

Aus der chirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
(Chirurgische Klinik I)  
Direktor: Prof. Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede

**Untersuchung des Einflusses von Dichlorvinylcystein auf den Zellzyklus in  
LLC-PK1 Zellen unter besonderer Berücksichtigung von Wachstumsfaktoren**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Avraam Mastorakis  
aus Athen, Griechenland

Würzburg, Mai 2006

Referent: Prof. Dr. Ana Maria Waaga-Gasser

Koreferent: Prof. Dr. med. M. Böck

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 14.08.2006

Der Promovend ist Arzt:

**Für meine Eltern**



# Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Aktuelle Kenntnisstand über die Nephrotoxizität und Nephrokanzerogenität polychlorierter aliphatischer Kohlenwasserstoffe und deren Einfluß in der Entstehung der Nierentumoren	2
2.1. Zytotoxische und gentoxische Wirkungen von S-(1,2-dichlorvinyl)-L-Cystein (DCVC) in Nierenzellen	6
1.3. Wachstumsfaktoren	7
1.3.1. Transforming Growth Factor $\beta$ (TGF $\beta$ )	9
1.3.2. Proliferating Cell Nuklear Antigen (PCNA)	11
1.4. Zielsetzung der Arbeit	14
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1. Reagenzien	15
2.2. Zellkultur	15
2.3. Etablierung von Klonen	15
2.4. Zellzahl-Bestimmung	16
2.5. DNA-Bestimmung	16
2.6. Glukose-Transport	17
2.7. c-fos-Expression	17
2.8. Antikörpernachweis der Wachstumsfaktoren	18
2.8.1. Testsubstanzen und Lösungen	18
2.8.2. Geräte	19
2.9. Färbung	19
2.9.1. Prinzip	19
2.9.2. Vorgang	20

2.10.	Mikroskopieren	22
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>24</b>
3.1.	Zellzahlbestimmung in Wildtyp- und DCVC-Klonen	24
3.2.	DNA-Gehalt in Wildtyp- und DCVC-Klonen	24
3.3.	Aufnahme von $\alpha$ -Methylglukose	25
3.4.	Expression von c-fos	26
3.5.	Expression von TGF $\beta$ in Wildtyp-Klonen	27
3.6.	Expression von TGF $\beta$ in DCVC-Klonen	29
3.7.	Expression von TGF $\beta$ in Wildtyp- und DCVC-Klonen	30
3.8.	Expression von PCNA in Wildtyp-Klonen	32
3.9.	Expression von PCNA in DCVC-Klonen	33
3.10.	Expression von PCNA in Wildtyp- und DCVC-Klonen	35
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>37</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>42</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>44</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>52</b>

## 1. EINLEITUNG

Das Nierenzellkarzinom, ein maligner epithelialer Tumor des Nierenparenchyms, ist mit einem Anteil von über 80% der häufigste maligne Tumor der Niere und macht ca. 1-2% aller bösartigen Tumoren überhaupt aus (1). Epidemiologische Daten zur Situation des Nierenzellkarzinoms in Deutschland liegen bis heute nur bruchstückhaft vor. Nach dem Saarländischen Tumorregister betrug die Inzidenz für das Nierenzellkarzinom (ICD 189.0) 1987 für Männer 12,6 und für Frauen 8,6/100.000; für die alten Bundesländer war zu diesem Zeitpunkt mit etwa 8.000 Neuerkrankungen pro Jahr bei steigender Tendenz zu rechnen (2). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt im siebten Lebensjahrzehnt. Männer befällt dieses Krebsleiden doppelt so häufig wie Frauen. Die Ätiologie des Nierenzellkarzinomes ist nicht gesichert, diskutiert werden heute u.a. hormonelle Einflüsse, Schwermetallbelastung (z.B. Cadmium, Blei), starker Tabakkonsum, vernarbende Prozesse der Niere sowie Virusinfektionen oder genetische Einflüsse (3). Das Bemühen um ein Verständnis für die Ätiologie hat zur Aufdeckung einer Vielzahl von Phänomenen geführt, die auf verschiedenen Ebenen eine Rolle in der Kanzenrogenese spielen. Vorgänge auf Kernebene, immunologische Zusammenhänge, Zell-Zell-Interaktionssysteme, biochemische Marker und molekularbiologische Ereignisse werden erfasst, analysiert und quantifiziert in der Hoffnung, das maligne Potenzial des Tumors oder seiner Metastasen besser beschreiben zu können (Tabelle 1).

Abb. 1: Auswahl aktueller Prognoseparameter des Nierenzellkarzinoms

- DNA-Gehalt (Ploidie, S-Fraktion)
- Proliferationsmarker (PCNA, KI-67, MIB-1 u.a.)
- Angiogenesefaktoren (VEGF, b-FGF, EGF, HGF, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , 'microvessel density' u.a.)
- Zelladhäsion (CD44, E-Cadherin, N-CAM u.a.)
- Onkogene (MET, bcl-2, c-erb-2/-3/-4, c-myc, c-fos, ras u.a.)
- Tumorsuppressorgene (p53, NM23, RB, p16, p21 u.a.)
- Andere (Metalloproteinasen, Ferritin, Nephrokalzinin, Ganglioside, Aminopeptidase, Chromogranin, Pankreastatin, Serotonin, oxidativer Stress, uPAR, CK-2, CA-125 u.a.)

## 1.1. Aktueller Kenntnisstand über die Nephrotoxizität und Nephrokancerogenität polychlorierter aliphatischer Kohlenwasserstoffe und deren Einfluss in der Entstehung der Nierentumoren

Einige chlorierte Alkene, wie z.B. Tri- und Tetrachlorethylen, Hexachlorbutadien und das Alkin Dichloracetylen wirken toxisch auf die Nieren und es wurde beobachtet, dass sie eine wichtige Rolle bei der signifikanten Zunahme der Inzidenz von Adenokarzinomen in proximalen Nierentubuluszellen bei Ratten spielen. Die Induktion von Nierentumoren wird durch mehrmalige Dosen ausgelöst, die gleichzeitig ausgeprägte, unspezifisch nephrotoxische Effekte verursachen (4-8).

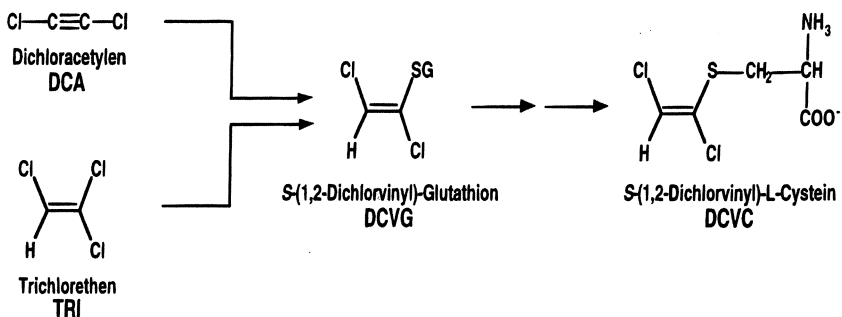


Abb. 2 Struktur, chemische Bezeichnung und verwendete Abkürzungen der in der vorliegenden Arbeit vorkommenden polyhalogenierten Alkene und ihrer S-Konjugate.

Trichlorethylen (TRI) und Tetrachlorethylen (TETRA) werden aufgrund ihrer Eigenschaften als Lösungs- und Entfettungsmittel verwendet und deshalb industriell in großen Mengen hergestellt. Die oben genannten Substanzen, sowie Hexachlorbutadien (HCBDB), welches bei deren Herstellung entsteht, sind stabile Verbindungen.

Sie sind verantwortlich für die Grundwasser- und Luftverschmutzung. Insbesondere die Entdeckung der Nephrotoxizität und Nephrokancerogenität im Tier hat für den Menschen eine sehr große Bedeutung, da er sehr stark der Exposition dieser polyhalogenierten Alke-



nen ausgesetzt ist. Dies hat in großem Maße zur Aufklärung des für die Organspezifität wichtigen Bioaktivierungsweges beigetragen.

Die Erklärung des nephrokanzerogenen Effektes lässt sich nicht durch die Aktivierung von TRI und TETRA über Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenasen in der Leber finden (9). Die elektrophilen Zwischenstufen (Oxirane, halogenierte Aldehyde und Säurechloride) werden sehr schnell durch weitere Reaktionen deaktiviert:

1. Umlagerung des Oxirans zu Säurechloriden oder chlorierten Aldehyden;
2. nachfolgende Hydrolyse des Säurechlorids zu der entsprechenden Carbonsäure;
3. Oxidation bzw. Reduktion des Aldehyds;
4. Reaktion mit Membranphospholipiden.

Die in der Leber gebildeten Metabolite spielen bei den extrahepatischen Effekten keine Rolle, weil sie eine kurze Halbwertszeit in biologischen Systemen besitzen. Ein weiterer Grund hierfür ist, dass die Konzentration von Cytochrom P-450 in der Niere wesentlich geringer als in der Leber ist.

Die Entdeckung, dass keine oxidative Verstoffwechslung des nephrotoxisch und nephrokanzerogen wirkenden Hexachlorbutadien (HCBd) stattfindet (10), widerspricht ebenso der Bedeutung des oxidativen Metabolismus für die nierenspezifischen Effekte.

Der mehrstufige hepatorenale Bioaktivierungs- und Transportweg spielt die verantwortliche Rolle für die Organotropie der polyhalogenierten Haloalkene. Dieser Biomechanismus wird durch die Konjugation der Ausgangsverbindungen mit Glutathion (GSH) in der Leber ausgelöst.

Normalerweise führt die GSH-Konjugation zu einer Entgiftung der Substanzen, die der Leber zugeführt werden. In diesem Falle kommt es jedoch zu einer Toxifizierung der Ausgangssubstanz.

Nun soll dieser Bioaktivierungsweg am Beispiel von Dichloracetylen (DCA) und TRI im Folgenden erläutert werden; die Bioaktivierung von TETRA und HCBd verläuft ähnlich.

Die Verbindungen DCA und TRI werden katalysiert und dadurch entsteht das S-(1,2-Dichlorvinyl)-Glutathion (DCVG). Die GSH S-Transferase ist an dieser Reaktion als Enzym beteiligt.

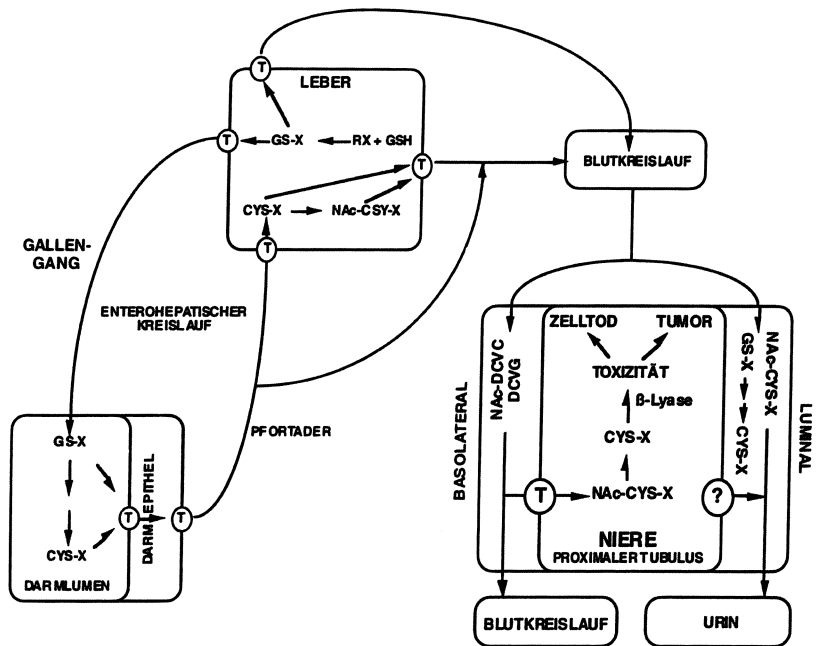


Abb. 3: Hepatorenaler Transport und sequentielle Biotransformation von polyhalogenierten Alkenen über den "Merkaptursäurestoffwechsel  $\beta$ -Lyase" Bioaktivierungsweg. RX = Polyhalogeniertes Alken, GS-X = Haloalkenylglutathion S-Konjugat, CS-X = Haloalkenylcystein S-Konjugat, NAc-Cys-X = Haloalkenylmerkaptursäure.

Das gebildete Glutathionkonjugat wird auf direktem Wege oder durch biliäre Ausscheidung und Reabsorption aus dem Dünndarm zur Niere transportiert (Abb. 3). Das in der Leber gebildete DCVG wird auf dem hepatorealen Transportweg durch die  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase und Dipeptidasen der Gallengangsepithelzellen teilweise zum S-(1,2-Dichlorvinyl)-L-Cystein (DCVC) abgebaut (11). Das Erreichen der proximalen Tubuluszellen der Nieren durch DCVG und DCVC erfolgt sowohl von luminaler Seite nach glomerulärer Filtration, als auch von basolateraler Seite mit peritubulärem Blutkreislauf. Gemeinsam ist beiden Fällen der Abbaumechanismus von DCVG: die  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase und Dipeptidasen, die in der proximalen Tubuluszellen sehr hohe Aktivitäten aufweisen (12) metabolisieren das Glutathionkonjugat (DCVG) zum Cystein-konjugat.

Um die wichtige physiologische Aufgabe der Rückgewinnung glomerulär filtrierter Aminosäuren und kleiner Peptiden zu erfüllen, verfügen die proximalen Tubuluszellen über sehr effiziente Transportsysteme für Aminosäuren und Aminosäurederivate. Diese Transportsysteme sind verantwortlich für die Konzentrierung von DCVC in den proximalen Tubuluszellen. In diesem Abschnitt des Nephrons wird DCVC mit dem Urin als zum Teil acetylierte Mercaptursäure ausgeschieden (Detoxifizierung, Abb. 4).

Wegen der Substituentenstruktur ist DCVC auch ein Substrat für die  $\beta$ -Lyase (13, 14). Die

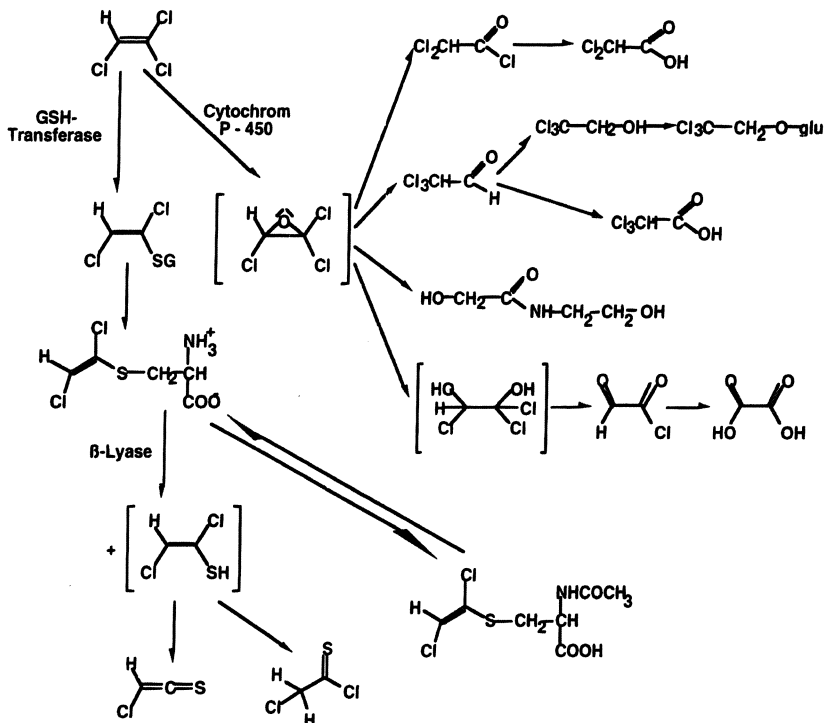


Abb. 4: Glutathionabhängige und oxidative metabolische Aktivierung von Trichlorethen im Säuger.

$\beta$ -Lyase ist in den Mitochondrien und im Zytosol der proximalen Tubuluszellen in hohen Konzentrationen zu finden und ist ein pyridoxalphosphatabhängiges Enzym des Intermediärstoffwechsels. Folgende Verbindungen werden von der  $\beta$ -Lyasekatalysierten Spaltung

des DCVC produziert: Pyruvat, Ammoniak und ein reaktives Thiolat (Abb 4.). Die Umwandlung des Thiolats in Thiocarbonsäurechlorid erfolgt durch intramolekulare Umlagerung in das entsprechende Thioketen durch spontan ablaufende Chlorwasserstoffeliminierung (11, 15-17).

Thioketen und Thiokarbonsäurechlorid sind reaktive Spezies, die in der Lage sind, mit Proteinen und Nukleinsäuren zu reagieren und daher das Potential einer nephrotoxischen und nephrokanzerogenen Wirkung besitzen.

Zum einen spielt die enzymatische Ausstattung der proximalen Tubulussegmente mit hohen Aktivitäten von  $\gamma$ -Glutamyltranspeptids und  $\beta$ -Lyase eine große Rolle für die organotrope Wirkung der halogenierten Alkene und zum anderen auch die Fähigkeit der proximalen Tubuluszellen, Aminosäurederivate zu konzentrieren.

## **1.2. Zytotoxische und gentoxische Wirkungen von S-(1,2-dichlorvinyl)-L-Cystein (DCVC) in Nierenzellen**

DCVC wirkt in den permanenten, sehr gut charakterisierten Schweinenierenzelllinien LLC-PK1 gentoxisch.

LLC-PK1 Zellen weisen in Kultur viele biochemische und morphologische Charakteristika der proximalen Tubulusepithelzellen der Niere auf (18, 19).

Diese Zellen verfügen über  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase und  $\beta$ -Lyase-Aktivitäten (20).

Die beiden letztgenannten Punkte spiegeln den Grund für die Eignung als nahe stehendes Zellkultursystem für die Untersuchung der gentoxischen und allgemein zytotoxischen Wirkungsmechanismen von DCVC wider. Nach Exposition der LLC-PK1 Zellen gegenüber DCVC wurde eine erhöhte Rate an DNA-Reparatur nachgewiesen (21, 22).

Die Induktion von DNA-Reparatur wurde in einem sehr schmalen Konzentrationsbereich beobachtet, weil schon geringfügig höhere DCVC-Konzentrationen den gentoxischen Effekt durch die Induktion allgemeiner, unspezifischer Zytotoxizität und Zelltod überlagert wurde.

Als regulatorischer Mechanismus der durch DCVC induzierten Zytotoxizität erweist sich die Veränderung der zellulären Kalziumhomöostase. Die DCVC exponierten LLC-PK1 Zellen weisen eine deutliche Beeinträchtigung der mitochondrialen Kalziumspeicherkapazität auf. Wenn den LLC-PK1 Zellen Cysteinonjugat appliziert wird, werden darauf folgend erhöhte zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen detektiert (23).

Die erhöhte Kalzium-Konzentration hat als Folge die Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Phospholipasen und Proteasen, die ihrerseits zu einer Beeinträchtigung der Zellmembranintegrität und Organisation des Zytoskeletts führt (24).

Kalziumabhängige Prozesse, die für kanzerogene Substanzen ausschlaggebend sind, werden im Folgenden beschrieben:

1. Die Aktivierung kalziumabhängiger Endonukleasen induziert erhöhte DNA-Doppelstrangbruchraten (25, 26), die zum einen direkt in die Abläufe der Genexpression eingreifen und zum anderen eine vermehrte Poly(ADP-Ribosyl)ierung verursachen können.
2. Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung stellt eine posttranslationale Modifikation von nuklearen Proteinen dar (27). Diese Proteinmodifikation wird als primär epigenetischer Mechanismus der Modulation der Genexpression angesehen. Der Grund dafür ist die induzierte Modulation DNA-bindender und –nicht bindender Proteine und die daraus resultierende Veränderung der DNA Konformation.
3. Kalzium spielt eine übergeordnete Rolle durch die Aktivierung der Proteinkinase (PK), der PKC und/oder cAMP-abhängigen PK und durch die daraus folgende Phosphorylierung regulatorischer DNA-bindender Proteine bei der Genexpression (28, 29).

Hiermit wird deutlich, dass außer den direkten genotoxischen Effekten von DCVC auch kalziumabhängige Mechanismen durch verändertes Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Tubuluszellen für die maligne Transformation verantwortlich gemacht werden können.

### **1.3. Wachstumsfaktoren**

In der letzten Zeit wurden 20 verschiedene Peptide mit stimulierenden und inhibierenden Effekten auf die Proliferation von epithelialen und mesenchymalen Zellen identifiziert. Diese Wachstumsfaktoren wurden generell nach ihrer biologischen Aktivität benannt, außerdem wurde klar, dass Polypeptide wie EGF (epidermal growth factor), IGF-1 und IGF-2 (insulin-like growth factor), transforming growth factor ( $\text{TGF } \alpha$ ,  $\text{TGF } \beta$ ), platelet derived

growth factor (PDGF), fibroblast und heparinbinding growth factor ( $\alpha$ FGF, BDGF) multifokale Stoffe sind. Zusätzlich zur Stimulation und Inhibierung der Proliferation von Zellen und Aufrechterhaltung ihrer Lebensfähigkeit haben Wachstumsfaktoren auch eine signifikante Rolle in der Embryogenese, Differenzierung, Chemotaxis, beim Flüssigkeitstransport und in der Geweberegeneration. Von besonderem Interesse erscheint die Rolle dieser Faktoren bei der neoplastischen Transformation und verschiedenen Formen von zellproliferativen Krankheitsstadien. Die Genstruktur, cDNA-Struktur und die komplette Aminosäuresequenz der verschiedenen Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren sind zum größten Teil beschrieben.

Wachstumsfaktoren regulieren die Genexpression in ihrer Targetzellen. Zwei Klassen von Genen wurden beschrieben: zum einen Gene, die generell Komponenten vom Wachstumsfaktoren sind, zum anderen Gene, die für eine charakteristische Zelllinie sind spezifische Stadien der Differenzierung verantwortlich sind. Der initiale Teil der Wachstumsfaktoren bindet an einen speziellen Rezeptor, der in der äußeren Zellmembran lokalisiert ist. Die Rezeptoren von EGF, TGF $\alpha$ , IGF-1 und PDGF sind tyrosinspezifische Proteinkinasen, ebenso zeigt der FGF-Rezeptor tyrosinspezifische Kinaseaktivität. Der IGF-2-Rezeptor besitzt diese Kinaseaktivität nicht, auch ist der Wirkungsmechanismus der Rezeptoren von TGF  $\beta$  und FGF noch nicht aufgeklärt.

Die Bindung der Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren induziert eine Freisetzung eines intrazellulären "second messenger's", der seinerseits ein Signal zum Nukleus weitergibt. Die „second messengers“ können Phosphoproteine, Inositolphosphate, Diacylglycerol, zyklische Nukleotide oder spezifische Ionen sein.

Schon kurze Zeit nach Bindung des Wachstumsfaktor-Rezeptorkomplexes konnten Änderungen in der Genexpression gefunden werden.

Die Affinität eines Wachstumsfaktors hängt auch von der An- oder Abwesenheit anderer Faktoren oder der Cytokinproduktion ab. Auch kann der Rezeptor für ein spezifisches Peptid in seiner Verteilung oder Bindungsaffinität einem zweiten Wachstumsfaktor zugänglich sein. So stimuliert TGF  $\beta$  *in vitro* das Wachstum von Fibroblasten in Anwesenheit von PDGF, aber inhibiert es in Anwesenheit von EGF. Die Aktivierung von PDGF-Rezeptoren kann die Affinität von EGF-Rezeptoren für seine Liganden reduzieren.

### 1.3.1. Transforming Growth Factor $\beta$ (TGF $\beta$ )

Der Wachstumsfaktor TGF  $\beta$  stellt ein regulatorisches Molekül dar, das eine entscheidende Rolle (direkt oder indirekt) bei der Tumorentstehung und Metastasierung spielt (30). Der direkte, transzelluläre Mechanismus wurde schon oben beschrieben. Die indirekte Wirkung stellt sich als Folge von Änderungen im extrazellulären Matrixraum oder in der Cytokinproduktion dar.

Obwohl bestimmte Wachstumsfaktoren als systemische Wirkstoffe frei zirkulierend zu finden sind, werden sie nur in spezifischen Geweben synthetisiert, wo sie durch autokrine oder parakrine Mechanismen lokal wirken können.

Während der Embryogenese wird das TGF  $\beta$  von allen Geweben synthetisiert. Beim Menschen wird es in großen Mengen in  $\alpha$ -Granulozyten (31). Im Knochenmark und in anderen intestinalen Geweben gebildet (32, 33), auch konnte TGF $\beta$  in Myo-, Osteo-, Chondroblasten und Zellen, die an der Hämatopoese beteiligt sind, nachgewiesen werden. Zelltypen, deren spezielle Funktionen vom TGF $\beta$  reguliert werden, sind Lymphozyten und hormonbildende Zellen (Adrenocorticoidbildende Zellen und Pituitäszellen).

Zur TGF  $\beta$ -Familie gehören die TGF  $\beta$ 1- $\beta$ 2- $\beta$ 3-Isomere. Das Molekül wird mit einer N-Amino-Sequenz synthetisiert, die für jedes Isomer unterschiedlich ist und das TGF  $\beta$  in einer latenten Phase „hält“, so dass eine Interaktion zwischen dem Molekül und dem Rezeptor unmöglich ist (34).

Erst nach Abspaltung dieses Glykopeptids vom N-aminoterminalen Ende des Proteins wird dieses aktiviert.

Obwohl der pH-Wert und die Proteolyse das TGF  $\beta$  *in vitro* aktivieren können, ist der Mechanismus von TGF  $\beta$  in Tumoren noch nicht bekannt (34, 35). TGF  $\beta$  stimuliert die Zellproliferation, kann aber auch eine Inhibierung bewirken (36, 37). Es stimuliert das Wachstum von einigen mesenchymalen Zelltypen, obwohl es bei normalen epithelialen und den mesenchymalen Zellen inhibitorisch wirkt.

Es ist beobachtet worden, dass sich die Empfindlichkeit von Fibrosarkom-Tumorzellen gegenüber dem Wachstumssuppressions-Effekt gemäß des metastatischen Potentials ändert: TGF  $\beta$  inhibiert das Wachstum von normalen Zellen, aber bei malignen Zellen scheint

es das Wachstum zu fördern (38). Der Mechanismus, wodurch das TGF  $\beta$  seine antiproliferative Wirkung entfaltet, bedarf noch intensiver Forschung.

Die zellulären Prozesse, an denen TGF  $\beta$  beteiligt ist, sind die Proliferation, Differenzierung, Adhäsion und Migration.

### Mechanismus

TGF  $\beta$  inhibiert die Zellproliferation, die von unterschiedlichen Mitogenen induziert wird. Diese Tatsache und andere Beobachtungen haben zu der Vermutung geführt, dass TGF  $\beta$  den proliferativen Effekt der mitogenen Substanzen verhindert, indem es distal von den mitogenen Rezeptoren inhibitorisch wirkt und dadurch die Signale zur Proliferation blockiert (39, 40).

Experimente und Beobachtungen haben gezeigt, dass der inhibitorische Mechanismus von TGF  $\beta$  in der G1-Phase des Zellzyklus stattfindet (41-45). Die TGF  $\beta$ -Wirkung verhindert die Retinoblastom-Phosphorylierung in der Spät-G1-Phase (45), die ihrerseits in der inaktiven Form den Übergangssuppressor von der G1 zur S-Phase darstellt.

Retinoblastom (RB) ist ein Wachstumssuppressorgen, dessen Mutation oder Deletion seiner beiden Allele zur einen kanzerogenen Transformation führt. Diese Transformation kann reversibel sein, wie einige Fälle gezeigt haben, wobei eine Reinduktion von normalem RB in der Zelle beobachtet wurde (46, 47).

Schematische Darstellung der TGF  $\beta$ -Inhibition von der G1 zur S-Phase epithelialer Lungenzellen:



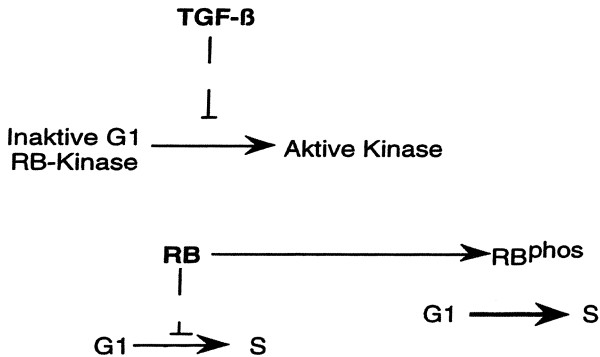


Abb.5: Die spezifische G1-RB-Kinase wird in der mittleren G1-Phase aktiviert Und dadurch RB phosphoryliert. Die phosphorylierte Form der RB führt Zum Übergang von der G1-Phase zur S-Phase des Zyklus. Der inhibitorische Effekt von TGF  $\beta$  wird aufgehoben.

Es wurde beobachtet, dass invasive Zellen eine erhöhte Protease-Aktivität im Vergleich zu normalen und wenig invasiven Zellen besitzen. Deswegen wird vermutet, dass die strenge Regulation der proteolytischen Aktivität bei aggressiven Tumorzellen ausfällt (48).

Solche Faktoren wie das TGF  $\beta$  haben keine regulatorische Wirkung auf die limitierte Proteolyse aufgrund einer defekten „Response“.

Die Expression von Kollagenasen in Tumoren wird bei normalen Fibroblasten durch TGF  $\beta$  inhibiert.

TGF  $\beta$  stimuliert zum einen in Fibrosarkom- und Adenokarzinomzellen die Protease-expression, und zum anderen produziert das Fibrosarkom selbst erhöhte Mengen an TGF  $\beta$  (48).

### 1.3.2. Proliferating Cell Nuklear Antigen (PCNA)

PCNA wurde von Miyachi et al. Im Jahre 1978 als Antigen im Nukleus beschrieben. Gemäß ihrer Beobachtung fördert dieses Antigen die Zellproliferation bei Kontakt mit dem Serum der Patienten, die an systemischen Lupus Erythematosus (SLE) leiden.

PCNA ist ein Molekül von 36 kDa und in der Evolution weitgehend konserviert. Es agiert als Kofaktor für die DNA-Polymerase  $\delta$  sowohl in der S-Phase als auch in der mit der

DNA-Reparatur assoziierten DNA-Synthese. Der vielleicht wichtigste Punkt ist, dass das PCNA-Molekül eine sehr lange Proteinhalbwertszeit besitzt (im Vergleich zu Ki-67), d.h. nach dem Austritt aus der M-Phase zeigen die Zellen noch nachweisbare Konzentrationen an PCNA für längere Zeitperioden. Zusätzlich ist selbst in Zellen, die sich nicht im Zellzyklus befinden, PCNA in sehr kleinen Mengen zu finden, mit steigender Konzentrationen beim Eintritt in den Zellzyklus; nur in Zellen mit längeren Ruhephasen ist PCNA vollkommen verschwunden. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass während PCNA zur DNA-Synthese (während der S-Phase) unbedingt erforderlich ist, Zellen PCNA produzieren können, sich aber nicht notwendigerweise im Zellzyklus befinden müssen. PCNA-Expression kann durch Wachstumsfaktoren sowohl *in vivo* als auch *in vitro* induziert werden. Dem scheint die merkwürdige Beobachtung zugrunde zu liegen, dass die PCNA-Expression in nicht im Zellzyklus befindlichen, an Tumore grenzenden Zellen induziert werden kann.

PCNA gehört zu den Proteinen, die eine wichtige Rolle in biologischen Prozessen der Zellteilung und Zellproliferation spielen, wie schon oben beschrieben wurde. Das PCNA wurde nicht nur wegen seiner Rolle in der DNA-Synthese und Reparaturmechanismus erforscht, sondern wird auch als Zellproliferationsmarker und prognostischer Indikator in der Pathologie angewendet.

Die Anwesenheit von PCNA in verschiedenen Geweben und Spezies, in Eukaryoten und Prokaryoten (49-51) zeigt, wie wichtig dieses Antigen ist.

Die Tatsache, dass ein ähnliches PCNA-Gen zwischen Eukaryoten und einigen Viren existiert, zeigt, dass primordiale PCNA-Gene eine sehr wichtige Rolle bei der Teilung von *Planta* und *Animalia* (52) vor einer Milliarde Jahren gespielt haben.

### **PCNA während des Zellzyklus**

Um den Zeitpunkt der PCNA-Synthese während des Zellzyklus zu finden, wurde der Gehalt an PCNA in synchronisierten Zellen mit monoklonalen und polyklonalen Antikörpern und mit der Methode der Immunfluoreszenz und der Flow-Cytometrie gemessen (53-56). Alle Ergebnisse haben gezeigt, dass ein Maximum bei der S-Phase erreicht wurde, wie die Anwesenheit von PCNA während der DNA-Replikation und die Lokalisation von Thymidin im Nukleus der replizierten Zellen bewiesen hat (50).

Weitere Versuche haben gezeigt, dass die PCNA-Konzentration während der Spät-G1-Phase ansteigt, ihr Maximum während der S-Phase erreicht (7-fachgrößer als bei ruhenden Zellen) und wieder während der Mitose und der G2-Phase absinkt (50, 53-55).

### **DNA Excision Reparatur**

Die Tatsache, dass PCNA in den Nuklei von nicht in der S-Phase befindlichen Zellen, die UV-bestrahlt wurden, detektiert werden kann, spricht dafür, dass PCNA in der Excision-Reparatur involviert ist (57, 58). Versuche, in denen die Proteinsynthese durch Cycloheximid und die DNA-Synthese durch Amphidicolin gehemmt wurden und die Zellen UV-bestrahlt wurden, haben gezeigt, dass PCNA noch detektierbar war, obwohl alle Voraussetzungen für eine Neu-Synthese ausgeschlossen wurden. Das hat zu der Überlegung geführt, dass nicht neu synthetisiertes PCNA aus einem schon existenten „Pool“ im Nukleus stammt und die Expression von PCNA der durch die UV-Bestrahlung bedingten DNA-Reparatur-Synthese vorausgeht (58).

Desweiteren wurden fraktionierte Zellextrakte und UV-bestrahltes DNA-Plasmid untersucht (59). Hier konnte nach intensiver Untersuchung und Inzisions- und der Polymerisations-schritte gezeigt werden, dass PCNA mobilisiert wird, um die von den abgeschnittenen Fragmenten verursachten Lücken zu reparieren. Natürlich nehmen in diesem Exzisionsprozess mehrere andere Proteine, wie Replikationsfaktor C (RF-C), DNA Polymerase  $\delta$  und  $\epsilon$  u.s.w. teil.

Toschi und Bravo waren in der Lage zu zeigen, dass dieses PCNA, das in den Exzisions-Reparaturmechanismus involviert ist, keine „enge Beziehung“ zu den anderen Nukleus-komponenten hat und dass es zum Teil der PCNA-Population angehört, die in mit organischen Lösungen fixierten Zellen nicht detektierbar ist.

## 1.4. Zielsetzung der Arbeit

Sowohl durch *in-vitro* als auch *in vivo* Versuche konnte gezeigt werden, dass Dichlorvinylcystein, der Hauptmetabolit von TRI, in hohen Konzentrationen und nach kurzer Wirkungsdauer für die organspezifische Toxizität und Kanzerogenität in der Niere verantwortlich ist.

Da sich die Exposition am Arbeitsplatz in weitaus niedrigeren Konzentrationsbereichen bewegt und der Mensch ein Arbeitsleben lang dieser Belastung ausgesetzt ist, steht nun im Mittelpunkt dieser Dissertation die Frage, ob sich auch bei niedrigen Konzentrationen an Dichlorvinylcystein über einen längeren Zeitraum Veränderungen in Richtung Tumorentstehung feststellen lassen.

Vordergründig soll durch die Untersuchung von bestimmten Wachstumsfaktoren, die schon in der frühen Phase des Zellzyklus eine tragende Rolle spielen, nachgewiesen werden, inwieweit die Behandlung mit Dichlorvinylcystein deren Wirkungsweise beeinflusst. Zur Bestätigung eventuell auftretender Veränderungen werden weiterhin andere physiologische und biochemische Parameter wie Bestimmung der Glucoseaufnahme oder der c-fos-Expression untersucht.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1. Reagenzien**

Dichlorvinylcystein wurde wie beschrieben synthetisiert (14, 60) und 99% rein durch analysierte HPLC bestimmt.

$^{14}\text{C}$ - $\alpha$ -Methylglucose (282 mCi/mmol) wurde von NEN Dupont Frankreich bezogen.

### **2.2. Zellkultur**

Kultivierte LLC-PK1 Nierenzellen (American Type Culture Collection, passage 196-216) besitzen viele morphologische und physiologische Charakteristika der Tubuluszelle in der Niere.

Die LLC-PK1 Zellen (American Type Culture Kollektion, passage 196-216) wurden in 75 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), ergänzt mit 20 mM Hepes, 10% FCS, 100 U Penicillin/ml, 10 mg Streptomycin/ml, 1,7 g NaHCO<sub>3</sub>/l und 4,5 g Glukose/l gehalten. Für die Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  Dichlorvinylcystein (gelöst in PBS als 1 mM Stammlösung) für sieben Wochen den LLC-PK1 Zellen bei jeder Passage die Chemikalie dem Medium zugegeben. Plasmamembranintegrität und Zellüberlebensfähigkeit wurden durch Bestimmung der Laktatdehydrogenase-Abgabe in das Inkubationsmedium bestimmt. Nach sieben Wochen Exposition gegenüber Dichlorvinylcystein wurden morphologisch veränderte einzelne Zellen für die Etablierung von Klonen selektiert. Im Vergleich hierzu wurden ebenso von unbehandelten Kontroll-LLC-PK1 Zellen Klone unter gleichen Bedingungen gewonnen.

### **2.3. Etablierung von Klonen**

Für die Selektion von morphologisch veränderten einzelnen Zellen wurden 1000 Zellen/Petrischale (10 cm Durchmesser) ausgesät, und am nächsten Tag erfolgte eine Abtrennung einer vereinzelt Zelle von den anderen durch einen sterilen Glasring unter dem Mikroskop. Nach Erreichen der Konfluenz im Glasring wurden die Klone trypsiniert und

auf Six-Well-Platten (3 cm Durchmesser) ausgesät. Die Klone wurden für mindestens vier Wochen in Dichlorvinylcystein-freiem DMEM-Medium gehalten, bevor sie für die unten beschriebenen Versuche eingesetzt wurden.

## 2.4. Zellzahl-Bestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen auf Si-Well-Platten ausgesät.

Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen, trypsinisiert und 200  $\mu$ l der Zellsuspension in 9,8 ml Isotonlösung II (0,9 % isotonische NaCl-Lösung) pipettiert. Die Zellzahl wurde anschließend am Counter bestimmt.

## 2.5. DNA-Bestimmung

Lösungen: Extraktionspuffer: -62,5 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,86 g/100 ml  
-2,5 M NaCl: 14,61 g/100 ml  
-pH auf 7,4 einstellen

Hoechst-Stammlösung (H33258/Bisbenzamid):

-2,5  $\mu$ g Bisbenzamid auf 1 ml H<sub>2</sub>O bidest

Zur Bestimmung der DNA wurden die Zellen ebenso wie bei der Zellzahl-Bestimmung auf Six-Well-Platten ausgesät. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit kaltem 1xPBS-Puffer gewaschen.

Pro Platte wurden 800  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest zugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1500  $\mu$ l Extraktionspuffer wurden die Six-Well-Platten für weitere 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde von jeder Platte nach gutem resuspendieren der Lösung 1150  $\mu$ l abgenommen und in eine Einmalkuvette überführt, mit 750  $\mu$ l der Hoechststammlösung versetzt und für zehn Minuten im Dunkeln gehalten. Die Messung der DNA erfolgte am DNA-Fluorimeter (SFM 25 Kontron Instruments) bei 360 nm Ex- tinction und 450 nm Emission.

## 2.6. Glukose-Transport

Cellular fos (c-fos) ist ein Kernprotein der grossen Familie der IEG (immediately early genes), von denen über 100 bekannt sind und die Zellproliferation, Zellausdifferenzierung bis Zelltod regulieren.

Die LLC-Pk1 Zellen wurden in niedrigem Glukose-Medium gehalten, um eine möglichst hohe Anzahl von Glukose-Transportmolekülen zu erreichen (Moran et al., 1983). Vor der Glukose-Aufnahme wurden die Kontroll- und die Dichlorvinylcystein-behandelten LLC-PK 1 in MEM

(minimal essential Medium) mit niedrigem Glukosegehalt (5mM Glukose anstelle von 25 mM), ergänzt mit 10 5 FCS (Foetal Calf Serum), für 72 Stunden inkubiert.

Konfluente Monolayer, gewaschen in Six-Well-Platten, wurden dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend für zwei Minuten in 0,9 ml PBS (Phosphat gepufferte Saline) bei 37°C vorgewärmt. Nach Zugabe von  $^{14}\text{C}$ - $\alpha$ -Methylglukose mit einer Endkonzentration von 0,2  $\mu\text{Ci/ml}$  wurde die Aufnahme von Glukose zeitabhängig bis 90 Minuten bei 37°C ermöglicht (Amsler und Cook, 1982). Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem TBS wurden die Zellen in zwei ml 0,2 % (wt/vol) solubilisiert und die Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ - $\alpha$ -Methylglukose in einem Packard Liquid Scintillation Counter quantifiziert.

## 2.7. c-fos-Expression

Wildtyp-LLC-PK1 Zellen und die Dichlorvinylcystein-behandelten Klone wurden in 75  $\text{cm}^2$  Gewebekulturflaschen mit 10 ml DMEM (10% FCS) ausgesät. Nach Erreichen einer 70%igen Konfluenz wurde das Inkubationsmedium durch DMEM ersetzt, welches nur 0,2% FCS enthielt. Nach 24-stündigem Serumentzug wurden die Zellen für 30, 60 und 90 Minuten mit DMEM, ergänzt mit 10% FCS, stimuliert und anschließend durch Trypsinierung geerntet.

Das Gesamt-Protein wurde auf einem 10%igem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet.

Das FOS-Protein wurde mit Antikörpern detektiert (1. Antikörper: Mouse Monoclonal c-fos IgG, Dianova, Hamburg; 2. Antikörper: Goat Antimouse gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, Serva, Heidelberg) und mittels BCIP/NBT-Färbung (Sigma, Deishofen) zur

laserdensitometrischen Bestimmung sichtbar gemacht (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA).

## 2.8. Antikörpernachweis der Wachstumsfaktoren

### 2.8.1. Testsubstanzen und Lösungen

Folgende Chemikalien wurden beim Versuch verwendet:

Primär-Antikörper:

- Monoklonal Anti- $\beta$ -Actin (Sigma, Deisenhofen)
- Anti-PCNA Monoklonal (Medac, Hamburg)
- Anti TGF  $\beta$  3 (Ab-1) Monoklonal mouse IgG (Dianova, Hamburg)

Brücken-Antikörper:

- Rabbit Anti-Mouse Immunoglobuline (DAKO, Hamburg)
- APAAP Mouse Monoklonal (DAKO, Hamburg)

Tris-Puffer: 5 l

- Tris-Base                      4,50 g
- Tris-HCl                      34,25 g
- NaCl                          43,90 g
- Aqua dest. Ad 5,0 l
- pH auf 7,5 $\pm$ 0,1 einstellen

RPMI 1640 (1x) mit L-Glutamin und Na(CO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (PAA Laboratories GmbH.)

RPMI-Medium:

- RPMI                              5 ml
- Aquq dest.                      45 ml
- Inaktiviertes Rinderserum    5 ml

DAKO Neufuchsin Substratsystem (K698), mit 2 mM Levamisol versetzt und folgende Reagenzien beinhaltet:



- Flasche a: Trispuffer-Konzentrat 7 ml, pH 8,8
- Flasche b: gepuffertes Substrat-Konzentrat 5 ml, pH 8,2
- Flasche c: Neufuchsin in 2N HCl 5 ml
- Flasche d: Aktivierungsgagens in Aqua dest.

Glyceringelatine (DAKO, Hamburg), Hämalan (Merck, Darmstadt), Humanserum (Transfusionsmedizin, Uniklinik Würzburg)

Die Präparate wurden gefärbt. Sämtliche Präparate (mit Ausnahme von Hämalan und Gluceringelatine) wurden im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

## 2.8.2. Geräte

- Lichtmikroskop (Olympus, CH2, Japan)
- Schütteltisch (GLW, Würzburg)
- Vortexer Reamix 2789 (Assistent)
- 4-Kammer-Permanox-Objektträger (Nunc, Wiesbaden)

## 2.9. Färbung

### 2.9.1. Prinzip

#### **APAAP-(alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase) Methode:**

Bei dieser Methode werden drei Reagenzien eingesetzt: Primärantikörper, Sekundärantikörper und der APAAP-Komplex, bestehend aus dem Enzym alkalische Phosphatase und einem Antikörper gegen die alkalische Phosphatase. Der Primärantikörper ist spezifisch gegen das Antigen gerichtet. Der Sekundär- oder Brückenantikörper (link-antibody kann sich sowohl an den Primärantikörper als auch an den APAAP-Komplex binden da beide in derselben Tierspezies hergestellt wurden.

Der Brückenantikörper wird im Überschuß zugeführt. Dadurch bindet sich nur eine Hälfte seines Fab-Fragmentes an den Primärantikörper, die andere Hälfte bleibt frei zur Bindung an den Antikörper des APAAP-Komplexes. Das Enzym alkalische Phosphatase wird durch eine Substrat-Chromogenreaktion sichtbar gemacht.

Durch die Verwendung unkonjugierter Antikörper bei der APAAP-Methode wird eine größere Empfindlichkeit als bei den direkten, indirekten Techniken und der PAP-Methode (Immunhistochemische Methode mit Peroxidase als verwendetes Enzym) erzielt. Das kommt besonders bei formalinfixiertem, mit Paraffin eingebettetem Gewebe zum Tragen, wo eine starke Anfärbung erzielt wird, obwohl ein großer Teil des Antigens durch Fixierung und Gewebeaufbereitungsverfahren zerstört wird. Wegen dieses Antigenverlustes während der Fixierung sollten direkte und indirekte Techniken an Gefrierschnitten durchgeführt werden, um gleich bleibend interpretierbare Ergebnisse zu erhalten.

Die größere Flexibilität der APAAP-Methode hinsichtlich der Probenaufbereitung kompensiert deren größeren Zeitaufwand.

### **2.9.2. Vorgang**

Die Primär-Antikörper wurden im folgenden Verhältnis mit RPMI-Medium verdünnt:

Anti-Aktin 1:1000

Anti-PCNA 1:50

Anti-TGF  $\beta$  1:50

2  $\mu$ l Anti-Aktin, 40  $\mu$ l Anti-PCNA, 40  $\mu$ l Anti-TGF  $\beta$  wurden mit jeweils 2000  $\mu$ l RPMI-Medium in drei beschrifteten Teströhrchen verdünnt und mit dem Vortex gemischt. Die Anti-Aktin-Antikörper dienten dem Nachweis der positiven und das einfache RPMI-Medium der negativen Kontrolle.

Die Ansätze wurden in die 4-Kammern-Objektträger pipettiert. Die Menge betrug je 250  $\mu$ l.

Die Präparate wurden 60 min lang auf dem Schütteltisch unter feuchten Tüchern zum Schutz vor Austrocknung inkubiert. Danach wurden die Plättchen viermal mit Tris-Puffer gespült.

Dann folgte die Verdünnung der Brücken-Antikörper in einem Verhältnis von 1:25 mit Humanserum/RPMI-Medium (1:8 Verhältnis). Das heißt, dass 300  $\mu\text{l}$  Brücken-Antikörper mit 937,5  $\mu\text{l}$  Humanserum und 7200  $\mu\text{l}$  Humanserum/RPMI-Medium in einem Teströhrchen verdünnt und gemischt wurden.

Diese Mischung wurde in die Objektträger zu je 250  $\mu\text{l}$  pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 30 min unter feuchten Tüchern. Dann wurden die Plättchen viermal mit Tris-Puffer gewaschen.

Anschließend wurden 175  $\mu\text{l}$  des APAAP-Komplexes mit 8575  $\mu\text{l}$  RPMI-Medium, das einem Verhältnis von 1:50 entspricht, in einem Teströhrchen verdünnt und gemischt. Die Mischung wurde in jede einzelne Vertiefung des Plättchens zu je 250  $\mu\text{l}$  mittels Pipette gegeben. Danach erfolgte die 30-minütige Inkubation unter feuchten Tüchern und die zehnmahlige Abspülung mit Tris-Puffer.

Reagenzienzubereitung des Neufuchsin Substratsystems:

Die Reagenzien sind unmittelbar vor Gebrauch anzusetzen.

Substrat:

- 8 Tropfen aus Flasche a (Tris-Puffer-Konzentrat) in ein Teströhrchen tropfen.
- Mit Aqua dest. Auf 8 ml auffüllen.
- 4 Tropfen aus Flasche b (Substrat-Konzentrat) hinzufügen und vorsichtig mischen.

Chromogen:

- 4 Tropfen aus Flasche c (Neufuchsin-Chromogen) und 4 Tropfen aus Flasche d (Aktivierungsagens) in ein leeres Teströhrchen tropfen. Vorsichtig mischen.
- 3 min stehenlassen.

Substrat-Chromogen-Reagenz:

- Das Substrat-Reagenz in das Teströhrchen mit dem Chromogen pipettieren.
- Mischen.

Das hierbei gewonnen Substratsystem wurde zu jeweils 250  $\mu\text{l}$  in die Objektträgerkammer gegeben. Dann erfolgte eine Inkubation von 15 min unter gleichen Bedingungen wie oben beschrieben und das viermalige Abspülen mit Tris-Puffer.

Nun wurden in jede Kammer 250  $\mu\text{l}$  Hämalun für 30 sec zur Gegenfärbung pipettiert. Das Plättchen wurde im Anschluss im oben beschriebenen Behälter abgespült, bis die Farbe des Tris-Puffers klar erschien.

Die Glyceringelatine wurde im heißen Bad verflüssigt und anschließend auf den Objektträger, der von den Kammern getrennt wurde, gegeben. Im Anschluss wurde der Objektträger mit einem Deckplättchen abgedeckt und für 24 Stunden getrocknet. Der Objektträger wurde nach Datum, Verfärbung und Art der Zellen beschriftet. Die Präparate wurden dann unter Aluminiumfolie zum Schutz vor Ausbleichung gelagert.

## **2.10. Mikroskopieren**

Die Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop mit einer Lichtintensität von 8 und einer 10-fachen Vergrößerung untersucht.

Zuerst wurde die negative und positive Kontrolle untersucht. Als erstes wurden die Präparate, die am besten gefärbt waren und bei denen die Zellen am besten gewaschen waren, ausgewählt. Insgesamt wurden acht Präparate pro Versuchstag vorbereitet und davon wurden vier ausgewertet.

Wenn festgestellt wurde, dass die Zuverlässigkeit der Färbetechnikergebnisse anhand der Farbe der Kontrollen gesichert war, wurde das Präparat für die weitere Untersuchung und Auswertung ausgewählt. Die negative Kontrolle durfte nicht und die positive musste gefärbt sein. Bei einigen Präparaten kam es vor, dass auch die negative Kontrolle gefärbt war und als Ursache wurde festgestellt, dass Kontakt zwischen den „Kästchen“ existierte. Natürlich wurden solche Präparate und andere, die aus anderen Gründen (z.B. kontaminierte Antikörper) ungeeignet waren, vom ganzen Prozess ausgeschlossen. Die Präparate, die die Voraussetzungen erfüllten, wurden weiter mikroskopiert.

Als erstes wurde das PCNA und dann das TGF  $\beta$  untersucht. Jeweils 2000 Zellen wurden ausgewertet, d.h. wieviel davon positiv (rot oder rosa) gefärbt und wieviel negativ (nicht gefärbt, weiß oder lila) waren.

Es wurde bei den PCNA- und TGF  $\beta$ -„Kästchen“ beobachtet, aber auch bei der positiven Kontrolle, dass am Rand der Kästchen die Zellen meistens bei höherer Konfluenz (75%, 100%, 125%) stärker gefärbt waren als die Zellen in der Mitte der Präparate. Dieses Phänomen wurde physikalisch erklärt als das Ergebnis der Adhäsionskräfte zwischen den Wänden am Rand und den Farbstoff-Molekülen. Daraus folgend wurde die Konzentration der Farbstoffmoleküle in diesem Bereich erhöht.

Damit solche Parameter nicht das Ergebnis der Auswertung beeinflussen, wurden immer Zellen, die sich in der Mitte des Präparates befanden, ausgewertet.

Die Zellen wurden immer unter der 20-fachen Vergrößerung ausgewertet. Mit einem manuellen Zähler wurden die negativen und die positiven Zellen registriert. Das Ergebnis von den jeweils insgesamt 2000 Zellen und natürlich auch alle Auffälligkeiten wurden im Protokollheft festgehalten. Daraufhin wurden die entsprechenden Präparate vom ganzen Prozess ausgeschlossen.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Zellzahlbestimmung in Wildtyp- und DCVC-Klonen

Der Vergleich der Zellzahl zwischen Wildtyp- und DCVC-Klonen zeigt, dass mit zunehmender Konfluenz die Teilungsrate der Zellen ansteigt. Die Wildtyp-Klone teilen sich fast doppelt so schnell wie die DCVC-Klone, wobei beide einer exponentiellen Wachstumskurve folgen (Abb. 6).

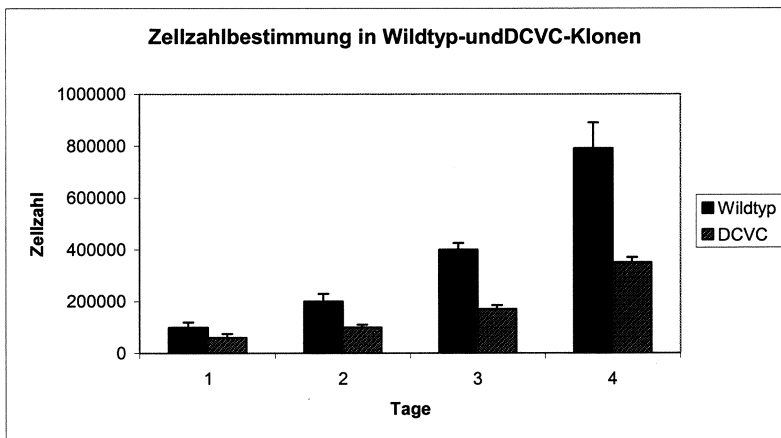


Abb. 6: Zellzahlbestimmung in Wildtyp- und DCVC-Klonen;  
Ausgangszellzahl: 60 000 Zellen

#### 3.2. DNA-Gehalt in Wildtyp- und DCVC-Klonen

Die Messung des DNA-Gehaltes zeigt ebenso wie die Bestimmung der Zellzahl (3.7), dass mit zunehmender Konfluenz sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den DCVC-behandelten Klonen die Wachstumsrate ansteigt. Die Wildtypzellen teilen sich doppelt so schnell wie die DCVC-behandelten Zellen, wobei auch hier sowohl die Wildtyp-Klone als auch die DCVC-Klone einer exponentiellen Wachstumskurve folgen (Abb. 7)

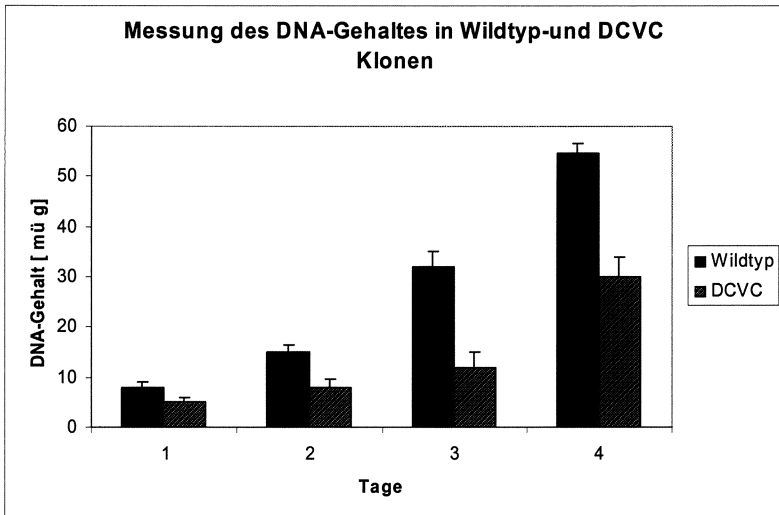


Abb. 7: Messung des DNA-Gehaltes in Wildtyp- und DCVC-Klonen; Ausgangszellzahl: 60 000 Zellen

### 3.3. Aufnahme von $\alpha$ -Methylglukose

Durch Quantifizierung der zellulären Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ - $\alpha$ -Methylglukose zeigt sich, dass der Natrium-abhängige Glukosetransport zu fast 50 % in den DCVC-behandelten Klonen gegenüber den Kontrollzell-Klonen zu allen Inkubationszeiten reduziert ist. Die zeitabhängige Aufnahme von Glukose nimmt vom Zeitpunkt 30 min bis hin zu 60 min sowohl bei den Kontrollzell- und DCVC-behandelten Klonen zu, am stärksten vom Übergang von 60 min auf 90 min (Abb. 8).

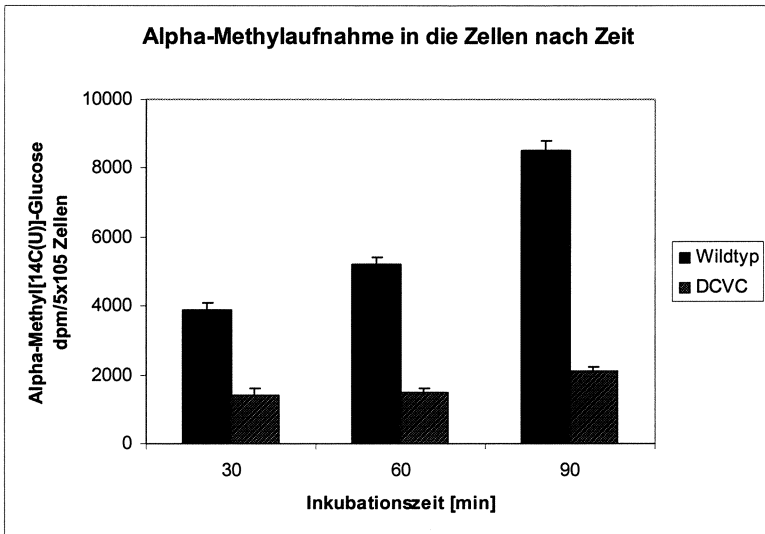


Abb. 8: Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ - $\alpha$ -Methylglukose in Wildtyp- und DCVC-Klonen in Zeitabhängigkeit.

### 3.4. Expression von c-fos

Die mit DCVC (5xM)- behandelten Klone weisen gegenüber den Wildtyp-Klonen eine verstärkte c-fos-Expression auf, vor allem zum Zeitpunkt 60 min. Hier liegen die integrierten Blotbanden für die DCVC-Klone fast doppelt so hoch vor wie für die Wildtyp-Klone. Zu den Inkubationszeiten 30 und 90 min ist die Menge an fos-Protein in den DCVC-Klonen gegenüber den Kontroll-Klonen nur leicht erhöht. Auch nimmt der fos-Gehalt im Gesamtprotein von Kontrollzell- und DCVC-Klonen von 30 auf 60 min zu, von 60 min auf 90 min bleibt der Proteingehalt bei den Kontrollzell-Klonen konstant, bei den DCVC- behandelten Klonen nimmt er um ca. 40% ab (Abb. 9).



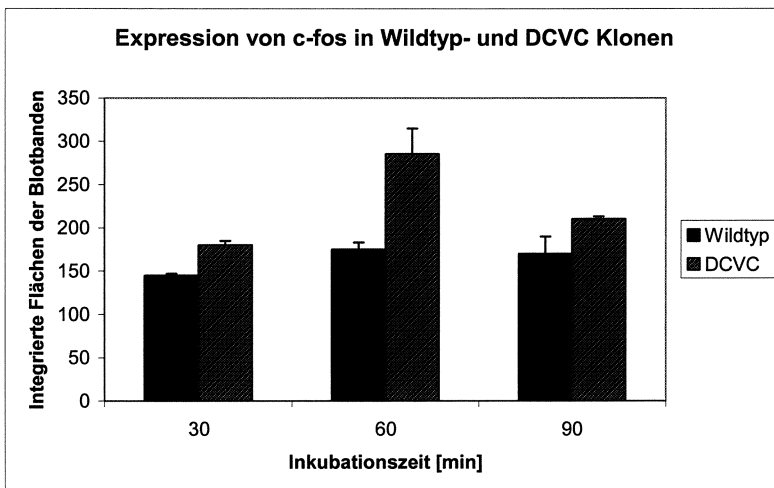


Abb. 9: Expression von c-fos in Wildtyp- und DCVC Klonen In Zeitabhängigkeit.

### 3.5. Expression von TGF $\beta$ in Wildtyp-Klonen

Im Vergleich zu den mit DCVC-behandelten Klonen zeigen die Wildtyp-Klone bei der Expression von TGF  $\beta$  in Abhängigkeit der Konfluenz keine großen Schwankungen.

Die Zahl der Wildtypzellen, die sich noch im Anfangsstadium des Wachstums befinden (25 %-ige Konfluenz) und bei denen das TGF  $\beta$  lichtmikroskopisch detektierbar ist, beträgt 62,67 %.

Der Prozentsatz der „positiven“ Zellen ist fast identisch, 62,75% bei der nächsten Phase

(50 %-ige Konfluenz). Das gleiche gilt für die 75 %-ige Konfluenz. In dieser Phase beträgt die Zahl der Kontrollzellen, die nachweisbare Mengen von TGF  $\beta$  enthalten, 60,2 % (Abb. 10).

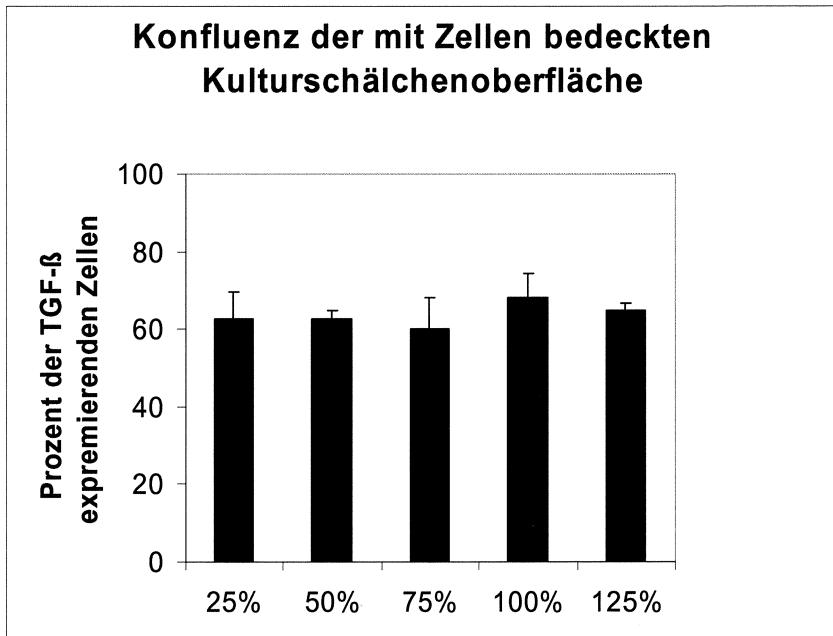


Abb. 10: Expression von TGF  $\beta$  in Wildtyp-Klonen; die Werte ergeben sich aus dem Mittelwert von 3 untersuchten Klonen.

Bei den 2.000 Zellen, die in der Phase der 100 %-igen Konfluenz ausgewertet wurden, also im Stadium des Wachstums, wo die Kulturschälchenoberfläche voll mit Wildtypenzellen bedeckt war, haben sich davon 68,3 % als positiv gefärbt erwiesen.

Der Prozentsatz steigt an, aber nicht signifikant. Das beweist der Vergleich der Zahlen zwischen den verschiedenen Stadien. Der Unterschied schwankt von 5,2 % bis zu 8 % (jeweils verglichen mit der 25 %-igen und der 75 %-igen Konfluenz). Fast in der Mitte der Differenz der anderen Stadien befindet sich die Zahl der TGF  $\beta$  positiven Zellen, nämlich 64,7 % dieses Mal nach einem Wachstum von weiteren zwei Tagen, was einer Konfluenz von 125 % entspricht.

### 3.6. Expression von TGF $\beta$ in DCVC-Klonen

Bei einer Konfluenz von 25% der mit DCVC behandelten Klone beträgt der Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen 92,5 %. Der Prozentsatz der Zellen, in denen das TGF  $\beta$  exprimiert wurde, sinkt bei der 50 %-igen Konfluenz auf 79,5 %. Bei der Erhöhung der Konfluenz auf 75 % steigt der Gehalt von TGF  $\beta$  geringfügig auf 83,7 % an. Die Differenz beträgt nur 4,2 %, was auf die absolute Zellzahl, die auf TGF  $\beta$  positiv ausgewertet wurden, umgerechnet 84 Zellen beträgt. Man kann sogar sagen, dass in diesem Stadium der Konfluenz die Anzahl der Zellen, die das TGF  $\beta$  noch exprimiert haben, konstant bleibt.

Eine weitere Erhöhung der Konfluenz auf 100 %, d.h. eine Auswertung der behandelten Zellen nach sechs Tagen, hat eine Senkung der Zellzahl mit noch detektierbarem TGF  $\beta$ -Gehalt auf 61,8 % als Ergebnis. Die Abnahme an TGF  $\beta$  verhält sich umgekehrt proportional zur Konfluenz (Abb. 11).

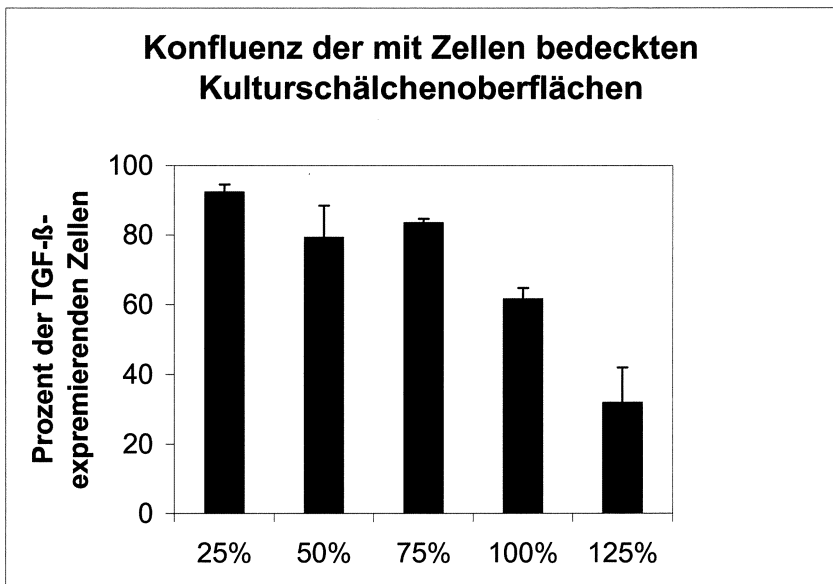


Abb. 11: Expression von TGF  $\beta$  in DCVC-Klonen;  
Die Werte ergeben sich aus dem Mittelwert von  
3 untersuchten Klonen

Der Vergleich der Abnahme vom Stadium der 25 %-igen Konfluenz bis zum 50 %-igen mit der von der 75 %-igen bis zur 100 %-igen Konfluenz zeigt, dass diese von ungefähr 13% auf 22 % steigt. Die erhöhte Abnahme zeigt sich sehr deutlich beim weiteren Wachstum der DCVC-behandelten Klone. Zwei Tage nach ihrer 100 %-igen Konfluenz exprimieren nur 29,17 % der ausgewerteten Zellen noch detektierbare Mengen von TGF  $\beta$ . Hier beträgt die Differenz zwischen den zwei letzten Stadien des Wachstums der Zellen 32%.

### **3.7. Expression von TGF $\beta$ in Wildtyp- und DCVC-Klonen**

In Vergleich der mit DCVC-behandelten Klonen und den Wildtyp-Klonen ergibt bezüglich der Expression von TGF  $\beta$  in Abhängigkeit der Konfluenz deutliche Unterschiede (Abb.12).

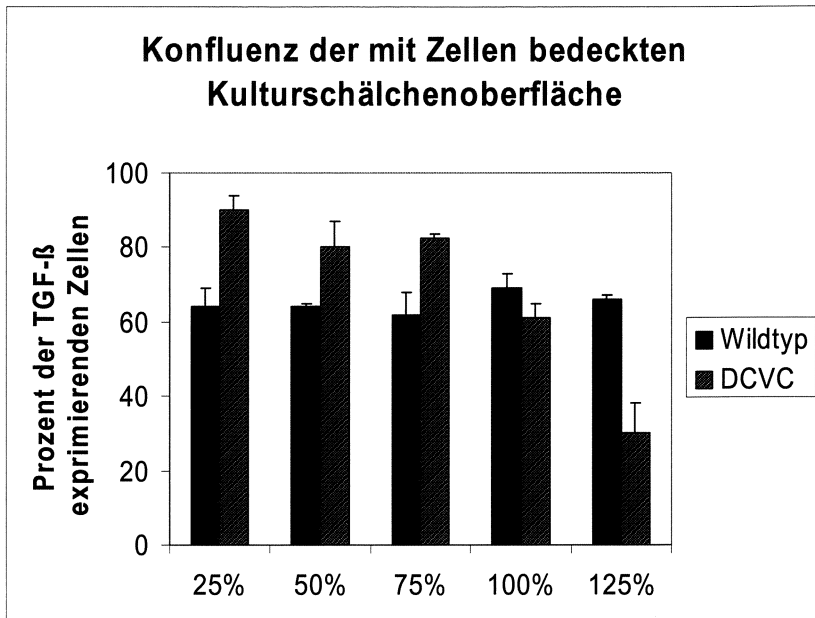


Abb. 12: Expression von TGF $\beta$  in Wildtyp-Klonen und DCVC-Klonen; Die Werte ergeben sich aus dem Mittelwert von 3 untersuchten Klonen.

Die 25 %-ige Konfluenz zeigt, dass die DCVC-behandelten Klone einen größeren Gehalt an TGF  $\beta$  als die Wildtyp-Klone haben. Die Differenz beträgt sogar 30 %.

Die Anzahl der Zellen, die auf TGF  $\beta$  eine positive Färbung ergeben, liegt für die Zellen der DCVC-Klone auch im Stadium der 50 %-igen Konfluenz gegenüber den Wildtyp-Klonen erhöht vor. Hier hat die Differenz abgenommen, weil die Zahl der TGF  $\beta$ -exprimierten Zellen der DCVC-Klone sinkt, aber die Zahl der Wildtypzellen konstant bleibt, wie schon oben beschrieben wurde. 336 Zellen mehr wurden als „positiv“ bezeichnet in einer Summe von 2.000 Zellen, die ausgewertet wurden, d.h. 16,8 % Überschuss für die DCVC-behandelten Zellen.

Die Auswertung der 75 %-igen Konfluenz führt zum ungefähr gleichen Ergebnis: die Differenz beträgt 20,3 %.

In dieser Wachstumsphase kehrt sich das Bild um, und bei der 100 %-igen Konfluenz liegt ein Überschuss an TGF  $\beta$ -exprimierten Zellen

zugunsten der Wildtyp-Klone vor. Die Differenz beträgt zwar nur 7 %, aber die Abnahme ist steigend.

Bei der 125 %-igen Konfluenz ist die Differenz mit 35,5 % deutlich größer als im vorherigen Stadium. Die Zahl der positiv gefärbten Zellen in DCVC-Klonen geht zurück im Vergleich mit der ziemlich konstanten Zahl der Kontroll-Klone. Bei höherer Konfluenz (100 %, 125 %) überwiegt die Zahl der TGF  $\beta$  exprimierten Zellen des Wildtyps.

Bei den „kleineren“ Konfluenzen (25, 50, 75 %) ist die Situation umgekehrt und die Zahl der DCVC-behandelten Zellen der Klone überwiegt.

### 3.8. Expression von PCNA in Wildtyp-Klonen

Das Wachstum der Wildtyp-Klone beeinflusst den Gehalt an PCNA nur wenig. Zu diesem Ergebnis führt die Auswertung der Wildtyp-Klonzellen (Abb. 13).

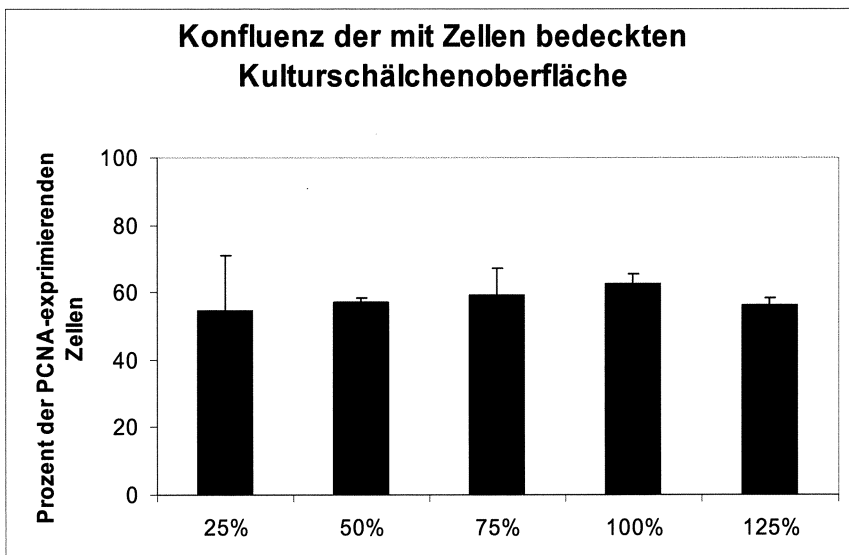


Abb. 13: Expression von PCNA in Wildtyp-Klonen; Die Werte ergeben sich aus dem Mittelwert von 3 untersuchten Klonen.

Bei der 25 %-igen Konfluenz wurden 1096 Zellen als „positiv-gefärbt“ ausgewertet, d.h. 54,8 % der 2.000 Zellen enthielten detektierbare Mengen an PCNA.

Das weitere Zellwachstum und die entsprechende Auswertung zum gleichen Ergebnis. Der Prozentsatz der Zellen der 50 %-igen Konfluenz, die PCNA exprimierten, betrug nun 57,2%. Die Differenz von 2,4 % entspricht einem Ergebnis, das man als identisch bezeichnen kann.

Bei der 75 %-igen Konfluenz steigt der Prozentsatz geringfügig auf 59,3 % an. Die Differenz zwischen dem vorherigen und diesem Stadium ist wiederum nicht groß, aber man stellt eine gering steigende Tendenz fest.

Diese Aussage lässt sich bestätigen, wenn man das Wachstumsstadium der 100 %-igen Konfluenz betrachtet. Die Zahl der PCNA-exprimierten Zellen steigt weiter an und beträgt hier 62,67 %. Die Erhöhung ist wiederum geringfügig. Die Differenz zwischen den letzten beiden Wachstumsphasen beträgt 3,37 % und insgesamt 7,87 % Zwischen diesem Stadium und dem Anfangsstadium.

Wenn man die Phase der 125 %-igen Konfluenz auswertet, stellt man fest, dass die Expression von PCNA in den Kontroll-Klonen keine großen Schwankungen aufweist, wobei die Zellzahl auf 56,4 % absinkt (Abb. 13).

### **3.9. Expression von PCNA in DCVC-Klonen**

Im Gegensatz zu den Wildtyp-Klonen zeigt die Auswertung der DCVC-Klone, dass keine konstante Expression von TGF  $\beta$  in Abhängigkeit von der Konfluenz, sondern eine Annahme zu verzeichnen ist (Abb. 14).

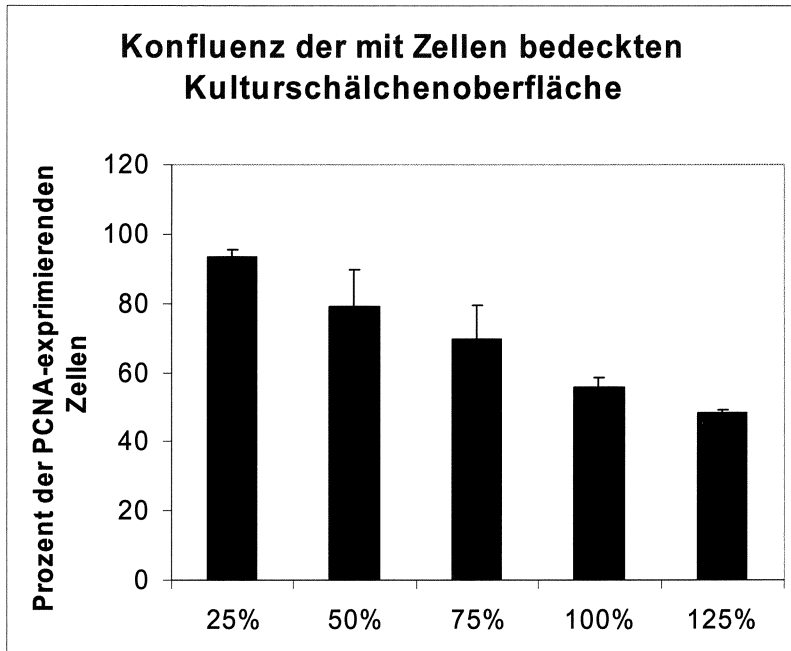


Abb. 14: Expression von PCNA in DCVC-Klonen; die Werte ergeben sich aus dem Mittelwert von 3 untersuchten Klonen

Die Auswertung der 35 %-igen Konfluenz zeigt eine erheblich größere Zahl von PCNA-exprimierten Zellen. Der Prozentsatz der „positiv-gefärbten“ Zellen beträgt 93,3 %.

Die Erhöhung der Konfluenz auf 50 % hat die Senkung der Zahl der Zellen, die PCNA exprimiert haben, zum Ergebnis. Der Prozentsatz beträgt 78,85 %.

Die Differenz ist deutlich und bei den nächsten Stadien ist sie sogar noch auffälliger. Ein weiteres Wachstum der DCVC-Klonen für zusätzlich 1 Tag, damit eine 75 %-ige Konfluenz gewährleistet werden kann, zeigt eine weitere Abnahme der Zahl der PCNA-exprimierten Zellen auf 69,5 %.

Aus der Beobachtung der Ergebnisse bei 25 %-iger und 75 %-iger Konfluenz läßt sich ausagen, dass jede vierte Zelle im Präparat nicht mehr zur Expression des PCNA fähig ist.

Wenn die Kulturschälchenoberfläche komplett mit Zellen bedeckt ist, d.h. dass die Konfluenz 100 % beträgt, wird fast nur von der Hälfte (55,6 %) der DCVC-Klone PCNA exprimiert.



Das Wachstum nach zwei Tagen führt zu einem Prozentsatz von 48,12% positiv gefärbter Zellen. Die 125 %-ige Konfluenz ist also keine Ausnahme dieser Tendenz und in dieser Wachstumsphase ist nur jede Zelle als „positiv-gefärbt“ zu bezeichnen und dadurch als PCNA-exprimierend zu bewerten.

### 3.10. Expression von PCNA in Wildtyp- und DCVC-Klonen

Bei der 25 %-igen Konfluenz ist der Unterschied zwischen den Wildtyp- und DCVC-Klonen, die PCNA exprimiert haben, am deutlichsten. Die ausgewertete Anzahl der DCVC-behandelten Zellen weist knapp doppelt so viele PCNA-positive Zellen auf, wie die der Wildtypzellen (Abb. 15).

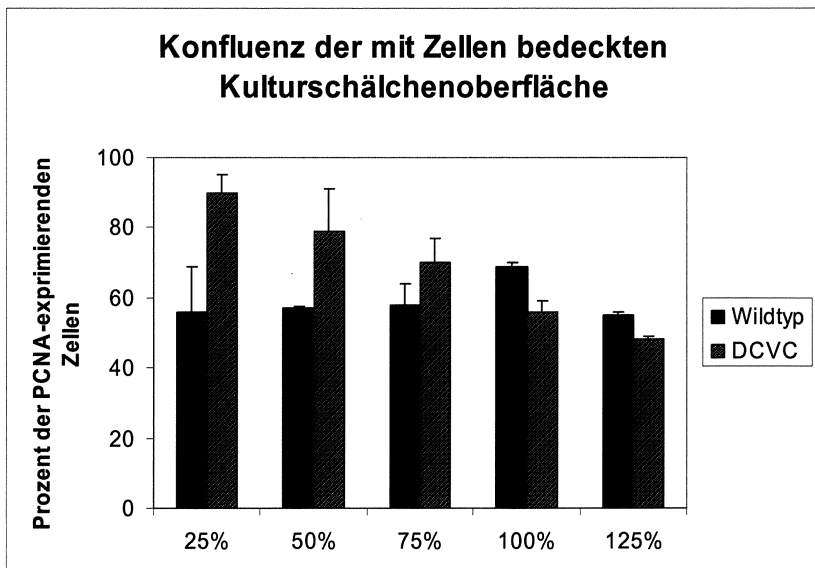


Abb. 15: Expression von PCNA in Wildtyp- und DCVC (5 $\mu$ M)-Klonen; Die Werte ergeben sich aus dem Mittelwert von je 3 untersuchten Klonen.

Der Vergleich der nächsten Wachstumsphase, d.h. der 50 %-igen Konfluenz zeigt wiederum eine Abweichung zwischen den beiden Klonen. Diese Diskrepanz ist niedriger als im 25 %-igen Stadium und beträgt hier 21,65 %.

Auch bei einer Konfluenz von 75 % zeigen die DCVC-Klone mehr positiv gefärbte Zellen als die Wildtyp-Klone, doch ist der Unterschied noch geringer als bei einer Konfluenz von 50 %.

Die abnehmende Tendenz der Zahl der PCNA-exprimierenden Zellen führt zu einem umgekehrten Bild, was das Stadium der 100 %-igen Konfluenz betrifft.

Die Überzahl ist auf der Seite der Wildtyp-Klone. Die Differenz beträgt knapp 10 %. Dieser Prozentsatz entspricht dem, der sich aus dem Vergleich der 75 %-igen Konfluenz berechnen lässt, aber zugunsten der DCVC-Klone, wie schon oben erwähnt.

Diese Differenz bleibt im nächsten Stadium (125 % Konfluenz) konstant, obwohl die Expression von TGF $\beta$  in Wildtyp- und DCVC-Klonen abnimmt.

## 4. DISKUSSION

Jedes Jahr treten annähernd 31.900 Fälle von Nieren- und Harnwegskarzinomen auf, die in über 11.900 Fällen zum Tode führen (61). Diese Tumore machen beinahe 3 % der malignen Erkrankungen erwachsener Personen aus und verteilen sich im Verhältnis 1,5:1,0 zwischen Frauen und Männern. Die meisten Fälle von Nierenzellkarzinomen werden im Alter von 50 bis 70 Jahren beobachtet, obwohl auch schon Kinder mit 6 Monaten betroffen sein können. Zwischen 1975 und 1995 wurde eine stetige und signifikante Zunahme der Inzidenz an Nierenzellkarzinomen beobachtet; diese betrug zwischen 2 bis 4 Prozent pro Jahr. Daraus resultiert eine Steigerung von 43 % seit 1973 (62, 63). Nierenzellkarzinome werden in diverse Subtypen unterschieden, wie hellzellige (75%), papilläre vom Typ I oder II (15%), chromophile (5%) und onkozytäre (5%) Tumore. Diese Tumore werden über Histologie und klinisches Auftreten (64) differenziert und sie werden durch diverse genetische Veränderungen verursacht (62, 65).

Als auslösende Faktoren wurden sowohl schädigende Umwelteinflüsse als auch hormonelle, zelluläre, sowie genetische Dispositionen diskutiert. Das Rauchen wurde bereits in Studien als Risikofaktor für ein erhöhtes Auftreten von Nierenzellkarzinomen bei erwachsenen Patienten beschrieben (66). Bei mehrjährigem Nikotinmissbrauch wurde bei beiden Geschlechtern eine signifikante und dosisabhängige Zunahme des Auftretens von Nierenzellkarzinomen beobachtet (67). Genauso ist Übergewicht mit einem erhöhten Risiko, an einem Nierenkarzinom zu erkranken, verbunden. Dies gilt in höherem Maße für Frauen (68). Auch Analgetikamissbrauch, der bekanntermaßen zu Nierenbeckenkarzinomen führen kann, wird mit einem erhöhten Risiko für Nierenzellkarzinome in Verbindung gebracht. Dabei werden vor allem dann Nierenzellkarzinome beobachtet, wenn Patienten nach Gebrauch von phenacetinhaltigen Analgetika eine Nephropathie entwickelten (69, 70). Schädliche Umwelt- und Arbeitsbedingungen wurden ebenfalls mit der Entwicklung von Nierenzellkarzinomen in Verbindung gebracht. Brauch et al. wiesen in diesem Zusammenhang eine kausale Verbindung zwischen der andauernden Exposition mit hohen Konzentrationen des industriellen Lösungsmittels Trichloräthylen und einem erhöhten Auftreten von Nierenzellkarzinomen nach (71).

Trichlorethylen (TRI) und Tetrachlorethylen (TETRA) zählen zu der Gruppe der chlorierten Kohlenwasserstoffe, die wegen ihrer ausgezeichneten Fettlöslichkeit und ihrer Nicht-

brennbarkeit in großen Mengen als Lösungsmittel und in der Textilreinigung verwendet werden. Dies betrifft u.a. die Farben- und Lackindustrie, insbesondere aber die Metallindustrie, in der organische Lösungsmittel zum Entfetten von Metallteilen eingesetzt werden. TRI und TETRA besitzen in hohen Konzentrationen narkotische Wirkungen. Bei langer Exposition treten Leber- und Nierenschäden auf. Beide chlorierten Ethylenderivate erzeugen im Tierversuch Nierenschäden und Nierenzellkarzinome. Auch beim beruflich exponierten Menschen sind Nierenzellkarzinome nach Einwirkung beider Lösemittel beobachtet worden. Die Bioaktivierungsmechanismen, die zu Nierenschäden und Nierenkrebs führen, sind identisch. In Fall / Kontroll-Studien ist die Exposition – soweit überhaupt hinreichend quantifiziert – meist relativ niedrig gewesen. Andres bei den neuen Untersuchungen mit hohen Inzidenzraten, wo exorbitant hohe Dosen über lange Zeiträume eingewirkt haben (9, 72, 73). Bei TRI bildet der Mensch – gemessen an der Ausscheidung der Endprodukte im Harn – mehr 1,2-DCVC, die eigentliche Vorstufe der ultimalen elektrophilen Intermediate als z.B. die Ratte (74). Dies kann als Hinweis auf eine höhere Empfindlichkeit des Menschen gelten. Bei TRI kommt hinzu, dass sich diese Verbindung leicht zu Dichloracetylen zersetzt. Kommt TRI mit erhitzten Metalloberflächen oder mit Alkali (Spülmittel) in Berührung, ist immer mit der Bildung von Dichloracetylen, das unter diesen Bedingungen stabil gehalten wird, zu rechnen. Dichloracetylen gehört zu den stärksten bekannten kanzerogenen Stoffen. Wahrscheinlich ist Dichloracetylen bei vielen Fällen von Nierenzellkarzinom nach TRI-Exposition maßgeblich beteiligt (75).

Die vorliegende Studie zeigt auf, wie die langfristige Exposition mit niedrigen und als nicht toxisch geltenden Konzentrationen von DCVC zur morphologischen und biochemischen Dedifferenzierung von LLC-PK1-Zellen führen kann. Diese Veränderungen blieben auch nach dem Absetzen der Dosis über 30 Passagen hinweg stabil. Neben dem Verlust der morphologisch kubischen Zellform sowie einer reduzierten Zellzahl in der Zellkultur spricht die verminderte Aufnahme von Glukose für ein zerstörtes membranständiges Transportsystem und /oder für eine Schädigung in der Ausbildung von so genannten *tight junctions* DCVC exponierten Klone. Darüber hinaus zeigt die eingeschränkte pH-abhängige Ammoniakproduktion eine Beeinträchtigung des intramitochondrialen phosphat-abhängigen Glutaminase-Wegs an; dieses ist der wichtigste Weg in der Ammoniak-Genese der LLC-PK1 Zellen und auch funktionell in der Niere bedeutungsvoll (76). Die drei Eigenschaften, Polarisierung der Zellmembran, Glukose-Aufnahme und Ammoniakproduktion sind wesentliche Merkmale für die physiologische Integrität der LLC-PK1

Zellen und deren *in vivo* Korrelat, den proximalen Tubuluszellen der Niere. LLC-PK1 Zellen einer erhöhten Konzentration an DCVC auszusetzen, bedeutet einen Verlust der Membran-Polarität und verursacht eine Dedifferenzierung der Zellen. Das prototypisch dedifferenzierende TPA sowie eine Hypoxie verursachen einen vergleichbaren Effekt einer verminderten Membranpolarität sowie eines geschädigten Glukosetransportes und einer Ammoniakproduktion in den LLC-PK1 Zellen (77). Unter den posttranslationalen Modifikationen der nukleären Proteine spielt die Poly(ADP-Ribosyl)ierung in der Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle. Dabei zeigen sich hohe Aktivitäten in schlecht differenzierten und stark proliferierenden Geweben (27, 78-83). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch Nachweis einer erhöhten Poly(ADP-Ribose)-Transferase-Aktivität in den dedifferenzierten DCVC-induzierten Klonen bestätigt. Während hohe Konzentrationen von Poly(ADP-Ribosyl)-Konjugaten die DNA-Histon-Interaktionen durch Hinzufügen negativer Ladungen zu denen Histonen abschwächt, ermöglicht eine hohe Poly(ADP-Ribosyl)ierungsaktivität eine DNA-Bindung sowie eine Expression von Genen. Diese Beobachtung könnte sich in erhöhten Spiegeln von FOS-Proteinen widerspiegeln, obwohl die gegenwärtigen Experimente keinen kausalen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Poly(ADP-Ribosyl)ierung und der Induktion der c-Fos-Expression ergab.

Untersuchungen der intermediären Filamente und der Zusammensetzung nukleärer Matrix-Proteine zeigen deutlich qualitative als auch quantitative Unterschiede zwischen den Wildtyp LLC-PK1 Zellen und DCVC-behandelten Zellen.

Ähnliche Veränderungen in der Zusammensetzung der intermediären Filamentproteine wurden in den DCVC-behandelten Klonen gefunden. Studien zeigen auf, dass die Zusammensetzung und Struktur der nukleären Matrix und der intermediären Filamentproteine wichtige Parameter in der Regulation der Gen-Transkription sind; daher spielen sie in der Zelldifferenzierung und malignen Transformation eine wichtige Rolle (84).

Vergleichende Analysen der Zusammensetzung nukleärer Matrix-Proteine in normalen und malignen Geweben diverser Organe und Zelllinien (Kolon, Prostata und Brust) zeigten, dass ein Teil der nukleären Matrixproteine nicht nur für den Zelltyp, sondern auch für den Grad der Differenzierung spezifisch sind (85, 86). Diese Beobachtungen wurden kürzlich an menschlichen Tumoren bestätigt (87, 88). Dies lässt den Schluss zu, dass die Veränderungen an den LLC-K1-Klonen durch den Einfluss der nephrotoxischen und nephrokarzinogenen Schlüsselmetabolite von Trichlorethylen und Dichloracetylen bei malignen Veränderungen im Bereich der Niere eine Rolle spielen.

Karzinogene Veränderungen in Nieren wurden sowohl bei Ratten sowie bei Arbeitern, die dauerhaft Trichlorethylen exponiert waren, beobachtet. (9, 84).

DCVC wird durch  $\beta$ -Lyase zu dem hoch elektrophilen Thioketon gespalten, das mit Proteinen und DNA reagiert und dabei cytotoxische und genotoxische Auswirkungen zeigt (14, 25). Da die DCVC Konzentrationen des vorliegenden Versuches keinen Einfluss auf die Integrität der Zellmembran und der Zellproliferation zeigten, d.h. nicht zytotoxisch wirkten, könnte man spekulieren, dass genotoxische Ereignisse in die beobachtete morphologische und biochemische Dedifferenzierung der LLC-K1 Zellen eingebunden waren.

Die Progression einer Zelle durch den Zellzyklus wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (cyclin dependent kinases, CDK) reguliert. Man geht davon aus, dass extrazelluläre Faktoren, die Wachstum, Differenzierung, Überleben und Apoptose beeinflussen, die Aktivität der CDKs über D-Cycline und /oder CDK-Inhibitoren steuern. Zu den Rezeptoren, deren Signalwege auf diese Weise wirken, gehören u.a. Tyrosinkinase-Rezeptoren, TGF- $\beta$ -Rezeptoren sowie Bestandteile der extrazelluläre Matrix (89). TGF  $\beta$  spielt beim Tumorstromwachstum eine entscheidende Rolle, da es sowohl als anti-proliferativer Faktor als auch als Tumor-Promoter funktioniert. Ist das TGF  $\beta$ -Signal blockiert, führt dies zu verstärktem Zellwachstum als Voraussetzung für Tumorbildung (39, 40). Hinzu kommt noch, dass zahlreiche Komponenten des TGF  $\beta$ -Weges Tumor-Suppressoren und im Krebsfall mutiert sind (90). Auf dem Verständnis des Signalweges der Wachstumsfaktoren und der Identifikation veränderter aktivierter Signalkomponenten basiert einer der viel versprechendsten aktuellen Ansätze in der Krebs-Therapie (91).

PCNA gehört zu den Proteinen, die eine wichtige Rolle in biologischen Prozessen der Zellteilung und Zellproliferation spielen. Weitere Versuche haben gezeigt, dass die PCNA-Konzentration während der Spät-G1-Phase ansteigt, ihr Maximum während der S-Phase erreicht (7-fachgrößer als bei ruhenden Zellen) und wieder während der Mitose und der G2-Phase absinkt (50, 53-55). Im Vergleich der DCVC-behandelten Klone und der Wildtyp-Klone ergaben sich für TGF  $\beta$  in Abhängigkeit der Konfluenz deutliche Unterschiede in unseren Versuchsansätzen. Die Auswertung der 25 %-igen Konfluenz zeigte, dass die DCVC-behandelten Klone einen größeren Gehalt an TGF  $\beta$  als die Wildtyp Klone aufwiesen. Die Auswertung der 75 %-igen Konfluenz führte zu einer Differenz von 20,3 %. In dieser Wachstumsphase kehrte sich das Bild um, und bei der 100 %-igen Konfluenz lag

ein Überschuss an TGF  $\beta$ -exprimierten Zellen zugunsten der Wildtyp-Klone vor. Die Überzahl der PCNA-exprimierenden Zellen war auf der Seite der Wildtyp-Klone. Die Differenz betrug 10 %. Dieser Prozentsatz entsprach dem, der sich aus dem Vergleich der 75 %-igen Konfluenz berechnen lässt, aber zugunsten der DCVC-Klone. Diese Differenz blieb im nächsten Stadium konstant, obwohl die Expression von TGF  $\beta$  in DCVC-Klonen abnahm. Dichlorvinylcystein scheint unter Einflussnahme bestimmter Wachstumsfaktoren in der frühen Phase der Zellzyklus hinsichtlich der Proliferation eine wichtige Rolle zu spielen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Dichlorvinylcystein (DCVC), als Schlüsselmetabolit der nephrotoxischen und nephrokarzinogenen Chemikalien Trichlorethylen und Dichloracetylen, bewirkt eine hochpotente zelluläre Toxizität bei LLC-PK1-Zellen. Diese Ereignisse werden in engem Zusammenhang mit der von S-(1,2-dichlorovenyl)-L-Cystein induzierten Freisetzung mitochondrialer  $\text{Ca}^{+}$ -Ionen und ihrer cytotoxischen Auswirkungen auf Nierenzellen gesehen. Kultivierte LLC-PK1 Zellen besitzen viele morphologische und physiologische Charakteristika von Tubuluszellen in der Niere. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Frage, ob eine lang andauernde Exposition von LLC-PK1-Zellen mit niedrigen, als nicht toxisch geltenden Konzentrationen an DCVC zu stabilen Veränderungen in morphologischer und biochemischer Hinsicht führen kann. Nach sieben wöchiger Inkubation mit DCVC wurden die morphologisch veränderten Zellen unter dem Mikroskop einzeln gewonnen und ohne DCVC für weitere 4-8 Wochen kultiviert. Im Gegensatz zu der physiologischer weise kubischen Form unbehandelter LLC-PK Zellen bildeten die DCVC behandelten Zellen eine längliche spindelförmige Gestalt, mit einer Tendenz zu unregelmäßigen Zellbegrenzungen aus. Eine langfristige Behandlung von LLC-PK1 Zellen mit niedrigen, nicht zytotoxischen Konzentrationen an Dichlorvinylcystein induzierte eine stabile morphologische Transformation und Entdifferenzierung. Die transformierten Klone wiesen eine erhöhte Poly(ADP-Ribosyl)ierung auf. Darüber hinaus waren die Glukoseaufnahme, die pH-abhängige Ammoniak-Produktion, und die Formation zu Zellaggregaten als wichtige Eigenschaften der originären tubulären Nierenzellen in den LLC-PK1 Klonen deutlich beeinträchtigt. Die TGF  $\beta$ - und PCNA-Expression wurde zwischen den Wildtyp-Klonen und DCVC-Klonen verglichen. Die Überzahl der PCNA-exprimierenden Zellen war auf der Seite der Wildtyp-Klone. Die Differenz betrug 10 %. Dieser Prozentsatz entspricht dem, der sich aus dem Vergleich der 75 %-igen Konfluenz berechnen lässt, aber zugunsten der DCVC-Klone. Diese Differenz bleibt im nächsten Stadium konstant, obwohl die Expression von TGF  $\beta$  in DCVC-Klonen abnimmt.

In Verbindung mit einem Verlust an Membran-Polarität zeigten die Klone eine veränderte Zusammensetzung ihrer nukleären Matrix- und intermediären Filamentproteine. Dazu lässt sich eine herunter regulierte Poly(ADP-ribosyl)ierung und eine erhöhte Expression des C-fos feststellen. Die Etablierung dedifferenzierter LLC-PK1 Zellen mit stabilen Charakteristika nach der langzeitigen Exposition mit DCVC mag als hilfreiches in vivo Model die-



nen, um biochemische Veränderungen im Zusammenhang mit der Fragestellung chronischer Toxizität und Kanzerogenität für die Niere zu analysieren.

## 6.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Fischer CG, Waechter W, Kraus S, Fuentecilla Perez E, Weidner W, Dudeck J: Urologic tumors in the Federal Republic of Germany: data on 56,013 cases from hospital cancer registries. *Cancer* 1998; 82(4):775-83
2. Holzel D, Altwein JE: [Tumors of the urogenital tract: clinico-epidemiologic facts]. *Urologe A* 1991; 30(2):134-8
3. Schlehofer B, Pommer W, Mellempgaard A, Stewart JH, McCredie M, Niwa S, Lindblad P, Mandel JS, McLaughlin JK, Wahrendorf J: International renal-cell-cancer study. VI. the role of medical and family history. *Int J Cancer* 1996; 66(6):723-6
4. Kociba RJ, Schwetz BA, Keyes DG, Jersey GC, Ballard JJ, Dittenber DA, Quast JF, Wade CE, Humiston CG: Chronic toxicity and reproduction studies of hexachlorobutadiene in rats. *Environ Health Perspect* 1977; 21:49-53
5. Kociba RJ, Keyes DG, Jersey GC, Ballard JJ, Dittenber DA, Quast JF, Wade CE, Humiston CG, Schwetz BA: Results of a two year chronic toxicity study with hexachlorobutadiene in rats. *Am Ind Hyg Assoc J* 1977; 38(11):589-602
6. Reichert D, Spengler U, Romen W, Henschler D: Carcinogenicity of dichloroacetylene: an inhalation study. *Carcinogenesis* 1984; 5(11):1411-20
7. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Trichloroethylene (CAS No. 79-01-6) in Four Strains of Rats (ACI, August, Marshall, Osborne-Mendel) (Gavage Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* 1988; 273:1-299
8. Huff J: Chemicals studied and evaluated in long-term carcinogenesis bioassays by both the Ramazzini Foundation and the National Toxicology Program: in tribute to Cesare Maltoni and David Rall. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 982:208-30
9. Henschler D, Vamvakas S, Lammert M, Dekant W, Kraus B, Thomas B, Ulm K: Increased incidence of renal cell tumors in a cohort of cardboard workers exposed to trichloroethene. *Arch Toxicol* 1995; 69(5):291-9
10. Wolf CR, Berry PN, Nash JA, Green T, Lock EA: Role of microsomal and cytosolic glutathione S-transferases in the conjugation of hexachloro-1:3-butadiene and its possible relevance to toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 228(1):202-8

11. Dekant W, Vamvakas S, Anders MW: Bioactivation of nephrotoxic haloalkenes by glutathione conjugation: formation of toxic and mutagenic intermediates by cysteine conjugate beta-lyase. *Drug Metab Rev* 1989; 20(1):43-83
12. Vamvakas S, Elfarra AA, Dekant W, Henschler D, Anders MW: Mutagenicity of amino acid and glutathione S-conjugates in the Ames test. *Mutat Res* 1988; 206(1):83-90
13. Elfarra AA, Anders MW: Renal processing of glutathione conjugates. Role in nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* 1984; 33(23):3729-32
14. Dekant W, Vamvakas S, Berthold K, Schmidt S, Wild D, Henschler D: Bacterial beta-lyase mediated cleavage and mutagenicity of cysteine conjugates derived from the nephrocarcinogenic alkenes trichloroethylene, tetrachloroethylene and hexachlorobutadiene. *Chem Biol Interact* 1986; 60(1):31-45
15. Dekant W, Metzler M, Henschler D: Identification of S-1,2,2-trichlorovinyl-N-acetylcysteine as a urinary metabolite of tetrachloroethylene: bioactivation through glutathione conjugation as a possible explanation of its nephrocarcinogenicity. *J Biochem Toxicol* 1986; 1(2):57-72
16. Dekant W, Koob M, Henschler D: Metabolism of trichloroethene--in vivo and in vitro evidence for activation by glutathione conjugation. *Chem Biol Interact* 1990; 73(1):89-101
17. Dekant W, Vamvakas S, Koob M, Kochling A, Kanhai W, Muller D, Henschler D: A mechanism of haloalkene-induced renal carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1990; 88:107-10
18. Hull RN, Cherry WR, Weaver GW: The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. *In Vitro* 1976; 12(10):670-7
19. Gstraunthaler G, Pfaller W, Kotanko P: Biochemical characterization of renal epithelial cell cultures (LLC-PK1 and MDCK). *Am J Physiol* 1985; 248(4 Pt 2):F536-44
20. Stevens J, Hayden P, Taylor G: The role of glutathione conjugate metabolism and cysteine conjugate beta-lyase in the mechanism of S-cysteine conjugate toxicity in LLC-PK1 cells. *J Biol Chem* 1986; 261(7):3325-32
21. Vamvakas S, Kochling A, Berthold K, Dekant W: Cytotoxicity of cysteine S-conjugates: structure-activity relationships. *Chem Biol Interact* 1989; 71(1):79-90

22. Vamvakas S, Dekant W, Henschler D: Assessment of unscheduled DNA synthesis in a cultured line of renal epithelial cells exposed to cysteine S-conjugates of haloalkenes and haloalkanes. *Mutat Res* 1989; 222(4):329-35
23. Vamvakas S, Sharma VK, Sheu SS, Anders MW: Perturbations of intracellular calcium distribution in kidney cells by nephrotoxic haloalkenyl cysteine S-conjugates. *Mol Pharmacol* 1990; 38(4):455-61
24. Vamvakas S, Anders MW: Perturbation of calcium homeostasis as a link between acute cell injury and carcinogenesis in the kidney. *Toxicol Lett* 1990; 53(1-2):115-20
25. Vamvakas S, Bittner D, Dekant W, Anders MW: Events that precede and that follow S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine-induced release of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and their association with cytotoxicity to renal cells. *Biochem Pharmacol* 1992; 44(6):1131-8
26. Elia MC, DeLuca JG, Bradley MO: Significance and measurement of DNA double strand breaks in mammalian cells. *Pharmacol Ther* 1991; 51(3):291-327
27. Boulikas T: Relation between carcinogenesis, chromatin structure and poly(ADP-ribosylation) (review). *Anticancer Res* 1991; 11(2):489-527
28. Gabellini N, Facci L, Milani D, Negro A, Callegaro L, Skaper SD, Leon A: Differences in induction of c-fos transcription by cholera toxin-derived cyclic AMP and Ca<sup>2+</sup> signals in astrocytes and 3T3 fibroblasts. *Exp Cell Res* 1991; 194(2):210-7
29. Whitaker M, Patel R: Calcium and cell cycle control. *Development* 1990; 108(4):525-42
30. Massague J, Cheifetz S, Boyd FT, Andres JL: TGF-beta receptors and TGF-beta binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 593:59-72
31. Assoian RK, Sporn MB: Type beta transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1986; 102(4):1217-23
32. Seyedin SM, Thomas TC, Thompson AY, Rosen DM, Piez KA: Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(8):2267-71

33. Thompson NL, Flanders KC, Smith JM, Ellingsworth LR, Roberts AB, Sporn MB: Expression of transforming growth factor-beta 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. *J Cell Biol* 1989; 108(2):661-9
34. Pircher R, Jullien P, Lawrence DA: Beta-transforming growth factor is stored in human blood platelets as a latent high molecular weight complex. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 136(1):30-7
35. Miyazono K, Heldin CH: Role for carbohydrate structures in TGF-beta 1 latency. *Nature* 1989; 338(6211):158-60
36. Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB: Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(1):119-23
37. Tucker MA, Gillespie GY: Production of a bioactive high molecular weight transforming growth factor beta-like molecule by human malignant glioma cell lines. *Growth Factors* 1994; 11(2):153-62
38. Schwarz LC, Gingras MC, Goldberg G, Greenberg AH, Wright JA: Loss of growth factor dependence and conversion of transforming growth factor-beta 1 inhibition to stimulation in metastatic H-ras-transformed murine fibroblasts. *Cancer Res* 1988; 48(24 Pt 1):6999-7003
39. Like B, Massague J: The antiproliferative effect of type beta transforming growth factor occurs at a level distal from receptors for growth-activating factors. *J Biol Chem* 1986; 261(29):13426-9
40. Chambard JC, Pouyssegur J: TGF-beta inhibits growth factor-induced DNA synthesis in hamster fibroblasts without affecting the early mitogenic events. *J Cell Physiol* 1988; 135(1):101-7
41. Nakamura T, Tomita Y, Hirai R, Yamaoka K, Kaji K, Ichihara A: Inhibitory effect of transforming growth factor-beta on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 133(3):1042-50
42. Shipley GD, Tucker RF, Moses HL: Type beta transforming growth factor/growth inhibitor stimulates entry of monolayer cultures of AKR-2B cells into S phase after a prolonged prereplicative interval. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(12):4147-51
43. Heimark RL, Twardzik DR, Schwartz SM: Inhibition of endothelial regeneration by type-beta transforming growth factor from platelets. *Science* 1986; 233(4768):1078-80

44. Lin T, Blaisdell J, Haskell JF: Transforming growth factor-beta inhibits Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 146(2):387-94
45. Laiho M, DeCaprio JA, Ludlow JW, Livingston DM, Massague J: Growth inhibition by TGF-beta linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell* 1990; 62(1):175-85
46. Weinberg RA: The retinoblastoma gene and cell growth control. *Trends Biochem Sci* 1990; 15(5):199-202
47. Weinberg RA: The Rb gene and the negative regulation of cell growth. *Blood* 1989; 74(2):529-32
48. Schwarz LC, Wright JA, Gingras MC, Kondaiiah P, Danielpour D, Pimentel M, Sporn MB, Greenberg AH: Aberrant TGF-beta production and regulation in metastatic malignancy. *Growth Factors* 1990; 3(2):115-27
49. Zuber M, Yasui W, Tan EM, Ryoji M: Quantitation and subcellular localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) in oocytes and eggs of *Xenopus laevis*. *Exp Cell Res* 1989; 182(2):384-93
50. Celis JE, Madsen P, Celis A, Nielsen HV, Gesser B: Cyclin (PCNA, auxiliary protein of DNA polymerase delta) is a central component of the pathway(s) leading to DNA replication and cell division. *FEBS Lett* 1987; 220(1):1-7
51. Yamaguchi M, Nishida Y, Moriuchi T, Hirose F, Hui CC, Suzuki Y, Matsukage A: *Drosophila* proliferating cell nuclear antigen (cyclin) gene: structure, expression during development, and specific binding of homeodomain proteins to its 5'-flanking region. *Mol Cell Biol* 1990; 10(3):872-9
52. Hori H, Osawa S: Evolutionary change in 5S RNA secondary structure and a phylogenetic tree of 54 5S RNA species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(1):381-5
53. Sadaie MR, Mathews MB: Immunochemical and biochemical analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in HeLa cells. *Exp Cell Res* 1986; 163(2):423-33
54. Bravo R, Celis JE: Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) during S-phase are not triggered by post-translational modifications that are expected to moderately affect its charge. *FEBS Lett* 1985; 182(2):435-40

55. Bravo R, Macdonald-Bravo H: Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication. *Embo J* 1985; 4(3):655-61
56. Kurki P, Ogata K, Tan EM: Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1988; 109(1):49-59
57. Celis JE, Madsen P: Increased nuclear cyclin/PCNA antigen staining of non S-phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair. *FEBS Lett* 1986; 209(2):277-83
58. Toschi L, Bravo R: Changes in cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. *J Cell Biol* 1988; 107(5):1623-8
59. Coverley D, Marr J, Ainscough J: Ciz1 promotes mammalian DNA replication. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 1):101-12
60. Vamvakas S, Berthold K, Dekant W, Henschler D: Bacterial cysteine conjugate beta-lyase and the metabolism of cysteine S-conjugates: structural requirements for the cleavage of S-conjugates and the formation of reactive intermediates. *Chem Biol Interact* 1988; 65(1):59-71
61. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ: Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 2003; 53(1):5-26
62. Chow WH, Devesa SS, Warren JL, Fraumeni JF, Jr.: Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *Jama* 1999; 281(17):1628-31
63. Zbar B, Klausner R, Linehan WM: Studying cancer families to identify kidney cancer genes. *Annu Rev Med* 2003; 54:217-33
64. Amin MB, Tamboli P, Javidan J, Stricker H, de-Peralta Venturina M, Deshpande A, Menon M: Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(3):281-91
65. Linehan WM, Walther MM, Zbar B: The genetic basis of cancer of the kidney. *J Urol* 2003; 170(6 Pt 1):2163-72
66. Møllegaard A, Engholm G, McLaughlin JK, Olsen JH: Risk factors for renal cell carcinoma in Denmark. I. Role of socioeconomic status, tobacco use, beverages, and family history. *Cancer Causes Control* 1994; 5(2):105-13
67. Maclure M, Willett W: A case-control study of diet and risk of renal adenocarcinoma. *Epidemiology* 1990; 1(6):430-40

68. Shapiro JA, Williams MA, Weiss NS: Body mass index and risk of renal cell carcinoma. *Epidemiology* 1999; 10(2):188-91
69. Tavani A, La Vecchia C: Epidemiology of renal-cell carcinoma. *J Nephrol* 1997; 10(2):93-106
70. Gago-Dominguez M, Yuan JM, Castelao JE, Ross RK, Yu MC: Regular use of analgesics is a risk factor for renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 81(3):542-8
71. Brauch H, Weirich G, Hornauer MA, Storkel S, Wohl T, Bruning T: Trichloroethylene exposure and specific somatic mutations in patients with renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(10):854-61
72. Vamvakas S, Bruning T, Thomasson B, Lammert M, Baumuller A, Bolt HM, Dekant W, Birner G, Henschler D, Ulm K: Renal cell cancer correlated with occupational exposure to trichloroethene. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998; 124(7):374-82
73. Vamvakas S, Bruning T, Bolt HM, Henschler D, Ulm K: Renal cell cancer correlated with occupational exposure to trichloroethene. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126(3):178-80
74. Bernauer U, Birner G, Dekant W, Henschler D: Biotransformation of trichloroethene: dose-dependent excretion of 2,2,2-trichloro-metabolites and mercapturic acids in rats and humans after inhalation. *Arch Toxicol* 1996; 70(6):338-46
75. Vamvakas S, Kordowich FJ, Dekant W, Neudecker T, Henschler D: Mutagenicity of hexachloro-1,3-butadiene and its S-conjugates in the Ames test--role of activation by the mercapturic acid pathway in its nephrocarcinogenicity. *Carcinogenesis* 1988; 9(6):907-10
76. Sahai A, Cole LA, Tannen RL: Pathways and regulation of ammoniogenesis by the LLC-PK1 cells in culture. *J Lab Clin Med* 1989; 114(3):285-93
77. Sahai A, Xu G, Sandler RS, Tannen RL: Hypoxia-mediated impaired differentiation by LLC-PK1 cells: evidence based on the protein kinase C profile. *Kidney Int* 1992; 42(5):1145-52
78. Althaus FR, Lawrence SD, Sattler GL, Pitot HC: ADP-ribosyltransferase activity in cultured hepatocytes. Interactions with DNA repair. *J Biol Chem* 1982; 257(10):5528-35



79. Singh N, Cerutti P: Poly ADP-ribosylation of histones in tumor promoter phorbol-12-myristate-13-acetate treated mouse embryo fibroblasts C3H10T1/2. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 132(2):811-9
80. Muehlemaier D, Larsson R, Cerutti P: Active oxygen induced DNA strand breakage and poly ADP-ribosylation in promotable and non-promotable JB6 mouse epidermal cells. *Carcinogenesis* 1988; 9(2):239-45
81. Singh N: A comparative study on the effect of tumor promoters on poly ADP-ribosylation in A431 cells. *Int J Cancer* 1990; 46(4):648-52
82. Boulikas T: Poly(ADP-ribosyl)ation, DNA strand breaks, chromatin and cancer. *Toxicol Lett* 1993; 67(1-3):129-50
83. Boulikas T: Poly(ADP-ribose) synthesis in blocked and damaged cells and its relation to carcinogenesis. *Anticancer Res* 1992; 12(3):885-98
84. Puck TT, Krystosek A: Role of the cytoskeleton in genome regulation and cancer. *Int Rev Cytol* 1992; 132:75-108
85. Fey EG, Penman S: Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(1):121-5
86. Getzenberg RH, Pienta KJ, Huang EY, Coffey DS: Identification of nuclear matrix proteins in the cancer and normal rat prostate. *Cancer Res* 1991; 51(24):6514-20
87. Partin AW, Getzenberg RH, CarMichael MJ, Vindivich D, Yoo J, Epstein JI, Coffey DS: Nuclear matrix protein patterns in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Cancer Res* 1993; 53(4):744-6
88. Keesee SK, Meneghini MD, Szaro RP, Wu YJ: Nuclear matrix proteins in human colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(5):1913-6
89. Bartek J, Bartkova J, Lukas J: The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. *Exp Cell Res* 1997; 237(1):1-6
90. Neil JR, Galliher AJ, Schiemann WP: TGF-beta in cancer and other diseases. *Future Oncol* 2006; 2(2):185-9
91. Pinkas J, Teicher BA: TGF-beta in cancer and as a therapeutic target. *Biochem Pharmacol* 2006

## 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Bcl-2	B cell lymphoma/leukaemia gene 2
BDGF	heparinbinding growth factor
CA-125	tumorassoziertes Oberflächenantigen
CD44	Hermes-Antigen, Pgp-1
c-erb-2	EGF rezeptor
c-fos	cellular fos
CK-2	Proteinkinase
c-myc	Protooncogen
DCA	Dichloracetylen
DCVC	(1,2-Dichlorvinyl)-L-Cystein
DCVG	S- (1,2-Dichlorvinyl)-Glutathion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	dithiothreitol
E-Cadherin	Zelladhäsionsmolekül E(epitheliales)-Cadherin
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EGTA	ethylene glycol bis( $\beta$ -aminoethyl ether)- $N,N'$ -tetraacetic acid
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast growth factor

GSH	Glutathion
HCBD	Hexachlorbutadien
Hepes	<i>N</i> -[hydroxyethyl]piperazine- <i>N'</i> -[2-ethanesulfonic acid]
HGF	hepatocyte growth factor
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IGF	insulin-like growth factor
IL	Interleukin
KI-67	Proliferationsmarker
LLC-PK1	Schweinenierenzelllinien
MES	2-( <i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid
MET	Onkogen
MIB-1	Proliferationsmarker
N-CAM	cell adhesion molecule
NM23	Tumorsuppressorgen
p16	Tumorsuppressorgen
p21	Tumorsuppressorgen
p53	Tumorsuppressorgen
PBS	phosphate-buffered saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PKC	Proteinkinase C

PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
ras	Superfamilie zusammengefasste Proteine
RB	Retinoblastom
SDS	sodium dodecyl sulfate
TBS	trisbuffered saline
TETRA	Tetrachloerethylen
TGF	transforming growth factor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetate
TRI	Trichlorethylen
Tris	tris[hydroxymethyl]aminomethane
uPAR	urokinase-type plasminogen activator receptor
VEGF	vascular endothelial growth factor

## Curriculum Vitae

Name	Mastorakis Avraam
Geburt	08. Juni 1971, Athen Griechenland
Familienstand	ledig
Eltern	Mastorakis Kyriakos, Mastoraki Angeliki

### ***Bildung***

1977 – 1989 Schulbesuch mit dem Abschluß der Allgemeinen Hochschulreife – „Apolyterion“ in Athen

### ***Deutsche Sprache***

09/1989 – 07/1990 Studium der deutschen Sprache in der Sprachschule der Universität Heidelberg

### ***Hochschulbildung***

05/1991 – 11/1998 Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

### ***Famulaturen***

09/1994 – 10/1994	Krankenhaus der griechischen Luftwaffe, Athen, Intensivstation – Innere Medizin
09/1995 – 10/1995	Northern General Hospital of Sheffield University, Great Britain, Innere Medizin
03/1996 – 04/1996	Universitätsklinik Würzburg Pharmakologie und Toxikologie
08/1996 – 09/1996	HNO – Praxis in Athen

### ***Praktisches Jahr***

10/1997 – 02/1998	Chirurgie, Universitätsklinik Würzburg
02/1998 – 06/1998	Gynäkologie, Universitätsklinik Würzburg
06/1998 – 09/1998	Innere Medizin, Universitätsklinik Würzburg

### ***Weiterbildung im Fachgebiet Chirurgie***

01.01.1999 – 15.05.1999	AiP in der Cnopf'sche Klinik Nürnberg-Kinderchirurgie
16.05.1999 – 30.06.2000	AiP in der Chirurg. Universitätsklinik Würzburg (Intensivstation und Kinderchirurgie)
01.07.2000 - bis heute	Kinderchirurgie und DRG's Chirurg. Universitätsklinik Würzburg

***Forschung***

09/2003 – 2006

Dissertation:  
Untersuchung des Einflusses von Dichlorvinylcystein auf den  
Zellzyklus in LLC-PK1 Zellen unter besonderer  
Berücksichtigung von Wachstumsfaktoren

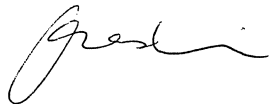
***Sprachkenntnisse***

Griechisch

Englisch

Deutsch

First certificate of English-  
University of Cambridge

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Gast' with a flourish at the end.

