

**EFFEKTER AV BROMERTE
FLAMMEHEMMERE PÅ GENEKSPRESJON I
MUSELEVER.
EN TOKSIKOGENOMISK TILNÆRMING**

av
MARIA A. LANDIN

Cand. Scient. thesis



**Universitetet i Oslo
Biologisk Institutt
Toksikologi
Utført ved Institutt for Oral Biologi
HØSTEN 2004**

Hovedfagsoppgave i toksikologi for
Cand.scient.graden

Effekter av bromerte flammehemmere på genekspresjon i muselever
En toksikogenomisk tilnærming.

av
Maria Augusta dos
Santos Silva
Landin

Universitetet i Oslo
Biologisk institutt,
Avdeling for Toksikologi
Utført ved Institutt for
Oral Biologi
Høsten 2004

Forord

Denne oppgaven i toksikologi/toksikogenomikk ble utført ved Institutet for Oral Biologi, Odontologisk Fakultet i perioden januar 2002 til juli 2004, og er et ledd i cand.scient.graden ved Biologisk Institutt, avdeling for Toksikologi, Universitetet i Oslo.

Jeg vil først og fremst takke hovedveileder professor Harald Osmundsen for god veiledning, inspirasjon, kritikk og framskaffelse av et godt faglig miljø. Professor Sigurd From vil jeg takke for muligheten til å drive dyreforsøk med transgene mus. En varm takk til professor Frode Fonnum og Trine Reistad for hjelp til valg av hovedfagsoppgave. Jeg vil spesielt takke min internveileder Jørgen Stenersen for gode råd og moralsk støtte under arbeidet med hovedoppgaven.

En spesiell takk går til Toril og Per Woldene for uunnværlig hjelp med rettskrivning av norsken i oppgaven. Jeg vil takke avdelingsingeniørene Toril Woldene, Bente Gehrken, Ann-Kristin Hansen, Renate Hars, Emenike Ribs K.Erbe og Stian Kristensen (IT) for hjelp med praktisk arbeid, støtte og gode råd. Jeg vil også takke, Benny Geronimo og Nicky for all praktisk hjelp på dyrestallen. Videre takker jeg alle ved Institutt for Oral biologi som har hjulpet meg og gjort IOB til en hyggelig og inspirerende arbeidsplass og et flott sted å gjennomføre hovedoppgaven.

Til slutt vil jeg takke min far, Filomena, Claudia Cathrine, Elin og arbeidskollegaer som har vært hjelpsomme, forståelsesfulle og inspirerende.

Blindern, november 2004

Maria Augusta Landin

Innholdsfortegnelse

| | |
|--|-----------|
| 1 Sammendrag | 8 |
| 1.1 Resultater fra behandling med HBCD eller IBP..... | 8 |
| 2 Forkortelser | 10 |
| 3 Innledning | 12 |
| 3.1 Toksikogenomikk | 12 |
| 3.1.1 Eksponering til dioksin gir opphav til bestemte genekspresjonsmønstre..... | 12 |
| 3.1.2 cDNA mikromatrise med 9K sonder ble brukt for å kartlegge TCDD respons gener..... | 14 |
| 3.2 Toksikogenomikken ser nærmere på antioksidant respons | 15 |
| 3.3 Bruk av mikromatriser for å kartlegge genuttrykksmønstre etter eksponering for peroksisomproliferatorer | 20 |
| 3.4 Bromerte flammehemmere | 28 |
| 3.4.1 Kjemisk struktur av IBP og HBCD..... | 28 |
| 3.4.2 Kjemiske egenskaper..... | 28 |
| 3.4.3 Bromerte flammehemmeres funksjon..... | 28 |
| 3.4.4 Forbrenningsprosessen..... | 29 |
| 3.4.5 Virkningsmekanismen for bromerte flammehemmere..... | 29 |
| 3.4.6 Bioakkumulering av HBCD og IBP..... | 29 |
| 3.4.7 Nedbryting av HBCD og IBP..... | 30 |
| 3.4.8 Biologiske effekter av eksponering til HBCD eller IBP..... | 30 |
| 3.4.9 Akutte, sub-kroniske og kroniske toksikologiske effekter..... | 30 |
| 4 Materialer | 32 |

| | |
|---|----|
| 5 Metoder | 33 |
| 5.1 Behandling av forsøksdyrene | 33 |
| 5.1.1 Transport, oppstalling, kost og stell av dyr..... | 33 |
| 5.1.2 Behandling..... | 34 |
| 5.1.3 Endepunkter..... | 34 |
| 5.1.4 Prøveuttak og preparering..... | 35 |
| 5.1.5 Avliving av dyrene..... | 35 |
| 5.1.6 Behandling med fôr tilsatt HBCD eller IBP..... | 35 |
| 5.2 Isolering av total RNA | 36 |
| 5.2.1 Isolering av RNA med RNAwiz™..... | 36 |
| 5.2.2 DNasebehandling..... | 39 |
| 5.3 Isolering av RNA til mikromatriseanalyser | 39 |
| 5.3.1 RNeasy Mini Protokoll til RNA isolering..... | 39 |
| 5.3.2 Måling av RNA konsentrasjon..... | 39 |
| 5.3.3 OD måling..... | 40 |
| 5.3.4 Ribogreen-metode..... | 40 |
| 5.4 Ett-trinnsRT-PCR | 43 |
| 5.4.1 QIAGEN ett-trinnsRT-PCR..... | 46 |
| 5.4.1.2 Primere til RT-PCR..... | 46 |
| 5.5 Elektroforese | 48 |
| 5.5.1 Kvantitering av mRNA-mengde med Total Lab. V2..... | 49 |
| 5.6 Membranmatriser | 51 |
| 5.6.1 Nonrad-GEArray TM Q Protokoll..... | 54 |
| 5.6.1.1 Tillaging av Buffer B..... | 54 |
| 5.6.1.2 Merkingssmiks..... | 55 |
| 5.6.1.3 Merking av RNA (prøvene) med Biotin-16-2'-dUTP..... | 55 |
| 5.6.1.4 Prehybridisering med laksemelke (DNA)..... | 55 |
| 5.6.1.5 Prøvedenaturering..... | 56 |

| | |
|--|-----------|
| 5.7 Vasking og detektering..... | 56 |
| 5.7.1 Vasking..... | 56 |
| 5.7.2 Detektering..... | 56 |
| | |
| 5.8 Mikromatriser..... | 57 |
| 5.8.1 Expression Array Detection Kit (2-trinns hybridisering) til mikroarrays (v.30)..... | 61 |
| 5.8.1.1 cDNA syntese (innsetting av dimerer med RNA capture sequence)..... | 62 |
| 5.8.1.2 RT-PCR..... | 63 |
| 5.8.1.3 Prevasking av mikromatrise..... | 64 |
| 5.8.1.4 cDNA-rensing og oppkonsentrering..... | 64 |
| 5.8.1.5 Hybridisering (av cDNA til mikromatrise)..... | 64 |
| 5.8.1.6 Vasking etter cDNA-hybridisering..... | 65 |
| 5.8.1.7 3DNA-hybridisering..... | 65 |
| | |
| 5.9 Statistikk..... | 68 |
| 5.9.1 T-test..... | 68 |
| 5.9.2 Anova..... | 69 |
| 5.9.3 K-means klustering..... | 69 |
| 5.9.4 Principal Component Analysis (PCA)..... | 69 |
| | |
| 5.10 Måling av enzymaktivitet..... | 69 |
| 5.10.1 Måling av peroksisomal β -oksidasjon..... | 71 |
| 5.10.2 Måling av katalaseaktivitet..... | 72 |
| 5.10.3 Bestemmelse av proteininnholdet i homogenatet..... | 73 |

| | |
|--|-----------|
| 5.11 Fiksering og farging av peroksisomer i leversnitt (EM analyse) ... | 74 |
| 5.11.1 Preparering av vevsbiter til elektronmikroskop (EM)... | 75 |
| 6 Resultater..... | 77 |
| 6.1 Effekter av HBCD- eller IBP-behandling på kroppsvekt hos villtype (balbc) mus..... | 78 |
| 6.1.1 Effekter av HBCD-eller IBP-behandling på levervekt hos villtype (balbc) mus..... | 78 |
| 6.1.2 Effekter av HBCD-eller IBP-behandling på nyrevekt hos villtype (balbc) mus..... | 78 |
| 6.2 Effekter av HBCD- eller IBP-behandling på kroppsvekt hos transgene og villtype ♂ mus..... | 79 |
| 6.2.1 Effekter av HBCD-eller IBP-behandling på kroppsvekt hos transgene- og villtype ♀ mus..... | 80 |
| 6.2.2 Effekter av HBCD-eller IBP-behandling på levervekt hos transgene og villtype ♀ mus..... | 81 |
| 6.2.3 Effekter av HBCD-eller IBP-behandling på levervekt hos transgene og villtype ♂ mus..... | 81 |
| 6.2.4 Effekter av HBCD-eller IBP-behandling på nyrevekt hos transgene og villtype ♀ mus..... | 82 |
| 6.2.5 Effekter av HBCD-eller IBP-behandling på nyrevekt hos transgene og villtype ♂ mus..... | 83 |
| 6.3 Effekter av behandling med 1% HBCD eller IBP på mRNA-nivå..... | 84 |
| 6.3.1 Effekter av behandling med 4 % HBCD eller IBP på mRNA-nivå..... | 85 |
| 6.4 Membranmatriser..... | 86 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 6.4.1 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på gener assosiert med apoptose i muselever..... | 86 |
| 6.4.2 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener involvert i oksidativt-stress i muselever..... | 87 |
| 6.4.3 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av Hsp -relaterte gener i muselever..... | 89 |
| 6.4.4 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener assosiert med DNA reparasjon i muselever..... | 90 |
| 6.4.5 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener implisert i cellesyklus (I) i muselever..... | 91 |
| 6.4.5.1 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener implisert i cellesyklus (I I) i muselever..... | 92 |
| 6.4.6 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på inflammasjonsrespons i muselever..... | 93 |
| 6.4.7 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener som koder for proteiner i ekstracellulær matriks(ECM) i muselever..... | 94 |
| 6.4.7.1 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på gener som koder for proteiner i ekstracellulær matriks(ECM) (II) og adhesjonsmolekyler i muselever..... | 95 |
| 6.4.8 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på gener som koder for vekstfaktorer (I) i muselever..... | 96 |
| 6.4.8.1 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på gener som koder for vekstfaktorer (II) i muselever..... | 97 |
| 6.4.8.2 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på gener som koder for vekstfaktorer (III) i muselever..... | 98 |
| 6.5 | Mikromatriser..... | 99 |
| 6.5.1 | Effekter av HBCD-behandling på ekspresjon av gener som kan påvirke apoptose eller celleproliferasjon (I)..... | 100 |
| 6.5.1.1 | Effekter av HBCD-behandling på ekspresjon av gener som kan påvirke apoptose (II) og celleproliferasjon..... | 101 |
| 6.5.2 | Effekter av HBCD-behandling på ekspresjon av cytokrom P450-gener..... | 102 |
| 6.5.3 | Effekter av HBCD-behandling på ekspresjon av gener som koder for fase II detoksifiseringsenzymet..... | 103 |
| 6.5.4 | Effekter av HBCD-behandling på ekspresjon av gener som koder for proteiner i cytokrom oksidasekomplekset | 104 |
| 6.6 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på peroksisomal β-oksidasjonsaktivitet i ♀ muselever..... | 105 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 6.6.1 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på peroksisomal β -oksidasjonsaktivitet i ♂ muselever..... | 106 |
| 6.6.2 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på peroksisomal β -oksidasjonsaktivitet i villtype (balbc) muselever..... | 107 |
| 6.7 | Effekter av behandling med enten HBCD eller IBP på katalaseaktivitet i muselever..... | 108 |
| 6.7.1 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på katalaseaktivitet hos PPAR- α knockout og villtype CD-1 ♀ mus..... | 108 |
| 6.7.2 | Effekter av behandling med enten HBCD eller IBP på katalaseaktivitet hos PPAR- α knockout og villtype CD-1 ♂ mus..... | 109 |
| 6.7.3 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på katalase aktivitet hos villtype balbcmus..... | 110 |
| 6.8 | Effekter av HBCD-eller IBP-behandling på dødelighet | 111 |
| 6.9 | EM analyse av leversnitt (I)..... | 112 |
| 6.9.1 | EM analyse av leversnitt (II)..... | 113 |
| 7.0 | Diskusjon..... | 114 |
| 7.1 | Effekt av behandling med HBCD eller IBP på kroppsvekt, levervekt og nyrevekt..... | 114 |
| 7.1.1 | Kroppsvekt..... | 114 |
| 7.1.2 | Levervekt..... | 114 |
| 7.1.3 | Nyrevekt..... | 114 |
| 7.2 | Effekter av behandling med enten HBCD eller IBP på mRNA-nivå..... | 115 |
| 7.2.1 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på peroksisomal proliferasjon..... | 115 |
| 7.2.1.1 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på mRNA-nivå av Acyl-CoA oksidase..... | 115 |
| 7.2.1.2 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på mRNA-nivå av PPAR- α | 116 |
| 7.2.2 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på mRNA-nivå av NADPH-cytokrom P450 reduktase..... | 116 |
| 7.2.3 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på mRNA-nivå av tidlig responsgener..... | 116 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 7.3 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på mRNA-nivå av β-aktin.. | 117 |
| 7.4 | Membranmatriser..... | 118 |
| 7.4.1 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener assosiert med apoptose..... | 118 |
| 7.4.1.1 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener involvert i oksidativt-stress..... | 119 |
| 7.4.1.2 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av Hsp-gener og tilknyttede gener | 120 |
| 7.4.1.3 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener assosiert med DNA-reparasjon..... | 120 |
| 7.4.1.4 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener implisert i cellyklus..... | 121 |
| 7.4.1.5 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener som uttrykkes ved inflammasjon..... | 122 |
| 7.4.1.6 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener som koder for proteiner i ekstracellulær matriks og for adhesjonsmolekyler..... | 123 |
| 7.4.1.7 | Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener som koder for vekstfaktorer..... | 124 |
| 7.5 | Mikromatriser..... | 125 |
| 7.5.1 | Effekter av HBCD-behandling på ekspresjon av gener som kan påvirke apoptose og cellevekst/proliferasjon..... | 125 |
| 7.5.1.1 | Effekter av HBCD-behandling på ekspresjon av gener som koder for proteiner i cytokrom oksidasekompleks i muselever | 130 |
| 7.5.1.2 | Effekter av HBCD-behandling på ekspresjon av P450 i muselever... | 132 |
| 7.6 | PPAR-α regulering av genekspressjon..... | 133 |
| | Konklusjon..... | 134 |
| 8 | Referanser..... | 135 |

1. Sammendrag

Toksikogenomikk forener metoder brukt i klassisk toksikologi og metoder fra molekylær biologi. Den nye disiplinen bruker transkripsjonal genprofilering som et ledd i risikovurdering for både nye og gamle kjemikalier som da kan testes for potensiell toksisitet på molekylærnivå. Dette gjøres ved å monitorere mRNA-nivået for mange tusen gener av gangen. Slik overvåking kan gi oss et bilde om hvordan kjemikalier eller andre forbindelser påvirker det molekylære maskineriet før synlige skader oppstår.

Flammehemmere tilsettes produkter og materialer slik at risiko for antennelse og utvikling av brann reduseres betraktelig.

HBCD og IBP er to av totalt 70 ulike bromerte organiske forbindelser. Disse brukes som flammehemmere.

Toksikogenomiske metoder og teknikker ble brukt for å undersøke rapporten fra American Chemical Council CAS No.3194556 hvor industrien i USA utførte en risikovurdering for HBCD. Her kartlegges de biologiske effektene hos villtype og transgene mus etter eksponering for HBCD. Basert på denne undersøkelsen konkluderte American Chemical Council med at bruk av HBCD ikke utgjør noe miljørisiko.

Total-RNA ble isolert fra lever og nyrer fra Balbc- og CD-1-villtypemus samt fra PPAR- α -knockoutmus. RNA konsentrasjon ble målt ved OD 260nm og med Ribogreen-metode. RNA-integritet ble bekreftet ved bruk av RT-PCR (revers-transkriptase). Deretter ble RNA amplifisert, merket og omgjort til cDNA. Dette ble hybridisert på membranmatriser eller mikromatriser for å kartlegge forandringer i genekspressjon. Resultatene fra membranmatrisene og fra mikromatrisene ble bekreftet med RT-PCR. Det ble kjørt enzymanalyser for katalase og acyl-CoA oksidase for å validere resultatene fra mikromatrisene.

1.1 Resultater fra HBCD eller IBP behandling:

Kroppsvekt

Behandling med HBCD eller IBP viste ikke endret kroppsvekt hos CD-1-villtype hannmus mens hunnmus viste betydelig tap av kroppsvekt. HBCD behandling førte til signifikant økning av kroppsvekt hos både PPAR- α knockout hunn- og hannmus.

Levervekt

Behandling med HBCD eller IBP viste forskjellige effekter på levervekt hos hann- og hunnmus både hos villtype og PPAR- α knockoutmus. Behandlingen førte til tap av levervekt både hos PPAR- α -knockout og villtype hunnmus mens hannmus viste signifikant økning av levervekt.

Nyrevekt

Behandling med HBCD eller IBP ga forskjellige effekter på nyrevekt hos PPAR- α knockout- og villtypemus. IBP ga reduksjon i nyrevekt både hos villtype og PPAR- α knockout hunnmus. HBCD-behandling førte til signifikant økning av nyrevekt hos PPAR- α knockoutmus.

RT-PCR

Behandling med HBCD eller IBP viste samme effekt på mRNA-mengde av utvalgte gener i muselever hos villtypemus. HBCD- eller IBP-behandling førte til økning av mRNA- mengder for gener implisert i metabolisme av xenobiotika, tidlig respons med unntak av mRNA mengder for oksidase og PPAR- α hvor behandling med 4 % HBCD førte til økte mRNA mengder mens 4 % IBP førte til signifikant reduksjon.

Membranmatriser

Behandling med HBCD og IBP ga forskjellige resultater for ekspresjon av gener (i muselever) implisert i varmessress (Hsp), oksidativt-stress, reparasjon av DNA og cellesyklus. Det samme gjelder for gener som koder for proteiner i ekstracellulær matriks (ECM). HBCD-behandling førte til suppresjon mens IBP førte til induksjon av disse genene.

Behandling med HBCD eller IBP viste samme uttrykksmønstre på gener som uttrykkes ved inflammasjon og for gener som koder for vekstfaktorer, samt for gener som koder for adhesjonsmolekyler.

Mikromatriser

Hos villtypemus førte behandling med HBCD til induksjon av gener (i muselever) som kan påvirke apoptose, energi omsetning, oksidativt-stress, xenobiotika metabolisme og cellesyklus. Hos PPAR- α knockoutmus ble disse genene ikke tilstrekkelig induert pga at PPAR- α -genet er slått av.

2. Forkortelser

| | |
|------------------------|--|
| AHR | Aryl hydrocarbon receptor |
| ARNT | Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator |
| B(a)P | Benzo(a)pyrene |
| Bax | BCL2-associated X protein. |
| BCF | Bioakkumuleringsfaktor |
| BHA | Butylert hydroksyanisol (Phenolic antioksidant) |
| CAT | Catalase |
| cDNA | Complementary deoxyribonucleic acid |
| CIP1 | Inhibits cyclin-dependent kinases (cdks)(p53-binding protein) |
| CX | Cycloheximide |
| CYP | Cytochrome P450 |
| DEHP | Dietylheksylsulfat |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| DRE | Dioksin respons element |
| EM | Elektronmikroskop |
| EPM | Effector pathway map |
| EpRE | Elektrofilrespons element |
| FasL | Fas-ligand |
| FMO5 | Flavin containing monooxygenase 5 |
| GPO | Glutation peroksidase |
| GST | Glutation transferase |
| GST-YA | Glutation transferase gjær/yeast |
| HBCD | 1,2,5,6,9,10-heksabromo-cyklododecan |
| HO1 | Murin hem oksygenase1 |
| IBP | 4,4'-isopropylidenebis(2,6-dibromofenol) |
| IBP | 4,4'-Isopropylidenbis[2,6-dibromo-] Phenol (TBBPA) |
| IGF-BP | Insulin-like growth factors (IGFs) binding proteins (BPs) |
| IL | Interleucin |
| LD₅₀ | Dosen der femtiprosent av forsøksdyrene dør |
| MDM2 | Mouse double minute 2 (p53-binding protein) |
| MEPT | Map of effector pathway of toxicants |
| mRNA | Messenger ribonucleic acid |
| MRP | Multidrug resistans assosietad protein |
| MTD | Maximal tolerable dose |
| NADPH | Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat |
| NQO1 | Quinon oksiredutase |
| Nrf2 | Erytroid transkripsjon faktor |

| | |
|---------------------------------|---|
| PCA | Principal Component Analysis |
| PCB | Polyklorinerte bifenyler |
| PCL | Programmert celleoverlevelse |
| PPAR-α | Peroksisom proliferator reseptor alfa |
| RB | Retinoblastom |
| RNA | Ribonucleic acid |
| ROS | Reactive oxygen species |
| RT-PCR | reverse transcriptase polymerase chain reaction |
| RXR | Retinoid X reseptor |
| SOD | Super oxide dismutase |
| tBHQ | Tertbutylquinon |
| TCDD | 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin |
| TGF-β | Tumor growth factor beta |
| TNF-α | Tumor necrose factor alfa |
| Tris | Hydroksymetyl aminometan |
| Triton X-100 | Detergent |
| w/w | Weight/weight |
| WY-16,463 | ((4-kloro-6[2,3-xylidino]-2-pyrimidinyltio)edikksyre) |
| XRE | Xenobiotic response element |

3. Innledning

3.1 Toksikogenomikk

Toksikogenomikk er en sammensmelting av klassisk toksikologi og molekylær-biologiske metoder til bruk for å undersøke tidlige effekter ved eksponeringen til et fremmedstoff. En sannsynlig første målbar respons, hvis en celle eller organisme eksponeres for et fremmedstoff, er forandringer i nivået av utvalgte mRNA-molekyler. Vi kan måle mRNA-nivåene, og dermed etablere et genuttrykksmønster, som kan brukes som et redskap for å forklare mekanismene for observert toksisitet.

Fremmedstoffer påvirker cellene som i sin tur setter i gang forsvars-og kontrollmekanismer som fører til endringer i genuttrykk etter et bestemt ekspresjonsmønster. Dette kan foreligge før observerbare toksikologiske effekter. Toksikogenomikk kan dermed anvendes til å predikere toksisitet og til å påvise tidlig eksponering for et fremmedstoff.

Toksikogenomiske metoder er brukt i flere toksikologiske studier for å kartlegge endringer i genuttrykk etter eksponering for dioksiner eller PCB og andre CYP-induserende stoffer. Dette er stoffer som tilsynelatende er godt kartlagt av klassisk toksikologi m.h.t. biologiske effekter, men mekanismene som fører til disse biologiske effektene er ofte lite kjent.

3.1.1 Eksponering til dioksin gir opphav til bestemte gen ekspresjonsmønstre

Det er kjent at tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) dannes som et biprodukt under forbrenning av industriavfall og fossilbrensel. Dioksin bioakkumuleres og er den mest studerte miljøgiften [Van den, B.M. et al. CRC Crit. Rev. Toxicol., 24,1,1994].

Dette studiet tar opp tidligere studier utført med klassiske toksikologiske metoder som beskriver induksjonsmekanismer for *CYP1A1* og *CYP1A2* ved Ah-reseptor mediert mekanisme.

Dioksineksponering påvirker ekspresjon av ellers strengt regulerte gener. Til tross for at de biologiske effektene av dioksineksponeringen er godt kartlagt, har [Van den, B.M. et al. CRC Crit. Rev. Toxicol., 24,1,1994 ; Pier Alberto Bertazzi et al.1993 ; Lennart Hardell 1973] studiet kastet lys over nye funksjoner og regulerings-

mekanismer av aryl hydrokarbon reseptoren (AHR). Det er allment akseptert i klassisk toksikologi at effekter av dioksineksponeringen er en konsekvens av binding av dioksin til AHR reseptor .

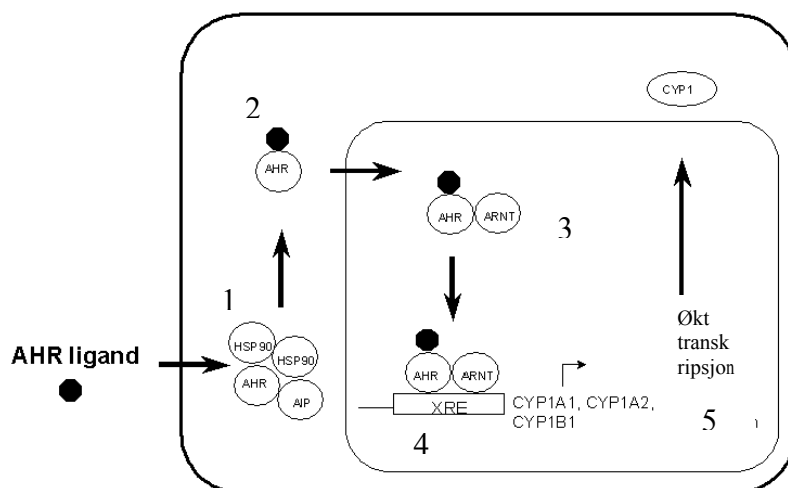
De fleste studiene er designet til å kartlegge induksjon av CYP1A1 ved dioksinavhengig aktivering av AHR. AHR-reseptoren tilhører en transkripsjonsfaktorfamilie som danner et kompleks med to HSP90proteiner(1). Ved binding av tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) skjer det en konformasjonsendring slik at komplekset dissosierer (2) og vandrer til cellekjernen og danner en dimer med den aromatiske kjernereseptortransporter (ARNT)(3)[Hoffman, E.C. et al. 1991]. Heterodimeren binder seg til promotoren for AHRE (4) også kalt dioksinrespons-elementer (DRE) eller xenobiotiske responselementer (XRE). Dette forårsaker en endring i transkripsjonshastighet (se figur1).

Noen av de induserte genene koder for fase I og fase II detoksifiserende enzymene som CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, GST-YA subenhet, NAD(P)H oksidoreduktase-1, UDP-glukoronosyltransferase-1A6 og aldehyd-3-dehydrogenase [Nebert, D. W. 1987].

Bruk av (*Ahr*^{-/-}) [Fernandez-Salguero, P. et al.1995] gjorde det mulig å studere hvilken rolle AHR spiller i ekspresjon av gener, implisert i metabolismen av xenobiotica i cellyklus, i signaloverføring og i apoptose. Studier med *Ahr*-knockoutmus har vist at de toksikologiske og patologiske effektene uteblir i TCDD-mediert induksjon tross at dosene er 10 ganger høyere enn dosene som gir alvorlige toksiske effekter hos villtypemus (*Ahr*^{+/+}). Ligandaktivering av AHR påvirker transkripsjonen av en nyopptaget *AH*-repressor (AHRR). Dersom AHRR virker på ARNT og forårsaker nedregulering av ekspresjon av AHR, kan dette forklare den vevsavhengige sensitiviteten og variabiliteten. AHR er mest uttrykt i lungene, moderat uttrykt i lever, thymus, placenta, hjerne, hjerte og mildt og lite uttrykt i skjelettmuskulatur.

Ekspresjon av AHR påvirkes av eksponering til TCDD, fenobarbital, serum, mitogener, retinsyre og TGF- β [Pollenz, R.S. 1966]. Behandling av cellekulturer med kjemikalier som har innvirkning på histon-deacetylase (HDAC) viser at ekspresjon av AHR er avhengig av kromatinstrukturen [Garrison, P.M. et al. 2000].

Elferink, C.J. et al. fant ut at AHR påvirker ekspresjon av retinoblastoma protein (RB) [Elferink, C.J. et al.2001]. Dette kan være kritisk for regulering av transkripsjon av gener involvert i cellesyklus.



Figur 1 AHR reseptor danner et kompleks med HSP90 (1). Ved ligandbinding skjer det en konformasjonsendring og komplekset dissosierer og vandrer til cellekjernen (2), hvor det danner en dimer med ARNT (3). Heterodimeren binder seg til AHRE promotoren (4). Dette fører til endring i transkripsjonshastighet (5).

3.1.2 cDNA mikromatrise med 9K sonder ble brukt for å kartlegge TCDD responsgener

Tre nye toksikogenomiske studier [Freuh, F.W. et al. 2001; Thomas, R. S. et al.2001; Puga, A. et al. 2000], førte til oppdagelse av nye signalveier (pathways) for dioksinmediert genregulering.

Det første studiet er et *in vitro* forsøk hvor den humane HepG2 cellelinjen ble brukt for å etablere en database for TCDD respons gener,[Puga, A. et al. 2000].

Eksponering av disse cellene med 10nM i 4 og 8 timer med TCDD førte til endring i ekspresjon av 300 gener, herav 114 gener som ble oppregulert og 196 gener som ble nedregulert med en faktor på 2.1 eller mer. Noen av disse genene er direkte knyttet til sentrale cellulære prosesser som kalsiumregulering, apoptose, Ras/MAP kinase signalvei, celle-adhesjon, utvikling av kreft og metastasering, xeno-metabolisme og proteintransport. Samme cellelinje ble også eksponert for Benzo-a-pyren (BaP), og

dette påvirket ekspresjon av gener som regulerer endotelial NO syntetase, PAI-1, VEGF, FGL-2, troponin og kalmulin-bindende proteiner. Ekspresjon av gener som regulerer cellesyklus og apoptose ble også berørt. Freuh, F.W. et al., eksponerte samme cellelinje i 18 timer med 10nM TCDD, og kunne konstatere at 85 gener ble oppregulert og 27 ble nedregulert. Mange av de berørte genene er de samme som nevnt over.

Det ble brukt cycloheksimide (CX) i overnevnte forsøk. Cycloheksimide ble brukt for å hemme proteinsyntesen for å kunne skille mellom effekter på genekspresjon eller på proteinsyntesen.

Effektene av TCDD *in vivo* ble undersøkt av Thomas, R. S. et al., 2001. Målet med studiet var å identifisere et felles gensett hos mus som kunne brukes til å predikere respons for xenobiotika. I dette studiet ble C57B1/6J mus eksponert til TCDD. RNA isolert fra lever av behandlede mus ble sammenliknet med RNA isolert fra kontrollgruppen. Toksiske effekter av eksponeringen med PCB-153, Aroklor1260, fenobarbital, Cipro, Wy-16,463 (de to siste er peroksisomproliferatorer), TNF- α , lipopolysakkaride, IL-6 (som er inflamatorisk) og hypoksiinduserende stoffer som kobolt og fenylydrazin, ble sammenliknet med resultatene fra TCDD. Dette frembragte mønstre basert på kjemisk struktur og mRNA ekspresjon. Ett sett med 12 gener viste seg å være sentralt: *CYP1A1*, *FMO5*, *CYP4A14*, *IL-18*, *CYP2B10*, *CYP4A10*, *mus BMTT*, *CYP2C29*, *CYP1A1*, *SAA112*, og to ukjente transkripter.

3.2. Toksikogenomikken ser nærmere på antioksidantrespons

Klassisk toksikologi beskriver den antioksidante responsen som cellens forsvar mot reaktive oksygenforbindelser (ROS). Reaktive oksygenforbindelser produseres hele tiden inni cellen, enten som et resultat av den mitokondrielle elektrontransporten eller som et biprodukt fra reaksjoner katalysert av lipooksigenase, sykloooksigenase eller xantinoksidase. Reaktive oksygenforbindelser kan også genereres som en konsekvens av intracellulær metabolisme av cytokrom P450 monooksygenaser.

Reaktive oksygen forbindelser er meget cytotoxiske og kan forårsake skade på bl.a. DNA og dannelse av lipidperoksider [Willem H. Mager, et al. 1999].

Peroksidene blir detoksifisert av glutathion-peroksidaser, glutathion S-transferaser, aldehyd dehydrogenaser og aldo-keto reduktaser.

Detoksifiserte metaboliter blir så fjernet fra cellene av multidrug resistans associated Protein (MRP) [Itoh, K. et al.1999]. Det finnes flere antioksidantenzymmer som for eksempel katalase, superoksid-dismutase (SOD), glutation peroksidase (GPO) og katalase (CAT) som omdanner ROS til mindre toksiske forbindelser [Stenersen, J.]. Forandringer i transkripsjon av gener som koder for antioksidantproteiner, er regulert ved antioksidant responselementer (ARE) [Friling, R.S. et al. 1990]. Dette er også kalt elektrofil responselement (EpRE) [Walsh, A.C., toxicol. 2003].

Disse antioksidant-responselementene er påvist i promotorene til følgende fase II detoksifiserende enzymer: Humant og rotte NAD(P)H: NQO1 quinon oksidoreduktase, HO1 murin hemoksygenase-1, mus og rotte GST Ya og rotte GST P [Jaiswal, A.K. et al. 2000].

Antioksidant responselementer og erythroid transkripsjonsfaktor bindingssekvens (NF-E2) ser ut til å dele et konsensusmotiv: TGAC/TNNNGC. Dette ble avdekket under studier med GST-Ya ARE fra rotter [Paulson, K.E. et al.1990]. [Itoh,Ken et al., 1997] brukte Nrf2-knockoutmus for å undersøke denne påstanden.

BHA (Butylert hydroxyanisol) er kjent for å hindre svulst- dannelse hos mus behandlet med karsinogener som BaP (Benzo-a- Pyren), antracen, diethylnitrosamin og uretan [Wattenberg, L.F. 1978].

BHA induserer fase II-enzymmer [Primiano, T. et al. 1997] BHA kalles en monofunksjonal induktor pga. at det bare induserer fase II-enzymmer og ikke fase I-enzymmer [Buetler,T.M. et al. 1995]. BHA påvirker ekspresjon av GST-gener i lever og biosyntese av NQO1 [Buetler, T.M. et al.1995].

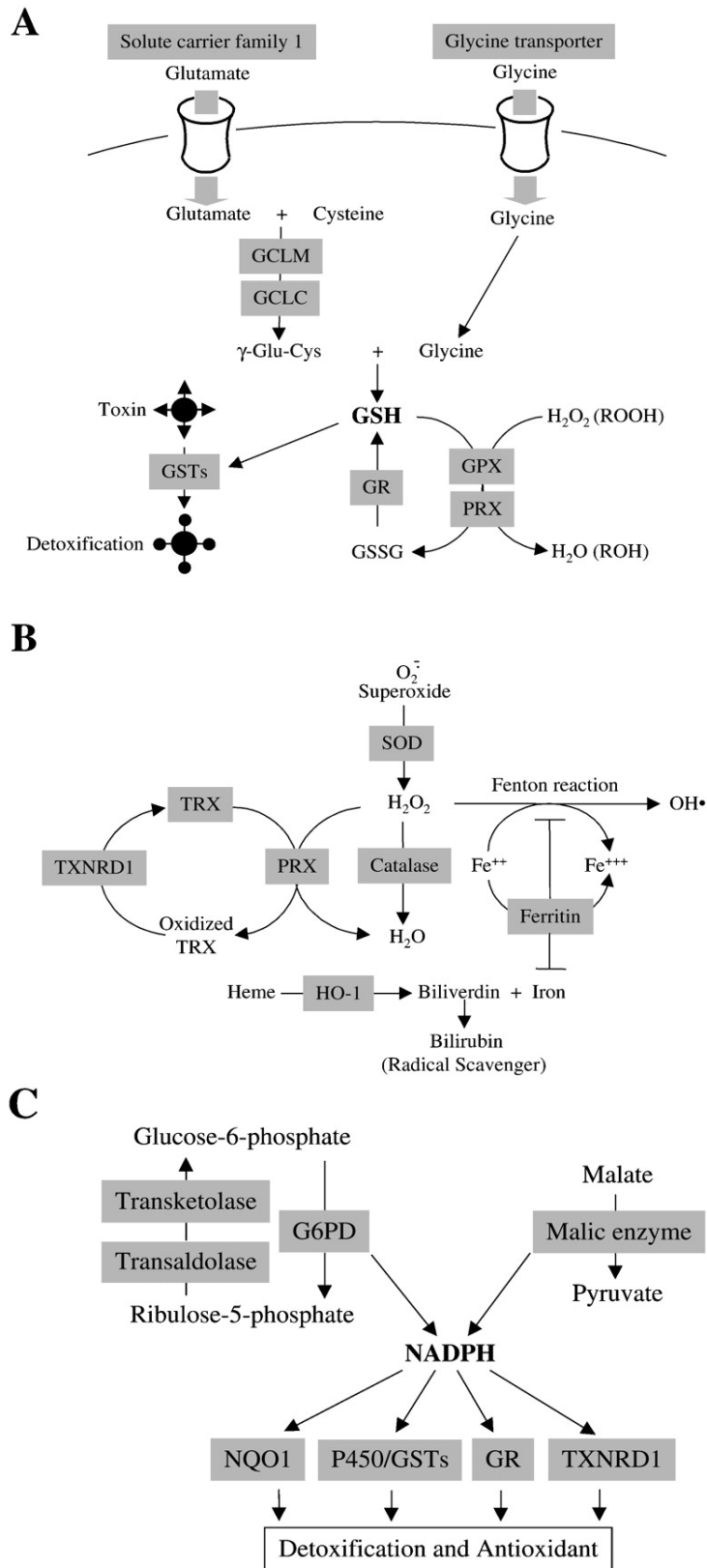
Nrf2-knockout mus ble behandlet med 0,7 % BHA(w/w). Etter 16 dager ble knockoutmusene avlivet og konsentrasjonen av GST og NQO1 i flere vev ble undersøkt. Nrf2 (erythroid transkripsjonsfaktor) er en heterodimer av p45 og tilhører den lille MAF protein familien (se figur 3.2.1) [Igarashi, K. et al. 1994].

Studiet konkluderer med at gener som koder for fase II-enzymmer, reguleres av bl.a. Nrf2-MAF heterodimerer.

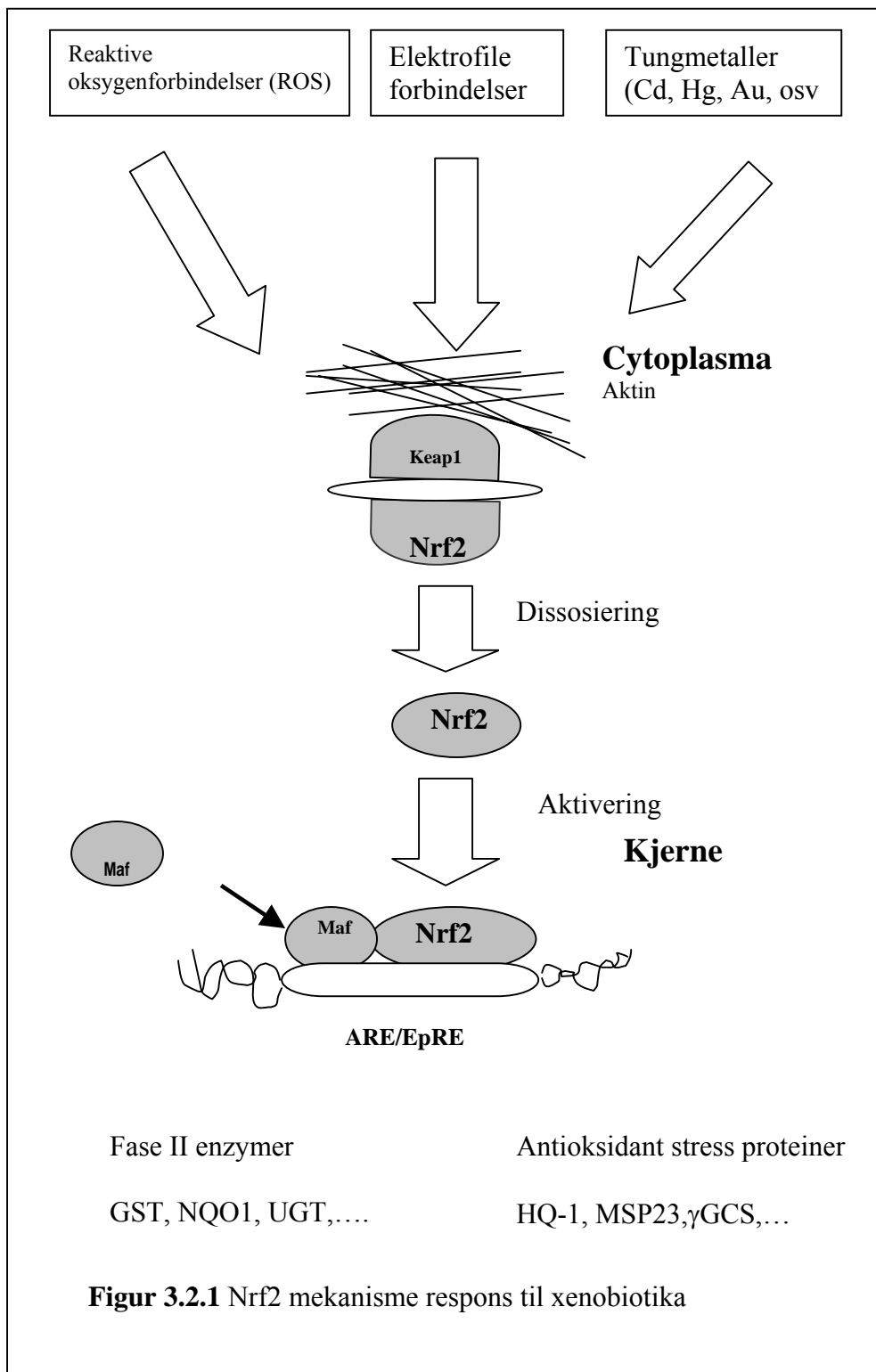
En annen undersøkelse, utført med humane celler, bekreftet at Nrf2 spiller en viktig rolle i induksjon av antioksidantgener. Ved å eksponere IMR-32 celler for tBHQ påviste Lee, J. M et al., at tert-butylhydroquinone utløser akkumulering av Nrf2 som binder ARE.

Det er grunn til å tro at tert-betylhydroquinone (tBHQ) også inducerer fase II-enzymet i bl.a. human neuroblastom IMR-32 celler [Lee, J.M. et al. 2001]. tBHQ er en potent aktivator av ARE. Transkripsjonsfaktoren Nrf2 spiller en viktig rolle i induksjon av forskjellige antioksidantgener (se figur 3.2.1). Lee, J.M. et al. 2001 viste at aktivering av NQO1-ARE er avhengig av Nrf2, og at tBHQ inducerer transport av Nrf2 til kjernen i humane neuroblastomaceller. Hos mennesker inducerer tBHQ enzymet dihydrodiol dehydrogenase. Dette enzymet spiller en viktig rolle i den cellulære responsen til oksidativt stress.

Studiet konkluderer med at oksidativt stress kan defineres som overbelastning av kapasiteten til de cellulære antioksidanters forsvarsmekanismer. Når cellen utsettes for oksidativt stress reagerer den med å transkribere ARE regulerte overlevelsesgener som danner en PI3-Nrf2-ARE signalvei. Genene som induseres kalles ”programmed cell life genes” (PCL) [Duffy, S. et al.1998]. Ved disse studiene ble mekanismen for antioksidantresponsen etablert.



Figur 3.2. Nrf2-avhengige gener påvist ved oligomikroarray analyse (grå bokser). Genenes inndeling er basert på funksjon og metabolsk funksjon. (A), detoksifisering av H_2O_2 og jern homeostase (B), NADPH homeostase (C). GR, glutathionereductase; GPX, glutathione peroxidase; PRX, peroxiredoxin; SOD, superoxide dismutase; TRX, thioredoxin; G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase.



3.3 Bruk av mikromatriser for å kartlegge genuttryksmønster etter eksponering for peroksisomproliferatorer .

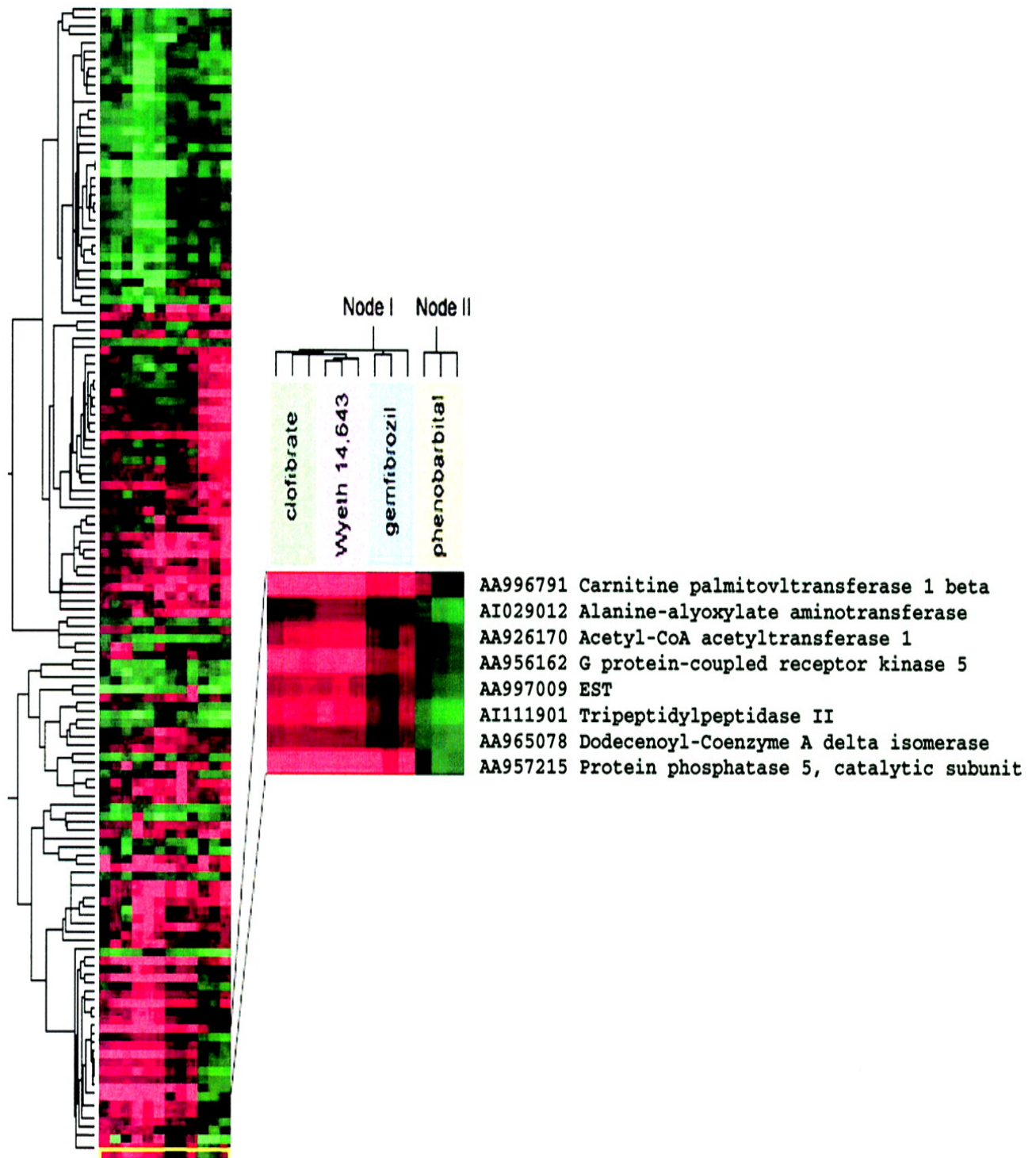
Ved bruk av mikromatriser, kan man måle endringer i ekspresjon av tusenvis av gener involvert i organismens respons til kjemisk eksponering på mRNA nivå [Burchiel et al.,2001]. Et slikt ekspresjonsmønster kan gi bestemte uttryksprofiler for kjemiske forbindelser med forskjellig struktur, men som kan være beslektede m.h.t. toksikologiske og farmakologiske endepunkter som for eksempel stoffene dietylheksylftalat (DEHP) og Wyeth14,643. Wyeth14,643 er tilsynelatende mer potent enn DEHP som hepatokarsinogen, men begge stoffene induserer peroksisomal proliferasjon i rottelever [Biegel et al. 1992].

En del toksikogenomiske studier uttrykker bekymring for forbindelser som fungerer via PPAR-avhengige mekanismer. PPAR tilhører en ligand-aktivert kjerne-reseptor-familie i steroid-reseptor superfamilien. Denne superfamilien regulerer ekspresjon av mangfoldige gener involverte i lipid metabolisme, energi balanse og celledifferensiering [Clarke, S. et al.1999].

PPAR- α er en kjernereseptor som aktiveres av forskjellige langkjedede fettsyrer og regulerer ekspresjon av gener som koder for enzymer i peroksisomal β -oksidasjon og P450 i mitokondrier. Aktivering av PPAR- α stimulerer derfor β -oksidasjon i peroksisomer. PPAR- α reseptoren formidler effektene av fibrater som fenofibrat og gemfibrosil som er PPAR- α agonister.

Induksjon av peroksisomal β -oksidasjon hos mus fører til proliferasjon av peroksisomer, hepatomegali og noen ganger også hepatokarsinom [Lock, E.A. et al.1989]. Fettsyrer og herbicider er andre eksempler på peroksisomproliferatorer [Hammadeh,et al. 2002]. Hammadeh,et al. brukte tre kjente peroksisomproliferatorer: Klofibrat (etyl-p-klorofenoksyisobutytrat), gemfibrosil [(5-2[2,5-dimetylfenoksy]2-2-dimetylpenan syre)], og Wy-14,643 ((4-kloro-6[2,3-xylidino]-2-pyrimidinyltio)eddik syre) samt fenobarbital.

Spørsmålet var om to kjemisk ubeslektede forbindelser kunne gi liknende genuttrykksmønstre. VAF⁺ hannrotter ble eksponert til ett av disse stoffene. De administrerte dosene var innenfor MTD (maksimal tolerabel dose): 250mg/kg/dag for peroksisomal proliferatorer og 120mg/kg/dag for fenobarbital. Musene ble eksponerte i både 24 timer og over 14 dager. Dyrene ble avlivet og organene ble tatt ut både for histologiske undersøkelser og RNA-ekstraksjon. 1,7 K mikromatriser ble hybridisert med fluorescensmerket cDNA fra kontroll og eksponert/behandlede rottelever. Det ble kjørt tre replikater for hver forbindelse, dette for å redusere sannsynlighet for falske positive verdier. I evalueringen av resultatene ble det brukt signifikante forandringer i genuttrykk (ratio distribusjons modell med 95% konfidensintervall) (se tabell 3.3.1 og 3.3.1.2). Det ble ikke registrert noen akutt toksisitet og histologiske endringer kunne ikke påvises. Det ble registrert signifikante forandringer i genekspressjon etter 24 timers-eksponering med hierarkisk klustering (se figur 3.3). Principal komponentanalyse (PCA) ble brukt for å gruppere genene som ble berørt under den subkroniske testingen. Genene ble gruppert/klustret i henhold til signalstørrelse. PCA-analyse påviste likhet mellom genuttrykksmønstre i rottelever behandlet med klofibrat, gemfibrosil og Wy-14,643. Resultatet viser klare forskjeller i forhold til genuttrykksmønsteret i lever fra fenobarbitaleksponerte rotter (se figur 3.3.2).



Figur 3.3 Hierarkisk klustring: Genene er gruppert/klustret i henhold til uttrykksnivå. mRNA fra rottelever behandlet 24 timer med enten: Klofibrat, gemfibrosil, Wy-14,643 eller fenobarbital [Hammadeh,et al.,2002].

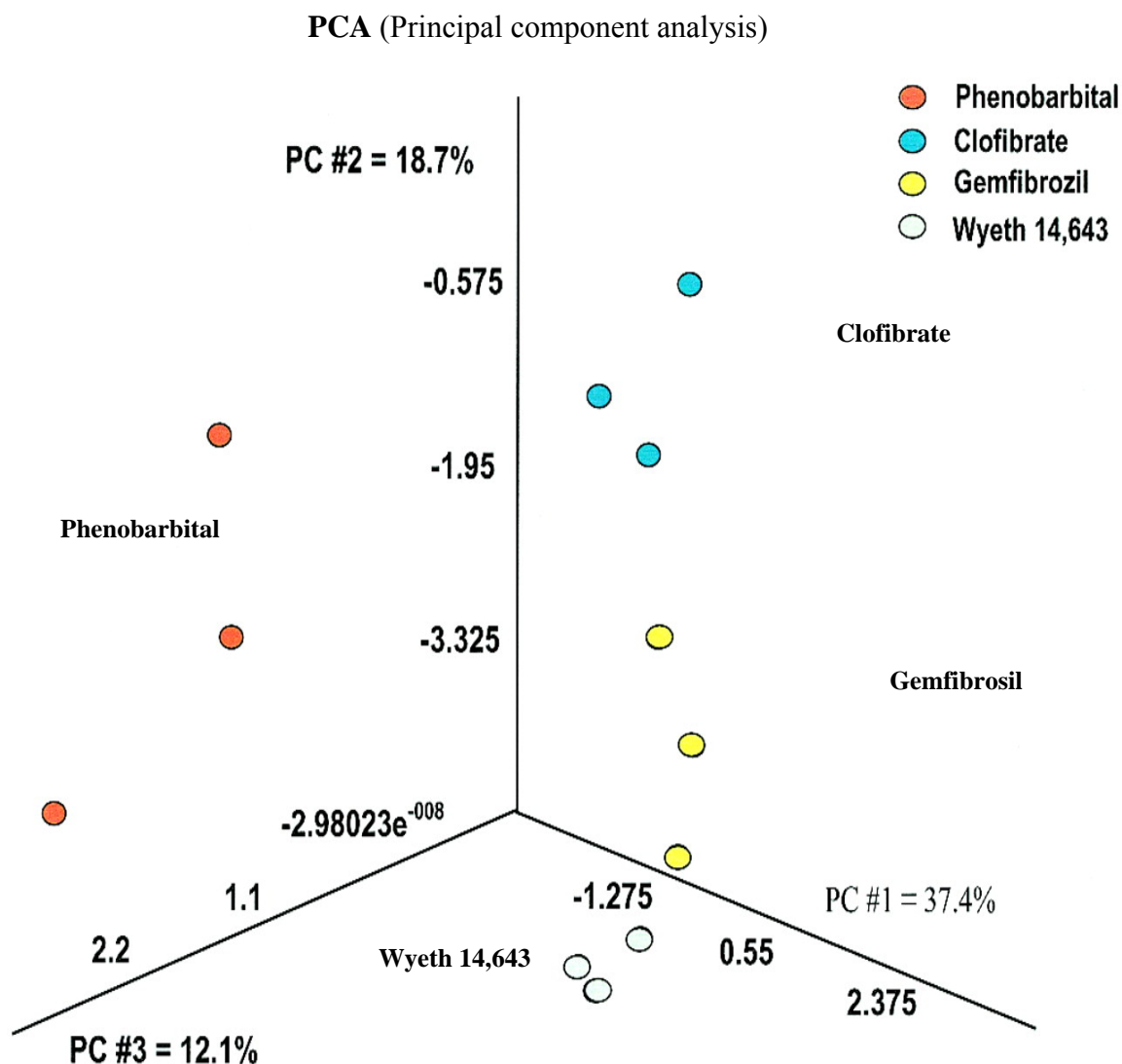
Grønn (farge): nedregulerte gener
 Rød (farge): oppregulerte gener
 Sort (farge):ingen forandringen i uttrykk

| | | | Nedregulering/oppregulering | | | | | | | |
|----------------------------|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------|-------------|----------|-----------|----------|--------------|----------|
| | | | Klofibrat | | Gemfibrosil | | Wy-14,643 | | Fenobarbital | |
| Biokjemisk | Gen navn | Beskrivelse | 24 t | 14 dager | 24 t | 14 dager | 24 t | 14 dager | 24 t | 14 dager |
| Cellessyklus/proliferasjon | | | | | | | | | | |
| | Syklin B | cellessyklus | 4.46 | 8.05 | 1.44 | 1.83 | 1.87 | 1.62 | 4.34 | 1.85 |
| | Syklin G | cellessyklus | 0.59 | 0.77 | 0.79 | 0.61 | 0.70 | 0.64 | - | - |
| | Histidin dekarboksilase | omdanner histidin til histamin | 17.16 | 70.39 | 6.22 | 7.66 | 4.44 | 4.82 | - | - |
| | Cdc2 | cellessyklus | - | - | - | - | - | - | 3.04 | 1.37 |
| | P55cdc | cellessyklus | - | - | - | - | - | - | 0.57 | 0.38 |
| | ARL5 | DNA syntese | - | - | - | - | - | - | 2.04 | 1.81 |
| | DNA polymerase b | DNA syntese/reparasjon | - | - | - | - | - | - | 2.08 | 3.55 |
| Mikrosomal enzymer | | | | | | | | | | |
| P450 enzymer | CYP2B1 | mikrosomal enzym | - | - | - | - | - | - | 12.04 | 11.5 |
| | CYP3A9 | mikrosomal enzym | - | - | - | - | - | - | 1.81 | 3.80 |
| | CYP2C6 | mikrosomal enzym | - | - | - | - | - | - | 2.19 | 2.87 |
| | Epoksid hydrolase | mikrosomal enzym | - | - | - | - | - | - | 5.30 | 8.52 |
| | Karboksylesterase | mikrosomal enzym | - | - | - | - | - | - | 6.66 | 16.21 |
| Detoksifiserende enzymer | | | | | | | | | | |
| | GST Ya,Yb,Yc | Glutation S-transferase | - | - | - | - | - | - | 4.03 | 4.89 |
| | Aflatoksin ald.redukt. | Detoksif.av aflat.B1 | - | - | - | - | - | - | 3.45 | 6.30 |

Tabell 3.3.1 Effekter av behandling med klofibrat, gemfibrosil, Wy-14,643 og fenobarbital på genuttrykk [Hammadeh,et al.,2002].

| | | | Nedregulering/oppregulering | | | | | | | |
|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|----------|-------------|----------|-----------|----------|--------------|----------|
| | | | Klofibrat | | Gemfibrosil | | Wy-14,643 | | Fenobarbital | |
| Biokjemisk | Gen navn | Oppgave | 24 t | 14 dager | 24 t | 14 dager | 24 t | 14 dager | 24 t | 14 dager |
| Fettsyre metabolisme/transport | | | | | | | | | | |
| | FABP | Fettsyre bindende protein | 2.05 | 1.37 | 2.28 | 2.09 | 1.11 | 2.42 | - | - |
| | Carnitin palmt. Transferase1 | Mitokondriell ferje for fettsyrer | 9.57 | 55.13 | 3.02 | 4.12 | 5.82 | 1.71 | 1.17 | 1.61 |
| | | | | | | | | | | |
| β -oksidasjon | | | | | | | | | | |
| | Acyl CoA oksidase | Første trinn av β -oksidasjon | 1.06 | 3.41 | 1.93 | 5.85 | 0.73 | 5.05 | 3.87 | 7.92 |
| | Tiolase | β -oksidasjon enzym | 1.66 | 1.39 | 1.20 | 1.09 | 1.78 | 0.75 | 1.62 | 1.36 |
| | Enoyl CoA isomerase | β -oksidasjon enzym | 1.68 | 2.07 | 1.31 | 1.00 | 1.75 | 0.54 | 0.57 | 0.37 |
| Glykolyse/glukogeog. | | | | | | | | | | |
| | G-6-P | Glukose-6-fosfatase | 0.45 | 0.35 | 0.69 | 0.41 | 0.68 | 0.37 | 0.38 | 0.47 |
| | Glukose transportør | Transport av glukose | 0.2 | 0.15 | 0.72 | 0.83 | 0.68 | 0.37 | - | - |
| | Laktat dehydrogenase | | 1.32 | 0.94 | 0.81 | 0.80 | 0.89 | 0.44 | 0.51 | 0.59 |
| | Pyruvat karboksylase | Glukogeogenese enzym | 0.67 | 0.44 | 0.69 | 0.75 | 0.56 | 0.61 | 0.38 | 0.41 |
| | GSDP type I | Lagring av glykogen | 0.27 | 0.48 | 0.61 | 0.94 | 0.64 | 1.19 | - | - |
| Celle struktur | | | | | | | | | | |
| | α -tubulin | Cytoskjelett protein | 8.52 | 13.01 | 2.22 | 2.42 | 2.72 | 1.46 | - | - |

Tabell 3.3.1.2 Effekter av behandling med klofibrat, gemfibrosil, Wy-14,643 og fenobarbital på genuttrykk [Hammadeh,et al.,2002].

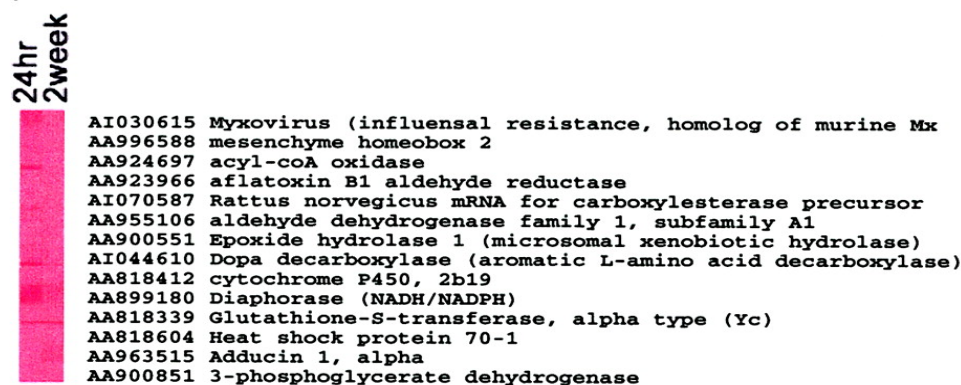


Figur 3.3.2 PCA analyse ble brukt for å visualisere statistisk signifikante forandringer i gener etter eksponering. Hver farget prikk representerer data fra en rotte eksponert i 24 timer. Den første prinsipalkomponenten (PC#1) inneholdt data med 37,4% varians, den andre og tredje prinsipalkomponenten (PC#2 og PC#3) inneholdt henholdsvis 18.7% og 12.1% varians.

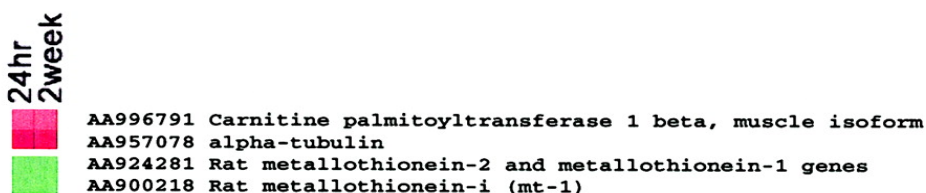
Studiet antyder også at det kan være en direkte korrelasjon mellom kronisk celle proliferasjon som er mekanismen bak svulstdannelse ved behandling med fenobarbital [Barbason et al. 1983] og hepatomegali hos rotter behandlet med fenobarbital i 14 dager. Mange studier viser at fenobarbital induserer DNA syntese hos forskjellige mus og rotter [Busser and Lutz, 1987]. Resultatene fra [Hammadeh, et al. 2002] studiet bekrefter at fenobarbitalbehandling induserer hepatisk celleproliferasjon. Rotter eksponert for fenobarbital viser økte nivåer av mRNA for polymerase b og cyclin B, både etter 24 timers og 14 dagers behandling. Gener som koder for et rho-

assosiert proteinkinase som er et protein implisert i cytoskjelett-dannelse viste også økt mRNA-nivå etter behandling med fenobarbital [Hammadeh,et al. 2002]. Dette studiet viste at eksponering til kjemikalier som hører til samme klasse produserer mer samsvarende genuttrykksmønstre enn kjemikalier fra andre kjemiske klasser. Dette ble tydeliggjort ved fremvisning av resultatene i effector pathway map (EPM) (se fig 3.3.4). Studiet konkluderer med at RNA-basert genuttrykk-analyse kan ses på som et øyeblikksfotografi av molekylære hendelsesforløp i tid og rom.

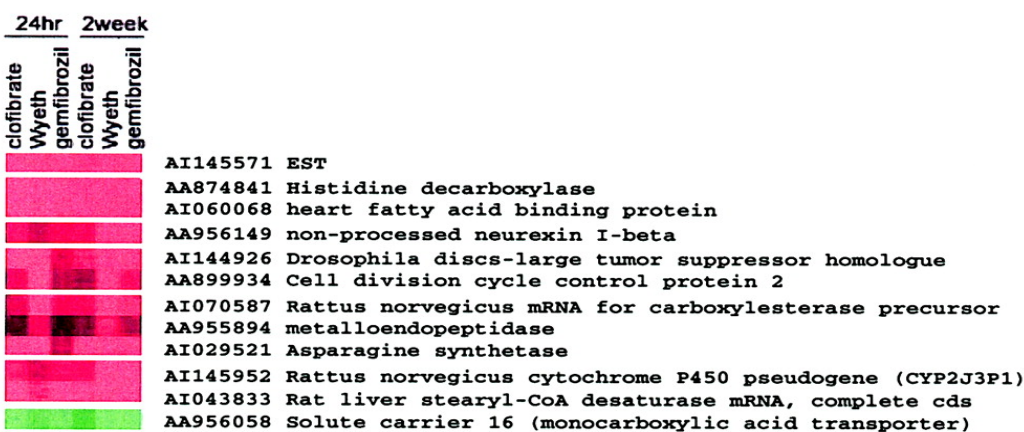
A phenobarbital



B gemfibrozil



C

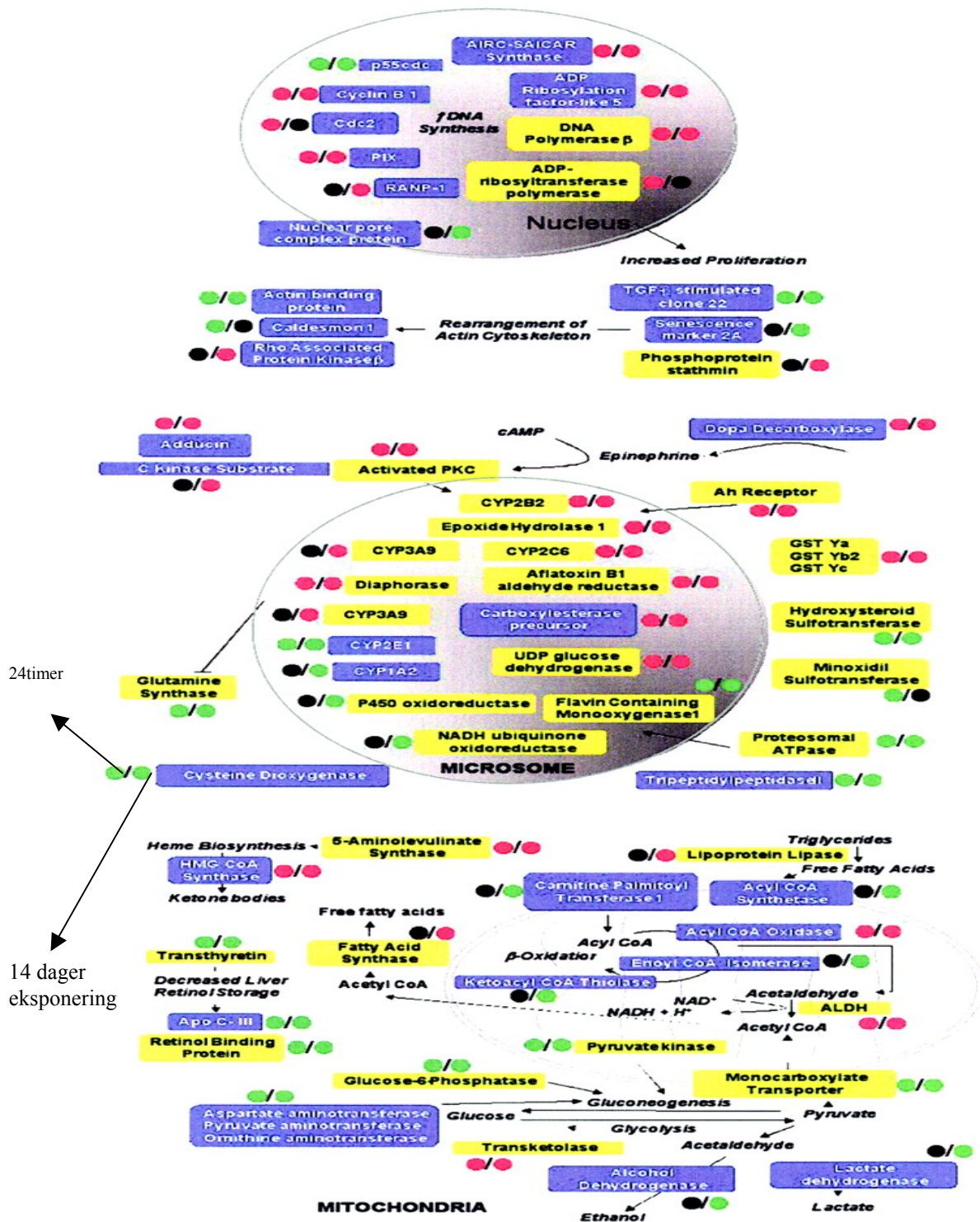


Figur 3.3.3 2D hierarkisk klustering: Gener på vertikal akse og dyrene vannrett. Genuttrykksmønstre for Klofibrat, gemfibrosil, Wy-14,643,og fenobarbital etter 24 timers og 14 dagers eksponering. Dette er data fra 9 hybridiseringer og 3 replikater. Opp eller nedregulering i forhold til kontroll rotter[Hammadeh,et al.,2002].

Rød (farge): gener som ble induktert

Grønn (farge): gener som ble nedregulerte

Sort (farge): ingen endring i genuttrykk



24timer
 14 dager eksponering

Figur 3.3.4 MEPT (map of effector pathways of toxicant) Effekter av fenobarbital-eksponering på genekspresjon [Hammadeh, et al., 2002].

Gule (bokser): enzymer som ble berørt av eksponering og kjent fra tidligere studier.

Blå (bokser): disse enzymene er aldri blitt tilknyttet til fenobarbital eksponering.

Røde (sirkler): oppregulering.

Grønne sirkler: nedregulering.

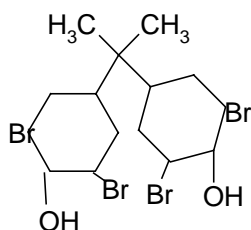
Sorte (sirkler): ingen forandring i genuttrykk

3.4 Bromerte flammehemmere

Bromerte flammehemmere deles i tre grupper avhengig av inkorporeringen i polymere: monomere, reaktive og addiktiver. De bromerte monomerene tilsettes før polymeriseringen av plasten finner sted og består av bromerte styrener og butadiener. De reaktive flammehemmere som IBP tilsettes polymerblandingen slik at forbindelsen bindes kovalent til plasten. Additive flammehemmere som HBCD tilsettes plastblandingen, men forbindelsen bindes ikke kjemisk til plasten [Sagredo, C et al.2004].

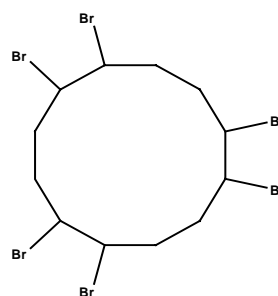
3.4.1 Kjemisk struktur av IBP og HBCD

IBP (TBBPA)



4,4'-isopropylidenebis(2,6-dibromophenol)

HBCD



1,2,5,6,9,10-Hexabromo-cyclododecane (HBCD)

3.4.2 Kjemiske egenskaper

IBP har fast form ved romtemperatur, molekylvekt på 543.87 og log Kow = 4.5
HBCD har fast form ved romtemperatur, molekylvekt på 641.7, log kow 5.625 og vannløselighet:3.4ug/L ved 25°C. Kommersiell HBCD er en blanding av tre stereoisomerer: alfa(6%), beta(8%) og gama(80%).

3.4.3 Bromerte flammehemmeres funksjon

Bromerte flammehemmere skal hindre antenning eller spredning av brann i bygningsmaterialer i fly, biler og husholdningsartikler (for eksempel elektriske apparater, mobiltelefoner, pc-er, etc). Lettantennelige materialer tilsettes flammehemmere for å redusere brannfaren.

3.4.4 Forbrenningsprosessen

En forbrenningsprosess er en gassfasereaksjon mellom et drivstoff og oksygen.

Forbrenningsprosessen foregår over fire trinn:

- 1) oppvarming som er endotermisk
- 2) pyrolyse d.v.s. dekomponering / fordamping av materialet
- 3) forbrenning som er en eksotermisk reaksjon
- 4) forplantning. Her dannes det frie radikaler som er nødvendige for at flammene skal spre seg videre.

3.4.5 Virkningsmekanismen

Bromerte flammehemmere påvirker ett eller flere av disse trinnene slik at de enten reduserer forbrenningen og/eller forplantningen av flammene. Ved sterk varmeutvikling vil frie radikaler frigis fra materialet. Organo-bromforbindelser har høy affinitet for frie radikaler, og vil reagere med frigjorte radikaler og dermed redusere forplantningen av flammen.

3.4.6 Bioakkumulering av IBP og HBCD

IBP og HBCD er lipofile ($\log K_{ow} > 4$), har lavt damptrykk (er lite flyktige), er persistente og bioakkumulerer [Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, 729-5 Ochiai, Hadano-shi, Kanagawa, Japan]. Disse stoffene har blitt funnet i marine organismer, mennesker (morsmelk, blod) [Meironyite, J.D. et al. 1999] og bundet til sedimentene nær utslippskildene [Schalabach, E.F. et al. 2004 Niva Rapport; de Boer, J et al. 2003; Barregard, L. Et al. EPA svenske rapport, 2001]. Det er funnet bromerte flammehemmere i områder som Arktis og i de dype havene [Hale et al. 2003; Palm, Anna et al., Mars 2002 IVL Svenska miljöinstitutet B1465].

3.4.7 Nedbryting av HBCD og IBP

Sollys og noen mikroorganismer bryter ned høyere substituerte bromforbindelser til lavere bromforbindelser, men dette er en langsom og tidkrevende prosess [Birnbaum, L.S. et al. 2004]. HBCD og IBP er lite akutt toksiske for mennesker, men kan være akutt giftig for akvatiske former [Fjeld, E. et al., 2004 Rapport TA-2006/2004 sidene 65, 66, 73-79 Norsk institutt for vannforskning].

3.4.8 Biologiske effekter av eksponering til HBCD eller IBP

Biologiske effekter av 1,2,5,6,9,10-heksabromo-syklododekan (HBCD) er lite kjent. En rapport [CAS No.319456] utført på oppdrag av American Chemistry Council sammenfatter toksikologiske studier vedrørende HBCD.

Det ble gjennomført økotoksikologiske tester av HBCD med følgende modell organismer: Regnbue ørret, *Selenastrum capricornutum* og *Daphnia magna*.

Akutt toksisitet: HBCD er ikke akutt toksisk for fisk [project number :439A-101 Wildlife International Ltd, Easton,MD], alger [Roberts, C.et al. Project nr.: 439A-103,1997] eller krepsdyr [Drottar et al.,1998 project number :439A-108 Wildlife International Ltd, Easton,MD] i doser innenfor HBCD vannløselighet (3.4ug/l).

Tidligere studier med HBCD-konsentrasjoner utover 6.8ug/l viste samme resultater [project number :439A-102 Wildlife International Ltd, Easton,MD].

Studiet viser at HBCD bioakkumulerer i fisk. Beregnet BCF var på 8.974 [Drottar et al.,2000 project number: 439A-111 Wildlife International Ltd, Easton,MD].

3.4.9 Akutte, sub-kroniske og kroniske toksikologiske effekter

Akutte, subkroniske og kroniske toksikologiske tester ble utført på rotter og kaniner. VAF⁺ rotter som ble eksponert for HBCD, oralt, inhalert eller dermalt viste ingen akutte toksiske effekter [Lewis C.1978 ref.nr.:78385-2 og 78385-1, Consumer Product Testing, Fairfield, NJ]. LD50 for rotter oralt var 10g/kg og ved inhalasjon 200mg/kg. For kaniner var LD50 (dermalt)>8g/kg. NOAEL for gjentatte eksponeringer var 1mg/kg/dag. Studiet fastslo at HBCD ikke var irriterende eller etsende [Momma et al. Pharmacometrics,1985],[Nakamura, et al.1994].

Den subakkroniske testingen gikk over 28 dager. HBCD ble løst i maisolje og følgende doser ble brukt: 1000mg/kg/dag = høydose, 350mg/kg/dag = middeldose og 125 mg/kg/dag = lavdose. Rottene ble injisert i.p. med et volum på 5ml/kg.

Fem grupper på 12 dyr ble opprettet herav seks rotter av hvert kjønn.

Kontrollgruppene bestod av 12 hannrotter og 12 hunnrotter. Totalt ble det brukt 60 dyr. Kontrollgruppene ble injisert i.p. med maisolje. Etter 28 dager ble tre dyr fra hver gruppe veid, avlivet og obdusert. Det ble laget histologiske snitt av alle organene.

Parafinsnittene ble farget med hematoksilin og eosin. Resten av dyrene hadde en restitusjonsperiode på 14 dager og ble deretter avlivet og obdusert.. Studiet

konkluderer med at eksponeringen til HBCD ikke fører til toksiske effekter hos rotter og kan bare vise en økning av tromboplastin hos hannrotter i høydose-gruppen og den motsatte effekt hos hunnrotter. De nevnte også at HBCD forårsaker hepatomegali [Chengelis, C. 1996, Study No. WIL-186004, Wil Research Laboratories].

Hovedfagsarbeidet tok utgangspunkt i disse arbeidene og prøvde å belyse toksikogenomiske effekter av tilsvarende behandling med HBCD og IBP.

I vårt innledende forsøk ble ekspresjon av utvalgte gener fulgt med RT-PCR. Geneene som ble valgt ut var: Tidlig respons gener, gener som kontrollerer celledeling, celledød og gener som koder for detoksifiserende fase-I og fase II-enzymmer, vekstfaktorer, reseptorer knyttet til lipid metabolisme og xenobiotika respons.

Monitorerte gener: *Scr3*, *CYP*, *TNF α* , *INF γ* , *PPAR- α* , *acyl CoA oksidase*, *JunB*, *myc*, *erk2* og *PGC*.

Som kontrollgener det ble brukt såkalte "housekeeping gener". Dette er gener hvis uttrykk er tilnærmet konstant og kan dermed brukes som intern kontroll. Vi brukte L-27. Det viste seg at dette ikke var noe nyttig verktøy, fordi det er vanskelig å forutsi hvilke gener som vil få endret ekspresjon. Undersøkelsen ble så videreført med membranmatriser. Gener assosiert med celledød/stress, celleproliferasjon/kreftutvikling og veksthemming ble undersøkt. Undersøkelsen ga interessante resultater. Igjen var problemet et begrenset utvalg av gener. Dette førte til at oligobaserte mikromatriser ble tatt i bruk siden 30K musematriser var tilgjengelig fra NTNU-Norwegian Microarray Consortium i Trondheim.

4. Materialer

| | |
|---|------------------------|
| Array 350™ Expression Array Detection Kit | Genisphere |
| Bromfenol blå | Merck |
| BSA | Fluka |
| CoASH | Sigma |
| DAB | Sigma |
| Dietylpyrokarbonat (DEPC) | Sigma |
| Dithiotreitol (DTT) | Sigma |
| DNA-free™ | Ambion |
| Flavin Adenindinukleoti (FAD) | Sigma |
| GelStar® Nucleic Acid Gelstain | BMA |
| Glycerol | Sigma |
| H ₂ O ₂ | Ambion |
| HBCD | Sigma |
| HCl | Merck |
| IBP | Sigma |
| Insta-gel® | Pacard |
| Isopropanol | Arcus |
| K ₂ HPO ₄ | Merck |
| KCN | Merck |
| Kloroform | Merk |
| KOH | Merck |
| Mannitol | Sigma |
| Nikotinamid Adenindinukleotid (NAD ⁺) | Sigma |
| Nonrad-GEArray™ Kit | Superarray |
| PBS | Sigma |
| Primerer | Bioteknologisenter UiO |
| Qiagen OneStep RT-PCR kit | Qiagen |
| Ribogreen™ | Sigma |
| RNA Storage Solution | Ambion |
| RNAlater™ | Ambion |
| Rnase inhibitor | Ambion |
| RNAwiz™ | Ambion |
| Tris/Boric syre EDTA-buffer | Biorad |
| Tris-HCl | Sigma |
| Triton X-100 | Calbiochem |

5. Metoder

5.1 Behandling av forsøksdyrene

5.1.1 Transport, oppstalling, kost, og stell av dyr

Transport

Balbc og CD-1 mus ble kjøpt fra Veterinær Møllergård (DK). De ble transportert i ventilerte* bur TTC™ (Taconic Transit Cage) med lavt deksel i lastebiler utstyrt med luftkjøling. Burene hadde et gulveareal på 2.140cm². PPAR- α knockout- mus ble kjøpt fra Jackson's Lab (USA) og transportert med fly i TTC™ (Taconic Transit Cage) bur med lavt deksel med 1.389cm² gulvareal. Temperatur i burene ble holdt konstant (20°C)

*15 luftutsiftninger per time.

Oppstalling

Romtemperaturen var ca 23°C, luftfuktighet var rundt 55 % og døgnrytmen var 12 timer.

Antall luftutsiftninger per time: 15.

Balbc mus

26 hann Balbc innavlet albinomus ble fordelt i 5 grupper på henholdsvis tre eller to dyr. Dyrene ble stallet opp i bur med følgende mål: 26cm dypt, 20cm bredt og 13.5 cm høyt. Beecay sagflis ble benyttet som underlag.

CD-1 og PPAR- α knockoutmus

Det ble opprettet 10 grupper, inndelt i 5 undergrupper av hvert kjønn.

10 mus av hvert kjønn utgjorde kontrollgruppen. Hvert bur inneholdt tre eller fire mus. Burene hadde følgende mål: 41cm dypt, 26cm bredt og 14.5cm høyt. Burets gulveareal ble dekket med Beecay sagflis.

Kost

Balbc musene ble foret med Mouse Standard diet nr. 2 expanded fra B&K i pellet form

CD-1 og PPAR- α musene ble fôret med –"Rat and Mouse No 3 Breeding batch nr.22-801700 (P)-i pellet form

Stell

Utskifting av vann og underlag

Burene ble utstyrt med sterile vannflasker og kontrollert daglig for mulig bakterievekst. Vann og sagflis ble vanligvis byttet ut to ganger i uken.

5.1.2 Behandling

A. Balbc mus hadde en ukes akklimatisering og ble deretter gitt kost supplert med HBCD eller IBP i 3 dager.

B. CD-1 og PPAR- α knockout mus ble injisert daglig intraperitonealt (i.p.) i 10 dager med HBCD eller IBP. Følgende doser ble benyttet: 600mg/kg kv, 300mg/kg kv og 100mg/kg kv. Under injeksjonen ble det benyttet 1ml sprøyter utstyrt med 25Gx5/8" nåler.

5.1.3 Endepunkter

Følgende endepunkter for avslutting av behandling ble fulgt:

- Vekttap: tillatt minimum vekt 10g (Balbc) og 14g (CD-1 og PPAR- α)
- Tap av mobilitet og nedsatte reflekser *

* Kontrollert av dyrepassereren og rapportert til undertegnede

5.1.4 Prøveuttak og preparering

Balbc musene ble veid før forsøksstart og før avlivning.

CD-1 og PPAR- α knockoutmusene ble veid før og under forsøket og like før avliving. Organene ble tatt ut * og straks plassert i et 5ml rør inneholdende 1.5 ml RNA Later™. Deretter ble organene klippet i småbiter (0.5cm x 1cm x 1cm) slik at løsningen raskt kunne penetrere vevet og preservere RNA. Prøvene ble oppbevart ved 4°C over natten, og deretter lagret ved -80°C.

*ca 30mg av leveren ble klippet av til enzymanalyse, og øyeblikkelig lagret i flytende nitrogen.

En liten leverbit ble klippet av og lagret i en blanding av 2% formaldehyd og 2.5 % glutaraldehyd for histologisk analyse.

5.1.5 Avliving av dyrene

Musene ble avlivet ved nakkestrekk.

5.1.6 Behandling med fôr behandlet med HBCD eller IBP

A. HBCD- eller IBP- innholdende fôr:

1% (w/w) eller 4% (w/w) fôr ble laget i et begerglass ved at HBCD eller IBP tilsvarende 1% eller 4% av fôrvekt ble løst i et volum aceton som dekket fôret. Det ble blåst nitrogen gjennom blandingene over natta slik at aceton fordampet. Blandingene ble deretter satt i avtrekkskapet i 3 dager for avdamping av gjenværende aceton. Pelletene ble ristet flere ganger i løpet av de 3 dagene.

B. Tillaging av HBCD- eller IBP-løsninger for injeksjon:

Høydose: 600mg/kg kv

24mg HBCD eller IBP ble løst i 1ml maisolje

Middeldose: 300mg/kg kv

8mg HBCD eller IBP ble løst i 1ml maisolje

Lavdose: 100 mg/kg kv

4mg HBCD eller IBP ble løst i 1ml maisolje

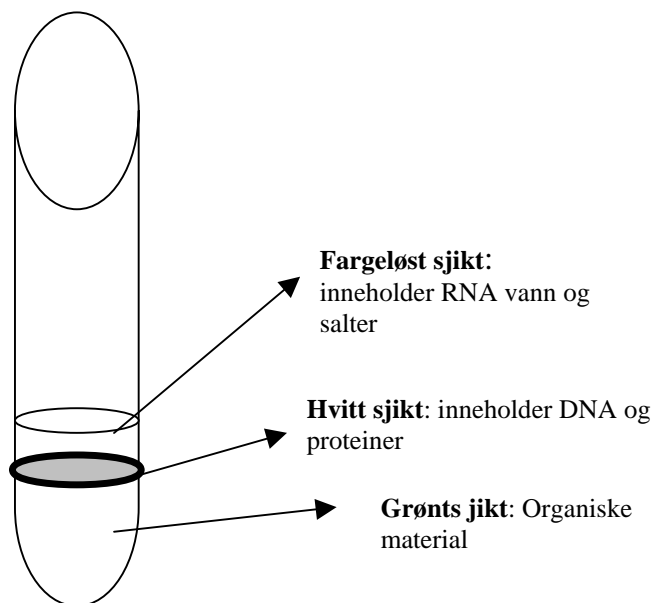
5.2 Isolering av total RNA

5.2.1 Isolering av RNA med RNAwiz™

Total RNA isolert fra lever og nyrer fra kontroll og behandlede dyr ble benyttet til: RT-PCR og hybridisering av membranmatriser.

Framgangsmåte:

100mg vev ble veid og homogenisert i et Corex-rør fylt med 1,5ml RNAwiz™. Homogenatet ble inkubert i 5 min ved romtemperatur for å dissosiere kjerne proteiner. Kloroform (0,2x startvolum) ble tilsatt for å lysere cellene, hindre RNase- aktivitet og denaturere proteinene. Prøven ble mikset i 20 sekunder og deretter inkubert i 20 minutter ved romtemperatur under risting. Prøven ble deretter sentrifugert i 55minuter v/ 4°C og 10000rpm.

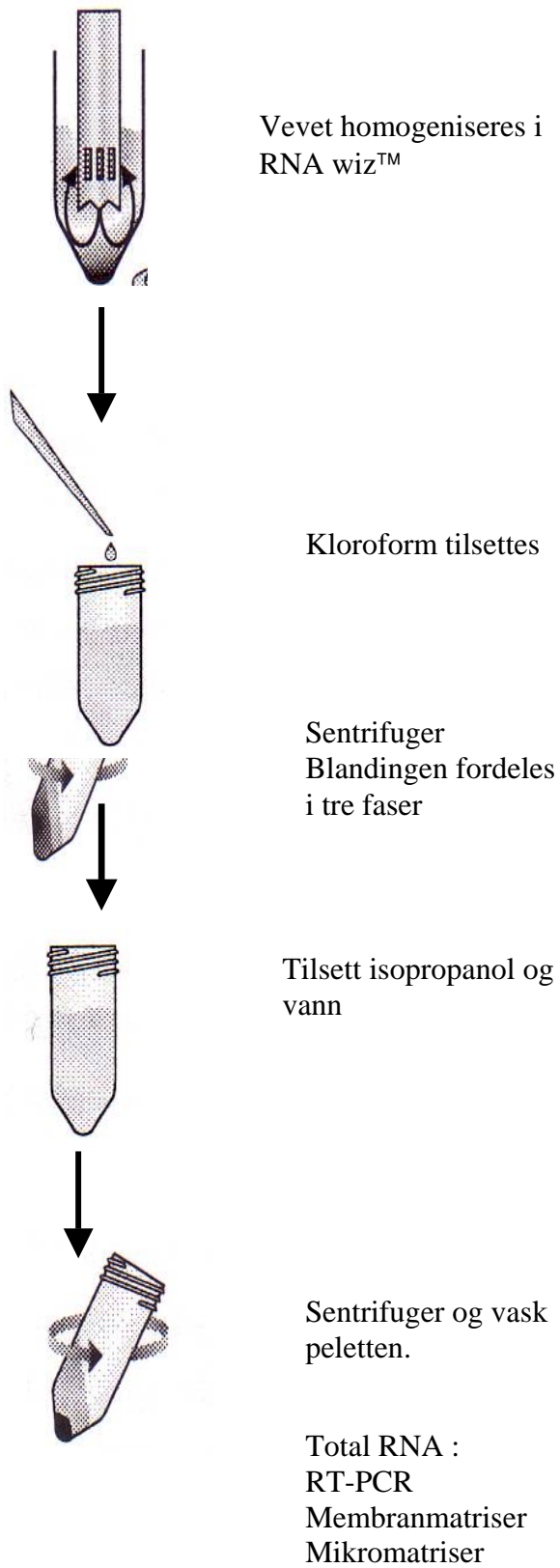


Figur 5.2.1 Blandingen ble separert i tre faser:

Den klare fasen ble sugd opp uten å forstyrre grumseskiktet og overført til et sterilt eppendorfrør. H₂O_{DEPC} (0,5x startvolum) ble tilsatt og blandet godt. Røret ble fylt opp med isopropanol for å separere RNA fra DNArester. Blandingen ble så inkubert i 10minutter v/ romtemperatur, sentrifugert i 30 minutter v/ 4°C og 14000rpm for å pelletere RNA. Supernatanten ble kastet, og pelleten vasket 2 ganger på følgende måte:

Pelleten ble resuspendert med kald 75 % etanol (startvolum) for å felle RNA. Blandingen ble godt ristet på en mikser og sentrifugert i 8 minutter v/ 4°C og 14000rpm. Supernatanten ble kastet og eppendorfrøret satt på hodet på autoklavert filterpapir. Pelleten ble så lufttørket og deretter resuspendert i 200µl RNA Storage Solution. Løsingen ble sentrifugert i 10 sek. og oppvarmet til 60°C for å fremskynde oppløsning av RNA. RNA konsentrasjon i prøvene ble målt ved A₂₆₀ og prøvene lagret v/ -80°C.

Fig. 5.2.1.2 Hovedtrinnene i RNAWiz™ metoden



5.2.2 DNasebehandling

DNA kontaminering i isolert RNA er et kjent fenomen. DNAet kan bli brukt som templat i RT-PCR og gi falske signaler. For å unngå dette ble det isolerte RNA Dnasebehandlet med DNA-free™ fra Ambion. Prøvene behandles med DNaser som klipper DNA. Avklippet DNA felles ut og den resulterte supernatanten overføres til et nytt rør. RNAkonsentrasjonen måles ved A_{260} nm, og prøvene oppbevares v/ -80°C.

5.3 Isolering av RNA til mikromatriseanalyser

5.3.1 RNeasy Mini Protokoll for RNAisolering

RNAwiz™ metoden viste seg å gi RNA med for lav renhet til at den kunne anvendes til mikromatriseanalyser. Slikt RNA ga for mye bakgrunnsstøy. Dette førte til at vi istedet brukte RNeasy Mini-metode, for å isolere RNA av bedre kvalitet. I denne metoden homogeniseres vevet og cellene lyses. RNA bindes til en silikakolonne og forurensningene vaskes bort. Renset RNA elueres deretter med vann.

Vev (30mg-40 mg) ble veid, homogenisert, vasket og sentrifugert. Eluert RNA (30-50 ul) ble lagret ved -80 °C.

For videre detaljer vises det til produsentenes metodebeskrivelse i Sigma cat # 9736 fra 07.10.2003

5.3.2 Måling av RNAkonsentrasjon

RNAkonsentrasjon ble målt enten som A_{260} nm eller med RiboGreen-metoden.

5.3.3 OD måling

Den vanligst metoden for å bestemme RNAkonsentrasjon er måling av absorbanse ved 260nm(A_{260}).

Ulempen med denne metoden er at proteiner, frie nukleotider og DNA interfererer. Dessuten er den relativt insensitiv.

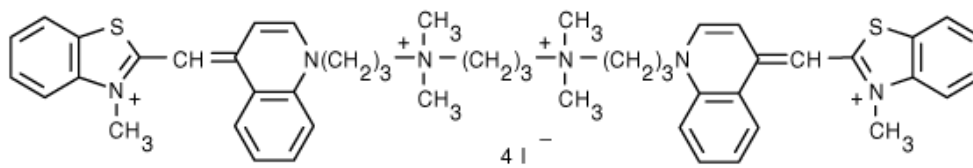
5.3.4 Ribogreen-metode

RiboGreen-RNA-reagens er et fluorescerende fargestoff for kvantitering av RNA i løsning. Metoden er meget selektiv for RNA og interferens fra andre komponenter er usannsynlig. RiboGreen RNAmetode er også meget sensitiv. RiboGreen kan enten fortynnes 2000x (høy sensitivitet(1)) eller 200x (lav sensitivitet (2)) i TE-buffer. Deretter lager man en RNAstandard: 200ng/ml for (1) og 2µg/µl (2).

0.1µg/µl RNA fortynnes 1000x – 5000x. Det tilsettes likt volum fortynnet RiboGreen-RNA-reagens til standarden og til RNA prøvene(fortynnede). Fluorescens blir målt i et spektrofluorometer (480nm eksitasjon, 520nm emisjon). Det lages en standardkurve ved å plote netto standard fluorescens mot konsentrasjon av RNA. Standardkurven brukes til å bestemme den ukjente RNA konsentrasjon til prøvene.

| | |
|---------------------|--|
| Mol. formel | C ₄₉ H ₅₈ I ₄ N ₆ S ₂ |
| Mol. vekt | 1302.78 |
| CAS Nr./Navn | 143413-84-7 / Quinolinium, 1-1'-[1,3- propanediylbis[(dimethyliminio)-3,1- propanediyl]]bis[4-[(3-methyl-2(3H)- benzothiazolylidene)methyl]]-, tetraiodide |

Tabell 5.3.4 RiboGreens (TOTO®-1 iodide)- molekylærformel og molekylærvekt



Figur 5.3.4.1 RiboGreen struktur formel. Ribogreen (TOTO® -1 iodide) er en Cyanin dimer. Den består av to cyanin monomerer (TO-PRO-1 iodide) kovalent bundet. TOTO®- iodide har høy affinitet for RNA molekylet.

Framgangsmåte:

Løsninger:

1mM RiboGreen RNA Quantitation reagent løst i DMSO

20x TE-buffer:

200mM Tris- HCl, 20mM EDTA pH 7.5

løst i DEPC vann

RNA standard:

200mg rRNA (Type VI from *Torula* yeast R-6625 lot 99F0853-pulver) ble løst i 1 ml 20x TE buffer

Ribogreen® RNA-reagens og prøvene ble tatt ut av fryseren en halv time før bruk.

TE-bufferen ble tatt ut av kjøleskapet og varmet opp i ett minutt ved 60°C i vannbad. Det oppnås bedre resultater hvis TE-bufferen har romtemperatur eller høyere

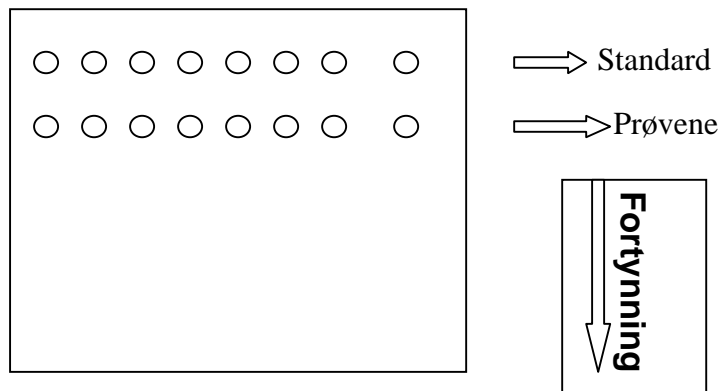
Eppendorf Termomixer confort ble satt på 60°C.

Prøvene og standarden ble varmet opp i ett min. v/60°C under risting og blandet godt før bruk. 5ml 20xTE-buffer ble overført til et 15ml rør, 2 µl (28U/µl) Rnase-inhibitor ble tilsatt og blandet godt.

1mM RiboGreen ble fortynnet 2000x: 20 prøver à volum på 200µl → 1µl

RiboGreen + 1.9 ml TE-buffer

Standarden og de fortynnede prøvene ble pipettert til en mikroplate som vist i figur 5.3.4.2



Figur 5.3.4.2 Retning av pipettering i mikroplate

Alle prøvene ble blandet godt (pipettert opp ned 2-3 ganger)

Mikroplaten ble dekket med aluminiumsfolie og inkubert i Eppendorf Termomixer comfort i 5min ved romtemperatur under risting

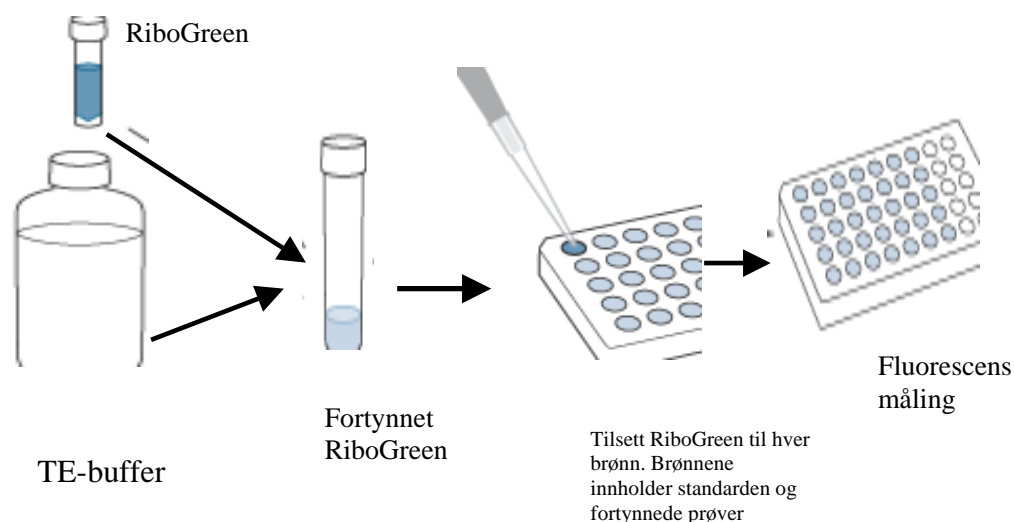
Gjenværende fortynnet Ribogreen[®] RNA-reagens ble pakket i aluminiumsfolie og lagret v/-20°C til senere bruk..

Ribogreen[®] RNA-reagens er lysømfintlig

Fortynning av standard

| Volum (µl) av TE | Volum (µl) 200ng/ml RNA stock | Volum (µl) 2000x fortynnet RiboGreen | Slutt- konsentrasjonen av RNA i assayet |
|------------------|----------------------------------|--|--|
| 0 | 100 | 100 | 100 ng/ml |
| 25 | 75 | 100 | 75 ng/ml |
| 50 | 50 | 100 | 50 ng/ml |
| 75 | 25 | 100 | 25 ng/ml |
| 87,5 | 12,5 | 100 | 12,5 ng/ml |
| 97,5 | 2,5 | 100 | 2,5 ng/ml |
| 99,5 | 0,5 | 100 | 0,5 ng/ml |
| 100 | 0 | 100 | blank |

Tabell 5.3.4.1 Standard: Høy sensitivitet assay

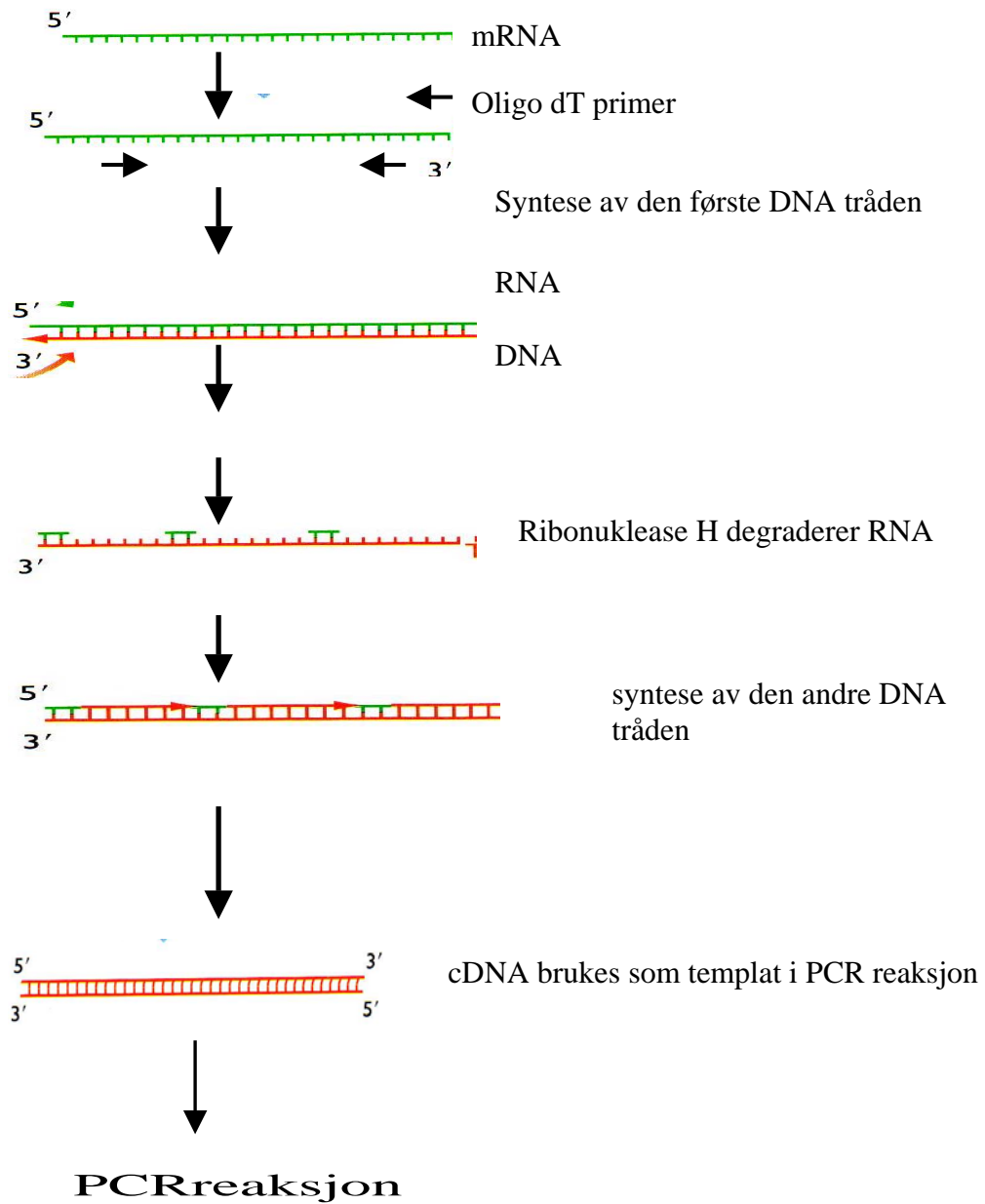


Figur 5.3.4.3 Oversikt over hovedtrinnene i RiboGreen protokol

5.4 Ett-trinns RT-PCR (Revers Transkriptase–Polymerase Chain Reaction)

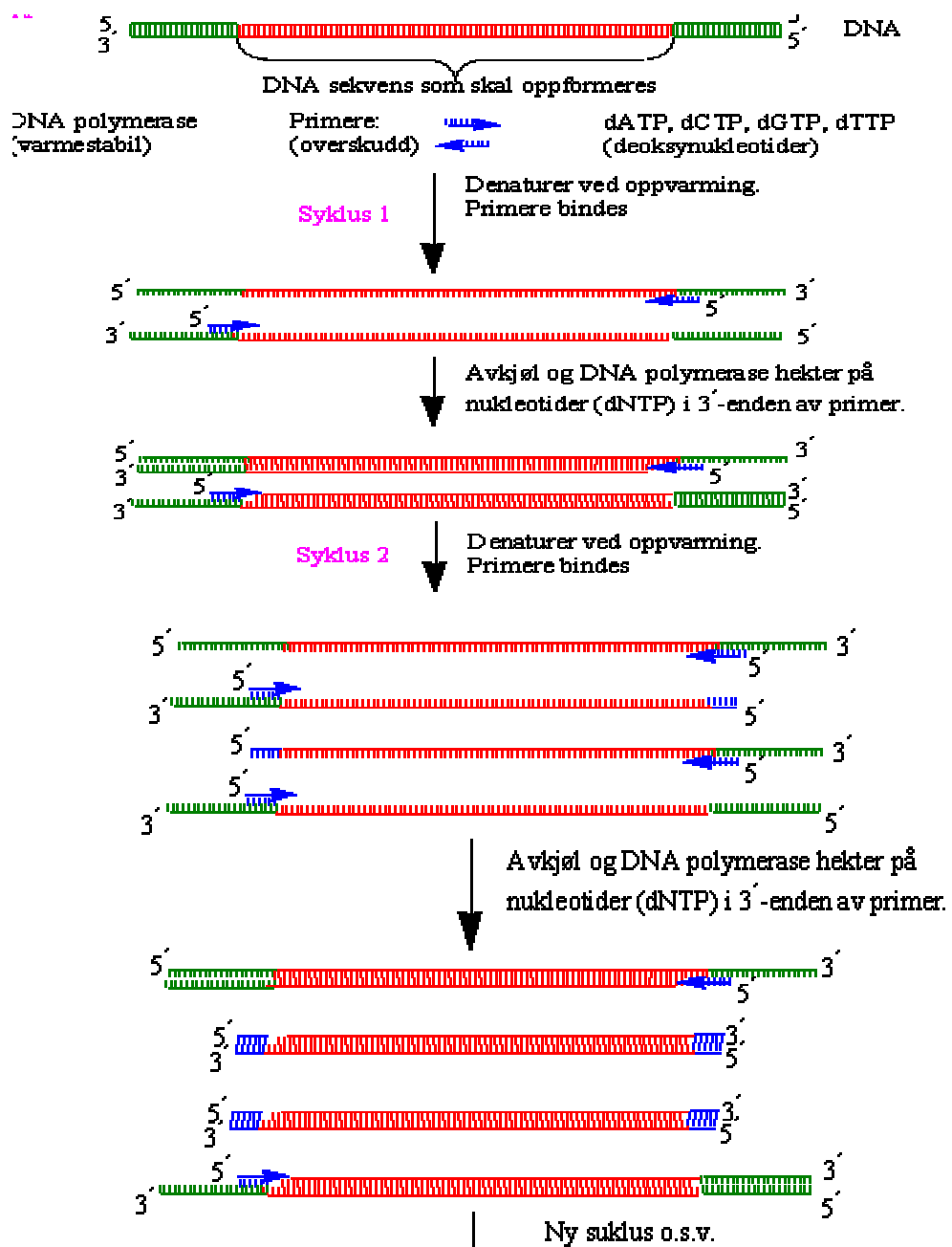
RT-PCR er en metode for primerbestemt kopiering av en mRNAsekvens til komplementær DNAsekvens. Revers transkriptasene Omniskript™ og Sensiskript™ syntetiserer dobbeltråd stegvis (RT syntetiserer den første tråden som DNA og deretter den andre DNA tråden) fra enkeltrådet RNA. Disse enzymene har en optimal temperatur mellom 50 - 60°C, under denne temperaturen holdes HotStar DNA-polymerase inaktiv. Når temperaturen økes til ca. 90°C endrer HotStar DNA-polymerase sin konformasjon og aktiveres. Når temperaturen økes til 95°C, denatureres dobbeltrådet DNA, dvs dupleksen faller fra hverandre. Temperaturen senkes deretter til ca. 40 - 65 °C, avhengig av hvilke primere som benyttes, slik at primerne (ca. 21 basepar) fester seg til enkeltrådene. Primerne er komplementære til sekvenset i mRNA som oppformes. Vi har brukt spesifikke primere slik at bare et enkelt mRNA blir anvendt av ett primerpar. Temperaturen blir hevet til 72 °C og HotStar DNA polymerase replikerer dobbeltrådet DNA fra 3'-OH-enden av primerne, ved å legge på deoksynukleotidene (dATP, dCTP, dGTP og dTTP som alle har samlenavnet dNTP), derved har man fått to nye like dobbeltråder. DNA-polymerase lager DNA fra 5' til 3' retning. Prosessen gjentas og alle de nye DNAer som lages virker som templat for nye DNA, slik at økningen er eksponensiell d.v.s DNAstykkene dobbles i hver syklus (2^n , hvor n er antall sykluser). DNA polymerase som benyttes i Qiagen ett trinns RT-PCR er varmestabil d.v.s. det beholder den katalytiske aktiviteten selv om temperaturen stiger opp til 94°C.

RT Revers Transkripsjon



Figur 5.4A Hovedtrinnene i reverstranskripsjon

PCRreaksjon



Figur 5.4B Hovedtrinnene i PCRreaksjon

5.4.1 QIAGEN ett-trinns RT-PCR

Det ble brukt 0,25µg RNA per RT-PCRreaksjon

Løsninger: For detaljer vises det til metode beskrivelse i Qiagen® OneStep RT-PCR kit håndbok, 01/2002.

Følgende RT-PCR program ble benyttet:

Revers Transkripsjon:

1 syklus/runde:

50 - 60°C 30 min.

PCR amplifikasjon

Aktivering av polymerase

90 °C 15 min.

Denaturering: 94 °C 0,5-1min.

Annealing: *°C 0,5-1min.

Ekstensjon: 72 °C for 1-1,5 min/kb

Ekstensjon

72 °C 5-10 min.

*Avhengig av hvilke primere som blir brukt. Se avsnitt 5.4.1.2

5.4.1.2 Primere til RT-PCR

Primere ble designet ved hjelp av Oligoprogrammet (Oligo v.6) ut fra relevante mRNAsekvenser.

| Primere | | | | | |
|----------------|----------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---|
| Primer | Accession nr. | S_m °C | RT-PCR Produkt størrelse | Basepar | |
| Oksidase | AF006688 | 50 | 447bp | 5'-AGA CTT CCA ATC ATG CGA TAG-3' | U |
| | | | | 5'-GTT TAT ACT GCT GCG TCT GAA-3' | L |
| PPAR- α | AI323000 | 58.3 | 455bp | 5'-AGG GCT GAG CGT AGG TAA TG-3' | U |
| | | | | 5'-GAA TTA TAA ACG CAA CGT AGA GTG-3' | L |
| P450 | D17571 | | 420bp | 5'-TCC ATT GCC TCG TCG TCT AAG-3' | U |
| | | | | 5'-GCC ACA TTA AGC TGC GTG AG-3' | L |
| c-myc | NM010849 | 60.3 | 621bp | 5'-TGG AGA TGA TGA CCG AGT TAC TTG-3' | U |
| | | | | 5'-GCT GGT GAG TGG AGA CGT GG-3' | L |
| Erk2 | NM 011949 | 54.7 | 921bp | 5'-GCA GGT GTT CGA CGT AGG-3' | U |
| | | | | 5'-GGC TCA TCA CTT GGG TCA TAA-3' | L |
| JunB | NM008416.1 | 61.8 | 230bp | 5'-AAA GAG GAA CCG CAG ACC GTA-3' | U |
| | | | | 5'-AGA CCG GCA GCA CTC GCA-3' | L |
| Scr3 | AB026583 | 58.4 | 621bp | 5'-CGG GAG TGG TGG GAA ACG C-3' | U |
| | | | | 5'-CCT GCT GTG GGC GAT ACT GTA-3' | L |
| β -aktin | X03672 | 53.8 | 542bp | 5'-TGT GGC ATC CAT GAA ACT ACA-3' | U |
| | | | | 5'-CAA CCA ACT GCT GTC GC-3' | L |
| L-27 | | 57.1 | 315bp | 5'-CAA AGC GCT CAT CGT GAAG-3' | U |
| | | | | 5'-TTC CCT GTC TTG TAT CGC TCC3-3' | L |

Figur 5.4.1.2 Oversikt over primere brukt til RT-PCR

Mastermiks

| Reagenser | μl uttak / prøve |
|--------------------------------|--|
| 5x Qiagen OneStep Buffer | 5 μ l |
| 10mM dNTP miks | 1 μ l |
| 28U/ μ l RNase inhibitor | 0,3 μ l |
| 0.6mM Primer U+L | z μ l |
| 250U OneStep RT-PCR Enzyme Mix | 1 μ l |
| RNasefritt vann | y μ l |
| Prøve | x μ l |
| Totalvolum | 25 μ l |

Tabell 5.4.1.3 Mastermiks brukt til ett trinnsRT-PCR

z antall μ l varierer avhengig av primerparet.

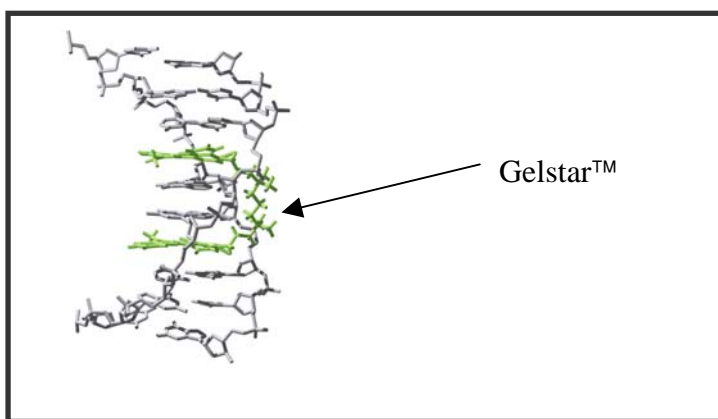
y brukes for å oppnå totalt volum

5.5 Elektroforese

RT-PCR produktene tilsatt Gelstar™ kan atskilles på grunnlag av størrelse ved agarosegelelektroforese. De store RT-PCR produktene vandrer kortere enn de mindre på grunn av at fosfat- grupper i nukleinsyrene vandrer mot anoden. 3 % TBE BioRad geler med 64 (2x32) brønner ble benyttet. Adskilte PCRprodukter ble detektert ved fluorescens på 530nm, etter at Gelstar eksiteres ved 430nm.

Gelstar™ er en usymmetrisk cyanin farge for deteksjon av nukleinsyrer i agarosegeler. GelStar™ binder seg til RT-PCRproduktene gjennom elektrostatiske krefter og/- eller ved interkalering (se figur nr. 5.5).

GelStar™ er mindre mutagent enn EtBr.



Figur 5.5 GelStar interkallerer med RT-PCR produkt

Løsninger:

Tillaging av 10xTris/Boric acid/EDTA buffer pH8,3 (TBE elektroforese buffer)

0,89 M Tris, 0,89 M borsyre, 0,02M EDTA

pH ble justert med KOH/HCl

Det ble laget 1L 2x Tris/Boric acid/EDTA buffer(50ml 10x TE buffer til 1000ml)

Tillaging av 1% loadingbuffer med 1% bromofenolblått:

5ml 100% glyserol

250µl 10x Tris/Boric acid/EDTA buffer pH 8.3

3,75 ml H₂O

1ml 10% bromofenolblå

Framgangsmåte

Det ble brukt loadingbuffer m/ 1% Gelstar. Loadingbuffer og Gelstar ble blandet og oppvarmet i 5 min. v/ 65°C i Eppendorf Termomixer comfort.

Det ble laget 10 % mer loadingbuffer enn det som var påkrevd fordi bufferen er veldig viskøs og det blir mye igjen i pipettespissen.

Prøvene ble varmet opp i 2 min.v/65°C i Eppendorf Termomixer comfort

Y μ l prøve ble tilsatt **X** μ l loadingbuffer (inneholdende Gelstar).

X og **Y** er avhengig av hvilke primere vi har brukt for å utføre PCRreaksjonen.

Prøvene og loadingbuffer ble blandet godt, oppvarmet i 2 min. v/65°C. En gel (3 %) ble satt inni elektroforeseapparatet og forvasket i 10 min v/100V

15 μ l loadingbuffer inneholdende prøve ble tilsatt hver brønn (64 brønners Instagel®), apparatet innstilt til 124V og gelen kjørt 10 min. Kraftforsyningen ble justert til 75V, og gelen kjørt ytterlig 45-50 min.

| Primere | μ l prøve | Primer kons. | μ l uttak loadingbuffer |
|-----------------|---------------|--------------|-----------------------------|
| mL-27 | 2 | 0.6mM | 18 |
| m β aktin | 5 | 0.6mM | 15 |
| mPPAR | 10 | 0.6mM | 10 |
| mcmyc | 10 | 0.6mM | 10 |
| mINF γ | 2,5 | 0.6mM | 17,5 |
| mcyp | 1 | 0.6mM | 19 |
| moxidase | 2 | 0.6mM | 18 |
| mGADPH | 1 | 0.6mM | 19 |

Tabell 5.5 Oversikt over prøveuttak (avhengig av primer par) og loadingbuffer

5.5.1. Kvantitering av mRNA-mengde med Total Lab. V2

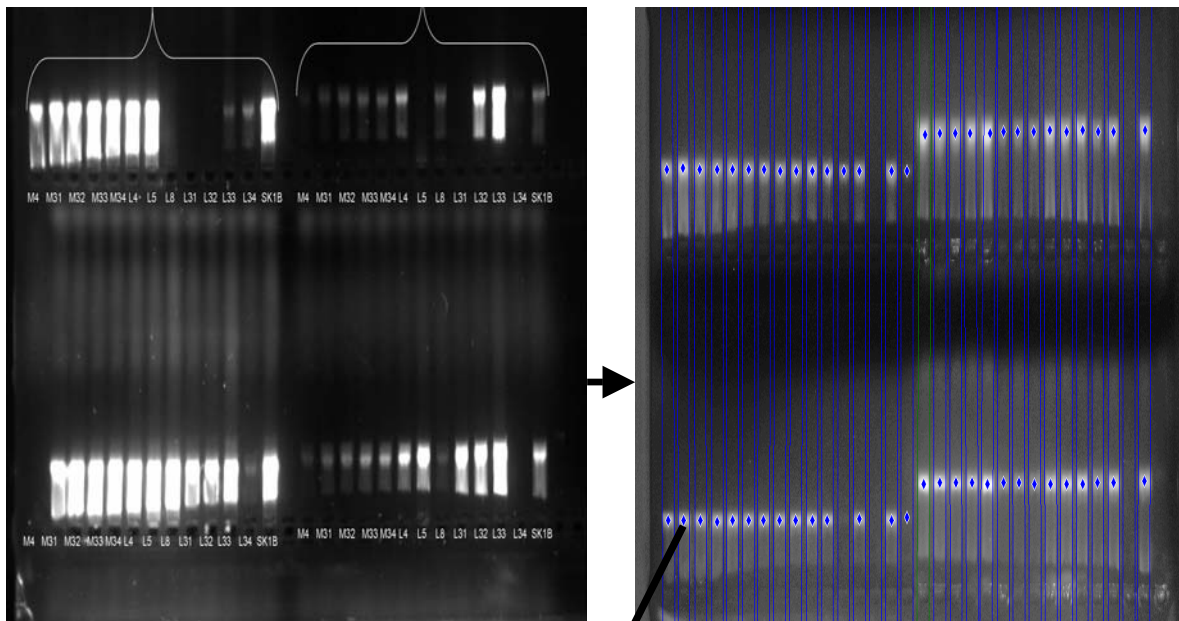
Mengde mRNA ble kvantitert v.h.a. Total-Lab.V2. Med dette programmet kan skannede bilder lagret i, 16 bit tif format kvantiteres.

Båndene på gelen avgrenses og kvantiteres. Pikkelvolumet innenfor det avgrensede området beregnes og resultatene presenteres som et regneark. Disse verdiene brukes til å beregne endringer i mengde mRNA i prøven. Resultatene ble normalisert i forhold til mengde mRNA for β -aktin eller L-27 i den samme prøven.

Behandlet prøve

_____ X 100

Kontroll (β -aktin,L-27)



A

B

Effects of treatment for 3 days with hexabromo-cyclododecane or with isopropylidenebis(2,6-dibromophenol) on hepatic levels of selected mRNAs as measured by RT-PCR.

| Primer | Behandling | |
|----------------|-------------|-------------|
| | 4(%w/w)HBCD | 4(%w/w)IBP |
| | pikselvolum | pikselvolum |
| Oxidase | 134 | 63 |
| PPAR-a | 123 | 91 |
| P-450 | 202 | 219 |
| cmyc | 199 | 143 |
| erk2 | 127 | 99 |
| JunB | 112 | 113 |
| Scr3 | 91 | 91 |
| β -actin | 108 | 72 |

C

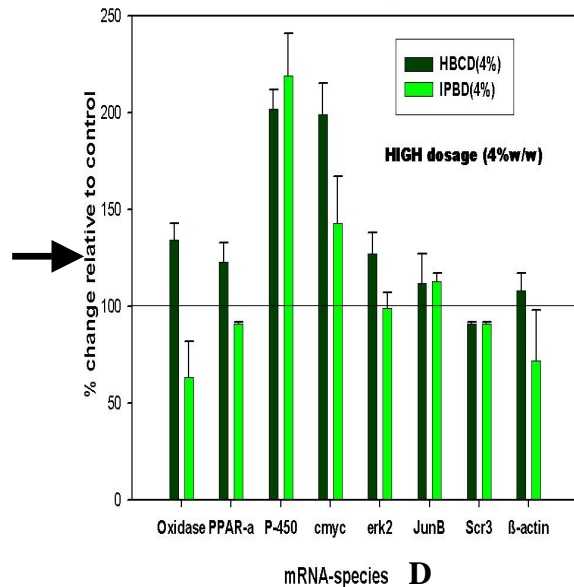


Fig 5.5 Oversikt over hovedtrinnene i behandling av RT-PCR resultatene. Båndene i gelen (A) avgrenses (B) og kvantifiseres v.h.a. programmet Total Labv2. Resultatene (pikselvolumet innenfor det avgrenset området) blir presentert exel-ark (C) og bearbeidet videre i programmet Sigma Plot 2000(D).

5.6 Membranmatriser

Membranmatriser er forløpere til mikromatriser. Ved å hybridisere cDNA merket med fluorescens eller radioaktivitet til kloner immobilisert i membranen, kan vi bl.a. overvåke genekspresjonen og fastslå om mRNA nivåene til de korresponderende genene er endret. Ved bruk av membranmatriser ble det mulig å fastslå forandringer i uttrykket av flere sett gener i et vev. For at forsøket skulle bli meningsfylt ble aktiviteten til gener, som koder for proteiner, assosiert med celledød/stress eller celleproliferasjon/kreft utvikling, undersøkt. Det ble brukt membranmatriser fra SuperArray inc.(www.superarray.com). Totalt er det 96 kloner/gener på Q-type membranmatriser.

Framgangsmåte:

I dette forsøket ble det brukt balbcmus fôret med kost supplert med henholdsvis 1% eller 4 % HBCD og 1% eller 4 % IBP. Totalt RNA ble ekstrahert fra kontrollmuselever og behandlet muselever, kopiert til cDNA merket og amplifisert. Deretter ble komplementær Biotin-merket cDNA brukt til hybridisering av membranmatrisene. For å redusere uspesifikk binding i membranmatrisen ble den prehybridisert med denaturert laksemelke-DNA. Merket cDNA fra behandlet og kontrollever ble denaturert og brukt til å hybridisere to separate, men identiske membranmatriser. cDNA syntetisert fra RNA fra kontrollever ble brukt til hybridisering av den ene membranen. cDNA syntetisert fra RNA fra behandlet lever ble benyttet til hybridisering av den andre membranen. Membranmatrisene ble inkubert med antistoffet AP-streptavidin og CDP-Star® for kjemiluminescens-deteksjon v/530nm.

MM-012, MM-008, MM-026 GEArray Q serier membranmatriser ble brukt i forsøket. Se www.superarray.com for detaljert beskrivelse og posisjon av kloner/gener i de forskjellige membranmatrisene.

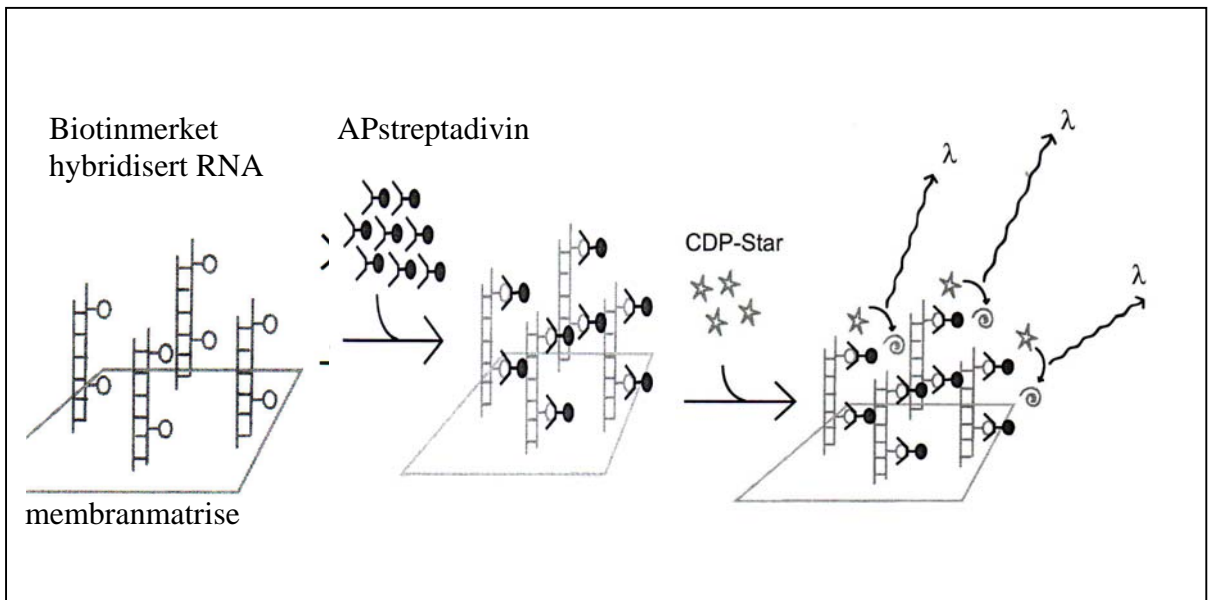
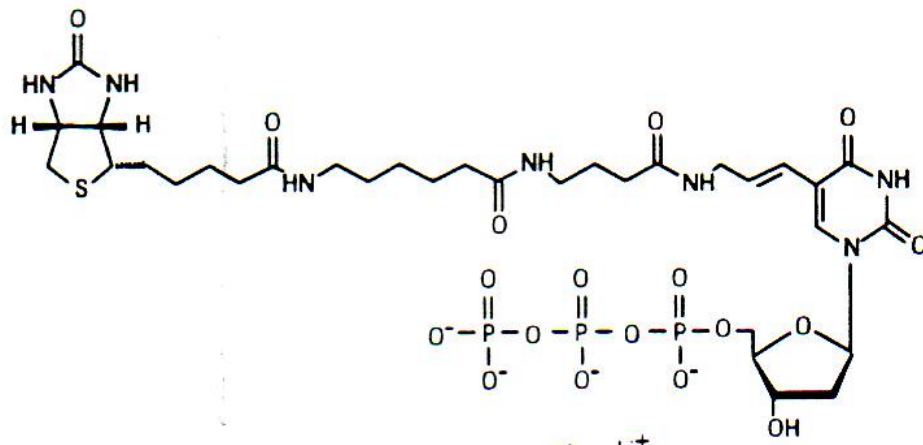
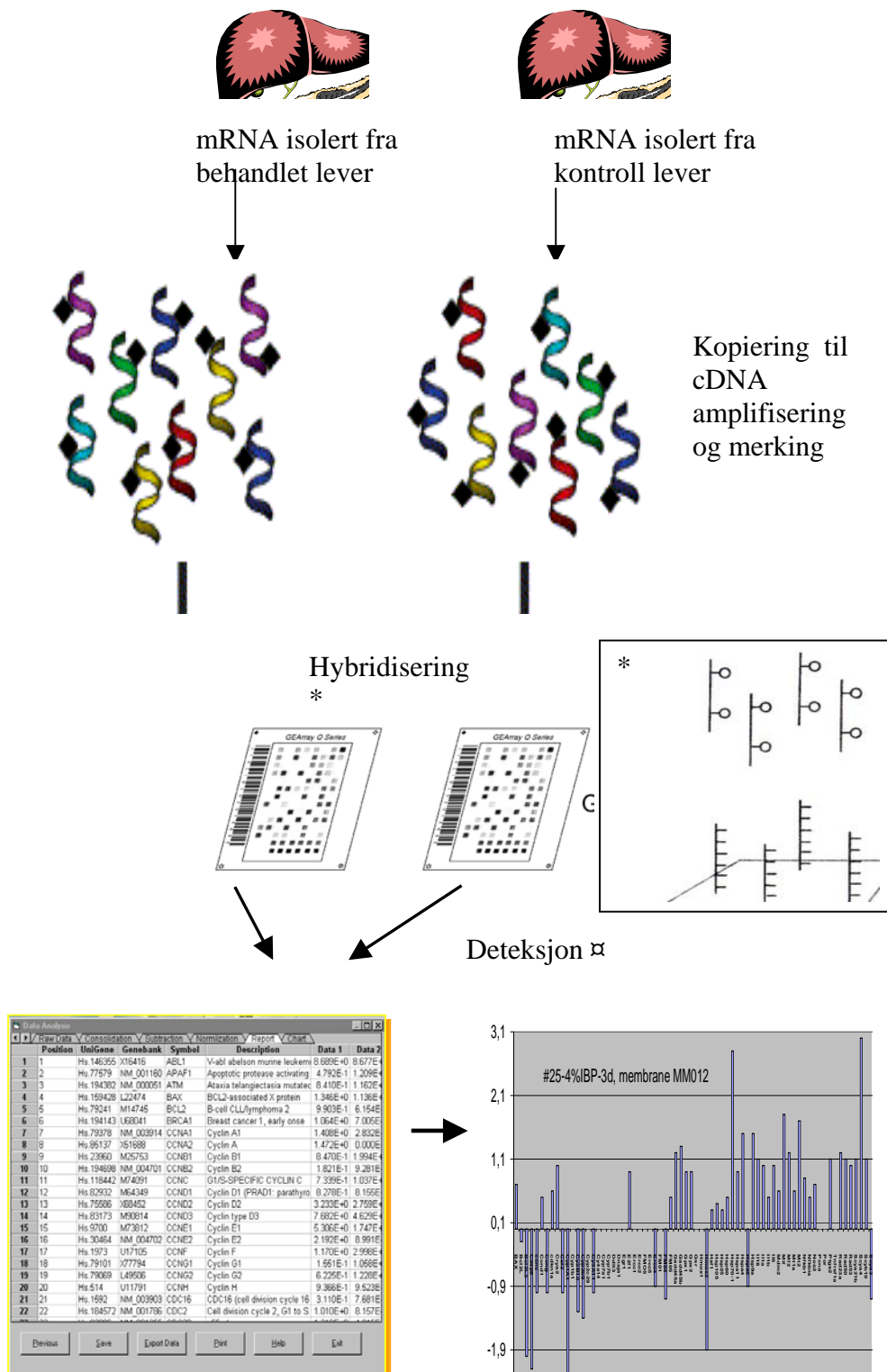


Fig 5.6A Kjemiluminescens deteksjon



Figur 5.6B Strukturformel til Biotin- 16- dUTP($C_{32}H_{48}N_7O_{18}P_3SLi_4$)



Figur 5.6C RNA ekstrahert fra behandlet- og kontrolllever kopiert til cDNA, amplifisert og merket med biotin ble hybridisert på to separate, identiske membranmatriser. Membranmatrisene ble skannet, spotene ble kvantitert med Total-labv2. Rådata bearbeidet i Sigmoidplot, GEAnalyser og Microsoft-exel

5.6.1 Nonrad-GEArray™ Q Protokoll

Med luminescens probe

Løsninger: For detaljer henvendes det til produsentenes metode beskrevet i GEArray™ Q series KIT (for non- radioactive detection) User's manual (www.superarray.com).

Følgende molekylære biologiske reagenser måtte kjøpes:

Biotin-16-2'-dUTP* (1mM Roche, cat.nr.1-093-070)

Sheared Salmom sperm DNA (Invitrogen, Cat.nr. 15632-011)

MMLV RT(200U/ µl Promega, cat.nr. N2511)

Framgangsmåte:

Dag 1.

5.6.1.1 Tillaging av Buffer B

Buffer B lages ved første gangs åpning av kit- esken.

5x GEA labeling buffer = Buffer B

50 µl 10x RT-buffer, 2µl 1M DTT, 10 µl 25mM dNTP miks ble blandet godt i 40 µl DEPC vann

Kitet krever 50µl dNTP miks (5mM dATP, 5mM dGTP, 5mM dCTP og 500µM dTTP). Jeg brukte en dNTP miks (25mM dGTP, 25 mM dTTP , 25 mM dATP , 500 µM dCTP). Derfor ble det brukt 10µl dNTP mix med 40µl vann

5.6.1.2 Merkingsmiks

| Labeling/merkingsmiks | Til 2 prøver |
|--|--------------|
| 5x GEA labeling buffer | 8 µl |
| 1mM Biotin-16-dUTP | 4 µl |
| 28U/µl RNaseinhibitor | 2 µl |
| MMLV Revers Transkriptase (200 units/µl) | 2 µl |
| RNasefritt vann | 4 µl |
| Totalt | 20µl |

Tabell 5.7.2 Typisk eksempel på labeling/merkingsmiks

5.6.1.3 Merking av RNA (prøvene) med Biotin-16-2'-dUTP

Følgende reagenser ble pipettert og blandet godt:

1-5 µg RNA (totalt RNA = vår prøve)

3 µl (ukjent konsentrasjon) GEA primermiks

1 µl 28U/µl RNaseinhibitor

Xµl RNasefritt vann (slik at sluttvolumet ble 10 µl)

Løsningen ble sentrifugert v/maks hastighet i 1 minutt i Biofuge A

Prøvene ble varmet opp i 3 minutter i Eppendorf Termomixer komfort ved 70°C, deretter ble temperaturen senket til 42°C.

Labelingmiksen ble overført til Eppendorf Termomixer komfort og inkubert i 2 minutter ved 42°C

10µl labelingmiks ble tilsatt hver prøve, blandet godt og inkubert 90 i minutter ved 42°C

Etter 90 minutter ble det tilsatt 5 µl 10x Stop løsning for å stoppe reaksjonen.

5.6.1.4 Prehybridisering med laksemelke (DNA)

Membranene ble fuktet med 2ml destillert vann

Forvarmet hybridiseringsløsning (3ml per prøve) ble overført til et falkonrør

100µg/ml laksemelke (DNA) (30µl per prøve) ble denaturert i 5 min. ved 99° C,

Denaturert laksemelke ble straks satt på is og 30 µl ble tilsatt hvert falkonrør (innholdende 3ml hybridiseringsløsning).

2ml hybridiseringsløsning ble tilsatt, overført til et hybridiseringsrør og satt i hybridiseringsovn 1 time v/60°C.

Resten av hybridiseringsløsningen (1 ml) ble holdt varm v/60°C.

5.6.1.5 Prøvedenaturering

Dette er en fortsettelse av punkt 5.6.1.3 (etter 90 min.)

10x denatureringsbuffer (5µl) ble tilsatt hver prøve og inkubert ved 68°C i 20 minutter i Eppendorf Termomixer komfort maskinen. Oppvarmet 2x

nøytraliseringsløsning (50µl) ble tilsatt, blandet godt og inkubert i 10 minutter ved 68°C. Væsken i hybridiseringsrøret ble helt av, og erstattet med hybridiserings løsning (resterende 1ml + denaturert prøve) og membranen hybridisert over natten v/60°C.

Dag 2

5.7 Vasking og detektering

5.7.1 Vasking

Hybridiseringsvæsken ble fjernet fra hybridiseringsrørene og vasket på følgende måte:

- A. **2 ganger** med 3 ml forvarmet* 2xSSC, 1% SDS i 20 minutter
- B. **2 ganger** med 3ml forvarmet* 0.1x SSC, 0.5 %SDS i 20 minutter

* vaskeløsningene ble varmet i minst 20 min v/68°C

5.7.2 Detektering

Detekteringen foregikk ved romtemperatur

CDP-Star ble satt på benken i 20 minutter før bruk

GEA blokkingsløsning Q (1,5ml) ble tilsatt hvert hybridiseringsrør for å blokkere membranen. Membranen ble så inkubert ved 18-20 °C i 50 min.under rotasjon.

5x vaskebuffer F fortynnet til 1:5 med vann .

1x vaskebuffer F (2ml/prøve) ble oppvarmet ved 37°C.

1 µl/prøve 1x AP-streptavidin ble fortynnet 1:7.500 i 1x vaskebuffer F.

GEA blokkingsløsning Q ble erstattet med 2 ml fortynnet 1xAP-streptavidin buffer og membranen ble inkubert i 15 minutter under rotasjon.

Membranen ble vasket fire ganger med 1x vaskebuffer F (4ml) og inkubert i 25 minutter ved 37°C.

1x vaskebuffer F ble erstattet med 1 ml CDP-Star og inkubert i 5 min. ved romtemperatur.

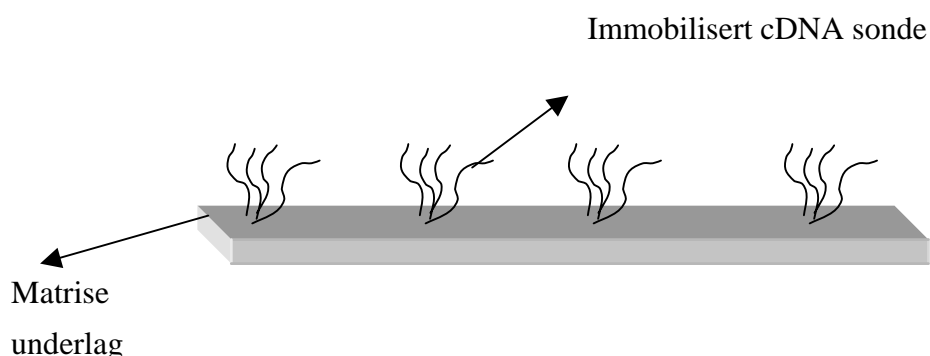
Membranen ble vasket med 1xAP-streptavidinbuffer (3ml)

Membranene ble tatt ut av hybridiseringsrøret og raskt lagt på et filterpapir for å fjerne overflødig væske. Deretter ble de pakket i plast (membranene ble merket med en blyant før forsegling av plasten).

5.8 Mikromatriser

Mikromatriser er en ordnet samling av immobilisert cDNA eller oligonukleotider. Dette immobiliserte materialet festes flekkevis til matriseunderlaget av glass eller nylon. Flekkene har en diameter > 300 mikrometer og høy densitet (opp til 40000 flekker på et areal rundt 6x2 cm). Festeoverflaten kalles for matriseunderlag.

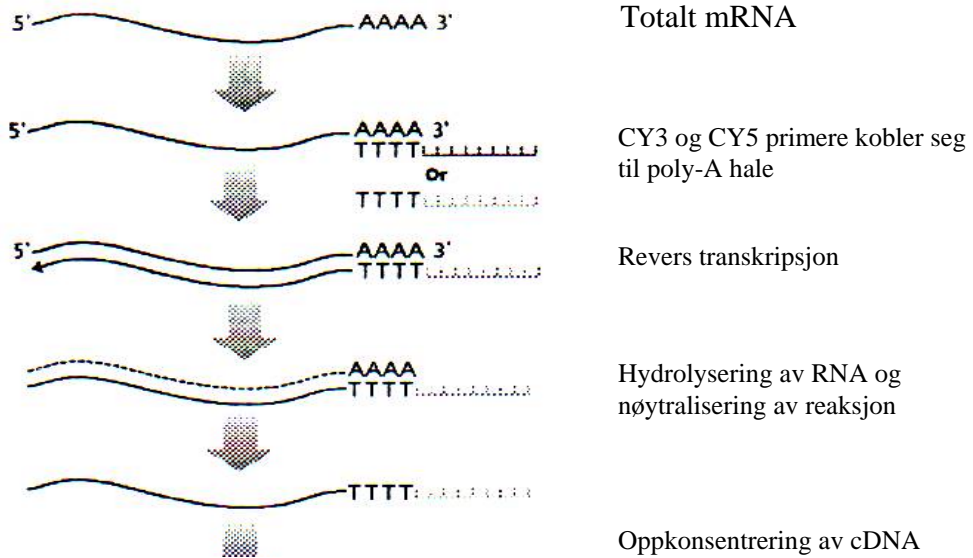
Oligonukleotidene eller cDNA som festes på matriseunderlaget kalles sonde-DNA (probe DNA). Merket cDNA fra behandlede eller kontrollprøver hybridiserer med det immobiliserte DNA. For å kartlegge effektene av HBCD- eller IBP-behandling hos muselever ble det benyttet 30k oligobaserte musmikromatriser fra NTNU-Microarray Core facility -Trondheim. Disse inneholder 30 000 gener/kloner (<http://www.operon.com/arrays/omad.php>).



Figur 5.8 Mikromatriseunderlag og immobilisert cDNA sonde

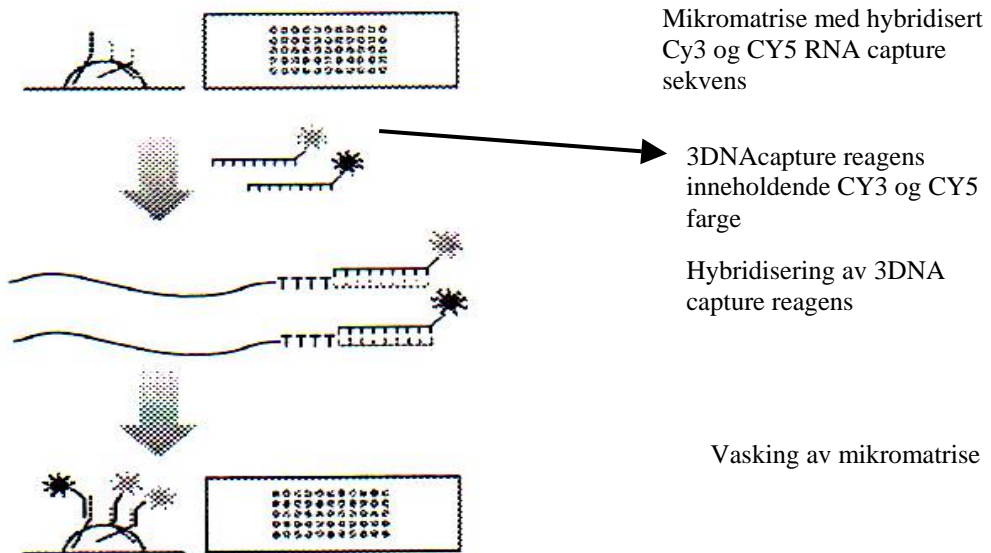
3DNA merking trinn 1:

1. RNA amplifikasjon og påsetting av RNA capture sekvens.

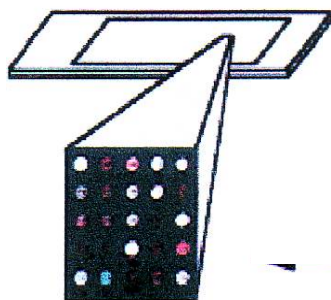


Hybridisering

3DNA merking trinn 2:



Skanning



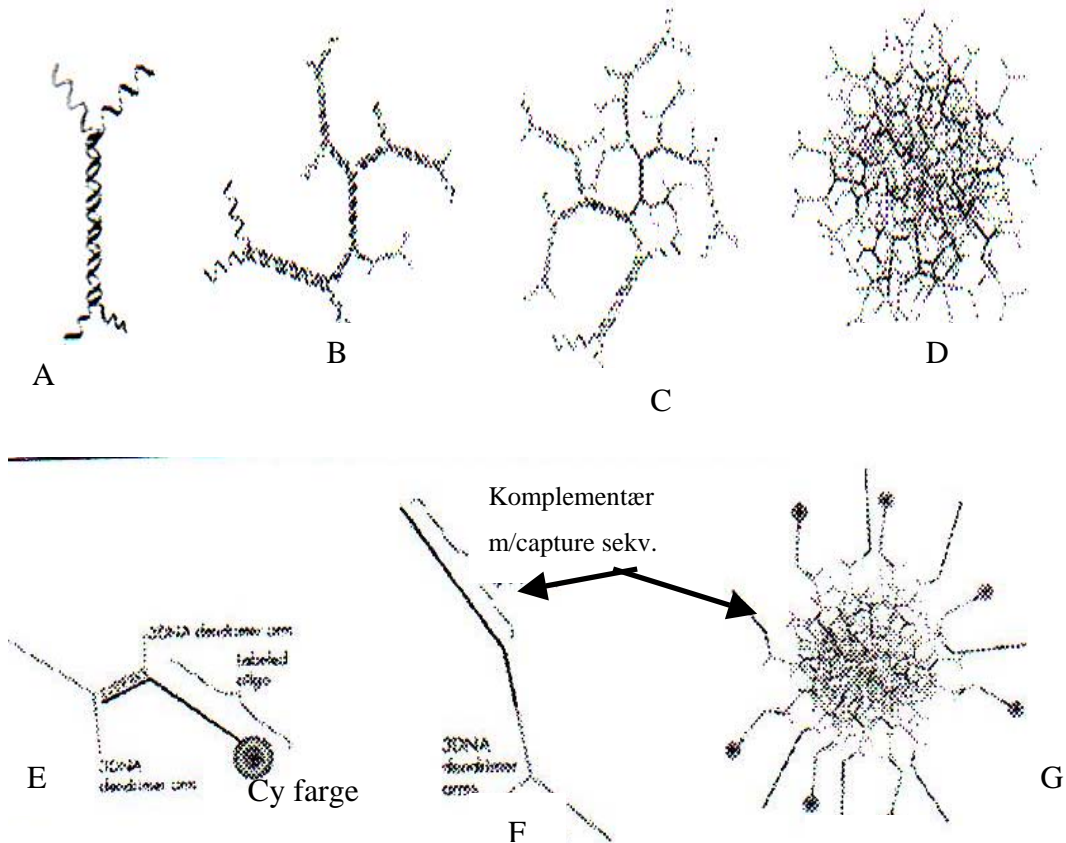
- Genet er mer uttrykt i kontrollever
- Genet er mer uttrykt i behandlet lever
- Genet er likt uttrykt i begge prøvene

Figur nr. 5.8A Hovedtrinnene i 3DNA merkingsmetode

Framgangsmåte:

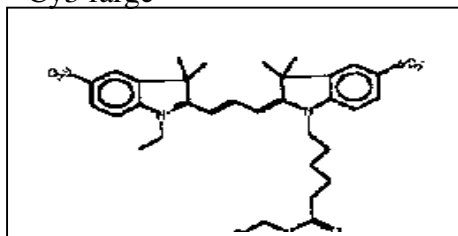
I denne metoden ble det brukt indirekte merking av cDNA med fluorescent 3DNA dendrimerer. Disse blir ikke inkorporert under cDNA syntese. Direkte inkorporering av cyaninfargene til cDNA før hybridisering, fører til dårligere hybridisering fordi dette krever bruk av substituerte baser.

3DNA dendrimerer

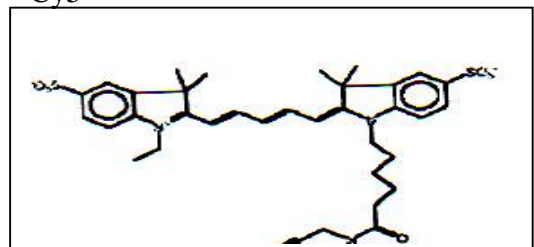


Figur 5.8B 3DNA dendrimer består av mindre enheter (A, B og C). Dendrimerene kan danne en tredimensjonal struktur (D). Cy3 og cy5 fargene er koblet til et av armene (E) mens spesifikke sekvenser (komplementære med RNA capture sekvensen) er koblet til andre armer (F). Dendrimerstrukturen betyr at hvert hybridiseringssignal kommer fra flere molekyler med Cy3 eller Cy5 (G). Derfor blir også sensitivitet på hybridiseringssignal høy med denne metoden.

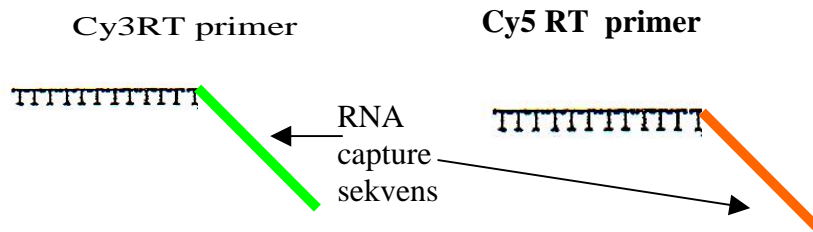
Cy3 farge



Cy5



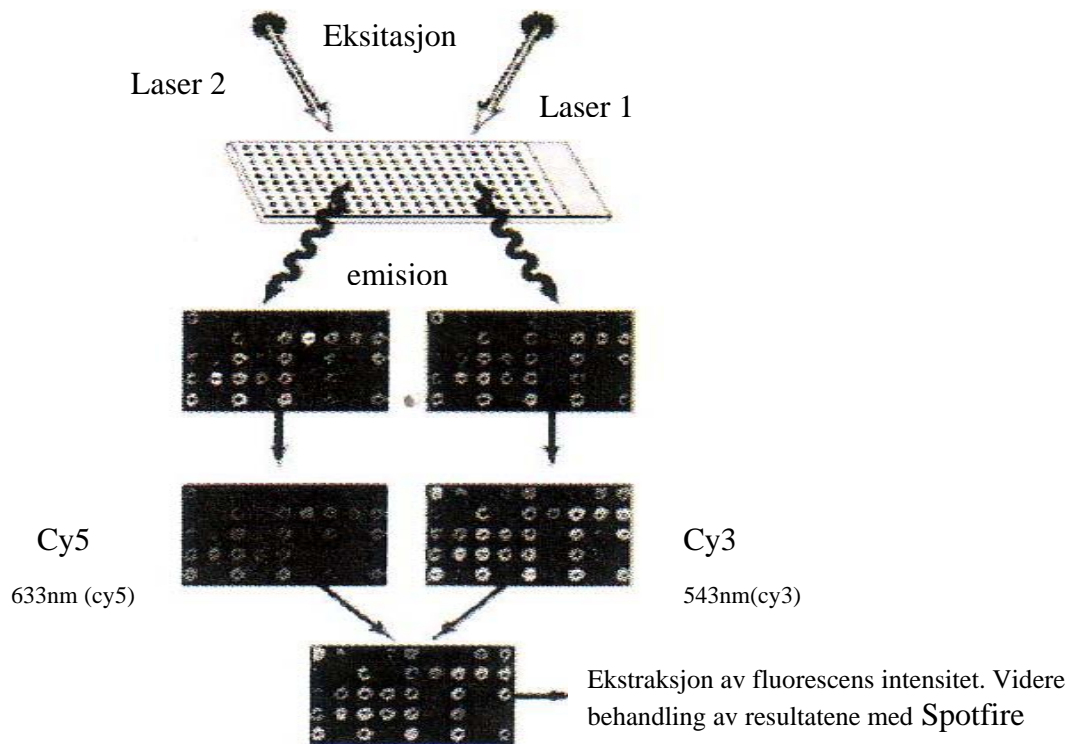
RNA ble isolert fra behandlet og kontrollmuselever (se punkt 5.2), kopiert til cDNA og amplifisert v.h.a. RT-PCR med Cy3 og Cy5 spesifikke oligo dT primere som også inkluderer en RNA capture sekvens. cDNA ble oppkonsentrert og hybridisert til mikromatrisen over natten ved 63°C.



Figur 5.8C Cy3 RT- eller Cy5 RT- spesifikke primere

..

cDNA som ikke var hybridisert ble vasket bort (se punkt 5.8.1.6) og 3DNA hybridisert til cDNA (3DNA dendrimerer kobler seg til RNA capture sekvens). Mikromatrisen ble vasket på samme måte som under punkt 5.8.1.6 . Mikromatrisen ble så skannet i en PerkinElmer mikromatriseskanner. Skanneren har to lasere, en med lys på 633nm for CY5 og en med lys på 543nm for CY3. Fluorescensintensiteten ble avlest med Scanarray express og resultatene ble behandlet videre med Spotfire.



Figur 5.8D Avlesning av fluorescensintensitet.

5.8.1 Expression Array Detection Kit (2-trinnshybridisering) for mikroarrays (v.30).

Oligo array (70 mer)

Dag 1.

Løsninger:

Løsninger til RT-PCR og merking av cDNA:

1,0pmol/μl RT primer for Cy3 Alexa Fluor 546

1,0pmol/μl RT primer Cy5 Alexa Fluor 647

dNTP miks: 10mM av hvert deoksynukleotid dATP, dCTP, dGTP, dTTP

28U/μl Superase-In™ Rnase inhibitor

Nuklease fritt vann

RTenzym : SuperScript II Enzym 200U/μl

5x SuperScript buffer II

Løsninger brukt til hybridisering:

Mus COT-1-DNA

2x SDS-basert hybridiseringsbuffer

Mus COT1 binder seg til små cDNA-biter og hindrer at disse hybridiserer til mikromatrise.

Løsninger brukt for å stoppe RT-PCR reaksjon:

0,5M NAOH,50mM EDTA (stopper cDNA syntese)

1M Tris-HCL , pH7,5

Løsninger brukt til rensing og oppkonsentrering av cDNA:

1xTE-buffer :10mM Tris-HCL, pH 8,0/1mM EDTA

70% (v/v)etanol (fortynnet i sykehusvann)

Løsninger brukt til farging av cDNA:

1,0pmol/μl Cy3 Alexa Fluor 546 3DNA Array 350 Capture Reagent

1,0pmol/μl Cy5 Alexa Fluor 647 3DNA Array 350 Capture Reagent

Vaskeløsninger:

Vaskebuffer I: 2x SSC, 0,2% SDS buffer

Vaskebuffer II: 2x SSC buffer

Vaskebuffer III: 0,2x SSC buffer

5.8.1.1 cDNA syntese (setter på RNA capture sekvens)

5μg RNA ble kopiert til cDNA. SuperScript II Enzym ble satt på is, og rørene inneholdende RT CY- primere ble satt på benken ved romtemperatur.

Antall mikroliter prøve uttak ble beregnet. Dette må regnes ut på nytt hver gang.

Det skal være maks 5μg RNA per prøve og maks 9μl volum (prøve + vann).

Totalvolumet: 11μl herav 2μl primer da har man igjen 9μl.

| Prøve – primer miks | | | |
|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------|
| CY3(grønn farge) | | CY5 (rød farge) | |
| 5ug RNA (prøve) | µl | 5ug RNA (prøve) | µl |
| 1,0pmole/µl RT primer CY3 | 2 µl | 1,0pmole/µl RT primer CY5 | 2 µl |
| RNase fritt vann | µl | RNase fritt vann | µl |
| <i>Totalt</i> | <i>11 µl</i> | <i>Totalt</i> | <i>11 µl</i> |

Tabell 5.8.1.1 Antall ul uttak RNA (må regnes ut for hver gang) og Cy-RT primere. RNase fritt vann brukes for å fylle opp til totalt volumet (11 µl).

Miksen ble blandet ved å knipse på rørene, sentrifugert i 10 sek og inkubert ved 80°C i 10 min. Etter innkubering ble rørene straks satt på is

5.8.1.2 RT-PCR

| Reaksjonsmiks til RT-PCR (til 2 prøver) | |
|--|--------------|
| 5x SuperScript buffer II | 8 µl |
| 0,1M DTT | 4 µl |
| 10mM dNTP blanding | 2 µl |
| 200U SuperScript II Enzym | 2 µl |
| 28U/µl RNase inhibitor | 2 µl |
| Total volum | 18 µl |

Tabell 5.8.1.2 Reaksjonsmiks til RT-PCR

Reaksjonsmiksen (9 µl) ble tilsatt hver prøve, blandet godt og inkubert i 2 timer ved 42°C. En løsning med (3,5 µl) 0,5M NaOH,50mM EDTA ble tilsatt for å stoppe RT-PCR reaksjonen, deretter blandet godt, sentrifugert i 10 sekunder og inkubert i 10 min. v/ 65°C for å denaturere DNA/RNAhybrider. 1M Tris-HCl pH 7,5 (5 µl) ble tilsatt for å nøytralisere reaksjonen, cDNA ble lagret v/-80°C.

5.8.1.3 Prevasking av mikromatrise

Dekkglassene ble vasket med etanol og satt til tørk i lafbenken

Mus COT 1 ble varmet i 15 min. v/ 80°C.

2x SDS basert hybridiseringsbuffer ble inkubert i 10min. v/ 65 °C og deretter holdt varm ved 63°C. Mus COT 1 holdes også som ved samme temperatur.

Mikromatrisen ble vasket med vaskebuffer I (40-45ml) i 20 min. v/ 55°C.

Vaskebuffer I ble erstattet med vaskebuffer III (40ml) og vasket i 10 min. v/ romtemperatur. Vaskebuffer III ble erstattet med dobbeltdestillert vann (40ml) og vasket i 3 min ved romtemperatur under rotasjon.

Mikromatrisen ble sentrifugert ved 1100 rpm i 2 min ved romtemperatur.

5.8.1.4 cDNA-rensing og oppkonsentrering

1x TE-buffer (100µl) ble tilsatt kolonnen og sentrifugert i 3 min. v/ 14000 rpm.

cDNA ble applisert til kolonnen uten å berøre membranen med pipette spissen.

Kolonnen ble sentrifugert i 10 min. ved 14000 rpm. 1x TE-buffer (5µl) ble tilsatt kolonnen.

Det ble knipset på kolonnen for å fordele TE bufferen utover membranen og inkubert i ett minutt ved romtemperatur. Kolonnen ble vendt opp ned i et nytt samlerrr og sentrifugert i 30 sekunder ved maks hastighet ved romtemperatur.

Kolonnen ble kastet. Total cDNA-volum var ca 5µl.

5.8.1.5 Hybridisering (av cDNA til mikromatrise)

| cDNA hybridiseringsmiks | |
|--------------------------------|--------------|
| cDNA fra Cy3 syntese | * µl |
| cDNA fra Cy5 syntese | *µl |
| 2xSDS hybridiseringsbuffer | 25 µl |
| Mus COT – 1 (konsentrasjon) | 1 µl |
| Nukleasefritt vann | µl |
| Total volum | 50 µl |

Tabell 5.8.1.5 Typisk cDNA hybridiseringsmiks

cDNA hybridiseringsmiksen ble blandet ved å knipse på røret, og inkubert først ved 80°C i 10 minutter og deretter ved 63°C i 20 minutter. cDNA-hybridiseringsmiksen ble applisert på mikromatrisen, som ble satt inn i hybridiseringskammeret og inkubert v/ 63°C over natten.

DAG 2.

5.8.1.6 Vasking etter cDNA-hybridisering

Forvarmet vaskebuffer II (30ml) ble helt i en petriskål. Mikromatrisen ble tatt ut av hybridiseringskammeret og satt i petriskålen slik at dekkglasset løsnet.

Mikromatrisen ble overført til et falconrør inneholdende 40-45ml vaskebuffer I og vasket i 20-25 min v/55°C under risting. Vaskebuffer I ble erstattet med 40-45ml vaskebuffer II og vasket i 20 min v/ romtemperatur. Vaskebuffer II ble erstattet med 40-45 ml vaskebuffer III og vasket i 20-25 min. v/romtemperatur. Vaskebuffer III ble tømt ut og mikromatrisen sentrifugert i 2 min. v/1100 rpm.

5.8.1.7 3DNA-hybridisering

| 3DNA-hybridiseringsmiks | |
|---|--------------|
| 1,0pmol/µl Cy3/Alexa Fluor 546 3DNA 900 capture reagens | 2,5 µl |
| 1,0pmol/µl Cy5/Alexa Fluor 647 3DNA 900 capture reagens | 2,5 µl |
| 2xSDS hybridiserings buffer | 25 µl |
| Nukleasefritt vann | 20 µl |
| Totalvolum | 50 µl |

Figur 5.8.1.7 Typisk 3DNA-hybridiseringsmiks

3DNA hybridiseringsmiksen ble blandet ved å knipse på røret og deretter inkubert i 10 minutter ved 80°C. Temperaturen ble senket til 55°C (med miksen i). 3DNA miksen ble applisert til mikromatrisen. Mikromatrisen ble inkubert i 4-5 timer ved 55°C.

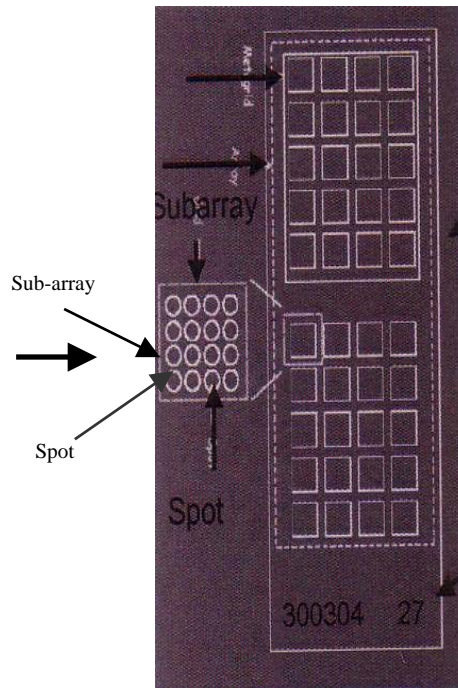
Mikromatrisen ble vasket etter innkubering som under punkt 5.8.1.6

Rørene ble dekket med aluminiumsfolie under vasking fordi Cy-fargene er lysømfintlige. Mikromatrisene ble snarest mulig skannet i en PerkinElmer mikromatriseskanner og fluorescensintensiteten fra hver spot beregnet med Scanarray express. Resultatene ble bearbeidet videre med programmet Spotfire.

1. Skannet matrise

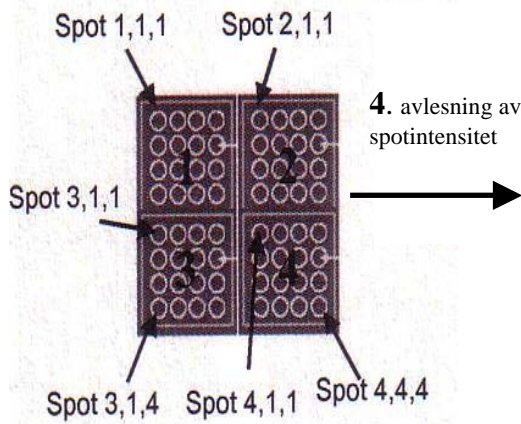


2. En maske legges over matrisen



3. Hver spot har sin bestemte posisjon i mikromatrisen. Posisjonen defineres slik(x,y,z).
 x er subarraynummer,
 y er kolonnennummer
 z er radnummer

5. Hver mikromatrise blir utlevert fra produsenten med en .GAL fil hvor spot posisjon og innhold beskrives



4. avlesning av spotintensitet

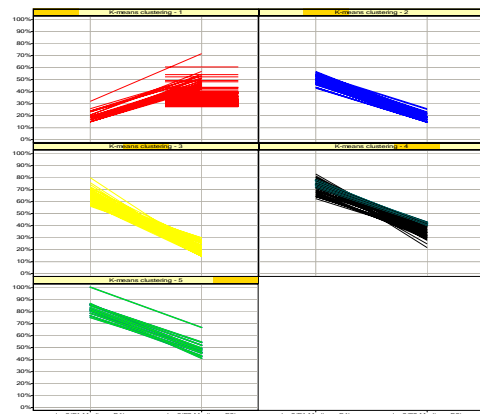
| Block | Column | Row | Name |
|-------|--------|-----|--|
| 1 | 1 | 1 | 1 Y1Y01 |
| 2 | 2 | 2 | 2 DANCB1 |
| 3 | 3 | 3 | 3 23760 DXP2PAC193 protein |
| 4 | 4 | 4 | 4 38814 phosphoprotein 2, cytoskeletal-binding protein-2 |
| 5 | 5 | 5 | 5 78475 alpha-1a tubulin |
| 6 | 6 | 6 | 6 742190 nuclear transcription factor 3-subunit B (nfactor 47C) |
| 7 | 7 | 7 | 7 432273 coactivator-associated protein |
| 8 | 8 | 8 | 8 28948 EST |
| 9 | 9 | 9 | 9 420244 shared immunoglobulin-like receptor DMS |
| 10 | 10 | 10 | 10 834865 Cdk-arginine an extensionless 19 (unique) 177 expressed sequence |
| 11 | 11 | 11 | 11 872688 ribonucleoprotein A2 (RNP A2) |
| 12 | 12 | 12 | 12 126280 PUA6289 protein |
| 13 | 13 | 13 | 13 141123 EST |
| 14 | 14 | 14 | 14 127198 EST |
| 15 | 15 | 15 | 15 195287 ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2 |

Figur 5.8.1.8A Hovedtrinnene i ekstraksjon av spot fluorescensintensitet (trinnene 1-5) og bearbeidelse av resultatene i spotfire (trinnene 6-8) (side 68).

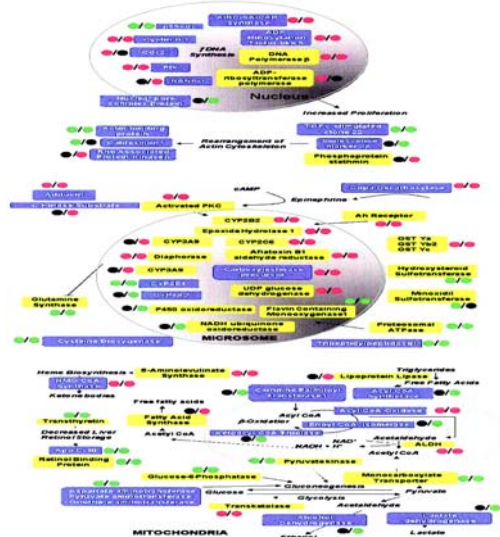
6. Filtrering og normalisering

| Block | Column | Row | Name | ID | X | Y | Dia |
|-------|--------|-----|---|----------------|-------|-------|-----|
| 29 | 12 | 4 | unknown | M300018570 | 4009 | 30595 | 50 |
| 29 | 24 | 14 | unknown | M300003088 | 19405 | 32175 | 50 |
| 30 | 6 | 16 | DSTFECOLAST ASSOCIATED RECEPTOR; DSTFECOLAST ASSO... | M300007212 | 7430 | 37045 | 80 |
| 31 | 7 | 16 | KILLER CELL LECTIN LIKE RECEPTOR 7 (T CELL SURFACE GLY... | M300007055 | 12145 | 37085 | 60 |
| 33 | 24 | 4 | unknown | M300018241 | 5905 | 39615 | 70 |
| 33 | 24 | 17 | RIKEN CDNA 4631427C17; CLONE MNCB-5555; HYPOTHETICAL... | M300008993 | 5910 | 41755 | 70 |
| 34 | 20 | 8 | unknown | M300012777 | 9780 | 40245 | 50 |
| 34 | 3 | 12 | ZINC FINGER PROTEIN 57 [Source:RefSeqAcc:NM_009559] | M200004111 | 6965 | 40895 | 50 |
| 36 | 16 | 12 | unknown | M300010810 | 18155 | 40885 | 50 |
| 37 | 15 | 7 | unknown | M300015370 | 4500 | 44585 | 50 |
| 38 | 13 | 2 | unknown | M300001057 | 8955 | 43785 | 50 |
| 41 | 7 | 14 | NEURONAL CELL DEATH INDUCIBLE PUTATIVE KINASE (TRB-3... | M300008400 | 3160 | 50295 | 50 |
| 45 | 17 | 5 | unknown | M200003612 | 4839 | 53295 | 70 |
| 45 | 16 | 10 | unknown | M300012364 | 4655 | 54135 | 80 |
| 46 | 3 | 4 | unknown | M300018378 | 6970 | 53095 | 70 |
| 46 | 15 | 11 | unknown | M300011657 | 8955 | 54235 | 80 |
| 47 | 21 | 12 | SIMILAR TO DYSPERLIN (FRAGMENT) [Source:SPTREMBL;Acc... | M300010990 | 14450 | 54405 | 90 |
| 48 | 1 | 12 | unknown | M300010260 | 15650 | 54405 | 60 |
| 32 | 19 | 18 | unknown | unknown (2815) | 18645 | 37375 | 50 |
| 4 | 1 | 8 | unknown | M300013682 | 15685 | 4195 | 60 |
| 31 | 14 | 15 | unknown | M300007355 | 13265 | 36915 | 50 |
| 19 | 3 | 10 | HOMEDBOX PROTEIN HLX1 [Source:SwissProt;Acc:Q61670] | M200000522 | 11465 | 22575 | 70 |
| 9 | 2 | 4 | unknown | M300018185 | 2305 | 12595 | 50 |
| 41 | 1 | 21 | unknown | unknown (1712) | 2160 | 51435 | 70 |
| 5 | 17 | 16 | unknown | unknown (9A23) | 4770 | 10110 | 70 |
| 24 | 3 | 7 | unknown | M300013289 | 16005 | 26530 | 50 |
| 6 | 5 | 11 | unknown | M300011429 | 7290 | 9195 | 90 |
| 30 | 10 | 21 | SECRETED MODULAR CALCIUM BINDING PROTEIN 2; SECRET... | M300003784 | 8090 | 37885 | 80 |
| 44 | 22 | 16 | T COMPLEX ASSOCIATED-TESTIS EXPRESSED 1 LIKE (PROTEL... | M200006351 | 19135 | 50585 | 80 |
| 7 | 7 | 18 | SOLUTE CARRIER FAMILY 23, MEMBER 1 (SODIUM-DEPENDEN... | M200008547 | 12105 | 10395 | 30 |
| 1 | 25 | 14 | BASIC LEUCINE ZIPPER TRANSCRIPTION FACTOR LIKE ACTIV... | M200000409 | 6945 | 5235 | 50 |

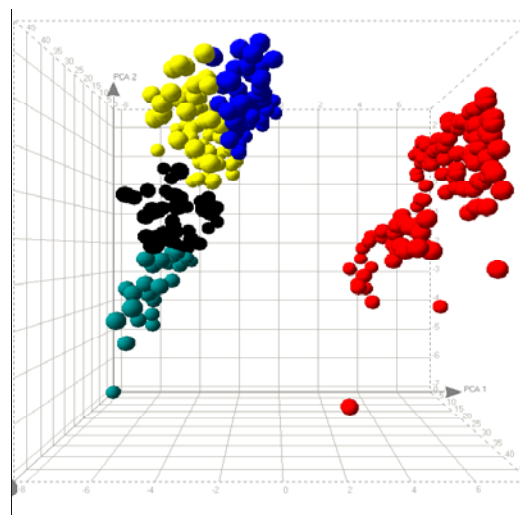
7. K-means klustering



9. Biologisk respons



8. Evaluering av Klustrene med PCA



Figur 5.8.1.8B Hovedtrinnene i ekstraksjon av spot fluorescensintensitet (trinnene 1-5) (side 67) og bearbeidelse av resultatene i spotfire (trinnene 6-8).

5.9 Statistikk

5.9.1 T-test

Students T-test ble brukt for å sammenligne og finne ut om det var signifikant variasjon mellom to grupper [Anderson, R.L. et al., 1995]. Populasjoner som ga $p < 0.05$ ble betraktet som signifikant forskjellige. Statistiske analyser ble utført med GraphPad Instat V3.05

5.9.2 Anova

Anova ble brukt for å finne variansen mellom gruppene [Anderson, R.L. et al., 1995]. I figurene er statistisk spredning indikert som standardavvik. Statistiske analyser ble utført med GraphPad InStat V3.05.

5.9.3 K-means klustering

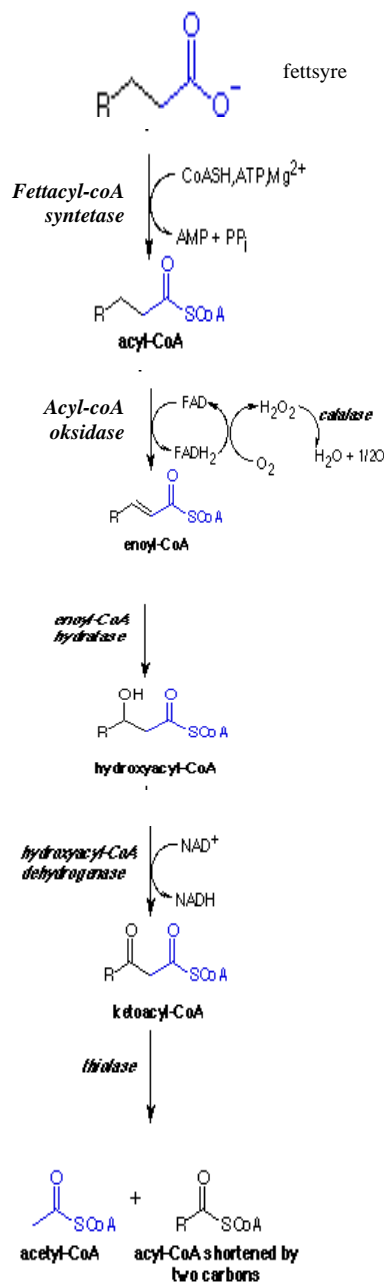
K-means klustering ble brukt for å gruppere gener (log-2 transformert netto fluorescenssignaler) i 6 klustre. Grupperingen skjedde på bakgrunn av likheter i fluorescens intensitet og forholdet mellom Cy3 og Cy5 signalene [Anderson, R.L. et al., 1995]. Statistiske analyser ble utført med Spotfire® DecisionSite 8.0.

5.9.4 Principal Component Analysis (PCA)

PCA ble brukt for å evaluere klustrene. Det ble valgt to prinsipale komponenter på log-2-transformert nettosignalene og tilsvarende z-score verdier [Jolliffe, I. et al., 1986]. Statistiske analyser ble utført med Spotfire® DecisionSite 8.0

5.10 Måling av enzymaktivitet

Oksidasjon av korte og mellomstore fettsyrer foregår i mitokondriene, mens oksidasjon av veldig lange fettsyrer foregår i peroksisomene. β -oksidasjon i begge organellene er ganske lik unntatt i trinn 2 (figur 5.10). I mitokondriene blir acyl-CoA omdannet til enoyl-CoA av acyl-CoA-dehydrogenase som overfører to elektroner til FAD [Singh, H. et al., 1988]. I peroksisomene er det acyl-CoA-oksidase som konverterer acyl-CoA til enoyl-CoA ved å overføre to elektroner til oksygen og dannelse av hydrogenperoksid [Osmundsen, H et al., 1980]. Hydrogenperoksid konverteres til vann av katalase [Hashimoto, T. 1990].



Figur 5.10 Hovedtrinnene i β -oksidasjon

5.10.1 Måling av peroksisomal β -oksidasjon

Peroksisomal β -oksidasjon ble målt som palmityl-CoA avhengig NAD^+ reduksjon.

| Reaksjonsblanding | |
|-----------------------------------|--------------------|
| Løsning | Sluttkonsentrasjon |
| K_2HPO_4 , pH 7,5 | 30mM |
| CoA | 0,2mM |
| NAD | 0,5mM |
| DTT | 1,0mM |
| Triton X-100 | 0.005% |
| FAD | 0,02mM |
| Substrat: 5mM Palmityl-CoA | |

Tabell 5.10.1 Typisk reaksjonsblanding
brukt i måling av peroksisomal β -oksidasjon.

Fremgangsmåte:

Laging av 5mM palmityl-CoA;

5mM Palmityl-CoA løsning ble laget ved å løse
Palmitoyl-CoA i 5mM MES-buffer

Reaksjonsblandingen ble termostatert til 30°C i en kuvette.

Det ble tilsatt $50\mu\text{M}$ prøve (peroksisomer).

Blandingen ble rørt godt, og satt i spektrofotometeret.

5mM palmityl-CoA ble tilsatt (sluttvolum på 1ml).

Økningen i absorbansen på 340nm ble registrert i 15 min.

5.10.2 Måling av katalaseaktivitet

Katalase konverterer den toksiske hydrogen peroksidet produsert av Acyl-CoA oksidase til vann og oksygen (se figur nr 5.10).

| Reaksjonsblanding | |
|--|---------------|
| Løsning | konsentrasjon |
| K ₂ HPO ₄ , pH 7,5 | 50mM |
| Triton X-100 | 0.5% |

Tabell 5.10.2 Typisk reaksjonsblanding for måling av katalaseaktivitet.

Lever prøvene(homogenatet) ble fortynnet 10x

| Fortynning av homogenatet | |
|---------------------------|---|
| 50µl | leverhomogenatet |
| 440 µl | 50mM K ₂ HPO ₄ pH 7,5 |
| 10µl | 0.5% Triton X100 |

Tabell 5.10.2.1 Fortynning av leverhomogenat

ULaging av 0,5% Triton x-100

0.1g 0,5% Triton x-100 ble løst i 20ml 50mM K₂HPO₄ pH 7,5 og destillert vann.

| Fortynning av H ₂ O ₂ | |
|---|---|
| 40ml | 50mM K ₂ HPO ₄ , pH 7,5 |
| 200µl | H ₂ O ₂ |

Tabell 5.10.2.2 Fortynning av standardløsning med hydrogenperoksid

Framgangsmåte:

1. 50mM K_2HPO_4 pH 7,5 (2000 μ l) og 50 μ l fortynnet homogenatet (se tabell nr.5.10.2.1) ble tilsatt i en kvarts kuvette, blandet godt og satt i spektrofotometeret innstilt på 25°C og 240nm.
2. 10mM H_2O_2 (500 μ l) ble tilsatt
3. Økningen i absorbansen på 240nm ble registrert i 1 minutt

5.10.3 Bestemmelse av proteininnholdet i homogenatet

Proteiner danner komplekser med kobberioner i alkalisk miljø. Disse kompleksene har blåfiolett farge. Det ble laget standardløsninger med kjente konsentrasjoner. Ved å måle A_{540} kunne vi tegne en standardkurve med absorbansen som funksjon av konsentrasjon. Absorbansen for homogenatet avleses, og konsentrasjonen leses direkte av standardkurven.

UBiuret reagens:

1 volum Benedicts reagens ble løst i 19 volumer 20% NaOH

Standard:

5mg, 4mg, 3mg, 2mg, 1 mg avfettet BSA ble løst i 1ml H_2O

Framgangsmåte:

Homogenatet ble fortynnet 10x med PBS buffer og blandet med 1.0 ml Biuret reagens. Blandingen ble inkubert ved romtemperatur i 15-20minutter og absorbansen avlest ved 540nm.

5.11.1 Preparering av vevsbiter til elektronmikroskop (EM)

Vevsbitene ble fiksert i 2 % formaldehyd, 2.5 % glutaraldehyd i 0,1M fosfatbuffer [Sabatini, Bensch et al. 1963]. Anbefalt fikseringstid var 5 timer, men vi lot vevsbitene ligge 4-6 uker i fikseringsbuffer. Vevsbitene ble tatt ut av fikseringsbuffer og vasket i 10 minutter i 0,1M fosfatbuffer. Etter vasking ble vevsbitene postfiksert i 1 % osmiumtetraoksyd i tre timer. Deretter ble vevsbitene raskt dehydrert i aceton, støpt i Agar 100 (fra Agar Scientific) og kuttet i ultratynne snitt (30 μ) med en Leica Ultracut UCT. De ultratynne snittene ble så farget med 3.3'- diaminobenzidin tetrahydroklorid (DAB) i 90 minutter. Deretter ble snittene inkubert i 15 minutter med uranylacetat, etterfulgt av innkubering i blysitrat i 3 minutter. Som kontroll ble det brukt leversnitt med bare kontrast(figur 6.9D og 69.1A). Preparatene ble undersøkt i elektronmikroskop (EM) (Philips CM 120).

6. Resultater

6.1 Effekter av HBCD-eller IBP-behandling på kroppsvekt hos villtype (balbc) mus.

Balbc mus ble behandlet med fôr tilsatt 1- eller 4 % HBCD eller IBP (punkt 5.1.2 og 5.1.6 A) i tre dager som beskrevet under punkt 5.1.3.

Behandlingen med 1 % (w/w) HBCD eller IBP (tabell.6.1) førte ikke til økning i kroppsvekt hos villtype balbc mus, mens 4% IBP(w/w) behandling førte til en signifikant★reduksjon av kroppsvekt.

Effekter av behandlingen med HBCD eller IBP på kroppsvekt hos villtype (balbc) mus

| Behandling | Dose% (w/w) | Kroppsvekt (g) |
|------------|-------------|----------------|
| kontroll | 0 | 18.6±1.46 |
| HBCD | 1 | 18.9±0.42 |
| HBCD | 4 | 16.7±0.91 |
| IBP | 1 | 18.1±0.95 |
| IBP | 4 | 13.8±1.96 ★ |

Tabell 6.1 Kroppsvekt etter 3 dagers kostbehandling med enten (1 og 4 % HBCD (w/w)) eller (1 og 4 % IBP (w/w)). Verdiene i tabellen representerer et gjennomsnitt av målingene ± standard avvik, basert på 3 dyr. Dyrene i kontrollgruppen spiste fôr behandlet med aceton.

6.1.1 Effekter av HBCD- eller IBP-behandling på levervekt hos villtype (balbc) mus.

Behandlingen med 1 % (w/w) HBCD (tabell 6.1.1) førte til en økning i levervekt (mild hepatomegali) hos villtypemus, mens 4 % (w/w) IBP-behandlingen førte til signifikant★ vekttap.

Effekter av behandlingen med HBCD eller IBP på levervekt hos villtype mus.

| Behandling | Dose % (w/w) | Relativ levervekt (% av kroppsvekt) |
|------------|--------------|-------------------------------------|
| kontroll | 0 | 7.6±1.08 |
| HBCD | 1 | 9.0±1.30★ |
| HBCD | 4 | 7.0±0.49 |
| IBP | 1 | 7.3±2.27 |
| IBP | 4 | 5.1±2.21★ |

Tabell 6.1.1 Relativ levervekt (% av kroppsvekt) etter 3 dagers kostbehandling med enten (1 og 4 % HBCD (w/w)) eller (1 og 4 % IBP (w/w)). Verdiene i tabellen representerer et gjennomsnitt av målingene ± standard avvik, basert på 3 dyr.

Dyrene i kontrollgruppen spist før behandlet med aceton.

6.1.2 Effekter av HBCD- eller IBP-behandling på nyrevekt hos villtype (balbc) mus.

Behandlingen med HBCD eller IBP (tabell 6.1.2) førte ikke til endringer av nyrevekt hos villtype balbc mus.

Effekter av behandlingen med HBCD eller IBP på nyrevekt hos villtype (balbc) mus

| Behandling | Dose% (w/w) | Relativ nyrevektvekt (% av kroppsvekt) |
|------------|-------------|--|
| kontroll | 0 | 1.5±0.15 |
| HBCD | 1 | 1.5±0.16 |
| HBCD | 4 | 1.4±0.13 |
| IBP | 1 | 1.4±0.32 |
| IBP | 4 | 1.8±0.30 |

Tabell 6.1.2 Relativ nyrevekt (% av kroppsvekt) etter 3 dager kost - behandling med (1 og 4 % HBCD (w/w)) eller (1 og 4 % IBP (w/w)). Verdiene i tabellen representerer et gjennomsnitt av målingene ± standard avvik, basert på 3 dyr. Dyrene i kontrollgruppen spist før behandlet med aceton

6.2 Effekter av HBCD- eller IBP-behandling på kroppsvekt hos transgene og villtype ♂ mus.

Transgene-(PPAR- α knockout) og villtype mus ble injisert daglig i 10 dager med henholdsvis 100-, 300- eller 600 mg/kg kroppsvekt (kv) HBCD eller IBP. Dyrene ble veid og deretter avlivet (se punkt 5.1.6 B), lever og nyrer ble tatt ut og veid som beskrevet i punkt 5.1.4.

Behandlingen med HBCD eller IBP (tabell 6.2) viste ikke endret kroppsvekt hos villtype CD-1 hannmus. HBCD (100- og 600mg/kg kv) behandling av PPAR- α knockout hannmus førte til signifikant \star økning i kroppsvekt. IBP-behandling førte til noe (ikke signifikant) vekttap hos disse musene.

Effekter av behandling med HBCD eller IBP på kroppsvekt hos transgene (PPAR- α knockout) og villtype (CD-1) ♂ mus.

| Behandling | Dose(mg/kg kv) | PPAR- α knockout mus Kroppsvekt (g) | Villtype (CD-1) mus Kroppsvekt (g) |
|------------|-----------------|--|------------------------------------|
| kontroll | Maisolje | 26.7 \pm 1.41 | 35.7 \pm 2.73 |
| HBCD | 100 | 32.5 \pm 1.15 \star | 28.7 \pm 1.09 |
| HBCD | 300 | 26.3 \pm 3.4 | 32.0 \pm 3.23 |
| HBCD | 600 | 31.5 \pm 2.0 \star | 36.3 \pm 1.42 |
| IBP | 100 | 25.3 \pm 1.84 | 35.8 \pm 0.56 |
| IBP | 300 | 23.8 \pm 3.86 | 36.4 \pm 3.66 |
| IBP | 600 | 25.2 \pm 2.55 | 36.7 \pm 2.81 |

Tabell 6.2 Kroppsvekt av PPAR- α knockout og villtype (CD-1) hannmus injisert i.p. daglig i 10 dager med 100mg/kg kv, 300mg/kg kv eller 600mg/kg kv. Verdiene i tabellen representerer et gjennomsnitt av målingene \pm standard avvik, basert på 10 dyr i kontrollgruppen og 5 dyr for de øvrige grupper. Dyrene i kontrollgruppen ble injisert med 0,1 ml i.p.maisolje

6.2.1 Effekter av HBCD- eller IBP- behandling på kroppsvekt hos transgene og villtype ♀ mus.

Hos PPAR- α knockout hunnmus førte HBCD- behandling til økning i kroppsvekt (tabell 6.2.1). IBP-(100-300mg/kg kv) behandling førte til signifikant★ tap i kroppsvekt. Både HBCD- og IBP-behandling førte til signifikant★ tap i kroppsvekt hos villtype (CD-1) mus

Effekter av behandling med HBCD eller IBP på kroppsvekt hos transgene (PPAR- α knockout) og villtype(CD-1) ♀ mus.

| Behandling | Dose (mg/kg kv) | PPAR- α knockout Kroppsvekt (g) | Villtype (CD-1) mus Kroppsvekt (g) |
|------------|------------------|---|---------------------------------------|
| kontroll | Maisolje | 22.5 \pm 5.89 | 31.3 \pm 0.2 |
| HBCD | 100 | 24.4 \pm 3.42 | 19.0 \pm 0.06 ★ |
| HBCD | 300 | 26.0 \pm 1.91 | 21.0 \pm 0.24★ |
| HBCD | 600 | 24.0 \pm 1.67 | 23.1 \pm 0.69★ |
| IBP | 100 | 21.3 \pm 3.6 ★ | 22.3 \pm 0.91★ |
| IBP | 300 | 20.1 \pm 2.46 ★ | 23.4 \pm 0.9★ |
| IBP | 600 | 25.1 \pm 1.71 | 30.2 \pm 2.0 |

Tabell 6.2.1 Kroppsvekt av PPAR- α knockout og villtype (CD-1) hunnmus injisert i.p. daglig i 10 dager med 100mg/kg kv, 300mg/kg kv eller 600mg/kg kv. Verdiene i tabellen representerer et gjennomsnitt av målingene \pm standard avvik, basert på 10 dyr i kontrollgruppen og 5 dyr for de øvrige grupper. Dyrene i kontrollgruppen ble injisert med 0,1 ml i.p. maisolje

6.2.2 Effekter av HBCD- eller IBP-behandling på levervekt hos transgene og villtype♀ mus.

HBCD og IBP behandling (tabell 6.2.2) førte til vekttap både hos transgene og villtype hunnmus, unntatt dosen 100mg/kg kv HBCD som førte til mild hepatomegali hos transgene mus.

Effekter av behandling med HBCD eller IBP på levervekt hos transgene (PPAR-α knockout) og villtype(CD-1) ♀ mus.

| Behandling | Dose (mg/kg kv) | PPAR-α knockout mus Relativ levervekt (% av kroppsvekt) | Villtype (CD-1) mus Relativ levervekt (% av kroppsvekt) |
|------------|------------------|---|---|
| kontroll | Maisolje | 5.3±0.85 | 4.7±0.16 |
| HBCD | 100 | 6.8±0.02★ | 3.2±0.28 |
| HBCD | 300 | 4.2±0.52 | 3.3±0.19 |
| HBCD | 600 | 3.4±0.44 | 3.9±0.11 |
| IBP | 100 | 4.5±0.82 | 4.2±0.30 |
| IBP | 300 | 5.0±0.36 | 4.6±0.08 |
| IBP | 600 | 4.5±0.22 | 4.4±0.01 |

Tabell 6.2.2 Levervekt (som prosent av kroppsvekt) av PPAR-α knockout og villtype (CD-1) hunnmus injisert i.p. daglig i 10 dager med 100mg/kg kv, 300mg/kg kv eller 600mg/kg kv. Verdiene i tabellen representerer et gjennomsnitt av målingene ± standard avvik, basert på 10 dyr i kontrollgruppen og 5 dyr for de øvrige grupper. Dyrene i kontrollgruppen ble injisert med 0,1 ml i.p. maisolje.

6.2.3 Effekter av HBCD-eller IBP-behandling på levervekt hos transgene og villtype♂ mus.

Behandlingen med HBCD og IBP (tabell 6.2.3) førte til signifikant★ økning i levervekt hos både villtype og transgene(PPAR-α knockout) hannmus.

Effekter av behandling med HBCD eller IBP på levervekt hos transgene (PPAR-α knockout) og villtype(CD-1) ♂ mus.

| Behandling | Dose (mg/kg kv) | PPAR-α knockout mus Relativ levervekt (% av kroppsvekt) | Villtype (CD-1) mus Relativ levervekt (% av kroppsvekt) |
|------------|-----------------|---|---|
| kontroll | Maisolje | 3.7±0.26 | 4.04±0.19 |
| HBCD | 100 | 6.8±0.33★ | 5.7±0.12★ |
| HBCD | 300 | 4.8±0.25★ | 5.3±0.53★ |
| HBCD | 600 | 4.8±0.45 | 5.2±0.19★ |
| IBP | 100 | 5.5±0.62★ | 5.5±0.18★ |
| IBP | 300 | 4.1±0.13 | 5.2±0.16★ |
| IBP | 600 | 4.9±0.25★ | 5.6±0.30★ |

Tabell 6.2.3 Levervekt (som prosent av kroppsvekt) av PPAR-α knockout og villtype (CD-1) hannmus injisert i.p. daglig i 10 dager med 100mg/kg kv, 300mg/kg kv eller 600mg/kg kv. Verdiene i tabellen representerer et gjennomsnitt av målingene± standard avvik, basert på 10 dyr i kontrollgruppen og 5 dyr for de øvrige grupper. Dyrene i kontrollgruppen ble injisert med 0,1 ml i.p. maisolje

6.2.4 Effekter av HBCD- eller IBP-behandling på nyrevekt hos transgene og villtype♀ mus.

HBCD- og IBP- (100mg/kg kv) (tabell 6.2.4) behandling førte til signifikant★ økning i nyrevekt hos transgene (PPAR-α knockkout). Dosene 300 og 600mg/kg kv IBP ga signifikant★ reduksjon i nyrevekt hos transgenemus. HBCD- eller IBP behandling førte ikke til endringer hos nyrevekt hos villtypemus.

Effekter av behandling med HBCD eller IBP på nyrevekt hos transgene (PPAR-α knockout) og villtype(CD-1) ♀ mus.

| Behandling | Dose (mg/kg kv) | PPAR-α knockout mus Relativ nyrevekttvekt (% av kroppsvekt) | Villtype (CD-1) mus Relativ nyrevekttvekt (% av kroppsvekt) |
|------------|-----------------|---|---|
| kontroll | Maisolje | 3.1±1.09 | 1.6±0.09 |
| HBCD | 100 | 4.7±0.28★ | 1.6±0.09 |
| HBCD | 300 | 4.7±0.52★ | 1.6±0.03 |
| HBCD | 600 | 4.3±0.39 | 1.4±0.29 |
| IBP | 100 | 3.2±0.12★ | 1.4±0.23 |
| IBP | 300 | 2.2±0.11★ | 1.1±0.03 |
| IBP | 600 | 1.2±0.09★ | 1.2±0.11 |

Tabell nr 6.2.4 Nyrevekt (som prosent av kroppsvekt) av PPAR-α knockout og villtype (CD-1) hunnkjønn mus injisert i.p. daglig i 10 dager med 100mg/kg kv, 300mg/kg kv eller 600mg/kg kv. Verdiene i tabellen representerer et gjennomsnitt av målingene ± standard avvik, basert på 10 dyr i kontrollgruppen og 5 dyr for de øvrige grupper. Dyrene i kontrollgruppen ble injisert med 0,1 ml i.p. maisolje

6.2.5 Effekter av HBCD- eller IBP-behandling på nyrevekt hos transgene og villtype

♂ mus.

HBCD-behandling (tabell 6.2.5) førte til signifikant★ økning i nyrevekt hos

transgene(PPAR- α knockout) men ingen signifikant økning i nyrevekt hos villtypemus.

IBP-behandling førte til signifikant★ tap av nyrevekt hos transgene mus.

Effekter av behandling med HBCD eller IBP på nyrevekt hos transgene (PPAR- α knockout) og villtype(CD-1) ♂ mus.

| Behandling | Dose (mg/kg kv) | PPAR- α knockout mus Relativ nyrevekt (% av kroppsvekt) | Villtype (CD-1) mus Relativ nyrevekt (% av kroppsvekt) |
|------------|-----------------|--|--|
| kontroll | Maisolje | 3.4±0.52 | 1.3±0.04 |
| HBCD | 100 | 5.3±0.14★ | 1.7±0.05 |
| HBCD | 300 | 5.5±0.02★ | 1.7±0.78 |
| HBCD | 600 | 5.2±0.30 | 1.7±0.78 |
| IBP | 100 | 1.9±0.08★ | 1.7±0.05 |
| IBP | 300 | 1.5±0.15★ | 1.4±0.01 |
| IBP | 600 | 1.7±0.15★ | 1.2±0.12 |

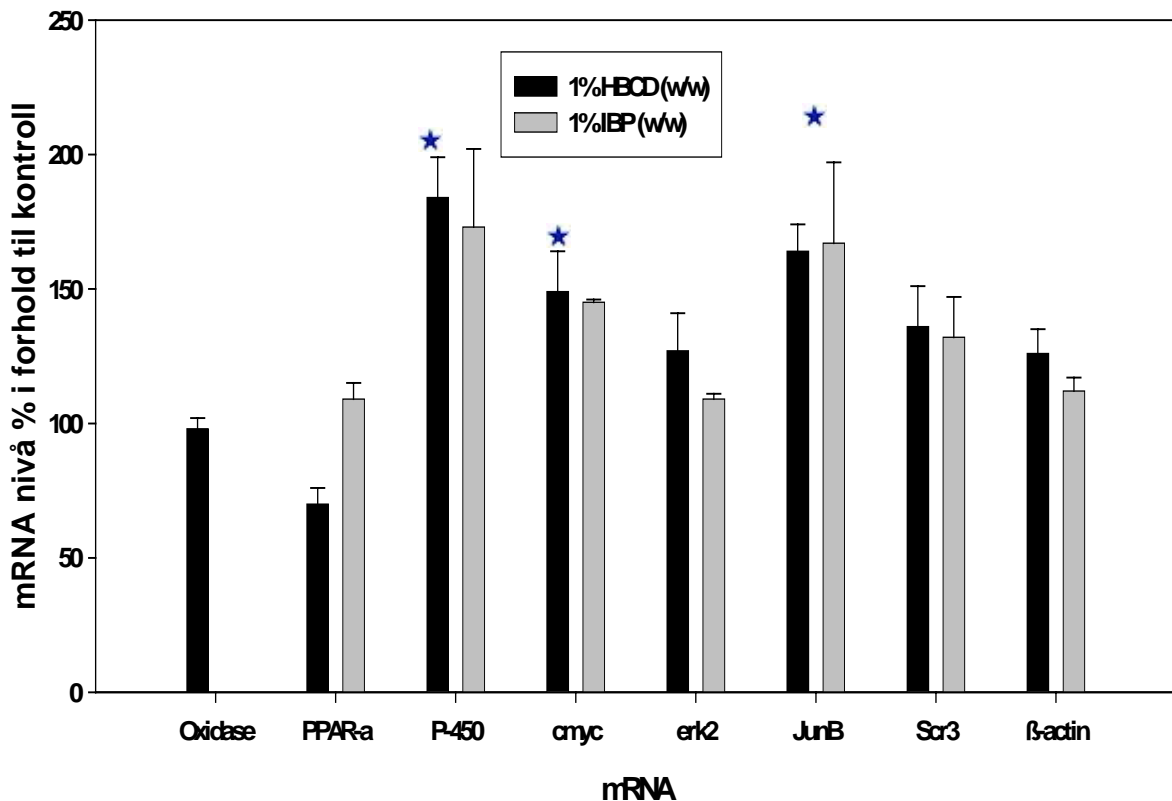
Tabell 6.2.5 Nyrevekt (som prosent av kroppsvekt) av PPAR- α knockout og villtype (CD-1) hannkjønn mus injisert i.p. daglig i 10 dager med 100mg/kg kv, 300mg/kg kv eller 600mg/kg kv. Verdiene i tabellen representerer et gjennomsnitt av målingene \pm standard avvik, basert på 10 dyr i kontrollgruppen og 5 dyr for de øvrige grupper. Dyrene i kontrollgruppen ble injisert med 0,1 ml i.p. maisolje.

6.3 Effekter av behandling med 1 % HBCD eller IBP på mRNA-nivå

RNA isolert fra Balbc muselever, ble kopiert til cDNA og amplifisert v.h.a. RT-PCR hvor primerpar for acyl-CoA oksidase, PPAR- α , P-450, cMyc, erk2, junB, SCr3, β -aktin og L-27 ble brukt til bestemmelse av korresponderende mRNA mengder.

HBCD (1 % w/w) behandling (figur 6.3) førte til betydelig reduksjon av mRNA mengde for PPAR- α . Behandling med HBCD eller IBP viste nokså like effekter. Begge behandlinger førte til signifikant \star økning av mRNA-nivå for PPAR- α , cmyc, P450 og JunB

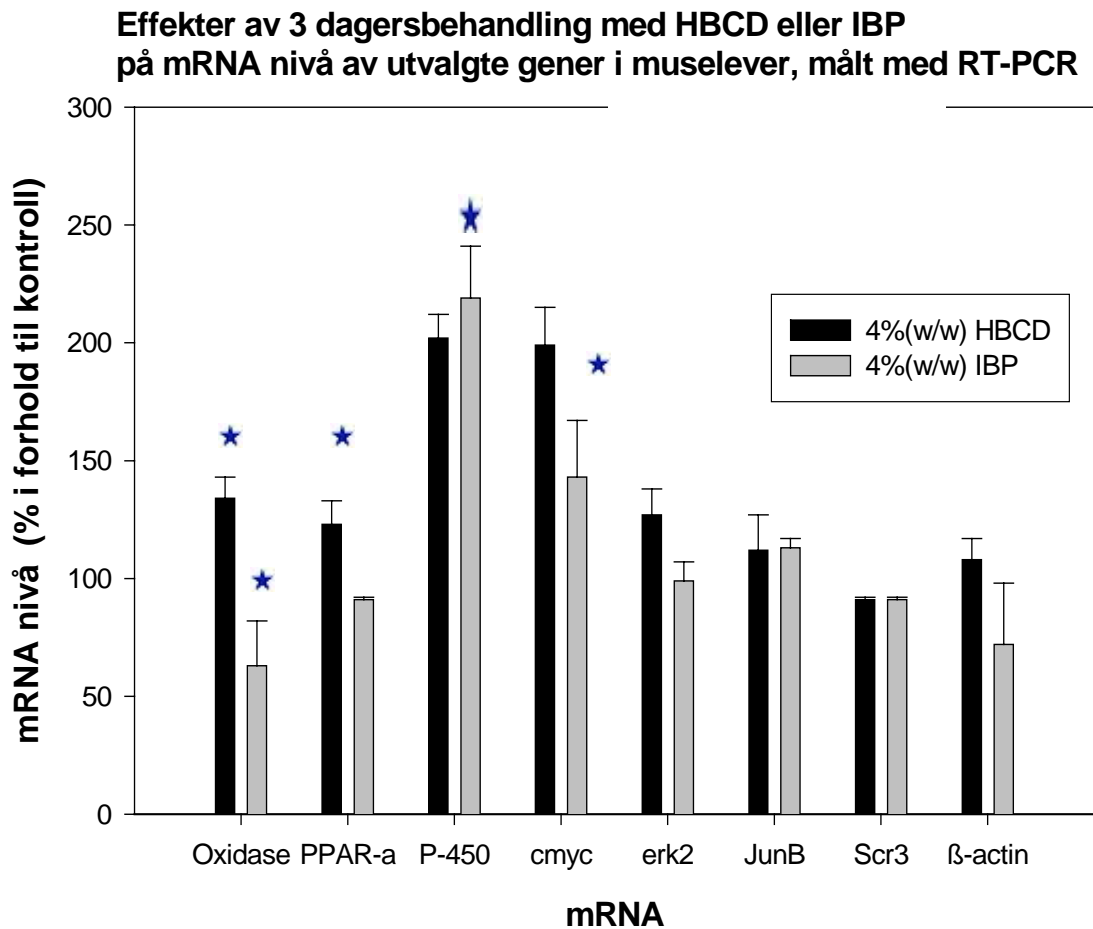
Effekter av 3 dager behandling med HBCD eller IBP på mRNA nivå av utvalgt gener i muselever, målt med RT-PCR



Figur 6.3 Mengde mRNA for oksidase, PPAR- α , P-450, cMyc, erk2, junB, SCr3 og β -aktin i lever, etter behandling med 1% (w/w) HBCD eller IBP i forhold til kontroll. Verdiene er gjennomsnitt av målingene fra fire dyr \pm standard avvik fra to parallelle målinger. Dyrene i kontrollgruppen spiste før behandlet med acetone.

6.3.1 Effekter av behandling med 4 % HBCD eller 4 % IBP på mRNA-nivå.

Behandling med HBCD (4 % w/w) (figur 6.3.1) førte til signifikant økning av mRNA-nivå for acyl-coA oksidase, PPAR- α , cmyc og P450, mens IBP behandling førte til signifikant★ reduksjon av mRNA-nivå for acyl-CoA oksidase.



Figur 6.3.1 Mengde mRNA for oksidase, PPAR- α , P-450, cMyc, erk2, junB, SCR3 og β - aktin i lever, etter behandling med 4% (w/w) HBCD eller IBP i forhold til kontroll. Verdiene er gjennomsnitt av målingene fra fire dyr \pm standard avvik fra to parallelle målinger. Dyrene i kontrollgruppen spiste før behandlet med aceton

6.4 Membranmatriser

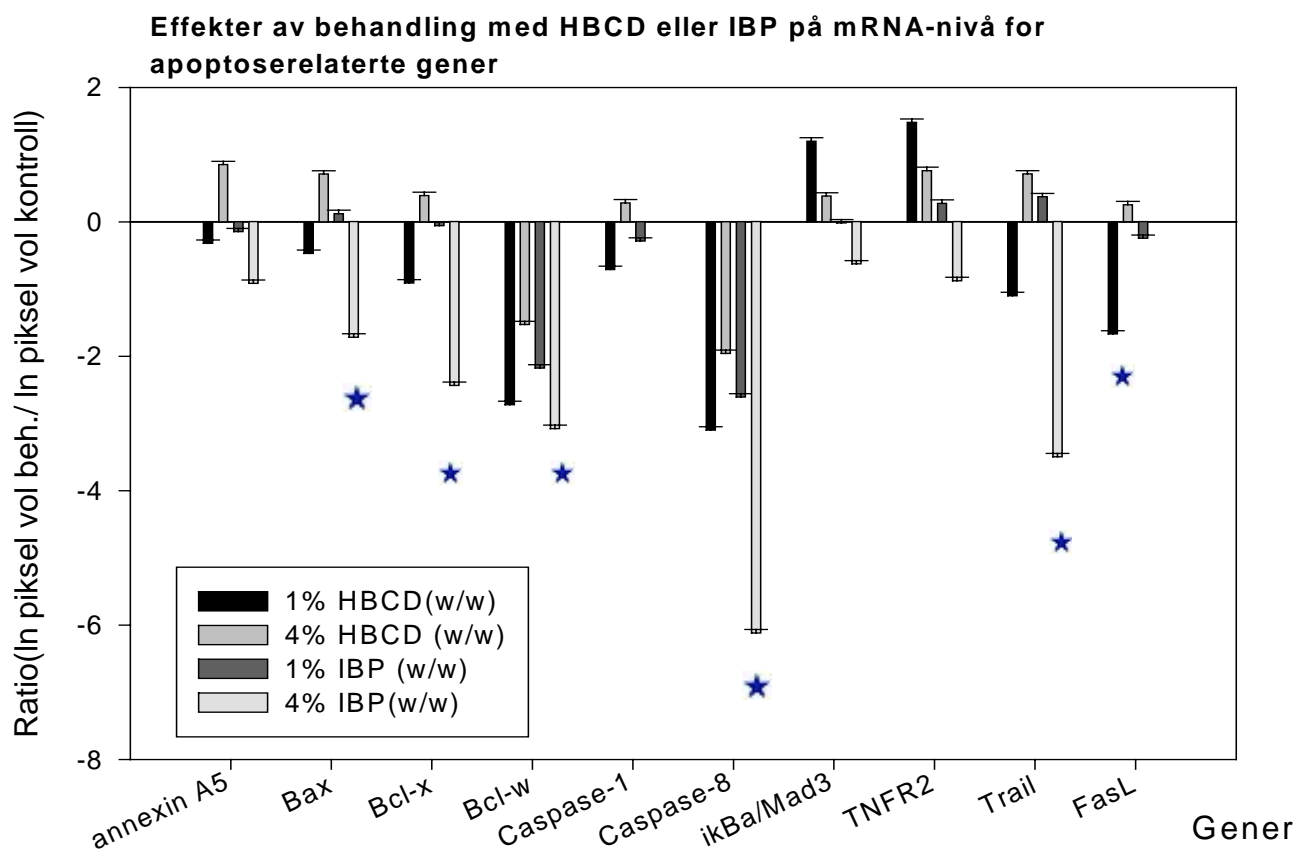
Musene ble foret med (1 % w/w) HBCD eller IBP i tre dager som beskrevet under punktene 5.1.2 og 5.1.6. Dyrene ble avlivet med nakkestrekk (punkt 5.1.5) og lever lagret i RNALater (punkt 5.1.4).

Isolert RNA, slik det står beskrevet under punkt 5.2.1 fra Balbc muselever ble kopiert til cDNA og amplifisert v.h.a. RT-PCR (punkt 5.4) og deretter hybridisert til membranmatrisene (punkt 5.6 ; 5.6.1-5.7.2).

6.4.1 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på gener assosiert med apoptose i muselever

Resultater viser at behandling med 1% IBP eller 1% HBCD ga nokså like effekter, bortsett fra ekspresjon av Mad3 og TNFR2.

Behandlingene (figur 6.4.1) førte til signifikant★ nedregulering av genene som koder for Bax, Bcl2-x, Bcl2-w, caspase8, Trail og FasL, mens 4% HBCD- eller IBP- behandling førte til oppregulering av de samme genene, unntatt for Trail som ble signifikant★ nedregulert av behandling med IBP.



Figur 6.4.1 Gener som koder for aneXin5, Bax, Bcl21, Bcl212, caspase1, caspase8, Nfkb α /Mad3, TNFR2, trail og FasL som induseres eller nedreguleres i villtype muselever etter 3 dagers behandling med HBCD eller IBP som beskrevet under punkt 5.1.3 A og B. Verdiene viser forholdet mellom de gjennomsnittlige ln-verdiene av normalisert pikselvolum i behandlet-og kontrollever fra tre mus.

6.4.2 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener involvert i oksidativt stress i muselever

Behandling med 1 % HBCD og 1% IBP ga forskjellige resultater (figur 6.4.2) for gene Cyp2b10, Cyp2c29, Cyp4a10, Cyp4a14, Cyp7a1, Cyp7b1, Fmo1, Fmo5, Gpx1 (glutathione peroxidase), Gsr (glutathione reductase), Gstm1 (glutathione S-transferase mu1), Gstm3, Hmox1, Mt1a, Cox-2, Sod1 og Sod2. Behandling med 1% HBCD førte til signifikant nedregulering mens 1% IBP førte til oppregulering av overnevnte gener. Behandling med 4% (w/w) HBCD og 4%(w/w) IBP ga liknende resultater for Gpx2. HBCD (4% w/w) førte til signifikant oppregulering av gene som koder for Cyp7a1, P450 (NADH P450). Søyler merket med ★er signifikante.

Effekt av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener involvert i oksidativ stress

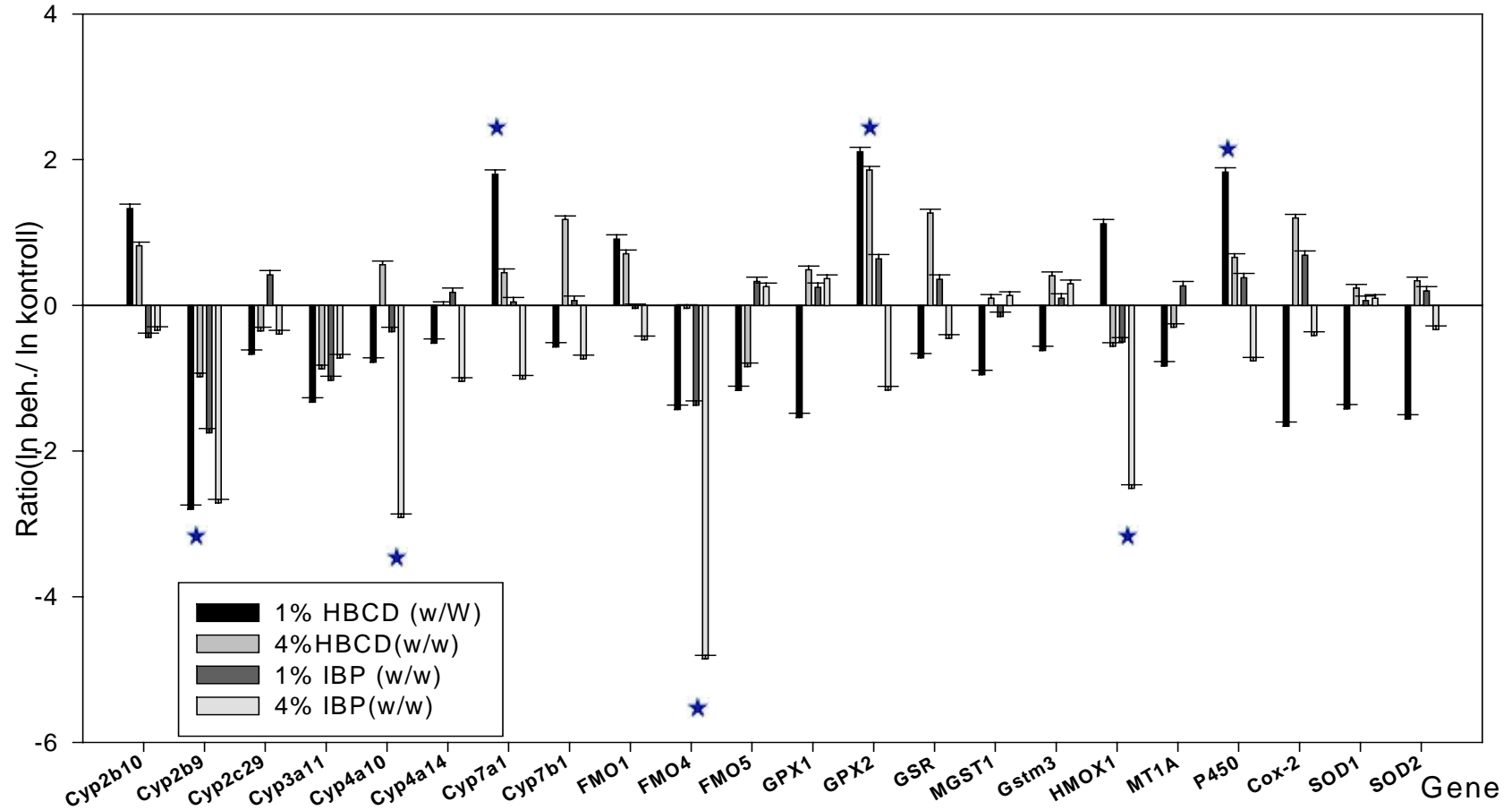
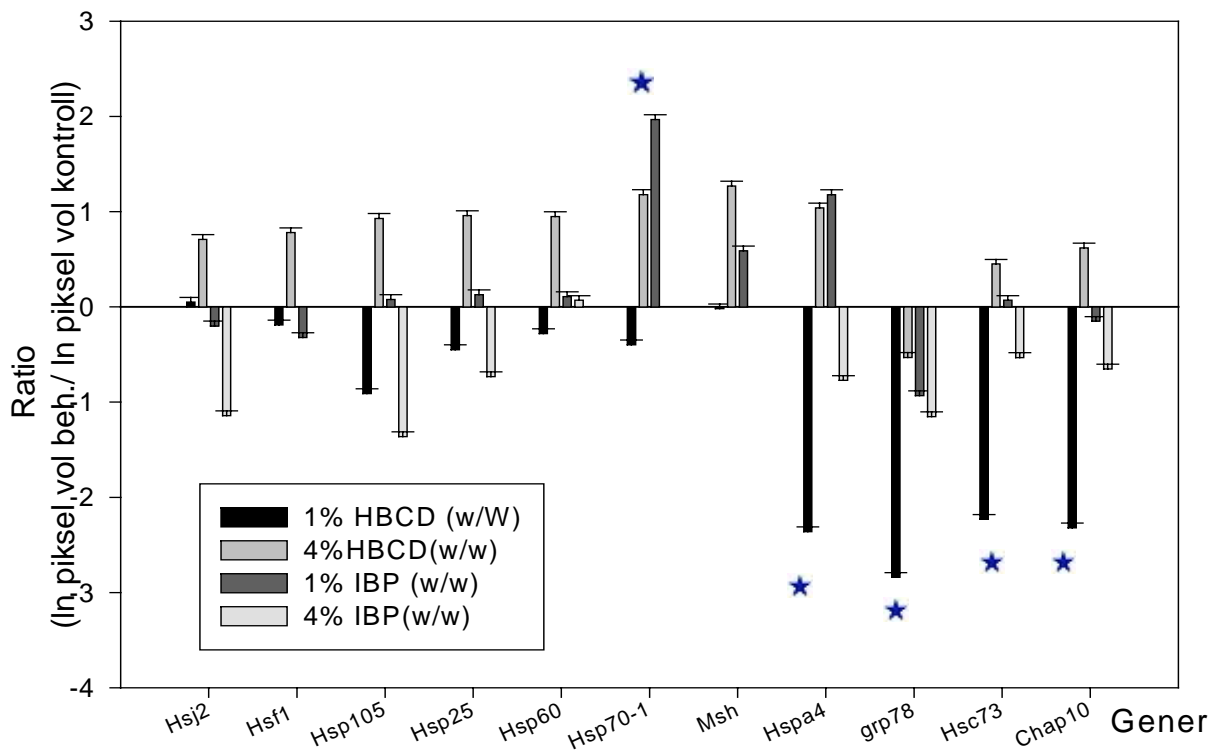


Fig. 6.4.2 Cyp2b10, Cyp2c29, Cyp3a11, Cyp4a10, Cyp4a14, Cyp7a1, Cyp7b1, Ephx2, Fmo1, Fmo4, Fmo5, Gpx1 (glutathione peroxidase), Gpx2, Gsr (glutathione reductase), Gstm1 (glutathione S-transferase mu1), Gstm3, Hmox1, Hmox2, Mt1a, Mt2, Por (NADH P450), Ptgs2 (cox-2), Sod1 og Sod2 som induseres eller nedreguleres i villtype muselever etter 3 dagers behandling med HBCD eller IBP som beskrevet under punkt 5.1.3 A og B. Verdiene viser forholdet mellom de gjennomsnittlige ln-verdiene av normalisert pikselvolum i behandlet- og kontrollever fra tre dyr.

6.4.3 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av Hsp-relaterte gener i muselever

Behandling med 1% (w/w) HBCD og IBP gir forskjellige resultater (figur 6.4.3) for Hsj2, Hsp105, Hsp25 (Hspb1), Hsp60, Hsp70-1 (hsp70 1), Hspa4 (hsp70 4). Disse nedreguleres av HBCD og oppreguleres av IBP (1% (w/w)) behandling. Behandling med 4% HBCD førte til induksjon, mens 1% HBCD førte til signifikant \star suppresjon av Hsp (varmestress) gener.

Effekt av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener assosiert med Hsp-gener

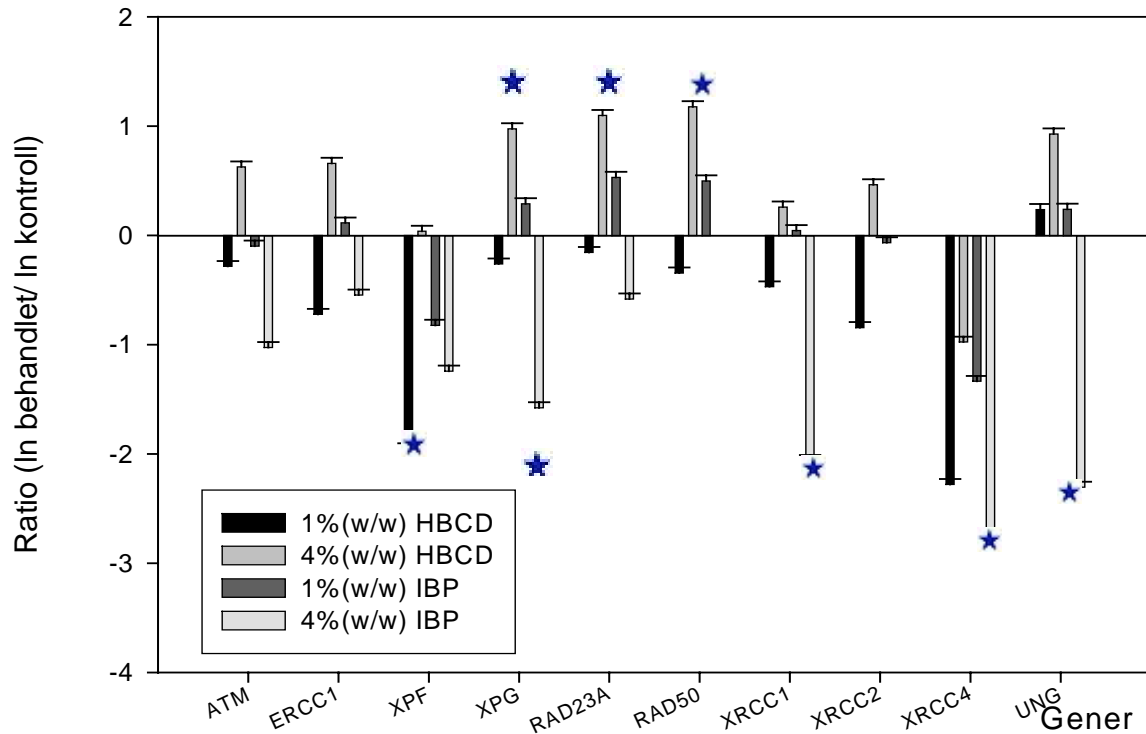


Figur 6.4.3: Ekspresjon av følgende Hsp-gener ble endret: Hsf1 (tcf5), Hsp25 (Hspb1), Hsp60, Hsp70-1 (hsp70 1), Hsp105, Hspa11 (hsp70 11), Hspa4 (hsp70 4), Hspa5 (grp78), Hspa8, Hspa9a (Hsp74a) (PBP74), Hspe1 (chaperonin 10) i villtype muselever etter 3 dagers behandling med HBCD eller IBP som beskrevet under punkt 5.1.3 A og B. Verdiene viser forholdet mellom de gjennomsnittlige ln-verdiene av normalisert pikselvolum i behandlet- og kontrollmuselever fra tre dyr.

6.4.4 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener assosiert med DNA reparasjon i muselever

Behandling med 1 % (w/w) HBCD og IBP ga forskjellige resultater (figur 6.4.4) for genene ERCC1,XPG, RAD23A, RAD50 og XRCC1 som ble nedregulert av HBCD og oppregulert av IBP. Behandling med 4 % (w/w) HBCD eller IBP ga også forskjellige resultater for Atm, Ercc1, XPF ,XPG, Rad23a, Rad50, Xrcc1 og UNG. Disse genene ble oppregulert av HBCD-behandling og signifikant★ nedregulert av IBP-behandling.

Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener assosiert med DNA-reparasjon



Figur 6.4.4 Gener som er implisert i DNA reparasjon: Atm, Ercc1, XPF ,XPG, Rad23a, Rad50, Xrcc1, Xrcc4 og Ung. Genene induseres eller nedreguleres i villtype muselever etter 3 dagersbehandling med HBCD eller IBP. Behandlingen er beskrevet under punkt 5.1.3 A og B. Verdiene viser forholdet mellom de gjennomsnittlige ln-verdiene av normalisert pikselvolum i behandlet- og kontrolllever fra tre dyr.

6.4.5 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener implisert i cellesyklus (I) i muselever

Behandling med 1% (w/w) HBCD (Figur 6.4.5) førte til nedregulering av cyclin C

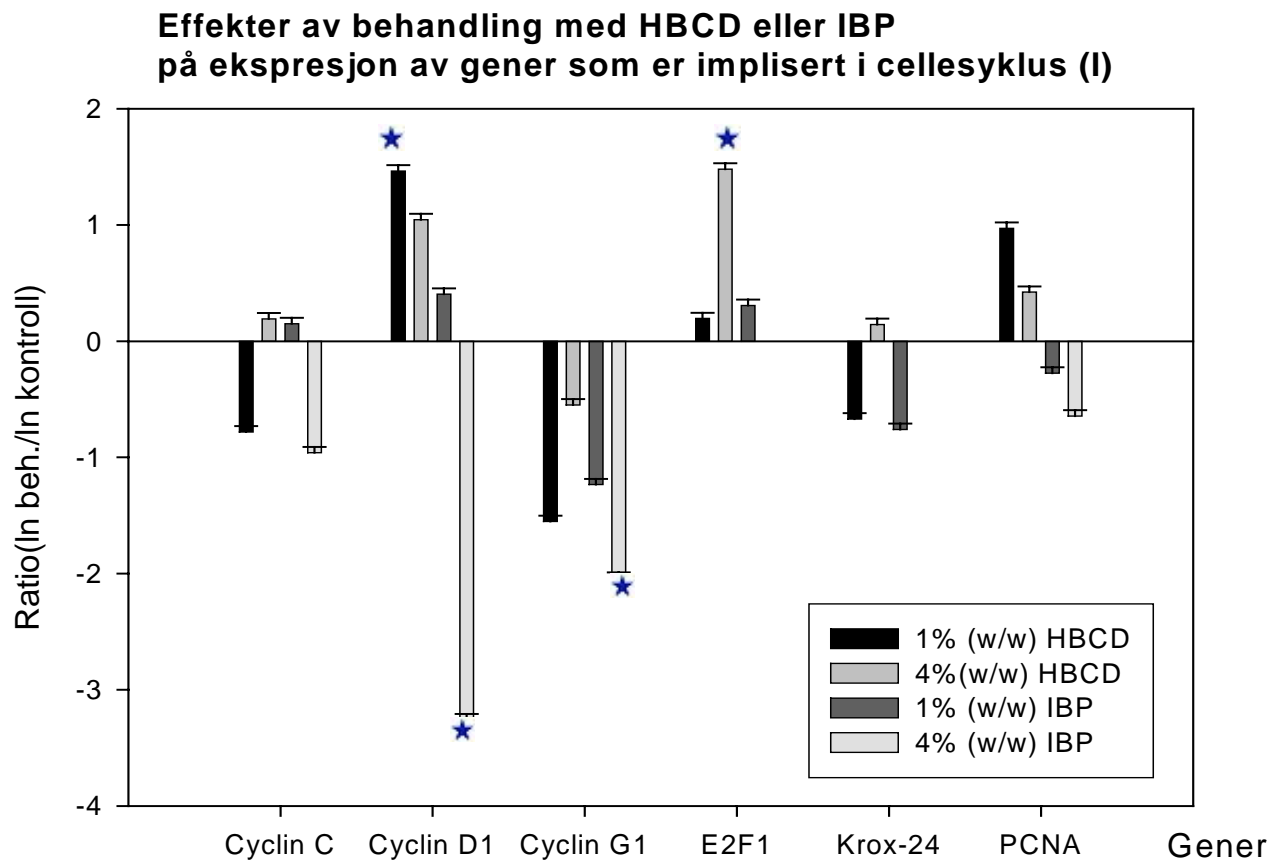
(Ccnc), Cyclin D1 (Ccnd1), Cyclin G1 (Ccng), E2f1, Krox-24 og PCNA, mens

behandling med 4% (w/w) HBCD førte til oppregulering av de samme genene.

Behandling med 1 % IBP førte til blandet respons med bl.a. oppregulering av Cyclin D1

og PCNA og nedregulering av Krox-24, Cyclin C og G1. Søyler merket med ★ er

signifikante.



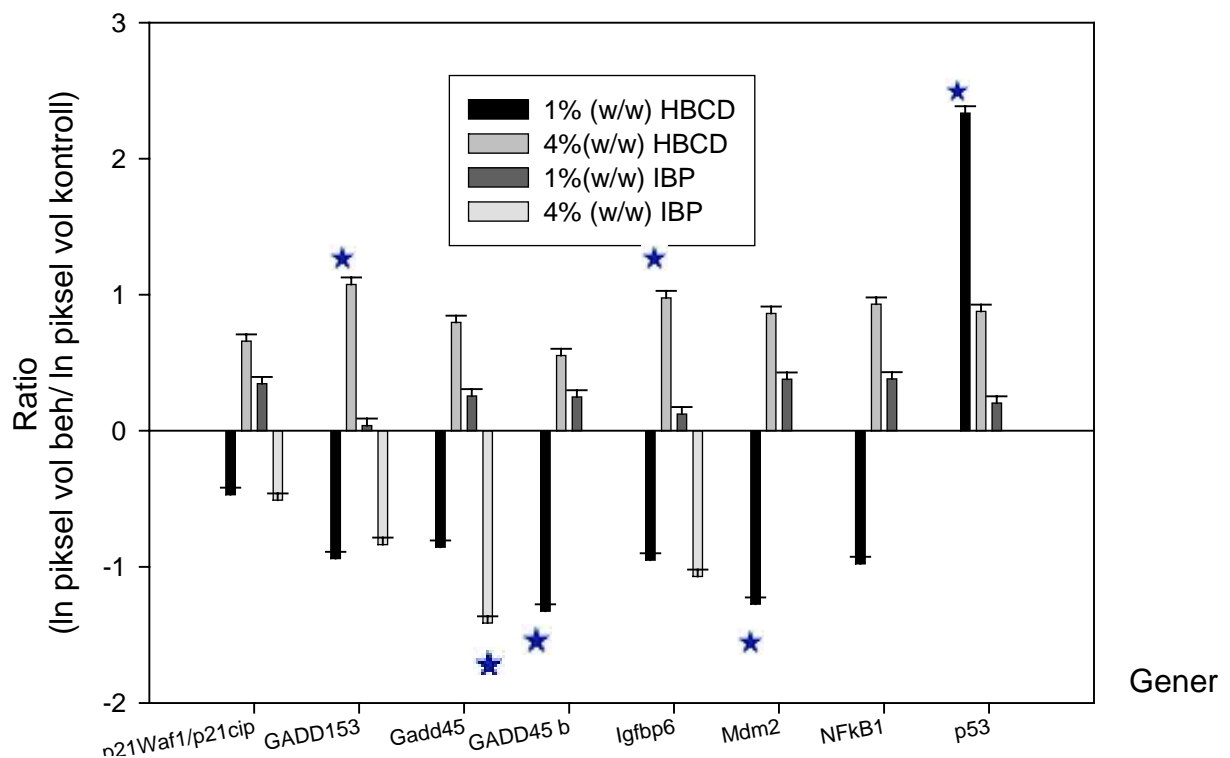
Figur 6.4.5 Gener implisert i celleproliferasjon/karcinogenese: Cyclin C (Ccnc), Cyclin D1 (Ccnd1), Cyclin G1 (Ccng), E2f1, Krox-24 og Pcna. Genene induseres eller nedreguleres i villtype muselever etter 3 dagers behandling med HBCD eller IBP som beskrevet under punkt 5.1.3 A og B. Verdiene viser forholdet mellom de gjennomsnittlige ln-verdiene av normalisert pikselvolum i behandlet- og kontrollever fra tre dyr.

6.4.5.1 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener

implisert i cellesyklus (II) i muselever

Behandling med 1 % (w/w) HBCD førte til nedregulering av p21Waf1/p21Cip1 (Cdkn1a), GADD153 (Ddit3), Gadd45a, Gadd45b, Igfbp6, Mdm2, NFkB1 samt av p53. Behandling med 4 % (w/w) HBCD førte til oppregulering av genene nevnt ovenfor. Behandling med 1 % (w/w) IBP viser samme respons som (4 % w/w) HBCD behandling. Vi kan også registrere at genekspressjonsmønster for 4 % (w/w) IBP behandling er identisk med respons til 4 % (w/w) HBCD behandling. Søylar merket med ★er signifikante.

Effekter av behandling med HBCD eller IBP på cellesyklus II



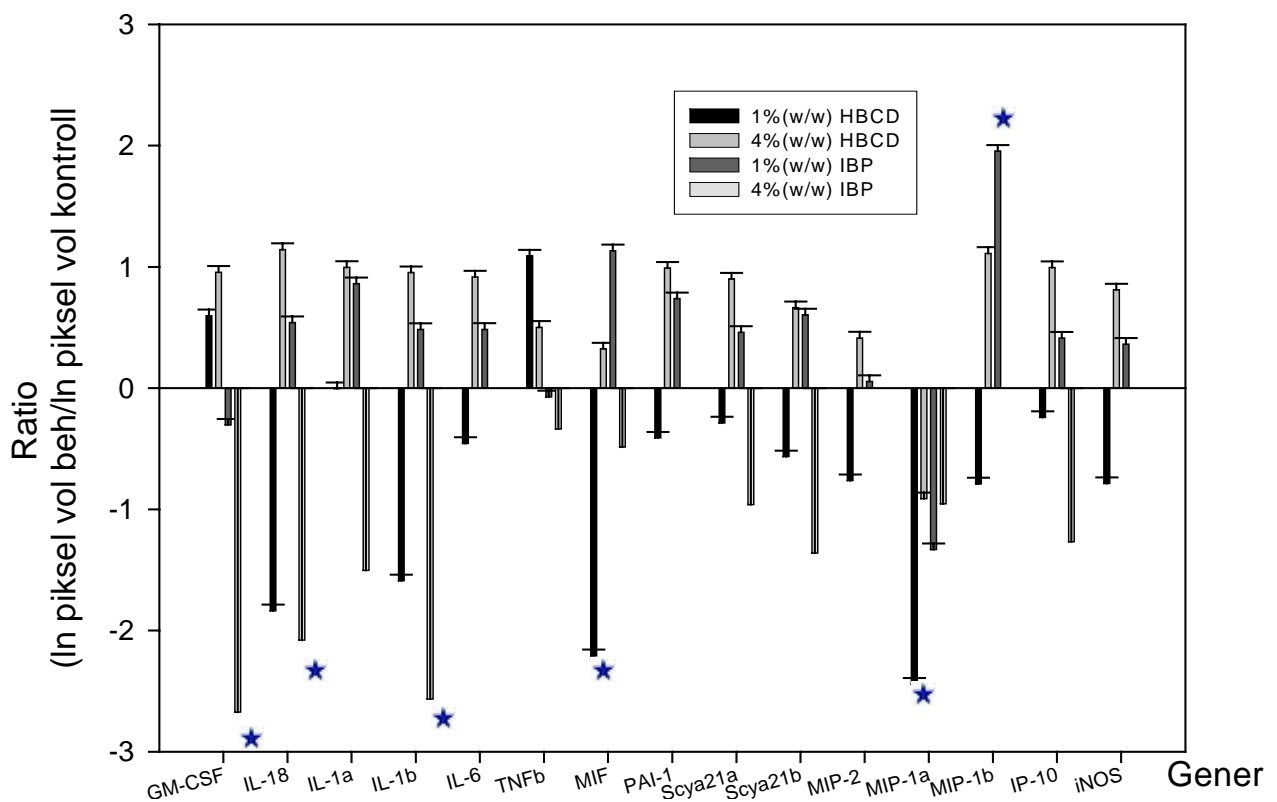
Figur 6.4.5.1 Cellevekst arrest gener som koder for: p21Waf1/p21Cip1 (Cdkn1a), GADD153 (Ddit3), Gadd45a, Gadd45b, Igfbp6, Mdm2, NFkB1, p53 (Trp53) . Genene induseres eller nedreguleres i villtype muselever etter 3 dagersbehandling med HBCD eller IBP som beskrevet under punkt 5.1.3 A og B. Verdiene viser forholdet mellom de gjennomsnittlige ln-verdiene av pikselvolumet i behandlet og kontrollever fra tre dyr.

6.4.6 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på inflammasjonsrespons i muselever

Behandling med 1 % (w/w) HBCD førte til oppregulering av genene som uttrykkes ved inflammasjon, mens 4% (w/w) HBCD førte til nedregulering av disse genene.

Behandling med IBP viser samme uttrykksmønstre som HBCD behandling. Søylmerket med ★ er signifikante.

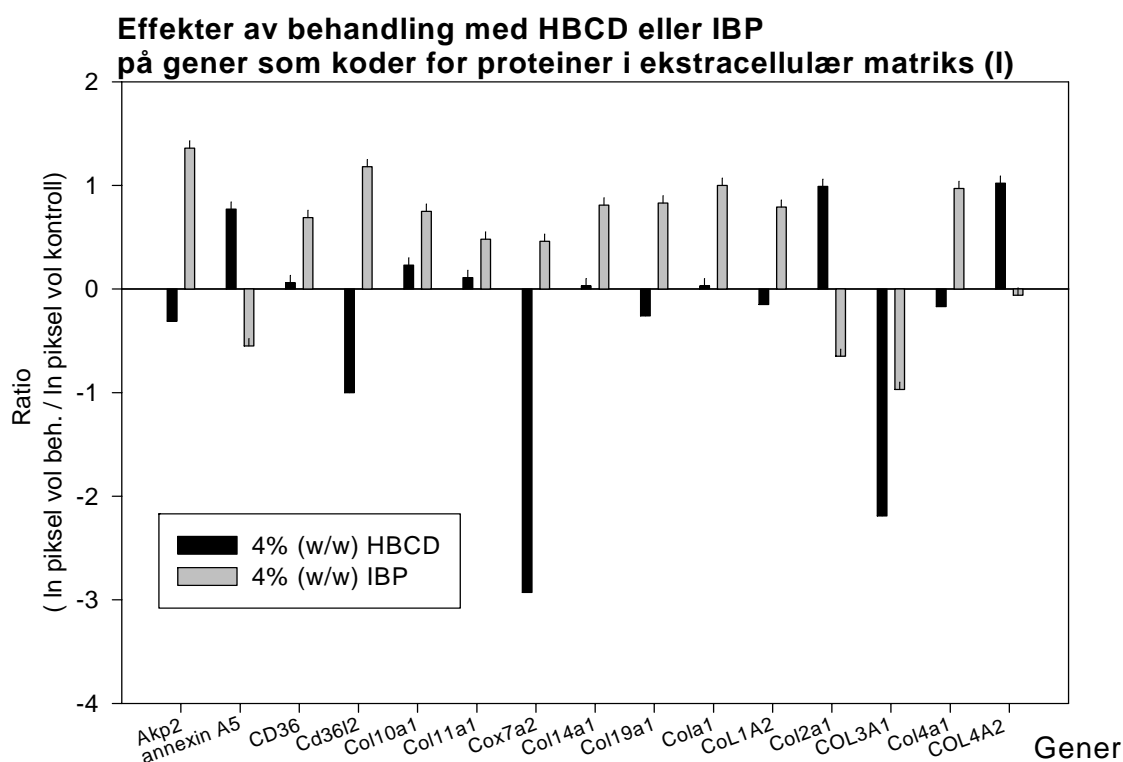
Effekter av behandling med HBCD eller IBP på inflammasjonsrespons



Figur 6.4.6 Gener som uttrykkes ved inflammasjon: GM-CSF (Csf2), Il1a, Il1b, Il6, TNF b/Lt, Mif, PAI1 (Serpine1), Scya21a, Scya21b, MIP-1a (Scya3), MIP-1b (Scya4), IP 10 (Scyb10) og iNOS . Genene induseres eller nedreguleres i villtype muselever etter 3 dagers behandling med HBCD eller IBP. Behandlingen er beskrevet under punkt 5.1.3 A og B. Verdiene viser forholdet mellom de gjennomsnittlige ln-verdiene av normalisert pikselvolumet i behandlet- og kontrollever.

6.4.7 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener som koder for proteiner i ekstracellulærmatriks (ECM) i muselever

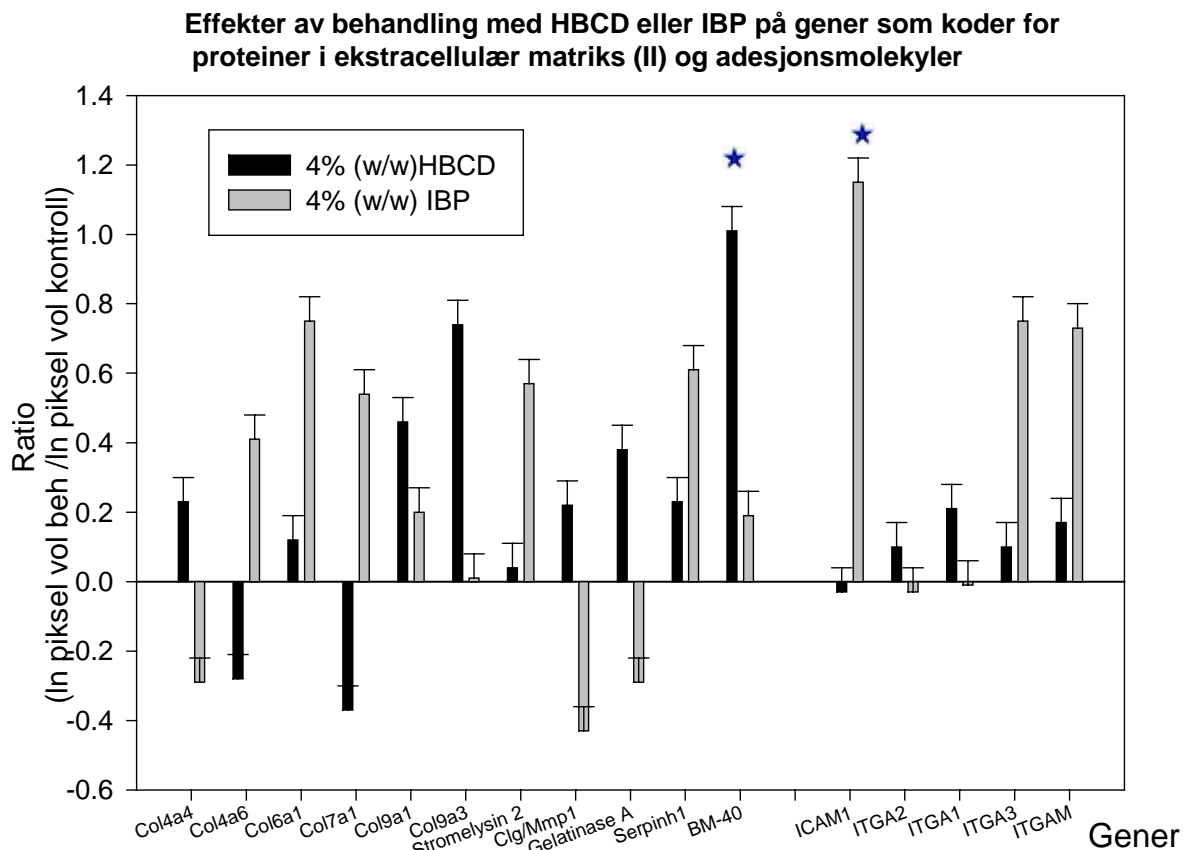
Behandling med 4 % (w/w) HBCD eller IBP (figur 6.4.7) viser forholdsvis lik respons unntatt ekspresjon av genene *Akp2*, *annexinA5*, *CD36*, *Cox7a2*, *col1A2*, *col21a1*, *col4a1* som nedreguleres av HBCD behandling, mens IBP behandlingen fører til oppregulering av de samme genene.



Figur 6.4.7 Gener som koder for proteiner som danner den ekstracellulære matriksen (ECM): *Akp2*, *Annexin A5*, *Cd36*, *Cd36l2*, *Col0a1*, *Col1a1*, *Cox7a2* (*Col12a1*), *Cola1*, *Col1a2*, *Col2a1*, *Col3a1*, *Col4a1*, *Col4a2*. Genene indueres eller nedreguleres i villtype muselever etter 3 dagers behandling med HBCD eller IBP. Behandling er beskrevet under punkt 5.1.3 A og B. Verdiene viser forholdet mellom de gjennomsnittlige ln-verdiene av normalisert pikselvolumet i behandlet- og kontrollevet fra tre dyr.

6.4.7.1 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på gener som koder for proteiner i ekstracellulær matriks (ECM) (II) og adhesjonsmolekyler i muselever

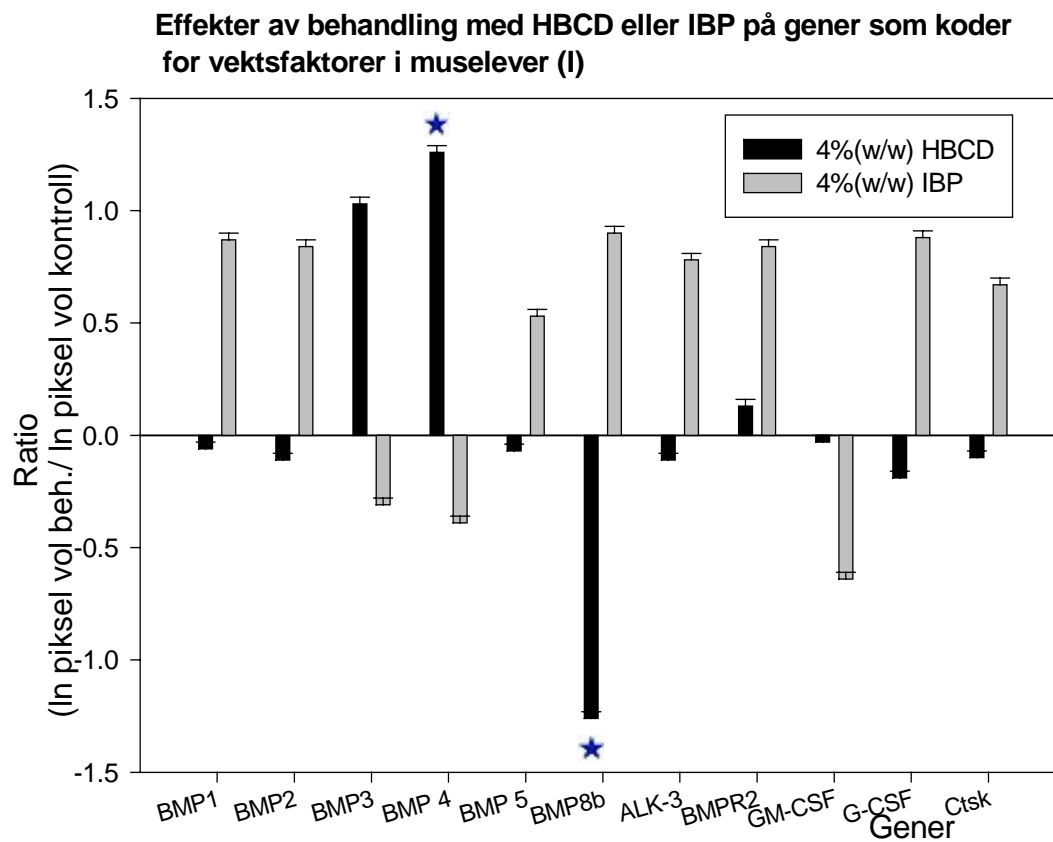
Behandling med 4 % (w/w) HBCD og IBP (figur 6.4.7.1) viser nokså lik respons og fører stort sett til oppregulering av gener som koder for disse proteiner: col6a1, Col9a1, Col9a3, Stromelysin 2, Serpinh1, BM-40 som inngår i ECM og Icam1, Itga2, Itga2b, Itga3, Itgam, Itgav, Itgb1 og Vcam1 som er implisert i celledhesjon. Behandling med HBCD eller IBP viser forskjellig respons for genene som koder for Col4a6 og Col7a1. De blir nedregulert av HBCD og oppregulert av IBP behandling. Gener som koder for Col4a4, Clg/Mmp1 og Gelatinase A blir oppregulert av HBCD- og nedregulert av IBP-behandling. Søylar merket med★ er signifikante.



Figur 6.4.7.1 Gener som koder for proteiner som inngår i den ekstracellulære matriks: Col4a4, Col4a6, col6a1, Col7a1, Col9a1, Col9a3, Stromelysin 2, Clg/Mmp1, Gelatinase A, Serpinh1, BM-40. Gener som kom koder for celledhesjon molekylene: Icam1, Itga2, Itga2b, Itga3, Itgam, Itgav, Itgb1, Vcam. Disse indueres eller nedreguleres i villtype muselever etter 3 dagers behandling med HBCD eller IBP. Behandling er beskrevet under punkt 5.1.3 A og B. Verdiene viser forholdet mellom de gjennomsnittlige ln-verdiene av normalisert pikselvolum i behandlet- og kontrollever fra tre dyr.

6.4.8 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på gener som koder for vekstfaktorer (I) i muselever.

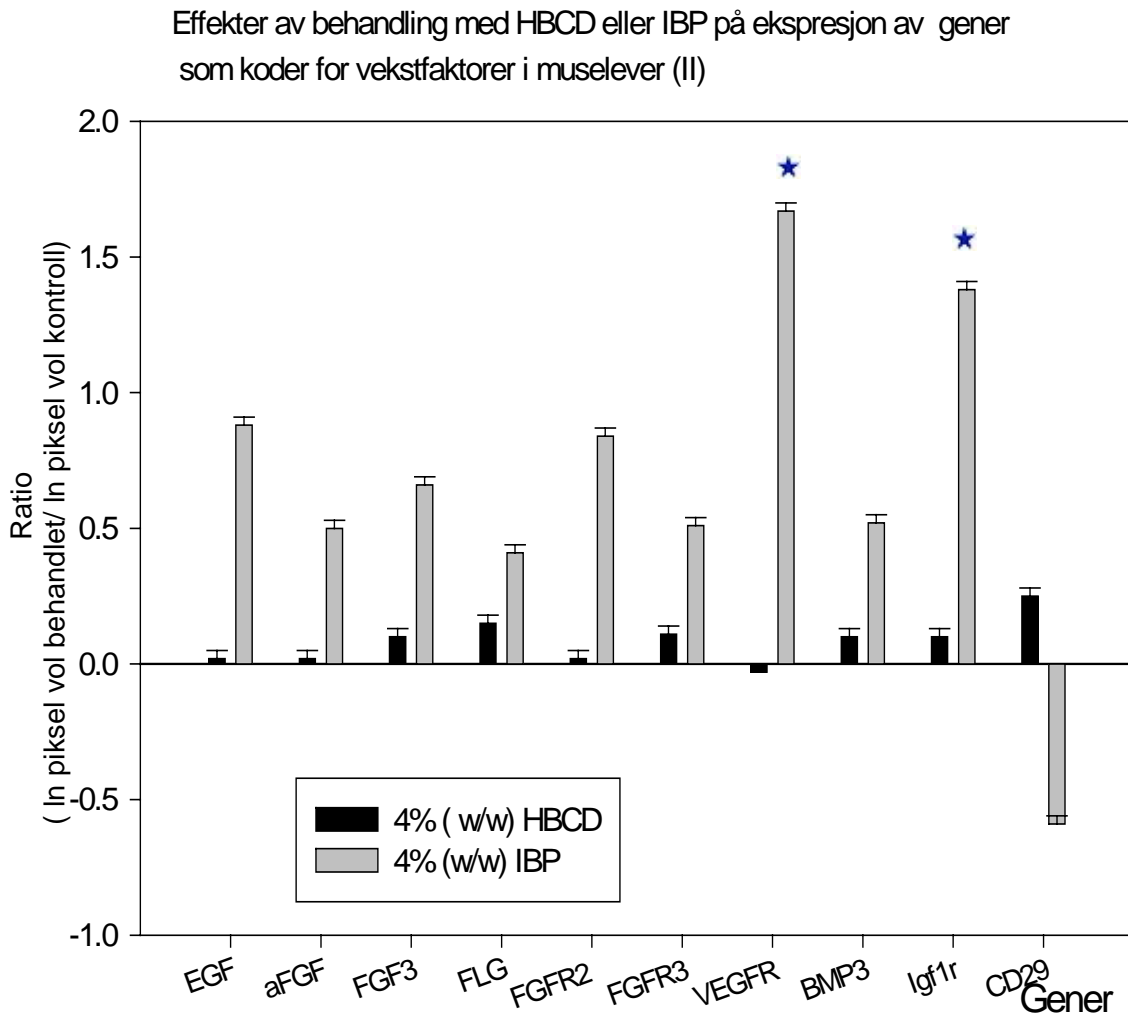
HBCD og IBP behandling (figur 6.4.8) viser forskjellig respons på genene som koder for vekstfaktorer. HBCD behandling fører til oppregulering (ikke signifikant) av BMP3 og BMP4 og nedregulering av BMP8b. IBP behandling fører til oppregulering av de fleste genene bortsett fra BMP3, BMP4 og GM-CSF. Søyler merket med ★ er signifikante.



Figur 6.4.8 Gener som koder for vekstfaktorene: Bmp1, Bmp2, Bmp3-ESTs, Bmp4, Bmp5, Bmp6, ALK-3, Bmpr2, GM-CSF (Csf2), G-CSF (Csf3) og Ctsk. Genene induseres eller nedreguleres i villtypemuselever etter 3 dager behandling med HBCD eller IBP. Behandlingen er beskrevet under punkt 5.1.3 A og B. Verdiene viser forholdet mellom de gjennomsnittlige ln-verdiene av normalisert pikselvolum i behandlet- og kontrollever fra tre

6.4.8.1 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på gener som koder for vekstfaktorer (II) i muselever

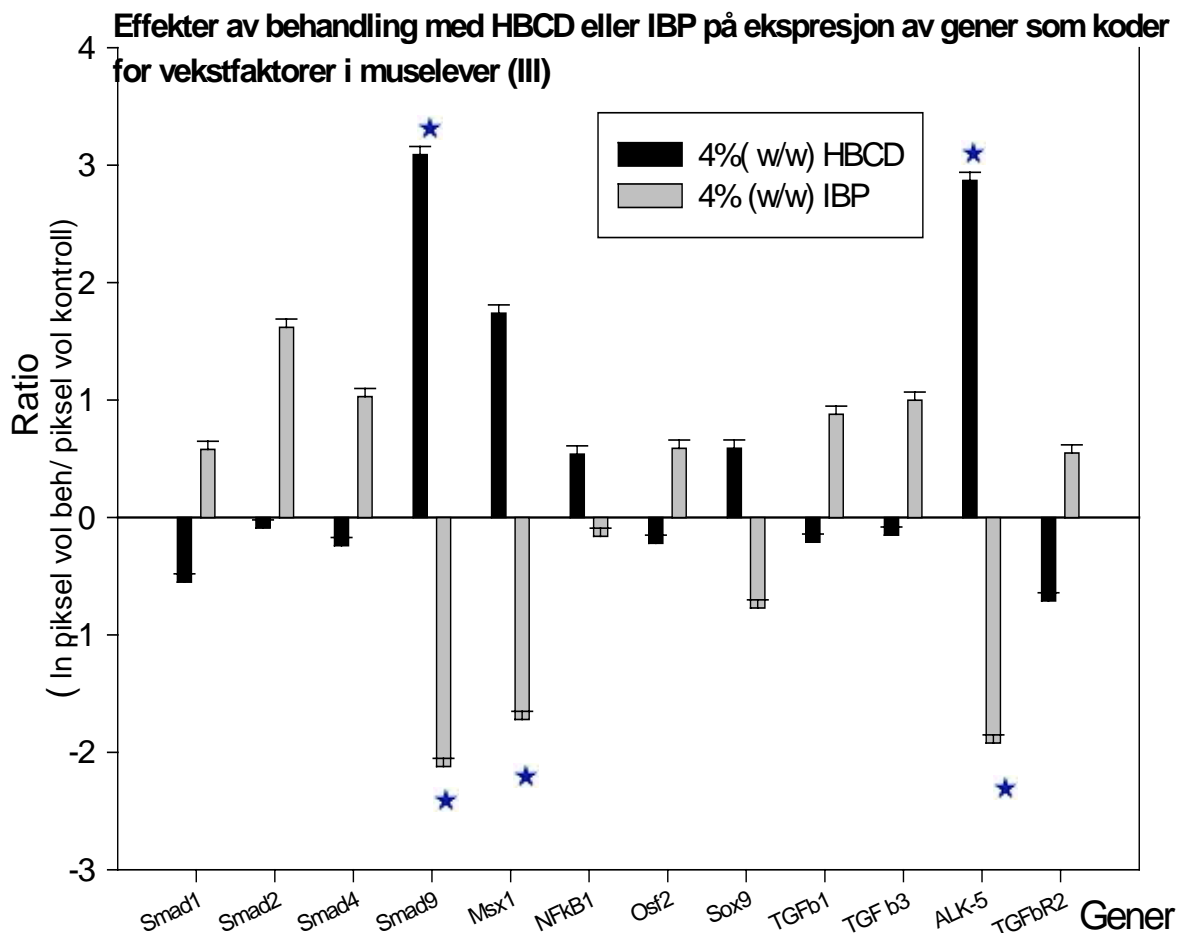
IBP behandling fører til signifikant★ oppregulering av genene som koder for vekstfaktorene vist i figur 6.4.8.1 i forhold til HBCD behandling, bortsett fra CD29-genet som blir nedregulert av IBP og oppregulert av HBCD behandling.



Figur 6.4.8.1 Gener som koder for vekstfaktorene: EGF, aFGF, , FGF3, FLG, FGFR2, FGFR3, VEGFR, BMP3, Igf1r og CD29. Genene induseres eller nedreguleres i villtype muselever etter 3 dagersbehandling med HBCD eller IBP. Behandlingen er beskrevet under punkt 5.1.3 A og B. Verdiene viser forholdet mellom de gjennomsnittlige In-verdiene av normalisert pikselvolumet i behandlet- og kontrollever fra tre dyr.

6.4.8.2 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på gener som koder for vekstfaktorer (III) i muselever

IBP behandling førte til signifikant★ oppregulering av genene som koder for vekstfaktorene, bortsett for Smad9, Msx1, Sox9 og Alk-5 (figur 6.4.8.2) som ble signifikant★ nedregulert av IBP og kraftig oppregulert av HBCD-behandling. Behandling med HBCD førte ikke til signifikante endringer av de øvrige gener.



Figur 6.4.8.2 Gener som koder for vekstfaktorene: Smad1, Smad2, Smad3, Smad4, Msx1, NFKB1, PDGFA, Osf2, Sox9, TGFb1, TGF b2, TGF b3, ALK-5 og TGFbR2. Genene indueres eller nedreguleres i villtypemuselever etter 3 dagers behandling med HBCD eller IBP. Behandlingen er beskrevet under punkt 5.1.3 A og B. Verdiene viser forholdet mellom de gjennomsnittlige ln-verdiene av normalisert pikselvolum i behandlet- og kontrollever fra tre dyr.

6.5 Mikromatriser

Musene ble injisert daglig intraperitonealt (i.p.) med HBCD eller IBP i 10 dager (som beskrevet under punkt 5.1.2 B), og deretter avlivet som beskrevet under punkt 5.1.5.

Isolert RNA (punkt 5.3.1) fra PPAR- α - og CD-1- muselever ble kopiert til cDNA og amplifisert, merket med RNA Capture sekvens spesifikk for cy3 eller cy5 v.h.a. RT-PCR (punkt 5.4 og 5.4.1) ble hybridisert til mikromatrise (punkt 5.8 og 5.8.1) og farget med cyanin fargene cy3 (grønn) og cy5 (rød) (5.8.1.1-5.8.1.7). Etter hybridiseringen ble spot fluorescensintensiteten avlest i en PerkinElmer mikroarray skanner. Vha en maske ble sirklene/flekkene i matrisen avgrenset.

Resultatene ble så behandlet videre i Spotfire (fig.5.8.4 trinn 1-8). Her ble genene filtrert ut fra en terskelverdi ($\leq 0,5$ (oppregulert) - ≥ 2 (nedregulert)) og normalisert etter Z-score Standard avvik lik 2. Verdiene i tabellene representerer forholdet(cy5/cy3) mellom fluorescensintensiten fra behandlet- (cy5) og kontroll- (cy3) lever fra tre parallelle hybridiseringer, basert på 5 dyr.

6.5.1 Effekter av HBCD-behandling på ekspresjon av gener som kan påvirke apoptose og celleproliferasjon (I)

HBCD behandling førte til oppregulering av gener som koder for proteiner som kan påvirke apoptose eller celleproliferasjon hos villtypemus. Hos PPAR- α knockout mus ser vi ikke tilstrekkelig induksjon av disse genene pga at PPAR- α genet er slått av (tabell 6.5.1).

Effekter av HBCD-behandling på ekspresjon av gener som kan påvirke apoptose og celleproliferasjon (I)

| Gen navn | | Beh.villtype balbc Kontroll villtype mus | Beh.PPAR- α knockout kontroll PPAR- α knockout mus | PPAR- α ubehandlet Vilttype ubehandlet |
|-----------------------|---|---|--|--|
| Alb1 | ALPHA-FETOPROTEIN PRECURSOR (ALPHA-FETOGLOBULIN) | 3.8 | 1.3 | 1.1 |
| Alb1 | ALPHA-FETOPROTEIN PRECURSOR (ALPHA-FETOGLOBULIN) | 4.3 | 1.3 | 0.8 |
| Aldh1a1 | ALDEHYDE DEHYDROGENASE 1A1 | 2.9 | 1.9 | 0.6 |
| Cat | CATALASE | 3.5 | 1.5 | 1.8 |
| Cp | CERULOPLASMIN PRECURSOR (FERROXIDASE). | 5.4 | 2.1 | 2.7 |
| Ctsl | CATHEPSIN L PRECURSOR (MAJOR EXCRETED PROTEIN) (MEP). | 3.8 | 1.9 | 0.6 |
| Cyp2e1 | CYTOCHROME P450 | 5.7 | 1.8 | 1.0 |
| Cyp3a11 | CYTOCHROME P450 3A11 | 3.9 | 1.7 | 4.0 |
| Gapd | GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE | 4.5 | 1.6 | 1.2 |
| Grim19-pending | NADH-UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE B16.6 SUBUNIT (CELL DEATH-REGULATORY PROTEIN GRIM-19). | 3.6 | 1.6 | 2.8 |
| Oaz1 | ORNITHINE DECARBOXYLASE ANTIZYME | 3.0 | 1.8 | 1.4 |
| Otc | ORNITHINE CARBAMOYLTRANSFERASE | 3.4 | 1.6 | 0.6 |
| Serpinc1 | ANTITHROMBIN-III PRECURSOR (ATIII). | 4.5 | 1.7 | 1.0 |
| Sod1 | SUPEROXIDE DISMUTASE [CU-ZN] | 3.5 | 1.7 | 0.0 |

Tabell 6.5.1 Forholdet mellom fluorescensintensitet av behandlet og kontrollever fra tre parallelle hybridiseringer, basert på 3 dyr. Tabellen viser de mest berørte gener etter 1 % (w/w) behandling av villtype balbc mus (kolonne3) og 300mg/kg kv HBCD-behandling av PPAR- α mus (kolonne 4). Det ble kjørt en kontroll villtype mot kontroll PPAR- α for å få innsikt i de biologiske konsekvensene forårsaket av å slå av PPAR- α genet (kolonne5). Genene ble filtrert etter terskelverdiene ((nedregulert) ≤ 0.5 , (oppregulert) ≥ 2) og normalisert etter Z-score Standard avvik lik 2.

6.5.1.1 Effekter av HBCD-behandling på ekspresjon av gener som kan påvirke apoptose og celleproliferasjon (II).

HBCD-behandling førte hos villtypemus til oppregulering av gener som koder for proteiner som påvirker apoptose. Hos PPAR- α knockout mus ser vi ikke tilstrekkelig induksjon av disse enzymene pga at PPAR- α genet er slått av. Disse genene uttrykkes nokså likt i PPAR- α knockout og villtype ubehandlede mus, bortsett fra Grim19 som er betydelig uttrykt hos ubehandlede transgene(PPAR- α knockout) enn hos ubehandlede villtype mus (tabell 6.5.1).

Effekter av HBCD-behandling på gener som kan påvirke apoptose og celleproliferasjon II

| Gen navn | | Beh.villtype balbc Kontroll villtype mus | Beh.PPAR- α knockout kontroll PPAR- α knockout mus | PPAR- α ubehandlet Vilttype ubehandlet |
|---------------|--|---|--|--|
| Itih2 | INTER-ALPHA-TRYPSIN INHIBITOR HEAVY CHAIN H2 | 3.1 | 2.6 | 0.2 |
| Itih4 | INTER ALPHA-TRYPSIN INHIBITOR, HEAVY CHAIN 4 | 4.1 | 2.6 | 0.4 |
| Apoh | BETA-2-GLYCOPROTEIN I PRECURSOR (APOLIPOPROTEIN H | 4.7 | 1.2 | 1.0 |
| B2m | BETA-2-MICROGLOBULIN PRECURSOR. | 9.0 | 1.6 | 0.6 |
| C3 | COMPLEMENT C3 PRECURSOR (HSE-MSF) | 12.7 | 3.7 | 0.7 |
| Cappa1 | F-ACTIN CAPPING PROTEIN ALPHA-1 SUBUNIT | 3.7 | 1.7 | 1.0 |
| Clu | CLUSTERIN | 16.9 | 0.8 | 0.0 |
| Dbi | ACYL-COA-BINDING PROTEIN (ACBP) (DIAZEPAM BINDING INHIBITOR) (DBI) | 4.1 | 1.2 | 2.5 |
| Pon1 | SERUM PARAOXONASE/ARYLESTERASE 1 | 3.7 | 2.0 | 1.3 |
| Prdx1 | PEROXIREDOXIN 1 | 3.4 | 1.8 | 0.9 |

Tabell 6.5.1.1 Forholdet mellom fluorescensintensitet av behandlet- og kontrollever fra tre parallelle hybridiseringer, basert på 3 dyr. Tabellen viser de mest berørte gener etter 1 % (w/w) behandling av villtype balbc mus (kolonne3) og 300mg/kg kv HBCD-behandling av PPAR- α mus (kolonne 4). Det ble kjørt en kontroll villtype mot kontroll PPAR- α for å få innsikt i de biologiske konsekvensene forårsaket av å slå av PPAR- α genet (kolonne5). Genene ble filtrert etter terskelverdiene ((nedregulert) ≤ 0.5 , (oppregulert) ≥ 2) og normalisert etter Z-score Standard avvik lik 2.

6.5.2 Effekter av HBCD-behandling på ekspresjon av cytokrom P450-gener

Hos villtypemus førte behandlingen til en oppregulering av gener som er implisert i respons til oksidativt stress og i xenobiotika metabolisme. Hos PPAR- α knockout mus ser vi ikke tilstrekkelig induksjon av disse genene pga at PPAR- α genet er slått av. Disse genene uttrykkes nokså likt i PPAR- α knockout og villtype ubehandlede mus, bortsett fra Cyp2c39, Cyp3a11 og Cyp3a16 som er betydelig uttrykt hos ubehandlede transgene (PPAR- α knockout) enn hos ubehandlede villtypemus.

Effekter av HBCD-behandling på ekspresjon av P- 450 gener i muselever

| Gen navn | | Beh.villtype balbc Kontroll villtype mus | Beh.PPAR- α knockout kontroll PPAR- α knockout mus | PPAR- α ubehandlet Vilttype ubehandlet mus |
|-----------------|----------------------|---|--|---|
| Cyp1a2 | CYTOCHROME P450 1A2 | 5.4 | 2.1 | 0.6 |
| Cyp2a12 | CYTOCHROME P450 1A12 | 5.9 | 1.3 | - |
| Cyp2a4 | CYTOCHROME P450 2A4 | 16.9 | 0.8 | 0.7 |
| Cyp2c37 | CYTOCHROME P450 2C37 | 12.7 | 3.7 | 1.5 |
| Cyp2c37 | CYTOCHROME P450 2C37 | 10.4 | 2.7 | 0.8 |
| Cyp2c37 | CYTOCHROME P450 2C37 | 10.0 | 3.1 | 0.8 |
| Cyp 2c39 | CYTOCHROME P450 2C39 | 15.2 | 4.6 | 5.5 |
| Cyp2c40 | CYTOCHROME P450 2C40 | 7.1 | 2.2 | 1.0 |
| Cyp2d9 | CYTOCHROME P450 2D9 | 3.6 | 2.3 | - |
| Cyp2d9 | CYTOCHROME P450 2D9 | 3.6 | 1.9 | 1.3 |
| Cyp2d10 | CYTOCHROME P450 2D10 | 6.3 | 2.0 | 1.0 |
| Cyp2d10 | CYTOCHROME P450 2D10 | 5.2 | 1.4 | 0.3 |
| Cyp2d11 | CYTOCHROME P450 2D11 | 10.4 | 2.1 | 0.5 |
| Cyp2e1 | CYTOCHROME P450 | 5.7 | 1.8 | 1.0 |
| Cyp3a11 | CYTOCHROME P450 3A11 | 5.1 | 2.4 | 3.1 |
| Cyp3a16 | CYTOCHROME P450 3A16 | 5.4 | 3.3 | 9.1 |
| Cyp4f14 | CYTOCHROME P450 4F14 | 9.1 | 1.5 | - |
| * | CYTOCHROME P450* | 205.0 | 1.6 | 1.5 |

Tabell 6.5.2 Forholdet mellom fluorescensintensitet av behandlet-og kontrollever fra tre parallelle hybridiseringer, basert på 3 dyr. Tabellen viser de mest berørte gener etter 1 % (w/w) behandling av villtype balbc mus (kolonne3) og 300mg/kg kv HBCD-behandling av PPAR- α mus (kolonne 4). Det ble kjørt en kontroll villtype mot kontroll PPAR- α for å få innsikt i de biologiske konsekvensene forårsaket av at PPAR- α genet slås av (kolonne5). Genene ble filtrert etter terskelverdiene ((nedregulert) ≤ 0.5 , (oppregulert) ≥ 2) og normalisert etter Z-score Standard avvik lik 2.

6.5.3 Effekter av HBCD-behandling på ekspresjon av gener som koder for fase II detoksifiseringsenzymmer

HBCD-behandling førte til oppregulering av ekspresjon av gener som koder for enzymer involvert i fase II detoksifiseringsmekanismen hos villtype mus (tabell 6.5.3). Hos PPAR- α knockout mus ser vi ikke tilstrekkelig induksjon av disse genene pga at PPAR- α genet er slått av. Disse genene uttrykkes ganske likt i PPAR- α knockout og villtype ubehandlet mus, med unntak av Gsta4, Gsta1, Gstm2 og Gstm3 (se også fig. 6.4.2).

Effekter av HBCD-behandling på ekspresjon av gener som koder for fase II detoksifiseringsenzymmer i muselever

| Gen navn | | Beh.villtype balbc Kontroll villtype mus | Beh.PPAR- α knockout kontroll PPAR- α knockout mus | PPAR- α ubehandlet Villtype ubehandlet |
|--------------|---|--|--|--|
| Gsta4 | GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 5.7 (GST A4-4) | 7.9 | 2.6 | 19.8 |
| Gsta1 | GLUTATHIONE S-TRANSFERASE] | 8.6 | 1.7 | 5.8 |
| Gsta1 | GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GT41A] | 5.6 | 0.9 | - |
| Gstm1 | GLUTATHIONE S-TRANSFERASE MU 1 (PMGT10) (GST 1-1). | 6.2 | 1.7 | - |
| Gstm2 | GLUTATHIONE S-TRANSFERASE MU 2 (GST CLASS-MU 2] | 8.1 | 2.6 | 3.1 |
| Gstm3 | GLUTATHIONE S-TRANSFERASE MU 3 (GST CLASS-MU 3]) | 5.8 | 2.0 | 5.2 |
| Gstm6 | GLUTATHIONE S-TRANSFERASE MU 6 (GST CLASS-MU 6) | 2.4 | 1.5 | 0.9 |
| Gstp1 | GLUTATHIONE S-TRANSFERASE P 1 (GST YF-YF) (GST-PIA) (GST CLASS-PI). | 6.2 | 1.4 | |
| Gstp2 | GLUTATHIONE S-TRANSFERASE P 2 (GST YF-YF) (GST-PIB) (GST CLASS-PI) | 3.8 | 1.1 | 0.3 |
| Gstt2 | GLUTATHIONE S-TRANSFERASE THETA 2 (GST CLASS-THETA) | 2.7 | 1.6 | 0.4 |
| Gstm4 | GLUTATHIONE S-TRANSFERASE, MU 4 | 7.0 | 2.7 | - |
| Gsto1 | GLUTATHIONE TRANSFERASE OMEGA 1 (GSTO 1-1) | 4.5 | 1.5 | - |

Tabell 6.5.3 Tabellen viser forholdet mellom fluorescensintensiteten av behandlet- og kontrollever fra tre parallelle hybridiseringer, basert på 3 dyr. Tabellen viser de mest berørte gener etter 1 % (w/w) behandling av villtype balbc mus (kolonne3) og 300mg/kg kv HBCD behandling av PPAR- α mus (kolonne 4). Det ble kjørt en kontroll villtype mot kontroll PPAR- α for å få innsikt i de biologiske konsekvensene forårsaket av at PPAR- α genet slås av (kolonne5). Genene ble filtrert etter ((nedregulert) ≤ 0.5 , (oppregulert) ≥ 2 og normalisert etter Z-score Standard avvik lik 2.

6.5.4 Effekter av HBCD-behandling på ekspresjon av gener som koder for proteiner i cytokrom oksidasekomplekset

Hos villtypemus førte behandlingen til en oppregulering av gener involvert i elektrontransportkjeden. Disse påvirker energiomsetningen i cellen. Hos PPAR- α knockout mus ser vi ikke tilstrekkelig induksjon av disse genene pga at PPAR- α genet er slått av. Disse genene uttrykkes nokså likt i PPAR- α knockout og villtype ubehandlet mus, bortsett fra Cox6a1 og Atp5 som er betydelig mer uttrykt hos ubehandlede transgene (PPAR- α knockout) enn hos ubehandlede villtypemus.

Effekter av HBCD-behandling på ekspresjon av gener som koder for proteiner i cytokrom oksidase komplekset i muselever

| Gen navn | | Beh.villtype balbc Kontroll villtype mus | Beh.PPAR- α knockout kontroll PPAR- α knockout mus | PPAR- α ubehandlet Viltype ubehandlet |
|---------------------------|---|--|--|---|
| Cox4a | CYTOCHROME C OXIDASE SUBUNIT IV ISOFORM 1 | 3.5 | 1.6 | 1.3 |
| Cox6a1 | CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE VIA-LIVER, | 3.2 | 1.6 | 2.4 |
| Cox6c | CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE VIC-2 | 4.7 | 1.2 | 0.9 |
| Cox7a2 | CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE VIIA-LIVER/HEART | 9.0 | 1.6 | 1.6 |
| Cox7b | CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE VIII | 2.8 | 1.4 | 1.2 |
| Cox7c | CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE VIIC, | 5.4 | 1.6 | 1.3 |
| Cox8a | CYTOCHROME C OXIDASE POLYPEPTIDE VIII-LIVER, | 3.2 | 1.6 | 1.5 |
| Atp5k | ATP SYNTHASE E CHAIN, MITOCHONDRIAL | 4.5 | 2.2 | 12.2 |
| Atp5l | ATP SYNTHASE, H+ TRANSPORTING | 3.2 | 1.6 | 0.4 |
| 0610009D 10Rik | ATP SYNTHASE D CHAIN, MITOCHONDRIAL | 3.7 | 1.3 | 0.9 |
| 2310021J1 0Rik | UBIQUINOL-CYTOCHROME C REDUCTASE COMPLEX 11 KDA PROTEIN, | 3.7 | 1.9 | 0.6 |

Tabell 6.5.4 Forholdet mellom fluorescensintensitet av behandlet- og kontrollever fra tre parallelle hybridiseringer, basert på 3 dyr. Tabellen viser de mest berørte gener etter 1 % (w/w) behandling av villtype balbc mus (kolonne3) og 300mg/kg kv HBCD behandling av PPAR- α knockoutmus (kolonne 4). Det ble kjørt en kontroll villtype mot kontroll PPAR- α for å få innsikt i de biologiske konsekvensene forårsaket av at PPAR- α genet slås av (kolonne5). Genene ble filtrert etter terskelverdiene ((nedregulert) ≤ 0.5 , (oppregulert) ≥ 2) og normalisert etter Z-score Standard avvik lik 2.

6.6 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på peroksisomal β -oksidasjonsaktivitet i ♀ muselever

Peroksisomene håndterer β -oksidasjon for lange fettsyrer [Osmundsen, H et al., 1980] og oksiderer sidekjedene av eicosanoider (arakidon syre derivat) som er molekyler som deltar i kort avstandssignalisering mellom cellene [Reddy, JK et al. 1994].

Resultatene viser at behandling med HBCD eller IBP (tabell 6.6) førte til økning av peroksisomal β -oksidasjonsaktivitet hos villtypemus. Behandling med HBCD eller IBP førte ikke til tilstrekkelig induksjon av peroksisomal β -oksidasjonsaktivitet hos PPAR- α knockout mus pga at PPAR- α genet er slått av. Rader merket med ★ er signifikante.

Effekter av behandling med HBCD eller IBP på peroksisomal β -oksidasjon

| Behandling | Dose (mg/kg kv) | Kjønn | PPAR- α knockout mus nmol/protein min. | Villtype (CD-1) mus nmol/protein min. |
|------------|------------------|-------|--|--|
| kontroll | Maisolje | F | 0.09±0.009 | 3.8±0.05 |
| HBCD | 100 | F | 0.062±0,028 | 8.3±0.05★ |
| HBCD | 300 | F | 0.014±0,002 | 3.9±0.05 |
| HBCD | 600 | F | 0.018±0,004 | 3.80.009 |
| IBP | 100 | F | 0.019±0,04 | 5.4±0.005 |
| IBP | 300 | F | 0.017±0,05 | 3.6±0.04 |
| IBP | 600 | F | 0.015±0,02 | 3.7±0.05 |

Tabell 6.6. Peroksisomal β -oksidasjonsaktivitet i lever hos transgene (PPAR- α knockout) og villtype (CD-1) mus injisert i.p. daglig i 10 dager med 100mg/kg kv, 300mg/kg kv eller 600mg/kg kv HBCD eller IBP. Verdiene i tabellen representerer et gjennomsnitt av målingene \pm standard avvik, basert på 10 dyr i kontrollgruppen og 5 dyr i de øvrige grupper. Behandlingen er forklart under punkt 5.1.7 B. Dyrene i kontrollgruppen ble injisert med 0,1 ml i.p. maisolje.

6.6.1 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på peroksisomal β -oksidasjonsaktivitet i σ muselever


Behandling med HBCD eller IBP (tabell 6.6.1) førte ikke til endring av peroksisomal β -oksidasjonsaktivitet hos transgene (PPAR- α knockout) eller villtype mus i forhold til kontrollen. HBCD- eller IBP-behandling (100mg/kg kv) førte ikke til tilstrekkelig induksjon av peroksisomal β -oksidasjonsaktivitet hos PPAR- α knockoutmus pga at PPAR- α genet er slått av. IBP- behandling førte ikke til endring av enzym aktivitet hos villtypemus.

Effekter av behandling med HBCD eller IBP på peroksisomal β -oksidasjon



| Behandling | Dose (mg/kg kv) | Kjønn | PPAR- α knockout mus nmol/protein min. | Villtype (CD-1) mus nmol/protein min. |
|------------|-----------------|-------|--|--|
| kontroll | Maisolje | M | 0.02 \pm 0.04 | 5.21 \pm 0.03 |
| HBCD | 100 | M | 0.14 \pm 0.005 | 4.88 \pm 0.02 |
| HBCD | 300 | M | 0.028 \pm 0,006 | 4.65 \pm 0.03 |
| HBCD | 600 | M | 0.031 \pm 0.03 | 5.51 \pm 0.02 |
| IBP | 100 | M | 0.017 \pm 0.03 | 3.83 \pm 0.05 |
| IBP | 300 | M | 0.096 \pm 0,06 | 4.22 \pm 0.05 |
| IBP | 600 | M | 0.011 \pm 0,02 | 3.53 \pm 0.08 |

Tabell 6.6.1 Peroksisomal β -oksidasjonsaktivitet i lever hos transgene (PPAR- α knockout) og villtype (CD-1) mus injisert i.p. daglig i 10 dager med 100mg/kg kv, 300mg/kg kv eller 600mg/kg kv HBCD eller IBP. Verdiene i tabellen representerer et gjennomsnitt av målingene \pm standard avvik, basert på 10 dyr i kontrollgruppen og 5 dyr i de øvrige grupper. Behandlingen er forklart under punkt 5.1.7 B Dyrene i kontrollgruppen ble injisert med 0,1 ml i.p. maisolje.

6.6.2 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på peroksisomal β -oksidasjonsaktivitet i villtype (balbc) muselever

Behandling med HBCD eller IBP (figur 6.6.2) førte til signifikant  økning av peroksisomal β -oksidasjon aktivitet hos behandlet villtype i forhold til ubehandlet villtype mus

Effekter av behandling med HBCD eller IBP på peroksisomal β -oksidasjon

| Behandling | Dose % (w/w) | Peroksisomal β -oksidasjon nmol/protein min. |
|------------|--------------|--|
| kontroll | maisolje | 3.4±0.0002 |
| HBCD | 1 | 5.1±0.0017  |
| HBCD | 4 | 4.6±0.0011  |
| IBP | 1 | 4.3±0.0019 |
| IBP | 4 | 4.1±0.0021 |

Tabell 6.6.2 Peroksisomal β -oksidasjonsaktivitet i lever hos villtype (balbc) mus etter 3 dagers kostbehandling med 1 og 4 % HBCD(w/w) eller 1 og 4 % IBP (w/w). Verdiene i tabellen representerer et gjennomsnitt av målingene \pm standard avvik, basert på 3 dyr. Behandlingen er forklart under punkt 5.1.7 A. Dyrene i kontrollgruppen spiste før behandlet med aceton.

6.7 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på katalaseaktivitet i lever

Katalase omdanner toksisk hydrogenperoksid produsert av acyl-CoA oksidase til vann og oksygen.

6.7.1 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på katalaseaktivitet hos PPAR- α knockout og villtype CD-1 ♀ mus

HBCD behandling (tabell 6.7.1) førte til betydelig økning av katalaseaktivitet i forhold til kontroll ved dose 100mg/kg kv hos villtypemus, men ikke til tilstrekkelig induksjon av katalaseaktivitet hos PPAR- α knockout hunnmus pga at PPAR- α genet er slått av. IBP behandling ført til økning av enzymaktivitet hos villtypemus.

Effekter av behandling med HBCD eller IBP på katalaseaktivitet hos PPAR- α knockout- og villtype CD-1 ♀ mus

| Behandling | Dose (mg/kg kv) | PPAR- α knockout mus | Villtype (CD-1) mus |
|------------|------------------|-----------------------------|---------------------|
| kontroll | Maisolje | 1.5 \pm 0.006 | 3.5 \pm 0.005 |
| HBCD | 100 | 1.7 \pm 0.0009 | 8.6 \pm 0.004★ |
| HBCD | 300 | 1.3 \pm 0.0053 | 2.8 \pm 0.04 |
| HBCD | 600 | 1.2 \pm 0.005 | 3.6 \pm 0.09 |
| IBP | 100 | 1.7 \pm 0.005 | 3.8 \pm 0.01 |
| IBP | 300 | 1.6 \pm 0.009 | 4.7 \pm 0.007★ |
| IBP | 600 | 0.09 \pm 0.005 | 4.6 \pm 0.009 |

Tabell 6.7.1 Katalaseaktivitet i lever hos transgene (PPAR- α knockout) og villtype (CD-1) mus injisert i.p. daglig i 10 dager med 100mg/kg kv, 300mg/kg kv eller 600mg/kg kv HBCD eller IBP. Verdiene i tabellen representerer et gjennomsnitt av målingene \pm standard avvik, basert på 10 dyr i kontrollgruppen og 5 dyr i de øvrige grupper. Behandlingen er forklart under punkt 5.1.7 B Dyrene i kontrollgruppen ble injisert med 0,1 ml i.p.maisolje. Kolonner merket med ★er signifikant.

6.8 Effekter av HBCD- eller IBP-behandling på dødelighet

Behandling med HBCD eller IBP forårsaket stor dødelighet hos PPAR- α knockout mus (tabell 6.8 og 6.8.1).

Effekter av behandling med HBCD eller IBP på dødelighet hos PPAR- α ♀ mus

| Behandling | Dose (mg/kg kv) | PPAR- α knockout mus Antall døde mus | Villtype (CD-1) mus Antall døde mus |
|------------|------------------|--|--|
| kontroll | Maisolje | 0 | 0 |
| HBCD | 100 | 5 | 0 |
| HBCD | 300 | 2 | 0 |
| HBCD | 600 | 4 | 0 |
| IBP | 100 | 3 | 0 |
| IBP | 300 | 1 | 0 |

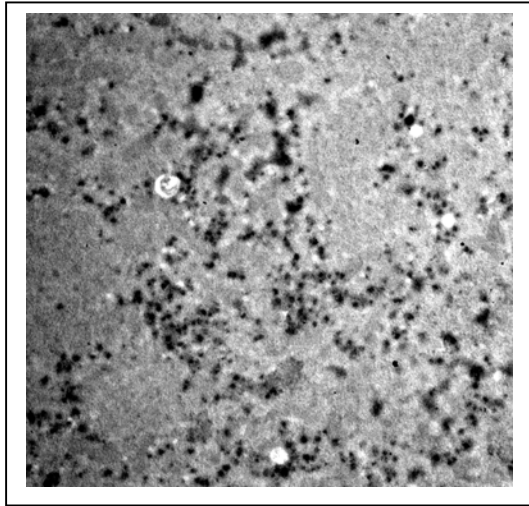
Tabell 6.8 Oversikt over antall mus som døde av totalt 120 mus under behandling med HBCD eller IBP. PPAR- α knockout og villtype (CD-1) mus ble injisert i.p. daglig i 10 dager med HBCD eller IBP med følgende doser: 100mg/kg kv, 300mg/kg kv eller 600mg/kg kv

Effekter av behandling med HBCD eller IBP på mortalitet hos PPAR- α ♂ mus

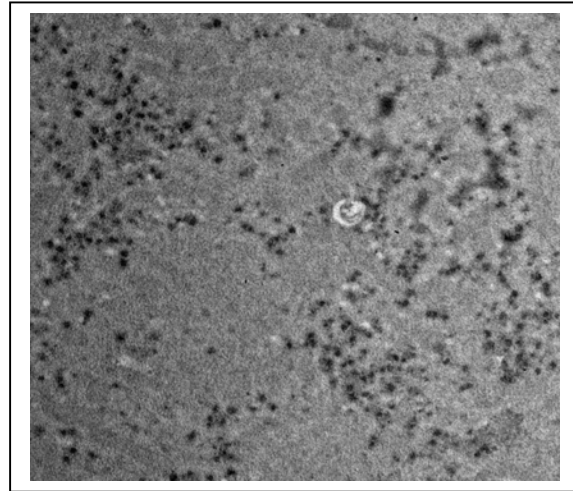
| Behandling | Dose (mg/kg kv) | PPAR- α knockout mus Antall døde mus | Villtype (CD-1) mus Antall døde mus |
|------------|------------------|--|--|
| kontroll | Maisolje | 0 | 0 |
| HBCD | 100 | 6 | 0 |
| HBCD | 300 | 2 | 0 |
| HBCD | 600 | 3 | 0 |
| IBP | 100 | 3 | 0 |
| IBP | 300 | 2 | 0 |
| IBP | 600 | 5 | 0 |

Tabell 6.8.1 Oversikt over antall mus (av totalt 126 mus) som døde under behandling med HBCD eller IBP. PPAR- α knockout og villtype (CD-1) mus ble injisert i.p. daglig i 10 dager med HBCD eller IBP med følgende doser: 100mg/kg kv, 300mg/kg kv eller 600mg/kg kv

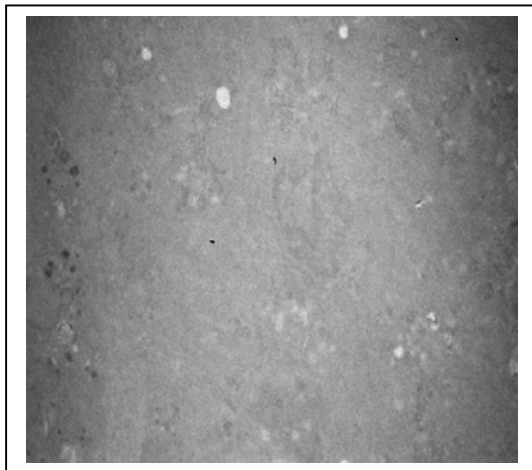
6.9 EM analyse av leversnitt (I)



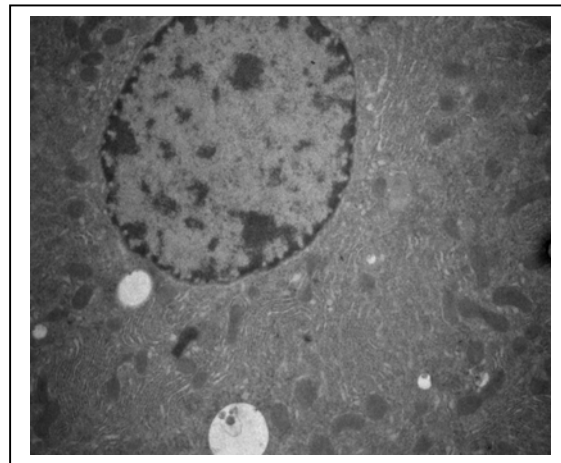
Figur 6.9A Leversnitt fiksert 90min. i 2% formaldehyd, 2.5 % glutaraldehyd i 0,1M fosfatbuffer fra villtype- ♀ mus (CD-1) injisert i.p. daglig i 10 dager med 100mg/kg kv HBCD. 15499,70X



Figur 6.9B Leversnitt fiksert 90min. i 2% formaldehyd, 2.5 % glutaraldehyd i 0,1M fosfatbuffer fra villtypemus (Balbc) føret i 3 dager med 1 % (w/w) HBCD. 15499,70X

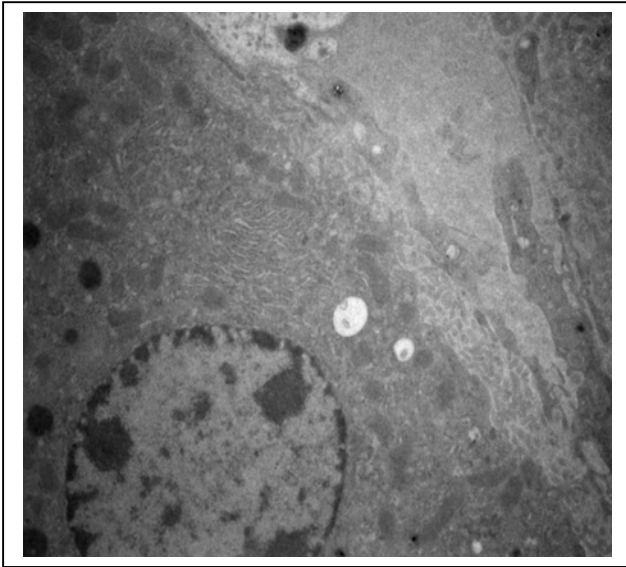


Figur 6.9C Leversnitt fiksert 90min. i 2% formaldehyd, 2.5 % glutaraldehyd i 0,1M fosfatbuffer fra PPAR- α knockout- ♀ mus injisert i.p. daglig i 10 dager med 100mg/kg kv HBCD.15499,70X

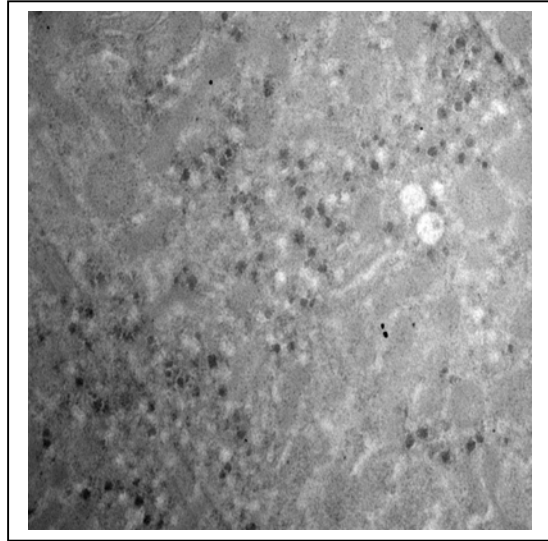


Figur 6.9D Leversnitt bare kontrastering fra villtype- ♀ mus (CD-1) injisert i.p. daglig i 10 dager med maisolje. 15499,70X

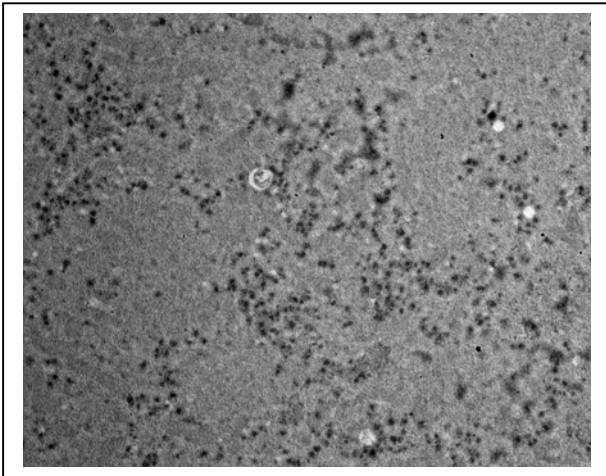
6.9.1 EM analyse av leversnitt (II)



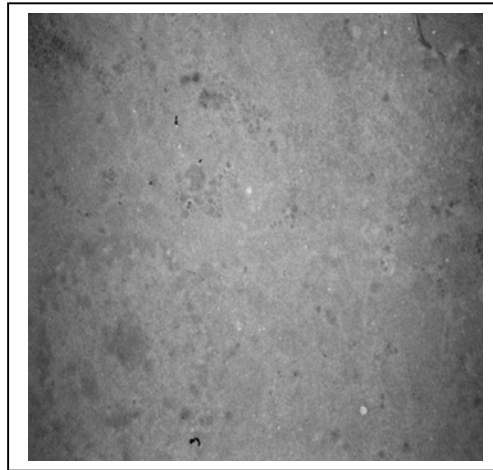
Figur 6.9.1A Leversnitt bare kontrastering fra PPAR- α - ♀ kockoutmus injisert i.p. daglig i 10 dager med maisolje. 15499,70X



Figur 6.9.1B Leversnitt fiksert 90min. i 2% formaldehyd, 2.5 % glutaraldehyd i 0,1M fosfatbuffer fra villtypemus (Balbc) fôret i 3 dager med 1 % (w/w) IBP. 15499,70X



Figur 6.9.1C Leversnitt fiksert 90min. i 2% formaldehyd, 2.5 % glutaraldehyd i 0,1M fosfatbuffer fra villtype- ♀ mus (CD-1) injisert i.p. daglig i 10 dager med 100mg/kg kv IBP. 15499,70X



Figur 6.9.D Leversnitt fiksert 90min. i 2% formaldehyd, 2.5 % glutaraldehyd i 0,1M fosfatbuffer fra PPAR- α knockout- ♀ mus injisert i.p. daglig i 10 dager med 100mg/kg kv IBP. 15499,70X

7. Diskusjon

7.1 Effekt av behandling med HBCD eller IBP på kroppsvekt, levervekt og nyrevekt

7.1.1 Kroppsvekt

Tidligere forsøk med rotter eksponert til IBP viser at forbindelsen initialt akkumulerer bl.a. i fett og lever og deretter skilles ut gjennom feces. IBP er lipofilt ($\log K_{ow} = 4.5$) og akkumulerer i fettvevet [Szymanska et al., 2001].

Mus og rotter som er blitt behandlet med HBCD [CAS No3194556, ACC 2001] har ikke vist endring av kroppsvekt. Mine resultater viser at behandling med HBCD fører til vektøkning hos PPAR- α knockoutmus (tabell 6.2 og 6.2.1).

Mine forsøk viser også at behandling med en høydose (4 % w/w) HBCD eller IBP fører til tap av kroppsvekt (tabell 6.1) hos villtypemus (tabell 6.2 og 6.2.1).

7.1.2 Levervekt

Tidligere studier hvor mus og rotter blir behandlet med HBCD [CAS No3194556, ACC 2001], viser at behandling fører til hepatomegali. Litteratursøk indikerer at slike forsøk med IBP ikke er beskrevet. *In vitro* forsøk tyder på at IBP er toksisk for hepatocytter og sannsynlig forstyrrer mitokondrielle funksjoner [Boecker, et al., 2001]. IBP er også påvist å være nevrotoksisk i granulærceller hos rotter [Fonnum ; Reistad, et al., 2002].

Mine resultater viser at HBCD i lavdoser forårsaker økning i relativ levervekt hos villtype balbc (Tabell 6.1.2) og PPAR- α knockoutmus (tabell 6.2.2 og 6.2.3). Behandlingen med HBCD fører til tap av levervekt hos villtype CD-1 mus (tabell 6.2.2 og 6.2.3). Behandling med IBP fører til tap av levervekt hos villtype balbcmus (tabell 6.1.1), CD-1 og PPAR- α knockoutmus (tabell 6.2.2 og 6.2.3).

7.1.3 Nyrevekt

Et studie utført av Wil Research Laboratories, 1996 [CAS No 3194556] hvor rotter ble sondeernært i 90 dager med IBP, viste ingen endring i nyrevekt. Histologiske undersøkelser av nyrene kunne ikke påvise noe forandringer i nyrevev. I mine forsøk førte behandling med

IBP ikke til tap av nyrevekt, unntatt for musene behandlet med 100mg/kg kv (tabell 6.2.4 ; 6.2.5) eller 4 % (w/w) IBP (tabell 6.1.2). Disse viste en økning av nyrevekt. Mine resultater viser at behandling med HBCD fører til en økning av relativ nyrevekt hos PPAR- α knockout (tabell 6.2.4) og hos CD-1 hannmus (tabell 6. 2.5). Det ble ikke observert forandringer i nyrevekt hos balbcmus (tabell 6.1.2) noe som tyder på at disse musene (som ble føret med kost tilsatt HBCD) ikke tok opp forbindelsen i samme grad som PPAR- α knockout og CD-1 mus som ble injisert daglig i.p. i ti dager med HBCD.

7.2 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på mRNA-nivå

7.2.1 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på peroksisomal proliferasjon

Behandling av mus eller rotter med peroksisomale proliferatorer, herbicider og leukotriene antagonist øker antall peroksisomer i leveren [Wolfrum,C. et al.,2000]. Peroksisomer er organeller som inneholder enzymer som deltar i oksidativ metabolisme samt i lipidmetabolismen. De såkalte peroksiomproliferatorene virker ved å binde seg til peroksisomal proliferatoraktivert reseptorer (PPAR) [Forman, B et al., 1997].

7.2.1.1 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på mRNA-nivå av Acyl-CoA oksidase

Fettsyrer er energirike molekyler som kan benyttes som energikilde under faste. Fettsyrer og fettsyrederivater er også signalmolekyler [Chawla,A. et al.,2001]. Fettsyrer degraderes i mitokondrier, peroksisomer og/eller i endoplasmatisk retikulum ved α - β - eller ω -oksidasjon [Lazarow & de Duve 1976]. Peroksisomal β -oksidasjon er viktig for katabolismen av substrater som ikke kan oksideres i mitokondriene. Defekte peroksisomer fører hos mennesker til abnormaliteter under utvikling av nervesystemet [Lazarow et al., 1981; Purdue, Singh, Lazarow et al., 1994]. Acyl-CoA oksidase er med på å bestemme hastighet i peroksisomal β -oksidasjon. Acyl-CoA oksidase dehydrogenerer substratet og reduserer FAD. FADH₂ i sin tur donerer elektroner direkte til oksygen med generering av hydrogenperoksid. Mine resultater viser at behandling med 4% (w/w) HBCD (figur 6.3.1) førte til oppregulering av acyl-coA oksidase mens IBP-behandling(figur 6.3.1) førte til nedregulering av dette

enzymet. Behandling med 1% (w/w) HBCD (figur 6.3) førte ikke til endring av ekspresjon av acyl-CoA oksidase i muselever. Det foreligger ingen data for 1% (w/w) IBP. I litteratursøk er det ikke funnet tilsvarende forsøk med HBCD eller IBP.

7.2.1.2 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på mRNA-nivå av PPAR- α

PPAR- α regulerer transkripsjon av en rekke genprodukter som har ansvar for metabolisme av fettsyrene, blant disse mRNA for enzymer i β og ω -oksidasjon [Forman, Barry et al., 1997]. Fettsyrene fungerer også som ligand for PPAR- α . Regulering av fettsyremetabolisme er viktig for cellehomeostase. Ubalanse kan føre til kjente sykdommer hos mennesker som insulinresistens, fedme, hyperlipidemia og høyt blodtrykk [Berger, J. et al., 1999]. Mine resultater viser at behandling med 4%(w/w) HBCD oppregulerer ekspresjon av PPAR- α , mens 4% (w/w) IBP nedregulerer ekspresjon av PPAR- α i muselever(figur 6.3.1). Lavere doser av HBCD eller IBP har motsatt effekt (figur 6.3). Dette kan tyde på at HBCD eller en HBCD-metabolitt oppfører seg som en fettsyre som kan binde seg til PPAR- α .

7.2.2 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på mRNA-nivå av NADPH-cytokrom P450 reduktase

Det er kjent at NADPH-cytokrom P450 reduktase fungerer som elektron donor for flere oksygenaser (cytokrom P450, heme oksygenase og squalene monooksygenase) i endoplasmatisk retikulum. Cytokrom P450 deltar i syntese av steroide hormoner og i metabolismen av mange fremmedstoffer [Makita et al., 1996; Capdevila, JH. et al., 1992] Mine resultater viser at behandling med HBCD eller IBP (figur 6.3 og 6.3.1) fører til oppregulering av NADPH-cytokrom P450 i muselever. I litteratursøk er det ikke funnet tilsvarende forsøk med HBCD eller IBP.

7.2.3 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på mRNA-nivå av tidlig respons gener

Det er kjent fra tidligere studier at c-myc er en transkripsjonsfaktor som regulerer celleproliferasjon [Bouchard et al., 1998 ; Burgin et al., 1998]. C-myc induseres av cytokiner og vekstfaktorer [Dang et al., 1999] (se figur 6.4.6 og 6.4.8.1). I mange svulster konstateres

unormal ekspresjon av c-myc [Marcu et al.,1992]. C-myc regulerer overgang fra G1 til S-fase ved å aktivere CDK kompleksene [Mateyak, M. K. 1999 : Obaya et al.,1999]. Avvikende ekspresjon av c-myc tilsidesetter de strenge kontrollpunktene i G1- og S-fase i celledyklus og promoterer svulstdannelse [Chernova, O.B. et al., 1998].

Mine resultater viser at behandling med HBCD eller IBP fører til oppregulering av c-myc (figur 6.3 og 6.3.1).

JunB er et tidlig respons protoonkogen og assosieres med celleproliferasjon og differensiering [Dungy et al., 1991]. JunB er medlem av AP-1 transkripsjonsfaktorkompleks som konverterer ekstracellulære signaler og modellerer genekspresjon [Angel et al.,1991].

Mine resultater viser at behandling med lave doser HBCD (figur nr.6.3) fører til oppregulering av JunB.

Celleadhesjon til den ekstracellulære matriksen (ECM) spiller en viktig rolle i generering av langsiktige signaler av betydning for cellevekst, migrasjon og overlevelse [Hanks, S.K. et al.,1997]. Den mest kjente signaloverføringen via ECM er aktivering av ekstracellulær-signal-regulert kinase2-mitogenaktivert protein kinase (Erk2/MAP-kinase). Mange vekstfaktorer, bl.a. epidermal vekstfaktor (EGF) (se figur 6.4.8.1), er ansvarlige for cellevekst og benytter seg av denne type signaloverføring [Geimer,P et al.,1991; Sakurai et al., 1997; Kjelsberg,C et al., 1997].

Mine resultater viser at behandling med HBCD førte til oppregulering av Erk2 (figur 6.3 og 6.3.1) og suppresjon av EGF (figur 6.4.8.1). IBP behandling førte ikke til endringer i ekspresjon av Erk2 (figur 6.3), men til økt nivå av mRNA for EGF (figur 6.4.8.1). Disse to tilsynelatende motstridende resultater tyder på at induksjon av EGF etter behandling med IBP ikke gir langvarig induksjon av MAP-kinase-kaskade. Det samme fenomenet ble observert under behandling av HepG-celler med EGF [Sipeki, S. et al.,1999]. Aktivering av Erk2 ved HBCD-behandling, kan ha vært forårsaket av andre vekstfaktorer. Det er i litteratursøk ikke funnet tilsvarende forsøk med HBCD eller IBP.

7.3 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på mRNA-nivå av β -aktin

Ekspresjon av β -aktin brukes flittig som intern kontroll i mRNA ekspresjonsstudier. Mine resultater viser at det er forskjeller i ekspresjon av β -aktin i muselever etter behandling med HBCD eller IBP (Se figur 6.3 og 6.3.1). Ekspresjon av β -aktin ble nedregulert av IBP-behandling, og ble derfor ikke brukt som intern kontroll.

7.4 Membranmatriser

7.4.1 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener assosiert med apoptose

Det er kjent at mitokondriene spiller en viktig rolle i både caspaseavhengig og uavhengig apoptose. Bax induserer permeabilisering av den ytre mitokondrielle membran, og forårsaker lekkasje av apoptotiske molekyler [Gross et al. 1999] som cytokrom-c [Deshmukh, et al. 1998]. Disse aktiverer Apaf-1 og utløser caspase-kaskaden [Laabich, A. et al. 2000 ; Li et al., 1997].

Økning av intracellulært Ca^{2+} -nivå kan sette i gang caspaseuavhengig apoptose.

Calciuminfluks kan aktivere sekundære budbringere som for eksempel NO-syntetase (NOS) (se figur 6.4.6). Dette fører til overflod av NO og dannelse av meget reaktive peroksynitriter [Beckman, et al., 1991]. Disse kan forstyrre elektrontransporten og gi tap av membranpotensiale [Nicholls et al., 2000]. Feil i oksidativ fosforylering kan resultere i dannelse av reaktive oksygenforbindelser (ROS) [Dalkara et al., 1998].

Mine resultater viser at *FasL*, *Bax*, *Bcl-X*, *Bcl-w*, *caspase1* og *caspase 8* ble nedregulert etter behandling med 1% (w/w)-HBCD eller IBP (figur 6.4.1). Det er kjent at apoptose kan settes i gang via Fas/FasL systemet.

FasL er medlem av tumornekrosefaktor-reseptorfamilien. Når FasL binder seg til Fas-reseptoren går målcellen i apoptose [Nagata et al., 1995].

TNFR2 ble oppregulert av HBCD-behandling og nedregulert av 4% (w/w) IBP behandling. Tidligere studier har vist at det i ødelagte optiske nerver kan registreres oppregulering av tumornekrosereseptor (TNFR) i aksonene til retinale ganglionceller [Yuan, L et al., 2000].

Både Fas og TNFR er kjent som dødsreseptorer. Det er også kjent at oppregulering av TNFR kan sette i gang en inflammasjonsrespons [Oguro, T. et al., 1998], [Bulera, S.J. et al., 2001]. Litteratursøk viste at tilvarende forsøk med HBCD eller IBP ikke er beskrevet.

7.4.1.1 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener involvert i oksidativt-stress

Det er kjent at oksidativt stress fører til uttømming av GSH og forbruk av ATP reservene, samt en økning av Ca^{2+} -konsentrasjonen og lipidperoksidasjon i cytoplasma [Fernandez-Checa et al., 1997].

Det synes som metabolismen av HBCD i levercellene foregår ved en cytokrom P450 avhengig oksidasjon (figur 6.4.2). Dette fører til uttømming av GSH og dermed DNA skader. I tillegg ser det ut til at behandlingen induserer *p53* (figur 6.4.5.1), *BAX* (figur 6.4.1) og *CDK* (figur 6.4.5).

GADD45 (figur 6.4.5.1) nedreguleres, mens *PCNA* oppreguleres av behandlingen.

Behandling med HBCD eller IBP førte også til nedregulering av gener (figur 6.4.2) involvert i oksidativt stress som for eksempel *GSTM3*. Dette er samme type respons som ble observert når astrocyter ble behandlet med bly [Zawia et al., 1996].

Behandling med 1% (w/w) HBCD førte til nedregulering av *MGST1*, *GSTM3*, *SOD1*, *SOD2*, *GPX* samt gener som koder for enzymer som deltar i metabolismen av xenobiotika (*CYP2B9*, *CYP2C9* og *CYP3A11*).

GSTM3 konjugerer hydrofobe elektrofile forbindelser og reaktive oksygenforbindelser (ROS) med glutation. Glutation peroksidase1 (GPX1) spiller en viktig rolle i antioksidantresponsen [Moriarty, P.M. et al., 1998].

Behandlingen førte også til oppregulering av plasma glutation transferase (GPX2). Disse resultatene ligner resultater beskrevet for mus som lider av selenmangel [Rao, Lin, et al., 2001; Reiter et al., 1984]. Litteratursøk viste at tilvarende forsøk med HBCD eller IBP ikke er beskrevet.

7.4.1.2 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av Hsp-gener og tilknyttede gener

Heat-shock proteiner (Hsp) fungerer bl.a. som chaperoner. Disse spiller en viktig rolle i signalveier. De er også implisert i transport av proteiner mellom organeller, og flere er implisert i den antiapoptotiske responsen [Jolly,C et al.,2000]. Heat-shock proteiner ser ut til å spille en viktig rolle for immunologisk toleranse [Brent,J.A. et al.,1993]. Behandling med 1% (w/w) HBCD fører til nedsatt ekspresjon av heat shock proteingener (*HSP105,HSP25,HSP60og HSP70*) (figur 6.4.3) . Det ser ut til at oppregulering av HSPer og JUN fungerer som forsvarsmekanisme mot celleødeleggelse og bl.a. fører til induksjon av NADPHregenerering [Angel et al., 1991 ; Dungy et al., 1991; Cascales et al., 1991]. Det er kjent at mRNA-nivået for disse genene øker både under karsinogenese og som ledd i forsvarsmekanismer mot varmemstress i leverceller behandlet med thioacetamide (THA) [Cascales,M et al.,1991] (se også kommentar under avsnitt 7.4.1.4). Litteratursøk viste at tilvarende forsøk med HBCD eller IBP ikke er beskrevet.

7.4.1.3 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener assosiert med DNA-reparasjon

Mine resultater viser at gener som koder for proteiner implisert i DNA-reparasjon stort sett nedregulert av behandling med 1% (w/w) HBCD eller 4% (w/w) IBP. Det er kjent at cellene daglig utsettes for enten fysisk stress [Okahara et al.,1995], [Donadelli,et al.,1998], kjemisk stress [Silva Lima et al., 2000 ; Blackburn et al., 1999] eller genotoksisk stress [Amundson et al., 1999]. Disse kan bl.a. skade DNA, og slik påvirke flere cellulære prosesser [Levine, A.J. et al., 1999 ; Lakin,N.D. et al., 1999]. Cellene svarer til slikt stress ved å nøye kontrollere cellesyklus og ved å optimalisere DNA-reparasjon [Adimoolam,S. Et al., 2003 ; Wahl,G.M.,et al., 2001 ; Lakin,N.D. et al., 1999]. Behandling med 4% (w/w) HBCD eller 1% (w/w) IBP ser ut til å indusere en del transkripsjonsfaktorer (se figur 6.4.4), noe som tyder på at behandlingen fører til DNA- eller proteinskade. Behandling med 1% (w/w) HBCD eller 4% (w/w) IBP fører til nedregulering av disse faktorene, noe som kan tyde på at de fleste DNA skadene er blitt reparert. Litteratursøk viste at tilvarende forsøk med HBCD eller IBP ikke er beskrevet.

7.4.1.4 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener implisert i cellesyklus

Det er kjent at aldring av normale celler medfører at telomerene forkortes ved hver celledeling. Dette medvirker til å regulere hvor mange ganger en celle kan dele seg [Campisi, J., 2000; (Blackburn 1999)].

Andre årsaker som fører til aldring av cellene er ødeleggelse av DNA [Di Leonardo et al., 1994], mutert RAS [Serrano, M., 1997], fysisk, kjemisk eller genotoksisk stress (se punkt 7.4.1.3).

Ved DNA-skader forårsaket av ikke-genotoksisk stress øker cellene ekspresjon av tumorsupressorgenet p53. Dette genet regulerer cellulære prosesser som cellesyklusarrest [Levine, A.J. et al., 1997], apoptose og DNA reparasjon [Adimoolam, S. et al., 2003].

Induksjon av p53 medfører midlertidig stopp i cellesyklusen, og oppregulering av ekspresjon av genene *CIP1*, *GADD45*, *MDM2* og *IGF-BP* [Wahl, G.M. et al. 2001].

Ikke-genotoksiske forbindelser modulerer genekspresjon på en mer diffus måte.

Denne type stress setter i gang metabolske endringer som gir økt oksidativt stress, suppresjon av apoptose, stimulering av regenerativ cellevekst og endret intercellulær kommunikasjon [Ashby, J. et al., 1992; Williams, G.M. et al., 1996; Silva L. et al., 2000].

Cellevekstarrest i normale celler settes i gang ved aktivering av p53 og etterfølgende induksjon av p21^{waf1/cip1/sdi1}.

Dette inhiberer cyklin-avhengige kinaser (CDK) [Chang, B.D. et al., 2001; Chang, B.D. et al., 2000] og gir induksjon av vekstinhitorfaktorer [Komarova, E.A. et al., 1998].

Mine resultater viser at behandling med 1% (w/w) HBCD induserer ekspresjon av p53 (figur 6.4.5.1). Da kunne man forvente induksjon av p21^{waf1/cip1/sdi1}.

Resultatene viser at behandling med 1% (w/w) HBCD førte til nedregulering av både p21 og av vekstinhitorfaktorer som GADD153, GADD45a, GADD45b, Igfbp6, Mdm2 og NfkB1.

Dette kan være med på å forklare økningen i levervekt hos villtype balbc mus (tabell 6.1.1).

Det er kjent at nedregulering av ekspresjon av GADD153 og GADD45 forårsaker DNA-skader og nedregulerer kjernefaktoren KB (NF-kB). Dette fører til stopp i cellevekst [Komarova, E.A. et al., 1998].

Induksjon av p21 fører til induksjon av gener som koder for proteiner som inngår i ekstracellulær matriks (ECM) [Chang, B.D. et al., 2000] (figur 6.4.7 og 6.4.7.1).

Behandling med 4 % (w/w) HBCD eller IBP viser også induksjon av både p53 og p21.

Dette fører til at levercellene som blir skadet av behandlingen erstattes. Denne behandlingen gir ingen endring i relativ levervekt (tabell 6.1.1). Levervekttap (tabell 6.1.1) forårsaket av behandling med 4 % (w/w) IBP kan delvis forklares ved at behandlingen ikke fører til induksjon av p53 (figur 6.4.5.1), mens p21 ble noe nedregulert og GADD45b ikke ble uttrykt. Dette kan være forklaring på det ekstreme levervekttapet.

Celleproliferasjon er viktig for vevsregenerasjon. CyclinG samt c-myc spiller en viktig rolle i celleproliferasjon [Hoffman et al.,1998].

Mine resultater viser at behandlingen med HBCD eller IBP fører til induksjon av c-myc (figur 6.3 og 6.3.1), CyclinD1, PCNA og nedregulering av CyclinG1(se figur 6.4.5). Oppregulering av cyclinD1, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) og c-myc etter behandling med HBCD kan være med på å forklare leverregenerering. Nedreguleringen av cyclinD1 som følge av 4 % (w/w) behandling med IBP kan også være med på å forklare det betydelige tap av levervekt. Litteratursøk viste at tilsvarende forsøk med HBCD eller IBP ikke er beskrevet.

7.4.1.5 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener som uttrykkes ved inflammasjon

Forbindelser som skader hepatocytter frembringer en inflammatorisk reaksjon i lever. Kupffer-celler er leverens makrofager og finnes i sinusoider. Ved leverskade aktiveres disse og cellene skiller ut proinflammatoriske cytokiner (IL1, IL6) [Muto, Y. et al., 1988] , TNF α [Hishinuma, Nagakawa et al. 1990; Nagakawa, Hishinuma et al. 1990], aktiv oksygen [Arthur, M.J. et al., 1975] og nitrogenoksid (NO) som ødelegger endotelcellene i sinusoider og i hepatocytter [Zhang, G.L et al., 2002].

Mine resultater viser at behandling med 4 % (w/w) HBCD eller 1% (w/w) IBP induserer en inflammatorisk respons i levercellene (figur 6.4.6). Dette er indikert ved at behandlingen førte til oppregulering av cytokiner (IL-6, IL-18, IL1 α , IL-6) (figur 6.4.6), induserbar nitrogenoksid syntetase (iNOS) og tumor nekrosefaktor beta TNF β [(Wahl, Hunt et al. 1988)]. Behandling med 1% (w/w) HBCD førte til nedregulering av ekspresjon av disse cytokiner samt induserbar nitrogenoksid syntetase (iNOS), mens TNF β oppreguleres.

Det er kjent at IL-6 spiller en viktig rolle i akuttefaseresponsen ved medikamentindusert leverskade og ved leverregenerering [Streetz, K. et al.,2000; (Jones, Lo et al. 2000; Niehof, Streetz et al. 2001)]. Induksjon av IL-1 og TNF stimulerer proteaseproduksjon og følgelig degradasjon av ECM [Chang,BD et al.,2000 ; Yu, Z. et al.,2000 ; Komarova,E.A et al., 1998].

Behandling med 4 % (w/w) IBP førte til nedregulering av cytokiner og TNF. Denne behandlingen synes å hindre cellene i å starte en inflammasjonsrespons. Et slikt fenomen ble også registrert ved behandling av HeLa-celler med benzo(a)pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE) [Yu, Z. et al., 2000].

Behandling med HBCD førte til oppregulering av tumornekrosefaktor (TNF) (figur 6.4.6). Dette viser at behandling med HBCD setter i gang inflammasjonsrespons, mens behandling med IBP nedregulerer ekspresjon av TNF.

Litteratursøk viste at tilsvarende forsøk med HBCD eller IBP ikke er beskrevet.

7.4.1.6 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener som koder for proteiner i ekstracellulær matriks og for adhesjonsmolekyler

Det er kjent at cellenes interaksjon med ekstracellulær matriks (ECM) er viktig for utvikling og funksjon av et organ. Modulering av celle-matriks interaksjoner er mulig pga det unike proteolytiske systemet som hydrolyserer de ulike komponenter i ECM.

Ved å regulere integriteten og komposisjon av ECM, kan cellene regulere vekst, reparere skader og gjenoppbygge vevsstrukturen [(Bostrom, Ravanti et al. 2000; Ekholm, Ravanti et al. 2000; Ravanti and Kahari 2000)]. ECM spiller en viktig rolle i metastasering av kreftceller og i blodhjernebarrieren [Malay,Mandal et al.,2003].

Behandling med 4% (w/w)-HBCD eller IBP førte til oppregulering av ICAM1 (figur 6.4.7.1). Dette kan bl.a. føre til fortykning av blodårene og til vaskulære forstyrrelser som vanligvis er assosiert med alderdom [Li,Z. Et al.,1999]. Behandling med HBCD førte til nedregulering av en rekke gener som koder for kollagenmolekyler (se figur 6.4.7). Slik nedregulering kan føre til misdannelser under bendannelse [Hicks et al., 1996], og kompromittere integriteten av ECM [Ravanti,L et al.,2000].

Behandling med HBCD førte også til oppregulering av Gelatinase A og Serpinh1. Gelatinase A degraderer ECM og hindrer fibroproliferasjon (fibrin deponering). Gelatinase A kan forårsake tetning av arterier (arterosklerose) [Malay,Mandal et.al. 2003].

Behandling med IBP førte til nedregulering av GelatinaseA og Serpinh1.

Behandling med 4% (w/w) HBCD førte til nedregulering av genet som koder for Annexin5 (figur 6.4.7). Dette genet koder for et kalsiumavhengig fosforlipidbindende protein [Kohler et al.,1997] og er en potent inhibitor av protein kinase C aktivitet (PKC) [Dubois et al.,1996].

Annexin5 inhiberer protein kinase ved å binde seg til PKC [Boersma, Liem et al. 2003 ; Dubois et al.,1996]. Som kjent spiller protein kinase C en viktig rolle i fosforylering av andre

proteiner som inngår i viktige signalveier [Nobes and Hall, 1995 ; Hall, 1998]. Litteratursøk viste at tilsvarende forsøk med HBCD eller IBP ikke er beskrevet.

7.4.1.7 Effekter av behandling med HBCD eller IBP på ekspresjon av gener som koder for vekstfaktorer

Transforming growth faktorbeta (TGFb) regulerer bl.a. cellevekst og differensiering [Bonewald, L.F et al.,1990 ; Sporn and Roberts 1988; Sporn and Roberts 1988]. TGFb stimulerer syntese av ekstracellulære matriseproteiner og reseptorer som for eksempel fibronektin, fibronektinreseptor, kollagen og integriner [Massague, J.,1990 ; Anklesaria, Teixido et al. 1990; Boyd, Cheifetz et al. 1990; Cheifetz, Hernandez et al. 1990; Heino and Massague 1990].

Fibronektin er sammen med type I kollagen hovedkomponentene i ECM. Ved veveskader spiller den ekstracellulære matriksen en viktig rolle i helbredelsesprosessen [Massague, J.,1990 ; Wahl, Hunt et al. 1988].

TGFb1 mediert induksjon av fibronektin krever aktivering av Jun N terminal kinase (JNK) [Hocevar, B.A. et al.,1999]. TGFb inhiberer adipogenese og ECM degradasjon [Roberts, A.B. et al., 1988]. TGFb binder seg til reseptorene TGFbR1 og TGFbR2. Ligandbinding til disse kinaseassosierte reseptorer aktiverer og fosforylerer (Smad) som translokteres til kjernen og stimulerer transkripsjon av målgener.

Smad1 og smad3 aktiveres av TGFb mens Smad5 og Smad8 aktiveres av bone morphogenetic proteins (BMP)[Zhang,Y. et al. 1999 ; Yamamoto, N. et al., 1997; Akiyama, Katagiri et al. 1997]. Overekspressjon av Smad1 og Smad5 induserer alkalisk fosfatase- (ALP) og JunB aktivitet [Chaloux, et al.,1998].

Behandling med IBP ser ut til å indusere ekspresjon av Smad1, Smad2, Smad4, TGFb1, TGFb3 (figur 6.4.8.2), BMP1, BMP2 (figur 6.4.8) og BMP3 (figur 6.4.8.1), mens HBCD-behandling fører til nedregulering av disse genene. Litteratursøk viste at tilvarende forsøk med HBCD eller IBP ikke er beskrevet.

7.5 Mikromatriser

7.5.1 Effekter av HBCD-behandling på ekspresjon av gener som kan påvirke apoptose og cellevekst/proliferasjon

Regulering av apoptose spiller en viktig rolle i regenerasjon og karsinogenese av hepatocytter [(Kanda, Takagi et al. 2002)].

Transforming growth faktorbeta1(TGFb1)

Transforming growth faktorbeta1(TGFb1) er en kjent induktor av apoptose i hepatocytter [(Wan, Cai et al. 2000; Lin and Chou 1992]. TGFb undertrykker regenerasjon av hepatocytter og inhiberer DNA-syntese i Hep3B-celler [Imai, Hiramatsu et al. 1997; Imai, Ohta et al. 1997] (figur 6.4.8.2). Det er kjent at albumin inhiberer apoptose enten ved å stimulere cellevekst eller ved å binde seg til den toksiske forbindelsen [(Hsu and Hsu 1998; Hsu, Wu et al. 1998)].

Det kan også tenkes at HBCD ved å binde seg til albumin (tabell 6.5.1) blir utilgjengelig for metabolisme og dermed hindrer ALB1 levercellene i å gå i apoptose. Dette kan delvis forklare den observerte hepatomegali (tabell 6.1.1; 6.2.2 ; 6.2.3).

Oppregulering av cytochrome P450, subfamily IIE (ethanol-inducible) og polypeptide1(CYP2E1) (figur 6.5.2) i hepatocytter fører til c-Jun-mediert celledød [Am J Physiol Gastrointest Liverphysiol 282:G257-G266, 2000].

Cytokrom P450 2e gruppen (cyp2e1)

CYP2E1 medierer oksidativ metabolisme av en mengde endogene og fremmede forbindelser [Gonzalez, F.J. et al.,1988] som for eksempel etanol [Koop,D.R. et al., 1982; Lieber, C. et al.,1997]. CYP2E1 har NADPH oksidaseaktivitet som i fravær av substrat resulterer i økt produksjon av superoksid og hydrogenperoksid [(Hakkola, Hu et al. 2003)]. Oksidativt-stress mediert overekspressjon av CYP2E1 fører til leverskader [(Leclercq, Farrell et al. 2000)]. Hos villtype CD-1 mus førte behandling med HBCD til at museleverne viste tegn til skader. Ved uttak av lever etter avlivning kunne vi observere hvite felter på leveren, med en konsistens som indikerte fett. Dette ligner på leverskader påført etter langvarig etanolkonsum (lipidose).

Åpning av den mitokondriell permeabilitet transisjonspore (MPTP) forårsaker hepatocyt apoptose [Zamzami,N et al.,1996; Green, DR et al., 1998]. Vanligvis er poren stengt og dette signaliserer celleoverlevelse. Proapoptotiske, pronekrotiske signaler eller økning av cytosolisk Ca^{2+} -konsentrasjon kan åpne poren [Qian,T. et al.,1999; Bellomo,G.et al., 1985]. MPTP åpning fører til matriksutvidelse, sammenbrudd av ytre membran i mitokondriene og dermed lekkasje av cytokrom c til cytosol [Qian,T. et al.,1999; Lemasters, J. Et al.,1999]. I cytosol fører cytokrom c i samarbeid med apoptotisk protease aktiveringsfaktor1 (Apaf-1) og 2-deoksyadenosin 5'-trifosfat(dATP) til aktivering av kaspaser og dermed apoptose [Qian,T. et al.,1999; Lemasters, J. Et al.,1999].

Cytokrom P450 3a gruppen (cyp3A11)

Det er kjent at hepatotoksiner som metaboliseres av CYP3A , biotransformeres til reaktive metabolitter som oksiderer cellulære thiol, øker cytosolisk Ca^{2+} -konsentrasjon og åpner MPTP [Bruno, M. et al., 1998].

Behandling med HBCD fører til oppregulering av ekspresjon av CYP3A11 hos villtypemus (figur 6.5.2) (tabell 6.2.2). Hos PPAR- α knockoutmus ser vi ikke tilstrekkelig induksjon av CYP3A11-genet pga at PPAR- α genet er slått av (figur 6.5.2).

Flermettede fettsyrer kan reagere med frie radikaler og starte lipidperoksidasjon (LPO) med påfølgende syntese av reaktive metabolitter/intermediater. Disse kan i sin tur spaltes til potensielle toksiske forbindelser som alkener, aldehyder, ketoner og hydrokso-syrer [Estebauer,H et al., 1991]. Lipidaldehyder kan være cytotoxiske i små mengder fordi disse danner konjugater med GSH og oksideres av aldehyd dehydrogenaser (ALDH) klasse 1 og 3 [(Lindahl, Roper et al. 1978; Lindahl 1980; Harvey and Lindahl 1982; Lin and Lindahl 1987; Lindahl and Petersen 1991); (Lindahl 1992) ;K.D. Bunting, KD et al.,1998].

Aldehyd dehydrogenaser (ALDH) klasse 1 og 3

ALDH1a1 fungerer som detoksifiserende/avgiftende enzym som oksiderer middelstore lipidaldehyder og beskytter cellene mot GSH uttømming, protein alkylering, inhibering av cellevekst, cytotoksitet og apoptose [A.J. Townsend et al., 2001].

Katalase (Cat)

Katalase (Cat) er et hemoprotein antioksidantenzym og bruker H_2O_2 både som substrat og elektronreseptor [Corral et al., 1974]. Det er kjent at det dannes H_2O_2 under peroksisomal β -oksidasjon [Hovik, Brodal et al. 1991; Osmundsen, Bremer et al. 1991].

Hydrogenperoksid er en kjent tumorpromotor i leverceller [(Huang, Peng et al. 1999)] og kan inducere ekspresjon av tidlig responsgener som *c-Fos*, *c-Jun*, *c-myc* og *Egr1* [(Huang, Peng et al. 1999)].

Effektene av H_2O_2 i tumorpromosjon inhiberes av antioksidanter som enzymet katalase. Forbindelser som fører til økt produksjon av H_2O_2 er bl.a. 2,3,7,8-tetraklorodibenz-p-dioksin (TCDD) [(Stohs, Hassan et al. 1983; Stohs, Al-Bayati et al. 1986; Stohs 1990)], okadasyre (OA) [(Schmidt, Traenckner et al. 1995)] og peroksisomale proliferatorer [(Goel, Lalwani et al. 1986; Rao, Subbarao et al. 1986)].

Behandling med HBCD førte til oppregulering av ekspresjon av katalase (Cat) i villtypemus mens hos PPAR- α knockoutmus ser vi ikke tilstrekkelig induksjon av Cat-genet pga at PPAR- α -genet er slått av (figur 6.5.1 og tabell 6.7.1 ; 6.7.2).

Dette tyder på at forsvar mot hydrogenperoksid er noe redusert hos transgene mus og er med på å forklare den høye dødelighetsraten hos PPAR- α knockoutmus (tabell 6.8 og 6.8.1).

Catepsin L (Ctsl)

Catepsin L (Ctsl) er en lysosomal cystein-proteinase [Fuchs, R. et al., 1989 ; Kirchke, H. et al., 1987]. Catepsiner uttrykkes i flere vev og oppreguleres lokalt ved inflammasjonsstedet [Chapman, H.A., et al., 1997]. Ctsl degraderer proteiner i lysosomer , kontrollerer morfogenese, differensiasjon av hudceller, svette- og talgkjertler. Catepsiner er også viktig for ECM remodelering [Chapman, H.A., et al., 1997 ; Gelb, B.D. et al., 1996]. Ubalanse i ekspresjon av catepsiner og dets inhibitorer kan forårsake svulstutvikling [Calkins, C.C. et al., 1995]. Behandling med HBCD førte til betydelig oppregulering av Ctsl hos villtypemus, men ingen endring i ekspresjon ble funnet hos PPAR- α knockoutmus (figur 6.5.1).

Retinoid interferon (IFN)-indusert mortalitet (GRIM 19)

Retinoid interferon (IFN)-indusert mortalitet (GRIM 19) er et kjerneprotein som induseres av IFN/RA system. Interferoner (IFN) regulerer den antivirale, antitumor og immune responsen [(Angell, Lindner et al. 2000; Chidambaram, Angell et al. 2000)].

Disse regulerer bl.a. signal transducing activators of transkripsjonsproteiner (STAT).

Retinsyre (RA) som er et metabolit/mellomprodukt av vitamin A metabolismen påvirker cellevekst, differensiering og metabolisme [Love, J.M. et al. 1994].

Overekspressjon av GRIM19 fremmer celledød [John E. Angell et al. 2000].

HBCD behandling førte til oppregulering av GRIM 19 hos villtypemus og nedregulering hos PPAR- α knockoutmus (figur 6.5.1.1). Nedregulering av GRIM19 promoterer cellevekst [John E. Angell et al. 2000]. Dette kan delvis forklare den høye levervekst observert hos transgene (PPAR- α knockout) hunnmus etter behandling med 300mg/kg kv HBCD behandling (tabell 6.2.3).

Ornitin dekarboksylase (ODC)

Ornitin dekarboksylase (ODC) konverterer L-ornitin til putrescin [(Pegg, Shantz et al. 1995); (Li, Law et al. 1999)]. Dette er et meget viktig steg i produksjon av polyaminer som er essensielle for celledeling. Hormoner , tumor promotorer og vekstfaktorer induserer ODC. Induksjonen av enzymet fremmer cellevekst og proliferasjon [Davis et al. 1992 ; Shantz , Pegg 1999]. Når cellene utsettes for oksidativt stress induseres også ODC av protein kinase C (PKC) [Otieno & Kensler 2000].

ODC-aktivitet inhiberes av antizym ODC (Oaz1) [(Ivanov, Gesteland et al. 1998); (Feith, Shantz et al. 2001; Shantz, Feith et al. 2001)]. Oaz1 merker også ODC og Smad1 for degradasjon [(Murakami, Matsufuji et al. 2000), Gruendler et al. 2001]. Merking av ODC regulerer derfor polyaminmetabolismen [Sakata,K et al. 2000]. Som nevnt, medierer Smad proteinene, signalene induserte fra transforming growth factor β (TGF β) (figur 6.4.8.2). Denne er involvert i celleproliferasjon, differensiasjon og apoptose [Itoh et al. 1999]. ODC antizym reguleres av polyamin konsentrasjon i cellene ved såkalt programmert ribosomal frameshifting [(Ichiba, Matsufuji et al. 1995)].

Behandling med HBCD førte til oppregulering av Oaz1 og Otc (figur 6.5.1.1). Det kan tenkes at HBCD promoterer induksjon av disse enzymene hos de behandlede mus fordi vi kan utelukke induksjon av TGF β og Smad (figur 6.4.8.2).

Serin protease inhibitor (Serpin)

Serin protease inhibitor (Serpin) regulerer en rekke serin- og cysteinproteinaser. Proteinaser deltar i flere biologiske prosesser som fibrinolyse, blodkoagulering, inflammasjon, cellemobilitet, differensiering og apoptose [Askew, Y et al., 2001]. Serpin1 (antithrombin III) ble oppregulert hos villtype og transgene mus (figur 6.5.1.1).

Frie radikaler og andre reaktive oksygen- og nitrogenforbindelser dannes som et resultat av normal oksidativ metabolisme eller ved eksponering til fremmedforbindelser. Hvis antioksidantforsvaret ikke er adekvat, kan ikke reaktive molekyler elimineres eller nøytraliseres av antioksidanter. Dette medfører skader på lipidmembraner, lipoproteiner, signalmekanismer og RNA eller DNA. Når oksidative skader akkumuleres kaller vi tilstanden oksidativt stress [McCord, J.M., 2000; Halliwell, B. 1996].

Superoksid dismutase (SOD)

Superoksid dismutase er et metalloenzym som forsvarer cellene mot toksiske superoksidradikaler ved å katalysere følgende reaksjon: $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ [Fridovich, I., 1997 ; Elstner, E.F., 1991]. Hydrogenperoksid metaboliseres videre av katalase eller glutation peroksidase.

Studier med SOD-knockoutmus viser at musene har en normal utvikling, men er mer utsatt for toksiske effekter av O_2 [Carlsson, L.M. et al., 1995].

Behandling med HBCD førte til oppregulering av Cu-Zn superoksid dismutase (SOD1) hos villtypemus og hos PPAR- α knockotmus (figur 6.5.1.1).

Disse resultatene er tilsynelatende motstridende med resultatene fra membranmatrisene (figur 6.4.2). Forklaringen kan være at det ble brukt lever fra mus som ble HBCD-kostbehandlet i tre dager til membranmatrisene, mens det ble benyttet lever fra mus injisert med HBCD daglig i.p. i 10 dager til mikromatrisene.

Membranmatriseresultatene tyder at HBCD-behandling fører til nedregulering av ekspresjon av SOD1 og SOD2 i de tre første dagene etter behandling. Mikromatrisene viser at etter lengre eksponering blir det restitusjon og påfølgende induksjon av ekspresjonen.

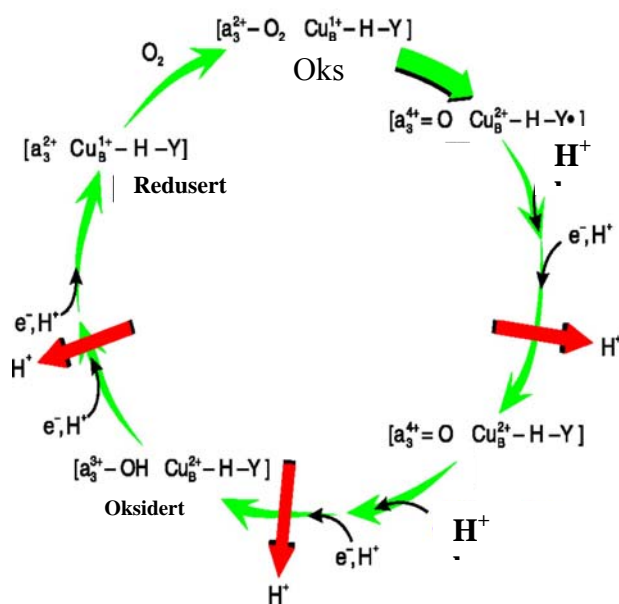
Inter- α -Trypsin inhibitor (Itih)

Inter- α -Trypsin inhibitor (Itih) (figur 6.5.1.1) er et glykoprotein implisert i stabilisering av ECM [Huang et al., 1993] og inhibisjon av apoptose [Hill et al. 1998; Stahler et al. 1998]. Transkripsjon av Itih reguleres av interleukin-6 (IL-6) [Piniero et al. 1999; Sarafan et al. 1995; Koj et al. 1993 ; (Kordula, Dubin et al. 1993)]. Glykoproteinet uttrykkes rikelig i leveren og binder seg kovalent til hyaluronsyre (HA) [Zhao et al., 1995]. HA er et av hovedkomponentene i ECM [Laurent et al., 1992 ; Edelstam, Laurent et al. 1992 ; Alston-Smith, Pertoft et al. 1992]. Dette glykoprotein deltar i spredning av svulster og arthrititis [Kobayashi,H. et al. 1995; Hutadilok et al. 1998]. HI130 som er en underenhet i Itih er nær beslektet med epidermalvekstfaktor (EGF) [Schreitmuller et al., 1987]. Vekstfaktorer og cytokiner spiller en viktig rolle i regenerering av leverceller [Michalopoulos et al., 1997]. Aktivering av NF- κ B og STA3, induserer ekspresjon av *c-myc*, *JunB* og *cFos*. Dette setter i gang celleproliferasjon og erstatning av skadede leverceller [Leu et al. 2001; Taub et al. 1996]. I humane hepatocytter inhiberer Itih elastase, acrosin, cathepsin, plasmin og chymotripsin [Aubry et al., 1997] og står for ca 5 % av total antiproteaseaktivitet i lever [Steinbuch, 1976]. Behandling med HBCD førte til oppregulering av Itih2 og Itih4 hos villtype- og PPAR- α knockoutmus (figur 6.5.1.1) til tross for at resultatene fra membranmatrisene viser en nedregulering av ekspresjon av IL-6 (figur 6.4.6). Dette tyder på at det finnes andre reguleringsmekanismer for transkripsjon av Itih enn IL-6, fordi ekspresjon av kollagen blir stort sett nedregulert av behandling (figur 6.4.7). Litteratursøk viste at tilsvarende forsøk med HBCD eller IBP ikke er beskrevet.

7.5.1.1 Effekter av HBCD behandling på ekspresjon av gener som koder for proteiner i cytokrom oksidasekompleks i muselever

Cytokrom oksidaser (COX) er proteiner som overfører elektroner og protoner til O₂ og danner vann (se figur 7.5.1.1) [Jasaitis et al. 2000; Dzhagarov, Belyanovich et al. 2000; Jasaitis, Borisov et al. 2000; Azarkina, Borisov et al. 1997; Capitano, Vygodina et al. 1997; Konstantinov, Siletsky et al. 1997; Vygodina, Capitano et al. 1997]. Cytokrom oksidase (COX) utgjør kompleks IV i respirasjonskjeden [(Babcock, Varotsis et al. 1992; Babcock and Wikstrom 1992), Gerald T. (1999); Saraste, M., et al.,1991 ; García-Horsman, J. A.,et al.,

1994]. Kompleks IV er også en redoksdrevet protonpumpe og derfor essensiell for oksidativ fosforylering [Babcock, G. T. et al., 1992].



Figur 7.5.1.1 Reduksjon av O_2 ved Cytokrom c oksidase.
Babcock, Gerald T. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 12971-12973

Behandling med HBCD førte til oppregulering av ekspresjon av flere av komponentene i kompleks IV hos villtypemus (tabell 6.5.3). Hos PPAR- α knockoutmus ser vi ikke tilstrekkelig induksjon av disse komponentene pga at PPAR- α -genet er slått av (tabell 6.5.3). Ekspresjon av cytokrom oksidasekomplekset påvirker energiomsetningen i levercellene og transgene mus er ikke i stand til å etterkomme de økte energikravene etter behandling med HBCD.

Sammen med lav ekspresjon av Cyp 450, kan dette forklare den store dødelighet observert blant transgene mus. Villtypemus behandlet med HBCD i tre dager viser en sterk nedregulering av *cox7a2* (figur 6.4.7). Ti dagers behandling med HBCD fører til økt ekspresjon av dette genet hos villtype musene (se tabell 6.5.3). Vi kan se at ATP syntetase (*Atp5k*) oppreguleres hos villtypemus, mens hos PPAR- α knockoutmus ser vi ikke tilstrekkelig induksjon av *Atp5k* pga at PPAR- α -genet er slått av (tabell 6.5.3).

7.5.1.2 Effekter av HBCD-behandling på ekspresjon av P450 i muselever

P450 er hemthiolatproteiner, men kalles også b-type cytokromer [Nomenclature of electron-transfer proteins. Recommendations 1989. Eur. J. Biochem. 200, 599-611].

Cytokrom P450 2 c gruppen (Cyp2c)

Cytokrom P450 2 c gruppen (Cyp2c) (figur 6.5.2) er viktig for metabolisme av xenobiotika i lever og er kjent for å metabolisere bl.a. arakidonsyre i lever [(Tsao, Foley et al. 2000)] og i tarm [Tsao, Foley et al. 2000 ; Kaminsky, LS et al., 1992] (se også punkt 7.2.2).

Cyp P450 2 d gruppen (cyp2d9)

Det er kjent at Cyp P450 2 d gruppen (cyp2d9) er implisert i oksidasjon av testosteron (figur 6.5.2) [Wong et al., 1989], metabolisme av β -blokkere og antidepressiva [Masubuchi et al., 1995; Masubuchi, Narimatsu et al. 1994 ; Suzuki et al., 1992].

Cytokrom P450 2e gruppen (cyp2e1)

Cytokrom P450 2e gruppen (cyp2e1) (figur 6.5.2) konverterer sine substrater til karsinogene metaboliter (epoksider) og medierer dannelse av GSH konjugater [Premdas et al. 2000; Ekstrom and Ingelman-Sundberg 1984; Ekstrom and Ingelman-Sundberg 1989; Ekstrom, von Bahr et al. 1989; Mosialou, Ekstrom et al. 1993].

Disse spiller også en viktig rolle i leversykdomer som steatohepatit/steatose [Ludwig, J. et al. 1980; Matteoni, C.A. et al. 1999].

Cyp2e1 (figur 6.5.2) stimulerer lipidperoksidasjon og initierer oksidativt stress [Lieber, C.S. et al., 1997; Yang, S.Q. et al., 1997].

Cytokrom P450 3a gruppen (cyp3a16 og cyp3a11)

Det er kjent at overekspresjon av cyp3a16 (figur 6.5.2) er assosiert med diabetes eller insulin resistens [Leiter et al., 1998]. Mengde frie fettsyrer i serum påvirker ekspresjon av bl.a. dette enzymet [Masuzaki et al. 2001; Khan et al. 2000].

Cyp3a11 (figur 6.5.2) er beskrevet under punktet 7.4.1.1. Ekspresjon av disse cyp enzymene er PPAR- α avhengige.

Behandling med HBCD førte til oppregulering av ekspresjon av overnevnte cyp enzymer (figur 6.5.2) hos villtypemus, men hos PPAR- α knockoutmus ser vi ikke tilstrekkelig induksjon av disse enzymene pga at PPAR- α -genet er slått av. Dette kan være med på å forklare den store dødeligheten blant PPAR- α knockoutmus i forhold til villtypemus (tabell 6.8.1 og 6.8.2).

7.6 PPAR- α -regulering av genekspresjon

Peroksisomproliferator-aktivert-reseptor består av fire subtyper: PPAR- α , PPAR- δ (hNUC), PPAR- β (FAAR), PPAR- γ . Subtypene kodes av forskjellige gener [Schoonjans, K. et al. 1997].

Ekspresjon av PPAR- α reguleres av fettsyrer og fettsyremetabolitter [Schoonjans, K. et al. 1997]. PPAR regulerer transkripsjon ved å binde seg til Retinoid X reseptor (RXR). Dette komplekset binder seg til spesifikke DNA responselementer de såkalte peroksisom proliferator respons elementer (PPRE) i genpromotorer og fungerer som ligandaktivert-transkripsjonsfaktor [Gearing et al. 1993]. Etter ligandbinding gjennomgår PPAR- α konformasjonsendringer og rekrutterer en eller flere koaktivatorer som for eksempel steroid reseptor koaktivator1 (SRC1) som er en kjerne reseptor-koregulator.

Dette resulterer i induksjon av transkripsjon av RNA [McInerney, Rose et al. 1998 ; DiRenzo, J. Et al., 1997].

PPAR- α uttrykkes i lever, nyre, hjerte og musklene og regulerer ekspresjon av gener implisert i lipidmetabolisme bl.a. β -oksidasjon [Schoonjans, K. et al., 1997].

Det er kjent at forbindelser som Wy-14,643 og klofibrat er peroksisomproliferatorer og binder seg til PPAR- α [Krey, G. et al., 1997 ; Zhu, Y. et al., 1996]. Fettsyrer β -oksideres i mitokondrier og i peroksisomer [Lazarow, et al., 1981].

Enzymene som er implisert i β -oksidasjon induseres av peroksisomale proliferatorer [Jia, Qi et al. 2003; Bartles, Khuon et al. 1990 ; Reddy, J.K. et al. 1975]. Lange fettsyrer kan også metaboliseres av mikrosomale CYP4A1 og CYP4A3 fettsyre- ω -oksidaser til dikarboksyf-fettsyrer. Disse kan metaboliseres videre via β -oksidasjon [Muerhof, A.S. et al. 1992 ; Kimura, S. et al. 1989].

Studier utført med PPAR- α og-/eller acyl-CoA oksidase (AOX) knockoutmus viste at PPAR- α spiller en viktig rolle i induksjon av CYP4A og dermed utvikling av steatose i AOX-knockoutmus [Takashi, H. et al. 1999].

PPAR- α og acyl-CoA oksidase (AOX) knockoutmus viste fravær av peroksisomal proliferasjon, steatose og celleproliferasjon i leveren [Fan, C. et al., 1998].

AOX-knockoutmus viste derimot utvikling av steatose fulgt av hepatocytregenerasjon (fornyelse) og spontan peroksisomal proliferasjon [Hashimoto, T. et al., 1999 ; Fan, C. et al., 1998]. Flere gener som koder for peroksisomale, mikrosomale og mitokondrielle proteiner ble oppregulert hos disse musene [Fan, C. et al., 1998].

PPAR- α er også kjent for å mediere antiinflammatoriske aktiviteter [Vanden Berghe, Vermeulen et al. 2003 ; Ricote, M. et al. 1998 ; Jiang, C.A. et al. 1998].

Det er kjent av PPAR- α knockoutmus viser en langvarig inflammasjonsrespons når de behandles med leukotriener [Vanden Berghe, Vermeulen et al. 2003, Devchand, P.R. et al., 1996], noe som tyder på at PPAR- α [Niino, M. et al., 2001] og PPAR- α ligander [Cunard, R. et al., 2002 ; Devchand, P.R. et al., 1996] besitter antiinflammatoriske egenskaper. Disse ligander inhiberer ekspresjon av cytokin aktivert IL-6, VCAM og syklooksygenase [Delerive, P. et al. 1999; Marx, N. et al. 1999], Nf κ B og IL-12 [Spencer, N. et al., 1997].

Det er også kjent at PPAR- α induserer apoptose i makrofagene [Giulia, C. et al., 1998].

Effekter av behandling med HBCD eller IBP på mRNA nivå av PPAR- α er beskrevet under punkt 7.2.1.2.

Konklusjon

Behandling med HBCD eller IBP forårsaker et vidt spekter av cellulære endringer.

Behandling endrer ekspresjon av gener som koder for stressproteiner, cytoskjelettkomponenter, ekstracellulære matriksproteiner en del tidlige respons gener og gener som koder for proteiner implisert i cellyklus, apoptose og inflammatorisk respons.

RT-PCR, membranmatrise- og mikromatrisestudiet viser rimelig samsvar mellom resultatene.

Mikromatiseresultatene viser at ekspresjon av fase I- (cyp P450) og fase II-enzym, samt ekspresjon av gener som koder for proteiner som utgjør kompleks IV i respirasjonkjeden, er PPAR- α avhengig.

Referanser

1. Adimoolam, S. and J. M. Ford (2003). "p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair." *DNA Repair (Amst)* 2(9): 947-54.
2. Akiyama, S., T. Katagiri, et al. (1997). "Constitutively active BMP type I receptors transduce BMP-2 signals without the ligand in C2C12 myoblasts." *Exp Cell Res* 235(2): 362-9.
3. Alam, J., D. Stewart, et al. (1999). "Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene." *J Biol Chem* 274(37): 26071-8.
4. Alston-Smith, J., H. Pertoft, et al. (1992). "Endocytosis of hyaluronan in rat Kupffer cells." *Biochem J* 286 (Pt 2): 519-26.
5. Amundson, S. A., M. Bittner, et al. (1999). "Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses." *Oncogene* 18(24): 3666-72.
6. Amundson, S. A., K. T. Do, et al. (1999). "Induction of stress genes by low doses of gamma rays." *Radiat Res* 152(3): 225-31.
7. Angel, P. and M. Karin (1991). "The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation." *Biochim Biophys Acta* 1072(2-3): 129-57.
8. Angell, J. E., D. J. Lindner, et al. (2000). "Identification of GRIM-19, a novel cell death-regulatory gene induced by the interferon-beta and retinoic acid combination, using a genetic approach." *J Biol Chem* 275(43): 33416-26.
9. Anklesaria, P., J. Teixeira, et al. (1990). "Cell-cell adhesion mediated by binding of membrane-anchored transforming growth factor alpha to epidermal growth factor receptors promotes cell proliferation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(9): 3289-93.
10. Arthur, D. S., A. K. Mathur, et al. (1975). "The effect of artificial ventilation on functional residual capacity and arterial oxygenation. II. Comparison of spontaneous respiration and artificial ventilation at similar arterial carbon dioxide tensions, tidal volumes and inspiratory gas flow rates." *Can Anaesth Soc J* 22(4): 432-5.
11. Ashby, J. (1992). "Consideration of CASE predictions of genotoxic carcinogenesis for omeprazole, methapyrilene and azathioprine." *Mutat Res* 272(1): 1-7.
12. Ashby, J. (1992). "Prediction of non-genotoxic carcinogenesis." *Toxicol Lett* 64-65 Spec No: 605-12.
13. Ashby, J. (1992). "Use of short-term tests in determining the genotoxicity or nongenotoxicity of chemicals." *IARC Sci Publ*(116): 135-64.
14. Askew, Y. S., S. C. Pak, et al. (2001). "SERPINB12 is a novel member of the human ov-serpin family that is widely expressed and inhibits trypsin-like serine proteinases." *J Biol Chem* 276(52): 49320-30.
15. Aubry, M. and J. Bieth (1976). "A kinetic study of the inhibition of human and bovine trypsins and chymotrypsins by the inter-alpha-inhibitor from human plasma." *Biochim Biophys Acta* 438(1): 221-30.
16. Azarkina, N., V. Borisov, et al. (1997). "Spontaneous spectral changes of the reduced cytochrome bd." *FEBS Lett* 416(2): 171-4.
17. Babcock, G. T., C. Varotsis, et al. (1992). "O₂ activation in cytochrome oxidase and in other heme proteins." *Biochim Biophys Acta* 1101(2): 192-4.
18. Babcock, G. T., C. Varotsis, et al. (1992). "O₂ activation in cytochrome oxidase and in other heme proteins." *Biochim Biophys Acta* 1101(2): 192-4.
19. Babcock, G. T. and M. Wikstrom (1992). "Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration." *Nature* 356(6367): 301-9.
20. Babcock, G. T. and M. Wikstrom (1992). "Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration." *Nature* 356(6367): 301-9.
21. Bartles, J. R., S. Khuon, et al. (1990). "Peroxisome proliferator-induced alterations in the expression and modification of rat hepatocyte plasma membrane proteins." *Cancer Res* 50(3): 669-76.
22. Beckman, J. S. (1991). "The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury." *J Dev Physiol* 15(1): 53-9.
23. Bellomo, G., P. L. Nicotera, et al. (1985). "Insulin degradation in human erythrocyte: effects of cations." *Acta Diabetol Lat* 22(1): 63-9.
24. Berger, J., M. D. Leibowitz, et al. (1999). "Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects." *J Biol Chem* 274(10): 6718-25.
25. Birnbaum, Linda S. et al. (2004). "Brominated flame retardants: Cause of Concern?." *Environmental Health Perspectives* vol. 112 nr.1: 9-17.
26. Blackburn, E. (1999). "The telomere and telomerase: how Do they interact?" *Mt Sinai J Med* 66(5-6): 292-300.
27. Blackburn, R. V., D. R. Spitz, et al. (1999). "Metabolic oxidative stress activates signal transduction and gene expression during glucose deprivation in human tumor cells." *Free Radic Biol Med* 26(3-4): 419-30.

28. Boeker, K. H. (2001). "Treatment of acute liver failure." *Metab Brain Dis* 16(1-2): 103-17.
29. Boersma, H. H., I. H. Liem, et al. (2003). "Comparison between human pharmacokinetics and imaging properties of two conjugation methods for ^{99m}Tc-annexin A5." *Br J Radiol* 76(908): 553-60.
30. Boer de J. et al. (1999). "Developments in the use of chromatographic techniques in marine laboratories for the determination of halogenated contaminants and polycyclic aromatic hydrocarbons, 1000: 223-251
31. Bonewald, L. F., Z. Schwartz, et al. (1990). "Stimulation of plasma membrane and matrix vesicle enzyme activity by transforming growth factor-beta in osteosarcoma cell cultures." *J Cell Physiol* 145(2): 200-6.
32. Bostrom, P. J., L. Ravanti, et al. (2000). "Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in transitional-cell carcinoma of the urinary bladder." *Int J Cancer* 88(3): 417-23.
33. Bouchard, C., P. Staller, et al. (1998). "Control of cell proliferation by Myc." *Trends Cell Biol* 8(5): 202-6.
34. Boyd, F. T., S. Cheifetz, et al. (1990). "Transforming growth factor-beta receptors and binding proteoglycans." *J Cell Sci Suppl* 13: 131-8.
35. Brent, J. A. and B. H. Rumack (1993). "Role of free radicals in toxic hepatic injury. I. Free radical biochemistry." *J Toxicol Clin Toxicol* 31(1): 139-71.
36. Brent, J. A. and B. H. Rumack (1993). "Role of free radicals in toxic hepatic injury. II. Are free radicals the cause of toxin-induced liver injury?" *J Toxicol Clin Toxicol* 31(1): 173-96.
37. Bruno, M. K., E. A. Khairallah, et al. (1998). "Inhibition of protein phosphatase activity and changes in protein phosphorylation following acetaminophen exposure in cultured mouse hepatocytes." *Toxicol Appl Pharmacol* 153(1): 119-32.
38. Bulera, S. J., S. M. Eddy, et al. (2001). "RNA expression in the early characterization of hepatotoxicants in Wistar rats by high-density DNA microarrays." *Hepatology* 33(5): 1239-58.
39. Bunting, K. D. and A. J. Townsend (1998). "Dependence of aldehyde dehydrogenase-mediated oxazaphosphorine resistance on soluble thiols: importance of thiol interactions with the secondary metabolite acrolein." *Biochem Pharmacol* 56(1): 31-9.
40. Burczynski, M. E., H. K. Lin, et al. (1999). "Isoform-specific induction of a human aldo-keto reductase by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), electrophiles, and oxidative stress: implications for the alternative pathway of PAH activation catalyzed by human dihydrodiol dehydrogenase." *Cancer Res* 59(3): 607-14.
41. Burczynski, M. E., G. R. Sridhar, et al. (2001). "The reactive oxygen species--and Michael acceptor--inducible human aldo-keto reductase AKR1C1 reduces the alpha,beta-unsaturated aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal to 1,4-dihydroxy-2-nonenal." *J Biol Chem* 276(4): 2890-7.
42. Burgin, A., C. Bouchard, et al. (1998). "Control of cell proliferation by Myc proteins." *Results Probl Cell Differ* 22: 181-97.
43. Calkins, C. C. and B. F. Sloane (1995). "Mammalian cysteine protease inhibitors: biochemical properties and possible roles in tumor progression." *Biol Chem Hoppe Seyler* 376(2): 71-80.
44. Campisi, J. (2000). "Cancer, aging and cellular senescence." *In Vivo* 14(1): 183-8.
45. Capdevila, J. H., J. R. Falck, et al. (1992). "Cytochrome P450 and the arachidonate cascade." *Faseb J* 6(2): 731-6.
46. Capitano, N., T. V. Vygodina, et al. (1997). "Redox-linked protolytic reactions in soluble cytochrome-c oxidase from beef-heart mitochondria: redox Bohr effects." *Biochim Biophys Acta* 1318(1-2): 255-65.
47. Carlsson, L. M., J. Jonsson, et al. (1995). "Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(14): 6264-8.
48. Cascales, M., P. Martin-Sanz, et al. (1991). "Alterations in hepatic peroxidation mechanisms in thioacetamide-induced tumors in rats. Effect of a rhodium(III) complex." *Carcinogenesis* 12(2): 233-40.
49. Chalaux, E., T. Lopez-Rovira, et al. (1998). "JunB is involved in the inhibition of myogenic differentiation by bone morphogenetic protein-2." *J Biol Chem* 273(1): 537-43.
50. Chang, B. D., E. V. Broude, et al. (2000). "p21Waf1/Cip1/Sdi1-induced growth arrest is associated with depletion of mitosis-control proteins and leads to abnormal mitosis and endoreduplication in recovering cells." *Oncogene* 19(17): 2165-70.
51. Chang, B. D., M. E. Swift, et al. (2002). "Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(1): 389-94.
52. Chang, B. D., K. Watanabe, et al. (2000). "Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(8): 4291-6.
53. Chapman, H. A., R. J. Riese, et al. (1997). "Emerging roles for cysteine proteases in human biology." *Annu Rev Physiol* 59: 63-88.
54. Chawla, A., J. J. Repa, et al. (2001). "Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files." *Science* 294(5548): 1866-70.
55. Cheifetz, S., H. Hernandez, et al. (1990). "Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms." *J Biol Chem* 265(33): 20533-8.

56. Chernova, O. B., M. V. Chernov, et al. (1998). "MYC abrogates p53-mediated cell cycle arrest in N-(phosphonacetyl)-L-aspartate-treated cells, permitting CAD gene amplification." *Mol Cell Biol* 18(1): 536-45.
57. Chidambaram, N. V., J. E. Angell, et al. (2000). "Chromosomal localization of human GRIM-19, a novel IFN-beta and retinoic acid-activated regulator of cell death." *J Interferon Cytokine Res* 20(7): 661-5.
58. Chinetti, G., S. Griglio, et al. (1998). "Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages." *J Biol Chem* 273(40): 25573-80.
59. Clarke, S. D., P. Thuillier, et al. (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptors: a family of lipid-activated transcription factors." *Am J Clin Nutr* 70(4): 566-71.
60. Cunard, R., D. DiCamillo, et al. (2002). "WY14,643, a PPAR alpha ligand, has profound effects on immune responses in vivo." *J Immunol* 169(12): 6806-12.
61. Cunard, R., M. Ricote, et al. (2002). "Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors." *J Immunol* 168(6): 2795-802.
62. Dalkara, T., M. Endres, et al. (1998). "Mechanisms of NO neurotoxicity." *Prog Brain Res* 118: 231-9.
63. Davis, G. E. (1992). "Affinity of integrins for damaged extracellular matrix: alpha v beta 3 binds to denatured collagen type I through RGD sites." *Biochem Biophys Res Commun* 182(3): 1025-31.
64. Davis, R. H., D. R. Morris, et al. (1992). "Sequestered end products and enzyme regulation: the case of ornithine decarboxylase." *Microbiol Rev* 56(2): 280-90.
65. Delerive, P., K. De Bosscher, et al. (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1." *J Biol Chem* 274(45): 32048-54.
66. Delerive, P., F. Martin-Nizard, et al. (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway." *Circ Res* 85(5): 394-402.
67. Deshmukh, M. (1998). "Caspases in ischaemic brain injury and neurodegenerative disease." *Apoptosis* 3(6): 387-94.
68. Devchand, P. R., H. Keller, et al. (1996). "The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control." *Nature* 384(6604): 39-43.
69. Dhakshinamoorthy, S. and A. K. Jaiswal (2001). "Functional characterization and role of INrf2 in antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene." *Oncogene* 20(29): 3906-17.
70. Di Leonardo, A., S. P. Linke, et al. (1994). "DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts." *Genes Dev* 8(21): 2540-51.
71. DiRenzo, J., M. Soderstrom, et al. (1997). "Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors." *Mol Cell Biol* 17(4): 2166-76.
72. Dohr, O., R. Sinning, et al. (1997). "Effect of transforming growth factor-beta1 on expression of aryl hydrocarbon receptor and genes of Ah gene battery: clues for independent down-regulation in A549 cells." *Mol Pharmacol* 51(5): 703-10.
73. Donadelli, R., L. Benatti, et al. (1998). "Identification of a novel gene--SSK1--in human endothelial cells exposed to shear stress." *Biochem Biophys Res Commun* 246(3): 881-7.
74. Dubois, M., I. De Waziers, et al. (1996). "P450 induction by Aroclor 1254 and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in cultured hepatocytes from rat, quail and man: interspecies comparison." *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 113(1): 51-9.
75. Dubois, M., H. Plaisance, et al. (1996). "Hierarchical cluster analysis of environmental pollutants through P450 induction in cultured hepatic cells." *Ecotoxicol Environ Saf* 34(3): 205-15.
76. Dubois, T., J. P. Oudinet, et al. (1996). "Annexins and protein kinases C." *Biochim Biophys Acta* 1313(3): 290-4.
77. Duffy, S., A. So, et al. (1998). "Activation of endogenous antioxidant defenses in neuronal cells prevents free radical-mediated damage." *J Neurochem* 71(1): 69-77.
78. Dungy, L. J., T. A. Siddiqi, et al. (1991). "C-jun and jun-B oncogene expression during placental development." *Am J Obstet Gynecol* 165(6 Pt 1): 1853-6.
79. Dungy, L. J., T. A. Siddiqi, et al. (1991). "Transforming growth factor-beta 1 expression during placental development." *Am J Obstet Gynecol* 165(4 Pt 1): 853-7.
80. Dzhagarov, B. M., L. M. Belyanovich, et al. (2000). "Picosecond absorption spectroscopy of cytochrome c oxidase: excited states and relaxation processes in heme groups of cytochromes a and a3." *Dokl Biophys* 373-375: 53-5.
81. Edelstam, G. A., U. B. Laurent, et al. (1992). "Concentration and turnover of intraperitoneal hyaluronan during inflammation." *Inflammation* 16(5): 459-69.
82. Ekholm, E. C., L. Ravanti, et al. (2000). "Expression of extracellular matrix genes: transforming growth factor (TGF)-beta1 and ras in tibial fracture healing of lathyrctic rats." *Bone* 27(4): 551-7.

83. Ekstrom, G. and M. Ingelman-Sundberg (1984). "Cytochrome P-450-dependent lipid peroxidation in reconstituted membrane vesicles." *Biochem Pharmacol* 33(15): 2521-3.
84. Ekstrom, G. and M. Ingelman-Sundberg (1989). "Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P-450 (P-450IIE1)." *Biochem Pharmacol* 38(8): 1313-9.
85. Ekstrom, G., C. von Bahr, et al. (1989). "Human liver microsomal cytochrome P-450IIE1. Immunological evaluation of its contribution to microsomal ethanol oxidation, carbon tetrachloride reduction and NADPH oxidase activity." *Biochem Pharmacol* 38(4): 689-93.
86. Elferink, C. J., N. L. Ge, et al. (2001). "Maximal aryl hydrocarbon receptor activity depends on an interaction with the retinoblastoma protein." *Mol Pharmacol* 59(4): 664-73.
87. Elstner, E. F. (1991). "Oxygen radicals--biochemical basis for their efficacy." *Klin Wochenschr* 69(21-23): 949-56.
88. Elstner, E. F. and W. Osswald (1991). "Air pollution: involvement of oxygen radicals (a mini review)." *Free Radic Res Commun* 12-13 Pt 2: 795-807.
89. Esterbauer, H., R. J. Schaur, et al. (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes." *Free Radic Biol Med* 11(1): 81-128.
90. Fan, C. Y., J. Pan, et al. (1996). "Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene." *J Biol Chem* 271(40): 24698-710.
91. Feith, D. J., L. M. Shantz, et al. (2001). "Targeted antizyme expression in the skin of transgenic mice reduces tumor promoter induction of ornithine decarboxylase and decreases sensitivity to chemical carcinogenesis." *Cancer Res* 61(16): 6073-81.
92. Fernandez-Checa, J. C., N. Kaplowitz, et al. (1997). "GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect." *Am J Physiol* 273(1 Pt 1): G7-17.
93. Fernandez-Salguero, P., T. Pineau, et al. (1995). "Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor." *Science* 268(5211): 722-6.
94. Forman, B. M., J. Chen, et al. (1997). "Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9): 4312-7.
95. Forman, B. M., B. Ruan, et al. (1997). "The orphan nuclear receptor LXRalpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 10588-93.
96. Fridovich, I. (1997). "Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters." *J Biol Chem* 272(30): 18515-7.
97. Friling, R. S., A. Bensimon, et al. (1990). "Xenobiotic-inducible expression of murine glutathione S-transferase Ya subunit gene is controlled by an electrophile-responsive element." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(16): 6258-62.
98. Frueh, F. W., K. C. Hayashibara, et al. (2001). "Use of cDNA microarrays to analyze dioxin-induced changes in human liver gene expression." *Toxicol Lett* 122(3): 189-203.
99. Fuchs, R. and H. G. Gassen (1989). "Nucleotide sequence of human preprocathepsin H, a lysosomal cysteine proteinase." *Nucleic Acids Res* 17(22): 9471.
100. Garcia-Horsman, J. A., B. Barquera, et al. (1994). "The superfamily of heme-copper respiratory oxidases." *J Bacteriol* 176(18): 5587-600.
101. Garcia-Horsman, J. A., E. Berry, et al. (1994). "A novel cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* that lacks CuA." *Biochemistry* 33(10): 3113-9.
102. Garrison, P. M., J. M. Rogers, et al. (2000). "Effects of histone deacetylase inhibitors on the Ah receptor gene promoter." *Arch Biochem Biophys* 374(2): 161-71.
103. Ge, N. L. and C. J. Elferink (1998). "A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle." *J Biol Chem* 273(35): 22708-13.
104. Gearing, K. L., M. Gottlicher, et al. (1993). "Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(4): 1440-4.
105. Geimer, P. and E. G. Bade (1991). "The epidermal growth factor-induced migration of rat liver epithelial cells is associated with a transient inhibition of DNA synthesis." *J Cell Sci* 100 (Pt 2): 349-55.
106. Gelb, B. D., K. Moissoglu, et al. (1996). "Cathepsin K: isolation and characterization of the murine cDNA and genomic sequence, the homologue of the human pycnodysostosis gene." *Biochem Mol Med* 59(2): 200-6.
107. Gelb, B. D., G. P. Shi, et al. (1996). "Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency." *Science* 273(5279): 1236-8.
108. Goel, S. K., N. D. Lalwani, et al. (1986). "Peroxisome proliferation and lipid peroxidation in rat liver." *Cancer Res* 46(3): 1324-30.
109. Gonzalez, F. J. (1988). "The molecular biology of cytochrome P450s." *Pharmacol Rev* 40(4): 243-88.
110. Gonzalez, F. J. and S. Kimura (2003). "Study of P450 function using gene knockout and transgenic mice." *Arch Biochem Biophys* 409(1): 153-8.

111. Gonzalez, F. J., B. J. Schmid, et al. (1988). "Human P450PCN1: sequence, chromosome localization, and direct evidence through cDNA expression that P450PCN1 is nifedipine oxidase." *DNA* 7(2): 79-86.
112. Gonzalez, F. J., F. Vilbois, et al. (1988). "Human debrisoquine 4-hydroxylase (P450IID1): cDNA and deduced amino acid sequence and assignment of the CYP2D locus to chromosome 22." *Genomics* 2(2): 174-9.
113. Gouillon, Z. Q., K. Miyamoto, et al. (1999). "Role of CYP2E1 in the pathogenesis of alcoholic liver disease: modifications by cAMP and ubiquitin-proteasome pathway." *Front Biosci* 4: A16-25.
114. Green, D. R. and G. P. Amarante-Mendes (1998). "The point of no return: mitochondria, caspases, and the commitment to cell death." *Results Probl Cell Differ* 24: 45-61.
115. Green, D. R. and J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." *Science* 281(5381): 1309-12.
116. Gross, A., J. M. McDonnell, et al. (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." *Genes Dev* 13(15): 1899-911.
117. Gruendler, C., Y. Lin, et al. (2001). "Proteasomal degradation of Smad1 induced by bone morphogenetic proteins." *J Biol Chem* 276(49): 46533-43.
118. Hakkola, J., Y. Hu, et al. (2003). "Mechanisms of down-regulation of CYP2E1 expression by inflammatory cytokines in rat hepatoma cells." *J Pharmacol Exp Ther* 304(3): 1048-54.
119. Halliwell, B. (1996). "Antioxidants in human health and disease." *Annu Rev Nutr* 16: 33-50.
120. Hale, R. C. et al (2003) " Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the North American environment, 29: 771-779
121. Halliwell, B. (1996). "Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation." *Biochem Soc Trans* 24(4): 1023-7.
122. Halliwell, B. (1996). "Mechanisms involved in the generation of free radicals." *Pathol Biol (Paris)* 44(1): 6-13.
123. Halliwell, B. (1996). "Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans." *Free Radic Res* 25(1): 57-74.
124. Halliwell, B. (1996). "Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo?" *Free Radic Res* 25(5): 439-54.
125. Haltia, T., M. Saraste, et al. (1991). "Subunit III of cytochrome c oxidase is not involved in proton translocation: a site-directed mutagenesis study." *Embo J* 10(8): 2015-21.
126. Hamadeh, H. K., P. Bushel, et al. (2002). "Detection of diluted gene expression alterations using cDNA microarrays." *Biotechniques* 32(2): 322, 324, 326-9.
127. Hamadeh, H. K., P. Bushel, et al. (2002). "Detection of diluted gene expression alterations using cDNA microarrays." *Biotechniques* 32(2): 322, 324, 326-9.
128. Hamadeh, H. K., P. R. Bushel, et al. (2002). "Prediction of compound signature using high density gene expression profiling." *Toxicol Sci* 67(2): 232-40.
129. Hamadeh, H. K., P. R. Bushel, et al. (2002). "Prediction of compound signature using high density gene expression profiling." *Toxicol Sci* 67(2): 232-40.
130. Hamadeh, H. K., P. R. Bushel, et al. (2002). "Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles." *Toxicol Sci* 67(2): 219-31.
131. Hanks, S. K. and T. R. Polte (1997). "Signaling through focal adhesion kinase." *Bioessays* 19(2): 137-45.
132. Harvey, W. K. and R. Lindahl (1982). "Activity of various aldehyde-metabolizing enzymes in chemically-induced rat hepatomas." *Biochem Pharmacol* 31(6): 1153-5.
133. Hashimoto, T. (1999). "Peroxisomal beta-oxidation enzymes." *Neurochem Res* 24(4): 551-63.
134. Hashimoto, T., T. Fujita, et al. (1999). "Peroxisomal and mitochondrial fatty acid beta-oxidation in mice nullizygous for both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Genotype correlation with fatty liver phenotype." *J Biol Chem* 274(27): 19228-36.
135. Heino, J. and J. Massague (1990). "Cell adhesion to collagen and decreased myogenic gene expression implicated in the control of myogenesis by transforming growth factor beta." *J Biol Chem* 265(18): 10181-4.
136. Hempel, J., K. Harper, et al. (1989). "Inducible (class 3) aldehyde dehydrogenase from rat hepatocellular carcinoma and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated liver: distant relationship to the class 1 and 2 enzymes from mammalian liver cytosol/mitochondria." *Biochemistry* 28(3): 1160-7.
137. Hicks, D. (1996). "Characterization and possible roles of fibroblast growth factors in retinal photoreceptor cells." *Keio J Med* 45(3): 140-54.
138. Hicks, K. K., J. T. Shin, et al. (1996). "Molecular mechanisms of angiogenesis: experimental models define cellular trafficking of FGF-1." *P R Health Sci J* 15(3): 179-86.
139. Hill, R. M., K. S. Morresey, et al. (1998). "A new intracellular serine protease inhibitor expressed in the rat pituitary gland complexes with granzyme B." *FEBS Lett* 440(3): 361-4.
140. Hishinuma, I., J. Nagakawa, et al. (1990). "Involvement of tumor necrosis factor-alpha in development of hepatic injury in galactosamine-sensitized mice." *Hepatology* 12(5): 1187-91.
141. Hocevar, B. A., T. L. Brown, et al. (1999). "TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway." *Embo J* 18(5): 1345-56.
142. Hoffman, B. and D. A. Liebermann (1998). "The proto-oncogene c-myc and apoptosis." *Oncogene* 17(25): 3351-7.

143. Hoffman, B. B., K. Sharma, et al. (1998). "Transcriptional activation of transforming growth factor-beta1 in mesangial cell culture by high glucose concentration." *Kidney Int* 54(4): 1107-16.
144. Hoffman, E. C., H. Reyes, et al. (1991). "Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor." *Science* 252(5008): 954-8.
145. Hoffman, K. B., J. Larson, et al. (1998). "Activation of NMDA receptors stimulates extracellular proteolysis of cell adhesion molecules in hippocampus." *Brain Res* 811(1-2): 152-5.
146. Hoffmann, J. C., C. Herklotz, et al. (1998). "Effects of the anti-CD2 mAb OX34 on in vivo proliferation." *Ann N Y Acad Sci* 859: 216-8.
147. Hoffmann, K. F., P. Caspar, et al. (1998). "IFN-gamma, IL-12, and TNF-alpha are required to maintain reduced liver pathology in mice vaccinated with *Schistosoma mansoni* eggs and IL-12." *J Immunol* 161(8): 4201-10.
148. Hoffmann, M., M. Schmidt, et al. (1998). "Activation of EGF receptor family members suppresses the cytotoxic effects of tumor necrosis factor-alpha." *Cancer Immunol Immunother* 47(3): 167-75.
149. Hovik, R., B. Brodal, et al. (1991). "Metabolism of acetyl-CoA by isolated peroxisomal fractions: formation of acetate and acetoacetyl-CoA." *J Lipid Res* 32(6): 993-9.
150. Hsu, P. L. and S. M. Hsu (1998). "Abundance of heat shock proteins (hsp89, hsp60, and hsp27) in malignant cells of Hodgkin's disease." *Cancer Res* 58(23): 5507-13.
151. Hsu, S. L., W. S. Wu, et al. (1998). "Retinoic acid-induced apoptosis is prevented by serum albumin and enhanced by Lipiodol in human hepatoma Hep3B cells." *Cancer Lett* 129(2): 205-14.
152. Huang, L., M. Yoneda, et al. (1993). "A serum-derived hyaluronan-associated protein (SHAP) is the heavy chain of the inter alpha-trypsin inhibitor." *J Biol Chem* 268(35): 26725-30.
153. Huang, R. P., A. Peng, et al. (1999). "Tumor promotion by hydrogen peroxide in rat liver epithelial cells." *Carcinogenesis* 20(3): 485-92.
154. Huang, S., Z. Chen, et al. (1999). "Correlation between IL-3 receptor expression and growth potential of human CD34+ hematopoietic cells from different tissues." *Stem Cells* 17(5): 265-72.
155. Hutadilok, N., P. Ghosh, et al. (1988). "Binding of haptoglobin, inter-alpha-trypsin inhibitor, and alpha 1 proteinase inhibitor to synovial fluid hyaluronate and the influence of these proteins on its degradation by oxygen derived free radicals." *Ann Rheum Dis* 47(5): 377-85.
156. Ichiba, T., S. Matsufuji, et al. (1995). "Nucleotide sequence of ornithine decarboxylase antizyme cDNA from *Xenopus laevis*." *Biochim Biophys Acta* 1262(1): 83-6.
157. Imai, K., A. Hiramatsu, et al. (1997). "Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release." *Biochem J* 322 (Pt 3): 809-14.
158. Imai, K., S. Ohta, et al. (1997). "Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and activation of progelatinase A in human osteoarthritic cartilage." *Am J Pathol* 151(1): 245-56.
159. Itoh, K., T. Ishii, et al. (1999). "Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress." *Free Radic Res* 31(4): 319-24.
160. Ivanov, I. P., R. F. Gesteland, et al. (1998). "A second mammalian antizyme: conservation of programmed ribosomal frameshifting." *Genomics* 52(2): 119-29.
161. Ivanov, I. P., R. F. Gesteland, et al. (2000). "Antizyme expression: a subversion of triplet decoding, which is remarkably conserved by evolution, is a sensor for an autoregulatory circuit." *Nucleic Acids Res* 28(17): 3185-96.
162. Jasaitis, A., V. B. Borisov, et al. (2000). "Electrogenic reactions of cytochrome bd." *Biochemistry* 39(45): 13800-9.
163. Jeyapaul, J. and A. K. Jaiswal (2000). "Nrf2 and c-Jun regulation of antioxidant response element (ARE)-mediated expression and induction of gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene." *Biochem Pharmacol* 59(11): 1433-9.
164. Jia, Y., C. Qi, et al. (2003). "Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha)-regulated genes in liver in the absence of peroxisome proliferation in mice deficient in both L- and D-forms of enoyl-CoA hydratase/dehydrogenase enzymes of peroxisomal beta-oxidation system." *J Biol Chem* 278(47): 47232-9.
165. Jiang, C., A. T. Ting, et al. (1998). "PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines." *Nature* 391(6662): 82-6.
166. Jolly, C. and R. I. Morimoto (2000). "Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death." *J Natl Cancer Inst* 92(19): 1564-72.
167. Jolly, C. A., H. Chao, et al. (2000). "Sterol carrier protein-2 suppresses microsomal acyl-CoA hydrolysis." *Mol Cell Biochem* 205(1-2): 83-90.
168. Jolly, C. A., D. C. Wilton, et al. (2000). "Microsomal fatty acyl-CoA transacylation and hydrolysis: fatty acyl-CoA species dependent modulation by liver fatty acyl-CoA binding proteins." *Biochim Biophys Acta* 1483(1): 185-97.

169. Jones, B. E., C. R. Lo, et al. (2000). "Hepatocytes sensitized to tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity undergo apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways." *J Biol Chem* 275(1): 705-12.
170. Kahn, B. B. and J. S. Flier (2000). "Obesity and insulin resistance." *J Clin Invest* 106(4): 473-81.
171. Kaminsky, L. A. and M. H. Whaley (1992). "Evaluation of within-day precision of serum cholesterol measured by a portable analyzer." *Med Sci Sports Exerc* 24(1): 134-8.
172. Kaminsky, L. S., J. M. Fraser, et al. (1992). "Rat liver metabolism and toxicity of 2,2,2-trifluoroethanol." *Biochem Pharmacol* 44(9): 1829-37.
173. Kaminsky, P., M. Klein, et al. (1992). "[Mitochondrial disorder secondary to inflammation in polymyositis. Two cases]." *Presse Med* 21(27): 1279-82.
174. Kanda, D., H. Takagi, et al. (2002). "Transforming growth factor alpha protects against Fas-mediated liver apoptosis in mice." *FEBS Lett* 519(1-3): 11-5.
175. Kang, K. W., M. K. Cho, et al. (2001). "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt by tert-butylhydroquinone is responsible for antioxidant response element-mediated rGSTA2 induction in H4IIE cells." *Mol Pharmacol* 59(5): 1147-56.
176. Kersten, S., B. Desvergne, et al. (2000). "Roles of PPARs in health and disease." *Nature* 405(6785): 421-4.
177. Kimura, S., N. Hanioka, et al. (1989). "The rat clofibrate-inducible CYP4A gene subfamily. I. Complete intron and exon sequence of the CYP4A1 and CYP4A2 genes, unique exon organization, and identification of a conserved 19-bp upstream element." *DNA* 8(7): 503-16.
178. Kimura, S., J. P. Hardwick, et al. (1989). "The rat clofibrate-inducible CYP4A subfamily. II. cDNA sequence of IVA3, mapping of the Cyp4a locus to mouse chromosome 4, and coordinate and tissue-specific regulation of the CYP4A genes." *DNA* 8(7): 517-25.
179. Kirschke, H. and B. Wiederanders (1987). "Lysosomal proteinases." *Acta Histochem* 82(1): 2-4.
180. Kjelsberg, C., H. Sakurai, et al. (1997). "Met -/- kidneys express epithelial cells that chemotax and form tubules in response to EGF receptor ligands." *Am J Physiol* 272(2 Pt 2): F222-8.
181. Kobayashi, H., J. Gotoh, et al. (1996). "Inter-alpha-trypsin inhibitor bound to tumor cells is cleaved into the heavy chains and the light chain on the cell surface." *J Biol Chem* 271(19): 11362-7.
182. Kohler, G., U. Hering, et al. (1997). "Annexin V interaction with phosphatidylserine-containing vesicles at low and neutral pH." *Biochemistry* 36(26): 8189-94.
183. Kohler, G., H. Veelken, et al. (1997). "Oncogene and HSP-70 expression in primary tumor cell cultures of renal cell carcinoma compared to their corresponding cell line." *Anticancer Res* 17(5A): 3225-31.
184. Koj, A., E. Korzus, et al. (1993). "Regulation of synthesis of some proteinase inhibitors in human hepatoma cells HepG2 by cytokines, hepatocyte growth factor and retinoic acid." *Biol Chem Hoppe Seyler* 374(3): 193-201.
185. Komarova, E. A., L. Diatchenko, et al. (1998). "Stress-induced secretion of growth inhibitors: a novel tumor suppressor function of p53." *Oncogene* 17(9): 1089-96.
186. Konstantinov, A. A., S. Siletsky, et al. (1997). "The roles of the two proton input channels in cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* probed by the effects of site-directed mutations on time-resolved electrogenic intraprotein proton transfer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(17): 9085-90.
187. Koop, D. R., E. T. Morgan, et al. (1982). "Purification and characterization of a unique isozyme of cytochrome P-450 from liver microsomes of ethanol-treated rabbits." *J Biol Chem* 257(14): 8472-80.
188. Kordula, T., A. Dubin, et al. (1993). "Molecular cloning and expression of an intracellular serpin: an elastase inhibitor from horse leucocytes." *Biochem J* 293 (Pt 1): 187-93.
189. Krey, G., O. Braissant, et al. (1997). "Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay." *Mol Endocrinol* 11(6): 779-91.
190. Kroetz, D. L., P. Yook, et al. (1998). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha controls the hepatic CYP4A induction adaptive response to starvation and diabetes." *J Biol Chem* 273(47): 31581-9.
191. Kwak, M. K., K. Itoh, et al. (2001). "Role of transcription factor Nrf2 in the induction of hepatic phase 2 and antioxidative enzymes in vivo by the cancer chemoprotective agent, 3H-1, 2-dimethiole-3-thione." *Mol Med* 7(2): 135-45.
192. Lakin, N. D. and S. P. Jackson (1999). "Regulation of p53 in response to DNA damage." *Oncogene* 18(53): 7644-55.
193. Laurent, T. C. and J. R. Fraser (1992). "Hyaluronan." *Faseb J* 6(7): 2397-404.
194. Laurent, U. B., J. R. Fraser, et al. (1992). "Catabolism of hyaluronan in the knee joint of the rabbit." *Matrix* 12(2): 130-6.
195. Lazarow, P. B. (1981). "Assay of peroxisomal beta-oxidation of fatty acids." *Methods Enzymol* 72: 315-9.
196. Lazarow, P. B. (1981). "Different chain length specificities of peroxisomal and mitochondrial enoyl-CoA hydratases." *Arch Biochem Biophys* 206(2): 342-5.
197. Lazarow, P. B. and C. De Duve (1976). "A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug." *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(6): 2043-6.

198. Leclercq, I. A., G. C. Farrell, et al. (2000). "CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis." *J Clin Invest* 105(8): 1067-75.
199. Lee, J. M., J. M. Hanson, et al. (2001). "Phosphatidylinositol 3-kinase, not extracellular signal-regulated kinase, regulates activation of the antioxidant-responsive element in IMR-32 human neuroblastoma cells." *J Biol Chem* 276(23): 20011-6.
200. Lee, J. M., J. D. Moehlenkamp, et al. (2001). "Nrf2-dependent activation of the antioxidant responsive element by tert-butylhydroquinone is independent of oxidative stress in IMR-32 human neuroblastoma cells." *Biochem Biophys Res Commun* 280(1): 286-92.
201. Leiter, E. H., P. C. Reifsnnyder, et al. (1998). "NIDDM genes in mice: deleterious synergism by both parental genomes contributes to diabetogenic thresholds." *Diabetes* 47(8): 1287-95.
202. Lemasters, J. J., T. Qian, et al. (1999). "Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death." *J Bioenerg Biomembr* 31(4): 305-19.
203. Leu, J. L., M. A. Crissey, et al. (2001). "Interleukin-6-induced STAT3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response to liver injury." *Mol Cell Biol* 21(2): 414-24.
204. Levine, A. J. (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." *Cell* 88(3): 323-31.
205. Lennart Hardell and others, "Case-control study: soft-tissue sarcomas and exposure to phenoxyacetic acids or chlorophenols," *BRITISH JOURNAL OF CANCER* Vol. 39 (1979), pgs. 711-717.
206. Li, F., L. Adam, et al. (2002). "p21-activated kinase 1 interacts with and phosphorylates histone H3 in breast cancer cells." *EMBO Rep* 3(8): 767-73.
207. Li, N., M. I. Venkatesan, et al. (2000). "Induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages by diesel exhaust particle chemicals and quinones via the antioxidant-responsive element." *J Immunol* 165(6): 3393-401.
208. Li, R. S., G. L. Law, et al. (1999). "Ornithine decarboxylase is a transcriptional target of tumor suppressor WT1." *Exp Cell Res* 247(1): 257-66.
209. Li, X., H. Yu, et al. (1997). "Protein kinase C and protein kinase A inhibit calcium-dependent but not stress-dependent c-Jun N-terminal kinase activation in rat liver epithelial cells." *J Biol Chem* 272(23): 14996-5002.
210. Li, Z., J. Froehlich, et al. (1999). "Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats." *Hypertension* 33(1): 116-23.
211. Lieber, C. S. (1997). "Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role." *Physiol Rev* 77(2): 517-44.
212. Lieber, C. S. (1997). "Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role." *Physiol Rev* 77(2): 517-44.
213. Lieber, C. S. (1997). "Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism." *Clin Chim Acta* 257(1): 59-84.
214. Lieber, C. S. (1997). "Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases." *Adv Pharmacol* 38: 601-28.
215. Lieber, C. S. (1997). "Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases." *Adv Pharmacol* 38: 601-28.
216. Lin, J. K. and C. K. Chou (1992). "In vitro apoptosis in the human hepatoma cell line induced by transforming growth factor beta 1." *Cancer Res* 52(2): 385-8.
217. Lin, K. H. and R. Lindahl (1987). "Role of aldehyde dehydrogenase activity in cyclophosphamide metabolism in rat hepatoma cell lines." *Biochem Pharmacol* 36(19): 3305-7.
218. Lindahl, R. (1980). "Differentiation of normal and inducible rat liver aldehyde dehydrogenases by disulfiram inhibition in vitro." *Biochem Pharmacol* 29(21): 3026-9.
219. Lindahl, R. (1992). "Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27(4-5): 283-335.
220. Lindahl, R. and D. R. Petersen (1991). "Lipid aldehyde oxidation as a physiological role for class 3 aldehyde dehydrogenases." *Biochem Pharmacol* 41(11): 1583-7.
221. Lindahl, R., M. Roper, et al. (1978). "Rat liver aldehyde dehydrogenase--immunochemical identity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin inducible normal liver and 2-acetylaminofluorene inducible hepatoma isozymes." *Biochem Pharmacol* 27(20): 2463-5.
222. Lock, E. A., A. M. Mitchell, et al. (1989). "Biochemical mechanisms of induction of hepatic peroxisome proliferation." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29: 145-63.
223. Ludwig, J., T. R. Viggiano, et al. (1980). "Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease." *Mayo Clin Proc* 55(7): 434-8.
224. Laabich, A., G. Li, et al. (2001). "Characterization of apoptosis-genes associated with NMDA mediated cell death in the adult rat retina." *Brain Res Mol Brain Res* 91(1-2): 34-42.
225. Makita, K., J. R. Falck, et al. (1996). "Cytochrome P450, the arachidonic acid cascade, and hypertension: new vistas for an old enzyme system." *Faseb J* 10(13): 1456-63.
226. Mandal, M., S. Das, et al. (2003). "Role of matrix metalloprotease-2 in oxidant activation of Ca²⁺ ATPase by hydrogen peroxide in pulmonary vascular smooth muscle plasma membrane." *J Biosci* 28(2): 205-13.
227. Marcu, K. B., S. A. Bossone, et al. (1992). "myc function and regulation." *Annu Rev Biochem* 61: 809-60.

228. Mariussen, E., O. Myhre, et al. (2002). "The polychlorinated biphenyl mixture aroclor 1254 induces death of rat cerebellar granule cells: the involvement of the N-methyl-D-aspartate receptor and reactive oxygen species." *Toxicol Appl Pharmacol* 179(3): 137-44.
229. Marques-da-Silva, A. C., R. B. D'Avila, et al. (1997). "Ca²⁺ dependence of gluconeogenesis stimulation by glucagon at different cytosolic NAD(+)-NADH redox potentials." *Braz J Med Biol Res* 30(7): 827-36.
230. Marshall, A. and J. Hodgson (1998). "DNA chips: an array of possibilities." *Nat Biotechnol* 16(1): 27-31.
231. Marshall, A. and J. Hodgson (1998). "DNA chips: an array of possibilities." *Nat Biotechnol* 16(1): 27-31.
232. Marx, N., T. Bourcier, et al. (1999). "PPAR γ activation in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression: PPAR γ as a potential mediator in vascular disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(3): 546-51.
233. Marx, N., G. K. Sukhova, et al. (1999). "PPAR α activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells." *Circulation* 99(24): 3125-31.
234. Massague, J. (1990). "Transforming growth factor- α . A model for membrane-anchored growth factors." *J Biol Chem* 265(35): 21393-6.
235. Massague, J., S. Cheifetz, et al. (1990). "TGF- β receptors and TGF- β binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties." *Ann N Y Acad Sci* 593: 59-72.
236. Masubuchi, Y., S. Narimatsu, et al. (1994). "Role of the CYP2D subfamily in metabolism-dependent covalent binding of propranolol to liver microsomal protein in rats." *Biochem Pharmacol* 48(10): 1891-8.
237. Masubuchi, Y., C. Takahashii, et al. (1995). "Inhibition and induction of cytochrome P450 isozymes after repetitive administration of imipramine in rats." *Drug Metab Dispos* 23(9): 999-1003.
238. Masubuchi, Y., S. Umeda, et al. (1993). "Participation of the CYP2D subfamily in lidocaine 3-hydroxylation and formation of a reactive metabolite covalently bound to liver microsomal protein in rats." *Biochem Pharmacol* 46(10): 1867-9.
239. Masuzaki, H., J. Paterson, et al. (2001). "A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome." *Science* 294(5549): 2166-70.
240. Masuzaki, T. and K. Tanaka (2001). "[Nutritional assessment by analysis of Rapid turnover proteins (RTP)]." *Nippon Rinsho* 59 Suppl 5: 123-6.
241. Mateyak, M. K., A. J. Obaya, et al. (1999). "c-Myc regulates cyclin D-Cdk4 and -Cdk6 activity but affects cell cycle progression at multiple independent points." *Mol Cell Biol* 19(7): 4672-83.
242. Matteoni, C. A. and Z. M. Younossi (1999). "In diagnosing hepatitis C, which patient needs which test?" *Cleve Clin J Med* 66(9): 529-30.
243. Matteoni, C. A., Z. M. Younossi, et al. (1999). "Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity." *Gastroenterology* 116(6): 1413-9.
244. McCord, J. M. (2000). "The evolution of free radicals and oxidative stress." *Am J Med* 108(8): 652-9.
245. McInerney, E. M., D. W. Rose, et al. (1998). "Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation." *Genes Dev* 12(21): 3357-68.
246. McMahan, M., K. Itoh, et al. (2001). "The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes." *Cancer Res* 61(8): 3299-307.
247. Meironyte, D.J. et al. (1999). "Analysis of polybrominated diphenyl ethers in swedish human milk." *Toxicology and Environmental Sci.* 58: 329-341.
248. Michalopoulos, G. K. and M. C. DeFrances (1997). "Liver regeneration." *Science* 276(5309): 60-6.
249. Moriarty, P. M., C. C. Reddy, et al. (1998). "Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA." *Mol Cell Biol* 18(5): 2932-9.
250. Mosialou, E., G. Ekstrom, et al. (1993). "Evidence that rat liver microsomal glutathione transferase is responsible for glutathione-dependent protection against lipid peroxidation." *Biochem Pharmacol* 45(8): 1645-51.
251. Muerhoff, A. S., K. J. Griffin, et al. (1992). "Characterization of a rabbit gene encoding a clofibrate-inducible fatty acid omega-hydroxylase: CYP4A6." *Arch Biochem Biophys* 296(1): 66-72.
252. Muerhoff, A. S., K. J. Griffin, et al. (1992). "The peroxisome proliferator-activated receptor mediates the induction of CYP4A6, a cytochrome P450 fatty acid omega-hydroxylase, by clofibric acid." *J Biol Chem* 267(27): 19051-3.
253. Murakami, Y., S. Matsufuji, et al. (2000). "Degradation of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome." *Biochem Biophys Res Commun* 267(1): 1-6.
254. Murphy, T. H., M. J. De Long, et al. (1991). "Enhanced NAD(P)H:quinone reductase activity prevents glutamate toxicity produced by oxidative stress." *J Neurochem* 56(3): 990-5.
255. Murphy, T. H., M. Miyamoto, et al. (1989). "Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress." *Neuron* 2(6): 1547-58.
256. Muto, Y., K. T. Nouri-Aria, et al. (1988). "Enhanced tumour necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure." *Lancet* 2(8602): 72-4.

257. Nagakawa, J., I. Hishinuma, et al. (1990). "Involvement of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of activated macrophage-mediated hepatitis in mice." *Gastroenterology* 99(3): 758-65.
258. Nagata, S. and P. Golstein (1995). "The Fas death factor." *Science* 267(5203): 1449-56.
259. Nagata, S. and T. Suda (1995). "Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations." *Immunol Today* 16(1): 39-43.
260. Nebert, D. W. and F. J. Gonzalez (1987). "P450 genes: structure, evolution, and regulation." *Annu Rev Biochem* 56: 945-93.
261. Nicholls, D., P. Bernardi, et al. (2000). "Apoptosis and the laws of thermodynamics." *Nat Cell Biol* 2(10): E172-3.
262. Nicholls, D. G. and M. W. Ward (2000). "Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts." *Trends Neurosci* 23(4): 166-74.
263. Niehof, M., K. Streetz, et al. (2001). "Interleukin-6-induced tethering of STAT3 to the LAP/C/EBPbeta promoter suggests a new mechanism of transcriptional regulation by STAT3." *J Biol Chem* 276(12): 9016-27.
264. Niino, M., K. Iwabuchi, et al. (2001). "Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice by an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma." *J Neuroimmunol* 116(1): 40-8.
265. Nobes, C. D. and A. Hall (1995). "Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility." *Biochem Soc Trans* 23(3): 456-9.
266. Nobes, C. D. and A. Hall (1995). "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia." *Cell* 81(1): 53-62.
267. Nobes, C. D., P. Hawkins, et al. (1995). "Activation of the small GTP-binding proteins rho and rac by growth factor receptors." *J Cell Sci* 108 (Pt 1): 225-33.
268. Nobes, C. D. and A. M. Tolkovsky (1995). "Neutralizing anti-p21ras Fabs suppress rat sympathetic neuron survival induced by NGF, LIF, CNTF and cAMP." *Eur J Neurosci* 7(2): 344-50.
269. Obaya, A. J., M. K. Mateyak, et al. (1999). "Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle." *Oncogene* 18(19): 2934-41.
270. Oguro, T., M. Hayashi, et al. (1998). "The expression of heme oxygenase-1 gene responded to oxidative stress produced by phorone, a glutathione depletor, in the rat liver; the relevance to activation of c-jun n-terminal kinase." *J Pharmacol Exp Ther* 287(2): 773-8.
271. Oguro, T. and T. Yoshida (1998). "[New role of stress protein heme oxygenase--its relationship with physiopathology]." *J Toxicol Sci* 23(2): App41-53.
272. Okahara, K., J. Kambayashi, et al. (1995). "Shear stress induces expression of CNP gene in human endothelial cells." *FEBS Lett* 373(2): 108-10.
273. Okey, A. B. and L. M. Vella (1984). "Elevated binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 3-methylcholanthrene to the Ah receptor in hepatic cytosols from phenobarbital-treated rats and mice." *Biochem Pharmacol* 33(4): 531-8.
274. Osmundsen, H., J. Bremer, et al. (1991). "Metabolic aspects of peroxisomal beta-oxidation." *Biochim Biophys Acta* 1085(2): 141-58.
275. Otieno, M. A. and T. W. Kensler (2000). "A role for protein kinase C-delta in the regulation of ornithine decarboxylase expression by oxidative stress." *Cancer Res* 60(16): 4391-6.
276. Paulson, K. E., J. E. Darnell, Jr., et al. (1990). "Analysis of the upstream elements of the xenobiotic compound-inducible and positionally regulated glutathione S-transferase Ya gene." *Mol Cell Biol* 10(5): 1841-52.
277. Pegg, A. E., L. M. Shantz, et al. (1995). "Ornithine decarboxylase as a target for chemoprevention." *J Cell Biochem Suppl* 22: 132-8.
278. Pier Alberto Bertazzi and others, "Cancer Incidence in a Population Accidentally Exposed to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-PARA-dioxin," *EPIDEMIOLOGY* Vol. 4 (September, 1993), pgs. 398-406.
279. Pilon, D., A. E. Roberts, et al. (1988). "Effect of glutathione depletion on the irreversible association of acrylonitrile with tissue macromolecules after oral administration to rats." *Toxicol Appl Pharmacol* 95(2): 311-20.
280. Pilon, D., A. E. Roberts, et al. (1988). "Effect of glutathione depletion on the uptake of acrylonitrile vapors and on its irreversible association with tissue macromolecules." *Toxicol Appl Pharmacol* 95(2): 265-78.
281. Pineiro, M., M. A. Alava, et al. (1999). "ITIH4 serum concentration increases during acute-phase processes in human patients and is up-regulated by interleukin-6 in hepatocarcinoma HepG2 cells." *Biochem Biophys Res Commun* 263(1): 224-9.
282. Pollenz, R. S. (1996). "The aryl-hydrocarbon receptor, but not the aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator protein, is rapidly depleted in hepatic and nonhepatic culture cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." *Mol Pharmacol* 49(3): 391-8.
283. Premdas, P. D., R. J. Bowers, et al. (2000). "Inactivation of hepatic CYP2E1 by an epoxide of diallyl sulfone." *J Pharmacol Exp Ther* 293(3): 1112-20.
284. Pubgene v.2.3 : <https://server.pubgene.com/PubGene/>

285. Puga, A., S. J. Barnes, et al. (2000). "Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest." *J Biol Chem* 275(4): 2943-50.
286. Puga, A., A. Maier, et al. (2000). "The transcriptional signature of dioxin in human hepatoma HepG2 cells." *Biochem Pharmacol* 60(8): 1129-42.
287. Purdue, P. E. and P. B. Lazarow (1994). "Peroxisomal biogenesis: multiple pathways of protein import." *J Biol Chem* 269(48): 30065-8.
288. Qian, T., B. Herman, et al. (1999). "The mitochondrial permeability transition mediates both necrotic and apoptotic death of hepatocytes exposed to Br-A23187." *Toxicol Appl Pharmacol* 154(2): 117-25.
289. Rao, L., B. Puschner, et al. (2001). "Gene expression profiling of low selenium status in the mouse intestine: transcriptional activation of genes linked to DNA damage, cell cycle control and oxidative stress." *J Nutr* 131(12): 3175-81.
290. Rao, M. S., V. Subbarao, et al. (1986). "Peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis: histochemical analysis of ciprofibrate-induced preneoplastic and neoplastic lesions for gamma-glutamyl transpeptidase activity." *J Natl Cancer Inst* 77(4): 951-6.
291. Ravanti, L. and V. M. Kahari (2000). "Matrix metalloproteinases in wound repair (review)." *Int J Mol Med* 6(4): 391-407.
292. Reddy, J. K. and T. P. Krishnakantha (1975). "Hepatic peroxisome proliferation: induction by two novel compounds structurally unrelated to clofibrate." *Science* 190(4216): 787-9.
293. Reiter, R. and A. Wendel (1984). "Selenium and drug metabolism--II. Independence of glutathione peroxidase and reversibility of hepatic enzyme modulations in deficient mice." *Biochem Pharmacol* 33(12): 1923-8.
294. Reyes, H., S. Reisz-Porszasz, et al. (1992). "Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor." *Science* 256(5060): 1193-5.
295. Ricote, M., J. Huang, et al. (1998). "Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13): 7614-9.
296. Ricote, M., A. C. Li, et al. (1998). "The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation." *Nature* 391(6662): 79-82.
297. Roberts, A. B., K. C. Flanders, et al. (1988). "Transforming growth factor beta: biochemistry and roles in embryogenesis, tissue repair and remodeling, and carcinogenesis." *Recent Prog Horm Res* 44: 157-97.
298. Roberts, A. B. and M. B. Sporn (1988). "Transforming growth factor beta." *Adv Cancer Res* 51: 107-45.
299. Roberts, A. B., N. L. Thompson, et al. (1988). "Transforming growth factor-beta: possible roles in carcinogenesis." *Br J Cancer* 57(6): 594-600.
300. Robles, S. J. and G. R. Adami (1998). "Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts." *Oncogene* 16(9): 1113-23.
301. Sakata, K., K. Kashiwagi, et al. (2000). "Properties of a polyamine transporter regulated by antizyme." *Biochem J* 347 Pt 1: 297-303.
302. Sakata, K., K. Shigemasa, et al. (2000). "Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary." *Int J Oncol* 17(4): 673-81.
303. Sakurai, H., T. Tsukamoto, et al. (1997). "EGF receptor ligands are a large fraction of in vitro branching morphogens secreted by embryonic kidney." *Am J Physiol* 273(3 Pt 2): F463-72.
304. Sarafan, N., J. P. Martin, et al. (1995). "The human inter-alpha-trypsin inhibitor genes respond differently to interleukin-6 in HepG2 cells." *Eur J Biochem* 227(3): 808-15.
305. Saraste, M., L. Holm, et al. (1991). "The happy family of cytochrome oxidases." *Biochem Soc Trans* 19(3): 608-12.
306. Saraste, M., T. Metso, et al. (1991). "The *Bacillus subtilis* cytochrome-c oxidase. Variations on a conserved protein theme." *Eur J Biochem* 195(2): 517-25.
307. Savas, U., K. K. Bhattacharyya, et al. (1994). "Mouse cytochrome P-450EF, representative of a new 1B subfamily of cytochrome P-450s. Cloning, sequence determination, and tissue expression." *J Biol Chem* 269(21): 14905-11.
308. Schena, M. (2003). "Microarrays as toxin sensors." *Pharmacogenomics J* 3(3): 125-7.
309. Schena, M. (2003). "Microarrays as toxin sensors." *Pharmacogenomics J* 3(3): 125-7.
310. Schena, M., R. A. Heller, et al. (1998). "Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics." *Trends Biotechnol* 16(7): 301-6.
311. Schena, M., R. A. Heller, et al. (1998). "Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics." *Trends Biotechnol* 16(7): 301-6.
312. Schena, M., R. A. Heller, et al. (1998). "Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics." *Trends Biotechnol* 16(7): 301-6.
313. Schena, M., D. Shalon, et al. (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." *Science* 270(5235): 467-70.

314. Schena, M., D. Shalon, et al. (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." *Science* 270(5235): 467-70.
315. Schmidt, K. N., E. B. Traenckner, et al. (1995). "Induction of oxidative stress by okadaic acid is required for activation of transcription factor NF-kappa B." *J Biol Chem* 270(45): 27136-42.
316. Schoonjans, K., G. Martin, et al. (1997). "Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions." *Curr Opin Lipidol* 8(3): 159-66.
317. Schreitmuller, T., K. Hochstrasser, et al. (1987). "cDNA cloning of human inter-alpha-trypsin inhibitor discloses three different proteins." *Biol Chem Hoppe Seyler* 368(8): 963-70.
318. Seebacher, T., M. Manske, et al. (1991). "Laminin synthesized by stationary and migrating rat liver epithelial cells lacks the A chain." *Exp Cell Res* 196(1): 66-71.
319. Serrano, M., A. W. Lin, et al. (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." *Cell* 88(5): 593-602.
320. Shantz, L. M., D. J. Feith, et al. (2001). "Targeted overexpression of ornithine decarboxylase enhances beta-adrenergic agonist-induced cardiac hypertrophy." *Biochem J* 358(Pt 1): 25-32.
321. Silva Lima, B. and J. W. Van der Laan (2000). "Mechanisms of nongenotoxic carcinogenesis and assessment of the human hazard." *Regul Toxicol Pharmacol* 32(2): 135-43.
322. Singh, N., R. A. Zoeller, et al. (1994). "Addition of lipid substituents of mammalian protein glycosylphosphoinositol anchors." *Mol Cell Biol* 14(1): 21-31.
323. Sipeki, S., E. Bander, et al. (1999). "Phosphatidylinositol 3-kinase contributes to Erk1/Erk2 MAP kinase activation with hepatocyte growth factor-induced cell scattering." *Cell Signal* 11(12): 885-90.
324. Spencer, N. F. and R. A. Daynes (1997). "IL-12 directly stimulates expression of IL-10 by CD5+ B cells and IL-6 by both CD5+ and CD5- B cells: possible involvement in age-associated cytokine dysregulation." *Int Immunol* 9(5): 745-54.
325. Sporn, M. B. and A. B. Roberts (1988). "Peptide growth factors are multifunctional." *Nature* 332(6161): 217-9.
326. Sporn, M. B. and A. B. Roberts (1988). "Transforming growth factor-beta: new chemical forms and new biological roles." *Biofactors* 1(1): 89-93.
327. Stahler, F. and K. Roemer (1998). "Mutant p53 can provoke apoptosis in p53-deficient Hep3B cells with delayed kinetics relative to wild-type p53." *Oncogene* 17(26): 3507-12.
328. Steinbuch, M. (1976). "The inter-alpha-trypsin inhibitor." *Methods Enzymol* 45: 760-72.
329. Stohs, S. J. (1990). "Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)." *Free Radic Biol Med* 9(1): 79-90.
330. Stohs, S. J., Z. F. Al-Bayati, et al. (1986). "Glutathione peroxidase and reactive oxygen species in TCDD-induced lipid peroxidation." *Adv Exp Med Biol* 197: 357-65.
331. Stohs, S. J., M. Q. Hassan, et al. (1983). "Lipid peroxidation as a possible cause of TCDD toxicity." *Biochem Biophys Res Commun* 111(3): 854-9.
332. Streetz, K., L. Leifeld, et al. (2000). "Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure." *Gastroenterology* 119(2): 446-60.
333. Streetz, K. L., T. Luedde, et al. (2000). "Interleukin 6 and liver regeneration." *Gut* 47(2): 309-12.
334. Strobeck, M. W., A. F. Fribourg, et al. (2000). "Restoration of retinoblastoma mediated signaling to Cdk2 results in cell cycle arrest." *Oncogene* 19(15): 1857-67.
335. Sundberg, R., A. Ar'Rajab, et al. (1989). "Improvement of liver preservation quality with UW solution by chlorpromazine pretreatment of the donor in an experimental model." *Transplantation* 48(5): 742-4.
336. Suzuki, T., S. Narimatsu, et al. (1992). "Purification and characterization of a cytochrome P-450 isozyme catalyzing bunitrolol 4-hydroxylation in liver microsomes of male rats." *Drug Metab Dispos* 20(3): 367-73.
337. Szymanska, J. A., A. Sapota, et al. (2001). "The disposition and metabolism of tetrabromobisphenol-A after a single i.p. dose in the rat." *Chemosphere* 45(4-5): 693-700.
338. Takimoto, K., R. Lindahl, et al. (1992). "Regulation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible expression of aldehyde dehydrogenase in hepatoma cells." *Arch Biochem Biophys* 298(2): 493-7.
339. Talalay, P. (2000). "Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes." *Biofactors* 12(1-4): 5-11.
340. Tamayo, P., D. Slonim, et al. (1999). "Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6): 2907-12.
341. Taub, R. (1996). "Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration." *Faseb J* 10(4): 413-27.
342. Taub, R. (1996). "Liver regeneration in health and disease." *Clin Lab Med* 16(2): 341-60.
343. Thomas, R. S., D. R. Rank, et al. (2001). "Identification of toxicologically predictive gene sets using cDNA microarrays." *Mol Pharmacol* 60(6): 1189-94.
344. Townsend, A. J., S. Leone-Kabler, et al. (2001). "Selective protection by stably transfected human ALDH3A1 (but not human ALDH1A1) against toxicity of aliphatic aldehydes in V79 cells." *Chem Biol Interact* 130-132(1-3): 261-73.
345. Trouba, K. J., H. K. Hamadeh, et al. (2002). "Oxidative stress and its role in skin disease." *Antioxid Redox Signal* 4(4): 665-73.

346. Tsao, C. C., J. Foley, et al. (2000). "CYP2C40, a unique arachidonic acid 16-hydroxylase, is the major CYP2C in murine intestinal tract." *Mol Pharmacol* 58(2): 279-87.
347. Tukey, R. H. and D. W. Nebert (1984). "Regulation of mouse cytochrome P3-450 by the Ah receptor. Studies with a P3-450 cDNA clone." *Biochemistry* 23(25): 6003-8.
348. Van den, B. M. (1994). "The toxicogenetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins." *Toxicol.*
349. van den Bosch, H., R. B. Schutgens, et al. (1992). "Biochemistry of peroxisomes." *Annu Rev Biochem* 61: 157-97.
350. van der Oost, J., C. von Wachenfeld, et al. (1991). "Bacillus subtilis cytochrome oxidase mutants: biochemical analysis and genetic evidence for two aa3-type oxidases." *Mol Microbiol* 5(8): 2063-72.
351. Vanden Berghe, W., L. Vermeulen, et al. (2003). "A paradigm for gene regulation: inflammation, NF-kappaB and PPAR." *Adv Exp Med Biol* 544: 181-96.
352. Vaziri, C., A. Schneider, et al. (1996). "Expression of the aryl hydrocarbon receptor is regulated by serum and mitogenic growth factors in murine 3T3 fibroblasts." *J Biol Chem* 271(42): 25921-7.
353. Vygodina, T. V., N. Capitanio, et al. (1997). "Proton pumping by cytochrome c oxidase is coupled to peroxidase half of its catalytic cycle." *FEBS Lett* 412(3): 405-9.
354. Wahl, G. M. and A. M. Carr (2001). "The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53." *Nat Cell Biol* 3(12): E277-86.
355. Wahl, S. M., D. A. Hunt, et al. (1988). "Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation." *J Immunol* 140(9): 3026-32.
356. Wan, Y. J., Y. Cai, et al. (2000). "Fatty acyl-CoAs inhibit retinoic acid-induced apoptosis in Hep3B cells." *Cancer Lett* 154(1): 19-27.
357. Wan, Y. J., Y. Cai, et al. (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated pathways are altered in hepatocyte-specific retinoid X receptor alpha-deficient mice." *J Biol Chem* 275(36): 28285-90.
358. Wang, G. L. and G. L. Semenza (1995). "Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1." *J Biol Chem* 270(3): 1230-7.
359. Wanner, R., S. Brommer, et al. (1995). "The differentiation-related upregulation of aryl hydrocarbon receptor transcript levels is suppressed by retinoic acid." *Biochem Biophys Res Commun* 209(2): 706-11.
360. Wilhelmsson, A., S. Cuthill, et al. (1990). "The specific DNA binding activity of the dioxin receptor is modulated by the 90 kd heat shock protein." *Embo J* 9(1): 69-76.
361. Williams, G. M., M. J. Iatropoulos, et al. (1996). "Chemical carcinogen mechanisms of action and implications for testing methodology." *Exp Toxicol Pathol* 48(2-3): 101-11.
362. Wolfrum, C., T. Borchers, et al. (2000). "Binding of fatty acids and peroxisome proliferators to orthologous fatty acid binding proteins from human, murine, and bovine liver." *Biochemistry* 39(46): 14363.
363. Wong, G., T. Itakura, et al. (1989). "Gene family of male-specific testosterone 16 alpha-hydroxylase (C-P-450(16 alpha)) in mice. Organization, differential regulation, and chromosome localization." *J Biol Chem* 264(5): 2920-7.
364. Yamamoto, N., S. Akiyama, et al. (1997). "Smad1 and smad5 act downstream of intracellular signalings of BMP-2 that inhibits myogenic differentiation and induces osteoblast differentiation in C2C12 myoblasts." *Biochem Biophys Res Commun* 238(2): 574-80.
365. Yang, S. D., S. C. Lee, et al. (1997). "Heat stress induces tyrosine phosphorylation/activation of kinase FA/GSK-3 alpha (a human carcinoma dedifferentiation modulator) in A431 cells." *J Cell Biochem* 66(1): 16-26.
366. Yang, S. Q., H. Z. Lin, et al. (1997). "Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6): 2557-62.
367. Yoshida, R., A. Sanchez-Bueno, et al. (1997). "Ca²⁺-dependent, Fas- and perforin-independent apoptotic death of allografted tumor cells by a type of activated macrophage." *J Immunol* 159(1): 15-21.
368. Younossi, Z. M., T. Gramlich, et al. (1999). "Hepatic iron and nonalcoholic fatty liver disease." *Hepatology* 30(4): 847-50.
369. Yu, J. C., Z. M. Jiang, et al. (1999). "Glutamine: a precursor of glutathione and its effect on liver." *World J Gastroenterol* 5(2): 143-146.
370. Yu, Z., B. N. Ford, et al. (2000). "Identification of genes responsive to BPDE treatment in HeLa cells using cDNA expression assays." *Environ Mol Mutagen* 36(3): 201-5.
371. Yu, Z., L. M. Huse, et al. (2000). "Increased CYP2J expression and epoxyeicosatrienoic acid formation in spontaneously hypertensive rat kidney." *Mol Pharmacol* 57(5): 1011-20.
372. Yuan, L. and A. H. Neufeld (2000). "Tumor necrosis factor-alpha: a potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head." *Glia* 32(1): 42-50.
373. Zamzami, N., P. Marchetti, et al. (1996). "Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis." *FEBS Lett* 384(1): 53-7.
374. Zamzami, N., S. A. Susin, et al. (1996). "Mitochondrial control of nuclear apoptosis." *J Exp Med* 183(4): 1533-44.
375. Zawia, N. H. and G. J. Harry (1996). "Developmental exposure to lead interferes with glial and neuronal differential gene expression in the rat cerebellum." *Toxicol Appl Pharmacol* 138(1): 43-7.

376. Zhang, G. X., H. Xu, et al. (2002). "The role of IL-12 in the induction of intravenous tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* 168(5): 2501-7.
377. Zhang, Y. and R. Derynck (1999). "Regulation of Smad signalling by protein associations and signalling crosstalk." *Trends Cell Biol* 9(7): 274-9.
378. Zhu, Y., C. Qi, et al. (1996). "Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma." *Gene Expr* 6(3): 185-95.
379. Zhu, Y. F., C. N. Chung, et al. (1996). "The study of 2,3,4-trihydroxyacetophenone and 2,4,6-trihydroxyacetophenone as matrices for DNA detection in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." *Rapid Commun Mass Spectrom* 10(3): 383-8.