

**Apoptose in Rattenhepatozyten in Primärkultur –  
Einfluss von TCDD und polychlorierten Biphenylen**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern  
zur Erlangung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

genehmigte

**Dissertation**

D 386

vorgelegt von

Dipl. Biol. Stefan Martin Bohnenberger

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Tag der wissenschaftlichen Aussprache:

17. Juni 2003

Die Experimente zu vorliegender Arbeit wurden von November 1999 bis Januar 2003 am Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern, Abteilung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Dr. D. Schrenk durchgeführt.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 17. Juni 2003

Promotionskommission:

Vorsitzender:	Prof. Dr. S. Ernst
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. D. Schrenk
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Trommer

*Quidquid agis, prudenter agas  
et respice finem.*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Apoptose – der programmierte Zelltod	1
1.1.1	Induktion von Apoptose	6
1.2	Rolle der Apoptose in der Hepatokarzinogenese	7
1.3	Epigenetische Karzinogene der Rattenleber	9
1.3.1	Die polychlorierten Biphenyle (PCBs)	9
1.3.1.1	Chemie, Eigenschaften und Vorkommen der PCBs	9
1.3.1.2	Toxikologische Relevanz und biologische Wirkungen der PCBs	10
1.3.2	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin (TCDD)	12
1.3.2.1	Chemie, Eigenschaften und Vorkommen von TCDD	12
1.3.2.2	Toxikologische Relevanz und biologische Wirkungen von TCDD	14
1.3.3.	Phenobarbital	17
1.3.3.1	Biologische Wirkungen von Phenobarbital	17
<b>2.</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
3.1	Chemikalien und Biochemikalien	21
3.2	Geräte und Materialien	23
3.3	Nährmedien, Lösungen, Puffer	25
3.4	Versuchstiere und Versuchstierhaltung	33
3.5	Leberperfusion und Präparation der Hepatozyten	33
3.6	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung	35
3.7.	Zellkultur	37
3.7.1	Herstellung der Kollagenlösung für die Kollagengel-Sandwichkultur	37
3.7.2	Herstellung der Kollagenlösung für die einfache Kollagenkultur	38
3.7.3	Zellkultur im Kollagengel-Sandwich	38
3.7.3.1	Behandlung der Zellen bei Experimenten zum Einfluss von PCBs, Phenobarbital sowie TCDD auf die Apoptose	39
3.7.4	Zellkultur in Einfach-Kollagenkultur	40
3.7.4.1	Behandlung der Zellen bei Experimenten zur DNA-Fragmentierung	41

3.7.4.2	Behandlung der Zellen bei Experimenten zur Caspase-3-Aktivität.....	42
3.7.4.3	Behandlung der Zellen bei Experimenten zur 7-Ethoxyresorufin- <i>O</i> - deethylase- (EROD-) Aktivität.....	44
3.8	Detektion apoptotischer Zellkerne.....	44
3.8.1	Erstellung der fluoreszenzmikroskopischen Präparate.....	44
3.8.2	Charakterisierung und Quantifizierung apoptotischer Zellkerne.....	45
3.8.3	Statistik.....	45
3.9	DNA-Fragmentierungsanalyse.....	45
3.9.1	Isolierung der DNA.....	46
3.9.2	Quantifizierung der DNA.....	49
3.9.3	Agarosegel-Elektrophorese.....	49
3.10	Caspase-3-Assay.....	50
3.10.1	Gewinnung der Lysate.....	50
3.10.2	Proteinbestimmung nach Lowry.....	50
3.10.3	Fluorimetrische Bestimmung der Caspase-3-Aktivität.....	51
3.11	Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin- <i>O</i> -deethylase (EROD)-Aktivität.....	53
3.11.1	Gewinnung der Lysate.....	53
3.11.2	Fluorimetrische Bestimmung der EROD-Aktivität.....	53
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
4.1	Fluoreszenzmikroskopische Detektion apoptotischer Zellkerne.....	55
4.2	Einfluss von Phenobarbital, PCB 28, 138 und 183 auf die Apoptose.....	57
4.2.1	Einfluss von Phenobarbital auf die Apoptose.....	57
4.2.2	Einfluss von PCB 28, 138 und 183 auf die Apoptose.....	59
4.2.2.1	Einfluss von PCB 28 auf die Apoptose.....	60
4.2.2.2	Einfluss von PCB 138 auf die Apoptose.....	62
4.2.2.3	Einfluss von PCB 183 auf die Apoptose.....	64
4.3	DNA-Fragmentierungsanalyse.....	66
4.4	Caspase-3-Assay.....	68
4.4.1	Einfluss von UV-Strahlung auf die Caspase-3-Aktivität.....	68
4.4.2	Einfluss von Glycochenodeoxycholsäure auf die Caspase-3-Aktivität.....	68
4.4.3	Einfluss von Phenobarbital auf die Caspase-3-Aktivität.....	70
4.5	Einfluss von TCDD auf die Apoptose in Rattenhepatozyten.....	72

4.5.1	Einfluss von TCDD auf die Apoptose in primären Han/Wistar-Rattenhepatozyten...	72
4.5.2	Einfluss von TCDD auf die Apoptose in primären Long-Evans-Rattenhepatozyten...	74
4.6	Induktion der 7-Ethoxyresorufin- <i>O</i> -deethylase Aktivität durch TCDD.....	74
4.6.1	Primäre Han/Wistar-Rattenhepatozyten.....	75
4.6.2	Primäre Long-Evans-Rattenhepatozyten.....	77
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>79</b>
5.1	Apoptoseinduktion durch UV-Strahlung.....	79
5.2	Hemmung der Apoptose durch „nicht-dioxinartige“ PCBs sowie Phenobarbital in primären Wistar-Ratten-Hepatozyten.....	80
5.3	Biochemische Apoptosenachweise.....	83
5.3.1	DNA-Fragmentierungsanalyse.....	84
5.3.2	Caspase-3-Assay.....	85
5.3.3	Weitere biochemische Apoptosemarker.....	88
5.4	Einfluss von TCDD auf die Apoptose sowie die EROD-Aktivität in primären Han/Wistar- und Long-Evans-Rattenhepatozyten.....	89
5.4.1	Einfluss von TCDD auf die Apoptose.....	90
5.4.2	Einfluss von TCDD auf die EROD-Aktivität.....	92
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>95</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>97</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>113</b>
8.1	IUPAC-Nomenklatur der PCBs.....	113

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1: Einfluss der Apoptose auf die Homöostase
- Abb. 1.2: Morphologische und biochemische Veränderungen während der Apoptose und Nekrose
- Abb. 1.3: Allgemeine Strukturformel der PCBs
- Abb. 1.4: Allgemeine Strukturformel der PCDDs
- Abb. 1.5: Strukturformel von 2,3,7,8-TCDD
- Abb. 1.6: Schematische Darstellung der AhR-vermittelten Genexpression
- Abb. 1.7: Strukturformel von Phenobarbital
- Abb. 3.1: Schematische Darstellung einer *in situ*-Leberperfusion
- Abb. 3.2: Behandlungsschema zur Untersuchung des Einflusses von PCBs, Phenobarbital sowie TCDD auf die Apoptose in Rattenhepatozyten
- Abb. 3.3: Behandlungsschema bei Versuchen zur Induktion der DNA-Fragmentierung durch UV-Strahlung
- Abb. 3.4: Behandlungsschema bei Experimenten zur Induktion der Caspase-3 durch UV-Strahlung
- Abb. 3.5: Behandlungsschema bei Experimenten zur Induktion der Caspase-3 durch die Gallensäure GCDC
- Abb. 3.6: Behandlungsschema bei Experimenten zum Einfluss von Phenobarbital auf die Caspase-3-Aktivität
- Abb. 3.7: Behandlungsschema bei Versuchen zur EROD-Aktivität
- Abb. 3.8: DNA-Fragmentierung durch Endonukleaseaktivität

- Abb. 3.9: Schematische Darstellung des Messprinzips zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität
- Abb. 3.10: Oxidative Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin zu Resorufin
- Abb. 4.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von primärkultivierten Rattenhepatozyten in Kollagengel-Sandwichkultur
- Abb. 4.2: Apoptotische Rattenhepatozyten in Primärkultur 12 ½-Stunden nach der UV-Behandlung mit einer Dosis von  $90 \text{ J x m}^{-2}$
- Abb. 4.3: Einfluss von Phenobarbital auf die Apoptose in primären Wistar-Rattenhepatozyten in Abhängigkeit von der Konzentration
- Abb. 4.4: Strukturformel von PCB 28
- Abb. 4.5: Einfluss von PCB 28 auf die Apoptose in primären Wistar-Rattenhepatozyten in Abhängigkeit von der Konzentration
- Abb. 4.6: Strukturformel von PCB 138
- Abb. 4.7: Einfluss von PCB 138 auf die Apoptose in primären Wistar-Rattenhepatozyten in Abhängigkeit von der Konzentration
- Abb. 4.8: Strukturformel von PCB 183
- Abb. 4.9: Einfluss von PCB 183 auf die Apoptose in primären Wistar-Rattenhepatozyten in Abhängigkeit von der Konzentration
- Abb. 4.10: Einfluss von UV-Strahlung auf die DNA-Fragmentierung
- Abb. 4.11: Einfluss von GCDC auf die Caspase-3-Aktivität in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit
- Abb. 4.12: Einfluss von 2mM-Phenobarbital auf die GCDC-induzierte Caspase-3-Aktivität



- Abb. 4.13: Induktion der EROD-Aktivität in primären Han/Wistar-Rattenhepatozyten durch TCDD
- Abb. 4.14: Mittelwerte und Standardabweichungen der EROD-Aktivitäten in primären Han/Wistar-Hepatozyten
- Abb. 4.15: Induktion der EROD-Aktivität in primären Long-Evans-Rattenhepatozyten durch TCDD
- Abb. 4.16: Mittelwerte und Standardabweichungen der EROD-Aktivitäten in primären Long-Evans-Hepatozyten
- Abb. 4.17: Einfluss von TCDD auf die Apoptose in primären Han/Wistar-Rattenhepatozyten in Abhängigkeit von der Konzentration

## **Tabellenverzeichnis**

- Tab. 1.1: Kriterien zur Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose
- Tab. 1.2: Beispiele für endogene und exogene Apoptosestimuli
- Tab. 3.1: Zusammensetzung der Grundmedien
- Tab. 3.2: Ansetzen der Grundmedien
- Tab. 3.3: Zusammensetzung von ITS und ITS<sup>+</sup>
- Tab. 3.4: Zusammensetzung von NIH<sub>A</sub> und NIH<sub>B</sub>
- Tab. 4.1: Einfluss von Phenobarbital auf die Apoptose in Abhängigkeit von der Konzentration
- Tab. 4.2: Einfluss von PCB 28 auf die Apoptose in Abhängigkeit von der Konzentration
- Tab. 4.3: Einfluss von PCB 138 auf die Apoptose in Abhängigkeit von der Konzentration
- Tab. 4.4: Einfluss von PCB 183 auf die Apoptose in Abhängigkeit von der Konzentration
- Tab. 4.5: Einfluss von TCDD auf die Apoptose in Abhängigkeit von der Konzentration
- Tab. 8.1: IUPAC-Nomenklatur der PCBs

## Abkürzungsverzeichnis

2-AAF	2-Acetylaminofluoren
Ac	Acetyl
ADP	Adenosindiphosphat
AFC	7-Amino-4-trifluormethyl-cumarin
AhR	aryl hydrocarbon-Rezeptor
ALDH	Aldehyddehydrogenase
AMC	7-Amino-4methyl-cumarin
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CAR	constitutively active receptor
CHAPS	3-[3-(Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propansulfonat
CYP	Cytochrom P450
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEVD	Asp-Glu-Val-Asp
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl-)tetraessigsäure
EROD	7-Ethoxyresorufin- <i>O</i> -deethylase
FKS	fetales Kälberserum

GCDC	Glycochonodeoxycholsäure
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
hsp	heat shock protein
H/W	Han/Wistar
kD	Kilodalton
L-E	Long-Evans
mdm-2	mouse-double-minute-2
min	Minuten
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NIH	National Institute of health
NQO	Chinonoxidoreduktase
PARP	poly-ADP-ribose-polymerase
PAS	per-arnt-sim
PB	Phenobarbital
PBREM	phenobarbital-responsive-enhancer-module
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCDD	Polychlorierte Dibenzodioxine
PCDF	Polychlorierte Dibenzofurane
PCP	Pentachlorphenol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PROD	7-Pentoxyresorufin- <i>O</i> -dealkylase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species

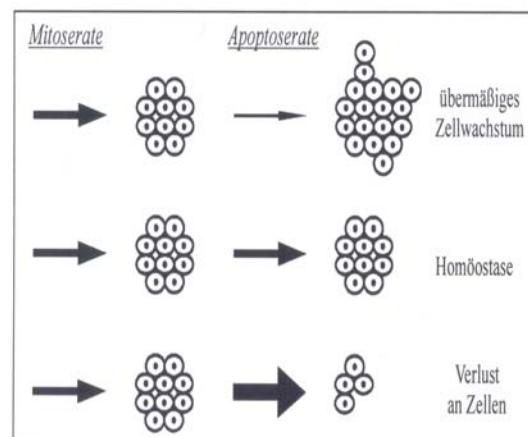
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
S-D	Sprague-Dawley
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
TEF	TCDD equivalency factors
TEQ	TCDD equivalence
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
UV	ultraviolette Strahlung
WHO	World Health Organisation
XRE	xenobiotic responsive element

# 1. Einleitung

## 1.1 Apoptose – der programmierte Zelltod

Mit dem Begriff „Apoptose“ bezeichnet man den genetisch programmierten Zelltod, PCD (**p**rogrammed **c**ell **d**eath), ein Phänomen, das von Kerr et al. 1972 erstmalig beschrieben wurde. Dieses aktiv induzierte Absterben einer Zelle kann sowohl durch exogene als auch durch endogene Stimuli erfolgen und läuft stets nach dem gleichen Mechanismus, einem physiologischen Mehrschrittprozess, ab. Diese Form des Zelltodes ist scharf abzugrenzen von der Nekrose, einem degenerativen Prozess, der mit inflammatorischen Begleiterscheinungen einhergeht (Wyllie et al., 1980). Hierbei sind meist ganze Zellareale betroffen, während die Apoptose gezielt in einzelnen Zellen abläuft. Der programmierte Zelltod ist ein wichtiger Faktor bei der Aufrechterhaltung der Zell-Homöostase in den einzelnen Organen, da er als Antagonist zur Mitose an der Regulation des dynamischen Gleichgewichtes zwischen der Proliferation und dem Absterben von Zellen beteiligt ist. Die Nettoproliferation resultiert somit aus einer gesteigerten Mitoserate respektive einer erhöhten Apoptoserate (Thompson, 1995; Schwarz et al., 1995). Ferner trägt die Apoptose durch selektive Eliminierung geschädigter oder präkanzerogener Zellen im Sinne von „better dead than wrong“ zum Schutz und zur Erneuerung von normalem, adultem Gewebe bei (Payne et al., 1995). Bereits während der Embryonalentwicklung kommt der Apoptose eine zentrale Bedeutung zu, so beispielsweise bei der Entfernung der Interdigitalzellen der Hände und Füße.

**Abb. 1.1:**  
Einfluss der Apoptose auf die Homöostase. Die Gesamtzellzahl wird über eine ausgeglichene Bilanz zwischen Proliferation und Apoptose konstant gehalten. Die Dicke der Pfeile symbolisiert das Ausmaß der Proliferation und der Apoptose. Bei einer Beeinflussung der Apoptose ist das Gleichgewicht gestört, woraus ein Nettowuchs oder ein Nettoverlust an Zellen resultiert (nach Thompson, 1995).



Auch die Entstehung von Erkrankungen, wie z.B. Krebs oder auch bestimmte Virusinfektionen stehen im Zusammenhang mit einer Fehlregulation der Apoptose. So konnte beispielsweise in B-Lymphozyten, die mit dem **Epstein-Barr-Virus (EBV)** infiziert waren, eine erhöhte Expression des Protoonkogens *bcl-2* nachgewiesen werden, was eine verminderte apoptotische Zelleliminierung zur Folge hat (Payne et al., 1995).

Auf biochemischer Ebene beginnt die Apoptose mit der Aufnahme eines auslösenden Stimulus, der über Signaltransduktionsketten im Zellinneren weitergeleitet wird. In der darauffolgenden *Effektorphase* kommt es zur Aktivierung von Proteasen, wie den *Caspasen* sowie ihren Regulatoren. Die letzte Phase, auch *post mortem*-Phase genannt, ist vom Abbau der DNA durch Endonukleasen gekennzeichnet (Vaux und Strasser, 1996).

In initialen Apoptosestadien lässt sich eine Aufhebung der Phospholipid-Asymmetrie in der Plasmamembran nachweisen, worauf eine Methode zur Detektion frühapoptotischer Zellen durch Annexin V beruht (Vermees et al., 1995). Die Membranintegrität bleibt hierbei jedoch im Gegensatz zur Nekrose erhalten.

Für die sichtbaren morphologischen Charakteristika der Apoptose gilt nach Arends et al., (1990) der nachstehende Ablauf in drei aufeinanderfolgenden Phasen, wobei darauf hingewiesen werden muss, dass sichtbare morphologische Veränderungen erst in relativ späten Apoptosestadien beobachtet werden können.

**1. Phase:**

- Verlust von Zell-Zell-Interaktionen
- Veränderungen im Wasserhaushalt der Zelle, die zur Entwässerung und zur Kondensation des Zytoplasmas führen, Schrumpfen der Zelle.
- Kondensation des Chromatins in Schollen in der Peripherie des Zellkerns, wobei dieser Halbmond- oder Sichelform annimmt.

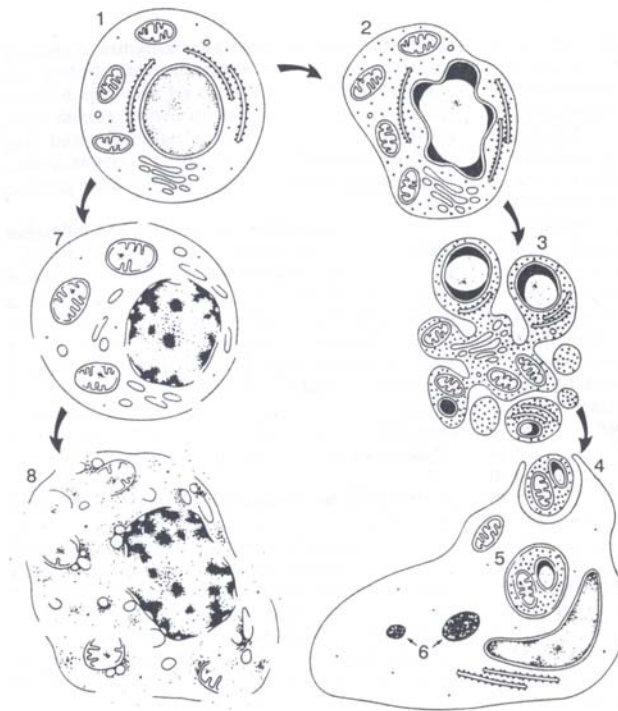
**2. Phase:**

- Lappung der Zelle (Membranblebbing)
- Fragmentierung des Zellkerns bzw. des Chromatins durch Endonukleaseaktivität, wobei DNA-Fragmente einer definierten Länge von Vielfachen von ca. 180 Basenpaaren entstehen („DNA-Ladder“) (Whyllie et al., 1980).
- Sichtbarwerden von sogenannten „apoptotic bodies“, die durch Umhüllung der Chromatinfragmente, z.T. intakter Organellen und Cytoplasmaresten mit einer Membran entstehen (Corcoran et al., 1994).
- Phagozytose dieser „apoptotic bodies“ *in vivo* durch benachbarte Zellen und Makrophagen oder lysosomaler Verdau, dadurch Vermeidung von Entzündungsprozessen.

**3. Phase:**

- Weitere Degenerierung der restlichen Kern- und Zytoplasmastrukturen.





**Abb. 1.2: Morphologische und biochemische Veränderungen während der Apoptose und der Nekrose (modifiziert nach Kerr, 1995)**

Da diese Vorgänge als der Nekrose ähnlich angesehen werden können, wird hierbei häufig von „sekundärer Nekrose“ gesprochen (Arends et al., 1990). Die erwähnte DNA-Fragmentierung scheint Untersuchungen von Schulte-Hermann et al. (1992) zufolge nicht auf alle apoptotischen Zelltypen zuzutreffen und stellt somit offenbar kein generelles Charakteristikum der Apoptose dar.

Von diesem Phänomen ist eine andere Form des Zelltodes – die Nekrose – scharf abzugrenzen, da diese – im Gegensatz zur Apoptose – einen passiven, degenerativen Prozess, beispielsweise als Reaktion auf Gewebs- bzw. Zellverletzungen, repräsentiert (Wyllie et al., 1980). Aus dem Verlust der Membranintegrität und des osmotischen Gleichgewichtes resultiert ein Anschwellen der Zellen selbst sowie verschiedener Organellen, insbesondere der Mitochondrien. Durch Freisetzung von Zellfragmenten in das umliegende Gewebe kommt es – veranlasst durch proteolytische Enzyme – zu entzündlichen Reaktionen (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1994). Nach Auflösung des Zellkerns (Karyolyse) kommt es zu einer unregelmäßigen Chromatinkondensation, welche das Endstadium der Nekrose verkörpert.

Nekrose	Apoptose
<i>Physiologische Kriterien</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tod von Zellgruppen</li> <li>• deutliche Entzündungsreaktion</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• meist Tod einzelner Zellen</li> <li>• keine Entzündungsreaktion</li> </ul>
<i>Morphologische Kriterien</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anschwellen der Zellen</li> <li>• Verlust der Membranintegrität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellschrumpfung Kondensation von Zytoplasma + Chromatin Bildung sog. „apoptotic bodies“</li> <li>• Membranintegrität bleibt erhalten</li> </ul>
<i>Biochemische Kriterien</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Passiver Vorgang</li> <li>• zufällig verteilter Verdau der DNA ⇒ Schmier im Agarosegel</li> <li>• Postlytische DNA-Fragmentierung (= spätes Ereignis des Zelltodes)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aktiver Prozess</li> <li>• Durch Endonukleaseangriff definierte Nukleosomenfragmente ca. 180 bp ⇒ „ladder“-DNA im Agarosegel</li> <li>• Prälytische DNA-Fragmentierung (= frühes Ereignis des Zelltodes)</li> </ul>

**Tab. 1.1: Kriterien zur Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose**

Wie bereits erwähnt, spielen Caspasen bei der Induktion von Apoptose eine zentrale Rolle. Unabhängig vom auslösenden Stimulus laufen alle bisher bekannten apoptotischen Signalwege in der Zelle über die Aktivierung von Caspase-Kaskaden ab.

Caspasen sind eine Klasse von Cystein-Proteasen mit der Aminosäure Cystein in ihrem aktiven Zentrum, die ihre Substrate spezifisch hinter einem Aspartatrest spalten. Der Name „Caspase“ setzt sich aus „C“ für Cystein und „aspase“ für **A**spartat-spaltend zusammen. Am Beginn der Caspase-Kaskade steht die Aktivierung sogenannter Initiatorcaspasen, welche wiederum weitere Caspasen, die als Effektorcaspasen (Caspasen 3, 6 und 7) bezeichnet werden, aktivieren. Die Aktivierung dieser Effektorcaspasen stellt einen irreversiblen Prozess dar, nach dessen Stattfinden die Apoptose unweigerlich erzwungen wird (Wagener, 1999; Zhivotovsky et al., 1999).

Eine bedeutende Funktion bei der Auslösung von Apoptose nimmt die Caspase-3 ein. Dieses Enzym bewerkstelligt u.a. die proteolytische Spaltung einiger Schlüsselproteine, wie z.B. PARP (**p**oly-**A**DP-**r**ibose-**p**olymerase), was im Zusammenhang mit der DNA-Reparatur eine Rolle spielt. Es wird angenommen, dass die Regulation der

DNA-Ligase II-Aktivität durch eine von PARP bewerkstelligte ADP-Ribosylierung moduliert wird (Creissen et al., 1982). Durch ADP-Ribosylierung wird die Aktivität der DNA-Ligase II gehemmt, was zum Ausbleiben der Reparatur und somit zur Apoptose führen kann.

### 1.1.1 Induktion von Apoptose

Das genetisch codierte Programm zur Auslösung des apoptotischen Zelltodes kann durch eine Vielzahl an Stimuli aktiviert werden, welche sowohl exogener als auch intrinsischer Natur sein können.

So kann die Apoptose durch DNA-schädigende physikalische Einflüsse, wie z.B. UV- oder  $\gamma$ -Strahlung ausgelöst werden, wobei letztere in der Therapie von Tumoren von Bedeutung ist. Weiterhin zeigen sich Substanzen, welche in der Krebstherapie als Chemotherapeutika eingesetzt werden (z. B. Cisplatin, Doxorubicin, Bleomycin) als Apoptoseinduktoren, wovon man sich eine Proliferationshemmung verspricht. Auch bestimmte Viren, wie z.B. Hepatitisviren, können über DNA-Schäden den physiologischen Zelltod herbeiführen (Thompson, 1995).

Zu den internen Induktoren zählen Cytokine wie TNF (**tumor necrosis factor**) oder auch Glukokortikoide. Ferner kann auch der Entzug bestimmter Hormone, wie z.B. Östrogen den apoptotischen Zelltod auslösen. So konnte in einer Studie von Payne et al. (1995) die apoptoseinduzierende Wirkung des Antiöstrogens Tamoxifen aufgezeigt werden. Da Östrogen selbst von mitogener Wirkung ist, wird Tamoxifen bei der Behandlung von Mamma-Karzinomen eingesetzt.

Auch die im Fremdstoffmetabolismus entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS: **reactive oxygen species**) können, sofern sie nicht durch z.B. **Superoxid-Dismutase** (SOD), Peroxidase oder Katalase unwirksam gemacht werden oder durch Antioxidantien (z. B. Vitamin C, E sowie Glutathion) abgefangen werden, über gentoxische Läsion die Apoptose auslösen (Jacobson, 1996).

Typ	Beispiele
<b>Physiologische Induktoren</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hormon-Überschuss, z.B. Glukokortikoide</li> <li>- Hormon-Entzug, z.B. Östrogen und Testosteron</li> <li>- Tumornecrosisfactor, TNF</li> <li>- Transforming growth factor, TGF <math>\beta</math></li> <li>- positive/negative Selektion von T-Lymphozyten</li> </ul>
<b>Induktoren in Verbindung mit DNA-Schäden</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- genotoxische Karzinogene</li> <li>- Virusinfektionen, z.B. Hepatitis</li> <li>- UV-Strahlung und Gamma-Strahlung</li> <li>- Onkogene, z.B. myc</li> <li>- Tumorsuppressorgene, z.B. p53</li> </ul>
<b>Toxine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ethanol</li> <li>- Dimethylsulfonat</li> <li>- Thioacetamid</li> </ul>
<b>Therapie-assoziierte Agentien</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chemotherapeutika: Cisplatin, Doxorubicin, Bleomycin</li> </ul>

Tab 1.2: Beispiele für endogene und exogene Apoptosestimuli (nach Thompson, 1995, modifiziert)

## 1.2 Rolle der Apoptose in der Hepatokarzinogenese

Der Begriff „Karzinogenese“ bezeichnet den Übergang einer gesunden Zelle in eine maligne Krebszelle. Die Karzinogenese vollzieht sich in einem mehrstufigen Prozess, innerhalb welchem die Phasen der *Initiation*, *Promotion* und *Progression* unterschieden werden. (Scherer, 1984).

Die Initiation einer Zelle erfolgt durch eine irreversible Läsion des genetischen Materials, die z.B. durch UV- oder  $\gamma$ -Strahlung, aber auch durch genotoxische Chemikalien wie z.B. N-Nitrosomorpholin oder 2-Acetylaminofluoren (2-AAF) hervorgerufen werden kann. Auch spontane Mutationen können ebenfalls solche Veränderungen verursachen. Bleiben sowohl die intrazelluläre DNA-Reparatur, als auch die Induktion des programmierten Zelltodes aus, so wird der Schaden nach stattfindender Zellteilung irreversibel fixiert (Pitot und Sirica, 1980). Initiierte Zellen können mit Hilfe von histologischen, immunzytochemischen und biochemischen Methoden charakterisiert werden. So ist beispielsweise eine erhöhte Expression der placentaren Glutathion S-Transferase (GST-P) ein Marker für initiierte Zellen.

In der darauffolgenden Phase der Promotion kommt es in Anwesenheit von Substanzen mit tumorpromovierenden Eigenschaften zur klonalen Expansion der initiierten Zellen (Schulte-Herrmann, 1985). Deren selektive Vermehrung führt zur Ausbildung sogenannter präneoplastischer Foci (Herde) in der Leber, welche sich zunächst zu gutartigen Neoplasien weiterentwickeln (Pitot et al., 1978). Die Wirkung von Tumorpromotoren ist reversibel und muss über einen längeren Zeitraum anhalten, um Präneoplasien entstehen zu lassen.

Im Modell der Rattenleber ist die tumorpromovierende Wirkung für einige Substanzen bereits eingehend untersucht, so z.B. für 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (Schrenk et al., 1994) polychlorierte Biphenyle (Buchmann et al., 1991; Connor et al., 1995; Hemming et al., 1993) Phenobarbital (Bursch et al., 1984) sowie auch für den Peroxisomenproliferator Nafenopin (Bayly et al., 1994).

Solche Substanzen, welche ohne selbst genotoxische Veränderungen hervorzurufen bei chronischer Verabreichung zur Entstehung bösartiger Tumore führen, werden als epigenetische Kanzerogene bezeichnet. Darüber hinaus sind auch sogenannte komplette Kanzerogene bekannt, die sich sowohl durch initiiierende als auch promovierende Eigenschaften auszeichnen.

Die sich im letzten Schritt der Karzinogenese vollziehende Progressionsphase ist durch eine Zunahme der Wachstumsautonomie sowie der Malignität des Tumors gekennzeichnet. Nach Pitot et al. (1996), scheint eine verstärkte Expression von TGF $\alpha$  (Transforming growth factor  $\alpha$ ) ein selektiver Marker für die Progressionsphase in Rattenhepatozyten zu sein.

Die Apoptose spielt im Rahmen der Tumorpromotion eine entscheidende Rolle. Präneoplastische Klone zeichnen sich sowohl durch eine erhöhte Proliferation als auch durch eine gesteigerte Apoptoserate aus (Schulte-Herrmann, 1985). Ursprünglich wurde die Wirkung von Tumorpromotoren ausschließlich auf diese verstärkte Proliferation zurückgeführt, bis am Beispiel von Phenobarbital sowie TCDD gezeigt werden konnte, dass sich die erhöhte Proliferationsrate durch eine Hemmung der Apoptose erklärt (Bursch et al., 1984; Stinchcombe et al., 1995). Tumorpromotoren wirken somit in präneoplastischen Zellen als „survival factors“, indem sie diesen einen selektiven Wachstumsvorteil verschaffen (Schulte-Herrmann et al., 1995).

## 1.3 Epigenetische Karzinogene der Rattenleber

### 1.3.1 Die polychlorierten Biphenyle (PCBs)

#### 1.3.1.1 Chemie, Eigenschaften und Vorkommen der PCBs

Die polychlorierten Biphenyle – PCBs – bestehen aus einem Biphenylgerüst, welches an maximal 10 verschiedenen Positionen im Molekül chlorierbar ist, so dass insgesamt 209 Konstitutionsisomere (Kongenere) unterschieden werden können. Die offizielle Nomenklatur stellt eine von Ballschmiter und Zell (1980) vorgeschlagene fortlaufende Nummerierung der einzelnen Kongenere dar, welche von der IUPAC übernommen wurde.

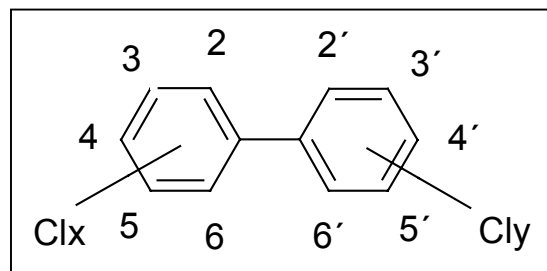


Abb. 1.3: Allgemeine Strukturformel der PCBs

Charakteristische chemische Eigenschaften der PCBs sind ihre geringe Wasserlöslichkeit einerseits sowie ihre hohe Lipophilie andererseits, welche mit steigendem Chlorierungsgrad zunimmt. Ferner zeichnen sich diese Substanzen durch hohe chemische und thermische Stabilität und Viskosität, einen hohen Flammpunkt sowie eine hohe Dielektrizitätskonstante aus. Diese Eigenschaften prädestinierten diese Verbindungen, deren erstmalige Synthese 1864 gelang, zu einer breiten industriellen Verwendung z.B. als Bestandteil von Hydraulikölen sowie in Kondensatoren und Transformatoren (geschlossene Systeme). Weiterhin wurden sie als Weichmacher in Kunststoffen und Dichtungsmassen zum Einsatz gebracht (offene Systeme).

Hiervon abzugrenzen ist die sogenannte *de novo*-Synthese, die bei Verbrennungsprozessen organischer Materialien in Anwesenheit von Chlorverbindungen – so z.B. in Müllverbrennungsanlagen – abläuft. Aufgrund der geringen Selektivität der Synthesereaktion entsteht hierbei – so wie bei der großtechnischen Herstellung auch – stets ein Gemisch verschiedener Kongenere, deren Anzahl mit ca. 130 angegeben wird (Safe, 1990).

Nach Bekanntwerden der toxikologischen Relevanz der PCBs wurde in der Bundesrepublik zunächst deren Anwendung in offenen Systemen verboten (1978), dann schließlich die gesamte Produktion (1983). Seit 1989 gilt ferner ein Verbot über die Verwendung importierter PCBs (Schrenk, 1994).

Aufgrund ihrer ausgeprägten Lipophilie und geringen mikrobiellen Abbaubarkeit kommt es zur Akkumulation in der Nahrungskette, woraus sich die außerordentliche Persistenz dieser Substanzen erklärt (Safe, 1994). Die mittlere Halbwertszeit aller PCBs wird mit ca. 7 Jahren angegeben (Yakushiji et al., 1984).

### 1.3.1.2 Toxikologische Relevanz und biologische Wirkungen der PCBs

Die polychlorierten Biphenyle (PCBs) zählen zu den wichtigsten persistenten Kontaminanten in Nahrung und Umwelt.

Die toxikologische Relevanz dieser Substanzen wurde nach Vergiftungskatastrophen, die als Yusho (Japan, 1968) und Yu-Cheng (Taiwan, 1979) in die Geschichte eingegangen sind, deutlich. Hierbei kam es durch eine Leckage in einem Wärmetauscher bei der Produktion von Reisöl zu erheblichen Verunreinigungen von Lebensmitteln mit PCBs.

Nach diesen Unfällen haben sich u.a. Chlorakne und Hautveränderungen als akut toxische Wirkungen dieser Substanzen auf den Menschen herausgestellt (IARC, 1997; Kuratsune et al., 1987). Weiterhin zeigten sich embryonale Missbildungen nach der Exposition schwangerer Frauen (Kuratsune et al., 1987). Ferner stehen diese Verbindungen im Verdacht, Lernstörungen bei Kindern hervorzurufen, wenn deren Mütter während der Schwangerschaft PCB-belastet waren, beispielsweise durch den Verzehr von belastetem Fisch (Jacobson et al., 1990). Experimentellen Studien zufolge zeigen die PCBs neurotoxische Wirkungen, verursachen endokrine Störungen und wirken als

potente Tumorpromotoren in der Rattenleber (Safe, 1994; Buchmann et al., 1991; Giesy et al., 1998). Bei PCB-exponierten Arbeitern zeigte sich eine signifikante Zunahme der Sterblichkeit an Leberkrebs (Brown et al., 1987).

Die polychlorierten Biphenyle können je nach ihrer Wirkungsweise in der Rattenleber in zwei Kategorien unterteilt werden – in „dioxinartige“ PCBs einerseits und in „nicht-dioxinartige“ PCBs andererseits (Giesy et al., 1998).

Erstere sind Agonisten des **Aryl-hydrocarbon-Rezeptors** (AhR) und entfalten „dioxinartige“ Wirkungen in der Rattenleber wie die Induktion von Cytochrom P450 1A1- und 1A2-Isoenzymen (CYP1A1/1A2) des Phase I-Fremdstoffmetabolismus (Giesy et al., 1998). Die tumorpromovierende Wirkung dieser Substanzen in der Rattenleber konnte in mehreren Initiations-Promotionsstudien bereits gezeigt werden (Buchmann et al., 1991; Hemming et al., 1993). Ferner wurde in Studien der eigenen Arbeitsgruppe für einige Vertreter dieser Stoffklasse ein hemmender Effekt auf die durch UV-Licht induzierte Apoptose in primärkultivierten Hepatozyten männlicher Wistar-Ratten beobachtet (Zeiger, 2001).

Diese Eigenschaften haben diese PCBs gemeinsam mit dem TCDD, dessen tumorpromovierende Wirkung in der Rattenleber ebenfalls nachgewiesen ist (Schrenk et al., 1994).

Die bisher untersuchten „nicht-dioxinartigen“ PCBs induzieren Cytochrom P450 2B1- und 2B2-Isoenzyme (CYP2B1/2B2) des Phase I-Fremdstoffmetabolismus in der Rattenleber und sind somit keine Liganden des Ah-Rezeptors (Giesy et al., 1998; Connor et al., 1995). Auch sind für einige dieser Substanzen tumorpromovierende Wirkungen in der Rattenleber festgestellt worden (Safe, 1994; Buchmann et al., 1991; Hemming et al., 1993). Weiterhin konnten in Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe sowohl Hemmeffekte auf die durch UV-Licht induzierte Apoptose in Hepatozyten männlicher Wistar-Ratten als auch die Induktion der 7-Pentoxoresorufin-*O*-dealkylase-(PROD-) Aktivität als funktionellem Parameter für die CYP2B-Induktion für die PCB-Kongenerne 101 und 187 beobachtet werden (Bohnenberger et al., 2001).

Diese Eigenschaften haben diese Substanzen gemeinsam mit dem mit ihnen strukturell nicht näher verwandten Arzneimittel Phenobarbital, einem potenten Tumorpromotor in der Rattenleber (Kolaja et al., 1996).



Einzelne Kongenere induzieren sowohl CYP1A- als auch 2B-Isoenzyme. Diese PCBs werden daher als „mixed-type-Inducers“ bezeichnet (Connor et al., 1995).

Die Gewinnung von Daten in Bezug auf die toxikologischen, respektive biologischen Wirkungen der PCBs ist von herausragender Bedeutung bei der Risikobeurteilung dieser Substanzen sowie bei der Festsetzung von Grenz- und Richtwerten. Die toxikologische Bewertung der dioxinartigen PCBs bzw. deren Gemische stützt sich auf ein von Tanabe und Mitarbeitern entwickeltes Parametersystem, das „TCDD-equivalence“- (TEQ-) Konzept (Kannan et al., 1988). Die einzelnen PCBs werden hierbei durch „TCDD-equivalency-Factors“, TEF-Werte, charakterisiert d.h. in Korrelation zu 2,3,7,8-TCDD gesetzt, welchem per Definition der Wert TEF = 1 zugeordnet wird. Für PCB-Gemische gilt dann

$$\text{TEQ} = \sum (\text{Konzentration} \times \text{TEF})$$

Die TEF-Werte für die einzelnen PCB-Verbindungen wurden von der WHO festgesetzt (van den Berg, 1998).

### 1.3.2 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD)

#### 1.3.2.1 Chemie, Eigenschaften und Vorkommen von TCDD

2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) zählt zu der Stoffklasse der polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxine (PCDDs), welche aus einem Grundgerüst, bestehend aus zwei Benzolringen, die durch zwei Etherbrücken verknüpft sind, aufgebaut sind. Je nach Chlorierungsgrad können für die PCDDs 75 Kongenere unterschieden werden.

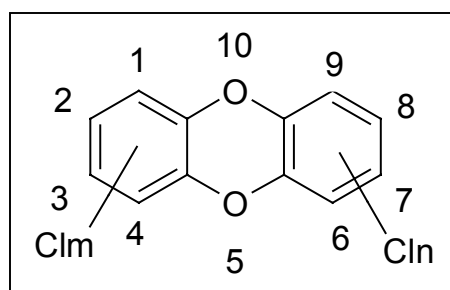


Abb. 1.4: Allgemeine Strukturformel der PCDDs

Der prominenteste Vertreter dieser Substanzklasse ist das TCDD, welches seine Bekanntheit durch einen Chemieunfall in Seveso/Oberitalien (1976) erlangt hat, wobei diese Verbindung im Kilogramm-Maßstab freigesetzt wurde.

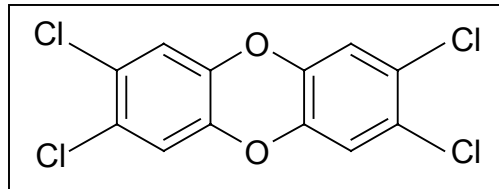


Abb. 1.5: Strukturformel von 2,3,7,8-TCDD

TCDD wurde im Gegensatz zu den PCBs niemals gezielt synthetisiert, sondern entsteht als Nebenprodukt bei industriellen Herstellungsprozessen verschiedener Substanzen und Materialien, so z.B. bei der großtechnischen Synthese des als Fungizid eingesetzten Pentachlorphenol (PCP, Verbot 1989) der polychlorierten Biphenyle (PCB, Verbot 1989) oder bei der Herstellung von chlorgebleichtem Papier. Weiterhin entstehen PCDDs und PCDFs (**polychlorierte Dibenzo-*p*-furane**) bei Verbrennungsprozessen organischer Materialien in Anwesenheit von Chlorverbindungen, u.a. in Müllverbrennungsanlagen und Krematorien oder auch bei der Holzverfeuerung. Bedingt durch die Herstellungsverbote relevanter Substanzen sowie aufgrund der Verbesserung von Abgasreinigungsanlagen und Filtersystemen sind die Neueinträge dieser Substanzen in den letzten Jahren stark zurückgegangen.

PCDDs und PCDFs akkumulieren aufgrund ihrer außerordentlichen Lipophilie im Fettgewebe sowie in der Leber und können über die Muttermilch ausgeschieden werden, was als gesundheitlich bedenklich einzustufen ist. Die Halbwertszeit von TCDD wird mit 5-10 Jahren angegeben (Beck et al., 1989). Neueren Untersuchungen zufolge ist diese Belastung scheinbar rückläufig (Fürst et al., 1992).

Der Hauptaufnahmepfad für den Menschen ist, wie auch bei den PCBs, neben der Atemluft sowie über Staub- und Bodenpartikel – aufgrund der Anreicherung dieser Verbindungen in der Nahrungskette – der Verzehr von Lebensmitteln tierischer Herkunft.

### 1.3.2.2 Toxikologische Relevanz und biologische Wirkungen von TCDD

Nach der Vergiftungskatastrophe von Seveso (1976) zeigte sich bei der betroffenen Bevölkerung gehäuft das Krankheitsbild der Chlorakne, was als hauptsächliches Charakteristikum der akut toxischen Wirkungen von TCDD auf den Menschen gilt (IARC, 1997). Interessanterweise aber wurden diese Symptome nicht bei allen Personen, bei denen erhöhte TCDD-Blutspiegel festgestellt worden waren, beobachtet. Weiterhin steht diese Substanz im Verdacht, tumorpromovierend zu wirken, was in mehreren Tierversuchen dokumentiert werden konnte (Pitot et al., 1989; Schrenk et al., 1994), für den Menschen aber zwar als wahrscheinlich, bisher jedoch nicht als gesichert gilt (Manz et al., 1991).

Ferner werden teratogene, embryotoxische sowie immuntoxische Effekte diskutiert, welche allerdings nach bisherigem Kenntnisstand nicht eindeutig verifiziert werden können.

Die toxikologische Bewertung der PCDDs stützt sich auf das TEF/TEQ-Konzept, welches ursprünglich für die Substanzklasse der PCBs entwickelt worden war.

Die Wirkungen von TCDD in der Rattenleber sind eingehend untersucht. So konnte bewiesen werden, dass TCDD einen Agonisten des Ah-Rezeptors repräsentiert (Bock et al., 1993) und somit u.a. CYP1A1 induziert, was durch quantitative Erfassung der CYP1A1-katalysierten 7-Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD)-Aktivität gezeigt werden kann (Schrenk et al., 1991).

Bereits vor einiger Zeit wurde in tierexperimentellen Studien an Sprague-Dawley-Ratten ein erhöhtes hepatokarzinogenes Potential für TCDD festgestellt, allerdings nur in weiblichen Individuen (Kociba et al., 1978). Weiterhin konnte TCDD anhand von Initiations-Promotions-Studien eine tumorpromovierende Potenz zugeschrieben werden; es zeigte sich hierbei eine signifikante Zunahme an enzymveränderten präneoplastischen Foci sowie die Ausbildung von Hepatomen (Pitot et al., 1980). Aufgrund dessen sowie den Befunden aus ähnlichen Versuchen gilt es als gesichert, dass TCDD, verglichen mit anderen Substanzen, den stärksten Tumorpromotor in der Nagerleber repräsentiert (Pitot et al., 1980; Schrenk et al., 1994).

In Untersuchungen von Fox et al. (1993) wurde in der normalen Leber nur eine leicht erhöhte Proliferation nach TCDD-Behandlung nachgewiesen, was auch von Schrenk et al. (1992) *in vitro* für Hepatozyten gezeigt werden konnte. Ferner offenbarte sich bei Initiations-Promotions-Experimenten von Stinchcombe et al. (1995) ebenfalls eine geringe Proliferationssteigerung in Präneoplasien nach TCDD-Behandlung, allerdings auch eine deutlich verringerte Apoptoserate. Das umliegende Normalgewebe war jedoch ohne Befund. Darüber hinaus konnte bei *in vitro*-Studien an Hepatozyten dokumentiert werden, dass die durch 2-Acetylaminofluoren (2-AAF) induzierte Apoptose durch TCDD hemmbar ist (Wörner und Schrenk, 1996). Interessanterweise zeigten sich allerdings keinerlei Hemmeffekte auf die durch TGF $\beta$ -1-induzierte Apoptose. Weiterhin wurde sowohl eine Verminderung der DNA-Fragmentierung als auch eine Verringerung des Anstiegs des Tumorsuppressorgenproduktes p53 beobachtet (Wörner und Schrenk, 1998). Die alleinige Behandlung von Rattenhepatozyten mit TCDD führte allerdings zu einem leichten Anstieg der Apoptoseinzidenz. Die DNA-Fragmentierung sowie der Anstieg des p53-Proteins waren ebenfalls geringfügig erhöht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass tumorpromovierende Substanzen wie TCDD auf präneoplastisch veränderte Zellen als „survival factors“ wirken (Schulte-Hermann et al., 1994), indem sie diesen einen Wachstumsvorteil verschaffen und deren klonale Expansion fördern.

Wie bereits erwähnt, spielt der Arylhydrocarbon-(Ah-) Rezeptor – oder auch Dioxinrezeptor genannt – eine zentrale Rolle bei der Wirkung „dioxinartiger“ Substanzen in der Zelle und zählt zur **per-arnt-sim**-Familie (PAS) der **basic-Helix-Loop-Helix**-Proteine (bHLH) (Burbach et al., 1992; Ema et al., 1992). Dieser Rezeptor ist im inaktiven Zustand im Cytoplasma lokalisiert und liegt dort als Proteinkomplex vor. Hierzu zählen zwei „Hitzeschockproteine“ hsp90 (Denis et al., 1988), das Hepatitis Virus **X**-assoziierte Protein XAP2 sowie ein Ko-Chaperon p23. Kommt es zur Aufnahme eines Liganden, spalten sich die assoziierten Proteine ab. Möglicherweise wird durch die Bindung der beiden hsp90 zum einen eine Dimerisierung verhindert, zum anderen scheint der AhR erst dadurch zur Ligandbindung befähigt zu werden (Rowlands et al, 1997).

Das XAP2-Protein wird u.a. auch als „Ah-receptor-associated-Protein“ bezeichnet (Carver et al., 1998) und dient wahrscheinlich der Stabilisierung des AhR-hsp90-Komplexes.

Erfolgt die Bindung eines Liganden, transloziert der Ah-Rezeptor-Ligandkomplex vom Cytoplasma in den Zellkern und bindet dort an ein weiteres Protein, den Ah-receptor nuclear translocator (ARNT) (Pollenz et al., 1994). Dieses Heterodimer bindet dann an spezifische, regulatorische DNA-Sequenzen, die sogenannten XREs (xenobiotic responsive elements), was zur Transskriptionsaktivierung mehrerer Gene, der AhR-Genbatterie führt (Rowlands et al., 1997). Damit kommt es u.a. zur Induktion von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus wie CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 (Phase I) sowie der Glutathion-S-Transferase Ya, Aldehyd-3-Dehydrogenase, UDP-Glucuronosyltransferase 1A6 und der NAD(P)H:Chinonoxidoreduktase (Phase II) (Nebert und Gonzales, 1987; Schrenk, 1998).

TCDD ist einer der prominentesten Agonisten des AhR. So zeigte sich in einer Studie an Mäusen, dass Individuen mit niedrigaffinem Rezeptortyp gegenüber Dioxinen weit- aus weniger sensitiv waren, als normale (Okey et al., 1994). Ferner zeigten sich AhR-defiziente Tiere sogar unempfindlich gegenüber TCDD (Fernandez-Salguero et al., 1996). Weiterhin ist bekannt, dass Individuen des Rattenstammes Han/Wistar, welche eine Veränderung im Sinne einer Deletion im AhR-codierenden Gen aufweisen (Pohjanvirta et al., 1999) eine außerordentlich geringe Sensitivität gegenüber den akut toxischen Wirkungen von TCDD zeigen. So offenbarte sich in tierexperimentellen Studien, dass bei Han/Wistar-Ratten nach TCDD-Gabe die ermittelten LD<sub>50</sub>-Werte, verglichen mit denen ebenso behandelter Individuen des Long-Evans-Stammes, zirka um den Faktor 1000 erhöht waren (Pohjanvirta et al., 1993; Unkila et al., 1994).

Neben TCDD zählen u.a. auch 3-Methylcholanthren, Benzo(a)pyren sowie einige Vertreter der PCBs zu den Liganden des Ah-Rezeptors. Für letztere konnte gezeigt werden, dass insbesondere die „dioxinartigen PCBs“, welche eine koplanoide Struktur annehmen können als AhR-Agonisten fungieren (Rowlands et al., 1997). Auch in Nahrungsmitteln natürlich vorkommende Verbindungen, können als AhR-Agonisten fungieren, so z.B. Indol [3,2-b]-carbazol, welches aus in Kohlarten enthaltendem Indol-3-carbinol entsteht. Ein physiologischer Ligand des Ah-Rezeptors ist – trotz zahlreicher Untersuchungen – bislang noch nicht identifiziert worden.

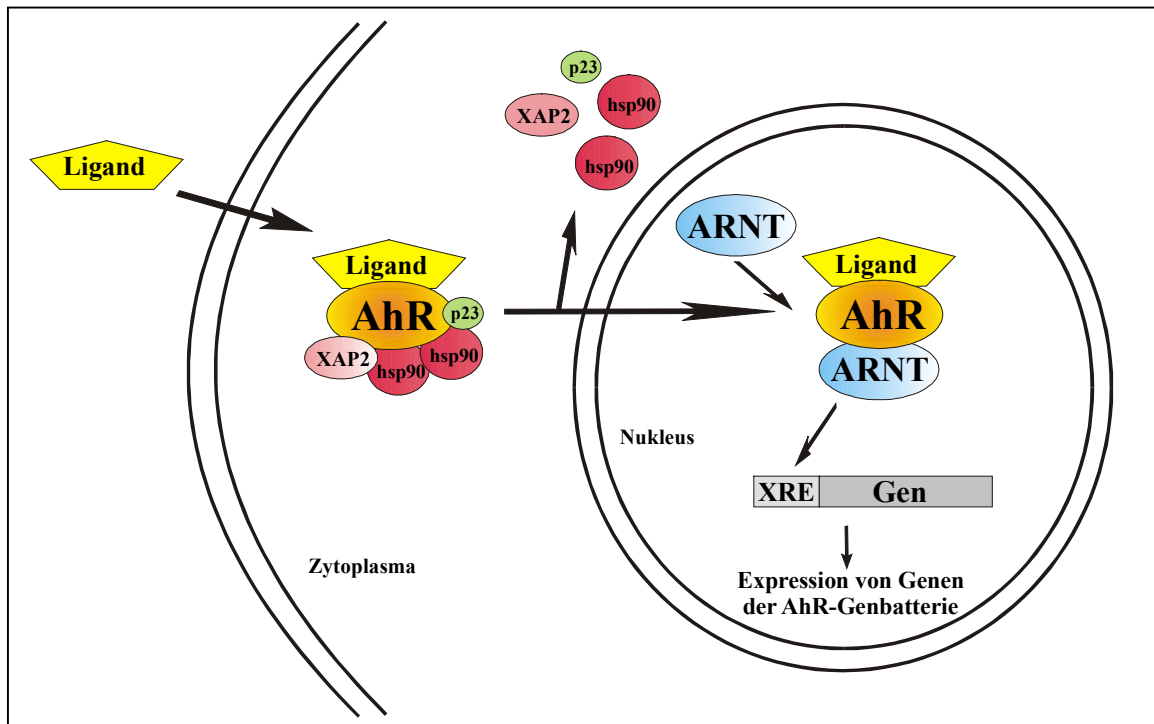


Abb.1.6: Schematische Darstellung der AhR-vermittelten Genexpression

### 1.3.3. Phenobarbital

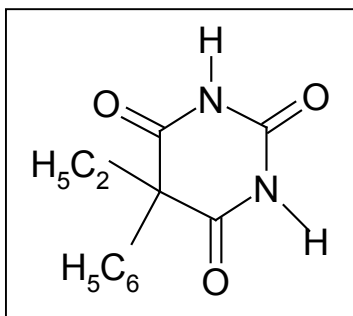


Abb. 1.7: Strukturformel von Phenobarbital

#### 1.3.3.1 Biologische Wirkungen von Phenobarbital

Das Barbitursäurederivat Phenobarbital wird beim Menschen aufgrund seiner sedierenden, narkotisierenden sowie antikonvulsiven Wirkung als Arzneimittel eingesetzt. In der Rattenleber zeigt diese Substanz die Wirkung eines potenten Tumorpromotors, und zwar streng organ- und speziesspezifisch (Peraino et al., 1971; Kristiansen et al., 1989). So führten bei *in vivo*-Studien für den Menschen klinisch relevante Dosen

(3-4 mg/kg/Tag) bei Ratten nach vorheriger Verabreichung des initiierenden Agens 2-Acetylaminofluoren (2-AAF) zur Entstehung von Tumoren. Die alleinige Gabe von Phenobarbital führte zu keinerlei Effekten (Peraino et al., 1975, 1980). Diese ausgeprägten organ- und speziesspezifischen Effekte lassen es als wahrscheinlich erscheinen, dass dem Metabolismus von Phenobarbital bei Ratte und Mensch verschiedene Hauptwege zugrunde liegen.

Die der tumorpromovierenden Wirkung von Phenobarbital in der Rattenleber zugrunde liegenden Mechanismen sind derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch wird seit einiger Zeit eine Hemmung der Apoptose als möglicher Mechanismus der Tumorpromotion diskutiert. So konnte z.B. von der Arbeitsgruppe Schulte-Hermann die tumorpromovierende Wirkung von Phenobarbital nach Tierexperimenten an Ratten auf eine Apoptosehemmung zurückgeführt werden (Bursch et al., 1984). Weiterhin zeigte sich in Studien von Wörner und Schrenk (1996), Grün (1998) sowie Bohnenberger (1999), dass die durch genotoxische Läsion ausgelöste Apoptose in Rattenprimärhepatozyten durch Phenobarbital *in vitro* hemmbar ist.

Eine der prominentesten Wirkungen von Phenobarbital in der Nagerleber ist die Induktion von CYP2B1 und 2B2 (Schulte-Hermann et al., 1986), was in Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe auch für primärkultivierte Hepatozyten bestätigt werden konnte (Bohnenberger et al., 2001). Bisher ist eine Reihe von weiteren Phenobarbital-vermittelten Effekten auf die Genregulation zellulärer Komponenten bekannt.

So ruft Phenobarbital Studien von Garcia-Allan et al. (1997) zufolge in der Rattenleber nach chronischer Verabreichung eine Reduktion epidermaler Wachstumsfaktorrezeptoren hervor. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in einer Besetzung dieser Rezeptoren durch TGF $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ) liegen (Johansson et al., 1990), was sich aus einer erhöhten TGF $\alpha$ -Expression durch Phenobarbital erklären könnte. In Untersuchungen von Garcia-Allan et al. (1997) wurde jedoch kein signifikanter Anstieg der TGF $\alpha$ -Transskripte festgestellt.

Weiterhin ist bekannt, dass Phenobarbital den Fortgang des Zellzyklus beeinflusst. So konnte durch Gonzales et al. (1998) bei *in vitro*-Versuchen an Maus-Hepatozyten eine G1- bzw. G2-Phasenarretierung durch Phenobarbital nach Bleomycin-induziertem DNA-Schaden gezeigt werden. Das Verbleiben der Zellen in der G1- bzw. G2-Phase war zudem mit einer Induktion des Tumorsuppressorgenproduktes p53 korreliert (Gonzales et al., 1998).

Der nähere Zusammenhang zwischen der Enzyminduktion und der tumorpromovierenden Wirkung in der Rattenleber ist derzeit noch weitgehend unklar. Seit einiger Zeit wird diskutiert, dass dem „constitutively active receptor“ (CAR) bei der Regulation der CYP2B-Genexpression in der Nagerleber eine zentrale Funktion zukommt.

So konnte beispielsweise von Kawamoto et al. (1999) anhand einer Studie mit Mäusen nach Phenobarbitalbehandlung eine Anreicherung von CAR-Protein in Hepatozytenzellkernen mittels Western-Blot-Analyse gezeigt werden.

CAR ist im inaktiven Zustand im Cytoplasma lokalisiert und wird auf bisher ungeklärtem Wege in Anwesenheit von Phenobarbital in den Zellkern transloziert. Dort kommt es zur Heterodimerisierung von CAR mit dem **Retinoid-X-Rezeptor (RXR)**. Dieses CAR-RXR-Heterodimer agiert als Transskriptionsfaktor, indem es mit einem responsiven Element in durch Phenobarbital induzierbaren Genen, dem „**phenobarbital-responsive enhancer module**“ (PBREM) wechselwirkt und somit die Transskription von CYP2B in Gang setzt.



## 2. Ziel der Arbeit

Die „nicht-dioxinartigen“ polychlorierten Biphenyle repräsentieren eine Substanzklasse, für welche derzeit noch sehr wenig experimentelle Daten vorliegen, die zur Risikobeurteilung dieser Stoffe herangezogen werden können.

Im Rahmen vorliegender Doktorarbeit sollten die „nicht-dioxinartigen“ PCB-Kongenere 28, 138 sowie 183 auf eine apoptosehemmende Wirkung in Abhängigkeit von der Konzentration untersucht werden. Die Induktion von Apoptose erfolgte durch UV-Strahlung (Dosis:  $90 \text{ J x m}^{-2}$ ). Als Referenzverbindung diente das Arzneimittel Phenobarbital, dessen apoptosehemmende Wirkung bereits bekannt ist. Hierzu sollte in Anlehnung an ein von Wörner (1998) etabliertes *in vitro*-Modell zur Apoptosehemmung vorgegangen werden.

Im darauffolgenden Teil dieser Arbeit sollten zwei weitere Methoden zur Erfassung von Apoptose in primären Rattenhepatozyten eingesetzt werden. Zum einen sollte hierzu nach einem Protokoll von Wörner (1998) zur DNA-Fragmentierungsanalyse vorgegangen werden, zum anderen sollte ein von Nicholson et al. (1995) beschriebener Caspase-3-Assay etabliert werden. Beide Methoden sollten zur weiteren Charakterisierung des Einflusses von „nicht-dioxinartigen“ PCBs auf die Apoptose herangezogen werden.

Abschließend sollte der Einfluss von 2,3,7,8-TCDD auf die Apoptose nach UV-Bestrahlung ( $90 \text{ J x m}^{-2}$ ) sowie auf die Induktion der Ah-Rezeptor vermittelten Aktivität von CYP1A-Isoenzymen in primärkultivierten Hepatozyten von Han/Wistar- und Long-Evans-Ratten studiert werden. Die Untersuchungen zur Beeinflussung der Apoptose sollten ebenfalls entsprechend dem Modell von Wörner (1998) stattfinden. Die Experimente zur CYP1A-Isoenzyminduktion sollten mittels quantitativer Erfassung der CYP1A-korrelierten 7-Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD)-Aktivität nach einer Methode von Burke und Mayer (1974) erfolgen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien und Biochemikalien

Ac-DEVD-AFC	Biomol, Hamburg
Ac-DEVD-CHO	Biomol, Hamburg
AFC	Sigma, Steinheim
Agarose	Gibco BRL, Heidelberg
Aprotinin	Sigma, Steinheim
BSA Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
CHAPS	AppliChem, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagenase-Hepatocyte Qualified	Gibco BRL, Heidelberg
DAPI	Sigma, Steinheim
Dexamethason	Sigma, Steinheim
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogensulfat	Merck, Darmstadt
DMEM Trockenmedium (1 g/l D-Glucose)	Biochrom Seromed, Berlin
DMEM Trockenmedium	Gibco BRL, Heidelberg
DMSO	Fluka Chemika, Neu-Ulm
DNA-Marker (1 kb)	Peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen
DTT	Sigma, Steinheim
EDTA	Roth, Karlsruhe
EGTA	Sigma, Steinheim
7-Ethoxyresorufin	Sigma, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
FKS	Gibco BRL, Heidelberg
Folin-Ciocaltaeus-Phenolreagenz	Fluka Chemika, Neu-Ulm
Gel loading Solution	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Gentamycinsulfat	Biochrom Seromed, Berlin
Glutaraldehyd	Roth, Karlsruhe

---

Glycochenodeoxycholsäure	Sigma, Steinheim
Heparin	Serva, Heidelberg
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isocitrat	Sigma, Steinheim
Isocitratdehydrogenase	Sigma, Steinheim
ITS	Becton Dickinson, Heidelberg
ITS <sup>+</sup>	Becton Dickinson, Heidelberg
Kaiser's Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
K/Na-Tartrat	Sigma, Steinheim
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, Steinheim
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
MNNG	Fluka Chemika, Neu-Ulm
NADP	Sigma, Steinheim
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
PCBs	Promochem, Wesel
Pepstatin A	Sigma, Steinheim
Phenobarbital	Sigma, Steinheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma, Steinheim
Proteinase K	Roche, Diagnostics, Mannheim
RNase A	Roche, Diagnostics, Mannheim
see DNA	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England
SDS	Serva, Heidelberg
Sucrose	Roth, Karlsruhe
Sulforhodamin 101	Sigma, Steinheim
2,3,7,8-TCDD	Ökometric, Bayreuth

Tris	BioRad, München
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Waymouth MD 705/1 Trockenmedium	Gibco BRL, Heidelberg

### 3.2 Geräte und Materialien

Autoklav	
Varioklav Typ 500	H+P Labortechnik, München
Brutschrank	
Heraeus BB 6220 CU	Heraeus, Hanau
DNA-Detektion	
Eagle-Eye®	Stratagene, Heidelberg
Elektrophoresekammern	
Easy-Cost	AGS, Heidelberg
Kulturschalen	
Petrischalen 94 x 16 mm	Sarstedt, Nürnberg
Petrischalen 60 x 15 mm	Sarstedt, Nürnberg
Quadripermschalen	Neolab, Heidelberg
Mikroskopie	
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Zeiss, Jena
Lichtmikroskop	Eschenbach, Nürnberg
Mikrotiterplatten 96 Well	Greiner, Nürtingen
Photometer	
Luminescence Spektrometer LS-5	Perkin Elmer, Überlingen
Spektralphotometer Uvikon 930	Kontron Instruments, Mailand, Italien
Plate-Reader	
Fluoroskan Ascent FL	Labsystems, Helsinki, Finnland

## Rattenleberperfusion

Braunülen Vasofix 16G	B. Braun, Melsungen
Einmal-Injektionskanülen Sterican 26G	B. Braun, Melsungen
Einmal-Injektionsspritzen Omnifix-F 1 ml	B. Braun, Melsungen
Gewebebänder Tesa <sup>®</sup>	Beiersdorf AG, Hamburg
Luftblasenfalle	
Präparierbesteck	
Präpariertisch	
Schlauchpumpe BVP	Ismatec, Glattsbrugg-Zürich, Schweiz
Seidentuch	
Silikonschläuche	

## Spannungsquellen

LKB-GPS 200/400	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England
-----------------	---------------------------------------------------------

## Sterilbank

UVF 6.12 S	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
------------	---------------------------

## Sterilfilter

Membranfilter 0,45 µm	Sartorius, Göttingen
Rotilabo Spritzenfilter 0,45 µm	Roth, Karlsruhe

## Thermostat T MA 6

Lauda Dr. R. Wobser GmbH &  
Co. KG, Lauda-Königshofen

## UV-Bestrahlung

Biometra, Göttingen

## Zählkammer

Fuchs-Rosenthal	Brand, Wertheim
-----------------	-----------------

## Zentrifugen

Beckman GS-6R	Beckman, München
Beckman Microfuge R	Beckman, München
Beckman J2-21	Beckman, München
Sigma 1 K 15	Sigma, Osterode

## Zentrifugenröhrchen

Blue-cap-Rundbodenröhrchen	Greiner, Nürtingen
PP-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner, Nürtingen
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Greiner, Nürtingen

Wasserbad

GFL 1003

Gesellschaft für Labortechnik mbH,  
Burgwedel

### 3.3 Nährmedien, Lösungen, Puffer

#### Nährmedien:

Die beiden Spezialminimalmedien für primäre Zellkulturen NIH (National Institute of Health) <sub>A</sub> und NIH<sub>B</sub> enthalten zu gleichen Teilen als Grundmedien DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) und Waymouth MD 705/1- Medium, deren Bestandteile in nachstehender Tabelle aufgelistet sind.

Substanz	DMEM (Dulbecco u. Freeman, 1959) [mg/l]	Waymouth MD 705/1 (Waymouth, 1959) [mg/l]
<b>1. Anorganische Salze</b>		
NaCl	6400	6000
KCl	400	150
CaCl <sub>2</sub>	200	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	80
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	-	120
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	-	0,500
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 9 H <sub>2</sub> O	0,1	-
MgSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	-	0,080
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	-	240
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	200	100
NaHCO <sub>3</sub>	3700	2240
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	124	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	300
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	-	566
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	-	0,110
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	-	0,250
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	-	0,120
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	-	0,150

<b>Substanz</b>	<b>DMEM</b> (Dulbecco u. Freeman, 1959) [mg/l]	<b>Waymouth MD 705/1</b> (Waymouth, 1959) [mg/l]
<b>2. Aminosäuren</b>		
L-Arginin HCl	84	75
L-Asparaginsäure	-	60
L-Cystein · HCl	-	90
L-Cystin	48	15
L-Glutamin	580	350
L-Glutaminsäure	-	150
Glycin	30	50
L-Histidin	-	128
L-Histidin HCl · H <sub>2</sub> O	42	-
L-Isoleucin	105	25
L-Leucin	105	50
L-Lysin · HCl	146	240
L-Methionin	30	50
L-Phenylalanin	66	50
L-Prolin	-	50
L-Serin	42	-
L-Threonin	95	75
L-Tryptophan	16	40
L-Tyrosin	72	40
L-Valin	94	65
<b>3. Vitamine</b>		
Ascorbinsäure	-	17,5
Biotin	-	0,020
Cholinchlorid	4	250
Folsäure	4	250
i-Inositol	7,2	1
Nicotinamid	4	1
D-Calcium-Pantothenat	4	1
Pyridoxal · HCl	4	1
Riboflavin	0,400	1
Thiamin ·	4	10
Vitamin B <sub>12</sub>	-	0,200

Substanz	DMEM (Dulbecco u. Freeman, 1959) [mg/l]	Waymouth MD 705/1 (Waymouth, 1959) [mg/l]
<b>4. Andere Komponenten</b>		
D-Glucose	1000	5000
Glutathion (reduziert)	-	15
Hypoxanthin	-	25
Natriumpyruvat	110	-
Phenolrot	15	10

Tab. 3.1: Zusammensetzung der Grundmedien

Die beiden Grundmedien wurden wie folgt angesetzt:

DMEM Medium [5l]	Waymouth MD 705/1 [5l]
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trockenmedium unter ständigem Rühren in 4,5 l H<sub>2</sub>O bidest. lösen</li> <li>• Zugabe von <b>18,5 g</b> NaHCO<sub>3</sub></li> <li>• pH Wert auf 7,2 einstellen</li> <li>• auf 5 l mit H<sub>2</sub>O bidest. auffüllen</li> <li>• durch Filtration sterilisieren</li> <li>• Lagerung bei +4°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trockenmedium unter ständigen Rühren in 4,5 l H<sub>2</sub>O bidest. lösen</li> <li>• Zugabe von <b>11,2 g</b> NaHCO<sub>3</sub></li> <li>• pH Wert auf 7,2 einstellen</li> <li>• auf 5 l mit H<sub>2</sub>O bidest. auffüllen</li> <li>• durch Filtration sterilisieren</li> <li>• Lagerung bei +4</li> </ul>

Tab. 3.2: Ansetzen der Grundmedien

NIH<sub>A</sub> und NIH<sub>B</sub> enthalten als weitere Zusätze noch ITS bzw. ITS<sup>+</sup>:

Komponenten	ITS	ITS <sup>+</sup>
Insulin	5 µg/ml	6,25 µg/ml
Transferrin	5 µg/ml	6,25 µg/ml
Selenige Säure	5 ng/ml	1,25 ng/ml
BSA	-	1,25 mg/ml
Linolsäure	-	5,35 µg/ml

Tab. 3.3: Zusammensetzung von ITS und ITS<sup>+</sup> (Endkonzentrationen)



NIH<sub>A</sub> und NIH<sub>B</sub> setzen sich dann wie folgt zusammen:

Komponenten	Aussaatmedium NIH <sub>A</sub> [500 ml]	Erhaltungsmedium NIH <sub>B</sub> [500 ml]
Waymouth Medium 705/1	250 ml	250 ml
FKS (Fötale Kälberserum)	50 ml	-
1M HEPES (pH 7,4)	5 ml	5 ml
Gentamycin-Sulfat 50 mg/ml	500 µl	500 µl
Dexamethason 100 µM	250 µl	250 µl
ITS	500 µl	-
ITS <sup>+</sup>	-	5 ml
DMEM	ad 500 ml	ad 500 ml

Tab. 3.4: Zusammensetzung von NIH<sub>A</sub> und NIH<sub>B</sub>

Nach Fertigstellung beider Medien erfolgte, wie bei den Grundmedien, eine Mediumkontrolle über 2 Tage. In Petrischalen ausgegossene Proben wurden im Brutschrank inkubiert und anschließend mikroskopisch auf eine mikrobielle Kontamination hin überprüft.

Die Lagerung der Medien erfolgte bei +4°C

### Lösungen und Puffer

*Perfusionen:*

- Perfusionsmedium PI

NaCl	6,3 g
KCl	0,32 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,27 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,15 g
NaHCO <sub>3</sub>	1,81 g
HEPES	3,58 g
Glucose · H <sub>2</sub> O	1,5 g
ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>idest.</sub>	
EGTA	0,038 g
ad 1 l Perfusionsgrundlösung (pH 7,4)	

- Perfusionsmedium PII

DMEM/Ham's F12 (1:1)

HEPES (10 mM) pH 7,4

Collagenase

- Waschpuffer

DMEM/Ham's F12 (1:1)

HEPES (10 mM) pH 7,4

FKS (20%)

- Pentobarbitallösung

Pentobarbital 33 mg/ml H<sub>2</sub>O bidest.

- Heparinlösung 1000 U/ml 0,9%-NaCl

- Trypanblau-Lösung

Trypanblau 0,4 %

NaCl 0,81 %

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,06 %

### *Zellkultur*

- 10 x DMEM

DMEM Trockenmedium 1,2 g  
(Gibco BRL, Heidelberg)

NaHCO<sub>3</sub> 243,8 mg

Aqua bidest. 10,0 ml

*Mikroskopische Untersuchungen*

- Fixierlösung: 1% Glutaraldehydlösung [10 ml]  
Natriumphosphat/Magnesiumchlorid-Puffer 9,6 ml  
25% Glutaraldehyd 0,4 ml
- 100 mM Natriumphosphat pH 7,0/ 1 mM Magnesiumchlorid-Puffer [500 ml]  
58 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  5,162 g  
42 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  2,898 g  
1 mM  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  500  $\mu\text{l}$
- NaCl-Lösung 0,9 %

*DNA-Extraktion*

- DNA-Extraktionspuffer  
EDTA 1 mM  
SDS 1 %  
Tris·HCL (pH 7,4) 50 mM
- Laufpuffer: 5 x TBE  
Borsäure 27,5 g  
EDTA (0,5 M) 20,0 ml  
Tris·HCL (pH 8,0) 50,0 g
- Proteinase K- Lösung  
Proteinase K 10 mg x ml<sup>-1</sup>  
Tris·HCL (pH 7,5) 20 mM

## • RNase A- Lösung

RNase A	10 mg x ml <sup>-1</sup>
NaAc (pH 7,5)	100 mM

## • Sevag

Chloroform: Isoamylalkohol	25:1
----------------------------	------

## • TE-Puffer

EDTA	1 mM
Tris·HCl (pH 8,0)	10 mM

*Gewinnung der Lysate*

## • Lysis-Puffer

HEPES (pH 7,5)	25 mM	
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	
EGTA	1 mM	
Triton X-100	0,1%	
PMSF	1 mM	} unmittelbar vor Verwendung zugeben
Pepstatin	1 µg x ml <sup>-1</sup>	
Leupeptin	1 µg x ml <sup>-1</sup>	
Aprotinin	1 µg x ml <sup>-1</sup>	

*Caspase-Messung*

## • Assay-Puffer (2 x)

HEPES (pH 7,4)	100 mM	
Sucrose	2%	
CHAPS	0,2%	
DTT	10 mM	(unmittelbar vor Verwendung zugeben)

## • Caspase-3-Inhibitor-Lösung ( 1mM Stock)

Ac-DEVD-CHO, lyoph. Peptid	1 mg	
DMSO (hochrein)	1,99 ml	
Lagerung: -20°C		

## • Caspase-3-Substrat-Lösung (10 mM Stock)

Ac-DEVD-AFC, lyoph. Peptid	5 mg	
DMSO (hochrein)	686 µl	
Lagerung: -20°C		

## • DTT-Stock-Lösung (1M)

DTT	100 mg	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	650 µl	
Lagerung: -20°C		

## • Fluoreszenz-Standard-Lösung (100 mM Stock)

AFC	5 mg	
DMSO (hochrein)	2,174 ml	
Lagerung: -20°C		

### Proteinbestimmung

- Lowry A

Natriumcarbonatlösung (2 g/100 ml)	50,0 ml
K/Na-Tartrat-Lösung (2,7 g/100 ml)	0,5 ml
Kupfersulfat-Lösung (1,0 g/100 ml)	0,5 ml

- Lowry B (Folin-Ciocaltaeus-Phenolreagenz)

Verdünnung 1:1 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

(unmittelbar vor Gebrauch ansetzen)

## 3.4 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Zur Rattenleberperfusion wurden männliche Ratten der Stämme Wistar (Charles-River, Kieselegg), Han-Wistar (National Public Health Institute, Kuopio, Finnland) sowie Long-Evans (National Public Health Institute, Kuopio, Finnland) mit einem Körpergewicht von 150-200 g herangezogen. Die Tierhaltung erfolgte im Tierhaus der Universität Kaiserslautern in Makrolon-Käfigen unter künstlichen Tag-Nacht-Lichtverhältnissen. Zu Trinkwasser und Trockenfutter (Altromin, Lage) hatten die Tiere freien Zugang.

## 3.5 Leberperfusion und Präparation der Hepatozyten

Als Grundlage zur Durchführung der Rattenleberperfusion diente eine zweistufige *in situ* Perfusionstechnik, modifiziert nach Seglen (1976).

Die Perfusionsmedien wurden zuvor sterilfiltriert und auf eine Temperatur von 42°C in einem Wasserbad erwärmt sowie alle Operationsbestecke autoklaviert.

Das zur Perfusion herangezogene Tier wurde durch i.p. Injektion einer Lösung des Barbiturates Pentobarbital (300µl pro 100 g Körpergewicht) narkotisiert.

Nach Öffnung der Bauchdecke und Freilegung der Leber mit ihren Gefäßsystemen, wurde um die Pfortader (Vena porta hepatica) zunächst eine lockere Ligatur gelegt. Anschließend erfolgte die Injektion des Antikoagulans Heparin (0,1 ml pro 100 g Körpergewicht; Einwirkzeit ca. 2 min.) in die untere Hohlvene (Vena cava inferior), um eine vorzeitige Blutgerinnung zu verhindern. Nach Einstechen der Braunüle, durch welche die Perfusionsmedien in die Leber gelangten, wurde die Ligatur um die Pfortader festgezogen. Durch anschließendes Durchtrennen der Vena cava inferior, wurde das Abfließen von Blut und Perfusat aus der Leber gewährleistet. Das im ersten Perfusionsschritt bis zur vollständigen Entblutung der Leber verwendete EGTA-haltige Perfusionsmedium PI bewirkt durch Entzug von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen das Lösen von Desmosomen. Während diesem Perfusionsschritt, wurde der nunmehr entbluteten Leber collagenasehaltiges Perfusionsmedium (100 Collagenase digestion units pro ml Perfusionsmedium; insgesamt 200 ml Lösung) zugeführt.

Das Enzym Collagenase wird durch die ebenfalls im Perfusionsmedium vorhandenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aktiviert und bewirkt eine Dissoziation des Leberparenchyms in einzelne Zellen. Währenddessen wurde die Leber vollständig freigelegt und eine Abfluss-Braunüle in die Vena cava inferior eingeführt. Die Perfusion erfolgte daraufhin rezirkulierend. Nach ca. 10 Minuten zeigte sich eine Erweichung der Leber, welche nun eine netzartige Oberflächenstruktur aufwies. Die Leber konnte nun vorsichtig herauspräpariert und die Leberkapsel mit Hilfe einer Pinzette über einem Seidentuch unter sterilen Bedingungen geöffnet werden. Durch Zugabe von insgesamt 200 ml Waschlösung, wurde ein Herausschwemmen der Hepatozyten erreicht.

Die somit entstandene Zellsuspension wurde auf vier 50 ml-Falcon-Tubes (steril) verteilt und zur Abtrennung toter Zellen bei ca. 50 g (Beckman-Zentrifuge) 2-3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Nach Resuspendierung des Pellets in jeweils 25 ml Waschlösung und erneuter Zentrifugation wurden die sedimentierten Zellen in jeweils 8 ml Waschlösung aufgenommen und in einem 50 ml Falcon-Tube (steril) vereinigt.

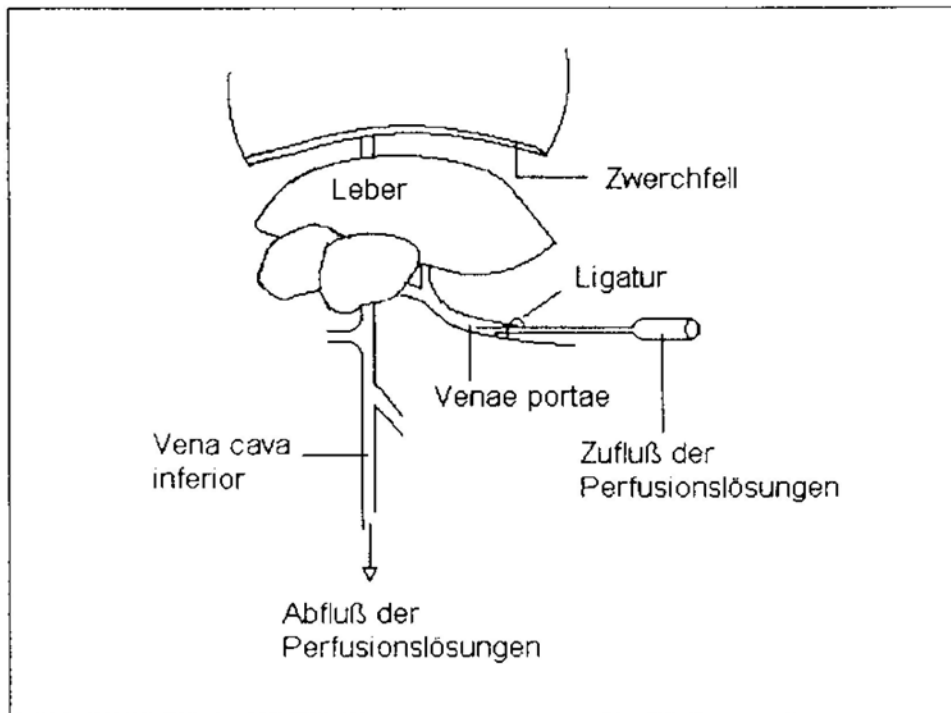


Abb. 3.1: Schematische Darstellung einer *in situ*-Leberperfusion

### 3.6 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

#### Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach Verdünnung von 10  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit 990  $\mu\text{l}$  Waschpuffer in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer, wobei unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung 2-3 Felder (mit jeweils 16 Kleinstquadraten) ausgezählt wurden.



Die Anzahl der Zellen pro Milliliter Suspension wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{GZ \times 80 \times 1000 \times Vf}{16} = \text{Zellen/ml}$$

GZ: durchschnittlich ausgezählte Gesamtzellzahl

80; 16: Faktoren der Zählkammer

1000: Umrechnungsfaktor von  $\mu\text{l}$  auf ml

Vf: Verdünnungsfaktor (Vf = 100)

### Bestimmung der Vitalität

Die Bestimmung der Vitalität erfolgte nach dem Trypanblau-Ausschlußtest. Hierbei wurde ein Aliquot einer 1:100-Verdünnung mit Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:1 versetzt. Da tote Zellen durch das Eindringen des Farbstoffes blau angefärbt werden, waren diese bei mikroskopischer Betrachtung von lebenden Zellen unterscheidbar.

Der Vitalitätsfaktor ist der Quotient aus der Anzahl lebender Zellen und der Gesamtzellzahl. Die Anzahl lebender Zellen pro Milliliter Suspension errechnet sich durch Multiplikation der Zelldichte pro ml mit dem Vitalitätsfaktor.

$$\text{Vitalitätsfaktor} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

$$\text{Lebendzellzahl/ml} = \text{Zelldichte/ml} \times \text{Vitalitätsfaktor}$$

Zur erfolgreichen Versuchsdurchführung sollte die Vitalität mindestens 85% betragen.

### 3.7. Zellkultur

#### 3.7.1 Herstellung der Kollagenlösung für die Kollagengel-Sandwichkultur

Die Herstellung der Kollagenlösung für die Sandwichkultur erfolgte nach einem Protokoll von Houy (1998). Alle verwendeten Lösungen wurden zuvor sterilfiltriert, sowie alle Hilfsmittel autoklaviert.

Kollagenfasern aus insgesamt 8 Rattenschwänzen wurden in 800 ml einer 3-prozentigen Essigsäure aufgenommen und über Nacht unter Rühren bei 4°C gelöst. Zur Sedimentierung unlöslicher Bestandteile wurde die entstandene Suspension anschließend 90 min. bei 3750 rpm (Beckman GS-6R) und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit 30-prozentiger NaCl-Lösung versetzt (40 ml Lösung + 8 ml 30-prozentige NaCl), wodurch nach anschließender Zentrifugation (3750 rpm, 4°C, 30 min.) eine Ausfällung des Kollagens erreicht wurde. Nach diesem Fällungsschritt zeigte sich ein Pellet, welches dann direkt zur Aufarbeitung herangezogen werden konnte, sowie eine auf dem Flüssigkeitsspiegel schwimmende Schicht. Das Pellet wurde zur Reinigung in insgesamt 100 ml 5-prozentiger NaCl-Lösung resuspendiert, anschließend zentrifugiert (3750 rpm, 4°C, 30 Min.) und in 25 ml 0,6-prozentiger Essigsäure gelöst.

Die oben schwimmende Schicht wurde erneut in 30-prozentiger NaCl-Lösung (insgesamt 50 ml) aufgenommen und zentrifugiert (3750 rpm, 4°C, 30 Min.). Das hierbei erhaltene Pellet wurde analog weiterbehandelt und ebenfalls in insgesamt 25 ml 0,6-prozentiger Essigsäure gelöst.

Die nunmehr gelösten Pellets wurden in einer sterilen Flasche vereinigt und durch Zugabe von weiterer 0,6-prozentiger Essigsäure auf ein Volumen von insgesamt 400 ml gebracht.

Nach Dialyse gegen 1 mM-HCl (2 l 1 mM-HCl gegen 100 ml Kollagenlösung; Dauer: 48 Stunden, 4maliger Pufferwechsel) wurde die somit aufgereinigte Kollagenlösung lyophilisiert.

Die Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung erfolgte durch Lösen des gefriergetrockneten Kollagens in 1 mM-HCl bis zu einer Endkonzentration von 1,5 mg/ml.

### 3.7.2 Herstellung der Kollagenlösung für die einfache Kollagenkultur

Alle verwendeten Lösungen wurden zuvor sterilfiltriert sowie alle Hilfsmittel autoklaviert.

Aus Rattenschwänzen extrahierte Kollagenfasern wurden 4 Stunden unter einer Rotlichtlampe getrocknet und anschließend in ca. 1 cm lange Stücke geschnitten. Diese wurden in kleinen Petrischalen zu je 0,5 g portioniert und unter UV-Licht-Einfluss über Nacht sterilisiert. Zur Herstellung der Kollagenlösung wurden zwei 0,5 g-Portionen steriler Fasern in eine autoklavierte 1 l-Flasche überführt und mit 880 ml 0,05-prozentiger Essigsäure aufgegossen. Die Suspension wurde mindestens über Nacht bei 4°C gerührt und anschließend mit 3750 rpm (Beckman GS-6R) bei 4°C über 24 Stunden zentrifugiert.

### 3.7.3 Zellkultur im Kollagengel-Sandwich

Die Behandlung der Zellen erfolgte bei allen Experimenten zur Apoptosehemmung in Anlehnung an ein von W. Wörner (1998) etabliertes *in vitro*-Modell. Die Inkubation der Hepatozytenkulturen wurde grundsätzlich im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> vorgenommen.

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Substanzen auf die Apoptose in Rattenhepatozyten fanden Versuche mit Zellen verschiedener Rattenstämme statt.

Substanzen	Rattenstamm	Apoptose
PCB 28, 138, 183 Phenobarbital	Wistar ♂	UV-induziert basal
TCDD	Long-Evans ♂ Han-Wistar ♂	UV-induziert

Die Kultivierung der Primärhepatozyten erfolgte auf über Nacht unter UV-Licht sterilisierten Objektträgern.

Für das hierbei angewendete Kollagengel-Sandwich-Kultivierungsverfahren wurde die wie unter 3.7.1 beschriebene hergestellte Kollagen-Lösung im Verhältnis 10:1 mit 10 x DMEM versetzt. Die Objektträger wurden unmittelbar nach Ansetzen dieser nunmehr gebrauchsfertigen Lösung mit jeweils 700 µl Kollagen beschichtet. Die Aushärtung der frischen Kollagenschicht erfolgte über einen Zeitraum von 1 Stunde im Brutschrank; im Anschluss daran wurde die Aussaat der Zellen (60.000/cm<sup>2</sup>) in jeweils 5 ml NIH<sub>A</sub> vorgenommen. Nach einer 2-3-stündigen Anheftungsphase, wurde das Aussaatmedium gegen 3 ml NIH<sub>B</sub> ausgetauscht. Die zweite Kollagenschicht (500 µl) wurde 1 Stunde vor Beginn der Behandlung aufgetragen.

Nach dem 1. Mediumwechsel wurden die Hepatozyten über Nacht (ca. 16 Stunden) inkubiert.

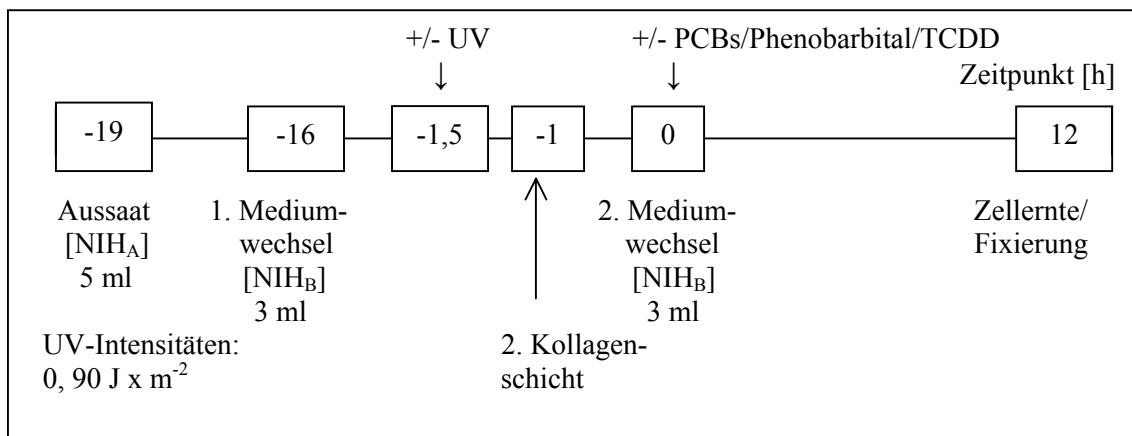
### **3.7.3.1 Behandlung der Zellen bei Experimenten zum Einfluss von PCBs, Phenobarbital sowie TCDD auf die Apoptose**

Bei Experimenten zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Xenobiotika auf die durch UV-Licht induzierte Apoptose erfolgte die Bestrahlung der Zellen mit einer UV-Licht-Dosis von 90 J x m<sup>-2</sup> 30 min. vor dem Auftragen der 2. Kollagenschicht, wobei das Medium vorher abgenommen wurde. Die Zugabe der Substanzen fand nach dem Aushärten der 2. Kollagenschicht (1 Stunde, 37°C) mit dem 2. Mediumwechsel in folgenden Endkonzentrationen statt:

- PCB 28: 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 3 x 10<sup>-6</sup> M
- PCB 138: 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> M
- PCB 183: 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> M
- Phenobarbital: 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup> M
- TCDD: 10<sup>-13</sup>, 10<sup>-12</sup>, 10<sup>-11</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup> M

Die Applikationslösungen waren gegenüber den jeweiligen Endkonzentrationen im Medium 200-fach konzentriert, was einer konstanten DMSO-Konzentration von 0,5% entspricht. Die Kontrollen wurden jeweils mit dem entsprechenden Volumen an DMSO (PCB- und TCDD-Ansätze) bzw. Aqua bidest (Phenobarbital-Ansätze) behan-

delt. Der Zeitpunkt der Zugabe der Substanzen wurde als Zeitpunkt 0 definiert, die Zellernte erfolgte 12 Stunden später. Bei den Experimenten zur Untersuchung des Einflusses dieser Substanzen auf die basale Apoptose wurde analog verfahren, wobei keine Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht stattfand.



**Abb. 3.2:** Behandlungsschema zur Untersuchung des Einflusses von PCBs, Phenobarbital sowie TCDD auf die Apoptose in Rattenhepatozyten.

### 3.7.4 Zellkultur in Einfach-Kollagenkultur

Für Experimente zur DNA-Fragmentierung, Caspase-3-Aktivität sowie zur Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin-*O*-deethylase-Aktivität (EROD) wurden Petrischalen der Größen 94 x 16 mm und 60 x 15 mm mit wie unter 3.7.2 beschrieben hergestellter Kollagenlösung benetzt und unter UV-Licht über Nacht in der Sterilbank getrocknet. Den jeweiligen Versuchszwecken entsprechend, wurden Rattenprimärhepatozyten wie folgt ausgesät:

Versuchszweck	Rattenstamm	Kulturschale □	Zelldichte [cm <sup>-2</sup> ]	Volumen Kulturmedium
DNA-Fragmentierung	Wistar ♂	94 mm	80.000	NIH <sub>A</sub> 8 ml NIH <sub>B</sub> 7 ml
Caspase-3-Aktivität	Wistar ♂	60 mm	60.000	NIH <sub>A</sub> 4 ml NIH <sub>B</sub> 3 ml
EROD-Aktivität	Han-Wistar ♂ Long-Evans ♂	60 mm	60.000	NIH <sub>A</sub> 4 ml NIH <sub>B</sub> 3 ml

Die Aussaat der Hepatozyten fand bei allen durchgeführten Experimenten in NIH<sub>A</sub>-Medium (10% FKS) statt, welches nach 3 Stunden durch das FKS-freie Erhaltungsmedium NIH<sub>B</sub> ersetzt wurde. Die Kultivierung erfolgte über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.7.4.1 Behandlung der Zellen bei Experimenten zur DNA-Fragmentierung

Bei Experimenten zur DNA-Fragmentierung wurde in Anlehnung an ein Protokoll von Wörner (1998) versucht, die DNA-Fragmentierung durch UV-Strahlung auszulösen. Hierzu wurden die Zellen vor dem 2. Mediumwechsel mit den UV-Licht-Dosen 0, 60, 90, 120, 150, 200 J x m<sup>-2</sup> bestrahlt, wobei das Medium zuvor abgesaugt wurde.

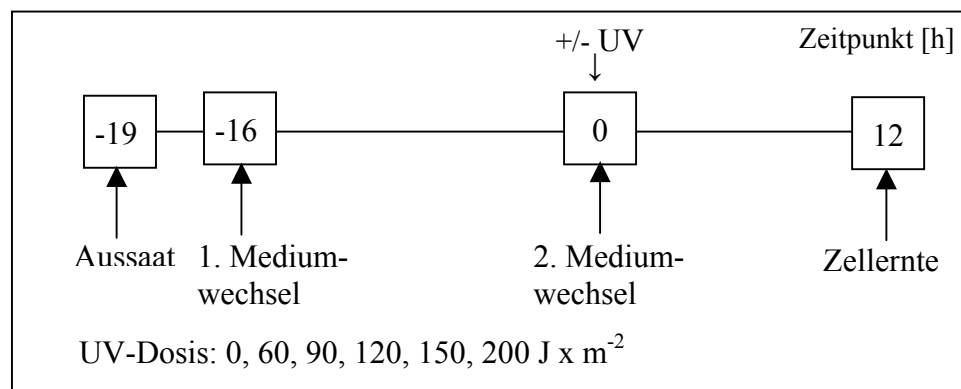
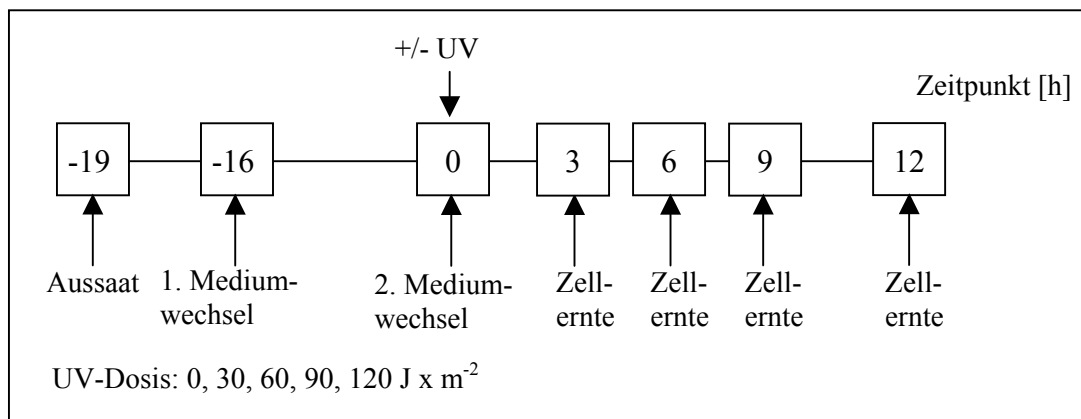


Abb. 3.3: Behandlungsschema bei Versuchen zur Induktion der DNA-Fragmentierung durch UV-Strahlung

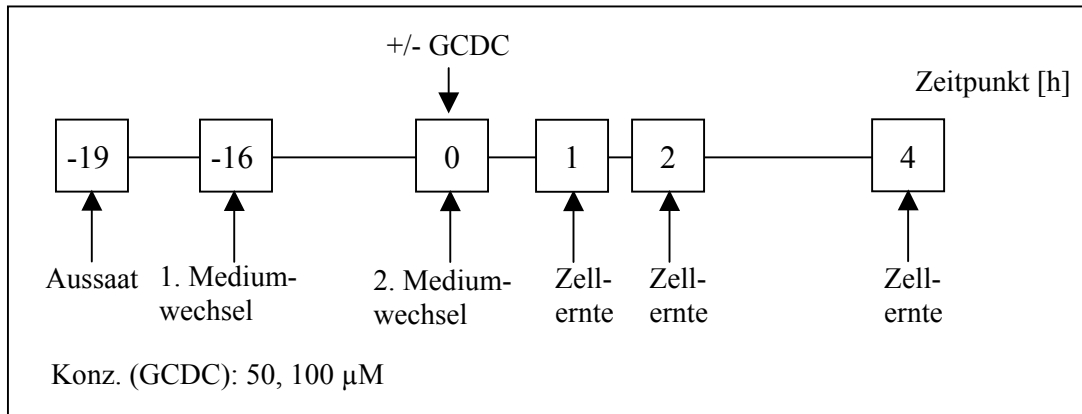
### 3.7.4.2 Behandlung der Zellen bei Experimenten zur Caspase-3-Aktivität

Zunächst sollte in Basisversuchen der Effekt von UV-Strahlung auf die Induktion der Caspase-3 in Rattenhepatozyten untersucht werden. Hierzu wurde eine Dosisreihe mit den UV-Licht-Intensitäten 0, 30, 60, 90 und 120 J x m<sup>-2</sup> unter Berücksichtigung verschiedener Inkubationszeiten (3, 6, 9, 12 Stunden) durchgeführt. Die UV-Bestrahlung fand nach Absaugen des Mediums vor dem 2. Mediumwechsel statt.



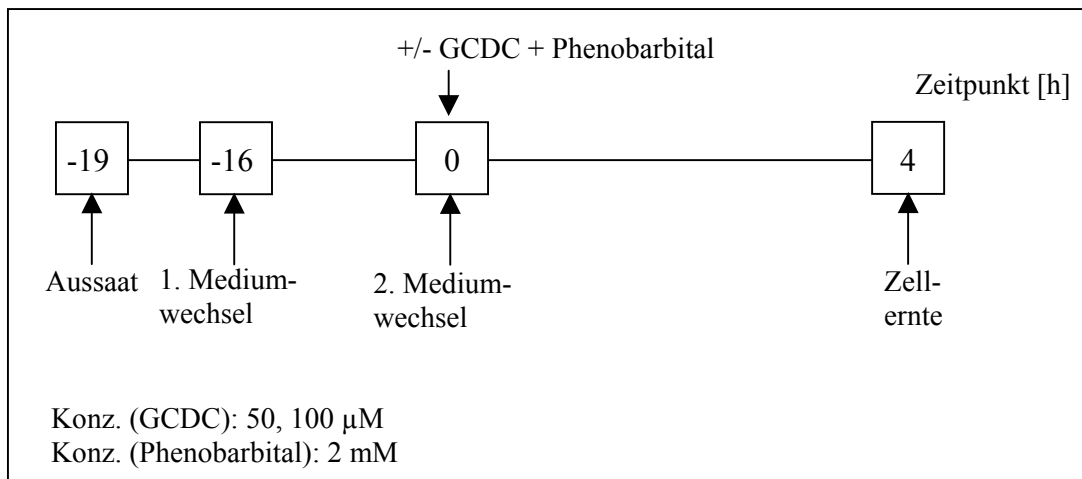
**Abb. 3.4:** Behandlungsschema bei Experimenten zur Induktion der Caspase-3 durch UV-Strahlung

Bei Untersuchungen zur Induktion der Caspase-3 durch die Gallensäure Glycocheno-deoxycholsäure (GCDC) wurden Versuchsreihen zum Dosis- und Zeitverlauf durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen nach dem 2. Mediumwechsel mit GCDC (gelöst in DMSO) in den Konzentrationen 50 µM und 100 µM behandelt. Die Applikationslösungen waren gegenüber den jeweiligen Endkonzentrationen im Medium 200-fach konzentriert, so dass stets eine konstante Konzentration an DMSO im Medium vorlag. Zu jeder Versuchsreihe wurden je zwei Kontrollen durchgeführt, die zum einen nur NIH<sub>B</sub>-Medium, zum anderen DMSO im Medium (Endkonzentration den Testansätzen entsprechend) enthielten. Die Zellernte erfolgte jeweils nach 1, 2 und 4 Stunden.



**Abb. 3.5:** Behandlungsschema bei Experimenten zur Induktion der Caspase-3 durch die Gallensäure GCDC

Zum Nachweis möglicher Effekte von Phenobarbital und auf die Caspase-3-Aktivität wurden die Kulturen mit 2 mM-Phenobarbital (gelöst in  $H_2O_{bidest}$ ) behandelt. Die Promotorzugabe erfolgte mit dem 2. Mediumwechsel zusammen mit der Zugabe von GCDC (50, 100 µM), die Kontrollen enthielten nur  $NIH_B$ -Medium bzw.  $NIH_B$  + DMSO. Die Inkubationszeit betrug 4 Stunden.



**Abb. 3.6:** Behandlungsschema bei Experimenten zum Einfluss von Phenobarbital auf die Caspase-3-Aktivität



### 3.7.4.3 Behandlung der Zellen bei Experimenten zur 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase- (EROD-) Aktivität

Nach Kultivierung der Hepatozyten über Nacht erfolgte die Zugabe von TCDD (gelöst in DMSO) mit dem 2. Mediumwechsel. Die hierbei verwendeten TCDD-Applikationslösungen waren gegenüber den jeweiligen Endkonzentrationen 200-fach konzentriert, so dass die DMSO-Konzentrationen im Medium stets 0,5% betragen. Die Kontrollen wurden mit den gleichen Volumina an DMSO behandelt.

Die Versuchsansätze wurden mit folgenden (End-)Konzentrationen an TCDD behandelt:  $10^{-13}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  M. Die Zellernte erfolgte nach 48-stündiger Inkubation.

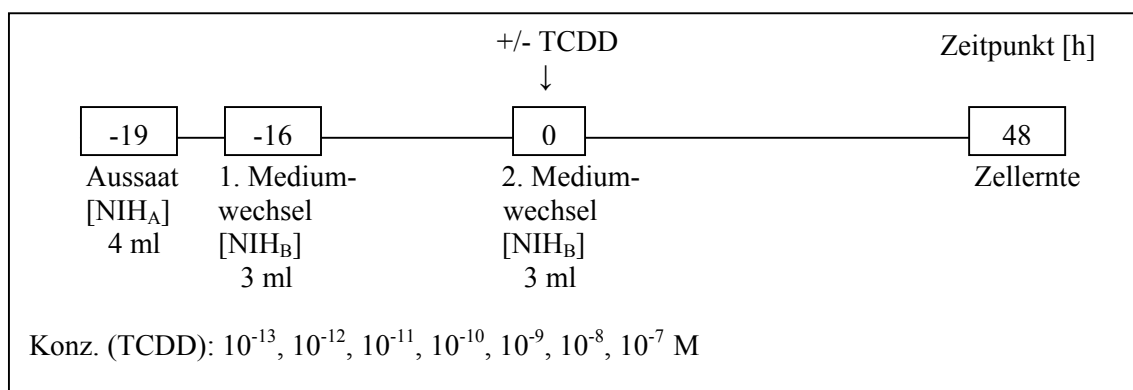


Abb. 3.7: Behandlungsschema bei Versuchen zur EROD-Aktivität

## 3.8 Detektion apoptotischer Zellkerne

### 3.8.1 Erstellung der fluoreszenzmikroskopischen Präparate

Nach Durchführung der jeweiligen Behandlungsschemata wurden die Objektträger mit Hilfe einer Pinzette aus den Quadripermschalen entnommen und in einer 0,9-prozentigen Lösung von NaCl gewaschen. Die anschließende Fixierung erfolgte über 30 Minuten in einer glutaraldehydhaltigen Fixierlösung (1% Glutaraldehyd). Nach wiederholtem Waschen wurden die Präparate mit DAPI/Sulforhodamin 101-Lösung gefärbt (7 min.), erneut gewaschen, luftgetrocknet und mit Kaiser's-Glyceringelatine eingedeckelt. Die Aufbewahrung der Präparate erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

### 3.8.2 Charakterisierung und Quantifizierung apoptotischer Zellkerne

Apoptotische Nuclei können von normalen Zellkernen anhand morphologischer Merkmale unterschieden werden. Als apoptotische Nuclei wurden

- stark kondensierte Zellkerne
- halbmond- bis sichelförmige Zellkerne
- fragmentierte Kerne (tropfenförmiges Chromatin)

gewertet.

Die fluoreszenzmikroskopische Inspektion der Präparate erfolgte als Blindversuch anhand verschlüsselt codierter Objektträger in Doppelbestimmung, wobei pro Objektträger jeweils 3 x 1000 Zellkerne gezählt wurden.

Als quantitatives Maß für die Apoptoseinzidenz galt der prozentuale Anteil apoptotischer Zellkerne unter 1000 ausgezählten Kernen.

### 3.8.3 Statistik

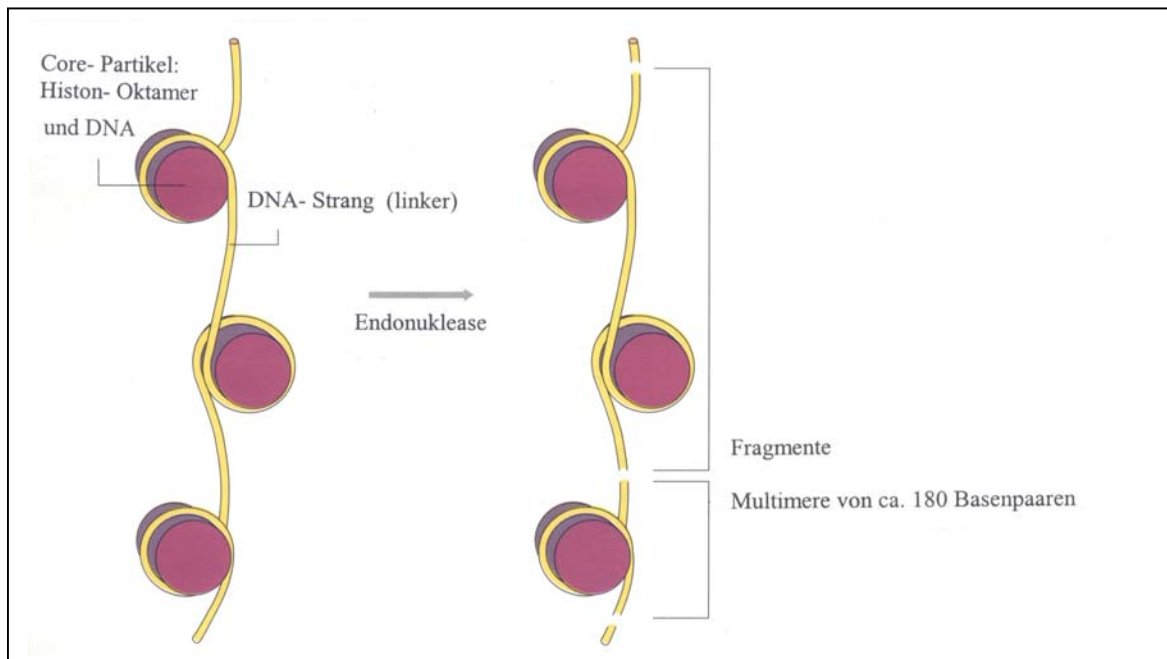
Zur statistischen Auswertung wurde von allen gewonnenen Daten der Mittelwert und die jeweilige Standardabweichung bestimmt. Die Überprüfung der Ergebnisse auf Signifikanz erfolgte mittels des Softwareprogramms „InStat“ (ANOVA und Dunnett's post test). Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $P \leq 0,05$ ) wurde als schwach signifikant, 1% Irrtumswahrscheinlichkeit ( $P \leq 0,01$ ) wurde als signifikant betrachtet.

## 3.9 DNA-Fragmentierungsanalyse

Die internukleosomale DNA-Fragmentierung durch Endonukleaseaktivität ist ein frühes charakteristisches Ereignis der Apoptose (Whilly et al., 1980; Duke et al., 1983).

Das Chromatin der Eukaryontenzelle stellt sich als komplexes Gebilde dar, bestehend aus DNA, welche mit basischen Proteinen, den sogenannten *Histonen*, assoziiert ist. Acht solcher zusammengelagerter Histone bilden ein Oktamer, um das die DNA in  $1\frac{3}{4}$  Windungen herumgewickelt ist. Diese Zusammenschlüsse aus Histon-Oktamer und DNA-Abschnitt, dessen Länge 146 Basenpaaren entspricht, werden als *Core-Partikel* bezeichnet. Diese Einheiten sind über ein Übergangsstück, einem sogenannten

*Linker*, miteinander verbunden. Die Schnittstelle der Endonuklease liegt genau zwischen diesen Core-Partikeln und die daraus resultierenden DNA-Fragmente sind somit Multimere von ca. 180 Basenpaaren, welche nach einer Agarosegel-Elektrophorese als DNA-Leiter („*ladder*“) sichtbar gemacht werden können.



**Abb. 3.8: DNA-Fragmentierung durch Endonukleaseaktivität**

### 3.9.1 Isolierung der DNA

Zur Isolierung der DNA bei Versuchen zur DNA-Fragmentierung wurde in Anlehnung an ein von Wörner (1998) modifiziertes Protokoll nach Maniatis et al. (1989) vorgegangen.

Pro Behandlungspunkt wurden 6 Petrischalen (94 mm) einer bewachsenen und behandelten Hepatozytenkultur zur DNA-Extraktion herangezogen. Die Zellernte erfolgte mit Hilfe eines sterilen Einmal-Zellschabers, wobei die Zellen zusammen mit dem Medium in einem blue-cap-Rundboden-Zentrifugenröhrchen aufgenommen wurden. Nach anschließender Zentrifugation (10 min., 4°C, 5000 g) (Beckman J2-21) wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet getrocknet und ggf. bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Durchführung der Extraktion wurde das Pellet zunächst in 8 ml Extraktionspuffer gelöst. Der Proteinverdau erfolgte nach Zugabe

von je 500 µl Proteinase K-Lösung im Wasserbad bei 37°C über 45 min., der RNA-Verdau fand ebenfalls im Wasserbad bei 37°C über 30 min. nach Zugabe von 500 µl RNase A-Lösung pro Ansatz, statt.

### **Durchführung der Extraktion nach Wörner (1998)**

- Lysat mit Phenol (4°C) 1:1 versetzen, kräftig schütteln, anschließend zentrifugieren (5 min., 4°C, 4000 g)
  - ▶ Überstand in weiteres Zentrifugenröhrchen überführen
- Überstand mit ½ Vol. Phenol (4°C) und ½ Vol. Sevag versetzen, kräftig schütteln, zentrifugieren (5 min., 4°C, 4000 g)
  - ▶ Überstand in weiteres Zentrifugenröhrchen überführen
- Überstand mit Sevag 1:1 versetzen, kräftig schütteln, zentrifugieren (5 min., 4°C, 4000 g)
  - ▶ Überstand in weiteres Zentrifugenröhrchen überführen
- Überstand mit 300 µl 7,5M-Ammoniumacetat-Lösung versetzen, kräftig schütteln
- Ansatz mit 2-fachem Volumen an absolutem Ethanol (-20°C) versetzen
- Präzipitation der DNA über 1-4 Wochen bei -20°C
- Präzipitat abzentrifugieren (20 min., 4°C, 6000 g)
- Pellet in 1,5 ml-Eppendorf-Cup überführen
- DNA nochmals abzentrifugieren (10 min., 4°C, 10000 g)
- Verwerfen des Überstandes, trocknen des Pellets zunächst mit einem Wattestäbchen, dann im Heizblock über 5 min. bei 56°C
- Pellet in TE-Puffer aufnehmen; Volumen richtet sich nach der Größe des Pellets; mit 30 µl TE-Puffer beginnen, dann Volumen ggf. steigern

- Pellet durch vorsichtiges Scheren mit einer Eppendorf-Pipette lösen (niemals vortexen)
- ggf. Lagerung der Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$

Abweichend von vorstehendem Protokoll, wurde bei Experimenten mit der Präzipitationshilfe „see DNA“ (Amersham) wie folgt vorgegangen:

- Zellkultur auf 60 x 15 mm-Petrischalen: 2,5 Mio. Zellen pro Platte
- Pro Behandlungspunkt 4 bewachsene Platten ernten
- Zellpellet in 300  $\mu\text{l}$  Extraktionspuffer (unmittelbar vorher RNase in Endkonzentration  $20 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$  zugeben) aufnehmen und in ein 1,5 ml-Eppendorf-Cup überführen  
—————▶ 1 h,  $37^{\circ}\text{C}$  (Wasserbad)
- Proteinverdau: 2  $\mu\text{l}$  Proteinase K-Lösung zugeben  
—————▶ 3 h,  $50^{\circ}\text{C}$  (Wasserbad)
- 300  $\mu\text{l}$  eiskaltes PCI (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1) zusetzen und schütteln
- Überstand in neues Cup überführen, mit 1,5  $\mu\text{l}$  see-DNA (Amersham), 30  $\mu\text{l}$  3 M-NaAc und 600  $\mu\text{l}$  eiskaltem Ethanol ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) versetzen
- DNA-Präzipitation über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$
- Zentrifugation: 15000 rpm (Beckman Microfuge),  $4^{\circ}\text{C}$ , 15 min.
- Pellet in 70%-Ethanol waschen
- Zentrifugation: 15000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15 min.
- Pellet trocknen und in 8  $\mu\text{l}$  TE aufnehmen

### 3.9.2 Quantifizierung der DNA

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes der Proben erfolgte über die Messung der Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm in einem Kontron Uvikon 930 Spektralphotometer gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  als Referenz. Hierzu wurden 2  $\mu\text{l}$  der in TE gelösten DNA in 398  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  aufgenommen. Der Referenzprobe, welche anstelle der DNA nur  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  enthielt, wurde über die Auto-Zero-Funktion des Gerätes der Extinktionswert 0 zugeteilt. Die Reinheit der DNA konnte über den Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  ermittelt werden. Dieser sollte größer als 1,6 sein.

Die DNA-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c(\text{DNA}) = \frac{E_{260} \times R_f \times 200}{1000} \text{ } [\mu\text{g} \times \mu\text{l}^{-1}]$$

$E_{260}$  = Absorption bei  $\chi = 260$  nm

$R_f = 50$

200/1000 = Verdünnungsfaktoren

### 3.9.3 Agarosegel-Elektrophorese

Die Detektion der DNA-Fragmente sowie deren Auftrennung nach Größe erfolgte über eine Agarose-Gel-Elektrophorese.

Für ein 1%iges Agarosegel wurden 500 mg Agarose in 50 ml 1 x TBE-Puffer aufgenommen und in einem Mikrowellenherd bis zum Sieden erhitzt. Nach kurzzeitigem Abkühlen konnte die Ethidiumbromidlösung (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Abzug!) zugegeben und das flüssige Gel in die Kammer gegossen werden.

Alternativ hierzu wurde ein Ethidiumbromidbad (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) verwendet.

Ethidiumbromid interkaliert zwischen den beiden DNA-Einzelstrangmolekülen und kann unter UV-Durchlicht sichtbar gemacht werden.

Die einzelnen Proben wurden auf jeweils gleichen DNA-Gehalt eingestellt (5  $\mu\text{g}$ , 15  $\mu\text{g}$ , 20  $\mu\text{g}$ ), mit je 5  $\mu\text{l}$  Gel-Loading-Solution vermischt, kurz zentrifugiert und auf das ausgehärtete Gel aufgetragen.

Der Gellauf (Laufpuffer: 1 x TBE) erfolgte zunächst über 1 Stunde bei einer Spannung von 30 V, dann 2-3 Stunden bei 50 V.

Die Detektion der Banden erfolgte an einem Stratagene Eagle-Eye®.

### 3.10 Caspase-3-Assay

Der im Rahmen vorliegender Arbeit zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität in primärkultivierten Hepatozyten durchgeführte Assay beruht auf einem modifizierten Protokoll nach Nicholson et al. (1995).

#### 3.10.1 Gewinnung der Lysate

Pro Behandlungspunkt wurden 5 bewachsene und behandelte Platten zur Gewinnung der Lysate herangezogen.

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml eiskalter NaCl-Lösung gewaschen, anschließend in je 1 ml eiskalter NaCl-Lösung abgeschabt, in ein Eppendorf-Cup überführt und zentrifugiert (5 min., 4°C, 1000 g). Zur Lyse der Zellen wurde das Pellet in jeweils 150 µl Lysis-Puffer resuspendiert und 30 min. auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (15 min., 4°C, 13000 g) wurden die Lysate aliquotiert, wobei jeweils ein Aliquot zur Proteinbestimmung nach Lowry herangezogen wurde. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C.

#### 3.10.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung des Proteingehaltes der einzelnen Ansätze erfolgte nach einer von Lowry et al. (1951) etablierten Methode. Diese beruht auf der Bildung eines blau-violetten Farbkomplexes zwischen  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen und den Peptidbindungen im basischen Milieu (Biuret-Reaktion) sowie der Reduktion des eine Mischung von Phosphorwolframsäure und Phosphomolybdänsäure enthaltenden Folin-Ciocaltaeus-Phenol-Reagenz.

Zur Durchführung wurde wie folgt vorgegangen (pro Ansatz):

- 1000 µl Lowry A
- 95 µl H<sub>2</sub>O bidest.
- 100 µl 1M-NaOH
- 5 µl Lysat (Achtung: Leerwert 5 µl H<sub>2</sub>O bidest.)

Inkubation 10 min. bei Raumtemperatur

- 100 µl Lowry B

Inkubation 30 min. bei Raumtemperatur

Die photometrische Messung der Extinktion des gebildeten Farbkomplexes erfolgte bei 720 nm, wobei dem Leerwert über die Autozerofunktion des Gerätes der Wert 0 zugewiesen wurde.

Die Proteinkonzentration konnte aus den gemessenen Extinktionswerten über eine BSA-Eichkurve berechnet werden.

$$\text{Proteinkonzentration } [\mu\text{g/ml}] = \frac{\Delta E \times 75 \times V_f}{0,1}$$

E = gemessene Extinktion

V<sub>f</sub> = Verdünnungsfaktor

### 3.10.3 Fluorimetrische Bestimmung der Caspase-3-Aktivität

Bei der zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität angewendeten Methode wird sich die Tatsache zunutze gemacht, dass Caspasen ihre Substrate spezifisch nach einem Asparaginsäurerest spalten. Als „Modell“-Substrat wurde Ac-DEVD-AFC eingesetzt, ein mit 7-Amino-4-trifluormethyl-cumarin gekoppeltes Polypeptid mit der Sequenz DEVD (= Asp - Glu - Val - Asp). Bei vorhandener Caspase-3-Aktivität kommt es zur Freisetzung von AFC, was als Fluoreszenz bei den Wellenlängen 390 nm (Exzitation) und 520 nm (Emission) fluorimetrisch detektierbar ist. Da dieses Substrat auch von anderen Caspasen sowie unspezifischen Proteasen gespalten werden kann, wurde zu jedem Messansatz ein sogenannter Blockansatz gefahren, dem zusätzlich Ac-DEVD-



CHO (dem Substrat entsprechender Aldehyd) zugesetzt wurde. Dieser blockiert spezifisch das aktive Zentrum der Caspase-3. Weiterhin erfolgte zu jedem Ansatz die Messung des Blankwertes (Leerwert), welcher nur Lysis-Puffer enthielt. Die Fluoreszenz der Blankansätze wurde jeweils von den gemessenen Fluoreszenzen der ungeblockten und geblockten Ansätze subtrahiert.

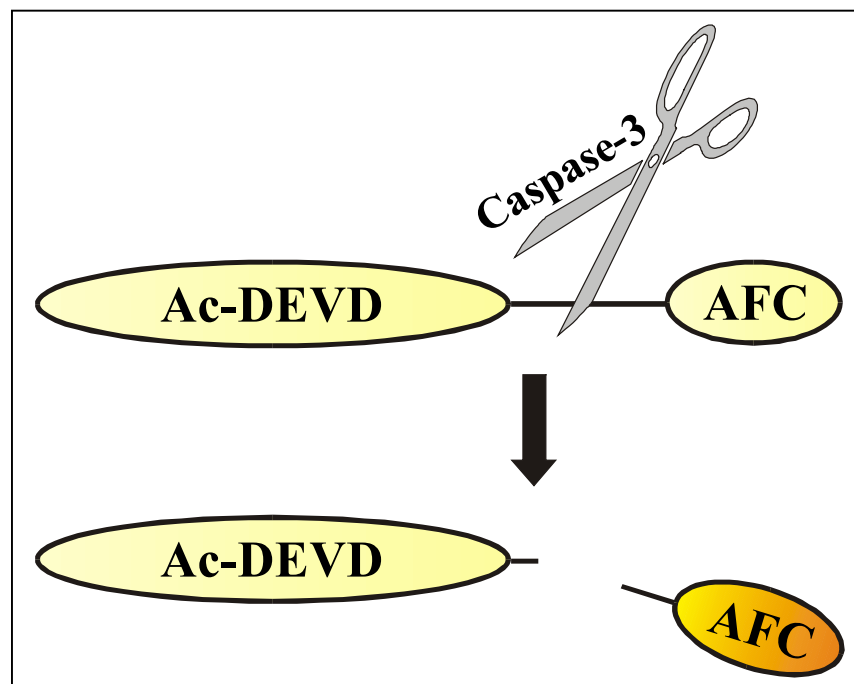


Abb. 3.9: Schematische Darstellung des Messprinzips zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität

Durchführung pro Einzelansatz (pro Well):

- 100  $\mu$ l 2 x Assay-Puffer
- 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest.
- 2  $\mu$ l 1M-DTT
- 2  $\mu$ l DMSO (nur ungeblockte Ansätze)
- 2  $\mu$ l Inhibitorstock-Lösung (nur geblockte Ansätze)
- 50  $\mu$ l Lysat (Bankansatz 50  $\mu$ l Lysis-Puffer)

Inkubation 10 min. bei Raumtemperatur

- 1  $\mu$ l Substratstock-Lösung (zuletzt zugeben; Reaktionsstart)

Die Messung der Fluoreszenz fand in einem Fluoroskan Ascent FL-Plattenlesegerät (Software: Ascent ASC 2.4.2) bei Raumtemperatur alle 5 min. über 12 Messpunkte statt. Die während der Reaktion gebildete Menge an AFC wurde mit Hilfe einer zuvor erstellten AFC-Eichgerade für jede Einzelmessung ermittelt und daraus jeweils die spezifische Aktivität in pmol AFC/min x mg berechnet. Die spezifische Caspase-3-Aktivität für jede Einzelmessung ergab sich aus der Differenz zwischen den Aktivitäten der geblockten und ungeblockten Ansätze. Die Caspase-3-Aktivität für jeden Ansatz wurde als Mittelwert der jeweiligen Einzelmessungen bestimmt.

### 3.11 Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD)-Aktivität

#### 3.11.1 Gewinnung der Lysate

Nach 48-stündiger Inkubation der Hepatozyten wurde das Medium abgenommen und der Zellrasen zweimal mit 1 ml eiskalter 0,9%-NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mittels eines Einmal-Zellschabers in 400 µl Tris-Sucrose-Puffer (100 mM-Tris/250 mM-Sucrose) aus der Schale gekratzt, in ein Eppendorf-Cup überführt und sofort auf Eis gestellt. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Ultraschallsonde (60 W, 15 s).

#### 3.11.2 Fluorimetrische Bestimmung der EROD-Aktivität

Die Aktivität der 7-Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase (EROD) korreliert mit der Induktion von Cytochrom P450 1A. Der nach Burke und Mayer (1974) durchgeführte Test basiert auf der von Cytochrom P450 1A katalysierten oxidativen Dealkylierung von Ethoxyresorufin zu Resorufin.

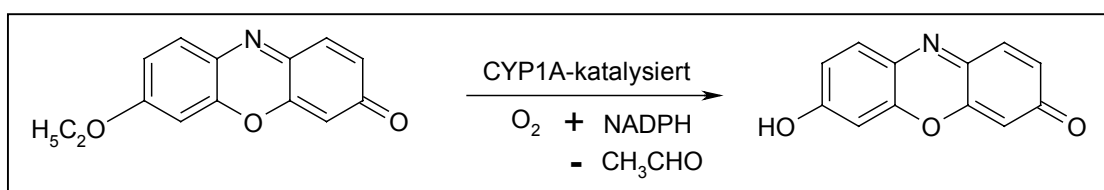


Abb. 3.10: Oxidative Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin zu Resorufin

Zusammensetzung des Inkubationsansatzes (pro Eppendorf-Cup):

50 µl	1 M-Tris-HCL pH 7,4
50 µl	50 mM - MgCl <sub>2</sub>
50 µl	5 mM - NADP
50 µl	50 mM - Isocitrat-Na
50 µl	0,6 mM - EDTA
10 µl	Isocitratdehydrogenase (1 mg/ml)
280 µl	verdünntes Lysat (ca. 50 µg Protein/Ansatz)

Durchführung:

2 min. Vorinkubation im Wasserbad (37°C)

Reaktionsstart durch Zugabe von je 10 µl Ethoxyresorufin (75 mM in DMSO)

10 min. Inkubation im Wasserbad (37°C)

Reaktionsstop durch Zugabe von 1 ml Methanol

Zentrifugation 14000 rpm über 5 min. (Sigma Zentrifuge)

Die Proben sind im Dunkeln ca. 1 Stunde haltbar.

Die Messungen wurden bei folgenden Fluorimeter-Parametern vorgenommen:

Exzitationswellenlänge	550 nm
Emissionswellenlänge	585 nm
Spaltgröße	5 (rechts und links)
Fix Scale	10,0
Response	3

Dem Wasser anstelle von Lysat enthaltenden Leerwert wurde über die Auto-Zero-Funktion am Gerät der Wert 0 zugeteilt. Die während des Reaktionsablaufes gebildete Menge an Resorufin konnte anhand einer vorher erstellten Resorufin-Eichgerade ermittelt und die spezifische EROD-Aktivität in pmol Resorufin/min x mg berechnet werden.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Fluoreszenzmikroskopische Detektion apoptotischer Zellkerne

Zur fluoreszenzmikroskopischen Detektion und Quantifizierung apoptotischer Nuclei wurden die auf Objektträgern im Kollagengel-Sandwich kultivierten und nunmehr fixierten Primärhepatozyten simultan mit den Fluoreszenzfarbstoffen DAPI (4'6-Diamidino-2-phenylindol) und Sulforhodamin 101 gefärbt. Diese Methode erlaubte eine gleichzeitige Darstellung von Cytoplasma und Zellkernchromatin.

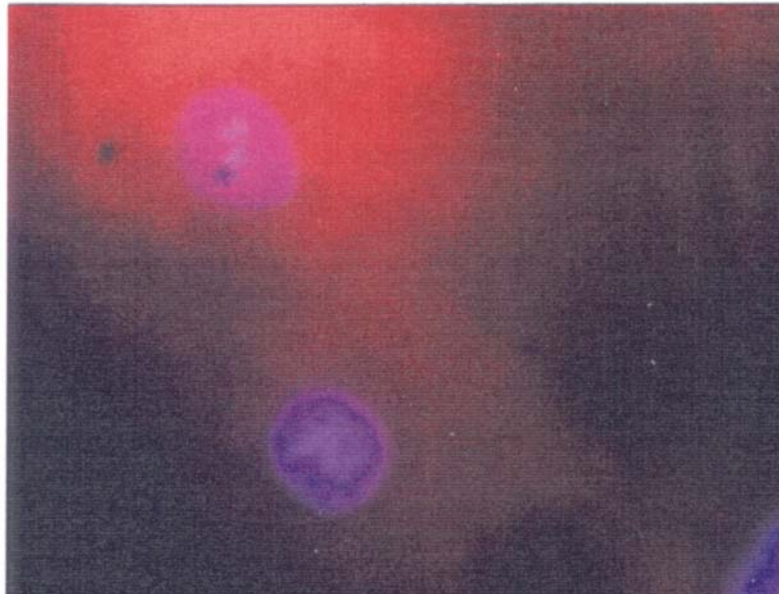
DAPI (Emissionsoptimum bei  $\lambda = 485$  nm) bindet bevorzugt an A/T-reiche DNA und verleiht somit dem Kernchromatin eine blaue Fluoreszenz.

Sulforhodamin 101 (Emissionsoptimum bei  $\lambda = 620$  nm) diente aufgrund seiner Affinität zu Proteinen der Darstellung des Zytoplasmas, welches dann durch rote Fluoreszenz sichtbar wurde.

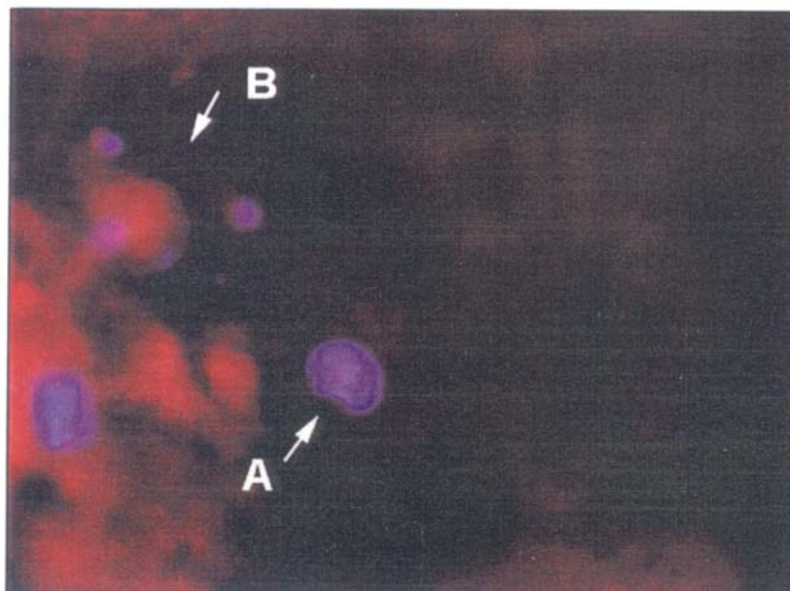
Bei der fluoreszenzmikroskopischen Inspektion der Präparate wurden folgende Apoptosetypen erfasst:

- Deutlich in ihrer Gesamtheit geschrumpfte Zellen, die an der Stelle des Zellkernes tropfenförmige Chromatinfragmente enthielten
- Zellen mit stark kondensiertem Zellkern
- Zellen mit halbmondförmigem Chromatin

Als quantitatives Maß zur Bestimmung der Apoptoseinzidenz diente der prozentuale Anteil apoptotischer Nuclei unter jeweils 1000 ausgezählten Zellkernen.



**Abb. 4.1:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von primär-kultivierten Rattenhepatozyten in Kollagengel-Sandwich-Kulturen. Die Zellkerne (blau) wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI, das Zytoplasma mit Sulforhodamin 101 (rot) angefärbt.



**Abb. 4.2:** Apoptotische Rattenhepatozyten in Primärkultur 12 ½ Stunden nach der UV-Behandlung mit einer Dosis von 90 J/m<sup>2</sup>. Dargestellt sind zwei verschiedene Morphologie-Typen der Apoptose: halbmondförmig kondensiertes Chromatin (A) und fragmentiertes, tropfenförmiges Chromatin (B).

## 4.2 Einfluss von Phenobarbital, PCB 28, 138 und 183 auf die Apoptose

Die Untersuchungen zum Einfluss der „nicht-dioxinartigen“ PCBs 28, 138 und 183 sowie der Referenzsubstanz Phenobarbital auf die Apoptose in primären Hepatozyten männlicher Wistar-Ratten in Kollagengel-Sandwichkultur fanden in Anlehnung an ein von Wörner (1998) etabliertes *in vitro*-Modell zur Apoptosehemmung statt.

Bei allen durchgeführten Versuchen wurde jeweils die Hälfte der präparierten Objektträger zur Induktion von Apoptose nach gentoxischer Läsion mit einer UV-Strahlungsdosis von  $90 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$  behandelt.

Die Bestrahlung erfolgte 90 min. vor Beginn der 12-stündigen Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Testsubstanzen in ausgewählten Konzentrationen.

Zur Evaluierung möglicher Einflüsse der PCBs und Phenobarbital auf die basale Apoptose wurden analoge Experimente ohne vorherigere UV-Bestrahlung durchgeführt.

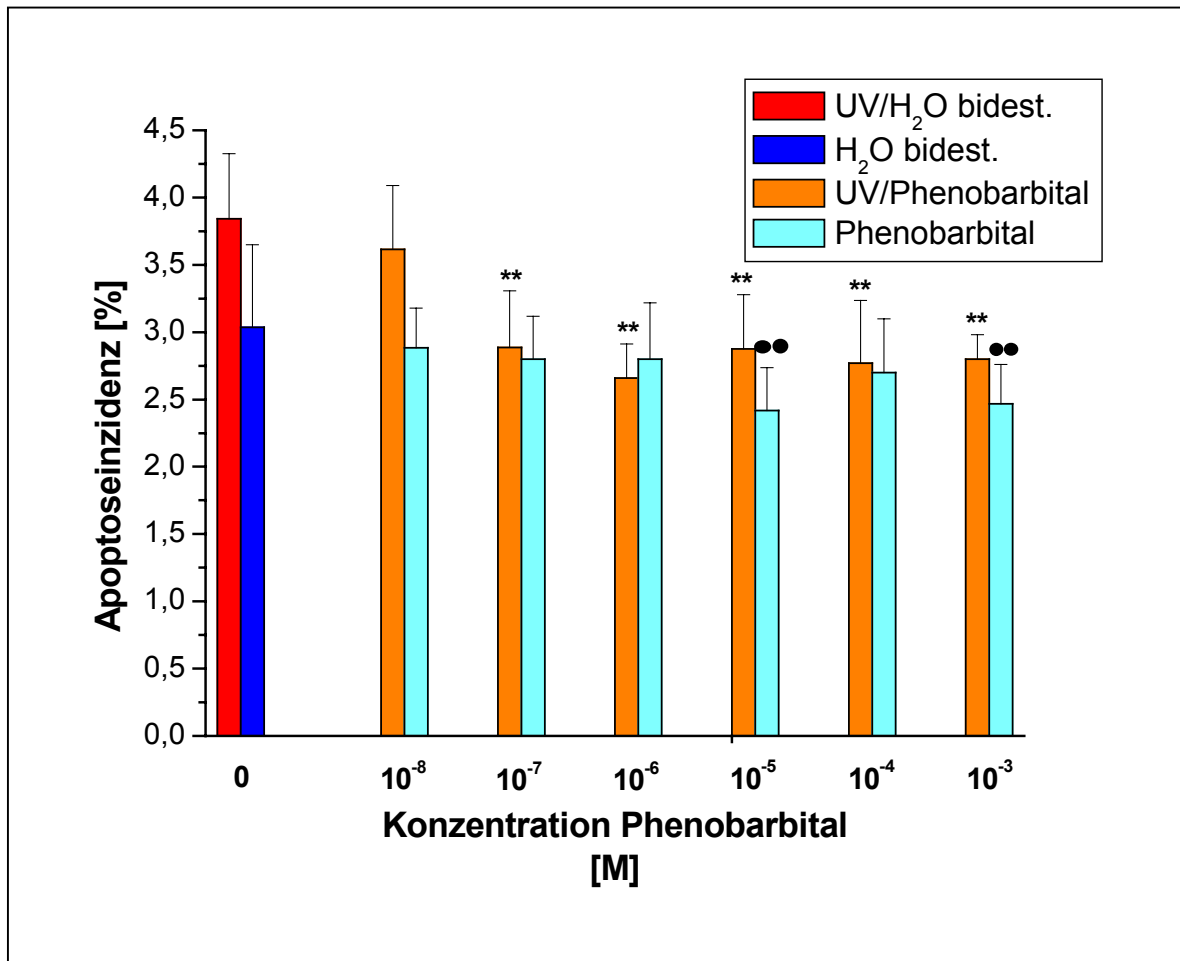
### 4.2.1 Einfluss von Phenobarbital auf die Apoptose

Alle Versuchsreihen wurden in je drei voneinander unabhängigen Experimenten (3 Tiere) mit jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt.

Die  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ -Kontrolle repräsentiert stets den Mittelwert aus sämtlichen Kontrollansätzen aller identisch durchgeführter Versuche.

Die UV-induzierten Ansätze zeigten in den Kontrollen eine mittlere Apoptoseinzidenz von ca. 3,8%, in den unbestrahlten Proben hingegen wurde eine durchschnittliche Apoptosehäufigkeit von ca. 3,0% beobachtet.

In nachfolgender Abbildung sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der ermittelten Apoptoseinzidenzen sowie die Ergebnisse des Signifikanztests (Dunnett-Test – \* bzw. •: schwach signifikant, \*\* bzw. ••: signifikant) graphisch dargestellt.



**Abb. 4.3:** Einfluss von Phenobarbital auf die Apoptose in primären Wistar-Rattenhepatozyten in Abhängigkeit von der Konzentration (0 (Kontrolle)  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  M). Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus den Auszählungsergebnissen von 3 unabhängigen Experimenten berechnet. Die mit Sternen (UV-bestrahlte Ansätze) und Punkten versehenen Werte (unbestrahlte Ansätze) unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle.

Wie aus der vorstehenden Darstellung deutlich erkennbar, ist die durch UV-Licht induzierte Apoptose in primären Rattenhepatozyten durch Phenobarbital hemmbar.

Signifikante Hemmeffekte zeigten sich ab einer Phenobarbital-Konzentration von  $10^{-7}$  M. Die maximale Hemmung wurde bei  $c = 10^{-6}$  M erzielt, die Apoptoseinzidenz war hierbei um 30,7% gegenüber der bestrahlten H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>-Kontrolle verringert.

Für alle aufsteigenden Konzentrationen ab  $10^{-7}$  M konnte sogar eine Verringerung der Apoptosehäufigkeit bis unterhalb des Niveaus der basalen Apoptose (unbestrahlte H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>-Kontrolle) beobachtet werden.

Die basale („spontane“) Apoptose wurde durch Phenobarbital insgesamt weniger stark beeinflusst. Signifikante Effekte zeigten sich zwar auch hier, jedoch erst ab einer Konzentration von  $10^{-5}$  M. Diese Hemmeffekte waren allerdings, verglichen mit den UV-behandelten Ansätzen, deutlich geringer ausgeprägt und ließen keine Konzentrationsabhängigkeit erkennen.

Zum besseren Verständnis sind in nachstehender Tabelle die Daten zum Einfluss von Phenobarbital auf die Apoptose aufgeführt. Angegeben sind jeweils die berechneten Mittelwerte der Apoptoseinzidenz für die einzelnen Konzentrationen sowie der Signifikanzgrad.

**Tab. 4.1:**  
Einfluss von Phenobarbital auf die Apoptose in Abhängigkeit von der Konzentration

Konz. (PB) [M]	Apoptoseinzidenz [%]	
	UV-induziert	basal
0 (Kontrolle)	3,84	3,04
$10^{-8}$	3,61	2,88
$10^{-7}$	2,89**	2,80
$10^{-6}$	2,66**	2,80
$10^{-5}$	2,88**	2,42••
$10^{-4}$	2,77**	2,70
$10^{-3}$	2,80**	2,47••

#### 4.2.2 Einfluss von PCB 28, 138 und 183 auf die Apoptose

Alle Versuchreihen wurden in je drei voneinander unabhängigen Experimenten (3 Tiere) mit jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt.

Die DMSO-Kontrolle repräsentiert stets den Mittelwert aus sämtlichen Kontrollansätzen aller identisch durchgeführten Versuche.

Die UV-induzierten Ansätze zeigten in den DMSO-Kontrollen eine mittlere Apoptoseinzidenz von ca. 3,6%, in den unbestrahlten Proben hingegen wurde eine durchschnittliche Apoptosehäufigkeit von 2,9% beobachtet.



### 4.2.2.1 Einfluss von PCB 28 auf die Apoptose

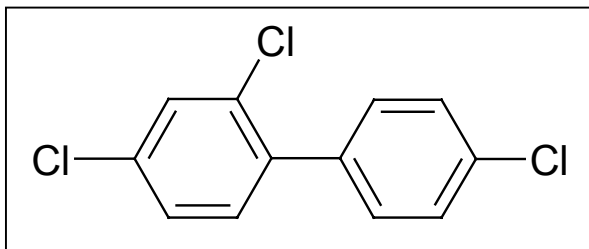


Abb. 4.4: Strukturformel von PCB 28 (2,4,4'-Trichlorbiphenyl)

In Abbildung 4.5 sind die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss von PCB 28 auf die Apoptose dargestellt.

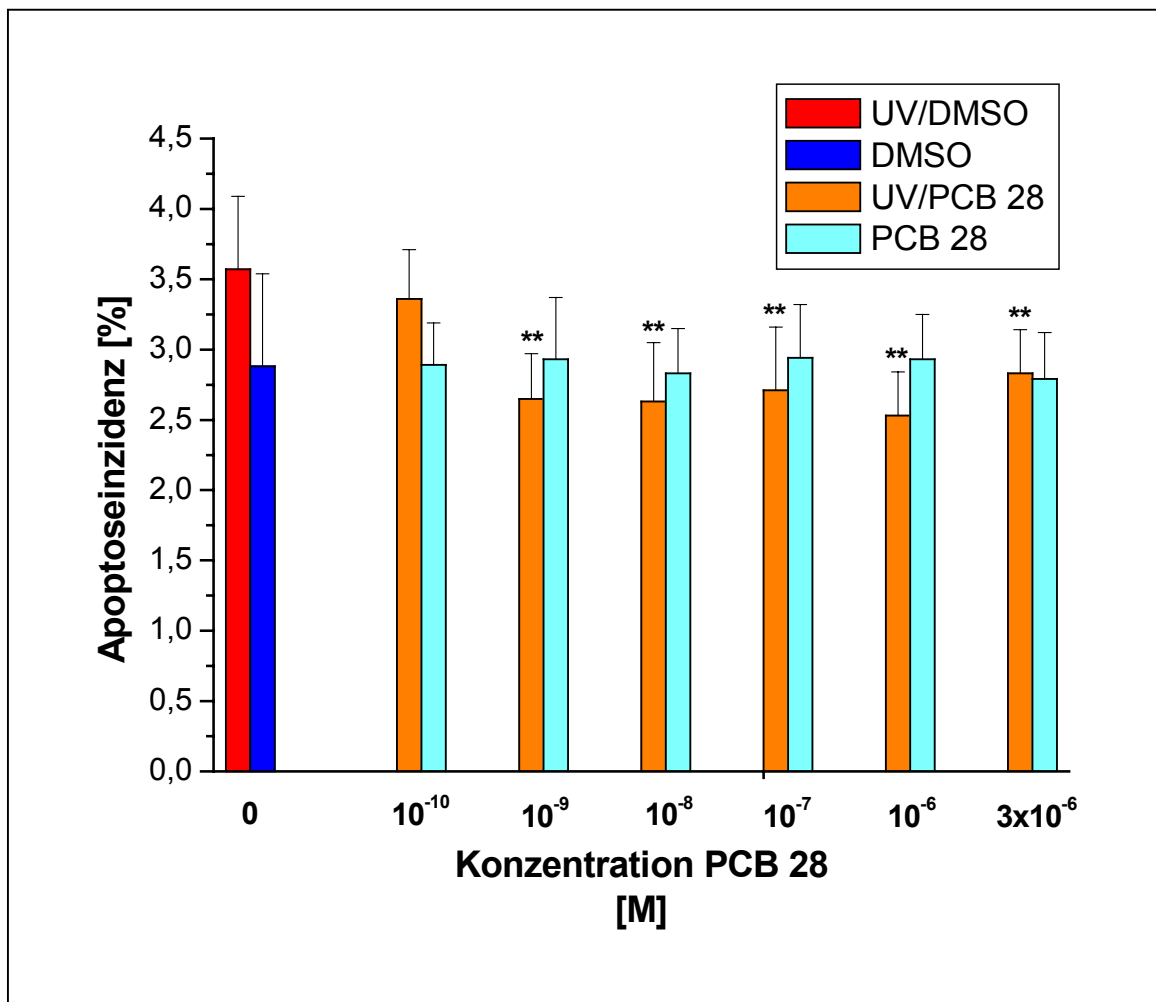


Abb. 4.5: Einfluss von PCB 28 auf die Apoptose in primären Wistar-Rattenhepatozyten in Abhängigkeit von der Konzentration (0 (Kontrolle),  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$  M). Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus den Auszählungsergebnissen von 3 unabhängigen Experimenten berechnet. Die mit Sternen versehenen Werte (UV-bestrahlte Ansätze) unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle.

Bei allen mit UV-Licht bestrahlten Ansätzen traten innerhalb der aufsteigenden Konzentrationsreihe ab  $c = 10^{-9}$  M signifikante Hemmeffekte auf. Der Maximaleffekt zeigte sich bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  M, was einer Verringerung der Apoptoseinzidenz von 29,1% gegenüber der bestrahlten DMSO-Kontrolle entspricht. Ab  $c = 10^{-9}$  M konnte für alle weiteren Konzentrationen ein Zurückdrängen der Apoptosehäufigkeit bis unterhalb des Niveaus der basalen Apoptose (unbestrahlte DMSO-Kontrolle) beobachtet werden.

Für die basale Apoptose waren keine signifikanten Effekte nach Behandlung mit PCB 28 erkennbar.

In nachstehender Tabelle sind noch einmal die Ergebnisse detailliert zusammengefasst dargestellt. Aufgeführt sind die Mittelwerte der Apoptoseinzidenzen für die einzelnen Konzentrationen sowie der Signifikanzgrad.

**Tab. 4.2:**  
Einfluss von PCB 28 auf die Apoptose in Abhängigkeit von der Konzentration

Konz. (PCB 28) [M]	Apoptoseinzidenz [%]	
	UV-induziert	basal
0 (Kontrolle)	3,57	2,90
$10^{-10}$	3,36	2,89
$10^{-9}$	2,65**	2,93
$10^{-8}$	2,63**	2,83
$10^{-7}$	2,70**	2,94
$10^{-6}$	2,53**	2,93
$3 \times 10^{-6}$	2,83**	2,79

### 4.2.2.2 Einfluss von PCB 138 auf die Apoptose

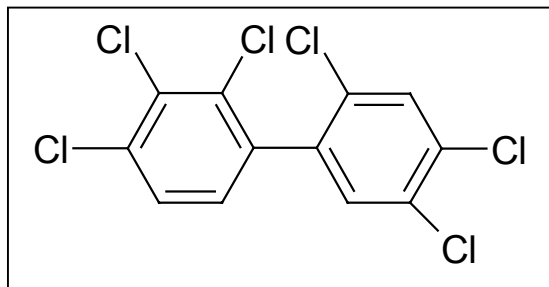


Abb. 4.6: Strukturformel von PCB 138 (2,2',3,4,4',5'-Hexachlorbiphenyl)

Das folgende Diagramm zeigt die für die Experimente mit PCB 138 gewonnenen Resultate auf.

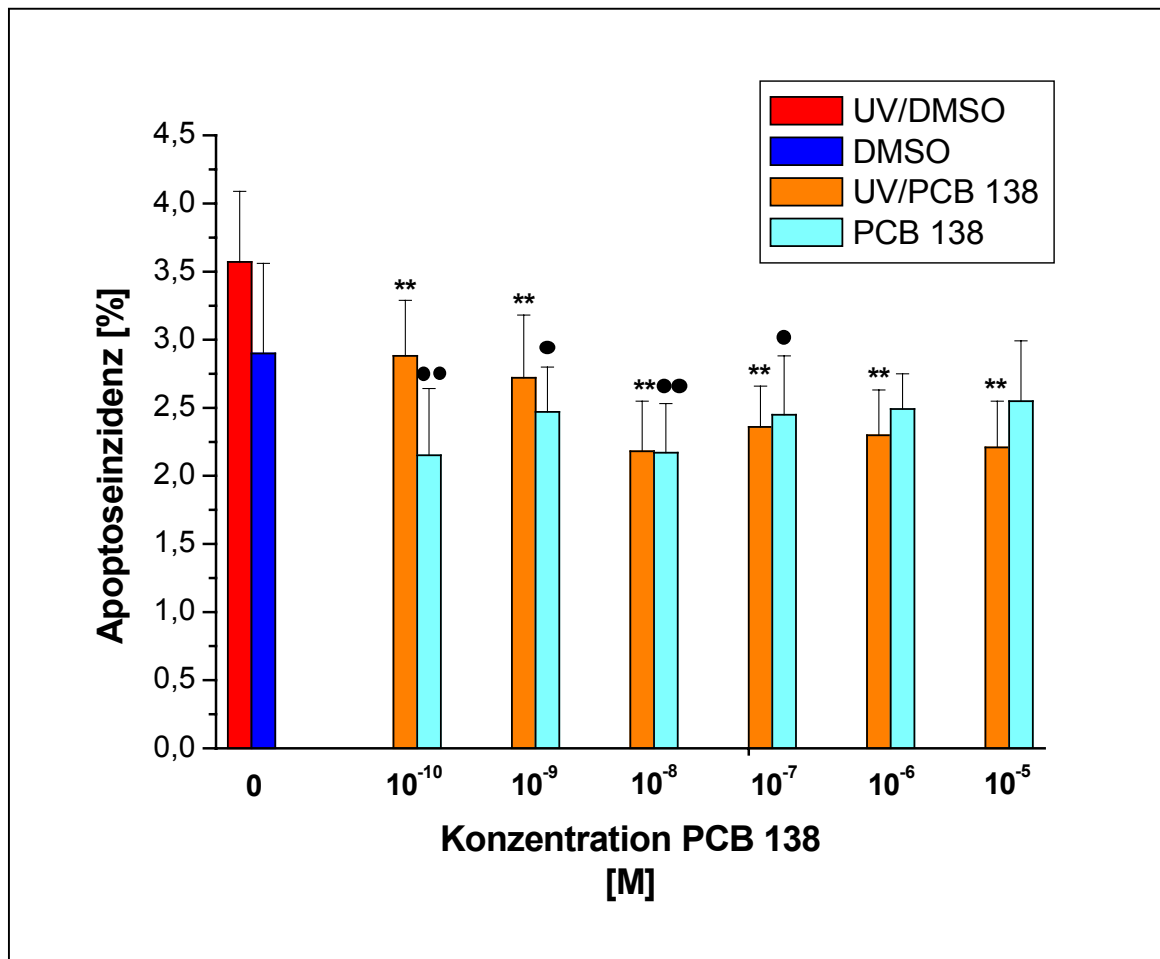


Abb. 4.7: Einfluss von PCB 138 auf die Apoptose in primären Wistar-Ratt hepatozyten in Abhängigkeit von der Konzentration (0 (Kontrolle), 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> M). Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus den Auszählungsergebnissen von 3 unabhängigen Experimenten berechnet. Die mit Sternen (UV-behandelte Ansätze) oder Punkten (unbestrahlte Ansätze) versehenen Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle.

Wie aus obiger Abbildung ersichtlich, konnten für alle verwendeten Konzentrationen (ab  $10^{-10}$  M) signifikante Hemmeffekte nachgewiesen werden. Ab  $c = 10^{-9}$  M zeigte sich für alle weiteren aufsteigenden Konzentrationen ein Zurückdrängen der Apoptose bis unter das Niveau der basalen Apoptose (unbestrahlte DMSO-Kontrolle). Die stärkste Hemmung der Apoptose gegenüber der UV-bestrahlten DMSO-Kontrolle (38,7%) wurde bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  M erreicht.

Die Ergebnisse für die unbestrahlten Ansätze zeigen, dass die basale Apoptose insgesamt schwächer beeinflusst wurde. Signifikante Effekte traten zwar auch hier auf, ließen aber keine Tendenz zur Konzentrationsabhängigkeit erkennen.

Die nachfolgende Tabelle listet die Mittelwerte für die einzelnen Konzentrationen sowie die Ergebnisse des Signifikanztests noch einmal auf.

**Tab. 4.3:**  
Einfluss von PCB 138 auf die Apoptose in Abhängigkeit von der Konzentration

	Apoptoseinzidenz [%]	
	UV-induziert	basal
0 (Kontrolle)	3,57	2,90
$10^{-10}$	2,88**	2,15••
$10^{-9}$	2,72**	2,47•
$10^{-8}$	2,19**	2,17••
$10^{-7}$	2,36**	2,45•
$10^{-6}$	2,31**	2,49
$10^{-5}$	2,21**	2,55

### 4.2.2.3 Einfluss von PCB 183 auf die Apoptose

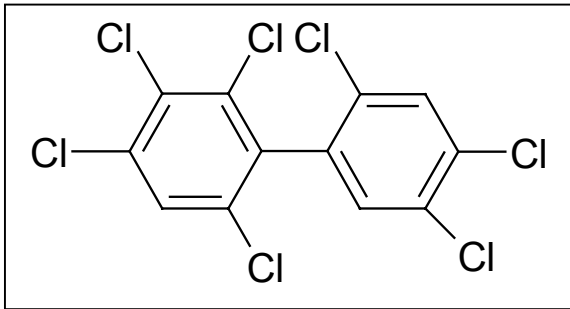


Abb. 4.8: Strukturformel von PCB 183 (2,2',3,4,4',5',6-Heptachlorbiphenyl)

Die Ergebnisse der Experimente zum Einfluss von PCB 183 auf die Apoptose sind in Abb. 4.9 graphisch aufgeführt.

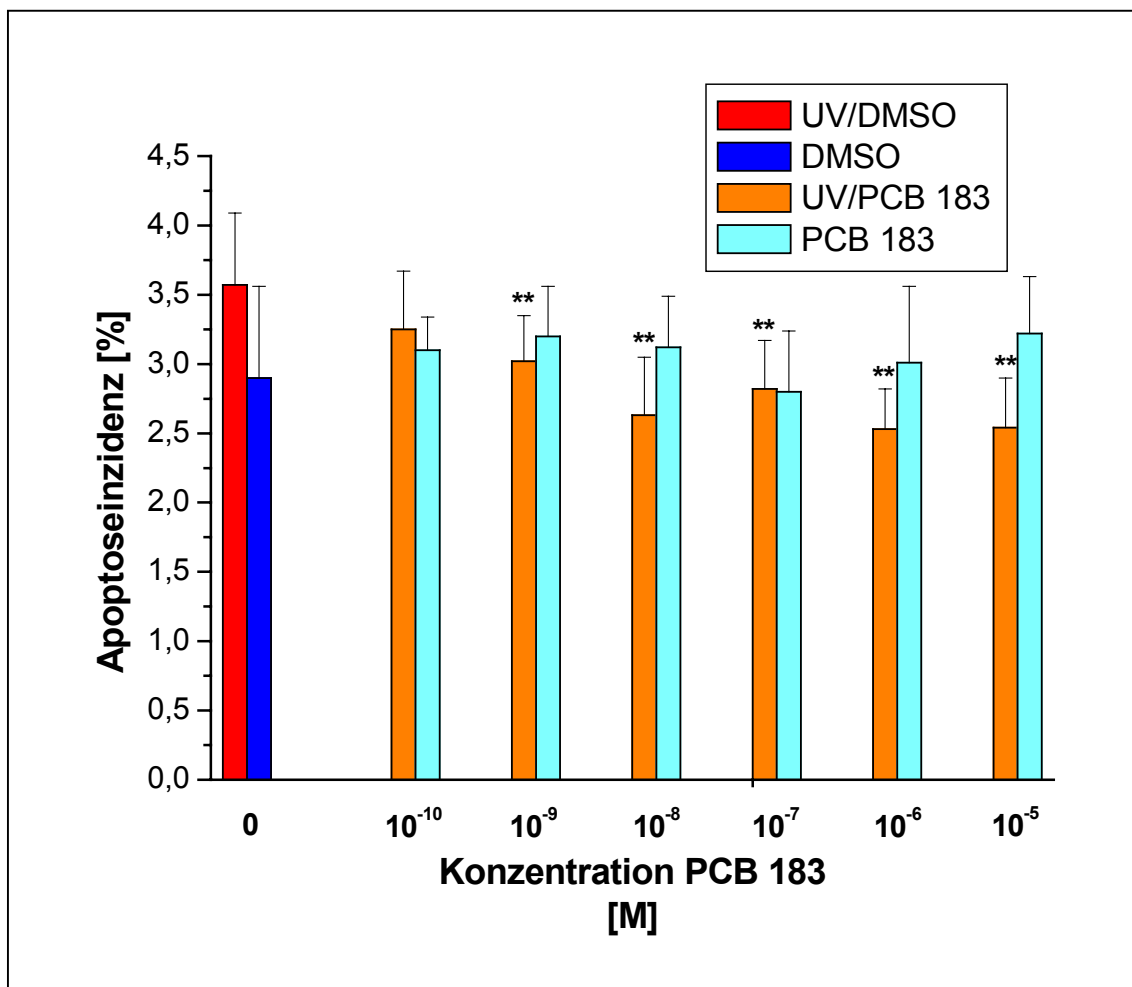


Abb. 4.9: Einfluss von PCB 183 auf die Apoptose in primären Wistar-Rattenhepatozyten in Abhängigkeit von der Konzentration (0 (Kontrolle),  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M). Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus den Auszählungsergebnissen von 3 unabhängigen Experimenten berechnet. Die mit Sternen (UV-bestrahlte Ansätze) versehenen Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle.

Ab  $c = 10^{-9}$  M wurde bei allen weiter aufsteigenden Konzentrationen eine signifikante Hemmung der Apoptose durch PCB 183 in UV-bestrahlten Hepatozyten beobachtet, wobei die stärkste Hemmung bei  $c = 10^{-6}$  M (29,1% Verringerung gegenüber der bestrahlten DMSO-Kontrolle) erreicht wurde. Ab einer Konzentration von  $10^{-8}$  M lagen die Apoptoseinzidenzen unterhalb der basalen Apoptose (unbestrahlte DMSO-Kontrolle).

In den unbestrahlten Ansätzen konnten keine signifikanten Effekte festgestellt werden.

Die folgende Tabelle stellt noch einmal die für PCB 183 erzielten Ergebnisse zusammen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte der Apoptoseinzidenzen für die einzelnen Konzentrationen sowie die ermittelten Signifikanzen.

**Tab. 4.4:**  
Einfluss von PCB 183 auf die Apoptose in Abhängigkeit von der Konzentration.

	Apoptoseinzidenz [%]	
	UV-induziert	basal
0 (Kontrolle)	3,57	2,90
$10^{-10}$	3,25	3,10
$10^{-9}$	3,02**	3,20
$10^{-8}$	2,63**	3,12
$10^{-7}$	2,82**	2,80
$10^{-6}$	2,53**	3,01
$10^{-5}$	2,54**	3,22

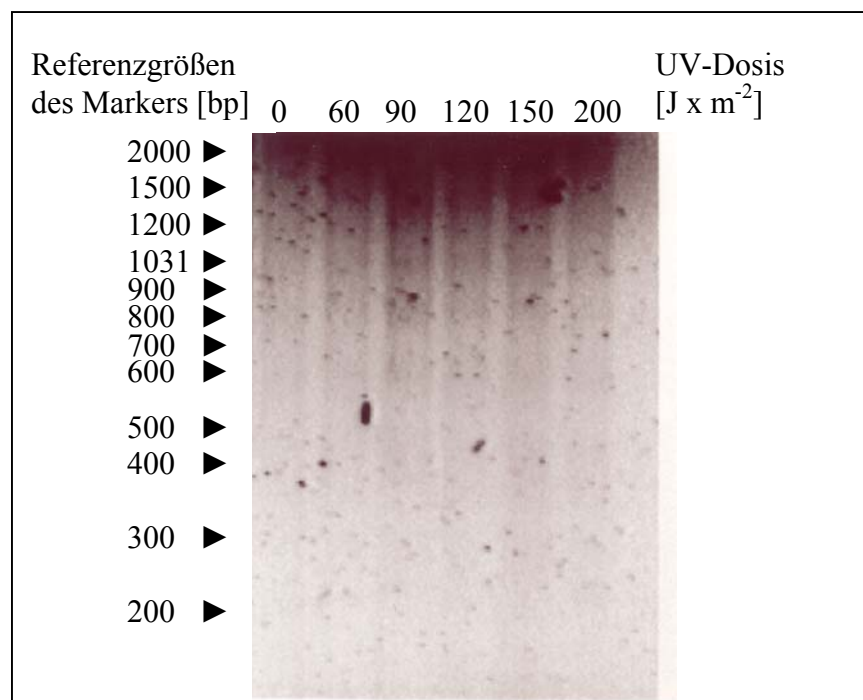
### 4.3 DNA-Fragmentierungsanalyse

Zur Etablierung eines weiteren Verfahrens zum Studium des Einflusses polychlorierter Biphenyle auf die Apoptose in primären Rattenhepatozyten sollte eine DNA-Fragmentierungsanalyse durchgeführt werden.

Die internukleosomale DNA-Fragmentation stellt ein Ereignis relativ später Apoptosestadien dar und ist mittels Agarose-Gel-Elektrophorese als charakteristisches Bandenmuster (DNA-„ladder“) darstellbar.

Hierzu wurde in Anlehnung an ein Protokoll von Wörner (1998) vorgegangen.

Zunächst wurde entsprechend aller bisherigen Experimente versucht, die Apoptose durch UV-Strahlung zu induzieren. Eine Versuchsreihe mit verschiedenen Strahlungsdosen (0 (Kontrolle), 60, 90, 120, 150, 200 J x m<sup>-2</sup>) sollte Auskunft darüber erteilen, bei welcher Dosis im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollansätzen die maximale DNA-Fragmentierung erzielt werden kann.



**Abb. 4.10:** Einfluss von UV-Strahlung auf die DNA-Fragmentierung in primären Rattenhepatozyten nach 12-stündiger Inkubationszeit. Aufgetragen wurden jeweils 5 µg DNA. Die Abbildung ist repräsentativ für mehrere durchgeführte Experimente.

Wie aus obiger Abbildung erkennbar, konnten keine eindeutigen dosisabhängigen Einflüsse der UV-Strahlung auf die DNA-Fragmentierung festgestellt werden, zudem zeigte sich eine schlechte Detektierbarkeit des Bandenmusters, welches möglicherweise von einem nekrotischen „Schmier“ überdeckt wurde. Ferner waren diese Ergebnisse nur schwer reproduzierbar.

Zur Lösung dieser Probleme wurden mehrere unabhängige Experimente unter variierten Bedingungen durchgeführt.

Um zellschädigende Einflüsse der UV-Strahlung zu minimieren, wurden analoge Versuchsreihen durchgeführt, wobei das Medium vor der UV-Bestrahlung nicht oder nur teilweise entfernt wurde, was weder zu einer Schärfung der Banden, noch zu einer Verbesserung der Reproduzierbarkeit beigetragen hat.

Um eine unvollständige Ausfällung der zum Teil sehr kleinen DNA-Bruchstücke im Rahmen der DNA-Präparation auszuschließen, wurde die Präzipitationshilfe „seeDNA“ (Amersham) eingesetzt. Dieses auf dem Prinzip der Kopräzipitation basierende Verfahren sollte eine effiziente Ausfällung der Fragmente über Nacht gewährleisten. Letzteres wurde zwar erreicht, jedoch brachte diese Methode insgesamt keine Verbesserung.

Weiterhin wurde versucht, die Detektierbarkeit der Banden über eine Variation der auf das Gel aufgetragene DNA-Menge (5, 10, 15, 20 µg) zu verbessern, was aber nicht zum Erfolg führte.

Ferner sollte die Verwendung eines Ethidiumbromid-Bades als modifizierte Färbetechnik eine bessere Erkennbarkeit der Banden ermöglichen, was ebenfalls nicht zu aussagefähigen Ergebnissen führte.



## 4.4 Caspase-3-Assay

Als weitere Methode zum Nachweis von Apoptose sollte ein Caspase-3-Assay etabliert werden.

Die Aktivitätssteigerung der Caspase-3 ist ein charakteristisches biochemisches Ereignis innerhalb der Signaltransduktion der Apoptose. Der Nachweis einer erhöhten Caspase-3-Aktivität kann somit als Marker für apoptotische Zellen herangezogen werden.

Im Rahmen vorliegender Arbeit sollte der Einfluss von Phenobarbital auf die zuvor induzierte Caspase-3-Aktivität in primären Rattenhepatozyten in Anlehnung an ein Protokoll von Nicholson et al. (1995) untersucht werden.

### 4.4.1 Einfluss von UV-Strahlung auf die Caspase-3-Aktivität

Zunächst wurde entsprechend den Experimenten zur Apoptosehemmung (Kap. 4.2) versucht, die Caspase-3-Aktivität in Primärhepatozyten durch UV-Strahlung dosis- und zeitabhängig zu induzieren.

Bei Verwendung der UV-Strahlungsdosen (0 (Kontrolle), 30, 60, 90, 120 J x m<sup>-2</sup>) zeigte sich nach mehreren Versuchsreihen mit variierten Inkubationszeiten (3, 6, 9, 12 Stunden) in allen Ansätzen keine detektierbare Caspase-3-Aktivität.

### 4.4.2 Einfluss von Glycochenodeoxycholsäure auf die Caspase-3-Aktivität

Um zellschädigende Effekte der UV-Strahlung auszuschließen, wurde an deren Stelle die hydrophobe Gallensäure Glycochenodeoxycholsäure (GCDC) als induzierendes Agens eingesetzt.

Hierzu wurde zunächst eine Konzentrations- und Zeitverlaufsreihe mit den Konzentrationen  $c(\text{GCDC}) = 50 \mu\text{M}$ ,  $100 \mu\text{M}$  durchgeführt. Die Inkubationszeiten betragen 1, 2 und 4 Stunden.

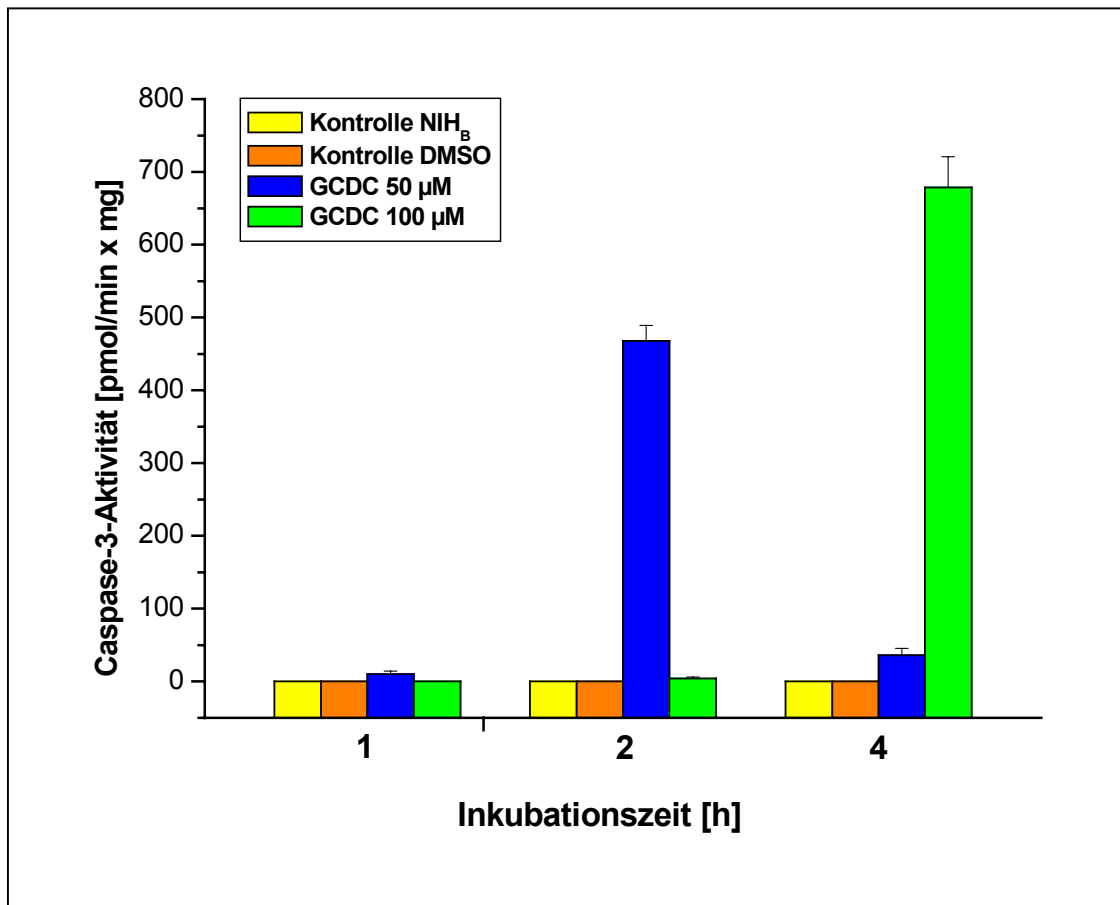


Abb. 4.11: Einfluss von GCDC auf die Caspase-3-Aktivität in Abhängigkeit von der Konzentration (50 µM, 100 µM) und der Inkubationszeit (1, 2, 4 Stunden). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von einem Experiment.

Wie aus obiger Abbildung ersichtlich, zeigte sich in diesem Experiment eine maximale Induktion der Caspase-3-Aktivität nach Behandlung der Zellen mit 100 µM-GCDC nach 4 Stunden. In den Kontrollansätzen (NIH<sub>B</sub> bzw. NIH<sub>B</sub>+DMSO) konnte keine messbare Caspase-3-Aktivität festgestellt werden.

### 4.4.3 Einfluss von Phenobarbital auf die Caspase-3-Aktivität

Zur Untersuchung des Einflusses von 2mM-Phenobarbital auf die Caspase-3-Aktivität nach Behandlung der Zellen mit GCDC wurden Versuchsreihen mit 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ -GCDC durchgeführt.

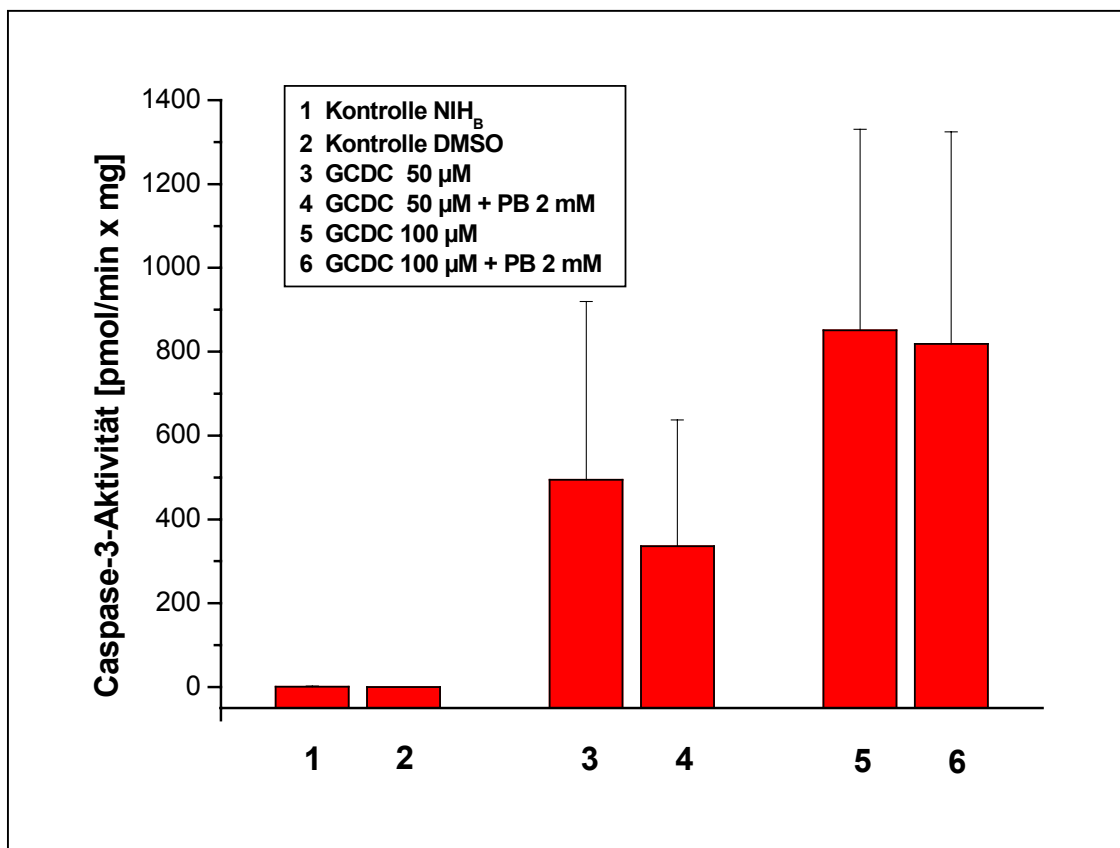


Abb. 4.12: Einfluss von Phenobarbital (2 mM) auf die durch GCDC (50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) induzierte Caspase-3-Aktivität nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Experimenten.

Wie aus obiger Abbildung ersichtlich, zeigten sich keine signifikanten Einflüsse von 2mM-Phenobarbital auf die durch GCDC induzierte Caspase-3-Aktivität. In den unbehandelten Kontrollansätzen (NIH<sub>B</sub> bzw. NIH<sub>B</sub>+DMSO) war keine Aktivität der Caspase-3 detektierbar. Die Ergebnisse zeigen zwar, dass die Caspase-3 durch die

Gallensäure GCDC prinzipiell induzierbar ist, aber die Experimente wiesen eine äußerst schwache Reproduzierbarkeit in Bezug auf eine messbare Induzierbarkeit der Caspase-3 auf. Weiterhin konnten auch wegen der extremen Schwankungsbreite keine Aussagen aufgrund der erzielten Ergebnisse getroffen werden.

Um den Versuchsansatz auf systematische Fehler hin zu überprüfen, wurden mehrere unabhängige Experimente mit modifizierten Versuchsparametern durchgeführt. Mit diesen Modifikationen sollte das Ziel verfolgt werden, eine sicher reproduzierbare Induktion der Caspase-3-Aktivität zu erreichen, die eine konkrete Aussage bezüglich einer etwaigen Beeinflussung z.B. durch Phenobarbital erlauben sollte. Hierzu fanden jeweils mehrere Versuche mit verschiedenen Substanzen zur Induktion der Caspase-3-Aktivität statt:

#### N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG)

- ▶ eingesetzte Konzentrationen: 0,1, 1, 10  $\mu\text{M}$
- ▶ Inkubationszeiten: 1, 2, 3 Stunden

#### Cisplatin

- ▶ eingesetzte Konzentration: 100  $\mu\text{M}$
- ▶ Inkubationszeit: 7 Stunden

#### Staurosporin

- ▶ eingesetzte Konzentrationen: 1, 10  $\mu\text{M}$
- ▶ Inkubationszeiten: 1, 2 Stunden

Die Versuchsreihen mit MNNG und Cisplatin wurden zum Teil in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Brüne, Fachbereich Biologie, Universität Kaiserslautern, durchgeführt. Die Messung der Caspase-3-Aktivität erfolgte hierbei analog zu der unter Kap. 3.10 beschriebenen Methode, jedoch wurde als fluorogenes Caspase-3-Substrat an Stelle von Ac-DEVD-AFC Ac-DEVD-AMC (AMC: 7-Amino-4-methyl-cumarin) verwendet. Bei keiner der durchgeführten Versuchsreihen war eine messbare Caspase-3-Aktivität nachweisbar.

## 4.5 Einfluss von TCDD auf die Apoptose in Rattenhepatozyten

Die Untersuchungen zum Einfluss von TCDD auf die Apoptose in primären Hepatozyten männlicher Han/Wistar- und Long-Evans-Ratten wurden analog zu den in Kap. 4.2 vorgestellten Studien zur Apoptosehemmung durchgeführt.

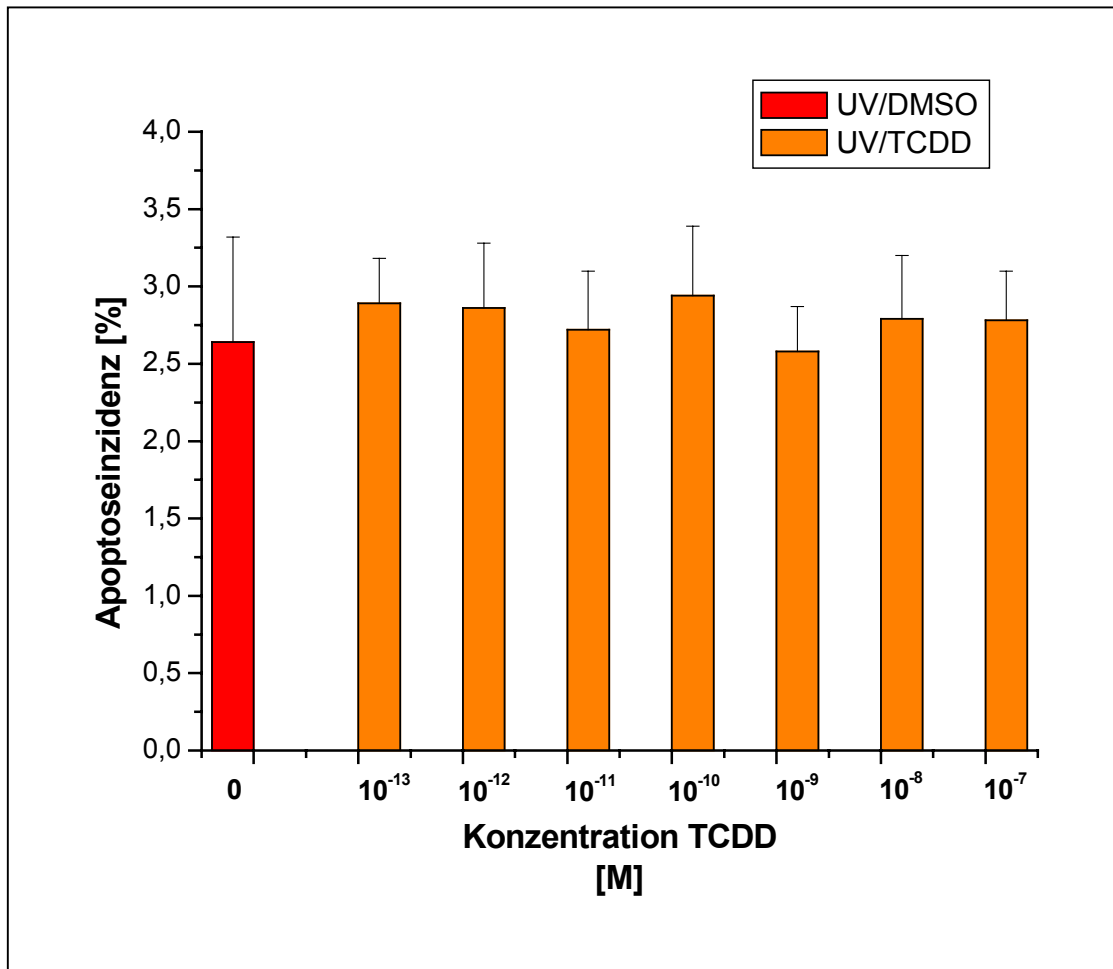
Die Zellkultur fand im Kollagengel-Sandwich auf Objektträgern statt. Zur Induktion der Apoptose erfolgte eine Bestrahlung der Zellen mit einer UV-Dosis von  $90 \text{ J x m}^{-2}$  90 min. vor Beginn der 12-stündigen Inkubation mit TCDD in den Konzentrationen 0 (Kontrolle)  $10^{-13}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  M.

Alle Versuchsreihen repräsentieren drei voneinander unabhängige Experimente in jeweiliger Doppelbestimmung.

### 4.5.1 Einfluss von TCDD auf die Apoptose in primären Han/Wistar-Rattenhepatozyten

Die DMSO-Kontrollen zeigten nach UV-Bestrahlung eine durchschnittliche Apoptoseinzidenz von ca. 2,6% (Mittelwert aus drei Experimenten).

Die folgende graphische Darstellung (Abb. 4.13) gibt die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweils ermittelten Apoptosehäufigkeit wieder.



**Abb. 4.13.:** Einfluss von TCDD auf die Apoptose in primären Han/Wistar-Rattenhepatozyten in Abhängigkeit von der Konzentration (0 (Kontrolle),  $10^{-13}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  M). Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus den Auszählungsergebnissen von 3 voneinander unabhängigen Experimenten berechnet.

Wie aus Abb. 4.13 ersichtlich, konnten keine signifikanten Einflüsse von TCDD auf die Apoptose in primären Han/Wistar-Rattenhepatozyten nach UV-Bestrahlung detektiert werden.

In Tabelle 4.5 sind die ermittelten Daten zum Einfluss von TCDD auf die Apoptose zusammengefasst. Aufgeführt sind die jeweiligen Mittelwerte der Apoptoseinzidenzen für die einzelnen Konzentrationen.

**Tab. 4.5:**  
**Einfluss von TCDD auf die Apoptose**  
**in Abhängigkeit von der Konzentra-**  
**tion nach UV-Bestrahlung**

	Apoptoseinzidenz [%]
	UV-induziert
0 (Kontrolle)	2,64
$10^{-13}$	2,89
$10^{-12}$	2,86
$10^{-11}$	2,72
$10^{-10}$	2,94
$10^{-9}$	2,58
$10^{-8}$	2,79
$10^{-7}$	2,78

#### 4.5.2 Einfluss von TCDD auf die Apoptose in primären Long-Evans-Rattenhepatozyten

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Inspektion der Präparate konnten in insgesamt drei unabhängig durchgeführten Versuchsreihen keine apoptotischen Nuklei in Long-Evans-Rattenhepatozyten-Kulturen beobachtet werden.

In einem analog durchgeführten Experiment mit einer auf  $150 \text{ J x m}^{-2}$  erhöhten UV-Strahlungsdosis konnten ebenfalls keine apoptotischen Zellkerne detektiert werden.

#### 4.6 Induktion der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase-Aktivität durch TCDD

Die im folgenden vorgestellten Experimente zur Induktion der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität in primären Rattenhepatozyten durch TCDD wurden nach einem Protokoll von Burke und Mayer (1974), modifiziert von Pohl und Fouts (1980) durchgeführt.

Die Kultivierung der Zellen fand auf einfach-kollagenbeschichteten Kulturschalen statt, die Inkubation mit TCDD in den Konzentrationen 0 (Kontrolle),  $10^{-13}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  M erfolgte über einen Zeitraum von 48 Stunden.

In den nachstehenden Kapiteln sind die erzielten Ergebnisse für primäre Hepatozyten männlicher Han/Wistar- sowie Long-Evans-Ratten aufgeführt.

Für die fluoreszenzspektrometrisch gewonnenen Daten wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve (Software: Origin 6.1) durch sigmoidale Anpassung der Werte ermittelt, wodurch eine Berechnung der jeweiligen  $EC_{50}$ -Werte erlaubt wurde. Die  $EC_{50}$ -Werte werden jeweils durch die Wendepunkte der sigmoidalen Kurven repräsentiert.

#### 4.6.1 Primäre Han/Wistar-Rattenhepatozyten

Die folgende graphische Darstellung zeigt die Induktion der EROD-Aktivität in primären Hepatozyten männlicher Han/Wistar-Ratten nach TCDD-Behandlung.

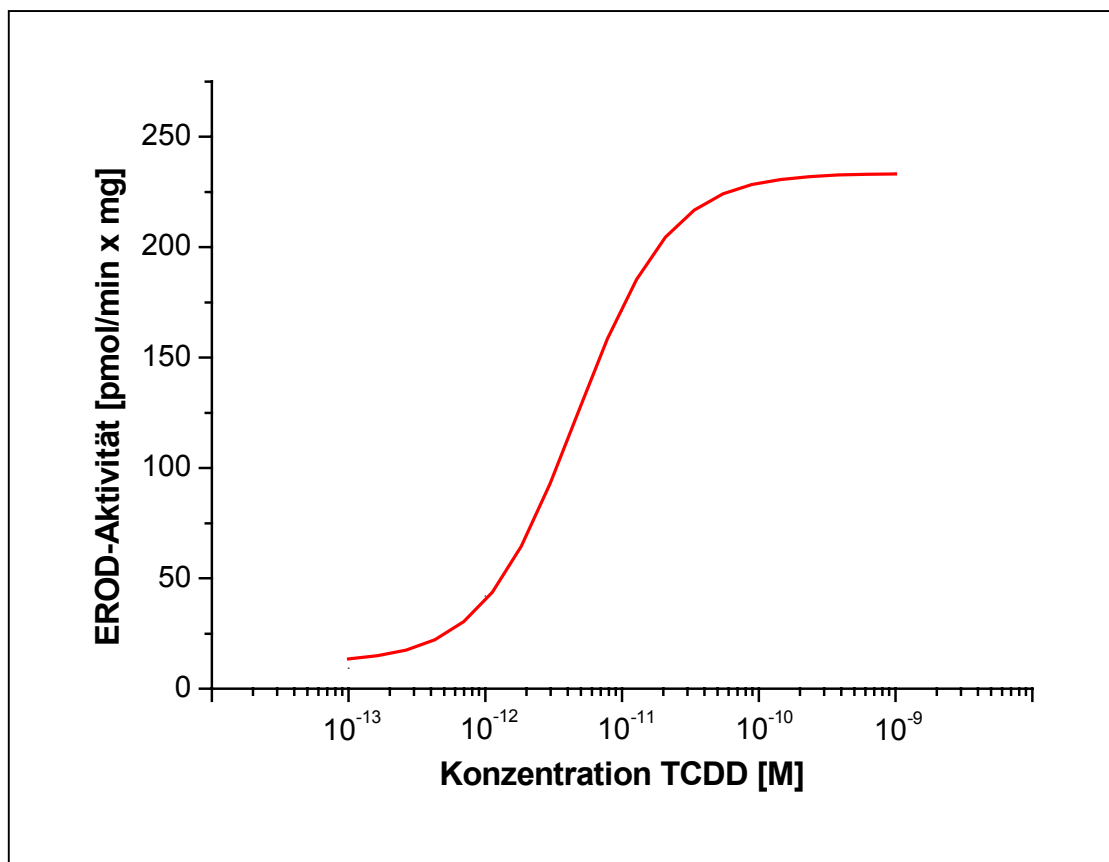


Abb. 4.14: Induktion der EROD-Aktivität in primären Han/Wistar-Rattenhepatozyten durch TCDD. Die dargestellten Werte sind repräsentativ für 3 Experimente.



Aus dieser sigmoidal angepassten Konzentrations-Wirkungskurve (Origin 6.1) wurde ein  $EC_{50}$ -Wert von ca.  $4,6 \times 10^{-12}$  M (Wendepunkt der Kurve) berechnet. Das 95%-Konfidenzintervall ( $P \leq 0,05$ ) beträgt  $\pm 3,7 \times 10^{-13}$ .

Die nachstehende Abbildung gibt detailliert Auskunft über die für die jeweiligen TCDD-Konzentrationen gewonnenen Daten zur EROD-Aktivität. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 durchgeführten Experimenten.

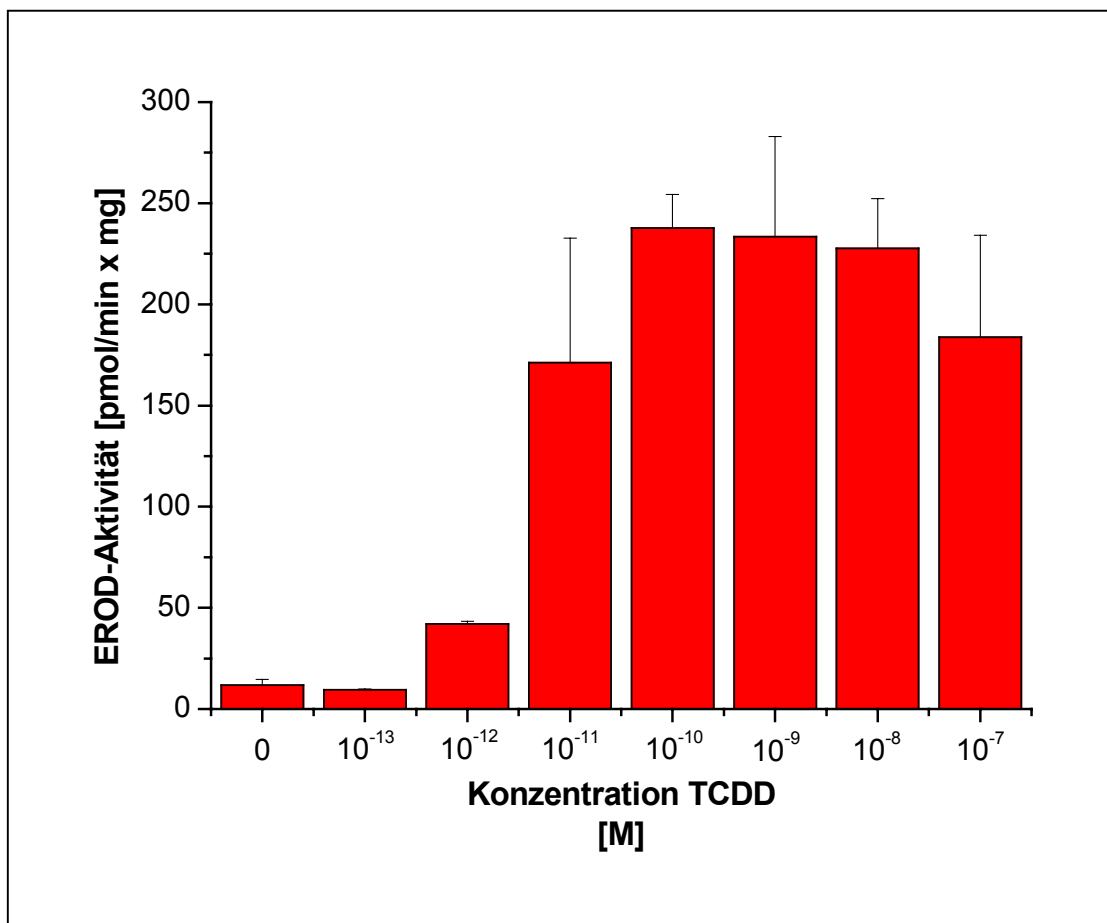


Abb. 4.15: Mittelwerte und Standardabweichungen der EROD-Aktivitäten in primären Han/Wistar-Rattenhepatozyten.

### 4.6.2 Primäre Long-Evans-Rattenhepatozyten

Die untere Graphik repräsentiert die Induktion der EROD-Aktivität in primären Hepatozyten männlicher Long-Evans-Ratten nach TCDD-Behandlung.

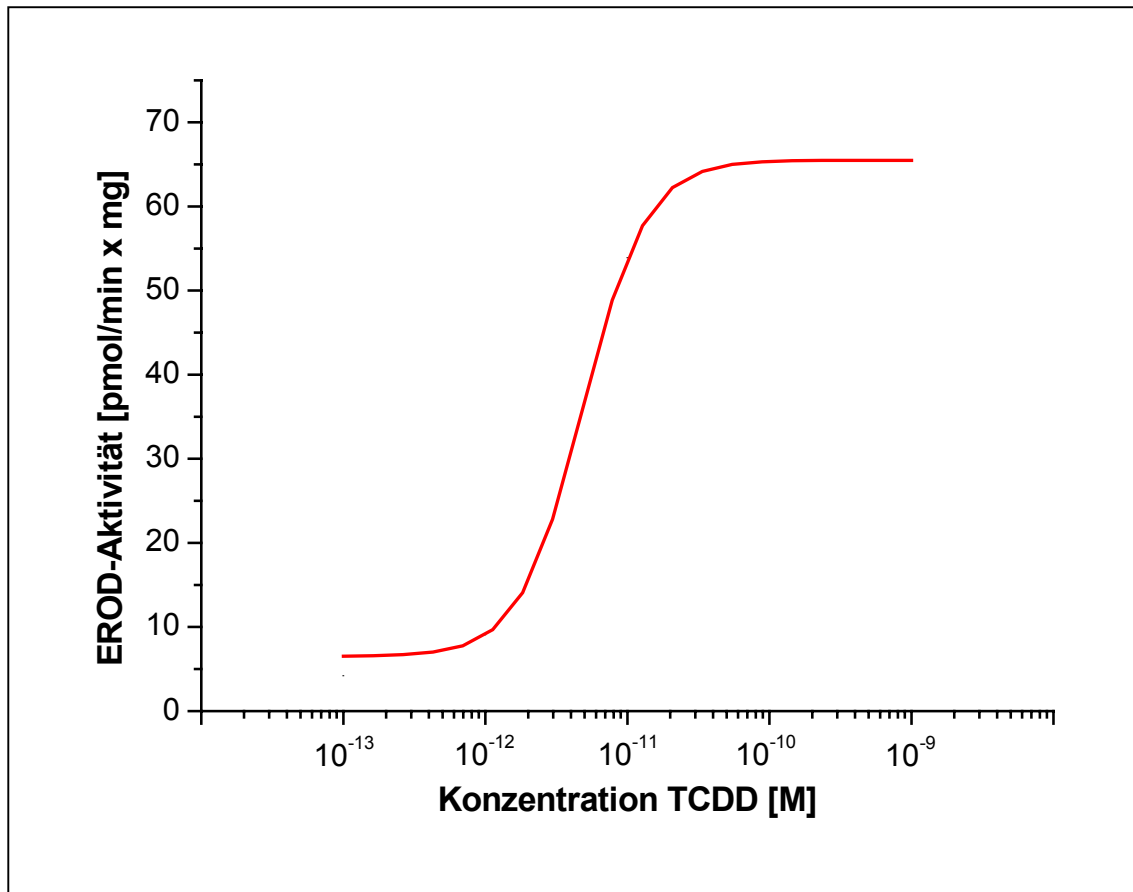


Abb. 4.16: Induktion der EROD-Aktivität in primären Long-Evans-Rattenhepatozyten durch TCDD. Die dargestellten Werte sind repräsentativ für 3 Experimente.

Der aus dieser sigmoideal angepassten Konzentrations-Wirkungskurve (Origin 6.1) berechnete  $EC_{50}$ -Wert beträgt ca.  $4,9 \times 10^{-12}$  M mit einem 95%-Konfidenzintervall ( $P \leq 0,05$ ) von  $\pm 5,0 \times 10^{-13}$ .

In folgendem Diagramm sind die für die einzelnen TCDD-Konzentrationen ermittelten Daten zur EROD-Aktivität aufgeführt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 durchgeführten Experimenten.

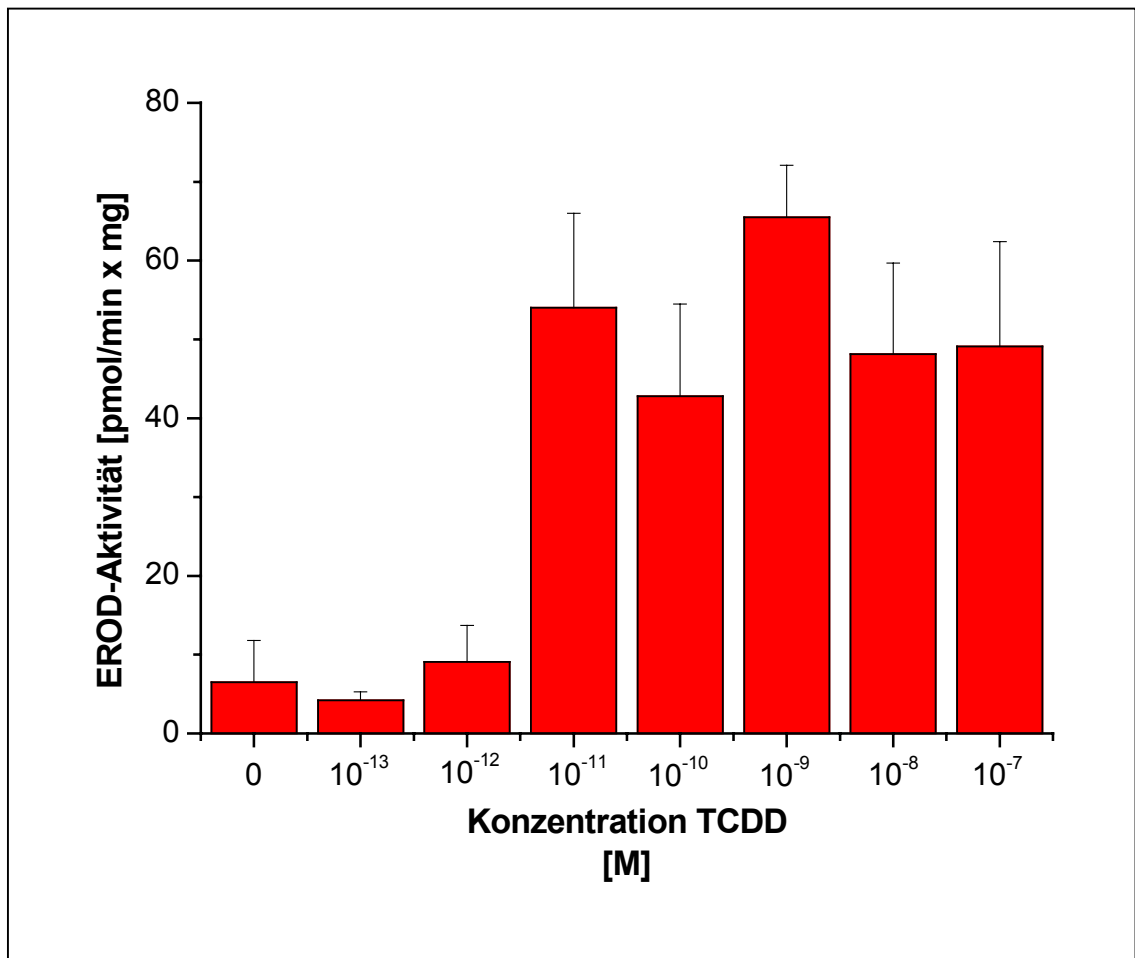


Abb. 4.17: Mittelwerte und Standardabweichungen der EROD-Aktivitäten in primären Long-Evans-Rattenhepatozyten.

## 5. Diskussion

### 5.1 Apoptoseinduktion durch UV-Strahlung

Die Behandlung von kultivierten Zellen mit UV-Strahlung zur Induktion von Apoptose ist eine bei *in vitro*-Studien zur tumorpromovierenden Wirkung von Chemikalien vielfach verwendete Methode, die jedoch im Tierversuch von keinerlei Bedeutung ist.

Die Gentoxizität von UV-Strahlung besteht im Gegensatz zur  $\gamma$ -Strahlung nicht etwa in einer klastogenen, d.h. Strangbrüche verursachenden Wirkung (Kaufmann und Paules, 1996), sondern in der Dimerisierung benachbarter Thyminbasen innerhalb eines DNA-Stranges, wobei deren Doppelbindungen in einer Cycloaddition unter Ausbildung eines Vierrings miteinander reagieren. Die diesbezüglich wirksamste Wellenlänge beträgt 260 nm und entspricht dem Absorptionsmaximum der DNA.

Im mehrstufigen Prozess der Kanzerogenese spielen solche DNA-schädigenden Wirkungen gentoxischer Agentien in der Phase der Initiation eine herausragende Rolle: Nach eingetretenem Schaden ist die Zelle zunächst in der Lage, diesen zu erkennen und nach Stoppen des Zellzyklus intrinsische Reparaturmechanismen zu aktivieren. Die Reparatur besteht im Falle einer Läsion durch UV-Strahlung in einer sogenannten Exzisionsreparatur, bei welcher das Thymindimer sowie benachbarte Nukleotide durch Endonukleaseaktivität aus dem betreffenden DNA-Strang herausgetrennt werden. Das somit eliminierte Teilstück wird mit Hilfe einer DNA-Polymerase aus einzelnen Nukleotiden neu synthetisiert und in die entstandene Lücke ligiert. Kann der Schaden auf diese Weise nicht behoben werden, wird die Apoptose eingeleitet, wobei eine vermehrte Bildung des Tumorsuppressorgenproduktes p53 eine Rolle zu spielen scheint. So konnte von Wörner (1998) eine vermehrte Bildung von p53-Protein mittels Westernblot-Analyse beobachtet werden.

Die Auslösung von Apoptose bzw. die vermehrte Induktion von p53 scheint nicht in der Bildung der Thymin-Dimere begründet zu sein, sondern in dem durch die Reparatur verursachten Strangbruch (Nelson und Kastan, 1994).

In Versuchen zu vorliegender Arbeit sowie in früheren Studien der Arbeitsgruppe (Grün, 1998; Bohnenberger, 1999; Kunz, 2001) zeigte sich, dass die Apoptose in Rattenprimärhepatozyten in Kollagengel-Sandwichkulturen durch UV-Strahlung auf 3-4% induzierbar ist.

Mit der Anwendung des Sandwichverfahrens zur Zellkultivierung soll erreicht werden, dass sich apoptotische Zellen („apoptotic bodies“) im Rahmen der experimentellen Handhabung weniger stark ablösen und somit in die Auswertung mit einbezogen werden können. Genotoxische Agentien wie UV-Strahlung können somit *in vitro* zur Apoptoseinduktion herangezogen werden, wobei Präneoplasien simuliert werden sollen. Jedoch steht bisher der Nachweis noch aus, ob und inwieweit diese UV-behandelten Primärhepatozyten dem Status einer initiierten Zelle *in vivo* entsprechen, wie man sie z.B. nach Gabe von **Diethylnitrosamin** (DEN) bei Ratten in tierexperimentellen Studien findet. Die Verwendung von Primärhepatozyten hat den Vorteil gegenüber permanenten Zelllinien, dass diese die gesamte genetische Ausstattung einer „normalen“ Zelle *in vivo* aufweisen und deren Differenzierungsgrad entsprechend näher kommen.

## **5.2 Hemmung der Apoptose durch „nicht-dioxinartige“ PCBs sowie Phenobarbital in primären Wistar-Ratten-Hepatozyten**

Die Hemmung der Apoptose in präneoplastischen Zellen wird seit einiger Zeit als wichtiger Mechanismus der Tumorpromotion in der Nagerleber diskutiert (Bursch et al., 1984).

Unterbleiben nach genotoxischer Läsion sowohl die Reparatur des eingetretenen DNA-Schadens, als auch die Auslösung von Apoptose, so wird diesen initiierten Zellen ein Wachstumsvorteil verschafft, der die klonale Expansion präneoplastischer Foci favorisiert und somit einer Erhöhung des Risikos einer malignen Transformation Vorschub leistet (Schulte-Hermann et al., 1993).

Die Unterdrückung von Apoptose in präneoplastischen Zellen konnte bereits für einige Tumorpromotoren in der Rattenleber wie z.B. Phenobarbital und TCDD gezeigt werden (Bursch et al., 1984; Stinchcombe et al., 1995; Plant et al., 1998).

Die Untersuchung tumorpromovierender und anderer biologischer und toxikologischer Wirkungen ist ein wichtiger Parameter bei der Risikobeurteilung solcher Substanzen.

Die Situation gestaltet sich insofern als schwierig, da sich die PCBs je nach ihrem biologischen und toxikologischen Wirkungsmuster in der Rattenleber in „dioxinartige“ Kongenere einerseits und „nicht-dioxinartige“ Kongenere andererseits unterteilen lassen (Giesy et al, 1998), wobei jedoch keine klare Grenze zwischen diesen beiden Kategorien gezogen werden kann.

Erstere fassen non-ortho-substituierte Kongenere zusammen, welche eine koplanoide Struktur annehmen können und bereits eingehend untersucht sind. Die „dioxinartige“ Wirkung dieser Substanzen beruht auf ihrer Bindungsaffinität zum Ah-Rezeptor, was mit der Induktion von CYP1A-Isoenzymen im Zusammenhang steht (Safe, 1994; Giesy et al., 1998). Die bisher untersuchten „dioxinartigen“ PCBs wirken in der Rattenleber als Tumorpromotoren (Buchmann et al, 1991; Connor et al., 1995; Hemming et al., 1993). So konnte beispielsweise von Buchmann et al. (1991) in einem Initiations-Promotionsexperiment an weiblichen Wistar-Ratten eine deutliche Zunahme an enzymveränderten Leberfoci beobachtet werden, nachdem die Tiere nach vorheriger Gabe von Diethylnitrosamin (DEN) als initiierendes Agens mit „dioxinartigen“ PCBs behandelt wurden.

Diese Effekte haben diese PCBs gemeinsam mit TCDD, dessen tumorpromovierende Wirkung in der Rattenleber ebenfalls bereits bewiesen ist (Kociba et al., 1978; Schrenk et al., 1994).

Die im Rahmen vorliegender Arbeit in einem *in vitro*-Modell untersuchten Kongenere zählen zu den „nicht-dioxinartigen“ PCBs, sie sind einfach (PCB 28) respektive mehrfach ortho-substituiert (PCB 138, 183).

Für diese Kategorie liegen derzeit noch sehr wenig Daten vor, die zur Risikobeurteilung dieser Stoffklasse herangezogen werden können.

Für einzelne Vertreter ist untersucht, dass sie CYP2B-Isoenzyme in der Rattenleber induzieren (Giesy et al., 1998; Connor et al., 1995). Von Connor et al., (1995) konnte anhand einer *in vivo*-Studie an weiblichen Sprague-Dawley-Ratten eine erhöhte Aktivität der mit der Induktion von CYP2B korrelierten Pentoxyresorufin-O-dealkylase (PROD) nach Behandlung der Tiere mit einfach- oder mehrfach ortho-substituierten PCBs (u.a. PCB 28, 101, 187, 183) beobachtet werden. Bei Analysen der PROD-

Aktivität in der eigenen Arbeitsgruppe zeigten sich die „nicht-dioxinartigen“ Kongenere PCB 28, 101 sowie 187 ebenfalls als Induktoren der PROD, jedoch in kultivierten Primärhepatozyten männlicher Wistar-Ratten (Bohnenberger et al., 2001).

Weiterhin konnten auch für einige „nicht-dioxinartige“ PCB-Kongenere in tierexperimentellen Studien tumorpromovierende Effekte demonstriert werden (Safe, 1994; Buchmann et al., 1991) so z.B. für PCB 153 nach Initiation mit DEN in weiblichen Sprague-Dawley-Ratten (Hemming, et al., 1993).

Die tumorpromovierenden Eigenschaften in der Rattenleber sowie die Induktion von CYP2B-Isoenzymen haben diese PCBs gemeinsam mit Phenobarbital (Giesy et al., 1998; Connor et al., 1995).

Bei allen untersuchten PCBs sowie bei Phenobarbital zeigten sich konzentrationsabhängig apoptosehemmende Effekte nach vorheriger UV-Bestrahlung, wobei die Apoptoseinzidenz annähernd auf das Niveau der „spontanen“ Apoptose zurückgedrängt wurde. In dieser Studie zeichnete sich für die maximalen Hemmeffekte gegenüber der bestrahlten Kontrolle die Reihenfolge PCB 138 (38,7%) > Phenobarbital (30,7%) > PCB 28, 183 (jeweils 29,1%) ab.

Die Tatsache, dass bei allen untersuchten PCBs und im Falle von Phenobarbital die basale („spontane“) Apoptose weitaus schwächer beeinflusst wurde, lässt eventuell die Schlussfolgerung zu, dass sich dieser Typ Apoptose von der durch UV-Strahlung hervorgerufenen unterscheidet und möglicherweise ein anderer Signalweg an deren Induktion beteiligt sein könnte.

Die in den unbestrahlten Ansätzen gefundene Apoptoseinzidenz ist mit 2,9% verglichen mit der „spontanen“ Apoptose *in vivo* erhöht, was möglicherweise auf Stress durch Isolierung, Ausplattieren und Kultivieren der Zellen zurückzuführen ist.

Diese Befunde stehen im Einklang mit Ergebnissen aus früheren Studien mit PCB 101 und PCB 187 (Bohnenberger, 1999).

Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass derzeit noch keine Klarheit darüber besteht, ob und inwieweit aufgrund der *in vitro* gefundenen Effekte tatsächlich auf die *in vivo*-Situation geschlossen werden kann, d.h. die Apoptosehemmung *in vitro* Rückschlüsse auf tumorpromovierende Eigenschaften dieser Substanzen zulässt. Die für Phenobarbital *in vivo* bereits gezeigte Wirkung als Tumorpromotor konnte auf eine

Hemmung der Apoptose in präneoplastischen Zellen zurückgeführt werden (Bursch et al., 1984). Die in den Untersuchungen zu vorliegender Arbeit sowie in Studien der Arbeitsgruppe (Wörner, 1998), gefundene *in vitro*-Apoptosehemmung durch Phenobarbital in Hepatozyten deutet darauf hin, dass im Falle von Phenobarbital die *in vitro*-Apoptosehemmung durchaus als Surrogat für die *in vivo*-Verhältnisse gelten könnte. Bei den untersuchten PCBs ist diese Frage noch offen.

Ein langfristiges Ziel solcher Untersuchungen ist es, die bisher geringe Anzahl von Daten, die zur Risikoabschätzung der als „nicht-dioxinartig“ eingestuften PCBs herangezogen werden können, sinnvoll zu ergänzen, um letztendlich ein System analog zum für „dioxinartige“ Substanzen geltenden TEF/TEQ-System zu entwickeln, eventuell mit Phenobarbital als Referenzsubstanz. Vor diesem Hintergrund könnte sich die Möglichkeit eröffnen, verschiedene Substanzen und Chemikalien mit einem solchen *in vitro*-Testsystem auf tumorpromovierende Wirkungen hin zu prüfen, was gegebenenfalls zukünftig einen teilweisen Verzicht auf Tierexperimente zur Konsequenz haben könnte. Eine Verifizierung der gefundenen Ergebnisse anhand einer Initiations-Promotionsstudie an Wistar-Ratten erscheint hier allerdings als sinnvoll.

Weiterhin ist bisher unklar, inwiefern ein Zusammenhang besteht zwischen der PROD-Aktivität als funktionellem Parameter für die Induktion von CYP2B und der tumorpromovierenden Wirkung.

### 5.3 Biochemische Apoptosenachweise

Im Rahmen vorliegender Arbeit sollte unter Verwendung biochemischer Apoptosenachweise eine Verifizierung der unter Kap. 4.2 vorgestellten Ergebnisse zum Einfluss „nicht-dioxinartiger“ PCBs und Phenobarbital auf die Apoptose in Rattenhepatozyten versucht werden.



### 5.3.1 DNA-Fragmentierungsanalyse

Die internukleosomale DNA-Fragmentierung durch Endonukleaseaktivität ist ein wichtiges charakteristisches Ereignis später Apoptosestadien. Die hierbei entstehenden Fragmente sind von definierter Länge (Vielfache von ca. 180 bp) und können nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel als „Leiter“ (*ladder*) sichtbar gemacht werden (Wyllie, 1980; Bortner et al., 1995).

In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe (Wörner und Schrenk, 1996) zeigte sich, dass die durch UV-Strahlung induzierte Apoptose in Rattenprimärhepatozyten als „DNA-Ladder“ im Agarosegel sowohl darstellbar ist, als auch dass diese Methode zum Nachweis apoptosehemmender Effekte durch tumorpromovierende Xenobiotika geeignet ist. Aufgrund dessen erschien diese Technik als *in vitro*-Testsystem zur Ausweitung des Assays zum Studium apoptosehemmender Wirkungen „nicht-dioxinartiger“ PCBs als prädestiniert.

In Anlehnung an das von Wörner (1998) etablierte Protokoll wurde zunächst versucht, die Ausbildung der DNA-Leiter durch Bestrahlung der Zellen mit verschiedenen UV-Dosen (Dosisreihe) zu induzieren. Bereits in Vorversuchen hierzu zeichnete sich eine schlechte Detektierbarkeit der Fragmente ab, zudem war keine klare Abhängigkeit der Intensität der DNA-Fragmentierung von der eingesetzten UV-Licht-Dosis erkennbar.

Die Präzipitationsdauer ist bei solchen Experimenten von entscheidender Bedeutung, da das Ausfällen der zum Teil sehr kleinen Bruchstücke in -20°C kaltem Ethanol möglichst vollständig erfolgen sollte. In Basisversuchen zur Präzipitationsdauer (1-4 Wochen) deutete sich an, dass hierfür ein Zeitraum von mindestens 4 Wochen angemessen erscheint. Um zu überprüfen, ob die Probleme der schwachen Detektierbarkeit sowie der schlechten Reproduzierbarkeit in der Sphäre der Vollständigkeit der Präzipitation zu suchen sind, wurden weitere Experimente mit der Präzipitationshilfe „see DNA“ (Amersham) durchgeführt. Das Prinzip von „see DNA“ besteht darin, dass eine polymerartige Substanz, ohne dabei den Nachweis zu stören, an die DNA bindet und somit eine schnellere (über Nacht) und effizientere Präzipitation gewährleisten kann (Prinzip der „Kopräzipitation“). Dies konnte zwar erreicht werden, jedoch brachte auch diese Variation der Versuchsbedingungen keine Verbesserung in Bezug auf die Detektierbarkeit der Banden.

Eine mögliche Ursache für diese Phänomene könnte in einem zu hohen Anteil nekrotischer Zellen liegen, welcher sich als „Schmier“ im Agarosegel darstellt. Jedoch war bei der fluoreszenzmikroskopischen Apoptosedetektion (Kap. 4.1) der Anteil nekrotischer Zellen in den einzelnen Präparaten recht gering. Dies ist wahrscheinlich vor dem Hintergrund zu sehen, dass bei jenen Experimenten die Zellkultur im Kollagensandwich stattfand, wobei die vergleichsweise dicke Kollagenschicht, in welche die Zellen eingebettet sind, einen Teil der ebenfalls zum nekrotischen Zelltod führenden UV-Strahlung absorbieren und somit die Effekte abschwächen könnte. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die nach UV-Bestrahlung detektierte Apoptoseinzidenz mit ca. 3,6% in den Kontrollen relativ niedrig angesiedelt war und es somit zu einer gegenseitigen Überlagerung von apoptotischen und nekrotischen Effekten gekommen sein könnte, was wahrscheinlich zur schlechten Detektierbarkeit der Banden beigetragen hat.

Insgesamt zeigte sich, dass diese Methode zum Nachweis von Apoptose bzw. apoptosehemmender Effekte im vorliegenden System nicht etabliert werden konnte. Die konkrete Ursache hierfür bleibt weiterhin unklar.

### 5.3.2 Caspase-3-Assay

Die Induktion von Cysteinproteasen, den Caspasen, nimmt eine Schlüsselposition im Signaling der Apoptose ein. Die Caspase-3 zählt zusammen mit den Caspasen-6 und -7 zu den Effektorcaspasen, zu deren Aktivierung es wiederum der Induktion sogenannter Initiatorcaspasen bedarf. Die Effektorcaspasenaktivierung repräsentiert im Signaltransduktionsweg des programmierten Zelltodes den „point of no return“, d.h. die Auslösung der Apoptose ist ab diesem Stadium irreversibel und wird somit erzwungen (Wagener, 1999; Zhivotovski et al., 1999).

Im weiteren Vorgehen wurde nun versucht, einen Caspase-3-Assay zu etablieren, welcher über den Einfluss von PCBs und Phenobarbital auf die mit der Apoptose korrelierte Caspase-3-Aktivität in primären Rattenhepatozyten Auskunft geben sollte.

Zunächst wurde in Anlehnung an vorangegangene Experimente zur Apoptosehemmung versucht, die durch UV-Strahlung induzierte Apoptose über einen Anstieg der Caspase-3-Aktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Strahlungs-dosis zu detektieren.

Für die durch genotoxische UV-Strahlung ausgelöste Apoptose gilt ein über das Tumorsuppressorgenprodukt p53 ablaufender Signalweg als wahrscheinlich, bei welchem die Hochregulierung von p53-Protein zur Induktion proapoptotischer Mitglieder der BCL-2-Familie wie z.B. BAX (Levine, 1993, 1997) führt, was wiederum die mitochondriale Ausschüttung von Cytochrom C veranlasst und schließlich nach weiteren Schritten über die Aktivierung der Caspase-3 in die Auslösung des programmierten Zelltodes mündet.

Versuche zur UV-Dosisreihe offenbarten jedoch, dass auch nach mehreren Wiederholungen keine Caspase-3-Aktivität nachweisbar war. Die Ursache hierfür lässt sich - wie auch im Falle der DNA-Fragmentierungsstudien - in einer durch die UV-Bestrahlung verursachten massiven Zellschädigung (Nekrose) vermuten, wodurch die Ausbildung von Apoptosen möglicherweise verhindert wurde. Eine Zellkultivierung im Kollagengel-Sandwich hätte eventuell dieses Problem mildern können, jedoch war dies nicht möglich, da die hierbei anfallenden, außerordentlich hohen Proteinmengen den Nachweis empfindlich gestört hätten.

Um negative Einflüsse der UV-Strahlung auszuschließen, wurde anstelle jener die hydrophobe Gallensäure Glycochenodeoxycholsäure (GCDC) zur Apoptoseauslösung eingesetzt. Es konnte bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass nach Behandlung von Primärhepatozyten mit GCDC eine gesteigerte Caspase-3-Aktivität detektierbar ist (Faubion et al., 1999; Webster et al., 2002).

Versuche zum Konzentrations- und Zeitverlauf deuteten an, dass die Caspase-3-Aktivität durch GCDC in einem detektierbaren Bereich prinzipiell induzierbar ist, jedoch zeichnete sich auch hier eine extrem geringe Reproduzierbarkeit ab. Weitere Experimente mit 2 mM-Phenobarbital zeigten wiederum eindeutig, dass sich die Caspase-3-Aktivität durch Behandlung mit GCDC in den Konzentrationen 50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M induzieren ließ, aber eine signifikante Hemmung der Aktivität konnte nicht festgestellt werden. Ferner war auch aufgrund der ausgeprägten Schwankungen keine sichere Aussage zum Einfluß von Phenobarbital auf die Caspase-3-Aktivität möglich.

Dieses Experiment war jedoch nur dreimal reproduzierbar. Eine eventuelle Ursache hierfür liegt möglicherweise darin, dass die toxische Gallensäure auf bisher ungeklärtem Wege aktiv aus den Zellen transportiert wird, oder aber dass die erreichte Caspase-3-Aktivität nur in diesen drei Wiederholungen ausreichend erhöht war, um diese detektieren zu können.

Interessanterweise konnte allerdings in keinem der durchgeführten Experimente eine basale Caspase-3-Aktivität in den unbehandelten Kontrollansätzen detektiert werden. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die basale Caspase-3-Aktivität in den Hepatozyten unterhalb der Empfindlichkeitsgrenze des Plattenlesegerätes lag.

Das Kernproblem bei der Durchführung bzw. Etablierung dieses Assays stellte vor allem die unzureichende Reproduzierbarkeit dar, deren Ursache im zeitlichen Rahmen vorliegender Arbeit nicht mehr aufgeklärt werden konnte.

Bei der Verwendung der Gallensäure GCDC als apoptogenes Agens muss jedoch berücksichtigt werden, dass hierbei ein anderer Signalweg zugrunde liegt, als bei der Apoptoseauslösung durch UV-Strahlung.

Während die Behandlung von Hepatozyten mit UV-Strahlung zu einem mit der genotoxischen Läsion korrelierten nachweisbaren Anstieg von p53 führt (Wörner und Schrenk, 1998), läuft die GCDC-induzierte Apoptose in Rattenhepatozyten wahrscheinlich über eine ligandunabhängige Aktivierung des Todesrezeptors Fas, was nach Aktivierung der Initiatorcaspase-8 ebenfalls in eine Caspase-3-Aktivierung mündet (Faubion et al., 1998; Miyoshi et al., 1999).

Vor diesem Hintergrund kamen im weiteren Verlauf mit MNNG (N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin) und Cisplatin hochpotente Apoptoseinduktoren zum Einsatz, deren apoptoseauslösende Wirkung auf einer Schädigung des genetischen Materials der Zelle basiert. Die Variation der induzierenden Substanzen hatte zum Ziel, eine sicher reproduzierbare Induktion der Caspase-3-Aktivität zu erreichen. Diese Studien wurden zum Teil in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Brüne, Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern, durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass weder in eigenen Untersuchungen noch bei den in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Brüne durchgeführten Experimenten mit MNNG- sowie Cisplatin-behandelten Hepatozytenkulturen messbare Caspase-3-Aktivitäten beobachtet wurden. Ein Pilotexperi-

ment (nicht dargestellt) zur Apoptoseinduktion durch MNNG (Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ) mit auf Objektträgern kultivierten Hepatozyten ergab eine maximale Apoptoseinzidenz von ca. 5,5%. Offenbar waren auch diese Werte zu gering um einen Anstieg der Caspase-3-Aktivität beobachten zu können.

Insgesamt kann gesagt werden, dass es im zeitlichen Rahmen vorliegender Arbeit nicht gelungen ist, einen biochemischen Assay zu quantitativen Erfassung von Apoptose in primären Rattenhepatozyten zu etablieren, der zur Detektion von Einflüssen auf die Apoptose herangezogen werden kann. Höchstwahrscheinlich hängt dies mit der niedrigen Apoptoseinzidenz in Verbindung mit einer erhöhten Nekrose zusammen, so dass keine Effekte erfassbar waren. Die Arbeitsgruppe Brüne kam zur gleichen Schlussfolgerung (persönliche Mitteilung T. Schmid). Die genauen Ursachen hierfür konnten nicht vollständig aufgeklärt werden.

Die sicherste Methode zur Detektion von Apoptose sowie apoptosehemmender Effekte scheint im vorliegenden Zellkultursystem somit die Fluoreszenzmikroskopie (DAPI/Sulforhodamin 101-Färbung) zu repräsentieren.

### 5.3.3 Weitere biochemische Apoptosemarker

Neben den im Rahmen vorliegender Arbeit angewendeten Methoden zur Erfassung von Apoptose sind weitere „Marker“ bekannt.

So eröffnet beispielsweise das Prinzip der Durchflusszytometrie die Möglichkeit einer quantitativen Beurteilung verschiedener Zellparameter wie u.a. des DNA-Gehaltes. Apoptotische Zellen können daher wegen ihrer morphologischen Veränderungen wie Chromatinkondensation und DNA-Fragmentation sowie der damit verbundenen Bildung von „apoptotischen Körperchen“, welche diese DNA-Bruchstücke enthalten, detektiert und somit von „normalen“ somatischen Zellen diskriminiert werden. Es wäre aufgrund dessen nach durchflusszytometrischer Analyse ein Signal im hypodiploiden Bereich eines 1-Parameter-Histogrammes („Sub-G1-Peak“) zu erwarten, welcher als Marker für apoptotische Nuclei angesehen wird (Darzynkiewicz et al., 1992, 1997).

Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zufolge erweist sich diese Methode des Apoptosenachweises in Rattenprimärhepatozyten nicht als geeignet, da die nach UV-Bestrahlung erreichten Apoptoseinzidenzen wahrscheinlich zu gering sind, so dass diese im 1-Parameter-Histogramm nicht vom sogenannten Debris-Bereich zu unterscheiden sind (Grün, 1998).

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung apoptotischer Zellen bietet der Nachweis mit Annexin V. Diese Methode beruht auf der für initiale Apoptosestadien typischen Phosphatidylserin (PS)-Distribution in der Plasmamembran („Flip-Flop-Mechanismus“). Annexin V ist ein Calciumionen-abhängiges phospholipid-bindendes Protein mit einer ausgeprägten Affinität zu Phosphatidylserin und kann daher als „Sonde“ für nunmehr an der Membranaußenseite lokalisiertes PS verwendet werden. Da die PS-Umverteilung ebenfalls ein charakteristisches Merkmal nekrotischer Zellen darstellt, muss zur Diskriminierung von Apoptose und Nekrose simultan die Propidiumiodid als Kernfarbstoff gegengefärbt werden (Vermes et al., 1995). Propidiumiodid färbt ausschließlich nekrotische Zellen, deren Plasmamembran bereits permeabilisiert ist.

In eigenen Versuchen zum Apoptosenachweis in primären Rattenhepatozyten mit Annexin V (nicht dargestellt) konnten ebenfalls keine positiven Effekte erzielt werden.

#### **5.4 Einfluss von TCDD auf die Apoptose sowie die EROD-Aktivität in primären Han/Wistar- und Long-Evans-Rattenhepatozyten**

Die Induktion von CYP1A-Isoenzymen durch bestimmte Substanzen in der Rattenleber ist ein wichtiger Parameter bei der Risikobeurteilung dieser Stoffe. Der Nachweis dieser Enzyminduktion erfolgt in der Regel durch die quantitative Erfassung der 7-Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD)-Aktivität als Gradmesser für die CYP1A-Induktion (Burke und Mayer, 1974; Pohl und Fouts, 1980). 2,3,7,8-TCDD repräsentiert den potentesten Agonisten des Ah-Rezeptors (Safe, 1990). Zu den Ah-Rezeptor-vermittelten Wirkungen in der Rattenleber zählen weiterhin, neben der erwähnten

CYP1A-Induktion, die Induktion der Glutathion-S-Transferase (GST), UDP-Glucuronosyltransferase (UGT 1A6), NAD(P)H: Chinonoxidoreduktase (NQO1) sowie der Aldehyd-3-dehydrogenase (ALDH) (Schrenk, 1998).

TCDD wirkt als potenter Tumorpromotor in der Rattenleber. So wurde beispielsweise in Initiations-Promotions-Studien an weiblichen Ratten bei vorheriger gentoxischer Läsion eine signifikante Zunahme an enzymveränderten Leberfoci nach TCDD-Behandlung beobachtet (Schrenk et al., 1994; Stinchcombe et al., 1995; Teeguarden et al., 1999). Ferner konnte anhand von *in vitro*-Studien an Hepatozyten männlicher Wistar-Ratten ein apoptosehemmender Effekt von TCDD nach apoptogener UV-Bestrahlung nachgewiesen werden (Wörner und Schrenk, 1998). Ebenfalls liegen nach Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe *in vitro*-Daten zur EROD-Aktivität in TCDD-behandelten Primärhepatozyten vor (Schmitz et al., 1995). Die hierbei gefundenen EC<sub>50</sub>-Werte liegen bei ca.  $2 \times 10^{-11}$  M.

#### 5.4.1 Einfluss von TCDD auf die Apoptose

Die Motivation für die Experimente zu vorliegender Doktorarbeit ist vor dem Hintergrund zu sehen, dass bestimmte Rattenstämme signifikante Unterschiede in Bezug auf die akut toxische Wirkung von TCDD aufweisen.

So konnte in vergleichenden Studien mit den Rattenstämmen Long-Evans (L-E) und Han/Wistar (H/W) beobachtet werden, dass Tiere des Stammes H/W eine zirka um den Faktor 1000 geringere Sensitivität gegenüber TCDD zeigen (LD<sub>50</sub>  $\approx$  9600  $\mu\text{g} \times \text{kg}^{-1}$  Körpergewicht) als Individuen des Stammes L-E, für welche die letale Dosis LD<sub>50</sub> mit ca. 10-20  $\mu\text{g} \times \text{kg}^{-1}$  angegeben wird (Pohjanvirta et al., 1993; Unkila et al., 1994). Auch andere Leberparameter, wie angeschwollene und mehrkernige Hepatozyten sowie inflammatorische Erscheinungen, waren bei H/W-Ratten weitaus schwächer ausgeprägt (Pohjanvirta et al., 1989). Interessanterweise zeigte sich in weiteren Untersuchungen, dass andere, mit der toxischen Wirkung von TCDD korrelierenden Effekte, wie u.a. Thymusatrophie und Embryotoxizität bei beiden Stämmen in gleicher Ausprägung auftraten (Pohjanvirta und Tuomisto, 1994; Huuskonen et al., 1994).

Tierexperimentelle Studien zur tumorpromovierenden Wirkung von TCDD in der Leber mit beiden Rattenstämmen offenbarten nach Initiation mit Diethylnitrosamin (DEN) und vorheriger partieller Hepatektomie zur Proliferationsanregung zwar sowohl bei H/W- als auch bei L-E-Tieren einen signifikanten ( $P < 0,001$ ) Anstieg an enzymveränderten Leberfoci, jedoch zeigten sich Vertreter des L-E-Stammes zirka um den Faktor 100 empfindlicher diesbezüglich, als die Individuen des H/W-Stammes (Viluksela et al., 2000).

Zur Klärung der Frage, ob diese *in vivo* gefundene tumorpromovierende Wirkung von TCDD mit einer Hemmung der Apoptose *in vitro* korreliert, wurden analog zu den Untersuchungen zum Einfluss von PCBs auf die Apoptose Experimente durchgeführt. Die Tatsache, dass bei primärkultivierten Hepatozyten männlicher H/W-Ratten nach Bestrahlung mit einer UV-Licht-Dosis von  $90 \text{ J x m}^{-2}$  in Sandwichkultur und anschließender Behandlung mit TCDD in ausgewählten Konzentrationen keine signifikanten Effekte auf die Apoptose gefunden wurden, legt den Schluss nahe, dass hier dieses Modell wahrscheinlich nicht als *in vitro*-Methode zur Untersuchung tumorpromovierender Wirkungen von TCDD gelten kann.

Der Befund, dass bei Hepatozyten männlicher L-E-Ratten nach UV-Bestrahlung (Dosen: 90, 150  $\text{J x m}^{-2}$ ) keine apoptotischen Nuclei fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden konnten, spricht zusammen mit dem Faktum, dass bei H/W-Hepatozyten die DMSO-Kontrolle mit ca. 2,6% verglichen mit der bestrahlten Kontrolle bei Wistar-Hepatozyten sehr viel niedriger liegt, für die Vermutung, dass sich die Signalwege der Apoptose bei den untersuchten Rattenstämmen unterscheiden. Möglicherweise zeigen sowohl H/W- als auch insbesondere L-E-Leberzellen höhere Resistenzen gegenüber UV-Strahlung als „initiierendes Agens“, was etwa durch effektivere DNA-Reparaturmechanismen oder auch durch eine modifizierte Regulation von p53 erklärbar wäre. In diesem Zusammenhang könnte auch eine veränderte Modulation der Ubiquitin-Ligase mdm2 (**m**ouse-**d**ouble-**m**inute**2**) eine Rolle spielen.



### 5.4.2 Einfluss von TCDD auf die EROD-Aktivität

Die Tatsache, dass die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten  $EC_{50}$ -Werte in Hepatozytenprimärkulturen männlicher H/W- und L-E-Ratten keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Spezies aufwiesen, steht im Einklang mit den Befunden aus mehreren tierexperimentellen Studien, bei welchen nach EROD-Messungen mit der cytosolischen S9-Fraktion aus Lebern TCDD-behandelter Tiere ebenfalls keine signifikanten Differenzen zwischen diesen beiden Tierstämmen beobachtet wurden (Viluksela et al., 2000; Simanainen et al., 2002). Ein direkter Vergleich zwischen den *in vitro* bestimmten Daten und den *in vivo*-Ergebnissen fällt jedoch schwer, da bei tierexperimentellen Befunden keine  $EC_{50}$ -Werte ermittelt werden können.

Hieraus könnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass der Enzyminduktion einerseits und der akut-toxischen Wirkung sowie der tumorpromovierenden Potenz von TCDD andererseits möglicherweise fundamental verschiedene Mechanismen zugrunde liegen.

Die ermittelten  $EC_{50}$ -Werte (ca.  $5 \times 10^{-12}$  M) stimmen mit den von Schmitz et al. (1995) für primäre Wistar-Rattenhepatozyten gefundenen Daten ( $EC_{50} = 2 \times 10^{-11}$  M) annähernd überein.

Zur Klärung der Frage, ob und inwieweit der Ah-Rezeptor eine Grundlage für die Unterschiede zwischen den H/W- und L-E-Stämmen bildet, haben Pohjanvirta et al. (1999) die Größe der Ah-Rezeptoren von H/W, L-E und Sprague-Dawley (S-D)-Ratten mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der Ah-Rezeptor bei L-E- und S-D-Ratten mit einem Molekulargewicht von ca. 106 kD dem „normalen“ Ratten-Ah-Rezeptor entspricht, während der Ah-Rezeptor der H/W-Tiere mit ca. 98 kD von deutlich geringerem Molekulargewicht war.

Da sich aber bezüglich der CYP1A-Induktion keine Unterschiede zwischen H/W- und L-E-Ratten feststellen ließen, kann daraus geschlossen werden, dass der 98 kD-Rezeptor voll funktionsfähig ist (Pohjanvirta et al., 1999).

Bei entsprechenden Studien zum ARNT-Protein wurden keine Differenzen beobachtet, das Molekulargewicht von ARNT war bei H/W-, L-E- sowie bei S-D-Ratten mit ca. 97 kD in allen drei untersuchten Stämmen gleich (Pohjanvirta et al., 1998), jedoch zeigte sich bei L-E-Ratten eine vergleichsweise höhere Proteinmenge (Pohjanvirta et al., 1999).

Die Bindungsaffinität des ligandbeladenen Heterodimers an die XRE scheint ebenfalls bei L-E- und H/W-Ratten gleich zu sein (Pohjanvirta et al., 1999).

Sequenzuntersuchungen offenbarten bei Han/Wistar-Ratten einen strukturell veränderten Ah-Rezeptor im Sinne einer Deletion am carboxyterminalen Ende an der Transaktivierungsdomäne (Pohjanvirta et al., 1999; Tuomisto et al., 1999). Diese Tatsache stellt wahrscheinlich einen wichtigen Faktor für die ausgeprägte Resistenz dieses Tierstammes dar (Viluksela et al., 2000). Es erscheint somit plausibel, dass zwar für die akut-toxische Wirkung von TCDD die strukturell veränderte Transaktivierungsdomäne des Ah-Rezeptors eine Rolle spielt, biologische Effekte wie die CYP1A-Induktion jedoch eher „unempfindlich“ gegenüber den molekularen Differenzen im Ah-Rezeptor sind.

Daraus könnte das Fazit gezogen werden, dass kein Zusammenhang existiert zwischen der CYP1A-Induktion einerseits und den akut-toxischen sowie tumorpromovierenden Wirkungen andererseits.

Insgesamt kann gesagt werden, dass derartige Vergleiche zwischen diesen beiden Rattenstämmen ein interessantes Tiermodell darstellt, welches zu mechanistischen Untersuchungen in Bezug auf die Wirkungen von TCDD und anderen Substanzen als geeignet erscheint.

Bei Betrachtung der maximalen Induktionshöhen (maximale Effizienz) der EROD-Aktivität fallen beim Vergleich der für H/W- respektive L-E-Hepatozyten gewonnenen Daten deutliche Unterschiede auf. Solche stark voneinander abweichende Induktionshöhen in verschiedenen Zelltypen stellen ein generelles Problem bei der Vergleichbarkeit dar. Daraus erklärt sich die Konvention,  $EC_{50}$ -Werte anzugeben. Der  $EC_{50}$ -Wert repräsentiert diejenige Konzentration, bei welcher der halbmaximale Effekt, d.h. 50% der maximal induzierbaren EROD-Aktivität, erreicht wird. Die Bestimmung der  $EC_{50}$ -Werte erfolgt über die Ermittlung des Wendepunktes der sigmoidalen Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Bei einer solchen sigmoidalen Kurvenanpassung bleiben die zu höheren Konzentrationen hin verringerten Aktivitäten unberücksichtigt. Dieses Abfallen der Werte stellt ein prinzipielles Problem dar, welches beispielsweise auch von Schmitz (1994) in Rattenprimärhepatozyten beobachtet wurde. Als mögliche Erklärungen hierfür könnten u.a. eine kompetitive Hemmung der Enzymaktivität oder auch zytotoxische Effekte herangezogen werden. Letztere

sind auch vor dem Hintergrund zu sehen, dass zur Berechnung der Aktivität die nach Lowry bestimmte Gesamtproteinmenge herangezogen, d.h. auch das Material toter Zellen mit einbezogen wird. Warum die maximalen Induktionshöhen der EROD-Aktivität in H/W- und L-E-Hepatozyten in einem solch hohen Maße voneinander abweichen, bleibt letztendlich unklar. Ein Vergleich mit Daten anderer Arbeitsgruppen ist derzeit noch nicht möglich, da bisher für diese Untersuchungen noch keine weiteren *in vitro*-Daten vorliegen.

## 6. Zusammenfassung

Zur Untersuchung der Beeinflussung des apoptotischen Zelltodes durch „nicht-dioxinartige“ polychlorierte Biphenyle in primären Rattenhepatozyten wurden Experimente in Kollagengel-Sandwich-Kultur durchgeführt. Die Auslösung von Apoptose erfolgte mittels Behandlung der Zellen mit UV-Licht. Hierzu wurden die PCB-Kongenere 28, 138 und 183 ausgewählt, als Referenzsubstanz diente Phenobarbital. Es konnte festgestellt werden, dass alle verwendeten PCBs sowie Phenobarbital die UV-induzierte Apoptose konzentrationsabhängig signifikant hemmen. Im Rahmen dieser Studie zeigte sich für die maximalen Hemmeffekte gegenüber der bestrahlten Kontrolle die Reihenfolge PCB 138 (38,7%) > Phenobarbital (30,7%) > PCBs 28, 183 (jeweils 29,1%). Die basale („spontane“) Apoptose wurde insgesamt weitaus schwächer beeinflusst. Zur eingehenderen Wirkungscharakterisierung dieser PCBs wäre eine Verifikation der gefundenen Ergebnisse anhand eines Tierexperimentes mit Hinblick auf mögliche tumorpromovierende Effekte dieser Substanzen in der Rattenleber von Interesse.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde versucht, einen Assay zu etablieren, der als biochemischer Marker für Apoptose in primären Rattenhepatozyten eingesetzt werden sollte.

In Studien zur DNA-Fragmentierung („DNA-ladder“) konnte keine Abhängigkeit der DNA-Fragmentierung von der eingesetzten UV-Dosis detektiert werden. Somit konnte diese Methode nicht zur Charakterisierung einer Beeinflussung der Apoptose eingesetzt werden.

Untersuchungen zur Beeinflussung der Gallensäure-induzierten Caspase-3-Aktivität durch Phenobarbital zeigten keine signifikanten Effekte auf die Caspase-3-Aktivität. Zudem zeichneten sich die Versuche durch eine hohe Schwankungsbreite sowie eine geringe Reproduzierbarkeit aus, so dass keine klare Aussage getroffen werden konnte.

Eine biochemische Nachweismethode der Apoptose und deren Beeinflussung durch Xenobiotika konnte somit im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht etabliert werden.

Abschließend wurde in vorliegender Arbeit der Einfluss von TCDD auf die Apoptose sowie auf die Induktion der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität als funktionellem Parameter für die CYP1A-Isoenzym-Induktion in primären Rattenhepatozyten der Stämme Han/Wistar und Long-Evans studiert.

In Untersuchungen zum Einfluss von TCDD auf die durch UV-Strahlung ausgelöste Apoptose in Han/Wistar-Hepatozyten konnten keine signifikanten Effekte beobachtet werden. Die maximale Induzierbarkeit der Apoptose lag mit ca. 2,6% deutlich unterhalb der für Hepatozyten des Wistar-Stammes gefundenen Werte. Bei analogen Experimenten mit Long-Evans-Hepatozyten zeigte sich, dass die Apoptose in diesem Zelltyp nicht induzierbar war. Die Ergebnisse zeigen ferner, dass in beiden Zelltypen eine konzentrationsabhängige Steigerung der EROD-Aktivität festgestellt werden konnte. Die hierbei ermittelten  $EC_{50}$ -Werte betragen für beide Zelltypen ca.  $5 \times 10^{-12}$  M und entsprechen somit annähernd den bereits von Schmitz et al. (1995) publizierten Daten ( $2 \times 10^{-11}$  M) für primäre Wistar-Rattenhepatozyten. Die maximale Induktionshöhe lag jedoch in Long-Evans-Hepatozyten deutlich niedriger als in Zellen des Han/Wistar-Stammes.

## 7. Literaturverzeichnis

Arends, M.J., Morris, R.G. und Whyllie, A.H. (1990)

Apoptosis. The role of the endonuclease.

*Am. J. of Pathology*, **136 (3)**, 593-608

Ballschmiter, K. und Zell, M. (1980)

Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography.

*Composition of technical Arochlor- and Clophen-PCB mixtures*

Bayly, A.C., Roberts, R.A. und Dive, C. (1994)

Suppression of liver cell apoptosis in vitro by the non-genotoxic hepatocarcinogen and peroxisome proliferator nafenopin.

*J. Cell Biol.*, **125**, 197-203

Beck, H., Eckart, K. Mathar, W. und Wittowski, R. (1998)

PCDD and PCDF body burden from food intake in the Federal Republic of Germany.

*Chemosphere*, **18**, 417-424

Bock, K.W. (1993)

Aryl hydrocarbon or dioxin receptor: Biologic and toxic responses.

*Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **125**, 1-42

Bohnenberger, S.M. (1999)

Einfluss von polychlorierten Biphenylen (PCB) auf die Apoptose in Rattenhepatocyten.

*Diplomarbeit Fachbereich Biologie, Universität Kaiserslautern*

Bohnenberger, S., Wagner, B., Schmitz, H.-J. und Schrenk, D. (2001)

Inhibition of apoptosis in rat hepatocytes treated with „non-dioxin-like“ polychlorinated biphenyls

*Carcinogenesis*, **22 (10)**, 1601-1606

Bortner, C.D., Oldenburg, N.B.E. und Cidlowski, J.A. (1995)

The role of DNA fragmentation in apoptosis.

*Trends Cell Biol.*, **5**, 21-26

Brown, D.P. (1987)

Mortality of workers exposed to polychlorinated biphenyls: an update.

*Arch. Environ. Health*, **42**, 333-339

Buchmann, A., Ziegler, B., Wolf, A., Robertson, L.W., Durham, S.K. und Schwarz, M. (1991)

Effects of polychlorinated biphenyls in rat liver: Correlation between primary subcellular effects and promoting activity.

*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **111**, 454-468

Burbach, K.M., Poland, A. und Bradfield, C.A. (1992)

Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8185-8189

Burke, D. und Mayer, R. (1974)

Ethoxyresorufin direct fluorometric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene

*Drug Metab. Dispos.*, **2**, 583-588

Bursch, W., Lauer, B., Timmermann-Trosiener, I., Barthel, G., Schuppler, J. und Schulte-Hermann, R. (1984)

Controlled death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters.

*Carcinogenesis*, **5**, 453-455

Carver, L.A., LaPres, J.J., Jain, S., Dunham, E.E. und Bradfield C.A. (1998)

Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9.

*J. Biol. Chem.*, **273 (50)**, 33580-33587

Connor, K., Safe, S., Jefcoate, C.R. und Larsen, M. (1995)

Structuredependent induction of CYP2B by polychlorinated biphenyl congeners in female Sprague-Dawley rats.

*Biochem. Pharmacol.*, **50**, 1913-1920

Corcoran, G.B., Fix, L., Jones, D.P., Treinen-Moslen, M., Nicotera, P., Oberhammer, F. und Buttyran, R. (1994)

Apoptosis: Molecular control point in toxicity.

*Toxicol. Appl. Pharmacol.* **128**, 169-181

Creissen, D. und Shall S. (1982)

Regulation of DNA ligase activity by poly (ADP-ribose).

*Nature*, **296**, 271-272

Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M.A., Lassota, P. und Traganos, F. (1992)

Features of apoptotic cells measured by flow cytometry.

*Cytometry*, **13**, 795-808

Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W. Murakami, T. und Traganos, F. (1997)

Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis).

*Cytometry*, **27**, 1-20

Denis, M., Gustafsson, J.-Å., Wilkström, A.C. (1988)

Interaction of the Mr = 90 000 heat shock protein with the steroid-binding domain of the glucocorticoid receptor.

*J. Biol. Chem.*, **263**, 18520-18523

Duke, R., Chervenak, R. und Cohen, J. (1983)

Endogenous endonuclease-induced DNA-fragmentation : An early event in cell mediated cytolysis.

*Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 6361-6365

Ema, M., Sogawa, K., Watanabe, N., Chujoh, Y., Matsushita, N., Gotoh, O., Funae, Y. und Fujii-Kuriyama, Y. (1992)

cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor.

*Biochem. Biophys. Res. Commun*, **184**, 246-253

Environmental Protection Agency (2001a)

<http://www.epa.gov/Toxteam/pcbid/table.htm>



Faubion, W.A., Guicciardi, M.E., Miyoshi, H., Bronk, S.F., Roberts, P.J., Svingen, P.A., Kaufmann, S.H. und Gores, G.J. (1999)

Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas.

*J. Clin. Invest.* **103** (1), 137-145

Fernandez-Salguero, P.M., Hilbert, D.M., Rudikoff, S., Ward, J.M. und Gonzalez, F.J. (1996)  
Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity.

*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **140**, 173-179

Fox, T.R., Best, L.L., Goldsworthy, S.M., Mills, J. und Goldsworthy, T.L. (1993)

Gene expression and cell proliferation in rat liver after 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure.

*Cancer Res.*, **53**, 2265-2271

Fürst, P., Fürst, C. und Willmers, K. (1992)

Bericht über die Untersuchung von Frauenmilch auf polychlorierte Dibenzodioxine, Dibenzofurane, Biphenyle sowie Organchlorpestizide 1984-1991.

*Chemisches Landesuntersuchungsamt Nordrhein-Westfalen, Münster*

Garcia-Allan, C., Loughlin, J., Orton, T. und Lord, P. (1997)

Changes in protein and mRNA levels of growth factor/growth factor receptors in rat-livers after administration of phenobarbital or methylclofenapate

*Arch. Toxicol.*, **71** (7), 409-415

Giesy, J.P. und Kannan, K. (1998)

Dioxin-like and non-dioxin-like toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for risk assessment.

*Crit. Rev. Toxicol.*, **28**, 511-569

Gonzales, A.J., Christensen, J.G., Preston, R.J., Goldsworthy, T.L., Testy, T.D. und Fox, T.R. (1998)

Attenuation of G1-Checkpoint function by the non-genotoxic carcinogen Phenobarbital.

*Carcinogenesis*, **19** (7), 1173-1183

Grün, A. (1998)

Einfluss von Phenobarbital auf den programmierten Zelltod (Apoptose) in kultivierten Primärhepatocyten der Ratte.

*Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern*

Hemming, H., Flodström, Wärngård, L., Bergman, Ä., Kronevi, T., Nordgren, I. und Ahlborg, U.G. (1993)

Relative tumor promoting activity of three polychlorinated biphenyls in rat liver.

*Eur. J. Pharmacol. Environ. Toxicol.*, **248**, 163-174

Houy, S. (1998)

Primary rat hepatocytes in collagen-sandwich configuration : Characterization and first applications as a toxicological in vitro tool.

*Dissertation, Universität Kaiserslautern, Fb. Chemie*

Huuskonen, H., Unkila, M., Pohjanvirta, R. und Tuomisto, J. (1994)

Developmental toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the most TCDD-resistant and -susceptible rat strains.

*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **124 (2)**, 174-180

IARC (1997)

Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans.

*IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol. 69, Lyon*

Jacobson, J.L., Jacobson, S.W. und Humphrey, H.E.B. (1990)

Effects of exposure to PCBs and related compounds on growth and activity in children

*Neurotoxicol. Teratol.*, **12**, 319-326

Johansson, S., Andersson, N. und Andersson, G. (1990)

Pretranslation and post-translational regulation of the EGF receptor during the prereplicative phase of liver-regeneration

*Hepatology*, **12**, 533-541

Kaufmann, W.K. und Paules, R.S. (1996)

DNA damage and cell cycle checkpoints.

*FASEB J.*, **10**, 238-247

Kawamoto, T., Sueyoshi, T., Zelko, I., Moore, R., Washburn, K. und Negishi, M. (1999)

Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene.

*Mol. Cell. Biol.*, **19**, 6318-6322

Kerr, J.F., Wyllie, A.H. und Currie, A.R. (1972)

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.

*Br. J. Cancer*, **26**, 239-257

Kerr, J.F. (1995)

Neglected opportunities in apoptosis research.

*Trends in Cell Biol.*, **5**, 55-57

Kociba, R.J., Keyes, D.G., Beyer, J.E., Carreen, R.M., Wade, C.E., Dittenber, D.A., Kalnius, R.P., Franson, L.E., Park, C.N., Barnard, S.D., Hummel, R.A. und Humiston, C.G. (1978)

Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats.

*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **46**, 279-303

Kolaja, K.L., Stevenson, D.E., Walborg Jr., E.F. und Klaunig, J.E. (1996)

Dose dependence of phenobarbital promotion of preneoplastic hepatic lesions in F344 rats and B6C3F1 mice: effects on DNA synthesis and apoptosis.

*Carcinogenesis*, **17**, 947-954

Kristiansen, E., Clemmensen, S. und Olsen, P. (1989)

Carcinogenic potential of cooked food mutagens (IQ and MeIQ) in Wistar-rats after short-term exposure.

*Pharmacol. Toxicol.*, **65**, 332-335

- Kunz, S. (2001)  
Einfluss von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) auf die Apoptose in Primärhepatozyten der Ratte.  
*Diplomarbeit Fachbereich Biologie, Universität Kaiserslautern*
- Kuratsune, M., Nakamura, Y. und Ikeda, M. (1987)  
Analysis of deaths seen among patients with Yusho – a preliminary report  
*Chemosphere*, **16**, 2085-2088
- Levine, A.J. (1993)  
The tumor suppressor genes.  
*Ann. Rev. Biochem.*, **62**, 623-651
- Levine, A.J. (1997)  
P53, the cellular gatekeeper for growth and division.  
*Cell*, **88**, 323-331
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951)  
Protein measurement with the folin phenol reagent.  
*J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982)  
Cloning, a laboratory manual.  
*Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour.*
- Manz, A., Berger, J., Dwyer, J.H., Flesch-Janys, D., Nagel, S. und Walsgott, H. (1991)  
Cancer mortality among workers in chemical plant contaminated with dioxin.  
*Lancet*, **338**, 959-964
- Miyoshi, H., Rust, C., Roberts, P.J., Burgart, L.J., Gores, G.J. (1999)  
Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas.  
*Gastroenterology*, **117** (3), 732-736
- Nebert, D.W. und Gonzalez, F.J. (1987)  
P450 genes: structure, evolution and regulation.  
*Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 945-993

Nelson, W.G. und Kastan, M.B. (1994)

DNA strand breaks, the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways.

*Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1815-1823

Nicholson, D.W., Ali, A. Thornberry, N.A. Vaillancourt, J.P., Ding C.K., Gallant, M. Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M. Lazebnik, Y.A. (1995)

Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis.

*Nature*, **376 (6353)**, 17

Okey, A.B., Riddick, D.S. und Harper, P.A. (1994)

Molecular biology of the aromatic hydrocarbon (dioxin) receptor.

*Trends Pharmacol. Sci.*, **15**, 226-232

Payne, C.M., Bernstein, C. und Bernstein, H. (1995)

Apoptosis overview emphasizing the role of oxidative stress DNA damage and signal transduction pathways.

*Leukemia and Lymphoma*, **19**, 43-93

Peraino, C., Staffeldt, E.F., Haugen, D.A., Lombard, L.S., Stevens, F.J. und Fry, R.J.M. (1980)

Effects of varying the dietary concentrations of phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis.

*Cancer Res.*, **40**, 3268-3273

Peraino, C., Fry, R.J.M., Staffeldt, E. und Christopher, J.P. (1975)

Comparative enhancing effects of phenobarbital, allobarbital, diphenylhydantoin and dichlorodiphenyltrichloroethane on 2-acetylaminofluorene- induced hepatic tumorigenesis in the rat.

*Cancer Res.*, **35**, 2884-2890

Peraino, C., Fry, M. und Staffeldt, E. (1971)

Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene.

*Cancer Res.*, **31**, 1506-1512

Pitot, H.C., Barsness, L., Goldsworthy, T. und Kitagawa, T. (1978)

Biochemical characterization of the stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine.

*Nature*, **271**, 456-458

Pitot, H.C. und Sirica, A.E. (1980)

The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis.

*Biochem. Biophys. Acta*, **605 (2)**, 191-215

Pitot, H.C. Goldsworthy, T., Campbell, H.A. und Poland, A. (1980)

Quantitative evaluation of the promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine.

*Cancer Res.*, **40**, 3616-3620

Pitot, H.C. (1989)

Progression: The terminal stage in carcinogenesis.

*Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 599-607

Pitot, H.C., Dragen, Y.P., Teeguarden, J., Hsia, S. und Campell, H. (1996)

Quantitation of multistage carcinogenesis in rat livers.

*Toxicol. Pathol.*, **24 (1)**, 119-128

Plant, N.J., Horley, N.J., Dickins, M., Hasmall, E., Elcombe, C.R. und Bell, D.R. (1998)

The coordinate regulation of DNA synthesis and suppression of apoptosis in differentially regulated by the liver growth agents, Phenobarbital and methylclofenapate.

*Carcinogenesis*, **19**, 1521-1527

Pohjanvirta, R., Tuomisto, L. und Tuomisto, J. (1989)

The central nervous system may be involved in TCDD toxicity.

*Toxicology*, **58**, 167-174

Pohjanvirta, R., Unkila, M. und Tuomisto, J. (1993)

Comparative acute lethality of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), 1,2,3,7,8-pentadibenzo-p-dioxin and 1,2,3,4,7,8-hexadibenzo-p-dioxin in the most TCDD-susceptible and the most TCDD-resistant rat strain.

*Pharmacol. Toxicol.*, **73**, 52-56

Pohjanvirta, R. und Tuomisto, J. (1994)

Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in laboratory animals: Effects, mechanisms and animal models.

*Pharmacol. Rev.*, **46**, 483-549

Pohjanvirta, R., Wong, J.M.Y., Li, W. Harper, P.A., Tuomisto, J. und Okey, A.B. (1989)

Point mutation in intron sequence causes altered carboxylterminal structure in the arylhydrocarbon receptor of the most 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-resistant rat strain.

*Mol. Pharmacol.*, **11**, 389-398

Pohjanvirta, R., Viluksela, M., Tuomisto J.T., Unkila, M., Karasinska, J., Franc, M.-A., Holowenko, M., Giannone, J.V., Harper P.A., Tuomisto, J. und Okey, A.B. (1999)

Physicochemical differences in the AH receptors of the most TCDD-susceptible and the most TCDD-resistant rat strains.

*Toxicology and Applied Pharmacology*, **155**, 82-95

Pohl, R. und Fouts, J. (1980)

A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions.

*Anal. Biochem.*, **107**, 150-155

Pollenz, R.S., Sattler, C.A. und Poland, A. (1994)

The aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein show distinct subcellular localisations in Hepa 1c1c7 cells by immunfluorecence microscopy.

*Mol. Pharmacol.*, **45**, 428-438

Rowlands, J.C., Gustafsson, J.Å. (1997)

Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction.

*Crit. Rev. Tox.*, **27**, 109-134

Safe, S.H. (1994)

Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses and implications for risk assessment.

*Crit. Rev. Toxicol.*, **24**, 87-149

Safe, S. (1990)

Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzodioxins (PCDDs), dibenzofuranes (PCDFs) and related compounds. Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs).

*CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **21**, 51-88

Scherer, E. (1984)

Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis.

*Biochim. Biophys. Acta*, **738**, 219-236

Schmitz, H.J. (1994)

Enzyminduzierende Wirkung umweltrelevanter Gemische polychlorierter Biphenyle (PCB) in Zellkulturen der Ratte.

*Diplomarbeit, Eberhardt-Karls-Universität, Tübingen*

Schmitz, H.J., Hagenmaier, A., Hagenmaier, H.P., Bock, K.W., Schrenk, D. (1995)

Potency of mixtures of polychlorinated biphenyls as inducers of dioxin receptor-regulated CYP1A activity in rat hepatocytes and H4IIE cells.

*Toxicology*, **99**, 47-54

Schrenk, D., Lipp, H.-P., Brunner, H., Wiesmüller, T. Hagenmaier, H. und Bock, K.W. (1991)

Induction of hepatic P450-dependent monooxygenase in female mice from PCDD/PCDF-contaminated area.

*Chemosphere*, **22**, 1011-1018



- Schrenk, D., Karger, A. Lipp, H.-P. und Bock, K.W. (1992)  
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and ethinylestradiol as comitogens in cultured rat hepatocytes.  
*Carcinogenesis*, **13**, 453-456
- Schrenk, D. (1994)  
Polychlorierte Biphenyle.  
*In Beyer, A., Eis, D. (Hrsg.), Handbuch der praktischen Umweltmedizin, Springer Verlag, Heidelberg*
- Schrenk, D., Buchmann, A., Dietz, K., Lipp, H.-P., Brunner, H. Sirma, H., Münzel, P. Hagenmaier, H. Gebhardt, R. und Bock, K.W. (1994)  
Promotion of preneoplastic foci in rat liver with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzo-p-dioxin and a defined mixture of 49 polychlorinated dibenzo-p-dioxins.  
*Carcinogenesis*, **15**, 509-515
- Schrenk, D. (1998)  
Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo- and xenobiotics.  
*Biochem. Pharmacol*, **55**, 1155-1162
- Schulte-Hermann, R. (1985)  
Tumor promotion in the liver.  
*Arch. Toxicol.*, **57**, 147-158
- Schulte-Hermann, R., Timmermann-Trosiener, I. und Schuppler, J. (1986)  
Facilitated expression of adaptive responses to phenobarbital in putative pre-stages of liver cancer.  
*Carcinogenesis*, **7 (10)**, 1651-1655
- Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Grasl-Kraupp, B., Oberhammer, F. und Wagner, A. (1992)  
Programmed cell death and its protective role with particular reference to apoptosis.  
*Toxicol. Lett.*, **64-65**, 569-574

Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Kraupp-Grasl, B., Oberhammer, F., Wagner, A. und Jirtle, R. (1993)

Cell proliferation and apoptosis in normal liver and preneoplastic foci.

*Environ. Health Perspect.*, **101** (Suppl. 5), 87-90.

Schulte-Hermann, R., Bursch, W. und Grasl-Kraupp, B. (1994)

Bedeutung der Apoptose für die Tumorentstehung.

*Verh. Dtsch. Ges. Path.*, **78**, 15-21

Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Grasl-Kraupp, B., Müllauer, L. und Ruttkay-Nedecky, B. (1995)

Apoptosis and multistage carcinogenesis in rat liver.

*Mut. Res.*, **333**, 81-87

Schwarz, M., Buchmann, A. und Bock, K.-W. (1995)

Role of cell proliferation at early stages of hepatocarcinogenesis.

*Toxikol. Lett.*, **82/83**, 27-32

Seglen, P.O. (1976)

Preparation of isolated rat liver cells

*Meth. Cell. Biol.*, **13**, 29-83

Simanainen, U., Tuomisto, J.T., Tuomisto, J. und Viluksela, M. (2002)

Structure-activity relationships and dose responses of polychlorinated dibenzo-p-dioxins for short-term effects in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-resistant and-sensitive rat strains.

*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **181** (1), 38-47

Stinchcombe, S., Buchmann, A., Bock, K.W. und Schwarz, M. (1995)

Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver.

*Carcinogenesis*, **16**, 1271-1275

Teeguarden, J.G., Dragan, Y.P., Singh, J., Vaughan, J., Xu, Y.-H., Goldsworthy, T. und Pitot, H.C. (1999)

Quantitative analysis of dose- and time-dependent promotion of four phenotypes of altered hepatic foci by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in female Sprague-Dawley-Rats  
*Toxicol. Sci.*, **51**, 211-223

Thompson, C.B. (1995)

Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.  
*Science*, **267**, 1456-1462

Tuomisto, J.T., Viluksela, M. Pohjanvirta, R. und Tuomisto, J. (1999)

The Ah-receptor and a novel gene determine acute toxic responses to TCDD: Segregation of the resistant alleles to different rat lines.  
*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **155**, 71-81

Unkila, M., Pohjanvirta, R., MacDonald, E., Tuomisto, J.T. und Tuomisto J. (1994)

Dose-response and time course of alterations in tryptophan metabolism by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the most TCDD-susceptible and the most TCDD-resistant rat strain: Relationship with TCDD lethality.  
*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **128**, 280-293

Van den Berg, M., Birnbaum, L. Bosveld, A.T., Brunstorm, B. Cook, P., Feeley, M. Giesy, J.P., Hanberg, A. Hasegawa, R. Kennedy, S.W. Kubiak, T. Larsen, J.C., van Leeuwen, P.X., Liem, A.K., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D. Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F. und Zacharewski, T. (1998)

Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife.  
*Environ. Health Perspect.*, **106**, 775-792

Vaux, D.L. und Strasser, A. (1996)

The molecular biology of apoptosis.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2239-2244

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. und Reutelingsperger, C. (1995)

A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.

*J. Immun. Methods*, **184**, 39-51

Viluksela, M., Bager, Y., Tuomisto, J.T., Scheu, G. Unkila, M., Pohjanvirta, R., Flodstrom, S., Kosma, V.M., Maki-Paakkanen, J., Vartiainen, T., Klimm, C., Schramm, K.W., Warngard, L. und Tuomisto J. (2000)

Liver tumor-promoting activity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in TCDD-sensitive and TDD-resistant rat strains.

*Cancer Res.*, **60 (24)**, 6911-6920

Wagener, C. (1999)

Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumore.

*Thieme Verlag*, 2. veränderte Auflage

Webster, C.R., Usechak, P. und Anwer M.S. (2002)

cAMP inhibits bile acid-induced apoptosis by blocking caspase activation and cytochrome c release.

*Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol*, **283 (3)**, G727-738

Wyllie, A.H., Kerr, J.F. und Currie A.R. (1980)

Cell death: the significance of apoptosis

*Int. Rev. Cytol.*, **68**, 251-306

Wyllie, A.H. (1994)

Apoptosis. Death gets a brake.

*Nature*, **369 (6478)**, 272-273

Wörner, W. und Schrenk, D. (1996)

Influence of liver tumor promoters on apoptosis in rat hepatocytes induced by 2-acetylaminofluorene, ultraviolet light, or transforming growth factor  $\beta$ 1

*Cancer Res.*, **56**, 1272-1278

Wörner, W. und Schrenk, D. (1998)

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin suppresses apoptosis and leads to hyperphosphorylation of p53 in rat hepatocytes.

*Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **6**, 239-247

Wörner, W. (1998)

Einfluss von tumorpromovierenden Xenobiotika auf den programmierten Zelltod (Apoptose) in kultivierten Primärhepatozyten der Ratte.

*Dissertation, Eberhardt-Karls-Universität, Tübingen.*

Yakushiji, T., et. al (1984)

Rate of decrease and half-life of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the blood of mothers and their children occupationally exposed to PCBs.

*Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **13**, 341-345

Zeiger, M. (2001)

Induktion von CYP1A-Isoenzymen in humanen Hepatoblastom-Zellen, Rattenhepatomzellen und primären Rattenhepatozyten und Beeinflussung der Apoptose in primären Rattenhepatozyten durch „dioxinartige“ PCBs.

*Dissertation, Fachbereich Chemie, Universität Kaiserslautern*

Zhivotovsky, B., Samali, A., Gahm, A., Orrenius, S. (1999)

Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis.

*Cell death and Differentiation*, **6**, 644-651

## 8. Anhang

### 8.1 IUPAC-Nomenklatur der PCBs

Abb. 8.1: IUPAC-Nomenklatur der PCBs

Nummer	Struktur	Nummer	Struktur	Nummer	Struktur
1	2	71	2,3',4',6	141	2,2',3,4,5,5'
2	3	72	2,3',5,5'	142	2,2',3,4,5,6
3	4	73	2,3',5',6	143	2,2',3,4,5,6'
4	2,2'	74	2,4,4',5	144	2,2',3,4,5',6
5	2,3	75	2,4,4',6	145	2,2',3,4,6,6'
6	2,3'	76	2,3',4',5'	146	2,2',3,4',5,5'
7	2,4	77	3,3',4,4'	147	2,2',3,4',5,6
8	2,4'	78	3,3',4,5	148	2,2',3,4',5,6'
9	2,5	79	3,3',4,5'	149	2,2',3,4',5',6
10	2,6	80	3,3',5,5'	150	2,2',3,4',6,6'
11	3,3'	81	3,4,4',5	151	2,2',3,5,5',6
12	3,4	82	2,2',3,3',4	152	2,2',3,5,6,6'
13	3,4'	83	2,2',3,3',5	153	2,2',4,4',5,5'
14	3,5	84	2,2',3,3',6	154	2,2',4,4',5,6'
15	4,4'	85	2,2',3,4,4'	155	2,2',4,4',6,6'
16	2,2',3	86	2,2',3,4,5	156	2,3,3',4,4',5
17	2,2',4	87	2,2',3,4,5'	157	2,3,3',4,4',5'
18	2,2',5	88	2,2',3,4,6	158	2,3,3',4,4',6
19	2,2',6	89	2,2',3,4,6'	159	2,3,3',4,5,5'
20	2,3,3'	90	2,2',3,4',5	160	2,3,3',4,5,6
21	2,3,4	91	2,2',3,4',6	161	2,3,3',4,5',6
22	2,3,4'	92	2,2',3,5,5'	162	2,3,3',4',5,5'
23	2,3,5	93	2,2',3,5,6	163	2,3,3',4',5,6
24	2,3,6	94	2,2',3,5,6'	164	2,3,3',4',5',6
25	2,3',4	95	2,2',3,5',6	165	2,3,3',5,5',6
26	2,3',5	96	2,2',3,6,6'	166	2,3,4,4',5,6
27	2,3',6	97	2,2',3,4',5'	167	2,3',4,4',5,5'
28	2,4,4'	98	2,2',3,4',6'	168	2,3',4,4',5',6
29	2,4,5	99	2,2',4,4',5	169	3,3',4,4',5,5'
30	2,4,6	100	2,2',4,4',6	170	2,2',3,3',4,4',5
31	2,4',5	101	2,2',4,5,5'	171	2,2',3,3',4,4',6
32	2,4',6	102	2,2',4,5,6'	172	2,2',3,3',4,5,5'
33	2,3',4'	103	2,2',4,5',6	173	2,2',3,3',4,5,6
34	2,3',5'	104	2,2',4,6,6'	174	2,2',3,3',4,5,6'
35	3,3',4	105	2,3,3',4,4'	175	2,2',3,3',4,5',6
36	3,3',5	106	2,3,3',4,5	176	2,2',3,3',4,6,6'
37	3,4,4'	107	2,3,3',4',5	177	2,2',3,3',4,5',6'
38	3,4,5	108	2,3,3',4,5'	178	2,2',3,3',5,5',6
39	3,4',5	109	2,3,3',4,6	179	2,2',3,3',5,6,6'
40	2,2',3,3'	110	2,3,3',4',6	180	2,2',3,4,4',5,5'
41	2,2',3,4	111	2,3,3',5,5'	181	2,2',3,4,4',5,6
42	2,2',3,4'	112	2,3,3',5,6	182	2,2',3,4,4',5,6'
43	2,2',3,5	113	2,3,3',5',6	183	2,2',3,4,4',5',6
44	2,2',3,5'	114	2,3,4,4',5	184	2,2',3,4,4',6,6'
45	2,2',3,6	115	2,3,4,4',6	185	2,2',3,4,5,5',6
46	2,2',3,6'	116	2,3,4,5,6	186	2,2',3,4,5,6,6'
47	2,2',4,4'	117	2,3,4',5,6	187	2,2',3,4',5,5',6
48	2,2',4,5	118	2,3',4,4',5	188	2,2',3,4',5,6,6'
49	2,2',4,5'	119	2,3',4,4',6	189	2,3,3',4,4',5,5'
50	2,2',4,6	120	2,3',4,5,5'	190	2,3,3',4,4',5,6

Nummer	Struktur	Nummer	Struktur	Nummer	Struktur
51	2,2',4,6'	121	2,3',4,5',6	191	2,3,3',4,4',5',6
52	2,2',5,5'	122	2,3,3',4',5'	192	2,3,3',4,5,5',6
53	2,2',5,6'	123	2,3',4,4',5'	193	2,3,3',4',5,5',6
54	2,2',6,6'	124	2,3',4',5,5'	194	2,2',3,3',4,4',5,5',
55	2,3,3',4	125	2,3',4',5',6	195	2,2',3,3',4,4',5,6
56	2,3,3',4'	126	3,3',4,4',5	196	2,2',3,3',4,4',5,6'
57	2,3,3',5	127	3,3',4,5,5'	197	2,2',3,3',4,4',6,6'
58	2,3,3',5'	128	2,2',3,3',4,4'	198	2,2',3,3',4,5,5',6
59	2,3,3',6	129	2,2',3,3',4,5	199	2,2',3,3',4,5,5',6'
60	2,3,4,4'	130	2,2',3,3',4,5'	200	2,2',3,3',4,5,6,6'
61	2,3,4,5	131	2,2',3,3',4,6	201	2,2',3,3',4,5',6,6'
62	2,3,4,6	132	2,2',3,3',4,6'	202	2,2',3,3',5,5',6,6'
63	2,3,4',5	133	2,2',3,3',5,5'	203	2,2',3,4,4',5,5',6
64	2,3,4',6	134	2,2',3,3',5,6	204	2,2',3,4,4',5,6,6'
65	2,3,5,6	135	2,2',3,3',5,6'	205	2,3,3',4,4',5,5',6
66	2,3',4,4'	136	2,2',3,3',6,6'	206	2,2',3,3',4,4',5,5',
67	2,3',4,5	137	2,2',3,4,4',5	207	2,2',3,3',4,4',5,6,
68	2,3',4,5'	138	2,2',3,4,4',5'	208	2,2',3,3',4,5,5',6,
69	2,3',4,6	139	2,2',3,4,4',6	209	2,2',3,3',4,4',5,5',
70	2,3',4',5	140	2,2',3,4,4',6'		

## **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt dem Betreuer dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. Dr. D. Schrenk für die Überlassung des spannenden Themas, die freundliche Aufnahme in seinem Arbeitskreis sowie für seine stetige Begeisterungsfähigkeit, Diskussionsbereitschaft und wohlwollende Unterstützung während meiner gesamten Doktorandenzeit.

Herrn Dr. H.-J. Schmitz sei für seine ständige Hilfsbereitschaft und sein immer offenes Ohr für experimentelle Fragestellungen sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit gedankt.

Frau Susi Kunz, die immer an meiner Seite gestanden hat, gilt mein besonderer Dank für die unzähligen Perfusionen und ihre aufopfernde Hilfsbereitschaft. Ihre Erfahrungen auf unserem Arbeitsgebiet sowie ihre selbstlose Unterstützung in allen Situationen waren für mich von unschätzbarem Wert.

Allen Kollegen und Kolleginnen aus Zimmer 52/409A, insbesondere Frau Dr. Ragna Hussong, Frau Christine Pohl und Monika Groß gilt ein herzliches Dankeschön für die gute Atmosphäre in „unserem Büro“ und für die stets heitere und kollegiale Stimmung.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für das kollegiale Klima bedanken.

Last but not least sei den Herren Dr. A. von Knethen und T. Schmid von der Arbeitsgruppe Brüne am Fachbereich Biologie für die stetige Kooperationsbereitschaft, Beratung und Unterstützung bei Caspase-Messungen gedankt.

Nicht zuletzt gebührt meinen Eltern aufrichtiger Dank dafür, dass sie mir das Studium ermöglicht haben.



Teile aus dieser Arbeit wurden publiziert:

Wagner, B., Bohnenberger, S., Grün, A., Zankl, H. und Schrenk, D. (2000)

Effects of „non-dioxin-like“ polychlorinated biphenyls on CYP2B1/2 activity and on apoptosis in rat hepatocytes

*Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, Supplement to Vol. 361, Nr. 4*

Bohnenberger, S., Wagner, B., Schmitz, H.-J. und Schrenk D. (2001)

Inhibition of apoptosis in rat hepatocytes treated with „non-dioxin-like“ polychlorinated biphenyls.

*Carcinogenesis*, **22 (10)**, 1601-1606

## **Lebenslauf und Bildungsgang**

Name: Bohnenberger  
Vornamen: Stefan Martin  
Geburtsdatum: 04.07.1972  
Geburtsort: Saarbrücken  
Familienstand: ledig  
Eltern: Dipl. Kfm. Werner Bohnenberger  
Steffi Bohnenberger, geb. Spanier, Lehrerin

### **Schulbildung:**

09.1978-06.1982 Grundschole Perl/Obermosel  
09.1982-05.1991 Staatliches Gymnasium Saarburg  
27.05.1991 Abiturprüfung

### **Studium:**

WS 1991/92 Studium der Chemie an der Universität Kaiserslautern  
06.01.1995 Diplom – Vorprüfung in Chemie  
WS 1995/96 Studium der Biologie an der Universität Kaiserslautern  
23.12.1996 Zwischenprüfung in Biologie  
27.09.1999 Diplom – Hauptprüfung in Biologie

Diplomarbeit von Januar bis September 1999 unter der Anleitung von Prof. Dr. Dr. Schrenk mit dem Thema: „Einfluss polychlorierter Biphenyle (PCB) auf die Apoptose in Rattenhaptozyten“

seit 11.1999 Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. Schrenk