

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

**Stellenwert der RT-PCR zur quantitativen
Genexpressionsanalyse epigenetischer Modifikationen
in HepG2 Zellen**

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

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

vorgelegt von

Petkov, Martin Andreev

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nüssler
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Schenk

Tag der Disputation: 25.10.2021

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung	1
1.1. Leberanatomie und CYP Metabolismus	1
1.2. Warum <i>in vitro</i> Medikamententests?.....	3
1.3. Primäre humane Hepatozyten	3
1.4. Stammzellen	4
1.5. Hepatomzelllinien.....	4
1.6. Etablierte Methoden zur Messung der Proteinexpression	7
1.7. Etablierte Assays zur Bestimmung der Enzymaktivität.....	8
1.8. Etablierte Methoden der Genexpressionsanalyse	10
1.8.1. cDNA Synthese durch Reverse Transkriptase	11
1.8.2. Das Prinzip der PCR	12
1.8.3. Das vollquantitative Verfahren der Real Time PCR (qPCR)	14
1.9. Typische Anwendungsgebiete etablierter Assays	15
1.10. Vorüberlegungen dieser Arbeit	16
2. Material und Methoden	18
2.1. Verwendete Zelllinie: HepG2 Zellen	18
2.2. Materialien	18
2.3. Methoden	23
2.3.1. Kultivierung von HepG2 Zellen und Zellstimulation.....	23
2.3.2. Kultivierung von PHHs aus Spenderleber	24
2.3.3. RNA Isolation mit TriFast	25
2.3.4. RNA Quantifizierung.....	26
2.3.5. Kontrolle der RNA Integrität	26
2.3.6. cDNA Synthese und konventionelle PCR (RT-PCR)	27
2.3.7. PCR Datenauswertung.....	29
2.3.8. Statistik	29
3. Ergebnisse	30
3.1. Primer Optimierung	30
3.1.1. <i>GAPDH</i> Primer Optimierung	30
3.1.2. <i>CYP</i> Primer Optimierung	31
3.1.3. Primer Optimierung von <i>KDM4C</i> und <i>KDM6B</i>	33

3.1.4. Primer Optimierung von <i>HDAC1</i> und <i>HDAC2</i>	34
3.1.5. Primer Optimierung von <i>PRMT1</i>	35
3.2. Genexpression nach HepG2 Stimulation: RT-PCR vs. qPCR	37
3.2.1. <i>CYP1A2</i>	37
3.2.2. <i>CYP2C9</i>	38
3.2.3. <i>CYP3A4</i>	39
3.2.4. <i>KDM4C</i>	40
3.2.5. <i>KDM6B</i>	41
3.2.6. <i>HDAC1</i>	42
3.2.7. <i>HDAC2</i>	43
3.2.8. <i>PRMT1</i>	44
4. Diskussion	45
4.1. Ansatz der Arbeit	45
4.2. Einordnung ermittelter Expressionslevel in die Literatur	46
4.3. Vor- und Nachteile der semiquantitativen RT-PCR am vorliegenden Beispiel ..	48
4.4. Limitierungen an der Durchführung der Experimente	52
4.4.1. Primäre humane Hepatozyten als Referenz	52
4.4.2. HepG2 Kultivierung	52
4.4.3. Primer Optimierung	53
4.4.4. <i>GAPDH</i> als Housekeeping Gen	54
4.5. Ansätze zur Optimierung der RT-PCR Methode	55
4.5.1. Magnesium und dNTPs	55
4.5.2. Matrize	56
4.5.3. DNA Polymerase und Primer	58
4.5.4. Additive	59
4.5.5. Fluoreszenzfarbstoffe	60
4.6. Methoden der Genexpressionsanalyse: Eignung am vorliegenden Beispiel	61
4.7. qPCR – die beste Methode in allen Fragestellungen?	63
4.7.1. Schmelzkurvenanalyse und fluorogene Sonden	64
4.8. Schlussfolgerung	66
5. Zusammenfassung	68
6. Literaturverzeichnis	70
7. Erklärung um Eigenanteil der Dissertationsschrift	87
8. Danksagung	88
9. Lebenslauf	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kurzübersicht etablierter Assays für metabolische Tests	15
Tabelle 2: Chemikalien	18
Tabelle 3: Medien, Puffer und Lösungen.....	20
Tabelle 4: Geräte	21
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien.....	22
Tabelle 6: HepG2 Kulturmedien und deren Bestandteile	23
Tabelle 7: Zusammensetzung der PCR Proben	27
Tabelle 8: Zeit- / Temperaturabschnitte einer RT-PCR	28
Tabelle 9: Verwendete Primer	28
Tabelle 10: Ergebnisse der Primer Optimierung mit RT-PCR	36

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung eines Leberläppchens	1
Abbildung 2: Anteile von Leberenzymen an der Biotransformation.....	2
Abbildung 3: Epigenetisch wirkende Gene und deren Einfluss	6
Abbildung 4: Die drei Phasen der Amplifikation einer PCR.....	13
Abbildung 5: Darstellung der unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen	24
Abbildung 6: RNA Isolation mit TriFast.....	25
Abbildung 7: <i>GAPDH</i> Primer Optimierung.....	31
Abbildung 8: <i>CYP1A2</i> Primer Optimierung.....	31
Abbildung 9: <i>CYP2C9</i> Primer Optimierung.....	32
Abbildung 10: <i>CYP3A4</i> Primer Optimierung.....	32
Abbildung 11: <i>KDM4C</i> Primer Optimierung	33
Abbildung 12: <i>KDM6B</i> Primer Optimierung	34
Abbildung 13: <i>HDAC1</i> Primer Optimierung	34
Abbildung 14: <i>HDAC2</i> Primer Optimierung	35
Abbildung 15: <i>PRMT1</i> Primer Optimierung	35
Abbildung 16: Vergleich der <i>CYP1A2</i> Expression.....	37
Abbildung 17: Vergleich der <i>CYP2C9</i> Expression.....	38
Abbildung 18: Vergleich der <i>CYP3A4</i> Expression.....	39
Abbildung 19: Vergleich der <i>KDM4C</i> Expression	40
Abbildung 20: Vergleich der <i>KDM6B</i> Expression	41
Abbildung 21: Vergleich der <i>HDAC1</i> Expression.....	42
Abbildung 22: Vergleich der <i>HDAC2</i> Expression.....	43
Abbildung 23: Vergleich der <i>PRMT1</i> Expression.....	44
Abbildung 24: Chromatin Array.....	54

Abkürzungsverzeichnis

5-AZA	5-Azacytidin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CYP	Cytochrom P450
CYPs	Cytochrom P450 Oxidasen
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylcarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMTi	DNA Methyltransferase Inhibitoren
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
dNTPs	Desoxynukleosid-Triphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylen-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	fötale Rinderserum
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GR	GelRed
GV	GoldView
HDAC1	Histondeacetylase 1
HDAC2	Histondeacetylase 2
HDACi	Histondeacetylase Inhibitoren
HNF4 α	Hepatozyten-nukleärer Faktor 4 alpha
KDM4C	Lysin Demethylase 4C
KDM6B	Lysin Demethylase 6B
LC / MS	Flüssigchromatographie / Massenspektrometrie
MALDI-TOF	Matrixassistierte Laser Desorption Ionisierung mit Flugzeitanalyse
MIQE	Mindestinformationen für die Publikation quantitativer Real Time PCR Experimente
mRNA	Boten RNA
P/S	Penicillin / Streptomycin

PCR	Polymerase - Kettenreaktion
PHHs	Primäre humane Hepatozyten
PRMT1	Protein Arginin Methyltransferase 1
qPCR	Real Time PCR / Vollquantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Seq	RNA - Sequenzierung
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR / Konventionelle PCR
SAGE	serielle Analyse der Genexpression
SG	SYBR Green
ssDNA	einzelsträngige DNA
TRIS	Tromethamin
UBC	Ubiquitin C
YWHAZ	Tryptophan 5-Monooxygenase Aktivator

1. Einleitung

1.1. Leberanatomie und CYP Metabolismus

Die menschliche Leber ist mit 1200 bis 1800 Gramm das größte zentrale Stoffwechsel- und Entgiftungsorgan des Körpers (Paulsen, 2017). Als größte menschliche Drüse ist sie in die wichtigsten Stoffwechselprozesse des Körpers beteiligt, darunter Eisen- / Vitaminspeicherung, Plasmaproteinproduktion und Glukosestoffwechsel (Welsch, 2005). Organisiert sind die parenchymalen Leberzellen (Hepatozyten) in Leberläppchen. Diese stellen ein polares, hochstrukturiertes und dreidimensionales System einschließlich Sinusoide und Canaliculi dar (Simons and Fuller, 1985). Der Blutfluss eines Leberläppchens verläuft dabei von peripher nach zentral. In der Mitte eines jeden Leberläppchens befindet sich die Zentralvene, von wo aus das Blut über die 3 Lebervenen in die obere Hohlvene abfließt (Abbildung 1). Neben genannter Stoffwechselaktivitäten findet hier auch der Abbau körperfremder Substanzen wie Pharmazeutika statt (Gebhardt, 1992).

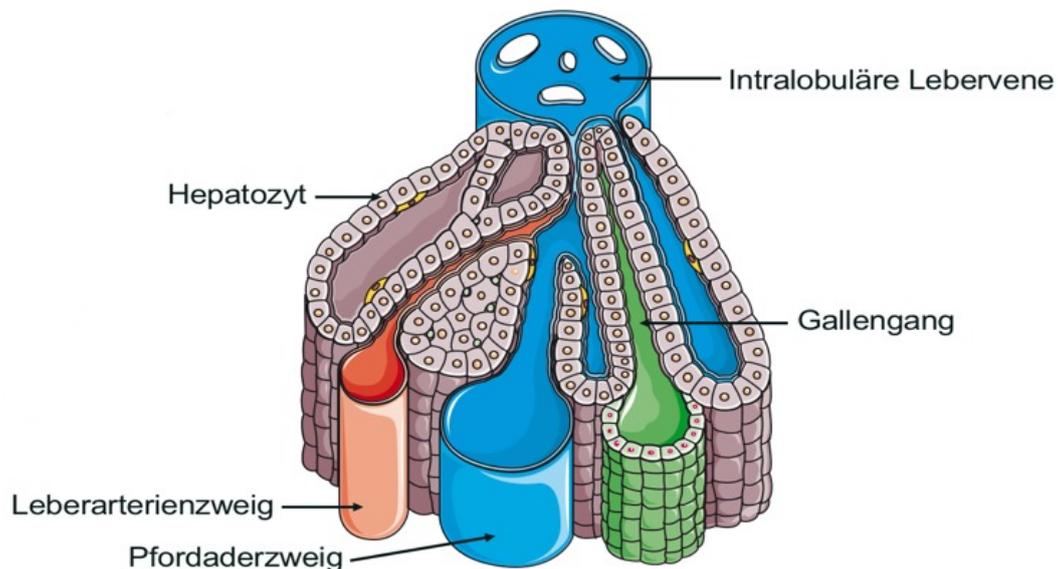


Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung eines Leberläppchens

Jedes Leberläppchen hat einen eigenen Zufluss aus Zweigen von Leberarterie und Pfortader. Dadurch wird eine Versorgung mit sauerstoffreichem Blut sowie mit Metaboliten gewährleistet, die in den Hepatozyten weiter abgebaut und anschließend in den Gallengang sezerniert werden (Welsch, 2005). Die Abbildung wurde erstellt unter Verwendung von Servier Medical Art (<http://smart.servier.com/>).

Dabei spielen Cytochrom P450 (CYP) Proteine eine entscheidende Rolle. Diese sind maßgeblich an der oxidativen Eliminierung pharmazeutischer Substanzen beteiligt (Lindros, 1997).

Mittlerweile sind über 50 verschiedene CYP Typen beim Menschen bekannt (Wilkinson, 2005). Von diesen sind bestimmte Gruppen besonders häufig an Medikamentenreaktionen beteiligt (Guengerich, 2008). Wichtige in dieser Arbeit untersuchte CYP Typen sind in Abbildung 2 aufgeführt.

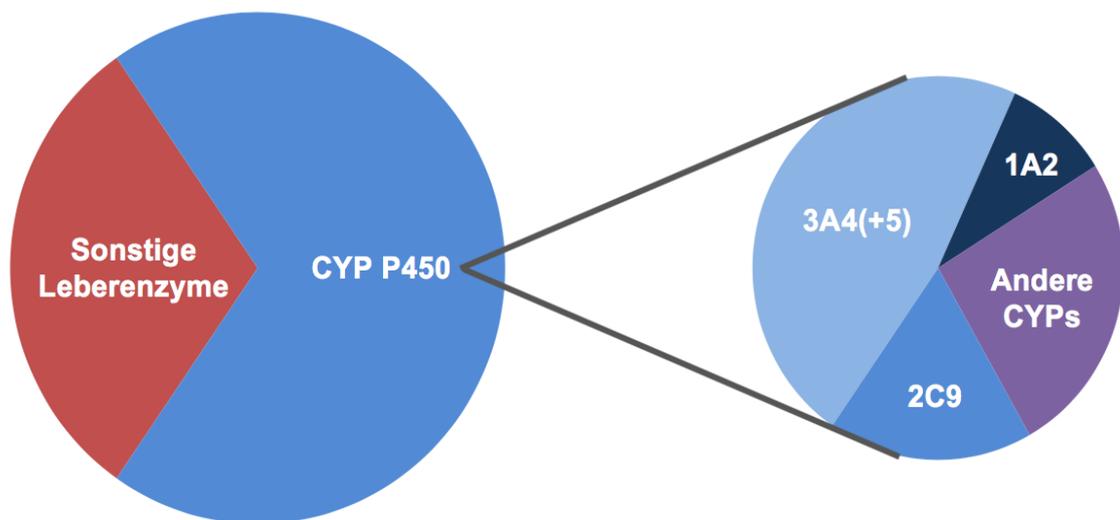


Abbildung 2: Anteile von Leberenzymen an der Biotransformation

Gezeigt sind die Anteile der Enzyme am Umsatz der am häufigsten verschriebenen Pharmazeutika in den USA. Deutlich zu sehen ist der hohe Anteil von Cytochrom P450, wobei die CYP3 Familie unter allen CYPs am häufigsten beteiligt ist. (Abbildung erstellt nach Williams *et al.*, 2004).

CYP Proteine haben eine entscheidende Entgiftungsfunktion (Lindros, 1997). Durch Metabolisierung pharmazeutischer Substanzen können jedoch auch toxische Stoffwechselprodukte entstehen, die leberschädigend sein können (Shou *et al.*, 1996). Aus diesem Grund ist eine genaue Kenntnis über Pharmakodynamik und Pharmakokinetik von Medikamenten wichtig (Williams *et al.*, 2004). Neue Pharmazeutika werden daher vor ihrer Zulassung intensiv in mehreren Phasen auf Toxizität untersucht, um unter anderem medikamenteninduzierte Leberschädigungen zu minimieren (Horien and Yuan, 2017).

1.2. Warum *in vitro* Medikamententests?

Medikamenteninduzierte Hepatotoxizität ist weltweit der häufigste Grund warum neu zugelassene Medikamente wieder vom Markt genommen werden müssen (Van den Hof *et al.*, 2014). Adverse Effekte von Medikamenten sind oft schwer vorauszusagen und mit bis zu 13 % die zweithäufigste Ursache für akutes Leberversagen (Ostapowicz *et al.*, 2002). Es hat sich gezeigt, dass genetische Prädispositionen, Geschlecht, Alter und Ethnie einen wichtigen Einfluss auf den Metabolismus von Medikamenten im Menschen haben (Rajman *et al.*, 2017, Wolbold *et al.*, 2003, Sadler *et al.*, 2016). Aufgrund eines unterschiedlichen Metabolismus können Tierversuche lebertoxische Wirkungen nur bedingt vorhersagen (Shanks *et al.*, 2009). So kann die gleiche Substanz in bestimmten Fällen beim Menschen zu toxischen Metaboliten abgebaut werden, die beim Tier nicht nachweisbar sind (Jaeschke *et al.*, 2014). Daher werden Medikamente vor ihrer Zulassung im Rahmen präklinischer Studien ebenfalls *in vitro* getestet (Ewart *et al.*, 2018).

1.3. Primäre humane Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten (PHHs) sind heutzutage der Goldstandard für *in vitro* Tests auf Lebertoxizität (Bell *et al.*, 2016). Diese werden in Deutschland vor allem aus reseziertem Lebergewebe gewonnen, zum Beispiel im Rahmen einer Tumor Operation oder Organexplantation bei chronischen Lebererkrankungen (Kleine *et al.*, 2014). Als Kultivierungsform ist die Monolayer Kultur in 2D etabliert (Gomez-Lechon *et al.*, 2008). Es wurde berichtet, dass eine Isolierung von Hepatozyten aus ihrem natürlichen Netzwerk innerhalb weniger Tage zu einer Änderung der Zellphysiologie und Dedifferenzierung führt (Godoy *et al.*, 2013, Knobloch *et al.*, 2012). Dabei verlieren die Zellen auch ihre Fremdstoffmetabolisierenden Eigenschaften (Guillouzo and Guguen-Guillouzo, 2008). Um das umgebende Gewebe besser imitieren zu können und so die metabolische Aktivität der Zellen länger aufrecht zu erhalten, wird in den letzten Jahren verstärkt an 3D Kulturen gearbeitet. Diese können die Funktionalität und Differenzierung zwar länger aufrechterhalten, jedoch das komplexe 3D Netzwerk in einer Leber nicht vollständig nachbilden (Godoy *et al.*, 2013). Durch den

schnellen Funktionsverlust stellen PHHs für die langfristige Beobachtung von Lebertoxizität keine dauerhaft befriedigende Möglichkeit dar (Koyama *et al.*, 2018). Außerdem ist auch die Verfügbarkeit der Zellen durch begrenzte Spender limitiert und die Zellviabilität sehr variabel, weswegen dringend zuverlässige Alternativen benötigt werden (Olsavsky *et al.*, 2007).

1.4. Stammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte Vorläuferzellen (Bajada *et al.*, 2008). Sie können unter gezielter Stimulation zu bestimmten Geweben ausdifferenziert werden (Weiner, 2008). Die Verwendung embryonaler Stammzellen als Alternative zu PHHs wäre aufgrund ihrer Pluripotenz und phänotypischen Plastizität wissenschaftlich betrachtet eine gute Alternative, ist jedoch ethisch umstritten, da durch ihre Isolation die Blastozyste zerstört werden muss (Lou and Liang, 2011). In Deutschland ist die Forschung an embryonalen Stammzellen streng reglementiert und nach §4 Stammzellgesetz bis auf wenige Sonderfälle verboten (Müller-Terpitz, 2006). Adulte multipotente Stammzellen werden oft für die *in vitro* Toxizitätsforschung herangezogen (Qihao *et al.*, 2007). Trotz Stimulation durch bestimmte hepatische Wachstumsfaktoren oder Co-Kultivierung mit Leberzellen bleibt ihre Differenzierung und metabolische Kapazität jedoch oft limitiert (Seeliger *et al.*, 2013, Snykers *et al.*, 2009, Ruoß *et al.*, 2020). Auch induzierte pluripotente Stammzellen stellen durch die oftmals unvollständige Differenzierung und ineffektive Reprogrammierung aktuell keine befriedigende Alternative zu PHHs dar (Kammerer and Küpper, 2018).

1.5. Hepatomzelllinien

Eine weitere Alternative zu PHHs sind humane Hepatomzelllinien, darunter HepG2, Huh7, HLE und HepaRG (Godoy *et al.*, 2013).

Im Gegensatz zu PHHs zeichnen sie sich durch eine ständige Verfügbarkeit, unbegrenzte Teilungsfähigkeit, leichte Kultivierung und einen stabilen Phänotyp aus (Donato *et al.*, 2008). Die metabolische Kapazität und CYP Aktivität liegt bei den meisten dieser Zelllinien jedoch deutlich unter dem PHH Niveau (Rodriguez-Antona *et al.*, 2002). HepaRG Zellen haben unter den Hepatomzelllinien den

Vorteil einer besonders hohen CYP3A4 und CYP1A2 Aktivität, welche fast auf PHH Niveau ist (Kammerer and Küpper, 2018). Gleichzeitig liegt die Harnstoff Produktion, CYP2C9 und CYP2D6 Aktivität in HepaRG Zellen in Monolayer Kulturen deutlich unter dem Niveau in frischen PHHs (Jackson *et al.*, 2016, Lubberstedt *et al.*, 2011). Diese und weitere Hepatomzelllinien können den Metabolismus von PHHs meist nicht vollumfänglich abbilden, sodass aktuell viele Ansätze zur metabolischen Optimierung dieser Zellen erforscht werden (Kammerer and Küpper, 2018, Ruoß *et al.*, 2020).

Eine Möglichkeit zur Steigerung der metabolischen Kapazität ist die Optimierung der Kultivierungsbedingungen (Doostdar *et al.*, 1988). So kann die Verwendung einer bestimmten Zellpassage den Metabolismus von Hepatomzelllinien nachweislich steigern (Lin *et al.*, 2012). Auch die Inkubation mittels bestimmter Tryptophan Derivate oder Dimethylsulfoxid (DMSO) kann eine metabolische Optimierung bewirken (Zhang *et al.*, 2017, Kanebratt and Andersson, 2008). Beide Substanzen können in erhöhten Konzentrationen jedoch auch toxische Wirkungen aufweisen, was die Viabilität und metabolische Kapazität der Zellen vermindern kann (Zhang *et al.*, 2017).

Eine andere Möglichkeit besteht in genetischer Modifikation durch Transduktion, etwa durch Einbringung viraler Expressionsvektoren, die für metabolische Enzyme kodieren (Aoyama *et al.*, 2009). Mit dieser Methode ist durch Insertion eines spezifischen *CYP* Gens eine selektive Erhöhung der Enzymaktivität möglich (Steinbrecht *et al.*, 2019). Durch zufälliges Einsetzen der Gensequenzen können bei Überschreibungen des Wirtsgenoms jedoch auch Insertionsmutationen hervorgerufen werden, wodurch essentielle Gene abgeschaltet und zellspezifische Funktionen gestört werden können (Kim and Eberwine, 2010). Die Anzahl stabil transduzierbarer Gene zur metabolischen Optimierung ist daher begrenzt (Tolosa *et al.*, 2018).

Ein weiterer Ansatz zur metabolischen Optimierung ist der Versuch der Redifferenzierung und Reaktivierung Fremdstoff metabolisierender Eigenschaften durch epigenetische Modifikation (Yamashita *et al.*, 2003). Es ist bekannt, dass in Leberkrebszelllinien viele metabolisch relevante Gene durch Hypermethylierung supprimiert sind (Dannenbergh and Edenberg, 2006). So ist

der niedrige Differenzierungsgrad assoziiert mit einer Herabregulierung des Epithelmarkers *E-Cadherin* sowie einer erhöhten Expression des Transkriptionsfaktors *Snail*, welcher seinerseits das metabolische Schlüsselgen Hepatozyten-nukleärer Faktor 4 alpha (*HNF4α*) hemmt (Cicchini *et al.*, 2006, Serrano-Gomez *et al.*, 2016). Dies hat insofern Bedeutung, da *HNF4α* in Hepatozyten für die Expression bestimmter *CYPs* verantwortlich ist (Gonzalez, 2008, Jover *et al.*, 2001). Wichtige epigenetisch wirkende Gene und deren Einfluss sind in Abbildung 3 aufgeführt.

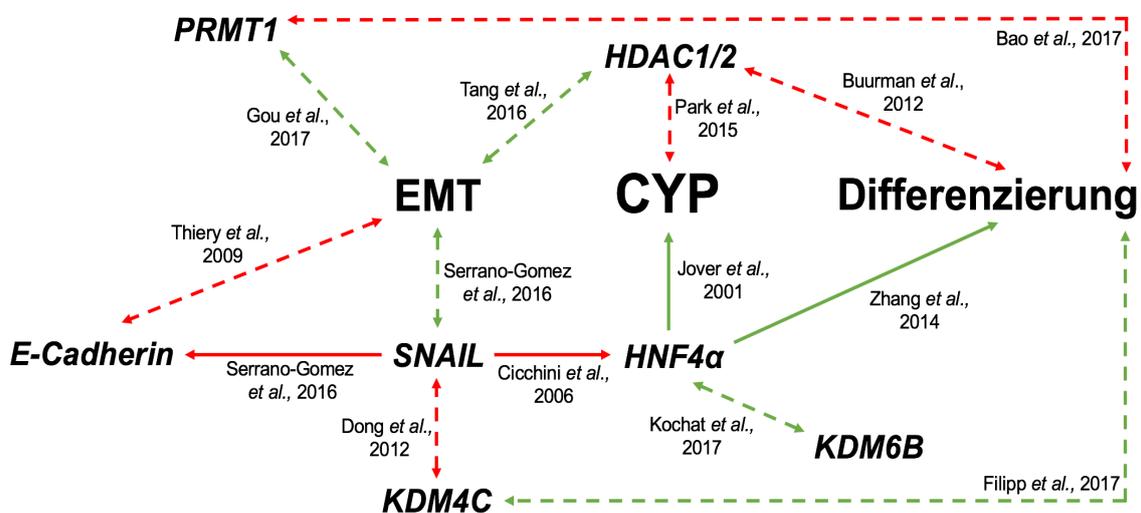


Abbildung 3: Epigenetisch wirkende Gene und deren Einfluss

Legende: EMT: epithelial-mesenchymale Transition; *KDM4C*: Lysin Demethylase 4C; *KDM6B*: Lysin Demethylase 6B; *HDAC1/2*: Histondeacetylase 1 und 2; *PRMT1*: Protein Arginin Methyltransferase 1; Durchgängige Pfeile in grün: Förderung / rot: Hemmung; Gestrichelte Pfeile in rot: negativ assoziiert / grün: positiv assoziiert

Epigenetisch wirkende Gene beeinflussen die EMT und Zelldifferenzierung und modulieren Gene wie *HNF4α*, die einen nachgewiesenen Einfluss auf die Ausprägung eines stabilen metabolischen Status und Phänotypen haben (Yamashita *et al.*, 2003). Dies geschieht beispielsweise durch Histonmodifikation und DNA Methylierung und wird durch epigenetische Modulatoren wie DNA Methyltransferase Inhibitoren (DNMTi) und Histondeacetylase Inhibitoren (HDACi) reguliert (Snykers *et al.*, 2009). Epigenetische Modifikation kann so beispielsweise in Hepatozyten-ähnlichen Zellen die Ausprägung leberähnlicher

Funktionen fördern (Seeliger *et al.*, 2013). Zudem konnte in einer Studie aus unserem Labor gezeigt werden, dass der DNA Methyltransferase Inhibitor 5-Azacytidin (5-AZA) in Verbindung mit Vitamin C in den Hepatomzelllinien Huh7 und HLE den Transkriptionsfaktor *Snail* herunterregulieren kann (Sajadian *et al.*, 2016). Dies legt nahe, dass diese Behandlung nicht nur herunterregulierte Gene wie *HNF4 α* , sondern auch metabolische Eigenschaften in Hepatomzelllinien reaktivieren kann (Yamashita *et al.*, 2003, Sajadian *et al.*, 2016, Snykers *et al.*, 2009).

Diese Annahme konnte in aktuellen Untersuchungen unseres Labors bestätigt werden. Es ist möglich die Genexpression bestimmter *CYPs* sowie epigenetisch relevanter Gene in der Hepatomzelllinie HepG2 mittels 5-AZA und Vitamin C zu erhöhen (Ruoß *et al.*, 2019). Dabei konnte für Insulin und Hydrocortison, analog zum wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung einer stabilen Differenzierung und Phänotypen in Hepatozytenkulturen, ein zusätzlicher positiver Effekt auf die metabolische Kapazität nachgewiesen werden (Kinoshita and Miyajima, 2002, Michalopoulos and Pitot, 1975, Ruoß *et al.*, 2019). Trotz der Zellbehandlung konnte jedoch keine mit frischen PHHs vergleichbare metabolische Kapazität nachgewiesen werden. Der positive Effekt auf den Metabolismus in HepG2 Zellen bleibt trotz epigenetischer Modifikation limitiert (Ruoß *et al.*, 2019). Daher ist die Anwendung genauer Messmethoden zum zuverlässigen Nachweis erzielter Wirkungen vor dem Hintergrund großer metabolischer Differenzen zu PHHs sehr wichtig.

1.6. Etablierte Methoden zur Messung der Proteinexpression

Der Metabolismus kann auf Protein Ebene durch verschiedene Methoden gemessen werden. Eine etablierte Möglichkeit zum Nachweis von Proteinen ist das Immunoblot Verfahren des Western Blot (Towbin *et al.*, 1979). Dabei werden die Proteine nach Isolation und elektrophoretischer Trennung auf eine Trägermembran transferiert (meist Nitrocellulose oder Polyvinylidenfluorid) und mit spezifischen Antikörpern inkubiert (Mahmood and Yang, 2012). Der Primärantikörper bindet dabei an das zu detektierende Protein. Nach Entfernung unspezifisch bindender Antikörper durch Waschen wird die Membran mit einem

Sekundärantikörper inkubiert. Dieser bindet an den hinteren Fc-Teil des Primärantikörpers und ist meist mit einem Enzym (zum Beispiel Meerrettichperoxidase) gekoppelt (Kim, 2017). Durch Substratgabe kommt es zum enzymatischen Abbau mit Farbreaktion, welche durch verschiedene Methoden nachgewiesen werden kann (meist Chemolumineszenz Kameras oder Röntgenfilm) (Khoury *et al.*, 2010).

Eine andere Methode zum Nachweis von Proteinen ist der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (ELISA) (Van Weemen and Schuurs, 1971). Bei diesem Verfahren wird das zu messende Protein mithilfe enzymaktiver Antikörper markiert, das zugegebene Substrat durch das gebundene Enzym umgesetzt und der entstehende Farbumschlag photometrisch gemessen (Gaastra, 1984). Im Gegensatz zum Western Blot werden die Proteine hier nicht vor der Reaktion aufgetrennt (Bass *et al.*, 2017). Western Blot und ELISA sind etablierte Methoden, um metabolisch relevante Proteine in Leberzellen oder Zelllinien zu messen (Xuan *et al.*, 2016, Ramsden *et al.*, 2014).

Die Matrixassistierte Laser Desorption Ionisierung mit Flugzeitanalyse (MALDI-TOF) als weitere Methode der Proteinanalytik beinhaltet die Herstellung dicht gepackter Matrixkristalle, in welche die Probe zunächst fixiert und anschließend mit einem speziellen Laser bestrahlt wird. Dabei lösen sich die Moleküle und werden gleichzeitig ionisiert (van den Boom *et al.*, 2013). Diese werden anschließend in einem elektrischen Feld beschleunigt, in ein Flugrohr geleitet und am Ende der Strecke detektiert. In Abhängigkeit ihrer Masse und damit Flugzeit können gemessene Proteine einem Massenspektrum zugeordnet werden (Singhal *et al.*, 2015). Die MALDI-TOF Methode ist im Stande, die Proteinexpression mehrerer Proteine gleichzeitig unter geringem Probenverbrauch zu messen (Zhou *et al.*, 1999). Insbesondere zum simultanen Nachweis und der Quantifizierung mehrerer CYP Typen wird dieses Verfahren häufig verwendet (Van Summeren *et al.*, 2011, Michaels and Wang, 2014).

1.7. Etablierte Assays zur Bestimmung der Enzymaktivität

Es bestehen prinzipiell zwei Möglichkeiten, Enzymaktivitäten zu bestimmen, durch Messung der Abnahme des Substrats oder Zunahme des Abbauprodukts

im Rahmen der Enzymreaktion (Harris and Keshwani, 2009). Die Konzentrationsänderung wird ins Verhältnis zur Zeitspanne der Reaktion gesetzt, woraus die Aktivität errechnet werden kann (Bisswanger, 2014). Enzym Assays können dabei in kontinuierliche und diskontinuierliche Verfahren eingeteilt werden (Aich *et al.*, 2001). Während kontinuierliche Assays eine konstante Messung der Enzymaktivität möglich machen, wird bei diskontinuierlichen Assays die enzymatische Reaktion gestoppt und Enzymsubstrate und Produkte gemessen (Robinson, 2015).

Etablierte Methoden sind Aktivitätsmessungen mittels Fluoreszenz basierter Assays. Dabei werden die Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Substrat, Kofaktoren und Puffer über eine definierte Zeit in Mikrotiterplatten inkubiert und das emittierte Signal anschließend gemessen (Donato *et al.*, 2004). So kann etwa durch Konzentrations- und damit Fluoreszenzzunahme des Metaboliten in einer bestimmten Zeitspanne auf den Enzymumsatz geschlossen werden (Maryati *et al.*, 2014). Häufig genutzte fluoreszierende Substrate in der CYP Aktivitätsmessung sind dabei verschiedene Cumarin Derivate (Juvonen *et al.*, 2018).

Ein weiterer etablierter Ansatz zur Aktivitätsmessung sind Lumineszenz basierte Assays (Stresser *et al.*, 2000). Dabei werden Derivate von Luciferin als CYP Substrate verwendet, die nach Metabolisierung luminogen werden. Diese reagieren anschließend mit dem Enzym Luciferase wodurch eine Lumineszenz emittiert wird (Auld *et al.*, 2013). Konventionelle Fluoreszenz und Lumineszenz basierte Assays sind schnelle und unkomplizierte Methoden, können jedoch nur bedingt Rückschlüsse auf die Funktion spezifischer CYP Typen wiedergeben, da ein simultaner Substratumsatz durch mehrere Isoenzyme des CYP Systems nicht immer ausgeschlossen werden kann (Chauret *et al.*, 1999, Ung *et al.*, 2018). Gleichzeitig ist der Nachweis der erzeugten Emission störanfällig gegenüber Änderungen von Temperatur, Ionenkonzentration und pH Wert der Versuchslösung (Gibbs, 2011). Zusätzlich sind oft hohe Lösungsvolumina und Enzymkonzentrationen zum sicheren Nachweis nötig (Rodrigues and Lin, 2001). Eine Alternative ist die Kopplung von flüssigchromatographischen und massenspektrometrischen Verfahren mittels LC / MS (Korfmacher, 2005). Dabei

wird das gewünschte Enzym mit einem spezifischen Substrat über eine definierte Zeit inkubiert, in eine mobile polare Phase aufgelöst und mittels Hochdruckpumpen durch eine stationäre unpolare Phase gepumpt (Xiao and Guengerich, 2012). Durch unterschiedlich lange Interaktionen zwischen beiden Phasen wird die Lösung in ihre Bestandteile aufgetrennt, das Lösungsmittel durch verschiedene Ionisationsverfahren verdampft und die übrigen ionisierten Bestandteile entsprechend ihrer Ladung durch das Massenspektrometer gemessen (Karpievitch *et al.*, 2010). Durch Kopplung beider Methoden kann so jedem Punkt des Chromatogramms ein Massenspektrum zugeordnet werden (Korfmacher, 2005). Durch das CYP System umgesetzte Substrate können so als Metabolite identifiziert und in Relation zur Inkubationszeit gesetzt werden, woraus sich die CYP Aktivität berechnen lässt (Pitt, 2009).

Anders als in konventionellen Fluoreszenz und Lumineszenz basierenden Verfahren sind hier hochsensitive Nachweise niedriger CYP Aktivitäten mit deutlich geringeren Lösungsvolumina möglich (Ung *et al.*, 2018). Dabei ist auch der Nachweis mehrerer CYP Aktivitäten in einer Lösung gleichzeitig möglich (Pillai *et al.*, 2013, Ruoß *et al.*, 2019).

1.8. Etablierte Methoden der Genexpressionsanalyse

Ein quantitativer Nachweis bestimmter Genabschnitte kann zum Beispiel mittels DNA Microarray erreicht werden (Aitman, 2001). Hier erfolgt die Genexpressionsanalyse mittels einen Glaschips mit mehreren Feldern, an welchen fluoreszenzmarkierte komplementäre DNA (cDNA) Fragmente gebunden sind, sodass bei Zugabe der fluoreszenzvorbereiteten Probe durch komplementäre Bindung eine Mischfluoreszenz emittiert wird, die mit einem Fluoreszenzmikroskop oder Laserscanner abgebildet, und danach quantifiziert werden kann (Stein, 2001).

Mit der seriellen Analyse der Genexpression (SAGE) können auch kleine, mitunter neue Gene geringer Basenlänge identifiziert werden (Yamamoto *et al.*, 2001). Dabei wird die cDNA zunächst mithilfe spezieller Restriktionsenzyme in kleine, sogenannte tag - Fragmente gespalten, mittels DNA Polymerasen vervielfältigt und dann durch selektive Enzyme zusammengeführt, sodass lange Ketten

der gewählten Gensequenz entstehen, die anschließend quantifiziert werden können (Pleasance *et al.*, 2003). Ebenfalls die Erstellung eines Genexpressionsprofils, welches metabolisch relevante Gene einschließt, ist so möglich (Yamashita *et al.*, 2000).

Ein komplexes Verfahren der Genexpressionsanalyse ist die Methode der RNA - Sequenzierung (RNA-Seq) (Wang *et al.*, 2009). Dazu wird die isolierte Boten RNA (mRNA) in cDNA umgeschrieben, die cDNA fragmentiert, mit bestimmten Sequenzen, sogenannten Adaptoren, verbunden und mithilfe einer DNA Polymerase vervielfältigt (Kukurba and Montgomery, 2015). Dabei entstehen mehrere kleine Fragmente, sogenannte *reads*, welche mittels Gelelektrophorese größenspezifisch aufgetrennt werden können (Jean *et al.*, 2010). Nach der Größenbestimmung der Fragmente wird durch Sequenzierung deren Basenfolge bestimmt. Eine etablierte Methode ist dabei die Anwendung fluoreszenzmarkierter Lösungen, welche sich nach Bindung eines bestimmten Nukleotids basenspezifisch anfärben lassen, woraus die Sequenz bestimmt werden kann (Hodkinson and Grice, 2015). Ermittelte Daten werden statistisch ausgewertet und durch Abgleich mit Datenbanken bestimmten Genen im Genom zugeordnet. Je höher die Expression eines Gens ist, desto häufiger wird eine spezifische Sequenz diesem Gen zugeordnet (Kukurba and Montgomery, 2015). Durch die RNA-Seq Methode können auch Expressionsprofile metabolisch relevanter Gene verschiedener Zelllinien erstellt und mit PHHs verglichen werden (Tyakht *et al.*, 2014).

In vielen modernen Verfahren der Genexpressionsanalyse, darunter auch RNA-Seq und SAGE, ist die Reverse Transkriptase und Polymerase - Kettenreaktion (PCR) ein essentieller Bestandteil, um Gene adäquat nachweisen zu können (Xu *et al.*, 2009, Di *et al.*, 2020, Kukurba and Montgomery, 2015).

1.8.1. cDNA Synthese durch Reverse Transkriptase

Einerseits ist RNA sehr anfällig für den Abbau durch RNAsen (Muyal *et al.*, 2009). Andererseits können selbst geringe Temperaturschwankungen zum Zerfall der RNA führen (Brisco and Morley, 2012). Um mRNA für Genexpressionsanalysen zu untersuchen, kann diese in cDNA umgeschrieben werden (Mülhardt, 2013).

Diese ist deutlich resistenter gegenüber enzymatischem Abbau und Temperaturschwankungen (Haddad and Baldwin, 2010). Um aus mRNA Strängen cDNA herzustellen, werden spezielle Primer, sogenannte Oligo(dT) Primer, verwendet. Diese bestehen aus Thymin Wiederholungen und binden an den aus Adenin bestehenden Poly(A) Schwanz am 3' Ende der mRNA, womit sie einen Anlagerungspunkt für die Reverse Transkriptase bilden (Rio, 2014). Als RNA abhängige DNA Polymerase synthetisiert diese durch Einbau komplementärer dNTPs eine einzelsträngige cDNA (Haddad and Baldwin, 2010). Bei besonders kurzer mRNA ohne Poly(A) Schwanz kommen Hexamer Primer zum Einsatz, welche aus zufälligen, kurzen Sequenzen bestehen und auch am 5' Ende binden können (Rio, 2014). Genabschnitte der synthetisierten cDNA können anschließend mittels PCR amplifiziert werden (Haddad and Baldwin, 2010).

1.8.2. Das Prinzip der PCR

Mit der Entdeckung der Polymerase - Kettenreaktion in den 80er Jahren durch Kary Mullis wurde die Genforschung um ein weiteres Verfahren der Genexpressionsanalyse erweitert (Mullis *et al.*, 1986). Aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität ist die PCR in vielen Laboren gut etabliert (Rajagopal *et al.*, 2019, Garibyan and Avashia, 2013). Die Methode basiert auf der Amplifikation bestimmter Genabschnitte mittels einer DNA Polymerase (Eckert and Kunkel, 1991).

Grob lässt sich der Ablauf eines PCR Zyklus in 4 Abschnitte einteilen. Im ersten Abschnitt, der Denaturierung, werden die DNA Stränge voneinander getrennt, indem auf etwa 95 °C erhitzt wird. Es entstehen DNA Einzelstränge (ssDNA). Anschließend wird auf eine niedrigere Temperatur heruntergeregelt, damit die Primer optimal binden können. Diese Temperatur nennt sich auch *Annealing* Temperatur (Rychlik *et al.*, 1990). In der sich anschließenden Amplifikation bindet die DNA Polymerase am 3' Ende des jeweils gebundenen Primers und synthetisiert einen komplementären DNA Strang. Verschiedene Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs) bilden dabei die Bausteine für die neue cDNA. Danach wird die Temperatur wieder erhöht, um beide Stränge

voneinander zu lösen. Diese bilden damit eine Matrize für einen neuen cDNA Strang (Lorenz, 2012). Die eigentliche Kettenreaktion lässt sich dabei in drei Phasen unterteilen (Lee and Kim, 2006) (Abbildung 4).

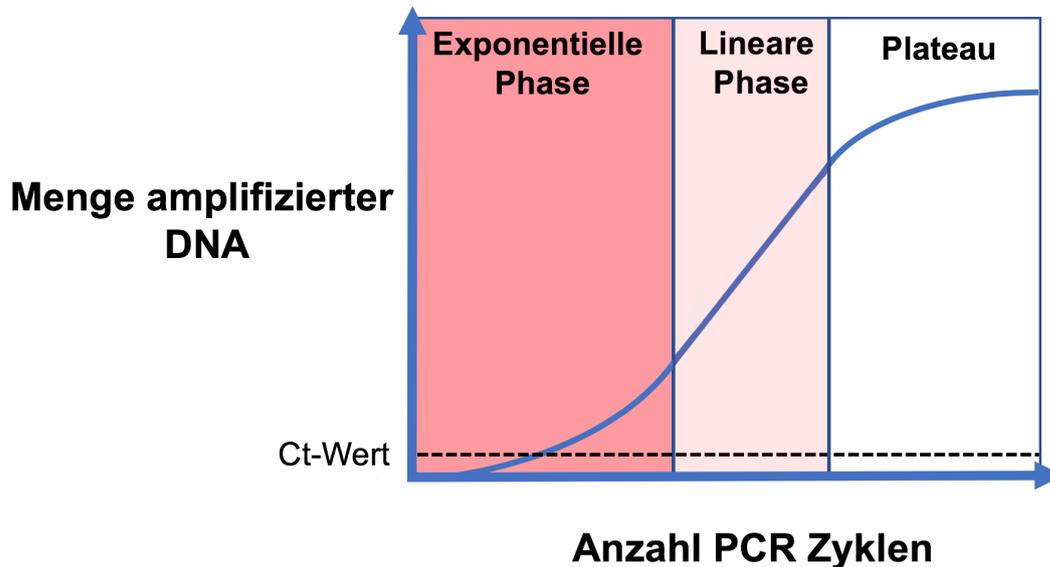


Abbildung 4: Die drei Phasen der Amplifikation einer PCR

In der ersten, exponentiellen Phase der PCR wird das Genprodukt in jedem Zyklus verdoppelt. Dadurch kommt es zum exponentiellen Anstieg der amplifizierten DNA. Mit Voranschreiten des Vorgangs kommt es zum sukzessiven Verbrauch der Reaktionskomponenten sowie einer sinkenden Effizienz der DNA Polymerase durch PCR Produkte (Kainz, 2000). Dies führt ab der linearen Phase zu einer zunehmend insuffizienten Amplifikation, welche schließlich in der Plateauphase zum Stillstand kommt. Der Ct-Wert stellt dabei die messbare Grenze dar, ab welcher die Amplifikation erstmals exponentiell abläuft (Antiabong *et al.*, 2016, Yuan *et al.*, 2006).

Die genauen Temperaturen während der PCR Zyklen sind abhängig von der jeweiligen Primersequenz, der Sequenzlänge und dem Guanin- / Cytosingehalt (Rychlik *et al.*, 1990). Auch das richtige Verhältnis zwischen dem dNTP und Magnesium (Mg^{2+}) Gehalt ist entscheidend, da die dNTP Bausteine in der Lage sind, Mg^{2+} zu binden. Dadurch kann die Funktion der Polymerase beeinflusst werden, was zu variablen Ergebnissen führen kann (Roux, 2009).

Die synthetisierten Amplifikate werden nach Beendigung der Reaktion gemessen. Bei der konventionellen PCR (RT-PCR) Methode werden dazu nach Durchlauf aller PCR Zyklen die Proben in ein Agarosegel aufgetragen, welches

aus Poren verschiedener Größen besteht (Mülhardt, 2013). Anschließend werden die negativ geladenen DNA Abschnitte durch die angeschlossene Stromquelle entsprechend ihrer Ladungen vom Minuspol weg zum Pluspol bewegt und durch die Poren entsprechend der Größe aufgetrennt (Lee and Kim, 2006). Die anschließende Detektion geschieht unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, welche in der Lage sind, in die DNA zu interkalieren und unter Bestrahlung einer bestimmten Wellenlänge zu fluoreszieren (Mülhardt, 2013). Dazu wird in der konventionellen Methode am häufigsten Ethidiumbromid (EtBr) genutzt (Lee *et al.*, 2012). Als sogenannte „End Point“ PCR wird die Fluoreszenz erst nach Ablauf aller Zyklen detektiert. Dabei wird meist in der Plateauphase der PCR gemessen (Nikitina *et al.*, 2003). Durch Primer Optimierung, Normierung von cDNA Gehalt und Zyklenzahl kann eine Messung vor dem Plateau erzielt werden, was semiquantitative Vergleiche möglich macht (Shiao, 2003, Bradford *et al.*, 2005).

1.8.3. Das vollquantitative Verfahren der Real Time PCR (qPCR)

Mit der Entwicklung der Real Time PCR in den 90er Jahren war es erstmals möglich, die Menge an amplifizierter DNA schon während der Reaktion vollquantitativ zu ermitteln (Heid *et al.*, 1996). Dies wird erzielt durch ein spezielles Fluorometer, welches eine Messung schon ab Beginn der Reaktion erlaubt. Dabei wird die Signalverstärkung durch Anlagerung des Fluoreszenzfarbstoffs an amplifizierte DNA Abschnitte an den Detektor weitergegeben, welcher nach jedem Zyklus die Intensität ermittelt (Kralik and Ricci, 2017). Anders als bei der konventionellen PCR findet hier die Messung schon in der exponentiellen Phase statt, was eine bessere Quantifizierung erlaubt (Singh *et al.*, 2014). Dadurch können auch geringe Unterschiede der Genexpressionen in verschiedenen Proben verglichen werden (Overbergh *et al.*, 2003). SYBR Green (SG) ist dabei der meist genutzte Farbstoff zum Nachweis (Mao *et al.*, 2007). Dieser besitzt eine 100-mal höhere Affinität zu doppelsträngiger DNA (dsDNA) als EtBr und erlaubt daher eine besonders sensitive Detektion (Valones *et al.*, 2009). In bestimmten Konzentrationen kann SG jedoch den Ablauf der PCR hemmen, indem es an Guanin - Cytosin (GC)

reiche Sequenzen bindet (Giglio *et al.*, 2003). Dabei interkaliert es irreversibel an die DNA Stränge, sodass diese durch Denaturierung nicht getrennt werden können. Bei Konzentrationen über 2 µM wurde dieses Phänomen vermehrt beobachtet (Gudnason *et al.*, 2007). Ein weiterer Nachteil ist die geringe Spezifität von SG (Mülhardt, 2013). Da der Farbstoff an jede dsDNA der Probe bindet, ist auch eine Bindung an Primer Dimere und unspezifische Amplifikationsprodukte möglich (Valones *et al.*, 2009). Um das amplifizierte Produkt zu identifizieren, ist daher die Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse möglich (Pryor and Wittwer, 2006).

Dazu wird die dsDNA langsam kontinuierlich erhitzt, wodurch sich die Doppelstränge lösen und der eingelagerte Farbstoff wieder freigesetzt wird. Dadurch wird ein Fluoreszenzabfall provoziert, welcher als Peak dargestellt wird und bei einer sequenzspezifischen Temperatur auftritt (Ahmed *et al.*, 2017). Dieser Schmelzpunkt ist abhängig von der Zusammensetzung des DNA Fragments und höher, je länger und GC reicher die Basensequenz ist (Mader *et al.*, 2008). Dadurch ist eine Unterscheidung von unspezifischen Nebenprodukten möglich, welche einen anderen Schmelzpunkt haben (Pryor and Wittwer, 2006).

1.9. Typische Anwendungsgebiete etablierter Assays

Genannte Assays werden für verschiedene Messungen im Rahmen metabolischer Tests verwendet.

Die wichtigsten Verfahren und deren übliche Anwendungsgebiete sind in Tabelle 1 zusammengefasst:

Tabelle 1: Kurzübersicht etablierter Assays für metabolische Tests

Methoden	Nachweis Ebene	Anwendung
Western Blot	Proteinexpression	Messung von metabolisch relevanten Proteinen in Zelllinien und Hepatozyten (Xuan <i>et al.</i> , 2016, Cui <i>et al.</i> , 2014, Lin <i>et al.</i> , 2012)
ELISA		Quantifizierung von Albumin, CYP Ausstattung und Urea Produktion (Gaskell <i>et al.</i> , 2016)
MALDI-TOF		Typisierung und Quantifizierung von CYPs sowie sekretierter Proteine (Blievernicht <i>et al.</i> , 2007, Van Summeren <i>et al.</i> , 2011)

Fluoreszenz basierte Assays	Enzymaktivität	Messung von CYP Aktivitäten und Quantifizierung von toxischen Metaboliten (Lin <i>et al.</i> , 2012, Seeliger <i>et al.</i> , 2013)
Lumineszenz basierte Assays		CYP Aktivitätsmessung sowie Messung der Zellviabilität nach Toxizitätstests (Kim <i>et al.</i> , 2015, Uno <i>et al.</i> , 2018)
LC / MS		Bestimmung verschiedener CYP Aktivitäten, Quantifizierung von Transport Enzymen (Achour <i>et al.</i> , 2017, Ruoß <i>et al.</i> , 2019)
DNA Microarray	Genexpression	Qualitativer Vergleich von metabolischen Genprofilen unterschiedlicher Hepatomzelllinien mit Hepatozyten (Olsavsky <i>et al.</i> , 2007, Jennen <i>et al.</i> , 2010)
SAGE		Simultane Identifikation mehrerer metabolisch agierender Gene in Hepatozyten Proben (Yamashita <i>et al.</i> , 2000)
RNA-Seq		Identifikation und Sequenzierung sowie Quantifizierung metabolisch relevanter Gene zur Erstellung von Expressionsprofilen, Vergleich von Zelllinien mit PHHs (Tyakht <i>et al.</i> , 2014)
RT-PCR qPCR		Genexpressionsanalyse von Transportproteinen und verschiedener metabolisch agierender Enzyme (CYPs, Transferasen) (Seeliger <i>et al.</i> , 2013, Ruoß <i>et al.</i> , 2019)

1.10. Vorüberlegungen dieser Arbeit

Aus Vorversuchen im Labor war ableitbar, dass HepG2 Zellen von mehreren untersuchten Hepatomzelllinien ein zu PHHs besonders ähnliches epigenetisches Expressionsprofil aufweisen (Ruoß *et al.*, 2019). Trotz epigenetischer Modifikation von HepG2 mit 5-AZA, Vitamin C, Insulin und Hydrocortison bleibt jedoch der positive Effekt auf die metabolische Kapazität der Zellen limitiert. Gleichzeitig ist die metabolische Differenz zwischen HepG2 Zellen und PHHs groß. Um den genauen Effekt der Behandlung zu erfassen ist somit die Wahl geeigneter und sensitiver Methodik entscheidend. Aufgrund der hohen Spezifität und Sensitivität, einfachen Durchführbarkeit und breiten Etablierung in der Forschungslandschaft wurde hierfür die Methodik der PCR gewählt und auf Anwendbarkeit geprüft. Dabei wurde die vollquantitative qPCR der konventionellen PCR gegenübergestellt und die erzielten Ergebnisse auf

Vergleichbarkeit geprüft, insbesondere vor dem Hintergrund partieller Quantität der konventionellen Methode. Untersucht wurden dabei besonders relevante *CYPs* und epigenetisch agierende Gene, welche eine zu PHHs abweichende Expression zeigen und gleichzeitig metabolische Funktion besitzen (analog Abbildung 2 und 3). Folgende Fragen wurden dabei bearbeitet:

1. Sind die gemessenen Expressionsunterschiede mittels konventioneller PCR vor dem Hintergrund der durchgeführten qPCR plausibel?
2. Ist die konventionelle Methode in dieser Fragestellung geeignet, um erzielte Expressionseffekte zu messen?
3. Welcher Effekt auf epigenetisch relevante Gene ist mittels RT-PCR nachweisbar?

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Zelllinie: HepG2 Zellen

Für alle durchgeführten Versuche wurde die Zelllinie HepG2 verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Hepatomzelllinie, welche aus einem gut differenzierten Lebertumor eines 15 jährigen argentinischen Jungen generiert werden konnte (Aden *et al.*, 1979).

2.2. Materialien

Tabelle 2: Chemikalien

Name	Hersteller	Artikelnummer	Lagerungs- temperatur	Hinweise
Agarose Standard	Carl Roth, Karlsruhe	2267.1	RT	
Azacytidin >98 %	Sigma, St. Louis (USA)	A2385-100MG	-20 °C	
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe	6943.1	RT	
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe	A512.1	RT	
cDNA Synthese Kit	Thermo Scientific, Waltham (USA)	Lot 00283099 K1612	-20 °C	
Chloroform >99 %	Carl Roth, Karlsruhe	Y015.1	RT	
DEPC >97 % (Diethyldicarbonat)	Carl Roth, Karlsruhe	K028.3	4 °C	
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Sigma, St. Louis (USA)	D5796	4 °C	4,5 g / l Glukose
Dulbecco's Phosphat gepufferte Koch- salzlösung (DPBS)	Sigma, St. Louis (USA)	D8537	RT	ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺
Ethanol, 99 %	Applichem, Darmstadt	A1613	RT	Dampf leicht entzündlich

Ethidiumbromid- lösung 1 % in Wasser	Carl Roth, Karlsruhe	2218.1	4 °C	
Ethylen- tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA), ≥99 % p.a.	Carl Roth, Karlsruhe	8043.2	RT	
fötales Rinder- serum (FCS)	Gibco, Carlsbad (USA)	10270-106	-20 °C	
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe	7530.1	RT	
Hepes Lösung, 1M	Sigma, St. Louis (USA)	H0887	4 °C	pH 7,0 – 7,6 steril
Hydrocortison	Pfizer, Puurs (Belgien)	-	4 °C	
Insulin	Novo Nordisk, Bagsværd (Dänemark)	-	4 °C	Human
L-Ascorbinsäure	Sigma, St. Louis (USA)	A8960-5G	RT	
L-Glutamin	PAA, Pasching (Österreich)	M11-006	-80 °C	Stabil
Natriumpyruvat	Sigma, St. Louis (USA)	S8636	4 °C	
Nichtessentielle Aminosäuren	Sigma, St. Louis (USA)	M7145	4 °C	
Penicillin / Streptomycin (P/S)	Sigma, St. Louis (USA)	P0781	-80 °C	10.000 U Penicillin / ml 10 mg Streptomycin / ml
pUC19 Marker	Carl Roth, Karlsruhe	X901.1	4 °C	
Ready Mix (KAPA2G Fast Ready Mix with Dye)	Peqlab, Erlangen	KM5101	-20 °C	

TriFast (<i>PeqGOLD</i>)	Peqlab, Erlangen	30-2020	4 °C	
Tromethamin (TRIS)	Sigma, St. Louis (USA)	T1503	RT	
Trypanblau	Carl Roth, Karlsruhe	CN76.1	RT	
Trypsin / EDTA	Sigma, St. Louis (USA)	T3924	-80 °C	0,5 g Trypsin / l 0,2 g EDTA / l
Williams' Medium E	Sigma, St. Louis (USA)	W1878	4 °C	

Tabelle 3: Medien, Puffer und Lösungen

Lösung	Bestandteile	Konzentration / Hinweise
10X TBE Lösung	TRIS Borsäure EDTA	0,89 M 0,89 M 0,02 M pH-Wert: 8,3 ± 0,2
1X TBE Lösung	100 ml 10X TBE Lösung TRIS Borsäure EDTA 900 ml ddH ₂ O	89 mM 89 mM 2 mM
70 % Ethanol	35 ml 99 % Ethanol 15 ml DEPC H ₂ O	bei RT lagern
Agarosegel	1,8 g Agarose Standard 100 ml 1 M TBE-Puffer 7 µl EtBr	Lösung ohne EtBr erhitzen, bis die Agarose aufgelöst ist, dann Hinzugabe von EtBr
DEPC H ₂ O	1 l ddH ₂ O 1 ml DEPC	0,1 % vor Benutzung 1 h bei 37 °C inkubieren, autoklavieren und abkühlen lassen

Hepatozyten Kulturmedium	Williams Medium E Glutamin P/S Hydrocortison Insulin Natriumpyruvat FCS nicht essentielle Aminosäuren	1 % 1 % (100 U / 0,1 mg / l) 0,8 µM 1 mM 1 mM 10 % 1 %
PCR Ladepuffer 5X	25 mg Bromphenolblau 5 ml 10X TBE 5 ml Glycerol (10 %)	5X TBE 5 % kann bei 4 °C (kurzzeitig) bis -20 °C (langfristig) gelagert werden
Trypanblau Arbeitslösung	0.75 ml Trypanblau 2.25 ml DPBS	0.125 %

Tabelle 4: Geräte

Gerätetyp /-modell	Artikelnummer	Hersteller
Abzugshaube 1200	200/02895/300	WALDNER Laboreinrichtungen, Wangen
Gefrierschrank (-20 °C) power cooling forma 900 series	7081896-04	Liebherr Machines, Bulle (Schweiz)
Gefrierschrank (-80 °C)	82760-2521	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Geldokumentationssystem (Gel iX Imager)	15545	INTAS Science Imaging, Göttingen
Laborinkubator 9040-0078	11-23846	Binder, Tuttlingen
Laborwaage ABJ 120-4 M	WB 110084	Kern & Sohn, Balingen
Laborwaage PCB 250-3	WD 110036863	Kern & Sohn, Balingen
Lichtmikroskop Primo Vert 415510-1101-000	3842000867	Carl Zeiss Microscopy, Jena
Mehrkanalpipette 10 - 50 µl, 20 - 200 µl, 50 - 300 µl		Corning, Corning (USA)
Messplatte (LVis Plate)	0680B0001C	BMG Labtech, Ortenberg
Mikrowellenofen 7838	AM 7838	Severin Elektrogeräte, Sundern

Mikrozentrifuge BN 08060235	C 1301 B	Labnet International, New Jersey (USA)
Mikrozentrifuge Fresco 17	41250019	Thermo Electron, Langenselbold
Netzteil Elektrophorese EV 222 P	99918	Peqlab, Erlangen
Neubauer Zählkammer		Paul Marienfeld, Königshofen
pH-Meter Five Easy FE 20	1232315296	Mettler-Toledo, Columbus (USA)
Rührwerk, Magnetrührer mit Edelstahlheizplatte, RH B 2	6.050.357	IKA-Werke, Staufen im Breisgau
Rührwerk, Magnetrührer MR Hei-Mix L	40700340	Heidolph Instruments, Schwabach
Sicherheitswerkbank Maxisave S2020 1.8	41293949	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Spektralphotometer Fluostar Omega	415-1264	BMG Labtech, Ortenberg
Thermoreaktor für Polymerase-Reaktionen (Veriti 96-Well Thermal Cycler 9902)	2990213851	Applied Biosystems, Carlsberg (USA)
Vortex Mixer	1101243	Corning, Corning (USA)
Wasserbad AL 25	LCB 0727-11-0094	Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen
Zentrifuge Megafuge 40 R	41307652	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller	Artikelnummer
Handschuhe Peha-soft nitrile	Paul Hartmann, Heidenheim	942207
Multititerplatte 6 Well	Corning, Corning (USA)	10146810
Pipettenspitzen 1 – 10 µl, 2 – 200 µl, 100 – 1000 µl	Starlab, Hamburg	S-1111-3000-B S-1113-1006-C S-1111-6001-C
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht	72.699
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Carl Roth, Karlsruhe	CH75.1, CK06.1
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen	188271 62.547.004
Spritze 10 ml, 20 ml	Braun, Melsungen	4606108V, 4606205V

Sterilfilter	Milipore, Massachusetts (USA)	SLGPO33RS
Stripetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning, Corning (USA)	20612013 17712012 21512025
Zellkulturflaschen T175	Greiner bio-one, Frickenhausen	660175
Zellschaber	Corning, Corning (USA)	1331203

2.3. Methoden

2.3.1. Kultivierung von HepG2 Zellen und Zellstimulation

Die HepG2 Zellen werden in vorgewärmten DMEM Medium, welches 10 % FCS und 1 % P/S enthält, bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert (Donato *et al.*, 2015). Die Zellen werden bei einer Konfluenz von 80 – 100 % gesplittet.

Dazu werden die Zellen einmal mit DPBS gewaschen und anschließend für 10 min mit einer Trypsin / EDTA Lösung inkubiert. Das erfolgreiche Ablösen der Zellen wird unter dem Lichtmikroskop verifiziert. Anschließend wird die Trypsin Reaktion durch die Hinzugabe von FCS haltigem Medium gestoppt, die Zellen bei 600 x g für 10 min zentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen. Zur Ermittlung der Zellzahl wird eine kleine Probe der Zellsuspension entnommen, 1:1 mit der gleichen Menge Trypanblau vermischt und mithilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt (Strober, 2001). Die Zellen werden entsprechend mit Kulturmedium verdünnt und wie in Ruoß *et al.*, 2019 beschrieben in einer Zellkonzentration von 8×10^4 Zellen / cm² ausplattiert. Nach 24 stündiger Kultivierung in 6 Well-Platten werden die Zellen jeweils 24 h mit 5-AZA, Vitamin C und anschließend weitere 24 h zusätzlich mit Hydrocortison und Insulin stimuliert. Die Medien Bestandteile und Konzentrationen sind Tabelle 6 zu entnehmen (Ruoß *et al.*, 2019).

Tabelle 6: HepG2 Kulturmedien und deren Bestandteile

Kulturmedium	Bestandteile	Konzentrationen
HepG2 Standardmedium	DMEM Medium P/S FCS	1 % (100 U / 0,1 mg / ml) 10 %

HepG2 Stimulationsmedium	HepG2 Standardmedium 5-AZA Vitamin C	10 µM 0,5 mM
HepG2 Stimulationsmedium + Insulin / Hydrocortison	HepG2 Standardmedium 5-AZA Vitamin C Insulin Hydrocortison	10 µM 0,5 mM 1 mM 0,8 µM

Es werden jeweils 2 ml steril filtriertes Medium pro Well verwendet. Ein Mediumwechsel wird alle 24 h durchgeführt. Bei nicht stimulierten Zellen wird analog dazu ebenfalls alle 24 h ein Mediumwechsel durchgeführt. Durch die verschiedene Behandlung ergeben sich so drei verschiedene Kultivierungsbedingungen. Der zeitliche Ablauf ist in Abbildung 5 dargestellt.

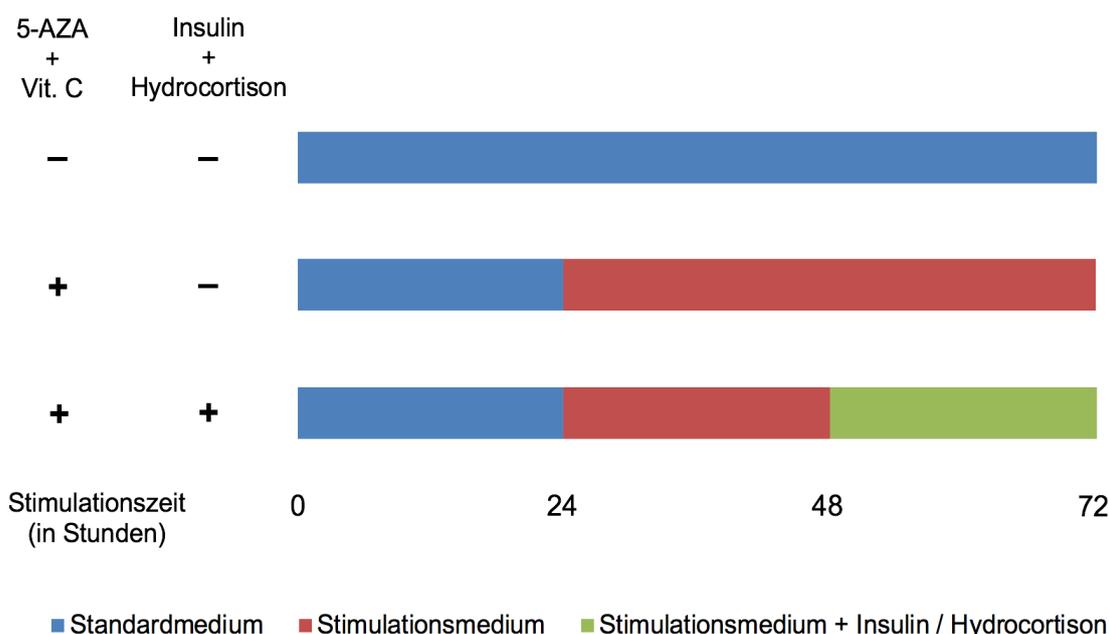


Abbildung 5: Darstellung der unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen

2.3.2. Kultivierung von PHHs aus Spenderleber

Als Referenz wurden primäre humane Hepatozyten verwendet. Diese wurden entweder im Labor von Prof. Dr. Nüssler isoliert oder von Kooperationspartnern als Zellsuspension zur Verfügung gestellt. Die eigentliche Isolation und

Aufreinigung erfolgte nicht durch mich, sondern durch andere Mitarbeiter des Sigfried-Weller-Instituts wie in Knobloch *et al.*, 2012 und Ruoß *et al.*, 2019 beschrieben. Nach Zellzählung der Suspension wurden die Zellen in Hepatozyten Kulturmedium aufgenommen und in einer Zellkonzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen / cm^2 in einer 6 Well-Platte ausplattiert.

2.3.3. RNA Isolation mit TriFast

Durch das Reagenz TriFast ist die Extraktion von RNA, Proteinen und DNA aus einer Probe möglich (Muyal *et al.*, 2009). Zur RNA Isolation wird entsprechend der Beschreibung des Herstellers (PEQLAB_v0815_D, Seite 2 – 4) gearbeitet. Abbildung 6 stellt einen schematischen Überblick der RNA Isolierung dar.

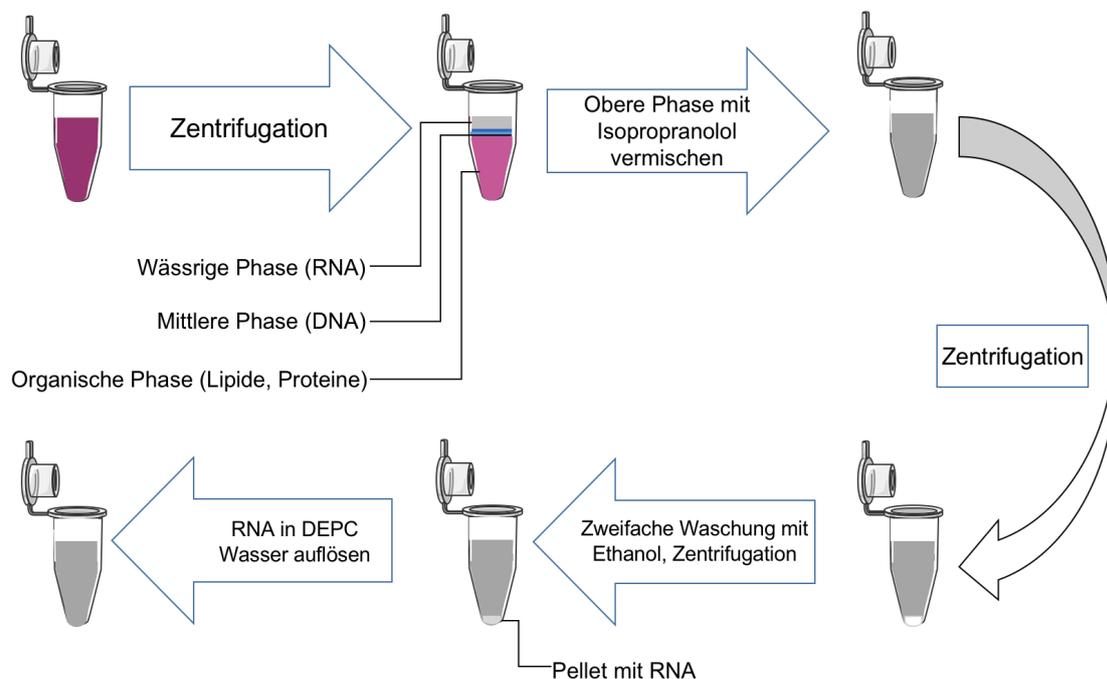


Abbildung 6: RNA Isolation mit TriFast

Die Abbildung wurde erstellt unter Verwendung von Servier Medical Art (<http://smart.servier.com/>).

Dazu werden in einer 6 Well-Platte jeweils 500 μl TriFast pro Well gegeben, die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird jeweils 100 μl Chloroform hinzugegeben, vermischt und für weitere 5 – 10 min bei

Raumtemperatur gelagert, die Lösung bei 12.000 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und währenddessen 250 µl Isopropanol für jede Probe in ein 1,5 ml neues Reaktionsgefäß pipettiert. Nach der Zentrifugation wird die RNA enthaltende obere wässrige Phase der Lösung in die vorbereiteten Reaktionsgefäße pipettiert, vermischt und die Lösung bei -20 °C für 1 bis 24 h gelagert.

Danach wird die Lösung nochmals unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und das RNA Pellet mit 1 ml 70 %-igem Ethanol in DEPC Wasser gewaschen. Anschließend wird die Lösung erneut unter genannten Bedingungen 10 min zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und erneut mit 1 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen. Die Gefäße werden danach offen auf Eis gelagert, bis das verbliebene Ethanol verdunstet ist. Das Pellet wird anschließend mit 30 – 50 µl DEPC Wasser resuspendiert und die offenen Gefäße 10 – 15 min auf Eis gelagert. Die Lagerung der RNA erfolgt bei -80 °C.

2.3.4. RNA Quantifizierung

Um den RNA Gehalt einer Probe zu bestimmen, wird die Absorption der in DEPC Wasser gelösten RNA mittels Spektralphotometer gemessen. Dabei werden 2 µl der Probe auf die zugehörige Messplatte „LVis Plate“ aufgetragen und bei 230 nm, 280 nm, entsprechend der Absorptionsmaxima von Proteinen, Lösungsmitteln und Salzen, sowie 260 nm, dem RNA Absorptionsmaximum, gemessen. Dadurch ist eine Messung von Reinheit und Konzentration der in der Lösung enthaltenen RNA möglich (Desjardins and Conklin, 2010).

2.3.5. Kontrolle der RNA Integrität

Nach stattgefundenener RNA Quantifizierung wird die Probe auf Integrität der RNA kontrolliert, indem mindestens 500 ng jeder RNA Probe in DEPC Wasser und 5X PCR Ladepuffer im Verhältnis 4 : 1 auf ein 1,8 %-iges Agarosegel in 1 M TBE Puffer aufgetragen werden (Rio *et al.*, 2010). Zur Visualisierung werden 3 µl des gebrauchsfertigen Markers in einen extra Slot gegeben und die Elektrophorese für 30 min und 90 V durchgeführt. Anschließend erfolgt die Fotografie unter UV

Licht mittels Geldokumentationssystem. Die intakte RNA zeigt dabei zwei Banden, entsprechend der großen 28 S und kleinen 18 S ribosomalen Unter-einheit (J.F and Russell, 2001).

2.3.6. cDNA Synthese und konventionelle PCR (RT-PCR)

Zum Zwecke der Genexpressionsanalyse wird im nächsten Schritt eine Messung mittels semiquantitativer RT-PCR durchgeführt (Lorenz, 2012). Dazu wird aus den geprüften RNA - Proben zunächst cDNA hergestellt, indem das „*RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*“ von Thermo Scientific genutzt und dabei nach der Beschreibung des Herstellers (Katalog Nummer: 67, Kapitel #1612) gearbeitet wird.

Nach Herstellung der cDNA, wird diese mittels DEPC Wasser auf eine Endkonzentration von 10 ng / µl verdünnt. Anschließend wird für jede hergestellte cDNA Probe eine Lösung entsprechend Tabelle 7 vorbereitet. Gearbeitet wird dabei gemäß der Herstelleranleitung (Katalog Nummer KR0374 – v7.16, Seite 2).

Tabelle 7: Zusammensetzung der PCR Proben

Komponenten	Volumen
Ready Mix (<i>KAPA2G Fast Ready Mix with Dye</i>)	10 µl
Vorwärtsprimer	1 µl
Rückwärtsprimer	1 µl
cDNA Template	1 µl – 4 µl (je nach Optimierung)
DEPC Wasser	Auffüllen bis auf 20 µl Gesamtprobe

Anschließend wird die PCR mittels Thermal Cycler (Applied Biosystems) durchgeführt. Die PCR Abschnitte werden wie in Tabelle 8 aufgeführt, durchlaufen.

Die Zyklenzahl und Primer Anlagerungstemperatur (*Annealing* Temperatur) sind Primer abhängig und werden individuell optimiert (entspricht 3. Abschnitt).

Tabelle 8: Zeit- / Temperaturabschnitte einer RT-PCR

25 – 35 Zyklen

95°C	95°C	<i>Annealing</i> Temperatur (Primer spezifisch)	72°C	72°C	4°C
3 min.	15 sec.	15 sec.	15 sec.	5 min.	∞

Anschließend werden jeweils 8 µl aller Proben, eine Negativkontrolle (mit DEPC Wasser statt cDNA) und 3 µl pUC19 Marker nebeneinander auf ein 1,8 %-iges Agarosegel in 1 M TBE Puffer aufgetragen und eine Gelelektrophorese bei 90 V für 40 min durchgeführt. Getestet werden folgende Gene:

Tabelle 9: Verwendete Primer

Zielgen	GenBank ID	Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer	Amplifikat Größe (bp)
<i>GAPDH</i>	NM_002046.4	GTCAGTGGTGGACCTGACCT AGGGGTCTACATGGCAACTG	420
<i>CYP1A2</i>	NM_000761.3	CTCTACAGTTGGTACAGATGGCA AGGTGTTGAGGGCATTCTGG	456
<i>CYP2C9</i>	NM_000761.3	CTGGATGAAGGTGGCAATTT AGATGGATAATGCCCCAGAG	308
<i>CYP3A4</i>	NM_017460.5	ATTCAGCAAGAAGAACAAGGACA TGGTGTCTCAGGCACAGAT	314
<i>KDM4C</i>	NM_015061.3	ACCCAACGTGAAGTCCAAG GCATGTCAGAGGCTGTGGAA	414
<i>KDM6B</i>	NM_001348716.1	GGTTCCAATGAGACAGGGCA TCCGTTTGTGCTCAAGGTGT	863
<i>HDAC1</i>	NM_004964.2	CGTTGCCCGGTGCTGGACAT TTTGACCCCAGGTGCGTGC	221
<i>HDAC2</i>	NM_001527.3	CTTCCCCGCGGGACTATCGC TCGGCAGTGGCTTTATGGGGC	316
<i>PRMT1</i>	NM_001536.5	CCGTGGACCCTCTGGTATAAG GGCCACAGGACACTTCTTCAA	192

2.3.7. PCR Datenauswertung

Anschließend erfolgt nach UV Belichtung die Aufnahme mittels *Gel iX Imager* mit mindestens drei verschiedenen Belichtungszeiten sowie unter Nutzung des Programms *Image J* die Messung der Bandenintensität nach Abzug des Hintergrundes. Es werden jeweils drei getrennt isolierte HepG2 Ansätze (N=3) zu jeweils drei Kulturbedingungen (entsprechend Abbildung 5) in jeweils drei cDNA Replikaten (n=3) getestet und zu einer aus fünf verschiedenen Leberspendern gepoolten cDNA Probe in Relation gesetzt. Die Expression der gemessenen Gene wird dabei auf die Expression des Gens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) normiert und in Relation zur Referenz (PHHs) gesetzt. *GAPDH* ist ein sogenanntes Housekeeping Gen, welches in allen Zellen ähnlich stark exprimiert wird (Etoh, 2008).

2.3.8. Statistik

Zum Zwecke der statistischen Auswertung fand eine Anleitung und Beratung durch den Labormitarbeiter Marc Ruoff statt. Die Berechnung der Einzelwerte der gemessenen Intensitäten erfolgt mittels Microsoft Excel 2010. Zum Expressionsvergleich und Diagrammdarstellung wird das Programm *GraphPad Prism 5* genutzt. Die Ergebnisse werden unter Durchführung einer einfaktoriellen Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit Kruskal-Wallis-Test und Dunn's multiplen Vergleichstest ausgewertet und auf Signifikanz geprüft. Statistisch signifikante p-Werte unter 0,05 werden über den Diagrammen mittels Sternchen (*) gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. Primer Optimierung

Viele der getesteten Gene waren aufgrund niedriger Basalexpression in HepG2 Zellen oder einem großen Expressionsunterschied zwischen der Zelllinie und PHHs schwierig zu messen. Vor Verwendung jeden Primers wurde eine Primer Optimierung durchgeführt, in welcher die optimale *Annealing* Temperatur, Template Menge und Zyklenanzahl für die weiteren Tests bestimmt wurde (Lorenz, 2012). Genutzt wurde ein Pool bestehend aus den später verwendeten HepG2 cDNA Proben sowie den cDNA Proben der fünf Spender, um die optimalen Bedingungen für den Querschnitt aller verwendeten Proben zu bestimmen. Zunächst wurde jeder Primer mit sechs verschiedenen *Annealing* Temperaturen getestet, die Bandenintensitäten miteinander verglichen und die Temperatur mit der höchsten Signalintensität ausgewählt. Anschließend wurden die Primer mit 25, 30 und 35 Zyklen sowie mit 5, 10, 20 und 40 ng cDNA Template getestet. Diese Bedingungen sind in der Literatur als optimal zum Nachweis für die meisten Gene und Primer beschrieben und entsprechen der Produktbeschreibung des Herstellers (Katalog Nummer KR0374 – v7.16, Seite 2) (Lorenz, 2012). Dabei wurde die Kombination von Zyklenzahl und Template gewählt, die bei einer Verdopplung der cDNA Menge auch eine annähernde Verdopplung der gemessenen Intensität zur Folge hat, um den linearen Abschnitt der PCR zu erfassen. Falls eine Expression erst bei 35 Zyklen und 40 ng Template zu detektieren war, wurde diese Bedingung für die weiteren Tests gewählt. Die Optimierung erfolgte zunächst für das Housekeeping Gen *GAPDH*, dann für alle weiteren Gene.

3.1.1. *GAPDH* Primer Optimierung

Im Falle von *GAPDH* ist eine annähernde Verdopplung der Expression ausschließlich zwischen 5 ng und 10 ng Template bei 25 Zyklen zu erreichen. Bei 30 Zyklen ist eine nur geringe, bei 35 Zyklen keine weitere Intensivierung messbar. Aufgrund der klaren Korrelation zwischen Template Menge und

Zunahme der Expression bei 25 Zyklen und 5 ng Template, wurden diese Parameter für die weiteren Tests verwendet.

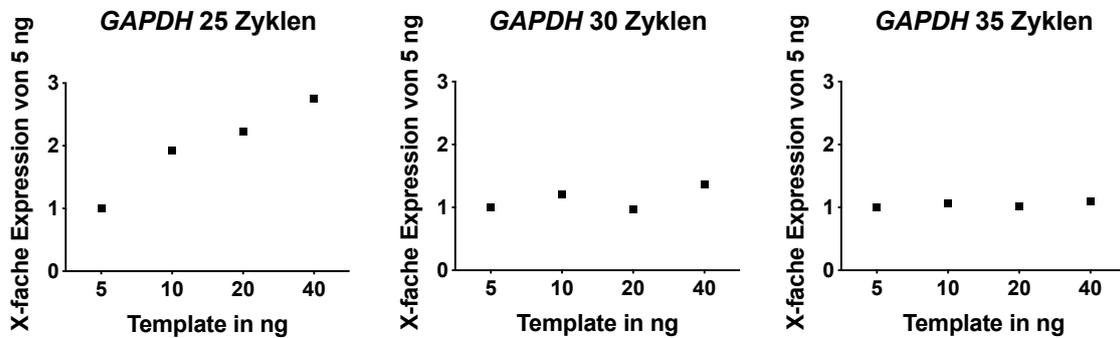


Abbildung 7: GAPDH Primer Optimierung bei 25, 30 und 35 Zyklen und 56 °C Annealing Temperatur (N=2, n=2)

3.1.2. CYP Primer Optimierung

Die Untersuchung der Expression der CYP Enzyme in HepG2 zeigt eine sehr niedrige und schwer detektierbare Basalexpression aller getesteten CYP Gene. Im Bereich von 25 und 30 Zyklen ist auch nach Erhöhung der Template Menge keine Detektion möglich.

Das Gen CYP1A2 zeigt lediglich bei 35 Zyklen und 40 ng cDNA eine detektierbare Expression, die deutlich höher ist als in allen anderen Bedingungen. Von allen getesteten CYP Genen zeigt sich diese Erhöhung im Falle von CYP1A2 am deutlichsten.

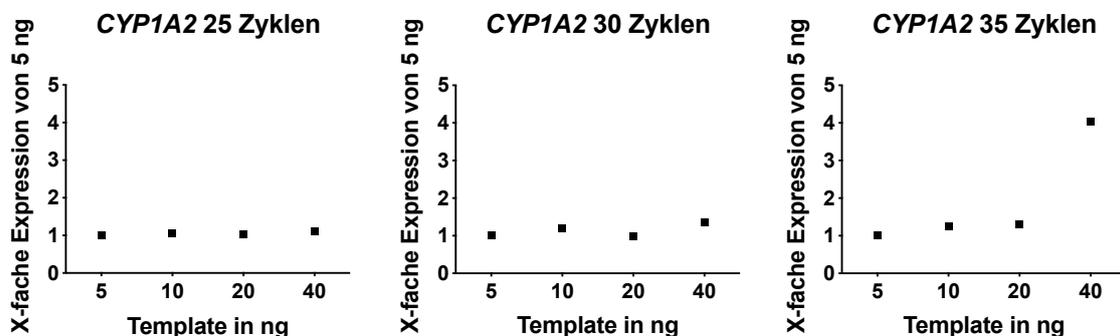


Abbildung 8: CYP1A2 Primer Optimierung bei 25, 30 und 35 Zyklen und 60 °C Annealing Temperatur (N=2, n=2)

Die Abbildung der Optimierung des *CYP2C9* Primers zeigt eine deutliche Detektion im Bereich von 35 Zyklen und 40 ng cDNA. Alle anderen Durchgänge zeigen hingegen für alle Bedingungen eine geringe Schwankung um den Ausgangswert von 25 Zyklen und 5 ng Probe.

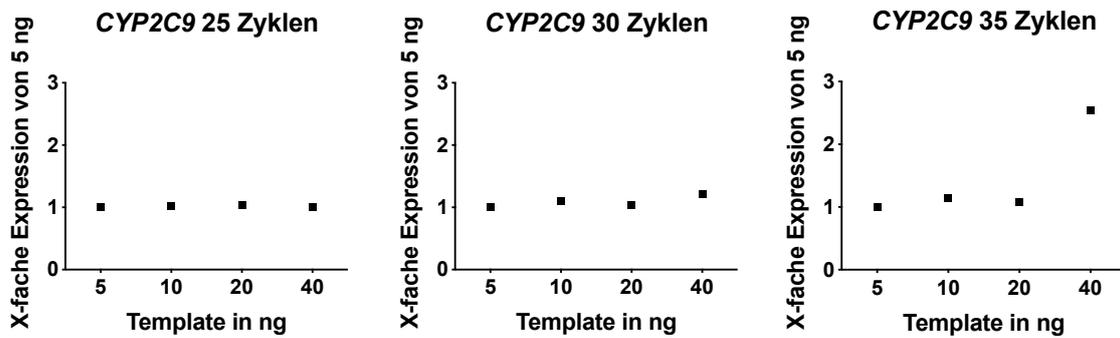


Abbildung 9: *CYP2C9* Primer Optimierung bei 25, 30 und 35 Zyklen und 60 °C *Annealing* Temperatur (N=2, n=2)

Die Expression von *CYP3A4* zeigt von allen getesteten *CYPs* bei 40 ng Template und 35 Zyklen die geringste Abweichung im Vergleich zur nächst niedrigeren Template Menge. Selbst in diesem Zustand ist eine Expression nur schwer zu detektieren.

Aufgrund der Tatsache, dass nur bei dieser Bedingung eine Expression nachweisbar ist, wurde diese Zyklenzahl für weitere Tests verwendet.

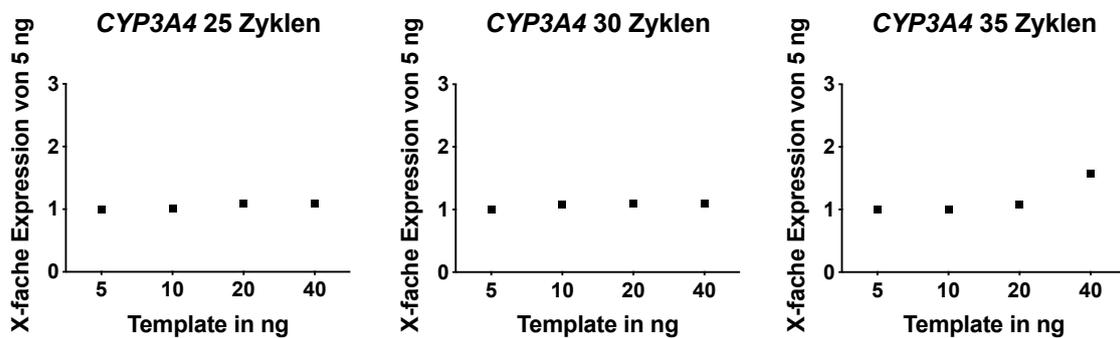


Abbildung 10: *CYP3A4* Primer Optimierung bei 25, 30 und 35 Zyklen und 60 °C *Annealing* Temperatur (N=2, n=2)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Primer Optimierung im Falle der *CYPs* von allen getesteten Genen am schwierigsten gestaltete. Die Detektion war in allen 3 getesteten *CYP* Primern erst bei hohen Zyklenzahlen und Template möglich. Außerdem war in keinem Zustand eine klare Verdopplung der Expression zu vernehmen. Für die weitere Expressionsanalyse der untersuchten *CYP* Gene wurde mit 35 Zyklen und 40 ng cDNA Probe weitergearbeitet.

3.1.3. Primer Optimierung von *KDM4C* und *KDM6B*

Die Optimierungen der Lysin Demethylasen Primer zeigen im Bereich von 30 Zyklen die größten zu vernehmenden Differenzen.

Im Falle des *KDM4C* Primers ist eine Verdopplung zwischen 10 ng und 20 ng bei 30 Zyklen sichtbar (Abbildung 11). Die Messung bei 25 Zyklen bleibt unter dem Detektionsniveau. Bereits ab der Template Menge von 5 ng und 35 Zyklen erfährt die Detektion eine zunehmende Sättigung, sodass trotz Erhöhung der Probenmenge nur noch kleine Differenzen zu vernehmen sind.

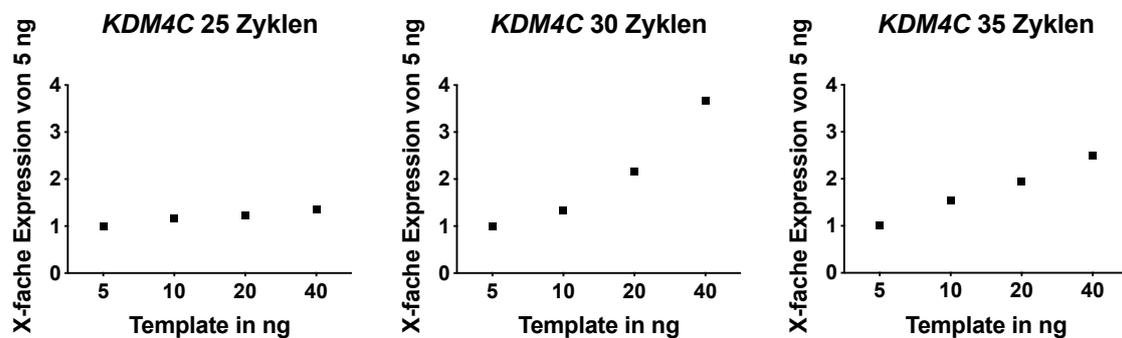


Abbildung 11: *KDM4C* Primer Optimierung bei 25, 30 und 35 Zyklen und 60 °C *Annealing* Temperatur (N=2, n=2)

Die Optimierung von *KDM6B* zeigt eine annähernde Verdopplung der Expression zwischen 20 ng und 40 ng bei 30 Zyklen. Messungen bei 25 und 35 Zyklen zeigen bei Verdopplung der Template Menge einen Expressionsanstieg deutlich unter dem Faktor 2, wobei bei 35 Zyklen ein höherer Anstieg zu verzeichnen ist.

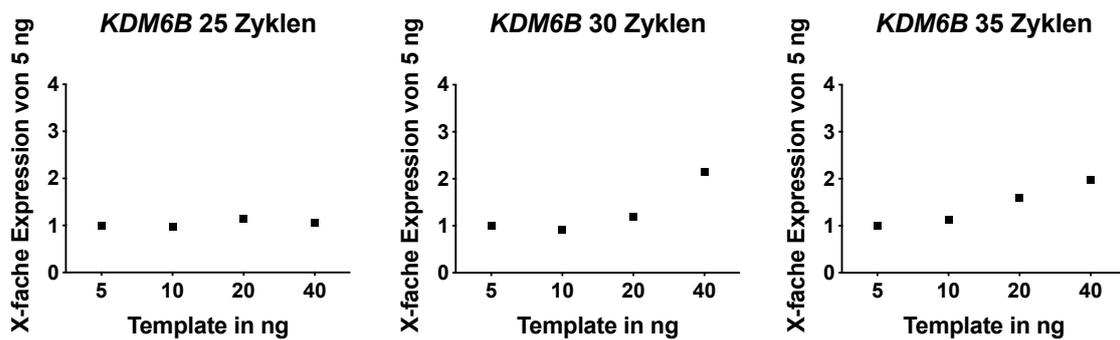


Abbildung 12: *KDM6B* Primer Optimierung bei 25, 30 und 35 Zyklen und 60°C *Annealing* Temperatur (N=2, n=2)

3.1.4. Primer Optimierung von *HDAC1* und *HDAC2*

Die Optimierung von *HDAC1* ergibt eine Verdopplung im Bereich zwischen 10 ng und 20 ng bei 25 Zyklen mit einer nachfolgenden sich schrittweise einstellenden Sättigung im Bereich von 30 und 35 Zyklen. Bei minimaler Zyklenzahl ist durch Template Erhöhung eine Steigerung der messbaren Expression um über das Achtfache des Ausgangswertes möglich.

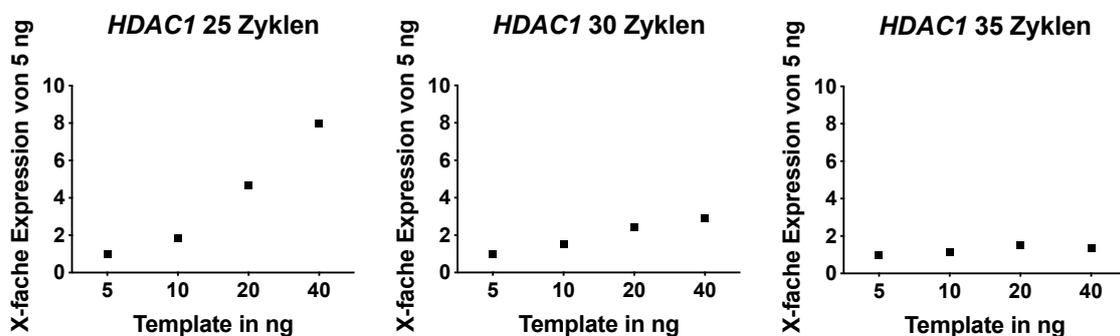


Abbildung 13: *HDAC1* Primer Optimierung bei 25, 30 und 35 Zyklen und 60 °C *Annealing* Temperatur (N=2, n=2)

Die Testung des *HDAC2* Primers zeigt ebenfalls eine Verdopplung im Bereich von 10 ng zu 20 ng cDNA Probe bei 25 Zyklen. Höhere Zyklenzahlen und Templates führen zu einem stetig geringer werdenden Anstieg, der sich bei 35 Zyklen am geringsten zeigt. Auch hier kann bei minimaler Zyklenzahl durch

Template Steigerung eine hohe Steigerung der Expression auf das etwa Achtfache des Ausgangswertes gemessen werden.

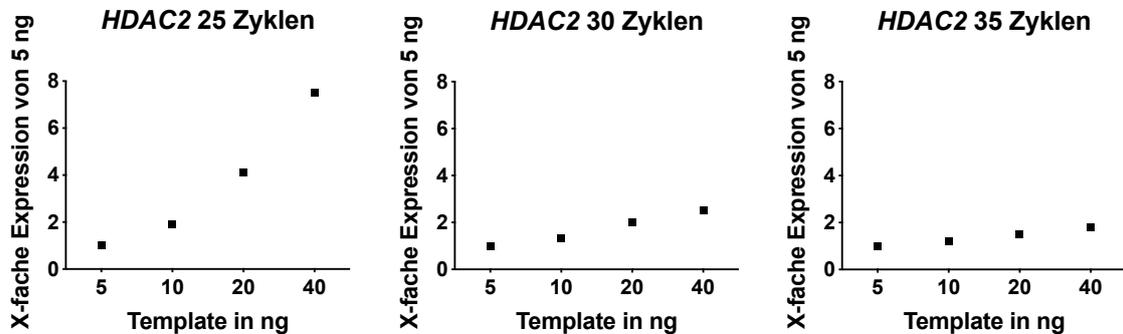


Abbildung 14: HDAC2 Primer Optimierung bei 25, 30 und 35 Zyklen und 62°C Annealing Temperatur (N=2, n=2)

Die Optimierungen beider *HDAC* Primer unterscheiden sich insofern maßgeblich zu allen anderen Optimierungen, da sie eine deutlich größere Detektionsspanne als bei allen anderen Testungen möglich machen.

3.1.5. Primer Optimierung von *PRMT1*

Die Optimierung des *PRMT1* Primers zeigt sich diffizil. Um eine sichtbare Expression zu detektieren, ist im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen (5 ng Template und 25 Zyklen) eine deutliche Erhöhung beider Parameter nötig.

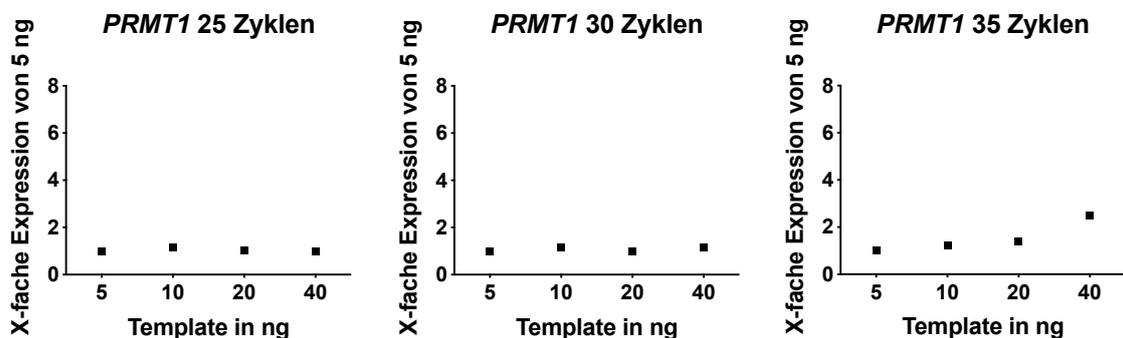


Abbildung 15: PRMT1 Primer Optimierung bei 25, 30 und 35 Zyklen und 61°C Annealing Temperatur (N=2, n=2)

Eine Verdopplung der Expression ist trotz genannter Maßnahmen im Falle von *PRMT1* bei keiner Bedingung zu vernehmen. Lediglich bei maximaler Zyklanzahl und Template ist es möglich, eine Expression zu detektieren, welche weniger als das Doppelte des Vorwertes beträgt. Es wurde daher mit 35 Zyklen und 40 ng Template Menge weitergearbeitet.

Nach Durchführung der Primer Optimierung erfolgte die Testung der Genexpression von HepG2 Zellen nach Stimulation mit 5-AZA, Vitamin C, Hydrocortison und Insulin sowie der Vergleich beider PCR Methoden. In Tabelle 10 sind die hierfür gewählten Bedingungen aufgeführt.

Tabelle 10: Ergebnisse der Primer Optimierung mit RT-PCR

Primer	Zyklenzahl	Templatemenge	Annealing Temperatur
<i>GAPDH</i>	25	5 ng	56 °C
<i>CYP1A2</i>	35	40 ng	62 °C
<i>CYP2C9</i>	35	40 ng	61 °C
<i>CYP3A4</i>	35	40 ng	62 °C
<i>KDM4C</i>	30	10 ng	60 °C
<i>KDM6B</i>	30	20 ng	60 °C
<i>HDAC1</i>	30	10 ng	60 °C
<i>HDAC2</i>	30	10 ng	62 °C
<i>PRMT1</i>	35	40 ng	61 °C

3.2. Genexpression nach HepG2 Stimulation: RT-PCR vs. qPCR

3.2.1. CYP1A2

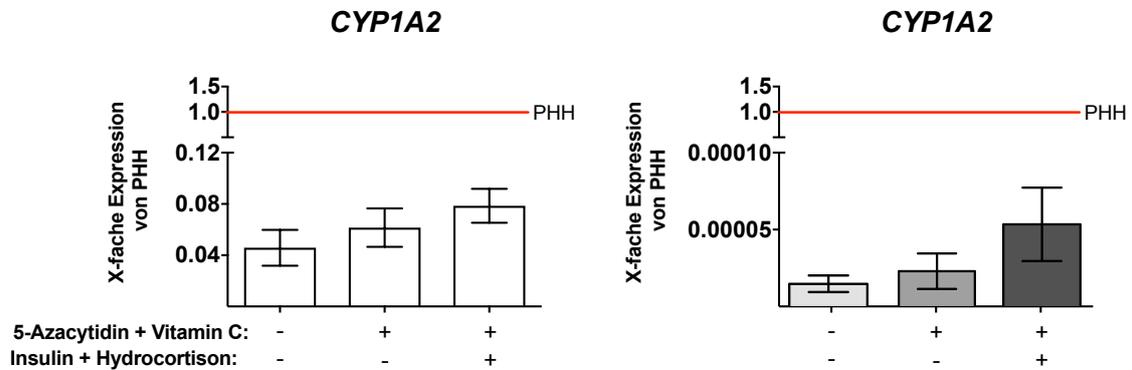


Abbildung 16: Vergleich der CYP1A2 Expression mittels RT-PCR (links) sowie qPCR (rechts) (Diagramm rechts aus Ruoß *et al.*, 2019, modifiziert mit deutschen Beschriftungen) (N=3, n=3)

Die Messung des Expressionslevels unter Nutzung beider PCR Methoden zeigt eine sehr niedrige CYP1A2 Basalexpression in HepG2 Zellen verglichen zu PHHs. Diese beträgt im nicht stimulierten Zustand etwa 0,04 (RT-PCR) sowie deutlich unter 5×10^{-5} (qPCR) der Expression in frischen kultivierten PHHs. Durch die Behandlung mittels 5-AZA und Vitamin C kann die Expression geringfügig gesteigert werden, was mit beiden Methoden detektiert werden kann. Vergleicht man die Expressionslevel der Behandlung mit Hydrocortison und Insulin mit dem Basallevel fällt auf, dass in der qPCR eine Steigerung um das Fünffache gemessen werden kann, während die RT-PCR hier nur eine annähernde Verdopplung der Expression in HepG2 anzeigt. Stellt man also den nicht stimulierten Status dem Effekt nach Stimulation durch alle Substanzen gegenüber, so ist mittels qPCR eine deutlich höhere Wirkung festzustellen. Beide PCR Methoden zeigen trotz Stimulation eine hohe Differenz zwischen HepG2 Zellen und PHHs an. Diese zeigt sich in der qPCR um ein Vielfaches höher als in der RT-PCR.

3.2.2. CYP2C9

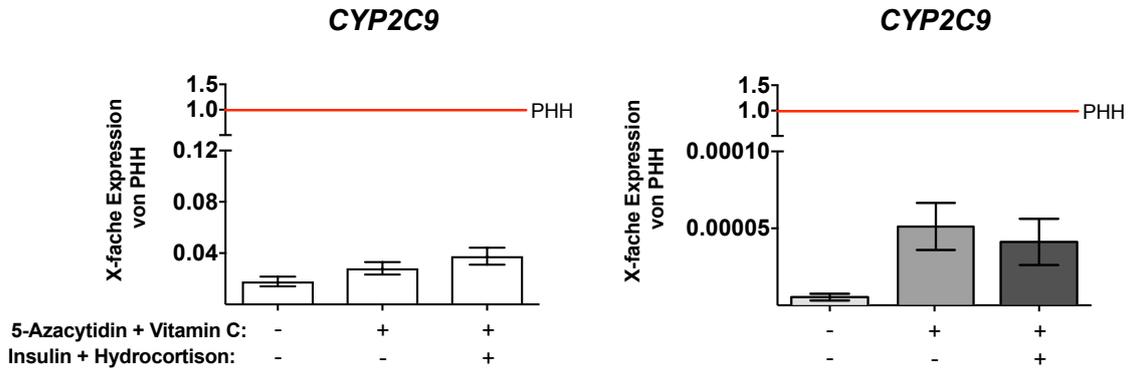


Abbildung 17: Vergleich der CYP2C9 Expression mittels RT-PCR (links) sowie qPCR (rechts) (Diagramm rechts aus Ruoß *et al.*, 2019, modifiziert mit deutschen Beschriftungen) (N=3, n=3)

Beide Methoden zeigen hier eine vielfach niedrigere Basalexpression in der Zelllinie im Vergleich zur PHH Kontrolle. In der qPCR kann im Vergleich zur RT-PCR ein weitaus größerer Expressionsunterschied zwischen HepG2 Zellen und PHHs detektiert werden. Eine positive Tendenz durch die Zellbehandlung ist durch beide Methoden nachweisbar, wobei die alleinige Stimulation mittels 5-AZA und Vitamin C in der qPCR einen deutlich höheren Expressionsanstieg zulässt. Hier zeigt die semiquantitative Methode einen nur geringen Effekt. Den Behandlungseffekt durch Insulin und Hydrocortison stellen beide Methoden unterschiedlich dar. Während die qPCR einen Expressionsabfall durch die additive Behandlung anzeigt, ist in der semiquantitativen Methode ein geringer Expressionsanstieg nachweisbar. Insgesamt sind mittels qPCR im Vergleich deutlich größere positive Effekte im Sinne einer Expressionssteigerung messbar. Trotzdem zeigen beide Methoden mit und ohne Zellstimulation eine CYP2C9 Genexpression in HepG2 deutlich unter PHH Niveau.

3.2.3. CYP3A4

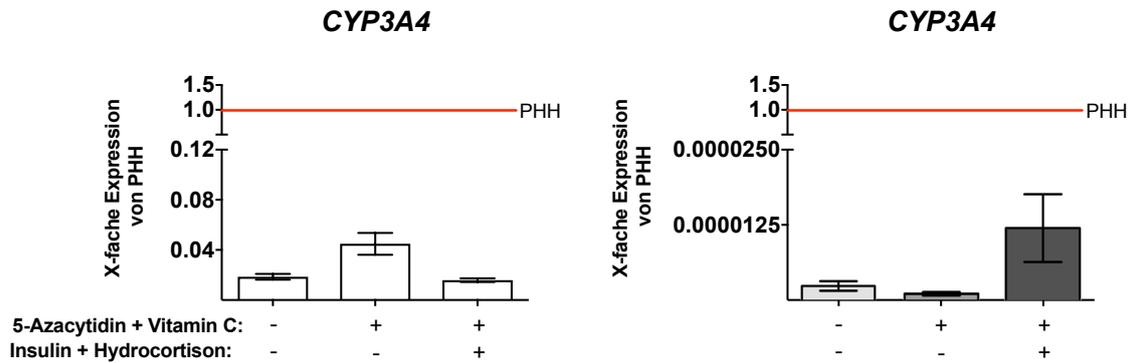


Abbildung 18: Vergleich der CYP3A4 Expression mittels RT-PCR (links) sowie qPCR (rechts) (Diagramm rechts aus Ruoß *et al.*, 2019, modifiziert mit deutschen Beschriftungen) (N=3, n=3)

Ähnlich wie bei den bisher beschriebenen CYP Enzymen ist die gemessene Basalexpression von HepG2 unabhängig von der verwendeten Methode im Vergleich zu PHHs deutlich vermindert. Nach der Stimulation mittels 5-AZA und Vitamin C sind hier entgegengesetzte Tendenzen zu vernehmen. Erstmals zeigt die vollquantitative Methode eine negative Tendenz der CYP3A4 Expression in der Zelllinie mit 5-AZA und Vitamin C Stimulation. Diese kann mittels RT-PCR nicht verifiziert werden. Hier zeigen sich gegenläufige Tendenzen. Die konventionelle PCR zeigt einen Expressionssprung auf das Doppelte in stimulierten Zellen. Auch unter Stimulation mit Insulin und Hydrocortison zeigen sich inkongruente Tendenzen. Die RT-PCR Auswertung gibt einen deutlichen Abfall auf den Ursprungswert ohne Stimulation an, während in der qPCR eine fünffache Steigerung der CYP3A4 Expression zu messen ist. Analog zu CYP1A2 und CYP2C9 ist auch hier trotz Stimulation unter Nutzung beider Methoden keine ausreichende Annäherung an die Expression in PHHs festzustellen. Die mittels RT-PCR geprüften Ergebnisse zeigen sich in großen Teilen mit den qPCR Ergebnissen vereinbar, jedoch nicht vollumfänglich.

3.2.4. *KDM4C*

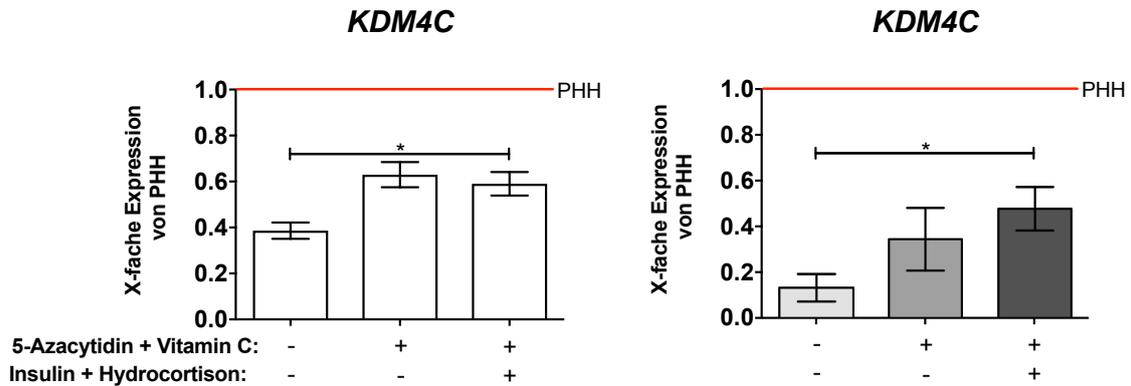


Abbildung 19: Vergleich der *KDM4C* Expression mittels RT-PCR (links) sowie qPCR (rechts) (Diagramm rechts aus Ruoß *et al.*, 2019, modifiziert mit deutschen Beschriftungen) (N=3, n=3; p-Wert < 0.05(*))

Im Gegensatz zu den *CYPs* zeigt sich der Expressionsunterschied zwischen HepG2 Zellen und PHHs beim Gen *KDM4C* deutlich kleiner. Die konventionelle Methode zeigt in HepG2 Zellen einen Anteil von etwa 40 % und die qPCR etwa 15 % an der Expression in PHHs an. Nach Stimulation mittels 5-AZA und Vitamin C ist eine deutliche Expressionssteigerung durch beide PCR Methoden zu vernehmen, welche sich in der qPCR deutlich höher zeigt. Noch deutlicher ist diese Steigerung durch die zusätzliche Gabe von Insulin und Hydrocortison zu sehen. Hier zeigt die vollquantitative Methode eine weitere Annäherung an das PHH Niveau und im Vergleich zum nicht stimulierten Status der Zelllinie eine Verfünffachung der Expression. Im Gegensatz dazu kann mit der semiquantitativen PCR kein weiterer Anstieg durch die zusätzliche Gabe detektiert werden. Insgesamt zeigen auch hier beide Methoden eine ähnliche Tendenz im Sinne einer Annäherung der *KDM4C* Expression an PHHs, wobei diese sich in der qPCR deutlicher zeigt. Mit beiden Methoden sind außerdem signifikante Resultate zu erzielen.

3.2.5. *KDM6B*

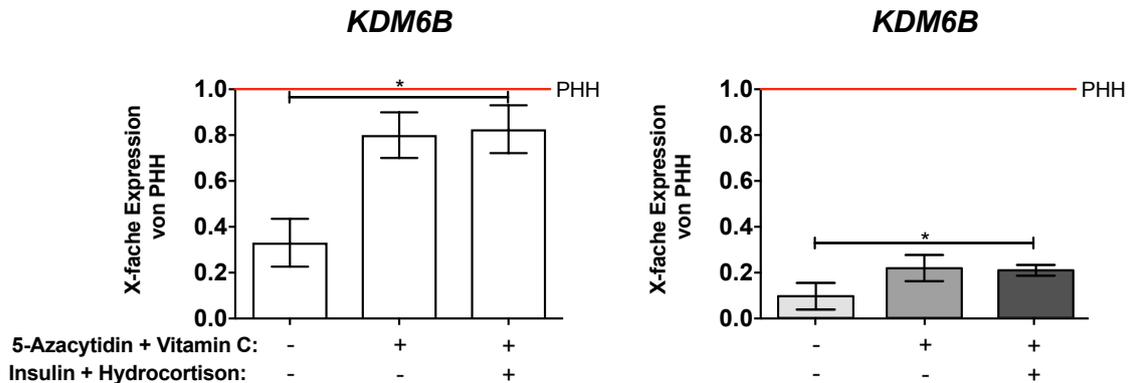


Abbildung 20: Vergleich der *KDM6B* Expression mittels RT-PCR (links) sowie qPCR (rechts) (Diagramm rechts aus Ruoß *et al.*, 2019, modifiziert mit deutschen Beschriftungen) (N=3, n=3; p-Wert < 0,05(*))

Die Genexpression von *KDM6B* zeigt sich in HepG2 in einer ähnlichen Größenordnung wie in PHHs. Auch hier stellt sich die Expression in der RT-PCR Methode höher dar. Durch die Stimulation mit 5-AZA und Vitamin C ist mittels qPCR eine Verdopplung der Expression festzustellen. In der semiquantitativen Methode ist ein größerer Effekt zu messen, sodass hier eine Angleichung, die fast auf PHH Niveau ist, nachweisbar ist. Eine geringe weitere Erhöhung durch die zusätzliche Stimulation mittels Insulin und Hydrocortison ist mittels RT-PCR festzustellen. Die qPCR zeigt nach der additiven Behandlung eine geringe Erniedrigung der *KDM6B* Expression im Gegensatz zum nicht stimulierten Status an. Mittels beider Methoden sind ähnliche Tendenzen nach der Zellbehandlung zu verzeichnen. Im Vergleich zur qPCR ist nach der Behandlung in dieser Fragestellung eine Genexpression zu messen, welche etwa dem PHH Niveau entspricht. In der qPCR ist auch durch die Behandlung im Vergleich zur Zelllinie eine vielfach höhere Expression in PHHs zu verzeichnen. Auch in diesem Fall sind unter Nutzung beider Methoden statistisch signifikante Resultate zu erzielen.

3.2.6. HDAC1

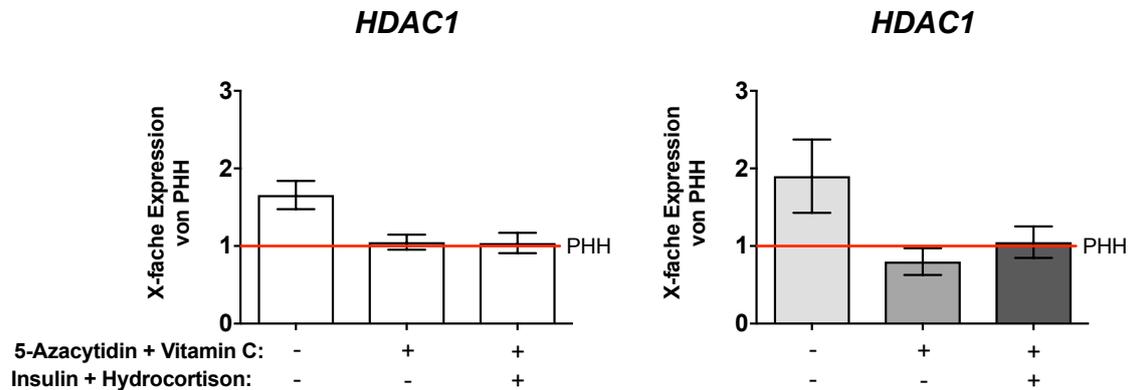


Abbildung 21: Vergleich der HDAC1 Expression mittels RT-PCR (links) sowie qPCR (rechts) (Diagramm rechts aus Ruoß *et al.*, 2019, modifiziert mit deutschen Beschriftungen) (N=3, n=3)

Die Basalexpression der Histondeacetylase 1 in nicht stimulierten HepG2 Zellen zeigt sich in beiden Methoden deutlich über PHH Niveau. Auffällig ist, dass der absolute Wert der Expression, anders als in den getesteten *CYP* Genen, in beiden Methoden ähnlich ist. Mit beiden Verfahren ist durch Stimulation mittels 5-AZA und Vitamin C die Expression von *HDAC1* in HepG2 Zellen rückläufig. Die RT-PCR zeigt hier eine Expression auf PHH Niveau, die vollquantitative Methode hingegen eine Expression darunter an. Nach additiver Stimulation mit Insulin und Hydrocortison zeigt sich in der qPCR eine deutliche Expressionssteigerung des Gens, welche immer noch unter PHH Niveau liegt. Die Methode der RT-PCR zeigt hier keine wesentliche Änderung der Genexpression an. Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass beide Verfahren die gleiche Tendenz durch die Zellbehandlung im Sinne einer Verringerung der Expression und damit Angleichung an das PHH Level anzeigen. In der vollquantitativen Methode sind zusätzlich unterschiedliche Expressionen zwischen der Stimulation mit 5-AZA und Vitamin C und der additiven Gabe von Insulin und Hydrocortison festzustellen.

3.2.7. HDAC2

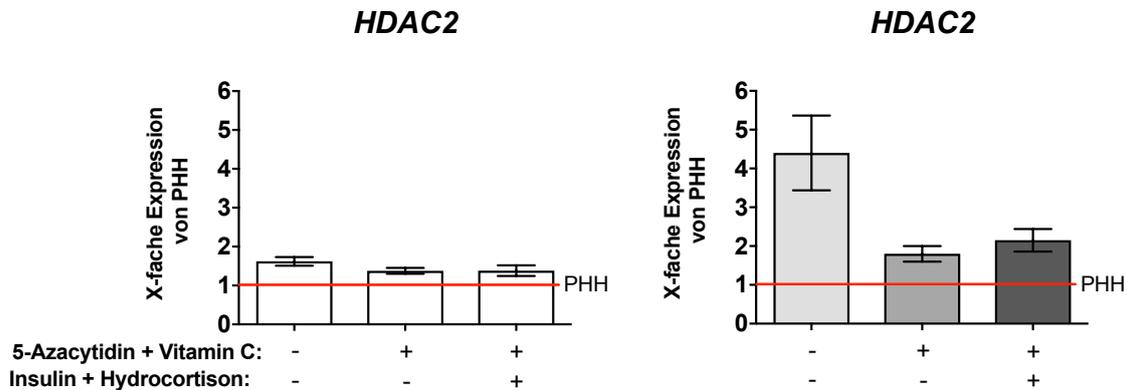


Abbildung 22: Vergleich der HDAC2 Expression mittels RT-PCR (links) sowie qPCR (rechts) (Diagramm rechts aus Ruoff *et al.*, 2019, modifiziert mit deutschen Beschriftungen) (N=3, n=3)

Die Basalexpression von *HDAC2* in der nicht stimulierten Zelllinie zeigt sich in der RT-PCR ähnlich der *HDAC1* Testung, in geringem Ausmaß über PHH Niveau. Die qPCR Messungen zeigen im Kontrast dazu eine Vielfach höhere Basalexpression. Nach Stimulation mittels 5-AZA und Vitamin C zeigt die qPCR einen Abfall der *HDAC2* Expression in der Zelllinie auf das etwa Zweifache des PHH Niveaus. Hier ist mittels RT-PCR die gleiche Tendenz, jedoch in absoluten Zahlen ein nur geringer Abfall festzustellen. Die semiquantitative Methode zeigt eine Genexpression leicht über PHH Niveau an. Die additive Stimulation mittels Insulin und Hydrocortison führt in beiden Methoden zu einer sichtbaren Expressionssteigerung, welche sich in der vollquantitativen Methode deutlicher zeigt. Insgesamt zeigen beide Methoden einen sichtbaren Abfall der Expression in Richtung des PHH Niveaus. In der qPCR zeigen sich die verschiedenen Auswirkungen durch die unterschiedlichen Zellbedingungen deutlich höher. Zusammenfassend sind positive Effekte durch die Stimulation im Sinne einer Expressionsannäherung an PHHs durch beide Methoden sicher darzustellen.

3.2.8. PRMT1

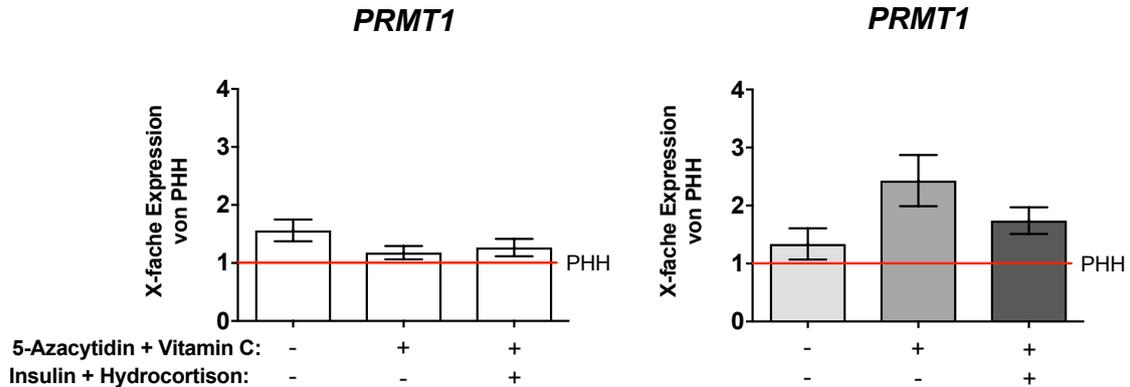


Abbildung 23: Vergleich der PRMT1 Expression mittels RT-PCR (links) sowie qPCR (rechts) (Diagramm rechts unveröffentlichte Daten Ruoß *et al.*, 2019) (N=3, n=3)

Im Falle von *PRMT1* zeigen beide PCR Methoden eine im Vergleich zu PHH höhere Basalexpression in nicht stimulierten HepG2 Zellen. Diese zeigt sich in beiden Methoden etwa 50 % über PHH Niveau. Während die Stimulation der Zelllinie mittels 5-AZA und Vitamin C sich in der semiquantitativen PCR in einer Expressionserniedrigung in Richtung PHH Niveau zeigt, ist diese in der qPCR nicht festzustellen. Diese zeigt eine deutlich messbare Expressionssteigerung von *PRMT1* auf etwa das Doppelte an. Nach additiver Gabe von Insulin und Hydrocortison ist mittels RT-PCR eine leichte Zunahme der Expression zu vernehmen, in der qPCR zeigt sich dies in einer Abnahme der Genexpression in Richtung des PHH Niveaus. Zusammenfassend zeigen beide Methoden hier miteinander unvereinbare Ergebnisse sowie unterschiedliche Tendenzen. Einzig die Basalexpression in der nicht stimulierten Zelllinie zeigt sich mit beiden Methoden ähnlich. Damit ist *PRMT1* das einzige getestete epigenetisch wirksame Gen, welches nach Anwendung beider Methoden gänzlich unterschiedliche Resultate hervorbringt.

4. Diskussion

4.1. Ansatz der Arbeit

Adverse Wirkungen von Pharmazeutika können zum akuten Leberversagen führen und sind der häufigste Grund, warum neu zugelassene Medikamente wieder vom Markt genommen werden müssen (Van den Hof *et al.*, 2014). Lebertoxische Metabolite beim Menschen sind in präklinischen Medikamententests am Tiermodell schwer vorauszusagen (Shanks *et al.*, 2009). Ein Grund hierfür ist die begrenzte Vergleichbarkeit zwischen menschlichem und tierischem Lebermetabolismus (Jaeschke *et al.*, 2014). Neue Pharmazeutika werden im Rahmen präklinischer Tests ebenfalls *in vitro* auf Lebertoxizität getestet (Ewart *et al.*, 2018). Primäre humane Hepatozyten stellen hierfür den Goldstandard dar (Bell *et al.*, 2016). Begrenzte Verfügbarkeit, rasche Dedifferenzierung in Kultur sowie spenderabhängige Variabilität machen potentielle Alternativen notwendig (Godoy *et al.*, 2013, Olsavsky *et al.*, 2007). Eine mögliche Alternative ist die Verwendung von Hepatomzelllinien wie HepG2, welche eine ständige Verfügbarkeit, gute Standardisierung, unbegrenzte Teilungsfähigkeit, jedoch auch eine limitierte metabolische Kapazität aufweisen (Donato *et al.*, 2015).

Eine Möglichkeit den Metabolismus zu erhöhen ist der Versuch der epigenetischen Reaktivierung Fremdstoff metabolisierender Enzyme durch 5-AZA und Vitamin C. Wie in vergangenen Studien unseres Labors gezeigt wurde, bleibt jedoch die Wirkung trotz Zellbehandlung limitiert, der metabolische Unterschied zu PHHs hoch (Ruoß *et al.*, 2019). Um erreichte Unterschiede durch die Behandlung nachzuweisen und mögliche additive Wirkungen neuer Substanzen untersuchen zu können, ist die Wahl sensitiver Methodik entscheidend. Ansatz der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob die schnell verfügbare und einfach durchzuführende Methode der konventionellen PCR mittels Gelelektrophorese, insbesondere vor dem Hintergrund ihres semiquantitativen Charakters, für diesen Zweck nutzbar ist. Dazu wurden besonders relevante, metabolisch sowie epigenetisch wirkende Gene getestet, indem zunächst die PCR Bedingungen optimiert, und anschließend bei der

eigentlichen Testung angewendet wurden. Die erhaltenen Resultate wurden anschließend auf Vergleichbarkeit und Plausibilität mit der vollquantitativen qPCR verglichen.

4.2. Einordnung ermittelter Expressionslevel in die Literatur

Betrachtet man die Basalexpression verschiedener Fremdstoff metabolisierender Enzyme in Hepatomzelllinien, so liegt diese meist um ein Vielfaches unter PHH Niveau (Zeilinger *et al.*, 2016). Dies ist in der Literatur auch so für die Zelllinie HepG2 beschrieben worden (Donato *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression von drei an der Biotransformation von Medikamenten besonders häufig beteiligten *CYPs* mit zwei verschiedenen PCR Methoden verglichen (Wilkinson, 2005). Mit beiden Methoden wurde in HepG2 Zellen im Vergleich zu PHHs eine deutlich niedrigere Basalexpression nachgewiesen. In der Literatur sind unterschiedliche Zahlen dazu zu finden (Jennen *et al.*, 2010, Gerets *et al.*, 2012).

Im Falle von *CYP1A2*, *CYP2C9* und *CYP3A4* ist, in Abhängigkeit von Art und Dauer der Zellkultivierung sowie der als Referenz herangezogenen Spenderhepatozyten, eine zwischen 100 und über 5000-fach niedrigere Expression nachgewiesen worden, wobei *CYP3A4* zumeist die niedrigste Expression aufwies und nicht immer zu detektieren war (Gerets *et al.*, 2012, Wilkening *et al.*, 2003). Die vorliegenden qPCR Daten der *CYP* Expressionsanalyse zeigen sich im Einklang mit bestehenden Untersuchungen in anderen Veröffentlichungen. Es zeigte sich im Vergleich zu PHHs eine mehr als 5000-fach niedrigere Basalexpression in HepG2 Zellen. Auch hier war die detektierte basale Expression von *CYP3A4* am niedrigsten. Im Gegensatz dazu war mittels RT-PCR eine deutlich höhere Basalexpression aller *CYP* Gene zu ermitteln. Diese zeigte sich um ein Vielfaches über den in der Literatur beschriebenen und mittels qPCR gemessenen Expressionen (Jover *et al.*, 1998). Die Zellbehandlung mittels 5-AZA und Vitamin C zeigte in beiden Methoden eine positive Tendenz im Sinne einer geringfügigen Annäherung der *CYPs* an das PHH Niveau. Aufgrund der Rolle epigenetisch wirkender Substanzen im Rahmen der Reaktivierung Fremdstoff metabolisierender Fähigkeiten in Leber-

krebszelllinien, erscheinen die hier festgestellten Wirkungen im Sinne einer Expressionssteigerung im Einklang mit bestehenden Voruntersuchungen (Yamashita *et al.*, 2003, Snykers *et al.*, 2009, Sajadian *et al.*, 2016). Die zusätzliche positive Wirkung von Insulin und Hydrocortison auf Viabilität, Metabolismus und Zellmorphologie in Hepatozytenkulturen ist seit langem bekannt (Michalopoulos and Pitot, 1975, Kinoshita and Miyajima, 2002). Eine additive positive Wirkung von Insulin und Hydrocortison auf die *CYP* Expression mehrerer Isotypen konnte hier mit beiden Methoden nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit der These, dass Insulin und Hydrocortison, wie in PHHs, auch in der Zelllinie einen positiven Einfluss auf die metabolische Kapazität haben könnte (Kinoshita and Miyajima, 2002, Michalopoulos and Pitot, 1975).

Betrachtet man die Lysin Demethylasen *KDM4C* und *KDM6B* in der Literatur, so wird ihnen nicht nur eine tumorsuppressive, sondern auch Metabolismus fördernde Wirkung zugewiesen (Dong *et al.*, 2012, Filipp, 2017). Neben anderen epigenetisch relevanten Genen ist auch *KDM6B* in Leberkrebszellen herunterreguliert (Agger *et al.*, 2009). Eine wichtige Rolle dabei spielt die in den entarteten Zellen stattgefundene Hypermethylierung dieses Gens (Zhang *et al.*, 2014). Es erscheint naheliegend, dass hier eine deutliche Herunterregulierung in HepG2 Zellen zu vernehmen ist. Vor dem Hintergrund der Dysregulation beider Gene in Leberkrebszellen sowie der bekannten demethylierenden Wirkung von 5-AZA und Vitamin C, erscheinen die festgestellten Effekte durch die Zellbehandlung im Sinne einer Expressionssteigerung und Annäherung an das PHH Niveau daher plausibel (Ruoß *et al.*, 2019). Auch die Tatsache, dass Insulin und Hydrocortison zu einer Expressionssteigerung von *KDM4C* in HepG2 führen, könnte die These untermauern, dass diese Substanzen nicht nur in PHHs, sondern auch in der Zelllinie HepG2 zur Differenzierung und Steigerung im Fremdstoffmetabolismus beitragen (Kinoshita and Miyajima, 2002, Filipp, 2017). Mehrere Studien haben den Einfluss epigenetisch modifizierender Substanzen wie HDAC Inhibitoren auf den Metabolismus in Leberkrebszelllinien untersucht (Snykers *et al.*, 2009, Yamashita *et al.*, 2003). Im Vergleich zu primären Hepatozyten sind *HDAC1* und *HDAC2* in Leberkrebszellen meist deutlich hochreguliert (Ler *et al.*, 2015). Beide PCR Methoden zeigten bei der Analyse

dieser Gene die gleiche Tendenz im Sinne einer geringen Hochregulation in HepG2 Zellen im Vergleich zu PHHs. Eine Hochregulation von *HDAC1* und *HDAC2* in HepG2 Zellen und weiteren Hepatomzelllinien wurde in anderen Laboren nachgewiesen (Freese *et al.*, 2019). Mit Stimulation durch 5-AZA und Vitamin C zeigten beide PCR Methoden ebenfalls eine ähnliche Tendenz im Sinne einer geringen Expressionshemmung in Richtung PHH Niveau. Da eine Überexpression verschiedener Histondeacetylasen in Tumorzellen häufig mit einer erhöhten Proliferationsaktivität und erniedrigtem Metabolismus assoziiert ist, erscheint eine Hemmung der Expression durch die Behandlung mit 5-AZA und Vitamin C plausibel (Park *et al.*, 2015).

Vergleicht man die voll- und semiquantitativen Ergebnisse der PCR Tests bezüglich der *PRMT1* Expression in der Zelllinie, so ist ebenfalls mit beiden Methoden eine deutliche Hochregulation in HepG2 Zellen nachzuweisen. Dies deckt sich mit Untersuchungen von Gou *et al.*, in welchen in Leberkrebszelllinien ebenfalls eine Hochregulation von *PRMT1* nachgewiesen wurde (Gou *et al.*, 2017). Die erhöhte Genexpression von *PRMT1* in Leberkrebszellen ist dabei mit einer erhöhten Zellteilungsaktivität assoziiert (Zhang *et al.*, 2018). Die Ergebnisse beider PCR Verfahren zeigen sich damit untereinander und auch mit bestehenden Voruntersuchungen in anderen Laboren im Einklang.

4.3. Vor- und Nachteile der semiquantitativen RT-PCR am vorliegenden Beispiel

Die konventionelle PCR mittels Gelelektrophorese stellt eine einfache, schnelle und günstige Methode dar, ein bestimmtes Gen zu amplifizieren sowie mehrere Proben gleichzeitig zu messen (Lee *et al.*, 2012). Dabei bietet die RT-PCR eine unkomplizierte Handhabung, sodass diese Methode in vielen Laboren zum Standard der Genexpressionsanalyse gehört (Mo *et al.*, 2012, Sanders *et al.*, 2014). Durch die Benutzung eines Markers mit DNA Fragmenten verschiedener Größen kann außerdem mit hoher Sicherheit auf das gesuchte Gen geschlossen werden (Lee *et al.*, 2012). Unspezifische Amplifikate werden elektrophoretisch getrennt und können als Nebenbanden visualisiert werden (Bradford *et al.*, 2005). Der Einfachheit der Methode steht eine im Vergleich zur vollquantitativen qPCR

in vielen Fragestellungen niedrigere Präzision gegenüber (Mülhardt, 2013). Dies äußerte sich bei den durchgeführten Experimenten in mehreren Bereichen.

Die im Vergleich zur qPCR deutlich geringer ausfallende dynamische Detektionsspanne und in der Literatur beschriebene niedrigere Sensitivität zur Messung niedrig exprimierter Gene kann dazu führen, dass Proben mit deutlich abweichenden Genexpressionen sich nicht adäquat unterscheiden lassen (Nakano *et al.*, 2017, Singh *et al.*, 2014).

Dies zeigte sich deutlich in der Messung der in HepG2 niedrig exprimierten *CYP* Gene im Vergleich zum PHH Niveau. Die mittels qPCR gemessenen und in der Literatur dokumentierten Basalexpressionen von *CYP1A2*, *CYP2C9* und *CYP3A4* in HepG2 Zellen im Verhältnis zu PHHs entsprechen weitestgehend einander (Gerets *et al.*, 2012, Wilkening *et al.*, 2003). Bereits die Optimierungen der RT-PCR Primer zeigten hingegen die begrenzte Sensitivität der konventionellen Methode zur Messung niedriger Basalexpressionen. Wie in Abbildung 8 – 10 gezeigt, konnte unter keiner Bedingung eine adäquate Verdopplung der Expression nachgewiesen werden. Eine messbare Expression war erst bei 35 Zyklen und 40 ng Template zu vernehmen. Der Einsatz hoher Zyklenzahlen führt jedoch durch einen Verbrauch der Reagenzien, Ineffektivität der DNA Polymerase und sich einstellender Plateauphase dazu, dass Expressionen nicht adäquat quantifiziert werden können (Øster and Höllsberg, 2002).

Ein weiterer Nachteil ist zudem die erhöhte Variabilität in der Plateauphase, welche ebenfalls bei der Messung gleicher Genexpressionen auftreten kann (Freeman *et al.*, 1999). Ein Grund hierfür ist, dass mittels RT-PCR lediglich eine Endpunktbetrachtung vorgenommen wird, in der die Reaktionskinetik, und damit die Effektivität während der PCR, nicht überprüft werden kann (Nikitina *et al.*, 2003). Faktoren wie geringe Konzentrationsunterschiede der Reagenzien und Variationen im Temperaturprofil des Cyclers können einen wichtigen Einfluss auf die Reaktionskinetik der PCR haben (Suzuki and Giovannoni, 1996). Dies kann dazu führen, dass Proben gleicher Genexpressionen durch unterschiedlich effektive PCR in der nachfolgenden Messung verschiedene Resultate hervorbringen (Ramakers *et al.*, 2003, Freeman *et al.*, 1999). Während die

Unterschiede in der exponentiellen Phase durch eine hohe PCR Effektivität und noch geringe Zyklenzahl klein sind, können diese mit Voranschreiten der Reaktion immer größer werden (Suzuki and Giovannoni, 1996, Freeman *et al.*, 1999). Zudem wird die Fluoreszenz bei der konventionellen Methode nicht während, sondern nach der Reaktion detektiert (Nikitina *et al.*, 2003). Daher kann auch der PCR Abschnitt, in dem gemessen wird, nicht sicher vorausgesagt werden, was quantitative Aussagen zusätzlich erschwert (Bradford *et al.*, 2005). Insbesondere während der Plateauphase der PCR gibt es so keine direkte Korrelation zwischen DNA Input und Gen Amplifikation (Pfaffl *et al.*, 1998). Am Beispiel der untersuchten *CYPs* kann man so feststellen, dass einerseits der Unterschied zwischen HepG2 und PHHs um ein Vielfaches kleiner erscheint, als in der Literatur beschrieben und mittels qPCR gemessen (Gerets *et al.*, 2012, Wilkening *et al.*, 2003). Andererseits zeigen sich im Vorfeld mittels qPCR gemessene Behandlungseffekte durch die Behandlung mit 5-AZA und Vitamin C in der RT-PCR oftmals kleiner (wie bei *CYP1A2* und *CYP2C9* gezeigt), nicht existent oder manchmal sogar gegensätzlich (wie im Falle von *CYP3A4* mit Zellstimulation durch Insulin und Hydrocortison).

Im Bereich höher exprimierter Gene konnten Effekte durch die Zellbehandlung besser ermittelt werden. Dies spiegelte sich ebenfalls in der Messung und Vergleichbarkeit der Expressionen im direkten Vergleich mit den gewählten PHHs als Referenz wider. Auffällig ist eine im Vergleich zu den erfolgten *CYP* Messungen deutlich bessere Erfassung der HepG2 und PHH Expressionen, welche nicht nur den qPCR Ergebnissen ähnlicher sind, sondern auch der Literatur entsprechen (Gou *et al.*, 2017, Agger *et al.*, 2009). Eine mögliche Ursache könnte die im Vorfeld durchgeführte Primer Optimierung sein. Durch eine messbare Verdopplung der Intensität nach 25 Zyklen (*HDAC1 / HDAC2*) und 30 Zyklen (*KDM4C / KDM6B*) konnten diese Gene, anders als im Falle der *CYPs*, anschließend bei niedrigeren Zyklen getestet werden. Es ist bekannt, dass die konventionelle Methode durch Reduktion der PCR Zyklen eine Messung im linearen Bereich der PCR möglich machen kann, wenn das Gen in ausreichendem Umfang exprimiert wird (Bradford *et al.*, 2005). Ein weiterer Grund dafür könnte die geringere Differenz in der Genexpression zwischen

HepG2 Zellen und PHHs sein, sodass sich die PHH Expression innerhalb der dynamischen Detektionsfähigkeit der RT-PCR befand (Singh *et al.*, 2014). Doch auch im Falle epigenetisch relevanter Gene ist die limitierte begrenzte dynamische Detektionsspanne des Verfahrens sichtbar. So beispielsweise bei der Betrachtung der Basalexpressionen von *HDAC1* und *HDAC2* in der Zelllinie. Mittels RT-PCR sind im Vergleich beider Gene in HepG2 untereinander annähernd identische Resultate festzustellen. Die qPCR Daten zeigen im Falle von *HDAC2* hingegen eine etwa dreifach höhere Expression in nicht stimulierten Zellen als mittels RT-PCR ermittelt.

Ein weiteres Beispiel für die begrenzte Detektionsspanne des konventionellen Verfahrens ist der messbare Effekt der Zellstimulation auf die *KDM6B* Expression von HepG2 und der direkte Vergleich mit PHHs. Obwohl beide Methoden hier eine ähnliche Tendenz aufzeigen, sind im Vergleich große Unterschiede zu sehen. Während die RT-PCR Methode eine sehr gute Annäherung an die PHH Expression anzeigt, zeigt die vollquantitative Methode eine mehr als fünffach höhere Expression in den Hepatozyten, die als Referenz genutzt wurden. Dieser große Unterschied war mittels RT-PCR nicht zu detektieren. Die aufgeführten Beispiele metabolischer und epigenetisch relevanter Gene verdeutlichen allesamt die zur Messung großer Expressionsunterschiede eingeschränkte Detektionsspanne des konventionellen Messverfahrens. Vor diesem Hintergrund sind auch kleinere Effekte, insbesondere in Genen mit niedriger Expression oder großen Expressionsdifferenzen zwischen den Zellen, nur schwer zu detektieren. Dies kann letztlich zu falschen Schlussfolgerungen führen, da kleine Effekte in Experimenten nicht immer richtig erfasst werden (Sanders *et al.*, 2014).

Trotz festgestellter Defizite konnte gezeigt werden, dass auch mittels RT-PCR im Falle epigenetisch relevanter Gene die Messung von signifikanten Unterschieden möglich ist (siehe *KDM4C* und *KDM6B* Messungen nach Zellstimulation). Wenn auch viele Ergebnisse quantitativ nicht mit bestehenden qPCR Daten vergleichbar waren, so konnten gleichwohl sehr ähnliche Tendenzen ermittelt werden.

4.4. Limitierungen an der Durchführung der Experimente

4.4.1. Primäre humane Hepatozyten als Referenz

Ein möglicher Kritikpunkt könnte die Anzahl der PHH cDNA Proben verschiedener Spender sein, welche als Referenz für die Genexpressionsanalyse genutzt wurde.

Es ist bekannt, dass PHHs bezüglich Funktionalität und Fremdstoff metabolisierender Eigenschaften große Unterschiede aufweisen, welche unter anderem abhängig sind von Isolation, Art der Zellkultivierung und Auswahl des Spenders (Bachmann *et al.*, 2015). Zudem stammen isolierte PHHs meist von alten, medikamentös vorbehandelten Patienten. Dies kann sich nachteilig auf die metabolische Kapazität und Viabilität der Zellen auswirken (Ruoß *et al.*, 2020). Aufgrund der beschriebenen spenderabhängigen Variabilität ist es üblich, cDNA Proben mehrerer Spender zu poolen, bevor diese als Referenz für Genexpressionsanalysen genutzt werden (Kvist *et al.*, 2018, Ruoß *et al.*, 2019). In dieser Arbeit wurde ein cDNA Pool von fünf verschiedenen Spendern als Referenz verwendet. Dies entspricht Arbeiten anderer Labore, welche ebenfalls eine ähnliche Anzahl an PHH Spendern für Vergleiche mit Hepatomzelllinien genutzt haben (Pathil *et al.*, 2006, Kvist *et al.*, 2018, Ruoß *et al.*, 2019). Es ist trotzdem nicht auszuschließen, dass der genutzte PHH cDNA Pool spenderabhängige Unterschiede der Genexpression nicht genügend ausgleichen konnte (Nikolaou *et al.*, 2016). Insbesondere in der Auswertung epigenetisch relevanter Gene und deren bekanntem metabolischen Einfluss wäre denkbar, dass festgestellte Effekte, die durch die Zellstimulation zu einer starken Annäherung an PHH Niveau geführt haben, nach Heranziehung von cDNA weiterer Spender, nicht mehr in diesem Ausmaß zu messen sein könnten (Gonzalez, 2008).

4.4.2. HepG2 Kultivierung

Auch die metabolische Kapazität von HepG2 Zellen unterscheidet sich deutlich in der Literatur (Donato *et al.*, 2015). Eine Variabilität des Zellmetabolismus verschiedener Hepatomzelllinien in Abhängigkeit der Zellpassage wurde bereits durch Lin *et al.* aus unserem Labor beschrieben. Dabei konnte in HepG2 Zellen

unterschiedlicher Zellpassagen eine variable Genexpression und Enzymaktivität verschiedener CYPs beobachtet werden (Lin *et al.*, 2012). Außerdem ist seit langem bekannt, dass der Metabolismus von Hepatomzelllinien unter anderem stark abhängig von der Art des genutzten Mediums ist (Nakabayashi *et al.*, 1982). So können in Earle's Medium kultivierte HepG2 Zellen eine höhere metabolische Aktivität aufweisen, als HepG2 Zellen kultiviert in Williams Medium E (Doostdar *et al.*, 1988). Dabei tragen Medienzusätze wie FCS zu einem großen Teil zur Aufrechterhaltung von Metabolismus und Viabilität der Zellen bei (Liebel *et al.*, 2015). Als tierisches Serum, welches aus Kälberföten isoliert wird, unterliegt FCS jedoch saisonalen und geographischen Schwankungen, die zu Variationen der Zusammensetzung führen können. Abweichungen der Serumzusammensetzung können wiederum zu phänotypischen Unterschieden der kultivierten Zellen führen (van der Valk *et al.*, 2010). Diese und weitere Faktoren haben einen wichtigen Einfluss auf den Metabolismus in HepG2 Zellen und führen in verschiedenen Laboren durch Nutzung verschiedener Protokolle zur Kultivierung zu unterschiedlichen Resultaten (Nikolaou *et al.*, 2016). Daher können keine allgemeingültigen Daten zum absoluten und relativen Expressionsniveau der Zelllinie HepG2 angegeben und daraus folgend innerhalb verschiedener Labore nur eingeschränkt Methoden verglichen werden (Tyakht *et al.*, 2014).

4.4.3. Primer Optimierung

Ein weiterer Punkt ist die durchgeführte Primer Optimierung. Wie erwähnt waren bestimmte Gene aufgrund niedriger Basalexpression nicht oder nur schwer nachweisbar. Insbesondere bei sehr unterschiedlich exprimierten Genen führte dies zu einer ineffektiven Optimierung der Primer. Dieser Umstand zeigte sich am deutlichsten bei der *CYP* Primer Optimierung. Wie beschrieben wurde hierfür ein Pool aus allen getesteten Proben verwendet, darunter auch PHH cDNA als Referenz. Falls die Expressionen innerhalb des cDNA Pools sehr unterschiedlich sind, wie etwa die *CYP* Expression in PHHs und HepG2 Zellen, kann dies zu PCR Bedingungen führen, die für keine der Zellarten optimal sind und eine angemessene Quantifizierung zusätzlich erschweren (Peixoto *et al.*, 2004). Vergleicht man stimulierte und nicht stimulierte HepG2 Zellen miteinander, ohne

PHHs mit einzubeziehen, wären durch Abwesenheit von PHH cDNA durch die Primer Optimierung eventuell deutlichere Effekte durch die Stimulation nachweisbar. Auf der anderen Seite ist jedoch vor allem der direkte Vergleich mit humanen Hepatozyten in der Erforschung von Zellalternativen üblich, weswegen auch diese herangezogen wurden (Cicinnati *et al.*, 2008).

4.4.4. *GAPDH* als Housekeeping Gen

Ein weiterer in der Literatur kontrovers diskutierter Punkt ist die Wahl des optimalen Housekeeping Gens (Chong *et al.*, 2017). Es ist bekannt, dass die Anwendung verschiedener Housekeeping Gene in gleichen Experimenten unterschiedliche Ergebnisse hervorbringen kann (Dheda *et al.*, 2005). Insbesondere im Vergleich von Leberkrebszelllinien und Hepatozyten wird *GAPDH* aufgrund sehr ähnlicher Expression als geeignetes Gen genannt (Cicinnati *et al.*, 2008). Andere Publikationen beschreiben Gene des Ubiquitin C (UBC) oder Tryptophan 5-Monooxygenase Aktivator (YWHAZ) Proteins als deutlich stabiler und sensitiver in dieser Fragestellung (Chua *et al.*, 2011). Eine mögliche Auswirkung der Nutzung verschiedener Housekeeping Gene wird am vorliegenden Beispiel in Abbildung 24 deutlich.

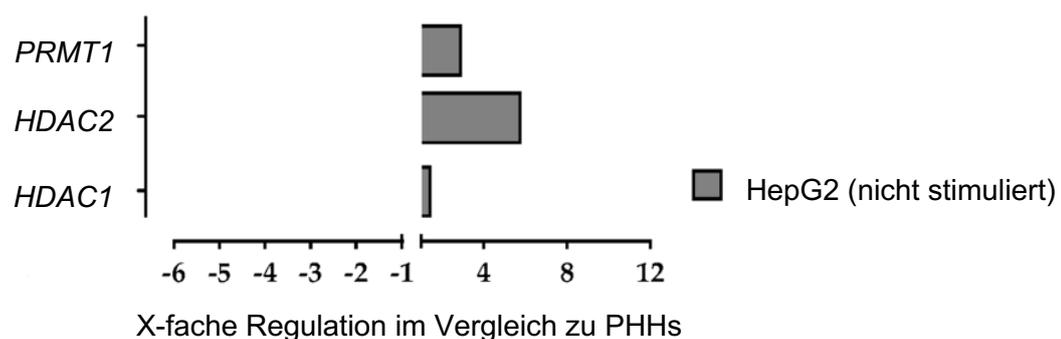


Abbildung 24: Chromatin Array der Genexpression von *HDAC1*, *HDAC2* und *PRMT1* in nicht stimulierten HepG2 Zellen im Vergleich zu PHHs (aus Ruoß *et al.*, 2019, modifiziert mit deutschen Beschriftungen)

Betrachtet man die mittels qPCR ermittelte Genexpression von *HDAC1*, *HDAC2* sowie *PRMT1* (Abbildung 21 – 23) und stellt diese den in Ruoß *et al.* publizierten Daten des Chromatin Array gegenüber, so ist in den Genen *HDAC2* und *PRMT1*

eine größere Diskrepanz zwischen HepG2 und PHHs festzustellen als mittels qPCR ermittelt wurde (Ruoß *et al.*, 2019). Auf der anderen Seite zeigt sich die Genexpression von *HDAC1* mit beiden Methoden sehr ähnlich. Ein relevanter Unterschied zwischen der durchgeführten qPCR und dem qPCR basierten Chromatin Array ist die Auswahl der Housekeeping Gene. Während zur Durchführung der qPCR, wie in der konventionellen PCR, das Gen *GAPDH* zur Normierung genutzt wurde, basiert das genutzte Chromatin Array auf mehrere verschiedene Housekeeping Gene, welche in die Ergebnisse einfließen (Zhai *et al.*, 2018).

Obwohl für beide Experimente nicht identische cDNA Proben genutzt wurden, ist trotzdem nicht auszuschließen, dass die Nutzung verschiedener Housekeeping Gene ein ausschlaggebender Punkt für die gemessenen Unterschiede war, zumal die Kultivierung der HepG2 Zellen und PHHs nach gleichem Protokoll erfolgte (Knobeloch *et al.*, 2012, Ruoß *et al.*, 2019). Daher ist denkbar, dass die Wahl eines anderen Gens in der durchgeführten RT-PCR ebenfalls abweichende Ergebnisse hervorgebracht hätte (Chua *et al.*, 2011). Da *GAPDH* als ein besonders gut etabliertes und für die PCR mit HepG2 Zellen häufig genutztes Housekeeping Gen gilt, wurde sich für die RT-PCR Tests letztlich dafür entschieden (Schulz *et al.*, 2012).

4.5. Ansätze zur Optimierung der RT-PCR Methode

4.5.1. Magnesium und dNTPs

Ein PCR Ansatz besteht aus Vorwärts / Rückwärts Primer, Magnesium Ionen, Puffer, dNTPs, DNA Polymerase und der Matrize (Template) (Eckert and Kunkel, 1991). PCR Reagenzien üben im Zusammenspiel einen großen Einfluss auf Sensitivität und Spezifität des Verfahrens aus und bieten viele Möglichkeiten der Optimierung (Lorenz, 2012). Die Wahl der richtigen Magnesium und dNTP Konzentration spielt dabei eine ganz besondere Rolle (Roux, 2009).

Die eingesetzte DNA Polymerase erfordert für eine regelrechte Funktion die Anwesenheit von Mg^{2+} als Cofaktor. Dabei bildet Mg^{2+} lösliche Komplexe mit dNTPs aus, welche wiederum von der DNA Polymerase während der Reaktion eingebaut werden (Lorenz, 2012). Mg^{2+} wird während der Reaktion auch von

Primern gebunden, wodurch deren spezifische und unspezifische Bindung an die Einzelstrang DNA zunimmt (Waters and Shapter, 2014). Wenn die Mg^{2+} Konzentration zu niedrig ist, läuft die Reaktion seltener ab, was zu einer ungenügenden Menge Amplifikat führen kann (Roux, 2009). Zu hohe Mg^{2+} Konzentrationen können hingegen über vermehrte Primer Anlagerung zu einer höheren Amplifikation nicht nur des gesuchten Gens, sondern über unspezifische Bindung auch anderer Sequenzen führen (Lorenz, 2012).

Neben der Konzentration der dNTPs ist auch deren Qualität ein wichtiger Faktor für die Durchführung einer erfolgreichen PCR (Mülhardt, 2013). Wiederholtes Auftauen und Einfrieren kann die Stabilität senken und zum Zerfall der dNTPs führen (Lorenz, 2012). Eine Möglichkeit die Stabilität von dNTPs zu erhöhen ist deren Modifikation mit funktionellen Gruppen. In einer Studie konnte eine bessere Stabilität bei dNTPs mit Alkyl Gruppen am terminalen Phosphat festgestellt werden, was unter anderem eine erhöhte Hitzeresistenz zur Folge hatte (Reynolds *et al.*, 2008). Demgegenüber könnten funktionelle Gruppen, die nach Einbau der dNTPs frei werden, durch Interaktion mit der DNA Polymerase und anderen Reagenzien die Amplifikation hemmen (Lorenz, 2012). Die Nutzung von Nukleotid Dimeren statt einzelner dNTPs kann ebenfalls durch eine geringere Neigung zur Hydrolyse und veränderter Sekundärstruktur zu einem langsameren Verfall der Nukleotide bei Hitze beitragen (Mohsen *et al.*, 2019). Insbesondere bei hohen Zyklenzahlen konnte dadurch eine signifikant höhere PCR Effizienz gegenüber einzelner dNTPs festgestellt werden (Mohsen *et al.*, 2019). Zum Nachweis niedriger Genexpressionen mittels RT-PCR, in denen oft viele Zyklen nötig sind, könnte dies die Sensitivität des Verfahrens erhöhen (Roux, 2009).

4.5.2. Matrize

Reinheit und Intaktheit des genutzten genetischen Materials ist eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche RT-PCR (Lorenz, 2012). Enzymatischer Abbau der RNA durch RNasen oder Kontaminationen durch PCR Inhibitoren wie Lösungsmittel, Salze und Zellproteine können zu falsch negativen Ergebnissen führen (Brisco and Morley, 2012). Durch Optimierung der RNA Isolation kann die

Effizienz und Sensitivität der RT-PCR deutlich gesteigert werden (Muyal *et al.*, 2009). Generell können Methoden der RNA Isolation in lösungsbasierte und säulenbasierte Verfahren eingeteilt werden (Tan and Yiap, 2009). Eine weit verbreitete, lösungsbasierte Methode zur RNA Isolation ist die manuelle Methode durch Nutzung einer gebrauchsfertigen Lösung wie TriFast, welche auch in dieser Arbeit genutzt wurde (Muyal *et al.*, 2009). Diese enthält Guanidinthiocyanat, welches die Zellen lysiert und RNasen deaktiviert, und Phenol, welches Proteine denaturiert (Tan and Yiap, 2009). Nach Zugabe von unpolarem Chloroform, was Lipide und Proteine löst, kann die RNA nach Zentrifugation aus der oberen, wässrigen Phase isoliert werden (Kapitel 2.3.3.). Lösungsbasierte Verfahren gelten als zuverlässige, gut etablierte und kostengünstige Methoden zur RNA Isolation (Tan and Yiap, 2009). Durch schnelle Deaktivierung von RNasen ist zudem der enzymatische Abbau der RNA begrenzt, was die Ausbeute erhöht (Muyal *et al.*, 2009). Demgegenüber beinhaltet die Isolation viele manuelle, zeitintensive Schritte, was das Kontaminationsrisiko (zum Beispiel Kreuzkontamination durch Abpipettieren von Teilen der organischen Phase) erhöhen und die RNA Qualität beeinträchtigen kann (Toni *et al.*, 2018, Muyal *et al.*, 2009).

Eine zeitsparende und automatisierte RNA Isolation ist hingegen mittels säulenbasierter Verfahren möglich (Karp *et al.*, 1998). Das Grundprinzip ist hierbei die Anziehung zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren des Zelllysates und der mit positiven Ladungen besetzten Matrix der Säulen (Mülhardt, 2013). Die Nukleinsäuren binden an die Matrixwand (meist Kieselgel) und können nach mehrmaligem Waschen und Entfernung des Durchsatzes durch Zentrifugation extrahiert werden (Tan and Yiap, 2009). Die Bindungsstärke der Nukleinsäuren ist dabei unter anderem abhängig vom pH und Salzgehalt des eingesetzten Puffers, wodurch eine Diskrimination zwischen RNA und DNA erreicht werden kann (Mülhardt, 2013). Gegenüber konventionellen, lösungsbasierten Verfahren findet keine Phasentrennung und keine manuelle Extraktion der RNA statt, wodurch das Risiko von Kreuzkontaminationen verringert und die RNA Qualität erhöht werden kann

(Muyal *et al.*, 2009). Mehr intakte RNA kann zu einer effizienteren Umschreibung in cDNA und letztlich zu mehr Amplifikat durch die PCR führen (Lorenz, 2012).

4.5.3. DNA Polymerase und Primer

Die am häufigsten verwendete DNA Polymerase für Amplifikationen mittels RT-PCR ist die Taq Polymerase (Mülhardt, 2013). Diese benötigt einen cDNA Strang als Matrize (Haddad and Baldwin, 2010). Eine Alternative zu konventionellen Taq Polymerasen sind DNA Polymerasen mit Reverse Transkriptase Aktivität (Mülhardt, 2013). Ein Vorteil der Nutzung dieser Enzyme ist die zeitsparende Durchführung und reduzierte Gefahr für Kontaminationen, da die cDNA Synthese und anschließende PCR in einem Schritt durchgeführt wird (Cai *et al.*, 2018). Eine Limitation ist die begrenzte Reverse Transkriptase und Polymerase Aktivität, unter anderem aufgrund des stark abweichenden Temperaturoptimums beider Enzyme (Heller *et al.*, 2019). Dies kann die Sensitivität der RT-PCR senken, weswegen diese Enzyme bislang keine befriedigende Alternative zur konventionellen Taq Polymerase darstellen (Mülhardt, 2013, Cai *et al.*, 2018).

DNA Polymerasen weisen auch deutlich unter ihrem Temperaturoptimum eine nachweisbare Aktivität auf (Mülhardt, 2013). Dies kann schon während der Vorbereitung der PCR Lösung durch Restaktivität bereits zu einer Synthese von Amplifikaten führen (Waters and Shapter, 2014). Diese sind meist unvollständig, da die Polymerase vor Fertigstellung des Amplifikats durch zu niedrige Aktivität vom Zielgen abfällt (Mullis, 1991). Diese unvollständigen Fragmente können einerseits die Aktivität der DNA Polymerase während der Reaktion hemmen und andererseits als Matrize für weitere Fehlamplikate dienen (Mülhardt, 2013). Eine Möglichkeit die Aktivität von DNA Polymerasen vor der Erhitzung zu hemmen ist deren Bindung und Inaktivierung durch thermolabile Substanzen wie Wachs (Lorenz, 2012). Diese liegen bei Raumtemperatur in fester Form vor und verflüssigen sich durch die Erhitzung im Cycler, wodurch die DNA Polymerase wieder frei und aktiv wird (Roux, 2009). Dadurch können Fehlamplikate reduziert und die Effizienz der PCR gesteigert werden (Mülhardt, 2013). Eine weitere Möglichkeit, die Bildung von Fehlamplikaten zu senken, besteht in der

Verwendung von Primern, welche mit funktionellen Gruppen modifiziert sind (Schoenbrunner *et al.*, 2017). Eine Möglichkeit ist dabei die Primer Optimierung mittels Thiol Modifikation. So modifizierte Primer sind unterhalb einer bestimmten Temperatur nicht in der Lage an DNA zu binden. Erst durch eine Erwärmung während der Reaktion binden sie an das zu amplifizierende Gen. Der genaue Mechanismus dahinter ist ungeklärt. Eine Theorie ist eine mögliche Interaktion zwischen der Thiol Gruppe des Primers und Proteinen in der Lösung bei niedrigen Temperaturen (Bai *et al.*, 2018).

4.5.4. Additive

Eine Möglichkeit die Menge des Amplifikats zu erhöhen ist eine Verlagerung der Reaktion zugunsten des Produkts (Mülhardt, 2013). Ein Nebenprodukt beim Einbau der dNTPs ist Pyrophosphat (Eckert and Kunkel, 1991). Eine zunehmende Pyrophosphat Konzentration während der Reaktion führt über Hemmung der DNA Polymerase zu einer ineffizienteren Amplifikation (Kainz, 2000). Durch die Zugabe von Pyrophosphatase kann die Pyrophosphat Konzentration gesenkt und die Effizienz der PCR erhöht werden (Mülhardt, 2013). Viele kommerziell erhältliche Pyrophosphatasen weisen eine begrenzte Thermostabilität und hohen Preis auf, weswegen das Enzym als Additiv für die RT-PCR bislang nur wenig etabliert ist (Cui *et al.*, 2015, Xiao *et al.*, 2004).

Eine weitere Möglichkeit zur Effizienz- und Sensitivitätssteigerung der RT-PCR ist die Herstellung gleichmäßiger Temperaturverhältnisse im PCR Ansatz während der Reaktion. So wurde in einer Studie von Rasheed *et al.* die cDNA Lösung mit speziellen Nanopartikeln aus Graphen versetzt. Das Resultat war eine effizientere Amplifikation durch einen besseren Wärmetransfer während des Polymerisationsvorgangs, wodurch mehr Endprodukte hergestellt werden konnten (Rasheed *et al.*, 2011). Auch Nanopartikel aus Silber oder Gold konnten eine Effizienzsteigerung hervorrufen (Vanzha *et al.*, 2016, Al-Dhabaan *et al.*, 2018). Dabei muss die Menge an Nanopartikeln für jede PCR individuell optimiert werden. Während eine zu niedrige Konzentration folgenlos bleiben könnte, kann eine zu hohe Gabe die Reaktion hemmen (Kambli and Kelkar-Mane, 2016).

4.5.5. Fluoreszenzfarbstoffe

Ein Grund für oftmals nicht detektierbare Unterschiede durch die konventionelle PCR besteht in der im Vergleich zur qPCR oftmals limitierten Präzision (Mülhardt, 2013). Eine Möglichkeit diese zu erhöhen besteht in der Wahl des passenden Fluoreszenzfarbstoffs. Obwohl Ethidiumbromid für die konventionelle PCR am häufigsten genutzt wird, sind mittlerweile auch andere Farbstoffe auf dem Markt, für welche eine oftmals höhere Sensitivität bescheinigt wird (Valones *et al.*, 2009). In einer Reihe von Studien konnte zudem eine toxische und mutagene Wirkung des interkalierenden und zellgängigen Farbstoffs EtBr gezeigt werden, weswegen ein hoher Bedarf an unschädlichen und sensitiven Alternativen besteht (Haines *et al.*, 2015).

Nicht interkalierende Färbemittel wie Methylblau gelten als günstige und weniger gesundheitsschädliche Alternativen, weisen im Vergleich zu EtBr jedoch eine deutlich niedrigere Sensitivität auf, weswegen sie für quantitative Expressionsanalysen meist ungeeignet sind (Lee *et al.*, 2012, Mülhardt, 2013). Häufig genutzte Alternativen sind hingegen fluoreszierende Farbstoffe wie SYBR Green und GoldView (GV) (Lin *et al.*, 2019, Lee *et al.*, 2012). In einer Arbeit von Huang *et al.* zeigten sich diese im Vergleich zu EtBr meist sensitiver, wobei deutliche Unterschiede in Abhängigkeit der zu messenden Fragmentgrößen festgestellt wurden. Bei Fragmenten unter 100 bp zeigte EtBr eine höhere Sensitivität als SG. DNA Amplifikate über 100 bp stellten sich durch SG und GV jedoch deutlich heller dar (Huang and Fu, 2005). Eine Dissoziation von SG von kleinen Fragmenten wurde bereits in anderen Studien beschrieben (Miller *et al.*, 1999). Eine Erklärung könnte die hohe Molekülgröße und starke Affinität von SG zu dsDNA sein, was die Mobilität kleiner Fragmente im Gel während der Elektrophorese behindern könnte (Hall, 2020, Huang and Fu, 2005, Ateş Sönmezoglu and Özkay, 2015). Ein weiterer alternativer Fluoreszenzfarbstoff ist GelRed (GR), dessen molekulare Struktur aus EtBr abgeleitet ist (Hall, 2020). GR konnte in Studien ebenfalls eine bessere Sensitivität als EtBr nachweisen und gilt außerdem als nicht zellpermeabel, wodurch der Farbstoff weniger toxisch sein soll (Haines *et al.*, 2015). Von Vorteil sind zudem die mit EtBr vergleichbaren optischen Eigenschaften, wodurch die Applikation als Alternative zu EtBr ohne

apparativem Mehraufwand (zum Beispiel Wechsel des Kamerafilters zur Detektion der Emissionen) möglich ist (Huang *et al.*, 2010). Ein Nachteil der meisten alternativen Farbstoffe ist der im Vergleich zu EtBr oftmals höhere Anschaffungspreis (Mülhardt, 2013). Außerdem eignen sich die alternativen, meist instabileren Substanzen selten als Farbstoff, welcher dem Gel direkt zugesetzt werden kann, weshalb das Agarosegel nach der Elektrophorese nachgefärbt werden muss (Sonmezoglu and Ozkay, 2015, Lee *et al.*, 2012). Dies führt zu einem hohen Farbstoffverbrauch (Lee *et al.*, 2012). Eine Methode, die Kosteneffizienz zu erhöhen ist daher die DNA Lösung mit einer verdünnte Probe des Farbstoffs zu mischen, bevor das Gel beladen wird (Miller *et al.*, 1999). Durch direkte Interkalierung wird dabei die Molekülgröße der Farbstoff beladenen dsDNA erhöht. Dies kann wiederum die Mobilität der dsDNA im Agarosegel während der Elektrophorese hemmen, was die Konfiguration der Banden und den korrekten Größennachweis beeinträchtigen kann (Huang *et al.*, 2010, Hall, 2020). Die nachträgliche Färbung des Gels zeigt sich daher bezüglich Sensitivität und Spezifität (exakte Größenbestimmung des Amplifikats) der Beimischung des Farbstoffs in die DNA Probe meist deutlich überlegen (Hall, 2020).

EtBr ist weiterhin der meist genutzte Fluoreszenzfarbstoff zum DNA Nachweis mittels Gelelektrophorese (Haines *et al.*, 2015). Die in Studien nachgewiesene niedrigere Kanzerogenität und höhere Sensitivität alternativer Farbstoffe könnte zukünftig zu einer breiteren Etablierung in RT-PCR Tests führen, sofern ein kosteneffizienterer Einsatz möglich ist (Hall, 2020, Haines *et al.*, 2015)

4.6. Methoden der Genexpressionsanalyse: Eignung am vorliegenden Beispiel

Aktuell etablierte und häufig genutzte Verfahren der Genexpressionsanalyse sind in Tabelle 1 aufgeführt. Nicht alle Methoden eignen sich in gleichem Maße für quantitative Expressionsanalysen. Wie beschrieben ist zur Messung niedrig exprimierter, aber metabolisch relevanter Gene in HepG2 Zellen ein hochsensitives Verfahren nötig, welches einerseits in der Lage ist, niedrige Genexpressionen zu detektieren, andererseits diese ins Verhältnis zu PHHs setzen kann. Gleichzeitig sollte die Methode ebenso im Stande sein, kleine

Unterschiede zuverlässig zu detektieren, um mögliche Effekte durch Zellstimulationen zu erfassen.

Mit einem DNA Microarray ist der simultane Nachweis mehrerer Tausend Gene verschiedener Zelllinien in mehreren Proben gleichzeitig möglich (Olsavsky *et al.*, 2007). So können komplexe Expressionsprofile metabolisch relevanter Gene erstellt sowie Zelllinien untereinander und mit PHHs verglichen werden (Jennen *et al.*, 2010). Dabei ist im Gegensatz zu konventionellen Blotting Verfahren eine vielfach niedrigere Menge DNA zur Messung erforderlich (Rajeevan *et al.*, 2001). Das Design der Methode, die Analyse sowie die Interpretation erzielter Ergebnisse ist deutlich komplexer als bei konventionellen Methoden der Genexpressionsanalyse (Tarca *et al.*, 2006). Außerdem ist eine begrenzte dynamische Detektionsspanne sowie eine limitierte Sensitivität zur Detektion niedrig exprimierter Gene in der Literatur beschrieben worden (Wang *et al.*, 2009). Die gleichzeitige Detektion mehrerer Fluoreszenzen in geringem Abstand zueinander kann dazu führen, dass starke Signale den Hintergrund schwächerer Signale erhöhen, wodurch die Detektion großer Expressionsunterschiede beschränkt sein kann (Mülhardt, 2013). Aufgrund bekannter Limitationen ist daher eine Validierung mittels PCR üblich (Rajeevan *et al.*, 2001).

Eine weitere etablierte Methode zum Vergleich verschiedener Expressionsprofile ist die SAGE Methode (Yamamoto *et al.*, 2001). Diese ist ebenfalls im Stande, die Expression einer hohen Anzahl metabolisch relevanter Gene in mehreren Proben gleichzeitig zu messen (Yamashita *et al.*, 2000). Auch hier ist der hohe technische Aufwand, die niedrige Sensitivität bei niedrig exprimierten Genen und die begrenzte dynamische Detektionsspanne ein limitierender Faktor, weswegen auch hier weitere Methoden zur Validierung verwendet werden (Costa *et al.*, 2013).

Das Verfahren der RNA - Sequenzierung zeigt sich zum Nachweis niedrig exprimierter Gene (wie CYPs in HepG2 Zellen) und großer Expressionsunterschiede als deutlich sensitiver, was auch durch eine im Vergleich zu DNA Microarrays deutlich höhere dynamische Detektionsspanne begründet ist (Tyakht *et al.*, 2014, Costa *et al.*, 2013). Als relativ neue Methode erfordert diese jedoch einen hohen apparativen Aufwand sowie eine zeitintensive

und komplexe nachfolgende Datenauswertung (Ozsolak and Milos, 2011). Zudem können Proben mit niedrigem Gehalt an Genprodukten ohne vorausgegangene Amplifikation oftmals nicht adäquat gemessen werden (Ozsolak and Milos, 2011, Kukurba and Montgomery, 2015). In SAGE, DNA Microarray und RNA-Seq Verfahren ist daher die Durchführung einer PCR zur Vervielfältigung dieser Genprodukte ein wichtiger Bestandteil, um die Sensitivität zu erhöhen (Xu *et al.*, 2009, Kukurba and Montgomery, 2015, Ozsolak and Milos, 2011). Dabei wird die nachfolgende Validierung der erzeugten Daten oftmals mittels qPCR durchgeführt (Zhang *et al.*, 2019).

Insbesondere zur quantitativen Analyse der Genexpression gilt die qPCR als Goldstandard (Costa *et al.*, 2013). Dies ist auch daher begründet, dass Messungen niedriger Expressionslevel unter Verbrauch geringster DNA Mengen schon während der Amplifikation mit einer hohen dynamischer Detektionsspanne möglich sind (Forootan *et al.*, 2017). Damit gilt sie der semiquantitativen RT-PCR für präzise quantitative Expressionsanalysen als überlegen, was ebenfalls in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte (Antiabong *et al.*, 2016).

4.7. qPCR – die beste Methode in allen Fragestellungen?

Die Methode der quantitativen Real Time PCR wird von mehreren Autoren als die beste und sensitivste Methode der Genexpressionsanalyse beschrieben (Forootan *et al.*, 2017, Loupakis *et al.*, 2009). Trotzdem weist sie einige Limitationen auf.

Aufgrund des hohen quantitativen Anspruchs und der im Vergleich zur konventionellen PCR komplexeren Datenauswertung können Defizite bei der Handhabung folgenreich sein und zu unterschiedlichen Ergebnissen führen (Smith and Osborn, 2009, Mülhardt, 2013). Dazu kommt, dass seit der Einführung viele Protokolle, Messinstrumente und Analysemethoden entwickelt wurden, welche unterschiedlich eingesetzt werden und ebenfalls zu variablen Resultaten führen können (Abdel Nour *et al.*, 2014). Dies kann den Vergleich von Messergebnissen verschiedener Labore schwierig gestalten (Sanders *et al.*, 2014). In einer Publikation von Nolan *et al.* werden ernste Bedenken bezüglich der Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit publizierter qPCR Daten ausgesprochen.

Es wird bemängelt, dass viele qPCR Messungen unterschiedlich durchgeführt werden, Abweichungen in der Ausführung und Datenanalyse jedoch schwerwiegende Auswirkungen auf die Zuverlässigkeit und Relevanz der Ergebnisse haben können. Dieser Umstand wird durch eine ungenügende Darstellung der Versuchsbedingungen in vielen Veröffentlichungen verschärft, sodass die Möglichkeit einer kritischen Bewertung dieser Daten und deren Reproduzierbarkeit limitiert sein kann (Nolan *et al.*, 2006).

Aus den genannten Gründen wurden im Jahre 2009 sogenannte MIQE (Mindestinformationen für die Publikation quantitativer Real Time PCR Experimente) Richtlinien veröffentlicht, die einen Mindeststandard an Versuchen mittels qPCR und Veröffentlichungen darstellen (Bustin *et al.*, 2009). Diese Regelungen beinhalten die genaue Angabe des verwendeten Protokolls zur Durchführung mit Referenz, genaue Volumina der verwendeten Lösungen mit allen Bestandteilen und deren Konzentrationen, Auswahl der Housekeeping Gene mit Begründung, Angabe des verwendeten Cyclers mit genauen Herstellerangaben und eine Vielzahl weiterer Angaben (Bustin *et al.*, 2009). Trotz eines positiven Effekts dieser Richtlinien, bleibt die fehlende Standardisierung und schwere Vergleichbarkeit von qPCR Resultaten ein aktuelles Thema, da diese Richtlinien oftmals nicht in vollem Umfang umgesetzt werden (Kuang *et al.*, 2018, Abdel Nour *et al.*, 2014).

4.7.1. Schmelzkurvenanalyse und fluorogene Sonden

Laut den MIQE Richtlinien ist die Kontrolle der Amplifikate auf Spezifität ein essentieller Bestandteil, um die Vergleichbarkeit und Zuverlässigkeit des Verfahrens zu überprüfen (Bustin *et al.*, 2009). Hierfür gilt die Schmelzkurvenanalyse als gut etablierte Methode (Valones *et al.*, 2009). Wie beschrieben hat die Basenabfolge eines DNA Abschnitts einen wichtigen Einfluss auf den Schmelzpunkt. Sequenzen mit hohem GC Gehalt werden durch eine besonders starke Bindung zwischen den Basen (drei Wasserstoffbrücken gegenüber zwei zwischen Adenin und Thymin) später getrennt, sodass ein Peak erst bei höheren Temperaturen zu vernehmen ist (Suspène *et al.*, 2008, Mader *et al.*, 2008). Amplifikate, in denen der GC Gehalt ungleichmäßig verteilt ist,

können durch zeitlich versetzte Freisetzung des Farbstoffs jedoch auch mehrere Peaks hervorrufen. Diese können als Nebenprodukte missinterpretiert werden (Ahmed *et al.*, 2017).

Eine Alternative ist die Nutzung fluorogene Oligonukleotide (Sonden) wie TaqMan, welche während der PCR sequenzspezifisch an das cDNA Template binden (Bradford *et al.*, 2005). Diese Sonden sind mit zwei verschiedenen Farbstoffen (Reporter und Quencher) markiert (Smith and Osborn, 2009). Der Reporter wird durch Licht eines charakteristischen Spektrums angeregt und sendet eine Emission aus. Das Emissionsspektrum vom Reporter entspricht dabei dem Anregungsspektrum des Quencher. In räumlicher Nähe (bei intaktem Oligonukleotid) überträgt der Reporterfarbstoff seine Energie an den Quencher weiter, wodurch ebenfalls Licht bestimmter Wellenlänge emittiert wird (Mülhardt, 2013). Wird der Reporter durch die herannahende DNA Polymerase freigesetzt, wird dessen Emission nicht mehr durch den Quencher ausgelöscht, wodurch die Lichtproduktion des Reporters detektiert werden kann (Smith and Osborn, 2009). Je mehr Genprodukt durch die DNA Polymerase amplifiziert wird, desto mehr Reporter Moleküle werden frei, wodurch die Signalstärke zunimmt (Mülhardt, 2013). Die im Vergleich zu interkalierenden Farbstoffen hohe Spezifität fluorogener Sonden gewährleistet, dass das detektierte Fluoreszenzsignal durch die Amplifikation der Zielsequenz hervorgerufen wird (Smith and Osborn, 2009). Der Spezifität des Verfahrens steht ein deutlich höherer Preis gegenüber (Bradford *et al.*, 2005). Zudem erfordert die Messung unterschiedlicher Gene den Einsatz verschiedener, sequenzspezifischer Sonden, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden (Valones *et al.*, 2009, Wilson *et al.*, 2015).

Als schnelle und unkomplizierte Methode kann die Spezifität ebenfalls mittels Gelelektrophorese überprüft werden (Bradford *et al.*, 2005). Diese wird auch in den MIQE Richtlinien zum Nachweis empfohlen (Bustin *et al.*, 2009). Insbesondere zur korrekten Interpretation mehrerer Peaks im Rahmen der Schmelzkurvenanalyse kann durch die schnelle Visualisierung unspezifischer Produkte (als Nebenbanden) eine klare Diskrimination zum Zielgen erreicht werden (Ahmed *et al.*, 2017). Ebenfalls eine Validierung sondenbasierter qPCR Messungen ist möglich und wird in aktuellen Studien durchgeführt, unter

anderem weil durch Nutzung eines Markers eine Bestätigung der Amplifikat Größe möglich ist (Aoki *et al.*, 2020).

4.8. Schlussfolgerung

Nach Auswertung und Diskussion der ermittelten Daten, komme ich zu dem Ergebnis, dass die semiquantitative RT-PCR ihre Daseinsberechtigung zur Expressionsanalyse nicht verloren hat. Ihre Schnelligkeit, Kosteneffizienz und einfache Handhabung ist zum zügigen Nachweis erreichter Effekte von großem Vorteil. In der qualitativen und quantitativen Analyse epigenetischer Modifikationen in HepG2 Zellen zeigten sich die Limitationen der Methode. Diese waren stets abhängig von der Basalexpression der Zelllinie, dem Behandlungseffekt sowie Expressionslevel der hinzugezogenen Referenz (PHHs).

Da die Unterschiede in der *CYP* Expression zu hoch und die Effekte durch die Behandlung zu klein waren, zeigte sich die konventionelle Methode zur alleinigen Quantifizierung der *CYP* Expression als ungeeignet. Gene, welche in ausreichendem Maß exprimiert werden, konnten hingegen nach PCR Optimierung zuverlässig nachgewiesen und Effekte akkurat beurteilt werden, wie hier anhand epigenetisch relevanter Gene gezeigt werden konnte. Der Vergleich von qPCR und RT-PCR Ergebnissen zeigte, dass mittels des RT-PCR Verfahrens Tendenzen zuverlässig detektiert werden konnten. Zur vollumfänglichen Quantifizierung erzielter Effekte ist jedoch die Anwendung der vollquantitativen PCR Methode sowie ein sensitiver Nachweis auf Protein und Aktivitätsebene nötig.

Die Untersuchung und metabolische Optimierung von Zellalternativen zu PHHs ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Die Tatsache, dass viele Ansätze immer noch keine ausreichenden Verbesserungen auf die metabolische Kapazität alternativer Zellen vorweisen können, verdeutlicht die Komplexität dieser Herausforderung. Vor diesem Hintergrund ist auch der Anspruch an die verwendete Methodik zur Messung erzielter Effekte hoch, da diese einerseits sehr sensitiv und präzise, andererseits gut etabliert und einfach zu handhaben sein muss. Insbesondere die Erforschung verschiedener Ansätze zur

Optimierung der konventionellen PCR bleibt ein aktuelles Thema, sodass sich neue Anwendungsmöglichkeiten eröffnen könnten. Vor diesem Hintergrund könnte die RT-PCR auch in Zukunft ein wichtiger Bestandteil bei der Untersuchung alternativer Zelllinien für metabolische Tests sein.

5. Zusammenfassung

Medikamentenassoziierte Hepatotoxizität ist der häufigste Grund, warum zugelassene Medikamente wieder vom Markt genommen werden. Individuelle Unterschiede des menschlichen Metabolismus sind schwer abzuschätzen, sodass neue Medikamente vor einer klinischen Anwendung umfangreich auf Toxizität getestet werden müssen. In der präklinischen Medikamentenentwicklung werden dabei *in vitro* und Tierexperimente durchgeführt, wobei letztere nur bedingt auf den Menschen übertragbar sind. Der heutige Goldstandard für *in vitro* Tests auf medikamenteninduzierte Hepatotoxizität sind primäre humane Hepatozyten (PHHs). Diese haben allerdings nur eine begrenzte Verfügbarkeit, dedifferenzieren rasch in Kultur und haben eine variable Zellviabilität. Eine Alternative zu PHHs sind Hepatomzelllinien wie HepG2 Zellen. Diese zeichnen sich durch eine ständige Verfügbarkeit, einfache Handhabung und gute Standardisierung aus, haben aber im Vergleich zu PHHs trotz verschiedener Ansätze zur Optimierung eine deutlich niedrigere metabolische Kapazität. Die epigenetische Modifikation mittels 5-AZA und Vitamin C bewirkt in HepG2 Zellen zwar eine metabolische Verbesserung, jedoch wird dadurch keine ausreichende Annäherung an PHHs erreicht. Da die erzielte Wirkung dadurch relativ klein ist, ist es wichtig diese geringen Effekte durch empfindliche Nachweismethoden zuverlässig messen zu können. Auf Ebene der Genexpression weist die Methode der PCR eine hohe Spezifität, Sensitivität sowie einfache Durchführbarkeit auf, weswegen sie in der vorliegenden Arbeit auf Anwendbarkeit überprüft wurde. Dabei wurde die konventionelle RT-PCR mittels Gelelektrophorese der vollquantitativen qPCR gegenübergestellt und die Ergebnisse auf Plausibilität geprüft. Insbesondere vor dem Hintergrund der nur partiellen Quantität der konventionellen Methode sollte die Frage beantwortet werden, welchen Stellenwert die RT-PCR zur Messung kleiner Expressionsunterschiede haben kann. Betrachtet wurden dabei die Gene besonders relevanter Cytochrom P450 Oxydasen (CYPs) sowie epigenetisch relevante Gene, die einen nachgewiesenen Einfluss in der metabolischen Funktion von Hepatozyten haben. Es zeigten sich bei der Untersuchung variable Ergebnisse. Im Falle epigenetisch wirksamer Gene konnten beiden Methoden

fast durchweg ähnliche Tendenzen im Sinne einer Annäherung an PHHs nachweisen. Die Expressionsanalyse untersuchter CYPs zeigte hingegen deutliche Grenzen der RT-PCR auf. Hier war aufgrund niedriger Basalexpression in HepG2 Zellen eine Messung nur im hohen Zyklusbereich möglich. Insbesondere kleine Behandlungseffekte durch 5-AZA und Vitamin C konnten nur schwer nachgewiesen und die metabolische Kapazität von PHHs auf Gen Ebene schwer erfasst werden. Die qPCR lieferte in vielen Bereichen genauere Ergebnisse und zeigte sich zum Nachweis kleinerer Unterschiede deutlich sensitiver. Schlussendlich ist auszuführen, dass die konventionelle PCR in dieser Fragestellung eine zuverlässige und einfache Methode sein kann, um Genexpressionen zu messen. In Zelllinien wie HepG2, die eine niedrige Basalexpression bestimmter Gene zeigen, können insbesondere kleine Expressionsunterschiede mitunter nur schwer detektiert werden. Auch die vollumfängliche Erfassung stark abweichender Expressionslevel metabolisch relevanter Gene kann sich im direkten Vergleich mit PHHs schwierig gestalten und macht die Anwendung einer vollquantitativen PCR erforderlich. Die weitere Optimierung durch Additive und alternative Fluoreszenzfarbstoffe zur Sensitivitätssteigerung bleibt Gegenstand aktueller Forschung und könnte die konventionelle Methode zukünftig noch nützlicher im Rahmen der Erforschung metabolischer Optimierungen neuer *in vitro* Verfahren machen.

6. Literaturverzeichnis

- ABDEL NOUR, A. M., AZHAR, E., DAMANHOURI, G. & BUSTIN, S. A. 2014. Five years MIQE guidelines: the case of the Arabian countries. *PloS one*, 9, e88266-e88266.
- ACHOUR, B., DANTONIO, A., NIOSI, M., NOVAK, J. J., FALLON, J. K., BARBER, J., SMITH, P. C., ROSTAMI-HODJEGAN, A. & GOOSEN, T. C. 2017. Quantitative Characterization of Major Hepatic UDP-Glucuronosyltransferase Enzymes in Human Liver Microsomes: Comparison of Two Proteomic Methods and Correlation with Catalytic Activity. *Drug Metab Dispos*, 45, 1102-1112.
- ADEN, D. P., FOGEL, A., PLOTKIN, S., DAMJANOV, I. & KNOWLES, B. B. 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282, 615-6.
- AGGER, K., CLOOS, P. A., RUDKJAER, L., WILLIAMS, K., ANDERSEN, G., CHRISTENSEN, J. & HELIN, K. 2009. The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A-ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence. *Genes Dev*, 23, 1171-6.
- AHMED, F. E., GOUDA, M. M., HUSSEIN, L. A., AHMED, N. C., VOS, P. W. & MOHAMMAD, M. A. 2017. Role of Melt Curve Analysis in Interpretation of Nutrigenomics' MicroRNA Expression Data. *Cancer genomics & proteomics*, 14, 469-481.
- AICH, S., DELBAERE, L. T. & CHEN, R. 2001. Continuous spectrophotometric assay for beta-glucuronidase. *Biotechniques*, 30, 846-50.
- AITMAN, T. J. 2001. DNA microarrays in medical practice. *BMJ (Clinical research ed.)*, 323, 611-615.
- AL-DHABAAN, F. A., YOUSEF, H., SHOALA, T., SHAHEEN, J., EL SAWI, Y. & FARAG, T. 2018. Enhancement of fungal DNA templates and PCR amplification yield by three types of nanoparticles. *Journal of Plant Protection Research*, 58, 66-72.
- ANTIABONG, J. F., NGOEPE, M. G. & ABECHI, A. S. 2016. Semi-quantitative digital analysis of polymerase chain reaction-electrophoresis gel: Potential applications in low-income veterinary laboratories. *Veterinary world*, 9, 935-939.
- AOKI, K., SUGASAWA, T., YANAZAWA, K., WATANABE, K., TAKEMASA, T., TAKEUCHI, Y., AITA, Y., YAHAGI, N., YOSHIDA, Y., KUJI, T., SEKINE, N., TAKEUCHI, K., UEDA, H., KAWAKAMI, Y. & TAKEKOSHI, K. 2020. The detection of trans gene fragments of hEPO in gene doping model mice by Taqman qPCR assay. *PeerJ*, 8, e8595-e8595.
- AOYAMA, K., YOSHINARI, K., KIM, H. J., NAGATA, K. & YAMAZOE, Y. 2009. Simultaneous expression of plural forms of human cytochrome P450 at desired ratios in HepG2 cells: adenovirus-mediated tool for cytochrome P450 reconstitution. *Drug Metab Pharmacokinet*, 24, 209-17.
- ATEŞ SÖNMEZOĞLU, Ö. & ÖZKAY, K. 2015. A New Organic Dye-Based Staining for The Detection of Plant DNA in Agarose Gels. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 34, 515-522.
- AULD, D. S., VEITH, H. & CALI, J. J. 2013. Bioluminescent assays for cytochrome P450 enzymes. *Methods Mol Biol*, 987, 1-9.

- BACHMANN, A., MOLL, M., GOTTWALD, E., NIES, C., ZANTL, R., WAGNER, H., BURKHARDT, B., SÁNCHEZ, J. J. M., LADURNER, R., THASLER, W., DAMM, G. & NUSSLER, A. K. 2015. 3D Cultivation Techniques for Primary Human Hepatocytes. *Microarrays (Basel, Switzerland)*, 4, 64-83.
- BAI, Y., XIAO, Y., SUO, Y., SHEN, Y., SHAO, Y., ZHANG, D. & ZHOU, C. 2018. Enhancement of PCR Sensitivity and Yield Using Thiol-modified Primers. *Scientific Reports*, 8, 14858.
- BAJADA, S., MAZAKOVA, I., RICHARDSON, J. B. & ASHAMMAKHI, N. 2008. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*, 2, 169-83.
- BAO, X., SIPRASHVILI, Z., ZARNEGAR, B. J., SHENOY, R. M., RIOS, E. J., NADY, N., QU, K., MAH, A., WEBSTER, D. E., RUBIN, A. J., WOZNIAK, G. G., TAO, S., WYSOCKA, J. & KHAVARI, P. A. 2017. CSNK1a1 Regulates PRMT1 to Maintain the Progenitor State in Self-Renewing Somatic Tissue. *Developmental cell*, 43, 227-239.e5.
- BASS, J. J., WILKINSON, D. J., RANKIN, D., PHILLIPS, B. E., SZEWCZYK, N. J., SMITH, K. & ATHERTON, P. J. 2017. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 27, 4-25.
- BELL, C. C., HENDRIKS, D. F. G., MORO, S. M. L., ELLIS, E., WALSH, J., RENBLUM, A., FREDRIKSSON PUIGVERT, L., DANKERS, A. C. A., JACOBS, F., SNOEYS, J., SISON-YOUNG, R. L., JENKINS, R. E., NORDLING, Å., MKRTCHIAN, S., PARK, B. K., KITTERINGHAM, N. R., GOLDRING, C. E. P., LAUSCHKE, V. M. & INGELMAN-SUNDBERG, M. 2016. Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Scientific reports*, 6, 25187-25187.
- BISSWANGER, H. 2014. Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1, 41-55.
- BLIEVERNICH, J. K., SCHAEFFELER, E., KLEIN, K., EICHELBAUM, M., SCHWAB, M. & ZANGER, U. M. 2007. MALDI-TOF mass spectrometry for multiplex genotyping of CYP2B6 single-nucleotide polymorphisms. *Clin Chem*, 53, 24-33.
- BRADFORD, W. D., CAHOON, L., FREEL, S. R., HOOPES, L. L. M. & ECKDAHL, T. T. 2005. An inexpensive gel electrophoresis-based polymerase chain reaction method for quantifying mRNA levels. *Cell biology education*, 4, 157-168.
- BRISCO, M. J. & MORLEY, A. A. 2012. Quantification of RNA integrity and its use for measurement of transcript number. *Nucleic acids research*, 40, e144-e144.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., SHIPLEY, G. L., VANDESOMPELE, J. & WITWER, C. T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55, 611-22.
- BUURMAN, R., GURLEVIK, E., SCHAFFER, V., EILERS, M., SANDBOTHE, M., KREIPE, H., WILKENS, L., SCHLEGELBERGER, B., KUHNEL, F. & SKAWRAN, B. 2012. Histone deacetylases activate hepatocyte growth

- factor signaling by repressing microRNA-449 in hepatocellular carcinoma cells. *Gastroenterology*, 143, 811-820.e15.
- CAI, D., BEHRMANN, O., HUFERT, F., DAME, G. & URBAN, G. 2018. Direct DNA and RNA detection from large volumes of whole human blood. *Scientific reports*, 8, 3410-3410.
- CHAURET, N., TREMBLAY, N., LACKMAN, R. L., GAUTHIER, J. Y., SILVA, J. M., MAROIS, J., YERGEY, J. A. & NICOLL-GRIFFITH, D. A. 1999. Description of a 96-well plate assay to measure cytochrome P4503A inhibition in human liver microsomes using a selective fluorescent probe. *Anal Biochem*, 276, 215-26.
- CHONG, G., KUO, F.-W., TSAI, S. & LIN, C. 2017. Validation of reference genes for cryopreservation studies with the gorgonian coral endosymbiont Symbiodinium. *Scientific reports*, 7, 39396-39396.
- CHUA, S. L., SEE TOO, W. C., KHOO, B. Y. & FEW, L. L. 2011. UBC and YWHAZ as suitable reference genes for accurate normalisation of gene expression using MCF7, HCT116 and HepG2 cell lines. *Cytotechnology*, 63, 645-654.
- CICCHINI, C., FILIPPINI, D., COEN, S., MARCHETTI, A., CAVALLARI, C., LAUDADIO, I., SPAGNOLI, F. M., ALONZI, T. & TRIPODI, M. 2006. Snail controls differentiation of hepatocytes by repressing HNF4alpha expression. *J Cell Physiol*, 209, 230-8.
- CICINNATI, V. R., SHEN, Q., SOTIROPOULOS, G. C., RADTKE, A., GERKEN, G. & BECKEBAUM, S. 2008. Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. *BMC Cancer*, 8, 350.
- COSTA, C., GIMENEZ-CAPITAN, A., KARACHALIOU, N. & ROSELL, R. 2013. Comprehensive molecular screening: from the RT-PCR to the RNA-seq. *Transl Lung Cancer Res*, 2, 87-91.
- CUI, H.-M., ZHANG, Q.-Y., WANG, J.-L., CHEN, J.-L., ZHANG, Y.-L. & TONG, X.-L. 2014. *In vitro* studies of berberine metabolism and its effect of enzyme induction on HepG2 cells.
- CUI, Y., LIU, F., LI, X., WANG, L., WANG, H., CHEN, G., YUAN, L., BRASH, J. L. & CHEN, H. 2015. Improvement in the Thermal Stability of Pyrophosphatase by Conjugation to Poly(N-isopropylacrylamide): Application to the Polymerase Chain Reaction. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7, 21913-21918.
- DANNENBERG, L. O. & EDENBERG, H. J. 2006. Epigenetics of gene expression in human hepatoma cells: expression profiling the response to inhibition of DNA methylation and histone deacetylation. *BMC Genomics*, 7, 181.
- DESJARDINS, P. & CONKLIN, D. 2010. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 2565.
- DHEDA, K., HUGGETT, J. F., CHANG, J. S., KIM, L. U., BUSTIN, S. A., JOHNSON, M. A., ROOK, G. A. & ZUMLA, A. 2005. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem*, 344, 141-3.
- DI, L., FU, Y., SUN, Y., LI, J., LIU, L., YAO, J., WANG, G., WU, Y., LAO, K., LEE, R. W., ZHENG, G., XU, J., OH, J., WANG, D., XIE, X. S., HUANG, Y. &

- WANG, J. 2020. RNA sequencing by direct tagmentation of RNA/DNA hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117, 2886-2893.
- DONATO, M. T., JIMENEZ, N., CASTELL, J. V. & GOMEZ-LECHON, M. J. 2004. Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab Dispos*, 32, 699-706.
- DONATO, M. T., LAHOZ, A., CASTELL, J. V. & GOMEZ-LECHON, M. J. 2008. Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Curr Drug Metab*, 9, 1-11.
- DONATO, M. T., TOLOSA, L. & GOMEZ-LECHON, M. J. 2015. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods Mol Biol*, 1250, 77-93.
- DONG, C., WU, Y., YAO, J., WANG, Y., YU, Y., RYCHAHOU, P. G., EVERS, B. M. & ZHOU, B. P. 2012. G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer. *J Clin Invest*, 122, 1469-86.
- DOOSTDAR, H., DUTHIE, S. J., BURKE, M. D., MELVIN, W. T. & GRANT, M. H. 1988. The influence of culture medium composition on drug metabolising enzyme activities of the human liver derived Hep G2 cell line. *FEBS Lett*, 241, 15-8.
- ECKERT, K. A. & KUNKEL, T. A. 1991. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR Methods Appl*, 1, 17-24.
- ETOH, K. 2008. Evaluation of a Real-Time PCR Assay for the Diagnosis of Pneumocystis pneumonia. *The Kurume medical journal*, 55, 55-62.
- EWART, L., DEHNE, E. M., FABRE, K., GIBBS, S., HICKMAN, J., HORNBERG, E., INGELMAN-SUNDBERG, M., JANG, K. J., JONES, D. R., LAUSCHKE, V. M., MARX, U., METTETAL, J. T., POINTON, A., WILLIAMS, D., ZIMMERMANN, W. H. & NEWHAM, P. 2018. Application of Microphysiological Systems to Enhance Safety Assessment in Drug Discovery. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 58, 65-82.
- FILIPP, F. V. 2017. Crosstalk between epigenetics and metabolism-Yin and Yang of histone demethylases and methyltransferases in cancer. *Brief Funct Genomics*, 16, 320-325.
- FOROOTAN, A., SJOBACK, R., BJORKMAN, J., SJOGREEN, B., LINZ, L. & KUBISTA, M. 2017. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol Detect Quantif*, 12, 1-6.
- FREEMAN, W. M., WALKER, S. J. & VRANA, K. E. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*, 26, 112-22, 124-5.
- FREESE, K., SEITZ, T., DIETRICH, P., LEE, S. M. L., THASLER, W. E., BOSSERHOFF, A. & HELLERBRAND, C. 2019. Histone Deacetylase Expressions in Hepatocellular Carcinoma and Functional Effects of Histone Deacetylase Inhibitors on Liver Cancer Cells In Vitro. *Cancers*, 11, 1587.
- GAASTRA, W. 1984. Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA). In: WALKER, J. M. (ed.) *Proteins*. Totowa, NJ: Humana Press.
- GARIBYAN, L. & AVASHIA, N. 2013. Polymerase chain reaction. *The Journal of investigative dermatology*, 133, 1-4.

- GASKELL, H., SHARMA, P., COLLEY, H. E., MURDOCH, C., WILLIAMS, D. P. & WEBB, S. D. 2016. Characterization of a functional C3A liver spheroid model. *Toxicology research*, 5, 1053-1065.
- GEBHARDT, R. 1992. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther*, 53, 275-354.
- GERETS, H. H. J., TILMANT, K., GERIN, B., CHANTEUX, H., DEPELCHIN, B. O., DHALLUIN, S. & ATIENZAR, F. A. 2012. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell biology and toxicology*, 28, 69-87.
- GIBBS, J. 2011. Selecting the Detection System - Colorimetric, Fluorescent, Luminescent Methods. *In: SCIENCES*, C. I. L. (ed.).
- GIGLIO, S., MONIS, P. T. & SAINT, C. P. 2003. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Research*, 31, e136-e136.
- GODOY, P., HEWITT, N. J., ALBRECHT, U., ANDERSEN, M. E., ANSARI, N., BHATTACHARYA, S., BODE, J. G., BOLLEYN, J., BORNER, C., BÖTTGER, J., BRAEUNING, A., BUDINSKY, R. A., BURKHARDT, B., CAMERON, N. R., CAMUSSI, G., CHO, C. S., CHOI, Y. J., CRAIG ROWLANDS, J., DAHMEN, U., DAMM, G., DIRSCH, O., DONATO, M. T., DONG, J., DOOLEY, S., DRASDO, D., EAKINS, R., FERREIRA, K. S., FONSAO, V., FRACZEK, J., GEBHARDT, R., GIBSON, A., GLANEMANN, M., GOLDRING, C. E. P., GÓMEZ-LECHÓN, M. J., GROOTHUIS, G. M. M., GUSTAVSSON, L., GUYOT, C., HALLIFAX, D., HAMMAD, S., HAYWARD, A., HÄUSSINGER, D., HELLERBRAND, C., HEWITT, P., HOEHME, S., HOLZHÜTTER, H. G., HOUSTON, J. B., HRACH, J., ITO, K., JAESCHKE, H., KEITEL, V., KELM, J. M., KEVIN PARK, B., KORDES, C., KULLAK-UBLUCK, G. A., LECLUYSE, E. L., LU, P., LUEBKE-WHEELER, J., LUTZ, A., MALTMAN, D. J., MATZ-SOJA, M., MCMULLEN, P., MERFORT, I., MESSNER, S., MEYER, C., MWINYI, J., NAISBITT, D. J., NUSSLER, A. K., OLINGA, P., PAMPALONI, F., PI, J., PLUTA, L., PRZYBORSKI, S. A., RAMACHANDRAN, A., ROGIERS, V., ROWE, C., SCHELCHER, C., SCHMICH, K., SCHWARZ, M., SINGH, B., STELZER, E. H. K., STIEGER, B., STÖBER, R., SUGIYAMA, Y., TETTA, C., THASLER, W. E., VANHAECKE, T., VINKEN, M., WEISS, T. S., WIDERA, A., WOODS, C. G., XU, J. J., YARBOROUGH, K. M. & HENGSTLER, J. G. 2013. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol*, 87, 1315-530.
- GOMEZ-LECHON, M. J., CASTELL, J. V. & DONATO, M. T. 2008. An update on metabolism studies using human hepatocytes in primary culture. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 4, 837-54.
- GONZALEZ, F. J. 2008. Regulation of Hepatocyte Nuclear Factor 4 α -mediated Transcription. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 23, 2-7.
- GOU, Q., HE, S. & ZHOU, Z. 2017. Protein arginine N-methyltransferase 1 promotes the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *Tumour Biol*, 39, 1010428317691419.

- GUDNASON, H., DUFVA, M., BANG, D. D. & WOLFF, A. 2007. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic acids research*, 35, e127-e127.
- GUENGERICH, F. P. 2008. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol*, 21, 70-83.
- GUILLOUZO, A. & GUGUEN-GUILLOUZO, C. 2008. Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 4, 1279-94.
- HADDAD, F. & BALDWIN, K. M. 2010. Reverse transcription of the ribonucleic acid: the first step in RT-PCR assay. *Methods Mol Biol*, 630, 261-70.
- HAINES, A. M., TOBE, S. S., KOBUS, H. J. & LINACRE, A. 2015. Properties of nucleic acid staining dyes used in gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 36, 941-4.
- HALL, A. C. 2020. A comparison of DNA stains and staining methods for Agarose Gel Electrophoresis. *bioRxiv*, 568253.
- HARRIS, T. K. & KESHWANI, M. M. 2009. Chapter 7 Measurement of Enzyme Activity. In: BURGESS, R. R. & DEUTSCHER, M. P. (eds.) *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J. & WILLIAMS, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6, 986-94.
- HELLER, R. C., CHUNG, S., CRISSY, K., DUMAS, K., SCHUSTER, D. & SCHOENFELD, T. W. 2019. Engineering of a thermostable viral polymerase using metagenome-derived diversity for highly sensitive and specific RT-PCR. *Nucleic acids research*, 47, 3619-3630.
- HODKINSON, B. P. & GRICE, E. A. 2015. Next-Generation Sequencing: A Review of Technologies and Tools for Wound Microbiome Research. *Advances in wound care*, 4, 50-58.
- HORIEN, C. & YUAN, P. 2017. Drug Development. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 90, 1-3.
- HUANG, Q., BAUM, L. & FU, W.-L. 2010. Simple and Practical Staining of DNA with GelRed in Agarose Gel Electrophoresis. *Clinical laboratory*, 56, 149-52.
- HUANG, Q. & FU, W. L. 2005. Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gel electrophoresis. *Clin Chem Lab Med*, 43, 841-2.
- J.F, S. & RUSSELL, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-Volume Set)*.
- JACKSON, J. P., LI, L., CHAMBERLAIN, E. D., WANG, H. & FERGUSON, S. S. 2016. Contextualizing Hepatocyte Functionality of Cryopreserved HepaRG Cell Cultures. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 44, 1463-1479.
- JAESCHKE, H., XIE, Y. & MCGILL, M. R. 2014. Acetaminophen-induced Liver Injury: from Animal Models to Humans. *Journal of clinical and translational hepatology*, 2, 153-161.
- JEAN, G., KAHLES, A., SREEDHARAN, V. T., DE BONA, F. & RATSCH, G. 2010. RNA-Seq read alignments with PALMapper. *Curr Protoc Bioinformatics*, Chapter 11, Unit 11.6.

- JENNEN, D. G., MAGKOUFOPOULOU, C., KETELSLEGGERS, H. B., VAN HERWIJNEN, M. H., KLEINJANS, J. C. & VAN DELFT, J. H. 2010. Comparison of HepG2 and HepaRG by whole-genome gene expression analysis for the purpose of chemical hazard identification. *Toxicol Sci*, 115, 66-79.
- JOVER, R., BORT, R., GOMEZ-LECHON, M. J. & CASTELL, J. V. 1998. Re-expression of C/EBP alpha induces CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genes in HepG2 cells. *FEBS Lett*, 431, 227-30.
- JOVER, R., BORT, R., GOMEZ-LECHON, M. J. & CASTELL, J. V. 2001. Cytochrome P450 regulation by hepatocyte nuclear factor 4 in human hepatocytes: a study using adenovirus-mediated antisense targeting. *Hepatology*, 33, 668-75.
- JUVONEN, R. O., AHINKO, M., HUUSKONEN, J., RAUNIO, H. & PENTIKAINEN, O. T. 2018. Development of new Coumarin-based profluorescent substrates for human cytochrome P450 enzymes. *Xenobiotica*, 1-10.
- KAINZ, P. 2000. The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta*, 1494, 23-7.
- KAMBLI, P. & KELKAR-MANE, V. 2016. Nanosized Fe₃O₄ an efficient PCR yield enhancer-Comparative study with Au, Ag nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 141, 546-552.
- KAMMERER, S. & KÜPPER, J.-H. 2018. Human hepatocyte systems for in vitro toxicology analysis. *Journal of Cellular Biotechnology*, 3, 85-93.
- KANEBRATT, K. P. & ANDERSSON, T. B. 2008. Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab Dispos*, 36, 1444-52.
- KARP, A., ISAAC, P. G. & INGRAM, D. S. 1998. *Isolation of Nucleic Acids Using Silica-Gel Based Membranes: Methods Based on the Use of QIAamp Spin Columns*.
- KARPIEVITCH, Y. V., POLPITIYA, A. D., ANDERSON, G. A., SMITH, R. D. & DABNEY, A. R. 2010. Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Based Proteomics: Biological and Technological Aspects. *The annals of applied statistics*, 4, 1797-1823.
- KHOURY, M. K., PARKER, I. & ASWAD, D. W. 2010. Acquisition of chemiluminescent signals from immunoblots with a digital single-lens reflex camera. *Analytical biochemistry*, 397, 129-131.
- KIM, B. 2017. Western Blot Techniques. *Methods Mol Biol*, 1606, 133-139.
- KIM, T. K. & EBERWINE, J. H. 2010. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*, 397, 3173-8.
- KIM, Y. H., BAE, Y. J., KIM, H. S., CHA, H. J., YUN, J. S., SHIN, J. S., SEONG, W. K., LEE, Y. M. & HAN, K. M. 2015. Measurement of Human Cytochrome P450 Enzyme Induction Based on Mesalazine and Mosapride Citrate Treatments Using a Luminescent Assay. *Biomol Ther (Seoul)*, 23, 486-92.
- KINOSHITA, T. & MIYAJIMA, A. 2002. Cytokine regulation of liver development. *Biochim Biophys Acta*, 1592, 303-12.
- KLEINE, M., RIEMER, M., KRECH, T., DETEMPLE, D., JÄGER, M. D., LEHNER, F., MANNS, M. P., KLEMPNAUER, J., BORLAK, J., BEKTAS, H. &

- VONDRAN, F. W. R. 2014. Explanted Diseased Livers – A Possible Source of Metabolic Competent Primary Human Hepatocytes. *PLoS One*, 9.
- KNOBELOCH, D., EHNERT, S., SCHYSCHKA, L., BUCHLER, P., SCHOENBERG, M., KLEEFF, J., THASLER, W. E., NUSSLER, N. C., GODOY, P., HENGSTLER, J. & NUSSLER, A. K. 2012. Human hepatocytes: isolation, culture, and quality procedures. *Methods Mol Biol*, 806, 99-120.
- KOCHAT, V., EQUBAL, Z., BALIGAR, P., KUMAR, V., SRIVASTAVA, M. & MUKHOPADHYAY, A. 2017. JMJD3 aids in reprogramming of bone marrow progenitor cells to hepatic phenotype through epigenetic activation of hepatic transcription factors. *PLoS One*, 12, e0173977.
- KORFMACHER, W. A. 2005. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discov Today*, 10, 1357-67.
- KOYAMA, S., ARAKAWA, H., ITOH, M., MASUDA, N., YANO, K., KOJIMA, H. & OGIHARA, T. 2018. Evaluation of the metabolic capability of primary human hepatocytes in three-dimensional cultures on microstructural plates. *Biopharm Drug Dispos*.
- KRALIK, P. & RICCHI, M. 2017. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in microbiology*, 8, 108-108.
- KUANG, J., YAN, X., GENDERS, A. J., GRANATA, C. & BISHOP, D. J. 2018. An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PloS one*, 13, e0196438-e0196438.
- KUKURBA, K. R. & MONTGOMERY, S. B. 2015. RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harbor protocols*, 2015, 951-969.
- KVIST, A. J., KANEBRATT, K. P., VALENTINSSON, A., PALMGREN, H., O'HARA, M., BJORKBOM, A., ANDERSSON, L. C., AHLQVIST, M. & ANDERSSON, T. B. 2018. Critical differences in drug metabolic properties of human hepatic cellular models, including primary human hepatocytes, stem cell derived hepatocytes, and hepatoma cell lines. *Biochem Pharmacol*, 155, 124-140.
- LEE, M. K. & KIM, H. R. 2006. [Comparison between Real-Time PCR and Agarose Gel Electrophoresis for DNA Quantification.]. *Korean J Lab Med*, 26, 217-22.
- LEE, P. Y., COSTUMBRADO, J., HSU, C.-Y. & KIM, Y. H. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 3923.
- LER, S. Y., LEUNG, C. H. W., KHIN, L. W., LU, G.-D., SALTO-TELLEZ, M., HARTMAN, M., IAU, P. T. C., YAP, C. T. & HOOI, S. C. 2015. HDAC1 and HDAC2 independently predict mortality in hepatocellular carcinoma by a competing risk regression model in a Southeast Asian population. *Oncology reports*, 34, 2238-2250.
- LIEBEL, S., DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., DE MAGALHAES, V. F., DA SILVA RDE, C., ROSSI, S. C., RANDI, M. A. & FILIPAK NETO, F. 2015. Low concentrations of cylindrospermopsin induce increases of reactive oxygen

- species levels, metabolism and proliferation in human hepatoma cells (HepG2). *Toxicol In Vitro*, 29, 479-88.
- LIN, C., YING, F., LAI, Y., LI, X., XUE, X., ZHOU, T. & HU, D. 2019. Use of nested PCR for the detection of trichomonads in bronchoalveolar lavage fluid. *BMC infectious diseases*, 19, 512-512.
- LIN, J., SCHYSCHKA, L., MUHL-BENNINGHAUS, R., NEUMANN, J., HAO, L., NUSSLER, N., DOOLEY, S., LIU, L., STOCKLE, U., NUSSLER, A. K. & EHNERT, S. 2012. 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*, 86, 87-95.
- LINDROS, K. O. 1997. Zonation of cytochrome P450 expression, drug metabolism and toxicity in liver. *Gen Pharmacol*, 28, 191-6.
- LORENZ, T. C. 2012. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e3998-e3998.
- LOU, Y.-J. & LIANG, X.-G. 2011. Embryonic stem cell application in drug discovery. *Acta pharmacologica Sinica*, 32, 152-159.
- LOUPAKIS, F., CREMOLINI, C., FONTANINI, G., STASI, I., SALVATORE, L. & FALCONE, A. 2009. Beyond KRAS: perspectives on new potential markers of intrinsic and acquired resistance to epidermal growth factor receptor inhibitors in metastatic colorectal cancer. *Therapeutic advances in medical oncology*, 1, 167-181.
- LUBBERSTEDT, M., MULLER-VIEIRA, U., MAYER, M., BIEMEL, K. M., KNOSPEL, F., KNOBELOCH, D., NUSSLER, A. K., GERLACH, J. C. & ZEILINGER, K. 2011. HepaRG human hepatic cell line utility as a surrogate for primary human hepatocytes in drug metabolism assessment in vitro. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 63, 59-68.
- MADER, E., LUKAS, B. & NOVAK, J. 2008. A strategy to setup codominant microsatellite analysis for high-resolution-melting-curve-analysis (HRM). *BMC genetics*, 9, 69-69.
- MAHMOOD, T. & YANG, P.-C. 2012. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4, 429-434.
- MAO, F., LEUNG, W.-Y. & XIN, X. 2007. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC biotechnology*, 7, 76-76.
- MARYATI, M., KAUR, I., JADHAV, G. P., OLOTU-UMOREN, L., OVEH, B., HASHMI, L., FISCHER, P. M. & WINKLER, G. S. 2014. A fluorescence-based assay suitable for quantitative analysis of deadenylase enzyme activity. *Nucleic acids research*, 42, e30-e30.
- MICHAELS, S. & WANG, M. Z. 2014. The revised human liver cytochrome P450 "Pie": absolute protein quantification of CYP4F and CYP3A enzymes using targeted quantitative proteomics. *Drug Metab Dispos*, 42, 1241-51.
- MICHALOPOULOS, G. & PITOT, H. C. 1975. Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Morphological and biochemical observations. *Exp Cell Res*, 94, 70-8.
- MILLER, S. E., TAILLON-MILLER, P. & KWOK, P. Y. 1999. Cost-effective staining of DNA with SYBR green in preparative agarose gel electrophoresis. *Biotechniques*, 27, 34-6.

- MO, Y., WAN, R. & ZHANG, Q. 2012. Application of reverse transcription-PCR and real-time PCR in nanotoxicity research. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 926, 99-112.
- MOHSEN, M. G., JI, D. & KOOL, E. T. 2019. Polymerase synthesis of four-base DNA from two stable dimeric nucleotides. *Nucleic acids research*, 47, 9495-9501.
- MÜLHARDT, C. 2013. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics, Vol. 7, Spektrum Akademischer Verlag, DOI:10.1007, ISBN:978-3-642-34636-1.*
- MÜLLER-TERPITZ, R. 2006. *Stammzellgesetz. Das Recht der Biomedizin: Textsammlung mit Einführung:327-32.*
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-73.
- MULLIS, K. B. 1991. The polymerase chain reaction in an anemic mode: how to avoid cold oligodeoxyribonuclear fusion. *PCR Methods Appl*, 1, 1-4.
- MUYAL, J., MUYAL, V., KAISTHA, B., SEIFART, C. & FEHRENBACH, H. 2009. Systematic comparison of RNA extraction techniques from frozen and fresh lung tissues: Checkpoint towards gene expression studies. *Diagnostic pathology*, 4, 9.
- NAKABAYASHI, H., TAKETA, K., MIYANO, K., YAMANE, T. & SATO, J. 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res*, 42, 3858-63.
- NAKANO, M., DING, Z. & SUEHIRO, J. 2017. Comparison of Sensitivity and Quantitation between Microbead Dielectrophoresis-Based DNA Detection and Real-Time PCR. *Biosensors*, 7, 44.
- NIKITINA, T. V., NAZAROVA, N., TISHCHENKO, L. I., TUOHIMAA, P. & SEDOVA, V. M. 2003. [Use of the real-time RT-PCR method for investigation of small stable RNA expression level in human epidermoid carcinoma cells A431]. *Tsitologija*, 45, 392-402.
- NIKOLAOU, N., GREEN, C. J., GUNN, P. J., HODSON, L. & TOMLINSON, J. W. 2016. Optimizing human hepatocyte models for metabolic phenotype and function: effects of treatment with dimethyl sulfoxide (DMSO). *Physiological reports*, 4, e12944.
- NOLAN, T., HANDS, R. E. & BUSTIN, S. A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1, 1559.
- OLSAVSKY, K. M., PAGE, J. L., JOHNSON, M. C., ZARBL, H., STROM, S. C. & OMIECINSKI, C. J. 2007. Gene expression profiling and differentiation assessment in primary human hepatocyte cultures, established hepatoma cell lines, and human liver tissues. *Toxicology and applied pharmacology*, 222, 42-56.
- OSTAPOWICZ, G., FONTANA, R. J., SCHIØDT, F. V. & ET AL. 2002. REsults of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the united states. *Annals of Internal Medicine*, 137, 947-954.
- ØSTER, B. & HÖLLSBERG, P. 2002. A Sensitive Quantification of HHV-6B by Real-time PCR. *Biological procedures online*, 4, 88-93.
- OVERBERGH, L., GIULIETTI, A., VALCKX, D., DECALLONNE, R., BOUILLON, R. & MATHIEU, C. 2003. The use of real-time reverse transcriptase PCR

- for the quantification of cytokine gene expression. *Journal of biomolecular techniques : JBT*, 14, 33-43.
- OZSOLAK, F. & MILOS, P. M. 2011. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature reviews. Genetics*, 12, 87-98.
- PARK, H. J., CHOI, Y. J., KIM, J. W., CHUN, H. S., IM, I., YOON, S., HAN, Y. M., SONG, C. W. & KIM, H. 2015. Differences in the Epigenetic Regulation of Cytochrome P450 Genes between Human Embryonic Stem Cell-Derived Hepatocytes and Primary Hepatocytes. *PLoS One*, 10, e0132992.
- PATHIL, A., ARMEANU, S., VENTURELLI, S., MASCAGNI, P., WEISS, T. S., GREGOR, M., LAUER, U. M. & BITZER, M. 2006. HDAC inhibitor treatment of hepatoma cells induces both TRAIL-independent apoptosis and restoration of sensitivity to TRAIL. *Hepatology*, 43, 425-34.
- PAULSEN, W. 2017. *Sobotta, Atlas der Anatomie*.
- PEIXOTO, A., MONTEIRO, M., ROCHA, B. & VEIGA-FERNANDES, H. 2004. Quantification of multiple gene expression in individual cells. *Genome research*, 14, 1938-1947.
- PFAFFL, M., MEYER, H. H. & SAUERWEIN, H. 1998. Quantification of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) mRNA: development and validation of an internally standardised competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 106, 506-13.
- PILLAI, V. C., STROM, S. C., CARITIS, S. N. & VENKATARAMANAN, R. 2013. A sensitive and specific CYP cocktail assay for the simultaneous assessment of human cytochrome P450 activities in primary cultures of human hepatocytes using LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*, 74, 126-32.
- PITT, J. J. 2009. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical biochemist. Reviews*, 30, 19-34.
- PLEASANCE, E. D., MARRA, M. A. & JONES, S. J. M. 2003. Assessment of SAGE in transcript identification. *Genome research*, 13, 1203-1215.
- PRYOR, R. J. & WITTEWER, C. T. 2006. Real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Methods Mol Biol*, 336, 19-32.
- QIHAO, Z., XIGU, C., GUANGHUI, C. & WEIWEI, Z. 2007. Spheroid formation and differentiation into hepatocyte-like cells of rat mesenchymal stem cell induced by co-culture with liver cells. *DNA Cell Biol*, 26, 497-503.
- RAJAGOPAL, A., YURK, D., SHIN, C., MENGE, K., JACKY, L., FRASER, S., TOMBRELLO, T. A. & TSONGALIS, G. J. 2019. Significant Expansion of Real-Time PCR Multiplexing with Traditional Chemistries using Amplitude Modulation. *Scientific Reports*, 9, 1053.
- RAJEEVAN, M. S., RANAMUKHAARACHCHI, D. G., VERNON, S. D. & UNGER, E. R. 2001. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods*, 25, 443-51.
- RAJMAN, I., KNAPP, L., MORGAN, T. & MASIMIREMBWA, C. 2017. African Genetic Diversity: Implications for Cytochrome P450-mediated Drug Metabolism and Drug Development. *EBioMedicine*, 17, 67-74.
- RAMAKERS, C., RUIJTER, J. M., DEPREZ, R. H. & MOORMAN, A. F. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*, 339, 62-6.

- RAMSDEN, D., TWEEDIE, D. J., CHAN, T. S. & TRACY, T. S. 2014. Altered CYP2C9 activity following modulation of CYP3A4 levels in human hepatocytes: an example of protein-protein interactions. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 42, 1940-1946.
- RASHEED, A., KAFIFY, R., FARIS, W. & SALLEH, H. 2011. Enhancement of Polymerase Chain Reaction using Graphene Nano-flakes. *Proceedings of the 2nd International Conference on Biotechnology Engineering ICBioE'11*,. Kuala Lumpur, Malaysia.
- REYNOLDS, B., MILLER, R., WILLIAMS, J. G. & ANDERSON, J. P. 2008. Synthesis and stability of novel terminal phosphate-labeled nucleotides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 27, 18-30.
- RIO, D. C. 2014. Reverse transcription-polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Protoc*, 2014, 1207-16.
- RIO, D. C., ARES, M., JR., HANNON, G. J. & NILSEN, T. W. 2010. Nondenaturing agarose gel electrophoresis of RNA. *Cold Spring Harb Protoc*, 2010, pdb prot5445.
- ROBINSON, P. K. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, 59, 1-41.
- RODRIGUES, A. D. & LIN, J. H. 2001. Screening of drug candidates for their drug--drug interaction potential. *Curr Opin Chem Biol*, 5, 396-401.
- RODRIGUEZ-ANTONA, C., DONATO, M. T., BOOBIS, A., EDWARDS, R. J., WATTS, P. S., CASTELL, J. V. & GOMEZ-LECHON, M. J. 2002. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica*, 32, 505-20.
- ROUX, K. H. 2009. Optimization and troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harb Protoc*, 2009, pdb ip66.
- RUOS, M., DAMM, G., VOSOUGH, M., EHRET, L., GROM-BAUMGARTEN, C., PETKOV, M., NADDALIN, S., LADURNER, R., SEEHOFER, D., NUSSLER, A. & SAJADIAN, S. 2019. Epigenetic Modifications of the Liver Tumor Cell Line HepG2 Increase Their Drug Metabolic Capacity. *International journal of molecular sciences*, 20, 347.
- RUOS, M., VOSOUGH, M., KONIGSRAINER, A., NADALIN, S., WAGNER, S., SAJADIAN, S., HUBER, D., HEYDARI, Z., EHNERT, S., HENGSTLER, J. G. & NUSSLER, A. K. 2020. Towards improved hepatocyte cultures: Progress and limitations. *Food Chem Toxicol*, 138, 111188.
- RYCHLIK, W., SPENCER, W. J. & RHOADS, R. E. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res*, 18, 6409-12.
- SADLER, N. C., NANDHIKONDA, P., WEBB-ROBERTSON, B. J., ANSONG, C., ANDERSON, L. N., SMITH, J. N., CORLEY, R. A. & WRIGHT, A. T. 2016. Hepatic Cytochrome P450 Activity, Abundance, and Expression Throughout Human Development. *Drug Metab Dispos*, 44, 984-91.
- SAJADIAN, S. O., TRIPURA, C., SAMANI, F. S., RUOSS, M., DOOLEY, S., BAHARVAND, H. & NUSSLER, A. K. 2016. Vitamin C enhances epigenetic modifications induced by 5-azacytidine and cell cycle arrest in the hepatocellular carcinoma cell lines HLE and Huh7. *Clinical Epigenetics*, 8, 46.

- SANDERS, R., MASON, D. J., FOY, C. A. & HUGGETT, J. F. 2014. Considerations for accurate gene expression measurement by reverse transcription quantitative PCR when analysing clinical samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406, 6471-6483.
- SCHOENBRUNNER, N. J., GUPTA, A. P., YOUNG, K. K. Y. & WILL, S. G. 2017. Covalent modification of primers improves PCR amplification specificity and yield. *Biology Methods and Protocols*, 2.
- SCHULZ, K., MILKE, L., RUBSAMEN, D., MENRAD, H., SCHMID, T. & BRUNE, B. 2012. HIF-1alpha protein is upregulated in HIF-2alpha depleted cells via enhanced translation. *FEBS Lett*, 586, 1652-7.
- SEELIGER, C., CULMES, M., SCHYSCHKA, L., YAN, X., DAMM, G., WANG, Z., KLEEFF, J., THASLER, W. E., HENGSTLER, J., STOCKLE, U., EHNERT, S. & NUSSLER, A. K. 2013. Decrease of global methylation improves significantly hepatic differentiation of Ad-MSCs: possible future application for urea detoxification. *Cell Transplant*, 22, 119-31.
- SERRANO-GOMEZ, S. J., MAZIVEYI, M. & ALAHARI, S. K. 2016. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Molecular Cancer*, 15, 18.
- SHANKS, N., GREEK, R. & GREEK, J. 2009. Are animal models predictive for humans? *Philos Ethics Humanit Med*, 4, 2.
- SHIAO, Y. H. 2003. A new reverse transcription-polymerase chain reaction method for accurate quantification. *BMC Biotechnol*, 3, 22.
- SHOU, M., GONZALEZ, F. J. & GELBOIN, H. V. 1996. Stereoselective epoxidation and hydration at the K-region of polycyclic aromatic hydrocarbons by cDNA-expressed cytochromes P450 1A1, 1A2, and epoxide hydrolase. *Biochemistry*, 35, 15807-13.
- SIMONS, K. & FULLER, S. D. 1985. Cell surface polarity in epithelia. *Annu Rev Cell Biol*, 1, 243-88.
- SINGH, S., RAWAT, S. & OKESH, C. 2014. Real Time And Traditional Polymerase Chain Reaction: A Comparative Study. *International Journal of Technology Enhancements and Emerging Engineering Research*, 2.
- SINGHAL, N., KUMAR, M., KANAUIA, P. K. & VIRDI, J. S. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology*, 6, 791-791.
- SMITH, C. J. & OSBORN, A. M. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*, 67, 6-20.
- SNYKERS, S., HENKENS, T., DE ROP, E., VINKEN, M., FRACZEK, J., DE KOCK, J., DE PRINS, E., GEERTS, A., ROGIERS, V. & VANHAECKE, T. 2009. Role of epigenetics in liver-specific gene transcription, hepatocyte differentiation and stem cell reprogramming. *J Hepatol*, 51, 187-211.
- SONMEZOGLU, O. A. & OZKAY, K. 2015. A New Organic Dye-Based Staining for The Detection of Plant DNA in Agarose Gels. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 34, 515-22.
- STEIN, L. D. 2001. Genetic analyses on DNA microarrays. *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 11, Unit 11.1.
- STEINBRECHT, S., KAMMERER, S. & KÜPPER, J. H. 2019. HepG2 cells with recombinant cytochrome P450 enzyme overexpression: Their use and

- limitation as in vitro liver model. *Journal of Cellular Biotechnology*, 5, 55-64.
- STRESSER, D. M., BLANCHARD, A. P., TURNER, S. D., ERVE, J. C., DANDENEAU, A. A., MILLER, V. P. & CRESPI, C. L. 2000. Substrate-dependent modulation of CYP3A4 catalytic activity: analysis of 27 test compounds with four fluorometric substrates. *Drug Metab Dispos*, 28, 1440-8.
- STROBER, W. 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*, Appendix 3, Appendix 3B.
- SUSPÈNE, R., RENARD, M., HENRY, M., GUÉTARD, D., PUYRAIMOND-ZEMMOUR, D., BILLECOCQ, A., BOULOY, M., TANGY, F., VARTANIAN, J. P. & WAIN-HOBSON, S. 2008. Inverting the natural hydrogen bonding rule to selectively amplify GC-rich ADAR-edited RNAs. *Nucleic Acids Res*, 36, e72.
- SUZUKI, M. T. & GIOVANNONI, S. J. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol*, 62, 625-30.
- TAN, S. C. & YIAP, B. C. 2009. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol*, 2009, 574398.
- TANG, H. M., KUAY, K. T., KOH, P. F., ASAD, M., TAN, T. Z., CHUNG, V. Y., LEE, S. C., THIERY, J. P. & HUANG, R.-J. 2016. An epithelial marker promoter induction screen identifies histone deacetylase inhibitors to restore epithelial differentiation and abolishes anchorage independence growth in cancers. *Cell Death Discovery*, 2, 16041.
- TARCA, A. L., ROMERO, R. & DRAGHICI, S. 2006. Analysis of microarray experiments of gene expression profiling. *Am J Obstet Gynecol*, 195, 373-88.
- THIERY, J. P., ACLOQUE, H., HUANG, R. Y. & NIETO, M. A. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139, 871-90.
- TOLOSA, L., JIMÉNEZ, N., PÉREZ, G., CASTELL, J. V., GÓMEZ-LECHÓN, M. J. & DONATO, M. T. 2018. Customised in vitro model to detect human metabolism-dependent idiosyncratic drug-induced liver injury. *Archives of toxicology*, 92, 383-399.
- TONI, L. S., GARCIA, A. M., JEFFREY, D. A., JIANG, X., STAUFFER, B. L., MIYAMOTO, S. D. & SUCHAROV, C. C. 2018. Optimization of phenol-chloroform RNA extraction. *MethodsX*, 5, 599-608.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.
- TYAKHT, A. V., ILINA, E. N., ALEXEEV, D. G., ISCHENKO, D. S., GORBACHEV, A. Y., SEMASHKO, T. A., LARIN, A. K., SELEZNEVA, O. V., KOSTRYUKOVA, E. S., KARALKIN, P. A., VAKHRUSHEV, I. V., KURBATOV, L. K., ARCHAKOV, A. I. & GOVORUN, V. M. 2014. RNA-Seq gene expression profiling of HepG2 cells: the influence of experimental factors and comparison with liver tissue. *BMC Genomics*, 15, 1108.

- UNG, Y. T., ONG, C. E. & PAN, Y. 2018. Current High-Throughput Approaches of Screening Modulatory Effects of Xenobiotics on Cytochrome P450 (CYP) Enzymes. *High-throughput*, 7, 29.
- UNO, K., MUROTOMI, K., KAZUKI, Y., OSHIMURA, M. & NAKAJIMA, Y. 2018. Bioluminescence-based cytotoxicity assay for simultaneous evaluation of cell viability and membrane damage in human hepatoma HepG2 cells. *Luminescence*, 33, 616-624.
- VALONES, M. A. A., GUIMARÃES, R. L., BRANDÃO, L. A. C., DE SOUZA, P. R. E., DE ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO, A. & CROVELA, S. 2009. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 40, 1-11.
- VAN DEN BOOM, D., WJST, M. & EVERTS, R. E. 2013. MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol*, 1015, 71-85.
- VAN DEN HOF, W. F., VAN SUMMEREN, A., LOMMEN, A., COONEN, M. L., BRAUERS, K., VAN HERWIJNEN, M., WODZIG, W. K. & KLEINJANS, J. C. 2014. Integrative cross-omics analysis in primary mouse hepatocytes unravels mechanisms of cyclosporin A-induced hepatotoxicity. *Toxicology*, 324, 18-26.
- VAN DER VALK, J., BRUNNER, D., DE SMET, K., FEX SVENNINGSSEN, A., HONEGGER, P., KNUDSEN, L. E., LINDL, T., NORABERG, J., PRICE, A., SCARINO, M. L. & GSTRANTHALER, G. 2010. Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro*, 24, 1053-63.
- VAN SUMMEREN, A., RENES, J., BOUWMAN, F. G., NOBEN, J. P., VAN DELFT, J. H., KLEINJANS, J. C. & MARIMAN, E. C. 2011. Proteomics investigations of drug-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. *Toxicol Sci*, 120, 109-22.
- VAN WEEMEN, B. K. & SCHUURS, A. H. 1971. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett*, 15, 232-236.
- VANZHA, E., PYLAEV, T., KHANADEEV, V., KONNOVA, S., FEDOROVA, V. & KHLEBTSOV, N. 2016. *Gold nanoparticle-assisted polymerase chain reaction: Effects of surface ligands, nanoparticle shape and material*.
- WANG, Z., GERSTEIN, M. & SNYDER, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10, 57-63.
- WATERS, D. L. & SHAPTER, F. M. 2014. The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Methods Mol Biol*, 1099, 65-75.
- WEINER, L. P. 2008. Definitions and criteria for stem cells. *Methods Mol Biol*, 438, 3-8.
- WELSCH, U. 2005. *Welsch Lehrbuch Histologie, Vol. 2, Urban & Fischer in Elsevier, ISBN: 978-3-437-42421-2,* Urban & Fischer in Elsevier.
- WILKENING, S., STAHL, F. & BADER, A. 2003. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos*, 31, 1035-42.
- WILKINSON, G. R. 2005. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med*, 352, 2211-21.
- WILLIAMS, J. A., HYLAND, R., JONES, B. C., SMITH, D. A., HURST, S., GOOSEN, T. C., PETERKIN, V., KOUP, J. R. & BALL, S. E. 2004. Drug-

- drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos*, 32, 1201-8.
- WILSON, C., SMITH, K. & SMITH, C. 2015. Recognizing false positives: Synthetic oligonucleotide controls for environmental DNA surveillance. *Methods in Ecology and Evolution*, 7.
- WOLBOLD, R., KLEIN, K., BURK, O., NUSSLER, A. K., NEUHAUS, P., EICHELBAUM, M., SCHWAB, M. & ZANGER, U. M. 2003. Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology*, 38, 978-88.
- XIAO, M., PHONG, A., LUM, K. L., GREENE, R. A., BUZBY, P. R. & KWOK, P.-Y. 2004. Role of excess inorganic pyrophosphate in primer-extension genotyping assays. *Genome research*, 14, 1749-1755.
- XIAO, Y. & GUENGERICH, F. P. 2012. Metabolomic analysis and identification of a role for the orphan human cytochrome P450 2W1 in selective oxidation of lysophospholipids. *J Lipid Res*, 53, 1610-7.
- XU, W. J., WANG, Z. X. & QIAO, Z. D. 2009. Modified PCR methods for 3' end amplification from serial analysis of gene expression (SAGE) tags. *Febs j*, 276, 2657-68.
- XUAN, J., CHEN, S., NING, B., TOLLESON, W. H. & GUO, L. 2016. Development of HepG2-derived cells expressing cytochrome P450s for assessing metabolism-associated drug-induced liver toxicity. *Chemico-biological interactions*, 255, 63-73.
- YAMAMOTO, M., WAKATSUKI, T., HADA, A. & RYO, A. 2001. Use of serial analysis of gene expression (SAGE) technology. *J Immunol Methods*, 250, 45-66.
- YAMASHITA, T., HASHIMOTO, S., KANEKO, S., NAGAI, S., TOYODA, N., SUZUKI, T., KOBAYASHI, K. & MATSUSHIMA, K. 2000. Comprehensive gene expression profile of a normal human liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 269, 110-6.
- YAMASHITA, Y., SHIMADA, M., HARIMOTO, N., RIKIMARU, T., SHIRABE, K., TANAKA, S. & SUGIMACHI, K. 2003. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell-cycle arrest/apoptosis and hepatocyte differentiation in human hepatoma cells. *Int J Cancer*, 103, 572-6.
- YUAN, J. S., REED, A., CHEN, F. & STEWART, C. N., JR. 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC bioinformatics*, 7, 85-85.
- ZEILINGER, K., FREYER, N., DAMM, G., SEEHOFER, D. & KNÖSPEL, F. 2016. Cell sources for in vitro human liver cell culture models. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 241, 1684-1698.
- ZHAI, Y., ZHANG, Z., YU, H., SU, L., YAO, G., MA, X., LI, Q., AN, X., ZHANG, S. & LI, Z. 2018. Dynamic Methylation Changes of DNA and H3K4 by RG108 Improve Epigenetic Reprogramming of Somatic Cell Nuclear Transfer Embryos in Pigs. *Cell Physiol Biochem*, 50, 1376-1397.
- ZHANG, M., LIU, Y. H., CHANG, C. S., ZHI, H., WANG, S., XU, W., SMITH, C. W. & ZHANG, H. B. 2019. Quantification of gene expression while taking into account RNA alternative splicing. *Genomics*, 111, 1517-1528.
- ZHANG, P. P., WANG, X. L., ZHAO, W., QI, B., YANG, Q., WAN, H. Y., SHUANG, Z. Y., LIU, M., LI, X., LI, S. & TANG, H. 2014. DNA methylation-

- mediated repression of miR-941 enhances lysine (K)-specific demethylase 6B expression in hepatoma cells. *J Biol Chem*, 289, 24724-35.
- ZHANG, X., LU, J., HE, B., TANG, L., LIU, X., ZHU, D., CAO, H., WANG, Y. & LI, L. 2017. A tryptophan derivative, ITE, enhances liver cell metabolic functions in vitro. *Int J Mol Med*, 39, 101-112.
- ZHANG, X. P., JIANG, Y. B., ZHONG, C. Q., MA, N., ZHANG, E. B., ZHANG, F., LI, J. J., DENG, Y. Z., WANG, K., XIE, D. & CHENG, S. Q. 2018. PRMT1 Promoted HCC Growth and Metastasis In Vitro and In Vivo via Activating the STAT3 Signalling Pathway. *Cell Physiol Biochem*, 47, 1643-1654.
- ZHOU, G.-H., LUO, G.-A., CAO, Y.-C. & ZHU, M.-S. 1999. Study on the quality of recombinant proteins using matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *World journal of gastroenterology*, 5, 235-240.

7. Erklärung um Eigenanteil der Dissertationsschrift

Diese Arbeit wurde im Siegfried-Weller-Institut (SWI) für Unfallmedizinische Forschung der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik der Eberhard Karls Universität Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Andreas Nüssler durchgeführt. Der konzeptionelle Aufbau der Versuche wurde mithilfe von Prof. Dr. Nüssler und dem Labormitarbeiter und Doktoranden Marc Ruoff besprochen und festgelegt. Sämtliche Zellversuche, Messungen, und statistischen Auswertungen der RT-PCR Daten wurden nach Einarbeitung durch Herrn Marc Ruoff durch mich, Martin Petkov, durchgeführt. Die Isolation der als Referenz genutzten Hepatozyten wurde wie beschrieben durch andere Labormitarbeiter durchgeführt. Die miteinbezogenen qPCR Daten wurden mir für Vergleichszwecke zur Verfügung gestellt und in einer Publikation unserer Arbeitsgruppe unter dem Titel „*Epigenetic Modifications of the Liver Tumor Cell Line HepG2 Increase Their Drug Metabolic Capacity*“ im *International Journal of Molecular Sciences* veröffentlicht. Im Rahmen dieser Veröffentlichung war ich beteiligt an der Zellkultivierung, RNA Isolation, cDNA Synthese und Korrektur des Manuskripts.

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen verwendet habe. Das Manuskript wurde durch Prof. Dr. Nüssler und Herrn Marc Ruoff korrigiert. Ich versichere, die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten an der Eberhard Karls Universität Tübingen beachtet zu haben. Ich erkläre außerdem, dass die hier vorliegende Dissertation in diesem und in keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht wurde und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültigen Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Tübingen, den 20.09.2020



Martin Petkov

8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Nüssler für die Bereitstellung des Themas sowie die zuverlässige fachliche Betreuung bedanken. Ohne seine kontinuierliche Unterstützung und motivierenden Worte wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Des Weiteren danke ich Herrn Marc Ruoff sehr herzlich für seine gute Einarbeitung, seine kompetente, ausdauernde Unterstützung und die vielen wertvollen Hilfestellungen, die mir während der ganzen Zeit eine große Hilfe waren.

Ebenso bedanke ich mich bei allen weiteren Mitarbeitern des Labors, die mich während meiner Zeit im Labor unterstützt haben.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Mutter für die moralische Unterstützung und Stärkung bedanken.