

Aus dem Institut für Toxikologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr.sc.techn. W. Lutz

Gentoxizität durch hormonell stimulierte Proliferation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Britta Birgit Semmel
aus Hösbach

Würzburg, August 2005

Referentin: Frau Professor Dr. H. Stopper

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. W. Fischer

Dekan: Prof. Dr. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 25.Juli 2006

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern
in Liebe
und Dankbarkeit.

1.	Einleitung	1
1.1.	Allgemeine Einführung	1
1.1.1.	Krebs	1
1.1.1.1.	Unterschiede zwischen malignen und benignen Tumoren	1
1.1.1.2.	Entstehung	1
1.1.2.	Hormone und Krebs	3
1.1.2.1.	Östradiol	3
1.1.2.2.	Epidermal growth factor (EGF)	5
1.1.2.3.	Insulin-like growth factor I (IGF-I)	6
1.1.2.4.	Insulin	7
1.1.3.	Zellzyklus und Zellteilung	8
1.1.3.1.	Allgemeines	8
1.1.3.2.	Zellzyklus und Krebs	9
1.1.3.3.	DNA-Schädigung und –Reparatur	10
1.1.4.	Hormone und Zellzyklus	13
1.2.	Hintergrund und Fragestellung dieser Arbeit	13
1.3.	Vorstellung der verwendeten Testsysteme	15
1.3.1.	Zellkultur	15
1.3.1.1.	BG-1-Zellen	15
1.3.1.2.	UCI-107-Zellen	15
1.3.2.	In vitro Mikrokern-Test	16
1.3.3.	Inhibierung der Zytokinese	17
1.3.4.	Zellzyklusanalysen	17
2.	Experimentalteil	18
2.1.	Material	18
2.1.1.	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	18
2.1.2.	Arbeitgeräte	19
2.2.	Zellwachstum	20
2.2.1.	Humane östrogensensitive Ovarialkarzinomzelllinie BG-1	20
2.2.1.1.	Erhalt der Zellkultur	20
2.2.1.2.	Proliferationsexperimente	21
2.2.2.	Humane östrogeninsensitive Ovarialkarzinomzelllinie UCI 107	21
2.2.2.1.	Erhalt der Zellkultur	22
2.2.2.2.	Proliferationsexperimente	22
2.3.	Gentoxizitätstest	23
2.3.1.	In vitro Mikrokerntest in humanen Ovarialkarzinomzelllinien	23
2.3.2.	Kernteilungsassay	24
2.3.3.	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung (Nachweis von Kinetochorproteinen)	25
2.4.	Bestimmung der Expression von Zellzyklusregulationsproteinen und DNA-damage-repair-Proteinen mittels Western-Blot	26
2.4.1.	Herstellung der Zelllysate	26
2.4.2.	Proteinbestimmung	27
2.4.3.	Herstellung der Gele	28
2.4.4.	Gelelektrophorese	29
2.4.4.1.	Prinzip	29
2.4.4.2.	Vorbereitung des Polyacrylamid-Gels	29
2.4.4.3.	Vorbereitung der Proben	29
2.4.4.4.	Gellauf	29
2.4.5.	Blotten	30
2.4.5.1.	Prinzip	30

2.4.5.2.	Vorbereitung	30
2.4.6.	Blocken	30
2.4.7.	Färben der Proteine mit Antikörpern	31
2.4.8.	Entwicklung der Membranen	32
2.4.9.	Auswertung der Membranen	32
2.4.10.	Strippen der Membran	33
2.4.11.	Färben der Gele mit Coomassie-Blue	33
2.5.	Zellzyklusanalyse	34
3.	Ergebnisse	36
3.1.	Proliferationsversuche	36
3.1.1.	Proliferationssteigerung durch Östradiol	36
3.1.2.	Proliferationssteigerung durch EGF, IGF und Insulin	37
3.1.2.1.	BG-1-Zellen	37
3.1.2.2.	UCI-Zellen	40
3.2.	Gentoxizitätstest	42
3.2.1.	Mikrokerninduktion	42
3.2.1.1.	BG-1-Zellen	42
3.2.1.2.	UCI-Zellen	47
3.2.2.	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	48
3.3.	Inhibierung der Zytokinese	49
3.3.1.	BG-1-Zellen	50
3.3.2.	UCI-Zellen	52
3.4.	Westernblot	54
3.4.1.	Langzeitversuche	54
3.4.1.1.	Östradiol	54
3.4.1.2.	IGF	62
3.4.2.	Kurzzeitversuche	68
3.4.2.1.	Östradiol	69
3.4.2.2.	Insulin	74
3.5.	Zellzyklusanalysen	80
4.	Diskussion	83
5.	Zusammenfassung	96
6.	Literaturverzeichnis	100
7.	Anhang	105
7.1.	Proliferationsexperimente	105
7.1.1.	Proliferationssteigerung durch Östradiol	105
7.1.2.	Proliferationssteigerung durch EGF, IGF und Insulin	105
7.1.2.1.	BG-1-Zellen	105
7.1.2.2.	UCI-Zellen	106
7.2.	Gentoxizitätstests	107
7.2.1.	Mikrokerninduktion	107
7.2.1.1.	BG-1-Zellen	107
7.2.1.2.	UCI-Zellen	109
7.2.2.	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	110
7.3.	Inhibierung der Zytokinese	110
7.3.1.	BG-1-Zellen	110
7.3.2.	UCI-Zellen	112
7.4.	Westernblot	114
7.4.1.	Langzeitversuche	114
7.4.1.1.	Östradiol	114

7.4.1.2.	IGF	116
7.4.2.	Kurzzeitversuche	119
7.4.2.1.	Östradiol	119
7.4.2.2.	Insulin	121
7.5.	Zellzyklusanalysen	122
7.5.1.	IGF	122
7.5.2.	EGF	123
7.5.3.	Östradiol und Insulin	124
7.5.3.1.	Östradiol	124
7.5.3.2.	Insulin	125

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Einführung

1.1.1. Krebs

Mit dem Begriff „Krebs“ bezeichnet man eine bösartige Neubildung (Tumor), im eigentlichen Sinn ist das Karzinom gemeint (Pschyrembel, 1998).

Die Kanzerogenese, also die Entwicklung einer malignen Tumorzelle aus einer gesunden Körperzelle, ist ein Prozess, der durch verschiedenste Ursachen bedingt über lange Zeit hinweg in mehreren Stufen abläuft. Dabei überschreitet die Zelle die Grenze zwischen gutartiger und bösartiger Veränderung.

1.1.1.1. Unterschiede zwischen malignen und benignen Tumoren

Die Entwicklung eines malignen Tumors aus einer benignen Veränderung erfolgt durch weitgehenden Verlust der gewebsspezifischen Differenzierung. Dadurch reagieren maligne Tumorzellen nicht mehr auf Signale des Organismus und zeigen eine verminderte „drug sensitivity“, so dass sie unabhängig von Wachstumssignalen schnell proliferieren, infiltrativ wachsen und durch Proteasen die Basalmembran des Ursprungsgewebes zerstören (Greim und Deml, 1996; Hartwell und Kastan 1994; Liotta und Kohn 2001; Nowell, 1976). Dies ermöglicht malignen Tumoren im Gegensatz zu benignen Tumoren die Bildung von Fernmetastasen über Streuung durch Blut, Lymphe oder die Ausbreitung per continuitatem.

1.1.1.2. Entstehung

Die Entwicklung einer malignen Läsion aus benignen Veränderungen ist ein Prozess, der erst mit einer Latenzzeit von Jahren bis zu Jahrzehnten in Erscheinung tritt (Greim und Deml, 1996; Barrett, 1993; Nowell, 1976). Dabei durchläuft die Zelle und mit ihr das tumoröse Gewebe mehrere morphologische Stufen. Von normalem Wachstum erreicht die Zelle über diverse benigne Zwischenschritte, beispielsweise die der Hyperplasie und Dysplasie, schließlich das Stadium der Neoplasie. Während die Zellen im hyperplastischen Stadium noch von Signalen des Körpers, zum Beispiel der Stimulation durch Hormone, abhängig sind, ist die Neoplasie dagegen durch autonomes Wachstum gekennzeichnet (Barrett, 1993; Henderson et al., 1982).

Nowell stellte bereits 1976 die These auf, dass alle Tumoren monoklonalen Ursprungs seien, das heißt, dass sie aus einer einzigen ursprünglich gesunden Zelle hervorgehen. Auch wenn

ein Karzinogen auf mehrere Zellen wirke und sie so initiiere, entstehe nur aus einer Zelle der eigentliche Tumor.

Die Kanzerogenese ist ein mehrstufiger Prozess, der in drei Stadien unterteilt werden kann: die Initiation, die Promotion und die Progression.

Bei der Initiation wird durch ein Karzinogen ein irreversibler DNA-Schaden induziert. Die Veränderung entspricht also einer somatischen Mutation. Sie wird durch Agenzien ausgelöst, die direkt oder indirekt mit der DNA interagieren und sie modifizieren. Dies führt meist zu einer veränderten Genexpression. Initiierende Karzinogene sind beispielsweise ionisierende Strahlung oder polyzyklische Kohlenwasserstoffe.

Die nachfolgende Promotion ist ein Prozess, der die Entstehung des Tumors beschleunigt. Dabei kommt es zur klonalen Expansion der initiierten Zelle. Durch die Proliferationssteigerung erhöht sich zusätzlich das Risiko weiterer Mutationen, die hieraus resultierende Läsion ist jedoch meist noch benigne. Als Promotoren bezeichnete Karzinogene wirken dementsprechend proliferativ und üben keinen direkten Einfluss auf die DNA aus. Beispiele für promovierend wirkende Karzinogene sind Hormone oder einige virale Erreger.

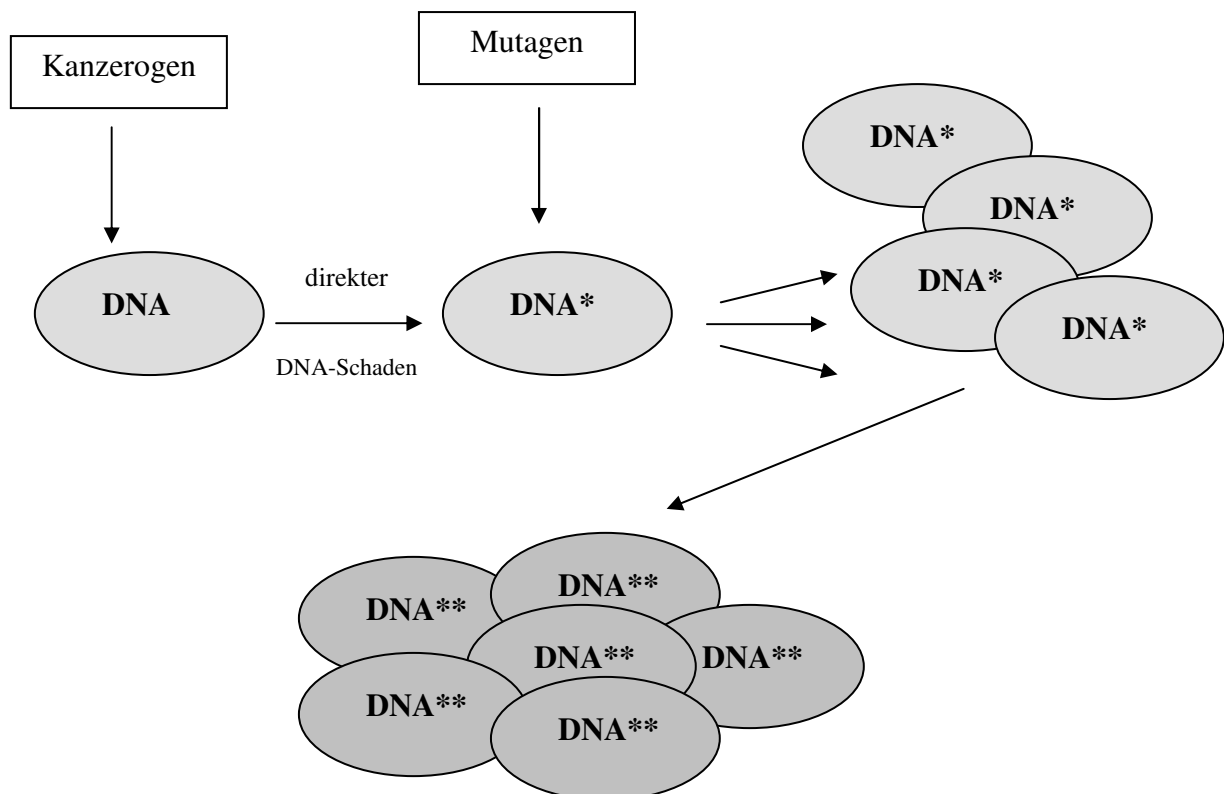


Abbildung 1 Prozess der Kanzerogenese. Durch Karzinogene wird die Zelle initiiert, aus einer gesunden Zelle entsteht eine Zelle mit DNA-Schaden. Mutagene bewirken eine Proliferation der initiierten Zelle, was mit dem Begriff Promotion gekennzeichnet ist. Aus dem hier meist noch benignen Tumor(*) wird im Rahmen der Progression durch weitere Mutationen ein maligner Tumor(**).

Durch weitere Mutationen entsteht aus dem benignen Tumor in der Phase der Progression schließlich eine maligne Neoplasie. Welche Faktoren oder Substanzen als Progressoren eine Rolle spielen, ist noch nicht geklärt. Man geht jedoch davon aus, dass drei bis zehn Mutationen nötig sind, um eine benigne Zelle entarten zu lassen (Barrett, 1993; Greim und Deml, 1996). Durch diese Vorgänge verlieren die Tumorzellen ihre Abhängigkeit vom Wirt und können autonom vom restlichen Organismus wachsen und sich verbreiten.

1.1.2. Hormone und Krebs

1995 machten die hormonabhängigen Karzinome in den USA einen Anteil von 35% bei den Männern und sogar von 40% bei den Frauen aus (Wingo et al., 1995). Zu den hormonabhängigen Karzinomen zählt man die Karzinome der Mamma, des Endometriums, des Ovars, der Prostata, der Hoden, der Schilddrüse und das Osteosarkom.

Epidemiologische und endokrinologische Studien zeigten, dass endogene Hormone, die physiologischerweise diese Gewebe regulieren, die Inzidenz von Neoplasien in diesen Geweben steigern können. Auch in Tierversuchen konnte die Inzidenz hormonabhängiger Karzinome durch Gabe hoher Dosen der Hormone gesteigert werden (Henderson et al., 1982).

Bei der Kanzerogenese durch Hormone kommen zwei verschiedene Mechanismen in Betracht: Hormone können zum einen direkt die DNA schädigen, beispielsweise durch Bildung von DNA-Addukten oder toxischen Metaboliten. Sie werden dann als genotoxische Karzinogene klassifiziert. Zum anderen können Hormone epigenetisch wirken. Epigenetische Karzinogene weisen keine direkte Reaktion mit der DNA auf. Sie besitzen aber Eigenschaften, durch die sie auf die Kanzerogenese Einfluss nehmen können, beispielsweise durch Steigerung der Zellproliferation und damit Promotion einer initiierten Zelle (Liehr, 2000; Barrett, 1993; Marquardt und Schäfer, 1994).

1.1.2.1. Östradiol

Östradiol zählt zu den Steroidhormonen. Diese können durch Zellmembranen diffundieren und an zytoplasmatische Rezeptoren binden. Der Ligand-Rezeptor-Komplex gelangt durch die Kernporen in den Zellkern, wo die Steroide mit der DNA Komplexe bilden und so die DNA-Expression alternieren (Ahmad et al., 2000). Dies kann zu einer Aktivierung von Proto-Onkogenen und Wachstumsfaktor-Signaltransduktionswegen führen, die schließlich in gesteigerter Proliferation münden (Kenemans und Bosman, 2003). Durch diese Proliferationssteigerung wirkt Östrogen als promovierendes Karzinogen.

Schon seit mehreren Jahren wird die kanzerogene Wirkung von 17 β -Östradiol diskutiert. Östradiol erhöht die Inzidenz von Karzinomen in der Brust, im Uterus, in der Cervix, in der Vagina und in den Lymphdrüsen. Zum Teil gilt dies für Versuche an Mäusen, zum Teil aber auch für den Menschen (Preston-Martin et al., 1990; Liehr, 2000).

Epidemiologische Daten unterstützen diese Ergebnisse: Als Risikofaktoren für ein Mamma-Karzinom gelten frühe Menarche und späte Menopause, was die Anzahl der ovulatorischen Zyklen und damit die Gesamtexpositionsdauer von Östrogenen auf Brustgewebe erhöht. Auch Übergewicht gilt als Risikofaktor, erklärbar durch die Östrogenproduktion des Fettgewebes. Weiterhin spielt auch die Östrogengabe mit Kontrazeptiva oder im Rahmen einer Hormonersatztherapie (HET) eine Rolle. So steigen bei alleiniger Gabe von Östrogenen sowohl das Endometriums- als auch das Mamma-Karzinomrisiko. Durch gleichzeitige Gabe von Progesteron sinkt zwar die Inzidenz von Endometriumskarzinomen, die von Mammakarzinomen steigt jedoch sogar im Vergleich zu alleiniger Östrogengabe (Peto, 2001; Chen et al., 2002; Henderson et al., 1982; Gambacciani et al., 2003; Kenemans und Bosman, 2003).

Bei der Entstehung eines Mamma-Karzinoms spielen also sowohl die exogene Hormonzufuhr, beispielsweise im Rahmen einer HET, als auch endogene erhöhte Östradiolkonzentrationen, beispielsweise durch Adipositas, eine Rolle. Entscheidend ist in beiden Fällen ein Hormonexzess.

Obwohl Östradiol in klassischen Mutagenitätstests wie beispielsweise dem Ames-Test nicht mutagen wirkt (Lang und Redmann, 1979), zeigten verschiedene Autoren jedoch karzinogene Wirkungen von Östradiol mit diversen anderen Methoden auf.

1996 beschrieben Eckert und Stopper chromosomale Veränderungen in V79-Zellen nach Behandlung mit Östradiol, sichtbar in einer erhöhten Mikrokernrate sowie in den Mikrokernen enthaltenen Kinetochoren. Hundal et al. zeigten 1997 einen Anstieg der Chromosomenaberrationen und Schwesterchromatid-Austauschrate bei mit diversen Östrogenen behandelten menschlichen Lymphozyten. Zudem beobachteten sie einen Anstieg der Mikrokernrate. Fischer et al. bestätigten 2001 die Erhöhung der Mikrokernrate durch Zugabe von Östradiol bei MCF-7-Zellen, 2003 erzielten Stopper et al. mit BG-1-Zellen ähnliche Ergebnisse.

Ahmad et al. (2000) wiesen eine klastogene Wirkung von Östradiol in menschlichen Lymphozyten nach. Am häufigsten konnten sie Chromatid- und Chromosomenfragmente und -brüche nachweisen. Hodgson et al. (1998) beobachteten in durch Östrogen induzierten Nierentumoren an Hamstern Alterationen in DNA-Fragmenten, die CAG-repeats enthielten.

Roy und Liehr beschrieben 1999 eine Reihe von Mechanismen, über die Östrogene und deren Metaboliten die DNA schädigen. Dazu gehören die direkte kovalente Bindung von Östrogen-Quinon-Metaboliten an die DNA und die Produktion freier Radikale durch metabolisches Redox-Cycling mit nachfolgenden Strang-Brüchen, 8-Hydroxylierung der Purin-Basen und Lipid-Hydroperoxid-vermittelte DNA-Modifikationen. Dies deutet auf die Möglichkeit der Initiation durch Östrogen-Metabolite hin.

1.1.2.2. Epidermal growth factor (EGF)

EGF ist ein Peptidhormon, das durch Bindung an den EGF-Rezeptor eine ATP-abhängige Autophosphorylierung des Rezeptors in Gang setzt. Infolge dessen erhöht sich die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität und es entstehen Bindungsplätze für Eiweiße mit SH2-Domänen, also mit Domänen für Phosphotyrosin. Durch Aktivierung dieser Zielmoleküle werden Genexpression, Proteinsynthese und Zytoskelettaktivität sowie eine Erhöhung der Proliferationsrate über den MAP-Kinase-Signalweg reguliert (Kath et al., 1998; Wells, 1999; Santen et al., 2002).

Da EGF ein ubiquitär vorkommender Wachstumsfaktor ist und keine mit Überexpression einhergehende Krankheit ausreichend erforscht ist, kennt man keine Karzinome, die spezifisch auf eine Erhöhung der EGF-Konzentration zurückgeführt werden könnten. EGF spielt jedoch eine große Rolle bei der Entwicklung von Karzinomen aus vorgeschädigten Zellen. So promoviert EGF sowohl die virale als auch die chemische Kanzerogenese. Zudem wirkt EGF immunsuppressiv, was die Elimination geschädigter Zellen durch das körpereigene Abwehrsystem erschwert und so die Überlebensfähigkeit dieser Zellen erhöht (Stoscheck und King, 1986).

Der EGF-Rezeptor (EGFR) zeigt Homologien zum viralen Onkogen v-erbB und die Funktion der Tyrosinkinase des Rezeptors ähnelt der des Src-Onkogens. Bei einigen Karzinomen findet sich zudem eine erhöhte Expression des EGFR (Nahta et al., 2003; Wells, 1999).

In transformierten Zellen ermöglicht EGF deren Entwicklung zu Neoplasien: Durch EGF wird der partielle Verlust der dichteabhängigen Wachstumskontrolle induziert, was die Invasion der transformierten Zellen in gesundes Gewebe erleichtert. Ebenfalls mit der Entwicklung von Neoplasien assoziiert ist der durch EGF ausgelöste Anstieg des Gehalts von Phosphotyrosin in Proteinen sowie die Aktivierung des zellulären Metabolismus wie beispielsweise der ATP-turnover-Rate. Auch ein Anstieg der Proliferationsrate und damit die Progression transformierter Zellen zählen zu den kanzerogenen Mechanismen von EGF (Stoscheck und King, 1986).

1.1.2.3. Insulin-like growth factor I (IGF-I)

IGF-I ist ein Peptidhormon, das vor allem in der Leber, aber auch in jedem anderen Gewebe des Körpers gebildet wird. Nach Bindung an die extrazelluläre Domäne des IGF-IR kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors mit nachfolgender Autophosphorylierung. Die Tyrosinkinaseaktivität wird stimuliert und Effektormoleküle werden aktiviert.

Über den MAP-Kinase-pathway stimuliert IGF-I die Proliferation der Zellen und beschleunigt die Progression der Zellen durch den Zellzyklus. Über den Phosphatidylinositol-3-pathway verhindert IGF-I die Differenzierung und die Apoptose der Zelle. Zudem interagiert IGF-I zur Proliferationssteigerung mit Östradiol, welches die Expression des IGF-IR heraufreguliert. Durch höhere IGF-I-Level verschaffen sich neoplastische Zellen also einen Überlebensvorteil durch verstärkte Proliferation und verminderte Apoptose (LeRoith und Roberts, 2003; Moschos und Mantzoros, 2002).

Bei der Entstehung von hormonabhängigen Tumoren spielt neben den spezifisch auf das Gewebe einwirkenden Hormonen auch der Wachstumsfaktor IGF-I eine Rolle. Erhöhte IGF-I-Level, wie sie exzessiv bei der Akromegalie vorkommen, vergrößern das Risiko an einem Kolon-Karzinom zu erkranken. Da gesunde und kanzerös veränderte Zellen den IGF-I-Rezeptor (IGF-IR) exprimieren, wird vermutet, dass IGF-I sowohl praemaligne als auch maligne Stadien eines Tumors beeinflusst (Giovannucci, 2001; Starke, 2003).

Weiterhin scheinen gewisse Karzinome die Sekretion von IGF-I zu erhöhen. IGF-I wirkt dann sowohl endokrin als auch para- und autokrin. Erhöhte IGF-I-Level finden sich bei praemenopausalen Mammakarzinomen sowie bei Karzinomen der Prostata, des Ovars und der

Lunge (Starke, 2003; Lai et al., 2001; LeRoith und Roberts, 2003; Moschos und Mantzoros, 2002).

1.1.2.4. Insulin

Insulin wird in den B-Zellen des Pankreas gebildet. Das Peptidhormon wirkt wie die oben erwähnten Wachstumsfaktoren über einen Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität, über den verschiedene Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden.

Durch Insulin ausgelöst wird über den MAP-Kinase-pathway das Wachstum der Zellen gesteigert. Außerdem verhindert Insulin wie auch IGF-I die Differenzierung und Apoptose der Zellen. Dadurch wird ein Milieu geschaffen, in dem sich Risikofaktoren und deren genetische Veränderungen akkumulieren können, was die Inzidenz verschiedener Karzinome erhöht (Komninou et al., 2003; Giovannucci, 2001; Kath, 1998).

Eine Erhöhung der Insulinserumkonzentration findet sich im Rahmen der Alterskrankheit Diabetes mellitus Typ II. Hierbei kommt es zu einer Insulinresistenz der Gewebe und einer daraus resultierenden Hyperinsulinämie. Bei Patienten mit Hyperinsulinämie finden sich gehäuft Karzinome des Kolons, des Endometriums und der Niere. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Insulin auch ein potentes Mitogen für Mamma-Karzinom-Zellen darstellt (Starke, 2003; Lai et al., 2001; Komninou et al., 2003).

1.1.3. Zellzyklus und Zellteilung

1.1.3.1. Allgemeines

Die Zellteilung ist die wichtigste Voraussetzung für das Überleben eines Zellverbandes, denn nur durch Teilung wird der Bestand an Zellen aufrechterhalten und das Gewebe durch Differenzierung an neu entstandene Erfordernisse des Organismus angepasst (Evan und Vousden, 2001). Aus einer Zelle mit einfachem Chromosomensatz müssen zwei Tochterzellen mit ebenfalls einfachem Chromosomensatz entstehen. Dies erfordert einen Ablauf nach einem genau geordnetem Schema, dem Zellzyklus.

Der Zellzyklus besteht aus der M-Phase (Mitose und Zytokinese) und der Interphase. Die Interphase wird wiederum in drei Phasen (G1, S und G2) eingeteilt. In der M-Phase findet die Teilung des Zellkerns beziehungsweise des genetischen Materials (Mitose) mit nachfolgender Zytoplasmateilung (Zytokinese) statt. Die nachfolgende G1-Phase (G steht für „gap“) wird zur Vorbereitung der DNA-Replikation, zur Biosynthese von Zellorganellen und zum Wachstum genutzt. In der S-Phase wird die DNA akkurat genau einmal repliziert. Hier eventuell aufgetretene Fehler können in der G2-Phase repariert werden, an die sich wiederum die Mitose anschließt. In der G0-Phase befinden sich Zellen, die nicht mehr am Zellzyklus teilnehmen.

Für das Überleben des Organismus ist es unabdingbar, dass der Zellzyklus korrekt verläuft. Um dies zu gewährleisten, unterliegt die Zellteilung einer homöostatischen Kontrolle. Diese Aufgabe übernehmen cyclin-dependent protein kinases (CDKs), die „master controller“ (Jacks und Weinberg, 1998) der Zellteilung.

Die CDKs bestehen aus einer katalytischen Untereinheit, einer Serin/Threonin-Kinase (Cdk), und einer regulatorischen Untereinheit, den Cyclinen. Die verschiedenen Cycline werden spezifisch für bestimmte Zellzyklusphasen synthetisiert, durch Phosphorylierung modifiziert und degradieren nach Abschluss der spezifischen Phase, wodurch die Aktivität der CDKs reguliert werden kann. Ein weiterer Kontrollmechanismus sind CDK-Inhibitoren (CKIs), die spezifische Cyclin-CDK-Komplexe blockieren können (Grafi, 1998; Jacks und Weinberg, 1998; Hartwell und Kastan, 1994).

Die Aufgaben der CDKs sind die Aktivierung der DNA-Replikation zu Beginn der S-Phase, die Verhinderung der Re-Replikation und die Einleitung der Metaphase (Stillman, 1996).

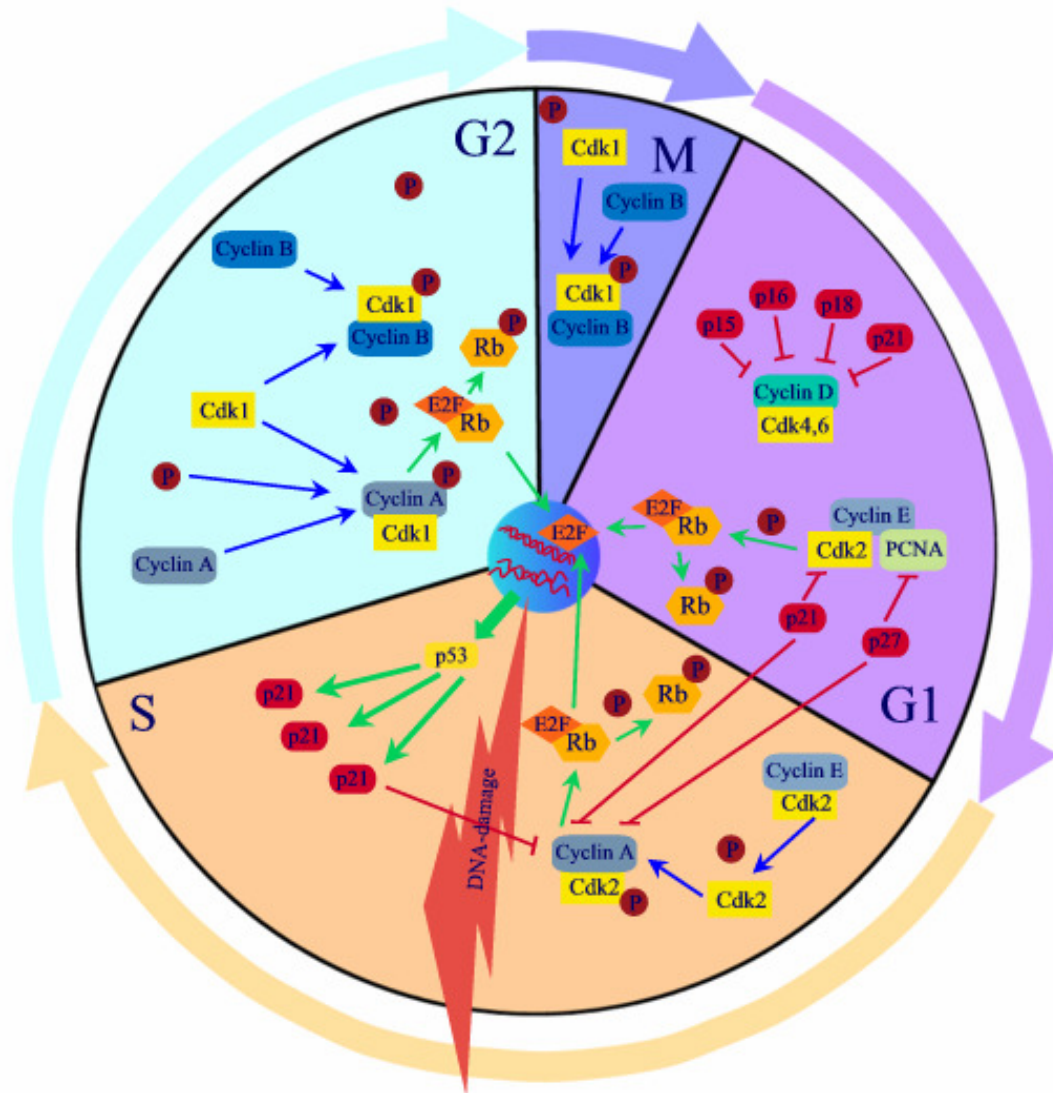


Abbildung 2 Dargestellt ist der Ablauf des Zellzyklus mit den wichtigsten Regulationsproteinen. In der G1-Phase reagiert vor allem Cyclin D auf mitogene Reize und reguliert die Transkription diverser Gene über E2F. Auch Cyclin E, wichtig für den Übergang in die S-Phase, wirkt über E2F. E2F bewirkt über Genregulierung einen Übergang in die S-Phase. In der S-Phase dissoziiert der Cyclin E/cdk2-Komplex, wodurch das freie Cdk2 an Cyclin A binden kann. In der G2-Phase wird Cyclin A durch cdk1 aktiviert. Am Ende der G2-Phase dissoziiert dieser Komplex wieder, und Cdk1 bindet an Cyclin B. Dieser Komplex, auch mitosis promoting factor (MPF) genannt, bewirkt die Kondensation des Chromatins und die Ausbildung des Spindelapparates und somit die Einleitung der Mitose.

Im Fall einer DNA-Schädigung wird p53 exprimiert, welches über p21 eine Inhibition diverser Cycline und damit eine Zellzyklusarrest bewirkt.

Abbildung modifiziert aus BD Biosciences Pharmingen 2003, S. 327

1.1.3.2. Zellzyklus und Krebs

In malignen Zellen ist die oben beschriebene Homöostase des Zellzyklus in Richtung Proliferation verschoben. Die Mitoserate der Zellen ist erhöht, die Apoptoserate erniedrigt. Tumorzellen weisen typischerweise Mutationen in Zellzyklusregulationsgenen auf. Diese Mutationen sind zum einen „gain-of-function“-Mutationen, bei denen normale zelluläre

Proto-Onkogene zu Onkogenen mutieren. Onkogene sind in Signaltransduktionswegen aktiv, die die Zellproliferation steuern. Zum anderen sind „loss-of-function“-Mutationen von Bedeutung, die Tumorsuppressorgene betreffen. Ein wichtiger Tumorsuppressor ist p53, der die Transkription von Proteinen für Wachstumsarrest, DNA-Reparatur, Apoptose und die Angiogenese inhibiert (Collins et al., 1997; Stewart und Pietenpol, 2001; Hartwell und Kastan, 1994).

Am häufigsten sind Zellzyklusregulatoren der G1-Phase mutiert. Diese Phase ist normalerweise abhängig von extrazellulären Signalen, insbesondere von Mitogenen. Nachdem Zellen unter Kontrolle von CDKs einen „restriction point“ in der späten G1-Phase durchlaufen haben, läuft die weitere Zellteilung unabhängig von extrazellulären Signalen. Durch Mutationen in G1-Regulatoren können Tumorzellen also die extrazelluläre Regulation umgehen und autonom proliferieren (Sherr, 1996).

1.1.3.3. DNA-Schädigung und –Reparatur

Um das „life time cancer risk“ zu erklären, reichen spontane Mutationen in den oben genannten Genen jedoch nicht aus: Oft sind Schädigungen von außerhalb verantwortlich für diese Mutationen. UV-Strahlung und ionisierende Strahlung sowie genotoxische Chemikalien sind nur einige der Mechanismen, die eine Änderung der DNA-Struktur hervorrufen können (Hoeijmakers, 2001). Doch gegen diese Schädigungen von außerhalb, denen der Organismus häufig ausgesetzt ist, existiert ein spezielles Reparatursystem.

Zellzyklus-Checkpoints sind biochemische Signalwege, die verschiedene von einander unabhängige Prozesse mit einander verknüpfen. Diese Checkpoints registrieren strukturelle Veränderungen der DNA und können einen Arrest im Zellzyklus, die Verlangsamung der Replikation, eine Erhöhung der Transkription bestimmter Replikations- und Reparaturenzyme sowie die Apoptose einleiten. Dies gewährleistet, dass die nächste Zellzyklusphase erst beginnt, wenn die vorhergehende korrekt und vollständig abgeschlossen ist (Elledge, 1996; Royer et al., 1999; Carr, 2002; Friedberg, 2003).

Im Wesentlichen unterscheidet man vier verschiedene Checkpoints. Der G1/S-Phasen-Checkpoint kontrolliert, ob die DNA intakt ist und überprüft die Fähigkeit der Zelle zur DNA-Replikation. Dieser Checkpoint verhindert die Replikation geschädigter DNA, indem im Falle einer Schädigung ein Zellzyklus-Arrest mit nachfolgender Reparatur eingeleitet wird.

Der Intra-S-Phase-Checkpoint blockiert bei DNA-Schädigung die „late origins“. Als Folge dessen kommt es zu einem verlangsamten Voranschreiten der Replikationsgabel und Reparatur der geschädigten Elemente.

Durch den G2/M-Phase-Checkpoint wird die korrekte und vollständige Replikation der DNA überprüft. Dadurch wird eine Chromosomensegregation im Falle einer inkompletten Replikation verhindert.

Der Spindel-Checkpoint inhibiert den Übergang in die Anaphase, bis alle Spindel-Mikrotubuli korrekt an den Kinetochoren der Chromosomen verankert sind. Auch wenn nur eine einzige chromosomale Verbindung fehlt, wird der Übergang in die Mitose verzögert (Luch, 2002; Elledge, 1996; Carr, 2002).

Die Checkpoints bestehen aus einem Netzwerk von Sensoren, Transduktoren und Effektoren. Über die Sensoren ist noch wenig bekannt, verschiedene Proteine wie PARP, PCNA-like-complex und BRCA1 stehen momentan im Fokus der Forschung (Zhou und Elledge, 2000).

Als Transduktoren dienen zwei parallele Wege, die auf unterschiedliche Arten von Schädigungen reagieren. Zum einen ist dies der ATM-pathway, der bei DNA-Doppelstrangbrüchen aktiviert wird, zum anderen der ATR-pathway, der auch auf Doppelstrangbrüche, aber auch auf Substanzen reagiert, die direkt mit der Funktion der Replikationsgabel interagieren. ATM und ATR sind PI3-verwandte Proteinkinasen mit einer C-terminalen Kinasedomäne, die Effektoren phosphorylieren können. Diese bewirken dann den Zellzyklus-Arrest (Osborn et al., 2002, Carr, 2002).

Am Beispiel des wichtigsten und am besten bekannten Effektors p53 soll dies verdeutlicht werden. p53 wird sowohl von ATM als auch von ATR via chk2 aktiviert und die Expression des Proteins wird bei Schädigung der DNA heraufreguliert.

p53 aktiviert zum einen die Expression von p21^{Cip1}, einem CKI. p21^{Cip1} wiederum bindet an diverse Cdk-Cyclin-Komplexe und inhibiert diese. Außerdem bindet p21^{Cip1} an das proliferating cell nuclear antigen (PCNA) und inaktiviert dieses, was eine Elongation der DNA verhindert. Dadurch wird ein Zellzyklus-Arrest vor allem in der G1/S-Phase erzielt. Zum anderen aktiviert p53 die Expression von GADD45, welches mit cdc2 interagiert und den Cdc2/CyclinB-Komplex dissoziiert. Das freie Cyclin B wird aus dem Kern hinaus transportiert und durch die Abwesenheit von Cyclin B wird cdc2 inhibiert, was einen Zellzyklusarrest in G2/M zur Folge hat.

Kann der DNA-Schaden von der Zelle nicht mehr repariert werden, so kann p53 über bax, fas und PIG-Gene die Apoptose einleiten (Stewart und Pietenpol, 2001; Sablina et al., 1998; Jin et al., 2002).

Zur Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität existieren verschiedene Reparatursysteme, die je nach Schädigung zum Einsatz kommen. Meist durch exogene Schädigung wie Röntgenstrahlung oder Sauerstoffradikale verursachte Einzelstrangbrüche oder Veränderungen der Basen werden durch das Basen-Exzisions-Reparatursystem eliminiert und die Lücken durch die DNA-Polymerasen β , δ und ϵ sowie PCNA wieder aufgefüllt. Sind komplette Nukleotide beispielsweise durch UV-Licht geschädigt, werden diese mit Hilfe des Nukleotid-Exzisions-Reparaturprogramms entfernt und mit Hilfe der normalen DNA-Replikationsenzyme korrekt wieder eingefügt.

Durch ionisierende Strahlung oder Chemotherapeutika wie zum Beispiel Mitomycin C (MMC) kann es zu Doppelstrangbrüchen oder cross-links zwischen den Strängen kommen. Diese werden mit Hilfe des recombinational repair, also durch homologe Rekombination oder durch end joining, wieder korrigiert.

Zuletzt kann schließlich auch bei der normalen DNA-Replikation ein Fehler auftreten, der meistens in einer falschen Basenpaarung (A-G- oder T-C-Mismatch) oder einer Insertion oder Deletion resultiert. Durch Proteine wie MSH2/6 werden diese Fehler erkannt, mit Hilfe einer Exonuklease entfernt und durch Polymerase korrekt wieder eingefügt (Hoeijmakers, 2001).

Anhand dieser weit verzweigten Signalwege wird deutlich, dass der Verlust oder die Veränderung eines einzigen Proteins fatale Folgen für den Gesamtorganismus haben können. Diese können zum einen den Zellzyklus, zum anderen die Reparaturenzyme betreffen. Ein Defekt in den Genen des Nukleotid-Exzisions-Reparatursystems ist bei der Krankheit Xeroderma pigmentosum bekannt, die mit einer erhöhten Tumorzinzidenz einhergeht. Auch bei der Ataxia teleangiectasia, bei der das ATM-Gen mutiert ist, ist die Tumorzinzidenz erhöht. Ebenfalls kann der Verlust von CKIs wie p21^{Cip1} eine Karzinomentstehung nach Exposition mit schädlichen Substanzen beschleunigen (Jackson et al., 2001; Friedberg, 2003). Zhou et al. konnten zeigen, dass Koffein die Aktivität des G2/M-Phasen-Checkpoints aufhebt, wodurch die Zellen empfindlicher gegenüber genotoxischen Agenzien oder ionisierender Strahlung wurden, da trotz DNA-Schädigung kein Zellzyklus-Arrest mehr eingeleitet werden konnte (^bZhou et al., 2000).

1.1.4. Hormone und Zellzyklus

Die Erkenntnisse, dass verschiedene Hormone bei der Kanzerogenese eine Rolle spielen und dass Zellzyklusregulationsproteine in Tumorzellen verändert exprimiert werden, führte zu einer Reihe von Versuchen über die Wirkung von Hormonen auf den Zellzyklus.

Diethylstilbestrol (DES), ein synthetisches Stilbenöstrogen, ist schon lange als kanzerogenes Agens bekannt, das Aneuploidie erzeugt. Unter Gabe von DES zeigt sich aber auch eine dosisabhängige Akkumulation von p53 mit nachfolgendem Arrest der Zellen in der G1-Phase (Luch, 2002).

Lai et al. konnten 2001 Wirkungen von sowohl von Östradiol selbst, als auch von Insulin und IGF auf die Expression von Zellzyklusproteinen nachweisen. Alle drei Hormone steigerten die Expression von Cyclin D. Die Expression von Cyclin E und p21 wurde durch Insulin erhöht, durch Östradiol jedoch gesenkt, was zu einer Forcierung des Zellzyklus führte.

Dinda et al. verglichen 2002 die Wirkungen von Östradiol und T₃ auf Mamma-Karzinom-Zellen. Beide zeigen proliferationssteigernde Wirkungen und eine Erhöhung der Expression von p53 und pRb. Die nachgewiesenen Effekte zeigten sich abhängig vom Östrogenrezeptor.

Hormone scheinen also direkt Einflüsse auf den Zellzyklus zu nehmen, die zum Teil vergleichbar mit Veränderungen des Zellzyklus in Tumorzellen sind.

1.2. Hintergrund und Fragestellung dieser Arbeit

Aus diversen epidemiologischen Studien bezüglich der Kanzerogenität von Hormonen gibt es Hinweise, dass eine erhöhte Proliferationsrate der Zellen per se die Inzidenz für ein Karzinom erhöht. Erklärt wird dies mit der Tatsache, dass Einzelstrang-DNA anfälliger für Schädigung ist als Doppelstrang-DNA. Zudem wird in der Mitose die Möglichkeit zur Rekombination eröffnet, was zu tief greifenden genetischen Veränderungen führen kann. So kann eine Genduplikation zuvor nicht exprimierte Onkogene aktivieren. Auch im heterozygoten Zustand inaktive Tumorsuppressorgene werden durch homozygote Dominanz aktiv. Ein weiterer Aspekt ist die Tatsache, dass Zellen, die sich nicht teilen, also beispielsweise Nervenzellen oder Kardiomyozyten, keine Karzinome entwickeln (Ames und Gold, 1990; Preston-Martin et al., 1993).

Dies führt zur Aufstellung der Hypothese, dass eine gesteigerte Proliferationsrate zu genetischer Instabilität führt.

Mit Hilfe des Mikrokerntests konnten Fischer et al. (2001) eine erhöhte genetische Instabilität nach Stimulation der östrogenrezeptorpositiven humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mit 17- β -Östradiol nachweisen. Dabei zeigte sich eine Dosisabhängigkeit: Je höher die zugegebene Konzentration war, desto mehr proliferierten die Zellen und umso höher war die Mikrokernanzahl. Da dieser Effekt bei der östrogenrezeptornegativen Zelllinie MDA nicht auftrat, konnte ein genotoxischer Effekt ausgeschlossen werden.

In einer weiteren Studie wurden die Ergebnisse durch Übertragung auf die humanen Ovarialkarzinomzelllinien BG-1 (östrogenrezeptorpositiv) und UCI 107 (östrogenrezeptornegativ) bestätigt. Durch Zellzyklusanalysen konnte die Vermutung bestätigt werden, dass die genetische Instabilität durch eine Beschleunigung des Zellzyklus bedingt ist (Stopper et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit sollten die oben dargestellten Ergebnisse bestätigt, erweitert und die Hypothese der Assoziation von gesteigerter Proliferationsrate und genetischer Instabilität bekräftigt werden. Dazu wurden die humanen Ovarialkarzinomzelllinien BG-1 und UCI verwendet. Die Zellen wurden zur Bestätigung der vorangehenden Arbeiten mit 17- β -Östradiol und zur Erweiterung der Hypothese mit Insulin, epidermal growth factor (EGF) und insulin-like growth factor I (IGF-I) zur Proliferation stimuliert. Die genetische Instabilität wurde bei beiden Zelllinien mit dem Mikrokerntest detektiert.

Da in der Arbeit von Stopper et al. (2003) eine Veränderung der Zellzyklus-Anteile sowie der Zellzyklusdauer gefunden wurde, sollten die Effekte auf den Zellzyklus genauer untersucht werden. Eine Erklärung der erhöhten genomischen Instabilität fand sich in einem niedrigeren G2/M-Phasen-Anteil. Normalerweise werden in dieser Phase Schäden, die während der DNA-Replikation aufgetreten sind, repariert. Durch Stimulierung der Proliferation ist die Zelle jedoch möglicherweise nicht mehr in der Lage, entstandene Fehler zu bemerken und zu reparieren. Dies könnte durch Beeinflussung des Zellzyklus entstehen: Um die Proliferationssteigerung umzusetzen, könnten Reparaturenzyme in geringerer Zahl exprimiert werden als unter normalen Bedingungen, Mitogen-reaktive Cycline oder CDKs wären hingegen stärker exprimiert. Deshalb wurde die Expression verschiedener Zellzyklusregulations- sowie Reparaturproteine mit Hilfe des Western-Blots analysiert. Hierbei sollten Auswirkungen der gesteigerten Proliferationsrate auf die Proteine des Zellzyklus im Vergleich zu unbehandelten Zellen untersucht werden.

Weiterhin sollten Zellzyklusanalysen durchgeführt werden, um den Einfluss der hormonellen Stimulation auf die Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen und die Dauer der einzelnen Phasen zu untersuchen.

1.3. Vorstellung der verwendeten Testsysteme

1.3.1. Zellkultur

1.3.1.1. BG-1-Zellen

BG-1 (Bowman-Gray) – Zellen sind humane Ovarialkarzinomzellen, die einem epithelialen Karzinom entstammen. Sie besitzen Östrogen- und Progesteronrezeptoren und haben eine Verdopplungszeit von 20 bis 24 Stunden. In diversen Arbeiten wurde diese Zelllinie charakterisiert und als Model zur Untersuchung östrogenabhängigen Wachstums beschrieben. Weiterhin exprimieren BG-1-Zellen epidermal-growth-factor-Rezeptoren und insulin-like-growth-factor-I-Rezeptoren, so dass sie sich hervorragend zur Untersuchung hormonabhängiger Proliferationsstimulation eignen (Geisinger et al., 1989; Geisinger et al., 1990, Baldwin et al., 1998).

1.3.1.2. UCI-107-Zellen

Auch UCI 107– Zellen sind humane Ovarialkarzinomzellen, die einem epithelialen Karzinom entstammen. Im Vergleich zu BG-1 sind sie jedoch östrogenrezeptornegativ, besitzen jedoch einen Progesteronrezeptor. Die Verdopplungszeit beträgt 24 bis 36 Stunden. In einer Arbeit von Chatzistamou et al. wurde kein proliferationssteigernder Effekt von IGF-I auf UCI-107 beschrieben. Da in diesem Versuch jedoch geringere Konzentrationen IGF-I benutzt wurden und die Inkubationszeit kürzer war als in der vorliegenden Arbeit, wurden diese Zellen von uns trotzdem zur Untersuchung hormonabhängiger Proliferationssteigerung genutzt. Zudem dienten sie als Negativkontrolle der östrogenabhängigen Proliferationssteigerung (Gamboa et al., 1995, Chatzistamou et al., 2001).

1.3.2. In vitro Mikrokern-Test

In dieser Arbeit wurde der in vitro Mikrokern-Test zur Analyse der genetischen Instabilität verwendet. Mikrokerne sind Chromatin-enhaltende Elemente im Zytoplasma der Zellen, die von einer Doppelmembran mit Nukleoporen umgeben sind und mit dem Zellkern nicht in Verbindung stehen. Morphologisch besteht aber zum einen Identität der Mikrokerne mit dem Zellkern, jedoch sind Mikrokerne nur 1/10 bis 1/3 so groß wie der Kern. Zum anderen ist die Membran der Mikrokerne mit der Kernmembran vergleichbar (Stopper und Müller, 1997; Schiffmann und DeBoni, 1991).

Mikrokerne entstehen durch Ausschluss ganzer Chromosomen oder Chromosomenfragmente während der Zellteilung. Unabhängig vom Zeitpunkt einer genetischen Schädigung entstehen Mikrokerne nur während der Mitose. Die eigentlichen Mechanismen der Mikrokernbildung sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Diskutiert werden Störungen des Spindelapparates mit nachfolgender Chromosomenfehlverteilung oder eine Absonderung genetischen Materials, das durch Mutationen verändert wurde (Tucker und Barrett, 1986; Schmuck et al., 1988).

Da Mikrokerne genetisches Material enthalten, das in der nachfolgenden Mitose nicht repliziert wird, wird die Entstehung von Mikrokernen als Teilschritt zur Entwicklung einer Aneuploidie verstanden. Aneuploidie wiederum ist involviert in die Karzinomentstehung, so dass die Bildung von Mikrokernen als Hinweis auf eine maligne Entartung gewertet werden kann. Zudem zeigte sich, dass in Zellen mit Mikrokernen die Expression von p53 heraufreguliert wird. Über p53 wird nachfolgend ein Zellzyklus-Arrest oder die Apoptose eingeleitet, so dass über einen p53-vermittelten Checkpoint die Proliferation in Zellen mit Mikrokernen verhindert wird. Sind die Zellen jedoch nicht in der Lage, p53 zu bilden, findet sich in diesen Zellen eine erhöhte Mikrokernrate (Schiffmann und DeBoni, 1991; Sablina et al., 1998; Schuler et al., 1998). Dies alles deutet auf eine entscheidende Rolle der Mikrokerne in der Kanzerogenese hin.

Der Mikrokern-Test wurde entwickelt, um Substanzen auf ihre mögliche Genotoxizität zu untersuchen. Er ist wenig aufwändig in der Durchführung und leicht reproduzierbar. Zudem lässt sich über den Mikrokerntest die Genotoxizität von Substanzen, die durch nicht-direkte Art und Weise die DNA alterieren, nachweisen. Diese wären in klassischen Mutagenitätstests negativ (Stopper und Müller, 1997).

Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit der in vitro Mikrokern-Test als Verfahren zur Detektierung genetischer Instabilität verwendet.

1.3.3. Inhibierung der Zytokinese

Da Mikrokern nur in sich teilenden Zellen entstehen, ist es für die Quantifizierung der genetischen Instabilität wichtig, die Mikrokernrate auf Zellen zu normieren, die sich nach Zugabe der Testsubstanz gleich oft geteilt haben. Hierfür wird die Zytokinese-Block-Mikrokern-Technik verwendet.

Durch Zugabe von Cytochalasin B wird die Zellteilung gestoppt, es entstehen zweikernige Zellen. Diese enthalten zwei Kerne mit etwa gleicher Größe, die durch dünne Nukleoplasmabrücken verbunden sein können und sich eventuell überlappen (Fenech, 1993). Der Zytokineseblock wurde in dieser Arbeit zum einen als weiterer Parameter zur Messung der Proliferationsrate verwendet, indem das Verhältnis von zwei- zu einkernigen Zellen bestimmt wurde. Kulturen, die sich in der Zeit unter Cytochalasin-B-Einfluss schneller und öfter geteilt hatten, wiesen ein höheres Verhältnis auf als sich langsamer teilende Zellen. Zum anderen konnte die Induktion von Mikrokernen auf genau eine Zellteilung normiert werden.

1.3.4. Zellzyklusanalysen

Für Zellzyklusanalysen werden die Zellen mit einem DNA-spezifischen Fluoreszenzmarker versetzt. Die Menge der DNA ist also direkt proportional zur Intensität der gemessenen Fluoreszenz. Die Fluoreszenz, die von den Zellen ausgeht, wird im FACS-Scan gemessen und in Signale umgewandelt, die von einem Computer analysiert werden. So können Histogramme erstellt werden, anhand derer die Anteile der Gesamtpopulation in den verschiedenen Zellzyklusphasen ermittelt werden können. Der DNA-Gehalt von Zellen in der G2-Phase ist genau doppelt so groß wie der von Zellen in der G1/0-Phase. In der S-Phase liegt der DNA-Gehalt zwischen den Werten von G1/G0 und G2 und nimmt mit Voranschreiten der Replikation zu (Schipper et al., 1998, Murray und Hunt, 1993).

Aus der Gesamtzellzyklusdauer und dem Anteil der Zellpopulation in den jeweiligen Phasen kann schließlich die Länge der Phasen errechnet werden.

2. Experimentaltteil

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Qualität kommerziell erworben und stammten von Sigma Chemie (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Bio-rad (München), NatuTec (Frankfurt), ICN (Eschwege) oder Aldrich Chemie (Steinheim). Hochreines Lösungsmittel wurde aus der hauseigenen Reinstwasser-Anlage entnommen (Millipore System).

Puffer und Lösungen wurden autoklaviert oder über Millipore Filter (0.2 μm) sterilfiltriert.

Allgemeine Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden von Greiner (Nürtingen) und Eppendorf (Hamburg) bezogen.

Vorbehandeltes Medium wurde bei der Firma Hyclone (Bonn) erworben.

2.1.2. Arbeitgeräte

Autoklav	Melag Typ 23, Melag
Blot-Apparatur	Trans-Blot SD, Semi-dry transfer cell BioRAD (Power-supply: BioRAD)
Brutschrank	Heraeus
Coulter Counter	Z2, Coulter Electronics
Elektrophorese	Hoefer Scientific instruments, San Francisco (Power-supply: Pharmacia)
FACS-Scan	BD Biosciences LSR Kimmon Electrics US, Ltd.
Fotomaterial	Polaroidfilme Typ 667, Polaroid
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Gel-Apparatur	Hoefer Dual Gel Caster
Pipetten	Gilson, Eppendorf, Sarstedt
Schüttler	TYP KL 2 Edmund Bühler
Spektrophotometer	U-2000 Spectrometer, Hitachi
Sterile Werkbank	Biohazard
Sterilisator	Heraeus
Waage	Sartorius BP 120 D
Wasserbad	Memmert
Western-blot-Membran	Nitrocellulose, Schleicher & Schuell
Zellmikroskop	Nikon TMS
Zentrifugen	Hettich
Zytozentrifuge	Cytospin 3, Shandon

2.2. Zellwachstum

2.2.1. Humane östrogensensitive Ovarialkarzinomzelllinie BG-1

Diese Zelllinie wurde von Dr. S. Müller, NIEHS, USA, zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden als adhärenente Zellkultur bei 37°C und 5%CO₂-Atmosphäre kultiviert und alle drei bis vier Tage vereinzelt und neu ausgesät.

2.2.1.1. Erhalt der Zellkultur

Reagenzien: Voll-Medium: DMEM/F12 (Sigma; phenolrotfrei)
10% FBS (Sigma; hitzeinaktiviert 56°C, 30 min)
1% L-Glutamin
1% Natrium-Pyruvat
0,4 % Penicillin/Streptomycin

PBS/CMF-Puffer: 8,0 g Natriumchlorid
0,2 g Kaliumchlorid
0,575 g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat
0,2 g Kaliumhydrogenphosphat
ad 1000 ml Aqua dest.

EDTA-Lösung: 0,02% EDTA-Lösung (Sigma)

Zum Erhalt der Zellkultur wurden die Zellen alle drei bis vier Tage mit 5 ml PBS/CMF-Puffer gewaschen und anschließend mit 1ml 0,02% EDTA-Lösung versetzt. Nach etwa 5 Minuten Inkubation bei 37° C lösten sich die Zellen ab und konnten mit 4 ml frischem Vollmedium resuspendiert und vereinzelt werden. Danach wurden 15 ml der Zellsuspension in einer Konzentration von 60000 Zellen pro ml Medium in Zellkulturflaschen (T75; Greiner) ausgesät.

2.2.1.2. Proliferationsexperimente

Reagenzien:	Reduziertes Medium:	DMEM/F12 (Sigma; phenolrotfrei) 5% FBS-DCC (hitzeinaktiviert 56°C, 30 min; Dextran/Aktivkohle behandelt) 1% L-Glutamin 1% Natrium-Pyruvat 0,4 % Penicillin/Streptomycin
	PBS/CMF:	siehe Kapitel 2.2.1.1
	EDTA-Lösung:	0,02% EDTA-Lösung (Sigma)

Zur experimentellen Wachstumsbestimmung wurden 4 ml der Zellsuspension in Zellkulturflaschen (T25, Greiner) in einer Dichte von 50000 bis 60000 Zellen pro ml in reduziertem Medium ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 1 ml PBS/CMF-Puffer gewaschen und frisches reduziertes Medium mit den Testsubstanzen, gelöst in DMSO oder PBS/CMF-Puffer, zugegeben. Die Lösungsmittelendkonzentration übertraf dabei nicht 0,1%. Nach weiteren 96 Stunden wurde ein erneuter Mediumwechsel mit Zugabe von Testsubstanzen durchgeführt. Nach 144 Stunden Wachstum wurden erneut frische Testsubstanzen zugegeben. Nach 168 Stunden konnten die Zellen geerntet werden.

Die Zellen wurden dazu nach Abnahme des Mediums mit 1ml PBS/CMF Puffer gewaschen, um alle Mediumreste zu entfernen. Nach Zugabe von 0,5 ml EDTA-Lösung und etwa 5minütiger Inkubation bei 37° konnten die Zellen abgelöst werden. Die abgelösten Zellen wurden in 2,5 ml reduziertem Medium aufgenommen und resuspendiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Probe von 200 µl gezogen, mit isotoner Lösung auf 10 ml aufgefüllt und die Probe im Coulter Counter mehrmals gemessen. Die Ergebnisse wurden gemittelt und schließlich als Mittelwert dargestellt.

2.2.2. Humane östrogeninsensitive Ovarialkarzinomzelllinie UCI 107

Diese Zelllinie wurde von Dr. S. Müller, NIEHS, USA, zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden als adhärenente Zellkultur bei 37°C und 5%CO₂-Atmosphäre kultiviert und alle drei bis vier Tage passagiert und neu ausgesät.

2.2.2.1. Erhalt der Zellkultur

Reagenzien: Voll-Medium:	500 ml RPMI (Sigma; phenolrotfrei) 5% FBS (Sigma; hitzeinaktiviert 56°C, 30 min) 1% L-Glutamin 0,4% Penicillin/Streptomycin
PBS/CMF-Puffer:	siehe Kapitel 2.2.1.1
EDTA-Lösung:	0,02% EDTA-Lösung (Sigma)

Die Zellen wurden mit 5 ml PBS/CMF Puffer gewaschen, mit 1 ml 0,02% EDTA-Lösung 1-2 Minuten inkubiert und dann abgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit 4 ml frischem Medium resuspendiert, vereinzelt und in 15 ml Medium mit 25000 Zellen pro ml in Zellkulturflaschen (T75; Greiner) ausgesät.

2.2.2.2. Proliferationsexperimente

Reagenzien: Reduziertes Medium:	500 ml DMEM/F12 (Biochrom; phenolrotfrei) 5% FBS-DCC (hitzeinaktiviert 56°C, 30 min; Dextran/Aktivkohle behandelt) 1% L-Glutamin 0,4% Penicillin/Streptomycin
PBS/CMF:	siehe Kapitel 2.2.1.1
EDTA-Lösung:	0,02% EDTA-Lösung (Sigma)

Zur experimentellen Wachstumsbestimmung wurden 4 ml der Zellsuspension in Zellkulturflaschen (T25, Greiner) in einer Dichte von 50000 Zellen pro ml in reduziertem Medium ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert. 24 Stunden nach Aussaat wurden die Testsubstanzen zugegeben. Nach weiteren 72 Stunden wurde das Medium abgenommen und frisches reduziertes Medium mit Testsubstanzen zugegeben. 48 Stunden später wurden erneut frische Testsubstanzen zugegeben, nach weiteren 24 Stunden (insgesamt nach 168 Stunden Wachstum) wurden die Zellen geerntet.

Dazu wurden sie mit 1 ml PBS/CMF Puffer gewaschen und mit 0,5 ml 0,02% EDTA-Lösung nach 1-2minütiger Inkubation bei 37°C abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 2,5 ml Medium aufgenommen und gut vereinzelt. Die Zellzahl wurde anschließend durch mehrmaliges Messen im Coulter Counter bestimmt und die Ergebnisse gemittelt.

2.3. Gentoxizitätstest

2.3.1. In vitro Mikrokerntest in humanen Ovarialkarzinomzelllinien

Über den Mikrokerntest kann der Nachweis der DNA-Schädigung durch bestimmte Substanzen geführt werden. Mikrokerne sind DNA-Bruchstücke, die neben dem Kern separat im Zytosol liegen. Sie enthalten Chromatin und besitzen eine intakte Kernmembran. Durch Färbung werden sie mikroskopisch sichtbar und können quantifiziert werden.

Reagenzien: Methanol

PBS/CMF: siehe Kapitel 2.2.1.1

Sörensen-Puffer: 33 mM Na₂HPO₄

34 mM KH₂PO₄

pH-Wert 6,8

Acridin-Orange-Lösung: 62,5 µg Acridin-Orange /ml Sörensen-Puffer

Die Objektträger zur Auswertung der Mikrokernelzahl wurden nach den Wachstumsexperimenten hergestellt. Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst und sorgfältig vereinzelt. Durch eine Zytozentrifuge (1000 rpm für 5 Minuten) wurden die Zellen auf die Objektträger gebracht und diese mindestens zwei Stunden in -20°C kaltem Methanol fixiert.

Zur Auswertung wurden die Präparate vier Minuten mit Acridin-Orange gefärbt und anschließend zweimal für jeweils fünf Minuten in PBS/CMF-Puffer gewaschen. Nach dem Eindecken der Objektträger erfolgte die Auswertung an einem Fluoreszenzmikroskop mit 500-facher Vergrößerung.

Dabei wurden die Mikrokerne aus drei unabhängigen Experimenten von jeweils drei Objektträgern auf jeweils 1000 Zellen gezählt. Die Anzahl an mikrokernelhaltigen Zellen wurde als Mittelwert angegeben.

2.3.2. Kernteilungsassay

Zur Bestimmung der Proliferationsrate der Zellen und Normierung der Mikrokernrate auf genau eine Zellteilung wurde ein Kernteilungsassay durchgeführt. Dabei wurden durch Zugabe von Cytochalasin B, welches die Zellteilung, nicht jedoch die Kernteilung hemmt, doppelkernige Zellen erzeugt. Durch einfache Bestimmung des Verhältnisses aus einkernigen zu doppel-, drei- und vierkernigen Zellen erhält man ein Maß für die Proliferation. Durch Zählen der Mikrokerne in den Doppelkernigen Zellen erhält man die Mikrokernrate, die nach genau einer Zellteilung aufgetreten ist.

Reagenzien:	Reduziertes Medium:	siehe Kapitel 2.2.1.2
	PBS/CMF-Puffer:	siehe Kapitel 2.2.1.1
	Sörensen-Puffer:	siehe Kapitel 2.3.1
	Methanol	
	Acridin-Orange-Lösung:	siehe Kapitel 2.3.1
	Cytochalasin B:	2 µg Cytochalasin B (Sigma)/ml DMSO

Zur experimentellen Durchführung wurden BG-1-Zellen und UCI-Zellen in einer Dichte von 50 000 Zellen pro ml Medium in Zellkulturflaschen (T25; Greiner) ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS/CMF-Puffer gewaschen und reduziertes Medium mit den gelösten Testsubstanzen hinzugeben. Nach weiteren 72 Stunden wurde erneut das Medium gewechselt und frische Testsubstanz mit Cytochalasin B (2 µg/ml in DMSO gelöst) zugegeben. 24 Stunden später wurden die Zellen mit PBS/CMF-Puffer gewaschen und nach Ablösen mit 0,02% EDTA-Lösung die Zellzahl mittels des Coulter-Counters bestimmt.

Nachdem gewährleistet war, dass die Zellzahl nicht gestiegen war, wurden die Zellen durch eine Zytozentrifuge (1000 rpm; 5 min) auf Objektträger aufgebracht und mindestens 1 Stunde in Methanol bei -20°C fixiert. Zur mikroskopischen Auswertung wurden die Zellen mit Acridin-Orange vier Minuten gefärbt. Es folgten zwei jeweils fünfminütige Waschgänge in PBS/CMF-Puffer. Ausgewertet wurden zum einen 1000 Zellen pro Objektträger und der Anteil der Ein- und Zweikernigen bestimmt. Zum anderen wurden die Mikrokerne pro 1000 Doppelkernige ermittelt. Die Ergebnisse wurden gemittelt und als Mittelwerte dargestellt.

2.3.3. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung (Nachweis von Kinetochorproteinen)

Mikrokerne können entweder komplette Chromosomen oder Chromosomenbruchstücke enthalten. Die Unterscheidung dieser Schädigungen kann durch den Nachweis von Kinetochorproteinen in Mikrokernen erfolgen.

Hierzu werden die Kinetochore spezifisch mit antinukleären Antikörpern von Sklerodermie-Patienten (CREST-Serum) markiert und mit einem FITC-konjugierten Zweitantikörper (Ziege-anti-Mensch) sichtbar gemacht. So lässt sich abschätzen, ob die Substanz klastogen oder aneugen wirkt.

Reagenzien: PBS/CMF:	siehe Kapitel 2.2.1.1
2. Antikörper:	Ziege-anti-human IgG, (FITC konjugiert, 1:100 in PBS/CMF/0.5% Tween 20 verdünnt, Sigma)
CREST-Serum:	1. Antikörper (Antibodies Inc., USA)
Eindecklösung:	Antifade (Onco, UK)
Bisbenzimid	Bisbenzimid H33258 5 µg/ml in PBS/CMF

Die mit einer Zytozentrifuge hergestellten und für mindestens zwei Stunden in -20°C kaltem Methanol fixierten Zellpräparate wurden fünf Minuten in einer PBS/CMF/0,1% Tween 20-Lösung gewaschen und mit 10 µl CREST-Serum 75 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Objektträger zweimal für je fünf Minuten mit PBS/CMF/0.5% Tween 20 gewaschen und mit 20 µl des 2. Antikörper Ziege-anti-human IgG (FITC-konjugiert) versetzt. Nach einer dreißigminütigen Inkubation bei 37°C wurden die Präparate erneut einmal mit PBS/CMF/0,1% Tween 20 gewaschen, drei Minuten mit Bisbenzimid gefärbt und zweimal je 10 Minuten mit PBS/CMF gewaschen. Abschließend wurden sie mit Antifade (25 µl) eingedeckt und die Kinetochor-Signale mikroskopisch ausgewertet.

Aus drei unabhängigen Versuchen wurden je drei Objektträger mit je 100 mikrokernhaltigen Zellen ausgewertet.

2.4. Bestimmung der Expression von Zellzyklusregulationsproteinen und DNA-damage-repair-Proteinen mittels Western-Blot

2.4.1. Herstellung der Zellysate

Reagenzien:	reduziertes Medium	siehe Kapitel 2.2.1.2
	Homogenisationspuffer	1,82 g Mannitol (0,2M) 0,86 g Saccharose (50mM) 0,12 g HEPES (10mM) ad 50 ml Aqua dest.
	PMSF-Lösung	1 mg PMSF ad 57,4 µl Isopropanol

Zur Herstellung der Zellysate wurden 4 ml humane östrogensensitive Ovarialkarzinomzellen BG-1 entsprechend der in Kapitel 2.2.1.2 beschriebenen Methode in einer Dichte von 50000-70000 Zellen pro ml in reduziertem Medium ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach 24 Stunden wurde ein Teil der Zellen gemäß des oben dargestellten Protokolls geerntet und in der auf 4-8° C heruntergekühlten Zentrifuge fünf Minuten mit 2000 rpm herunter zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen wurden mit 5 ml eiskaltem PBS/CMF versetzt und erneut fünf Minuten mit 2000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt.

Zur Stabilisierung und Homogenisierung der Proteine wurde das Zellpellet in Homogenisationspuffer mit 0,001% PMSF-Lösung resuspendiert. Die Lysate konnten dann bei -20°C aufbewahrt werden.

Die restlichen Testansätze wurden nun mit der Testsubstanz versehen.

Nach 96, 120, 144 und 168 Stunden wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet und lysiert.

Um die Konzentration der Testsubstanzen konstant zu halten und tote Zellen abzunehmen wurde nach 96 Stunden das Medium abgenommen und vier ml frisches reduziertes Medium mit Testsubstanz dazugegeben. Nach 144 Stunden wurde nochmals frische Testsubstanz in das Medium zugegeben.

2.4.2. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem Protein-Assay nach Bradford durchgeführt. Dieser Assay basiert auf der Zugabe des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250, der an die Aminosäuren der Proteine bindet. Nach Bindung des Farbstoffs ändert sich das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm. Durch photometrische Messungen kann anhand der gemessenen Extinktion mittels einer Eichgerade auf den Proteingehalt der Probe rückgeschlossen werden.

Reagenzien: BSA-Lösung 50 µg BSA
 ad 1 ml Aqua dest.
 Bio-Rad-Reagenz

Die Eichgerade wurde mit BSA entsprechend der unten stehenden Tabelle in einer vorgegebenen Konzentration von 50µg/ml erstellt. Um größtmögliche Genauigkeit zu erhalten wurde die Eichgerade im Doppelansatz gemessen.

mg/ml	0	4	8	16
Aqua dest.	800 µl	720 µl	640 µl	480 µl
BSA-Lösung	0 µl	80 µl	160 µl	320 µl
Bio-Rad-Reagenz	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Tabelle 1 Pipetierschema zur Erstellung der Eichgerade für den Bradford-Assay

Aus dem Zelllysat wurde eine Dreifachbestimmung mit je 3 µl des Lysats, 797 µl Aqua dest. und 200 µl Bio-Rad-Reagenz erstellt.

Nach gründlichem Mischen wurden die Lösungen in Einmalküvetten überführt und je zweimal bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

Anhand der Steigung der Eichgerade konnte nun mittels des Extinktionswertes der Probe auf den Proteingehalt des Lysats rückgerechnet werden. Für die Gelelektrophorese wurden durch Verdünnung mit Homogenisationspuffer Aliquots der verschiedenen Lysate in gleicher Proteinkonzentration erstellt.

2.4.3. Herstellung der Gele

Reagenzien:	Trenngelpuffer	25,68 g Tris ad 100 ml Aqua dest. pH 9,8
	Sammelgelpuffer	26,16 g Tris-HCl ad 100 ml Aqua dest. pH 6,1

Die Gele zur Auftrennung in der nachfolgenden Gelelektrophorese wurden in einer Mini-Proteinapparatur gegossen.

Zunächst wurde das Trenngel (10%) hergestellt:

2,34 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (40%)
1,80 ml	Trenngelpuffer
0,10 ml	SDS 10%
4,60 ml	Aqua dest.
0,003 ml	TEMED
0,06 ml	Ammoniumpersulfat (10%)

Das Trenngel wurde bis circa 1,5 cm unter den Rand der Apparatur gegossen und anschließend mit Isopropanol überschichtet, um eine klare Trennlinie zu erhalten. Nach einer Polymerisationszeit von 30 Minuten wurde das Isopropanol abgenommen und das Gel mit Aqua dest. gründlich von Resten des Isopropanols befreit.

Nun wurden die Kämme eingesetzt und das Sammelgel (6%) gegossen:

0,789 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (40%)
0,125 ml	Sammelgelpuffer
0,05 ml	SDS 10%
3,98 ml	Aqua dest.
0,005 ml	TEMED
0,05 ml	Ammoniumpersulfat (10%)

Das Sammelgel konnte über Nacht polymerisieren.

2.4.4. Gelelektrophorese

2.4.4.1. Prinzip

Bei der Gelelektrophorese werden die Proteine durch das SDS-Polyacrylamid-Gel mit negativer Ladung versehen. Da die meisten Proteine SDS in einem konstanten Verhältnis zur Proteinmasse binden, wird durch die negative Ladung des SDS die Nettoladung des Proteins maskiert. Durch das Anlegen von Spannung in der Elektrophorese werden die Proteine in der Reihenfolge ihrer molaren Massen getrennt.

2.4.4.2. Vorbereitung des Polyacrylamid-Gels

Reagenzien: Laufpuffer 3,03 g Tris
 14,42 g Glycin
 1 g SDS
 ad 1000 ml Aqua dest.
 pH 5,3

Dem auspolymerisierten Sammelgel wurden vorsichtig die Kämme entnommen und die Gele sodann in die Elektrophoreseapparatur eingebaut. Hinter und unter die Kammern wurde Laufpuffer gegossen. Auch die Taschen des Gels wurden sorgfältig mit Laufpuffer gespült.

2.4.4.3. Vorbereitung der Proben

Zu den Aliquots der Zelllysate wurde Rotiload im Verhältnis 1:4 hinzugefügt. Rotiload enthält Mercaptoethanol, welches die Proteine durch Reduktion der Disulfidbrücken in entfaltetem Zustand stabilisiert. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben in verschlossenen Eppendorf-Caps fünf Minuten bei 100°C erhitzt. Danach wurden die Lysate auf Eis gegeben und nacheinander in die Taschen des Gels pipettiert.

2.4.4.4. Gellauf

Der Gellauf erfolgte bei 45 mA im Sammelgel und 40 mA im Trenngel über einen Zeitraum von 60 Minuten.

Mit dem Block-Vorgang werden nicht-spezifische Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Dazu wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur unter sanftem Rütteln mit 5% Milchpulver in TBS-T-Puffer inkubiert.

Um die Reste des Block-Reagenz zu entfernen wurde die Membran nach Abschluss des Block-Vorgangs dreimal für jeweils 10 Minuten mit TBS-T gewaschen.

2.4.7. Färben der Proteine mit Antikörpern

Reagenzien:	TBS-T	siehe Kapitel 2.4.6
	TBS	0,121 g Tris
		0,877 g NaCl
		ad 1000 ml Aqua dest.
		pH 8,0
	Zweit-Antikörper	goat-anti-mouse-IgG-HRP 1:3000 in TBS-T mit 5% Milchpulver

Der erste Antikörper wurde nach Beendigung des Waschvorgangs in einer Konzentration von 1:5000 bis 1:1000 je nach verwendetem Antikörper in TBS-T mit 5% Milchpulver auf die Membran gegeben. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die nicht gebundenen Reste des Erstantikörpers durch dreimaliges Waschen mit TBS-T für jeweils 10 Minuten entfernt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper goat-anti-mouse-IgG-HRP gelöst in TBS-T mit 5% Milchpulver für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Die nichtgebundenen Reste des Zweitantikörpers wurden ebenfalls durch dreimaliges Waschen mit TBS-T für jeweils 10 Minuten und einmaliges Waschen mit TBS für fünf Minuten entfernt.

2.4.8. Entwicklung der Membranen

Reagenzien: Entwicklerlösung ECL-Entwicklerlösung (Santa Cruz)

Um die aufgetrennten Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden 1,5 ml (je 750 µl der Lösungen A und B) ECL-Entwicklerlösung auf die Membran gegeben. Das in der ECL-Lösung enthaltene Substrat wird durch die Meerrettichperoxidase (HRP) des Zweitantikörpers in ein Reaktionsprodukt umgewandelt, das an der Stelle der Proteinbande eine Schwärzung eines Films hervorruft.

Nach dreiminütiger Inkubation mit ECL-Lösung wurde die Membran in Saranfolie luftblasenfrei eingewickelt.

In der Dunkelkammer wurde die Membran mit der die Proteine enthaltenden Seite nach oben in eine Filmkassette eingelegt. Auf die Membran wurde nun ein zugeschnittenes Stück Film gelegt. Der Film wurde mindestens fünf Minuten belichtet.

Danach wurde der Film in die Photoentwicklerlösung gegeben, bis erste Banden sichtbar wurden. Nach einminütigem Waschen des Films in Wasser wurde der Film solange in Fixierlösung geschwenkt, bis der Hintergrund des Films durchsichtig erscheint. Um Reste des Fixierers zu entfernen wurde der Film mindestens 2 Minuten in Wasser gewaschen. Anschließend konnte der Film bei Raumtemperatur trocknen.

2.4.9. Auswertung der Membranen

Die Auswertung der Membranen erfolgte computergestützt mit dem Programm Geldoc 2000 (BioRAD). Hierzu wurden die Filme eingelesen und anhand der größten Bande der zu messende Bereich festgelegt. Der Computer ermittelte anschließend die mittlere Farbdichte der Banden, die mit der Menge des gebundenen Antikörpers auf der Membran und damit mit der Menge des vorhandenen Proteins korreliert.

2.4.10. Strippen der Membran

Mit dem Strippen werden der Erst- und Zweitantikörper von der Membran gelöst, so dass die weiterhin auf der Membran fixierten Proteine einer Detektion mit einem anderen Erstantikörper zugänglich gemacht werden können.

Reagenzien:	Stripping-Puffer	0,78 g Mercaptoethanol (100mM)
		9,81 g Tris-HCl (62,5mM)
		2 ml SDS
		ad 100 ml Aqua dest.
	TBS-T	siehe Kapitel 2.4.6

Zunächst wurde die Membran eine halbe Stunde bei 50°C unter leichtem Schütteln mit dem Stripping Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für je 10 Minuten mit TBS-T bei Raumtemperatur gewaschen. Um nichtspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5% Milchpulver in TBS-T geblockt. Nach dreimaligem Waschvorgang mit TBS-T für je 10 Minuten konnte die Immunodetektion wie oben beschrieben mit neuen Erst- und Zweitantikörpern durchgeführt werden.

2.4.11. Färben der Gele mit Coomassie-Blue

Um den korrekten Gellauf zu kontrollieren, wurden die Gele nach erfolgtem Semidry-Blot mit Coomassie-Blue gefärbt.

Reagenzien:	Färbelösung:	9% Essigsäure
		45% Methanol
		0,25% Coomassie-Blue
		ad Aqua dest.
	Entfärbelösung:	10% Methanol
		7% Eisessig
		ad Aqua dest.

Die Gele wurden unter sanftem Rütteln 30 Minuten in der Färbelösung bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in die Färbelösung überführt. Bei Raumtemperatur wurden sie wiederum unter sanftem Rütteln über Nacht, mindestens jedoch über zwölf Stunden entfärbt. Anhand der nun sichtbaren Banden auf den Gelen konnte überprüft werden, ob das Gel gleichmäßig und bis zum Ende gelaufen ist.

2.5. Zellzyklusanalyse

Um die Auswirkung der hormonellen Proliferationsstimulation auf den Zellzyklus zu untersuchen, wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt. Dabei wird die DNA der Zellen mit Propidiumiodid angefärbt. Die Zellsuspension fließt durch das Analysegerät, welches Detektoren besitzt, die das von den Zellen abgegebene Licht messen und in elektrische Signale umwandeln. Durch computergestützte Auswertung der im FACS-Scan analysierten Zellen kann der prozentuale Anteil der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen ausgemacht werden. Um die Dauer der einzelnen Phasen zu bestimmen, wurden die relativen Anteile mit der Gesamtzellzyklusdauer multipliziert.

Zur Untersuchung der Zellzyklusveränderungen wurden östrogenrezeptorpositive BG-1-Zellen in einer Konzentration von 50 000 Zellen/ml reduziertem Medium in einem Volumen von 4 ml in Zellkulturflaschen (T25) ausgesät. Nach 24 Stunden wurde die Testsubstanz IGF in einer Konzentration von 100µg/ml gelöst in PBS/CMF zugegeben. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach weiteren 72 Stunden wurde das Medium gewechselt und frische Testsubstanz zugegeben. 48 Stunden später wurde erneut IGF zugegeben. So konnte eine konstante Konzentration der Testsubstanz gewährleistet werden.

Die Zellen für die Zellzyklusanalyse wurden 96, 120, 144 und 168 Stunden nach Aussaat wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben geerntet. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Präparation der Zellen für die Analyse durchgeführt.

Reagenzien:	PBS/CMF-Puffer:	siehe Kapitel 2.2.1.1
	Ethanol-Lösung:	70% Ethanol ad Aqua dest.
	RNAse-Lösung:	50 Units/ml in PBS/CMF-Puffer (Höchst)
	Propidiumiodid-Lösung:	50 µg/ml in PBS/CMF-Puffer (Sigma)

Nach Bestimmung der Zellzahl wurde das Medium der Zellsuspension bei Raumtemperatur abzentrifugiert (1000 rpm, 5 Minuten). Der Überstand wurde abgenommen und mit 700 µl PBS/CMF gewaschen. Nach Abzentrifugation wurde der Überstand wiederum abgenommen. Die Zellen wurden nun mit Ethanol-Lösung für mindestens eine Stunde bei 4°C fixiert. Zur Färbung wurden die Zellen mit 0,5ml RNase-Lösung und 0,5ml Propidiumiodid-Lösung 20 Minuten bei 37° unter Lichtausschluss inkubiert. Durch die RNase wurden spezifisch die Nukleinsäuren der RNA hydrolysiert, so dass gewährleistet wurde, dass nur die DNA der Zellen analysiert wurde. Die DNA wurde durch Propidiumiodid angefärbt. Propidiumiodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch an DNA bindet.

Mit dem FACS-Scan konnten die Proben nun ausgewertet werden. Durch einen Laser mit definierter Wellenlänge wurden die mit Propidiumiodid gefärbten Proben zur Emission von Strahlung angeregt, die von Detektoren registriert wurde und direkt proportional zur Menge der vorhandenen DNA ist. Mittels computergestützter Auswertung dieser Emission konnten die prozentualen Anteile der Zellen an den Zellzyklusphasen bestimmt und die Dauer der einzelnen Phasen errechnet werden.

3. Ergebnisse

3.1. Proliferationsversuche

Um die proliferationsfördernden Eigenschaften der zu untersuchenden Testsubstanzen zu ermitteln, wurden östrogenrezeptorpositive BG-1-Zellen und östrogenrezeptornegative UCI-Zellen in gleichmäßiger Zellzahl in Kulturflaschen (T25) ausgesät. Um eine gleich bleibende Konzentration der Substanzen zu gewährleisten wurde nach 24, 96 und 144 Stunden die Testsubstanz in je vier verschiedenen Dosen zugegeben, nach 96 Stunden wurde außerdem das Medium erneuert. Nach 168 Stunden wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl zweifach mit dem Coulter-Counter bestimmt.

3.1.1. Proliferationssteigerung durch Östradiol

Die Proliferationssteigerung durch Östradiol wurde nur mit BG-1-Zellen durchgeführt, da aus Experimenten aus vorhergehenden Arbeiten bekannt war, dass Östradiol bei östrogenrezeptornegativen UCI-Zellen keinen proliferationssteigernden Effekt besitzt.

Östradiol wurde in DMSO gelöst in Konzentrationen von 0,01nM, 0,1nM, 1nM und 10nM zu den oben angegebenen Zeitpunkten zugegeben. Um eine proliferative Wirkung des Lösungsmittels auszuschließen diente neben unbehandelten Zellen eine Lösungsmittelkontrolle mit DMSO in einer Endkonzentration von 0,1% als Lösungsmittelkontrolle (entspricht Östradiol 0nM).

Nach 168 Stunden zeigte sich eine deutliche Proliferationssteigerung der mit Östradiol behandelten Zellen gegenüber der Lösungsmittelkontrolle. Zwischen Lösungsmittelkontrolle und einer Kontrolle aus unbehandelten Zellen konnte kein Unterschied festgestellt werden.

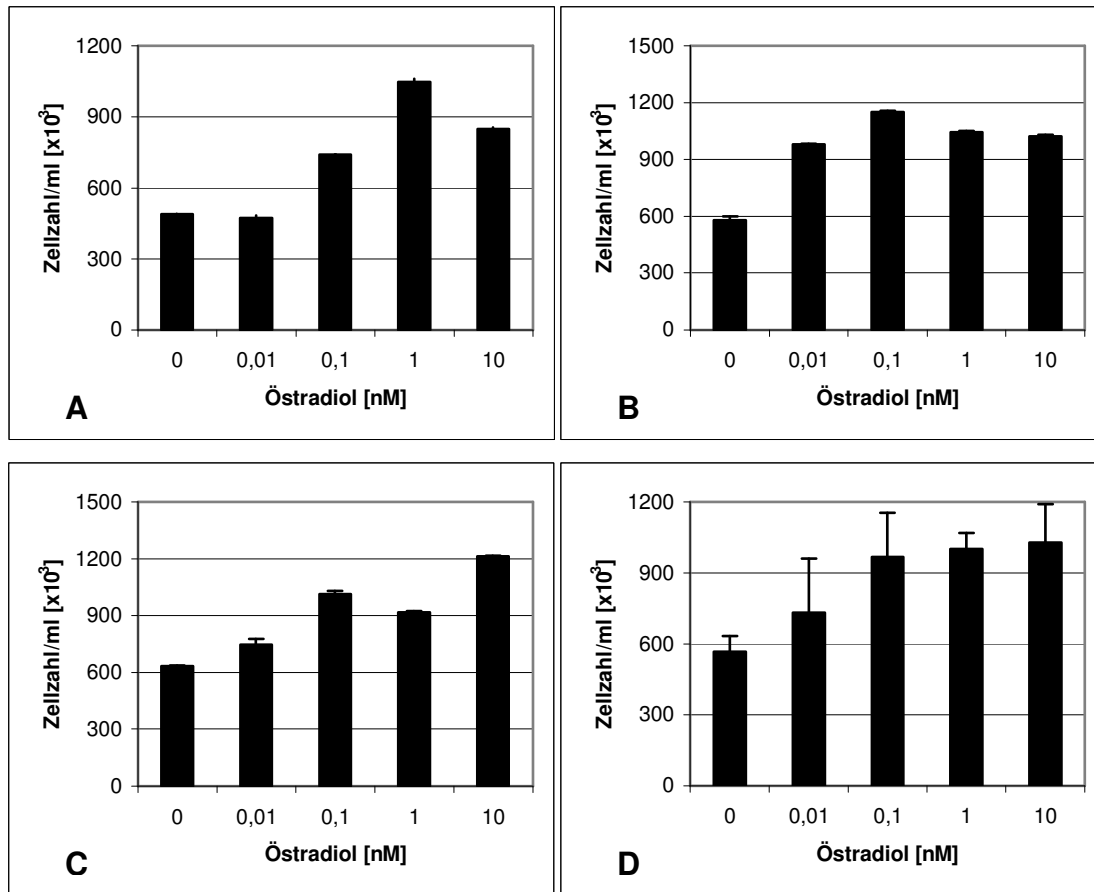


Abbildung 3: Dosisabhängige Proliferationssteigerung mit Östradiol. Lösungsmittelkontrolle 0,1% DMSO (0nM), Östradiol 0,01nM bis 10nM. Dargestellt sind die Ergebnisse dreier von einander unabhängiger Experimente (A bis C) und die gemittelten Ergebnisse (D).
Originaldaten im Anhang auf Seite 105

3.1.2. Proliferationssteigerung durch EGF, IGF und Insulin

3.1.2.1. BG-1-Zellen

Mit diesen Experimenten wurde der proliferationssteigernde Effekt von EGF, IGF und Insulin getestet. Die Testsubstanzen wurden in PBS/CMF gelöst, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Auch hier zeigte sich eine Proliferationssteigerung durch die Testsubstanzen nach 168 Stunden im Vergleich zur Kontrolle.

3.1.2.1.1. EGF

EGF wurde in vier verschiedenen Dosen (0,1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml und 100ng/ml) gelöst in PBS/CMF nach 24, 96 und 144 Stunden zugegeben.

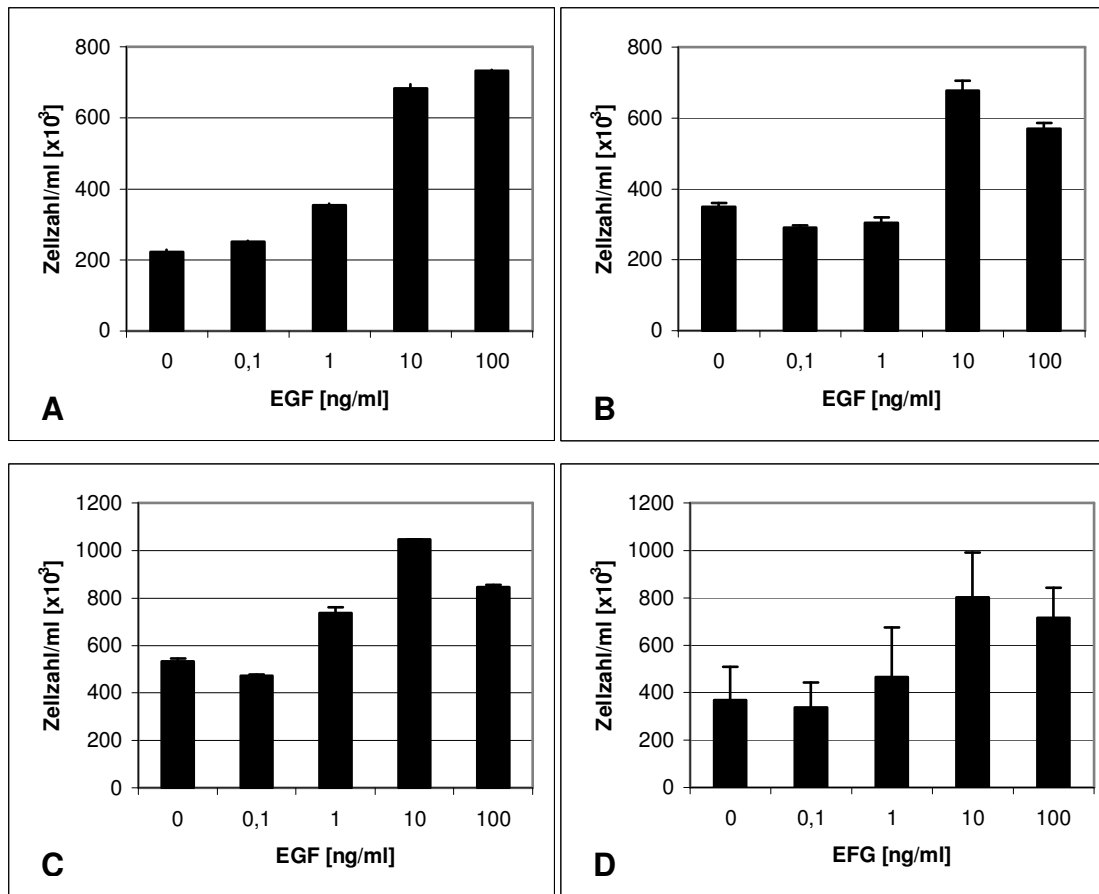


Abbildung 4 Dosisabhängige Proliferationssteigerung mit EGF. Kontrolle (0ng/ml), EGF 0,1ng/ml bis 100ng/ml. Dargestellt sind die Ergebnisse dreier von einander unabhängiger Experimente (A bis C) und die gemittelten Ergebnisse (D).

Originaldaten im Anhang auf Seite 105

3.1.2.1.2. IGF

IGF wurde in vier verschiedenen Dosen (0,1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml und 100ng/ml) gelöst in PBS/CMF nach 24, 96 und 144 Stunden zugegeben.

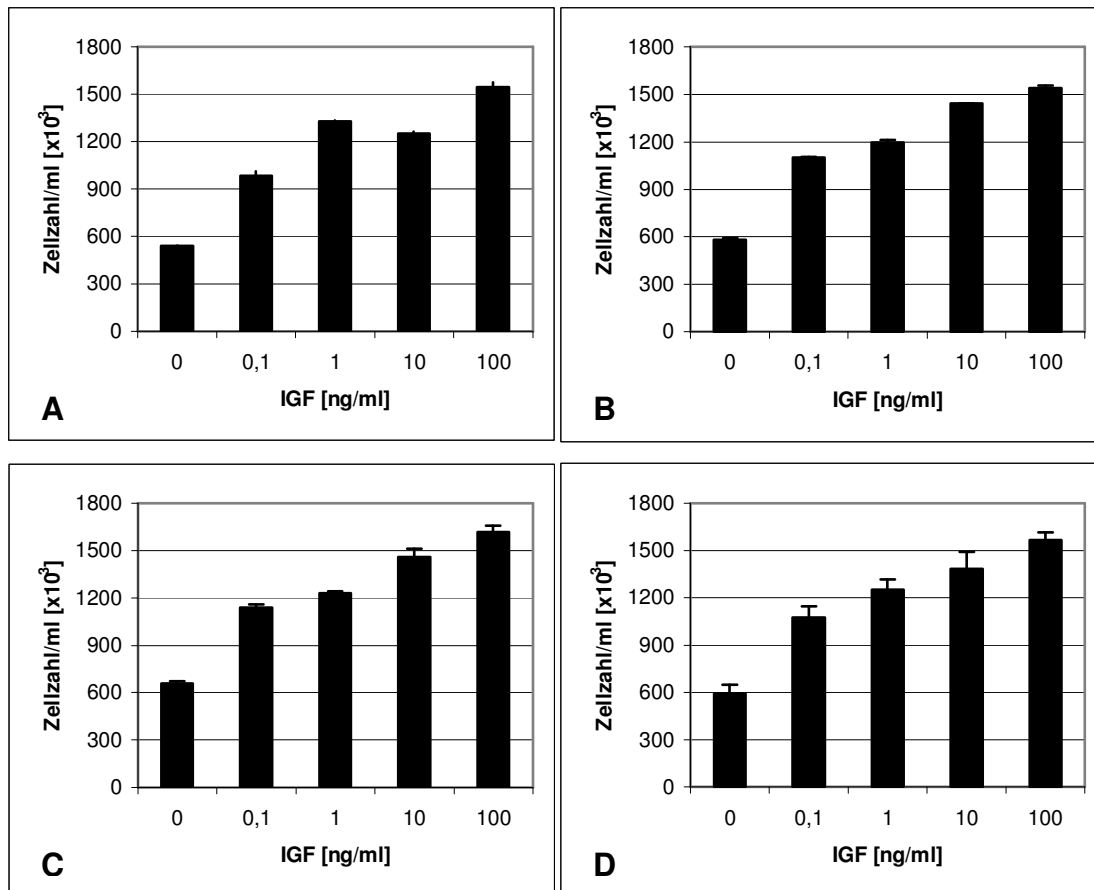


Abbildung 3 Dosisabhängige Proliferationssteigerung mit IGF. Kontrolle (0ng/ml), IGF 0,1ng/ml bis 100ng/ml. Dargestellt sind die Ergebnisse dreier von einander unabhängiger Experimente (A bis C) und die gemittelten Ergebnisse (D).

Originaldaten im Anhang auf Seite 106

3.1.2.1.3. Insulin

Auch für Insulin wurden vier unterschiedlich Dosen (0,1µg/ml, 1µg/ml, 1µg/ml und 100µg/ml) gelöst in PBS/CMF zugegeben, um eine dosisabhängige Steigerung der Proliferation zu erzielen.

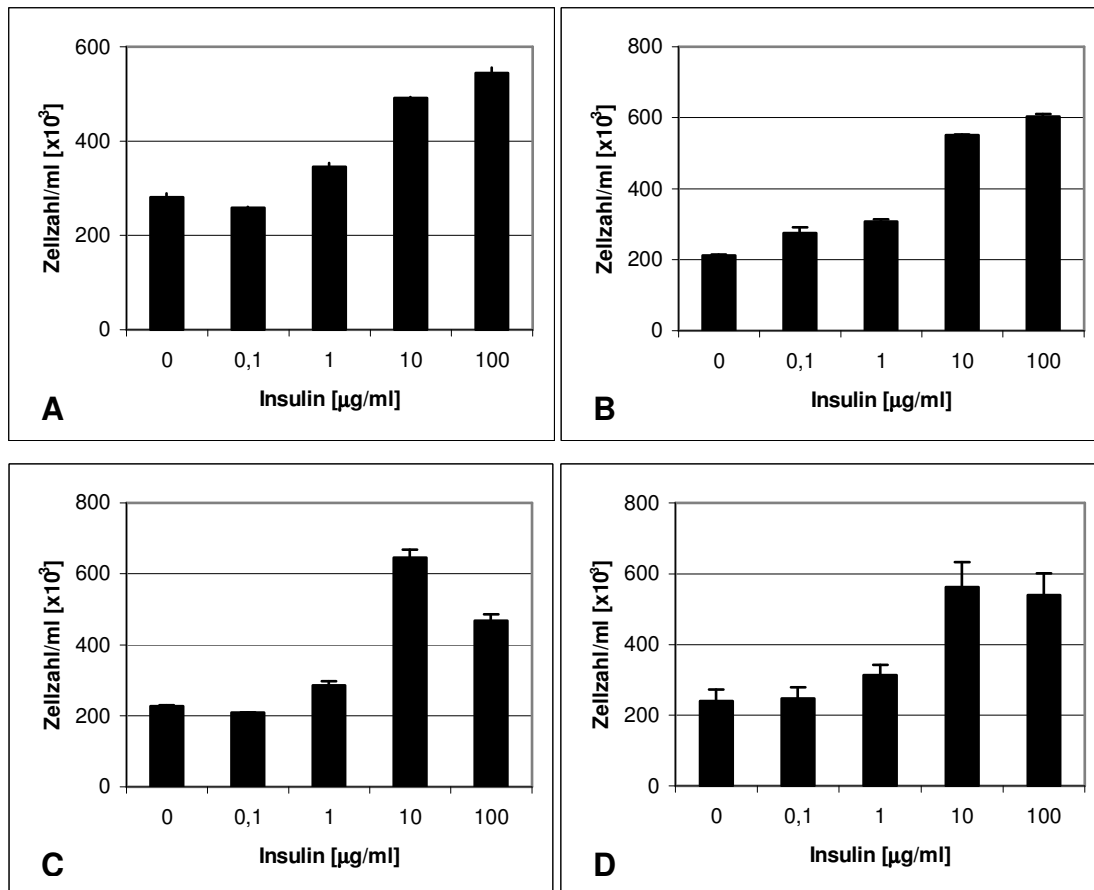


Abbildung 5 Dosisabhängige Proliferationssteigerung mit Insulin. Kontrolle (0 $\mu\text{g/ml}$), Insulin 0,1 $\mu\text{g/ml}$ bis 100 $\mu\text{g/ml}$. Dargestellt sind die Ergebnisse dreier von einander unabhängiger Experimente (A bis C) und die gemittelten Ergebnisse (D).

Originaldaten im Anhang auf Seite 106

3.1.2.2. UCI-Zellen

Um zu beweisen, dass der gezeigte Proliferations-effekt unabhängig vom Östrogenrezeptor ist, wurden die Proliferationsversuche an Östrogenrezeptor-negativen UCI-Zellen durchgeführt.

EGF und IGF wurden gelöst in PBS in je vier verschiedenen Konzentrationen (0,1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml und 100ng/ml) zugegeben. Auch für Insulin wurden die gleichen Konzentrationen (0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ gelöst in PBS/CMF) wie in Versuchen mit BG-1-Zellen verwendet.

Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, als Negativkontrolle Östradiol 5nM.

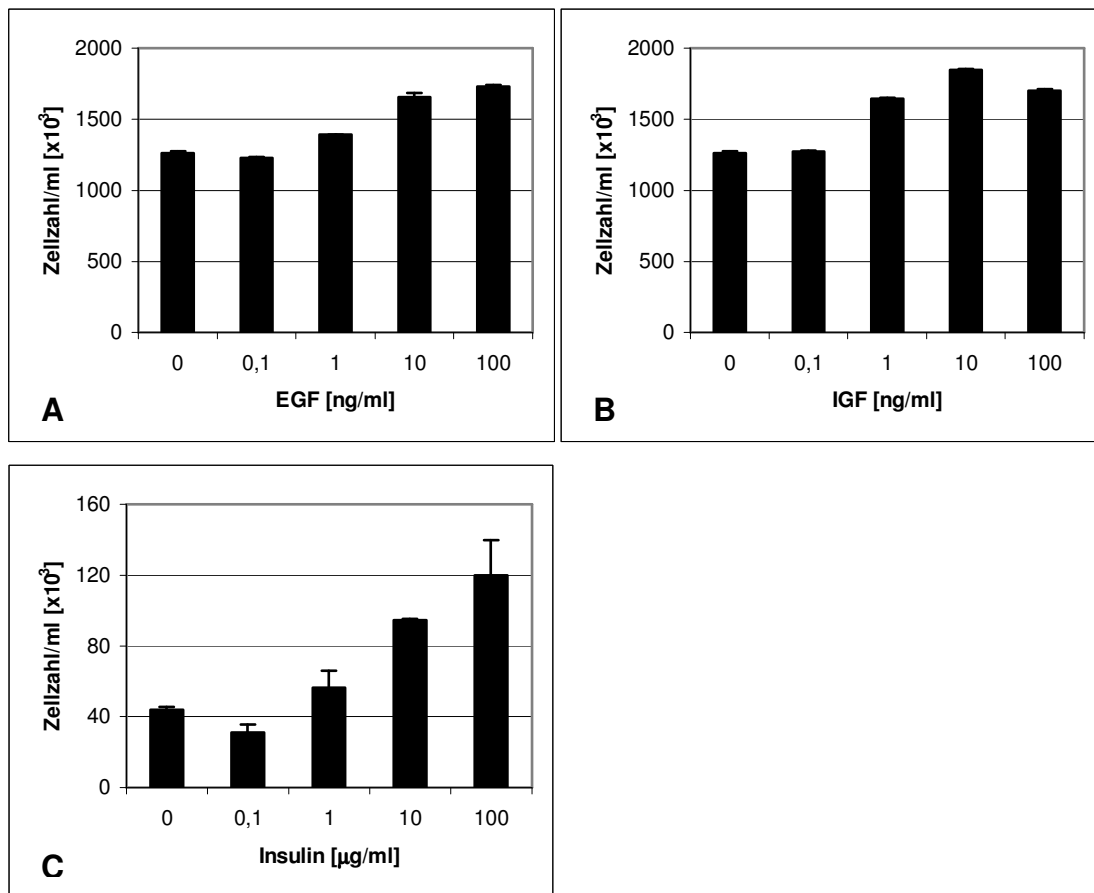


Abbildung 6 Dosisabhängige Proliferationssteigerung von UCI-Zellen mit (A) EGF (0,1 bis 100ng/ml), (B) IGF (0,1 bis 100 ng/ml) und (C) Insulin (0,1 bis 100 μ g/ml). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (0ng/ml bzw. 0 μ g/ml). Negativkontrolle Östradiol 5nM 48500 ± 770 Zellen/ml. Originaldaten im Anhang auf Seite 107-107

An UCI-Zellen konnte ebenso eine starke dosisabhängige Proliferationssteigerung durch die zugegebenen Substanzen im Vergleich zur Kontrolle registriert werden. Wie erwartet zeigten die mit Östradiol 5nM behandelten Zellen keine Wachstumssteigerung gegenüber der Kontrolle.

3.2. Gentoxizitätstest

Um den mutagenen Effekt der Proliferationssteigerung durch Östradiol, EGF, IGF und Insulin zu untersuchen, wurde der Mikrokern-Assay verwendet. Die Zellen aus den oben beschriebenen Proliferationsexperimenten wurden nach 168 Stunden geerntet und mit Hilfe der Zytocentrifuge auf Objektträger aufgebracht. Nach Fixierung der Präparate in -20°C kaltem Methanol wurden die Zellen gefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

3.2.1. Mikrokerninduktion

3.2.1.1. BG-1-Zellen

3.2.1.1.1. Mikrokerninduktion durch Östradiol

Wie die Proliferationsexperimente wurde auch der Mikrokernstest für Östradiol nur bei BG-1-Zellen durchgeführt. Ausgewertet wurden je drei Objektträger pro Substanz pro Versuch. Auf jedem Objektträger wurden 1000 Zellen und deren Mikrokerne gezählt. Um eine Mikrokerninduktion durch das Lösungsmittel auszuschließen, wurde die mit DMSO behandelte Kontrolle ebenfalls ausgezählt. Als Positivkontrolle diente Mitomycin C (MMC).

Im Mikrokernstest zeigten die mit Östradiol behandelten Zellen eine deutlich Zunahme der Mikrokerne und damit des genotoxischen Potentials mit steigender Dosis der Testsubstanz und damit mit steigender Proliferation.

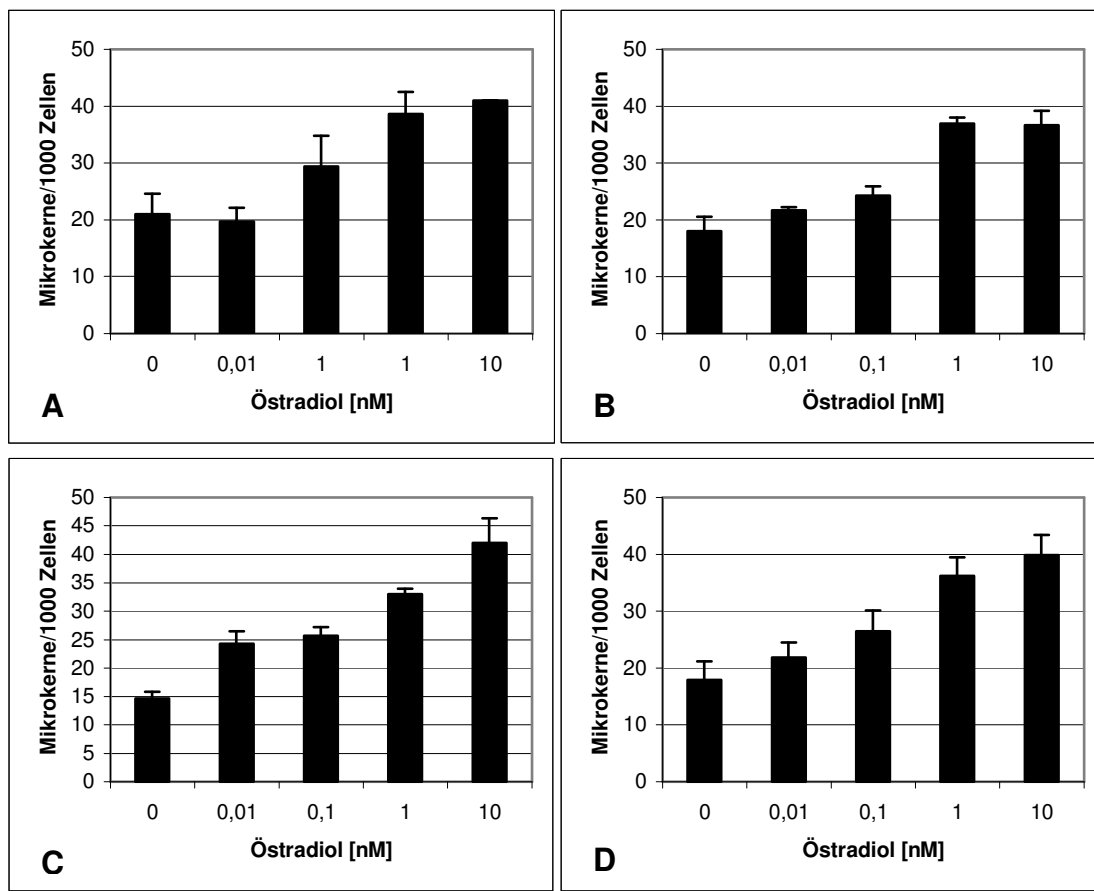


Abbildung 7 Mikrokerninduktion durch Östradiol. Lösungsmittelkontrolle (0nM), Östradiol 0,01 bis 10 nM. Dargestellt sind die Ergebnisse dreier von einander unabhängiger Versuche mit jeweils drei ausgezählten Objektträgern pro Testsubstanz (A bis C) und der Mittelwert dieser Ergebnisse (D).
 Positivkontrolle Mitomycin C (0,02µg/ml): 75 ± 35 Mikrokerne/1000 Zellen
 Originaldaten im Anhang auf Seite 107

3.2.1.1.2. Mikrokerninduktion durch EGF, IGF und Insulin

3.2.1.1.2.1. EGF, IGF

Für EGF und IGF wurde die Mikrokerninduktion der mit den Konzentrationen 0,1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml und 100 ng/ml behandelten Zellen sowie die der unbehandelten Kontrolle ausgewertet. Als Positivkontrolle diente wiederum MMC. Ausgezählt wurden pro Versuch dreimal 1000 Zellen pro Testsubstanz.

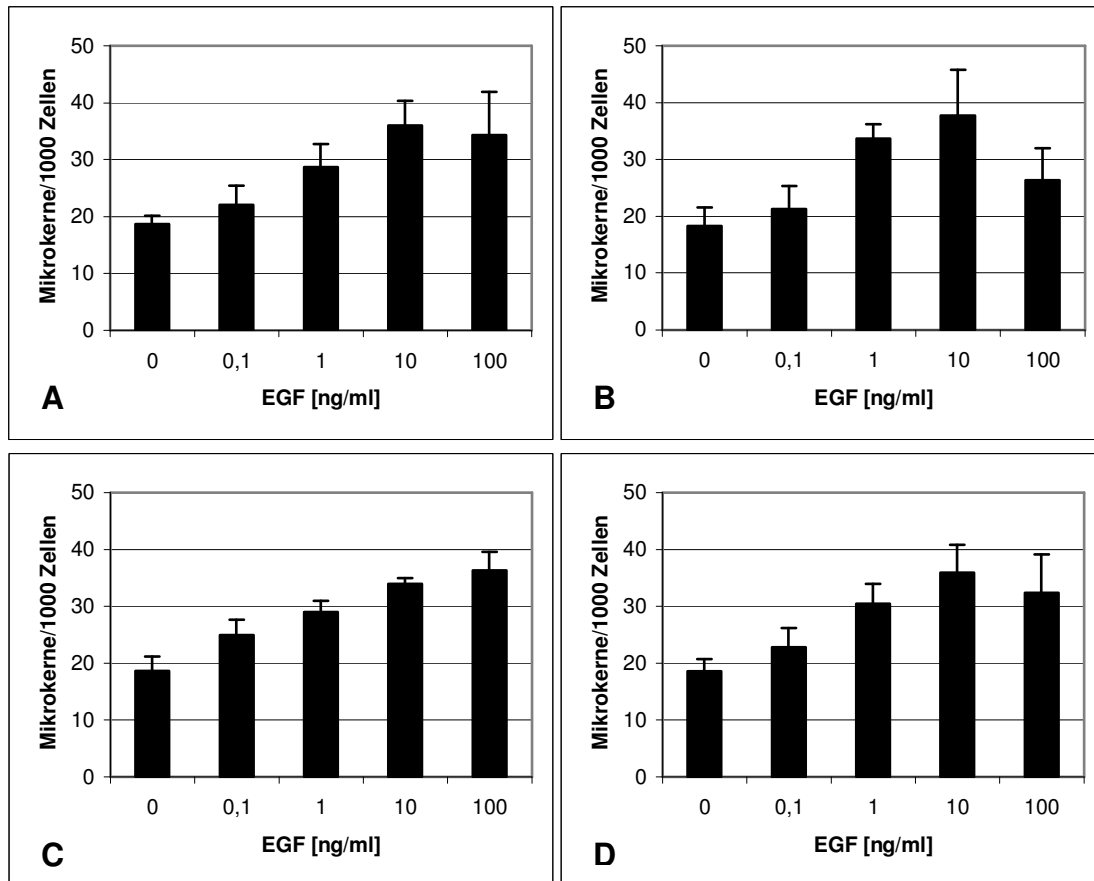


Abbildung 8 Mikrokerninduktion durch EGF. Unbehandelte Kontrolle (0ng/ml), EGF 0,1 bis 100ng/ml. Dargestellt sind die Ergebnisse dreier von einander unabhängiger Versuche mit jeweils drei ausgezählten Objektträgern pro Testsubstanz (A bis C) und der Mittelwert dieser Ergebnisse (D).
Positivkontrolle Mitomycin C (0,02 μ g/ml): 64 \pm 15 Mikrokerne/1000 Zellen
Originaldaten im Anhang auf Seite 108

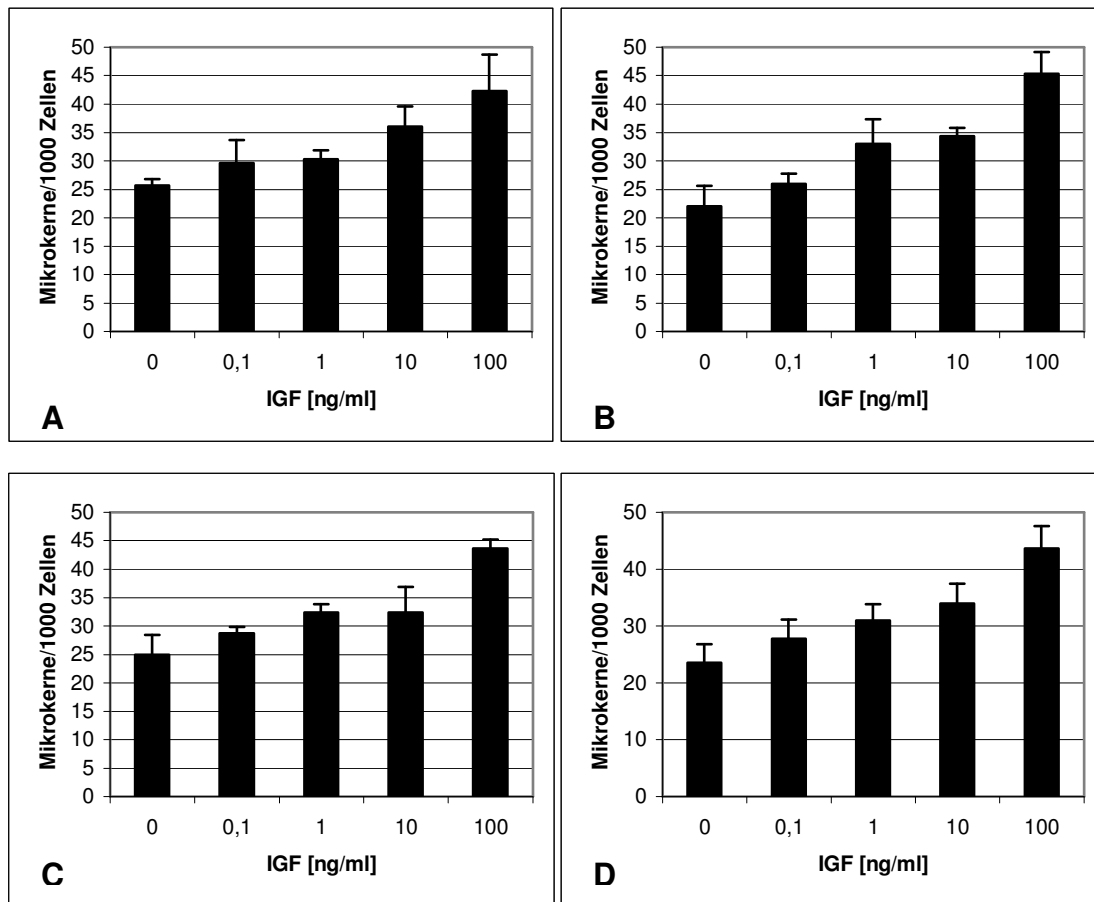


Abbildung 9 Mikrokerninduktion durch IGF. Unbehandelte Kontrolle (0ng/ml), IGF 0,1 bis 100ng/ml. Dargestellt sind die Ergebnisse dreier von einander unabhängiger Versuche mit jeweils drei ausgezählten Objektträgern pro Testsubstanz (A bis C) und der Mittelwert dieser Ergebnisse (D).
Positivkontrolle Mitomycin C (0,02 μ g/ml): 52 \pm 4 Mikrokerne/1000 Zellen
Originaldaten im Anhang auf Seite 108

Auch hier sieht man eine deutlich Mikrokerninduktion der Testsubstanz in Abhängigkeit der zugegebenen Konzentration.

3.2.1.1.2.2. Insulin

Die Mikrokerninduktion der mit 0,1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml und 100µg/ml Insulin behandelten Zellen wurde mikroskopisch ausgewertet. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, als Positivkontrolle MMC. Wiederum wurden pro Versuch dreimal 1000 Zellen pro Testsubstanz ausgezählt.

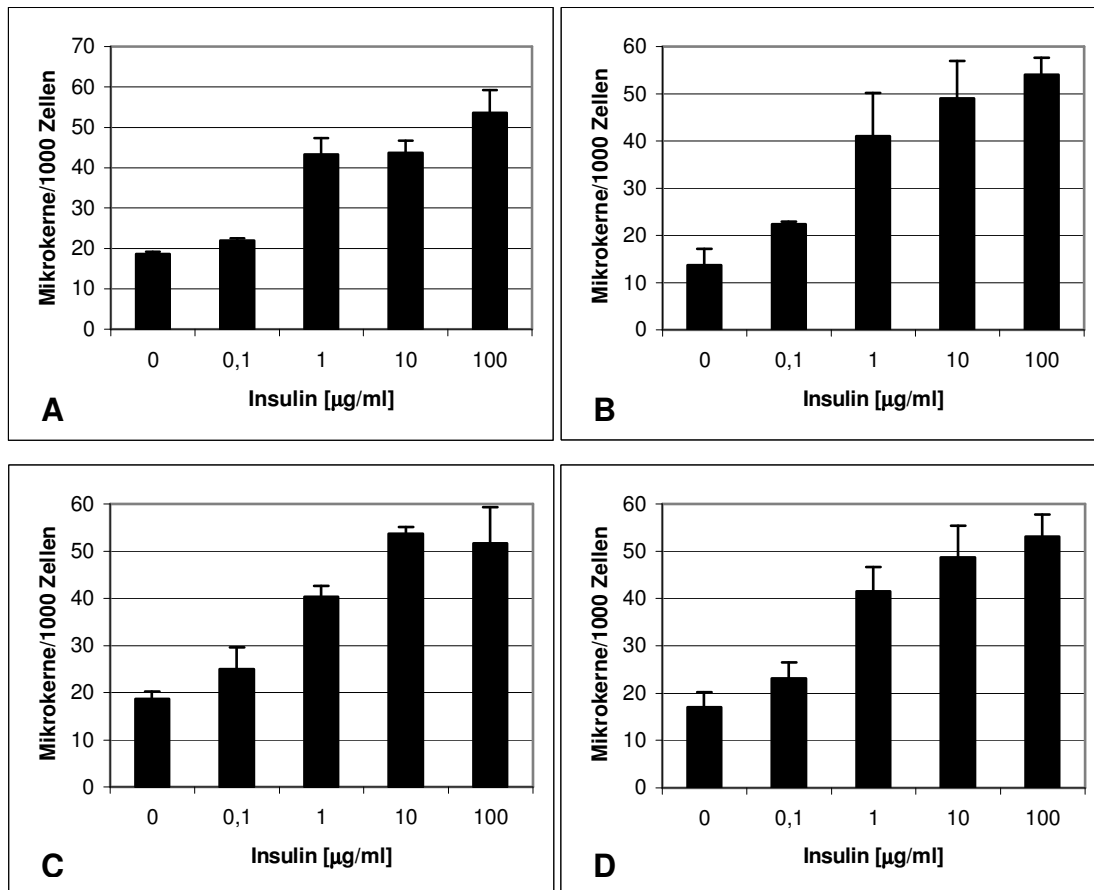


Abbildung 10 Mikrokerninduktion durch Insulin. Unbehandelte Kontrolle (0µg/ml), Insulin 0,1 bis 100µg/ml. Dargestellt sind die Ergebnisse dreier von einander unabhängiger Versuche mit jeweils drei ausgezählten Objektträgern pro Testsubstanz (A bis C) und der Mittelwert dieser Ergebnisse (D).

Positivkontrolle Mitomycin C (0,02µg/ml): 75 ± 2 Mikrokerne/1000 Zellen

Originaldaten im Anhang auf Seite 108

3.2.1.2. UCI-Zellen

Auch bei UCI-Zellen wurden die aus den Proliferationsexperimenten gewonnenen Zellen für den Mikrokern-Assay verwendet. Hierdurch sollte gezeigt werden, dass die durch Proliferation induzierte Genotoxizität nicht vom Östrogenrezeptor abhängt.

Die nach 168 Stunden geernteten Zellen wurden mit Hilfe der Cytospinzentrifuge auf Objektträger aufgebracht, gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Dabei wurden dreimal 1000 Zellen pro Testsubstanz untersucht. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, als Positivkontrolle wurde MMC verwendet, als Negativkontrolle wiederum Östradiol 5nM.

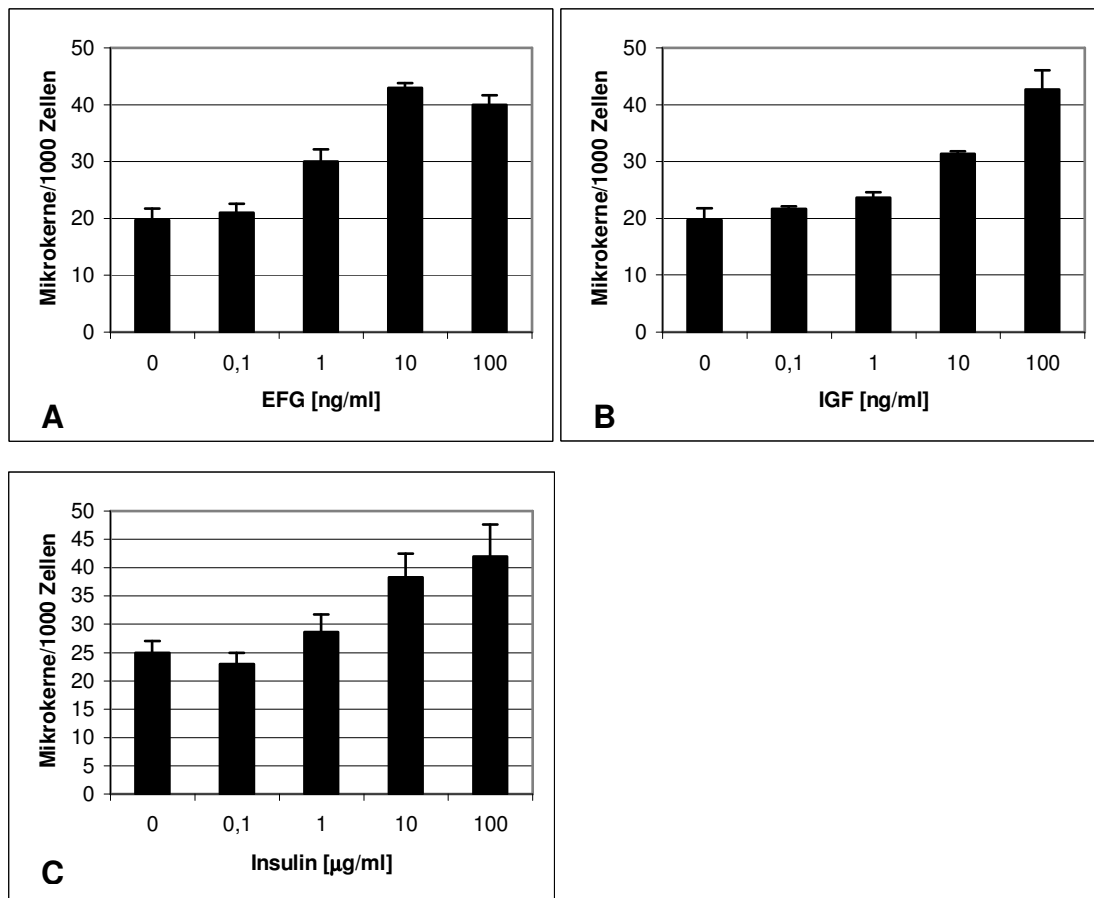


Abbildung 11 Dosisabhängige Mikrokerninduktion von UCI-Zellen mit (A) EGF (0,1 bis 100ng/ml), (B) IGF (0,1 bis 100 ng/ml) und (C) Insulin (0,1 bis 100 μ g/ml). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (0ng/ml bzw. 0 μ g/ml).

Positivkontrolle Mitomycin C (0,02 μ g/ml): 63 \pm 1 Mikrokerne/1000 Zellen.

Negativkontrolle Östradiol (5nM): 25 \pm 3 Mikrokerne/1000 Zellen

Originaldaten im Anhang auf Seite 109-109

3.2.2. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Die durch die getesteten Substanzen induzierten Mikrokerne enthalten einen Teil der DNA. Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung wird verwendet, um zu untersuchen, ob es sich bei den DNA-Fragmenten in den Mikrokernen um komplette Chromosomen oder Chromosomenbruchstücke handelt.

Hierzu werden die Kinetochorregionen der Chromosomen mit spezifisch bindenden Antikörpern aus dem Serum von Patienten mit dem CREST-Syndrom (CREST-Serum) und daran bindenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt. In der mikroskopischen Auswertung können anhand der positiven Signale in den Mikrokernen ganze Chromosomen mit intakten Kinetochoren detektiert werden.

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung wurde nur mit BG-1-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden gleichmäßig ausgesät und nach 24 Stunden mit den Testsubstanzen versetzt. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 96 Stunden. Nach 144 Stunden Wachstum wurden die Zellen geerntet.

Als Positivkontrolle diente DES 5µg/ml, als Negativkontrolle MMC.

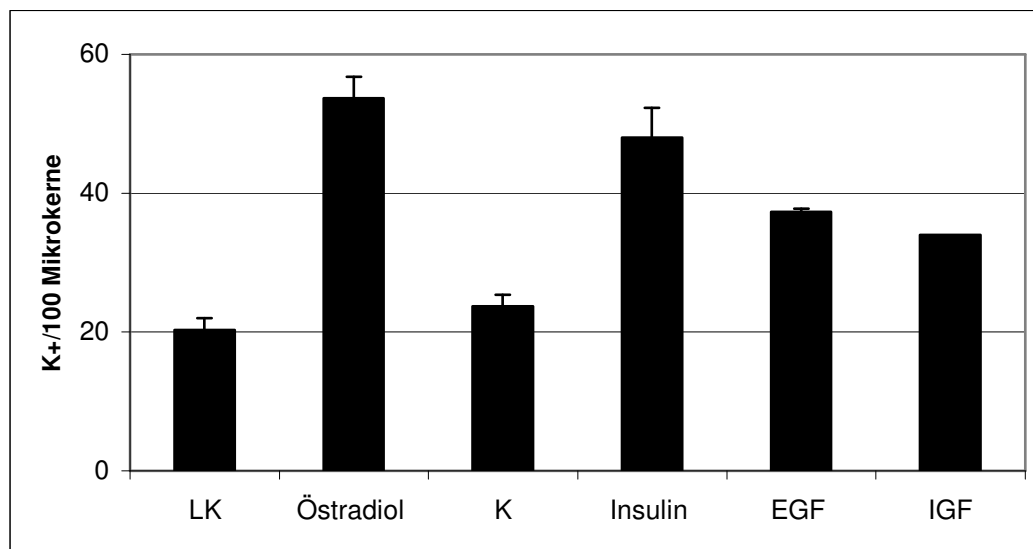


Abbildung 12 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit CREST-Serum. Dargestellt sind die Mittelwerte von kinetochorpositiven Mikrokernen aus dreimal 100 ausgezählten Mikrokernen. Die Zellen wurden mit 10nM Östradiol, 100µg/ml Insulin, 100ng/ml IGF und 100ng/ml EGF behandelt. Lösungsmittelkontrolle (LK) entspricht 0,1% DMSO, Kontrolle (K) entspricht unbehandelten Zellen.

Positivkontrolle DES: 64 ± 1 K⁺/100 Mikrokerne, Negativkontrolle MMC: 25 ± 3 K⁺/100 Mikrokerne

Originaldaten im Anhang auf Seite 110

Es wird deutlich, dass alle vier verwendeten Testsubstanzen im Vergleich zur Kontrolle bzw. Lösungsmittelkontrolle einen höheren Anteil Kinetochor-positiver Mikrokerne aufweisen. Damit lassen sich die Substanzen in die Gruppe der Aneuploidie erzeugenden Agenzien einordnen.

3.3. Inhibierung der Zytokinese

Zur Inhibierung der Zytokinese wurden die Zellen 96 Stunden nach gleichmäßiger Aussaat für 24 Stunden mit der zu untersuchenden Testsubstanz und Cytochalasin B inkubiert. Cytochalasin B inhibiert nach erfolgter Mitose die Zytokinese, so dass doppelkernige Zellen entstehen.

Zum einen wurden in diesem Versuch die Mikrokerne der doppelkernigen Zellen gezählt. Es wurde also der Anteil der Mikrokerne in den Zellen bestimmt, die sich genau einmal geteilt hatten.

Zum anderen wurde das Verhältnis von ein- zu doppelkernigen Zellen bestimmt. Dieses diente zusätzlich als Maß der Proliferation.

Um zu gewährleisten, dass sich die Zellen durch die Zugabe von Cytochalasin B nicht geteilt hatten, wurde nach der Ernte der Zellen die Zellzahl bestimmt. Diese Ergebnisse sind im Anhang dargestellt.

Da die Zellzahl für behandelte und unbehandelte Zellen nahezu gleich war und damit gewährleistet war, dass sich die Zellen nach Zugabe von Cytochalasin B nicht geteilt hatten, wurden die Zellen mit Hilfe der Zytozentrifuge auf Objektträger aufgebracht, gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Ausgewertet wurde der Anteil der Doppelkernigen unter 1000 Zellen pro Objektträger sowie der Anteil der Doppelkernigen mit Mikrokernen pro 1000 Doppelkernige. Für jede Testsubstanz wurden drei Objektträger ausgezählt.

3.3.1. BG-1-Zellen

Die ausgesäten BG-1 Zellen wurden nach 96 Stunden Wachstum mit den Testsubstanzen (Östradiol 5nM, Insulin 100µg/ml, EGF 100ng/ml und IGF 100ng/ml) sowie Cytochalasin B (2µg/ml) für 24 inkubiert. Als Kontrolle dienten für Östradiol mit 0,1% DMSO behandelte Zellen, für Insulin, EGF und IGF unbehandelte Zellen. Als Positivkontrolle wurde MMC verwendet.

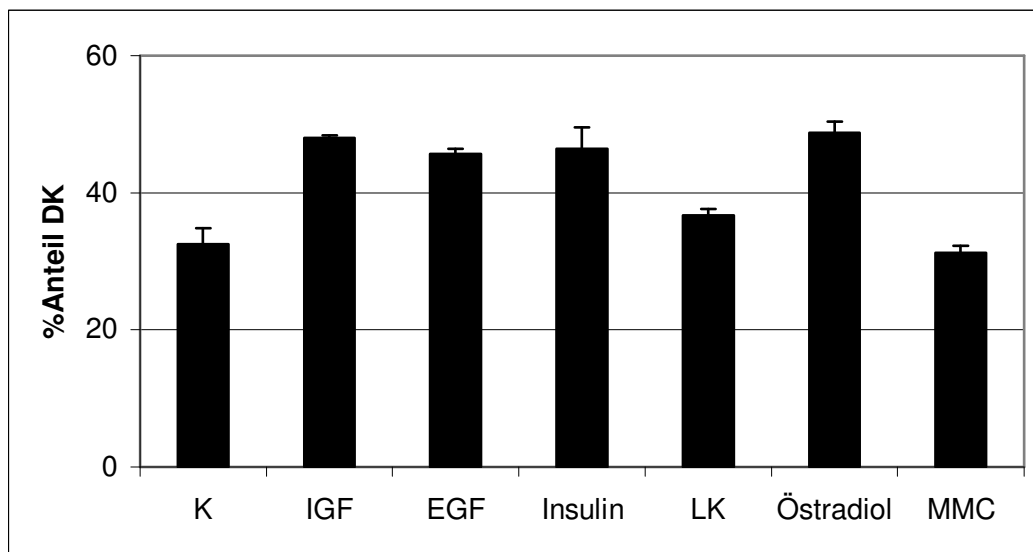


Abbildung 13 Prozentualer Anteil der doppelkernigen Zellen nach Behandlung mit Cytochalasin B (2µg/ml) und verschiedenen Testsubstanzen (Östradiol 5nM, Insulin 100µg/ml, EGF 100ng/ml, IGF 100ng/ml). Lösungsmittelkontrolle (LK) behandelt mit 0,1% DMSO, Kontrolle (K) unbehandelt, Positivkontrolle Mitomycin C (MMC) 0,02µg/ml. Dargestellt ist der Mittelwert von dreimal 1000 ausgezählten Zellen. *Originaldaten im Anhang auf Seite 110*

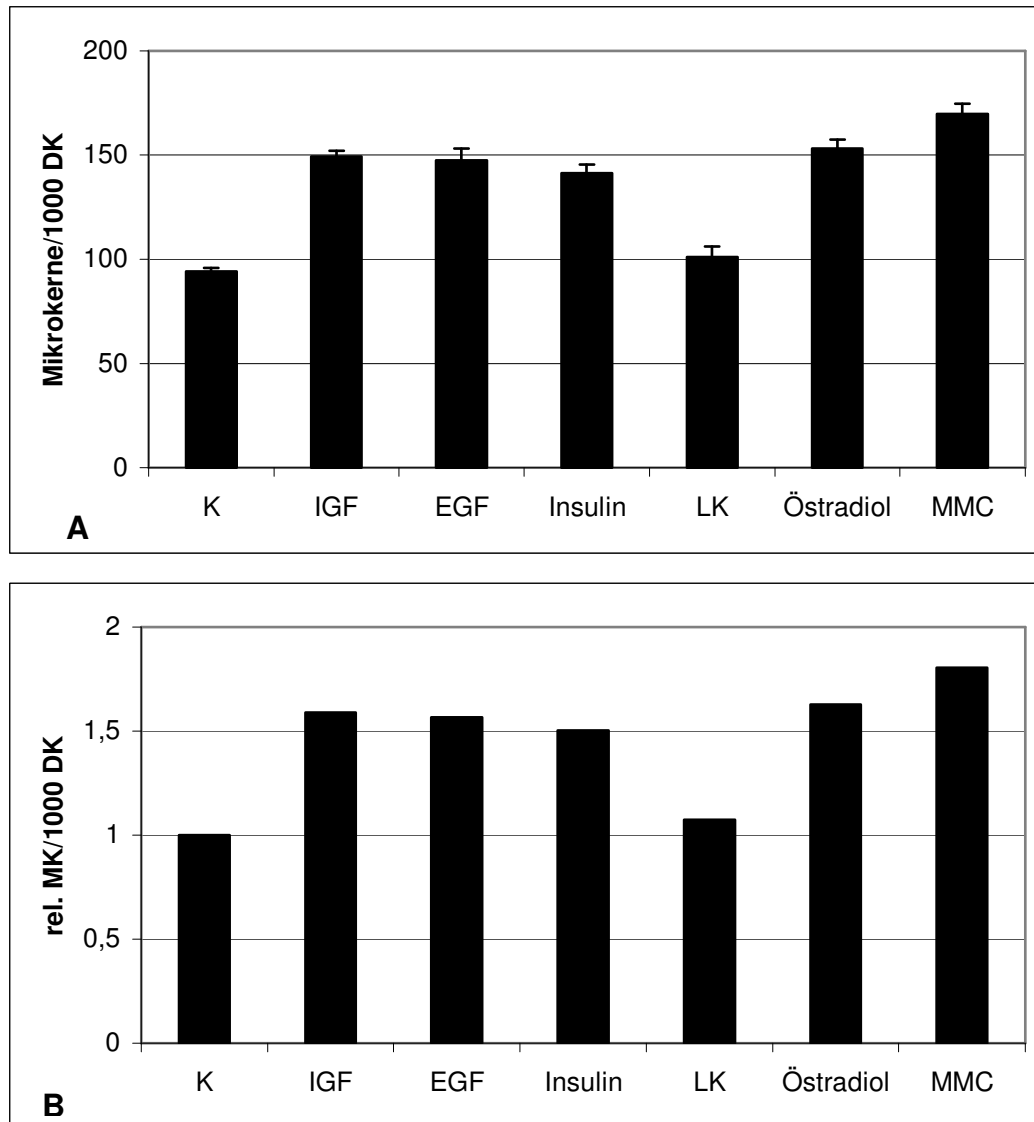


Abbildung 14 (A) Mikrokerninduktion in doppelkernigen Zellen und (B) relative Induktion der Mikrokerne nach Behandlung mit Cytochalasin B (2µg/ml) und verschiedenen Testsubstanzen (Östradiol 5nM, Insulin 100µg/ml, EGF 100ng/ml, IGF 100ng/ml). Lösungsmittelkontrolle (LK) behandelt mit 0,1% DMSO, Kontrolle (K) unbehandelt, Positivkontrolle Mitomycin C (MMC) 0,02µg/ml. Dargestellt ist der Mittelwert von dreimal 1000 ausgezählten Zellen.

Originaldaten im Anhang auf Seite 110

Die mit den proliferationsstimulierenden Substanzen Östradiol, Insulin, EGF und IGF behandelten Zellen zeigen im Vergleich zu Kontrolle bzw. Lösungsmittelkontrolle eine Steigerung der Mikrokernrate. Ebenso lässt sich aus den Ergebnissen eine Steigerung der Proliferation durch die Testsubstanzen sehen, welche sich aus dem Verhältnis von ein- zu doppelkernigen Zellen ergibt. Dies bedeutet, dass die stimulierten Zellen in den 24 Stunden Inkubation mit Cytochalasin B eine erhöhte Mitoserate bzw. kürzere Zellzyklusdauer aufweisen als die unbehandelten Zellen. Die stimulierten Zellen teilen sich also häufiger und schneller als die Zellen der Kontrolle.

3.3.2. UCI-Zellen

Die ausgesäten UCI-Zellen wurden nach 96 Stunden Wachstum mit den Testsubstanzen (Insulin 100 μ g/ml, EGF 100ng/ml und IGF 100ng/ml) sowie Cytochalasin B (2 μ g/ml) für 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Als Positivkontrolle wurde MMC verwendet.

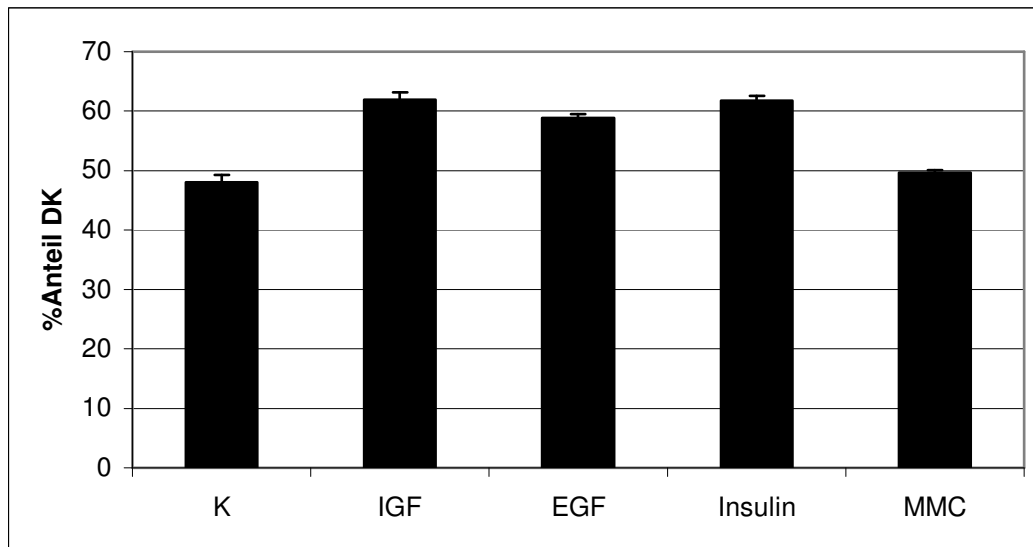


Abbildung 15 Prozentualer Anteil der doppelkernigen Zellen nach Behandlung mit Cytochalasin B (2 μ g/ml) und verschiedenen Testsubstanzen (Insulin 100 μ g/ml, EGF 100ng/ml, IGF 100ng/ml). Kontrolle (K) unbehandelt, Positivkontrolle Mitomycin C (MMC) 0,02 μ g/ml. Dargestellt ist der Mittelwert von dreimal 1000 ausgezählten Zellen.

Originaldaten im Anhang auf Seite 112

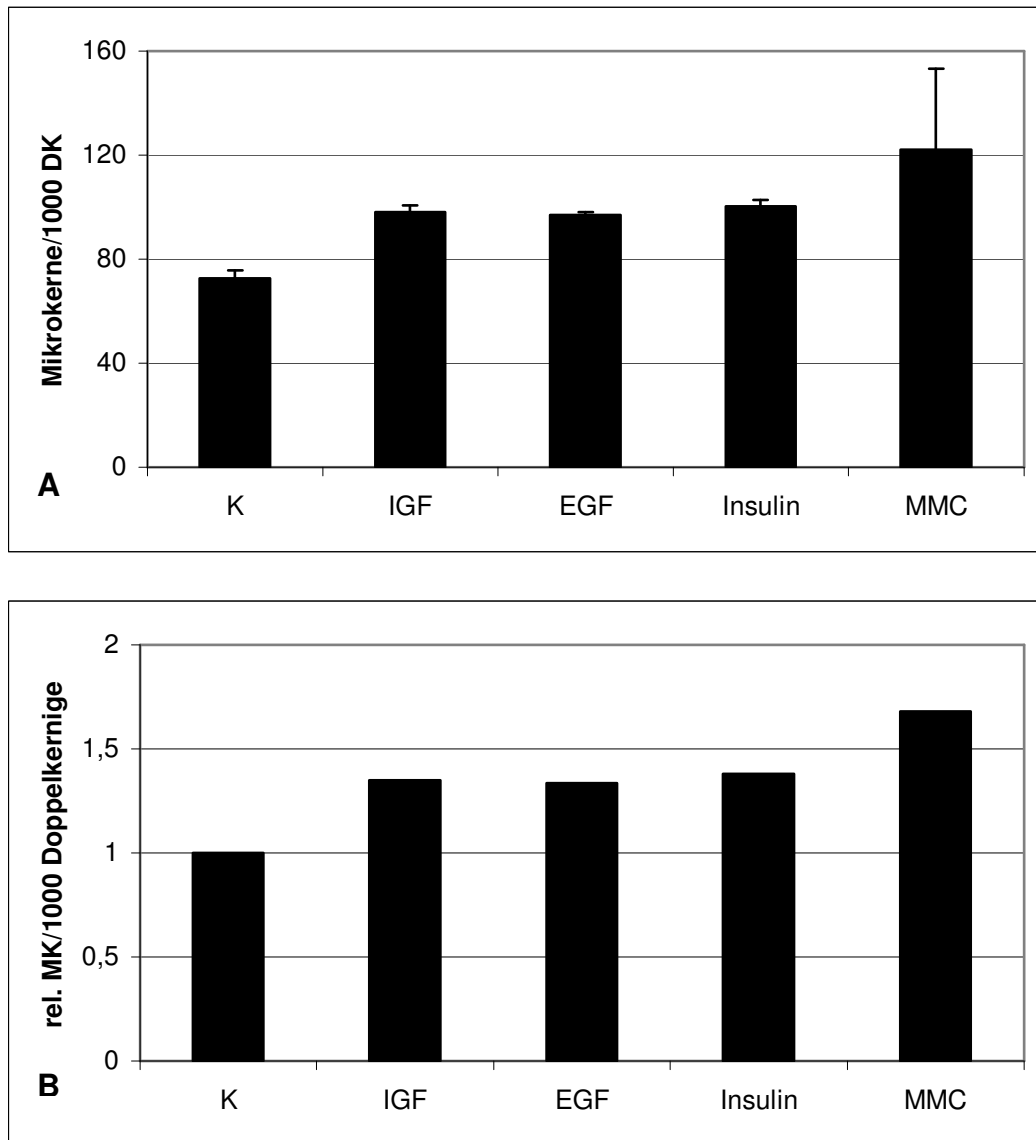


Abbildung 16 (A) Mikrokerninduktion in doppelkernigen Zellen und (B) relativer Anteil der Mikrokerne nach Behandlung mit Cytochalasin B ($2\mu\text{g/ml}$) und verschiedenen Testsubstanzen (Insulin $100\mu\text{g/ml}$, EGF 100ng/ml , IGF 100ng/ml). Kontrolle (K) unbehandelt, Positivkontrolle Mitomycin C (MMC) $0,02\mu\text{g/ml}$. Dargestellt ist der Mittelwert von dreimal 1000 ausgezählten Zellen. Originaldaten im Anhang auf Seite 112

Auch die UCI-Zellen weisen bei Behandlung mit IGF, EGF und Insulin eine erhöhte Mikrokernrate sowie eine gesteigerte Proliferationsrate auf.

Der Zusammenhang zwischen gesteigerter Proliferation und erhöhter Mikrokernzahl legt die Vermutung nahe, dass die proliferationsstimulierenden Substanzen einen Einfluss auf den Zellzyklus ausüben, durch den die Mikrokernrate erhöht wird.

3.4. Westernblot

Da die Ergebnisse der Gentoxizitätstest einen Einfluss der proliferationsstimulierenden Substanzen auf den Zellzyklus nahe legten, sollte die Expression verschiedener Zellzyklus-regulierender Proteine und bestimmter DNA-Reparatur-Enzyme untersucht werden.

3.4.1. Langzeitversuche

Hierzu wurden BG-1-Zellen gleichmäßig in T25-Flaschen ausgesät und nach 24, 96 und 144 Stunden mit den Testsubstanzen versetzt. Nach 96 Stunden wurde außerdem das Medium gewechselt.

Die Zellen wurden nach 24, 96, 120, 144 und 168 Stunden geerntet, lysiert und bei -20°C aufbewahrt.

Bei der Ernte erfolgte jeweils eine Zellzahlbestimmung mit dem Coulter-Counter, um sicherzustellen, dass die behandelten Zellen eine höhere Proliferationsrate aufweisen als die Kontrolle.

3.4.1.1. Östradiol

Die Zellen wurden zu den oben angegebenen Zeitpunkten mit 5nM Östradiol stimuliert, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und eine mit 0,1% DMSO versetzte Lösungsmittelkontrolle.

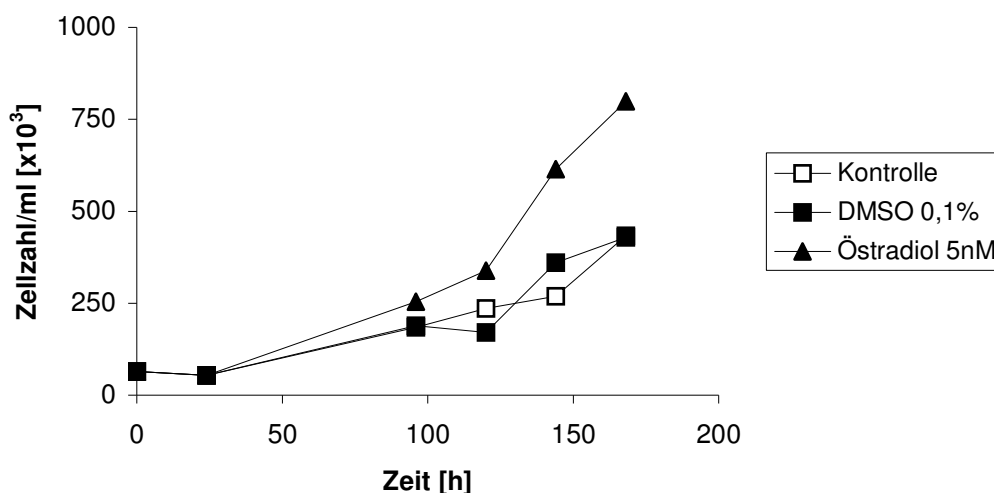


Abbildung 17 Wachstumskinetik mit 5nM Östradiol behandelter BG-1-Zellen. Kontrolle unbehandelte Zellen, Lösungsmittelkontrolle DMSO 0,1%.

Originaldaten im Anhang Seite 114

Die mit Östradiol stimulierten Zellen zeigten eine deutliche Proliferationssteigerung gegenüber unbehandelten bzw. mit DMSO behandelten Zellen, so dass die Lysate für den Westernblot verwendet werden konnten.

Hierfür wurde der Proteingehalt der Proben bestimmt und 20µg Protein pro Lysat auf die Gele aufgetragen. Um zu gewährleisten, dass jede Bande die gleiche Proteinmenge enthält, wurde die Membran zuerst mit α -Tubulin gefärbt. Dieses Protein ist in allen Zellen unabhängig von Zellzyklusphasen enthalten und somit weisen bei gleichem Proteingehalt alle Banden die gleiche Dichte auf. Anhand der hierdurch erhaltenen Dichte-Werte der einzelnen Banden wurden die Ergebnisse der getesteten Proteine später korrigiert, indem die Dichtewerte für α -Tubulin miteinander verglichen wurden und die Korrelation dieser Werte als Korrekturfaktor in die Berechnung der Dichtewerte für andere Proteine mit einbezogen wurde.

3.4.1.1.1. p53

Da der p53-Gehalt in Zellen mit Mikrokernen erhöht ist und p53 ein wichtiges Regulationsprotein für Zellzyklusarrest nach DNA-Schäden ist, wurde die Expression von p53 im Westernblot analysiert. Hierbei wurde die Expression sowohl von Wildtyp-p53 (p53wt) als auch von mutiertem p53 (p53mt) untersucht.

3.4.1.1.1.1.p53 wt

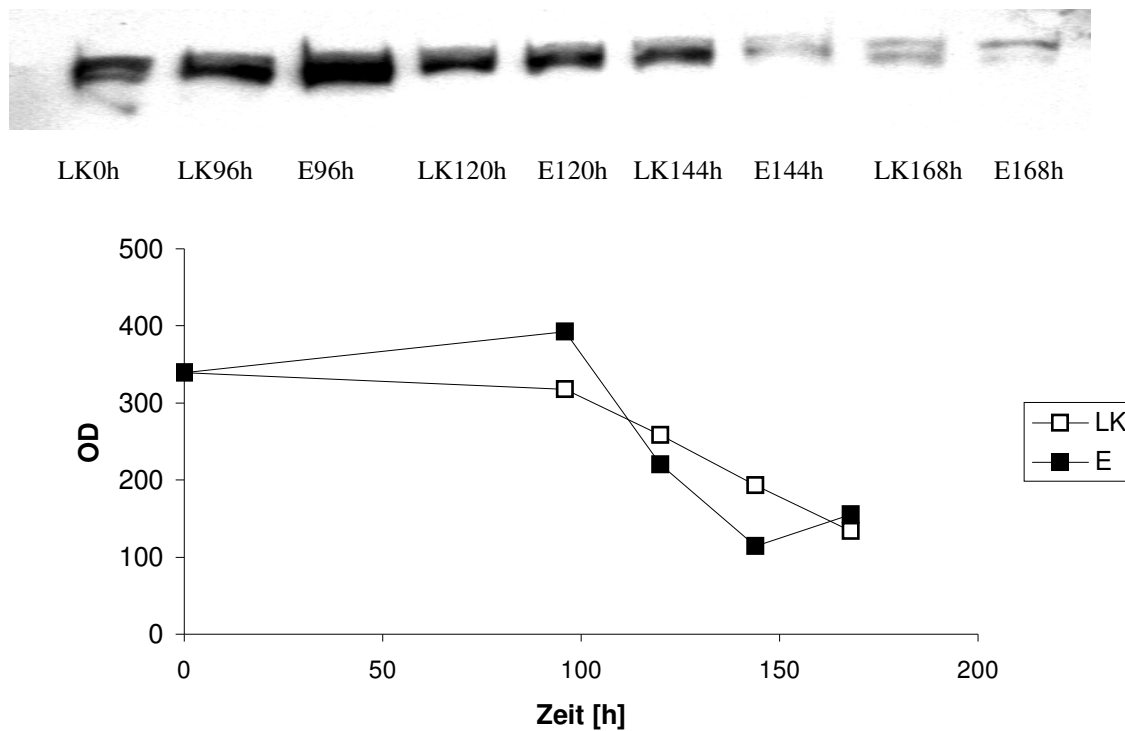


Abbildung 18 Expression von p53wt im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs.
E: Östradiol 5nM; LK: DMSO 0,1%
Originaldaten im Anhang Seite 114

Im zeitlichen Verlauf zeigt sich zuerst eine leichte Zunahme der p53-wt-Expression gegenüber der Kontrolle, die in der exponentiellen Wachstumsphase jedoch unter das Kontrollniveau absinkt und sich schließlich der Kontrolle angleicht.

3.4.1.1.1.2.p53mt

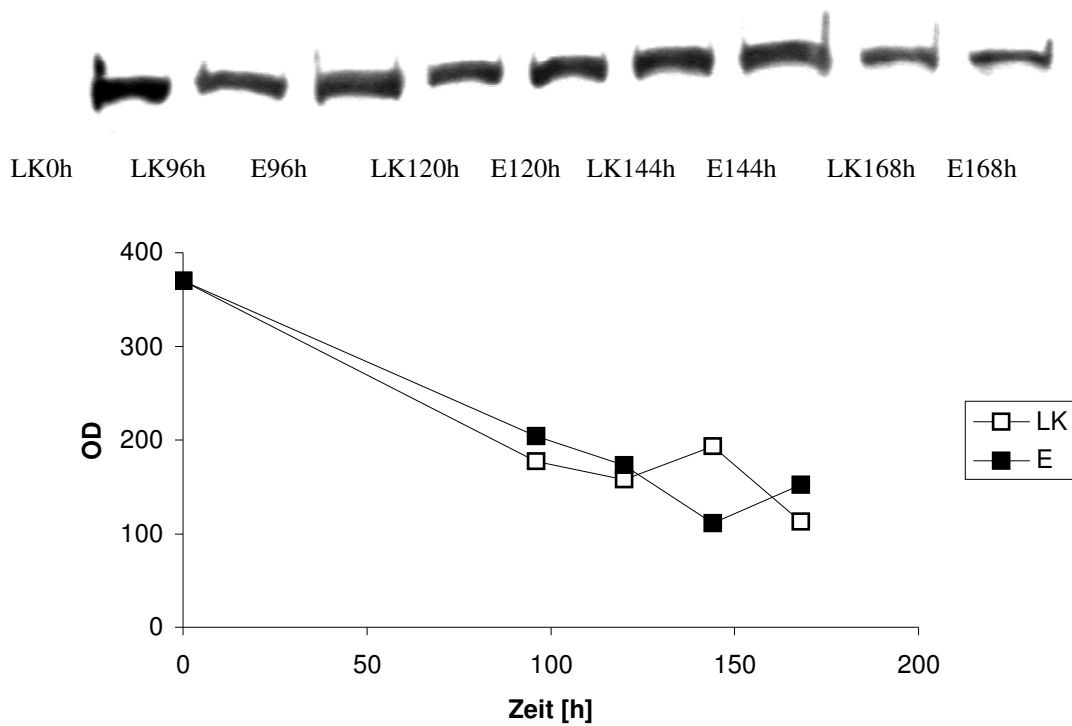


Abbildung 19 Expression von p53mt im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs.
E: Östradiol 5nM; LK: DMSO 0,1%
Originaldaten im Anhang Seite 114

Während zunächst die Expression von p53mt sowohl in den mit Östradiol als auch in den unbehandelten Zellen bis zum Zeitpunkt 120 Stunden abnimmt, zeigt sich dann ein Abfall der Konzentration in den behandelten, ein Anstieg in den unbehandelten Zellen. Zum Zeitpunkt 168 Stunden übersteigt die Expression von mutiertem p53 in den mit Östradiol behandelten Zellen den Wert der Kontrolle.

3.4.1.1.2. Cyclin B

Eine Möglichkeit nach DNA-Schaden einen Zellzyklus-Arrest zu erzielen, ist die Herabregulierung von Cyclin B über p53. Deswegen wurde die Expression von Cyclin B im Western-Blot untersucht.

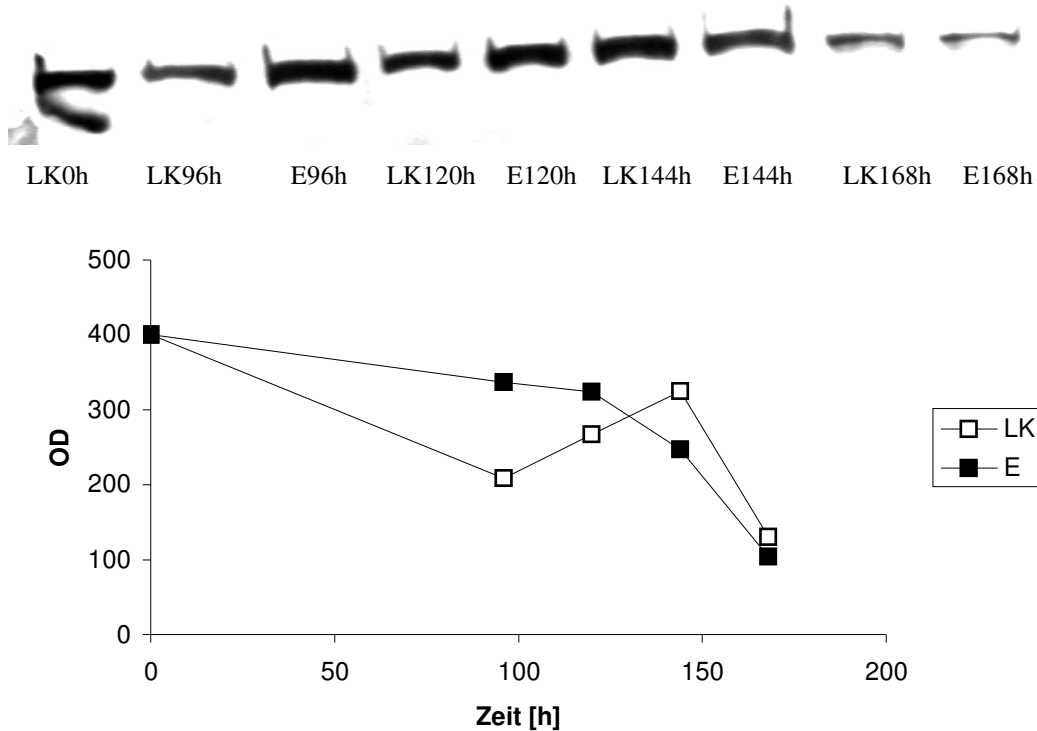


Abbildung 20 Expression von Cyclin B im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs.
E: Östradiol 5nM; LK: DMSO 0,1%
Originaldaten im Anhang Seite 115

Im zeitlichen Verlauf fällt zuerst eine Erhöhung der Cyclin B-Expression auf, die dann aber unter dem Kontrollniveau verläuft.

3.4.1.1.3. Cyclin A

Da Cyclin A auch über p53 reguliert wird und eine Bedeutung für den Übergang zur S-Phase hat, erschien es sinnvoll, die Expression von Cyclin A darzustellen.

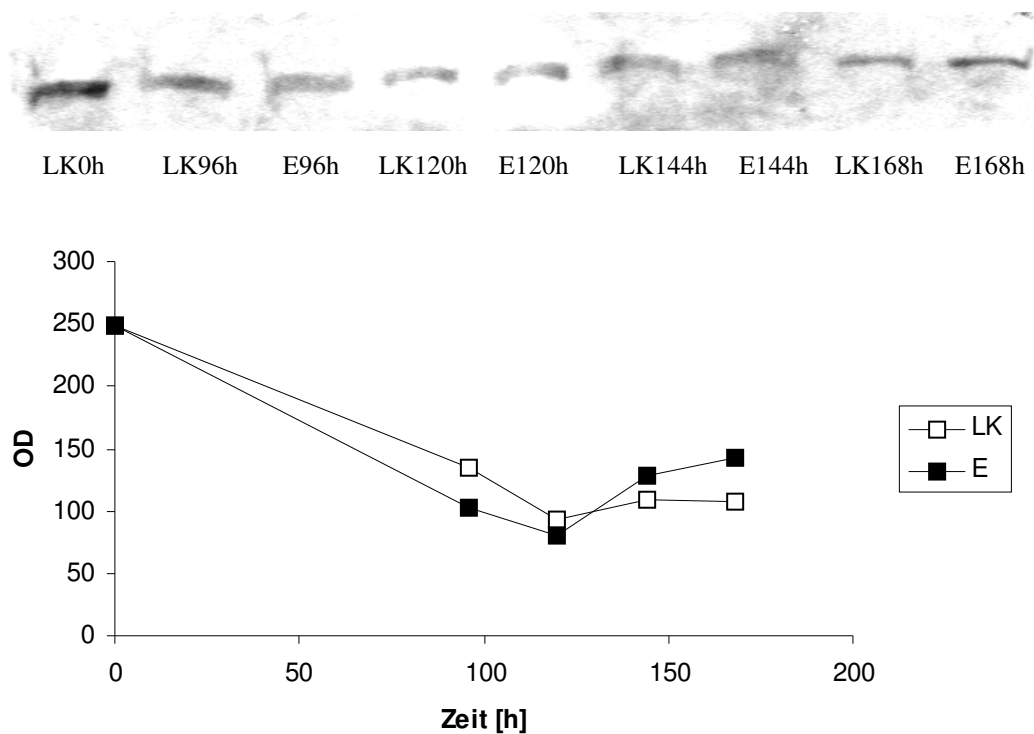


Abbildung 21 Expression von Cyclin A im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs.
 E: Östradiol 5nM; LK: DMSO 0,1%
 Originaldaten im Anhang Seite 115

Hier stellt sich ein fast gleicher Verlauf von Kontrolle und Östradiol dar. Am Ende der exponentiellen Wachstumsphase steigt die Expression von Cyclin A in den mit Östradiol behandelten Zellen jedoch an.

3.4.1.1.4. DNA-Polymerase δ

Die DNA-Polymerase δ ist ein wichtiges Reparaturenzym, das vor allem bei der Basen-Exzisions-Reparatur aktiv wird. Deswegen wählten wir es aus, um die Aktivität der Reparaturenzyme nach hormoneller Stimulation zu untersuchen.

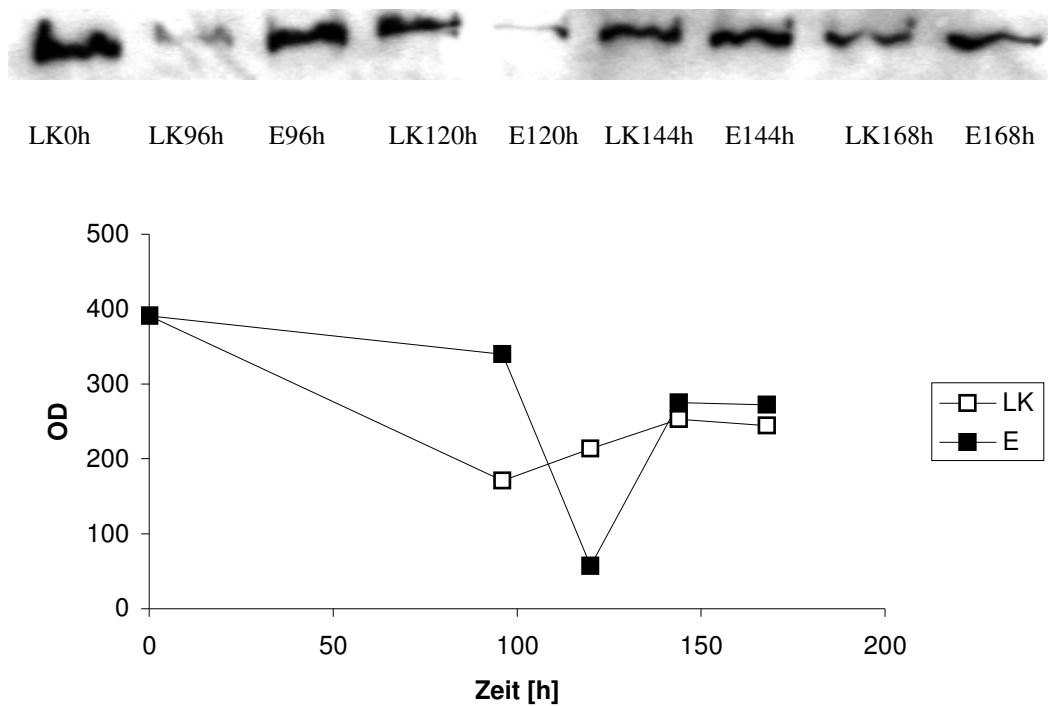


Abbildung 22 Expression von DNA Polymerase δ im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs.

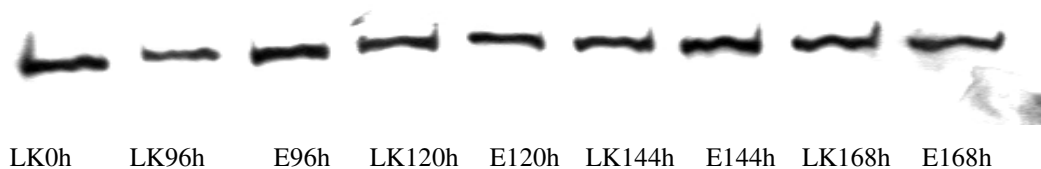
E: Östradiol 5nM; LK: DMSO 0,1%

Originaldaten im Anhang Seite 115

Zu Beginn des exponentiellen Wachstums findet sich eine Erhöhung der DNA-Polymerase δ in den mit Östradiol behandelten Zellen um nahezu Faktor 2. Nach einem starken Abfall auf die Hälfte der Kontrollkonzentration steigt die Expression jedoch wieder und verläuft etwas höher als die Kontrolle.

3.4.1.1.5. MSH2

Auch MSH2 spielt bei der Reparatur von DNA-Schäden eine bedeutende Rolle. MSH 2 erkennt Insertionen und Deletionen, weswegen wir uns durch die Darstellung des Verlaufs einen Aufschluss über die Reparaturtätigkeit der Zellen erhofften.



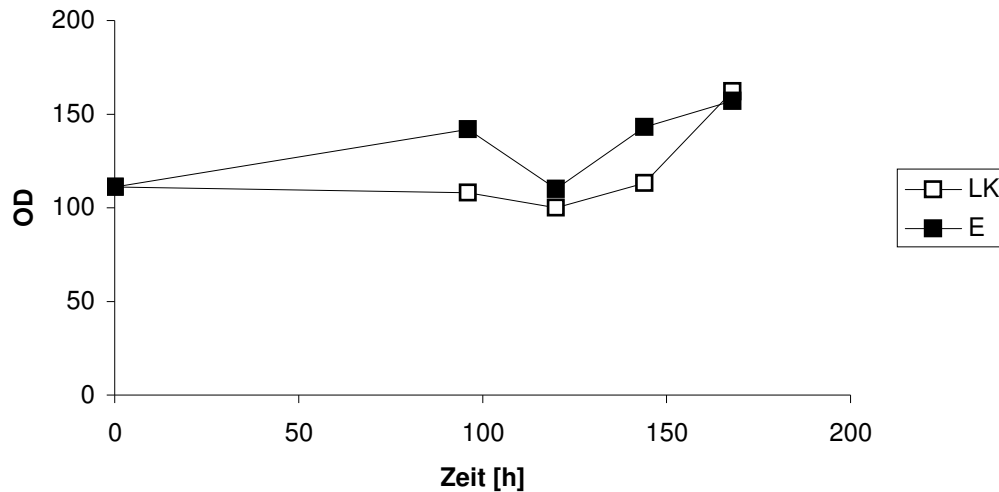
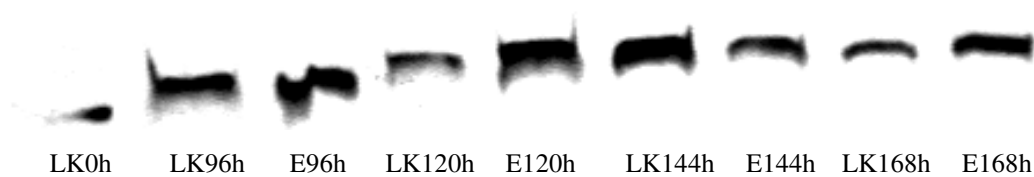


Abbildung 23 Expression von MSH2 im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs.
E: Östradiol 5nM; LK: DMSO 0,1%
Originaldaten im Anhang Seite 116

Tatsächlich liegt die Expression von MSH2 fast durchgehend über der Kontrolllinie, so dass eine gesteigerte Reparaturtätigkeit in den mit Östradiol behandelten Zellen vermutet werden kann.

3.4.1.1.6. PCNA

PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ist zum einen ein guter Proliferationsmarker, zum anderen ist es bei der Resynthese reparierter DNA beteiligt. Proliferierende Zellen sollten also einen Anstieg in der PCNA-Konzentration zeigen.



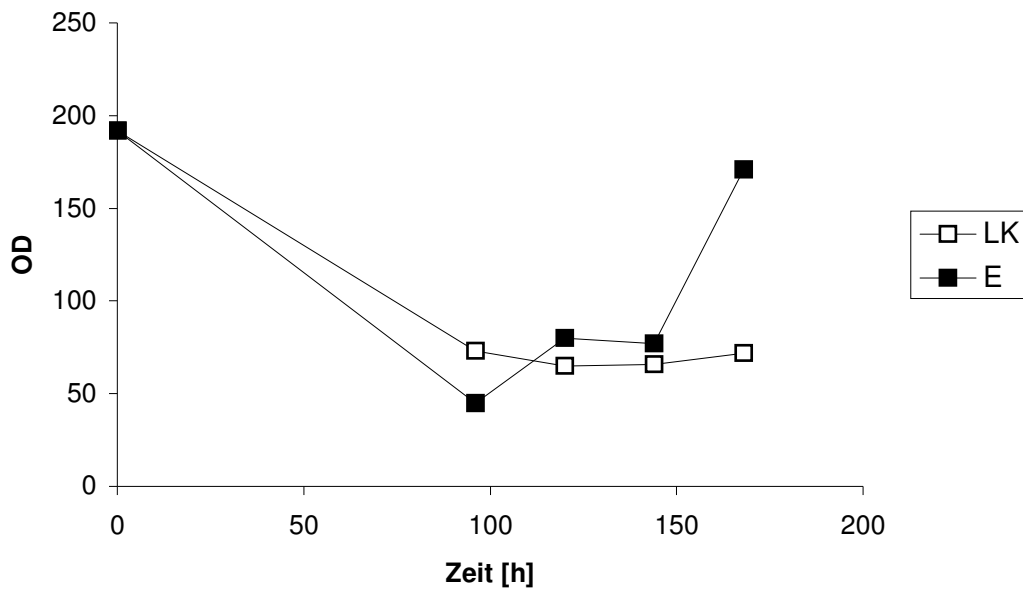


Abbildung 24 Expression von PCNA im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs. E: Östradiol 5nM; LK: DMSO 0,1%
Originaldaten im Anhang Seite 116

Wie erwartet sieht man zu Beginn des exponentiellen Wachstums eine Steigerung der PCNA-Konzentration bei Östradiol im Vergleich zur Kontrolle sowie eine Zunahme auf Faktor 2 zum Zeitpunkt 168 Stunden.

3.4.1.2. IGF

Auch mit IGF wurde ein Versuch über 168 Stunden durchgeführt. Die Zellen wurden hierbei mit 50ng/ml IGF stimuliert, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

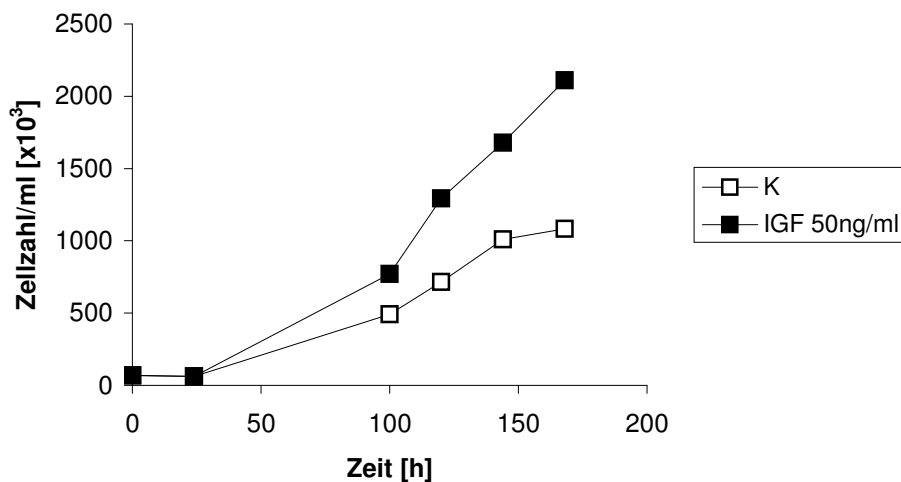


Abbildung 25 Wachstumskinetik mit 50ng/ml IGF behandelter BG-1-Zellen. Kontrolle unbehandelte Zellen. Originaldaten im Anhang Seite 116

Bei 168 Stunden zeigten die mit IGF behandelten Zellen eine Wachstumssteigerung um Faktor 1,9 gegenüber der Kontrolle. Die Zellen wurden also lysiert, der Proteingehalt bestimmt und die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen wiederum mit α -Tubulin normiert.

3.4.1.2.1. p53

Auch für IGF wurde der Gehalt an p53 bestimmt.

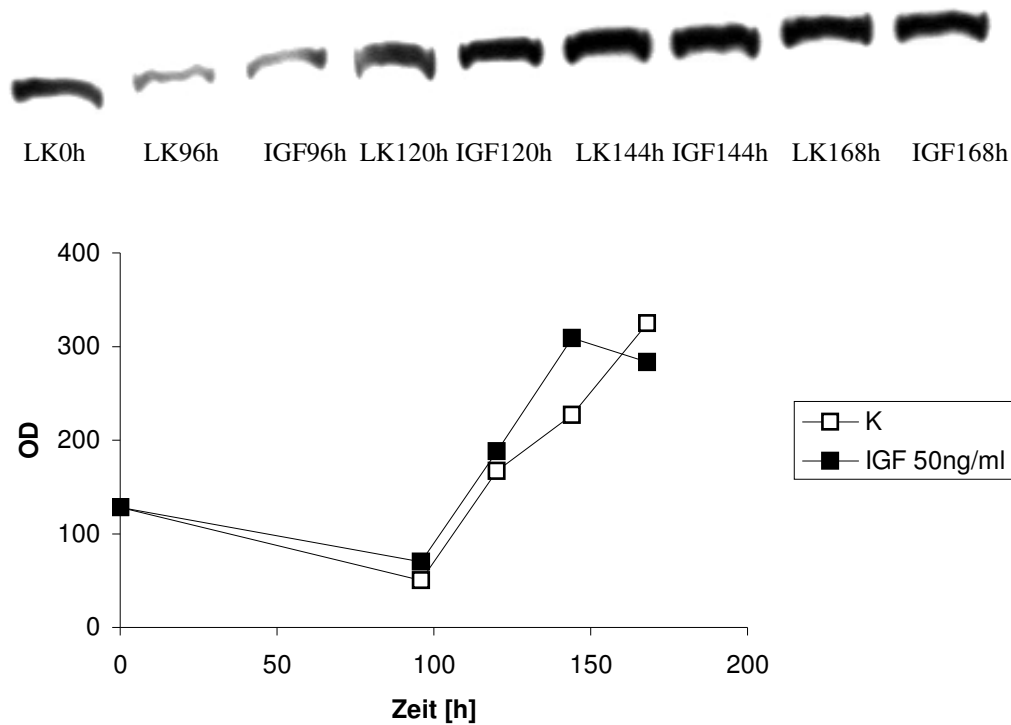


Abbildung 26 Expression von p53 im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs. IGF 50ng/ml; K: unbehandelte Zellen
Originaldaten im Anhang Seite 117

Hier zeigt sich sowohl in der Kontrolle als auch bei den mit IGF behandelten Zellen eine Zunahme der p53-Expression über die Zeit. Deutlich ist auch, dass die Expression von p53 in mit IGF stimulierten Zellen bis auf den letzten Wert über dem Niveau der Kontrolle liegt.

3.4.1.2.2. p21

Ein weiteres Ziel-Protein von p53 ist p21, über das ein Arrest des Zellzyklus nach DNA-Schaden in der G1/S-Phase erzielt wird. Deswegen sollte nach dem oben dargestellten p53 auch die Expression von p21 im Western-Blot untersucht werden.

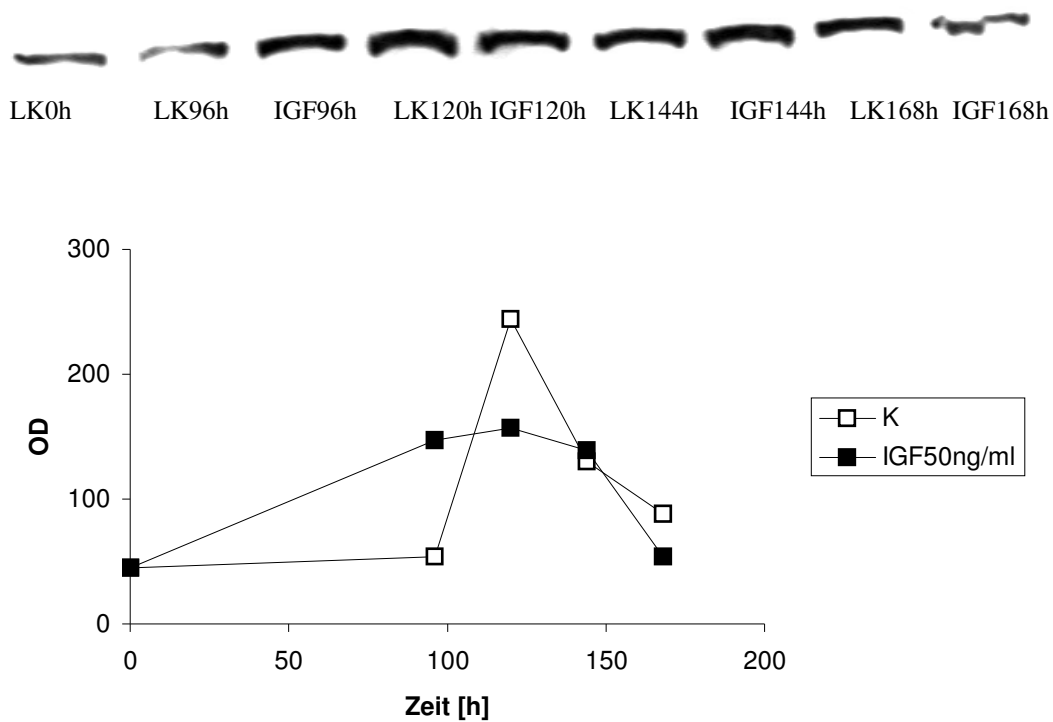
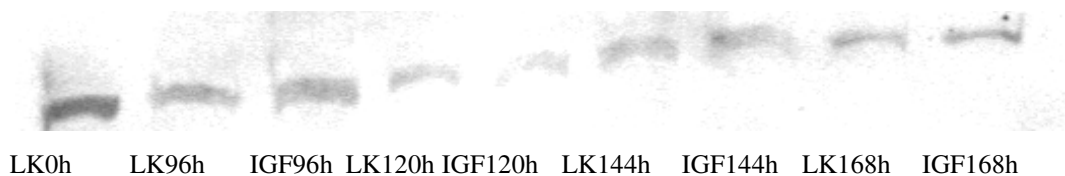


Abbildung 27 Expression von p21 im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs. IGF 50ng/ml; K: unbehandelte Zellen
Originaldaten im Anhang Seite 117

Die Expression von p21 in der Kontrolle zeigt einen starken Peak zu Beginn des exponentiellen Wachstums. In den mit IGF behandelten Zellen steigt die Konzentration von p21 in der exponentiellen Wachstumsphase langsamer an, erreicht bei 120 Stunden ihr Maximum und kehrt dann auf das Ausgangsniveau zurück.

3.4.1.2.3. cdk1/cdc2

Ein weiteres target-Protein von p53 ist cdk1/cdc2. Zusammen mit Cyclin B bildet es den mitosis promoting factor (MPF). Bei Aktivierung von p53 wird die Expression von cdc2 herunterreguliert, wodurch ein Zellzyklus-Arrest in der G2/M-Phase erzielt wird.



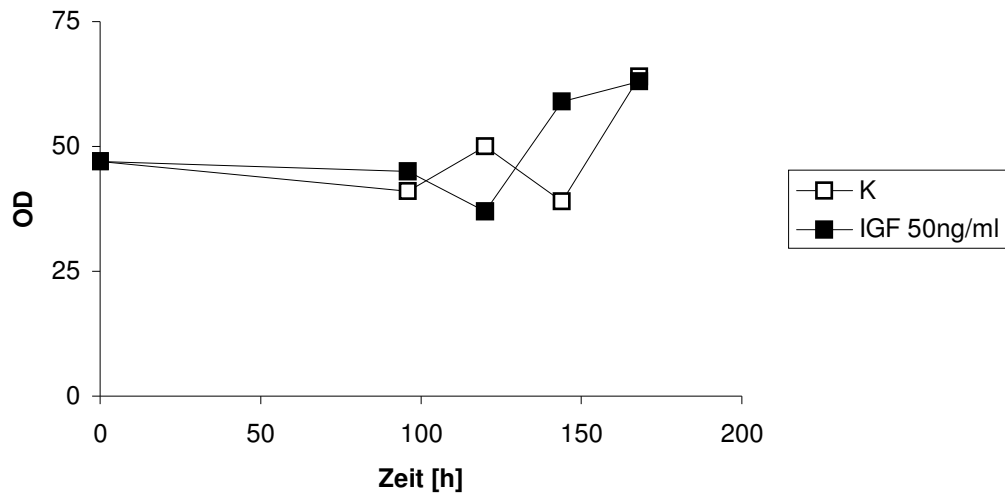
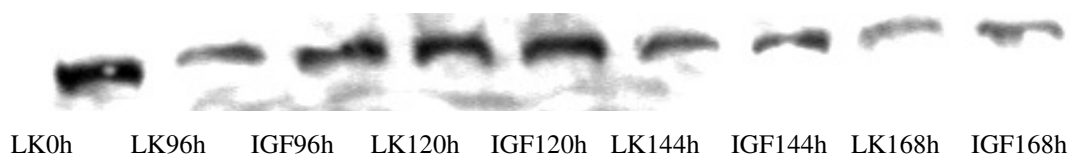


Abbildung 28 Expression von cdk1/cdc2 im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs. IGF 50ng/ml; K: unbehandelte Zellen
Originaldaten im Anhang Seite 117

Hier zeigt sich im zeitlichen Verlauf ein leichter Anstieg der Expression von cdk1/cdc2, die Werte von Kontrolle und stimulierten Zellen liegen sehr nahe beieinander. Allerdings zeigte sich im zeitlichen Verlauf eine leichte Zunahme der Expression, die nicht mit der Zunahme des ebenfalls bestimmten p53 (siehe 4.1.2.1.) erklärt werden kann.

3.4.1.2.4. Cyclin D

Cyclin D dient als Sensor für mitogene Stimulation und ist unter Stimulation während des ganzen Zellzyklus exprimiert. Die maximale Expression findet sich im Übergang von G1- zu S-Phase. Cyclin D kontrolliert die Aktivität des Transkriptionsfaktors E2F.



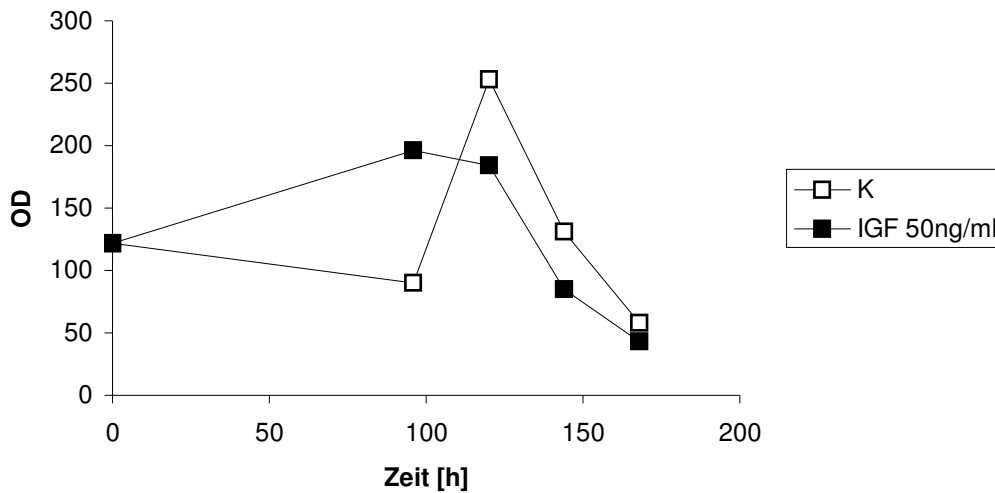
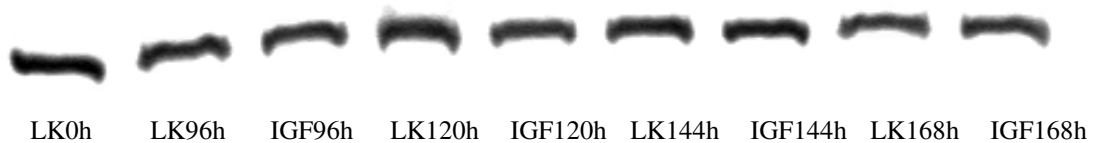


Abbildung 29 Expression von Cyclin D im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs. IGF 50ng/ml; K: unbehandelte Zellen
Originaldaten im Anhang Seite 118

In den unbehandelten Zellen findet sich zunächst ein Abfall der Cyclin D-Expression mit konsekutivem steilem Anstieg in der exponentiellen Wachstumsphase, gefolgt von raschem Abfall der Konzentration. Die Konzentration von Cyclin D in den mit IGF behandelten Zellen ist anfangs um ungefähr Faktor 2 gegenüber der Kontrolle erhöht, sinkt dann jedoch auf einen Wert unterhalb des Ausgangsniveaus ab.

3.4.1.2.5. PCNA

Da sich in den mit Östradiol behandelten Zellen PCNA als guter Marker für Proliferation bzw. Reparatur evtl. entstandener DNA-Schäden erwies, wurde die Expression von PCNA auch in den mit IGF behandelten Zellen untersucht.



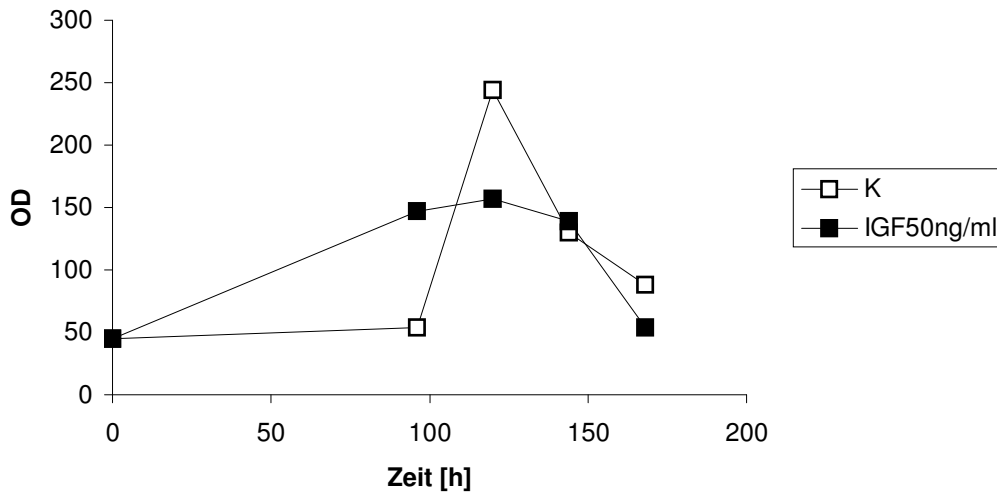


Abbildung 30 Expression von PCNA im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs. IGF 50ng/ml; K: unbehandelte Zellen
Originaldaten im Anhang Seite 118

In der PCNA-Expression zeigt sich ein ähnliches Bild wie in der Cyclin D-Expression: Ein langsamer Anstieg der mit IGF behandelten Zellen mit Maximum bei 120 Stunden, gefolgt vom langsamen Abfallen der Konzentration. Die unbehandelten Zellen zeigen einen Peak bei 120 Stunden mit stärkerem Konzentrationsabfall.

3.4.1.2.6. DNA-Polymerase δ

Als Reparaturenzym sollte auch unter Stimulation mit IGF wiederum die Expression von DNA-Polymerase δ beurteilt werden.

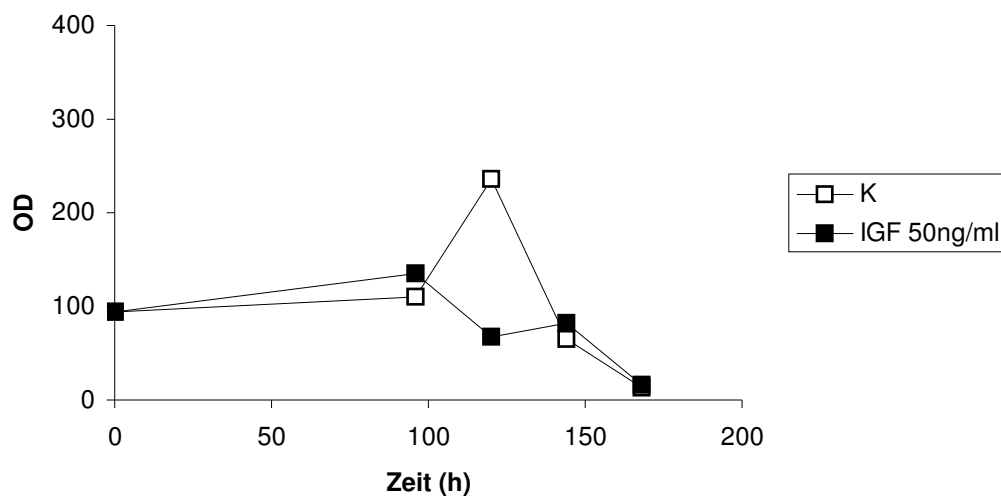


Abbildung 31 Expression von DNA-Polymerase δ im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs. IGF 50ng/ml; K: unbehandelte Zellen
Originaldaten im Anhang Seite 118

Es zeigt sich ein Anstieg der Expression von DNA-Polymerase δ bis zum Zeitpunkt 100 Stunden, danach ein kontinuierlicher Abfall der Konzentration in den behandelten Zellen. Die unbehandelten Zellen exprimieren DNA-Polymerase δ 120 Stunden nach Aussaat in fast 3fach so hoher Konzentration wie die behandelten Zellen.

3.4.1.2.7. MSH2

Auch MSH2 wurde als Marker für die Reparaturtätigkeit der Zellen von uns untersucht.

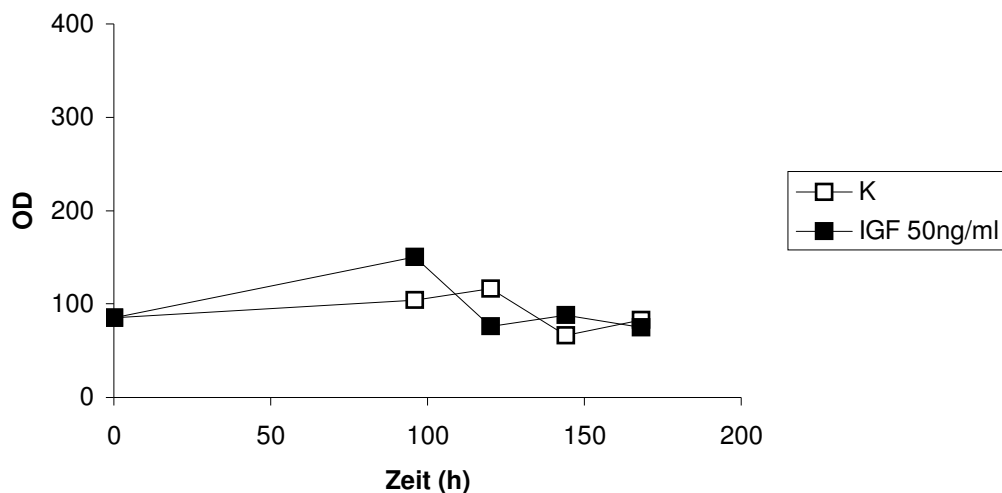


Abbildung 32 Expression von MSH2 im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs. IGF 50ng/ml; K: unbehandelte Zellen
Originaldaten im Anhang Seite 119

Im Verlauf über 168 Stunden zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von MSH2 zwischen behandelten und unbehandelten Zellen.

3.4.2. Kurzzeitversuche

Da ein starker Einfluss der Testsubstanzen auf den Zellzyklus direkt nach ihrer Zugabe nahe liegt, in dessen Folge die im Mikrokerntest aufgewiesenen Mutationen eintraten, untersuchten wir die Expression bestimmter Zellzyklus-Regulations-Proteine in Kurzzeitversuchen.

Hierzu wurden BG-1-Zellen gleichmäßig ausgesät und nach 24, 96 und 144 Stunden mit den Testsubstanzen versetzt. Nach 96 Stunden wurde außerdem das Medium gewechselt.

Die Zellen wurden 24, 26, 28, 30, 32, 48 und 168 Stunden nach Aussaat gerntet, lysiert und bei -20°C aufbewahrt.

Bei der Zellzahlbestimmung mit dem Coulter-Counter war vor allem die Wachstumssteigerung zum Zeitpunkt 168 Stunden von Bedeutung, zu dem die behandelten Zellen eine stärkere Proliferation als die der Kontrolle zeigen sollten.

3.4.2.1. Östradiol

Die Zellen wurden zu den oben angegebenen Zeitpunkten mit 5nM Östradiol stimuliert, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und eine mit 0,1% DMSO versetzte Lösungsmittelkontrolle.

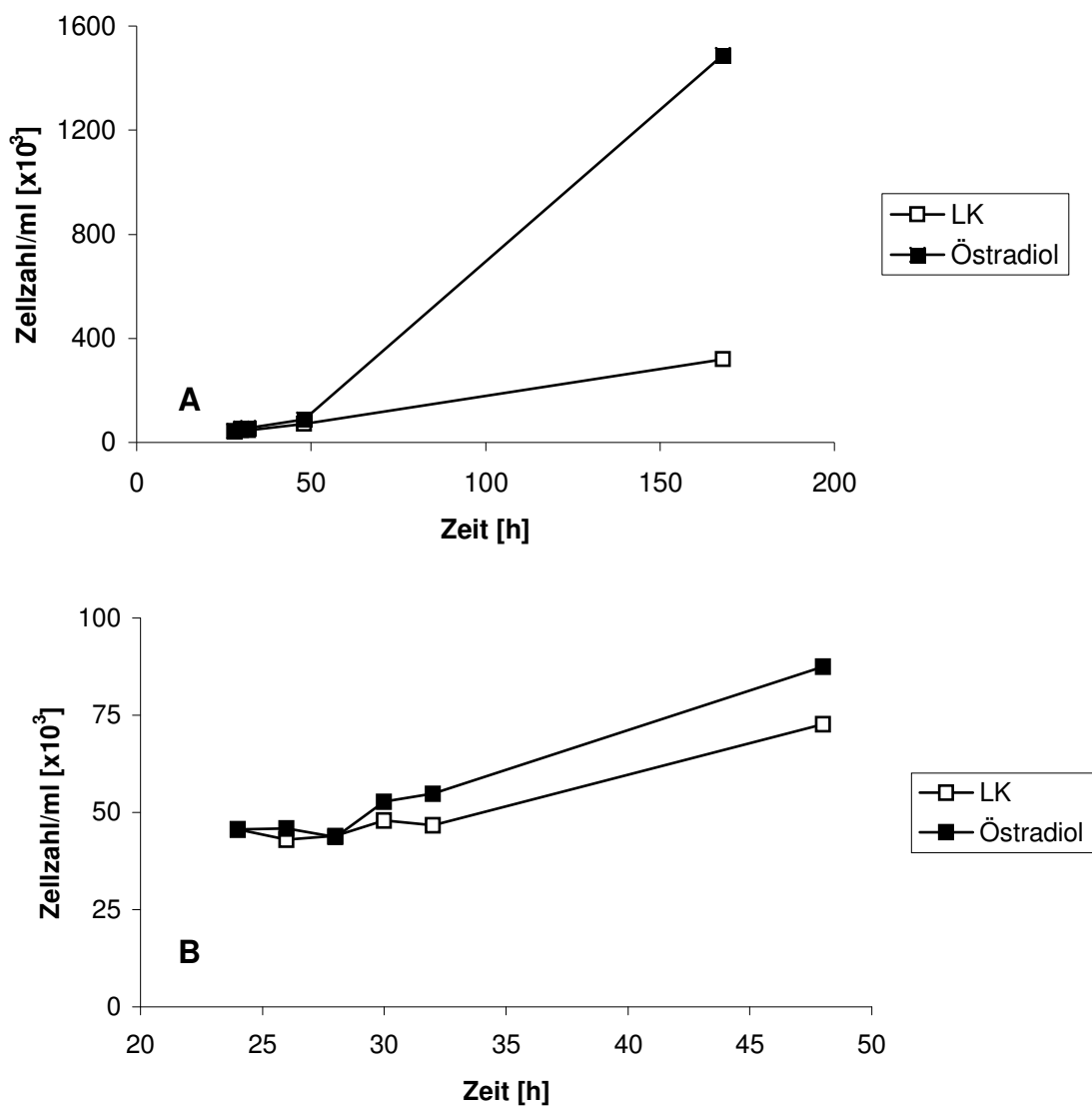


Abbildung 33 Wachstumskinetik mit 5nM Östradiol behandelter BG-1-Zellen, Lösungsmittelkontrolle (LK) DMSO 0,1%.

(A) Kinetik über 168 Stunden, (B) Kinetik von 24 Stunden (Testsubstanzzugabe) bis 48 Stunden
Originaldaten im Anhang Seite 119

In Abbildung A sieht man deutlich den erwarteten Proliferationsunterschied zwischen mit Östradiol stimulierten und unbehandelten Zellen, so dass die Zellen lysiert und für den Western-Blot verwendet wurden.

3.4.2.1.1. p53

Hier wurde der Effekt auf die Expression von p53 während der ersten 24 Stunden nach Testsubstanzzugabe beobachtet.

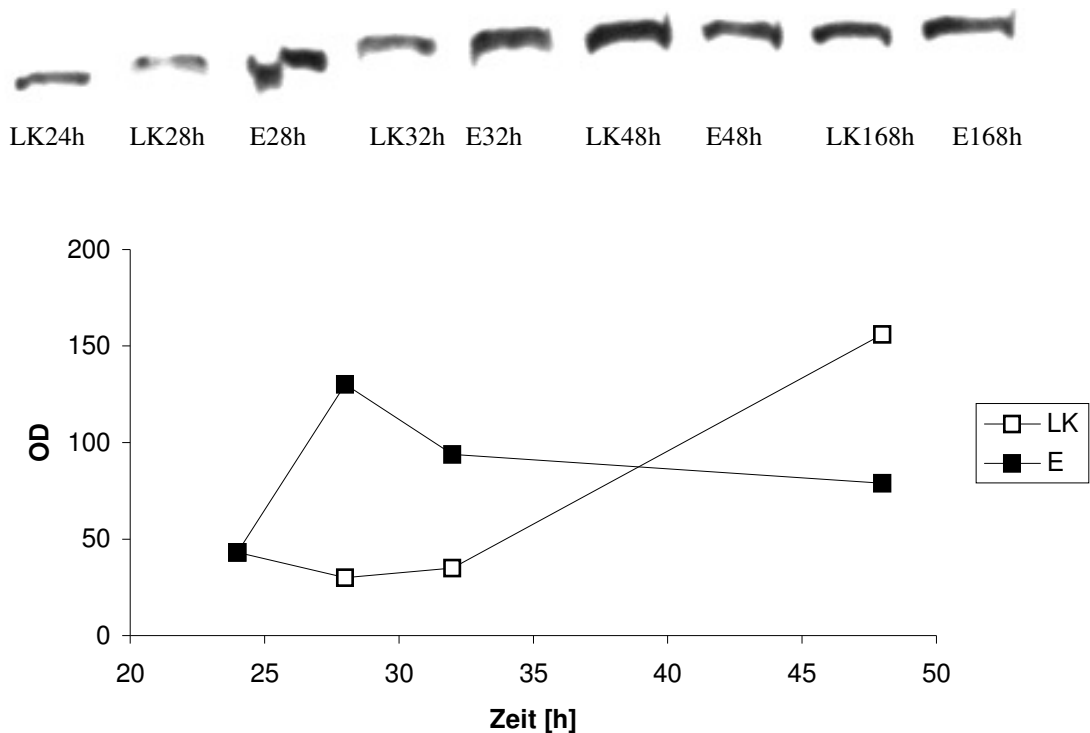


Abbildung 34 Expression von p53 im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs.
E: Östradiol 5nM; LK: 0,1% DMSO
Originaldaten im Anhang Seite 119

Zunächst sieht man eine deutliche Mehrexpression von p53 in den mit Östradiol behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Zum Zeitpunkt 40 Stunden steigt aber die Expression in der Kontrolle über die der mit Östradiol behandelten Zellen.

3.4.2.1.2. p21

Als target-Protein von p53 wurde wiederum die Expression von p21 analysiert.

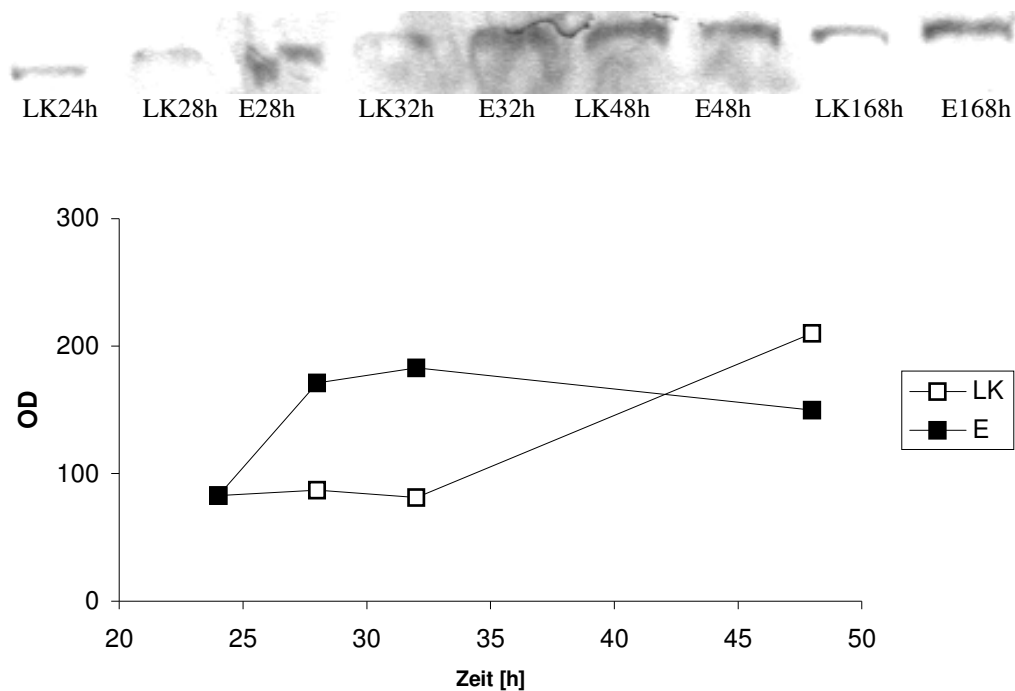


Abbildung 35 Expression von p21 im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs.

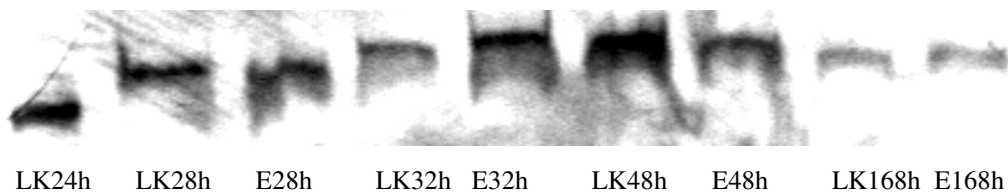
E: Östradiol 5nM; LK: 0,1% DMSO

Originaldaten im Anhang Seite 120

Auch in der Expression von p21 findet sich eine Erhöhung in behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Der Schnittpunkt zwischen Kontrolle und mit Östradiol behandelten Zellen liegt hier jedoch erst bei circa 42 Stunden.

3.4.2.1.3. Cyclin D

Der Effekt der mitogenen Stimulation sollte mit der Analyse der Expression von Cyclin D untersucht werden.



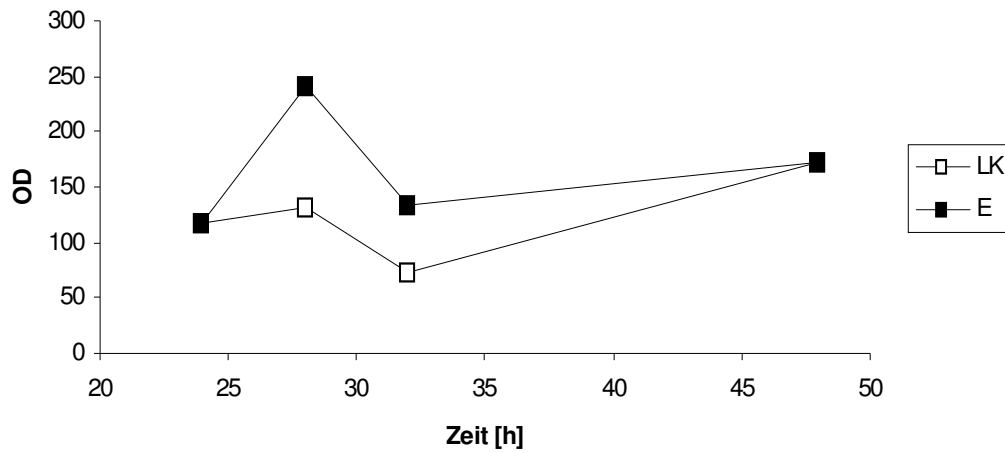


Abbildung 36 Expression von Cyclin D im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs.
E: Östradiol 5nM; LK: 0,1% DMSO
Originaldaten im Anhang Seite 120

Hier wird deutlich, dass die Expression von Cyclin D in den behandelten Zellen bis zum Zeitpunkt 48 Stunden über dem Niveau der Kontrolle liegt, die mitogene Stimulation in den behandelten Zellen in den ersten 48 Stunden also höher zu sein scheint.

3.4.2.1.4. MSH2

Zur Analyse der Reparaturtätigkeit wurde die Expression von MSH2 untersucht.

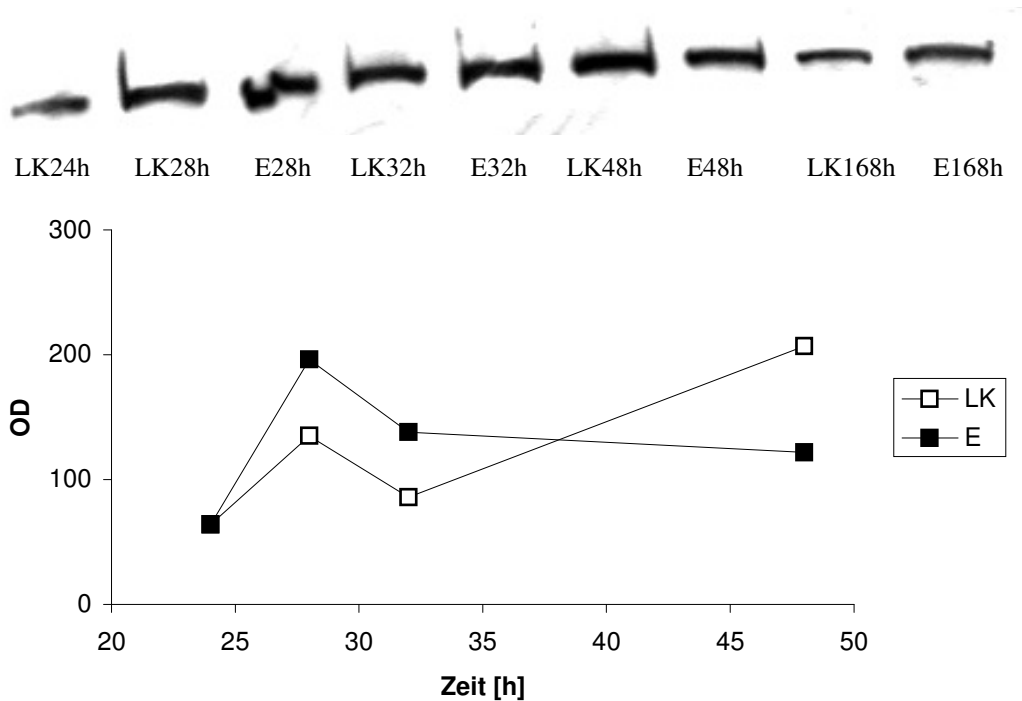


Abbildung 37 Expression von MSH2 im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs.
E: Östradiol 5nM; LK: 0,1% DMSO
Originaldaten im Anhang Seite 120

Auch die Expression von MSH2 ist in den mit Östradiol behandelten Zellen anfangs erhöht. Zum Zeitpunkt 38 Stunden übersteigt jedoch die Expression von MSH2 in der Kontrolle den Wert der behandelten Zellen.

3.4.2.1.5. PCNA

Als Proliferationsmarker wurde wiederum die Expression von PCNA bestimmt.

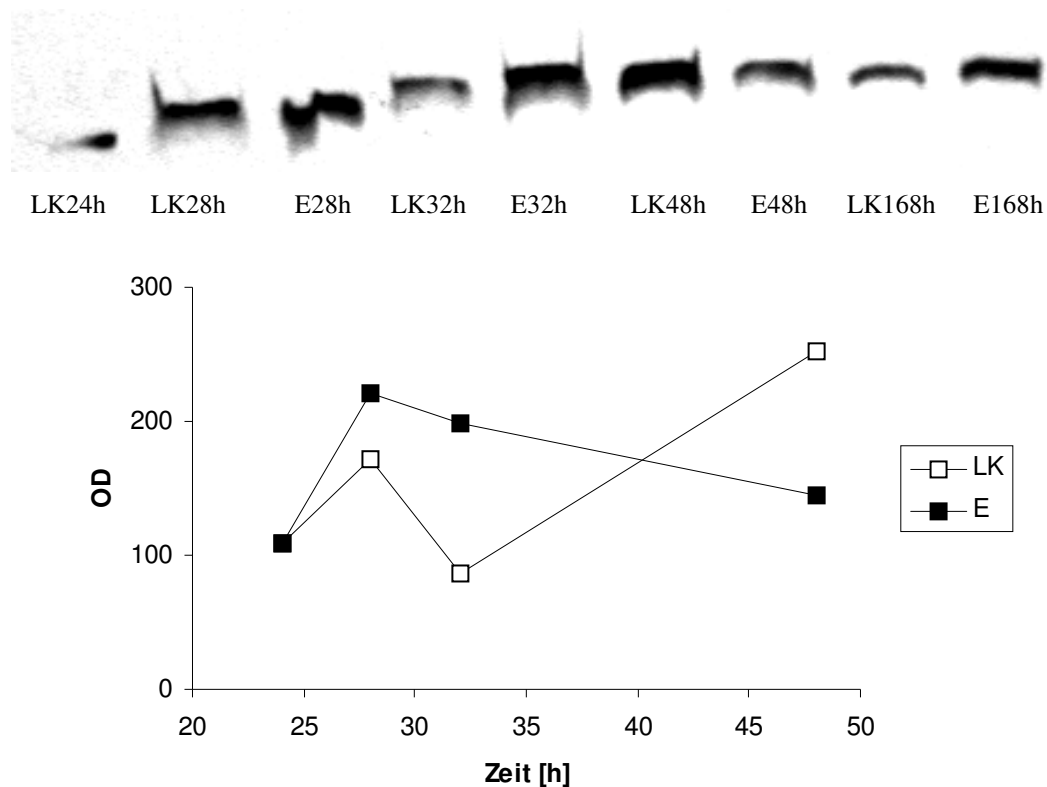


Abbildung 38 Expression von PCNA im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs.
E: Östradiol 5nM; LK: 0,1% DMSO
Originaldaten im Anhang Seite 120

Direkt nach der Zugabe der Testsubstanz zeigt sich ein Anstieg der Expression von PCNA bei den mit Östradiol behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die Expression von PCNA in den stimulierten Zellen sinkt im weiteren Verlauf leicht ab, die Expression in den mit Lösungsmittel behandelten Zellen steigt jedoch an und übertrifft zum Zeitpunkt 40 Stunden das Niveau der mit Östradiol behandelten Zellen und übertrifft diese zum Zeitpunkt 48 Stunden fast um den Faktor 2.

3.4.2.2. Insulin

Die Zellen wurden zu den oben angegebenen Zeitpunkten mit 100 μ g/ml Insulin stimuliert, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

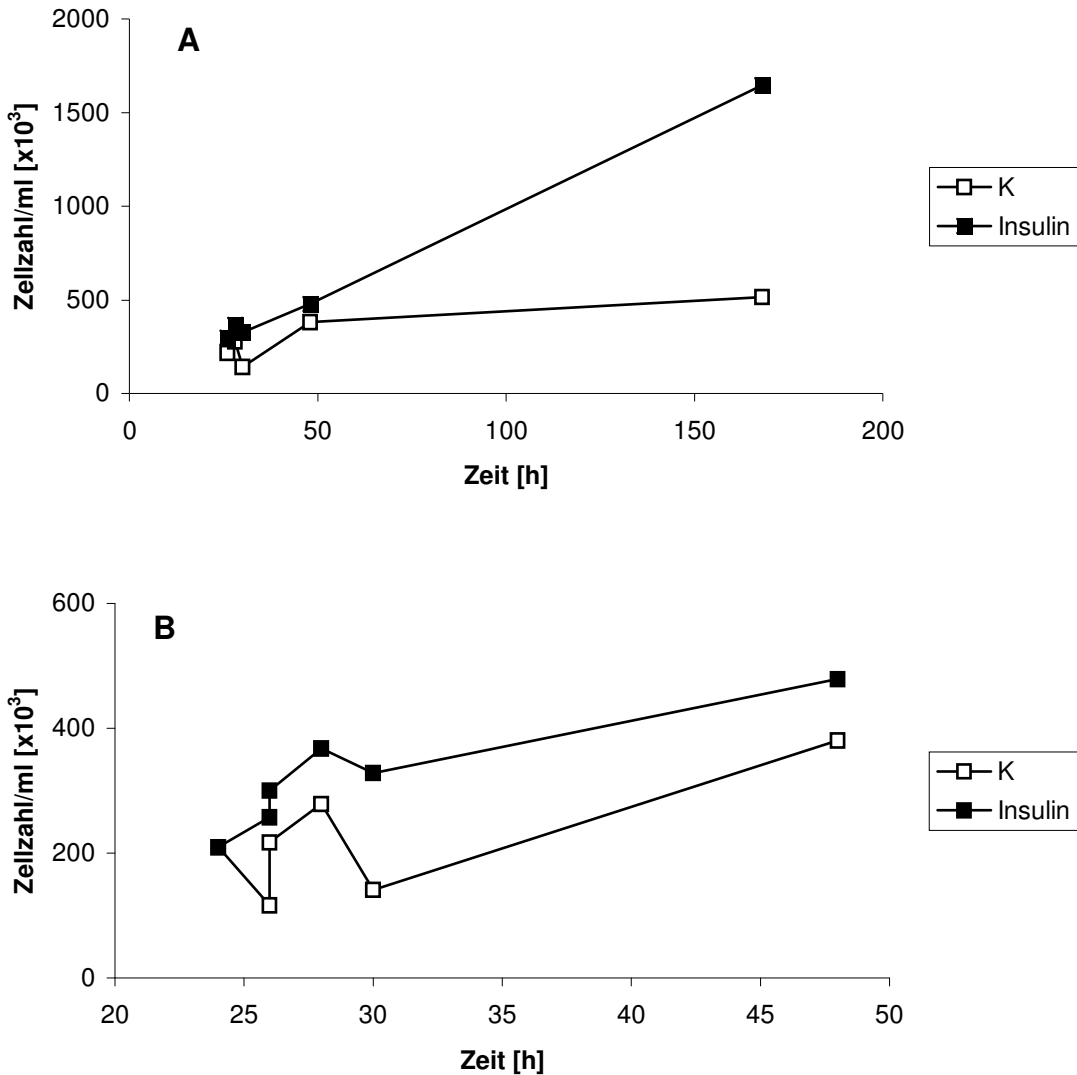


Abbildung 39 Wachstumskinetik mit 100 μ g/ml Insulin behandelte BG-1-Zellen, Kontrolle (K) unbehandelte Zellen.

(A) Kinetik über 168 Stunden, (B) Kinetik von 24 Stunden (Testsubstanzzugabe) bis 48 Stunden

Originaldaten im Anhang Seite 121

In Abbildung A sieht man einen deutlichen Proliferationsanstieg der mit Insulin behandelten Zellen, der die unbehandelten Zellen um Faktor 2 übersteigt. Somit waren die Zellen für Analysen mittels Western-Blot geeignet.

3.4.2.2.1. p53

Um Hinweise auf Schädigung der Zellen zu erhalten, wurde wiederum die Expression von p53 bestimmt.

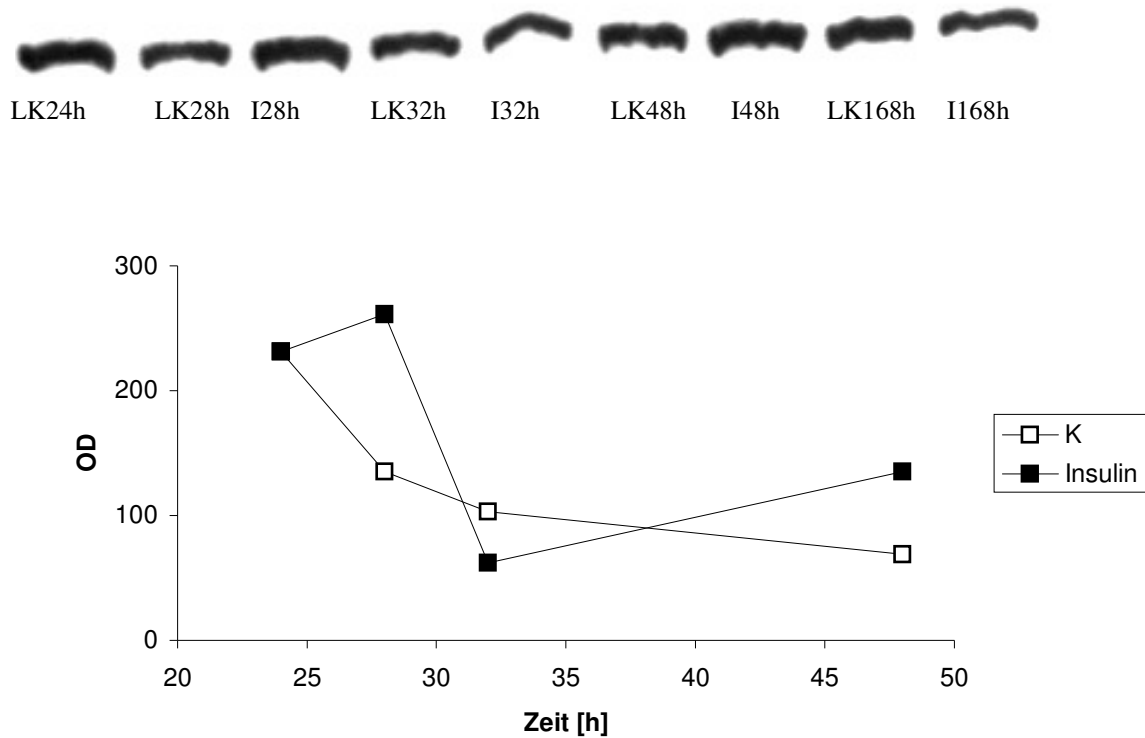


Abbildung 40 Expression von p53 im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs.
Insulin: 100µg/ml Insulin; K: unbehandelte Zellen
Originaldaten im Anhang Seite 121

Direkt nach Testsubstanzzugabe sieht man einen leichten Anstieg der Expression von p53 in den mit Östradiol behandelten Zellen, der zum Zeitpunkt 28 Stunden jedoch rasch abfällt, zum Zeitpunkt 32 Stunden aber leicht wieder ansteigt. In den unbehandelten Zellen fällt ein kontinuierlicher Abfall der p53-Expression auf.

3.4.2.2.2. p21

p21 als target protein von p53 wurde auch im mit Insulin durchgeführten Kurzzeitversuch analysiert.

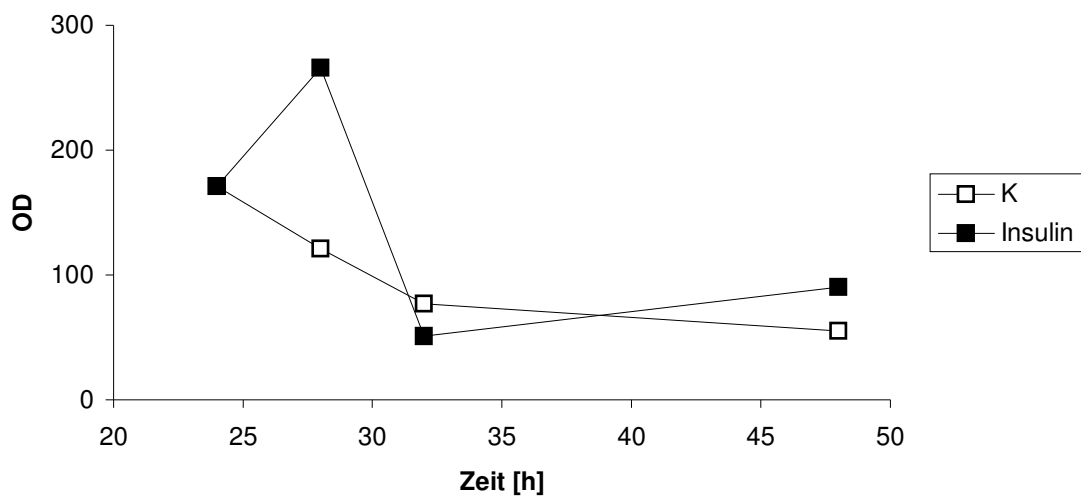
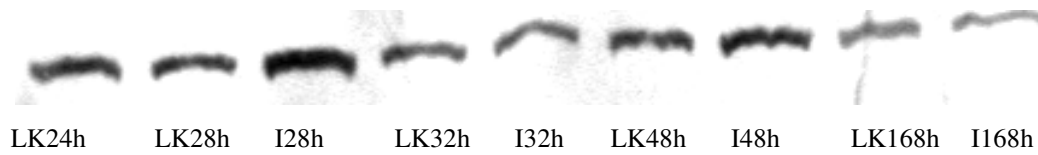


Abbildung 41 Expression von p21 im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs. Insulin: 100µg/ml Insulin; K: unbehandelte Zellen
Originaldaten im Anhang Seite 121

Im zeitlichen Verlauf zeigt sich in den unbehandelten Zellen ein kontinuierlicher Abfall der p21-Expression. In den mit Insulin stimulierten Zellen fällt zunächst ein Anstieg der Expression auf, der zum Zeitpunkt 28 Stunden sein Maximum erreicht, bei 32 Stunden den minimalen Wert hat und bis 48 Stunden leicht wieder ansteigt.

3.4.2.2.3. Cyclin D

Auch in den mit Insulin behandelten Zellen sollte die Reaktion auf mitogene Stimulation mittels der Analyse von Cyclin D untersucht werden.

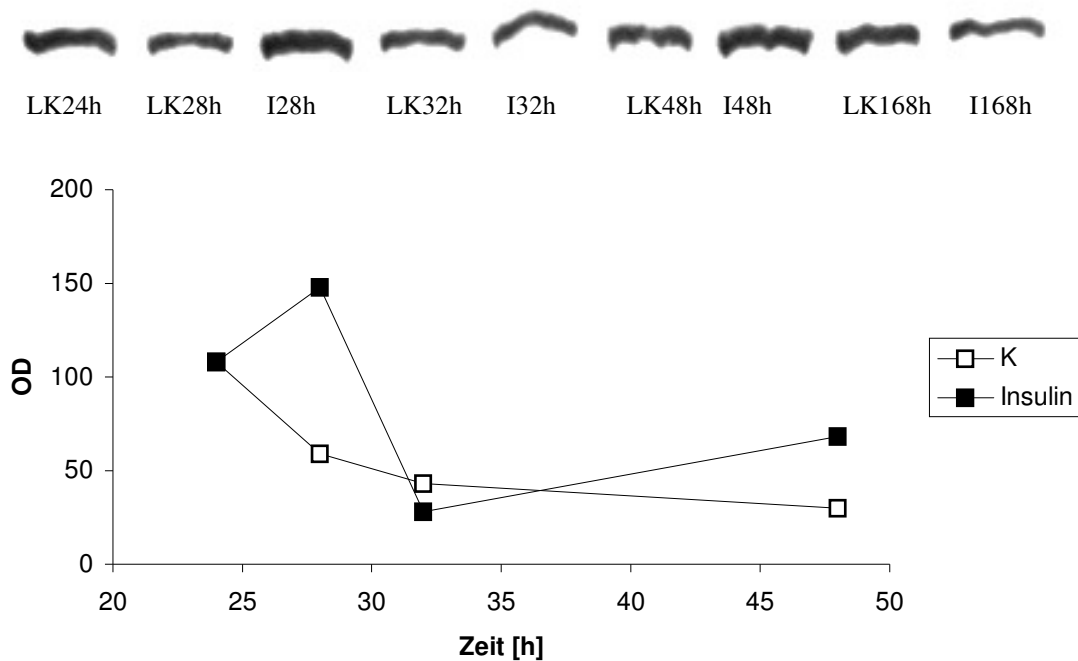


Abbildung 42 Expression von Cyclin D im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs. Insulin: 100µg/ml Insulin; K: unbehandelte Zellen
Originaldaten im Anhang Seite 121

Cyclin D wird in den mit Insulin behandelten Zellen nach Testsubstanzzugabe zunächst verstärkt exprimiert. Die Expression sinkt jedoch vier Stunden nach Testsubstanzzugabe (Zeitpunkt 28 Stunden) ab und erreicht bei 32 Stunden ihr Minimum, um dann leicht wieder anzusteigen. In den unbehandelten Zellen fällt eine konstante Verminderung der Expression über den gesamten analysierten Zeitraum auf.

3.4.2.2.4. MSH2

MSH2 wurde als Marker für Reparaturtätigkeiten gemessen.

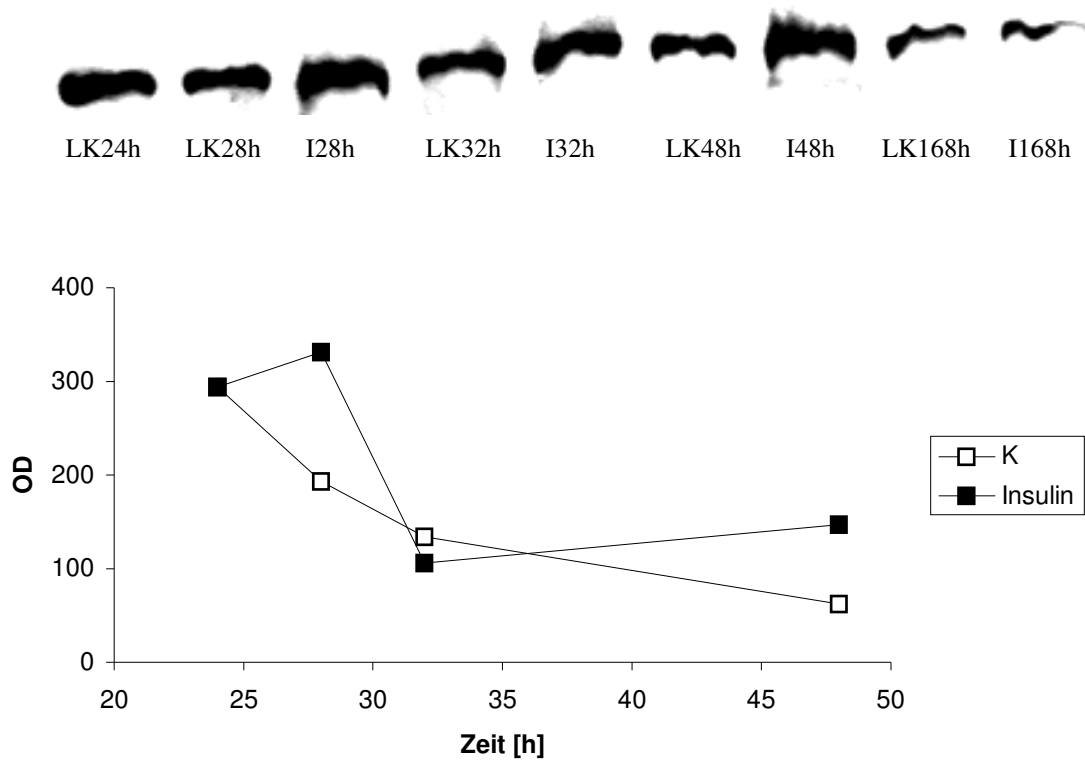


Abbildung 43 Expression von MSH2 im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs. Insulin: 100µg/ml Insulin; K: unbehandelte Zellen
Originaldaten im Anhang Seite 122

In den unbehandelten Zellen fällt eine konstante Abnahme der MSH2-Expression auf. In den mit Insulin stimulierten Zellen zeigt sich zuerst eine Zunahme der Expression bis 28 Stunden, dann ein Abfall unter Kontrollniveau bei 32 Stunden und schließlich eine Erhöhung der Expression.

3.4.2.2.5. PCNA

Auch in dem mit Insulin durchgeführten Versuch diente die Analyse von PCNA als Proliferationsmarker.

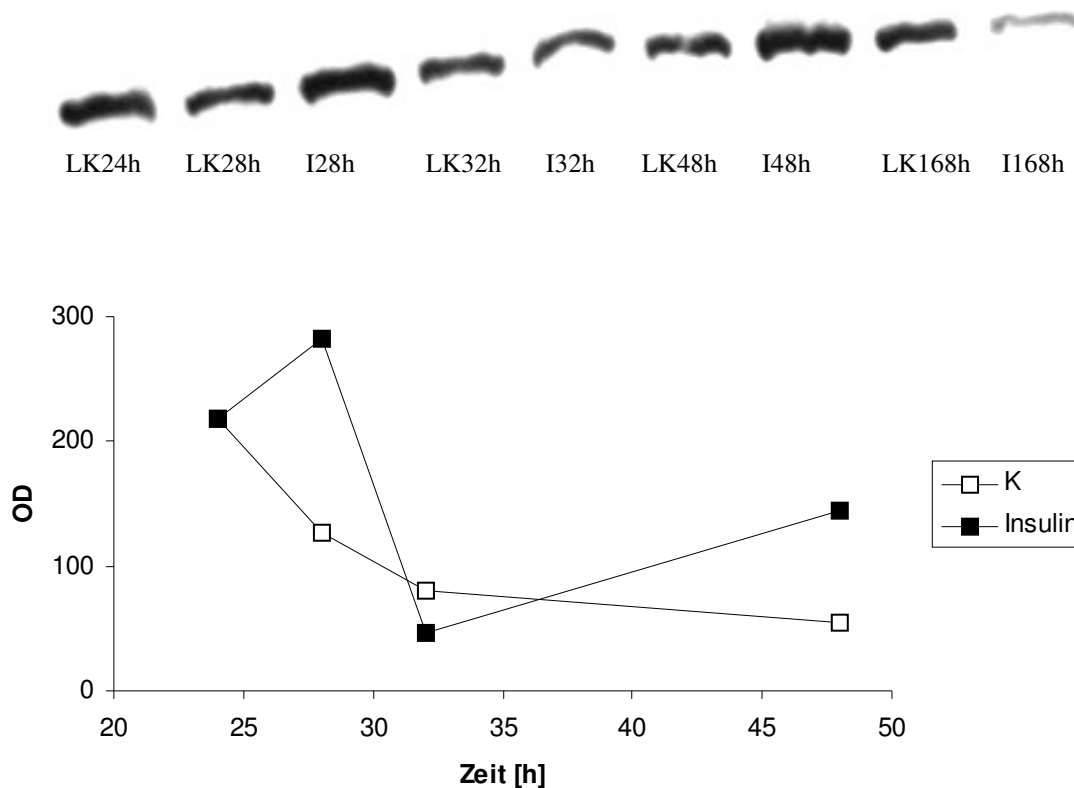


Abbildung 44 Expression von PCNA im Westernblot und grafische Darstellung des zeitlichen Verlaufs. Insulin: 100µg/ml Insulin; K: unbehandelte Zellen
Originaldaten im Anhang Seite 122

Die Expression von PCNA nimmt in den unbehandelten Zellen konstant ab, wohingegen in den mit Insulin stimulierten Zellen zunächst eine Zunahme der Expression zu sehen ist. Zum Zeitpunkt 28 Stunden erreicht sie ihr Maximum, sinkt dann bis zum Zeitpunkt 32 Stunden rapide ab und steigt schließlich bis zum Zeitpunkt 48 Stunden wieder über das Kontrollniveau.

3.5. Zellzyklusanalysen

Um den Einfluss der hormonellen Stimulation auf die Dauer und Anteile der Zellzyklusphasen zu analysieren, wurden östrogenrezeptorpositive BG-1-Zellen mit Hilfe des FACS-Scan hinsichtlich ihres Zellzyklus untersucht.

Hierzu wurden BG-1-Zellen mit 100 ng/ml IGF inkubiert, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Zellen wurden 24, 96 und 144 Stunden nach Aussaat mit frischer Testsubstanz versehen, 96 Stunden nach Aussaat wurde außerdem ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Ernte erfolgte 96, 120, 144 und 168 Stunden nach Aussaat. Nach Bestimmung der Zellzahl erfolgte die Präparation der Zellen für die Zellzyklusanalyse.

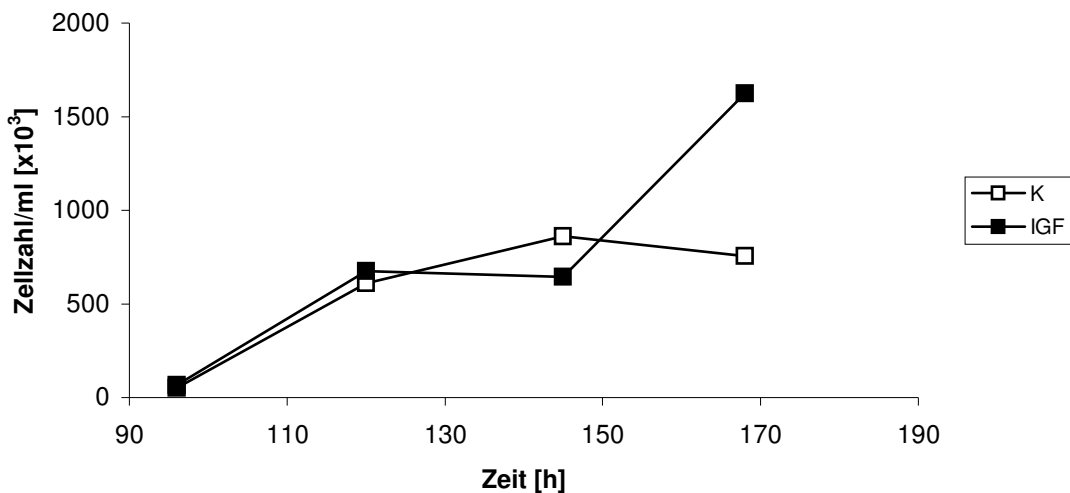


Abbildung 45 Wachstumskurve von BG-1-Zellen nach Stimulation mit IGF. Die Punkte stellen die Zeitpunkte der Ernte und Zellzyklusanalyse dar. K: unbehandelte Zellen; IGF: IGF 100ng/ml
Originaldaten im Anhang Seite 122

Zu Beginn der Wachstumskurve zeigen behandelte und unbehandelte Zellen einen nahezu parallelen Verlauf. Zum Zeitpunkt 144 Stunden zeigt sich sogar ein Absinken der Zellzahl der stimulierten Zellen gegenüber der Kontrolle. Nach 168 Stunden jedoch waren die behandelten Zellen um Faktor 2,2 mehr gewachsen als die unbehandelte Kontrolle. Da somit ein eindeutiger Wachstumsunterschied festgestellt werden konnte, wurden die Zellen zur Zellzyklusanalyse vorbereitet.

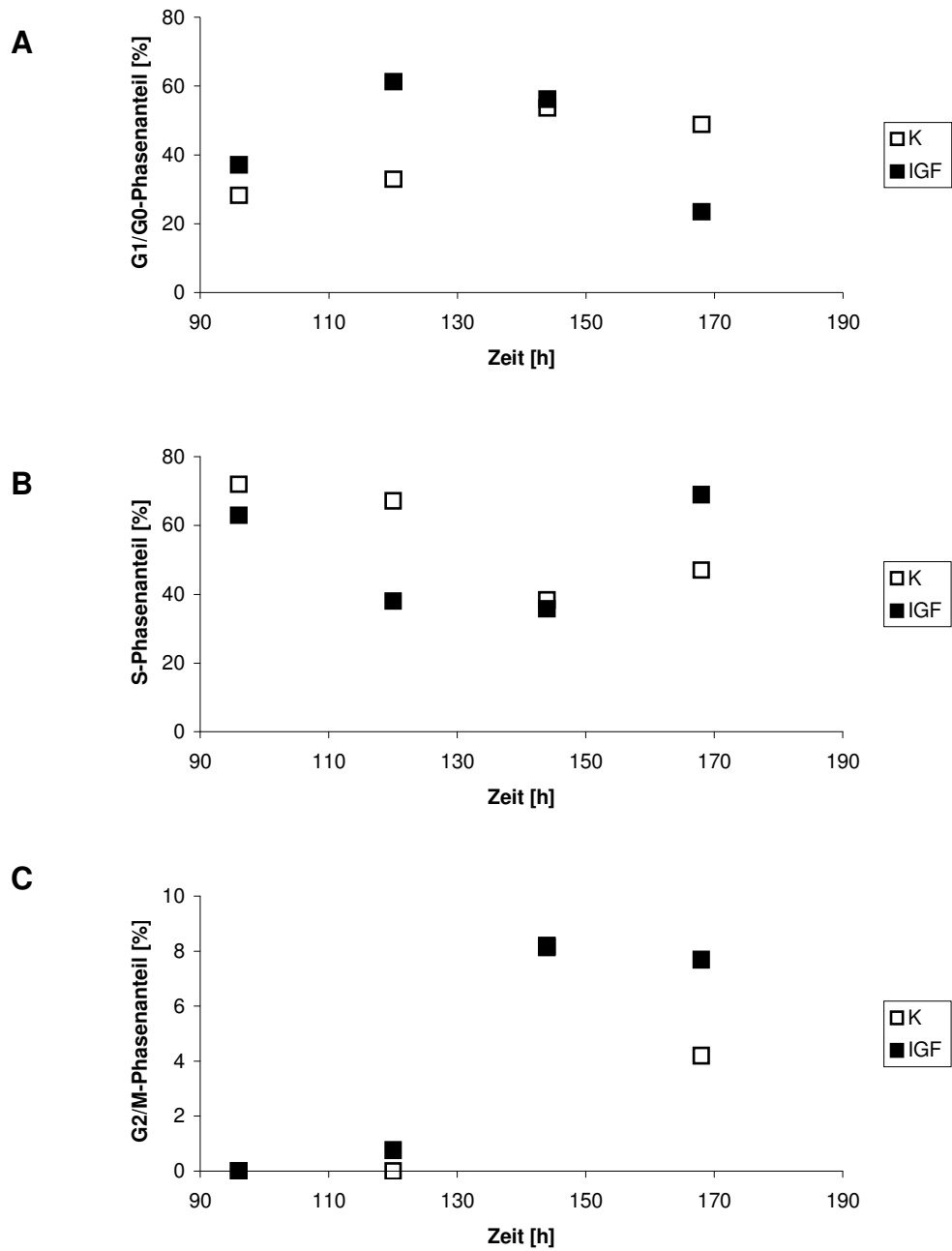


Abbildung 46 Zellzyklusanalyse von BG-1-Zellen. Dargestellt sind die Anteile an der G1/G0-Phase (A), der S-Phase (B) und der G2/M-Phase (C) als Mittelwert aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen..

K: unbehandelte Zellen; IGF: IGF 100ng/ml

Originaldaten im Anhang Seite 122

In der Zellzyklusanalyse sieht man in der Darstellung der Phasenanteile zu den Zeitpunkten 96 und 144 Stunden nahezu gleiche Werte für unbehandelte und mit IGF stimulierte Zellen, die in der Darstellung der G2/M-Phase sogar deckungsgleich sind. Beim Vergleich mit der Wachstumskurve zeigt sich, dass auch die Wachstumsraten der Zellen zu diesen Zeitpunkten nahezu gleich sind.

Zum Zeitpunkt 120 Stunden zeigen die behandelten Zellen einen höheren G1/G0-Anteil als die Kontrolle. Die Kontrolle überwiegt hier jedoch in der S-Phase, wo sich zum Zeitpunkt 120 Stunden fast doppelt so viele unbehandelte Zellen wie behandelte Zellen befinden. In der G2/M-Phase zeigt sich nur ein relativ kleiner Unterschied zwischen Kontrolle und behandelten Zellen.

168 Stunden nach Aussaat befanden sich nur halb so viele behandelte wie unbehandelte Zellen in der G1/G0-Phase. In der S- und G2/M-Phase sieht man jedoch ein deutliches Überwiegen der stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Bei Betrachtung der Wachstumskurve lässt sich der erhöhte Anteil der stimulierten Zellen in diesen Phasen mit dem Proliferationsanstieg der Zellen erklären.

Im Mittel befanden sich über den analysierten Zeitraum 41% der unbehandelten Zellen in der G1/G0-Phase, 56 % in der S-Phase und 3% in der G2/M-Phase. Die mit IGF stimulierten Zellen wiesen einen G1/G0-Phasenanteil von 45% auf, 51% befanden sich im Mittel in der S-Phase und 4% in der G2/M-Phase.

4. Diskussion

Die Proliferation von Zellen spielt in der Phase der Promotion eine entscheidende Rolle in der Kanzerogenese. Proliferationssteigernde Substanzen wurden deswegen als kokanzerogen bezeichnet (Greim und Deml, 1996, Marquardt, 1994, Barrett, 1993). In Arbeiten von Stopper et al. (2003) und Fischer et al. (2001) fanden sich jedoch Hinweise darauf, dass eine Proliferationssteigerung per se zu erhöhter genetischer Instabilität führt und somit für die Initiation einer Zelle verantwortlich sein kann.

In der vorliegenden Arbeit wird diese These weitgehend bestätigt. In auch von Stopper et al. (2003) verwendeten BG-1-Zellen konnte eine dosisabhängige Proliferation mit Östradiol in Dosen von 0,1 bis 10nM erzielt werden, bei höheren Dosierungen war die Zelldichte der wachstumslimitierende Faktor. Wurden die in den Proliferationsexperimenten gewonnenen Zellen dem Mikrokerntest zugeführt, so konnte eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gesteigerte Mikrokernfrequenz der proliferierten Zellen nachgewiesen werden. Die Ausbildung von Mikrokernen war ebenfalls dosisabhängig.

Als Negativkontrolle wurden die gleichen Östradiol-Dosen zu östrogenrezeptor-negativen UCI-107-Zellen gegeben. Diese zeigten weder eine Proliferationssteigerung noch eine erhöhte Mikrokernrate. Somit konnte eine direkt genotoxische Wirkung der verwendeten Dosierungen ausgeschlossen werden. All dies deckt sich mit den Ergebnissen von Stopper et al. (2003). Auch Fischer et al. hatten 2001 einen Zusammenhang zwischen durch Östradiol ausgelöste Proliferation und einer Erhöhung der Mikrokernrate in MCF-7-Zellen nachgewiesen.

Um den Zusammenhang zwischen genetischer Instabilität und gesteigerter Proliferation weiter zu untersuchen, wurden BG-1-Zellen mit anderen proliferationssteigernden Substanzen inkubiert. Verwendet wurden die Peptidhormone Insulin in Dosierungen von 0,1 bis 100 µg/ml sowie EGF (epidermal growth factor) und IGF-I (insulin-like growth factor I) in Dosierungen von jeweils 0,1 bis 100 ng/ml. Mit allen drei Substanzen konnte in BG-1-Zellen eine dosisabhängige Proliferation erzielt werden. Die Höchstdosis wurde wiederum durch die Wachstumsdichte in den Kulturflaschen bestimmt. Die in diesen Experimenten gewonnenen Zellen wurden wiederum im Mikrokerntest auf genetische Instabilität untersucht, und auch hier zeigte sich eine erhöhte Mikrokernfrequenz der stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle, die wiederum dosisabhängig auftrat.

Da es sich bei den in diesen Experimenten verwendeten Substanzen um Peptidhormone handelt, erscheint eine direkt genotoxische Wirkung durch Metabolite unwahrscheinlich. Hier erscheint es nun zunächst wichtig, die direkte genotoxische Wirkung von Insulin, EGF und IGF durch Antagonisten oder Anti-Rezeptor-Antikörper auszuschließen.

Durch Inkubation von UCI-107-Zellen mit Insulin, EGF und IGF konnte aber eine Vermittlung der Proliferation und damit der genetischen Instabilität über den Östrogenrezeptor und dessen Signaltransduktionsweg ausgeschlossen werden.

Aus der Literatur bekannt ist in diesem Zusammenhang eine Interaktion von Insulin und IGF mit dem Östrogenrezeptor zur Proliferationssteigerung. Außerdem konnte eine Regulation der Östrogenrezeptor-Expression durch EGF und IGF sowie eine Östrogenrezeptor-vermittelte Transkription unabhängig von Östrogen in der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 beobachtet werden (Lai et al., 2001). Da die von uns benutzte UCI-107-Zelllinie östrogenrezeptor-negativ ist, beruhen die beobachteten proliferationssteigernden Effekte vermutlich auf einer Wirkung der Wachstumsfaktoren mit ihren jeweiligen Rezeptoren. Um dies jedoch genauer zu untersuchen, empfiehlt sich auch hier die Wiederholung der Experimente mit Rezeptor-Antagonisten oder Antikörpern.

Obwohl Bartucci et al. (2001) beobachtet hatten, dass östrogenrezeptor-negative Brustkrebszellen der MDA123-Linie auf Stimulation mit IGF nicht mit Proliferation reagierten, scheint dies nicht generell für östrogenrezeptor-negative Zelllinien zu gelten. Wir konnten zeigen, dass UCI-107-Zellen auf EGF, IGF und Insulin in den gleichen Dosierungen wie BG-1-Zellen mit einer signifikanten Steigerung der Proliferationsrate reagieren. Auch die Mikrokernfrequenz in den behandelten Zellen stieg nach Inkubation mit diesen Substanzen dosisabhängig an.

Insgesamt bestätigen die Daten der Proliferations- und Mikrokernexperimente die Hypothese, dass die in Form der Mikrokerne detektierte genetische Instabilität durch eine hormonell ausgelöste Proliferationssteigerung verursacht wird. Auch die Ergebnisse vorangegangener Arbeiten unterstützen dies (Stopper et al., 2003, Fischer et al., 2001).

Um die Mikrokerninduktion durch Östradiol, EGF, IGF und Insulin näher zu untersuchen wurden die Mikrokerne auf das Vorhandensein von Kinetochoren überprüft. Aneugene Substanzen führen über fehlerhaften Aufbau des Spindelapparates zum Verlust kompletter

Chromosomen, die kinetochorpositiv sind. Dieser Effekt konnte für Diethylstilböstrol (DES) sowie für genotoxische Dosierungen von Östradiol nachgewiesen werden (Stopper et al., 2003, Lier, 2000, Eckert und Stopper, 1996, Stopper et al., 1993). Wir verwendeten DES als Positivkontrolle und beobachteten unter DES-Gabe einen Anteil von 64% kinetochor-positiven Mikrokernen. Durch 10nM Östradiol wurden in 54% der Fälle kinetochor-positive Mikrokerne induziert, wodurch die Substanz in der von uns verwendeten Dosis (10nM) entsprechend bereits vorhandener Literatur (Stopper et al., 2003, Liehr, 2000, Eckert und Stopper, 1996, Stopper et al., 1993) als aneugen einzuschätzen ist. Die beobachteten Mikrokerne entstehen also durch Zerstörung des Spindelapparates.

Substanzen, die klastogen wirken, also zu Chromosomenbruchstücken führen, sind an vorwiegend kinetochor-negativen Mikrokernen zu erkennen. Zu diesen Stoffen zählt unter anderem Mitomycin C (MMC) (Stopper et al., 2003, Eckert und Stopper, 1996, Stopper et al., 1993). Wir verwendeten MMC als Kontrolle (25% Kinetochor-positiv Mikrokerne). Unter Stimulation mit 100ng/ml IGF beobachteten wir 34%, mit 100ng/ml EGF 37% und mit 100µg/ml Insulin 48% kinetochor-positiv Mikrokerne, so dass diese Substanzen in den von uns verwendeten Dosierungen überwiegend eine klastogene Wirkung zu haben scheinen. Dies deutet weiterhin darauf hin, dass Mikrokerne, die durch Zugabe von IGF, EGF und Insulin in den oben angegebenen Dosierungen entstanden sind, nicht durch Schädigung des Spindelapparates, sondern durch andere Schädigungen des Genoms wie beispielsweise Deletionen hervorgerufen werden. Ähnliche Beobachtungen machten auch Stopper et al. (2003) mit Östradiol in niedriger Dosierung (100pM), bei der die Entstehung der Mikrokerne auf reine Proliferationssteigerung zurückgeführt wurde. Zum definitiven Ausschluss einer Entstehung der Mikrokerne durch Auswirkungen auf den Spindelapparat sollten allerdings weiterführende Experimente wie beispielsweise eine Immunfluoreszenzfärbung des Tubulingerüsts durchgeführt werden.

Durch Zugabe der Testsubstanzen wurde eine Proliferationssteigerung verbunden mit einer Steigerung der Mitoserate verglichen mit der Kontrolle induziert. Da nur sich teilende Zellen in der Lage sind, Mikrokerne zu bilden, sollte die Anzahl der Mikrokerne auf die Anzahl der Mitosen bezogen analysiert werden. Hierzu wurde zusätzlich zu den Testsubstanzen Cytochalasin B auf die Zellen gegeben. Cytochalasin B hemmt zwar die Zellteilung, nicht aber die Kernteilung (Mitose), so dass zweikernige Zellen entstehen, die genau einmal durch die Mitose gegangen sind (Fenech, 1993).

Zur erweiterten Analyse der Mikrokerninduktion wurden deswegen die Mikrokerne in den zweikernigen Zellen gezählt, so dass die Mikrokernrate bezogen auf eine Zellteilung ermittelt werden konnte. Verglichen mit der Kontrolle zeigte sich eine 1,6fach höhere Mikrokernrate bei mit 100ng/ml IGF bzw. EGF behandelten BG-1-Zellen. Auch durch Behandlung mit 100µg/ml Insulin stieg die Mikrokernrate auf das 1,5fache im Vergleich zur Kontrolle. Auch mit 10nM Östradiol behandelte BG-1-Zellen zeigten die 1,6fache Mikrokernrate, wohingegen kein Unterschied zwischen Kontrolle und Lösungsmittelkontrolle zu erkennen war.

In Experimenten mit östrogenrezeptor-negativen UCI-Zellen lag die Mikrokernrate bei Stimulation mit 100ng/ml IGF und EGF jeweils um den Faktor 1,3 über dem Kontrollwert, bei Stimulation mit 100µg/ml Insulin um den Faktor 1,4. Wie auch schon Ergebnisse von Stopper et al. (2003) sowie von Fischer et al. (2001) legt die erhöhte Mikrokernfrequenz in mit proliferationsfördernden Substanzen behandelten Zellen einen Verlust der genetischen Stabilität verglichen mit der Kontrolle nahe, die sich in der erhöhten Mikrokernrate nach einmaliger Teilung zeigt.

Weiterhin wurde der Cytochalasin-B-Test als Maß für die Proliferationssteigerung durch die von uns verwendeten Substanzen gewertet. Dies geschah durch einfache Gegenüberstellung der doppelkernigen Zellen mit einkernigen Zellen. In den BG-1-Zellen lag der Anteil der doppelkernigen Zellen nach Stimulation um etwa den Faktor 1,5 über der Kontrolle, in den UCI-Zellen etwa um Faktor 1,2. Dies zeigt ein weiteres mal, dass durch Zugabe von Östradiol, IGF, EGF und Insulin die Zellen zur Proliferation angeregt wurden.

Insgesamt legen die bisher dargestellten Ergebnisse dar, dass durch hormonell ausgelöste Proliferationssteigerung die genetische Stabilität der behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle sinkt. Dies zeigt sich in einer dosisabhängig erhöhten Mikrokernrate. Als Erklärung für die genetische Instabilität der behandelten Zellen vermuteten schon Fischer et al. (2001) sowie Stopper et al. (2003) eine Forcierung der vermehrt proliferierenden Zellen durch den Zellzyklus, einhergehend mit verminderter Reparaturtätigkeit bei DNA-Schädigung. In der FACS-Analyse konnten Stopper et al. (2003) in mit 100pM Östradiol behandelten BG-1-Zellen einen erhöhten Anteil von Zellen in der S-Phase und einen erniedrigten Anteil von Zellen in der G2/M-Phase feststellen, was sie mit einer Beschleunigung des G2/M-Phasen-Durchlaufs erklärten.

Aufgrund dieser Vorarbeiten führten wir den FACS-Scan mit BG-1-Zellen durch, die mit 100ng/ml IGF zur Proliferation stimuliert worden waren. Trotz eines Wachstumsunterschieds nach 168 Stunden konnte allerdings kein Hinweis auf eine Verkürzung der Reparaturphasen

gefunden werden, lediglich eine Proliferationssteigerung der behandelten Zellen wurde durch einen erhöhten S-Phasen-Anteil bestätigt. Die Aussagekraft dieser Ergebnisse scheint jedoch beschränkt durch verschiedene Probleme, die die FACS-Analyse beeinträchtigten. Zum einen ist die Wachstumskurve der in diesem Experiment verwendeten Zellen nicht ideal. Ein Unterschied in der Zellzahl findet sich erst zum Zeitpunkt 168 Stunden, zuvor verlaufen die Kurven von behandelten und unbehandelten Zellen nahezu gleich, so dass von einer ungenügenden Proliferationssteigerung durch IGF ausgegangen werden kann. Zum anderen war es schwierig eine geeignete Zellzahl für die Analysen zu erreichen, so dass jeweils mehrere Zellkulturflaschen zu einem Zeitpunkt geerntet werden mussten, was wiederum den Anteil der toten Zellen dramatisch erhöhte. Um eine wirkliche Aussagekraft dieses Experimentes zu erreichen, sollte es mit idealisierter Wachstumskurve sowie höheren Aussaatzellzahlen wiederholt werden, um die oben beschriebenen Fehler zu vermeiden.

Eine Bestätigung der Vermutung, dass eine Beschleunigung der Zellzyklusprogression durch hormonell stimulierte Proliferation zu genetischer Instabilität führt, fand sich in der Analyse der Expression von Zellzyklusregulationsproteinen und DNA-Reparaturenzymen im Westernblot. Wir untersuchten die Expression dieser Proteine sowohl in den ersten 24 Stunden nach Zugabe von 5nM Östradiol bzw. 100µg/ml Insulin als auch über einen Zeitraum von 168 Stunden nach Zugabe von 5nM Östradiol bzw. 50ng/ml IGF.

Als wohl wichtigstes und best untersuchtes Tumorsuppressorgen gilt bislang p53. Bei DNA-Schädigung wird die Expression von p53 hochreguliert, was eine komplexe Kaskade verschiedener Enzyme einleitet und schließlich zum Zellzyklusarrest in der G1/S-Phase, der G2/M-Phase oder – bei Unfähigkeit, die entstandenen Schäden zu reparieren – zur Apoptose führt (Stewart und Pietenpol, 2001; Sablina et al., 1998; Jin et al., 2002). In den Western-Blots über 24 Stunden beobachteten wir sowohl nach Zugabe von Östradiol als auch von Insulin eine um den Faktor 1,5 höhere Expression von p53 im Vergleich zur Kontrolle. Auch schon Dinda et al. (2002) beobachteten eine 2- bis 3fache Expression von p53 nach Gabe von 1nM Östradiol in östrogenrezeptor-positiven humanen duktalem Mamma-Ca-Zellen (T47D). Dies deutet darauf hin, dass die stimulierten Zellen durch Zugabe der Testsubstanzen und damit durch gesteigerte Proliferation vermehrt zum Zellzyklusarrest bzw. zur Apoptose durch p53 gezwungen werden.

Über 168 Stunden betrachtet zeigte sich nach Zugabe von IGF ein nahezu gleicher Verlauf der Kurven bis 144 Stunden nach Aussaat, wo die stimulierten Zellen wieder ein fast 1,5fache

Expression von p53 zeigen. Bei Stimulation mit Östradiol über 168 Stunden verwendeten wir sowohl Wildtyp-p53 (p53wt) als auch zusätzlich mutiertes p53 (p53mt), da bekannt ist, dass p53 in vielen Karzinomen bereits mutiert ist (Stewart und Pietenpol, 2001; Elledge, 1996; Hartwell und Kastan, 1994). Mit beiden Antikörpern zeigte sich eine leicht vermehrte Expression von p53wt bzw. p53mt bis zum Zeitpunkt 120 Stunden. 144 Stunden nach Aussaat überwog die Expression von p53 in unbehandelten Zellen, um dann bei 168 Stunden eine Mehrexpression in den behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle aufzuweisen. Bekannt war zuvor bereits ein Ansteigen der p53-Expression nach Zerstörung von Mikrotubuli (Luch, 2002; Sablina et al., 2001), was sich mit unseren Ergebnissen der erhöhten p53-Expression 168 Stunden nach Zugabe von 5nM Östradiol sowie der Aneuploidie nach Zugabe von 10nM Östradiol (siehe oben) deckt. Ähnliche Ergebnisse werden in der Literatur auch für das synthetische Östrogen Diethylstilböstrol (DES) beschrieben. Hier konnte eine dosisabhängige Kumulation von p53 mit einem Arrest der Zellen in der G1-Phase beobachtet werden, gefolgt von Aneuploidie (Luch, 2002). Des Weiteren zeigt sich in unseren Versuchen auch im Western über 168 Stunden eine Tendenz zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose durch p53, die durch hormonelle Proliferationssteigerung ausgelöst wurde.

Die Expression von p21, einem wichtigen target-Protein von p53 (Jin et al., 2002; Carr, 2000; Elledge, 1996), wurde über 24 Stunden nach Zugabe von 5nM Östradiol sowie 100µg/ml Insulin und ebenfalls über 144 Stunden nach Zugabe von 50ng/ml IGF untersucht. Ähnlich der Expression von p53 zeigt sich in den ersten 24 Stunden nach Proliferationsstimulation zumeist ein Überwiegen der Expression von p21 in den stimulierten Zellen. Auch Lai et al. (2001) hatten in MCF-7-Zellen in den ersten 25 Stunden nach Aussaat einen Anstieg der Expression von p21 nach Stimulation mit Insulin beobachtet. Allerdings detektierten sie ein Absinken der p21-Expression nach Gabe von Östradiol, so dass die hier gesehenen Effekte eventuell zelltyp- oder organspezifisch zu werten sind.

Über insgesamt 168 Stunden beobachteten wir zunächst ein Ansteigen der Expression von p21, die dann zum Zeitpunkt 168 Stunden nach Aussaat bzw. 144 Stunden nach Zugabe der Testsubstanz unter das Kontrollniveau fiel.

P21 bindet nach Aktivierung durch p53 an PCNA und verhindert so die Elongation der DNA, führt also zu einem Zellzyklusarrest (Stewart und Pietenpol, 2001; Sablina et al., 1998). Somit lassen sich unsere Ergebnisse als Einleitung eines Zellzyklusarrest in den stimulierten Zellen deuten, der zur stärksten Phase des exponentiellen Wachstums zwischen 144 und 168 Stunden nach Aussaat vermindert ist.

Auch Cyclin A, welches wichtig für die S-Phase-Progression ist, wird durch p53 reguliert. Im Falle eines DNA-Schadens wird Cyclin A über p53/p21 herunterreguliert (Sablina et al., 1998; Sherr, 1996). Wir untersuchten die Expression von Cyclin A über einen Zeitraum von 168 Stunden nach Zugabe von 5nM Östradiol. Der Verlauf der Expression in behandelten und unbehandelten Zellen zeigte keinen Unterschied, so dass wir davon ausgehen können, dass eine DNA-Schädigung durch Proliferationssteigerung mit Östradiol keine Auswirkung auf die Expression von Cyclin A hat.

Ein weiteres target-Protein von p53 zum Erzielen eines Zellzyklus-Arrest ist die Herabregulierung von Cyclin B (Stewart und Pietsenpol, 2001; Luch, 2002; Jin et al., 2002). Wir untersuchten die Expression von Cyclin B exemplarisch nach Zugabe von 5nM Östradiol über 168 Stunden. Während etwa 100 Stunden nach Aussaat die Expression von Cyclin B in behandelten Zellen über der Kontrolle liegt, sinkt sie zum Zeitpunkt 168 Stunden unter Kontrollniveau. Auch insgesamt findet sich ein Abfall der Cyclin B-Konzentration. Östradiol könnte also über Förderung der Proliferation zu einem DNA-Schaden zu führen, weswegen über Cyclin B ein Zellzyklusarrest erwirkt wird.

Zusammen mit cdk1 bildet Cyclin B den mitosis promoting factor (MPF) (Luch, 2002), weswegen die Expression von cdk1/cdc2 nach Stimulation mit 50ng/ml IGF untersucht wurde. Wir fanden nach 144 Stunden in stimulierten Zellen den 1,5fachen Wert von cdk1/cdc2 im Vergleich zur Kontrolle, nach 168 Stunden glichen sich die Expressionswerte in Kontrolle und stimulierten Zellen jedoch an. Insgesamt stieg die Expression im zeitlichen Verlauf eher an, was weder zu den Ergebnissen der p53- noch zu den denen der Cyclin B-Expression passt. Nach DNA-Schädigung hätte man eine Herunterregulation der cdk1/cdc2-Expression – einhergehend mit vorheriger vermehrter Expression von p53, die wir ja auch beobachteten – erwartet. Eine Erklärung bietet sich in den mannigfaltigen Wegen, über die p53 seine Wirkung entfaltet: Offensichtlich wirkt IGF oder der durch IGF verursachte genomische Schaden nicht über einen Zellzyklusarrest via Cyclin B/cdk1. Andere Signalwege über Cyclin D1/cdk4, Cyclin E/cdk2 oder Cyclin A/cdk2 (Sablina et al., 1998) sollten in nachfolgenden Arbeiten untersucht werden.

Dies zeigt aber auch, dass die Auswirkungen auf den Zellzyklus durch hormonelle Stimulation der Proliferation nicht gleich ablaufen, sondern vom proliferationsfördernden Agens abhängen. Somit können durch diese Arbeit keine Auswirkungen der Proliferation an

sich auf ein bestimmtes Zellzyklusregulationsprotein gemacht werden, sondern nur Aussagen über das hier verwendete Agens.

Die im Folgenden beschriebenen Proteine wurden deswegen wiederum soweit möglich für alle Testansätze (Östradiol 5nM sowie Insulin 100µg/ml über 24 Stunden; Östradiol 5nM sowie IGF 50ng/ml über 168 Stunden) untersucht.

Ein dritter Weg, über den p21 einen Zellzyklusarrest bewirken kann, ist die Herunterregulation von Cyclin D. Cyclin D dient als Sensor für mitogene Stimulation und ist unter Stimulation während des ganzen Zellzyklus exprimiert. Die maximale Expression findet sich im Übergang von G1- zu S-Phase. Cyclin D kontrolliert die Aktivität des Transkriptionsfaktors E2F (Luch, 2002; Sherr, 1996). 24 Stunden nach Gabe von 5nM Östradiol zeigte sich kein Unterschied in der Expression von Cyclin D in behandelten und unbehandelten Zellen. In der Literatur ist jedoch eine vermehrte Expression von Cyclin D in den ersten 25 Stunden nach Stimulation mit 100nM Östradiol beschrieben, erklärt durch eine erhöhte Mitosetätigkeit der Zellen (Lai et al., 2001). Nach 168 Stunden jedoch konnten wir eine 1,3fache Mehrexpression in den behandelten Zellen feststellen, was als Reaktion auf mitogene Stimulation gewertet werden kann. Allerdings wurde dieser Wert aus einem Western-Blot über 24 Stunden gewonnen. Zur genaueren Untersuchung sollte ein Western-Blot über 168 Stunden zur Expressionsbestimmung von Cyclin D unter Östradiol durchgeführt werden.

Nach Stimulation mit 100µg/ml Insulin zeigte sich 24 Stunden nach Zugabe der Testsubstanz ein Überwiegen der Expression in den behandelten Zellen. Auch Lai et al. (2001) hatten eine vermehrte Expression von Cyclin D in den ersten 25 Stunden nach Testsubstanzzugabe in MCF-7-Zellen beobachtet. Nach 168 Stunden überwog in unseren Experimenten die Expression jedoch in den unbehandelten Zellen. Dies kann als Arrest durch Supprimierung von Cyclin D gewertet werden. Auch hier sollte jedoch ein Langzeitwestern durchgeführt werden. Im Versuch über 168 Stunden mit 50ng/ml IGF beobachteten wir einen kontinuierlichen Abfall der Expression von Cyclin D zwischen 100 und 168 Stunden nach Aussaat, wobei die Expression in den behandelten Zellen unterhalb des Kontrollniveaus lag. Die Erklärung hierfür ist ein Zellzyklusarrest durch Herunterregulation der Expression von Cyclin D.

Ein weiterer Marker für Proliferation ist PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (Stewart und Pietenpol, 2001; Luch, 2002; Jin et al., 2002; Sablina et al., 1998). PCNA ist unbedingt

nötig für die S-Phase, und die Rate der Synthese PCNA korreliert direkt mit der Proliferationsrate (Schipper et al., 1998). Außerdem ist es an der Resynthese reparierter DNA beteiligt (Hoejmakers, 2001).

Zunächst analysierten wir die Expression von PCNA über 168 Stunden. Nach Zugabe von 5nM Östradiol zeigt sich bis zum Zeitpunkt 100 Stunden ein Abfall der Konzentration sowohl in behandelten als auch in unbehandelten Zellen. Bis 144 Stunden nach Aussaat verliefen die Werte parallel. 168 Stunden nach Aussaat schließlich zeigte sich ein Anstieg der Expression von PCNA in den behandelten Zellen auf den 3fachen Wert der Kontrolle, was auch eine erhöhte Proliferation oder Reparaturtätigkeit hinweist.

Nach Stimulation mit 50ng/ml IGF stieg die Expression von PCNA bis zum Zeitpunkt 120 Stunden an, um dann auf Kontrollniveau zurückzufallen. Die Kontrolle zeigte einen verspäteten Anstieg und lag nach 168 Stunden sogar über dem Niveau der behandelten Zellen. Hier lässt sich der Kurvenverlauf am ehesten als Proliferationsmarker auffassen, da die behandelten Zellen zum Zeitpunkt der Ernte (168 Stunden) sehr dicht wuchsen, die Mitosetätigkeit also eher gebremst war, wohingegen in den Kulturflaschen der Kontrolle noch reichlich Raum zur Proliferation vorhanden war.

Die Analyse der ersten 24 Stunden nach Aussaat ergab nach Stimulation mit 5nM Östradiol zunächst ein Überwiegen der PCNA-Expression in den behandelten Zellen, nach 24 Stunden jedoch einen Anstieg der Kontrollwerte über Östradiol-Niveau. Hier kann man PCNA wiederum als Proliferationsmarker werten. Durch Östradiol wurde die Proliferation forciert, wodurch sich ein früherer Anstieg von PCNA im Vergleich zur Kontrolle erklärt.

Nach Stimulation mit 100µg/ml Insulin zeigte sich zunächst ein Absinken der PCNA-Werte sowohl in Kontrolle als auch in den behandelten Zellen. Die Expression nahm in den behandelten Zellen zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Aussaat jedoch wieder zu. Anscheinend setzt die Proliferation nach Stimulation mit Insulin also später ein als die mit Östradiol.

Der Kurvenverlauf aller Versuche ist auffallend ähnlich dem Kurvenverlauf von p21, so dass eine weitere Erklärung der aufgezeigten Ergebnisse im Zusammenspiel zwischen p21 und PCNA liegt. Nach DNA-damage wird wie bereits beschrieben über p53 p21 aktiviert, welches an PCNA bindet und dieses inhibiert (Stewart und Pietenpol, 2001; Sablina et al., 1998).

Durch diesen Mechanismus wird bei Schädigung der DNA das Voranschreiten der DNA-Replikation behindert. Genau dies konnten wir also auch durch Stimulation der Proliferation durch Östradiol, IGF und Insulin beobachten.

Ein letzter Punkt der vorliegenden Arbeit war die Beurteilung der Expression verschiedener Reparaturenzyme. Zum einen wurde von mir hierfür die DNA-Polymerase δ gewählt, da sie

unter anderem zur Synthese der Reparaturstellen verwendet wird (Hoeijmakers, 2001). Nach Zugabe von 50ng/ml IGF fand sich ein Anstieg in der Expression von DNA-Polymerase δ bis zum Zeitpunkt 100 Stunden, danach ein kontinuierlicher Abfall der Konzentration in den behandelten Zellen. In den unbehandelten Zellen überrascht ein Peak der Expression von DNA-Polymerase δ zum Zeitpunkt 120 Stunden, der vergleichbar dem Peak der unbehandelten Zellen in der Expression von PCNA ist. Dies deutet darauf hin, dass auch hier die DNA-Polymerase δ nicht nur zur Reparatursynthese, sondern auch zu Synthese neuer DNA nach Proliferationsstimulierung exprimiert wurde (Hoeijmakers, 2001). Wurden die Zellen mit 5nM Östradiol stimuliert, so zeigten sie zu fast allen Zeitpunkten ein Überwiegen der Expression in den behandelten Zellen, zum Teil um Faktor 2. Dies kann sowohl als vermehrte Proliferation als auch als Reparaturtätigkeit gewertet werden.

Da sich die Untersuchung von DNA-Polymerase δ also nicht als ergiebig erwies, wurde MSH2 in die Analysen aufgenommen. MSH2 dient als Sensor des Fehlers vor allem bei DNA-mismatch (Hoeijmakers, 2001). Nach Stimulation mit 50ng/ml IGF konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen festgestellt werden, auch der Verlauf der Kurven über 168 Stunden war nahezu gleich. Unter Gabe von 5nM Östradiol konnte man über 168 Stunden einen leichten Anstieg der Konzentration von MSH2 beobachten, wobei die Expression in behandelten Zellen leicht über dem der Kontrolle lag. Deutlich wird dieses Überwiegen in den ersten 4 bis 6 Stunden nach Zugabe von Östradiol bzw. Insulin in den Western über 24 Stunden. Insgesamt spricht dies also für eine leicht vermehrte Reparaturtätigkeit in den behandelten Zellen.

Insgesamt weisen die Ergebnisse des Westerblots auf eine vermehrte Proliferation der stimulierten Zellen hin, die auch schon anhand der Zellzahlen und der Ergebnisse des Experimentes mit Cytochalasin B festgestellt wurde. Die hormonell stimulierte Proliferation führt also zu einer vermehrten Expression diverser Proteine, die den Zellzyklus vorantreiben wie beispielsweise Cyclin D. Diese Forcierung des Zellzyklus hat eine erhöhte Fehlerrate zur Folge. Sichtbar wird dies zum einen in einer erhöhten Mikrokernfrequenz der behandelten Zellen, die sich dosisabhängig steigern lässt. Zum anderen finden sich Hinweise auf DNA-Schädigung mit nachfolgendem Zellzyklusarrest durch den p53-pathway. Auch eine vermehrte Reparaturtätigkeit der stimulierten Zellen lässt sich vermuten.

Somit zeigt sich, dass nicht nur Hormone an sich über direkt genotoxische Wirkung, sondern vor allem die durch sie ausgelöste Proliferation Mutationen erzeugen können.

Schon 1982 vermuteten Henderson et al., dass Hormone über eine Proliferationssteigerung zu genetischen Fehlern führen können. So konnte die Inzidenz hormonabhängiger Karzinome durch Gabe hoher Dosen der Hormone im Tierversuch gesteigert werden, was allerdings auch durch genotoxische Wirkung der Hormone entstanden sein könnte.

Allerdings können auch nicht genotoxische Agenzien in hoher Dosis Karzinome verursachen. Beispiele hierfür sind infektiöse Agenzien, verschiedene Hormone sowie Tabak. Der kanzerogene Effekt dieser Substanz lässt sich über eine Proliferationssteigerung erklären: in hohen Dosen wirken diese Substanzen direkt zytotoxisch, so dass durch vermehrten Zelluntergang das Gewebe zur verstärkten Proliferation angeregt wird. Durch die Proliferationssteigerung erhöht sich das Auftreten genetischer Fehler. Durch nicht korrigierte Mutationen können schließlich Tumorsuppressorgene inaktiviert bzw. Onkogene aktiviert werden (Preston-Martin et al., 1990).

Mehrere epidemiologische Beispiele sprechen für diese These. So sind tatsächlich einige Infektionskrankheiten mit einem erhöhten Karzinomrisiko des entsprechenden Organs assoziiert. Als Beispiele seien das Hepatitis-C-Virus und das primäre Leberzellkarzinom sowie das Epstein-Barr-Virus und maligne B-Zell-Lymphome genannt. Auch mechanische und physikalische Traumata, die mit Zellverlust einhergehen, können das Auftreten von Karzinomen begünstigen. So beobachtet man vermehrt Gallenblasenkarzinome bei chronischem Gallensteinleiden (Preston-Martin et al., 1990). Des Weiteren ist ein Salz-Exzess, der auf die Magenschleimhaut mitogen wirkt, ein Risikofaktor für die Entstehung eines Magenkarzinoms (Ames und Gold, 1990).

Vor allem die Rolle der Hormone scheint in diesem Zusammenhang aber viel wichtiger als bisher angenommen. Bereits einleitend wurde der Zusammenhang zwischen Hormonen und zahlreichen Karzinomen ausführlich erläutert. So bestehen beispielsweise Zusammenhänge zwischen Hyperinsulinämie und der Entwicklung von Kolon-Karzinomen (Kominou et al., 2003). Auch bei Patienten mit Akromegalie, die einen erhöhten IGF-Spiegel aufweisen, konnte eine Erhöhung der Inzidenz für Kolon-Karzinome nachgewiesen werden (Starke, 2003). Aber auch bei exogen zugeführtem growth hormone (GH) mit IGF als Effektorhormon weisen die Daten auf eine Assoziation mit der Entstehung diverser Karzinome hin (Ogilvy-Stewart und Gleeson, 2004).

Eine bedeutende Rolle spielt aber vor allem Östrogen, dass sowohl durch exogene als auch durch endogene Quellen mit einer Erhöhung des Risikos für Brustkrebs sowie für

endometrioide Adenokarzinome einhergeht. Aktuellste Studien weisen besonders auf den zweifelhaften Nutzen der postmenopausalen Hormonersatztherapie hin, die nicht nur das Risiko primärer Karzinome erhöht, sondern auch mit einer erhöhten Inzidenz für Zweitkarzinome beispielsweise nach Brustkrebs einhergeht (Holmberg und Anderson, 2004; Kenemans und Bosman, 2003; Gambacciani et al., 2003; Chen et al., 2002).

Preston-Martin et al. (1990 und 1993) liefern eine Erklärung für all diese beobachteten Phänomene. Durch die Teilung der Zelle an sich erhöht sich das Risiko für die Entstehung genetischer Fehler, da die während der Teilung vorliegende Einzelstrang-DNA anfälliger ist als Doppelstrang-DNA. Zudem entsteht durch die Mitose die Möglichkeit genetischer Rekombination, die immer auch mit einem erhöhten Mutationsrisiko einhergeht. Durch die Genduplikation kann es außerdem zur Aktivierung bisher inaktiver Onkogene bzw. zur Expression prämutagener DNA kommen (Preston-Martin et al., 1993; Barrett, 1993). Des Weiteren führen Preston-Martin et al. (1990) als epidemiologischen Beweis an, dass Zellen, die sich nicht oder selten teilen wie beispielsweise Kardiomyozyten oder Nervenzellen auch nur selten Karzinome entwickeln.

Gegen die Theorie der Karzinomentstehung durch Proliferationssteigerung führt Barrett (1993) aber zum Beispiel die Tatsache an, dass eine erhöhte Zellteilung, wie sie physiologischerweise während der Entwicklung des Organismus auftritt, nicht automatisch zu einer erhöhten Karzinominzidenz führt. Auch seien viele toxische und/oder hyperplastische Stimuli nicht kanzerogen.

Um allerdings den Zusammenhang zwischen erhöhtem Mutationsrisiko durch gesteigerte Proliferation und erhöhtem Karzinomrisiko zu erörtern, reichen die Daten dieser Arbeit nicht aus. Zur Entstehung eines Karzinoms sind zum einen mehrere Mutationen nötig (Barrett, 1993), zum anderen spielen Mechanismen des Gesamtorganismus wie Abwehr von Tumorzellen durch natürliche Killerzellen eine Rolle.

Hierfür sollten zum einen epidemiologische Studien weiter verfolgt werden. Zum anderen wird es nötig sein, die Auswirkung von verschiedenartig ausgelöster Proliferationssteigerung beispielsweise nach Zerstörung eines Gewebeteils oder durch Infektionen sowohl in der Zellkultur als auch im Tiermodell zu untersuchen.

Belegt werden konnte durch diese Arbeit aber in jedem Fall ein Zusammenhang zwischen Proliferationssteigerung und Entstehung von Mutationen, was sich in einer erhöhten Mikrokernrate äußerte. Für die Entstehung der Mikrokerne scheint eine beschleunigte Zellzyklusprogression verantwortlich zu sein, eine Wiederholung der FACS-Analysen sollte diese These bestätigen. Außerdem finden sich Hinweise auf eine Beschleunigung des

Zellzyklus in den Westernblot-Analysen, die eine vermehrte Expression von Proteinen zeigen, die den Zellzyklus forcieren, beispielsweise Cyclin D. Durch die Beschleunigung der kompletten Zellteilung scheinen jedoch mehr Fehler in der Replikation der DNA zu aufzutreten, sichtbar an der gesteigerten Expression von Inhibitoren des Zellzyklus wie zum Beispiel p53. Dies geht mit einer leicht erhöhten Reparaturtätigkeit der hormonell stimulierten Zellen einher.

Um genauere Aussagen über eine Erhöhung der Mutationsfrequenz und auch der Mikrokernrate durch Proliferationssteigerung machen zu können, sollten auch andere Wege der Proliferationssteigerung zum Beispiel durch provozierten Zelltod durch mechanische oder chemische Traumata überprüft werden. Weiterhin ist es sicher erfolbringend, die Auswirkungen der Proliferation auf den Zellzyklus anhand weiterer Regulations- und Reparaturproteine zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

In der Entstehung eines malignen Tumors, der Kanzerogenese, unterscheidet man drei Phasen: Die Initiation, bei der eine einzige Zelle durch irreversible Schädigung ihrer DNA so verändert wird, dass sie in der nachfolgenden Phase der Promotion durch weitere Mutationen einen Wachstumsvorteil erhält, sowie zuletzt die Phase der Progression, die durch autonomes Wachstum und die Möglichkeit der Metastasierung gekennzeichnet ist.

Auf zellulärer Ebene ist die Kanzerogenese gekennzeichnet durch eine Folge von circa sieben bis zehn Mutationen. Diese Mutationen betreffen oft Tumorsuppressorgene, die hierdurch inaktiviert werden, oder Proto-Onkogene, die zu Onkogenen aktiviert werden. Dies wiederum kann zu Veränderungen im Ablauf des Zellzyklus führen: Die Zelle verliert die Fähigkeit zum Zellzyklus-Arrest oder zur Apoptose, so dass sie zum einen ungehemmt proliferiert, zum anderen Fehler in der Replikation nicht mehr reparieren kann und weitere Mutationen kumulieren.

Hormone spielen hierbei eine bedeutende Rolle, denn erhöhte Level verschiedener Hormone werden in Zusammenhang mit der Inzidenz unterschiedlicher Karzinome gebracht. So scheint ein Östradiol-Exzess mit der Entstehung von Mamma-Karzinomen und Karzinomen der weiblichen Geschlechtsorgane assoziiert zu sein. Ist der IGF-I-Spiegel erhöht, finden sich vermehrt Karzinome des Kolons, ebenso bei Hyperinsulinämie. Die Mechanismen, wie diese Hormone die Karzinominzidenz erhöhen, hängen von der Struktur des Hormons ab. Steroidhormone wie beispielsweise Östradiol können über toxische Metabolite direkt genotoxisch wirken, derartige Metabolite sind bei Peptidhormonen nicht bekannt. Beide Hormongruppen können jedoch über eine Steigerung der Proliferation in der Phase der Promotion epigenetisch auf Tumorzellen einwirken.

In verschiedenen Arbeiten zur Toxizität des Steroidhormons Östradiol fiel allerdings auf, dass es auch in nicht genotoxischer Dosis in östrogenrezeptor-positiven Mamma- und Ovarialkarzinomzellen zu erhöhter genetischer Instabilität führte, die bei östrogenrezeptor-negativen Zellen nicht nachgewiesen werden konnte. Eine Erklärung der beobachteten genetischen Instabilität fand sich in einer verminderten Dauer der G2/M-Phase des Zellzyklus, in der bei der Replikation aufgetretene Schäden repariert werden. Hier lag die Vermutung nahe, dass durch eine gesteigerte Proliferation Zellen

den Zellzyklus schneller durchlaufen müssen und durch die verminderte Reparaturtätigkeit das Risiko genetischer Instabilität erhöht ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden nun östrogenrezeptor-positive Ovarialkarzinomzellen (BG-1) sowie östrogenrezeptor-negative Ovarialkarzinomzellen (UCI-107) mit dem Steroidhormon Östradiol sowie den Peptidhormonen EGF, IGF und Insulin stimuliert. Die Zellen reagierten mit einer dosisabhängigen Proliferationssteigerung, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen sowie das Ausbleiben der Proliferation bei UCI-107-Zellen nach Stimulation mit Östradiol.

Die stimulierten Zellen wurden schließlich mittels des Mikrokern-Assays auf genetische Instabilität hin untersucht. Hier zeigte sich abhängig vom Maß der Proliferation eine Zunahme der Mikrokern mit steigender Proliferation. Durch Zugabe von Cytochalasin B konnte die Mikrokernfrequenz auf genau eine Kernteilung hin normiert werden, und auch hier zeigte sich eine vermehrte genetische Instabilität mit erhöhter Kernteilungsfrequenz. Als nächstes wurden die Mikrokern der stimulierten Zellen durch Färbung mit CREST-Serum auf den Anteil an Kinetochoren überprüft, um so eine Aussage über das aneugene beziehungsweise klastogene Potenzial der zugegeben Hormone machen zu können. Alle vier Testsubstanzen konnten der Gruppe der Aneuploidie erzeugenden Substanzen zugeordnet werden, wobei der Effekt bei Zugabe von Östradiol und Insulin deutlicher war als bei Zugabe von IGF und EGF. Dies deutet darauf hin, dass die Mikrokern durch Störung des Spindelapparates entstanden sind.

In der FACS-Analyse sollten nun die Auswirkungen einer Proliferationssteigerung auf die Zellzyklusphasen untersucht werden. Unter Stimulation mit IGF konnte zum Zeitpunkt des stärksten Wachstums eine deutliche Verminderung des G1- und sogar eine Erhöhung des G2/M-Phasen-Anteils beobachtet werden. Lediglich der erhöhte S-Phasen-Anteil der behandelten Zellen ließ auf eine gesteigerte Proliferation schließen.

Unterschiede zwischen stimulierten und unbehandelten Zellen fanden sich jedoch in der Expression einiger Zellzyklusregulationsproteine, die mit Hilfe des Western-Blots untersucht wurden. Hierzu wurden die Zellen 144 Stunden mit Östradiol oder IGF sowie in einer zweiten Versuchsreihe 24 Stunden mit Östradiol oder Insulin inkubiert.

p53, ein wichtiges Tumorsuppressorgen, war in allen Testansätzen gegenüber der Kontrolle vermehrt, was ein Hinweis auf die DNA-Schädigung durch die Proliferationssteigerung ist. Hierdurch könnte über die beobachtete p53-Mehrexpression ein Zellzyklusarrest eingeleitet werden. Bestätigt wurde diese Vermutung durch ein gleichfalls beobachtetes Ansteigen der p21-Expression, einem target-Protein von p53. An Östradiol untersuchten wir nun über 168 Stunden die Möglichkeiten, über die p21 den Zellzyklusarrest einleitet. Hierbei konnte an der Expression von Cyclin A kein Unterschied gegenüber der Kontrolle detektiert werden, wohingegen die Expression von Cyclin B über 168 Stunden absank. Da Cyclin B mit cdk1 den mitosis promoting factor (MPF) bildet, wurde nach Stimulation mit IGF die Expression von cdk1 untersucht. Hier fand sich jedoch kein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle. Als Marker für mitogene Stimulation wurde schließlich für alle Testansätze die Expression von Cyclin D untersucht. Hier zeigte sich in den Ansätzen mit Stimulation über 24 Stunden ein Anstieg der Cyclin D-Expression, wohingegen bei länger dauernder Stimulation (144 Stunden) die Expression unter den Kontrollwert fiel. Eine Erklärung findet diese Beobachtung in der Einleitung eines Zellzyklusarrests. Schwieriger ist die Beurteilung des Verlaufs von PCNA, das einerseits als Proliferationsmarker dienen kann und dementsprechend nach 120stündiger Inkubation mit Östradiol (Zeitpunkt 144 Stunden) erniedrigt war und so wiederum für einen Zellzyklusarrest steht. Gleiches wurde nach Inkubation mit IGF und Insulin beobachtet. Andererseits wird PCNA auch bei der Resynthese reparierter DNA-Stücke vermehrt exprimiert, was den Anstieg von PCNA nach 144stündiger Östradiol-Inkubation erklärt. Das gleiche Problem zeigte sich bei der Beobachtung der DNA-Polymerase δ , welche bei Inkubation mit Östradiol und Insulin sowohl als Ausdruck einer Proliferationssteigerung als auch einer Resynthese nach Reparatur gesehen werden kann. Ein weiteres Reparaturenzym, MSH2, zeigte nur geringe Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen.

Insgesamt konnte durch diese Arbeit also ein Anstieg der Mikrokernrate nach Zugabe verschiedener Hormone beobachtet werden. Bedeutend ist hier vor allem, dass somit eine Möglichkeit besteht, eine gesunde Zelle alleine durch eine Proliferationssteigerung über das physiologische Maß hinaus zu initiieren. Vergleichbare Ergebnisse zeigen auch epidemiologische Studien, die diverse Mechanismen, die zu Proliferation über das

physiologische Maß hinaus führen, für die Entstehung von Krebs verantwortlich machen.

Eine Erklärung hierfür findet sich in einer Forcierung der Zelle durch den Zellzyklus. Die in anderen Arbeiten gezeigte Verkürzung der G2/M-Phase konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden, was allerdings wahrscheinlich auf diversen Problemen mit der Optimierung des FACS-Scan für BG-1-Zellen beruht. Um definitive Aussagen diesbezüglich machen zu können, sollte der FACS-Scan mit BG-1, aber auch mit UCI-107-Zellen optimiert werden.

Bezüglich der Expression diverser Zellzyklusregulationsproteine konnte eine Tendenz verminderter Reparatur sowie verringerter Möglichkeit zum Zellzyklusarrest festgestellt werden. Mit weiteren Versuchen zur Expression anderer Proteine sollte dieses Ergebnis bestätigt werden. Zuletzt schließlich ist es sinnvoll, die gezeigte gesteigerte genomische Instabilität durch Proliferationssteigerung mit weiteren Versuchen zu bestätigen. Hierzu könnte sich beispielsweise die Auslösung der Proliferation durch mechanische Zellzerstörung eignen.

6. Literaturverzeichnis

- Ahmad, Md.E.,** Shadab, G.G.H.A., Hoda, A., Afzal, M., (2000) Genotoxic effects of estradiol-17 β on human lymphocyte chromosomes *Mutation Research*, **466**, 109-115.
- Ames, B.N.,** Gold, L.S., (1990) Falsche Annahmen über die Zusammenhänge zwischen der Umweltverschmutzung und der Entstehung von Krebs *Angewandte Chemie*, **102**, 1233-1246.
- Ames, B.N.,** Gold, L.S. (1990) Chemical carcinogenesis: Too many rodent carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**, 7772-7776.
- Apagova, L.S.,** Ivanov, A.V., Sablina, A.A., Kopnin, P.B., Sokova, O.I., Chumakov, P.M., Kopnin, B.P., (1998) p53-dependent effects of RAS oncogene on chromosome stability and cell cycle checkpoints *Oncogene*, **18**, 3135-3142.
- Baldwin, W.S.,** Curtis, S.W., Cauthen, C.A., Risinger, J.I., Korach, K.S., Barret, J.C., (1998) BG-1 ovarian cell line. An alternative model for examining estrogen dependent growth in vitro. *In vitro cellular and developmental biology of the animal*, **34**, 649-654.
- Barrett, J.C.,** (1993) Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment *Environmental Health Perspectives*, **100**, 9-20.
- Bartucci, M.,** Morelli, C., Mauro, L., Ando, S., Surmacz, E., (2001) Differential insulin-like growth factor I receptor signalling and function in estrogen receptor (ER)-positive MCF-7 and ER-negative MDA-MB-231 breast cancer cells *Cancer Research*, **61**, 6747-6754.
- Blume-Jensen, P.,** Hunter, T., (2001) Oncogenic kinase signalling *Nature*, **411**, 355-365.
- Carr, A. M.,** (2002) Mini review. DNA structure dependent checkpoints as regulators of DNA repair. *DNA repair*, **1**, 983-994.
- Carr, A.M.,** (2000) Piecing together the p53 puzzle *Science*, **287**, 1765-1766.
- Chatzistamou, I.,** Schally, A.V., Varga, J.L., Groot, K., Armatis, P., Bajo, A.M., (2001) Inhibition of growth and reduction of tumorigenicity of UCI-107 ovarian cancer by antagonists of growth hormone-releasing hormone and vasoactive intestinal peptide. *Journal of Cancer Research Clinical Oncology*, **127**, 645-652.
- Chen, C.-L.,** Weiss, N.S., Newcomb, P., Barlow, W., White, E., (2002) Hormone replacement therapy in relation to breast cancer. *JAMA*, **287**, 734-741.
- Collins, K.,** Jacks, T., Pavletich, N.P., (1997) The cell cycle and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 2776-2778.
- Dinda, S.,** Sanchez, A., Moudgil, V., (2002) Estrogen-like effects of thyroid hormone on the regulation of tumor suppressor proteins, p53 and retinoblastoma, in breast cancer cells. *Oncogene*, **21**, 761-768.
- Eckert, I.,** Stopper, H., (1996) Genotoxic effects induced by β -oestradiol in vitro. *Toxicology in vitro*, **10** (1996), 637-642.
- Elledge, S.J.,** (1996) Cell cycle checkpoints. Preventing an identity crisis *Science*, **274**, 1664-1672.
- Endow, S.A.,** Glover, D.M. (Hrsg.) (1998) Dynamics of cell division. Oxford University Press.
- Evan, G.I.,** Vousden, K.H., (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, **411**, 342-348.
- Fang, H.,** Tong, W., Perkins, R., Soto, A.M., Prechtel, N.V., Sheehan, D.M., (2000) Quantitative comparisons of in vitro assays for estrogenic activities. *Environmental Health Perspectives*, **108**, 723-729.

- Fenech, M.**, (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*, **285**, 35-44.
- Fischer, W.**, Keiwan, A., Schmitt, E., Stopper, H., (2001) Increased formation of micronuclei after hormonal stimulation of cell proliferation in human breast cancer cells. *Mutagenesis*, **16**, 209-212.
- Friedberg, E.C.**, (2003) DNA damage and repair. *Nature*, **421**, 436-440.
- Gambacciani, M.**, Monteleone, P., Sacco, A., Genazzani, A.R. (2003) Hormone replacement therapy and endometrial, ovarian and colorectal cancer. *Best Practise & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **17**, 139-147.
- Gamboa, G.**, Carpenter, P.M., Podnos, Y.D., Dorion, G., Iravani, L., Bolton, D., Mascarello, J.T., Manetta, A., (1995) Characterization and development of UCI 107, a primary human ovarian carcinoma cell line. *Gynaecologic Oncology*, **58**, 336-343.
- Geisinger, K.R.**, Kute, T.E., Pettenati, M.J., Welander, C.E., Dennard, Y., Collins, L.A., Berens, M.E. (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors. *Cancer*, **63**, 280-288.
- Geisinger, K.R.**, Berens, M.E., Duckett, Y., Morgan, T.M., Kute, T.E., Welander, C.E. (1990) The effects of estrogen, progesterone, and tamoxifen alone and in combination with cytotoxic agents against human ovarian carcinoma in vitro. *Cancer*, **65**, 1055-1061
- Giovannucci, E.**, (2001) Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer. A review of evidence. *American Institute for Cancer Research 11th Annual Research Conference on Diet, Nutrition and Cancer*.
- Grafi, G.**, (1998) Minireview: Cell cycle regulation of DNA replication. The endoreduplication perspective. *Experimental cell research*, **244**, 372-378.
- Greim, H.**, Deml, E. (Hrsg.), (1996) Toxikologie. Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner. VCH-Verlag.
- Hartwell, L.H.**, Kastan, M.B. (1994) Cell cycle control and cancer. *Science*, **266**, 1821-1828.
- Henderson, B.E.**, Feigelson, H.S., (2000) Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **21**, 427-433.
- Henderson, B.E.**, Ross, R.K., Pike, M.C., Casagrande, J.T., (1982) Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Research*, **42**, 3232-3239.
- Hirao, A.**, Kong, Y.-Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J., Mak, T.W. (2000) DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science*, **287**, 1824-1827.
- Hodgson, A.V.**, Ayala-Torres, S., Thompson, E.B., Liehr, J.G. (1998) Estrogen-induced microsatellite DNA alterations are associated with Syrian hamster kidney tumorigenesis. *Carcinogenesis*, **19**, 2169-2172.
- Hoeijmakers, J.H.J.**, (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. In: *Nature*, **411**, 366-374.
- Hundal, B.S.**, Dhillon, V.S., Sidhu, I.S., (1997) Genotoxic potential of estrogens. *Mutation Research*, **389**, 173-181.
- Jacks, T.**, Weinberg, R. A., (1998) The Expanding Role of Cell Cycle Regulators. *Science*, **280**, 1035-1036.
- Jackson, R.J.**, Adnane, J., Coppola, D., Cantor, A., Sebti, S.M., Pledger, W.J., (2001) Loss of cell cycle inhibitors p21Cip1 and p27Kip1 enhances tumorigenesis in knockout mouse models. *Oncogene*, **21**, 8466-8497.

- Jin, S.,** Tong, T., Fan, W., Fan, F., Antinore, M. J., Zhu, X., Mazzacurati, L., Li, X., Petrik, K. L., Rajaskaran, B., Wu, M., Zhan, Q. (2002) GADD45-induced cell cycle G2-M arrest associates with altered subcellular distribution of cyclin B1 and is independent of p38 kinase activity. *Oncogene*, **21**, 8696-8704.
- Kath, R.,** Höffken, K., Böhmer, F.D. (1998) Antagonisierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren bei malignen Erkrankungen. *Onkologie*, **4**, 1054-1064.
- Kenemans, P.,** Bosman, A., (2003) Breast cancer and post-menopausal hormone therapy. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **17**, 123-137.
- Knudson, A.,** (2002) Cancer genetics. *American Journal of Medical Genetics*, **111**, 96-102.
- Komninou, D.,** Ayonote, A., Richie, J.P.Jr., Rigas, B. (2003) Insulin resistance and its contribution to colon carcinogenesis. *Exp Biol Med*, **228**, 396-405.
- Lai, A.,** Sarcevic, B., Prall, O.J., Sutherland, R.L., (2001) Insulin/Insulin-like growth factor I and estrogen cooperate to stimulate Cyclin E-Cdk2 activation and cell cycle progression in MCF-7 Breast cancer cells through differential regulation of Cyclin E and p21WAF1/Cip1. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 25823-25833.
- Lang, R.,** Redman, U., (1979) Non-mutagenicity of some sex hormones in the Ames Salmonella/microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, **67**, 361-365.
- LeRoith D.,** Roberts Jr, C.T., (2003) The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Letters*, **195**, 127-137.
- Liehr, J.G.,** (2000) Is Estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocrine Reviews*, **1**, 40-54.
- Liotta, L.A.,** Kohn, E.C., (2001) The microenvironment of the tumor – host interface. *Nature*, **411**, 375-379.
- Luch, A.,** (2002) Cell Cycle Control and Cell Division. Implications for Chemically Induced Carcinogenesis. *ChemBioChem*, **3**, 506-516.
- Marquardt, H.,** Schäfer, S.G. (Hrsg.), (1994) Lehrbuch der Toxikologie. BI-Wissenschaftsverlag.
- Moschos, S.J.,** Mantzoros, C.S., (2002) The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology*, **63**, 317-332.
- Murray, A.,** Hunt, T., (1993) The cell cycle. An introduction. Oxford University Press.
- Nahta, R.,** Hortobagyi, G.H., Esteva, F. (2003) Growth factor receptors in breast cancer. Potential for therapeutic intervention. *The Oncologist*, **8**, 5-17.
- Nakabayashi, H.,** Sunada, I., Hara, M. (2001) Immunohistochemical analysis of cell cycle-related proteins, apoptosis, and proliferation in pituitary adenomas. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **49(9)**, 1193-1194.
- Nowell, P.C.,** (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, **194**, 23-28.
- Osborn, A.J.,** Elledge S.J., Zou, L., (2002) Checking on the fork. The DNA-replication stress-response pathway. *Trends in Cell Biology*, **12**, 509-516.
- Peto, J.,** (2001) Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*, **411**, 390-395.
- Ponder, B.A.,** (2001) Cancer genetics. *Nature*, **411**, 336-341.
- Preston-Martin, S.,** Pike, M.C., Ross, R.K., Henderson, B.E., (1993) Epidemiologic evidence for the increased cell division model of carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, **101** Suppl. 5, 137-138.
- Preston-Martin, S.,** Pike, M.C., Ross, R.K., Jones, P.A., Henderson, B.E., (1990) Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Research*, **50**, 7415-7421.
- Pschyrembel,** (1998) Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage, de Gruyter – Verlag.
- Roy, D.,** Liehr, J.G., (1990) Estrogen, DNA damage and mutations. *Mutation Research*, **424**, 107-115.

- Royer, H.D.**, Grinstein, E., Janz, M., (1999) Regulation des Zellzyklus und therapeutische Implikationen. *Onkologe*, **5**, 884-890.
- Sablina, A.A.**, Chumakov, P.M., Levine, A.J., Kopnin, B.P. (2001) p53 activation in response to microtubule disruption is mediated by integrin-Erk signalling. *Oncogene*, **20**, 899-909.
- Sablina, A.A.**, Ilyinskaya, G.V., Rubtsova, S.N., Agapova, L.S., Chumakov, P.M., Kopnin, B.P., (1998) Activation of p53-mediated cell cycle checkpoint in response to micronuclei formation. *Journal of Cell Science*, **111**, 977-984.
- Santen, R.J.**, Song, R.X., McPherson, R., Kumar, R., Adam, L., Jeng, M.-J., Yue, W., (2002) The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, **80**, 239-256.
- Savelyeva, L.**, Claas, A., Matzner, I., Schlag, P., Hofmann, W., Scherneck, S., Weber, B., Schwab, M. (2001) Constitutional genomic instability with inversions, duplications, and amplifications in 9p23-24 in BRCA2 mutation carriers. *Cancer Research*, **61**, 5179-5185.
- Tucker, R.W.**, Barrett, J.C., (1986) Decreased numbers of spindle and cytoplasmic microtubules in hamster embryo cells treated with a carcinogen, diethylstilbestrol. *Cancer Research*, **46**, 2088-2095.
- Schmuck, G.**, Lieb, G., Wild, D., Schiffmann, D., Henschler, D., (1988) Characterization of an in vitro micronucleus assay with Syrian hamster embryo fibroblasts. *Mutation Research*, **203**, 397-404.
- Wingo, P.A.**, Tong, T., Bolden, S., (1995) Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.*, **45**, 8-30.
- Schiffmann, D.**, De Boni, D., (1991) Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylstilbestrol. A novel mechanism by which micronuclei can arise. *Mutation Research*, **246**, 113-122.
- Schipper, D.L.**, Wagenmans, M.J.M., Peters, W.H.M., Wagener, D.J.T., (1998) Significance of cell proliferation measurement in gastric cancer. *European Journal of Cancer*, **34**, 781-790.
- Schuler, M.**, Hasegawa, L., Parks, R., Metzler, M., Eastmond, D.A., (1998) Dose-response studies of the induction of hyperploidy and polyploidy by diethylstilbestrol and 17 β -estradiol in cultured human lymphocytes using multicolour fluorescence in situ hybridisation. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **31**, 263-273.
- Sevellyeva, L.**, Claas, A., Matzner, I., Schlag, P., Hofmann, W., Scherneck, S., Weber, B., Schwab, M., (2001) Constitutional genomic instability with inversions, duplications, and amplifications in 9p23-24 in BRCA2 mutation carriers. *Cancer Research*, **61**, 5179-5185.
- Sherr, C.J.**, (1996) Cancer cell cycles. *Science*, **274**, 1672-1677.
- Starke, K.** (Hrsg.), (2003) Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 156, Springer-Verlag.
- Stewart, Z.A.**, Pietenpol, J.A., (2001) p53 signalling and cell cycle checkpoints. *Chemical Research in Toxicology*, **14**, 243-262.
- Stillmann, B.**, (1996) Cell cycle control of DNA replication. *Science*, **274**, 1659-1672.
- Stopper, H.**, Körber, C., Schiffmann, D., Caspary, W.J., (1993) Cell-cycle dependent formation and mitotic disturbances induced by 5-azacytidine in mammalian cells. *Mutation Research*, **300**, 165-177.
- Stopper, H.**, Müller, S.O., (1997) Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity. A minireview. *Toxicology in Vitro*, **11**, 661-667.

- Stopper, H.**, Schmitt, E., Gregor, C., Müller, St.O., Fischer, W.H., (2003) Increased cell proliferation is associated with genomic instability. Elevated micronuclei frequencies in estradiol-treated human ovarian cancer cells. *Mutagenesis*, **18**, 243-47.
- Stoscheck, C.M.**, King, L.E.Jr., (1986) Role of epidermal growth factor in carcinogenesis. *Cancer Research*, **46**, 1030-1037.
- Taipale, J.**, Beachy, P.A., (2001) The hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*, **411**, 394-354.
- Tyson, J.J.**, Novak, B., (2001) Regulation of eukaryotic cell cycle. Molecular antagonism, hysteresis, and irreversible transitions. *Journal of theoretical Biology*, **210**, 249-263.
- Wells, A.**, (1999) Molecules in focus: EGF receptor. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **31**, 637-643.
- Wetzker, R.**, (1999) Signaltransduktion und therapeutische Interventionsmöglichkeit. *Onkologie*, **10**, 877-883.
- Wheeler, W.J.**, Cherry, L.M., Downs, T., Hsu, T.C., (1986) Mitotic inhibition and aneuploidy induction by naturally occurring and synthetic estrogens in Chinese hamster cells in vitro. *Mutation Research*, **171**, 31-41.
- Woodburn, J.R.**, (1999) The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacological Therapy*, **82**, 241-250.
- ^a**Zhou, B.-B.S.**, Elledge, S. (2000) The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective. *Nature*, **408**, 433-439.
- ^b**Zhou, B.-B.S.**, Chaturvedi, P., Spring, K., Scott, S.P., Johanson, R.A., Mishra, R., Mattern, M.R., Winkler, J.D., Khanna K.K., (2000) Caffeine abolishes the mammalian G2/M DNA damage checkpoint by inhibiting ataxia-teleangiectasia-mutated kinase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 10342-10348.

7. Anhang

7.1. Proliferationsexperimente

7.1.1. Proliferationssteigerung durch Östradiol

	A 1	A 2	B 1	B 2	C 1	C 2	D	Stabw
K	496300	479500	579800	578200	634100	629700	566267	65383
E 0	576700	571800	577000	548700	606400	613300	582317	23833
E 0,01	462900	480800	978100	981100	767700	726500	732850	227786
E 0,1	740700	740000	1145800	1153700	1025200	1003700	968183	186704
E 1	1037500	1055900	1048700	1037000	920600	913600	1002217	66350
E 10	844000	853200	1028400	1016100	1214600	1211200	1027917	163055
MMC	344600	665200	694100	676300	369100	342100	515233	179372

Tabelle 2 Dosisabhängige Proliferationssteigerung mit Östradiol. Dargestellt sind die mittels Coulter-Counter ermittelten Zellzahlen. Jeder Versuch wurde im Doppelansatz durchgeführt und die Ergebnisse aus drei Versuchen (A bis C) gemittelt (D). Die Standardabweichung (Stabw) wurde mithilfe des Programms Excel errechnet. Gemessen wurden die Zellzahlen der unbehandelten Zellen (K) sowie der mit dem Lösungsmittel DMSO (E0), 0,01nM Östradiol (E 0,01), 0,1nM Östradiol (E 0,1), 1nM Östradiol (E 1), 10nM Östradiol (E 10) sowie mit Mitomycin C (MMC) behandelten BG-1-Zellen.

7.1.2. Proliferationssteigerung durch EGF, IGF und Insulin

7.1.2.1. BG-1-Zellen

7.1.2.1.1. EGF

	A 1	A 2	B 1	B 2	C 1	C 2	D	Stabw
EGF 0	218000	226200	356600	342800	540600	525200	368233	139910
EGF 0,1	253000	247600	294500	287000	470900	475500	338083	106261
EGF 1	357600	352200	315100	295000	718800	753000	465283	211181
EGF 10	673700	691300	658000	696400	1044600	1047300	801883	189541
EGF 100	731000	735100	581300	556500	853000	841400	716383	125433
MMC	98600	81000			518900	473700	293050	235527

Tabelle 3 Dosisabhängige Proliferationssteigerung mit EGF. Dargestellt sind die mittels Coulter-Counter ermittelten Zellzahlen. Jeder Versuch wurde im Doppelansatz durchgeführt und die Ergebnisse aus drei Versuchen (A bis C) gemittelt (D). Die Standardabweichung (Stabw) wurde mithilfe des Programms Excel errechnet. Gemessen wurden die Zellzahlen der unbehandelten Zellen (EGF 0) sowie 0,1ng/ml EGF (EGF 0,1), 1ng/ml EGF (EGF 1), 10ng/ml EGF (EGF 10), 100ng/ml EGF (EGF 100) sowie mit Mitomycin C (MMC) behandelten BG-1-Zellen.

7.1.2.1.2. IGF

	A 1	A 2	B 1	B 2	C 1	C 2	D	Stabw
IGF 0	539900	536800	650900	667500	577500	587500	593350	55046
IGF 0,1	964100	1003800	1152100	1124500	1103500	1095200	1073867	73451
IGF 1	1324800	1333900	1222500	1239300	1182800	1206700	1251667	63054
IGF 10	1239700	1258900	1422000	1498300	1442900	1441400	1383867	107466
IGF 100	1523300	1565300	1646700	1590900	1551600	1525000	1567133	46555
MMC	214200	135400	694100	676300	369100	342100	405200	233031

Tabelle 4 Dosisabhängige Proliferationssteigerung mit IGF. Dargestellt sind die mittels Coulter-Counter ermittelten Zellzahlen. Jeder Versuch wurde im Doppelansatz durchgeführt und die Ergebnisse aus drei Versuchen (A bis C) gemittelt (D). Die Standardabweichung (Stabw) wurde mithilfe des Programms Excel errechnet. Gemessen wurden die Zellzahlen der unbehandelten Zellen (IGF 0) sowie 0,1ng/ml IGF (IGF 0,1), 1ng/ml IGF (IGF 1), 10ng/ml IGF (IGF 10), 100ng/ml IGF (IGF 100) sowie mit Mitomycin C (MMC) behandelten BG-1-Zellen.

7.1.2.1.3. Insulin

	A 1	A 2	B 1	B 2	C 1	C 2	D	Stabw
I 0	275800	287200	213800	210200	225100	229300	240233	32925
I 0,1	260400	257600	286800	262400	209100	208900	247533	31621
I 1	351100	341300	304200	311800	275400	293600	312900	28710
I 10	489400	493300	551400	551600	661700	628700	562683	70139
I 100	536100	552900	608800	599000	481000	455700	538917	61606
MMC	189500	184900					187200	3253

Tabelle 5 Dosisabhängige Proliferationssteigerung mit Insulin. Dargestellt sind die mittels Coulter-Counter ermittelten Zellzahlen. Jeder Versuch wurde im Doppelansatz durchgeführt und die Ergebnisse aus drei Versuchen (A bis C) gemittelt (D). Die Standardabweichung (Stabw) wurde mithilfe des Programms Excel errechnet. Gemessen wurden die Zellzahlen der unbehandelten Zellen (I 0) sowie 0,1µg/ml Insulin (I 0,1), 1µg/ml Insulin (I 1), 10µg/ml Insulin (I 10), 100µg/ml Insulin (I 100) sowie mit Mitomycin C (MMC) behandelten BG-1-Zellen.

7.1.2.2. UCI-Zellen

7.1.2.2.1. EGF

	A 1	A 2	Mittelwert	Stabw
EGF 0	1244800	1276000	1260400	15600
EGF 0,1	1233200	1221100	1227150	6050
EGF 1	1389900	1393600	1391750	1850
EGF 10	1624800	1685500	1655150	30350
EGF 100	1740200	1720200	1730200	10000
MMC	976100	779400	877750	98350

Tabelle 6 Dosisabhängige Proliferationssteigerung mit EGF. Dargestellt sind die mittels Coulter-Counter ermittelten Zellzahlen. Jeder Versuch wurde im Doppelansatz durchgeführt und die Ergebnisse aus drei Versuchen (A bis C) gemittelt (D). Die Standardabweichung (Stabw) wurde mithilfe des Programms Excel errechnet. Gemessen wurden die Zellzahlen der unbehandelten Zellen (EGF 0) sowie 0,1ng/ml EGF (EGF 0,1), 1ng/ml EGF (EGF 1), 10ng/ml EGF (EGF 10), 100ng/ml EGF (EGF 100) sowie mit Mitomycin C (MMC) behandelten UCI-Zellen.

7.1.2.2.2. IGF

	B 1	B 2	Mittelwert	Stabw
IGF 0	1244800	1276000	1260400	15600
IGF 0,1	1279300	1267600	1273450	5850
IGF 1	1633000	1651800	1642400	9400
IGF 10	1853600	1836700	1845150	8450
IGF 100	1687800	1710700	1699250	11450
MMC	976100	779400	877750	98350

Tabelle 7 Dosisabhängige Proliferationssteigerung mit IGF. Dargestellt sind die mittels Coulter-Counter ermittelten Zellzahlen. Jeder Versuch wurde im Doppelansatz durchgeführt und die Ergebnisse aus drei Versuchen (A bis C) gemittelt (D). Die Standardabweichung (Stabw) wurde mithilfe des Programms Excel errechnet. Gemessen wurden die Zellzahlen der unbehandelten Zellen (IGF 0) sowie 0,1ng/ml IGF (IGF 0,1), 1ng/ml IGF (IGF 1), 10ng/ml IGF (IGF 10), 100ng/ml IGF (IGF 100) sowie mit Mitomycin C (MMC) behandelten UCI-Zellen.

7.1.2.2.3. Insulin

	C 1	C 2	Mittelwert	Stabw
I 0	43000	45000	44000	1414
I 0,1	27000	36000	31500	6364
I 1	67000	48000	57500	13435
I 10	94000	95000	94500	707
I 100	134000	106000	120000	19799
E	49000	48000	48500	707
MMC	37000	39000	38000	1414

Tabelle 8 Dosisabhängige Proliferationssteigerung mit Insulin. Dargestellt sind die mittels Coulter-Counter ermittelten Zellzahlen. Jeder Versuch wurde im Doppelansatz durchgeführt und die Ergebnisse aus drei Versuchen (A bis C) gemittelt (D). Die Standardabweichung (Stabw) wurde mithilfe des Programms Excel errechnet. Gemessen wurden die Zellzahlen der unbehandelten Zellen (I 0) sowie 0,1µg/ml Insulin (I 0,1), 1µg/ml Insulin (I 1), 10µg/ml Insulin (I 10), 100µg/ml Insulin (I 100) sowie mit Mitomycin C (MMC) behandelten UCI-Zellen. Als Negativkontrolle diente hier zusätzlich Östradiol 5nM (E).

7.2. Gentoxizitätstests

7.2.1. Mikrokerninduktion

7.2.1.1. BG-1-Zellen

7.2.1.1.1. Mikrokerninduktion durch Östradiol

	A 1	A 2	A 3	B 1	B 2	B 3	C 1	C 2	C 3	D	Stabw
K	14	19	16	20	15	17	20	13	23	17	3,28
E 0	25	20	18	20	18	16	14	16	14	18	3,48
E 0,01	20	22	17	22	21	22	22	26	25	22	2,62
E 0,1	32	23	33	26	24	23	27	24	26	26	3,71
E 1	36	37	43	36	38	37	32	34	33	36	3,23
E 10	41	41	41	37	34	39	47	39	40	40	3,52
MMC	114	112	136	56	48	51	56	48	51	75	35,25

Tabelle 9 Mikrokerninduktion durch Östradiol. Unbehandelte Zellen (K), Lösungsmittelkontrolle (E 0), Östradiol 0,01 bis 10 nM. Dargestellt sind die Ergebnisse dreier von einander unabhängiger Versuche mit jeweils drei ausgezählten Objektträgern pro Testsubstanz (A bis C) und der Mittelwert dieser Ergebnisse (D). Als Positivkontrolle diente Mitomycin C (0,02µg/ml).

7.2.1.1.2. Mikrokerninduktion durch EGF, IGF und Insulin

7.2.1.1.2.1. EGF

	A 1	A 2	A 3	B 1	B 2	B 3	C 1	C 2	C 3	D	Stabw
EGF 0	17	19	20	16	22	17	16	21	19	19	2,19
EGF 0,1	24	24	18	22	25	17	23	28	24	23	3,42
EGF 1	25	28	33	34	31	36	29	27	31	30	3,54
EGF 10	34	41	33	33	33	47	33	34	35	36	4,88
EGF 100	29	43	31	28	20	31	35	40	34	32	6,78
MMC	76	78	78				44	56	54	64	14,83

Tabelle 10 Mikrokerninduktion durch EGF. Unbehandelte Kontrolle (EGF 0), EGF 0,1 bis 100ng/ml. Dargestellt sind die Ergebnisse dreier von einander unabhängiger Versuche mit jeweils drei ausgezählten Objektträgern pro Testsubstanz (A bis C) und der Mittelwert dieser Ergebnisse (D). Als Positivkontrolle diente Mitomycin C (0,02µg/ml).

7.2.1.1.2.2. IGF

	A 1	A 2	A 3	B 1	B 2	B 3	C 1	C 2	C 3	D	Stabw
IGF 0	27	27	21	25	27	25	20	19	21	24	3,28
IGF 0,1	28	28	30	25	32	32	22	28	25	28	3,35
IGF 1	31	34	32	30	29	32	27	28	36	31	2,87
IGF 10	37	32	28	32	39	37	32	33	36	34	3,46
IGF 100	45	42	44	35	46	46	47	41	47	44	3,87
MMC	56	48	51							52	4,04

Tabelle 11 Mikrokerninduktion durch IGF. Unbehandelte Kontrolle (IGF 0), IGF 0,1 bis 100ng/ml. Dargestellt sind die Ergebnisse dreier von einander unabhängiger Versuche mit jeweils drei ausgezählten Objektträgern pro Testsubstanz (A bis C) und der Mittelwert dieser Ergebnisse (D). Als Positivkontrolle diente Mitomycin C (0,02µg/ml).

7.2.1.1.2.3. Insulin

	A 1	A 2	A 3	B 1	B 2	B 3	C 1	C 2	C 3	D	Stabw
I 0	19	18	19	17	10	14	20	17	19	17	3,16
I 0,1	18	26	22	22	22	23	20	26	29	23	3,37
I 1	40	44	46	43	31	49	43	39	39	42	5,15
I 10	50	41	40	41	57	49	55	54	52	49	6,55
I 100	50	56	55	55	50	57	45	50	60	53	4,65
MMC	75	77	73							75	2,00

Tabelle 12 Mikrokerninduktion durch Insulin. Unbehandelte Kontrolle (I 0), Insulin 0,1 bis 100µg/ml. Dargestellt sind die Ergebnisse dreier von einander unabhängiger Versuche mit jeweils drei ausgezählten Objektträgern pro Testsubstanz (A bis C) und der Mittelwert dieser Ergebnisse (D). Als Positivkontrolle diente Mitomycin C (0,02µg/ml).

7.2.1.2. UCI-Zellen

7.2.1.2.1. EGF

	A 1	A 2	A 3	MW	Stabw
EGF 0	17	20	22	20	2,05
EGF 0,1	19	21	23	21	1,63
EGF 1	33	28	29	30	2,16
EGF 10	43	42	44	43	0,82
EGF 100	40	38	42	40	1,63
MMC	61	63	64	63	1,25

Tabelle 13 Dosisabhängige Mikrokerninduktion von UCI-Zellen mit EGF (0,1 bis 100ng/ml). Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (EGF 0), als Positivkontrolle diente Mitomycin C (0,02µg/ml).

7.2.1.2.2. IGF

	B 1	B 2	B 3	MW	Stabw
IGF 0	17	20	22	20	2,05
IGF 0,1	22	21	22	22	0,47
IGF 1	25	23	23	24	0,94
IGF 10	31	32	31	31	0,47
IGF 100	44	46	38	43	3,40
MMC	61	63	64	63	1,25

Tabelle 14 Dosisabhängige Mikrokerninduktion von UCI-Zellen mit IGF (0,1 bis 100ng/ml). Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (IGF 0), als Positivkontrolle diente Mitomycin C (0,02µg/ml).

7.2.1.2.3. Insulin

	C 1	C 2	C 3	MW	Stabw
I 0	27	25	23	25	2,00
I 0,1	25	23	21	23	2,00
I 1	28	26	32	29	3,06
I 10	35	37	43	38	4,16
I 100	46	38	49	42	5,66
MMC	63	63	63	63	0,00
E	26	21	28	24	3,54

Tabelle 15 Dosisabhängige Mikrokerninduktion von UCI-Zellen mit Insulin (0,1 bis 100µg/ml). Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle (I 0). Zusätzlich wurden 0,02µg/ml Mitomycin C (MMC) als Positivkontrolle verwendet, 5nM Östradiol (E) als Negativkontrolle.

7.2.2. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

	1	2	3	Mittelwert	Stabw
LK	18	22	21	20	1,70
Östradiol	58	52	51	54	3,09
K	23	26	22	24	1,70
Insulin	54	46	44	48	4,32
EGF	38	37	37	37	0,47
IGF	36	34	32	34	1,63
MMC	25	28	21	25	2,87
DES	63	64	65	64	0,82

Tabelle 16 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit CREST-Serum. Aufgeführt sind Daten von kinetochorpositiven Mikrokernen aus dreimal 100 ausgezählten Mikrokernen. Die Zellen wurden mit 10nM Östradiol (gelöst in DMSO), 100µg/ml Insulin, 100ng/ml IGF und 100ng/ml EGF behandelt. Lösungsmittelkontrolle (LK) entspricht 0,1% DMSO, Kontrolle (K) entspricht unbehandelten Zellen. Als Positivkontrolle dienen 5µg/ml DES, als Negativkontrolle 0,02µg/ml Mitomycin C (MMC).

7.3. Inhibierung der Zytokinese

7.3.1. BG-1-Zellen

	1	2	Mittelwert	Stabw
K	155800	158600	157200	1400,00
LK	163200	162700	162950	250,00
E 5nM	163400	153400	158400	5000,00
IGF 100	178700	185800	182250	3550,00
EGF 100	186400	202300	194350	7950,00
I 100	232000	247700	239850	7850,00
MMC	170000	144700	157350	12650,00

Tabelle 17 Zellzahlen nach Behandlung der BG-1-Zellen mit Cytochalasin B (2µg/ml) und verschiedenen Testsubstanzen (Östradiol 5nM, Insulin 100µg/ml, EGF 100ng/ml, IGF 100ng/ml). Lösungsmittelkontrolle (LK) behandelt mit 0,1% DMSO, Kontrolle (K) unbehandelt, Positivkontrolle Mitomycin C (MMC) 0,02µg/ml.

	einkernige	zweikernige	dreikernige	vierkernige	% DK	MW % DK	Stabw
K	686	308	17	9	30	32	2,32
	674	332	13	5	32		
	625	346	14	8	35		
IGF	513	504	22	17	48	48	0,79
	487	491	13	14	49		
	515	487	17	10	47		
EGF	565	427	13	8	42	46	3,14
	530	508	8	8	48		
	542	495	13	11	47		
Insulin	568	484	10	4	45	46	0,90
	545	494	8	5	47		
	541	489	7	4	47		
LK	617	364	14	6	36	37	0,43
	605	371	13	8	37		
	619	370	10	11	37		
Östradiol	481	516	14	13	50	49	1,60
	512	479	10	14	47		
	503	498	12	8	49		
MMC	674	312	12	10	31	31	1,04
	685	305	12	4	30		
	672	332	14	8	32		

Tabelle 18 Prozentualer Anteil der doppelkernigen Zellen nach Behandlung mit Cytochalasin B (2µg/ml) und verschiedenen Testsubstanzen (Östradiol 5nM, Insulin 100µg/ml, EGF 100ng/ml, IGF 100ng/ml). Lösungsmittelkontrolle (LK) behandelt mit 0,1% DMSO, Kontrolle (K) unbehandelt, Positivkontrolle Mitomycin C (MMC) 0,02µg/ml.

	MK/1000 DK	MW DK	Stabw	rel.MK/1000DK
K	96 92 94	94	2,00	1,00
IGF	147 145 156	149	5,86	1,59
EGF	152 144 146	147	4,16	1,57
Insulin	136 142 146	141	5,03	1,50
LK	98 102 103	101	2,65	1,07
Östradiol	148 156 155	153	4,36	1,63
MMC	173 164 172	170	4,93	1,80

Tabelle 19 Mikrokerne pro 1000 doppelkernigen Zellen (MK/1000DK), Mittelwert der Mikrokerne von drei unterschiedlichen Objektträgern mit je 1000 ausgezählten Zellen (MW DK), Standardabweichung (Stabw) und der relative Anteil der Mikrokerne bezogen auf die Kontrolle (K=1) nach Behandlung mit Cytochalasin B (2µg/ml) und verschiedenen Testsubstanzen (Östradiol 5nM, Insulin 100µg/ml, EGF 100ng/ml, IGF 100ng/ml). Lösungsmittelkontrolle (LK) behandelt mit 0,1% DMSO, Kontrolle (K) unbehandelt, Positivkontrolle Mitomycin C (MMC) 0,02µg/ml.

7.3.2. UCI-Zellen

	1	2	Mittelwert	Stabw
K	588700	596500	592600	3900,00
IGF 100	764300	767000	765650	1350,00
EGF 100	814300	793800	804050	10250,00
I 100	778400	758200	768300	10100,00
MMC	751800	743400	747600	4200,00

Tabelle 20 Zellzahlen nach Behandlung der UCI-Zellen mit Cytochalasin B (2µg/ml) und verschiedenen Testsubstanzen (Insulin 100µg/ml, EGF 100ng/ml, IGF 100ng/ml). Kontrolle (K) unbehandelt, Positivkontrolle Mitomycin C (MMC) 0,02µg/ml.

	einkernige	zweikernige	dreikernige	vierkernige	% DK	MW % DK	Stabw
K	490	471	34	17	47	48	1,28
	493	498	29	6	49		
	486	501	26	11	49		
IGF	358	656	23	13	62	62	1,31
	363	630	34	16	60		
	348	651	25	12	63		
EGF	383	597	25	13	59	59	0,57
	374	592	16	12	60		
	380	584	20	14	59		
Insulin	364	638	22	12	62	62	0,84
	360	647	15	11	63		
	374	631	21	9	61		
MMC	491	505	20	9	49	50	0,46
	483	497	16	9	49		
	487	512	15	7	50		

Tabelle 21 Prozentualer Anteil der doppelkernigen Zellen nach Behandlung mit Cytochalasin B (2µg/ml) und verschiedenen Testsubstanzen (Insulin 100µg/ml, EGF 100ng/ml, IGF 100ng/ml). Kontrolle (K) unbehandelt, Positivkontrolle Mitomycin C (MMC) 0,02µg/ml.

	MK/1000 DK	MW DK	Stabw	rel. MK/1000 DK
K	76	73	3,06	1
	70			
	72			
IGF	101	98	2,65	1,35
	96			
	97			
EGF	98	97	1,00	1,33
	96			
	97			
Insulin	103	100	2,52	1,38
	100			
	98			
MMC	97	122	31,22	1,68
	112			
	157			

Tabelle 22 Mikrokerne pro 1000 doppelkernigen Zellen (MK/1000DK), Mittelwert der Mikrokerne von drei unterschiedlichen Objektträgern mit je 1000 ausgezählten Zellen (MW DK), Standardabweichung (Stabw) und der relative Anteil der Mikrokerne bezogen auf die Kontrolle (K=1) nach Behandlung mit Cytochalasin B (2µg/ml) und verschiedenen Testsubstanzen (Insulin 100µg/ml, EGF 100ng/ml, IGF 100ng/ml). Kontrolle (K) unbehandelt, Positivkontrolle Mitomycin C (MMC) 0,02µg/ml.

7.4. Westernblot

7.4.1. Langzeitversuche

7.4.1.1. Östradiol

	Kontrolle	DMSO	Östradiol
0	64133	64133	64133
24	54200	54200	54200
96	184550	188950	254350
120	234800	169450	339150
144	269000	360650	614933
168	433850	428400	799700

Tabelle 23 Wachstumskinetik mit 5nM Östradiol behandelter BG-1-Zellen. Kontrolle unbehandelte Zellen, Lösungsmittelkontrolle DMSO 0,1%. Die Zellzahlen wurden mit dem Coulter-Counter zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt (0 bis 168 Stunden).

7.4.1.1.1. p53

7.4.1.1.1.1.p53wt

A

Zeit	LK	E
0	370	370
96	177	204
120	158	173
144	193	111
168	113	152

B

Zeit	LK	E
0	244	244
96	156	204
120	131	166
144	187	190
168	99	103

Tabelle 24 Mittlere OD-Werte der Expression von p53 wt der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit Lösungsmittel DMSO 0,1% (LK) und 5nM Östradiol (E) behandelt. Tabelle B gibt die unkorrigierten Werte wieder, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.1.1.1.2.p53mt

A

Zeit	LK	E
0	339	339
96	318	393
120	258	220
144	193	114
168	134	155

B

Zeit	LK	E
0	224	224
96	280	393
120	214	211
144	187	105
168	119	113

Tabelle 25 Mittlere OD-Werte der Expression von p53mt der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit Lösungsmittel DMSO 0,1% (LK) und 5nM Östradiol (E) behandelt. Tabelle B gibt die unkorrigierten Werte wieder, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.1.1.2. Cyclin B

A

Zeit	LK	E
0	400	400
96	209	337
120	267	324
144	325	247
168	130	104

B

Zeit	LK	E
0	298	298
96	184	337
120	222	311
144	315	227
168	116	76

Tabelle 26 Mittlere OD-Werte der Expression von Cyclin B der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit Lösungsmittel DMSO 0,1% (LK) und 5nM Östradiol (E) behandelt. Tabelle B gibt die unkorrigierten Werte wieder, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.1.1.3. Cyclin A

A

Zeit	LK	E
0	248	248
96	134	103
120	93	81
144	109	128
168	108	142

B

Zeit	LK	E
0	164	164
96	121	103
120	77	78
144	106	118
168	96	104

Tabelle 27 Mittlere OD-Werte der Expression von Cyclin A der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit Lösungsmittel DMSO 0,1% (LK) und 5nM Östradiol (E) behandelt. Tabelle B gibt die unkorrigierten Werte wieder, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.1.1.4. DNA-Polymerase δ **A**

Zeit	LK	E
0	391	391
96	171	340
120	214	57
144	253	275
168	244	272

B

Zeit	LK	E
0	332	332
96	82	262
120	195	39
144	253	264
168	196	196

Tabelle 28 Mittlere OD-Werte der Expression von DNA-Polymerase δ der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit Lösungsmittel DMSO 0,1% (LK) und 5nM Östradiol (E) behandelt. Tabelle B gibt die unkorrigierten Werte wieder, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.1.1.5. MSH2

A

Zeit	LK	E
0	111	111
96	108	142
120	100	110
144	113	143
168	162	157

B

Zeit	LK	E
0	94	94
96	52	109
120	91	75
144	113	137
168	128	113

Tabelle 29 Mittlere OD-Werte der Expression von MSH2 der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit Lösungsmittel DMSO 0,1% (LK) und 5nM Östradiol (E) behandelt. Tabelle B gibt die unkorrigierten Werte wieder, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.1.1.6. PCNA

A

Zeit	LK	E
0	192	192
96	73	75
120	65	80
144	66	77
168	72	171

B

Zeit	LK	E
0	163	163
96	35	35
120	59	54
144	66	74
168	57	123

Tabelle 30 Mittlere OD-Werte der Expression von PCNA der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit Lösungsmittel DMSO 0,1% (LK) und 5nM Östradiol (E) behandelt. Tabelle B gibt die unkorrigierten Werte wieder, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.1.2. IGF

Zeit	K	IGF
0	69400	69400
24	61766	61766
100	491000	770050
120	715450	1292250
144	1010050	1678800
168	1083050	2110900

Tabelle 31 Wachstumskinetik mit 50ng IGF behandelter BG-1-Zellen. Kontrolle unbehandelte Zellen. Die Zellzahlen wurden mit dem Coulter-Counter zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt (0 bis 168 Stunden).

7.4.1.2.1. p53

A

Zeit	K	IGF
0	217	217
96	83	98
120	220	276
144	349	339
168	325	308

B

Zeit	K	IGF
0	128	128
96	50	70
120	167	188
144	227	309
168	325	283

Tabelle 32 Mittlere OD-Werte der Expression von p53 der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit 50ng/ml IGF (IGF) behandelt, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (K). Tabelle B gibt die unkorrigierten Werte wieder, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.1.2.2. p21

A

Zeit	K	IGF
0	45	45
96	54	147
120	244	157
144	130	139
168	88	54

B

Zeit	K	IGF
0	62	62
96	67	175
120	244	227
144	189	211
168	138	80

Tabelle 33 Mittlere OD-Werte der Expression von p21 der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit 50ng/ml IGF (IGF) behandelt, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (K). Tabelle B gibt die unkorrigierten Werte wieder, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.1.2.3. cdk1/cdc2

A

Zeit	K	IGF
0	47	47
96	41	45
120	50	37
144	39	59
168	64	63

B

Zeit	K	IGF
0	80	80
96	69	64
120	66	54
144	60	65
168	64	69

Tabelle 34 Mittlere OD-Werte der Expression von cdk1/cdc2 der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit 50ng/ml IGF (IGF) behandelt, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (K). Tabelle B gibt die unkorrigierten Werte wieder, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.1.2.4. Cyclin D

A

Zeit	K	IGF
0	122	122
96	90	196
120	253	184
144	131	85
168	58	43

B

Zeit	K	IGF
0	167	167
96	113	233
120	253	266
144	190	129
168	91	63

Tabelle 35 Mittlere OD-Werte der Expression von Cyclin D der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit 50ng/ml IGF (IGF) behandelt, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (K). Tabelle B gibt die unkorrigierten Werte wieder, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.1.2.5. PCNA

A

Zeit	K	IGF
0	84	84
96	74	79
120	105	82
144	91	126
168	130	123

B

Zeit	K	IGF
0	142	142
96	123	111
120	138	120
144	140	139
168	130	138

Tabelle 36 Mittlere OD-Werte der Expression von PCNA der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit 50ng/ml IGF (IGF) behandelt, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (K). Tabelle B gibt die unkorrigierten Werte wieder, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.1.2.6. DNA-Polymerase δ **A**

Zeit	K	IGF
0	94	94
96	110	135
120	236	67
144	65	82
168	13	16

B

Zeit	K	IGF
0	159	159
96	269	218
120	311	99
144	100	90
168	13	17

Tabelle 37 Mittlere OD-Werte der Expression von DNA-Polymerase δ der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit 50ng/ml IGF (IGF) behandelt, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (K). Tabelle B gibt die unkorrigierten Werte wieder, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.1.2.7. MSH2

A

Zeit	K	IGF
0	85	85
96	104	150
120	116	76
144	66	88
168	83	75

B

Zeit	K	IGF
0	114	114
96	174	211
120	152	112
144	102	97
168	83	81

Tabelle 38 Mittlere OD-Werte der Expression von MSH2 der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit 50ng/ml IGF (IGF) behandelt, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (K). Tabelle B gibt die unkorrigierten Werte wieder, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.2. Kurzzeitversuche

7.4.2.1. Östradiol

Zeit	LK			Östradiol		
	I	II	MW	I	II	MW
24	45700	45400	45550	45700	45400	45550
26	43900	42200	43050	47200	44500	45850
28	44600	43200	43900	46400	40900	43650
30	48700	47100	47900	54500	51000	52750
32	48200	45300	46750	52100	57600	54850
48	70300	75000	72650	90700	84300	87500
168	313800	326400	320100	1468500	1508700	1488600

Tabelle 39 Wachstumskinetik mit 5nM Östradiol sowie mit 0,1%DMSO (LK) behandelter BG-1-Zellen. Die Zellzahlen wurden mit dem Coulter-Counter zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt (0 bis 168 Stunden). Dargestellt sind die Ergebnisse zweier von einander unabhängiger Testansätze (I und II) sowie deren Mittelwert (MW).

7.4.2.1.1. p53

A

Zeit	LK	E
24	43	43
28	30	130
32	35	94
48	156	79

B

Zeit	LK	E
24	53	53
28	40	137
32	64	119
48	158	93

Tabelle 40 Mittlere OD-Werte der Expression von p53 der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit 5nM Östradiol (E) behandelt, als Lösungsmittelkontrolle dienten mit 0,1% DMSO behandelte Zellen (LK). Tabelle B zeigt die unkorrigierten Werte, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.2.1.2. p21

A

Zeit	LK	E
24	83	83
28	87	171
32	81	183
48	210	150

B

Zeit	LK	E
24	103	103
28	114	180
32	147	231
48	212	176

Tabelle 41 Mittlere OD-Werte der Expression von p21 der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit 5nM Östradiol (E) behandelt, als Lösungsmittelkontrolle dienten mit 0,1% DMSO behandelte Zellen (LK). Tabelle B zeigt die unkorrigierten Werte, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.2.1.3. Cyclin D

A

Zeit	LK	E
24	118	118
28	132	242
32	72	133
48	172	173

B

Zeit	LK	E
24	146	146
28	174	255
32	131	168
48	174	204

Tabelle 42 Mittlere OD-Werte der Expression von Cyclin D der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit 5nM Östradiol (E) behandelt, als Lösungsmittelkontrolle dienten mit 0,1% DMSO behandelte Zellen (LK). Tabelle B zeigt die unkorrigierten Werte, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.2.1.4. MSH2

A

Zeit	LK	E
24	64	64
28	135	196
32	86	138
48	207	122

B

Zeit	LK	E
24	79	79
28	178	206
32	156	175
48	209	143

Tabelle 43 Mittlere OD-Werte der Expression von MSH2 der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit 5nM Östradiol (E) behandelt, als Lösungsmittelkontrolle dienten mit 0,1% DMSO behandelte Zellen (LK). Tabelle B zeigt die unkorrigierten Werte, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.2.1.5. PCNA

A

Zeit	LK	E
24	109	109
28	171	221
32	87	198
48	252	145

B

Zeit	LK	E
24	134	134
28	225	233
32	159	251
48	255	170

Tabelle 44 Mittlere OD-Werte der Expression von PCNA der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit 5nM Östradiol (E) behandelt, als Lösungsmittelkontrolle dienten mit 0,1% DMSO behandelte Zellen (LK). Tabelle B zeigt die unkorrigierten Werte, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.2.2. Insulin

Zeit	K			Insulin		
	I	II	MW	I	II	MW
24	202800	216000	209400	202800	216000	209400
26	113700	118700	116200	247400	267700	257550
28	206300	227800	217050	301600	298700	300150
30	273900	283400	278650	367100	367100	367100
32	23800	258300	141050	323500	332800	328150
48	371900	389300	380600	477800	479900	478850
168	484400	545500	514950	1638300	1653500	1645900

Tabelle 45 Wachstumskinetik mit 100µg/ml Insulin sowie unbehandelter (K) BG-1-Zellen. Die Zellzahlen wurden mit dem Coulter-Counter zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt (0 bis 168 Stunden). Dargestellt sind die Ergebnisse zweier von einander unabhängiger Testansätze (I und II) sowie deren Mittelwert (MW).

7.4.2.2.1. p53 PCNA

A

Zeit	K	I
24	231	231
28	135	261
32	103	62
48	69	135

B

Zeit	K	I
24	265	265
28	177	261
32	188	160
48	203	277

Tabelle 46 Mittlere OD-Werte der Expression von p53 der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit 100µg/ml Insulin (I) behandelt, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (K). Tabelle B zeigt die unkorrigierten Werte, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.2.2.2. p21

A

Zeit	K	I
24	171	171
28	121	266
32	77	51
48	55	90

B

Zeit	K	I
24	197	197
28	159	266
32	139	130
48	162	183

Tabelle 47 Mittlere OD-Werte der Expression von p21 der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit 100µg/ml Insulin (I) behandelt, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (K). Tabelle B zeigt die unkorrigierten Werte, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.2.2.3. Cyclin D

A

Zeit	K	I
24	108	108
28	59	148
32	43	28
48	30	68

B

Zeit	K	I
24	124	124
28	77	148
32	79	72
48	87	138

Tabelle 48 Mittlere OD-Werte der Expression von Cyclin D der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit 100µg/ml Insulin (I) behandelt, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (K). Tabelle B zeigt die unkorrigierten Werte, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.2.2.4. MSH2

A

Zeit	K	I
24	294	294
28	193	331
32	134	106
48	62	147

B

Zeit	K	I
24	338	338
28	254	331
32	244	272
48	181	299

Tabelle 49 Mittlere OD-Werte der Expression von MSH2 der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit 100µg/ml Insulin (I) behandelt, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (K). Tabelle B zeigt die unkorrigierten Werte, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.4.2.2.5. PCNA

A

Zeit	K	I
24	218	218
28	127	282
32	81	47
48	54	144

B

Zeit	K	I
24	251	251
28	167	282
32	147	120
48	159	294

Tabelle 50 Mittlere OD-Werte der Expression von PCNA der zu den angegebenen Zeitpunkten geernteten BG-1 Zellen. Die Zellen wurden mit 100µg/ml Insulin (I) behandelt, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (K). Tabelle B zeigt die unkorrigierten Werte, Tabelle A die mit den OD-Werten der zugehörigen α -Tubulin-Kontrolle korrigierten Werte.

7.5. Zellzyklusanalysen

7.5.1. IGF

Zeit	K	MW	Stabw	IGF	MW	Stabw
96	50	50	0	70	65	5
	50			60		
120	610	610	0	810	675	135
	610			540		
144	960	860	100	500	645	145
	760			790		
168	800	755	45	1230	1625	395
	710			2020		

Tabelle 51 Wachstum von BG-1 Zellen nach Behandlung mit IGF 100 ng/ml (IGF) sowie unbehandelter Zellen (K). Dargestellt sind die Werte zweier von einander unabhängiger Testansätze, deren Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (Stabw).

Zeit [h]	Phasenanteile [%]					
	K G1/G0	S	G2/M	IGF G1/G0	S	G2/M
96 I	45,5	54,5	0	49,44	50,56	0
II	10,84	89,16	0	24,7	75,3	0
MW	28,17	71,83	0	37,07	62,93	0
120 I	48,09	51,91	0	45,44	54,56	0
II	17,6	82,4	0	77,13	21,32	1,55
MW	32,845	67,155	0	61,285	37,94	0,775
144 I	26,22	73,33	0,44	83,72	0	16,28
II	80,84	3,22	15,94	28,46	71,54	0
MW	53,53	38,275	8,19	56,09	35,77	8,14
168 I	77,98	14,82	7,2	35,5	54,49	10,01
II	19,67	79,15	1,19	11,35	83,27	5,38
MW	48,825	46,985	4,195	23,425	68,88	7,695

Tabelle 52 Zellzyklusanteile unbehandelter (K) sowie mit 100ng/ml IGF behandelter (IGF) BG-1-Zellen. Dargestellt sind die Anteile an G1/G0, S und G2/M-Phase zu verschiedenen Zeitpunkten (96 bis 168 Stunden) zweier unabhängiger Testansätze sowie deren Mittelwert (MW).

7.5.2. EGF

Hier angefügt sind die Daten zu Wachstum und Zellzyklusanteilen von mit 100ng/ml EGF stimulierten BG-1-Zellen, die allerdings aufgrund zu geringer Aussagekraft nicht im Ergebnisteil erwähnt werden.

Zeit	K	Mittelwert	Stabw	EGF	Mittelwert	Stabw
96	50 50	50	0	10 80	45	35
120	610 610	610	0	500 680	590	90
144	960 760	860	100	490 1080	785	295
168	800 710	755	45	1870 1540	1705	165

Tabelle 53 Wachstum von BG-1 Zellen nach Behandlung mit EGF 100 ng/ml (EGF) sowie unbehandelter Zellen (K). Dargestellt sind die Werte zweier von einander unabhängiger Testansätze, deren Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (Stabw).

Zeit [h]	Phasenanteile [%]					
	LK G1/G0	S	G2/M	EGF G1/G0	S	G2/M
96 I	45,5	54,5	0	84,19	5,06	10,74
II	10,84	89,16	0			
MW	28,17	71,83	0	84,19	5,06	10,74
120 I	48,09	51,91	0	38,48	61,52	0
II	17,6	82,4	0	55,91	44,09	0
MW	32,845	67,155	0	47,195	52,805	0
144 I	26,22	73,33	0,44	78,14	12,95	8,91
II	80,84	3,22	15,94			
MW	53,53	38,275	8,19	78,14	12,95	8,91
168 I	77,98	14,82	7,2	16,95	83,05	0
II	19,67	79,15	1,19	68,92	10,81	20,27
MW	48,825	46,985	4,195	42,935	46,93	10,135

Tabelle 54 Zellzyklusanteile unbehandelter (K) sowie mit 100ng/ml EGF behandelter (EGF) BG-1-Zellen. Dargestellt sind die Anteile an G1/G0, S und G2/M-Phase zu verschiedenen Zeitpunkten (96 bis 168 Stunden) zweier unabhängiger Testansätze sowie deren Mittelwert (MW).

7.5.3. Östradiol und Insulin

Hier werden die Messungen von mit Östradiol bzw. Insulin behandelten BG-1-Zellen aufgeführt. Wie aus den Zahlen der Wachstumskurven hervorgeht, zeigten die Zellen zu Ende des Versuches keinen proliferationssteigernden Effekt der Substanzen, weswegen die Daten im Ergebnisteil nicht dargestellt wurden.

7.5.3.1. Östradiol

Zeit	LK	MW	Stabw	E	MW	Stabw
96	190	165	25	120	225	105
	140			330		
120	370	370	0	790	650	140
	370			510		
144	970	825	145	530	605	75
	680			680		
168	640	585	55	1020	835	185
	530			650		

Tabelle 55 Wachstum von BG-1 Zellen nach Behandlung mit 5nM Östradiol (E) sowie mit 0,1% DMSO behandelten Zellen (LK). Dargestellt sind die Werte zweier von einander unabhängiger Testansätze, deren Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (Stabw).

Zeit [h]	Phasenanteile [%]						
	LK			E			
	G1/G0	S	G2/M	G1/G0	S	G2/M	
96 I		21,9	73,3	4,81	52,68	39,88	7,44
II		44,69	52,56	2,75	35,86	59,21	4,94
MW		33,295	62,93	3,78	44,27	49,545	6,19
120 I		26,73	69,07	4,2	62,75	36,68	0,57
II		20,76	79,24	0	71,44	28,56	0
MW		23,745	74,155	2,1	67,095	32,62	0,285
144 I		57,25	24,5	10,19	40,78	49,2	10,02
II		40,26	9,04	50,7	8,93	91,07	0
MW		48,755	16,77	30,445	24,855	70,135	5,01
168 I		29,79	66,97	3,24	33,26	56,47	10,27
II		21,25	67,43	11,32	27,79	71,35	0,86
MW		25,52	67,2	7,28	30,525	63,91	5,565

Tabelle 56 Zellzyklusanteile mit 0,1% DMSO behandelter (LK) sowie mit 5nM Östradiol behandelter (E) BG-1-Zellen. Dargestellt sind die Anteile an G1/G0, S und G2/M-Phase zu verschiedenen Zeitpunkten (96 bis 168 Stunden) zweier unabhängiger Testansätze sowie deren Mittelwert (MW).

7.5.3.2. Insulin

Zeit	K	MW	Stabw	I	MW	Stabw
96		100			210	
		100		0	280	35
120		620	815	195	680	35
		1010			610	
144		750	775	25	445	127,5
		800			700	

Tabelle 57 Wachstum von BG-1 Zellen nach Behandlung mit 50µg/ml Insulin (I) sowie unbehauelter Zellen (K). Dargestellt sind die Werte zweier von einander unabhängiger Testansätze, deren Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (Stabw).

Zeit [h]	Phasenanteile [%]						
	LK			I			
	G1/G0	S	G2/M	G1/G0	S	G2/M	
96 I		72,41	23,55	4,04	59,97	32,44	7,59
II		19,53	80,47	0	74,39	14,73	10,88
MW		45,97	52,01	2,02	67,18	23,585	9,235
120 I		21,56	71,7	6,74	59,88	40,12	0
II		31,34	67,4	1,26	33,45	66,55	0
MW		26,45	69,55	4	46,665	53,335	0
144 I		20,57	77,53	1,9	38,97	53,23	7,81
II		20,51	79,49	0	24,54	72,38	3,08
MW		20,54	78,51	0,95	31,755	62,805	5,445

Tabelle 58 Zellzyklusanteile unbehauelter (K) sowie mit 50µg/ml Insulin behauelter (I) BG-1-Zellen. Dargestellt sind die Anteile an G1/G0, S und G2/M-Phase zu verschiedenen Zeitpunkten (96 bis 168 Stunden) zweier unabhängiger Testansätze sowie deren Mittelwert (MW).

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bedanken:

Bei Frau Prof. Dr. Stopper für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die gute Betreuung der Arbeit.

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Fischer für die Übernahme des Koreferats und die große und wertvolle Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit.

Bei Frau Elisabeth Rüb-Spiegel und Frau Elisabeth Stein, die mich tatkräftig unterstützten und ohne die diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen wäre.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Stopper und Fischer für die kollegiale und freundliche Atmosphäre und ihre Unterstützung.

Bei meiner Familie und meinem Freund, die mir nicht nur in der Zeit der Dissertation Hilfe und Motivation waren.

Lebenslauf

Britta Birgit Semmel

Geboren am 17. Mai 1979 in Aschaffenburg

Eltern: Bernd Semmel, Schulrat

Edith Semmel, geb. Michel, Lehrerin

Schulbildung

1985-1989

1989-1998

Grundschule Hösbach

Maria-Ward-Gymnasium Aschaffenburg

Abitur im Mai 1998

Hochschulbildung

Nov. 1998 – Sept. 2000

Okt. 2000 – Apr. 2004

Seit Juli 2005

Vorklinisches Studium an der Universität Würzburg

Klinisches Studium an der Universität Würzburg

Assistenzärztin im Juliusspital Würzburg, Klinik für Innere

Medizin, Abteilung für Kardiologie