

Abb. 7.4. *Serial analysis of gene expression (SAGE)* (nach <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/NAWBIS/Modules/Expression/exp82.html> mit freundlicher Genehmigung von Mark E. Minie, Seattle, WA, USA, und dem NCBI Advanced Workshop for Bioinformation Specialists)

Messung von Expressionsprofilen mittels cDNA-Arrays: cDNA-Proben in einer Länge von 200-400 Basenpaaren werden automatisiert auf einem festen Träger immobilisiert. Danach wird mit mRNA des Untersuchungsmaterials hybridisiert. Fragmente mit 200 bp zeigen stabile Hybridisierungseigenschaften unabhängig von SNPs und variierendem GT-

Gehalt. Bei Fragmenten über als 400 bp können Kreuzhybridisierungen durch repetitive Elemente und unspezifische Interaktionen auftreten. Eine Länge von 200-400 bp ist ausreichend, um auch einzelne Gene großer Genfamilien mit hohem Homologiegrad zu unterscheiden (z.B. Cytochrom-P450-Enzyme). Neben **cDNA-microarrays** gibt es **Oligonukleotid-arrays**. Die Proben haben eine Länge von 50-70 Basen. In Hochdurchsatz-Analysen werden Oligonukleotid-arrays bevorzugt, für eine exakte Quantifizierung der mRNA-Expression eignen sich cDNA-arrays. Für die Auswertung werden bioinformatische Methoden wie z.B. Cluster-Analyse oder *self-organizing maps* verwendet. *Microarrays* werden nicht nur zur Messung der mRNA verwendet, sondern auch um Polymorphismen (s. Kap. 7.1) zu detektieren. Ein Beispiel ist in **Abb. 7.5** dargestellt.

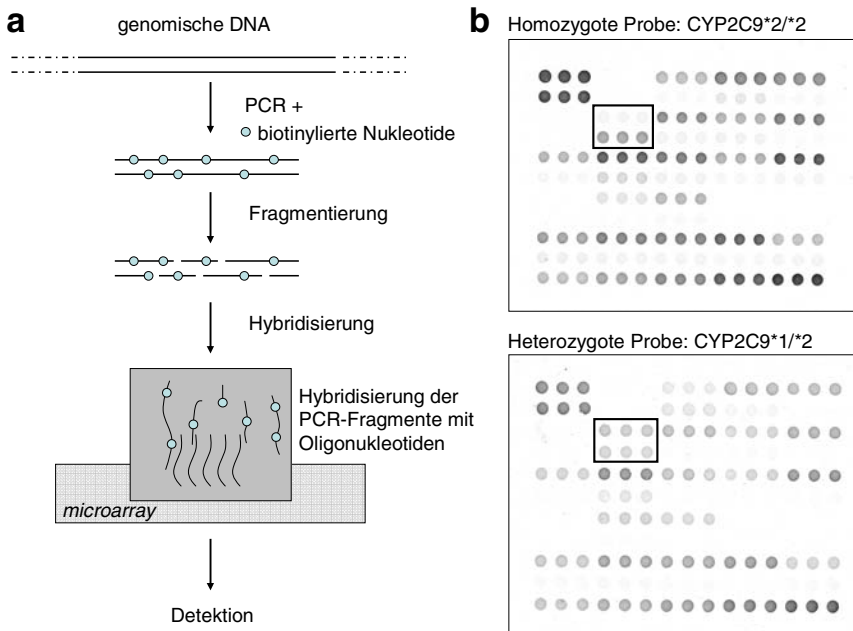


Abb. 7.5. *Microarrays* zum Nachweis genetischer Polymorphismen. **a** Über eine Polymeraseketten-Reaktion (PCR) wird die gewünschte Sequenz aus der genomischen DNA amplifiziert und mit biotinylierten Nukleotiden markiert. Die PCR-Produkte werden enzymatisch fragmentiert und mit dem *microarray* hybridisiert. Der *microarray* enthält die immobilisierten Wildtyp- und polymorphen Oligonukleotid-Sequenzen für therapeutisch relevante Gene wie z.B. CYP-Gene. **b** *Microarray*-Hybridisierungen von Patientenproben mit homozygotem CYP2C9*2/*2 (oben) und heterozygotem CYP2C9*1/*2 (unten) (Abb. von Jose Remacle, Namur, Belgien)

Anwendung: Es werden Profile der Genexpression oder von Polymorphismen erstellt, welche pharmakologische oder toxische Effekte einer Substanz widerspiegeln. Die Profilbildung verschiedener Substanzklassen wird bestimmten pharmakologischen und toxischen Mechanismen zugeordnet. Die grundlegende Idee ist, dass veränderte Genexpressionen oder Polymorphismen die frühesten messbaren Veränderungen in Zellen und Geweben nach toxischer Exposition darstellen.

Hohe Toxizität ist die häufigste Ursache, warum neue Substanzen aus der Arzneimittelentwicklung herausfallen. Häufig wird dies erst relativ spät im Entwicklungsprozess nach Abschluss der präklinischen Phase bei klinischen Studien festgestellt. Im schlimmsten Fall tauchen nicht akzeptable Nebenwirkungen sogar erst auf, wenn das Medikament zugelassen und auf dem Markt ist. Beispiele aus der Vergangenheit sind z.B. Contergan oder Baycoll. Die Hoffnung ist, dass man mit Hilfe toxikogenomischer Methoden toxische Effekte und ihre molekularen Wirkmechanismen frühzeitig während der präklinischen Untersuchungen vorhersagen kann, um potentiell toxische Substanzen aus der Entwicklung herauszunehmen.

7.2.3 Proteomik

Das Proteom ist schätzungsweise 3 - 10-mal größer als das Genom. Diese Variabilität wird durch kovalente Modifikationen, Zell-Zell-Interaktionen, Protein-Protein- und Protein-Ligand-Interaktionen verursacht. Da solche Modifikationen die Proteinfunktionen regulieren, ist das Proteom dynamisch. Das Genom dagegen weitgehend statisch. Es lassen sich zwei Richtungen proteomischer Analysen verfolgen:

- Die quantitative Erfassung der gesamten Proteinexpression eines Gewebes oder einer Zelle (**Expressionsproteomik**) (**Abb. 7.6**). Es lassen sich Signalwege unter physiologischen und pathologischen Bedingungen, der Einfluss von Arzneimitteln auf die Proteinexpression, neue Krankheitsmarker und ähnliche Fragestellungen untersuchen.
- Die subzelluläre Lokalisierung von Proteinen sowie Protein-Protein-Interaktionen. Die systematische Identifizierung von Proteinkomplexen erlaubt die Kartierung zellulärer Funktionseinheiten verschiedener Proteine. Diese Forschungsrichtung heißt *cell-map proteomics*.

Trennung und Fraktionierung von Proteinen: Die **zweidimensionale Gelelektrophorese** kann mehrere tausend Proteinspots voneinander trennen und erlaubt die Bestimmung des Molekulargewichtes und des isoelektrischen Punktes (pI) sowie die Auftrennung von Isoformen. Die **Flüssigkeitschromatographie** eignet sich zur Auftrennung mäßig komplexer

Molekulare Pharmakologie und Toxikologie
Biologische Grundlagen von Arzneimitteln und Giften
Efferth, Th.
2006, X, 328 S. 72 Abb., Softcover
ISBN: 978-3-540-21223-2