

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg
(Lehrstuhl für Toxikologie)
Vorstand: Prof. Dr. W. K. Lutz

**Über die Beteiligung EGF-Rezeptor-vermittelter
Signaltransduktionswege an den tumorpromovierenden
Effekten von 2-Acetylaminofluoren, 2-Nitrosofluoren
und Phenobarbital in HepG2-Zellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Anja Flunt
aus Münchberg

Würzburg, Juni 2002

Referent: Prof. Dr. H. G. Neumann
Koreferent: Prof. Dr. H. Stopper
Dekan: Prof. Dr. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Promovendin ist Ärztin

1	Einleitung	1
1.1	Das Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese	1
1.2	Aromatische Amine und ihre Bedeutung für die experimentelle Krebsforschung	3
1.3	Metabolisierung des AAF	4
1.4	Nitrosofluoren (NOF)	6
1.5	Phenobarbital: Bekannte Effekte eines Tumorpromotors	8
1.6	Die Rolle von Tumorpromotoren auf der Ebene der Signaltransduktion	10
1.6.1	EGF-Rezeptor	10
1.6.2	Proteinkinase C	13
1.7	Transkriptionsfaktoren in der Tumorpromotion	14
1.7.1	c-fos	14
1.7.2	c-jun	15
1.7.3	Der AP1-Komplex	16
1.7.4	NFκb	17
1.8	Zielsetzung der Arbeit	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Zellkultur	21
2.1.1	Zelllinie	21
2.1.2	Routinekultur der Zellen	22
2.1.3	Kryokonservierung der Zellen	23
2.1.4	Auftauen der Zellen	23
2.1.5	Mykoplasmentest	24
2.1.6	Zellzählung	24
2.1.7	Behandlung der Zellen	25
2.2	Gesamtproteingewinnung	26
2.3	Photometrische Bestimmung der Proteinmenge	27
2.3.1	Photometrische Bestimmung mit Pyrogallol-Rot	27
2.3.2	Photometrische Bestimmung mit BCA	28
2.4	Immunoblotting	28
2.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	29
2.4.1.1	Zusammensetzung der Polyacrylamidgele	29
2.4.1.2	Färben und Trocknen der Gele	30

2.4.2	Western-Blotting mit anschließender Proteindetektion	31
2.4.3	Immunopräzipitation (IP)	33
2.5	Gel-Mobility-Shift-Assay	35
2.5.1	Anreicherung von Proteinen aus dem Zellkern für Bindungsassays	36
2.5.2	Gelelektrophorese der Protein-DNA-Komplexe	37
2.5.2.1	Zusammensetzung des Acrylamidgels	38
2.5.3	Naßblot und Digoxigeninfärbung	39
2.6	Zytotoxizitätsnachweis: Laktat-Dehydrogenase-Aktivität (LDH)	40
2.7	Zellwachstum: Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zellen	41
2.8	Statistik	42
3	Ergebnisse	44
3.1	Wachstumsverhalten der HepG2-Zellen unter Behandlung mit AAF, NOF und Phenobarbital jeweils ohne und mit C-PKC-Inhibitor GF109203X	44
3.1.1	AAF	44
3.1.2	NOF	46
3.1.3	Phenobarbital	47
3.2	Laktat-Dehydrogenase-Test zur Beurteilung der Zytotoxizität	49
3.2.1	AAF	50
3.2.2	NOF	51
3.2.3	Phenobarbital	52
3.3	Bestimmung der Protein-Expression des EGF-Rezeptors, der Protein-kinase C, c-fos und c-jun unter Behandlung mit AAF, NOF und Phenobarbital	54
3.3.1	Bestimmung der Expression des EGF-Rezeptors	54
3.3.1.1	AAF	54
3.3.1.2	NOF	55
3.3.1.3	Phenobarbital	56
3.3.1.3.1	Aktivität des EGF-Rezeptors unter Behandlung mit 2mM Phenobarbital	59
3.3.2	Bestimmung der Expression der c-PKC unter Behandlung mit AAF, NOF und Phenobarbital	60
3.3.3	Bestimmung der Expression von c-fos unter Behandlung mit AAF,	

	NOF und Phenobarbital _____	62
3.3.4	Bestimmung der Expression von c-jun unter Behandlung mit AAF, NOF und Phenobarbital _____	64
3.4	Bestimmung der aktiven Transkriptionsfaktoren AP1 und NFκB im Kernprotein unter Behandlung mit AAF, NOF und Phenobarbital _____	66
3.4.1	Bestimmung des aktiven Transkriptionsfaktors AP1 _____	67
3.4.1.1	AAF _____	67
3.4.1.2	NOF _____	67
3.4.1.3	Phenobarbital _____	68
3.4.2	Bestimmung des aktiven Transkriptionsfaktors NFκB _____	68
3.4.2.1	AAF _____	68
3.4.2.2	NOF _____	70
3.4.2.3	Phenobarbital _____	70
4	Diskussion _____	72
4.1	Wachstumsverhalten der HepG2-Zellen unter Behandlung und zytotoxische Wirkung von AAF, NOF und Phenobarbital _____	72
4.2	Modulation der Signaltransduktion auf verschiedenen Ebenen _____	77
4.2.1	EGF-Rezeptor _____	77
4.2.2	Proteinkinase C _____	79
4.2.3	c-fos , c-jun, AP1 und NFκb _____	81
5	Zusammenfassung _____	86
6	Literaturverzeichnis _____	89
7	Abkürzungsverzeichnis _____	103

1 Einleitung

In den westlichen Industrieländern stellt Krebs nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Physikalisch Einflüsse (z.B. Strahlung), biologische Faktoren (z.B. viral assoziierte Tumoren) und chemische Agentien (polyzyklische Kohlenwasserstoffe, aromatische Amine, usw.) sind häufig maßgeblich an der Entstehung und der Progredienz des Krebsgeschehen beteiligt.

Aufgrund zahlreicher *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen konnte das wissenschaftlich allgemein anerkannte Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese entwickelt werden. Für einige Kanzerogene sind außer der DNA als Zielstruktur Rezeptoren und Signalkaskaden bekannt, die auf den verschiedenen Stufen am Prozess beteiligt sind, dennoch ist vieles ungeklärt. Ein detaillierteres Verständnis vom Zusammenspiel der verschiedenen molekularen Mechanismen bei der Krebsentstehung würde neue Perspektiven in Prävention und Behandlung eröffnen.

1.1 Das Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese

Die Krebsentstehung ist im allgemeinen ein langsamer Prozeß, der sich häufig über Jahre erstreckt und überwiegend in drei Stufen verläuft. Dieses Konzept scheint für endogene, spontan entstehende Tumoren genauso gültig zu sein wie für exogen z. B. durch Viren oder Chemikalien induzierte Tumoren (Weinstein 1988) Die ersten Erkenntnisse hierzu lieferten Versuche, die zur Entstehung von Hauttumoren bei der Maus durchgeführt wurden (Berenblum and Shubik 1947).

Die erste Phase, die Initiation, beruht auf einem irreversiblen, genotoxischen Effekt, der bereits durch die einmalige Gabe eines initiierenden Kanzerogens erzeugt werden kann. Häufig geschieht dies aufgrund von DNA-Adduktbildung, wie es z. B. für das 2-Acetylaminofluren typisch ist. In der anschließenden zweiten Phase, der Promotion, kommt es zur Ausprägung des in der ersten Stufe gesetzten DNA-Schadens. Promotoren sind folglich Stoffe, die selbst keine genotoxische Wirksamkeit besitzen, d. h. ohne

vorausgegangene Initiation keinen Tumor erzeugen können, die jedoch reversibel die Genexpression beeinflussen und auf diese Weise zu einer erhöhten Zellproliferation führen können. Speziell in initiierten Zellen kommt es zu malignem, unkontrolliertem Wachstum. Die Tumorentstehung wird so entscheidend beschleunigt.

Der Wirkmechanismus einer Reihe von Tumorpromotoren wurde in Initiations-Promotions-Versuchen bereits gut untersucht, wobei eine selektive Toxizität der Promotoren gegenüber Normalzellen nachgewiesen werden konnte. Andererseits ist für viele Promotoren der molekulare Mechanismus ungeklärt. Grundsätzlich lassen sich zwei verschiedene Hypothesen zur tumorpromovierenden Wirkung von Chemikalien unterscheiden, die hier vereinfacht als zytotoxische bzw. nicht-zytotoxische Mechanismen bezeichnet werden.

In dem Modell von Solt und Farber (Farber et al. 1977) wurde z. B. Diethylnitrosamin (DEN) in hoher Dosis als Initiator eingesetzt und anschließend 14 Tage lang mit 0,02% 2-Acetylaminofluoren (AAF) als Promotor im Futter behandelt. Als weiterer Proliferationsstimulus wurde eine partielle Hepatektomie durchgeführt. Diesem Modell zufolge sollte AAF den initiierten Zellen einen selektiven Wachstumsvorteil verschaffen, indem es normale Zellen in der Mitose behindert (Ghoshal et al. 1983), während die resistenten neoplastischen Hepatozyten ("resistant hepatocyte") unter dem anhaltenden regenerativen Stimulus durch die zytotoxischen Bedingungen selektiv proliferieren. Diese Hypothese kann eventuell die promovierenden Effekte verschiedener hepatotoxischer Substanzen erklären, aber sie kann z.B. nicht für die tumorpromovierenden Eigenschaften von Phenobarbital (PB) oder anderen nicht-hepatotoxischen Agentien herangezogen werden.

Gerlyng und Seglen (Gerlyng et al. 1990) schreiben der Zytotoxizität selbst keine kausale Rolle in der Leberkanzerogenität zu. Nach ihrem Modell sind Tumorpromotoren keine indirekten (zytotoxischen), sondern direkte Wachstumsstimulatoren mit Effekten auf die normale Leber und gleichermaßen auf neoplastisch veränderte Zellen, wobei die Überempfindlichkeit der neoplastisch veränderten Zellen die Selektivität der Promotion

erklären könnte. Dieses Konzept wäre mit der Tatsache vereinbar, daß völlig verschiedene Stoffgruppen mit sehr unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften tumorpromovierende Wirkungen in der Leber zeigen.

Trotz der unterschiedlichen biologischen Aktivität lösen dennoch viele Chemikalien auch gemeinsame biochemische Effekte aus. Für einige nicht-gentoxische Kanzerogene sind die dabei involvierten Signalwege bereits bekannt. Oft wirken sie über Rezeptoren und Signalkaskaden, die physiologischer Bestandteil von Zellen sind. Tetradeconoylphorbolactetat (TPA), ein Bestandteil des Crotonöls, ist beispielsweise ein Promotor von Hauttumoren und bindet wie der endogene Ligand Diacylglycerol an die Proteinkinase C. Somit setzt es eine Signalkaskade in Gang, die zur Bildung der Proto-Onkogenprodukte FOS und JUN führt. Diese binden wiederum als Heterodimer (AP-1) an DNA und regulieren die Expression verschiedener anderer Gene (Nishina et al. 1990).

Für die Manifestation von malignem Wachstum ist neben vorausgegangener Initiation und Promotion eine weitere dritte Stufe notwendig, die Progression, die ebenfalls einen irreversiblen Schritt in der Kanzerogenese darstellt. Diese Phase zeichnet sich durch zahlreiche Veränderungen des Karyotyps der Tumorzellen aus. Invasives Wachstum ist nun möglich.

1.2 Aromatische Amine und ihre Bedeutung für die experimentelle Krebsforschung

Polyzyklische Amino- und Nitroverbindungen sind ubiquitäre Umweltchemikalien (Klöhn et al. 1995), die in der Natur nicht vorkommen. Sie entstehen bei Verbrennungsprozessen, bei der Produktion von Farbstoffen, Arzneimitteln, Pestiziden und Kunststoffen und sind in der Atmosphäre vieler Großstädte nachweisbar (IARC 1989, Lewtas and Gallagher 1990). Das 2-Acetylaminofluoren (AAF) wurde ursprünglich als Insektizid synthetisiert, gelangte aber wegen seines kanzerogenen Potentials nicht in den Handel. Es gewann dann als Modellsubstanz in der chemischen

Kanzerogenese große Bedeutung. Neben verschiedenen Spezies wirkt AAF vor allem in der Ratte kanzerogen und stellt in der Rattenleber ein komplettes Kanzerogen dar, d.h. es zeigt initiiierende und promovierende Eigenschaften. Dabei ist die kanzerogene Wirkung wesentlich von seiner Metabolisierung im Zielgewebe abhängig, denn nicht das AAF selbst, sondern reaktionsfähige Metaboliten können mit den Basen der DNA Addukte bilden: hierbei entstehen vor allem drei verschiedene Addukte des Guanins (Kriek 1969, Franz et al. 1986). Diese Addukte am Guanin produzieren häufig G->T Transversionen (Shibutani and Grollman 1993). Nach dem Mehrstufenkonzept stellt dies den initialen Schritt zur Tumorentstehung dar. Die DNA-Bindung und Mutagenität des AAF ist aber dennoch nicht ausreichend, um seine Eigenschaft als komplettes Kanzerogen in der Rattenleber zu erklären. Seine tumorpromovierenden Effekte konnten in vivo in Form einer erhöhten Proliferation von Hepatozyten der Periportalregion nachgewiesen werden (Hadijolov and Bitsch 1997). Als zugrundeliegender Mechanismus wird oxidativer Streß und die Beeinträchtigung des Energiehaushaltes der Hepatozyten durch den aktiven Metaboliten 2-Nitrosofluoren (NOF) postuliert (Klöhn et al. 1995). Die Metabolisierung von AAF in der Leber ist somit entscheidend für die kanzerogene Wirkung.

1.3 Metabolisierung des AAF

In der folgenden Abbildung werden in vereinfachter Form die Metabolisierungswege des AAF gezeigt. Die mikrosomale N-Hydroxylierung von AAF zu N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren (N-OH-AAF) erfolgt als erster Aktivierungsschritt in der Leber unter Beteiligung des Cytochrom P450 1A1 und Cytochrom P450 1A2. Beim Menschen weisen die Aktivierungswege der aromatischen Amine große individuelle Unterschiede auf (Kadlubar et al. 1992). Die polymorphe N-Hydroxylierung, die hauptsächlich durch CYP-1A2 katalysiert wird, ist durch zahlreiche Substanzen, u.a. durch Zigarettenrauch, induzierbar. Ein Vergleich des AAF-Metabolismus in menschlichen Hepatozyten und

Ratten-Hepatozyten läßt die Vermutung zu, daß Menschen empfindlicher gegenüber AAF-Effekten reagieren als Ratten (Rudo et al. 1987).

Die Hydroxamsäure N-OH-AAF ist jedoch nicht der einzige gentoxische Metabolit. Durch Veresterung können DNA-reaktive Substanzen entstehen. Eine N-O-Transacetylierung der Hydroxamsäure führt zu reaktiven Metaboliten, die ebenfalls befähigt sind, derartige Bindungen einzugehen. Die Deacetylierung der Hydroxamsäure führt zur Bildung des Hydroxylamins N-Hydroxy-2-aminofluoren (N-OH-AF). Dieses kann entweder durch weitere Veresterung direkt Bindungen mit Makromolekülen eingehen oder es kann durch Sauerstoff autoxidiert werden. Das entstehende 2-Nitrosofluoren (NOF) wirkt als Redoxcycler in der Atmungskette an der mitochondrialen Membran und induziert hierbei die Bildung von Superoxidanionen (Neumann et al. 1994).

Während die Ester von N-OH-AF und N-OH-AAF als gentoxische Metaboliten DNA reaktiv sind und somit für die initiierenden Eigenschaften des AAF verantwortlich gemacht werden, wird NOF die nicht-gentoxische tumorpromovierende Komponente des kompletten Kanzerogens AAF zugeschrieben (Neumann et al. 1990, Neumann et al. 1994, Bitsch et al. 1997).

Metabolisierung des 2-Acetylaminofluorens

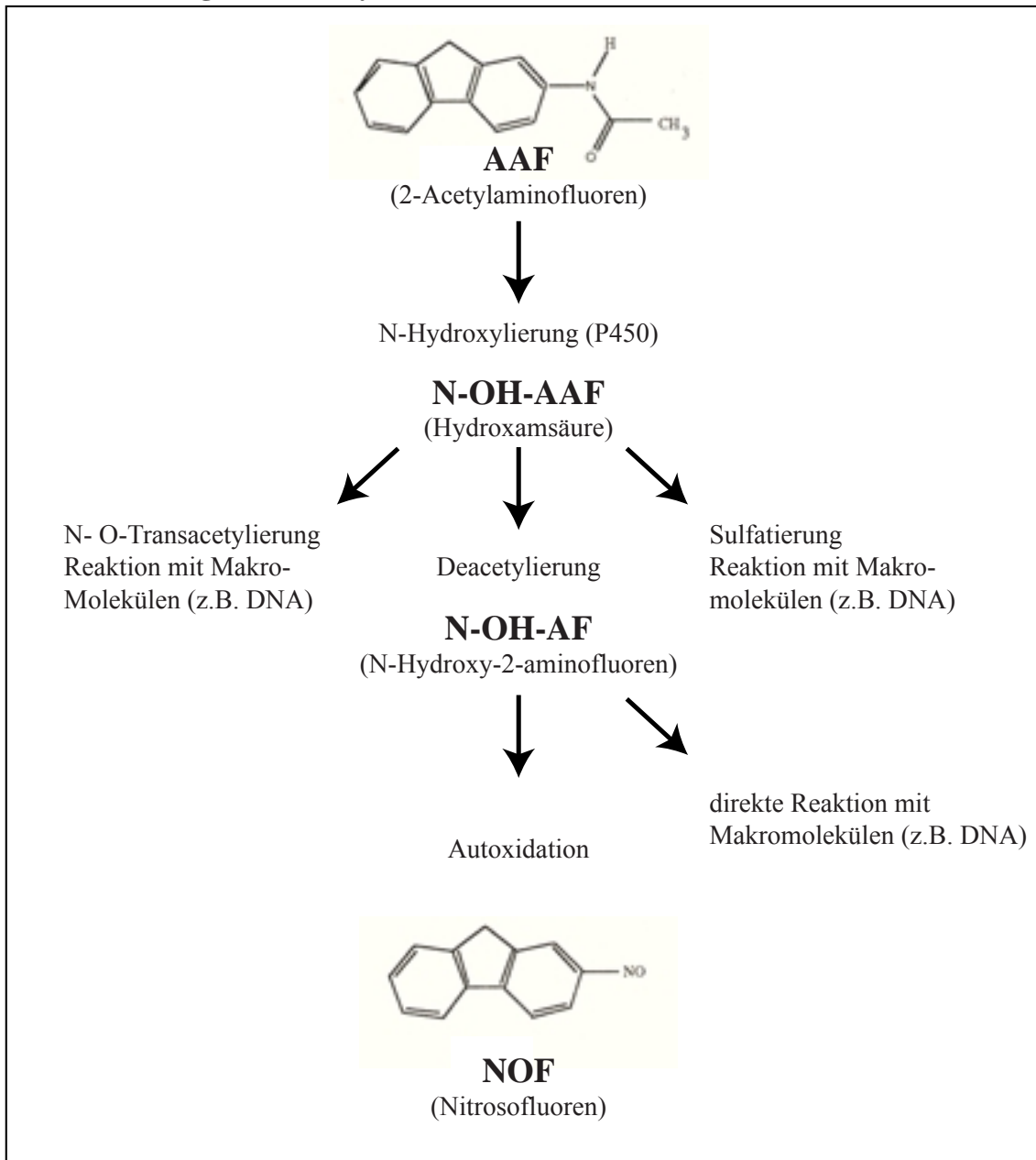


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Metabolisierung von AAF zu NOF in der Leber (Einzelheiten siehe Text)

1.4 Nitrosofluoren (NOF)

NOF wird wie oben bereits erwähnt für die nicht-gentoxischen Effekte des kompletten Kanzerogens AAF verantwortlich gemacht (Neumann et al. 1994). Die tumorpromovierenden Effekte sollen demnach durch oxidativen Streß entstehen, der sich

durch den nachfolgenden Mechanismus beschreiben läßt: Abb.2 zeigt, wie NOF in der mitochondrialen Atmungskette als Redoxcycler wirken kann (Klöhn et al. 1995).

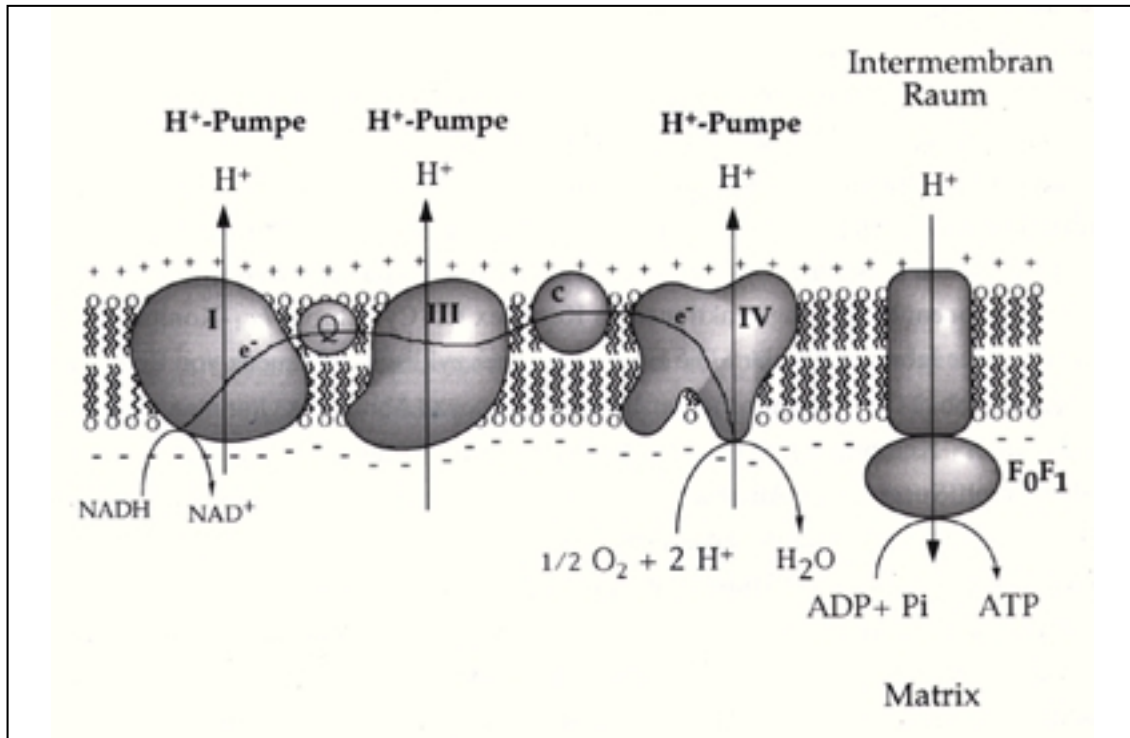


Abbildung 2: Die Atmungskette besteht aus 4 Komplexen (Komplex II wurde aus Übersichtsgründen weggelassen), zwei beweglichen Elektronencarriern, Ubichinon (Q) und Cytochrom c (c) und der ATP-Synthetase (F₀F₁-Komplex). NADH wird an der Matrixseite von Komplex I oxidiert. Die Elektronen fließen durch die Atmungskette und reduzieren Sauerstoff an Komplex IV. Der Elektronenfluss ist an drei Stellen der Atmungskette an die Extrusion von Protonen gekoppelt. Die Enthalpie, die durch das Zurückströmen der Protonen durch die ATP-Synthetasen frei wird, wird zur Phosphorylierung von ADP genutzt.

NOF reagiert an Komplex I und III als Elektronen-Akzeptor, indem es in einem Einelektronenschritt zum Nitroxylradikal (F-NH-O[•]) reduziert wird. Die Reoxidation dieses instabilen Nitroxylradikals durch anwesenden molekularen Sauerstoff in zellulären Systemen führt zur Bildung von Superoxidionen-Radikalen (O₂^{•-}). NOF stimuliert als Redoxcycler den Elektronenfluß, dies hat Einfluß auf den Energiehaushalt der Zelle (Neumann et al. 1994), die oxidative Phosphorylierung wird beeinträchtigt und in Folge führt dies zur ATP-Depletion der Zelle. Außerdem kommt es zu einer veränderten

Permeabilität der mitochondrialen „Permeability Transition Pore“ (PTP) (Klöhn et al. 1998). Bei dieser Pore handelt es sich um ein mitochondriales integrales Membranprotein, das an der Kontrolle des Membranpotentials und an Apoptose beteiligt ist. Bisher ist unklar, ob auch das Antiapoptoseprotein Bcl2 Baustein dieser Pore ist oder lediglich funktionell mit dieser assoziiert ist.

Mit den Enzymen Superoxiddismutase (SOD) und Gluthathionperoxidase (GPx) sind begrenzt zelluläre Entgiftungssysteme gegenüber oxidativem Streß vorhanden. Bei chronischer Exposition können diese überlastet werden. Es resultiert Zelltod und regenerative Zellproliferation.

1.5 Phenobarbital: Bekannte Effekte eines Tumorpromotors

Phenobarbital (Phenylethylbarbitursäure) gehört zur Gruppe der Barbiturate. In der Klinik findet diese Substanz als Sedativum, Hypnotikum und Antikonvulsivum Anwendung. Bei Initiations-Promotionsversuchen an der Rattenleber wird Phenobarbital sehr häufig als reiner Tumorpromotor verwendet. Es ist bekannt, daß Phenobarbital seine antikonvulsive und sedative Wirkung am GABA-Rezeptorkomplex hervorruft. Auf welchem Weg es hingegen tumorpromovierend wirkt, ist noch immer ungeklärt. Ebenso sind die Mechanismen unbekannt, die nach Phenobarbitalgabe adaptive Erscheinungen wie Enzyminduktion und morphologische Veränderungen in der Leber bewirken.

In den Lebern behandelte Tiere ist eine Vielzahl an morphologischen und metabolischen Veränderungen erkennbar: die Induktion von Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen ist eine seit langem bekannte Wirkung des Phenobarbitals (Conney and Gilman 1963). Es finden sich erhöhte Aktivitäten der mikrosomalen Epoxidhydrolase (Galteau et al. 1985), der UDP-Glucuronosyltransferasen (Jackson et al. 1986), verschiedener Glutathion-S-Transferasen (Sasaki et al. 1989) und einiger Isoenzyme des Cytochrom P 450 (Schulte-Hermann 1974) sowie der γ -Glutamyltranspeptidase, die in neoplastisch veränderten Foci erhöht exprimiert vorliegt und somit gleichzeitig als Marker für derartige Läsionen

gilt (Hong et al. 1995). Gesteigerte intrazelluläre Calciumkonzentrationen nach Phenobarbitalgabe lieferten einen Anhaltspunkt dafür, daß möglicherweise die Proteinkinase C am Induktionsprozeß beteiligt ist. Dogra und May (1996) konnten dies jedoch in ihrem Modell an Hühnerembryohepatozyten für die Induktion des CYP-2H1 nicht belegen. Möglicherweise sind die Induktionsmechanismen für die jeweiligen Enzyme unterschiedlich.

Morphologisch ist eine Erhöhung des glatten endoplasmatischen Reticulums in den Lebern phenobarbitalbehandelter Tiere nachweisbar (Burger and Herdson 1966), ebenso wie eine verstärkte RNA-Synthese und ein Anstieg der Aggregation von Polyribosomen gegenüber unbehandelten Leberzellen, was offenbar mit einer gesteigerten Proteinsynthese einhergeht (Ragnotti and Aletti 1975).

Die größte Bedeutung der Tumorpromotoren für die Entstehung von Tumoren liegt in einer Steigerung der Zellproliferation. Diese Wirkung ist auch nach Phenobarbitalbehandlung nachweisbar. Interessant sind in diesem Zusammenhang Beobachtungen am Lebergewebe von Ratten, die mit einem Initiator vorbehandelt wurden. Präneoplastisch veränderte Foci dieser Lebergewebe reagieren sowohl hinsichtlich der Enzyminduktion als auch hinsichtlich des Proliferationsverhaltens vergleichsweise stärker als umliegende nicht präneoplastisch veränderte Areale (Schulte-Hermann et al. 1986).

Ansatzpunkte für mögliche Wirkmechanismen lieferten Ergebnisse aus *in-vivo* Untersuchungen, in denen ein erhöhter Gehalt an c-fos-mRNA und FOS-Protein in den Lebern behandelter Ratten vor allem in den Bereichen um die Zentralvenen erkennbar waren (Bitsch et al. 1999). Hierbei wird dem EGF-Rezeptor eine wesentliche Rolle zugeschrieben (Eckl et al. 1988). Außerdem liegen Hinweise vor, daß Phenobarbital bei der Regulation des Apoptose-Proteins p53 (Gonzales et al. 1998) involviert sein könnte und seine promovierenden Eigenschaften möglicherweise unter Einfluß der Transkriptionsfaktoren AP1 (Pinkus et al. 1993) und NF κ b (Li et al. 1996) entfaltet.

1.6 Die Rolle von Tumorpromotoren auf der Ebene der Signaltransduktion

Sowohl für das komplette Hepatokanzerogen AAF, dessen initiiierende gentoxische Komponente bereits gut untersucht ist und für dessen aktiven Metaboliten NOF, dem die promovierenden Eigenschaften zugeschrieben werden, als auch für das in Initiations-Promotions-Versuchen häufig verwendete Phenobarbital wird aufgrund vorliegender Ergebnisse diskutiert, auf welche Weise diese drei unterschiedlichen Stoffe die Expression der Protoonkogene c-fos und c-jun und der Transkriptionsfaktoren AP1 und NF κ b über den Angriffe am EGF-Rezeptor und der Proteinkinase C erhöhen.

1.6.1 EGF-Rezeptor

Der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGF-Rezeptor) ist ein 170 kD schweres transmembranes Glykoprotein mit einer extrazellulären Ligandenbindungsstelle, einem lipophilen transmembranären Abschnitt und einer zytoplasmatischen Domäne, die eine Phospho-Tyrosin-Kinase-Aktivität besitzt (Ullrich et al. 1984). Der Rezeptor wird durch die zellulären Proto-Onkogene c-erb und c-fms kodiert und ist in den meisten Zelltypen vorhanden. Liganden des EGF-Rezeptors sind der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und der transformierende Wachstumsfaktor α (TGF α). EGF, der in nahezu allen Körperflüssigkeiten vorkommt, wird von Niere und Speicheldrüse synthetisiert und wirkt über einen endokrinen Weg. TGF α wird sowohl physiologisch als auch von malignen Zellen produziert und entfaltet seine Wirkung auf parakrinem, autokrinem und juxtakrinem Weg. Unter physiologischen Bedingungen spielt der EGF-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung, bei der Zellproliferation und Differenzierung. Durch Expression mutierter Rezeptoren, durch eine Überproduktion der EGF-Rezeptor spezifischen Liganden oder durch Überexpression des Rezeptors selbst sind ausreichend Möglichkeiten gegeben, um an der Kanzerogenese beteiligt zu sein.

In Abwesenheit von Liganden sind die Rezeptoren homogen auf fast allen Körperzellen vorhanden. Extrazelluläre Ligandenbindung bewirkt durch Konformationsänderung die Stimulation der cytosolisch lokalisierten Tyrosinkinase-Aktivität, was zur Autoaktivierung und Phosphorylierung von Tyrosin-Resten außerhalb des aktiven Zentrums führt. Durch diese Phosphorylierung können Effektorproteine, die über Phosphotyrosin-bindende Proteindomänen wie SH2 verfügen, an diese aktivierten Bindungsstellen andocken und auf diese Weise weitere nachgeschaltete Effektormoleküle der Signalübertragung aktivieren. Im Rahmen dieser Arbeit sind vor allem folgende Signaltransduktionswege ausgehend vom EGF-Rezeptor von Bedeutung:

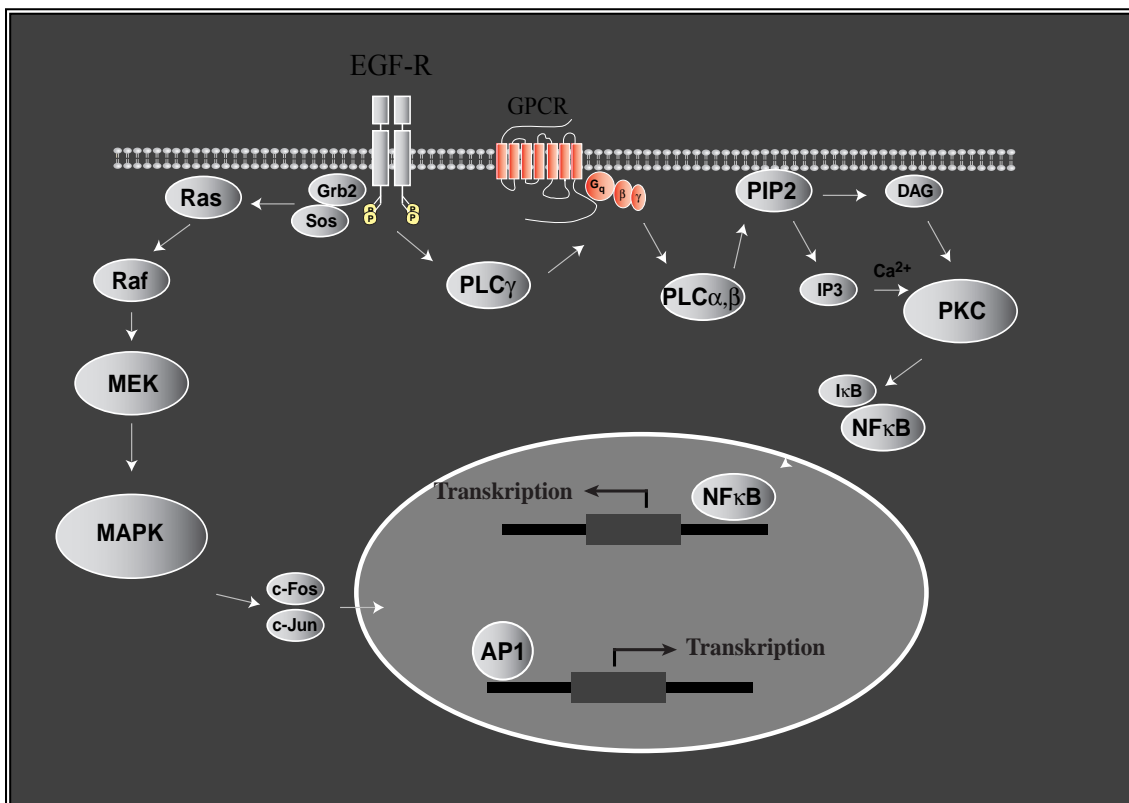


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Signaltransduktion vom EGF-Rezeptor zur Aktivierung von AP-1 (Einzelheiten siehe Text)

- Die Aktivierung der PhospholipaseC γ (PLC γ) durch den EGFR führt zur Phosphorylierung von Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP2), es entstehen die beiden second-messenger Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG). IP3

führt zur Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern und führt so zur Aktivierung weiterer Signalwege (Ullrich et al. 1984). DAG hingegen steht in Wechselwirkung zur Zellmembran und aktiviert die ProteinkinaseC (Kikkawa et al. 1986).

- Eine im Zusammenhang mit der Krebsentstehung wichtigere Kaskade, die durch den EGF-Rezeptor aktiviert wird, beinhaltet das membrangebundene ras-Protein. Ihm wird eine Schlüsselrolle in der Mitogenese zugeschrieben (Bokoch and Der 1993). Das ras-Protein aktiviert Raf bzw. dient ihm als membranärer Anker (Leevers et al. 1994). Raf 1 ist eine Serin-Threonin-Kinase, die weitere Kinasen aktiviert, sogenannte MEK (MAP/ERK-Kinasen). Diese wiederum führen zur Stimulierung der MAP-Kinasen, welche die Induktion zahlreicher Wachstumsfaktoren bewirken, unter anderem auch den durch die beiden Protoonkogene c-fos und c-jun gebildeten Wachstumsfaktor AP1.

Dieses vom EGF-Rezeptor ausgehende Netzwerk von Signalwegen stellt ein sehr effizientes System dar, so konnte bereits nach 6 min eine durch EGF induzierte erhöhte c-fos Expression in Zellen nachgewiesen werden (de Groot et al. 1991).

Die Überexpression des EGF-Rezeptors ist in menschlichen Tumoren häufig zu beobachten. Im Gegensatz hierzu ist die EGF Bindung in der regenerierenden Leber sowie in Leberknoten und Hepatomen deutlich erniedrigt (Earp and O'Keefe 1981). Dies legt den Schluß nahe, daß der ruhende Hepatozyt signifikant mehr EGF-Rezeptor exprimiert als der proliferierende Hepatozyt (Eriksson and Andersson 1992). Untersuchungen der Effekte verschiedener Tumorpromotoren auf die EGF-Rezeptor-Expression in der Leber unterstützen diese Beobachtungen. Der Phorbolester TPA erniedrigt die EGF Bindung z.B. in Hepatozyten, A431-, HepG2- und Hepatomzellen. Ebenso inhibieren PB (Meyer et al. 1989) und AAF (Josefsberg et al. 1984) die EGF Bindung an den Rezeptoren in Membranen von Mikrosomen und des Golgi-Apparates, ohne mit EGF um die Bindungsstelle zu konkurrieren.

1.6.2 Proteinkinase C

Zur Familie der Proteinkinase C werden Ser/Thr –spezifische Proteinkinasen gerechnet, die Ca^{2+} , Phosphatidylcholin und Diacylglycerol (DAG) als Kofaktoren benötigen. In Säugetieren sind bisher 12 Subtypen bekannt, die sich hinsichtlich Sequenz, Stimulierbarkeit und Regulation unterscheiden. Die Mitglieder der Proteinkinase C-Familie sind aus einer Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 68-83 kDa aufgebaut. In der Primärstruktur können eine N-terminale regulatorische Domäne sowie eine C-terminale katalytische Domäne unterschieden werden. Für die Regulation der Kinaseaktivität sind Pseudosubstratsequenzen am C-Terminus, der C1-Abschnitt mit zwei cysteinreichen Domänen Cys1 und Cys2 sowie der C2 Abschnitt von Bedeutung. In der Domäne C1 liegt die Bindungsstelle für TPA, die Domäne C2 enthält die Ca^{2+} Bindungsstelle, die nicht bei allen Mitgliedern der Familie enthalten ist.

In inaktivem Zustand ist die Pseudosubstratsequenz an das aktive Zentrum gebunden und die Kinase liegt zusammengeklappt im Cytosol vor. Durch Bindung der Kofaktoren wird wahrscheinlich eine Struktur der Proteinkinase C stabilisiert, in der das aktive Zentrum für Substratproteine zugänglich ist. Die Aktivierung der Proteinkinase C ist mit einer Umverteilung vom Cytosol zur Membran assoziiert und kann vor allem über zwei zentrale Signalwege erfolgen:

- Signalwege, die durch Rezeptor-Tyrosinkinasen wie dem EGF-Rezeptor ausgehen, leiten eine Stimulation des Enzymes ein, indem Phospholipase $\text{C}\alpha$ aktiviert wird.
- Auch von G-Protein gekoppelten Membranrezeptoren kann über die Phospholipase $\text{C}\beta$ eine Aktivierung erfolgen.

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* kann der Phorbolster TPA, der tumorpromovierende Eigenschaften besitzt, DAG ersetzen, indem er die Proteinkinase C direkt zu stimulieren vermag (Castagna et al. 1982). Nachfolgende Studien bestätigten, daß die PKC als Hauptziel für die promovierenden Eigenschaften der Phorbolster anzusehen ist

(Nishizuka 1984), da sie als zentrales Element an der Regulation von Proliferations- und Differenzierungsprozessen beteiligt ist.

Substrate dieser Enzymfamilie sind der Inhibitor $I_{\kappa B}$ des Transkriptionsfaktors $NF_{\kappa B}$, die Raf-Kinase und der Rezeptor für das Vitamin D_3 , sowie die MARCKS-Proteine (Myristoyliertes, Alanin-reiches C-Kinase-Substrat.). Dies sind Proteine, die an physiologisch wichtigen Vorgängen wie Zellmobilität, Sekretion, Membrantransport sowie an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind (Aderem 1992)

1.7 Transkriptionsfaktoren in der Tumorpromotion

1.7.1 c-fos

c-fos ist ein Protoonkogen und zählt zu den sogenannten “primary-response”-Genen, die dadurch charakterisiert sind, daß sie durch Modulation bereits vorhandener Transkriptionsfaktoren und Second-messenger-Systeme innerhalb sehr kurzer Zeit induziert werden können.

Zur fos-Genfamilie gehören fra-1, fra-2 und fos-B, die eine gewisse Homologie in der Gensequenz besitzen (Herschman 1991). Den Proteinen der fos-Genfamilie wird eine Rolle bei der Differenzierung der Zelle, der Proliferation, in der Tumorpromotion und der Regulation des Zellzyklus zugeschrieben (Muller and Wagner 1984, Angel and Karin 1991).

Physiologisch wird das c-fos-Gen auf einem geringen Ausgangsniveau exprimiert und kann durch entsprechende Stimuli innerhalb von Minuten induziert werden. Eine Überexpression, wie z.B. in c-fos transgenen Mäusen führt zur Ausbildung von Knochentumoren, Osteosarkomen und weiteren Knochendeformitäten (Ward and Joung 1976, Ruther et al. 1987). Die Tatsache, daß auch in humanen Tumoren erhöhte mRNA-Spiegel des c-fos-Gens und erhöhte FOS-Proteinspiegel nachweisbar sind, deutet daraufhin, daß dieses “early-response” Gen auch eine Rolle bei der Tumorentstehung beim Menschen spielt (Alt and Grassmann 1993)

Die Expression des c-fos Gens kann durch Serum aufgrund des SRE (Serum responsive elements), Wachstumsfaktoren wie EGF oder Tumorpromotoren wie Phenobarbital oder TPA induziert werden. Grundsätzlich erfolgt die Aktivierung des c-fos-Gens und der verwandten Gene nach dem gleichen Prinzip: zu Beginn findet eine Ligand-Rezeptor-Interaktion statt, wodurch es über bereits vorhandene Second-Messenger zur Aktivierung einer Proteinkinase kommt und durch weitere Phosphorylierung die entsprechenden Transkriptionsfaktoren stimuliert werden.

Für einige Induktoren des c-fos-Gens ist der genaue Signaltransduktionsweg aufgeklärt. Sowohl EGF als auch der Phorbolster TPA übertragen ihr Signal über die ProteinkinaseC bis hin zum SRE (Herschman 1991). Für andere Tumorpromotoren wie für das Phenobarbital liegen keine sicheren Ergebnisse vor.

Das c-fos-Gen unterliegt einer Autoregulation, wobei das Fos-Protein über das SRE eine Aktivierung der Transkription bewirkt und über das DSE (Dyad Symmetry Element) eine Repression vermittelt (Konig et al. 1989). Die Erhöhung der Genprodukte ist ähnlich wie bei anderen "primary-response" Genen nur transient, da die m-RNA relativ instabil ist: Durch wiederholte ATTA-Sequenzen am 3'-Ende der codierenden Region finden abbauende Enzyme ihren Angriffspunkt (Wilson and Treisman 1988).

1.7.2 c-jun

c-jun ist wie c-fos ein Proto-Onkogen und wird aufgrund der sehr schnellen Induzierbarkeit zu den "early-response" Genen gezählt. c-Jun bildet mit jun B und jun D die jun-Genfamilie (Hirai et al. 1989), denen eine gewisse Homologie in der Gensequenz gemeinsam ist und größtenteils mit der fos-Genfamilie koreguliert wird (Lamph et al. 1988).

In der embryonalen Entwicklung liegt ein relativ konstanter c-jun-Level vor (Ryder and Nathans 1988). Es ist jedoch ein gewebespezifisches Verteilungsmuster vorhanden: so finden sich erhöhte c-jun Level in Ovarien und Herz, während jun-B unter anderem in

Hoden und Ovarien erhöht ist (Hirai et al. 1989). Im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Leberregeneration an Ratten war nach partieller Hepatektomie neben anderen Proto-Onkogenen eine deutlich gesteigerte Expression der jun-Genfamilie nachweisbar.

Ebenso wie c-fos ist c-jun durch Tumorpromotoren wie TPA (Allegretto et al. 1990), durch Serumfaktoren wie Proteinkinase A (Lamph et al. 1988) oder Wachstumsfaktoren wie EGF (Ryder and Nathans 1988) induzierbar. Im Gegensatz zu c-fos führt das Genprodukt des c-jun bzw. des aus c-fos und c-jun gebildeten AP 1-Komplexes (Angel et al. 1988), nicht zur autoregulatorischen Repression, sondern vielmehr zur Induktion. Der schnelle Abbau der mRNA erfolgt nach dem gleichen Prinzip, wie oben für die fos-RNA beschrieben wurde.

1.7.3 Der AP1-Komplex

Der AP1-Komplex (transcription factor activator protein 1) ist als Transkriptionsfaktor an der Regulation der Genexpression beteiligt, indem er mit hoher Affinität an eine für ihn spezifische DNA-Region bindet. Sie wird als „AP1-Binding-Site“ bezeichnet und enthält die Sequenz TGA CTCA.

Der AP1-Komplex liegt als Dimer vor, wobei grundsätzlich die Bildung von Homodimeren aus der jun-Genfamilie oder die Entstehung von Heterodimeren mit Proteinen aus der fos-Familie und der jun-Familie möglich ist. Die Dimerisierung der Proteine findet am sogenannten “leucine-zipper” statt. Darunter ist eine Domäne im α -helikalen Bereich zu verstehen, die in der Lage ist, mit der entsprechenden Region eines anderen Proteins eine hydrophobe Bindung einzugehen. Diese Bindung ist bei der Bildung von Homodimeren weniger stabil als bei der Entstehung von Heterodimeren. Von der Zusammensetzung des AP1-Komplexes unabhängig ist jedoch die Bindungsaffinität an die DNA-Binding-Site, die durch die DNA-bindende-Domäne am aminoterminalen Ende des “leucin-zippers” der Proteine gewährleistet wird. Die

Anlagerung des AP1-Komplexes an die entsprechende DNA-Region zieht die Induktion verschiedener Gene nach sich, u.a. auch die Induktion von c-fos und c-jun. Derartige Domänen, an die der AP1-Komplex binden kann sind z.B. das ARE-, TRE- und das EpRE-Element. Im Rahmen der Zellzyklusregulation entfaltet AP1 seine regulatorische Funktion u.a. über das SRE, das für Zellproliferation und Zellzyklus von Bedeutung ist (Curran and Franza 1988).

Es konnte gezeigt werden, daß Phenobarbital in der Rattenleber verschiedene Enzyme wie z.B. P450-Monooxygenasen, UDP-Glucuronosyltransferasen, Glutathion-S-Transferasen und Chinon-Reduktasen über diese DNA-Elemente induziert (Pinkus et al. 1993).

1.7.4 NF κ B

Der nukleäre Faktor κ B gehört zur Gruppe der NF κ B/Rel Proteine, einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die regulatorisch bei Zellkommunikation, bei der embryonalen Entwicklung und insbesondere bei Entzündungsvorgängen, bei viralen und bakteriellen Infektionen oder bei jeglicher Art von Streß beteiligt sind.

In der aktiven DNA-bindenden Form liegt NF κ B als Dimer vor. Das Dimer kann sich aus den bisher fünf bekannten Mitgliedern der NF κ B/Rel-Familie zusammensetzen, zu denen NF κ B1 (p50 und dessen Precursor Protein p105), NF κ B2 (p52 und dessen Precursor p100), c-Rel, RelA (p65) und RelB gezählt werden (Siebenlist et al. 1994). Das Heterodimer aus p65 und p50 war die erste Form, die identifiziert werden konnte und ist gleichzeitig die Form, die in den meisten Zelltypen vorhanden ist. Diesen Proteinen ist die sogenannte Rel homologe Region (RHR) gemeinsam. Diese Region ist verantwortlich für die Dimerisierung durch hydrophobe Wechselwirkung am C-terminalen Ende, außerdem für die DNA-Bindung durch zwei Immunglobulin verwandte Domänen und für die Interaktion mit dem Inhibitor-Protein I κ B. Schleifen innerhalb des N-terminalen Endes sind für die nukleäre sequenzspezifische Erkennung verantwortlich

(Chen et al. 1998). Die verschiedenen Dimere besitzen unterschiedliche Bindungsaffinitäten für κ B-Bindungsstellen an der DNA. Ebenso bestehen Unterschiede in dem Ausmaß der Transkriptionsaktivierung.

NF κ B wird durch viele unterschiedliche Stimuli aktiviert. Potente Aktivatoren sind vor allem die Zytokine TNF α und Interleukin 1 (IL-1), sowie T und B-Zell-Mitogene, Bakterien und bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), Viren, virales Protein, doppelsträngige (ds) RNA oder physikalischer und chemischer Streß.

NF κ B reguliert die Transkription von Genen, die vor allem an einer Immunantwort oder an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind (Siebenlist et al. 1994). Unter gewissen Umständen verhindert es Apoptose, gegebenenfalls ist es jedoch auch in der Lage, Apoptose zu induzieren, so wirkt NF κ B in der regenerierenden Leber antiapoptotisch und fördert gleichzeitig die Mitose indem es in die Zellzyklusregulation eingreift (Brenner 1998). Eine inadäquate Regulation des nukleären Faktor κ B kann zur Entstehung von Krebs, zur Ausprägung von neurodegenerativen Erkrankungen, Ataxia-teleangiectasia, Arthritis, Asthma und zu weiteren entzündlichen Geschehen beitragen.

In inaktivem Zustand liegt der Transkriptionsfaktor gebunden an das Inhibitorprotein I κ B im Cytosol vor. Die I-Familie besteht aus acht Mitgliedern, von denen I κ B α und I κ B β die größte regulatorische Funktion besitzen (Whiteside and Israel 1997). Externe und interne Signale (s.o.) führen über unterschiedlichste Signalwege letztendlich zur Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes (bestehend aus IKK1 und IKK2), die eine Phosphorylierung spezifischer Serin-Reste der N-terminalen Domäne des I κ B-Proteins nach sich ziehen. Das phosphorylierte Protein wird mit Ubiquitin konjugiert und auf dem 26S-Proteosom-Weg degradiert. Diese Degradierung führt zur Freigabe des NLS von NF κ B und ermöglicht den Transport in den Kern, vermutlich durch Bindung an Karyopherine (Hirano et al. 1998).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Nach dem Initiations-Promotionsmodell besitzt das komplette Kanzerogen AAF sowohl initiierende, genotoxische als auch promovierende, nicht-genotoxische Eigenschaften, die seinem aktiven Metaboliten NOF zugeschrieben werden. Es wird postuliert, daß NOF seine promovierenden Eigenschaften aufgrund chronischer Zytotoxizität durch Beeinträchtigung des zellulären Energiehaushaltes entfaltet.

Phenobarbital, das in der Klinik als Antiepileptikum Anwendung findet, wird in der Forschung -speziell in Initiations-Promotionsversuchen zur Hepatokanzerogenese- als reiner Tumorpromotor eingesetzt. Während Phenobarbital seine antikonvulsive und sedative Wirkung über den GABA-Rezeptorkomplex entfaltet, ist bisher nicht bekannt, auf welchem Weg es tumorpromovierend wirkt. Diese drei Stoffe besitzen somit hinsichtlich der Kanzerogenese völlig unterschiedliche Eigenschaften.

Aufbauend auf die im Tierversuch gemachten Beobachtungen an den Lebern männlicher Ratten innerhalb dieser Arbeitsgruppe von Muster (1992), Deubelbeiss (1994) und Klöhn (1997) und auf die sich anschließenden *in vitro*-Versuche von Jakob (1999) und Lüling (1999) soll in dieser Arbeit der mögliche Beitrag bestimmter Effekte auf die EGF-Rezeptor vermittelten Signaltransduktionswege zur kanzerogenen Wirkung dieser drei unterschiedlichen Stoffe in HepG2-Zellen untersucht werden:

Es ist bereits bekannt, daß Phenobarbital- und AAF-Behandlung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu einem erhöhter Spiegel an FOS-Protein und JUN-Protein führen. Ebenso scheint die Expression des EGF-Rezeptors (EGFR) und auch die Bindungsfähigkeit von EGF an den Rezeptor durch diese Stoffe beeinflusst zu werden. Ziel ist es deshalb, den Signalweg ausgehend vom EGF-Rezeptor speziell über die Proteinkinase C bis auf die nukleäre Ebene hin zu untersuchen. Als Parameter sollen die Messung von Expressionsänderungen des EGFR selbst, der PKC und der Protoonkogene c-fos und c-jun, sowie der Nachweis einer veränderten Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren AP1 und NFκB dienen. Rückschlüsse auf eine Rolle der PKC sollen gezogen werden,

wenn nach Blockade der PKC durch den unspezifischen PKC-Inhibitor GF109203X die oben genannten Parameter entsprechend verändert werden.

Parallel sollen Veränderungen im Wachstumsverhalten der behandelten Zellen und das Maß der Zytotoxizität der jeweiligen Stoffe untersucht werden. Auch hierbei erfolgt die Messung sowohl ohne als auch mit Inkubation der behandelten Zellen durch den PKC-Inhibitor GF109203X.

2 Material und Methoden

Alle Chemikalien und Reagenzien, die nicht gesondert mit Bezugsquelle aufgeführt sind, wurden von den Firmen Boehringer, Calbiochem, GIBCO BRL, Merck, Santa Cruz, Serva, Sigma und Roth bezogen.

2.1 Zellkultur

Als Alternative zum Tierversuch können bei bestimmten Untersuchungen in-vitro Zellsysteme verwendet werden. Die Grundlage für diese Arbeit sind sowohl an den Lebern behandelte Tiere als auch mit in-vitro Zellsystemen erarbeitet worden. Der Leber in vivo am nächsten kommen frisch isolierte und nicht transformierte Leberzellen. Der Nachteil besteht jedoch in dem sehr hohen Arbeitsaufwand, die Zellen zu isolieren und der damit verbundenen geringen Reproduzierbarkeit der Versuche, da ständig neue Zellen gewonnen werden müssen. Demgegenüber besitzen kontinuierliche Zelllinien, wie sie in dieser Arbeit und auch in den vorausgehenden Untersuchungen verwendet wurden den Vorteil, daß sie über lange Zeiträume zur Verfügung stehen und sogar in-vitro Systeme verschiedener Labors vergleichbar sind, wenn mit der gleichen Zelllinie gearbeitet wird. Abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen können fast alle Funktionen des Stammgewebes erhalten sein oder bei stark entdifferenzierten Zelllinien vollständig fehlen.

2.1.1 Zelllinie

Die verwendete Zelllinie HepG2 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. F.J. Wiebel (GSF, München) zur Verfügung gestellt. HepG2 stellt eine kontinuierliche Zelllinie dar, die aus einem menschlichen Hepatoblastom isoliert wurde. Somit handelt es sich um eine sehr gut differenzierte Hepatomzelllinie (Knowles et al. 1980), in der wesentliche Funktionen normalen Lebergewebes erhalten sind. Die Zellen sind in der Lage Albumin

und α -Fetoprotein zu synthetisieren (Vesey et al. 1991), außerdem sind auch fremdstoffmetabolisierende Enzyme in aktiver und induzierbarer Form vorhanden (Doostdar et al. 1991). Während der exponentiellen Wachstumsphase vermehren sich die Zellen mit einer Verdopplungszeit von ca. 30 Stunden.

2.1.2 Routinekultur der Zellen

Alle Materialien für die Zellkulturarbeiten, wie Kulturgefäße, Verbrauchsmaterialien u.ä. wurden von der Firma Greiner bezogen.

Puffer und Nährmedium

PBS/CMF

2,7mM	KCl
1,5mM	KH ₂ PO ₄
140mM	NaCl
4,1mM	Na ₂ HPO ₄

Nährmedium:	DMEM (steril filtriert, Mykoplasmen- und Virusgetestet)
	Fötale Kälberserum
	100g/ml Streptomycin
	100IU/ml Penicillin

Durchführung

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Flow-Sterilbank durchgeführt. Durch einen laminaren Luftstrom wird das Eindringen von Raumluft in den sterilen Arbeitsbereich verhindert. Die Zellen erhielten als Nährmedium Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), das mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 100 μ g/ml Streptomycin und 100 IU/ml Penicillin ergänzt wurde. Die Zellen

wurden in Kulturflaschen bei 37° in feuchter Atmosphäre mit 5% CO₂ und 99% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Mediumwechsel erfolgte durchschnittlich nach 3-4 Tagen. Die Zellen wurden passagiert, wenn ein beinahe konfluentes Zellwachstum erreicht war, indem sie abtrypsiniert wurden und in neue Kulturflaschen übergeführt wurden. Um die Zahl spontan mutierter Zellen gering zu halten, wurden die Zellen verworfen, die bereits eine hohe Passage erreicht hatten (ca. 10) und neu aufgetaute Zellen wurden in Kultur genommen. Für alle Versuche wurden die Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase mit der entsprechenden Substanz behandelt.

2.1.3 Kryokonservierung der Zellen

Die Zellen wurden wie für die übliche Passage kurz mit 1xPBS Puffer gewaschen, vom Boden abtrypsiniert und in 5ml Medium je Flasche aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in ein 15ml Röhrchen überführt und 2min bei 100g zentrifugiert. Das Medium wurde anschließend dekantiert. Das verbleibende Pellet wurde erneut in 5,4ml Medium und 0,6ml DMSO aufgenommen und gut resuspendiert. Nachdem diese Suspension auf Eppendorf-Cups verteilt worden war, wurden diese zunächst für 1-2 Std. bei -20° weggefroren und dann für 1-2 Tage bei -80° aufbewahrt. Anschließend wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt, wo sie dauerhaft gelagert werden konnten.

2.1.4 Auftauen der Zellen

Die Eppendorf-Cups mit der Zellsuspension wurden aus dem Stickstoff entnommen und bei 37° schnell aufgetaut. Die Suspension wurde in 5ml Medium aufgenommen und bei 1000g 2min lang zentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde dekantiert und das Pellet wurde erneut in 5ml Medium aufgenommen, gut resuspendiert und auf 2 Kulturflaschen mit je 10ml Medium verteilt. Nach Anwachsen wurden die Zellen in der üblichen Weise in Kultur gehalten.

2.1.5 Mykoplasmentest

Die Zellen wurden zu Beginn der Kultur und dann in größeren Abständen auf Mykoplasmen getestet. Dazu wurden die Zellen nach der DNA-Fluorchrom-Methode mit dem Bisbenzimidfarbstoff H33258 von der Firma Hoechst behandelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Bisbenzimid bindet an DNA und färbt somit neben Zellkernen auch Mykoplasmen-, Bakterien- und Pilz-DNA. Vor der Färbung wurden die Zellen wie bei der gewöhnlichen Passage trypsiniert. Die in Suspension gebrachten Zellen wurden mit Hilfe des Cytospingerätes auf Glasobjektträger aufzentrifugiert und anschließend für mindestens 30min bei -20° in Methanol fixiert. Die auf den Objektträgern befindlichen Zellen wurden dann 1-2min bei Raumtemperatur mit Färbelösung ($5\mu\text{g/ml H}_2\text{O}$) inkubiert, mit H_2O gewaschen und mit Eindecklösung und Deckgläsern bedeckt. Die Prüfung auf eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop: Mykoplasmen sind als Anfärbung außerhalb der gut abgrenzbaren Zellkerne erkennbar.

2.1.6 Zellzählung

Bevor die Zellen mit den verschiedenen Substanzen behandelt wurden, mußte die Zellzahl in den jeweiligen Kulturflaschen bestimmt werden, um jeweils die gleiche Anzahl von Zellen auf Petrischalen bzw. Sixwellplatten auszubringen. Hierfür wurde ein automatisches Verfahren (Coulter Counter) eingesetzt. Die Zellen wurden wie bei der Routinepassage in Suspension gebracht. 0,2 ml dieser Suspension aus den jeweiligen Zellkulturflaschen wurden in Zählgläser mit 9,8 ml isotoner Kochsalzlösung aufgenommen und am Zellcounter mit 2 Messungen pro Probe gezählt. Bei dieser Art der Zellzählung ist eine vorausgehende vollständige Vereinzelnung der Zellen von großer Bedeutung, da auch agglomerierte Zellen nur als eine einzige Zelle gezählt werden. Die Zellzahl pro ml errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = Z \cdot \text{VF} / V$$

Z = Zellzahl im Zugvolumen

V = Zugvolumen des Counters

VF = Verdünnungsfaktor (10/0,2=50)

Die in der Zellsuspension verbliebenen 9,8ml wurden entsprechend der Bestimmung für weitere Versuche ausgebracht.

2.1.7 Behandlung der Zellen

Die Behandlung der Zellen wurde immer in der exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt. Dazu wurden die Zellen ungefähr 48 Stunden vor Behandlungsbeginn in die entsprechenden Kulturgefäße (Petrischalen oder Sixwell-Platten) ausgebracht und unmittelbar vor Behandlungsbeginn mit frischem Medium versorgt.

Als Lösungsmittel für AAF und NOF (Syntheseprodukt, zur Verfügung gestellt von P. C. Klöhn und H.J. Till, Institut für Toxikologie der Universität Würzburg) wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Im Kulturmedium war die Konzentration an DMSO <0,25%.

Für die Behandlung mit Phenobarbital wurden die gewünschten Konzentrationen aus einer 200mM Stammlösung von Phenobarbital-Natrium in DMEM entnommen. Um zu sehen, inwiefern die Proteinkinase C bei diesen Signalwegen involviert war, wurden alle Versuche sowohl mit als auch ohne Proteinkinase C-Inhibitor GF109203X durchgeführt. Dieser Inhibitor wurden in einer Konzentration von 400nM unmittelbar vor Behandlungsbeginn zugegeben.

Meßparameter	Behandlungszeit	Testsubstanzen (Konz)
DNA-Gehalt	4h, 24h	AAF 10µM, 50µM NOF 10µM Pheno 2mM, 5mM
LDH-Efflux	4h, 24h	AAF 10µM, 50µM NOF 10µM Phenob 2mM, 5mM Menadion 10, 50
Westernblot	4h, 24h	AAF 10µM, 50µM NOF 10µM Pheno 2mM, 5mM
Immunpräzipitation	24h	Pheno 2mM
Gelshift	2h, 6h, 48h	AAF 10µM, 50µM
	0,5h, 2h, 4h, 6h, 48h	NOF 10µM, 50µM
	0,5h, 2h, 6h, 24h, 32h	Pheno, 5mM

2.2 Gesamtproteingewinnung

Puffer und Lösungen

1 x PBS

Trypsin

Homogenisierungspuffer

200mM Mannitol

50mM Sucrose

10mM Hepes

1mM EDTA

pH 7,4

Durchführung

Pro Behandlungszeitraum/Konzentration wurden zwei Petrischalen zu 250 000 Zellen benötigt. Nach Behandlung der Zellen wurde das Medium abgenommen. Anschließend wurden die Platten mit 1x PBS-Puffer gewaschen und trypsiniert. Das Zellmaterial wurde in 15ml Zentrifugenröhrchen 3min bei 3000 U/min und 4° zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Um die intrazellulären Proteine für das weitere Vorgehen zugänglich zu machen, wurde das Zellpellet in 500µl hypotonen Homogenisierungspuffer aufgenommen. Durch mehrmaliges Aspirieren durch eine feine Kanüle wurden die Zellen zusätzlich geschert und aufgebrochen. Zur Aufbewahrung wurde das Zellmaterial in beschriftete Eppendorfcups überführt und bei 20° eingefroren.

2.3 Photometrische Bestimmung der Proteinmenge

2.3.1 Photometrische Bestimmung mit Pyrogallol-Rot

Der Gesamtproteingehalt der Zellen wurde mit “Total Protein *Pyrogallol-Rot Reagenz*” bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, daß Proteine mit Pyrogallol-Rot einen farbigen Komplex bilden, der bei 598nm sein Absorptionsmaximum hat. Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde eine Eichreihe von 0, 2, 4, 6 und 8µg aus einer Proteinstammlösung von 2mg/ml Rinderserumalbumin in jeweils 1ml Pyrogallol mitgeführt. Die Messung der Eichreihe wurde in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Von jeder zu vermessenden Proteinprobe wurde eine Doppelbestimmung mit je 4µl in 1ml Reagenz vorbereitet. Nach einer Inkubationszeit von 10min bei Raumtemperatur wurden die Proben photometrisch bei einer Wellenlänge von 598nm vermessen. Zur Berechnung der Eichreihe wurde eine Regressionsgerade erstellt.

2.3.2 Photometrische Bestimmung mit BCA

Puffer und Lösungen

BSA 2mg/ml H₂O

BCA-Proteinreagenz: BCA Reagenz A

BCA Reagenz B

Durchführung

Um gleiche Mengen Protein für den anschließenden Immunoblot einsetzen zu können, wurde zunächst die Proteinmenge in den Lysaten mittels BCA-Proteinreagenz bestimmt. Je 4µl der aus den Zellen gewonnenen Proteinlösung wurde mit 2ml BCA-Proteinreagenz (Pierce) entweder für 30min bei 37°C oder 2h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 562nm photometrisch quantifiziert. Das BCA-Reagenz setzt sich aus 50 Teilen Reagenz A und 1 Teil Reagenz B zusammen. Da die Farbentwicklung mit BCA keinen exakten Endpunkt erreicht, sollte die Messung aller Proben innerhalb von 10min erfolgen. Der Proteingehalt wurde mit Hilfe einer Eichgeraden berechnet, die aus einer mitgeführten Eichreihe mit bekanntem Proteingehalt an BSA (0/50/100/150/200 µg) erstellt wurde. Für die Eichreihe wurde eine Dreifachbestimmung und für die jeweiligen Proben eine Doppelbestimmung durchgeführt.

2.4 Immunoblotting

Diese Methode dient der Detektion und der Darstellung spezifischer Proteine. Die zunächst in der Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennten Proteine werden mittels eines Western-Blots auf die Oberfläche einer Nitrozellulosemembran übertragen. An die leicht zugänglichen Proteine kann der spezifische Antikörper binden, an den sich wiederum ein enzymgekoppelter Zweitantikörper anlagern kann. Mit Hilfe des entsprechenden Substrates wird die Bande durch eine Farbreaktion sichtbar.

2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Die Auftrennung der Proteine im Polyacrylamid-Gel erfolgte mit einem kontinuierlichen Puffersystem (modifiziert nach Laemmli) (Laemmli 1970).

2.4.1.1 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

	Sammelgel (6%)	Trenngel (10%)
Acrylamid/ Bisacrylamid	0,789ml	2,34ml
Tris-HCl-Puffer	2,16M Tris HCl, pH 6,1	2,12M Tris-HCl, pH 9,18
	0,125ml	1,8ml
10% SDS	0,05ml	0,1ml
H ₂ O bidest	3,98ml	4,6ml
TEMED	0,005ml	0,003ml
Ammoniumpersulfat	0,05ml	0,058ml

Puffer und Lösungen

10x Laufpuffer

250mM Tris pH 8,3

2M Glycin

1% SDS

Protein-Stoppuffer

60mM Tris HCl

7,5% SDS

15% Glycerin

15% β -Mercaptoethanol

3mM NaEDTA

0,015% Bromphenolblau

Durchführung

Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 bis 2:1 in Protein-Stop-Puffer aufgenommen und kurz aufgeköcht. Dies führt zur Denaturierung der Proteine und zu deren Beladung mit SDS, wodurch alle Ladungen überdeckt werden. Somit konnte die Auftrennung ausschließlich nach Proteingröße gewährleistet werden. Anschließend konnten die Proben in gleicher Menge auf das Gel aufgetragen werden. Die Elektrophorese wurde in einer Minigelapparatur mit 1xLaufpuffer durchgeführt. Bei 25-35mA dauerte es ca. 1h bis die Bromphenolblau-Front aus dem Gel gewandert war und die Elektrophorese beendet wurde. Für den Nachweis sehr schwerer Proteine (ca. 170kD) wurde der Lauf erst nach ca. 100min beendet.

Als Molekulargewichtsmarker diente die "Protein Test Mixture 4" (Boehringer Ingelheim) mit folgenden Proteinen: Phosphorylase B (97,4kD), Rinder-Albumin (67kD), Ei-Albumin (45kD), Carboanhydrase (29kD).

Im Anschluß daran wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und der im Gel verbleibende Proteinrest wurde mit Coomassie-Blue in einem Proteinfärbebad angefärbt.

2.4.1.2 Färben und Trocknen der Gele

Puffer und Lösungen

Proteinfärbelösung

9% Essigsäure
45% Methanol
0,25% Coomassie-Blue

Entfärbelösung

10% Methanol
7% Essigsäure

Dehydratisierungslösung

35% Ethanol
0,5-2% Glycerin

Durchführung

Um beurteilen zu können, ob der Probenauftrag auf die einzelnen Spuren eines Gels gleichmäßig erfolgt war, wurden die Blotgele mit einem Proteinfarbstoff gegengefärbt und mit dem Laserdensitometer ausgewertet.

2.4.2 Western-Blotting mit anschließender Proteindetektion

Puffer und Lösungen

Blotpuffer

50mM	Tris
40mM	Glycin
20%	Methanol

10xTBST

10mM	Tris HCl (pH 8,0)
150mM	NaCl
0,5mg/ml	Tween 20

10xTBS

10mM	Tris HCl (pH 8,0)
150mM	NaCl

Alkalische-Phosphatase-Puffer

100mM	NaCl
5mM	MgCl ₂
100mM	Tris HCl (pH 9,5)

Amido-Black-Färbelösung

0,1%	Amido-Black 10B
45%	Methanol
10%	Essigsäure

Amido-Black-Entfärbelösung

90%	Methanol
2%	Essigsäure

Alkalische Phosphatase-Färbung

15ml	AP-Puffer
99µl	NBT
49,5µl	BCIP

Primärantikörper

anti-C-PKC (rabbit)

anti-EGF-R (rabbit)

anti-c-fos (mouse)

anti-c-jun (rabbit)

Sekundärantikörper

goat anti rabbit

goat anti mouse

alle Antikörper wurden von der

Firma Santa Cruz bezogen

Durchführung

Nach der Gelelektrophorese wurden die Acrylamidgele zunächst für 10min in Blotpuffer äquiliert und anschließend in einem Semidry-Blotgerät bei einer Spannung von 20V eine Stunde lang auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Hierfür wurde die in Blotpuffer angefeuchtete Membran auf 16 ebenfalls mit Blotpuffer angefeuchtete Whatman-Papiere gelegt. Das Gel wurde blasenfrei auf die Membran aufgebracht und mit 16 weiteren angefeuchteten Whatman-Papieren bedeckt. Nach Ablauf des Transfers wurde die Nitrozellulosemembran zunächst für eine Stunde in einer 10% Magermilchsuspension in 1xTBST geblockt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membranoberfläche zu verhindern. Das Gegenfärben der Polyacrylamidgele erfolgte wie oben beschrieben. Nach dem einstündigen Blocken wurde die Membran zweimal mit 1xTBST und einmal mit 1xTBS jeweils für 10min unter langsamen Rotieren gewaschen. Die Inkubation mit dem Erstantikörper wurde über Nacht bei 4° durchgeführt. Dafür wurden folgende Verdünnungen von Antikörperlösungen verwendet: 1:1000 für den Anti-c-FOS-, den Anti-EGF-R-Antikörper und den Anti-c-PKC-Antikörper. Der Anti-c-jun-Antikörper wurde im Verhältnis 1:250 eingesetzt. Nach der Inkubationszeit wurde die Membran erneut zweimal mit 1xTBST und einmal mit 1xTBS für jeweils 10min gewaschen. Der zweite Antikörper, der für die anschließende Detektion mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war, wurde für die Inkubation in einer Verdünnung von 1:1000 in einer 5 % Magermilchpulverlösung in 1xTBS zugegeben und bei Raumtemperatur für 1h unter

leichtem Rotieren auf der Membran belassen. Anschließend wurde die Membran nach dem üblichen Waschvorgang (2x10min mit 1xTBST, 1x10min mit 1xTBS) in die Färbelösung überführt. Mit Hilfe des Substrates NBT/BCIP (132 μ l/66 μ l in 20ml AP-Puffer) wurde das spezifische Protein als braun-violette Bande durch eine Farbreaktion sichtbar. Die Färbereaktion wurde durch das Abwaschen der Membran mit deionisiertem Wasser gestoppt. Die semiquantitative Auswertung der Banden erfolgte nach dem Einlesen mit einem Bild-Scanner mittels des Programmes NIH-Image basierend auf unterschiedlich intensivem relativen Schwärzungsgrades.

2.4.3 Immunopräzipitation (IP)

Diese Methode dient der Anreicherung von Proteinen, um eine bessere Detektierbarkeit für den anschließenden Immunoblot (s.o.) zu erzielen. In dieser Arbeit diente diese Methode dem besseren Nachweis von Expression und Aktivität des EGFR nach Phenobarbitalbehandlung. Als festes Trägermaterial diente bei der IP Agarose, an die rekombinantes Protein A gebunden ist. Dieses wiederum besitzt die Eigenschaft, Immunglobuline unterschiedlicher Spezies zu binden. Die an Protein A-Agarose gebundenen Erstantikörper sind in der Lage, das für sie spezifische Protein in dem zu untersuchenden Proteinlysat zu binden. Als Endprodukt der IP resultiert ein "Sandwich" aus Protein A-Agarose, Erstantikörper und des gesuchten Proteins. Dieses "Sandwich" kann durch Zentrifugation von der übrigen Suspension abgetrennt werden und die einzelnen Bindungen können durch Aufkochen mit Proteinstoppuffer wieder gespalten werden, so daß lediglich das angereicherte Zielprotein zum SDS-PAGE aufgetragen werden kann.

Puffer und Lösungen

Ko-Immunopräzipitationspuffer

25mM	HEPES
150mM	NaCl
10mM	Na-Pyrophosphat
40mM	β -Glycerophosphat
1mM	Na ₂ -EDTA
1%	Triton-X-100
10ml	Lysispuffer
	ad 500ml aqua bidest

Lysispuffer

10 μ g/ml	Leupeptin
10 μ g/ml	Aprotinin
2mM	PMSF (100 μ M in Isoproanol)
1mM	Na-Vanadat

Stripping-Puffer

100mM	2-Mercaptoethanol
2%	SDS
62,5mM	Tris HCl, pH 6,7

Durchführung

400 μ g Protein des Zellysates wurden zusammen mit 100 μ l Koimmunopräzipitationspuffer (KIP-Puffer) 30min auf Eis lysiert. Die unlöslichen Zellfragmente wurden durch anschließendes 10 minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 12000rpm abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und

mit 50µl Protein-A-Agarose (1:1 Suspension in KIP-Puffer) überführt. Nachdem den Proben 1µg/ml des Erstantikörpers (anti-EGF-R, Maus-monoklonal, zur Verfügung gestellt von Dr. A.Ullrich, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) zugegeben wurden, erfolgte eine 4-stündige Inkubation bei 4°C auf einem Rollinkubator. Im Anschluß wurde das Protein-A-Pellet durch Zentrifugation isoliert (4°C, 10min, 1200rpm) und zweimal mit 200µl KIP-Puffer gewaschen. Dieses Pellet wurde in 50µl Proteinstoppuffer aufgenommen und 5min im Wasserbad aufgeköcht. Die Proben wurden in noch heißem Zustand erneut zentrifugiert (20s, 14000rpm). 20µl des Überstandes, der das Zielprotein enthielt, wurden nachfolgend für die elektrophoretische Trennung (SDS-PAGE) und den Immunoblot verwendet (Durchführung wie unter 2.4.2). Als Erstantikörper wurde hierfür ein phosphospezifischer Antikörper (rabbit, 1:1000) verwendet, der zum Nachweis des Aktivitätszustandes des EGFR diente. Der Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper (horse-anti-rabbit, 1:2500) ermöglichte die Detektion mittels ECL PlusTM Western blotting detection system von AmershamTM. Die Chemilumineszenz wurde mittels eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht. Um eine Aussage über die Expression des EGFR zu gewinnen, wurden die Bindungen der ersten Antikörper mit der Membran gelöst. Hierzu wurde die Membran mehrmals mit PBS gewaschen, bevor sie für 30min bei 60° in "Stripping Puffer" eingelegt wurde. Nach erneutem Waschvorgang mit PBS war die Membran für die Antikörper zugänglich, die wie unter 2.4.2 beschrieben eingesetzt wurden.

2.5 Gel-Mobility-Shift-Assay

Mittels eines Gel-Mobility-Shift-Assays können spezifisch an DNA bindende, aktive Proteinkomplexe im Zellkern nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden die aktiven Formen der Transkriptionsfaktoren AP1 und NFκB mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide nachgewiesen.

2.5.1 Anreicherung von Proteinen aus dem Zellkern für Bindungsassays

Puffer und Lösungen

Puffer A		Puffer C	
10mM	HEPES (pH 7,9)	20mM	HEPES (pH 7,9)
10mM	KCl	0,4M	NaCl
0,1mM	EDTA	1mM	EDTA
0,1mM	EGTA	1mM	EGTA
1mM	DTT	1mM	DTT
0,5mM	PMSF	1mM	PMSF

Durchführung

Für die Isolierung eines Kernextraktes wurden ungefähr $0,5 - 1,0 \cdot 10^5$ Zellen benötigt, dies entsprach vier Kulturschalen (10cm Durchmesser) pro Behandlungszeitraum/Konzentration. Die entsprechend des Behandlungsprotokolls behandelten Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers von den Platten abgelöst, in 10 ml TBS aufgenommen und in ein 15 ml Röhrchen gegeben. Bei 1500g wurden die Zellen 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde anschließend in 1ml TBS aufgenommen und in ein Eppendorf-Cup überführt. Nach 15minütigem Zentrifugieren bei 3000g wurde der Überstand abdekantiert. Das Pellet wurde in 400µl kaltem Puffer A aufgenommen und gut resuspendiert. Die Proben wurden 15min auf Eis gestellt, um Zeit zum Platzen zu geben. Im Anschluß wurden 25 µl einer 10 % Nonidet NP-40 Lösung dazugegeben und gut geschüttelt. Durch erneutes Zentrifugieren für 30sec erhielt man das Kernextraktpellet. Dieses Pellet wurde mit 50 µl eiskaltem Puffer C resuspendiert, für 15min bei 4° kräftig geschüttelt und anschließend bei 4° zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in Aliquots bei -70° eingefroren.

2.5.2 Gelelektrophorese der Protein-DNA-Komplexe

Um die aktive Form der Transskriptionsfaktoren AP1 und NFκB nachzuweisen, durften die Proteine weder während der Aufarbeitung noch während der Elektrophorese denaturiert werden, denn nur in nichtdenaturierter Form sind diese Proteine in der Lage, an die spezifischen DNA Sequenzen zu binden, in diesem Fall an das entsprechende zugegebene Oligonukleotid. Die Auftrennung erfolgte aufgrund unterschiedlicher Molekülgröße, da das Oligonukleotid mit angelagerten Proteinkomplexen wesentlich größer ist als das reine Oligonukleotid und somit in der Elektrophorese wesentlich näher am Startpunkt blieb. Die für AP1 und NFκB spezifischen Oligonukleotide wurden bereits mit Digoxigenin markiert und aufgereinigt bezogen (MWG Biotech, Ebersberg, D).

Bindungsmotiv für AP1: 5'-TG ACT CA-3'

Bindungsmotiv für NFκB: 5'-GGG GAC TTT CCC-3'

Puffer und Lösungen

Gel-Shift-Inkubations-5x-Puffer

20%	Glycerin
5mM	MgCl ₂
2,5mM	EDTA
2,5mM	DTT
250mM	NaCl
50mM	Tris HCL (pH 7,5)
0,05mg/ml	Poly(dI-dC)

10xTBE

890mM	Tris HCl (pH 8,0)
890mM	Borat
20mM	EDTA

Gel-Loading-10x-Puffer

250mM	Tris HCl (pH7,5)
0,2%	Bromphenolblau
0,2%	Xylol-Cyanol
40%	Glycerin

2.5.2.1 Zusammensetzung des Acrylamidgels

Acrylamidgel 5%

2ml	5x TBE
2,5ml	Acrylamid 40%
0,625ml	Glycerin 80%
14,4ml	H ₂ O
0,01ml	TEMED
0,15ml	APS 10%

Durchführung

Aus den Zellkernextrakten der behandelten Zellen wurden je 10µg (Volumen entsprechend der vorangegangenen Proteinbestimmung) mit Gel-Shift-5x-Puffer für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Spezifitätsnachweis wurde eine Leerkontrolle ohne Kernextrakt, eine Probe mit einem nichtmarkierten AP1-Oligonukleotid als Kompetitor und eine Probe mit einem nichtmarkierten Fremdoligonukleotid als Non-Kompetitor mitgeführt: Der Kompetitor verdrängt einen Teil des DIG-markierten Oligonukleotids aus der spezifischen Bindung und läßt somit die gefärbte Bande der DNA-Protein-Komplexe schwächer erscheinen. Der Non-Kompetitor hingegen hat auf die Bildung der spezifischen Komplexe aus Protein und markiertem Oligonukleotid keinen Einfluß. Den Proben wurde jeweils 5pmol des markierten DNA-Stückes zugesetzt und weitere 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Reaktion wurde dann mit jeweils 1µl Gel-Auftrags-10x-Puffer gestoppt. Nachdem ein Vorlauf des noch nicht beladenen Gels von ungefähr 20min bei 100V durchgeführt worden war, wurden die Proben auf das 5%ige nicht denaturierende Acrylamidgel aufgetragen. Als Laufpuffer diente dabei 0,25 x TBE. Der Gellauf erfolgte bei einer Umgebungstemperatur von 4° und einer Spannung von 120 V für ca. 3-4h, solange, bis die Farbfront noch 3cm vom Unterrand des Gels entfernt war.

2.5.3 Naßblot und Digoxigeninfärbung

Puffer und Lösungen

Transferpuffer

45mM Tris-Borat (pH 8,3)
1mM EDTA

Dig-Puffer 1

100 mM Maleinsäure
100 mM NaCl
pH 7,5

Dig-Puffer 2

1% Blocking Reagent
100 mM Maleinsäure
100 mM NaCl
PH 7,5

Dig-Puffer 3

100 mM Tris HCl (pH 9,5)
100 mM NaCl
50 mM MgCl₂

Durchführung

Die aufgetrennten Proben wurden mittels eines Naßblots auf eine Biodyne-B-Membran (pall) übertragen, um das Digoxigenin für den Antikörper zugänglich zu machen. Das Gel, das die aufgetrennten Proben aus den Kernextrakten enthielt, wurde blasenfrei auf die Membran aufgebracht und zwischen Whatman-Papieren in eine Naßblotapparatur eingehängt. Der Transfer erfolgte bei einer Spannung von 100V. Dieser Blot wurde bei einer Umgebungstemperatur von 4° über Nacht durchgeführt. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran mit Hilfe eines alkalische Phosphatase-gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörpers inkubiert, um die aktiven AP1- und NFκB-Komplexe zu detektieren. Die Membran wurde hierfür zunächst 5min luftgetrocknet und dann für eine Stunde bei 80° fixiert. Nach kurzem Abkühlen wurde die Membran mit DIG-Puffer 1 angefeuchtet, um dann für eine halbe Stunde im Dig Puffer 2 geblockt zu werden, um eine unspezifische Anlagerung des Antikörpers auf der Membran zu verhindern. Der Antikörper wurde anschließend in einer Konzentration von 150U/ml in Dig-Puffer 2

gelöst ebenfalls für eine halbe Stunde auf die Membran gegeben. Nach diesem Vorgang erfolgte zweimaliges Waschen mit Dig-Puffer 1 und ca. zweiminütiges Äquilibrieren mit Dig-Puffer 3. Die Färbelösung, bestehend aus 10ml Dig-Puffer 3, 45µl NBT und 35µl BCIP wurde über Nacht unter Lichtausschluß auf der Membran belassen. Die Färbereaktion wurde durch Abspülen der Membran mit entionisiertem Wasser gestoppt. Die nachfolgende densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Programm NIH Image 1.61/68k.

2.6 Zytotoxizitätsnachweis: Laktat-Dehydrogenase-Aktivität (LDH)

In Zellen mit intakten Membranen kommt es unter physiologischen Bedingungen nicht zum Austritt von Zytoplasmaenzymen in das umgebende Medium. Durch Behandlung mit zytotoxischen Agenzien kann jedoch eine Membranschädigung auftreten und z.B. den Efflux der Laktat-Dehydrogenase ins Umgebungsmedium bewirken. Dies kann photometrisch über den Umsatz von zugegebenem NADH bei einer Wellenlänge von 340nm in einem Triethanolamin-Puffer quantifiziert werden. Somit kann diese Messung zur Zytotoxizitätsbeurteilung herangezogen werden. Als Substrat der Laktat-Dehydrogenase diente Pyruvat, das unter Oxidation von NADH mit LDH zu Laktat reduziert wurde.

Die Laktat-Dehydrogenase wurde im Zellkulturmedium und im Lysat der behandelten Zellen und der Kontrollzellen gemessen. Die Gesamtaktivität setzte sich aus der LDH-Aktivität der lysierten Zellen und der Aktivität im Überstand zusammen. Die Menge LDH (%) im Überstand wurde als Quotient behandelte Zellen/Kontrollen angegeben.

Puffer und Lösungen

LDH-Puffer

100mM Triethanolamin

10mM Na₂-EDTA

Pyruvat (20mM)

NADH (10mg/ml)

Triton-X-100 (20µl/ml)

Durchführung

Die Zellen wurden wie üblich in Petrischalen ausgebracht und nach Schema mit den Substanzen behandelt. Im Anschluß wurde die LDH-Aktivität in den lysierten Zellen und im Überstand bestimmt. Dazu wurden 500µl Überstand abpipettiert. Die Lyse der Zellen erfolgt mit 5%igem Triton-X-100 (20µl/ml) 15min lang bei 37°. Für die Reaktion wurden 200µl Überstand bzw. Lysat mit 500 µl LDH Puffer und 270 µl H₂O versetzt. Nach Zugabe von 20µl Pyruvat und 10µl NADH wurde die NADH-Abnahme photometrisch bei 340nm 5min lang in 30 Sekundenintervallen gemessen. Die Menge LDH im Überstand in % des Gesamt-LDH wurde als Quotient von behandelten Zellen zur Kontrolle angegeben. Dieser Test diente dem Nachweis für die Zytotoxizität der Agenzien.

2.7 Zellwachstum: Bestimmung des DNA-Gehaltes der Zellen

Da sich HepG2-Zellen für eine Zellzählung nicht ausreichend vereinzeln lassen, wurde für das Wachstumsverhalten der Zellen die DNA-Menge bestimmt, die mit der Zellzahl gut korreliert (Lee et al.,1992). Das Prinzip beruhte dabei auf der Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs Bisbenzimid H33258 an DNA. Durch Mitführen einer Eichreihe mit Kalbsthymus-DNA (0-16µg/µl) konnte der jeweilige DNA-Gehalt quantifiziert werden.

Puffer und Lösungen

Extraktionspuffer

62,5mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (pH 7,4)

2,2M NaCl

Durchführung

Die Zellen wurden zum Ausbringen in Medium aufgenommen und in gleicher Menge in Sechs-Loch-Platten ausgebracht. Die Behandlung der Zellen erfolgte nach Behandlungsprotokoll. Zur Messung wurden das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von je 800 μl Wasser je Vertiefung für eine Stunde bei 37° aufgebrochen. Nach diesem Aufarbeitungsschritt wurde eine Kalbsthymus-DNA-Eichreihe (0, 1, 2, 4, 8, 16 μg in 400 μl H_2O) mitgeführt. Im Anschluß erfolgte die DNA-Extraktion durch Zugabe von 1500 μl Extraktionspuffer (für die Eichreihe 750 μl). Die Inkubation erfolgte für weitere 1,5h bei 37°. Nach Resuspension wurden die Proben für eine Doppelbestimmung mit je 1150 μl auf je zwei Fluoreszenzküvetten verteilt (für die Eichreihe wurde der ganze Ansatz verwendet) und mit je 750 μl Bisbenzimidlösung (2,5 μg Bisbenzimid/ml Extraktionspuffer) versetzt. 10min lang wurden diese Lösungen im Dunkeln inkubiert. Es wurde eine Emission der Wellenlänge 450nm am Fluorimeter gemessen, nachdem mit UV-Licht der Wellenlänge 360nm angeregt wurde. Anhand der Eichgeraden konnte eine Regressionsformel erstellt werden und der DNA-Gehalt der Proben quantifiziert werden.

2.8 Statistik

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden als arithmetische Mittelwerte mit dem dazugehörigen Standardfehler in den einzelnen Abbildungen dargestellt. Signifikanzangaben beziehen sich auf Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen oder von Proteinextrakten aus den Zellen nach unterschiedlichen Behandlungsmustern. Unterschiede eines Einzelparameters wurden mit einem

zweiseitigen Student-t-Test verglichen. Wurden mehr als zwei Parameter zwischen den Untersuchungskollektiven in die statistischen Berechnungen einbezogen, musste eine zweiseitige Varianzanalyse (two-way ANOVA) mit entsprechendem post-hoc-Test (Bonferroni's-Test) durchgeführt werden. Für alle statistischen Tests wurde als statistisch relevantes Signifikanzniveau ein p-Wert von $\leq 0,05$ angenommen. In den einzelnen Legenden der Abbildungen sind jeweils die Größe des Untersuchungskollektivs und der zur statistischen Berechnung verwendete Test angegeben. Die Fehlerbalken der Abbildungen entsprechen dem jeweiligen Standardfehler.

3 Ergebnisse

3.1 Wachstumsverhalten der HepG2-Zellen unter Behandlung mit AAF, NOF und Phenobarbital jeweils ohne und mit C-PKC-Inhibitor GF109203X

Die menschliche Hepatomzelllinie HepG2 ist eine Zelllinie, die überwiegend im Verbund wächst und sich nur schwer vereinzeln läßt. Das Wachstumsverhalten erfolgte deshalb durch eine fluorometrische DNA-Bestimmung. Die Zellen wurden in gleicher Menge auf Petrischalen ausgebracht. Es wurde davon ausgegangen, dass sich die Zellen nach 48 Stunden in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Vor Behandlungsbeginn wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die DNA-Bestimmung erfolgte jeweils nach 4, 24, 32, 48 und 72 Stunden.

3.1.1 AAF

Die Behandlung mit AAF erfolgte in Konzentrationen von 10 μ M und 50 μ M, wobei eine Testserie mit, eine weitere Testserie ohne den cPKC-Inhibitor GF109203X durchgeführt wurde. Die Kontrollen wurden mit dem Lösungsmittel DMSO in entsprechender Konzentration inkubiert.

Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, wiesen die Zellen unter der Behandlung mit 10 μ M AAF keine Wachstumsbehinderung auf. Der PKC-Inhibitor GF109203X schien ebenso keinen Einfluß auf das Wachstumsverhalten der Zellen zu nehmen.

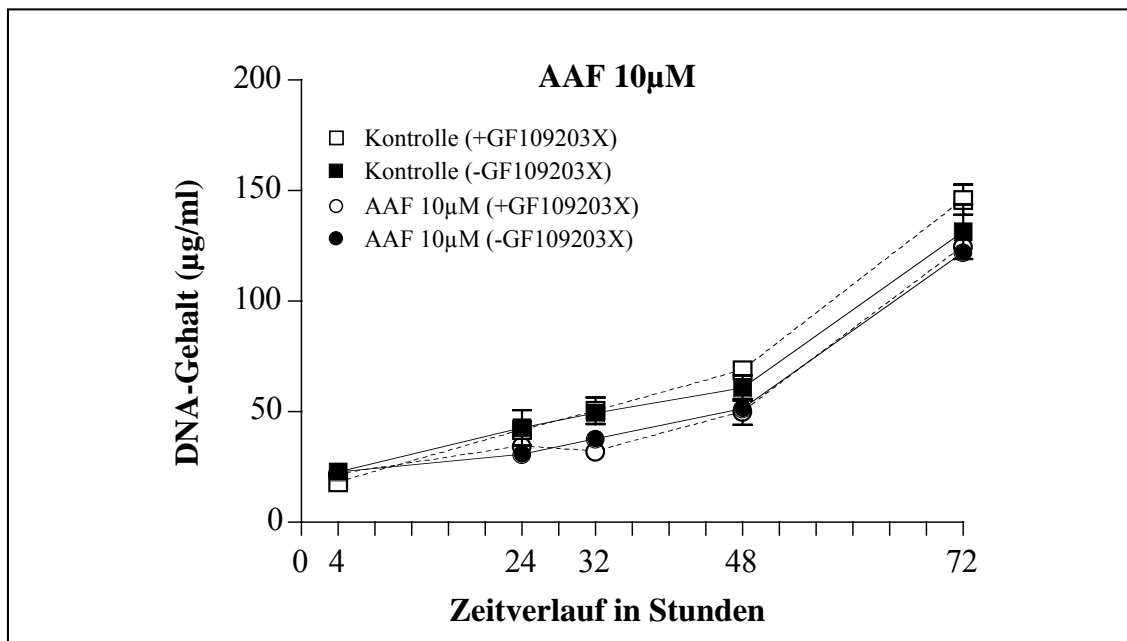


Abbildung 4: Messung des Proliferationsverhaltens von HepG2-Zellen durch fluorimetrische Bestimmung des DNA-Gehaltes nach Behandlung mit 10µM AAF über einen Zeitraum von 72h. Das Kanzerogen AAF behinderte das Proliferationsverhalten der Zellen nicht. Auch der c-PKC-Inhibitor GF109203X hatte auf das Wachstumsverhalten keinen Einfluss. (n=3, two-way ANOVA, kein signifikanter Unterschied)

Die Zufuhr von 50µM AAF schränkte das Wachstum der Zellen vor allem nach 72h stark ein (Abbildung 5). Dieser Effekt wurde durch die Zugabe des PKC-Inhibitors GF109203X deutlich vermindert.

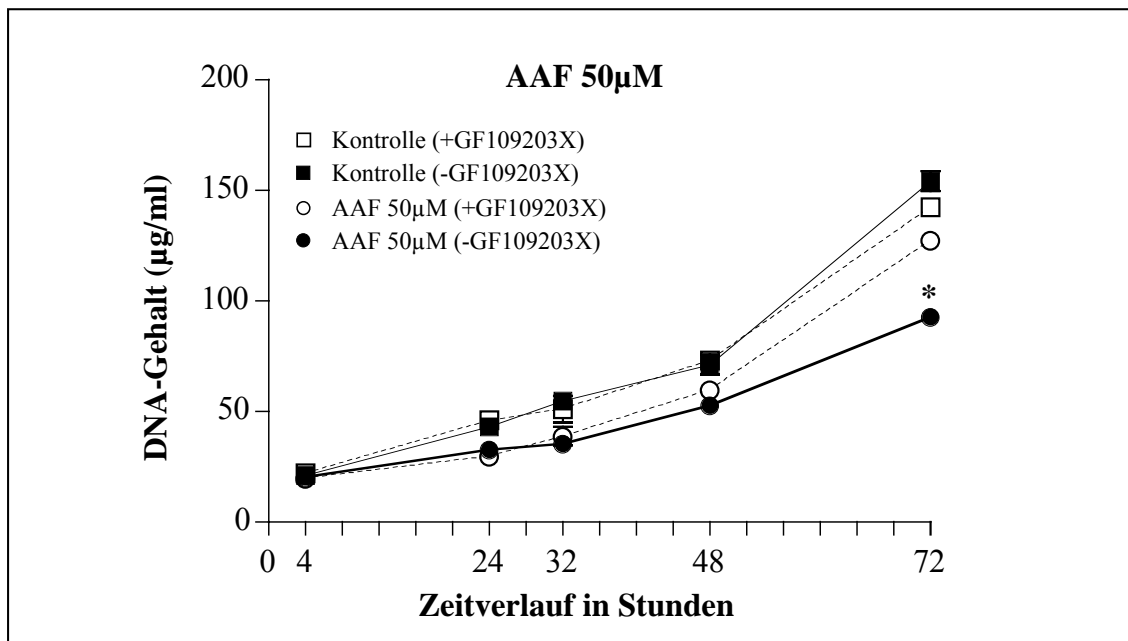


Abbildung 5: Messung des Proliferationsverhaltens von HepG2-Zellen durch fluorimetrische Bestimmung des DNA-Gehaltes nach Behandlung mit 50µM AAF über einen Zeitraum von 72h. Das Kanzerogen AAF behinderte das Proliferationsverhalten der Zellen, wobei der c-PKC-Inhibitor GF109203X die Proliferationshemmung von AAF nach 72 Stunden reduzierte (n=3, two-way ANOVA und Bonferroni's-Test, *p≤0,05)

3.1.2 NOF

Nitrosofluoren (NOF), der aktiver Metabolit des AAF, wurde in einer Konzentration von 10µM eingesetzt. Die DNA-Messung der behandelten Zellen zeigte eine deutliche Reduktion des DNA-Gehaltes im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Auch durch Zugabe von GF109203X konnte die Wachstumsbehinderung nicht reduziert werden, wie in Abbildung 6 zu erkennen ist.

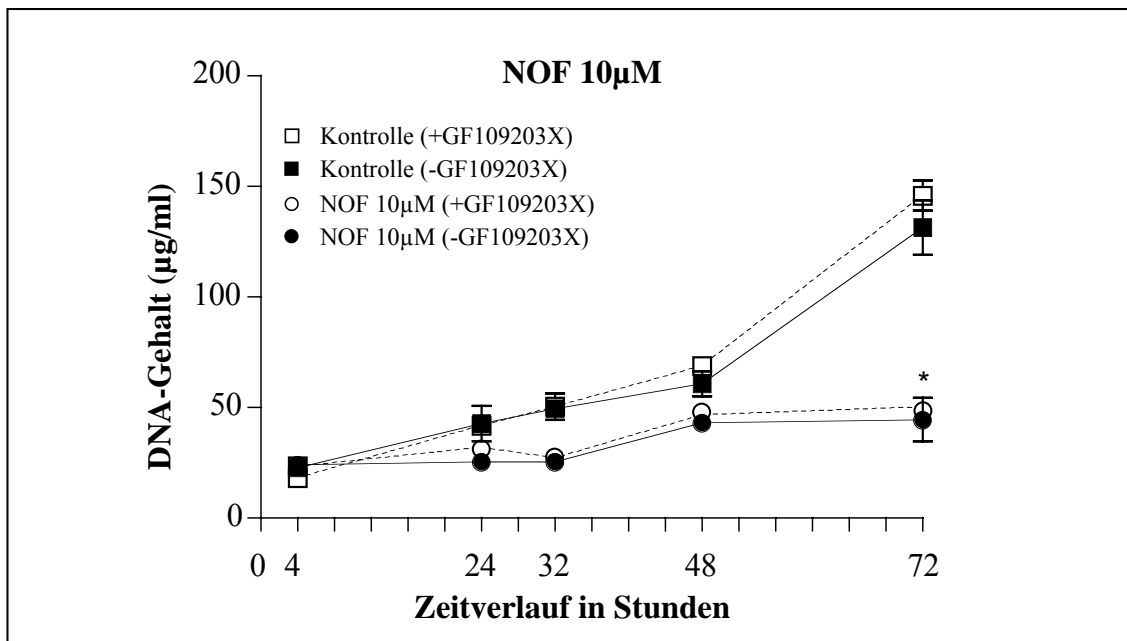


Abbildung 6: Messung des Proliferationsverhaltens von HepG2-Zellen durch fluorimetrische Bestimmung des DNA-Gehaltes nach Behandlung mit 10µM NOF über einen Zeitraum von 72h. Das Kanzerogen NOF behinderte das Proliferationsverhalten der Zellen nach einem Zeitraum von 72h. Der c-PKC-Inhibitor GF109203X hatte auf die durch NOF vermittelte Wachstumsbehinderung keinen Einfluss. (n=3, two-way ANOVA und Bonferroni's-Test, *p≤0,05)

3.1.3 Phenobarbital

Phenobarbital wurde in den Konzentrationen 2mM und 5mM eingesetzt.

Wiederum zeigte die Behandlung der Zellen mit der niedrigen Konzentration, in diesem Falle 2mM Phenobarbital, keine Behinderung des Zellwachstums (Abbildung 7).

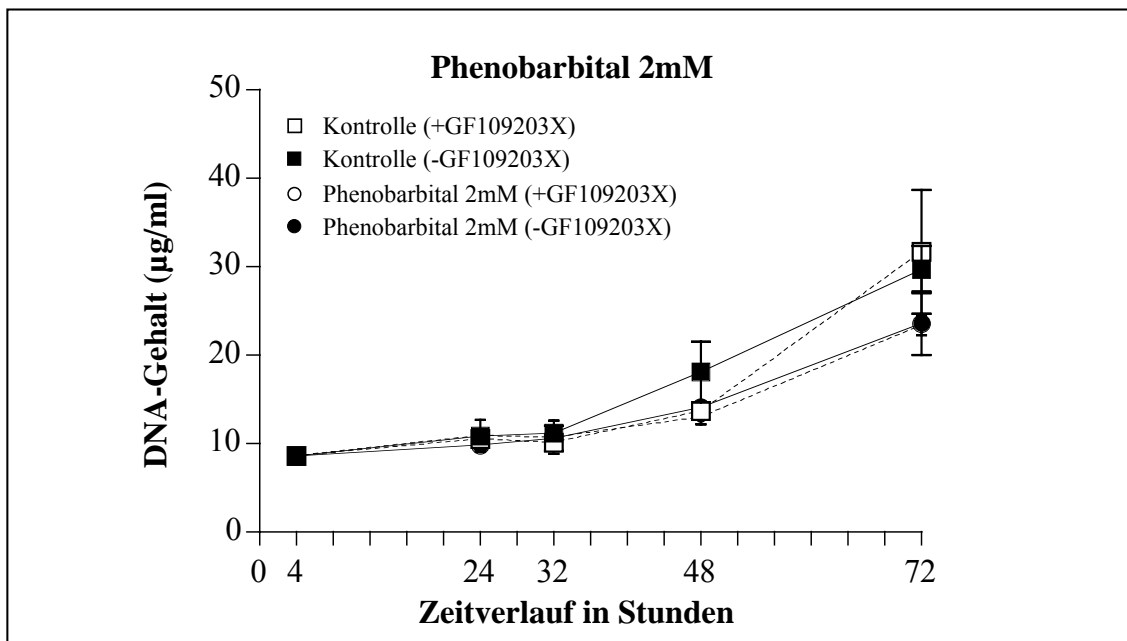


Abbildung 7: Messung des Proliferationsverhaltens von HepG2-Zellen durch fluorimetrische Bestimmung des DNA-Gehaltes nach Behandlung mit 2mM Phenobarbital über einen Zeitraum von 72h. Der Tumorpromotor Phenobarbital behinderte das Proliferationsverhalten der Zellen nicht. Auch der c-PKC-Inhibitor GF109203X hatte auf das Wachstumsverhalten keinen Einfluss. (n=3, two-way ANOVA, kein signifikanter Unterschied)

Allerdings wurde das Wachstum durch Erhöhung der Konzentration auf 5mM nach 48h und 72h Behandlungszeit stark beeinträchtigt (Abbildung 8). Durch die Behandlung mit GF109203X konnte diese Wachstumsbehinderung nicht beeinflusst werden.

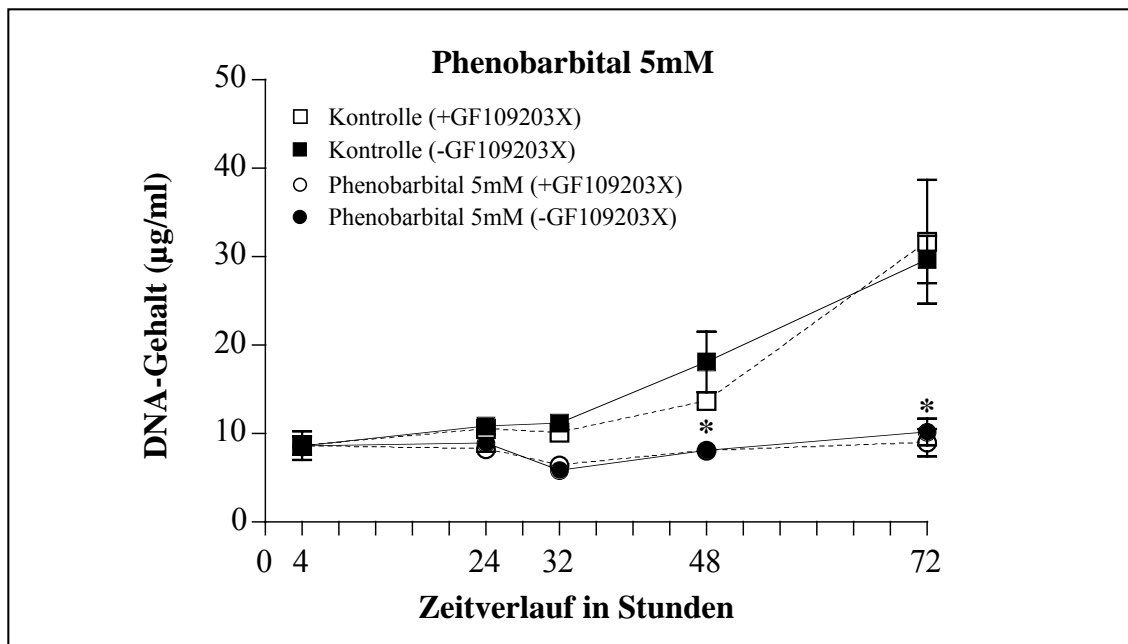


Abbildung 8: Messung des Proliferationsverhaltens von HepG2-Zellen durch fluorimetrische Bestimmung des DNA-Gehaltes nach Behandlung mit 5mM Phenobarbital über einen Zeitraum von 72h. Der Tumorpromotor Phenobarbital behinderte das Proliferationsverhalten der Zellen nach einem Zeitraum von 48h und 72h. Der c-PKC-Inhibitor GF109203X hatte auf die durch Phenobarbital vermittelte Wachstumsbehinderung keinen Einfluss. (n=3, two-way ANOVA und Bonferroni's-Test, *p≤0,05)

3.2 Laktat-Dehydrogenase-Test zur Beurteilung der Zytotoxizität

Das Enzym Laktat-Dehydrogenase (LDH) kommt unter physiologischen Bedingungen nur im Zytoplasma vor. Toxische Agenzien sind jedoch in der Lage, Zellmembranen zu schädigen und einen Austritt der LDH in das umgebende Medium zu bewirken. Die LDH wurde als Indikator für die Zytotoxizität der Testsubstanzen bestimmt. Die Zellen wurden in gleicher Menge auf Petrischalen ausgebracht und nach 48 Stunden unter Standardkulturbedingungen mit den Testsubstanzen behandelt. Die Messung der LDH-Aktivität im Überstand und in den lysierten Zellen erfolgte nach 4 und 24 Stunden und wurde ins Verhältnis zu der LDH-Aktivität im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen (gleich 100%) gesetzt. Jede Meßreihe wurde ohne Zugabe und mit Inkubation von c-PKC-Inhibitor GF109203X durchgeführt.

3.2.1 AAF

Wie Abbildung 9 zeigt, hatte AAF in der Konzentration von $10\mu\text{M}$ nach 4 Stunden Behandlung keine erhöhte LDH Aktivität zur Folge. Nach 24 Stunden Inkubation war jedoch eine erhöhte zytotoxische Wirkung des AAF ohne Inhibitorbehandlung erkennbar. Der Inhibitor wirkte hier protektiv. Nach 24 Stunden Behandlung mit GF109203X unterschieden sich die Werte nicht von denen der Kontrollen.

AAF in der $50\mu\text{M}$ Konzentration führte bereits nach 4 Stunden zu einem erhöhten LDH-Efflux, wenn auch weniger stark ausgeprägt als nach 24 Stunden Behandlungsdauer. Auch hier beeinflusste den Effekt, da nach beiden Zeitpunkten LDH-Aktivitäten gemessen wurden, die denen der zugehörigen Kontrollen entsprachen.

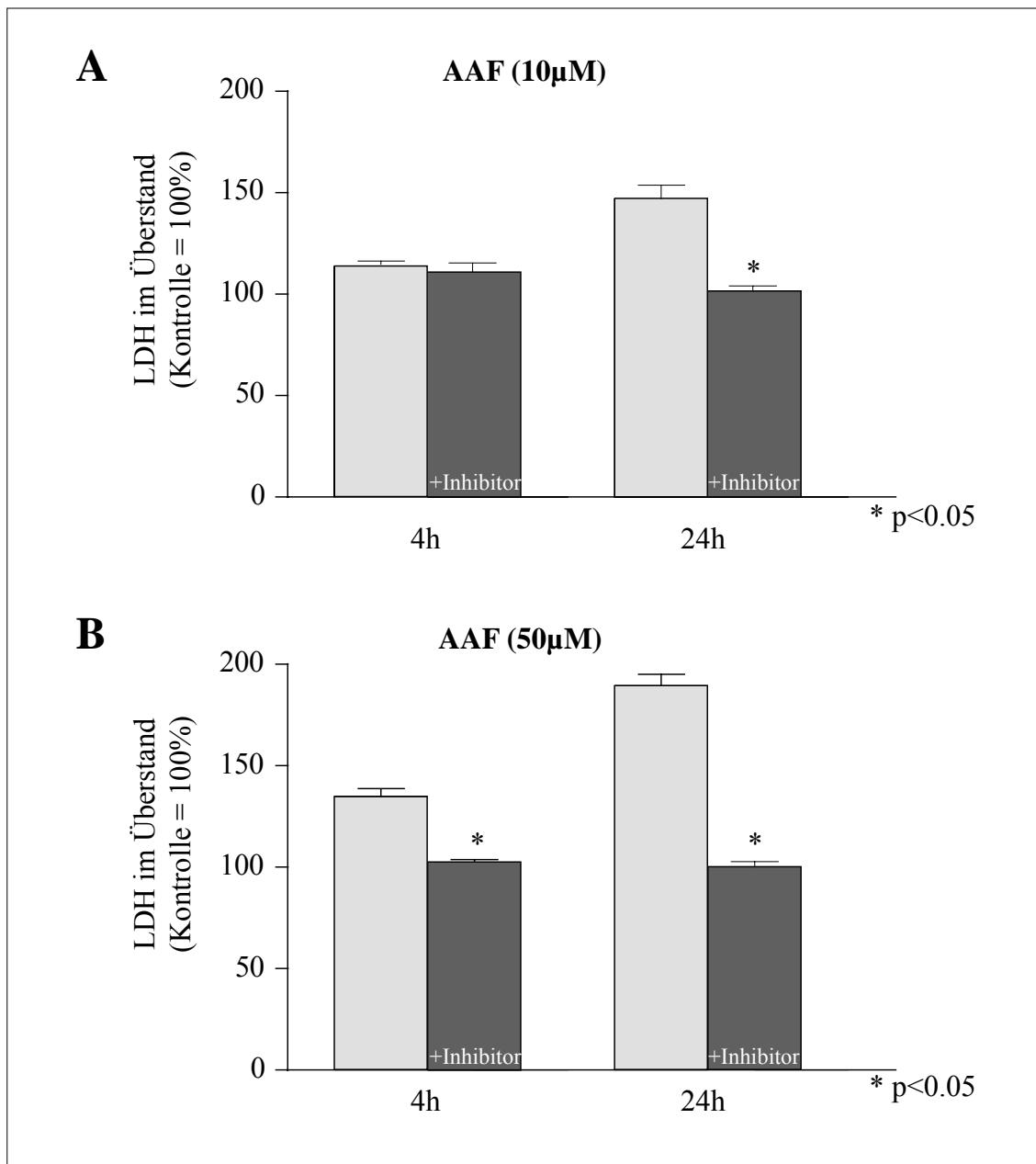


Abbildung 9: LDH-Efflux aus HepG2-Zellen unter AAF-Behandlung in einer Konzentration von 10µM (A) und 50µM (B), gemessen nach einem Zeitraum von 4h und 24h. Durch Zugabe des c-PKC-Inhibitors GF109203X konnte die zytotoxische Wirkung des Kanzerogens AAF aufgehoben werden (n=3, t-Test, *p≤0,05)

3.2.2 NOF

NOF wurde in einer Konzentration von 10µM verwendet. Es konnte sowohl nach 4 Stunden als auch nach 24 Stunden ein erhöhter LDH-Efflux verzeichnet werden. Der

Inhibitor nahm jedoch lediglich nach 24 Stunden Inkubation Einfluß. Hier lag das Meßergebnis im Bereich der Kontrollmessung.

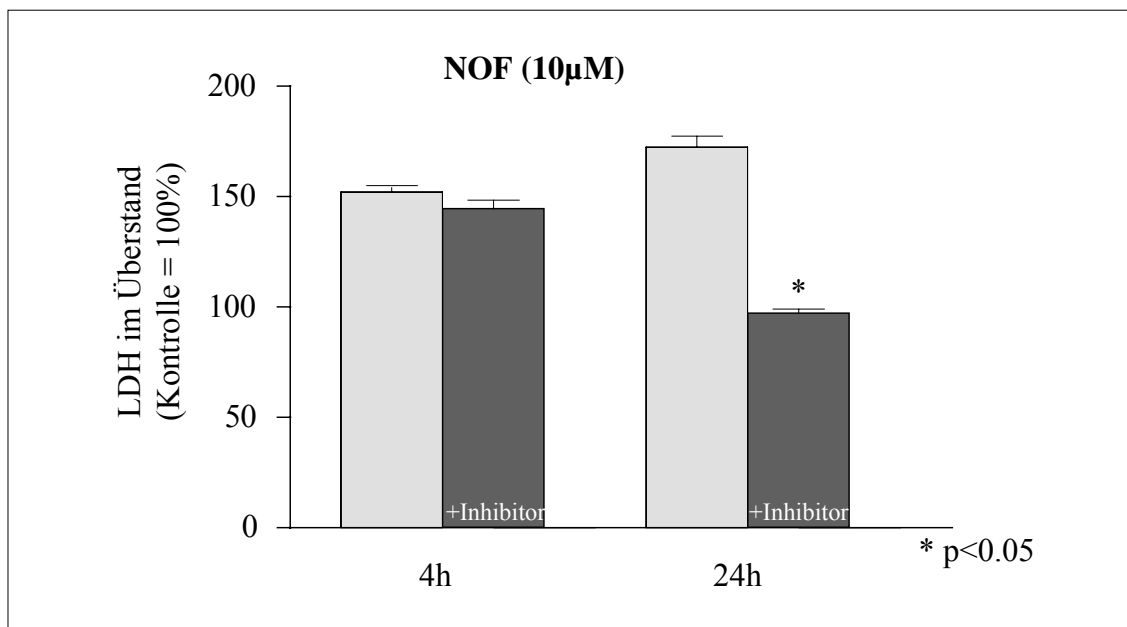


Abbildung 10: LDH-Efflux aus HepG2-Zellen unter NOF-Behandlung (10µM), gemessen nach einem Zeitraum von 4h und 24h. Durch Zugabe des c-PKC-Inhibitors GF109203X konnte die zytotoxische Wirkung des Kanzerogens NOF zeitabhängig aufgehoben werden (n=3, t-Test, *p≤0,05)

3.2.3 Phenobarbital

Phenobarbital führte nach 4 Stunden Behandlung in der niedrigeren 2mM Konzentration zu keiner nennenswerten Membranschädigung (Abb.11). Nach 24 Stunden stellte sich jedoch ein deutlicher zytotoxischer Effekt ein: die LDH-Aktivität im Überstand der behandelten Zellen erreichte nahezu das Zweifache der Aktivität der unbehandelten Kontrollen. GF109203X verhinderte diese zytotoxische Wirkung: durch Inkubation mit dem Inhibitor zeigten sich keine Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen.

Die Behandlung mit 5mM Phenobarbital führte nach 4 Stunden und nach 24 Stunden gleichermaßen zu einer membranschädigenden Wirkung, was durch Einsatz des Inhibitors spezifisch verhindert werden konnte.

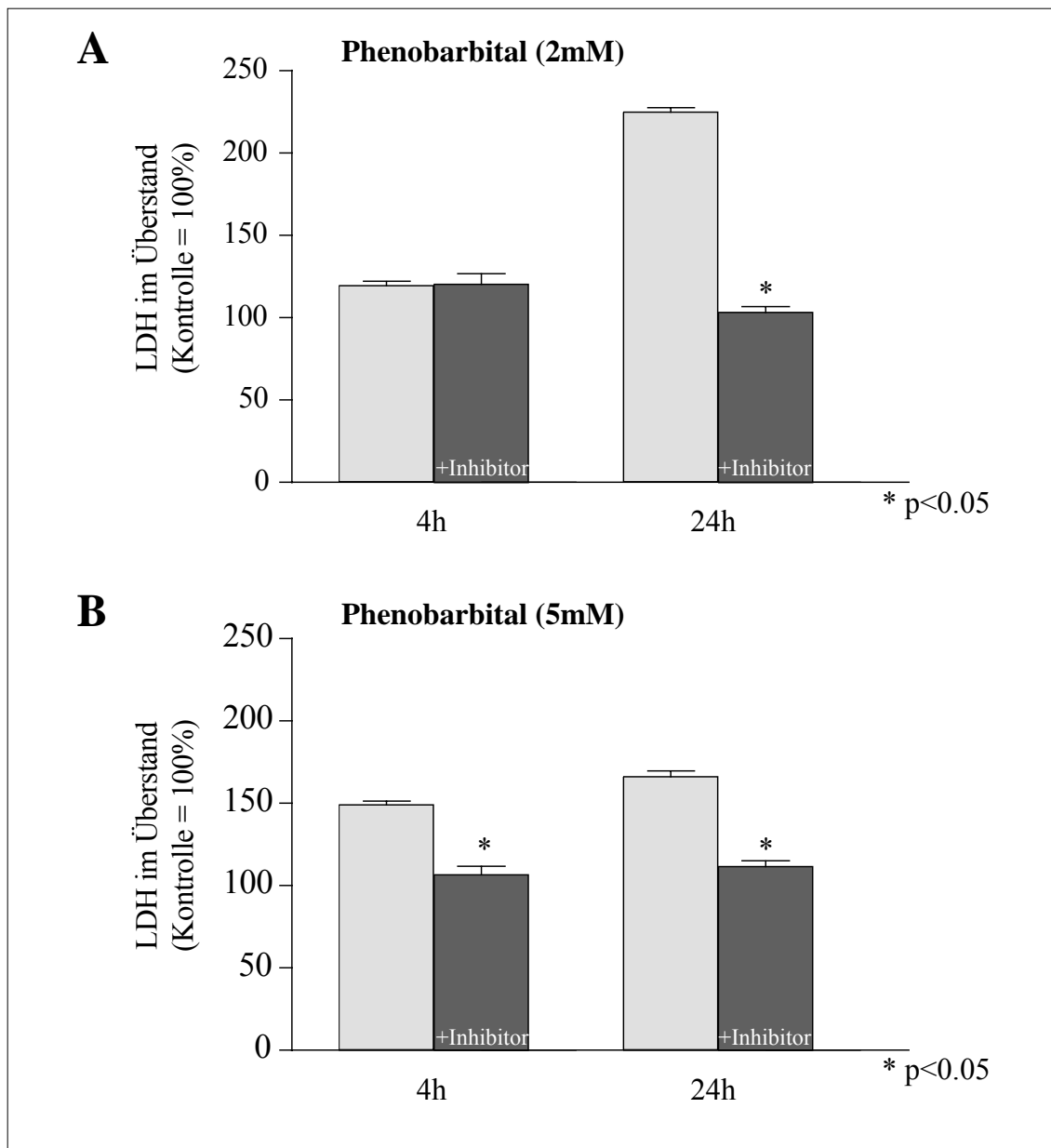


Abbildung 11: LDH-Efflux aus HepG2-Zellen unter Phenobarbital-Behandlung in einer Konzentration von 2mM (A) und 5mM (B), gemessen nach einem Zeitraum von 4h und 24h. Durch Zugabe des c-PKC-Inhibitors GF109203X konnte die zytotoxische Wirkung des Tumorpromotors Phenobarbital aufgehoben werden (n=3, t-Test, *p≤0,05)

3.3 Bestimmung der Protein-Expression des EGF-Rezeptors, der Proteinkinase C, c-fos und c-jun unter Behandlung mit AAF, NOF und Phenobarbital

Die Zellen wurden für die Behandlung mit den entsprechenden Substanzen in Kulturschalen (10cm Durchmesser) ausgebracht und entsprechend des Behandlungsschemas in Abschnitt 2.2 behandelt. Das Gesamtprotein wurde nach 4 und 24 stündiger Behandlung isoliert. Die gesuchten Proteine stellten sich im Westernblot als spezifische Bande dar. Zur Quantifizierung wurde die relative Blotdichte mit dem Programm NIH-Image ermittelt. Der Schwärzungsgrad der unbehandelten Kontrollen wurde hierbei gleich 100% gesetzt.

3.3.1 Bestimmung der Expression des EGF-Rezeptors

3.3.1.1 AAF

Die Behandlung mit 10 μ M AAF hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Expression des EGF-Rezeptors (Abb.12). Sowohl nach der 4 stündigen Behandlung als auch nach 24h lagen die Expressionsniveaus des EGF-Rezeptors um 100%, also in dem Bereich der unbehandelten Kontrollen. Die Inkubation mit dem c-PKC-Inhibitor GF10923X führte zu keiner Veränderung.

Anders als bei der niedrigeren Behandlungskonzentration AAF, scheint sich unter 4 stündiger Behandlung mit 50 μ M AAF eine Tendenz zur erhöhten Expression des EGF-R abzuzeichnen. Diese Tendenz konnte jedoch durch GFX unterdrückt werden. Nach 24 Stunden Behandlung mit 50 μ M AAF lag die Expressionshöhe des EGF-Rezeptors im Bereich der Kontrollen, somit zeigte auch der Einsatz des Inhibitors keine Unterschiede im Expressionsniveau.

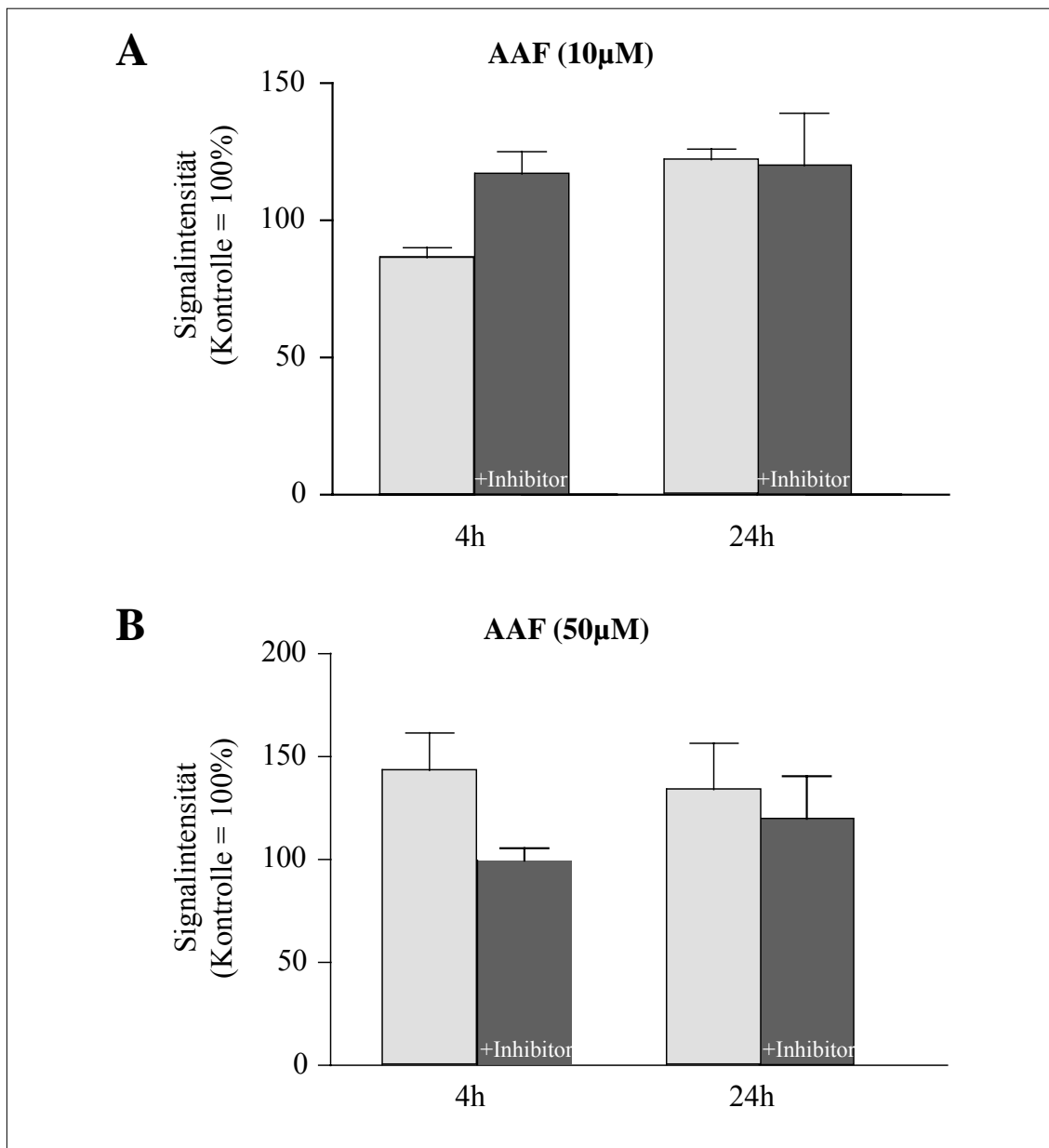


Abbildung 12: Expression des EGF-Rezeptors unter Behandlung mit AAF (10 μM, 50 μM), bestimmt nach einem Zeitraum von 4h (A) und 24h (B). Die Behandlung mit dem Kanzerogen AAF hatte mit und ohne Zugabe des c-PKC-Inhibitors GF109203X keinen Einfluss auf die Expression des EGF-Rezeptors (n=2, kein signifikanter Unterschied)

3.3.1.2 NOF

Die Behandlung mit 10 μM NOF zeigte keine Veränderung hinsichtlich der Expression des EGF-Rezeptors. Sowohl nach 4h als auch nach 24h, unabhängig von der Inkubation

mit dem c-PKC-Inhibitor, lag das Expressionsniveau des EGF-Rezeptors unter dieser Behandlung immer im Bereich der Kontrollen.

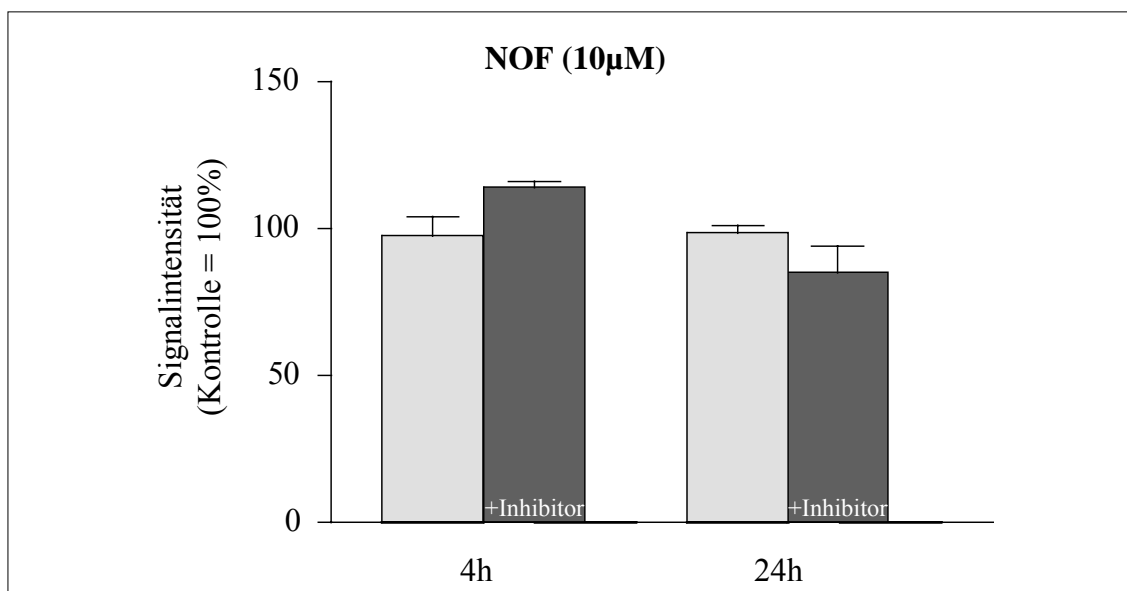


Abbildung 13: Expression des EGF-Rezeptors unter Behandlung mit NOF (10μM), bestimmt nach einem Zeitraum von 4h und 24h. Die Behandlung mit NOF hatte mit und ohne Zugabe des c-PKC-Inhibitors GF109203X keinen Einfluss auf die Expression des EGF-Rezeptors (n=2, kein signifikanter Unterschied)

3.3.1.3 Phenobarbital

Phenobarbital führte in der Konzentration von 2mM nach 4 stündiger Behandlung zu einer verminderten Expression des EGF-Rezeptors. Wie Abbildung 14 zeigt, wurde das Expressionsniveau durch Phenobarbital auf 75% des Kontrollwertes gesenkt. Dieser Effekt scheint möglicherweise Proteinkinase-C vermittelt zu sein, da die gleichzeitige Inkubation mit dem c-PKC-Inhibitor GF109203X diesen Effekt im Trend aufhob. Auch nach 24 stündiger Behandlung mit 2mM Phenobarbital zeigte sich eine Unterdrückung der Expression des EGF-Rezeptors. Auch dieser Effekt läßt im Trend eine Beteiligung der Proteinkinase C erkennen.

5mM Phenobarbital führte sowohl nach 4h Behandlung als auch nach 24h Behandlung zu einer starken Suppression der Expression des EGF-Rezeptors. Nach 4h Inkubation verringerte sich das Expressionsniveau um 50% im Vergleich zur Kontrolle. Nach 24h Behandlung sank das Expressionsniveau um weitere 10%, sodass nur 40% des Expressionsniveaus der Kontrollen erreicht wurden. Durch den c-PKC-Inhibitor konnte dieser Effekt unter 5mM Behandlung nach 24 stündiger Behandlung weitgehend aufgehoben werden.

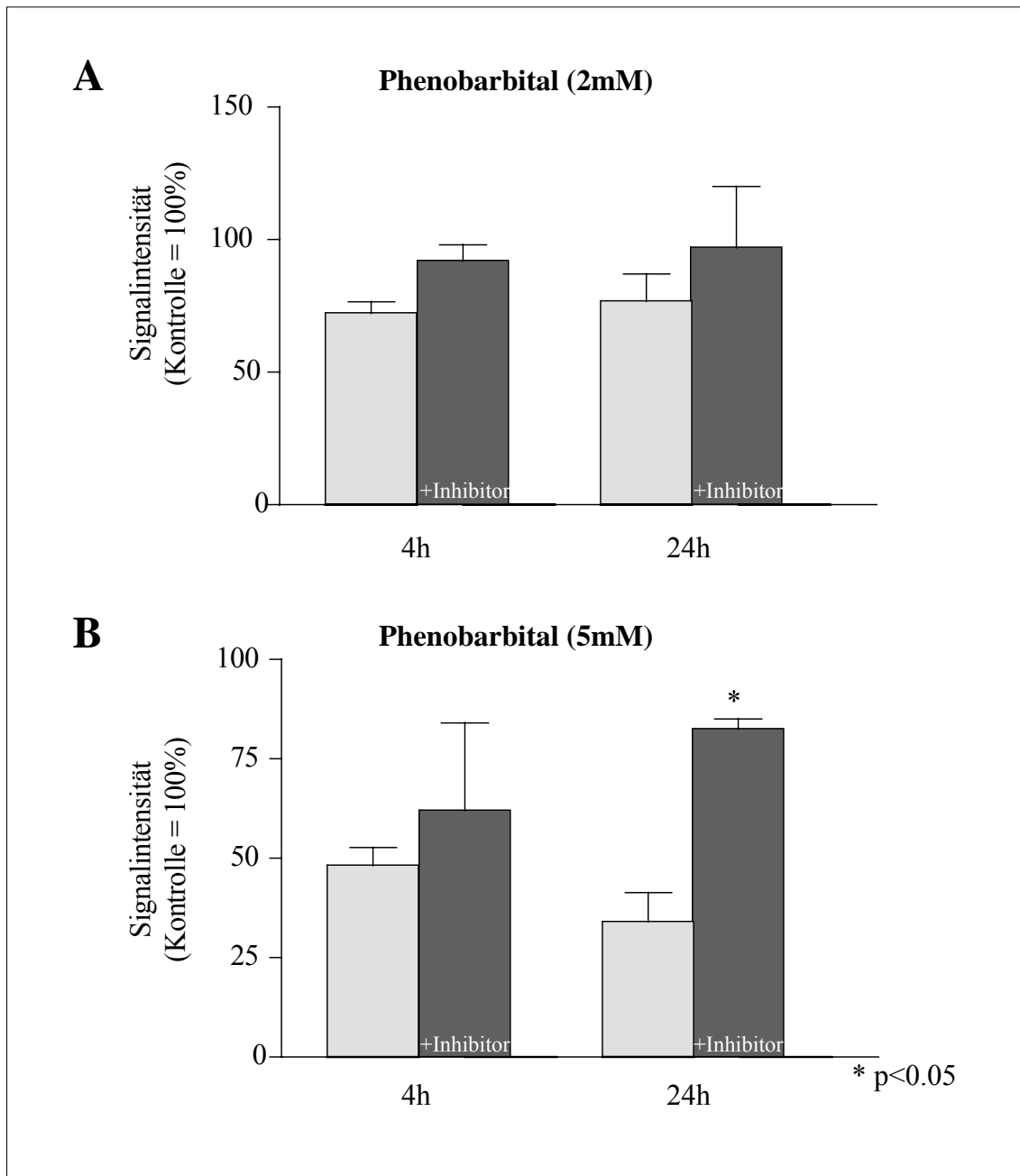


Abbildung 14: Expression des EGF-Rezeptors unter Behandlung mit Phenobarbital (2mM, 5mM) bestimmt nach einem Zeitraum von 4h und 24h. A) Die Behandlung mit dem Tumorpromotor Phenobarbital (2mM) führte nach 4h zu einer Reduktion der Expression des EGF-Rezeptors. Die Zugabe des c-PKC-Inhibitors GF109203X führte im Trend zu einer gesteigerten Expression des EGF-Rezeptors. Nach 24h konnte kein Effekt nachgewiesen werden. B) Die Behandlung mit 5mM Phenobarbital führte nach 4h zu einer starken Reduktion der EGF-Rezeptor-Expression, der nicht durch GF109203X aufgehoben werden konnte. Die Expression wurde nach 24 stündiger Behandlung noch weiter reduziert. Dieser Effekt konnte durch den c-PKC-Inhibitor weitgehend aufgehoben werden. (n=3-4, t-Test, *p<0,05)

3.3.1.3.1 Aktivität des EGF-Rezeptors unter Behandlung mit 2mM Phenobarbital

Um die Aktivität und Expression des EGF-R unter Behandlung mit 2mM Phenobarbital zu untersuchen, wurde zunächst, wie im Abschnitt 2.4 beschrieben, der EGF-Rezeptor mittels Immunpräzipitation angereichert. Mit dem anschließenden Westernblot wurde durch Verwendung eines phosphospezifischen Antikörpers die Aktivität des EGF-Rezeptors bestimmt. Nach Lösen dieser Verbindung wurde ein konventioneller Antikörper zugegeben, der aktivitätsunabhängig den Expressionsgrad des EGF-Rezeptors detektierte. Es zeigte sich wiederum eine verminderte Expression des Rezeptors (Abb. 15). Unter der Behandlung mit 2mM Phenobarbital zeigte sich eine deutlich gesteigerte Aktivität des Rezeptors im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Die maximale Aktivität des Rezeptors wurde durch Zugabe des endogenen Liganden EGF bestimmt.

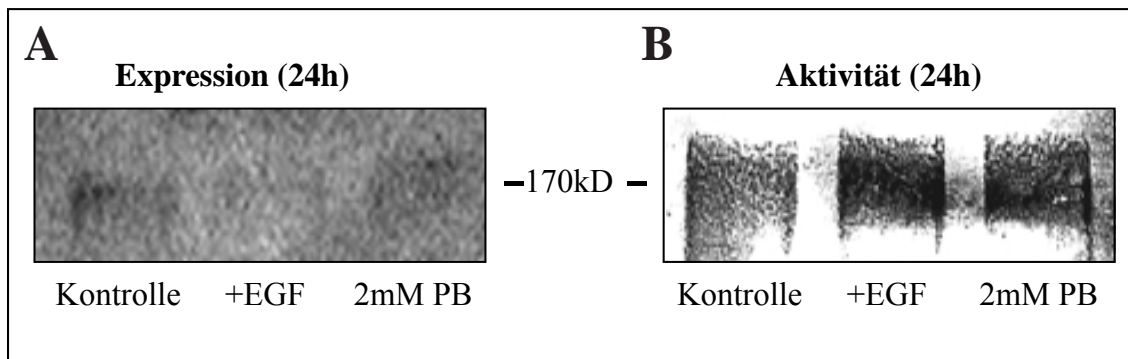


Abbildung 15: Representative Westernblots zur Darstellung der Expression (A) und Aktivierung (B) des EGF-Rezeptors nach einer Behandlung mit dem Tumorpromotor Phenobarbital in einer Konzentration von 2mM nach 24h. A) Phenobarbital reduzierte die Expression des EGF-Rezeptors. B) Weiterhin stieg die Aktivität des EGF-Rezeptors unter Phenobarbital-Behandlung an. Als Kontrolle wurde jeweils der endogene Ligand EGF mitgeführt.

3.3.2 Bestimmung der Expression der c-PKC unter Behandlung mit AAF, NOF und Phenobarbital

Die Behandlung der HepG2-Zellen mit AAF (10 μ M bzw. 50 μ M), NOF (10 μ M) und Phenobarbital (2mM bzw. 5mM) hatte keinen Einfluß auf die Expression des zytosolischen Enzyms Proteinkinase C. Unabhängig von der Inkubationszeit (4h und 24h) und unabhängig von der Zugabe des Proteinkinase-C-Inhibitors GF10923X lagen alle Ergebnisse im Bereich der Kontrollen (Abbildung 16 A-E).

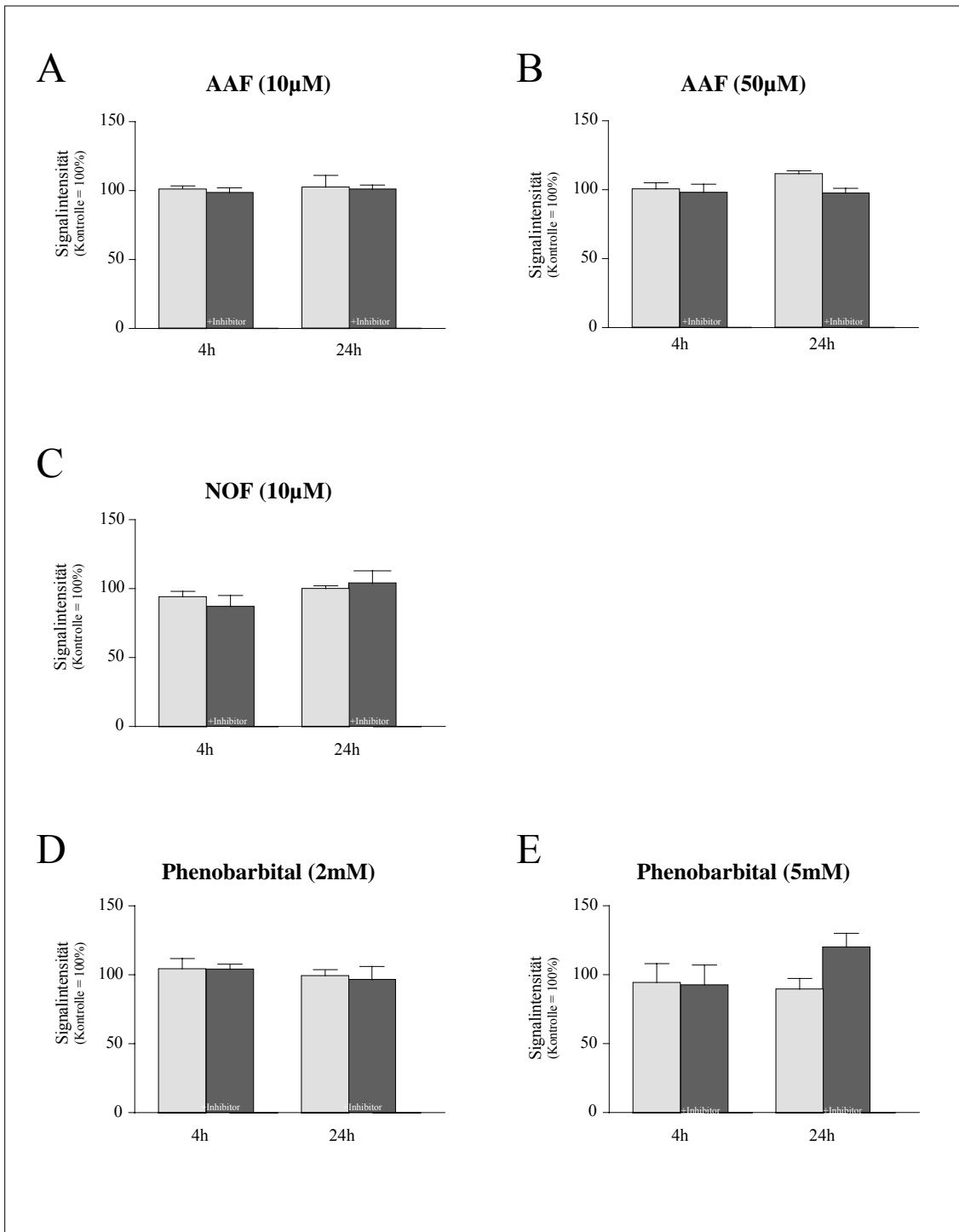


Abbildung 16: Expression der c-PKC nach Behandlung mit dem Kanzerogen AAF in einer Konzentration von 10µM (A) und 50µM (B), NOF in einer Konzentration von 10µM (C) und dem Tumorpromotor Phenobarbital in einer Konzentration von 2mM (D) und 5mM (E). Durch keine der angegebenen Substanzen wurde die Expression der Proteinkinase C verändert, auch die Zugabe des c-PKC-Inhibitors zeigte keinen Effekt. (n=2, kein signifikanter Unterschied)

3.3.3 Bestimmung der Expression von c-fos unter Behandlung mit AAF, NOF und Phenobarbital

Der Nachweis der Expression des Protoonkogens c-fos nach Behandlungsschema 2.2 erfolgte nach 4h und 24h (Abbildung 17a-e).

Unter Behandlung mit AAF zeigte sich lediglich nach 4h mit der niedrigen 10 μ M Konzentration eine Tendenz zur erhöhten Expression von c-fos. Die 10 μ M Behandlung über 24h zeigte keinen Einfluß auf die Expression von c-fos. Ebenso führt die 50 μ M Konzentration AAF und 10 μ M Konzentration NOF (Inkubation über 4h bzw 24h jeweils ohne und mit Inhibitor GFX) zu keiner Veränderung in der Expression des Protoonkogens c-fos.

Im Gegensatz zu Voruntersuchungen mit weniger gut differenzierten Rattenhepatomzellen und HepG2-Zellen führte Phenobarbital in diesem Versuch nicht zu einer Erhöhung der Expression von c-fos. Dieses Ergebnis zeigte sich unabhängig von der Dosis (2mM und 5mM) und auch unabhängig vom Behandlungszeitraum (4h bzw 24h). Die Inkubation mit dem c-PKC-Inhibitor GF109203X führte außerdem zu keiner Veränderung hinsichtlich der Expression von dem Protoonkogen c-fos.

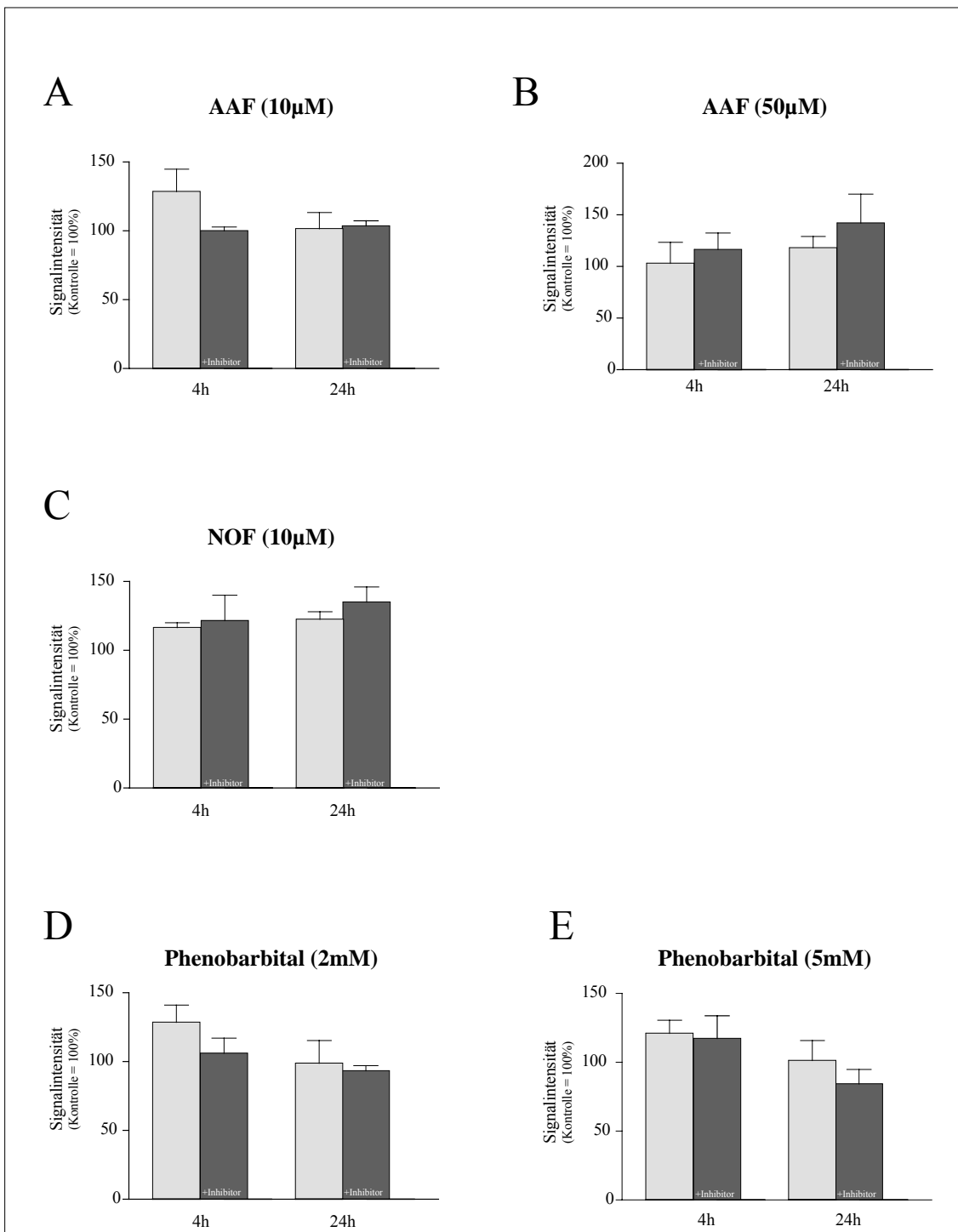


Abbildung 17: Expression der Protoonkogens c-fos nach Behandlung mit dem Kanzerogen AAF in einer Konzentrationen von 10µM (A) und 50µM (B), NOF in einer Konzentration von 10µM (C) und dem Tumorpromotor Phenobarbital in einer Konzentration von 2mM (D) und 5mM (E). Durch keine der angegebenen Substanzen wurde die Expression von FOS verändert, auch die Zugabe des c-PKC-Inhibitors zeigte keinen Effekt. (n=2, kein signifikanter Unterschied)

3.3.4 Bestimmung der Expression von c-jun unter Behandlung mit AAF, NOF und Phenobarbital

Die Behandlung der HepG2-Zellen nach dem Behandlungsschema 2.2 mit AAF (10 μ M und 50 μ M), NOF (10 μ M) und Phenobarbital (2mM und 5mM) führte zu keinem Expressionsanstieg des Protoonkogens c-jun. Sowohl nach 4h Behandlung als auch nach 24h Behandlung und unabhängig vom Einsatz des PKC-Inhibitors lagen alle Meßwerte im Bereich der Kontrollen (Abb. 18 A-E).

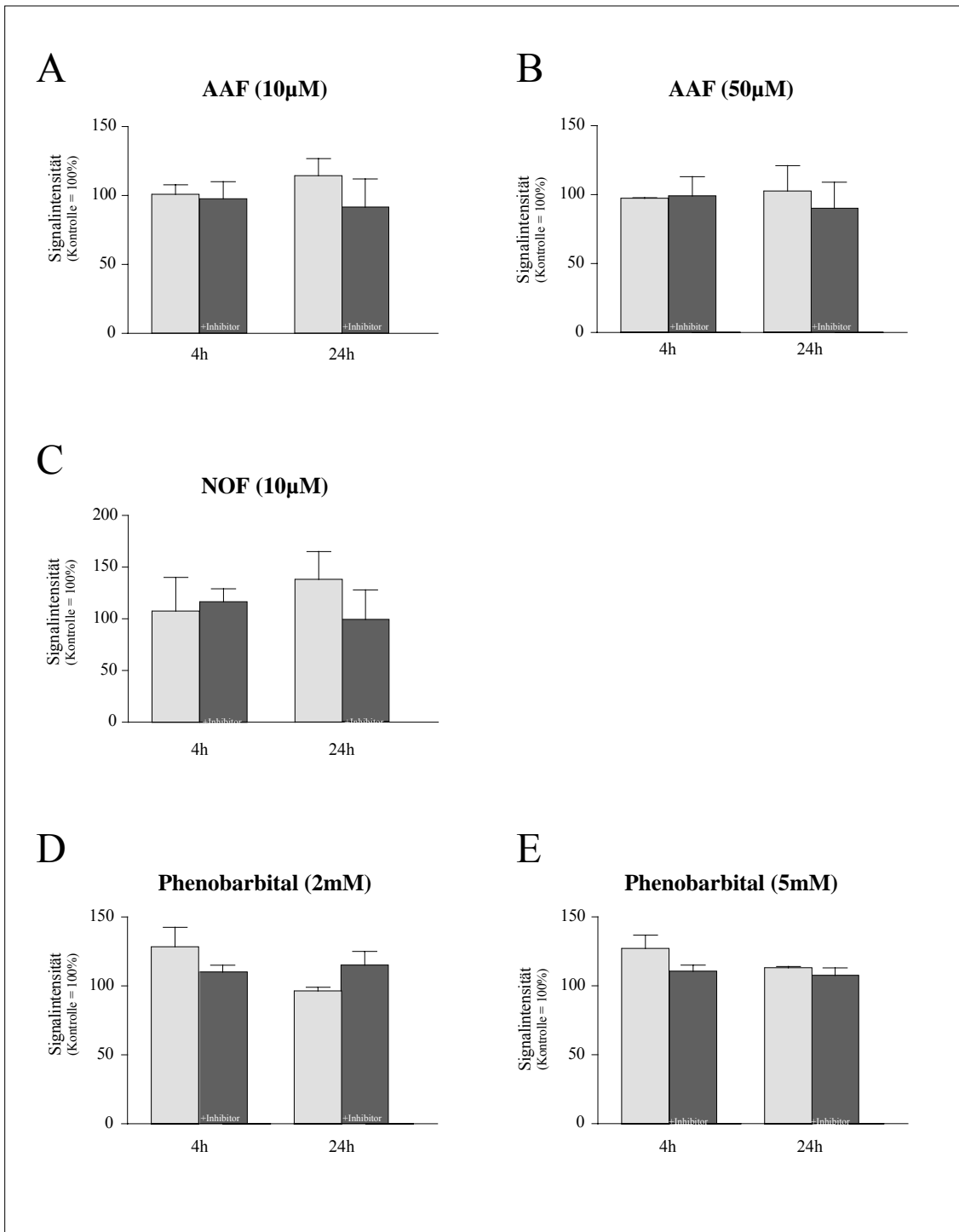


Abbildung 18: Expression der Protoonkogens c-jun nach Behandlung mit dem Kanzerogen AAF in einer Konzentrationen von 10µM (A) und 50µM (B), NOF in einer Konzentration von 10µM (C) und dem Tumorpromotor Phenobarbital in einer Konzentration von 2mM (D) und 5mM (E). Durch keine der angegebenen Substanzen wurde die Expression von JUN verändert, auch die Zugabe des c-PKC-Inhibitors zeigte keinen Effekt. (n=2, kein signifikanter Unterschied)

3.4 Bestimmung des aktiven Transkriptionsfaktoren AP1 und NFκB im Kernprotein unter Behandlung mit AAF, NOF und Phenobarbital

Mit Hilfe des Gel-Mobility-Shift-Assays können sequenzspezifische DNA-bindende Proteine wie z.B. die Transkriptionsfaktoren AP1 und NFκB nachgewiesen werden (Schmitz et al. 1991). Diese Methode basierte auf der Tatsache, daß Protein-Nukleotid-Komplexe langsamer durch ein natives (nicht denaturierendes) Polyacrylamidgel wandern als ungebundenes Nukleotid. Das jeweils spezifische Oligonukleotid für AP1 bzw. NFκB wurde mit Digoxigenin gekoppelt. Nach dem anschließenden Blot konnte somit ein Färbenachweis mit Hilfe eines alkalische Phosphatase gekoppelten anti-Dig-Antikörper erfolgen. Die semiquantitative Auswertung der Banden erfolgte mit Hilfe eines Laserdensitometers. Die Kontrollen wurden dabei gleich 100% gesetzt.

Um nachzuweisen, daß die Bindung spezifisch ist, wurde in einer Spur lediglich reines Oligonukleotid ohne Kernextrakt aufgetragen, das nahe der Lauffront zu erkennen war. In einer weiteren Spur erfolgte der Spezifitätsnachweis für die Bindung: eine Spur enthielt ein nicht DIG markiertes Oligonukleotid im Überschuß, die zugehörige Bande erschien deutlich abgeschwächt. In einer anderen Spur wurde ein nicht markiertes Fremdoligonukleotid zugegeben und in der vierten Kontrollspur wurde das markierte Oligonukleotid mit den Proteinkomplexen aufgetragen. Die beiden letztgenannten Behandlungen führten nicht zur Abschwächung der Banden.

3.4.1 Bestimmung des aktiven Transkriptionsfaktors AP1

3.4.1.1 AAF

Durch Behandlung der HepG2-Zellen mit dem kompletten Kanzerogen AAF in einer Konzentration von 10 μ M und 50 μ M über einen Zeitraum von 0,5h, 2h, 4h, 6h und 48h zeigte sich zwar in der Tendenz eine erhöhte AP1-Bindungsaktivität. Ein eindeutiges Ergebnis war anhand der durchgeführten Gel-Mobolity-Shift-Assays jedoch nicht möglich.

3.4.1.2 NOF

Die Behandlung der HepG2-Zellen mit NOF erfolgte in einer Konzentration von 10 μ M und 50 μ M über 0,5h, 2h, 4h, 6h und 48h (Abbildung 19).

In der niedrigeren 10 μ M Konzentration zeigte sich bereits nach 0,5h eine Tendenz zur erhöhten Anwesenheit von AP1 im Kernprotein. Nach 2h war das Maximum an AP1 im Kern erreicht. Die semiquantitative Auswertung zeigte nach 2h Behandlung um 50% höhere Dichtewerte im Vergleich zur Kontrolle. Im Verlauf der weiteren Behandlung war eine Abnahme von aktivem AP1 im Kernproteinkomplex zu verzeichnen bis nach 48h ein Wert erreicht wurde, der wieder im Bereich der Kontrollen lag.

Nahezu parallel zum Verlauf der AP1-Konzentration unter der 10 μ M Behandlung zeigte sich der Verlauf unter 50 μ M Behandlung. Nach 0,5h Inkubation war der aktive Transkriptionsfaktor AP1 zwar nicht erhöht, aber nach 2h Behandlung war auch hier das Maximum erreicht. Die Werte lagen um 50% höher als bei den Kontrollen. Im weiteren Verlauf nahm die Anwesenheit von aktivem AP1 ab bis nach 48h Behandlung eine Bindungsaktivität erreicht wurde, die wieder im Bereich der Kontrollen lag.

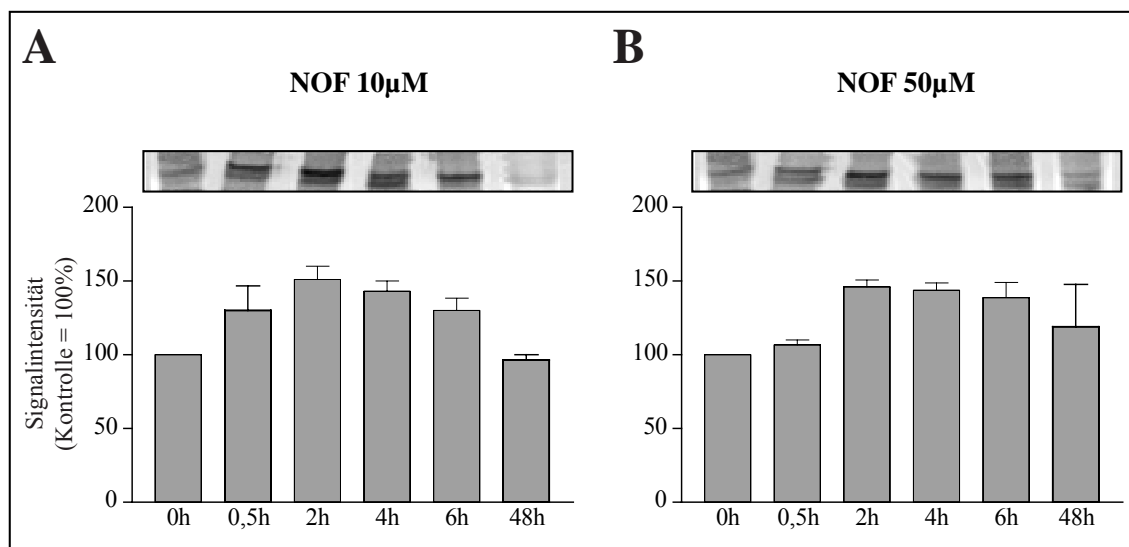


Abbildung 19: Nachweis der Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors AP1 durch Gel-Mobility-Shift-Assay unter Behandlung mit NOF in einer Konzentration von 10µM (A) und 50µM (B) über einen Zeitraum von 48 Stunden. NOF führte in beiden Konzentration zu einer erhöhten Bindungsaktivität, der nach einem Zeitraum von 48h wieder auf Kontrollniveau abfiel (n=3-4, t-Test).

3.4.1.3 Phenobarbital

Voruntersuchungen innerhalb dieser Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass der reine Tumorpromotor Phenobarbital in einer Konzentration von 5mM in HepG2-Zellen zu einer erhöhten AP1-Bindungsaktivität führten (Jakob, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde lediglich ein Gel-Mobility-Shift-Assay durchgeführt, der das Ergebnis aus Voruntersuchungen bestätigen konnte.

3.4.2 Bestimmung des aktiven Transkriptionsfaktors NFκB

3.4.2.1 AAF

Um zu untersuchen, inwiefern der Transkriptionsfaktor NFκB durch AAF (10µM und 50µM) aktiviert werden kann, wurde Kernprotein nach 0,5h, 2h, 4h, 6h und 48h isoliert, um im Anschluß den Gel-Mobility-Shift-Assay mit dem für NFκB spezifischen Oligonukleotid durchzuführen (Abbildung 20).

Die Behandlung mit 10 μ M AAF liess zwar eine Tendenz zur erhöhten Bindungsaktivität von NF κ B nach allen Behandlungszeitpunkten erkennen, die große Streuung dieser semiquantitativen Auswertung erlaubte jedoch keine eindeutige Aussage.

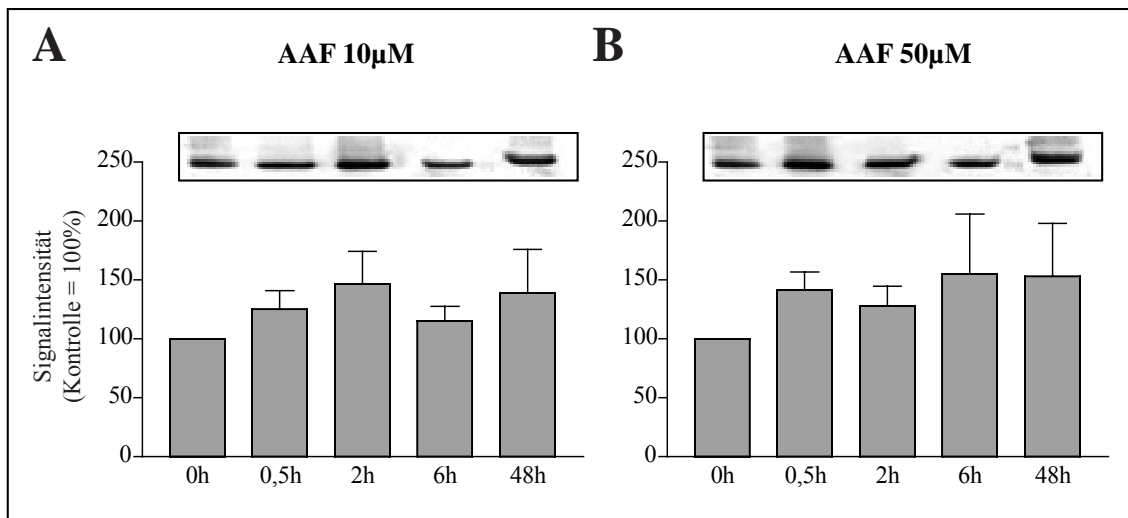


Abbildung 20: Nachweis der Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B durch Gel-Mobility-Shift-Assay unter Behandlung mit AAF in einer Konzentration von 10 μ M (A) und 50 μ M (B) über einen Zeitraum von 48h. AAF führte in beiden Konzentration zu einer erhöhten Bindungsaktivität, der nach einem Zeitraum von 48h erhöht blieb (n=3-4, t-Test).

Die 50 μ M Behandlungskonzentration schien bereits nach 0,5h und 2h eine geringgradige Erhöhung des aktiven Transkriptionsfaktors NF κ B zu bewirken (Abb. 20) Nach 6h und nach 48h war eine eindeutige Aussage mit Hilfe der semiquantitativen Auswertung nicht möglich, da die Werte stark streuten und teilweise das Zweifache unter Behandlung im Vergleich zur Kontrolle ausmachten, andererseits wurden aber auch Dichtewerte gemessen, die den Kontrollwerten entsprachen.

3.4.2.2 NOF

Die Behandlung der HepG2-Zellen mit NOF in einem Zeitraum von 0,5h, 2h, 4h, 6h und 48h führte sowohl in einer Konzentration von 10 μ M als auch in der sehr hohen 50 μ M

Konzentration zu einer stark erhöhten Bindungsaktivität von NFκB. Diese Untersuchungen lieferten trotz der teilweise großen Streuung ein eindeutiges Ergebnis. Nach 48h Behandlungszeit lag die Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors wieder im Bereich der Kontrollen.

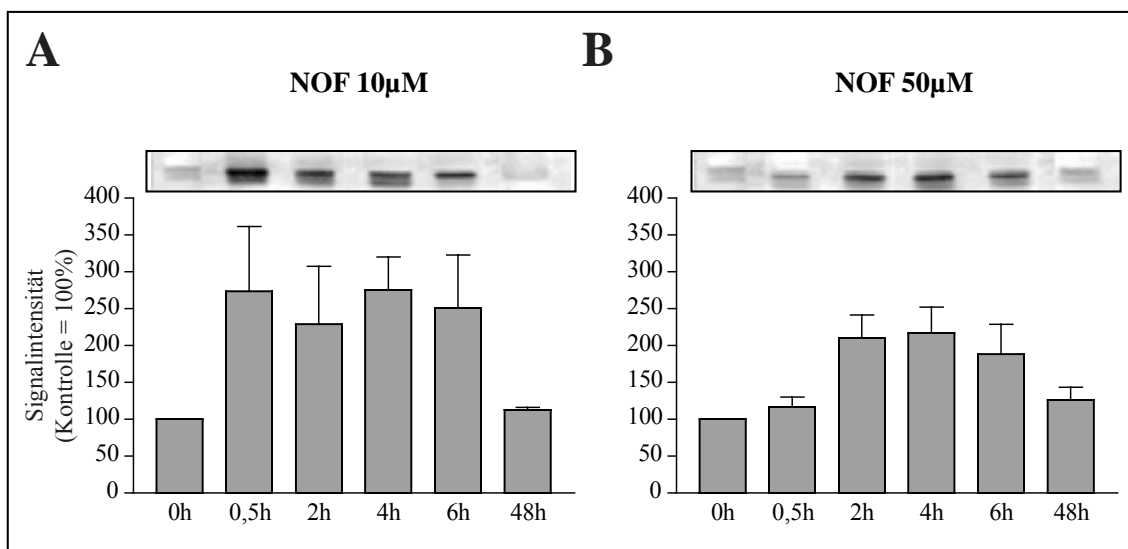


Abbildung 21: Nachweis der Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NFκB durch Gel-Mobility-Shift-Assay unter Behandlung mit NOF in einer Konzentration von 10µM (A) und 50µM (B) über einen Zeitraum von 48h. NOF führte in beiden Konzentration zu einer erhöhten Bindungsaktivität, der nach einem Zeitraum von 48h auf Kontrollniveau abfiel (n=3-4, t-Test).

3.4.2.3 Phenobarbital

Phenobarbital wurde für den Gel-Mobility-Shift-Assay bezüglich NFκB in einer Konzentration von 5mM eingesetzt. Die Behandlung der HepG2-Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 0,5h, 2h, 6h, 24h und 32h.

Bereits nach 0,5h war eine Tendenz zu erhöhter NFκB-Bindungsaktivität erkennbar. Nach 2h Behandlung wurde der Maximalwert (150% des Kontrollwertes) des aktiven Transkriptionsfaktors erreicht. 6h, 24h und 32h nach Behandlung mit Phenobarbital konnte ein konstant erhöhtes Niveau an aktivem NFκB beobachtet werden. Im Vergleich zu den Kontrollen waren die Werte um etwa 25% erhöht.

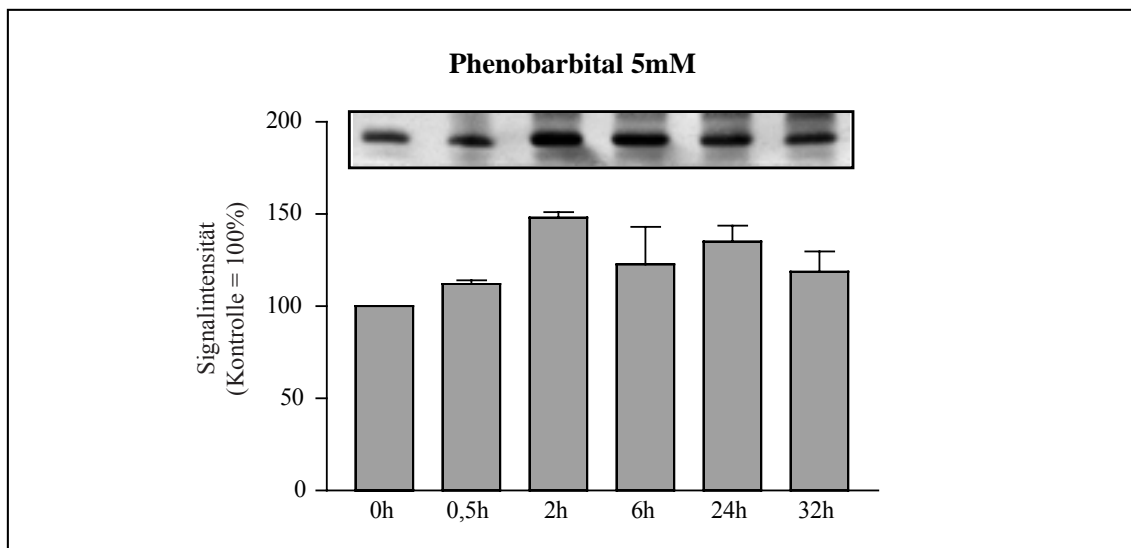


Abbildung 22: Nachweis der Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NFκB durch Gel-Mobility-Shift-Assay unter Behandlung mit Phenobarbital in einer Konzentration von 5mM über einen Zeitraum von 32h. Phenobarbital führte zu einer erhöhten Bindungsaktivität, die über einem Zeitraum von 32h erhöht blieb (n=3-4, t-Test).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Einflüsse der in der Kanzerogenese seit langem bewährten Modellsubstanzen AAF, NOF und Phenobarbital auf Zellwachstum und Signaltransduktion in HepG2-Zellen untersucht. Diese drei Substanzen besitzen unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich ihrer kanzerogenen Wirkung: AAF besitzt als komplettes Kanzerogen initiierende und promovierende Eigenschaften, NOF, dem als aktiven Metaboliten des AAF dessen promovierenden Eigenschaften zugeschrieben werden und der Prototyp eines Tumorpromotors Phenobarbital. In dieser Arbeit wurden nun Gemeinsamkeiten und Unterschiede dieser Stoffe in ihrer Wirkung auf das Zellwachstum und die Signaltransduktion ausgehend vom EGF-Rezeptor über die Proteinkinase C, über die Proteine FOS und JUN bis hin zur Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren AP1 und NF κ B untersucht. Die Beteiligung der PKC sollte hierbei vor allem durch den Vergleich der Meßparameter mit und ohne Einsatz des spezifischen und sehr potenten c-PKC-Inhibitors GF109203X beurteilt werden (Yeo and Exton 1995).

4.1 Wachstumsverhalten der HepG2-Zellen unter Behandlung und zytotoxische Wirkung von AAF, NOF und Phenobarbital

Die Entstehung von Tumoren ist ein komplexer Vorgang. Genotoxische Verbindungen, wie AAF, dessen Metaboliten mit der DNA von Zellen reagieren, sind potentiell kanzerogen. Bis zur Entdeckung von „nicht-genotoxischen“ Kanzerogenen wie Peroxisomenproliferatoren, Dioxin, Östradiol oder Phenobarbital (Issemann and Green 1990, Poellinger et al. 1992, Shaw and Jones 1994) nahm man an, daß diese DNA-Läsionen notwendig und hinreichend für die Tumorbildung sind. Seither hat sich aber die Suche nach nicht-genotoxischen, tumorpromovierenden Mechanismen intensiviert. Eine wesentliche Voraussetzung für die Bildung von präneoplastischen Läsionen und Tumoren scheint die Erhöhung der Zellproliferation zu sein (Shaw and Jones 1994).

Diese kann entweder über Beeinflussung der Wachstumsregulation, durch direkte Wirkung auf Wachstumsrezeptoren oder durch regenerative Zellproliferation nach Zelluntergängen aufgrund zytotoxischer Effekte ausgelöst werden. Daher ist die Untersuchung der Stimulation von Zellwachstum unter Behandlung mit kanzerogenen Substanzen von besonderem Interesse. Unter *in vitro* Bedingungen wurde im Rahmen dieser Arbeit die DNA-Zunahme der HepG2-Zellen unter Behandlung mit AAF (10 μ M, 50 μ M) als komplettem Kanzerogen, NOF (10 μ M), dem die promovierenden Eigenschaften des AAF zugeschrieben werden und Phenobarbital (2mM, 5mM), einem reinen Tumorpromotor, über einen Zeitraum von 4h, 24h, 32h, 48h und 72h untersucht. Die Bedeutung der Proteinkinase C wurde erfaßt, indem die DNA Messung jeweils ohne und mit Einsatz des PKC-Inhibitors GF109203X durchgeführt wurde.

AAF ist eine seit langer Zeit verwendete Modellsubstanz bei Untersuchungen zur Kanzerogenese. Als komplettes Kanzerogen besitzt es initiiierende und promovierende Eigenschaften. Die initiiierende genotoxische Wirkung ist bereits gut untersucht, wohingegen die promovierenden Eigenschaften noch unzureichend geklärt sind. Diese Eigenschaften werden vor allem den aktiven Metaboliten des AAF zugeschrieben. In vorausgehenden *in vivo* Untersuchungen konnte eine Gewichtsabnahme von Ratten unter AAF Behandlung verzeichnet werden (Neumann et al. 1994), die wahrscheinlich auf akute oder chronische Toxizität zurückzuführen war. *In vitro* Untersuchungen an HepG2-Zellen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, daß die Zellen dosisabhängig im Wachstum behindert wurden. Während 10 μ M AAF lediglich eine Tendenz zu einer verringerten DNA-Zunahme zeigten, war das Wachstum unter 50 μ M vor allem nach den späten Zeitpunkten 48h und 72h unter Behandlung eingeschränkt. Interessant war dabei die Tatsache, daß durch Präinkubation mit GF102309X die Zellen signifikant weniger stark im Wachstum behindert wurden. Die Inhibition der Proteinkinase C wirkte hier protektiv. Unter Behandlung mit dem aktiven Metaboliten NOF (10 μ M) waren die Zellen ebenso im Wachstum beeinträchtigt. Der Einsatz des PKC-Inhibitors zeigte

jedoch keinen Effekt. Diese Beobachtung legte den Verdacht nahe, daß AAF oder andere Metaboliten, nicht aber NOF einen Einfluß auf die Proteinkinase C ausübt.

Eine typische Reaktion von Hepatozyten, die in *in vivo*-Versuchen unter Einfluß eines Tumorpromotors stehen, ist gewöhnlich der Anstieg der DNA-Synthese als Zeichen gesteigerter Proliferation (Jirtle et al. 1991, Jones et al. 1993). Phenobarbital, der Prototyp eines Tumorpromotors in der Leber (Peraino et al. 1975), führte in *in vivo* Versuchen an der Leber von Ratten neben der seit langem bekannten Enzyminduktion auch zu einer Zellhypertrophie während der gesamten Expositionsdauer, die vor allem um die Zentralvene lokalisiert war (Jirtle et al. 1991). Eine Zunahme der Zellproliferation war jedoch nur während der ersten 72h nachweisbar. Chronische Phenobarbitalfütterung (länger als 3 Monate) reduzierte die Fähigkeit „normaler“, nicht initiiertes Hepatozyten, auf diese mitogenen Stimuli zu reagieren (Eckl et al. 1988, Meyer et al. 1989). Es wird diskutiert, daß insbesondere initiierte Zellen resistent sind gegenüber mitoseinhibitorischen Signalen und deshalb klonal expandieren können (Andersen et al. 1995, Mansbach et al. 1996]. *In vitro* Untersuchungen an kultivierten Rattenhepatozyten von Hodges et al. (2000) zeigten eine erhöhte DNA-Synthese in der S-Phase des Zellzyklus unter Phenobarbitalbehandlung und gleichzeitiger Stimulation mit dem Wachstumsfaktor EGF durch Aktivierung der p42/44 MAPKinase. Erstmals wurde hierbei auch eine Aktivierung dieser Kinase allein durch Phenobarbital beschrieben. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten HepG2-Zellen entstammten einem menschlichem Hepatom und sind somit als initiierte Zellen anzusehen. Somit würde man einen Wachstumsvorteil dieser Zellen unter Phenobarbital erwarten. Die Untersuchungen des Wachstumsverhalten der HepG2-Zellen unter Phenobarbitalbehandlung (2mM, 5mM) über einen Zeitraum von 72h zeigten jedoch eine dosisabhängige Wachstumsbehinderung. Durch Vorbehandlung mit dem c-PKC-Inhibitor GF109203X wurde keine Veränderung im Wachstumsverhalten der Zellen sichtbar. 2mM Phenobarbital hemmte das Wachstum nur tendenziell im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Die Erhöhung der Konzentration auf 5mM über 72h

fürte hingegen zu einer starken Einschränkung des Zellwachstums. Dieses Ergebnis stimmte mit in vitro Versuchen an unterschiedlichen Rattenhepatomzelllinien aus vorangegangenen Dissertationsarbeiten der Arbeitsgruppe überein (Jakob, 1999; Lüling, 1999). Dies deutet daraufhin, daß Phenobarbital das Zellwachstum auch in initiierten Zellen behindert. Dieser Effekt konnte von (Manjeshwar et al. 1994) ebenfalls an iniitierten Hepatozyten gezeigt werden.

Eine Erklärung für die Wachstumsbehinderung, die durch AAF, NOF und Phenobarbital ausgelöst wurde, könnte eine erhöhte Apoptoserate, eine Induktion von Wachstumsarrest oder eine direkte, akut zytotoxische Wirkung sein. Möglicherweise erfolgte die Beobachtung des Wachstums nicht lange genug, so daß eine reaktiv erhöhte Zellproliferation aufgrund chronischer Zytotoxizität in vitro nicht beobachtet werden konnte.

Um das Ausmaß der akuten zytotoxischen Wirkung zu klären, wurden Zytotoxizitätstests durchgeführt. Als Maß für Zytotoxizität wurde hierbei der LDH-Efflux in dem Medium behandelter und unbehandelter HepG2-Zellen gemessen, da dieses Enzym nur bei Zell- bzw. Membranschädigung nach extrazellulär gelangt.

AAF zeigte vor allem unter einer Behandlung mit 50µM über 24h einen erhöhten LDH-Efflux als Zeichen einer zytotoxischen Wirkung. Übereinstimmend mit der Bestimmung der DNA-Zunahme wurde die zytotoxische Wirkung durch Einsatz des PKC-Inhibitors verhindert. Dieses Phänomen konnte auch unter Behandlung mit NOF 10µM beobachtet werden: ohne Zugabe von GF102309X zeigte sich vor allem nach 24h Behandlung ein deutlicher LDH-Efflux, der unter Einsatz des PKC-Inhibitors GF109203X vergleichbar mit Werten von unbehandelten Kontrollzellen war.

Phenobarbital führte in der geringen 2mM Konzentration nach 24h zu einem starken LDH-Efflux, der durch Zugabe von GF109203X verhindert wurde. Dieses Ergebnis korrelierte nicht mit der zugehörigen Wachstumskurve, da dort nach 24h Behandlung eine DNA-Konzentration gemessen wurde, die den Werten der Kontrolle entsprach. Die 5mM Behandlungskonzentration führte nach 4h und nach 24h, wie nach der

Wachstumskurve zu erwarten, zu einem 1,5-fach höheren LDH-Efflux als in den Kontrollzellen. Dies konnte bereits aus Vorversuchen innerhalb der Arbeitsgruppe von Lüling (Institut für Toxikologie, Universität Würzburg) bestätigt werden. Auffallend ist auch hierbei die anscheinend zytoprotektive Wirkung des c-PKC-Inhibitors GF109203X. Durch die Zugabe dieses Inhibitors lagen die gemessenen Werte im Bereich der Kontrollen. Die gemessene Zytotoxizität stimmte mit dem morphologischen Bild der Zellen unter Behandlung überein. Die Rolle der Proteinkinase C sollte aufgrund der vorliegenden Ergebnisse in weiteren Versuchen geklärt werden, da bisher nicht ersichtlich wurde, ob die zytoprotektive Wirkung des c-PKC-Inhibitors stoffspezifisch oder unspezifisch erfolgte.

AAF wirkt vermutlich zytotoxisch durch Erzeugung von oxidativem Stress, der auch mit den tumorpromovierenden Eigenschaften dieses Kanzerogens in Verbindung gebracht wird. Klöhn et al. (1995) konnten zeigen, daß der Metabolit NOF an den Komplexen I und III der Atmungskette als Redoxcyclusler fungiert. Dies führte letztendlich zu einem kompensatorisch erhöhten Sauerstoffverbrauch (Neumann et al. 1994), einer Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung und einer ATP-Depletion, sowie einer veränderten Permeabilität der mitochondrialen Permeability-Transition-Pore (PTP) (Klöhn et al. 1998), die zum Teil durch das Antiapoptoseprotein Bcl-2 reguliert wird. NOF erwies sich hierbei als Induktor dieser Pore, die eine zentrale Bedeutung in der Regulation der mitochondrienabhängigen Apoptose zugeschrieben wird (Marzo et al. 1998). Till (2001) konnte im Rahmen seiner Promotionsarbeit *in vitro* zeigen, daß die zytotoxische Wirkung des AAF-Metaboliten NOF durch Überexpression von Bcl-2 verhindert werden kann. Die tumorpromovierenden Eigenschaften des NOF könnten somit durch Beeinflussung der Apoptoseregulation erklärt werden. Eine zytotoxische Wirkung, die eine regenerativ bedingte erhöhte Zellproliferation nach sich zieht, könnte so für die Tumorpromotion verantwortlich sein. Die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen stützen die zytotoxischen Eigenschaften des NOF, weisen aber auf die Beteiligung weiterer Komponenten wie der PKC an der Zellantwort hin

Auch der reine Tumorpromotor Phenobarbital soll durch vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen (reactive oxygen species, ROS) in neoplastisch veränderten Leberfoci tumorpromovierende Eigenschaften entfalten (Scholz et al. 1990).

Eine erhöhte Apoptoserate als Ursache für das behinderte Zellwachstum scheint jedoch durch den Tumorpromotor Phenobarbital nicht gegeben zu sein, da seit langem eher apoptoseinhibierende Effekte dieses Barbiturates für das Wachstum präneoplastischer Leberfoci verantwortlich gemacht werden (Bursch et al. 1984, Plant et al. 1998).

4.2 Modulation der Signaltransduktion auf verschiedenen Ebenen

4.2.1 EGF-Rezeptor

Der EGF-Rezeptor gehört zur Gruppe der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Durch Aktivierung werden intrazelluläre Signale weitergegeben, die vor allem Zellproliferation und Zelldifferenzierung zur Folge haben. Eine Dysregulation dieses Wachstumsrezeptors oder auch der weiteren Signalkaskade führt sehr häufig zur Ausprägung unterschiedlicher Tumoren (Aaronson 1991). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob AAF als komplettes Kanzerogen, NOF als ein aktiver Metabolit und der reine Tumorpromotor Phenobarbital möglicherweise ihre kanzerogene Wirkung auch über den Angriff am EGF-Rezeptor entfalten. Als mögliche Ansatzpunkte wurden hierzu die Expression des EGF-Rezeptors, der Proteinkinase C, c-fos und c-jun, sowie die Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren AP1 und NF κ b untersucht. Insbesondere wurde die Rolle der Proteinkinase C betrachtet, indem die Versuche in einer Testreihe mit und in einer weiteren Testreihe ohne Einsatz des PKC-Inhibitors GF109203X durchgeführt wurden.

Vorausgegangene *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen von Muster (1992) an kultivierten Hepatozyten männlicher Wistar Ratten zeigten eine Beeinflussung des EGF-R unter Behandlung des AAF. Dort zeigte sich eine Abnahme der mikrosomalen EGF-Rezeptor-Konzentration und eine deutliche Reduktion der EGF-Bindung an Plasmamembranen.

Der verantwortliche molekulare Mechanismus dafür ist jedoch nicht bekannt. *In vitro* Untersuchungen in dieser Arbeit an HepG2-Zellen zeigten keine Veränderung bezüglich der Expression des EGF-Rezeptors unter Behandlung mit AAF (10 μ M, 50 μ M über 4h und 24h) und dessen aktiven Metaboliten NOF (10 μ M über 4h und 24h). Es wurde hierbei jedoch die Expression des EGF-Rezeptors als Anteil am Gesamtproteingehalt der Zelle bestimmt. Über die EGF-Bindung kann deswegen durch diese relativ unempfindliche Versuchsanordnung keine Aussage getroffen werden. Für eine Beeinflussung des EGF-Rezeptors durch AAF wurden somit zwar keine Hinweise gefunden, sie ist aber auch nicht vollständig auszuschließen.

Es wird aufgrund von Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* seit langer Zeit angenommen, daß Phenobarbital seine tumorpromovierende Wirkung durch Interaktion mit dem EGF-Rezeptor entfaltet. Welcher molekulare Mechanismus letztendlich dahinter steht, ist noch immer ungeklärt. Eckl et al. (1988) konnten an kultivierten Hepatozyten phenobarbitalbehandelter Tiere eine Reduktion des EGF-Rezeptors verzeichnen. Neuere Erkenntnisse (Dalton et al. 2000) zeigen jedoch, daß durch Phenobarbitalgabe an Fischer 344 Ratten *in vivo* keine Reduktion des EGF-Rezeptors induziert werden kann. Brachte man die Hepatozyten dieser Tiere jedoch in Kultur, so war im weiteren Verlauf nur eine Behandlungskonzentration von 0,05mM Phenobarbital erforderlich, um eine Reduktion des EGF-Rezeptors herbeizuführen. Diese Konzentration unterschritt den unter *in vitro* Bedingungen gewöhnlich verwendeten Dosisbereich von 0,5mM-8mM (Pinkus et al. 1993). Beim Menschen wird Phenobarbital als Antikonvulsivum und Sedativum eingesetzt. Obwohl epidemiologisch keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Phenobarbital und humanem Leberzellkarzinom vorliegen (Clemmesen et al. 1974), lassen die niedrigen Konzentrationen an Phenobarbital, die bei sensibilisierten Tieren zu Veränderungen in der Signaltransduktion führen, doch Zweifel beim Einsatz am Menschen entstehen.

Ähnliche Beobachtungen bezüglich der Expression des EGF-Rezeptors konnten auch *in vitro* gezeigt werden (Meyer et al. 1989). Durch Zugabe von Phenobarbital (>1mM) zum Kulturmedium von Hepatozyten wurde eine Reduktion des EGF-Rezeptors beobachtet. Die Bindungsaktivität des Rezeptors wies hierbei keine Veränderungen auf (Jirtle et al. 1991). Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen aus dieser Arbeit überein. Die Behandlung der HepG2-Zellen mit Phenobarbital (2mM, 5mM) über einen Zeitraum von 4h und 24h führte zu einer verringerten Expression des EGF-Rezeptors. Unter der 2mM Phenobarbitalbehandlung verringerte sich sowohl nach 4h als auch nach 24h die Expression des Rezeptors auf ca. 75% der unbehandelten Kontrollzellen. 5mM führte zu einer weiteren Reduktion des EGF-Rezeptors, sodass nach 4h 50% der Expression der Kontrollen erreicht wurden. Nach 24h mit 5mM waren nur noch 35% des EGF-Rezeptors im Vergleich zu Kontrollen nachweisbar. Dalton et al. (2000) hingegen konnten eine Reduktion des Wachstumsrezeptors nur an kurzzeitig kultivierten, differenzierten Rattenhepatoyten feststellen. Hepatozyten, die sich längere Zeit in Kultur befanden und HepG2-Zellen zeigten den oben genannten Effekt nicht.

Es ist bekannt, daß Phenobarbital eine Induktion des Enzymssystems Cytochrom P450 bewirkt, insbesondere eine Induktion des Enzym CYP2B1/2 (Lubet et al. 1989). In der Literatur wird diskutiert, ob die Induktion dieses Enzyms und die gleichzeitige „Downregulation“ des EGF-Rezeptors unter Phenobarbitalbehandlung möglicherweise in kausalem Zusammenhang miteinander stehen. Untersuchungen zur Klärung dieser Frage ließen jedoch keinen Zusammenhang erkennen (Dalton et al. 2000).

4.2.2 Proteinkinase C

Die Signaltransduktion über die PKC spielt wahrscheinlich eine essentielle Rolle bei der Tumorentstehung. Daher war es Ziel der Arbeit, zu untersuchen, inwiefern dieses Enzym bei der Behandlung mit oben genannten Stoffen involviert ist. Wie bereits

mehrfach erwähnt, wurden die Versuche deshalb größtenteils zusätzlich mit dem ProteinkinaseC-Inhibitor GF109203X durchgeführt.

In vivo Untersuchungen über die Beeinflussung der Proteinkinase C durch Verfütterung aromatischer Amine, insbesondere des AAF, an männliche Wistar-Ratten wurden bereits in unserem Arbeitskreis durchgeführt. Hierbei konnte jedoch keine eindeutige Aussage über die Modulation der Proteinkinase C unter Behandlung mit aromatischen Aminen getroffen werden. *In vitro* Versuche bezüglich der Expression der PKC wurden in dieser Arbeit an HepG2-Zellen unter Behandlung über 4h und 24h mit AAF (10 μ M, 50 μ M) und dessen Metaboliten NOF (10 μ M) durchgeführt. Die Expression dieses Enzyms wurde als Anteil im Gesamtproteingehalt der Zellen gemessen. Hierbei zeigte sich keine Veränderung der Expression unter Behandlung, auch nicht durch Präinkubation mit GF109203X. Über die Aktivität dieses Enzyms läßt sich durch diese Versuchsgestaltung keine Aussage machen. Lee et al. (2000) konnten jedoch zeigen, daß Milzzellen von Mäusen unter AAF-Behandlung (50 μ M über 18h) eine deutlich reduzierte zytosolische PKC-Aktivität aufwiesen.

Inwiefern die Proteinkinase C bei der „Downregulation“ des EGF-Rezeptors unter Phenobarbitalbehandlung beteiligt ist, wird kontrovers diskutiert. Für Phenobarbital wurden hemmende Effekte auf die Proteinkinase C durch kompetitive Hemmung von dessen Effektor Diacylglycerol (DAG) beschrieben (Chauhan and Brockerhoff 1987). Meyer et al. (1989) führten die Veränderungen jedoch nicht auf eine Beteiligung der Proteinkinase C zurück. Die Expression des EGF-Rezeptors in HepG2-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit auch unter Einsatz des Inhibitors GF109203X betrachtet. Unter Behandlung mit 5mM Phenobarbital und dem PKC-Inhibitor über 24h war die Expression deutlich weniger stark reduziert. Eine Beteiligung der Proteinkinase C nach Phenobarbitalgabe ist demnach nicht völlig auszuschließen.

Betrachtet man die Expression der Proteinkinase C, so konnte unter Behandlung mit Phenobarbital (2mM, 5mM über 4h und 24h) keine Veränderung im Vergleich zu

unbehandelten Kontrollzellen beobachtet werden. Auch die zusätzliche Inkubation mit dem PKC-Inhibitor GF109203X hatte darauf keinen Einfluß.

Bei diesem Versuch wurde die Menge der PKC im Gesamtproteingehalt der Zellen gemessen. Es zeigte sich keine Expressionsänderung dieses Enzymes unter Behandlung mit AAF, NOF und Phenobarbital. Da aber der PKC-Inhibitor GF109203X Einfluß auf verschiedene andere Meßparameter (z.B. Zytotoxizität und Wachstumsverhalten) hatte, liegt die Vermutung nahe, daß zwar nicht die Expression, möglicherweise aber die Aktivität dieses Enzymes an der Wirkung von AAF, NOF und Phenobarbital beteiligt ist. Um einen besseren Nachweis der Aktivität dieses Enzyms zu bekommen, wäre es von Vorteil, in Folgeuntersuchungen den membranständigen Anteil der PKC zu bestimmen, da die Aktivität dieses Enzyms mit dem Übergang von einer löslichen, cytoplasmatischen Form zu einer membranständigen Form verbunden ist (Thomas et al. 1987).

4.2.3 c-fos , c-jun, AP1 und NF κ b

c-fos und c-jun sind „early-response“ Gene, deren Genprodukte eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung, bei der Zellproliferation und bei der Regulation des Zellzyklus übernehmen. Die Aktivierung dieser beiden Gene wird als Zwischenschritt in der Signaltransduktion der Tumorpromotion interpretiert (Mehmet and Rozengurt 1991). Die Expression dieser beiden Gene kann durch Wachstumsfaktoren wie EGF induziert werden. In der vorliegenden Arbeit sollte nun die Induktion von c-fos und c-jun durch AAF, NOF und Phenobarbital untersucht werden.

Untersuchungen von Deubelbeiss (1994) zeigten *in vivo*, daß eine Behandlung von Ratten mit Phenobarbital und vorausgegangener Initiation durch aromatische Amine wie AAF zu einer erhöhten Expression von c-fos und c-jun in der Leber führte. FOS war dabei im Bereich um die Zentralvene und im Bereich der Foci vermehrt vorhanden (Bitsch et al. 1999). Hinsichtlich der tumorpromovierenden Eigenschaften von

Phenobarbital war eine Erhöhung im Bereich der Foci von Bedeutung, da diese initiierte Zellen enthalten sollen. In vitro Versuche von Jakob (Institut für Toxikologie, Universität Würzburg) wurden hierzu an unterschiedlich differenzierten Rattenhepatomzelllinien und der hoch differenzierten humanen Hepatomzelllinie HepG2 mit der Fragestellung durchgeführt, ob durch Behandlung mit Phenobarbital eine relative Erhöhung dieser beiden Protoonkogenprodukte auch *in vitro* im Gesamtprotein der Zelle oder in den Kernextrakten induziert werden kann. Es zeichnete sich eine Kumulation der Genprodukte im Zellkern ab. Für die Rattenhepatomzelllinien war JUN und FOS gleichermaßen in Kernextrakt und Gesamtprotein verteilt, während bei der humanen Hepatomzelllinie HepG2 vor allem eine starke Kumulation von JUN im Kernextrakt beobachtet wurde. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Beobachtungen aus der vorliegenden Arbeit. Es war zwar kein eindeutig erhöhter FOS- oder JUN-Gesamtproteingehalt der HepG2-Zellen unter Behandlung mit Phenobarbital (2mM, 5mM), AAF (10µM, 50µM) und NOF (10µM) über 4h und 24h jeweils auch mit Einsatz des GF109203X nachweisbar. Dieses Ergebnis schließt aber die Möglichkeit nicht aus, daß die Genprodukte unter Behandlung vermehrt im Zellkern vorliegen, schließlich ist der Zellkern der Ort, wo sie die Transkription zahlreicher Gene bewirken (Angel and Karin 1991, Curran and Franza 1988). Dafür spricht die erhöhte Bindungsaktivität von AP1. Möglicherweise befanden sich die HepG2-Zellen zum Behandlungszeitpunkt nicht in derselben Phase des Zellzyklus, so daß keine eindeutigen erhöhten Expressionsspiegel beobachtet werden konnten. Dies könnte in Folgeversuchen ausgeschlossen werden, indem die HepG2-Zellen durch „Hungern“ mit serumfreiem Medium in die gleiche Phase des Zellzyklus gebracht würden.

FOS und JUN bilden als Heterodimer den AP1-Komplex. Dieser Transkriptionsfaktor spielt eine wichtige Rolle im normalen Zellzyklus (Curran and Franza 1988), bei der Zellproliferation (Angel and Karin 1991), aber auch bei zellulären Differenzierungsprozessen und neoplastischen Transformationen (Szabo et al. 1996).

Möglicherweise übt Phenobarbital seine tumrorpromovierende Eigenschaft über Induktion des AP1-Komplexes aus (Pinkus et al. 1993). Eine erhöhte AP1-Bindungsaktivität in HepG2-Zellen nach einer Behandlung mit Phenobarbital konnte Jakob (1999) bereits nachweisen. Interessant erschien nun die Frage, ob auch AAF und NOF über Induktion des AP1-Komplexes wirken können. Während für die Induktion des AP1-Komplexes unter AAF-Behandlung keine eindeutigen Ergebnisse vorliegen, führte NOF sowohl in der niedrigen 10 μ M Konzentration als auch in der 50 μ M Konzentration zu einer erhöhten Bindungsaktivität des AP1-Komplexes. Das Maximum wurde bereits nach 2h erreicht und nach 48h Behandlung entsprach die Bindungsaktivität wieder der Aktivität un behandelter Kontrollen. Somit besteht durchaus die Möglichkeit, daß vor allem NOF auch durch Induktion des AP1-Komplexes wirken kann. Es stellt sich nun die Frage, ob durch Verwendung des PKC-Inhibitors GF102309X die Bindungsaktivität des AP1-Komplexes unter Behandlung mit AAF, NOF und Phenobarbital in gleicher Weise beeinflußt wird. Diese Frage konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr bearbeitet werden.

Der Transkriptionsfaktor NF κ B ist bei der Regulation von Genen beteiligt, die an der Immunantwort, bei entzündlichen Prozessen, bei der Zellproliferation und auch bei Apoptose involviert sind. Es ist naheliegend, daß eine Deregulation dieses Transkriptionsfaktors die Entstehung von Tumoren begünstigen kann. Daher stellte sich im Rahmen dieser Arbeit die Frage, ob NF κ B auch die Entstehung von Lebertumoren durch AAF, NOF und Phenobarbital beeinflußt.

Da in dieser Arbeit Signalwege ausgehend vom EGF-Rezeptor untersucht werden, ist hinsichtlich der Aktivierung von NF κ B von Bedeutung, daß dieses sowohl durch Raf (über Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes) als auch durch die PKC (durch Phosphorylierung von I κ B) induziert werden kann (Baumann et al. 2000). Seit langer Zeit ist außerdem bekannt, daß NF κ B einen bedeutenden „Sensor“ für oxidativen Streß darstellt (Christman et al. 2000). Abhängig von der Art und dem Umfang der Entstehung

von Radikalen werden unterschiedliche Kaskaden zur Aktivierung von NF κ B angeschaltet. Oxidantien die z. B. an Oberflächenrezeptoren der Plasmamembran wirken, führen über Aktivierung der MAPK-Kaskade zu Stimulation dieses Transkriptionsfaktors (Janssen-Heininger et al. 2000). Oxidantien, die hingegen an den Mitochondrien freigesetzt werden, greifen weiter unten in der Signalkaskade an. Es wird diskutiert, daß oxidativer Streß zur Aktivierung der IP3-Kinase führt. Diese führt dann unabhängig von einer Degradierung des Inhibitorproteins I κ B zu einer Phosphorylierung von Untereinheiten von NF κ B, was ausreicht, um die Aktivität dieses Proteins zu erhöhen (Sizemore et al. 1999). Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß AAF (10 μ M, 50 μ M über einen Behandlungszeitraum von 48h) unabhängig von der Konzentration zu einer erhöhten Bindungsaktivität von NF κ B vor allem zu den frühen Behandlungszeitpunkten (0,5h bis 6h) führen. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Kuo (Deng et al. 2001) überein, die unter AAF Behandlung von H4-II-E Zellen eine Aktivierung von NF κ B durch Degradierung von I κ B β beobachten konnten.

NOF wird als aktiver Metabolit des AAF für dessen nicht-gentoxische tumorpromovierende Eigenschaften verantwortlich gemacht. Es ist bekannt, daß dieser Metabolit durch Entkopplung der Atmungskette oxidativen Streß erzeugt. Betrachtet man die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B unter Behandlung mit NOF (10 μ M, 50 μ M, Behandlung über 48h), so zeigte sich eine stark erhöhte Bindungsaktivität dieses Proteins.

Der reine Tumorpromotor Phenobarbital bewirkt ebenso eine erhöhte Bindungsaktivität von NF κ B. Vermutlich ist auch hierfür oxidativer Streß verantwortlich (Li et al. 1996). Ebenso wie unter AAF-Behandlung zeigt sich dies zu den frühen Behandlungszeiträumen (0,5 bis 6h).

Um die Rolle der ProteinkinaseC unter AAF, NOF und Phenobarbital vollständig zu klären, hätten sich zunächst Versuche anschließen sollen, die unter Verwendung von dem c-PKC-Inhibitor GF109203X die Induktion der beiden Transkriptionsfaktoren AP1

und NF κ B untersuchen. Dieser Versuch konnte wegen fehlender Geldmittel nicht mehr durchgeführt werden. Aus den Ergebnissen hätte hervorgehen können, ob die Aktivierung von AP1 und NF κ B tatsächlich nach den PKC-vermittelten Signaltransduktionswegen erfolgt. Daraus hätte auch ersichtlich werden können, ob die nachweislich zytoprotektive Wirkung von GF109203X unspezifisch ist oder möglicherweise auf eine Einbeziehung der ProteinkinaseC unter Behandlung mit AAF, NOF oder Phenobarbital hindeutet.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden drei Stoffe vergleichend untersucht, die auf unterschiedliche Weise in den Prozess der Lebertumorentstehung bei der Ratte eingreifen. 2-Acetylaminofluoren (AAF) besitzt nach dem Initiations-Promotionsmodell sowohl genotoxische, d.h. tumorinitiierende als auch nichtgenotoxische, d.h. tumorpromovierende Eigenschaften. 2-Nitrosofluoren (NOF), ein Metabolit des AAF, soll dabei aufgrund akut und chronisch toxischer Effekte letztlich für die proliferationssteigernde Wirkung im Sinne der Tumorpromotion verantwortlich sind, also nur tumorpromovierende Eigenschaften besitzen. Phenobarbital zeigt in Initiations-Promotionsversuchen vor allem tumorpromovierende Eigenschaften, die nicht auf zytotoxische Effekte zurückgeführt werden, deren molekularer Mechanismus jedoch unbekannt ist.

Vorausgegangene Untersuchungen hatten auf eine Beteiligung des EGF-Rezeptors und der davon ausgehenden Signaltransduktionswege an der für die Tumorpromotion bedeutsamen Proliferationskontrolle hingewiesen. Es sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob und gegebenenfalls an welcher Stelle die drei Stoffe in die vom EGF-Rezeptor ausgehenden Signaltransduktionswege eingreifen und dadurch die Proliferation im Sinne einer Tumorpromotion zu steigern im Stande sind.

Zu diesem Zwecke wurden die Veränderungen verschiedener Endprodukte in HepG2-Zellen unter Behandlung (4h, 24h) mit den drei Substanzen (AAF 10 μ M, 50 μ M; NOF 10 μ M, Bindungsaktivitäten zusätzlich 50 μ M; Phenobarbital 2mM, 5mM) gemessen:

- Das Wachstumsverhalten und die Freisetzung von LDH als Maß für Toxizität
- Die Expression des EGF-Rezeptors, der Proteinkinase C und der Protoonkogene c-fos und c-jun als Repräsentanten verschiedener Stufen der Kaskade.
- Die Wirksamkeit des PKC-Inhibitors GF109203X zur Bestätigung einer Beteiligung dieser Kaskade.

- Die Bindungsaktivität von AP1 und NF κ B als Transkriptionsfaktoren dieses Weges (bestimmt mit Hilfe des Gel-Mobility-Shift-Assays).

Alle drei Stoffe beeinträchtigen bei entsprechend hohen Konzentrationen das Wachstum der Zellen und setzen LDH als Zeichen einer Membranschädigung frei. NOF (10 μ M) war dabei deutlich wirksamer als AAF (50 μ M, zu späteren Zeitpunkten). Für Phenobarbital (5mM) sind bekanntermaßen höhere Konzentrationen erforderlich um Effekte zu erzielen. Die Hemmung der PKC hatte lediglich bei der hohen AAF-Konzentration einen signifikanten Effekt auf das Zellwachstum. Dagegen hob eine Hemmung der PKC die bei allen drei Verbindungen am LDH-Efflux gemessene Zytotoxizität praktisch auf.

Die Expression des EGF-Rezeptors wurde nur durch Phenobarbital beeinflusst, sie war deutlich erniedrigt. Dieser Effekt konnte bei der niedrigen Konzentration (2mM) durch Hemmung der PKC tendenziell, bei der hohen Konzentration (5mM) nach 24h signifikant und fast vollständig aufgehoben werden. Die Expression der PKC und von c-fos und c-jun wurde durch keine der Substanzen verändert. Dagegen war die Menge des AP1-Komplexes im Kernextrakt in Anwesenheit von NOF (10 μ M) bereits nach 0,5h erhöht. Sie erreichte nach 2h ein Maximum und war nach 48h wieder auf Kontrollniveau abgefallen. Bei der höheren Konzentration (50 μ M) wurde ein paralleler Verlauf der Veränderungen festgestellt. Die bereits früher beobachtete Aktivierung von AP1 durch Phenobarbital wurde bestätigt. Mit AAF konnten nur sehr schwache und nicht eindeutige Effekte erzielt werden. AAF beeinflusste auch die Aktivität von NF κ B nicht eindeutig, während NOF in beiden Konzentrationen und Phenobarbital mit der hohen Konzentration (5mM) die Aktivität von NF κ B schnell (0,5h) und vorübergehend (Maximum 2h) deutlich erhöht. Die Rolle der PKC für die Aktivierung der untersuchten Transskriptionsfaktoren konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr bestimmt werden, die Klärung dieses Problems könnte die beschriebenen Effekte bestätigen. Das komplette Hepatokanzerogen AAF erweist sich zwar als toxisch für die HepG2-Zellen, beeinflusst

jedoch die Signaltransduktion nicht nennenswert, was auf einer unzureichenden Verstoffwechslung zu NOF beruhen kann. Wird dagegen der Metabolit NOF direkt eingesetzt, lassen sich Effekte nachweisen, die sich sinnvoll in das Konzept der Tumorpromotion einordnen lassen. Die Ergebnisse stehen damit im Einklang mit der Vorstellung, daß bei der Erzeugung von Tumoren in der Rattenleber mit AAF sowohl initiiierende als auch promovierende Effekte beteiligt sind. Unterschiede zwischen NOF und Phenobarbital, wie die unterschiedliche Beeinflussung der Expression des EGF-Rezeptors, weisen darauf hin, daß sich auch die primären Zielstrukturen, die das Proliferations-Signal auslösen, unterscheiden. Abbildung 23 fasst die in dieser Arbeit erhobenen Befunde nochmals graphisch zusammen:

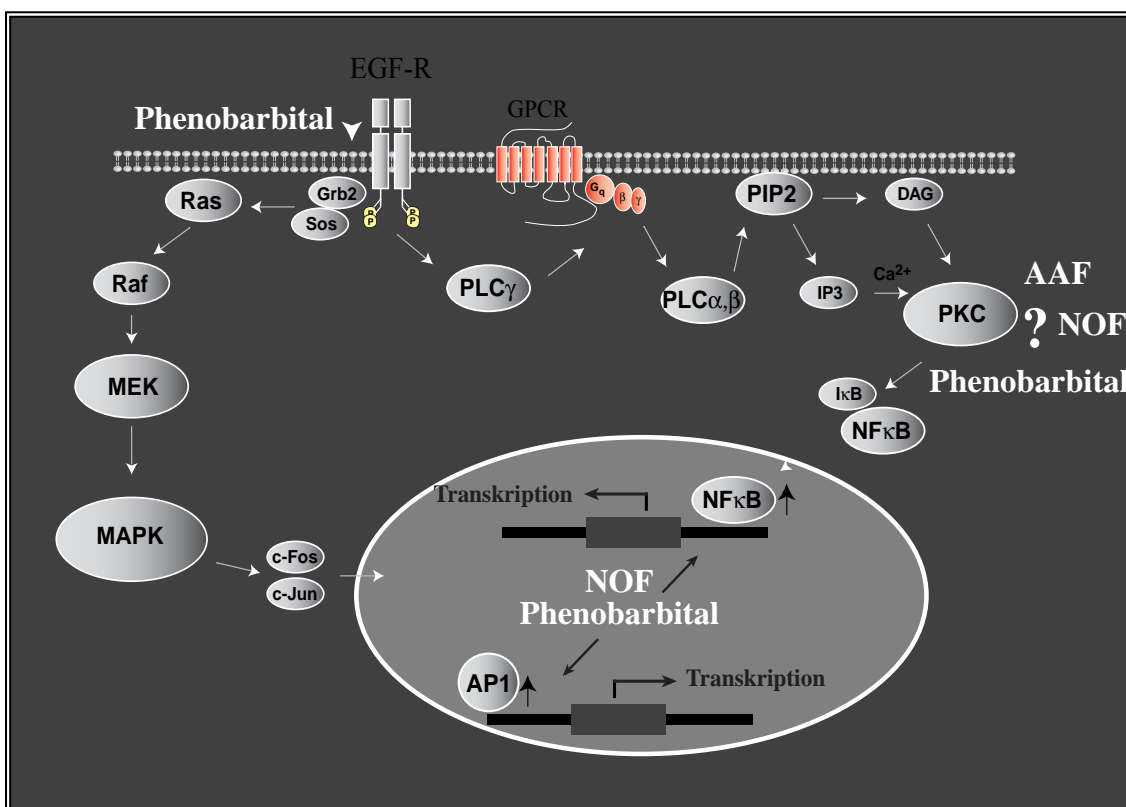


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Signaltransduktionsveränderungen durch AAF, NOF und Phenobarbital (Einzelheiten siehe Text)

6 Literaturverzeichnis

(1989) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes. International Agency for Research on Cancer. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 46: 1-458.

Aaronson SA (1991) Growth factors and cancer. *Science* 254: 1146-1153.

Aderem A (1992) The MARCKS brothers: a family of protein kinase C substrates. *Cell* 71: 713-716.

Allegretto EA, Smeal T, Angel P, Spiegelman BM, Karin M (1990) DNA-binding activity of Jun is increased through its interaction with Fos. *J Cell Biochem* 42: 193-206.

Alt M, Grassmann R (1993) Resistance of human fibroblasts to c-fos mediated transformation. *Oncogene* 8: 1421-1427.

Andersen ME, Mills JJ, Jirtle RL, Greenlee WF (1995) Negative selection in hepatic tumor promotion in relation to cancer risk assessment. *Toxicology* 102: 223-237.

Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M (1988) The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 55: 875-885.

Angel P, Karin M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072: 129-157.

Baumann B, Weber CK, Troppmair J, Whiteside S, Israel A, Rapp UR, Wirth T (2000) Raf induces NF-kappaB by membrane shuttle kinase MEKK1, a signaling pathway critical for transformation. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 4615-4620.

Berenblum J, Shubik P (1947) The role of croton oil application with a single painting of carcinogen in tumor induction of muscle skin. Br. J. Cancer 379-391.

Bitsch A, Deubelbeiss C, Greiner A (1999) c-fos gene expression in rat liver is induced by phenobarbital. Cancer Lett 135: 215-222.

Bitsch A, Fecher J, Jost M, Klohn PC, Neumann HG (1997) Genotoxic and chronic toxic effects in the carcinogenicity of aromatic amines. Recent Results Cancer Res 143: 209-223.

Bokoch GM, Der CJ (1993) Emerging concepts in the Ras superfamily of GTP-binding proteins. Faseb J 7: 750-759.

Brenner DA (1998) Signal transduction during liver regeneration. J Gastroenterol Hepatol 13 Suppl: S93-95.

Burger PC, Herdson PB (1966) Phenobarbital-induced fine structural changes in rat liver. Am J Pathol 48: 793-809.

Bursch W, Lauer B, Timmermann-Trosiener I, Barthel G, Schuppler J, Schulte-Hermann R (1984) Controlled death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters. Carcinogenesis 5: 453-458.

Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 257: 7847-7851.

Chauhan VP, Brockerhoff H (1987) Phenobarbital competes with diacylglycerol for protein kinase C. *Life Sci* 40: 89-93.

Chen L, Glover JN, Hogan PG, Rao A, Harrison SC (1998) Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* 392: 42-48.

Christman JW, Blackwell TS, Juurlink BH (2000) Redox regulation of nuclear factor kappa B: therapeutic potential for attenuating inflammatory responses. *Brain Pathol* 10: 153-162.

Clemmesen J, Fuglsang-Frederiksen V, Plum CM (1974) Are anticonvulsants oncogenic? *Lancet* 1: 705-707.

Conney A, Gilman AG (1963) Puromycin Inhibition of Enzyme induction by 3-Methylcholanthren and Phenobarbital. *J Biol Chem* 238: 3682-3685.

Curran T, Franza BR, Jr. (1988) Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell* 55: 395-397.

Dalton SR, Jirtle RL, Meyer SA (2000) EGF receptors of hepatocytes from rats treated with phenobarbital are sensitized to down-regulation by phenobarbital in culture. *Toxicol Appl Pharmacol* 165: 115-126.

de Groot RP, Rijken PJ, Boonstra J, Verkleij AJ, de Laat SW, Kruijer W (1991) Epidermal growth factor-induced expression of c-fos is influenced by altered gravity conditions. *Aviat Space Environ Med* 62: 37-40.

Deng L, Lin-Lee YC, Claret FX, Kuo MT (2001) 2-acetylaminofluorene up-regulates rat mdrlb expression through generating reactive oxygen species that activate NF-kappa B pathway. *J Biol Chem* 276: 413-420.

Deubelbeiss C (1994) Vergleichende Untersuchungen zur Entstehung enzymveränderter Herde und zu Expressionsveränderungen von Proto-Onkogenen durch aromatische Amine. Dissertation an der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Dogra SC, May BK (1996) Phenobarbital-induced activation of CYP2H1 and 5-aminolevulinate synthase genes in chick embryo hepatocytes is blocked by an inhibitor of protein phosphorylation. *Arch Biochem Biophys* 327: 271-278.

Doostdar H, Burke MD, Melvin WT, Grant MH (1991) The effects of dimethylsulphoxide and 5-aminolaevulinic acid on the activities of cytochrome P450-dependent mixed function oxidase and UDP- glucuronosyl transferase activities in human Hep G2 hepatoma cells. *Biochem Pharmacol* 42: 1307-1313.

Earp HS, O'Keefe EJ (1981) Epidermal growth factor receptor number decreases during rat liver regeneration. *J Clin Invest* 67: 1580-1583.

Eckl PM, Meyer SA, Whitcombe WR, Jirtle RL (1988) Phenobarbital reduces EGF receptors and the ability of physiological concentrations of calcium to suppress hepatocyte proliferation. *Carcinogenesis* 9: 479-483.

Eriksson LC, Andersson GN (1992) Membrane biochemistry and chemical hepatocarcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27: 1-55.

Farber E, Solt D, Cameron R, Laishes B, Ogawa K, Medline A (1977) Newer insights into the pathogenesis of liver cancer. *Am J Pathol* 89: 477-482.

Franz R, Schulten HR, Neumann HG (1986) Identification of nucleic acid adducts from trans-4-acetylamino stilbene. *Chem Biol Interact* 59: 281-293.

Galteau MM, Antoine B, Reggio H (1985) Epoxide hydrolase is a marker for the smooth endoplasmic reticulum in rat liver. *Embo J* 4: 2793-2800.

Gerlyng P, Seglen PO (1990) Effects of the tumor promoter 2-acetylaminofluorene and of 4-acetylaminofluorene on rat liver growth. *Bull Cancer* 77: 461-466.

Ghoshal AK, Mullen B, Medline A, Farber E (1983) Sequential analysis of hepatic carcinogenesis. Regeneration of liver after carbon tetrachloride-induced liver necrosis when hepatocyte proliferation is inhibited by 2-acetylaminofluorene. *Lab Invest* 48: 224-230.

Gonzales AJ, Christensen JG, Preston RJ, Goldsworthy TL, Tlsty TD, Fox TR (1998) Attenuation of G1 checkpoint function by the non-genotoxic carcinogen phenobarbital. *Carcinogenesis* 19: 1173-1183.

Herschman HR (1991) Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu Rev Biochem* 60: 281-319.

Hirai SI, Ryseck RP, Mechta F, Bravo R, Yaniv M (1989) Characterization of junD: a new member of the jun proto-oncogene family. EMBO J 8: 1433-1439.

Hirano F, Chung M, Tanaka H, Maruyama N, Makino I, Moore DD, Scheidereit C (1998) Alternative splicing variants of IkappaB beta establish differential NF- kappaB signal responsiveness in human cells. Mol Cell Biol 18: 2596-2607.

Hodges NJ, Orton TC, Strain AJ, Chipman JK (2000) Potentiation of epidermal growth factor-induced DNA synthesis in rat hepatocytes by phenobarbitone: possible involvement of oxidative stress and kinase activation. Carcinogenesis 21: 2041-2047.

Hong JT, Wilson MW, Glauert HP (1995) Effect of phenobarbital and the peroxisome proliferator ciprofibrate on gamma-Glutamyltranspeptidase activity and leukotriene C4 concentration in cultured rat hepatocytes. J Biochem Toxicol 10: 239-243.

Issemann I, Green S (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. Nature 347: 645-650.

Jacob S (1999) Effekte des Tumorpromotors Phenobarbital auf verschiedene Hepatomzelllinien. Dissertation an der Fakultät für Medizin der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Jackson MR, Kennedy SM, Lown G, Burchell B (1986) Induction of UDP-glucuronyl transferase mRNA in embryonic chick livers by phenobarbital. Biochem Pharmacol 35: 1191-1198.

Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA (2000) Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic Biol Med* 28: 1317-1327.

Jirtle RL, Carr BI, Scott CD (1991) Modulation of insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptors and transforming growth factor-beta 1 during liver regeneration. *J Biol Chem* 266: 22444-22450.

Jirtle RL, Meyer SA (1991) Liver tumor promotion: effect of phenobarbital on EGF and protein kinase C signal transduction and transforming growth factor-beta 1 expression. *Dig Dis Sci* 36: 659-668.

Jirtle RL, Meyer SA, Brockenbrough JS (1991) Liver tumor promoter phenobarbital: a biphasic modulator of hepatocyte proliferation. *Prog Clin Biol Res* 369: 209-216.

Jones HB, Clarke NA, Barrass NC (1993) Phenobarbital-induced hepatocellular proliferation: anti- bromodeoxyuridine and anti-proliferating cell nuclear antigen immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 41: 21-27.

Josefsberg Z, Carr BI, Hwang D, Barseghian G, Tomkinson C, Lev-Ran A (1984) Effect of 2-acetylaminofluorene on the binding of epidermal growth factor to microsomal and Golgi fractions of rat liver cells. *Cancer Res* 44: 2754-2757.

Kadlubar FF, Butler MA, Kaderlik KR, Chou HC, Lang NP (1992) Polymorphisms for aromatic amine metabolism in humans: relevance for human carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 98: 69-74.

Kikkawa U, Nishizuka Y (1986) The role of protein kinase C in transmembrane signalling. *Annu Rev Cell Biol* 2: 149-178.

Klöhn PC (1997) Die Rolle der Mitochondrien als Angriffspunkt für die nicht-gentoxische Wirkung des kompletten Kanzerogens 2-Acetylaminofluoren in der Rattenleber. Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Klöhn PC, Bitsch A, Neumann HG (1998) Mitochondrial permeability transition is altered in early stages of carcinogenesis of 2-acetylaminofluorene. *Carcinogenesis* 19: 1185-1190.

Klöhn PC, Massalha H, Neumann HG (1995) A metabolite of carcinogenic 2-acetylaminofluorene, 2-nitrosofluorene, induces redox cycling in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1229: 363-372.

Knowles BB, Howe CC, Aden DP (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209: 497-499.

König H, Ponta H, Rahmsdorf U, Buscher M, Schonthal A, Rahmsdorf HJ, Herrlich P (1989) Autoregulation of fos: the dyad symmetry element as the major target of repression. *EMBO J* 8: 2559-2566.

Kriek E (1969) On the mechanism of action of carcinogenic aromatic amines. I. Binding of 2-acetylaminofluorene and N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to rat-liver nucleic acids in vivo. *Chem Biol Interact* 1: 3-17.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lamph WW, Wamsley P, Sassone-Corsi P, Verma IM (1988) Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature* 334: 629-631.

Lee M, Yang KH (2000) 2-Acetylaminofluorene suppresses immune response through the inhibition of nuclear factor-kappaB activation during the early stage of B cell development. *Toxicol Lett* 114: 173-180.

Leevers SJ, Paterson HF, Marshall CJ (1994) Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* 369: 411-414.

Lewtas J, Gallagher J (1990) Complex mixtures of urban air pollutants: identification and comparative assessment of mutagenic and tumorigenic chemicals and emission sources. *IARC Sci Publ* 104: 252-260.

Li Y, Leung LK, Spear BT, Glauert HP (1996) Activation of hepatic NF-kappaB by phenobarbital in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 229: 982-989.

Lubet RA, McKinney CE, Cameron JW, Guengerich FP, Nims RW (1989) Preferential activation of 6-aminochrysene and 2-aminoanthracene to mutagenic moieties by different forms of cytochrome P450 in hepatic 9000 X g supernatants from the rat. *Mutat Res* 212: 275-284.

Lüling D (1999) Phenobarbital induzierte Effekte auf Wachstum und Genexpression in Hepatomzellen. Dissertation an der Fakultät für Medizin der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Manjeshwar S, Laconi E, Sheikh A, Rao PM, Rajalakshmi S, Sarma DS (1994) In vitro and in vivo response of hepatocytes from hepatic nodules to the mitoinhibitory effects of phenobarbital. *Carcinogenesis* 15: 1963-1968.

Mansbach JM, Mills JJ, Boyer IJ, De Souza AT, Hankins GR, Jirtle RL (1996) Phenobarbital selectively promotes initiated cells with reduced TGF beta receptor levels. *Carcinogenesis* 17: 171-174.

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Remy R, Xie ZH, Reed JC, Kroemer G (1998) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 187: 1261-1271.

Mehmet H, Rozengurt E (1991) Regulation of c-fos expression in Swiss 3T3 cells: an interplay of multiple signal transduction pathways. *Br Med Bull* 47: 76-86.

Meyer SA, Jirtle RL (1989) Phenobarbital decreases hepatocyte EGF receptor expression independent of protein kinase C activation. *Biochem Biophys Res Commun* 158: 652-659.

Muller R, Wagner EF (1984) Differentiation of F9 teratocarcinoma stem cells after transfer of c- fos proto-oncogenes. *Nature* 311: 438-442.

Muster W (1992) Biochemische Untersuchungen zu den nicht-genotoxischen Wirkungen des kompletten Kanzerogens 2-Acetylaminofluoren in vivo und in vitro. Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Neumann HG, Ambs S, Bitsch A (1994) The role of nongenotoxic mechanisms in arylamine carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 6: 173-176.

Neumann HG, Hammerl R, Hillesheim W, Wildschutte M (1990) Role of genotoxic and nongenotoxic effects in multistage carcinogenicity of aromatic amines. *Environ Health Perspect* 88: 207-211.

Nishina H, Sato H, Suzuki T, Sato M, Iba H (1990) Isolation and characterization of fra-2, an additional member of the fos gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 3619-3623.

Nishizuka Y (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308: 693-698.

Peraino C, Fry RJ, Staffeldt E, Christopher JP (1975) Comparative enhancing effects of phenobarbital, amobarbital, diphenylhydantoin, and dichlorodiphenyltrichloroethane on 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat. *Cancer Res* 35: 2884-2890.

Pinkus R, Bergelson S, Daniel V (1993) Phenobarbital induction of AP-1 binding activity mediates activation of glutathione S-transferase and quinone reductase gene expression. *Biochem J* 290: 637-640.

Plant NJ, Horley NJ, Dickins M, Hasmall S, Elcombe CR, Bell DR (1998) The coordinate regulation of DNA synthesis and suppression of apoptosis is differentially regulated by the liver growth agents, phenobarbital and methylclofenapate. *Carcinogenesis* 19: 1521-1527.

Poellinger L, Gottlicher M, Gustafsson JA (1992) The dioxin and peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear receptors in search of endogenous ligands. *Trends Pharmacol Sci* 13: 241-245.

Ragnotti G, Aletti MG (1975) The effect of phenobarbitone on protein synthesis by liver polyribosomes in fed and starved rats. *Biochem J* 146: 1-12.

Rudo K, Meyers WC, Dauterman W, Langenbach R (1987) Comparison of human and rat hepatocyte metabolism and mutagenic activation of 2-acetylaminofluorene. *Cancer Res* 47: 5861-5867.

Ruther U, Garber C, Komitowski D, Muller R, Wagner EF (1987) Deregulated c-fos expression interferes with normal bone development in transgenic mice. *Nature* 325: 412-416.

Ryder K, Nathans D (1988) Induction of protooncogene c-jun by serum growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 8464-7.

Sasaki H, Miyaura S, Horie K, Isono H (1989) Induction of glutathione S-transferase by phenobarbital in rat hepatocyte culture. *J Pharmacobiodyn* 12: 775-780.

Schmitz GG, Walter T, Seibl R, Kessler C (1991) Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal Biochem* 192: 222-231.

Scholz W, Schutze K, Kunz W, Schwarz M (1990) Phenobarbital enhances the formation of reactive oxygen in neoplastic rat liver nodules. *Cancer Res* 50: 7015-7022.

Schulte-Hermann R (1974) Induction of liver growth by xenobiotic compounds and other stimuli. *CRC Crit Rev Toxicol* 3: 97-158.

Schulte-Hermann R, Timmermann-Trosiener I, Schuppler J (1986) Facilitated expression of adaptive responses to phenobarbital in putative pre-stages of liver cancer. *Carcinogenesis* 7: 1651-1655.

Shaw IC, Jones HB (1994) Mechanisms of non-genotoxic carcinogenesis. *Trends Pharmacol Sci* 15: 89-93.

Shibutani S, Grollman AP (1993) Nucleotide misincorporation on DNA templates containing N-(deoxyguanosin-N2-yl)-2-(acetylamino)fluorene. *Chem Res Toxicol* 6: 819-824.

Siebenlist U, Franzoso G, Brown K (1994) Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 10: 405-455.

Sizemore N, Leung S, Stark GR (1999) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit. *Mol Cell Biol* 19: 4798-4805.

Szabo E, Riffe ME, Steinberg SM, Birrer MJ, Linnoila RI (1996) Altered cJUN expression: an early event in human lung carcinogenesis. *Cancer Res* 56: 305-315.

Thomas TP, Gopalakrishna R, Anderson WB (1987) Hormone- and tumor promoter-induced activation or membrane association of protein kinase C in intact cells. *Methods Enzymol* 141: 399-411.

Till HJ (2001) Über die Bedeutung des programmierten Zelltodes und seiner Regulation für die tumorpromovierenden Eigenschaften des kompletten Kanzerogens 2-Acetylaminofluoren in der Rattenleber. Dissertation an der Fakultät für Pharmazie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J (1984) Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309: 418-425.

Vesey DA, Cunningham JM, Selden AC, Woodman AC, Hodgson HJ (1991) Dimethyl sulphoxide induces a reduced growth rate, altered cell morphology and increased epidermal-growth-factor binding in Hep G2 cells. *Biochem J* 277: 773-7.

Ward JM, Young DM (1976) Histogenesis and Morphology of periosteal sarcomas induced by FBJ virus in NIH Swiss mice. *Cancer Res* 36: 3985-3992.

Weinstein IB (1988) The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment--twenty-seventh G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 48: 4135-4143.

Whiteside ST, Israel A (1997) I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol* 8: 75-82.

Wilson T, Treisman R (1988) Removal of poly(A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3' AU-rich sequences. *Nature* 336: 396-399.

Yeo EJ, Exton JH (1995) Stimulation of phospholipase D by epidermal growth factor requires protein kinase C activation in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 270: 3980-3988.

7 Abkürzungsverzeichnis

AAF	2-Acetylaminofluoren
AP1	Transkriptionsfaktor aktivierendes Protein
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Biscinchoninsäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
CYP1A1	Cytochrom P450 CYP1A1
CYP1A2	Cytochrom P450 CYP1A2
DAG	Diacylglycerin
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecos Modifiziertes Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
FCS	Fetales Kälberserum
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
IP	Immunopräzipitation
IP3	Inositoltriphosphat
LDH	Laktatdehydrogenase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
MEKK	Kinase der mitogen aktivierten Proteinkinase

NADH/NAD ⁺ ;	Nikotinamid-adenin-dinukleotid red./ox.
NADPH/NADP ⁺	Nikotinamid-adenin-dinukleotiddiphosphat red./ox.
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
O ²⁻	Superoxidanionenradikale
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PKC	Proteinkinase C
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOD	Superoxiddismutase
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenop-dioxin
TPA	12-O-Tetradekanoylphorbol-13-acetat
Tris	tris-(Hydroxymethyl)aminoethan