

Toxikoproteomics: Erste Erfahrungen in einer BMBF-Studie

Michaela Kröger¹, Jürgen Hellmann¹, Luca Toldo², Matthias Glückmann³, Bettina von Eiff¹, Kerstin Fella¹ und Peter-Jürgen Kramer¹

¹Institut für Toxikologie, Merck KGaA, D-Darmstadt, ²Abteilung Bio- und Chemoinformatik, Merck KGaA, D-Darmstadt,

³Applied Biosystems, Proteomic Support, D-Darmstadt

Zusammenfassung

Die rasante Entwicklung der Molekularen Toxikologie liefert innovative Ansätze für eine verbesserte Untersuchung zur Erkennung toxischer Wirkungen von Substanzen. Die Proteomanalyse bietet mit der 2DE/MS (2-Dimensionale Gelelektrophorese und Massenspektrometrie) sowie der SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation) einen vielversprechenden Ansatz, expositionsbedingte Veränderungen in Zellen und Geweben zu erfassen und zu klassifizieren. Der Rat Liver Foci Bioassay (RLFB) ist ein detailliert beschriebenes Modell zur Untersuchung der durch chemische Substanzen induzierten Leberkanzerogenese. Anhand dieses Modells wird in dieser Studie überprüft, ob proteinchemische Methoden der Molekularen Toxikologie zur Früherkennung toxischer und/oder kanzerogener Eigenschaften von Stoffen eingesetzt werden können. Damit verknüpft, soll eine Identifizierung und Prävalidierung von neuen hepatozellulären Biomarkern zur Erfassung und Prädiktion toxischer und kanzerogener Wirkungen von chemischen Stoffen erfolgen, um den RLFB aussagekräftiger zu machen und damit eine verbesserte Risikoabschätzung zu gewährleisten.

Die 2DE-Analyse in dieser Studie zeigt, dass deregulierte Proteine hauptsächlich anabolen und katabolen Vorgängen in der Zelle zuzuordnen sind. Darüber hinaus sind einzelne deregulierte Proteine identifiziert, die im Kanzerogeneseprozess eine Schlüsselrolle einnehmen. Ein Vergleich der differentiell exprimierten Proteine in Geweben Tumor tragender Tiere mit Geweben, die zu Beginn der Exposition mit einem Kanzerogen gewonnen wurden, lässt erkennen, dass Expressionsveränderungen zum Teil schon frühzeitig detektierbar sind (Biomarker).

Auch mit der SELDI-Methode sind mehrere differentiell exprimierte Massen bzw. Proteine, die sich davon ableiten, detektierbar. Die Spektren repräsentieren sogar spezifische Unterschiede in Geweben, die histopathologisch gleichen Endpunkten zuzuordnen sind. Mit bioinformatischen Analysen ist es schon frühzeitig möglich, einzelne diskriminierende Massenpeaks zu identifizieren, die eine Tumorbildung indizieren. Darüber hinaus lassen sich mit weiteren Clustermethoden gruppenspezifische Veränderungen abbilden bzw. diese detaillierter darstellen.

Diese Ergebnisse geben Hoffnung auf eine verbesserte Prädiktion der Toxikologie mittels proteinchemischer Marker, die in der Zukunft zu einer Verkürzung der Karzinogenitätsstudien und zur Einsparung von Versuchstieren führen kann.

Summary: Toxicoproteomics: first experiences in a BMBF-study
The rapid development of molecular toxicology is providing innovative approaches to an improved investigation and recognition of toxic substances. Proteome analysis offers, with 2DE/MS (two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry) and SELDI (surface enhanced laser desorption/ionisation), a promising discipline to classify molecular changes caused by toxic exposure. The Rat Liver Foci Bioassay (RLFB) is a detailed, well-described model for the investigation of liver carcinogenesis induced by chemical substances. Based on this model, we examined whether proteomic methods of molecular toxicology can be used for the early recognition of toxic and/or carcinogenic characteristics of toxic substances. In addition, identification and subsequent prevalidation of new hepatocellular biomarkers was performed, enabling better prediction of toxic and/or carcinogenic effects. This could lead to a more meaningful RLFB and thus to an improved risk assessment of chemicals.

2DE analysis in this study showed that deregulated proteins are assigned to mainly anabolic and catabolic metabolism pathways in the cell. Beyond this, individual proteins were identified which play a key role in the carcinogenic process. A comparison of the differentially expressed proteins in tissue from tumour-bearing animals and tissue derived from the start of the study revealed that protein expression changes (biomarkers) were already detectable shortly after exposure.

In addition, analysis by SELDI clearly showed several differentially expressed proteins and/or derived masses. The spectra represented specific differences in tissues, which could be assigned to the same histopathological endpoints. With bioinformatics analysis it was possible to identify individual discriminating mass peaks, which were indicative of tumour formation. Group specific changes can be illustrated and/or represented in more detail with further cluster analysis methods.

These results give hope for an improved prediction of hepatotoxicity and carcinogenicity by means of protein markers, which could in the future lead to a shortening of carcinogenicity studies and to a reduction in the use of experimental animals.

Keywords: molecular toxicology, toxicoproteomics, 2DE, SELDI, biomarker, predictive toxicology

Das Manuskript wurde am 19. 12. 2003 eingereicht; am 12. 2. 2004 wurde die revidierte Fassung zum Druck angenommen

1 Einleitung

Die etablierten Verfahren zur Erfassung und Bewertung toxikologischer Risiken umfassen unter anderem tierexperimentelle Untersuchungen auf kanzerogene Eigenschaften von Stoffen, die einen hohen Bedarf an Versuchstieren haben (2-Jahresstudien an Nagern). Dies ist nicht nur ein ethisches Problem; auch aufgrund des immensen zeitlichen und finanziellen Aufwandes bei der Durchführung solcher Studien besteht dringender Bedarf an Alternativmethoden, mit denen chronische Toxizität von Stoffen, einschließlich Kanzerogenität, erkannt werden kann. Auf Grund der geänderten Richtlinien zur Bewertung von Stoffen im Rahmen der neuen Chemikalienpolitik der EU (REACH-Konzept) ist dieser Bedarf noch dringlicher als bisher, da nun kurzfristig für eine Vielzahl noch nicht ausreichend charakterisierter Stoffe Daten vorzulegen sind. Diese müssten aus neu durchzuführenden Tierversuchen gewonnen werden, sofern nicht alternative Methoden zur Verfügung stehen (Combes et al., 2003). Somit ist es im Rahmen der stofflichen Risikobewertung von großem Interesse, Testsysteme zu entwickeln, welche innerhalb von kurz- bis mittelfristigen Zeiträumen eine verbesserte Prädiktion hinsichtlich eines toxischen/kanzerogenen Potenzials von Chemikalien oder aber auch Medikamenten erlauben (Elcombe et al., 2002; Moore et al., 1999).

Der *Rat Liver Foci Bioassay* (RLFB) ist eines der ersten *in vivo* Kurzzeit-Modelle zur Untersuchung der durch genotoxische Substanzen induzierten Leberkanzerogenese (Bannasch et al., 2001; Ittrich et al., 2003; Richter-Reihhelm, 1989). Hierbei wird das Auftreten präneoplastischer Herde aus veränderten Hepatozyten (*foci of altered hepatocytes*, FAH) als Indikator für die Entstehung eines Lebertumors herangezogen. Die Präneoplasien sind durch charakteristische Veränderungen des hepatozellulären Phänotyps gekennzeichnet, die mit histologischen Techniken nachweisbar sind. So sind unter den zellulären Veränderungen insbesondere die Modifikationen des Glykogengehalts festzustellen (Mayer et al., 2003). Biochemische Untersuchungen an mikrodisezierten präneoplasti-

schen Herden haben ergeben, dass diesem Gewebe Störungen der intrazellulären Signaltransduktion und des Stoffwechsels zugrunde liegen (Bannasch et al., 1982; Hiroyuki et al., 2003). Dieses Testsystem ist allerdings nur in bedingtem Umfang zur Prädiktion der Leberkanzerogenese einsetzbar; häufig führt es zu falsch negativen Ergebnissen. Insbesondere die Erkennung nicht-genotoxischer Kanzerogene erweist sich in diesen Kurzzeittests als problematisch. Auch der Einsatz zusätzlicher immunhistochemischer Untersuchungen führt in diesem Modell nicht zu Ergebnissen, die eine wirklich gesicherte Aussage bezüglich der kanzerogenen Eigenschaft eines Stoffes zulassen. Es wird deshalb zunehmend versucht, innovative Methoden in der Toxikologie einzusetzen, die auf molekularem Niveau aussagefähige Daten für eine Stoffbewertung liefern können (Groopmann et al., 1999; Merrick et al., 2003). Inwieweit diese Methoden herangezogen werden können, um zusätzliche Informationen für eine verbesserte Bewertung von Chemikalienwirkungen zu erhalten, muss geklärt werden und ist Gegenstand der vorliegenden Studie. Ob diese Methoden darüber hinaus in der Lage sind, frühzeitige molekulare Veränderungen prädiktiv für histopathologische Endpunkte wie Lebertumoren zu detektieren, soll ebenfalls in dieser Studie untersucht werden.

Es werden stetig neue molekularbiologische Methoden (sogenannte Omics-Technologien) verfügbar, die gewebsspezifische Veränderungen mit einer immer größeren Sensitivität detektieren. Unter der allgemein akzeptierten Prämisse, dass toxische Expositionen eines Organismus immer mit komplexen Modifikationen der zellulären Vorgänge einhergehen, beschäftigt sich die Molekulare Toxikologie im Wesentlichen mit der Erfassung der Expositions- und Prozessbedingten Veränderungen der transkriptionalen und translationalen Genexpression (Toxicogenomics und Toxicoproteomics) (Bandara et al., 2002; Oberemm, 2001; Robinson et al., 2003). Diese Methoden erlauben eine simultane Analyse von tausenden Genen bzw. Proteinen. Damit ergibt sich die Chance, toxikologische Wirkungsmechanismen zu erkennen und aufzuklären, welche der biologi-

schen Komplexität der Vorgänge in den Zellen/Geweben gerecht werden (Tennant, 2002). Darüber hinaus können die Daten aus den Gen- und Proteinexpressionsanalysen dazu genutzt werden, neue Biomarker für Wirkungsmechanismen zu finden. Der Vorteil begründet sich in der Verwendung biochemischer Endpunkte (Biomarker), die selbst kleinste Veränderungen auf molekularem Niveau repräsentieren, anstelle der herkömmlichen morphologischen und klinisch-chemischen Auswertungsmethoden (MacGregor et al., 1995; Waring et al., 2001). Dadurch kann ein erhöhter Informationsgewinn aus Tierversuchen gezogen werden. Nicht zuletzt lassen sich auf diese Weise wertvolle Informationen für eine Risikoabschätzung von Chemikalienwirkungen gewinnen, so dass Kurzzeit-Tierversuche in Verbindung mit den molekularen Methoden zur Risikoabschätzung kanzerogener Stoffe in der Zukunft denkbar sind (Moore et al., 1999; Sills et al., 2001).

Unter dem Forschungsschwerpunkt „Ersatzmethoden zum Tierversuch“ wurde das Projekt „Identifizierung und Prävalidierung von hepatozellulären Biomarkern zur Erfassung und Prädiktion toxischer und kanzerogener Wirkungen von chemischen Substanzen“ aufgesetzt. Das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderte Projekt wird in Kooperation mehrerer Laboratorien durchgeführt. Das Institut für Toxikologie der Firma Merck KGaA ist für die Durchführung der Tierstudie, die histologischen Untersuchungen sowie für die Proteomanalyse mittels 2DE/MS und SELDI zuständig. Die 2DE/MS wird zusätzlich vom BfR (Bundesamt für Risikobewertung) durchgeführt, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu stärken und die Reproduzierbarkeit dieser Methode zu untersuchen. Die Genomebene wird von der Firma Bayer untersucht. Für die biostatistische Auswertung der gesamten Daten, vor allen Dingen im Hinblick auf die Korrelation der Genomic- und Proteomic-Resultate sowie die zeitliche Abhängigkeit der Expressionsprofile, ist das DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum) Heidelberg zuständig.

Die Umwandlung einer normalen Zelle in eine präneoplastische bzw. entartete



Zelle ist ein langer, mehrstufiger Prozess. Für das vorliegende Projekt wurde daher ein bereits gut untersuchtes Kanzerogenesemodell gewählt: der NNM-Stopp-Versuch (Weber et al., 1994). Männliche Wistar-Ratten werden demzufolge sieben Wochen lang *per oral* mit N-Nitrosomorpholin (NNM) (20 mg/kg) behandelt, das bekanntermaßen Lebertumore initiiert und promoviert. Frühe präneoplastische Herde treten ca. ab der fünften Woche nach Absetzen des NNM (Woche 12) auf. Nach längeren Latenzzeiten (15 bis 20 Wochen) tritt ein fortgeschrittener präneoplastischer Phänotyp auf, der einer Ausbildung von hepatozellulären Neoplasmen (Adenomen und Karzinomen) unmittelbar vorausgeht. Um nun den Kanzerogeneseprozess auf molekularer Ebene abbilden zu können, werden einzelne Tiergruppen innerhalb von 25 Wochen getötet, das Lebergewebe entnommen und nach entsprechender Vorbereitung der jeweiligen Untersuchung zugeführt. Die neoplastische Transformation von Geweben kann auf diese Weise sowohl unter der akuten Einwirkung als auch nach Absetzen des Kanzerogens, ohne Überlagerung der akut toxischen Effekte des NNM, von den frühesten Veränderungen bis hin zum Auftreten von Neoplasien als toxikologischen Endpunkt mit morphologischen und molekularbiologischen Methoden sequentiell analysiert werden.

Bei der Merck KGaA wurden folgende Schritte zur Projektbearbeitung durchgeführt:

- Durchführung der NNM-Tierstudie mit Wistar-Ratten unter GLP-Bedingungen
- Histopathologische Untersuchung der Rattenlebern
- Durchführung und Auswertung von Expressionsanalysen (2DE und SELDI) mit Rattenleberextrakten
- Massenspektrometrische/bioinformatische Spotidentifizierung aus 2DE-Gelen
- Erarbeitung von bio-statistischen/-informatischen Analysen zur Auswertung von SELDI-Protein-Profilen

Bei der 2DE werden Proteingemische aufgrund zweier voneinander unabhängiger Kriterien, nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und ihrem Molekulargewicht (MW), aufgetrennt (Görg et al., 1985). Die Separation der einzelnen Proteine basiert bei beiden Methoden auf der un-

terschiedlichen Beweglichkeit geladener Teilchen in einer Gelmatrix mit angelegtem elektrischen Feld. Durch die Verknüpfung zweier Dimensionen (pI und MW) wird eine Analyse komplexer Proteinmischungen unter Beibehaltung der quantitativen Verhältnisse möglich, so dass molekulare Veränderungen in der Leber behandelter *versus* nicht behandelter Tiere gegenübergestellt werden können. Die Identifizierung der differentiell exprimierten Proteine erfolgt nachfolgend über MALDI-MS-Fingerprinting bzw. MS/MS-Fragmentationenanalyse. Nach dem Ausschneiden der zu analysierenden Spots werden die Proteine dafür mit Trypsin verdaut, die proteolytisch generierten Proteinfragmente (Peptide) aus dem Gel extrahiert und im MS analysiert. Die erhaltenen Massenspektren werden abschließend mit den Werten aus Proteinsequenzdatenbanken abgeglichen und das Protein auf diese Weise identifiziert.

Die SELDI-Technologie nutzt direkt die Massenspektrometrie, um die quantitativen Proteinverhältnisse in einem Zell-extrakt zu charakterisieren (Hutchens et al., 1993; Petricoin et al., 2002). Ciphergen Biosystems bietet diese Technologie als eine Art integrierte Plattform an, die aus einem Massenspektrometer und einem Sortiment verschiedener sogenannter Proteinchips besteht. Die Leber-extrakte werden direkt auf die Chipoberflächen appliziert. Diese unterscheiden sich bei den einzelnen Chips bezüglich ihrer physiko-chemischen Natur, so dass nur Proteine mit den entsprechenden Eigenschaften gebunden werden. Unspezifische Proteinbindungen werden von den Chips durch optimierte Waschbedingungen beseitigt. Spezifisch gebundene Proteine werden im Massenspektrometer ionisiert, detektiert und nach Bedarf in nachfolgenden Untersuchungen weiter analysiert. Ein Vergleich der Massenspektren unbehandelter *versus* behandelter Proben zeigt die differentiell exprimierten Proteine. Da diese Technologie auf Proteine kleiner Molekulargewichte beschränkt ist, kann sie als komplementär zur 2DE angesehen werden.

Die biostatistische und bioinformatische Auswertung der durch den Einsatz der 2DE und der SELDI-Technologie gewonnenen Daten wird mit mehreren Softwareprodukten durchgeführt. Diese

beinhalten das Programm Proteom-Weaver (2DE), den BiomarkerWizard (SELDI) sowie zusätzliche Windows-kompatible Tools aus dem Netz. Zur Identifizierung differentiell exprimierter Proteine erfolgt zunächst eine Auswertung der Daten für die einzelnen Zeitpunkte, bevor eine Analyse über die Zeit zur Ermittlung diskriminierender Proteine/Massen herangezogen wird. Nicht zuletzt wird das Clusterverhalten der Expressionsprofile überprüft, um eine Korrelation mit den gruppenspezifischen Veränderungen herzustellen bzw. um Ausreißer zu visualisieren.

Im Folgenden werden erste Ergebnisse der proteomischen Expressionsanalysen der NNM-Studie vorgestellt. Die Möglichkeiten und Grenzen dieser Techniken werden aufgezeigt sowie ihr Potenzial im Hinblick auf eine Verbesserung der Prädiktion der Toxikologie diskutiert.

2 Tiere, Material und Methoden

2.1 Material

Wenn nicht explizit erwähnt, wurden alle in der Studie verwendeten Chemikalien und Reagenzien von der Merck KGaA (D-Darmstadt) bezogen.

2.2 Tierstudie

Männliche Wistar Ratten (HsdCpb:WU) wurden randomisiert auf sechs Gruppen aus jeweils 6 Tieren verteilt. Die bei Studienbeginn 10 Wochen alten Ratten (Züchter Harlan Winkelmann GmbH, D-Borchen) wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten und am Ende der In-life Phase durch CO₂-Inhalation getötet. Drei Gruppen wurden über das Trinkwasser 20 mg/kg KG N-Nitrosomorpholin (NNM) verabreicht, drei weitere Gruppen dienten als zeitgleiche Kontrollen. Die Tiere der ersten Gruppe wurden nach einem Tag NNM-Exposition, die der zweiten Gruppe nach drei Wochen gemeinsam mit ihrer zeitgleichen Kontrollgruppe getötet. Die dritte Gruppe wurde sieben Wochen lang mit NNM exponiert und im Anschluss an eine 18-wöchige behandlungsfreie Beobachtungsphase in der Woche 25 zeitgleich mit ihrer Kontrollgruppe getötet.

2.3 Probenentnahme und Histopathologie

Gewebeproben aus dem linken und dem medialen Leberlappen jeder Ratte wurden sowohl für die molekularbiologischen als auch für die histologischen Untersuchungen gewonnen. Ein Teil der Leber wurde in ca. 0,3 x 0,3 mm große Stücke geschnitten, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Aus beiden Leberlappen wurden mittig drei ca. 2-3 mm dicke Scheiben geschnitten, auf Fließpapier gelegt und für die histologische Untersuchung in Formalin fixiert. Die fixierten Leberproben wurden in Paraffin eingebettet, geschnitten, mit H&E gefärbt und histologisch untersucht. Die beobachteten Läsionen wurden in Kategorien eingeordnet (Entzündung, Degeneration, Regeneration, Hyperplasie, Neoplasie, e.g. Adenom, Karzinom).

2.4 Probenvorbereitung für die 2DE/MS und SELDI

Je 50 bis 150 mg Lebergewebe wurde unter flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill pulverisiert und dadurch homogenisiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit 125 µl Lysispuffer 1 (10 mM Tris/pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,2 M Saccharose, 5 µl Protease Inhibitorcocktail Set III (Calbiochem, D-Bad Soden), 25 µl Benzonase) und 875 µl Lysispuffer 2 (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4% CHAPS (Calbiochem), 20 mM Spermin (Sigma-Aldrich, D-Steinheim), 40 mM DTT). Die Proteinkonzentration jeder Probe wurde nach der Bradford-Methode durch Zugabe von Bioquant®-Reagenz mit einem Eppendorf Bio Photometer bestimmt. Alle Leberzelllysate wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.5 2D-Gelelektrophorese (2DE)

Die Rehydrierung sowie die isoelektrische Fokussierung (IEF, 1. Dimension) der Proteingemische erfolgten bei Raumtemperatur unter Verwendung der IPG-Phosphor-Zelle (Amersham Pharmacia, SE-Uppsala) auf 24 cm langen, mit einem immobilisierten pH-Gradienten (pH 4-7) versehenen Streifen (IPG-Streifen von Amersham Pharmacia). Hierzu wurde jeweils 1 mg des Proteingemischs mit

Rehydrierungspuffer (6 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 0,5% CHAPS (Calbiochem), 0,2% Servalyte (Serva, D-Heidelberg), 15 mM Dithiothreitol (DTT) und einer Spur Bromphenolblau auf ein Volumen von 500 µl eingestellt und auf den IPG-Streifen verteilt. Nach 10 Stunden Rehydrierung der Proteine bei 30 V, startete die isoelektrische Fokussierung zunächst 1 h bei 200 V, dann 1 h bei 500 V und 1 h bei 1000 V. Anschliessend wurde innerhalb von 30 Minuten auf 8000 V erhöht und die IEF noch weitere 5 h bei 8000 V fortgeführt. Danach erfolgte eine Äquilibration der IPG-Streifen für 15 Minuten in 125 mM Tris/pH 7,5, 2,5% SDS, 30% Glycerol, 6 M Harnstoff und 1% DTT. In einem zweiten Schritt wurde nochmals 15 Minuten mit dem gleichen Puffer äquilibriert, wobei das DTT durch 5% Iodacetamid ersetzt wurde.

Die Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension erfolgte bei Raumtemperatur in 10%igen Acrylamidgelen in der Ettan Dalt II Kammer (Amersham Pharmacia) über 30 Minuten mit 5 Watt/Gel und ca. 5 Stunden mit 15 Watt/Gel (Laufpuffer: 2,5 l Taurinpuffer und 7,5 l SDS-Tris-Glycin-Puffer). Nach Fixierung der Gele in einer Mischung aus 30% Ethanol und 10% Essigsäure (30 min), wurden die Proteine in den Gelen über Nacht mit 1 µM Ruthenium in 20% Ethanol angefärbt. Die Visualisierung der gefärbten Protein-Spots erfolgte durch das Scannen der Gele mit dem Fluoreszenz-Laser-Scanner Molecular Imager® FX (BioRad, D-München). Durch Transformation der 16-bit Bilder ins tif-Format wurden die Gelbilder der weiteren Analyse zugänglich.

2.6 Image-Analyse (2DE)

Die 2D-Gel-Bearbeitungssoftware ProteomWeaver 2.0 (Definiens, D-München) diente zur Auswertung der erhaltenen Gelbilder. Die Gele eines Zeitpunktes wurden in drei getrennten Experimenten analysiert. Nach dem Einladen der tif-Bilder in ProteomWeaver wurde von der Software eine automatische Spot-Detektion durchgeführt. Hierbei wurde das Signal-Hintergrund-Verhältnis für die einzelnen Spots berechnet und als relative Intensität angegeben. Anschliessend erfolgte ein Matching aller Gele, d.h. die

Software überlagert jedes Bild mit jedem anderen Bild und sucht gleiche Spotmuster. Nach einer Normalisierung der Werte für die relativen Spot-Intensitäten auf den Median wurden Vergleiche zwischen den Gruppen bezüglich der Veränderung der Spot-Intensitäten angestellt. Als statistisch signifikant galten Expressionsunterschiede zwischen Kontrolle und jeweiliger behandelter Gruppe mit p-Werten < 0,02 (berechnet mit dem Mann-Whitney-Test). Hochreguliert, also überexprimiert im Vergleich zur Kontrollgruppe, waren Intensitätswerte, aus denen sich Regulationsfaktoren > 1,7 ergaben, als herunterreguliert galten Regulationsfaktoren < 0,7.

2.7 Probenvorbereitung für die MS

Differentiell exprimierte Protein-Spots wurden aus den Gelen ausgeschnitten und für den tryptischen Verdau in 1,5 ml Eppendorff-Tubes gegeben. Die Gelstücke wurden 5-10 mal jeweils 5 Minuten mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, anschließend mit 100 µl der Lösung bedeckt und 30 Minuten auf einem Thermomixer (Eppendorff) geschüttelt. Die Lösung wurde entfernt und zweimal 30 Minuten mit je 100 µl einer Mischung aus 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat und Acetonitril (1:1) gewaschen. Abschließend wurden die Gelstücke zur Denaturierung 5 Minuten mit 100 µl reinem Acetonitril bedeckt und dann in einer SpeedVac getrocknet. 10 µg/ml modifiziertes Schweine-Trypsin (Promega, D-Mannheim), gepuffert in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat, wurde solange zugesetzt, bis die Gelstücke die Flüssigkeit nicht mehr aufnahmen. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C unter leichtem Schütteln auf einem Thermomixer.

2.8 Massenspektrometrische Protein-Identifizierung (MS)

Vor der MS-Identifizierung wurden die tryptischen Peptide wie vom Hersteller beschrieben über C18 ZipTips (Millipore, USA-Billerica) gereinigt. Die verdauten Proben wurden dann in einer Standard Dried-Droplet-Präparation für die UV-MALDI-Analyse unter Verwendung von Alpha-Cyano-4-Hydroxymethylsäure als Matrix vorbereitet (Ap-



plied Biosystems P2-3143-00, 2 mg/ml in ACN:TFA (0,1% in Wasser) 1:1). Die MS und MS/MS-Messungen wurden mit dem 4700 Proteomics Analyzer MALDI TOF/TOF Massenspektrometer (Applied Biosystems) (200 Hz ND:YAG Laser, 355 nm) durchgeführt. Kombinierte PMF und MS/MS-Suchen erfolgten auf den Datenbanken SWISS-PROT oder NCBIInr mit Hilfe der Suchmaschine MASCOT v.1.7. MS/MS-Suchen wurden mit MS-Tag durchgeführt (www.prospector.ucsf.edu).

2.9 Vorbereitung der SELDI-Protein-Chips

WCX (Weak Cation Exchanger) Protein-Chip®-Arrays (Ciphergen Biosystems, USA-Fremont) wurden mit 50 µl 10 mM HCl äquilibriert. Jedes aus der Probenvorbereitung hervorgegangene Leberlysats wurde mit einem Bindepuffer (0,1 M Natriumacetat, 0,05% Triton X-100, pH 4,5) verdünnt (300 µg/ml) und 1 h bei Raumtemperatur sowie 225 rpm auf den Chips inkubiert (200 µl Probe/Spot). Mehrere Waschschritte (3 x Bindepuffer, 2 x Wasser) sorgten für die Entfernung von nicht gebundenen Proteinen und anderen Bestandteilen. Die Chips wurden bei Raumtemperatur getrocknet und mit 2 x 0,7 µl Sinapinsäure (SPA) als Matrix versetzt (SPA: 400 µl, 1% TFA in Wasser: ACN, 1:1).

2.10 SELDI-Messung und Auswertung

Die TOF-Spektren wurden im Ciphergen ProteinChip Reader (PBS II, Linear-Positiv-Modus, N-Laser, 337 nm) generiert und mit der ProteinChip Software bearbeitet. Die Auswertung beinhaltete einen multiplen Vergleich aller Spektren hinsichtlich signifikanter Veränderungen der Expression einzelner Massenpeaks in den Spektren von behandelten Leberlysaten im Vergleich zu den Kontrollen ($p < 0,01$ im Mann-Whitney-Test). Der „BiomarkerWizard“, ein in die Software integriertes Tool, erlaubt hierbei ein „Clustern“ der auftretenden Massenwerte über alle Spektren. Er erleichtert die Visualisierung der Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen, indem in einer Grafik die einzelnen Peakintensitäten gegen die Werte für die Massencluster aufgetragen werden. Als dereguliert

galten Massenpeaks mit Regulationsfaktoren $> 2,0$ bzw. $< 0,5$.

2.11 Bioinformatische Analyse der SELDI-Daten

Zur bioinformatischen Analyse aller SELDI-Daten wurde eine *Self Organized Map* (SOM) mit Hilfe einiger Algorithmen der Software SOM_PAK3.1 für Windows konstruiert. Zur Erstellung eines *Decision Trees* diente die Software MLC++ für Windows unter Verwendung der voreingestellten Parameter.

3 Ergebnisse

Zur Eignungsprüfung der proteomischen Methoden im Hinblick auf ihren Einsatz in der Molekularen Toxikologie für eine Risikobewertung von Substanzen, insbesondere von Chemikalien, mussten diese neuen Techniken zunächst einmal zwischen den Laboratorien harmonisiert werden. Für die einzelnen Arbeitsabläufe wurden standardisierte Protokolle (SOP, *Standard Operating Procedure*) erarbeitet. Daraufhin wurde die Aussagekraft der erhaltenen Daten sowie die Reproduzierbarkeit der jeweiligen Methode (2DE und SELDI) näher untersucht. Anhand vergleichender Analysen wurde die minimale Anzahl durchzuführender biologischer als auch technischer Replikate ermittelt. Daraus ergab sich, dass durch den Einsatz sechs biologischer Replikate in der Tierstudie die maximale Variationsquelle erfasst wird. Methodisch bedingte Unterschiede in den 2DE-Experimenten und den SELDI-Versuchen konnten mit vier technischen Replikaten eliminiert werden.

3.1 Tierstudie und Histopathologie

Während der NNM-Applikationsphase über 7 Wochen traten klinische akut toxische Reaktionen auf, die nach Absetzen des Kanzerogens zurückgingen. Diese Beobachtung äußerte sich zu Beginn der Studie in einer geringen Gewichtsabnahme der Tiere und einem reduzierten Trinkwasserverbrauch während der NNM-Applikation.

In Abhängigkeit von der Expositionsdauer zeigten sich lichtmikroskopisch unterschiedliche Veränderungen in der

Leber (Tab. 1 und Abb. 1). Schon nach einer Woche NNM-Behandlung erschien die Leber lobuliert-gefleddert. Diese Veränderung korrelierte mikroskopisch mit Einzelzellnekrosen, reduziertem Glykogengehalt und entzündlichen Zellinfiltraten. Die Hepatozyten zeigten im unterschiedlichen Ausmaß Zeichen der Degeneration. Mit zunehmender Expositionsdauer bzw. behandlungsfreier Nachbeobachtungszeit bildete sich eine kleinknotige Struktur, die bei einigen Tieren mit einer Leberatrophie, bei anderen Tieren mit der Ausbildung von Regeneratknoten, Adenomen oder Karzinomen zum Ende der Studie einherging.

3.2 2DE-Technik

Das vorhandene Gewebe wurde einer klassischen toxikoproteomischen Untersuchung mittels 2DE unterzogen. Die Probenvorbereitung, die Elektrophorese sowie die Computer gestützte Auswertung wurde zunächst eingesetzt, um in den Gelen Landmarks für eine Erleichterung und Standardisierung der folgenden Analysen zu bestimmen. Eine Identifizierung der einzelnen Proteine erfolgte mittels MALDI-MS bzw. MS/MS-Technik.

Da das vorhandene Probenmaterial zum Ende der Studie sehr gutes Ausgangsmaterial für die Charakterisierung eines Tumorendpunktes mit spezifischen Markern liefert, wurden die Proben der letzten Tötung vorrangig bearbeitet. Es erfolgte eine 2DE gestützte Expressionsanalyse der Woche 25 mit der Gruppe der Kontrolltiere *versus* der Gruppe NNM behandelter Tiere. Hierbei zeigte sich, dass nur ein sehr geringer Anteil der differentiell exprimierten Proteine in allen biologischen Replikaten detektierbar war. In Anbetracht der stark veränderten Lebern laut Histobefund sollte mit einer weitaus größeren Veränderung der Proteinexpression und damit natürlich auch einer gesteigerten Anzahl differentiell exprimierter Spots zu rechnen sein. Da die 2DE als sehr sensitive Technik in der Lage ist, kleinste Veränderungen im Proteinprofil abzubilden, sind übereinstimmende Expressionsprofile nicht für heterogene Gewebeveränderungen NNM behandelter Lebern zu erwarten, die sich in den jeweiligen Tieren einer Gruppe individuell in Regenerat-

knoten, Adenomen und/oder Karzinomen manifestieren. Daraus ergab sich die logische Konsequenz, das Gewebe behandelte Tiere noch einmal in Untergruppen zu unterteilen: Gewebe von Tieren, die Leberneoplasien entwickelt haben, und Lebergewebe von Tieren ohne Neoplasie-Befund. Die Analyse wurde erneut durchgeführt und lieferte das in Abbildung 2 dargestellte differentiell exprimierte Expressionsmuster. Mit der folgenden MS- bzw. MS/MS-Untersuchung konnten annähernd alle Proteine identifiziert werden; ein Auszug ist in Tabelle 2 zu sehen.

Um die akut toxischen Reaktionen in der Leber proteomisch mittels 2DE/MS abzubilden, wurden anschließend die Proben vom Tag eins näher untersucht. Schon nach einem Tag NNM Exposition konnten eine Reihe differentiell exprimierter Proteine detektiert werden. Analog erfolgte die Analyse des Lebergewebes von Woche drei (Vergleiche Tab. 2).

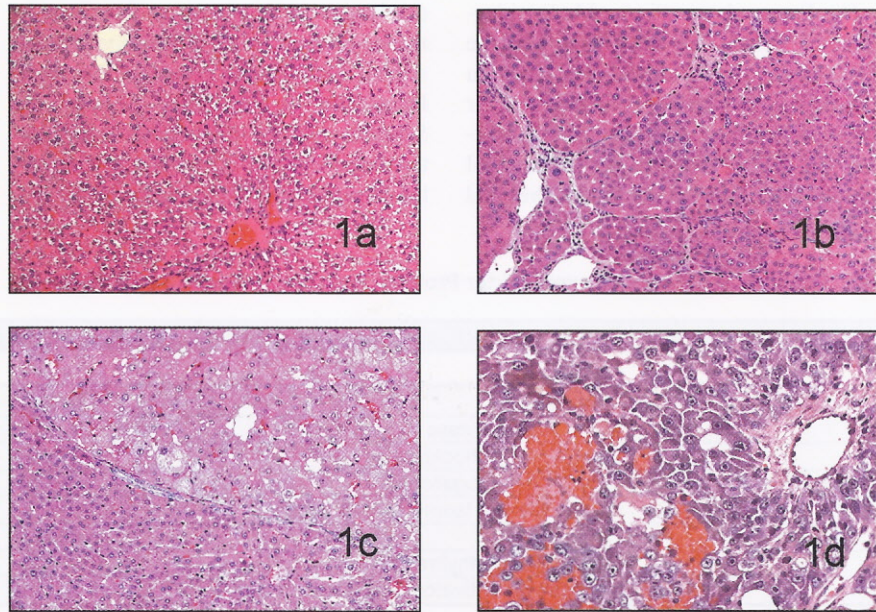


Abb. 1a bis d: Histopathologische Auswertung des Lebergewebes aus der NNM-Studie. a: Normalgewebe eines Kontrolltieres; b: Regeneratknötchen im Lebergewebe; c: neoplastische Veränderungen in der Leber (Adenom); d: neoplastischer Befund Karzinom

Tab. 1: Histopathologische Auswertung des Lebergewebes aus der NNM-Tierstudie

Gruppe	NNM (d, weeks)	Recovery (weeks)	Makroskopie (Anzahl)	Histologie (Anzahl)
N-00T	0	0	foci, rot, multiple (1) accentuated lobular pattern (1)	obB
N-01T	1 d	0	obB	Kapselreinziehungen, minimal
N-01w	1	0	accentuated lobular pattern (3)	focale Nekrosen , Lobulierung (7) Infiltrate (3)
N-03w	3	0	granular surface (7) small (7)	focale Nekrosen , Lobulierung (7) Infiltrate (7) abnormale (Riesen-)Hepatozyten (3) Gallengangsproliferation gering-stark (3)
N-08w	7	1	obB	focale Nekrosen , Lobulierung (7) Hypertrophie diffus, mittelgradig (5) Hypertrophie diffus, hochgradig (2) Gallengangsproliferation gering-stark(7)
N-12w	7	5	Discoloration, weiß (2) Swollen (1) granular surface (3) small (5) Nodule(s) (2)	abnormale (Riesen-)Hepatozyten (2) degenerierende abnormale Hepatozyten (5) Leberatrophie, hochgradig (5) Regeneratknötchen/Adenom (5) Massennekrose (1) Gallengangsproliferation gering-stark (7)
N-20w	7	13	Discoloration, weiß (2), Swollen (5) granular surface (1), small (2) Nodule(s) (2), Mass (2) Lungenmetastase (1)	degenerierende abnormale Hepatozyten (1) Leberatrophie, hochgradig (1) Regeneratknötchen/Adenom (1) Gallengangsproliferation gering-stark (1)
N-25w (w30+50)	7	18	Discoloration, weiß (4), Swollen (3) granular surface (6), small (4) Nodule(s) (2), Mass (7) Lungenmetastase (2) Lungenmetastase (1)	degenerierende abnormale Hepatozyten (1) Leberatrophie, hochgradig (4) Regeneratknötchen/Adenom/Karzinom (4) Gallengangsproliferation gering-stark (4)

obB: ohne besonderen Befund



Die Frage, ob spezifische Marker identifizierbar sind, die eine neoplastische Transformation von Leberzellen schon zu frühen Zeitpunkten der Tierstudie in der Leber detektieren, lässt sich voraussichtlich mit einem Vergleich der differentiell exprimierten Proteine der Woche drei und

der Woche 25 beantworten. Übereinstimmende Proteine beider Zeitpunkte könnten sich als frühe Marker erweisen. Das Venn-Diagramm in Abbildung 3 zeigt die Schnittmenge der differentiell exprimierten Proteine dieser Zeitpunkte, die immerhin 19 potenzielle frühe Marker beinhaltet.

3.3 SELDI-Technik

Auch mittels SELDI-Technologie erfolgte das Screening nach potenziellen Biomarkern in mit NNM behandeltem Lebergewebe. Vorrangig wurden die Proben vom Tag eins und der Woche 25 auf differentiell exprimierte Proteine unter-

Tab.: 2: Auswahl differentiell exprimierter Proteine vom Tag 1, Woche 3 und Woche 25.

Kategorie	Protein	AN	Regulation	p
Tag 1				
zellulärer Stress	Peroxiredoxin	P35704	2.05	0.0069
	Superoxiddismutase	P07632	2.37	0.0167
	60 kDa Hitzeschockprotein	P19226	2.61	0.0019
Metabolismus	Aldehyddehydrogenase	P11884	2.21	0.0009
	Protein Disulfid Isomerase A3 Vorläufer	P11598	2.33	0.0093
	Prohibitin	P24142	2.06	0.0013
	Catechol O-Methyltransferase	P22734	2.16	0.0060
	Proteasome Aktivator Komplex Untereinheit 1	Q63797	2.31	0.0078
Woche 3				
zellulärer Stress	60 kDa Hitzeschockprotein	P19226	4.38	0.0000
	Hitzeschock cognate 71 kDa Protein	P08109	2.38	0.0002
	Hitzeschockprotein HSP 90-beta	P11499	2.10	0.0000
	Lösliche Epoxidhydrolase	P80299	1.87	0.0000
	Catalase	P04762	0.69	0.0083
Metabolismus	Cathepsin B Vorläufer	P00787	1.78	0.0000
	Aldehyddehydrogenase	P11884	2.80	0.0000
	Pyruvatkinase	P12928	0.23	0.0000
	Leber Carboxylesterase 10 Vorläufer	P16303	0.28	0.0000
	Ornithinaminotransferase	P04182	0.53	0.0000
	Protein Disulfid Isomerase A6 Vorläufer	Q63081	0.55	0.0000
	Ketohexokinase	Q02974	0.57	0.0000
	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase	O35007	0.58	0.0000
	Glycerolkinase	Q63060	0.60	0.0000
	Adenosinkinase	P55264	0.61	0.0001
	Succinyl-CoA Ligase	Q9Z218	0.66	0.0000
	Alpha-Enolase	P04764	0.67	0.0094
	Catechol O-Methyltransferase	P22734	0.43	0.0000
	Fructose-1,6-Bisphosphatase	P19112	0.64	0.0000
Woche 25				
Neoplasie-spezifisch	Caspase-8 precursor	O89110	0.56	0.0051
	60 kDa Hitzeschockprotein	P19226	0.66	0.0005
	Rho GDP-Dissoziationshemmer 1	Q99PT1	0.73	0.0001
	Coatomer epsilon Untereinheit	Q60445	1.79	0.0007
	TFII basaler Transkriptionsfaktorkomplex	O08811	0.59	0.0015
zellulärer Stress	Hitzeschockprotein 70 (verwandt)	Q61316	1.95	0.0000
	47 kDa Hitzeschockprotein Vorläufer	P19324	0.43	0.0008
	Stress-70 Protein, mitochondrialer Vorläufer	O35501	0.49	0.0000
	Hitzeschock cognate 71 kDa Protein	P08109	0.45	0.0001
Metabolismus	Fructose-1,6-Bisphosphatase	P19112	0.68	0.0000
	Ornithinaminotransferase	P04182	0.57	0.0000
	Aldehyddehydrogenase	P11884	0.67	0.0001
	Malatdehydrogenase	P14152	0.58	0.0000
	ATP Synthase, beta-Kette	P10719	0.50	0.0000
	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase	O35007	0.62	0.0011
	Pyruvatkinase	P12928	0.57	0.0054
	Glycerolkinase	Q63060	0.69	0.0000
	Succinyl-CoA Ligase	Q9Z218	0.65	0.0008

AN: SWISS-PROT Accession Number
P: berechnet mit dem Mann-Whitney-Test

sucht. Ein vergleichendes Protein-Profilierung auf unterschiedlichen Chips lieferte den *WeakCationExchanger* (WCX) als optimale Oberfläche, um die jeweiligen Proteinmassen des Lebergewebes zu repräsentieren. Eine Detektion differentiell exprimierter Massen in den Spektren erfolgte mit der BiomarkerWizard-Software. Für den Tag eins konnte auf diese Weise ein verändertes Expressionsprofil in den behandelten Tieren festgestellt werden. Insgesamt wurden acht Massen mit statistisch signifikanten p-Werten als differentiell exprimiert ermittelt. Im Falle der Woche 25 zeigten allein schon die SELDI-Spektren des behandelten Lebergewebes stark veränderte Expressionsmuster im Vergleich zum Kontrollgewebe (Abb. 4).

Außerdem waren individuelle Proteinmuster der einzelnen Tiere detektierbar. Eine Korrelation der Spektren mit den pathologischen Makrobefunden zeigte eindeutig, dass mit Hilfe dieser Technik zwischen Neoplasie-Gewebe, Nicht-Neoplasie-Gewebe bzw. weiteren Befunden klar unterschieden werden kann. Darüber hinaus ließen sich sogar kleinste Veränderungen im Gewebe visualisieren, die eine weitere Differenzierung der Neoplasie-Proben ermöglichte (siehe Abb. 4 b, c, e und f). Die BiomarkerWizard-Analyse der Woche 25 zeigte analog den 2DE-Ergebnissen im Falle eines Vergleichs der NNM- versus der Kontroll-Leberproben nur geringfügige gemeinsame Veränderungen aller biologischen Replikate auf molekularem Niveau. Auch hier konnte durch die Einführung von Untergruppen (Neoplasie- bzw. Nicht-Neoplasie-Gewebe) eine Steigerung der differentiell detektierten Massen erzielt werden (Abb. 5), so dass insgesamt 30 Proteine mit statistisch signifikanter Intensitätsänderung im Tumor- versus Non-Tumor-Vergleich ermittelt werden konnten.

3.4 Bioinformatische Analyse der SELDI-Daten

Um potenzielle Marker mit einem hohen Informationsgehalt für eine Diskriminierung zwischen NNM- und Kontrollproben bzw. den einzelnen Zeitpunkten aufzufinden, wurden mit den kompletten Datensätzen der SELDI-Messungen weitere bioinformatische Analysen durchge-

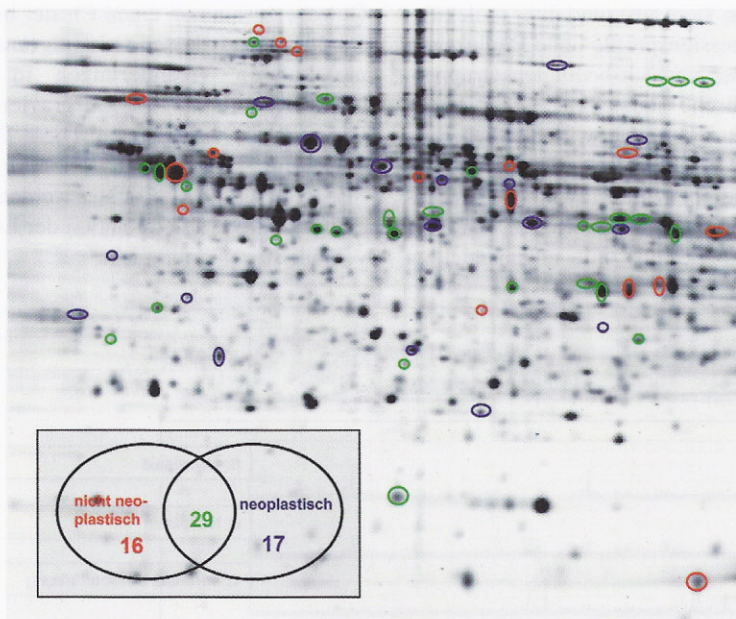


Abb. 2: 2D-Gel einer Leberprobe aus Woche 25. Differenziell exprimierte Proteine sind farblich gekennzeichnet. Spezifische Deregulationen Neoplasie tragender Tiere sind blau dargestellt (17), Veränderungen in nicht neoplastischem Gewebe rot (16). 29 Proteine werden in beiden Analysen als differentiell exprimiert angezeigt (grün).

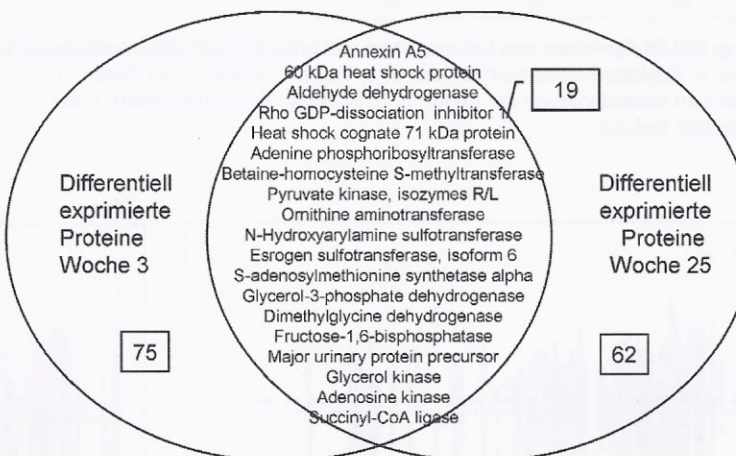


Abb. 3: Venn-Diagramm Woche 3/Woche 25. In Woche 3 sind 75 Proteine differentiell exprimiert, dagegen 62 in Woche 25. 19 Proteine ergeben die aus beiden Zeitpunkten resultierende Schnittmenge.

führt. Abbildung 6 zeigt den resultierenden *Decision Tree* bzw. den *Bayesian Classifier*. Es ist leicht zu erkennen, dass beide Methoden die gleichen Massen zur Diskriminierung liefern. Demnach lassen sich Protein-Profile des Zeitpunktes Tag eins von der Woche 25 mit der Masse 2708 Da abgrenzen. Kontrollen und NNM-Proben der Woche 25 sind durch die Masse 7437 Da diskriminierbar und

im Falle von Tag eins anhand der Masse 4405 Da differenzierbar. Eine weitere Identifizierung der Proteine hinter diesen Massen konnte bisher leider noch nicht erfolgen, ist aber Gegenstand der laufenden Forschung.

Abschliessend wurde mit den SELDI-Spektren ein *Self Organised Mapping* (SOM) durchgeführt. Diese Cluster-methode erlaubt eine Differenzierung der

einzelnen Tiere aufgrund ihrer molekularen Expressionsprofile ohne Berücksichtigung der versuchsbedingten Gruppen. Die grafische Darstellung ist in Abbildung 7 zu sehen. Hier wird deutlich, dass sowohl Tiere der Kontroll- als auch der NNM-Gruppen nicht zwingend zusammen gehören bzw. manchmal sogar behandeltes Gewebe mit unbehandeltem

Gewebe zusammen einen Cluster bildet. Darüber hinaus lassen sich aufgrund der molekularen Veränderungen in den NNM-behandelten Tieren gravierende Unterschiede visualisieren. Diese Differenzierung konnte auch schon in den SELDI-Spektren beobachtet werden, die eine detaillierte Interpretation der Leberveränderungen ermöglicht.

4 Diskussion

Die krebserzeugende Wirkung von Substanzen wird bis heute unter anderem in chronischen Versuchen an der Ratte bzw. Maus geprüft und basiert auf dem histopathologischen Nachweis benigner und maligner Neoplasien als toxikologischen Endpunkt. Bei der Ratte ist die Leber das Hauptzielorgan kanzerogener Effekte insbesondere von Chemikalien. Durch die sequentielle Untersuchung von Lebergeweben vor und nach Absetzen einer zeitlich limitierten Gabe eines kanzerogenen Agens, in diesem Fall NNM, sollte geprüft werden, inwieweit molekulare Veränderungen mit den sensitiven Omics-Methoden detektierbar sind. Darüber hinaus sollte herausgearbeitet werden, ob dem Auftreten der Neoplasien frühere molekulare Veränderungen vorausgehen, die sich letztendlich in neuen und vor allen Dingen frühen Biomarkern der Entstehung von Lebertumoren widerspiegeln. Diese könnten in der Zukunft eingesetzt werden, um prädiktiv das kanzerogene Potenzial von Substanzen zu ermitteln (Sills et al., 2001; Toraason et al., 2003; Waring et al., 2001).

Das Studiendesign und die Höhe der Exposition mit N-Nitrosomorpholin

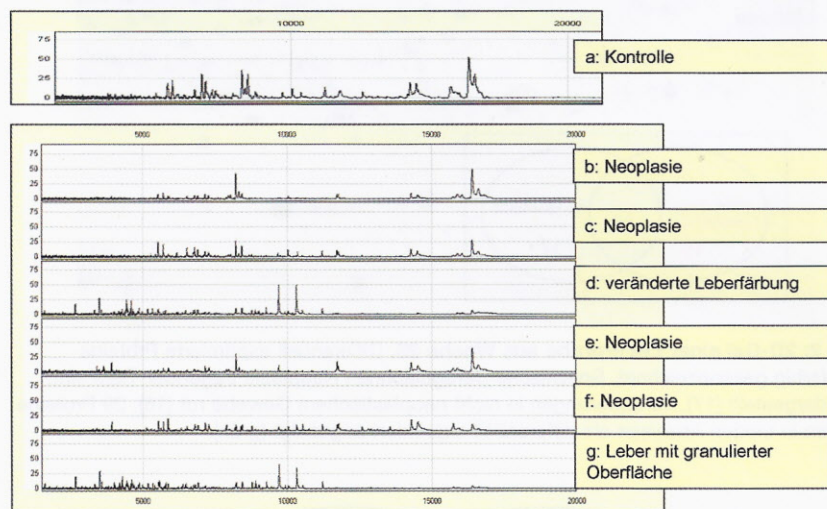
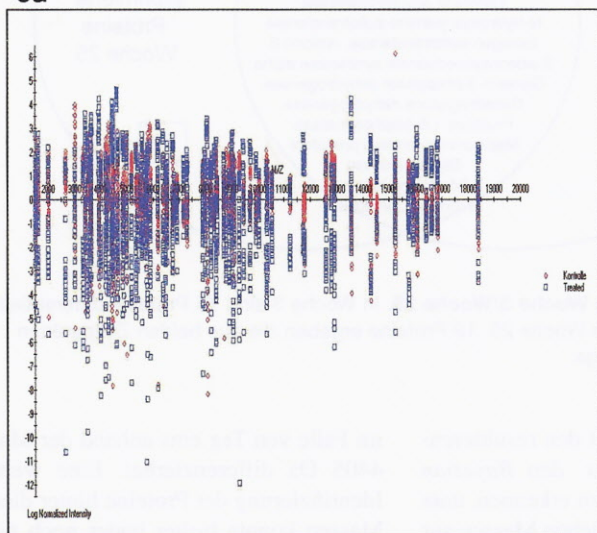


Abb. 4a-g: SELDI-Spektren von Leberproben mit unterschiedlichen pathologischen Befunden. a: Spektrum eines Kontrolltiers; b, c, e und f: Spektren von Tieren mit neoplastischen Veränderungen der Leber; d, g: Spektren von Rattenlebern ohne neoplastischen Befund.

5a



5b

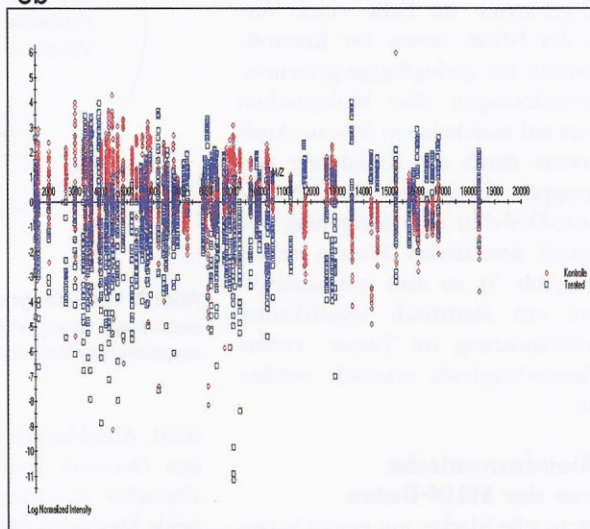


Abb. 5a und b: Durch den „BiomarkerWizard“ generierte Darstellung der Intensitätswerte aller in SELDI-Spektren auftretenden Massencuster (Proben aus Woche 25). Auf der y-Achse ist die Peakintensität halblogarithmisch aufgetragen, die x-Achse zeigt die M/Z-Werte der einzelnen Massencuster. Blau dargestellt sind die Intensitätswerte von behandelten

Proben, rot die von Kontrollen. 5a: SELDI-Spektren von Geweben Neoplasie tragender Tiere als auch Tieren ohne Neoplasie-Befund sind in die Analyse miteingegangen. 5b: Bei alleiniger Betrachtung der Gewebeproben Neoplasie tragender Tiere treten deutlichere Unterschiede zwischen Kontrollen und behandelten Proben hervor.

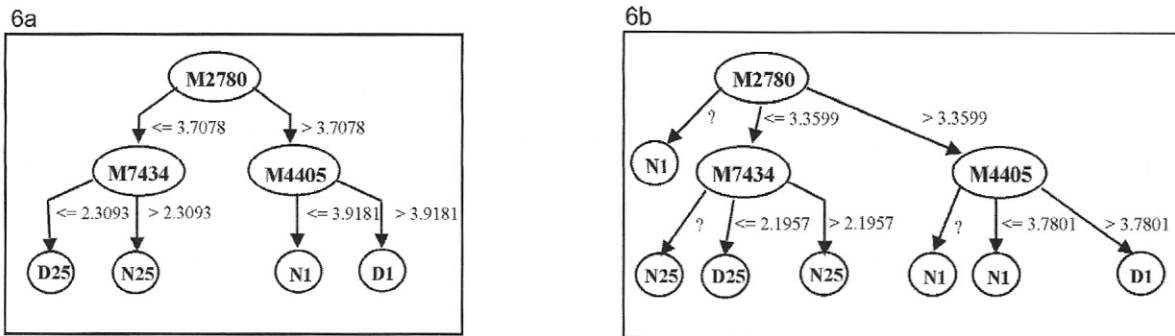


Abb. 6a und b: Bioinformatische Analyse der SELDI-Spektren von Tag 1 und Woche 25 mit Decision Tree-Analyse (a) und Bayesian Classifier (b). Beide Methoden liefern dieselben diskriminierenden Massen. Mit dem M/Z-Wert 2708 Da ist eine Unter-

scheidung der Spektren von Tag 1 und Woche 25 möglich. Die Masse 7437 Da erlaubt eine Differenzierung zwischen Kontrollen und behandelten Proben von der Woche 25, die Masse 4405 Da unterscheidet Kontrollen und behandelte Proben vom Tag 1.

(NNM) gründete auf den langjährigen Erfahrungen, die im Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg mit dieser Modellsubstanz gewonnen wurden. Ziel der Exposition war, Leberzellen soweit zu schädigen, dass prädisponierte Teilpopulationen dieser Zellen zu präneoplastischen und neoplastischen Herden entarten. Bei den verwendeten Dosierungen sollte das Allgemeinbefinden der Tiere nicht soweit beeinträchtigt werden, dass allgemein toxische Effekte (Anorexie, Abmageren etc.) die gesuchten Parameter überdecken oder beeinträchtigen konnten. Allerdings war es, um innerhalb des Versuchszeitraumes entartete Gewebeherde zu erzeugen, erforderlich, in den toxischen Bereich vorzustoßen. Gemäß dem Versuchsziel entwickelten einzelne Tiere sogar maligne Lebertumore. Beides zusammengekommen führte in dieser Studie zu einem gewissen Leiden der Tiere, welches allerdings durch die angewandten Kontrollmethoden weitestgehend reduziert und abgekürzt wurde (Schweregrad 2 nach CH-BVET, 1994, Information Tierschutz 1.04).

In zukünftigen Forschungsstudien und in den für die spätere routinemäßige Prüfung von Chemikalien notwendigen Studien werden solch hohe Expositionen nicht mehr benötigt. Das Ziel ist, ohne toxische Wirkung Parameter bestimmen zu können, die Auskunft über eine mögliche kanzerogene Wirkung geben können. Bei Studien dieses Typs soll das Lebergewebe, wenn überhaupt, nur in geringstem Maße geschädigt werden (lichtmikroskopisch nicht erkennbar) und es gibt daher auch keine Belastung im Sinne des Tier-

schutzes (Schweregrad 1 nach CH-BVET, 1994, Information Tierschutz 1.04).

4.1 Histopathologische Auswertung der NNM-Studie

Leberzelltumore entwickeln sich bei der Ratte aus präneoplastischen Vorstufen (FAH), die innerhalb von langen Latenzzeiten über knotige benigne Neoplasien (Adenome) oder ohne solche intermediären Formen direkt in die malignen Endstufen (Karzinome) übergehen (Banasch et al., 2003). Die histopathologische Auswertung der Studie zeigte, dass nach einer ausgeprägten akut toxischen Phase, charakterisiert durch deutliche Degenerationen und Zellnekrosen, sich zunehmend regenerative und proliferative Prozesse entwickelt haben, die in gut-

bis bösartigen Leberzellneoplasien mündeten (Tab. 1 und Abb. 1).

4.2 2DE/MS-Analyse der akuten NNM-Effekte

Um die akut toxischen Vorgänge in dem Lebergewebe näher zu beschreiben und der benignen/malignen Endstufe nach Abklingen dieser Reaktion gegenüberzustellen, wurde zunächst das Material einiger früher Zeitpunkte (Tag eins, Woche drei) analysiert. Die proteomischen Untersuchungen des NNM-Gewebes mittels 2DE zeigte, dass die Anzahl der deregulierten Proteine mit dem Auftreten und dem Schweregrad der akut toxischen Vorgänge in den Tieren korreliert, die nach drei Wochen besonders stark waren und nach 25 Wochen, also 18 Wochen nach Abset-

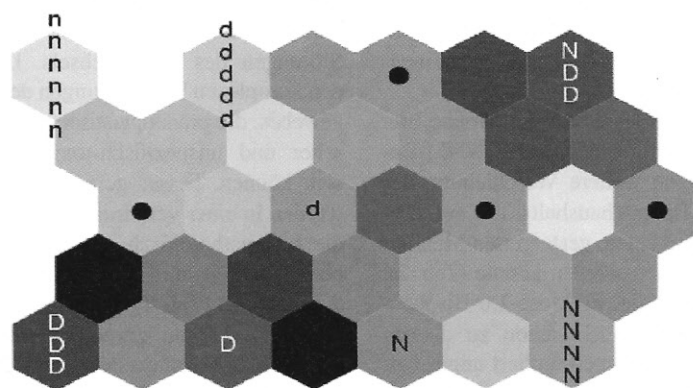


Abb. 7: Self Organized Mapping (SOM-Clustering) der SELDI-Spektren von Tag 1 und Woche 25 (4 x 3 Matrix). (n): „no drug“ (Kontrolle) Tag 1; (d): „drug“ (NNM) Tag 1; (N): „no drug“ (Kontrolle) Woche 25; (D): „drug“ (NNM) Woche 25. Die Kontrollproben von Tag 1 fallen alle in ein Cluster, die behandelten Proben von Tag 1 mit einer Ausnahme ebenfalls. In Woche 25 fallen Kontrollen und NNM-Proben nicht mehr durchgehend zusammen, eine Kontrolle findet sich sogar gemeinsam mit zwei behandelten Proben in demselben Cluster.



zen der Behandlung, zum großen Teil wieder abgeklungen waren. So wurden nach einem Tag 13 Proteine und nach drei Wochen 75 Proteine als differentiell exprimiert angezeigt.

Die nachfolgende Identifizierung dieser Moleküle mittels MALDI-MS bzw. MS/MS lieferte zu Beginn der Studie (Tag eins) eine Reihe an Proteinen, die den zellulären Stress in der Zelle reflektieren (siehe Tab. 2). Dieser wird auf molekularer Ebene hauptsächlich durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ausgelöst, die sowohl als schädliche Agenzien zum programmierten Zelltod führen sowie auch als Signalstoffe zum Schutz der Zellen wirken können (Kohen et al., 2002). So wird auf molekularer Ebene die Anhäufung von ROS durch abbauende Enzyme wie Peroxiredoxin und die Superoxid-Dismutase verhindert, die als differentiell exprimiert angezeigt wurden. Die Apoptose als auch sekundäre Reaktionen werden über intrazelluläre Boten wie das gesteigert exprimierte HSP 60 angestoßen. Diese führen unter anderem zu einem modifizierten Energiemetabolismus, was sich letztendlich in der veränderten Expression der Aldehyd-Dehydrogenase, der Protein Disulfid Isomerase, dem Prohibitin und natürlich der Catechol-O-Methyltransferase widerspiegelt. Diese Ergebnisse belegen, dass mit der 2DE/MS schon nach einem Tag NNM-Behandlung akute Veränderungen auf Translationsebene angezeigt werden, die histopathologisch in diesem Ausmaß nicht detektierbar sind, wohl aber mit den mechanistischen Prozessen der Tumoringuktion zusammenhängen können.

Die 2DE/MS-Analyse der Woche drei zeigte durch die andauernde NNM-Behandlung eine weitere Verschiebung des zellulären Energiehaushalts, die auf Proteinebene mit einem gesteigerten Metabolismus detektiert werden konnte (Tab. 2). Insbesondere die Fruktose-1,6-Bisphosphatase (FBP) wurde schon zu diesem Zeitpunkt als herunterreguliert angezeigt. FBP gilt als Schlüsselenzym des Glukosehaushalts, das durch Expressionserniedrigung eine Reduktion der Glukoneogenese mit gleichzeitigem Anstieg der Glykolyse und des Pentosephosphatweges bewirkt. Dadurch wird in den Zellen der erhöhte Energiebedarf für eine gesteigerte

Regeneration sowie den Ersatz geschädigter Leberzellen (Regenerative Zellproliferation) bereitgestellt (Bannasch et al., 1982; Hioryuki et al., 2001). Veränderungen des Glukosestoffwechsels in Zellen, die als präneoplastisch angesehen werden, wurden von Bannasch für die *Mixed Cell Foci of Altered Hepatocytes* beschrieben, die mit immunhistochemischen Techniken allerdings erst sehr viel später, das heißt Wochen nach Absetzen des NNM, detektiert werden konnten (Bannasch et al., 2003). Die Ergebnisse zeigen, dass mittels der sensitiven 2DE die degenerativen Prozesse in der Zelle früher als mit herkömmlichen Methoden abbildbar sind. Während in der Woche drei mit histopathologischen Methoden vorrangig die akut toxischen Reaktionen detektiert wurden, die auf molekularem Niveau durch die differentielle Expression der am zellulären Stress beteiligten Enzyme bestätigt wurden, konnten mit der 2DE/MS zusätzliche gravierende Veränderungen des zellulären Energiehaushalts nachgewiesen werden, die unter Umständen den komplexen Mechanismus der Tumoringuktion detaillierter abbilden.

4.3 2DE/MS-Analyse der chronischen NNM-Effekte

Eine erste Analyse des Lebergewebes aus Woche 25 mittels 2DE/MS lieferte differentiell exprimierte Proteine, die weitestgehend wiederum anabolen und katabolen Vorgängen in der Zelle zuzuordnen sind. Auch diese Resultate stimmen mit Literaturdaten überein (Mayer et al., 1998) und beschreiben die schon erwähnten Störungen des Stoffwechsels. Um aber den komplexen Veränderungen des Lebergewebes, die präneoplastischer, neoplastischer und unspezifisch-toxischer Natur sein können, besser gerecht zu werden, wurden in einer verfeinerten Gel-Analyse die histopathologischen Ergebnisse mitberücksichtigt und die Analyse erneut durchgeführt (Tab. 2). Durch diese Vorgehensweise konnte gezeigt werden, dass die am Metabolismus beteiligten Proteine vorrangig in allen Proben NNM-behandelter Tiere auftraten. Zusätzlich konnten aber spezifische Proteine detektiert werden, die nur in Tieren mit benignen/malignen Neoplasien beobachtet wurden und daher als Tumormarker kandidieren können. Unter diesen waren vor allen Dingen

der Rho GDP Dissociation Inhibitor, das HSP 60 sowie die Caspase-8 als herunterreguliert angezeigt, die eine Schlüsselrolle in der mitochondrialen Apoptosekontrolle einnehmen (Degterev et al., 2003; Schramek et al., 1997). Eine verminderte Expression dieser Proteine bewirkt eine Inhibition des programmierten Zelltodes, wodurch das ungehemmte Wachstum der entarteten Zellen begünstigt wird.

4.4 SELDI-Analyse der NNM-Effekte

Auch die proteomische Analyse der Leberproben mittels SELDI-Technologie lieferte zum Zeitpunkt Tag eins und Woche 25 eine Reihe differentiell exprimierter Proteinmassen. Analog zur 2DE/MS führte die verfeinerte Analyse mit Untergruppen aus Leberproben Neoplasie-tragender Tiere ebenfalls zu einer gesteigerten Detektion differentiell exprimierter Massen mit potenziellen Tumormarkern (siehe Abb. 4). Darüber hinaus ließen sich mittels SELDI-Spektrometrie massenspezifische Unterschiede in den Proben herausarbeiten, so dass einzelnen Tieren individuelle Proteinmuster zugeordnet werden können (Abb. 5). Diese kleinen Differenzen erlauben neben einer verbesserten Korrelation mit der Histopathologie als auch der Makrobefunde eine profundere Beschreibung des Neoplasiegewebes. Leider konnte eine weitere Identifizierung der Proteine hinter den Massen von Interesse noch nicht erfolgen. Dieser Umstand ist als klarer Nachteil der SELDI-Technologie zu nennen, der hoffentlich in der nahen Zukunft ausgeräumt werden kann. Denn gerade die minimalen Unterschiede in den SELDI-Spektren der behandelten Tiere zeigen das Potenzial dieser Technologie, kleinste Veränderungen auf molekularem Niveau zu repräsentieren, die natürlich einer detaillierten Aufklärung des Kanzerogeneseprozesses dienlich sein kann (Petricoin et al., 2002).

Die weitere Identifizierung der Massen von Interesse ist Gegenstand der intensiven Forschung im Labor der Merck KGaA und gestaltet sich zur Zeit noch als schwierig, da zu diesem Zweck mehrere herkömmliche chromatographische und elektrophoretische Verfahren (SDS-PAGE, 2DE, HPLC, etc.) herangezogen werden müssen, bevor die eigentliche Identifizierung über MALDI-MS bzw.

MS/MS erfolgen kann. Neueste Entwicklungen der Firma Ciphergen gehen dahin, die interessanten Massen auf der Chipoberfläche anzureichern, bevor eine Analyse der Proteine direkt vom SELDI-Chip über ein Interface mit MS/MS erfolgt (Wiesner, 2002). Diese Technik ist zur Zeit leider noch auf Proteine mit einer Masse unter 4000 Da beschränkt; sie wird aber ständig weiterentwickelt, so dass hoffentlich in naher Zukunft auch größere Proteine dieser Technik zugänglich sind.

4.5 Bioinformatische Analyse der SELDI-Daten

In Anbetracht der Tatsache, dass die Identifizierung der Proteine mit differentieller Expression unmittelbar aus den SELDI-Spektren noch kein etabliertes Verfahren darstellt, wurde mit weiteren bioinformatischen Analysen versucht, die Massen mit dem höchsten Informationsgehalt zur Unterscheidung der einzelnen Gruppen zu ermitteln. Diese diskriminierenden Massen lassen sich optimal mit *Decision Tree* Analysen berechnen. Als Grundlage für die Analyse dienten die mittels SELDI detektierten Massen mit ihren jeweiligen Intensitäten zu den Zeitpunkten Tag eins und Woche 25. Das Ergebnis ist in Abbildung 6a zu finden; insgesamt wurden drei Massen mit hohem Informationsgehalt zur Differenzierung der gruppenspezifischen Leberveränderungen angezeigt. Um diese Resultate zu verifizieren, wurde eine dem *Decision Tree* verwandte, bioinformatische Analyseverfahren durchgeführt. Der *Bayesian Classifier* liefert exakt die gleichen diskriminierenden Massen (Abb. 6b). Mit diesen lassen sich nun die NNM-behandelten von den unbehandelten Leberproben abgrenzen. Außerdem ist eine Differenzierung des Lebergewebes vom Tag eins und der Woche 25 möglich, die letztendlich die Reaktion der akuten Toxizität vom Endpunkt der benignen/malignen Entartung abgrenzt. Diese Massen werden zur Zeit vorrangig einer weiteren Analyse zwecks Proteinidentifizierung unterzogen, um als potenzielle Biomarker in weiteren Testsystemen noch einmal überprüft zu werden.

Da die SELDI-Technologie besonders geeignet ist, kleinste Veränderungen der Proteinexpression abzubilden, wurde das *Self Organised Mapping* (SOM) eingesetzt, um interindividuelle Unterschiede

in den Rattenlebern zu visualisieren (Abb. 7). Diese bioinformatische Analyseverfahren ist besonders gut geeignet, um gruppenspezifische Ähnlichkeiten als auch Besonderheiten herauszuarbeiten. Als Grundlage für die Analyse dienten ebenfalls die mittels SELDI detektierten Massen mit ihren jeweiligen Intensitäten zu den Zeitpunkten Tag eins und Woche 25. Die versuchsbedingten Gruppenzugehörigkeiten des Lebergewebes werden bei der eigentlichen Berechnung nicht berücksichtigt; im Gegenteil, nur die Angrenzungen bzw. Distanz der jeweiligen Protein-Profile untereinander bestimmt die sogenannte Clusterzugehörigkeit. Die Ergebnisse zeigten, dass aufgrund der SELDI-Profile schon am Tag eins sehr wohl zwischen NNM-behandeltem und unbehandeltem Lebergewebe unterschieden werden kann. Auffällig erscheint, dass die Proteinspektren einer einzelnen behandelten Probe sehr stark von den anderen NNM-Geweben abweichen. Eine Korrelation dieser Beobachtung mit histopathologischen Befunden belegt, dass bei diesem Tier im Gegensatz zu den anderen behandelten Tieren keine Minimalveränderungen im Lebergewebe auftraten.

Die Protein-Profile der Woche 25 zeigten basierend auf dieser Clustermethode eine Reihe an Divergenzen. So fallen nicht einmal alle Kontrolltiere zusammen in eine Gruppe. Während die Leberprofile von vier Tieren zusammenklustern, zeigen die Protein-Spektren zweier Tiere eine starke Abweichung, wobei das Gewebe eines Tieres sogar eine große Ähnlichkeit mit behandelten Leberproben zeigt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass allein schon der Alterungsprozess der Rattenlebern zu degenerativen Veränderungen führt, die den durch die NNM-Behandlung ausgelösten molekularen Modifikationen sehr ähnlich sein können. Diese Beobachtung erscheint im Hinblick auf die klassische Bewertung von Kanzerogenesestudien besonders wichtig und sollte daher stets berücksichtigt werden. Außerdem lassen sich mittels SOM-Clustering auf der Basis der SELDI-Profile die behandelten Lebern in drei Untergruppen separieren. Auch hier kann die histopathologische Auswertung zur Erklärung beitragen, die zwischen Tieren mit und ohne Neoplasie-Befund unterscheidet. Ein behandeltes Tier wird mit dieser Methode

jedoch als Ausreisser identifiziert, da es trotz Neoplasie-Befund eine große Distanz zu den übrigen Tumor-tragenden Tieren besitzt. Schon die Protein-Spektren des Lebergewebes ließen diese Divergenz erkennen, was zusammenfassend mit den oben beschriebenen Resultaten als Beweis gilt, dass die SELDI-Technologie in der Lage ist, kleinste molekulare Veränderungen mit einer großen Sensitivität zu detektieren, die makro- und mikroskopisch nicht erkennbar sind. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die hier verwendeten, neuen, bioinformatischen Analyseverfahren besonders gut geeignet sind, die maximale Information aus einer Tierstudie zu gewinnen.

4.6 Schlußbetrachtung

Die aus der BMBF-Studie gewonnenen Erkenntnisse ergeben deutliche Hinweise darauf, dass proteomische Methoden der Molekularen Toxikologie für eine verbesserte Risikobewertung von Substanzen, insbesondere von Chemikalien, herangezogen werden können. Das große Potenzial der hier vorgestellten Technologien, 2DE/MS und SELDI, für eine sensitive Detektion kleinster gewebsspezifischer Veränderungen kann durch eine Reihe von Ergebnissen belegt werden. Weitere Hinweise sind in der Literatur zu finden (Bandara et al., 2002; Iida et al., 2003; Ramos et al., 2003; Waring et al., 2001). Insbesondere die 2DE/MS-Daten zeigen, dass auf diesem Wege wertvolle mechanistische Informationen aus Tierversuchen gewonnen werden können. Wenn auch die SELDI-Technologie noch Limitationen im Bereich der Proteinidentifizierung erkennen lässt, liefert die vorliegende Studie wertvolle Anhaltspunkte für eine detaillierte Erfassung von Protein-Expressionsprofilen, die zusammen mit den bioinformatischen Analysemethoden eine verfeinerte Interpretation der molekularen Prozesse in der Zelle ermöglichen. Den hier beschriebenen zellulären Prozessen können Schlüsselproteine zugeordnet werden, die als potenzielle Biomarker kandidieren. Im Vergleich zu konventionellen Endpunkten sind die biochemischen Endpunkte mit diesen Markerproteinen früher im Kanzerogeneseprozess erkennbar, was als fundamentaler Fortschritt in einer verbesserten Prädiktion der Toxikologie angesehen werden kann. Da-



durch wird eine Verkürzung der Tierexperimente zur Abschätzung des toxischen/kanzerogenen Potenzials von Stoffen denkbar, die letztendlich eine Einsparung der Versuchstiere in den Studien bedeuten würde.

Literatur

- Bandara, L. R. and Kennedy, S. (2002). Toxicoproteomics – a new preclinical tool. *Drug Discov. Today* 7, 411-418.
- Bannasch, P., Hacker, H., Klimek, F. and Mayer, D. (1982). Hepatocellular glycosylation and related pattern of enzymatic changes during hepatocarcinogenesis. *Adv. Enzyme Regul.* 22, 97-121.
- Bannasch, P., Nehrbass, D. and Kopp-Schneider, A. (2001). Significance of hepatic preneoplasia for cancer chemoprevention. In A. B. Miller, H. Bartsch, P. Boffetta, L. Dragsted and H. Vainio (Ed.), *Biomarkers in Cancer Chemoprevention* (223-240). IARC Scientific Publications.
- Combes, R., Barratt, M. and Balls, M. (2003). An Overall Strategy for the Testing of Chemicals for Human Hazard and Risk Assessment under the EU REACH System. *ATLA* 31, 7-19.
- Degterev, A., Boyce, M. and Yan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* 22 (53), 8543-8567.
- Elcombe, C. R., Odum, J., Foster, J. R. et al. (2002). Prediction of rodent nongenotoxic carcinogenesis: evaluation of biochemical and tissue changes in rodents following exposure to nine nongenotoxic NTP carcinogens. *Environ. Health Perspect.* 110, 363-375.
- Görg, A. and Weiss, W. (2000). Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. In T. Rabilloud (Ed.), *Proteome research: two-dimensional gel electrophoresis and identification methods* (57-93). Wien, New York: Springer-Verlag.
- Groopman, J. D. and Kensler, T. W. (1999). The light at the end of the tunnel for chemical-specific biomarkers: daylight or headlight? *Carcinogenesis* 20, 1-11.
- Hiroiyuki, T., Shoji, F., Hideki, W. et al. (2003). Value of GST-P Positive Preneoplastic Hepatic Foci in Dose-Response Studies of Hepatocarcinogenesis: Evidence for Practical Thresholds with Both Genotoxic and Nongenotoxic Carcinogens. *Toxicol. Pathology* 31, 80-86.
- Hutchens, T. W. and Yip, T. T. (1993). New Desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 7, 576-576.
- Iida, M., Anna, C. H., Hartis, J. et al. (2003). Changes in global gene and protein expression during early mouse liver carcinogenesis induced by non-genotoxic model carcinogens oxazepam and Wyeth-14,643. *Carcinogenesis* 24, 757-770.
- Ittrich, C., Deml, E., Oesterle, D. et al. (2003). Prevalidation of a rat liver foci bioassay (RLFB) based on results from 1600 rats: a study report. *Toxicologic Pathology* 31, 60-79.
- Kohen, R. and Nyska, A. (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Pathology* 30, 620-650.
- MacGregor, J. T., Farr, S., Tucker, J. D. et al. (1995). New molecular endpoints and methods for routine toxicity testing. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26, 156-173.
- Mayer, D., Metzger, C., Leonetti, P. et al. (1998). Differential expression of key enzymes of energy metabolism in preneoplastic and neoplastic rat liver lesions induced by N-nitrosomorpholine and dehydroepiandrosterone. *Int. J. Cancer* 79, 232-240.
- Merrick, A. and Tomer, K. B. (2003). Toxicoproteomics: a parallel approach to identifying biomarkers. *Environ. Health Perspect.* 111, A578-A579.
- Moore, M. A., Tsuda, H., Tamano, S. et al. (1999). Marriage of a medium-term liver model to surrogate markers – a practical approach for risk and benefit assessment. *Toxicol. Pathol.* 27, 237-242.
- Oberemm, A. (2001). Molekulare Biomarker zur schnellen Erfassung und Bewertung toxischer Chemikalieneffekte. *UMID* 2, 3-6.
- Petricoin, E. F., Ardekani, A. M., Hitt, B. A. et al. (2002). Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 359, 572-577.
- Ramos, K. S. and Goehl, T. J. (2003). Toxicogenomics: An EHP section. *Environ. Health Perspect.* 111, A328-A328.
- Richter-Reichhelm, H. B. (1989). View of the regulatory use of rat liver foci data in the Federal Republic of Germany. *Toxicol. Pathol.* 17, 721-723.
- Schramek, K., Schumacher, M., Wilflingseder, D. et al. (1997). Differential expression and activation of MAP kinases in dedifferentiated MDCK-focus cells. *Am. J. Physiol.* 272(2Pt1), C383-391.
- Sills, R. C., French, J. E. and Cunningham, M. L. (2001). New models for assessing carcinogenesis: an ongoing process. *Toxicol. Lett.* 120, 187-198.
- Tennant, R. W. (2002). The national center for toxicogenomics: Using new technologies to inform mechanistic toxicology. *Environ. Health Perspect.* 110, A8-A10.
- Toraason, M., Andersen, M., Bogdanffy, M. S. et al. (2002). Improving risk assessment: Toxicological research needs. *Human and Ecological Risk Assessment* 8, 1405-1419.
- Waring, J. F., Ciurlionis, R., Jolly, R. A. et al. (2001). Microarray analysis of hepatotoxins in vitro reveals a correlation between gene expression profiles and mechanisms of toxicity. *Toxicol. Lett.* 120, 359-368.
- Weber, E. and Bannasch, P. (1994). Dose and time dependence of the cellular phenotype in rat hepatic preneoplasia and neoplasia induced in stop experiments by oral exposure to N-nitrosomorpholine. *Carcinogenesis* 15 (6), 1227-1234.
- Wiesner, A. (2002). Das ProteinChip-System von Ciphergen Biosystems Inc.. *Transcript. Laborwelt III(1)*, 47-49.

Danksagung

Für die finanzielle Förderung des Vorhabens (Projekt Nr. 0312619) möchten wir dem Projektträger Jülich des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) danken.

Korrespondenzadresse

Dr. Michaela Kröger
Merck KGaA
Institut für Toxikologie
Frankfurter Straße 250
D-64293 Darmstadt
Tel.: +49-6151-723587
Fax: +49-6151-727673
E-Mail: michaela.kroeger@merck.de