen Mengen bleibt ein konstantes Charakteristikum dieser Zelllinie. Widerspruch gibt es auch in bereits veröffentlichten Daten zur Steigerung der Expression von CPS1 in Huh7 Zellen durch Azacytidinbehandlung, wobei Liu *et al.* nur 5 µM Azacytidin über 72 h angewandt hatten [34]. Diskrepanzen zwischen bereits beschriebenen und den hier gemessenen Ergebnissen sind für Zelllinien nicht unbekannt. Hewitt *et al.* konnten bereits für HepG2 Zellen aus verschiedener Herkunft und verschiedenen Kulturbedingungen veränderte Charakteristika beschreiben [181]. Außerdem können sich auch Wachstumsbedingungen im Sinne von Konfluenz der Zellen auf den Zellmetabolismus auswirken; eine Aktivitätserhöhung von CYP3A4 in konfluierenden Huh7 Zellen und eine Aktivitätsminderung verschiedener Cytochrome in konfluierenden HepG2 Zellen wurden ebenfalls bereits beschrieben [144], [150]. Sowohl bei der Analyse der Aktivitäts- oder Produktionsmessungen als auch der mRNA konnten in allen Zelllinien deutliche Unterschiede über die verschiedenen Zellpassagen beobachtet werden. Die intraindividuelle Variabilität des Zellmetabolismus in den Passagen wurde schon ausführlich durch Lin *et al.* 2012 aus unserem Labor beschrieben [92]. Die Genexpression von CYP3A4 und 3A7 zeigte sich als Studienobjekt für die Transkription von sehr nahe beieinanderliegenden Genen [175], [176]. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen die Vermutung nahe, dass beide Enzyme nicht der gleichen epigenetischen Modifikation unterliegen: HLE und Huh7 Zellen zeigten für beide Enzyme ein sehr ähnliches Verteilungsmuster der Genexpression nach den verschiedenen Stimulationen, wohingegen in den

Zelllinien HepG2 und AKN1 dies eher nicht zu erkennen war (*cave* keine statistisch relevanten Expressionsunterschiede). Bei der Analyse der Genexpression ist zu bedenken, dass durch das technisch nötige Probenpooling die Probenanzahl um den Faktor 3 verkleinert wurde und daher unter Umständen bei einer größeren Stichprobe doch eine statistische Signifikanz erreicht werden könnte. Sicher ist jedoch, dass die Expression von CYP3A7 in allen getesteten Zelllinien besser erhalten blieb als die von CYP3A4 (11- 26 % versus 0- 6 % von pHs). Ein Grund dafür könnte sein, dass CYP3A7 vor allem in der Fetalperiode (undifferenzierte Gewebe) eine Rolle spielt und nach der Geburt quantitativ weniger wird [177]. Die Expression von CYP3A4 und 3A7 wird über intrazelluläre Rezeptoren reguliert [182]. Krusekopf *et al.* konnten bereits zeigen, dass verschiedene Induktoren ebenfalls abweichende Auswirkungen auf beide Enzyme haben [183].

4.2. Kritik an Methodik

4.2.1. Harnstoffzyklus und Normierung mittels SRB

Nicht oder kaum vorhandene Genexpression von NAGS, ARG1 und OTC trotz messbarer Harnstoffproduktion wurde sowohl in der Zelllinie AKN1 als auch in HLE und HepG2 Zellen beobachtet. In allen Zelllinien wirkte die Behandlung mit Azacytidin produktionsfördernd und eine deutlich erhöhte Harnstoffproduktion pro Zelle konnte nachgewiesen werden. In AKN1 und HepG2 Zellen stiegen nach Stimulation sowohl CPS1- und NAGS- als auch ARG1-Expression. In HLE Zellen sank erstere und die letzteren beiden stiegen ebenfalls an. Da CPS1 als geschwindigkeitsbestimmender Schritt des Harnzyklus gilt und durch das Produkt von NAGS allosterisch aktiviert wird, könnte dies vermutlich die erhöhte Harnstoffkonzentration unter Azacytidinbehandlung erklären [4]. Die allosterische Aktivierung von CPS1 zeigte eine größere Bedeutung für die Harnstoffproduktion als das alleinige Vorhandensein des Enzyms, da CPS1 ohne Aktivator nahezu inaktiv vorliegt und erst durch N-Acetylglutamat nach dem „Alles- oder Nichts“-Prinzip aktiv wird [4]. Eine Produktionssteigerung durch allosterische Aktivierung der CPS1 durch N-Acetylglutamat lag also in den Zelllinien HepG2, HLE und AKN1 nach Azacytidinstimulation nahe. Allerdings scheint die Höhe der Steigerung in Anbetracht der sehr geringen

Mengen an mRNA für NAGS, ARG1 und OTC äußert fragwürdig. Des Weiteren konnte in Huh7 Zellen durch Azacytidin eine erhöhte Harnstoffproduktion trotz Verminderung der CPS1-Transkription bei ähnlicher Menge an vorhandener NAGS-mRNA gemessen werden. Dies führte zu einer genaueren Betrachtung der verwendeten Methoden: Aufgrund des sehr niedrigen und nicht zuverlässig nachweisbaren Proteingehalts aller Zelllinien (Messung nach Lowry) wurde statt der häufig praktizierten Normierung auf mg Protein eine Normierung mittels SRB-Messung auf die Zellzahl gewählt. Für diesen Zweck wurde für jede Zelllinie eine Standardkurve etabliert (siehe Methoden), mit deren Hilfe die Zellzahl in den Wells der Lochplatten ermittelt werden konnte. Dabei wurde nicht beachtet, dass unter Stimulation sich die Zellmorphologie und -zusammensetzung verändern kann [56], [76], [83]. Es ist somit fragwürdig inwiefern die Standardkurven für behandelte Zellen gelten und daher ist eine Verfälschung der Ergebnisse nicht auszuschließen. Als Erfinder der SRB-Messung postulierten Skehan *et al.* außerdem, dass die Fixierung der Zellen mittels Ethanol oder Methanol zu Fixationsartefakten führen könnte [167]. Des Weiteren werden der Harnstoffmessung von Jung *et al.* Ungenauigkeiten für niedrige Harnstoffkonzentrationen und Phenolrot enthaltendes Medium bei einer Absorptionsmessung bei 505 nm nachgesagt [184]. Die hier durchgeführten Protokolle sind trotz ihrer vorhandenen Fehlerquellen in der Forschung etabliert [33], [185]. Es sollten daher auch alternative Transkriptionsvarianten und Isotypen von den getesteten Enzymen, welche in dieser Arbeit nicht erfasst wurden, in Betracht gezogen werden. Zum Beispiel zeigte ARG1 in den Zelllinien HepG2, HLE und AKN1 vereinfacht keine Expression (stets unter 2,5 % der Expression von pHHs) und doch konnte eine Harnstoffproduktion gemessen werden. ARG1 ist leberspezifisch und ist Teil des Harnstoffzyklus, wohingegen Arginase 2 (ARG2) ein extrahepatisch exprimiertes Enzym ist, aber die gleiche Reaktion katalysieren kann [186]. Spector *et al.* entdeckten 1981 Arginase 2 in Nierengewebe, womit sie die Frage, warum ARG1-defiziente Patienten weiterhin gewisse Mengen an Harnstoff synthetisierten, beantworten konnten [187]. Eine Überexpression von Arginase 2 konnte erst kürzlich in bestimmten Pankreastumoren festgestellt

werden [188]. Möglicherweise werden auch in hepatischen Tumorzellen alternative Stoffwechselwege zur Harnstoffproduktion begangen. So gibt es ebenfalls zwischen 4 von 5 Enzymen des Harnstoffzyklus und der Nukleinsynthese eine evolutionäre Verwandtschaft (Ausnahme Arginase) [9]. Zum Beispiel kann CPS2 ebenfalls Carbamoylphosphat herstellen, wobei im Gegensatz zu CPS1 Glutamin als Stickstoffdonor benötigt wird [9]. Diese Alternativen sind allerdings hier nur Spekulationen und könnten Ansatz weiterer Untersuchungen sein. Ebenso wie die Frage, ob Veränderungen auf Ebene der Translation und damit des Proteingehalts die Diskrepanz zwischen Harnstoffproduktion und Genexpression erklären könnten.

4.2.2. Phase I- und II-Aktivitätsmessung

Die Ergebnisse der Cytochromaktivitäten zeigten zusammengefasst nicht viele statistisch signifikante Unterschiede. In allen getesteten Zelllinien wirkten sich Aza20 und Aza10+VitC0,5 positiv auf CYP2C9-Aktivität aus. Dazu zeigten AKN1 Zellen noch eine Steigerung der GST-Aktivität und Huh7 Zellen der GST- sowie der CYP1A1/2-Aktivität unter Aza20-Inkubation. HLE Zellen präsentierten zusätzlich ebenfalls CYP1A1/2-Aktivitätssteigerung, aber auch UGT-Aktivitätsverminderung unter Aza20. Die einzige signifikante Änderung durch VitC1 war eine Verminderung der CYP2E1-Aktivität in der Zelllinie HLE. Wenn man die angewandte Methode genauer betrachtet, gibt es durchaus Diskussionspunkte: Zur Charakterisierung der Biotransformation mussten in der fluorometrischen Aktivitätsmessung DMSO und Acetonitril zum Lösen der Indikatorstoffe verwendet werden. Letztendlich waren Konzentrationen von 2,6 % DMSO für CYP1A1, 2,4 % DMSO und 0,19 % Acetonitril für CYP2E1 bzw. 3A4, 0,3 % DMSO für CYP2C9, 0,2 % DMSO für UGT und 0,25 % DMSO für GST nötig (siehe Tabelle 4). Seit mehreren Jahren sind organische Lösungsmittel bekannt, Phase I- und II-Enzyme zu beeinflussen: DMSO kann bereits ab einer Konzentration von 0,1- 1 % die Aktivität verschiedener Cytochrome reduzieren (u.a. CYP2C9, CYP2E1 und CYP3A4), aber auch andere Lösungsmittel zeigen Einfluss auf die Aktivitäten z.B. CYP1A1- Aktivitätsreduktion um 26 % unter 0,3 % Acetonitril und bei höheren Konzentrationen auch Supprimierung von u.a. CYP3A4 und 2C9 [189]–[194]. Unerwarteterweise konnte allerdings in der

Literatur auch ein Nachweis für die Erhöhung der Cytochromaktivität nach mehrwöchiger Inkubation mit 1 % DMSO in Huh7 Zellen erbracht werden [93]. Eine Enzyminhibition durch organische Lösungsmittel kann in dieser Arbeit somit nicht ausgeschlossen werden. Ein alternatives Protokoll zur Verminderung der organischen Reagenzien in der Enzymaktivitätsmessung ist durchaus erstrebenswert, damit Störfaktoren minimiert werden können. Des Weiteren sind die verschiedenen Indikatorstoffe zur fluorometrischen Detektion der Cytochromaktivität nicht spezifisch für die einzelnen Enzyme. 7-EC wird von mehreren Subtypen der CYP1, 2 und 3-Familie umgesetzt [162], [195], [196]. DBF wird von verschiedenen Autoren für mehrere Subtypen der CYP2 und 3-Familie benutzt [162], [197], [198]. Gleiches wird für MFC durch mehrere CYP2-Subtypen in der Literatur postuliert [162], [197], [198]. BFC wird sehr häufig als Substrat für CYP3A4 eingesetzt, ist allerdings auch durch andere Subtypen abhängig von Konzentration und Derivat umsetzbar [199], [200]. 4-MU wird von sehr vielen Isoformen der UGT umgesetzt und ist damit keinesfalls spezifisch für einen einzelnen Subtyp [192]. Da die Substrate der Aktivitätsmessung unspezifisch sind, zeigten sich häufig Diskrepanzen zwischen Ergebnissen der Aktivität und Genexpression der Cytochrome. Die Aktivitätsmessung ist daher besser als Screeningtest für enzymatische Aktivität von Biotransformationsenzymen anzusehen. Außerdem sind auch andere Subtypen der GST-Familie zu bedenken. GSTA1 wurde hier willkürlich für die Analyse der Genexpression festgelegt, da die GSTA-Familie eine der häufig vorkommenden GST-Subtypen ist (GSTM und GSTP kommen in etwa gleich häufig vor) [16]. Diese Kritikpunkte erschweren die Interpretation der Ergebnisse für Phase I- und II-Enzyme und in weiteren Untersuchungen sollten zur Bestätigung der Ergebnisse spezifische Reaktionen mittels sensitiverer Verfahren getestet werden (z.B. 1 β -Hydroxylierung von Testosteron durch CYP3A4 mittels Chromatographie [201]) und/oder Western Blot-Analysen zur Objektivierung der Proteinmenge durchgeführt werden.

4.2.3. LDH-Messung

Die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung von LDH mittels *Fluitest LDH-L Kit* sind eher als Tendenz zu betrachten, da die Herstellerfirma dieses

Testsystem nur für Blutserum und -plasma entwickelt hat [160]. Eine Interferenz durch Bestandteile des Kulturmediums oder Zellfragmente im Überstand kann daher nicht ausgeschlossen werden und liegt sogar nahe, denn selbst unbehandelte Zellen zeigten schon etwa 20 % der maximalen LDH-Ausschüttung. Ein Protokoll mit einer alternativen Methodik zur Messung der Freisetzung von LDH oder der Aminotransferasen (AST und ALT) sollte zur Toxizitätsbestimmung etabliert werden, ist aber bei geringen sezernierten Mengen häufig nicht anwendbar. In dieser Arbeit wurde die LDH-Messung in Zusammenschau mit Mikroskopie und Resazurinkonversion bewertet und liefert daher trotz nicht ausschließbarer Fehlerquellen deutliche Hinweise in Bezug auf Toxizität und Zellviabilität.

4.2.4. Multiple Nebenbanden in der mRNA-Analyse

Das Auftreten von unspezifischen Nebenprodukten in der Gelelektrophorese konnte in den Zelllinien für fast alle Zielgene beobachtet werden, allerdings konnte bei den meisten Fällen das gewünschte Produkt der PCR festgestellt werden (Beispiel siehe Abbildung 39).

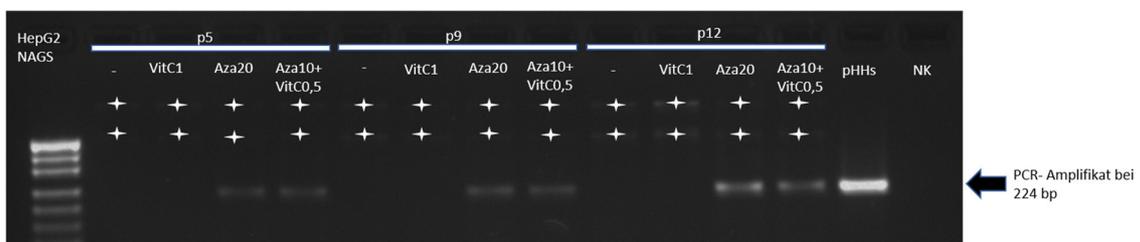


Abbildung 39 Beispiel für Nebenbanden in der Gelelektrophorese anhand der semiquantitativen PCR für die N-Acetylglutamat-Synthase (NAGS) in HepG2 Zellen.

Man kann je nach Stimulation und Zellpassage mehr oder weniger deutliche Nebenbanden in allen Proben von HepG2 Zellen feststellen. Keine Nebenbanden in der Probe der primären humanen Hepatozyten (pHHs).

p= Zellpassage, -= unstimuliert, NK= Negativkontrolle, + = Markierung der Nebenbanden

Es ist bekannt, dass bei sehr geringen Mengen an cDNA in der Probe unspezifische Primerbindung gehäuft stattfinden kann [202]. Dieses Phänomen konnte für die Gene (CYP1A1/2, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4/7, UGT1A6, GSTA1, CPS1, ASS1, ARG1, NAGS, OTC, Albumin und DNMT1/3A/3B) in variabler Ausprägung je Zelllinie, Stimulation und Zellpassage beobachtet werden. Aufgrund der hohen Probenanzahl wurde auf eine aufwendige Optimierung für jede Probe einzeln verzichtet und für alle Versuche

ausschließlich die durch pHs ermittelten, optimalen PCR-Charakteristika verwendet.

4.3. Referenzwert der primären humanen Hepatozyten

Als weiteren Diskussionspunkt muss die Bemessung der Normalwerte für primäre Hepatozyten angesehen werden. Betrachtet man zum Beispiel die CYP3A4-Aktivität in der Zelllinie Huh7 so wird eines deutlich: Der Vergleichswert von pHs scheint geringer zu sein als in der bisherigen Literatur beschrieben (z.B. [93], [203]), denn selbst unbehandelte Huh7 Zellen zeigten in dieser Arbeit trotz Streuung der Messwerte eine fast normwertige HFC-Produktion. Für die Enzyme der Biotransformation wurden 9 Leberspenden mit jeweils 3-6 Replikaten und für die Harnstoffproduktion wurden 6 verschiedene Spenden mit jeweils 3-6 Replikaten als hepatozytärer Vergleichswert bemessen. Für die PCR wurden insgesamt 15 Proben von primären humanen Hepatozyten gepoolt. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Funktionalität von Hepatozyten, welche von der Variabilität der Spender aber auch von der sorgfältigen Isolation abhängig waren [12], [13], [91], [102]. Daher ist ein allgemeingültiger Hepatozytenreferenzwert schwer definierbar. In der Folge ist es durchaus möglich, dass die gemessenen Normalwerte für Hepatozyten von bereits in der Literatur festgehaltenen Werten abweichen, weil alle Hepatozytenspenden gleich berücksichtigt wurden und somit auch Spender mit einer geringen Aktivität eingeschlossen wurden.

4.4. Epigenetisch modifizierte Zelllinien in präklinischen Studien

Betrachtet man die Ergebnisse für die Enzymaktivitäten und Genexpressionen der Phase I- und II-Enzyme, wird deutlich, dass mit der hier eingesetzten epigenetischen Modifikation keine optimale Alternative für primäre humane Hepatozyten in präklinischen Tests geschaffen wurde. Es zeigten sich nur vereinzelt signifikante Unterschiede in der Enzymaktivität, welche sowohl Steigerungen als auch Verminderungen durch Stimulation aufzeigten. Am aussichtsreichsten zeigte sich die Zelllinie HepG2, da sich alle Aktivitäten und Expression der getesteten Enzyme (einzige Ausnahme CYP3A7) unter Aza20 steigern ließen. HepG2 Zellen konnten nach Aza20-Stimulation (genauso wie

Huh7 Zellen) in 4 von 6 untersuchten Stoffumwandlungsprozessen Werte erreichen, welche vergleichbar mit basalen pHs waren. Trotzdem ist zu beachten, dass CYP3A4, CYP2C9 und CYP1A2 mit weniger als 4 % von pHs in HepG2 Zellen exprimiert wurden. Die höchsten Genexpressionen ohne Stimulation zeigte hingegen die Zelllinie Huh7, wobei die wichtigen Enzyme der CYP3-Familie etwas mehr in der Zelllinie HLE exprimiert wurden (CYP3A4 3,7 % und CYP3A7 0,9 % mehr in HLE Zellen). Durch Stimulation mit Azacytidin wurden geringere Expressionen beider Enzyme in HLE und Huh7 Zellen gemessen und daher scheinen HepG2 oder auch AKN1 Zellen, welche beide nur eine Suppression für CYP3A7 zeigten, geeigneter für Arzneimitteltests. AKN1 Zellen wiederum zeigten auch für CYP1A2, GSTA1 und UGT1A6 eine unerwünschte Expressionsverminderung nach Aza20-Stimulation. Außerdem zeigte die Zelllinie HepG2 im Vergleich zu AKN1 Zellen quantitativ betrachtet meist höhere oder aber mindestens nahezu gleiche Expressionen unter Aza20 und wirkt daher am geeignetsten in Zukunft ihren Metabolismus noch weiter steigern zu lassen.

Es ist anzunehmen, dass zukünftig weitere Regulationsmechanismen und damit Wege zur Beeinflussung von Stoffwechselwegen entdeckt werden.

So konnte bereits auch ein Einfluss von Histondeacetylasen auf die CPS1-Aktivität und eine posttranskriptionale wie posttranslationale Regulation von CYP3A4 durch miRNA nachgewiesen werden [11], [204], [205]. Dies bekräftigt die noch weitgehend unterforschten Möglichkeiten im Feld der Epigenetik, funktionelle Zellen aus Zelllinien herzustellen.

Eine andere Möglichkeit zur Erhöhung der Genexpression und damit letztendlich auch der Enzymaktivität könnte die bekannte Induzierbarkeit der Cytochrom P450-Enzyme wie zum Beispiel für CYP3A4 durch Rifampicin, Phenobarbital und Dexamethason (die ersten beiden Substanzen induzieren auch CYP2C9 und UGT) oder für CYP2E1 durch Ethanol und für CYP1A2 durch Omeprazol liefern [12], [206]–[208]. Viele Phase I- und II-Enzyme sind auch bereits in Zelllinien bekannt (insbesondere viele in HepG2 Zellen erforscht) durch Aktivierung von intrazellulären Rezeptoren wie unter anderem

dem Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor, Pregnan-X-Rezeptor und konstitutiven Androstan-Rezeptor hochreguliert zu werden [145], [147], [209]–[211]. Ebenso bietet die Art der Kultivierung eine weitere Strategie Enzymexpressionen und -aktivitäten zu beeinflussen. So konnten Doostdar *et al.* bereits 1988 zeigen, dass die Wahl des Kulturmediums die Enzymaktivitäten von Cytochromen deutlich beeinflussen kann, denn HepG2 Zellen kultiviert in DMEM zeigten eine deutlich niedrigere Substratumwandlung als HepG2 Zellen kultiviert in Williams E-Medium oder Earle's Medium (zum Beispiel Ethoxyresorufin-O-Dealkylation 47mal höher in Earle's Medium als in DMEM) [212]. Des Weiteren bewiesen Terashima *et al.* 2015, dass Unterschiede in der Genexpression von CYP1A1/2 und deren Regulation zwischen 2D und 3D Kulturen von verschiedenen Zelllinien bestehen (unter anderem HepG2 und Huh7 Zellen), wobei eine höhere Expression in 3D Kultur erreicht wurde [213].

Es wird deutlich, dass der Zellstoffwechsel und dessen komplexe Regulation viele weitere, bisher noch nicht ausgeschöpfte Möglichkeiten zur Optimierung des Metabolismus bieten. Es ist weiterhin zu hoffen, dass durch zukünftige Forschungen ein Protokoll zur Herstellung eines metabolischen adäquaten Ersatzes für pHHS aus Zelllinien erstellt werden kann.

4.5. Zelllinien als Leberunterstützungssysteme

Insbesondere die Zelllinien AKN1 und Huh7 zeigten durch Azacytidinbehandlung eine hohe Harnstoffsynthese, welche auf mit pHHS vergleichbare Werte bzw. höhere Werte gesteigert werden konnten. Daher zeigten diese beiden Zelllinien ein hohes Potential zur Neutralisierung von Ammoniak im Körper. Erhöhte Ammoniakkonzentrationen treten bei Patienten mit Störungen des Harnstoffzyklus (am häufigsten OTC-Mangel) und des Aminosäuretransports, aber auch bei Patienten mit akutem und chronischem Leberversagen unterschiedlichster Ätiologie auf [4], [6], [214].

Ammoniak wirkt neurotoxisch, wobei der genaue Schädigungsmechanismus noch nicht vollständig geklärt ist [4]. Die sogenannte hepatische Enzephalopathie bei Patienten mit Leberversagen hat ihren Auslöser neben der Überlastung des Organismus mit Ammoniak auch dem Anstieg anderer ZNS-

toxischer Substanzen im Blut zu verdanken, da die Hepatozyten aufgrund ihrer Schädigung nicht mehr ausreichend den Harnstoffzyklus und andere Exkretionsfunktionen betreiben können [6], [215]. Die Behandlung der hepatischen Enzephalopathie beinhaltet unter anderem die Beseitigung von auslösenden Faktoren wie die Vermeidung bzw. Behandlung von gastrointestinale Blutungen und Infektionen (Proteinabbau als Hauptquelle von Ammoniak) [6]. Die Ammoniakbildung bzw. -resorption von Darmflorabakterien kann mithilfe von Rifaximin (nicht resorbierbares Antibiotikum), Neomycin (Antibiotikum) oder Laktulose/Laktitol (Disaccharid), welche zur Unterdrückung der ammoniakbildenden Flora und pH-Absenkung im Darm führt (vermehrte Bildung von schlecht resorbierbarem NH_4), gesenkt werden [6]. Die intravenöse Gabe von L-Ornithin-Aspartat sowie der Einsatz von Arginin oder Citrullin, welche beide in der Therapie der Hyperammonämie bei Harnstoffzyklusdefekten eingesetzt werden, sollen den Harnstoffzyklus anregen und wie Natriumbenzoat, Natriumphenylbutyrat, Phenylacetat (Bindung von stickstoffhaltigen Verbindungen) zur Senkung des Ammoniakspiegels beitragen [6], [9], [214]. Eiweißarme Ernährung wird in der Therapie von Harnstoffzyklusdefekten und Leberversagen empfohlen [6], [9], [214]. Forcierte Diurese oder Dialyse zeigen ebenfalls eine Möglichkeit zur Ammoniakentfernung [214]. Ultima Ratio bei akutem oder chronischem Leberversagen ist die Lebertransplantation [6]. Ziel aller dieser therapeutischen Maßnahmen ist es den Ammoniakspiegel im Körper zu senken. Eine dauerhafte Alternative könnten hier modifizierte hepatozelluläre Zelllinien mit hohen Metabolisierungsraten des Harnstoffzyklus liefern. Forschung über Leberersatzverfahren wird bereits seit mehreren Jahrzehnten durchgeführt und noch hat sich kein System so etablieren können wie die Lebertransplantation. Trotzdem wird weiter geforscht, da Spenderorgane rar sind und eine Transplantation an sich ein hoch invasiver Eingriff und die Komplikationen nicht zu unterschätzen sind [216]. Die zwei größten Probleme, die durch Ersatzverfahren zu bewerkstelligen sind, sind zum einen die Integration von Zellen in den Empfänger und zum anderen eine Quelle zu finden, die Zellen mit hohem Metabolismus reproduzierbar und zuverlässig liefert [216].

Leberunterstützungssysteme können entweder komplett künstlich oder biologisch-künstlich sein; sie sollten idealerweise in der Lage sein die Detoxifikations-, Synthese- und Regulationsaufgaben der Leber zu übernehmen [216]. Das erprobteste Verfahren ist die extrakorporale Detoxifikation (nur teilweiser Ersatz der Leberfunktion) und basiert auf der Annahme, dass durch das Leberversagen toxische Stoffe im Blut akkumulieren, wobei viele davon an Albumin gebunden zu sein scheinen [217]. Seit den 90er Jahren sind einige Systeme bis zur klinischen Phase der Entwicklung gekommen. Die bekanntesten künstlichen Leberunterstützungssysteme scheinen MARS (*Molecular Adsorbent Recirculation System*), SPAD (*Single-Pass Albumin Dialyse*) und Prometheus zu sein [6], [215].

Sinn und Zweck solcher Systeme ist es, Patienten mit Leberversagen am Leben zu erhalten bis entweder die Leber sich selbst regeneriert hat oder ein passendes Spenderorgan gefunden werden kann, sogenanntes „*bridging*“ (Überbrückung) [216]. In der Forschung gibt es viele verschiedene innovative Ideen zum kompletten Ersatz der Leberfunktionen, unter anderem entwickelten Sussman *et al.* bereits 1992 ein extrakorporales System aus einer humanen Leberkrebszelllinie [216], [218]. Der Einsatz von epigenetisch modifizierten Zellen liefert hier eine neue Option zur Erhöhung der Metabolisierungsraten. Welche weiteren Leberfunktionen wie beispielsweise Glukose- und Gerinnungsfaktorensynthese neben Ammoniakexkretion durch stimulierte AKN1 oder Huh7 Zellen noch übernommen werden könnten, bleibt hier ungeklärt. Im Anbetracht der Tatsache, dass Huh7 Zellen im Gegensatz zu AKN1 Zellen auch eine Albuminsynthese zeigten, scheint diese Zelllinie für einen Ersatz mehrerer Leberfunktionen das größte Potential zu zeigen. Allerdings zeigten Huh7 Zellen eine Tendenz zur Expressionsverminderung von einigen Enzymen des Harnstoffzyklus und der Biotransformation nach Azacytidinstimulation, was über längere Zeit vermutlich wiederum zu Funktionseinbußen führen würde. Dies und mehr bleibt Gegenstand zukünftiger Forschungen mit einer interessanten Perspektive für Leberunterstützungssysteme bei unterschiedlichen Lebererkrankungen.

4.6. Azacytidin und Vitamin C als Therapie für hepatozelluläre Karzinome

Azacytidin wird bereits in der Chemotherapie von Erkrankungen des hämatopoetischen Systems eingesetzt (siehe Einleitung 1.2.2.2.) [73]. In Zukunft könnten Azacytidin oder dessen Derivate als epigenetische Modifikatoren und der damit verbundenen Wirkung auf den Zellzyklus und den Zellmetabolismus eine eventuelle Alternative in der Therapie des HCC, wie bereits in der Literatur vorgeschlagen wurde, darstellen [23], [24], [56], [82], [219], [220]. Da Azacytidin ein unspezifischer Modifikator der Methylierung ist, kommt es durch Behandlung damit vermutlich zu einer generellen Hypomethylierung in der Zelle; dies wiederum hat eine Reaktivierung von Genen (dies kann neben erwünschten auch unerwünschte Aktivierungen wie beispielsweise Onkogene beinhalten) aber auch eine erhöhte Instabilität der DNA zur Folge [23], [24], [221]. Daher muss der therapeutische Einsatz von Azacytidin zunächst genauestens auf Nutzen und Risiko/unerwünschte Wirkungen geprüft werden. Eventuell können Kombinationstherapien zu mehr Sicherheit und Wirksamkeit beitragen. So konnten Jiang *et al.* zeigen, dass Gadd45 β (ein Protein für die Regulation von Zellwachstum und -tod) nach Behandlung mit einem Histonmodifikator und darauffolgend mit Azacytidin in HepG2 Zellen reaktiviert wird; dieses Phänomen konnte nicht beobachtet werden, wenn zuerst Azacytidin und dann der Histonmodifikator oder beide gleichzeitig administriert wurden [219]. Ilyas *et al.* zeigten eine konzentrationsabhängige Zytotoxizität von Azacytidin in Huh7 Zellen, welche durch Alendronat (Bisphosphonat) verstärkt werden konnte; durch die Kombination war es möglich, trotz Dosisreduktion beider Substanzen gleiche Effekte zu erreichen [220]. In dieser Arbeit zeigte die Kombination beider Modifikatoren in niedrigerer Dosierung ebenfalls oftmals ähnliche Auswirkungen im Vergleich zu alleiniger Azacytidin-Stimulation in höherer Konzentration: In Bezug auf die Zellviabilität und Toxizität zeigten sich keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen beiden Stimulationsansätzen (minimal erhöhte Resazurinkonversion und niedrigere Toxizität unter Aza10+VitC0,5). Eine Expressionsverminderung der DNMT1 konnte in AKN1 und HepG2 Zellen, ebenso wie eine Verminderung der DNMT3A in AKN1 Zellen und der DNMT3B

in HLE Zellen nach Stimulation durch Aza20 sowie Aza10+VitC0,5 herbeigeführt werden. Unter Aza20 zeigte sich zusätzlich eine Expressionsverminderung von DNMT3B in Huh7 Zellen (cave hoher Standardfehler) und unter Aza10+VitC0,5 eine Suppression der DNMT3B in HepG2 Zellen. Die Kombination der Modifikatoren zeigte in Bezug auf die CYP-Aktivität teilweise verschiedene Auswirkungen, jedoch zeigten sich für die Harnstoffproduktion und Genexpression von Enzymen der Biotransformation und des Harnstoffzyklus sowie Albumin zumeist eine vergleichbare Auswirkung. Betrachtet man den Einfluss von Vitamin C auf Tumorwachstum, scheinen Forschungsergebnisse bisher nicht eindeutig zu sein und in dieser Arbeit konnte der bereits kontrovers diskutierte Einfluss von Vitamin C nachvollzogen werden [52], [69], [70], [82], [222]. Vitamin C zeigte hier keinen eindeutigen Einfluss auf die Zellproliferation in mit 1 mM Vitamin C-2-Phosphat behandelten Zellen bei gleichzeitig erhöhter (Zelllinien HLE, AKN1, Huh7) oder erniedrigter (Zelllinie HepG2) LDH-Freisetzung. Einen Einfluss auf die Transkription der DNA-Methyltransferasen zeigte sich nur in einer diskreten Zunahme für alle drei DNMT in AKN1 Zellen, sonst waren deren Expressionsspiegel wie in unbehandelten Zellen (keine statistische Relevanz). Inwiefern der Methylierungsstatus der Zelle durch die Aktivierung von eisen- und ketoglutaratabhängigen Dioxygenasen wie TET-Enzymen beeinflusst wurde, bleibt in dieser Arbeit unbeantwortet. Allerdings können beide hier verwendeten epigenetischen Modifikatoren synergistisch wirken: Sajadian *et al.* zeigten 2016, dass Vitamin C durch Azacytidin herbeigeführte epigenetischen Veränderungen sowie antiproliferative, apoptotische und zytotoxische Effekte verstärken kann [82]. Neuere Forschungen beschäftigen sich ebenfalls mit dem Einfluss von Vitamin C als Verstärker anderer Krebstherapien [82], [222]. Es ist zu hoffen, dass in Zukunft Patienten mit hepatozellulären Tumoren aus weiteren Untersuchungen zur epigenetischen Modifikation profitieren können.

4.7. Schlussfolgerung

Nach Evaluation und Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit komme ich zur Schlussfolgerung, dass mit der hier eingesetzten epigenetischen Modifikation mittels Azacytidin und Vitamin C mit Sicherheit noch keine optimale Alternative

für primäre humane Hepatozyten in präklinischen Tests geschaffen wurde. Allerdings zeigten sich durchaus Veränderungen des Zellmetabolismus, welche insbesondere für die Entgiftung von Ammoniak interessante Perspektiven aufzeigen. Hierfür scheinen die Zelllinien Huh7 oder AKN1 am geeignetsten zu sein, wobei erstere als einzige untersuchte Zelllinie zusätzlich noch relevante Mengen an Albumin herstellte. Im Hinblick auf die Biotransformation konnten hingegen nur signifikante Veränderungen für einzelne Enzyme der Cytochrom P450-Familie gezeigt werden, wobei die Zelllinie HepG2 am meisten Potential als Alternative zu pHHs nach 48-stündiger Modifikation durch 20 μ M 5-Azacytidin zeigte. Durch die relativ neu entdeckte Rolle der Epigenetik in Tumorgenese und Zelldifferenzierung und damit auch im Zellmetabolismus steht in Zukunft ein breites Feld zur Forschung offen. Es ist nicht auszuschließen, dass durch einen anderen Ansatz zur epigenetischen Modifikation oder eine Kombination von verschiedenen Behandlungen hepatozelluläre Zelllinien wieder zu normalem Zellmetabolismus konvertieren und somit dauerhaft verfügbare Zellen für *In-vitro*-Tests oder aber auch Therapiealternativen für Krebspatienten und Leberersatztherapien geschaffen werden könnten.

5. Zusammenfassung

Goldstandard zur Erforschung des Arzneimittelmetabolismus ist der primäre humane Hepatozyt, wobei aufgrund von Spenderknappheit eine optimale Alternative wünschenswert ist. In dieser Arbeit wurden vier Zelllinien (HepG2, Huh7, HLE und AKN1) untersucht, deren Zellmetabolismus mithilfe der epigenetischen Modifikatoren 5-Azacytidin und Vitamin C verbessert werden sollte. Die Stimulation der Zellen erfolgte für 48 Stunden in vier Ansätzen, d.h. unbehandelte Zellen als Kontrolle sowie Inkubation mit 20 μ M 5-Azacytidin oder 1 mM Vitamin C-2-Phosphat oder einer Kombination aus 10 μ M 5-Azacytidin mit 0,5 mM Vitamin C-2-Phosphat. Es wurden repräsentative Marker für Zellfunktionen im Sinne der Exkretion (Biotransformation und Harnstoffzyklus), Synthese (Albumin) und Zellviabilität in Hepatozyten ausgewählt. Anhand etablierter Methoden wurden Ergebnisse zum einen auf der Ebene der Aktivität für die Exkretionsfunktionen (fluorometrische Substanzumwandlung für Enzyme der Biotransformation und Absorptionsmessung für die Harnstoffproduktion) bzw. durch Nachweis von vorhandenem Protein für die Synthesefunktion (Albumin-ELISA mit Lumineszenzdetektion) gesammelt und zum anderen auf Ebene der Genexpression eine Analyse der mRNA (semiquantitative PCR) durchgeführt. Informationen zur Zellviabilität wurden mittels Mikroskopie, Resazurinkonversion und LDH-Messung erlangt. Zusätzlich zur Beurteilung der metabolischen Veränderungen wurden Veränderungen der Genexpression für die DNA-Methyltransferasen nach epigenetischer Modifikation mithilfe von semiquantitativer PCR bestimmt, da die Grundlage dieser Forschungsarbeit auf einer Erhöhung eben dieser Enzyme basierte. Hierfür wurde zunächst eine real-time-PCR mithilfe des „Chromatinarray für Epigenetik-modifizierende Enzyme“ durchgeführt. Es zeigte sich in allen unbehandelten Zelllinien ein verändertes Expressionsmuster der DNA-Methyltransferasen 1, 3A und 3B. In dieser Arbeit konnten keine signifikanten Änderungen derselben auf Ebene des mRNA-Gehalts nach 48-stündiger epigenetischer Modifikation durch Azacytidin oder Vitamin C nachgewiesen werden.

5-Azacytidinbehandlung alleine zeigte im Hinblick auf die Zellviabilität eine Verminderung des Wachstums bei erhöhter Toxizität. Die Kombination von

Azacytidin und Vitamin C-2-Phosphat zeigte diskret schwächere Auswirkungen (ohne statistisch relevanten Unterschied zu alleiniger Azacytidinstimulation). Ergebnisse der Stimulation mit Vitamin C-2-Phosphat alleine waren nicht in allen Zelllinien einheitlich. Beide Substanzen zeigten Potential für eine zukünftige Therapieoption für Patienten mit hepatozellulären Karzinomen. In dieser Arbeit wurden vereinzelt relevante Einflüsse von epigenetischer Stimulation auf die Enzymaktivität der Phase I- und II-Enzyme ohne statistisch signifikante Unterschiede in der Genexpression für verschiedene Zelllinien nachgewiesen. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit zeigte allerdings die Zelllinie HepG2 nach 48-stündiger Modifikation durch 20 μ M 5-Azacytidin das größte Potential zur weiteren Verbesserungen in Hinblick auf die Enzyme der Biotransformation.

Die Harnstoffproduktion ließ sich in allen getesteten Zelllinien mithilfe von Azacytidinstimulation steigern. Wohingegen deutliche Unterschiede in der Genexpression der Enzyme des Harnstoffzyklus in den verschiedenen Zelllinien beschrieben werden konnten (ohne statistische Relevanz). Insbesondere für AKN1 und Huh7 Zellen wurden hohe Harnstoffproduktionen nach Azacytidinstimulation nachgewiesen. Sie könnten daher eine interessante Perspektive für Leberersatzverfahren darstellen.

Albuminsekretion kann nur in Huh7 Zellen nachgewiesen werden, wohingegen nur in HepG2 Zellen eine signifikante Steigerung der Albumingenexpression durch Stimulation mit 20 μ M 5-Azacytidin gezeigt werden konnte.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass mittels des hier durchgeführten Stimulationsprotokolls keine der Zelllinien einen idealen Ersatz für primären humanen Hepatozyten in präklinischen Untersuchungen liefern konnte. Die charakteristische Zusammensetzung des Enzymhaushaltes konnte nicht wiedererlangt werden.

Es ist zu hoffen, dass weitere Forschungen unter anderem im Bereich der Epigenetik innovative Möglichkeiten im Hinblick auf präklinische Arzneimitteltests sowie Therapiemöglichkeiten für Leberkarzinome und Leberversagen liefern.

6. Literaturverzeichnis

- [1] G. Arnold u. a., 2003, *Anatomie*, 8. Auflage, S. 545- 611, T.Schieber und W. Schmidt, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- [2] R. Lüllmann-Rauch, 2009, *Taschenlehrbuch Histologie*, 3. Auflage, S. 393- 408, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York.
- [3] R. Baumann u. a., 2010, *Physiologie*, 6. Auflage, S. 228, 370- 374, 469-485, 434- 435, R. Klinke, H.-C. Pape, A. Kurtz und S. Silbernagl, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York.
- [4] S. Ansorge u.a., 2014, *Löffler/Petrides Biochemie & Pathobiochemie*, 9. Auflage, S. 313- 356, 770- 786, 845, P. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- [5] Aigner T. u. a., 2012, *Pathologie*, 5. Auflage, S. 626- 628, 641- 642, 655-657, W. Böcker, H. Denk, P. U. Heitz, G. Höfler, H. Kreipe und H. Moch, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München.
- [6] Gerd Herold und Mitarbeiter, 2013, *Innere Medizin*, S. 542- 563, Dr. med. Gerd Herold, Gerd Herold Köln.
- [7] G. E. Shambaugh, „Urea biosynthesis I. The urea cycle and relationships acid cycle¹ 2“, *Nutrition*, Bd. 30, Nr. 12, S. 2083–2087, 1977.
- [8] D. Nelson und M. Cox, 2011, *Lehninger Biochemie*, 4. Auflage, S. 902-910, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [9] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer und G. J. Gatto Jr., 2013, *Stryer Biochemie*, 7. Auflage, S. 681- 713, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [10] L. Caldovic u. a., „Restoration of ureagenesis in N-acetylglutamate synthase deficiency by N-carbamylglutamate“, *J. Pediatr.*, Bd. 145, Nr. 4, S. 552–554, 2004.
- [11] T. Nakagawa und L. Guarente, „Urea cycle regulation by mitochondrial sirtuin, SIRT5.“, *Aging (Albany. NY)*., Bd. 1, Nr. 6, S. 578–81, 2009.
- [12] T. Herdegen, R. Böhm, N. Cimin- Bredée, und J. Culman, 2010, *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*, 2. Auflage, S. 6-32, 442-444, 457-459, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York.
- [13] S. Rendic und F. J. Di Carlo, „Human Cytochrome P450 Enzymes: A Status Report Summarizing Their Reactions, Substrates, Inducers, and Inhibitors“, *Drug Metab. Rev.*, Bd. 29, Nr. 1–2, S. 413–580, 1997.
- [14] S. Yoshitomi, K. Ikemoto, J. Takahashi, H. Miki, M. Namba, und S. Asahi, „Establishment of the transformants expressing human cytochrome P450 subtypes in HepG2, and their applications on drug metabolism and toxicology“, *Toxicol. Vitr.*, Bd. 15, Nr. 3, S. 245–256, Juni 2001.
- [15] F. P. Guengerich, „Cytochrome P450 and chemical toxicology“, *Chem. Res. Toxicol.*, Bd. 21, Nr. 1, S. 70–83, 2008.
- [16] W. E. Evans, „Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics“, *Science*, Bd. 286, Nr. 5439, S. 487–491, Okt. 1999.
- [17] S. S. T. Lee, J. T. M. Buters, T. Pineau, P. Fernandez-Salguero, und F. J. Gonzalez, „Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 271, Nr. 20, S. 12063–12067, 1996.
- [18] S. Rendic und F. J. Di Carlo, „Human Cytochrome P450 Enzymes: A Status Report Summarizing Their Reactions, Substrates, Inducers, and Inhibitors“, *Drug Metab. Rev.*, Bd. 29, Nr. 1-2, S. 413-580, 1997.

- [19] G. Egger, G. Liang, A. Aparicio, und P. A. Jones, „Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy“, *Nature*, Bd. 429, Nr. 6990, S. 457–463, Mai 2004.
- [20] T. Acun, E. Oztas, T. Yagci, und M. C. Yakicier, „SIP1 is downregulated in hepatocellular carcinoma by promoter hypermethylation.“, *BMC Cancer*, Bd. 11, Nr. 1, S. 223, Jan. 2011.
- [21] E. L. Sceusi, D. S. Loose, und C. J. Wray, „Clinical implications of DNA methylation in hepatocellular carcinoma.“, *HPB (Oxford)*., Bd. 13, Nr. 6, S. 369–76, Juni 2011.
- [22] S. Khare, Q. Zhang, und J. A. Ibdah, „Epigenetics of hepatocellular carcinoma: Role of microRNA“, *World Journal of Gastroenterology*, Bd. 19, Nr. 33, S. 5439–5445, 2013.
- [23] W. ren Liu, Y. hong Shi, Y. fei Peng, und J. Fan, „Epigenetics of hepatocellular carcinoma: A new horizon“, *Chinese Medical Journal*, Bd. 125, Nr. 13, S. 2349–2360, 2012.
- [24] L. Ma, M. S. Chua, O. Andrisani, und S. So, „Epigenetics in hepatocellular carcinoma: An update and future therapy perspectives“, *World Journal of Gastroenterology*, Bd. 20, Nr. 2, S. 333–345, 2014.
- [25] C. Braconi *u. a.*, „microRNA-29 can regulate expression of the long non-coding RNA gene MEG3 in hepatocellular cancer.“, *Oncogene*, Bd. 30, Nr. 47, S. 4750–6, Nov. 2011.
- [26] L. O. Dannenberg und H. J. Edenberg, „Epigenetics of gene expression in human hepatoma cells: expression profiling the response to inhibition of DNA methylation and histone deacetylation.“, *BMC Genomics*, Bd. 7, S. 181, 2006.
- [27] Y. Saito *u. a.*, „Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas.“, *Int. J. cancer*, Bd. 105, Nr. 4, S. 527–32, Juli 2003.
- [28] J. M. Foulks *u. a.*, „Epigenetic Drug Discovery: Targeting DNA Methyltransferases“, *J. Biomol. Screen.*, Bd. 17, Nr. 1, S. 2–17, 2012.
- [29] M. Ivanov, I. Barragan, und M. Ingelman-Sundberg, „Epigenetic mechanisms of importance for drug treatment“, *Trends Pharmacol. Sci.*, Bd. 35, Nr. 8, S. 384–396, 2014.
- [30] L. Peng und X. Zhong, „Epigenetic regulation of drug metabolism and transport“, *Acta Pharm. Sin. B*, Bd. 5, Nr. 2, S. 106–112, 2015.
- [31] J. Y. Kim, M. R. Ahn, D. K. Kim, und Y. Y. Sheen, „Histone deacetylase inhibitor stimulate CYP3A4 proximal promoter activity in HepG2 cells“, *Arch Pharm Res*, Bd. 27, Nr. 4, S. 407–414, 2004.
- [32] D. F. Dluzen *u. a.*, „Regulation of UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 Expression and Activity by MicroRNA 491-3p.“, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Bd. 348, Nr. 3, S. 465–77, 2014.
- [33] C. Seeliger *u. a.*, „Decrease of global methylation improves significantly hepatic differentiation of Ad-MSCs: Possible future application for urea detoxification“, *Cell Transplant.*, Bd. 22, Nr. 1, S. 119–131, 2013.
- [34] H. Liu, H. Dong, K. Robertson, und C. Liu, „DNA methylation suppresses expression of the urea cycle enzyme carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1) in human hepatocellular carcinoma“, *Am. J. Pathol.*, Bd. 178, Nr.

- 2, S. 652–661, 2011.
- [35] M. S. Bartolomei und S. M. Tilghman, „GENOMIC IMPRINTING IN MAMMALS“, *Annu. Rev. Genet.*, Bd. 31, S. 493–525, Nov. 1997.
- [36] A. Bird, „DNA methylation patterns and epigenetic memory DNA methylation patterns and epigenetic memory“, *Genes Dev.*, Bd. 16, Nr. 1, S. 6–21, 2002.
- [37] A. P. Bird, „CpG-rich islands and the function of DNA methylation.“, *Nature*, Bd. 321, Nr. 6067, S. 209–13, Jan. 1986.
- [38] M. Esteller, „Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome.“, *Hum. Mol. Genet.*, Bd. 16, Nr. R1, S. R50-9, Apr. 2007.
- [39] A. Hermann, S. Schmitt, und A. Jeltsch, „The human Dnmt2 has residual DNA-(Cytosine-C5) methyltransferase activity“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 278, Nr. 34, S. 31717–31721, 2003.
- [40] G.-D. Kim, J. Ni, N. Kelesoglu, R. J. Roberts, und S. Pradhan, „Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases.“, *EMBO J.*, Bd. 21, Nr. 15, S. 4183–95, Aug. 2002.
- [41] J. K. Kim, M. Samaranyake, und S. Pradhan, „Epigenetic mechanisms in mammals“, *Cell. Mol. Life Sci.*, Bd. 66, Nr. 4, S. 596–612, 2009.
- [42] S. Pradhan, A. Bacolla, R. D. Wells, und R. J. Roberts, „Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation.“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 274, Nr. 46, S. 33002–10, Nov. 1999.
- [43] I. Rhee u. a., „DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells.“, *Nature*, Bd. 416, Nr. 6880, S. 552–6, 2002.
- [44] P. a Jones und S. B. Baylin, „The fundamental role of epigenetic events in cancer.“, *Nat. Rev. Genet.*, Bd. 3, Nr. 6, S. 415–28, 2002.
- [45] L. Lopez-Serra und M. Esteller, „Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words.“, *Br. J. Cancer*, Bd. 98, Nr. 12, S. 1881–5, Juni 2008.
- [46] P. C. Taberlay und P. A. Jones, „DNA methylation and cancer.“, *Prog. drug Res. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progrès des Rech. Pharm.*, Bd. 67, S. 1–23, Jan. 2011.
- [47] T. Miyake, K. Endo, S. Honjo, Y. Hirooka, und M. Ikeguchi, „Expression of DNA Methyltransferase (DNMT) 1, 3a and 3b proteins in human hepatocellular carcinoma“, *Yonago Acta Med.*, Bd. 53, Nr. 1, S. 1–7, 2010.
- [48] R. J. Klose und A. P. Bird, „Genomic DNA methylation: the mark and its mediators.“, *Trends Biochem. Sci.*, Bd. 31, Nr. 2, S. 89–97, März 2006.
- [49] S. Takamizawa, Y. Maehata, K. Imai, H. Senoo, S. Sato, und R. I. Hata, „Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells“, *Cell Biol. Int.*, Bd. 28, S. 255–265, 2004.
- [50] G. Drouin, J.-R. Godin, und B. Page, „The Genetics of Vitamin C Loss in Vertebrates“, *Curr. Genomics*, Bd. 12, Nr. 5, S. 371–378, 2011.
- [51] A. Monfort und A. Wutz, „Breathing-in epigenetic change with vitamin C.“, *EMBO Rep.*, Bd. 14, Nr.4, S. 337–46, 2013.

- [52] S. Ohno, Y. Ohno, und N. Suzuki, „High-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy in the treatment of patients with advanced cancer“, *Anticancer Research*, Bd. 29, Nr. 3, S. 809–15, 2009.
- [53] K. Blaschke *u. a.*, „Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells.“, *Nature*, Bd. 500, S. 222–6, 2013.
- [54] T.-L. Chung *u. a.*, „Vitamin C promotes widespread yet specific DNA demethylation of the epigenome in human embryonic stem cells.“, *Stem Cells*, Bd. 28, Nr. 10, S. 1848–1855, 2010.
- [55] J. Chen *u. a.*, „Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming.“, *Nat. Genet.*, Bd. 45, S. 1504–9, 2013.
- [56] S. O. Sajadian *u. a.*, „Induction of active demethylation and 5hmC formation by 5-azacytidine is TET2 dependent and suggests new treatment strategies against hepatocellular carcinoma.“, *Clin. Epigenetics*, Bd. 7, Nr. 1, S. 98, 2015.
- [57] E. A. Minor, B. L. Court, J. I. Young, und G. Wang, „Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 288, Nr. 19, S. 13669–13674, 2013.
- [58] M. Tahiliani *u. a.*, „Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1“, *Science*, Bd. 324, Nr. 5929, S. 930–935, 2009.
- [59] M. Mellén, P. Ayata, S. Dewell, S. Kriaucionis, und N. Heintz, „MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system“, *Cell*, Bd. 151, Nr. 7, S. 1417–1430, 2012.
- [60] M. Münzel, D. Globisch, und T. Carell, „5-Hydroxymethylcytosine, the Sixth Base of the Genome“, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, Bd. 50, Nr. 29, S. 6460–6468, 2011.
- [61] L. Shen und Y. Zhang, „5-Hydroxymethylcytosine: generation, fate, and genomic distribution“, *Curr. Opin. Cell Biol.*, Bd. 25, Nr. 3, S. 289–296, Juni 2013.
- [62] R. M. Kohli und Y. Zhang, „TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation“, *Nature*, Bd. 502, Nr. 7472, S. 472–479, 2013.
- [63] Y. Tsukada *u. a.*, „Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins“, *Nature*, Bd. 439, Nr. 7078, S. 811–816, Feb. 2006.
- [64] S. L. Accari und P. R. Fisher, „Emerging Roles of JmjC Domain-Containing Proteins“, in *International Review of Cell and Molecular Biology*, Bd. 319, 2015, S. 165–220.
- [65] P. Falnes, R. F. Johansen, und E. Seeberg, „AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in Escherichia coli“, *Nature*, Bd. 419, Nr. 6903, S. 178–182, 2002.
- [66] R. Ougland *u. a.*, „ALKBH1 is a histone H2A dioxygenase involved in neural differentiation“, *Stem Cells*, Bd. 30, Nr. 12, S. 2672–2682, 2012.
- [67] M. P. Westbye *u. a.*, „Human AlkB homolog 1 is a mitochondrial protein that demethylates 3-methylcytosine in DNA and RNA“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 283, Nr. 36, S. 25046–25056, 2008.
- [68] B. I. Fedeles, V. Singh, J. C. Delaney, D. Li, und J. M. Essigmann, „The AlkB family of Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenases: Repairing nucleic acid alkylation damage and beyond“, *Journal of Biological*

- Chemistry*, Bd. 290, Nr. 34. S. 20734–20742, 2015.
- [69] J. a Migliozi, „Effect of ascorbic acid on tumour growth.“, *Br. J. Cancer*, Bd. 35, Nr. 4, S. 448–53, 1977.
- [70] E. T. Creagan *u. a.*, „Failure of high-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy to benefit patients with advanced cancer. A controlled trial.“, *N. Engl. J. Med.*, Bd. 301, Nr. 13, S. 687–90, 1979.
- [71] H. Sakagami, K. Satoh, Y. Hakeda, und M. Kumegawa, „Apoptosis-inducing activity of vitamin C and vitamin K“, *Cell Mol Biol*, Bd. 46, Nr. 1, S. 129–143, 2000.
- [72] F. Šorm, A. Pískala, A. Čihák, und J. Veselý, „5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic“, *Experientia*, Bd. 20, Nr. 4, S. 202–203, 1964.
- [73] http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000978/WC500050240.pdf. [Zugegriffen: 12-März-2018].
- [74] C. Stresemann und F. Lyko, „Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine“, *Int. J. Cancer*, Bd. 123, Nr. 1, S. 8–13, 2008.
- [75] L. H. Li, E. J. Olin, H. H. Buskirk, und L. M. Reineke, „Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia.“, *Cancer Res.*, Bd. 30, Nr. 11, S. 2760–2769, 1970.
- [76] P. W. Hollenbach *u. a.*, „A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines“, *PLoS One*, Bd. 5, Nr. 2, S. e9001, 2010.
- [77] D. V Santi, A. Norment, und C. E. Garrett, „Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine.“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Bd. 81, Nr. 22, S. 6993–7, 1984.
- [78] M. Schaefer, S. Hagemann, K. Hanna, und F. Lyko, „Azacytidine inhibits RNA methylation at DNMT2 target sites in human cancer cell lines“, *Cancer Res.*, Bd. 69, Nr. 20, S. 8127–8132, 2009.
- [79] D. J. Weisenberger, M. Velicescu, J. C. Cheng, F. a Gonzales, G. Liang, und P. a Jones, „Role of the DNA methyltransferase variant DNMT3b3 in DNA methylation.“, *Mol. Cancer Res.*, Bd. 2, Nr. 1, S. 62–72, 2004.
- [80] K. Ghoshal *u. a.*, „5-Aza-Deoxycytidine Induces Selective Degradation of DNA Methyltransferase 1 by a Proteasomal Pathway That Requires the KEN Box, Bromo-Adjacent Homology Domain, and Nuclear Localization Signal“, *Mol. Cell. Biol.*, Bd. 25, Nr. 11, S. 4727–4741, 2005.
- [81] M. G. Goll *u. a.*, „Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2“, *Science (80-)*, Bd. 311, Nr. 5759, S. 395–398, 2006.
- [82] S. O. Sajadian *u. a.*, „Vitamin C enhances epigenetic modifications induced by 5-azacytidine and cell cycle arrest in the hepatocellular carcinoma cell lines HLE and Huh7“, *Clin. Epigenetics*, Bd. 8, Nr. 1, S. 1–13, 2016.
- [83] L. Šerman *u. a.*, „Changes of membrane proteins expression in rat placenta treated with 5-azacytidine“, *Tierarztl. Umsch.*, Bd. 63, Nr. 7, S. 391–395, 2008.
- [84] S. Hagemann, O. Heil, F. Lyko, und B. Brueckner, „Azacytidine and

- Decitabine Induce Gene-Specific and Non-Random DNA Demethylation in Human Cancer Cell Lines“, *PLoS One*, Bd. 6, Nr. 3, S. e17388, März 2011.
- [85] V. M. Komashko und P. J. Farnham, „5-azacytidine treatment reorganizes genomic histone modification patterns“, *Epigenetics*, Bd. 5, Nr. 3, S. 229–240, Apr. 2010.
- [86] S. Snykers *u. a.*, „Role of epigenetics in liver-specific gene transcription, hepatocyte differentiation and stem cell reprogramming“, *J. Hepatol.*, Bd. 51, Nr. 1, S. 187–211, 2009.
- [87] a Delers, J. Szpirer, C. Szpirer, und D. Saggiaro, „Spontaneous and 5-azacytidine-induced reexpression of ornithine carbamoyl transferase in hepatoma cells.“, *Mol. Cell. Biol.*, Bd. 4, Nr. 4, S. 809–12, 1984.
- [88] http://www.bfarm.de/DE/Buerger/Arzneimittel/Arzneimittelentwicklung/_node.html. [Zugegriffen: 30-Mai-2017].
- [89] <https://www.profil-forschung.de/klinische-studien/arzneimittelforschung.php>. [Zugegriffen: 30-Mai-2017].
- [90] O. Pelkonen und H. Raunio, „In vitro screening of drug metabolism during drug development: can we trust the predictions?“, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, Bd. 1, Nr. 1, S. 49–59, 2005.
- [91] J. V Castell, R. Jover, C. P. Martínez-Jiménez, und M. J. Gómez-Lechón, „Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies.“, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, Bd. 2, Nr. 2, S. 183–212, 2006.
- [92] J. Lin *u. a.*, „Comparative analysis of phase I and II enzyme activities in 5 hepatic cell lines identifies Huh-7 and HCC-T cells with the highest potential to study drug metabolism“, *Arch. Toxicol.*, Bd. 86, S. 87–95, 2012.
- [93] S. Choi, B. Sainz, P. Corcoran, S. Uprichard, und H. Jeong, „Characterization of increased drug metabolism activity in dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated Huh7 hepatoma cells.“, *Xenobiotica.*, Bd. 39, Nr. 3, S. 205–17, 2009.
- [94] M. T. Donato, R. Jover, und M. J. Gómez-Lechón, „Hepatic Cell Lines for Drug Hepatotoxicity Testing: Limitations and Strategies to Upgrade their Metabolic Competence by Gene Engineering.“, *Curr. Drug Metab.*, Bd. 14, Nr. 9, S. 946–68, 2013.
- [95] M. T. Donato, a Lahoz, J. V Castell, und M. J. Gómez-Lechón, „Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies.“, *Curr. Drug Metab.*, Bd. 9, Nr. 1, S. 1–11, 2008.
- [96] V. Soldatow, E. LeCluyse, L. Griffith, und I. Rusyn, „In vitro models for liver toxicity testing“, *Toxicol. Res. (Camb).*, Bd. 2, Nr. 1, S. 23–39, 2013.
- [97] E. F. A. Brandon, C. D. Raap, I. Meijerman, J. H. Beijnen, und J. H. M. Schellens, „An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: Pros and cons“, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Bd. 189, Nr. 3, S. 233–246, 2003.
- [98] J. George, B. Goodwin, C. Liddle, M. Tapner, und G. C. Farrell, „Time-dependent expression of cytochrome p450 genes in primary cultures of well-differentiated human hepatocytes“, *J. Lab. Clin. Med.*, Bd. 129, Nr. 6, S. 638–648, Juni 1997.

- [99] P. Fasinu, P. J. Bouic, und B. Rosenkranz, „Liver-Based In Vitro Technologies for Drug Biotransformation Studies - A Review“, *Curr. Drug Metab.*, Bd. 13, Nr. 2, S. 215–224, 2012.
- [100] M. Gomez-Lechon, M. Donato, J. Castell, und R. Jover, „Human Hepatocytes as a Tool for Studying Toxicity and Drug Metabolism“, *Curr. Drug Metab.*, Bd. 4, Nr. 4, S. 292–312, 2003.
- [101] J. G. Hengstler *u. a.*, „Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction.“, *Drug Metab. Rev.*, Bd. 32, Nr. 1, S. 81–118, Feb. 2000.
- [102] X. Ponsoda *u. a.*, „Drug biotransformation by human hepatocytes. In vitro/in vivo metabolism by cells from the same donor.“, *J. Hepatol.*, Bd. 34, Nr. 1, S. 19–25, 2001.
- [103] <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/mikrosomen/43004>. [Zugegriffen: 08-Apr-2018].
- [104] C. Liu, X. Zhuo, F. Gonzalez, und X. Ding, „Baculovirus-mediated expression and characterization of rat CYP2A3 and human CYP2a6: role in metabolic activation of nasal toxicants“, *Mol. Pharmacol.*, Bd. 50, Nr. 4, S. 781–788, Okt. 1996.
- [105] R. Gasser, C. Funk, P. Matzinger, W. Klemisch, und A. Viger-Chougnet, „Use of transgenic cell lines in mechanistic studies of drug metabolism.“, *Toxicol. In Vitro*, Bd. 13, Nr. 4–5, S. 625–32, Jan. 1999.
- [106] N. Kobayashi, K. A. Westerman, N. Tanaka, I. J. Fox, und P. Leboulch, „A reversibly immortalized human hepatocyte cell line as a source of hepatocyte-based biological support.“, *Addict. Biol.*, Bd. 6, Nr. 4, S. 293–300, 2001.
- [107] S. Wilkening, F. Stahl, und A. Bader, „Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties“, *Drug Metab. Dispos.*, Bd. 31, Nr. 8, S. 1035–1042, 2003.
- [108] M. I. Martić-Kehl, R. Schibli, und P. A. Schubiger, „Can animal data predict human outcome? Problems and pitfalls of translational animal research“, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, Bd. 39, Nr. 9, S. 1492–1496, 2012.
- [109] R. Greek und A. Menache, „Systematic reviews of animal models: Methodology versus epistemology“, *Int. J. Med. Sci.*, Bd. 10, Nr. 3, S. 206–221, 2013.
- [110] H. Olson *u. a.*, „Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals.“, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, Bd. 32, Nr. 1, S. 56–67, 2000.
- [111] P. Greaves, A. Williams, und M. Eve, „First dose of potential new medicines to humans: how animals help.“, *Nat. Rev. Drug Discov.*, Bd. 3, Nr. 3, S. 226–236, 2004.
- [112] D. Zhang, G. Luo, X. Ding, und C. Lu, „Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development“, *Acta Pharm. Sin. B*, Bd. 2, Nr. 6, S. 549–561, 2012.
- [113] C. Lu und a P. Li, „Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A

- in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog.“, *Chem. Biol. Interact.*, Bd. 134, Nr. 3, S. 271–81, 2001.
- [114] J. M. Collins, „Inter-species differences in drug properties“, *Chem. Biol. Interact.*, Bd. 134, Nr. 3, S. 237–242, 2001.
- [115] M. Martignoni, G. M. M. Groothuis, und R. de Kanter, „Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction“, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, Bd. 2, Nr. 6, S. 875–894, 2006.
- [116] C. A. Kemp *u. a.*, „Validation of model of cytochrome P450 2D6: an in silico tool for predicting metabolism and inhibition.“, *J. Med. Chem.*, Bd. 47, Nr. 22, S. 5340–6, Okt. 2004.
- [117] D. F. V Lewis, S. Modi, und M. Dickins, „Structure-activity relationship for human cytochrome P450 substrates and inhibitors.“, *Drug Metab. Rev.*, Bd. 34, Nr. 1–2, S. 69–82, Jan. 2002.
- [118] S. Ekins, J. Berbaum, und R. K. Harrison, „Generation and validation of rapid computational filters for cyp2d6 and cyp3a4.“, *Drug Metab. Dispos.*, Bd. 31, Nr. 9, S. 1077–80, Sep. 2003.
- [119] S. Ekins, M. J. de Groot, und J. P. Jones, „Pharmacophore and three-dimensional quantitative structure activity relationship methods for modeling cytochrome p450 active sites.“, *Drug Metab. Dispos.*, Bd. 29, Nr. 7, S. 936–44, Juli 2001.
- [120] K. Takayama *u. a.*, „3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing.“, *Biomaterials*, Bd. 34, Nr. 7, S. 1781–9, Feb. 2013.
- [121] M. D. Davidson, B. R. Ware, und S. R. Khetani, „Stem cell-derived liver cells for drug testing and disease modeling.“, *Discov. Med.*, Bd. 19, Nr. 106, S. 349–58, Mai 2015.
- [122] M. R. ALISON *u. a.*, „Cell differentiation: Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells“, *Nature*, Bd. 406, S. 257, 2000.
- [123] R. E. Schwartz *u. a.*, „Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells“, *J. Clin. Invest.*, Bd. 109, Nr. 10, S. 1291–1302, 2002.
- [124] C. J. Marek, G. A. Cameron, L. J. Elrick, G. M. Hawksworth, und M. C. Wright, „Generation of hepatocytes expressing functional cytochromes P450 from a pancreatic progenitor cell line in vitro.“, *Biochem. J.*, Bd. 370, Nr. Pt 3, S. 763–769, 2003.
- [125] L. Rambhatla, C.-P. Chiu, P. Kundu, Y. Peng, und M. K. Carpenter, „Generation of Hepatocyte-Like Cells from Human Embryonic Stem Cells“, *Cell Transplant.*, Bd. 12, Nr. 1, S. 1–11, 2003.
- [126] I. Nozaki *u. a.*, „Establishment of a human hepatoma cell line, HLE/2E1, suitable for detection of P450 2E1-related cytotoxicity“, *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.*, Bd. 36, Nr. 9, S. 566–570, Okt. 2000.
- [127] A. D. Rodrigues, „Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping. Attempting to bridge the gap between cDNA-expressed cytochromes P450 and native human liver microsomes“, *Biochemical Pharmacology*, Bd. 57, Nr. 5, S. 465–480, 1999.
- [128] C. E. P. Goldring *u. a.*, „Development of a transactivator in hepatoma cells that allows expression of phase I, phase II, and chemical defense

- genes“, *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, Bd. 290, Nr. 1, S. C104–C115, 2006.
- [129] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, und E. Charpentier, „A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity“, *Science*, Bd. 337, Nr. 6096, S. 816–821, 2012.
- [130] C. R. Dorr *u. a.*, „CRISPR/Cas9 genetic modification of CYP3A5 *3 in HuH-7 human hepatocyte cell line leads to cell lines with increased midazolam and tacrolimus metabolism“, *Drug Metab. Dispos.*, Bd. 45, Nr. 8, S. 957–965, 2017.
- [131] H. Yang, Y. Nie, Y. Li, und Y. J. Y. Wan, „Histone modification-mediated CYP2E1 gene expression and apoptosis of HepG2 cells“, *Exp. Biol. Med.*, Bd. 235, Nr. 1, S. 32–39, 2010.
- [132] M. R. Ahn, D. K. Kim, und Y. Y. Sheen, „Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor stimulate CYP3A4 proximal promoter activity in Hepa-I cells“, *Arch Pharm Res*, Bd. 27, Nr. 4, S. 415–421, 2004.
- [133] R. Jover, R. Bort, M. J. Gómez-Lechón, und J. V. Castell, „Cytochrome P450 regulation by hepatocyte nuclear factor 4 in human hepatocytes: A study using adenovirus-mediated antisense targeting“, *Hepatology*, Bd. 33, Nr. 3, S. 668–675, 2001.
- [134] R. Jover, R. Bort, M. J. Gómez-Lechón, und J. V. Castell, „Re-expression of C/EBP α induces CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genes in HepG2 cells“, *FEBS Lett.*, Bd. 431, Nr. 2, S. 227–230, 1998.
- [135] D. Knobeloch *u. a.*, „Human Hepatocytes: Isolation, Culture, and Quality Procedures“, in *Methods in Molecular Biology*, Bd. 806, 2012, S. 99–120.
- [136] a K. Nussler *u. a.*, „Isolation and characterization of a human hepatic epithelial-like cell line (AKN-1) from a normal liver.“, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, Bd. 35, Nr. April, S. 190–197, 1999.
- [137] I. Doi, M. Namba, und J. Sato, „Establishment and some biological characteristics of human hepatoma cell lines.“, *Gann*, Bd. 66, Nr. 4, S. 385–92, 1975.
- [138] G. I. Abelev, I. V. Assecritova, N. A. Kraevsky, S. D. Perova, und N. I. Perevodchikova, „Embryonal serum alpha-globulin in cancer patients: diagnostic value.“, *Int. J. Cancer*, Bd. 2, Nr. 5, S. 551–8, Sep. 1967.
- [139] S. Sharma, „Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines“, *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.*, Bd. 30, Nr. 1, S. 1, Jan. 2009.
- [140] L. X. Liu *u. a.*, „Gene expression profiles of hepatoma cell line HLE“, *World J. Gastroenterol.*, Bd. 9, Nr. 1007–9327 (Print), S. 683–687, 2003.
- [141] D. P. Aden, A. Fogel, S. Plotkin, I. Damjanov, und B. B. Knowles, „Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line.“, *Nature*, Bd. 282, Nr. 5739, S. 615–616, 1979.
- [142] D. López-Terrada, S. W. Cheung, M. J. Finegold, und B. B. Knowles, „Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line“, *Hum. Pathol.*, Bd. 40, Nr. 10, S. 1512–1515, 2009.
- [143] B. Knowles, C. Howe, und D. Aden, „Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines Secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen“, *Science*, Bd. 209, S. 497–499, Juli 1980.

- [144] E. Alexandre *u. a.*, „Expression of Cytochromes P-450 2E1, 3A4 and 1A1/1A2 in Growing and Confluent Human HepG2 Hepatoma Cells-Effect of Ethanol.“, *Toxicol. In Vitro*, Bd. 13, Nr. 3, S. 427–435, 1999.
- [145] W. M. A. Westerink und W. G. E. J. Schoonen, „Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells“, *Toxicol. Vitro.*, Bd. 21, Nr. 8, S. 1581–1591, 2007.
- [146] M. H. Grant, S. J. Duthie, A. G. Gray, und M. D. Burke, „Mixed function oxidase and UDP-glucuronyltransferase activities in the human Hep G2 hepatoma cell line“, *Biochem. Pharmacol.*, Bd. 37, Nr. 21, S. 4111–4116, Nov. 1988.
- [147] W. M. A. Westerink und W. G. E. J. Schoonen, „Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells“, *Toxicol. Vitro.*, Bd. 21, Nr. 8, S. 1592–1602, Dez. 2007.
- [148] L. Havekes, V. van Hinsbergh, H. J. Kempen, und J. Emeis, „The metabolism in vitro of human low-density lipoprotein by the human hepatoma cell line Hep G2.“, *Biochem. J.*, Bd. 214, Nr. 3, S. 951–8, 1983.
- [149] H. Nakabayashi, K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane, und J. Sato, „Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium.“, *Cancer Res.*, Bd. 42, Nr. 9, S. 3858–3863, 1982.
- [150] L. Sivertsson, M. Ek, M. Darnell, I. Edebert, M. Ingelman-Sundberg, und E. P. a Neve, „CYP3A4 catalytic activity is induced in confluent Huh7 hepatoma cells“, *Drug Metab. Dispos.*, Bd. 38, Nr. 6, S. 995–1002, 2010.
- [151] QIAGEN, „RNeasy® Lipid Tissue Handbook“, Februar 2009.
- [152] http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/330401.html.
[Zugegriffen: 23-Juni-2016].
- [153] http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-085A.html.
[Zugegriffen: 23-Juni-2016].
- [154] http://www.qiagen.com/de/shop/genes-and-pathways/technology-portals/browse-qpcr/qrt-pcr-for-mrna-expression/data-analysis/~link.aspx?_id=93C80B99536C4FCDBD1E5FC0759F1324&_z=z.
[Zugegriffen: 23-Juni-2016].
- [155] W. Strober, „Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability“, in *Current Protocols in Immunology*, Appendix 3: Appendix 3B, May 2001.
- [156] J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, und F. Pognan, „Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity“, *Eur. J. Biochem.*, Bd. 267, Nr. 17, S. 5421–5426, 2000.
- [157] R. J. Gonzalez und J. B. Tarloff, „Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity“, *Toxicol. Vitro.*, Bd. 15, Nr. 3, S. 257–259, 2001.
- [158] E. M. Czekanska, „Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye“, *Methods Mol. Biol.*, Bd. 740, S. 27–32, 2011.
- [159] F. K.-M. Chan, K. Moriwaki, und M. J. De Rosa, „Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase Activity“, in *Methods in Molecular Biology*, Bd. 979, S. 65–70, 2013.
- [160] https://www.analyticon-diagnostics.com/downloads/pbl_db/PLDH-L_GB-

- D_21_001.pdf. [Zugegriffen: 09-März-2018].
- [161] D. Jung, H. Biggs, J. Erikson, und P. U. Ledyard, „New Colorimetric reaction for end-point, continuous-flow, and kinetic measurement of urea.“, *Clin. Chem.*, Bd. 21, Nr. 8, S. 1136–40, Juli 1975.
- [162] M. T. Donato, N. Jiménez, J. V. Castell, und M. J. Gómez-Lechón, „Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes“, *Drug Metab. Dispos.*, Bd. 32, Nr. 7, S. 699–706, 2004.
- [163] S. Ehnert u. a., „Autologous Serum Improves Yield and Metabolic Capacity of Monocyte-Derived Hepatocyte-Like Cells: Possible Implication for Cell Transplantation“, *Cell Transplant.*, Bd. 20, Nr. 9, S. 1465–1478, Okt. 2011.
- [164] J. C. Fernández-Checa und N. Kaplowitz, „The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis.“, *Anal. Biochem.*, Bd. 190, S. 212–219, 1990.
- [165] G. C. Rice, E. a Bump, D. C. Shrieve, W. Lee, und M. Kovacs, „Quantitative analysis of cellular glutathione by flow cytometry utilizing monochlorobimane: some applications to radiation and drug resistance in vitro and in vivo.“, *Cancer Res.*, Bd. 46, Nr. 12 Pt 1, S. 6105–10, 1986.
- [166] https://www.bethyl.com/product/pdf/E80-129_28.pdf. [Zugegriffen: 14-Feb-2018].
- [167] P. Skehan u. a., „New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening.“, *J. Natl. Cancer Inst.*, Bd. 82, Nr. 13, S. 1107–1112, 1990.
- [168] https://de.vwr.com/assetsvc/asset/de_DE/id/17035117/contents. [Zugegriffen: 14-März-2018].
- [169] D. C. Rio, M. Ares, G. J. Hannon, und T. W. Nilsen, „Nondenaturing agarose gel electrophoresis of RNA“, *Cold Spring Harb. Protoc.*, Bd. 5, Nr. 6, 2010.
- [170] <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/rna-protocol/agarose-gel-electrophoresis-of-rna.html>. [Zugegriffen: 12-Apr-2018].
- [171] M. Holtzhauer, 2009, *Biochemische Labormethoden*, 3.Auflage, S.27-87, Springer Verlag Berlin.
- [172] https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012612_FirstStrand_cDNA_Synthesis_Kit_UG.pdf. [Zugegriffen: 14-März-2018].
- [173] M. Marone, S. Mozzetti, D. De Ritis, L. Pierelli, und G. Scambia, „Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample.“, *Biol. Proced. Online*, Bd. 3, S. 19–25, Nov. 2001.
- [174] <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-vs-digital-vs-traditional-pcr.html>. [Zugegriffen: 12-Apr-2018].
- [175] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1576>. [Zugegriffen: 26-März-2018].
- [176] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1551>. [Zugegriffen: 26-März-2018].
- [177] D. Lacroix, M. Sonnier, A. Moncion, G. Cheron, und T. Cresteil, „Expression of CYP3A in the Human Liver - Evidence that the Shift between CYP3A7 and CYP3A4 Occurs Immediately After Birth“, *Eur. J. Biochem.*, Bd. 247, Nr. 2, S. 625–634, 1997.

- [178] C. Stresemann, „Functional Diversity of DNA Methyltransferase Inhibitors in Human Cancer Cell Lines“, *Cancer Res.*, Bd. 66, Nr. 5, S. 2794–2800, 2006.
- [179] P. Y. Leung, K. Miyashita, M. Young, und C. S. Tsao, „Cytotoxic effect of ascorbate and its derivatives on cultured malignant and nonmalignant cell lines.“, *Anticancer Res.*, Bd. 13, Nr. 2, S. 475–80, 1993.
- [180] Y. I. Yamashita u. a., „Histone deacetylase inhibitor trichostatin a induces cell-cycle arrest/apoptosis and hepatocyte differentiation in human hepatoma cells“, *Int. J. Cancer*, Bd. 103, S. 572–576, 2003.
- [181] N. J. Hewitt und P. Hewitt, „Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines“, *Xenobiotica*, Bd. 34, Nr. 3, S. 243–256, 2004.
- [182] S. Betts, L. Björkhem-Bergman, A. Rane, und L. Ekström, „Expression of CYP3A4 and CYP3A7 in Human Foetal Tissues and its Correlation with Nuclear Receptors“, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, Bd. 117, Nr. 4, S. 261–6, März 2015.
- [183] S. Krusekopf, I. Roots, und U. Kleeberg, „Differential drug-induced mRNA expression of human CYP3A4 compared to CYP3A5, CYP3A7 and CYP3A43“, *Eur. J. Pharmacol.*, Bd. 466, Nr. 1–2, S. 7–12, 2003.
- [184] R. J. X. Zawada, P. Kwan, K. L. Olszewski, M. Llinas, und S.-G. Huang, „Quantitative determination of urea concentrations in cell culture medium.“, *Biochem. Cell Biol.*, Bd. 87, Nr. 3, S. 541–4, Juni 2009.
- [185] S. Ehnert, A. K. Nussler, A. Lehmann, und S. Dooley, „Blood monocyte-derived neohepatocytes as in vitro test system for drug metabolism“, *Drug Metab. Dispos.*, Bd. 36, Nr. 9, S. 1922–1929, 2008.
- [186] <https://www.omim.org/entry/107830>. [Zugegriffen: 15-März-2018].
- [187] E. B. Spector, S. C. H. Rice, und S. D. Cederbaum, „Evidence for two genes encoding human arginase. (Abstract)“, *Pediatr. Res.*, Bd. 15, S. 569, 1981.
- [188] T. Zaytouni u. a., „Critical role for arginase 2 in obesity-Associated pancreatic cancer“, *Nat. Commun.*, Bd. 8, Nr. 1, S. 242, 2017.
- [189] N. Chauret, a Gauthier, und D. a Nicoll-Griffith, „Effect of common organic solvents on in vitro cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes.“, *Drug Metab. Dispos.*, Bd. 26, Nr. 1, S. 1–4, 1998.
- [190] W. F. Busby, J. M. Ackermann, und C. L. Crespi, „Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450“, *Drug Metab. Dispos.*, Bd. 27, Nr. 2, S. 246–249, 1999.
- [191] G. C. Li D, Han Y, Meng X, Sun X, Yu Q, Li Y, Wan L, Huo Y, „Effect of Regular Organic Solvents on Cytochrome P450-Mediated Metabolic Activities in Rat Liver Microsomes“, *Drug Metab. Dispos.*, Bd. 38, Nr. 11, S. 1922–1925, 2010.
- [192] V. Uchaipichat u. a., „Human udp-glucuronosyltransferases: isoform selectivity and kinetics of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation, effects of organic solvents, and inhibition by diclofenac and probenecid“, *Drug Metab Dispos.*, Bd. 32, Nr. 4, S. 413–423, 2004.
- [193] J. Easterbrook, C. Lu, Y. Sakai, und A. P. Li, „Effects of organic solvents

- on the activities of cytochrome P450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes“, *Drug Metab. Dispos.*, Bd. 29, Nr. 2, S. 141–144, 2001.
- [194] D. Hickman, J. P. Wang, Y. Wang, und J. D. Unadkat, „Evaluation of the selectivity of in vitro probes and suitability of organic solvents for the measurement of human cytochrome P450 monooxygenase activities“, *Drug Metab. Dispos.*, Bd. 26, Nr. 3, S. 207–215, 1998.
- [195] D. J. Waxman und T. K. H. Chang, „Use of 7-ethoxycoumarin to monitor multiple enzymes in the human CYP1, CYP2, and CYP3 families.“, *Methods Mol. Biol.*, Bd. 320, S. 153–156, 2006.
- [196] H. Yamazaki, K. Inoue, M. Mimura, Y. Oda, F. P. Guengerich, und T. Shimada, „7-Ethoxycoumarin O-deethylation catalyzed by cytochromes P450 1A2 and 2E1 in human liver microsomes“, *Biochem. Pharmacol.*, Bd. 51, Nr. 3, S. 313–319, 1996.
- [197] C. L. Crespi und D. M. Stresser, „Fluorometric screening for metabolism-based drug-drug interactions“, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, Bd. 44, Nr. 1, S. 325–331, 2000.
- [198] A. Ghosal *u. a.*, „Rapid determination of enzyme activities of recombinant human cytochromes P450, human liver microsomes and hepatocytes.“, *Biopharm. Drug Dispos.*, Bd. 24, Nr. 9, S. 375–384, 2003.
- [199] A. B. Renwick *u. a.*, „Evaluation of 7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin, some other 7-hydroxy-4-trifluoromethylcoumarin derivatives and 7-benzyloxyquinoline as fluorescent substrates for rat hepatic cytochrome p450 enzymes“, *Xenobiotica*, Bd. 31, Nr. 12, S. 861–878, 2001.
- [200] A. B. Renwick, D. Surry, R. J. Price, B. G. Lake, und D. C. Evans, „Metabolism of 7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin by human hepatic cytochrome P450 isoforms“, *Xenobiotica*, Bd. 30, Nr. 10, S. 955–969, 2000.
- [201] J. A. Krauser, M. Voehler, L.-H. Tseng, A. B. Schefer, M. Godejohann, und F. P. Guengerich, „Testosterone 1 β -hydroxylation by human cytochrome P450 3A4“, *Eur. J. Biochem.*, Bd. 271, Nr. 19, S. 3962–3969, 2004.
- [202] R. H. Don, P. T. Cox, B. J. Wainwright, K. Baker, und J. S. Mattick, „‘Touchdown’ PCR to circumvent spurious priming during gene amplification“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 19, Nr. 14, S. 4008, 1991.
- [203] J. Lin *u. a.*, „Comparative analysis of phase I and II enzyme activities in 5 hepatic cell lines identifies Huh-7 and HCC-T cells with the highest potential to study drug metabolism“, *Arch. Toxicol.*, Bd. 86, Nr. 1, S. 87–95, 2012.
- [204] M. Ogura *u. a.*, „Overexpression of SIRT5 confirms its involvement in deacetylation and activation of carbamoyl phosphate synthetase 1.“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Bd. 393, Nr. 1, S. 73–8, 2010.
- [205] Y.-Z. Pan, W. Gao, und A.-M. Yu, „MicroRNAs regulate CYP3A4 expression via direct and indirect targeting.“, *Drug Metab. Dispos.*, Bd. 37, Nr. 10, S. 2112–7, 2009.
- [206] R. J. Edwards *u. a.*, „Induction of cytochrome P450 enzymes in cultured precision-cut human liver slices.“, *Drug Metab. Dispos.*, Bd. 31, Nr. 3, S. 282–8, 2003.

- [207] T. Takahashi, J. M. Lasker, A. S. Rosman, und C. S. Lieber, „Induction of cytochrome P-450E1 in the human liver by ethanol is caused by a corresponding increase in encoding messenger RNA“, *Hepatology*, Bd. 17, Nr. 2, S. 236–245, 1993.
- [208] O. Pelkonen, M. Turpeinen, J. Hakkola, P. Honkakoski, J. Hukkanen, und H. Raunio, „Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status“, *Arch. Toxicol.*, Bd. 82, Nr. 10, S. 667–715, Okt. 2008.
- [209] R. Zhang *u. a.*, „Induction of cytochromes P450 1A1 and 1A2 by tanshinones in human HepG2 hepatoma cell line.“, *Toxicol Appl Pharmacol.*, Bd. 252, Nr. 1, S. 18–27, 2011.
- [210] L. Sivertsson, I. Edebert, M. P. Palmertz, M. Ingelman-Sundberg, und E. P. a Neve, „Induced CYP3A4 expression in confluent Huh7 hepatoma cells as a result of decreased cell proliferation and subsequent pregnane X receptor activation.“, *Mol. Pharmacol.*, Bd. 83, Nr. 3, S. 659–70, 2013.
- [211] J. T. Sanderson, J. M. M. J. G. Aarts, A. Brouwer, K. L. Froese, M. S. Denison, und J. P. Giesy, „Comparison of Ah receptor-mediated luciferase and ethoxyresorufin-O-deethylase induction in H4IIE cells: Implications for their use as bioanalytical tools for the detection of polyhalogenated aromatic hydrocarbons“, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Bd. 137, Nr. 2, S. 316–325, 1996.
- [212] H. Doostdar, S. J. Duthie, M. D. Burke, W. T. Melvin, und M. H. Grant, „The influence of culture medium composition on drug metabolising enzyme activities of the human liver derived Hep G2 cell line“, *FEBS Lett.*, Bd. 241, Nr. 1–2, S. 15–18, 1988.
- [213] J. Terashima *u. a.*, „CYP1A1 and CYP1A2 expression levels are differentially regulated in three-dimensional spheroids of liver cancer cells compared to two-dimensional monolayer cultures“, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, Bd. 30, Nr. 6, S. 434–440, 2015.
- [214] E. Mönch, G. F. Hoffmann, H. Przyrembel, J.-P. Colombo, B. Wermuth, und J. V. Leonard, „Diagnose und Behandlung des Ornithintranscarbamylase (OTC) -Mangels *“, *Monatsschrift Kinderheilkd.*, Bd. 146, Nr. 7, S. 652–658, 1998.
- [215] S. R. Mitzner, „Extracorporeal liver support-albumin dialysis with the molecular adsorbent recirculating system (MARS)“, *Ann. Hepatol.*, Bd. 10, Nr. SUPPL. 1, S. 21–28, 2011.
- [216] B. Struecker, N. Raschzok, und I. M. Sauer, „Liver support strategies: cutting-edge technologies.“, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, Bd. 11, Nr. 3, S. 166–76, 2014.
- [217] P. Faybik und C.-G. Krenn, „Extracorporeal Liver Support“, *Curr Opin Crit Care*, Bd. 19, Nr. 2, S. 149–153, 2013.
- [218] N. L. Sussman *u. a.*, „Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device“, *Hepatology*, Bd. 16, Nr. 1, S. 60–65, 1992.
- [219] C. Jiang *u. a.*, „A sequential treatment of depsipeptide followed by 5-azacytidine enhances Gadd45 β expression in hepatocellular carcinoma cells“, *Anticancer Res.*, Bd. 27, Nr. 6 B, S. 3783–3789, 2007.
- [220] A. Ilyas, Z. Hashim, und S. Zarina, „Effects of 5'-azacytidine and alendronate on a hepatocellular carcinoma cell line: a proteomics

- perspective“, *Mol. Cell. Biochem.*, Bd. 405, Nr. 1–2, S. 53–61, Juli 2015.
- [221] M. Berdasco u. a., „Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry.“, *Dev. Cell*, Bd. 19, Nr. 5, S. 698–711, 2010.
- [222] A. Unlu, O. Kirca, M. Ozdogan, und E. Nayır, „High-dose vitamin C and cancer“, *J. Oncol. Sci.*, Bd. 1, S. 10–12, 2016.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Siegfried Weller Institut (SWI) für Unfallmedizinische Forschung der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik in Tübingen, Eberhard Karls Universität Tübingen, unter Betreuung von Prof. Dr. Andreas Nüssler durchgeführt. Diese Arbeit war Teil eines durch das Land Baden-Württemberg geförderten Projekts „Epigenetische Reaktivierung der Funktionalität hepatischer Zelllinien- als ständige Ressource für in vitro Toxizitätstests“. Dieses Projekt wurde durch Prof. Dr. Steven Dooley (Molekulare Hepatologie, Universitätsklinikum Mannheim, Ruprecht Karls Universität Heidelberg) in Kooperation mit Prof. Dr. Andreas Nüssler (Siegfried Weller Institut, Eberhard Karls Universität Tübingen, Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik in Tübingen) initiiert.

Sämtliche Versuche mit den Zelllinien (HepG2, Huh7, HLE und AKN1) wurden durch mich selbst, Lisa Ehret, nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Dr. rer. nat. Sahar Sajadian (damals noch Doktorantin), Bianca Braun (technische Assistentin), Anja Tschida (Arbeitsgruppenleiterin) und Marc Ruoß (Masterstudent) durchgeführt. Einzige Ausnahme ist die Durchführung und Auswertung des Arrays von Qiagen mithilfe von Sahar Sajadian. Vorarbeiten für diese Arbeit wurden durch Sahar Sajadian im SWI in Tübingen durchgeführt. Der Versuchsaufbau wurde mithilfe von Prof. Dr. Nüssler, Dr. sc. hum. Sabrina Ehnert und Sahar Sajadian besprochen und zusammen festgelegt. Versuche zur Erhaltung der Vergleichswerte mit primären humanen Hepatozyten wurden durch mich und mehrere Labormitglieder (Marc Ruoß, Sahar Sajadian, Aylin Yurtseven), welche ebenfalls primäre humane Hepatozyten als Vergleichswerte benötigten, durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch meine Kobetreuerin Dr. Sabrina Ehnert eigenständig durch mich. Im Rahmen der gleichen Arbeitsgruppe wurden bereits Teile meiner Messungen und Ergebnisse (Cytochrom-Aktivitätsmessung, Harnstoffproduktion sowie Genexpression von Cytochromen) vorab 2016 in Sahar Sajadians naturwissenschaftlichen Dissertation „*Epigenetic modifications and consequences of epigenetic alterations in Hepatocellular Carcinoma cell lines*“ (Universität Dortmund) veröffentlicht.

Ich versichere, das Manuskript inklusive Literaturrecherche und Darstellung der experimentellen Ergebnisse selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Das Manuskript wurde durch Prof. Dr. Nüssler korrigiert.

Stuttgart, den 02.09.2018

Lisa Ehret