

**Untersuchungen zur tumorpromovierenden Wirkung
,nicht-dioxinartiger' polychlorierter Biphenyle in der Rattenleber**

Dem Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
,Doktor der Naturwissenschaften'

genehmigte

Dissertation

D 386

vorgelegt von

Dipl. Biol. Susanne Kunz

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

Kaiserslautern 2004

Die Experimente zu vorliegender Arbeit wurden von April 2001 bis August 2004 am Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern, Abteilung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. D. Schrenk durchgeführt.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 17. Dezember 2004

Promotionskommission:

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

Inhaltsverzeichnis

<i>Abbildungsverzeichnis</i>	I
<i>Tabellenverzeichnis</i>	III
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	IV
1 Einleitung	1
1.1 Chemische Karzinogenese	1
1.1.1 Mehrstufenmodell der Karzinogenese	1
1.1.2 Bedeutung der Apoptose in der Hepatokarzinogenese	3
1.1.3 Proliferationskontrolle – Protoonkogene und Tumorsuppressorgene	4
1.2 Apoptose – der programmierte Zelltod	5
1.2.1 Morphologische und biochemische Charakteristika	5
1.2.2 Apoptotische Signalwege	8
1.3 Tumorpromotoren der Leber	10
1.3.1 Phenobarbital.....	10
1.3.2 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin	12
1.3.2.1 Struktur, Eigenschaften und Belastungspfade.....	12
1.3.2.2 Toxizität	13
1.3.2.3 Mechanismen toxischer Wirkungen.....	15
1.3.3 Polychlorierte Biphenyle (PCBs).....	18
1.3.3.1 Struktur, Eigenschaften und Belastungspfade.....	18
1.3.3.2 Toxizität	20
1.3.3.3 Mechanismen toxischer Wirkungen.....	22
2 Ziel der Arbeit	25
3 Material und Methoden	27
3.1 Chemikalien	27
3.2 Geräte und Materialien	29
3.3 Nährmedien und Zusätze	31
3.4 Lösungen und Puffer	33
3.5 Wirkung von ‚nicht-dioxinartigen‘ PCBs auf primäre Hepatozyten	41
3.5.1 Isolierung parenchymaler Leberzellen	41
3.5.1.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	41
3.5.1.2 <i>In situ</i> Perfusion einer Rattenleber und Präparation von Hepatozyten	41
3.5.1.3 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	42
3.5.2 Zellkultur	43
3.5.2.1 Herstellung einer Kollagenlösung.....	43
3.5.2.2 Kultivierung von Hepatozyten auf kollagenbeschichteten.....	44
Gewebekulturschalen	44
3.5.2.3 Kultivierung von Hepatozyten auf Kollagengelen und im.....	44
Kollagengelsandwich	44
3.5.3 Proteinbestimmung nach Lowry	45
3.5.4 Western Blot Analyse.....	46
3.5.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
3.5.4.2 Protein-Transfer	47
3.5.4.3 Immunoblot und Detektion	48
3.5.5 Einfluss von PCB 153 auf die intrazelluläre Calcium-Homöostase	49
3.5.5.1 Einfluss von PCB 126 und 153 auf isolierte Membranfraktionen	49
3.5.5.1.1 Präparation von Rattenlebermikrosomen	49
3.5.5.1.2 Einbau von spinmarkierten Fettsäuren und Messung mit Elektronen Spin	49
Resonanz	49

3.5.5.2	Einfluss von PCB 153 auf die Calcium-Homöostase in Hepatozyten	50
3.5.5.2.1	Kultivierung der Zellen und Beladung mit Calcium-sensitiven Farbstoffen ...	50
3.5.5.2.2	Mikrofluorimetrische Bestimmung der Ca ²⁺ -Konzentration in Hepatozyten ..	51
3.5.6	Untersuchungen zur Phosphorylierung von Bad an Serin 136 durch PCB 153	52
3.5.6.1	Kultivierung von Primärhepatozyten	52
3.5.6.2	Lyse der Zellen und Immunpräzipitation	53
3.5.6.3	Nachweis im Western Blot	53
3.5.7	Caspase-3-Aktivierung durch Etoposid, Camptothecin und MNNG	54
3.5.7.1	Kultivierung von Primärhepatozyten	54
3.5.7.2	Lyse der Zellen	55
3.5.7.3	Caspase-3-Assay	55
3.5.8	Fluoreszenzmikroskopische Detektion apoptotischer Zellkerne nach MNNG- Behandlung	57
3.5.8.1	Kultivierung von Primärhepatozyten	57
3.5.8.2	Zellfixierung und Färbung	57
3.5.8.3	Charakterisierung und Quantifizierung apoptotischer Zellkerne	57
3.5.9	Einfluss von PCBs, Phenobarbital und TCDD auf die MNNG-induzierte	58
	Caspase-3-Aktivierung	58
3.5.9.1	Kultivierung von Primärhepatozyten	58
3.5.10	Einfluss von Phenobarbital, PCB 153, TCDD und PCB 126 auf die MNNG- induzierte Cytochrom c-Freisetzung	59
3.5.10.1	Kultivierung von Primärhepatozyten	59
3.5.10.2	Lyse der Zellen	59
3.5.10.3	Nachweis im Western Blot	60
3.5.11	Statistische Auswertung	60
3.6	Initiations-Promotions-Studie mit PCB 28 und PCB 101	61
3.6.1	Versuchstiere und Versuchstierhaltung	61
3.6.2	Behandlung der Tiere	61
3.6.3	Fixierung des Lebergewebes	62
3.6.4	Bestimmung des PCB-Gehaltes in der Leber	63
3.6.5	Herstellung von Gewebeschnitten und immunhistochemische Untersuchung	64
3.6.5.1	ATPase-Färbung	64
3.6.5.2	GSTP/BrdU-Doppelfärbung	64
3.6.6	Quantifizierung präneoplastischer Läsionen und Bestimmung der DNA- Synthese	65
3.6.7	Fluorimetrische Bestimmung der EROD- und PROD-Aktivität	65
3.6.8	Statistische Auswertung	67
4	Ergebnisse	68
4.1	Untersuchungen zur Wirkung von ‚nicht-dioxinartigen‘ PCBs in	68
	primären Hepatozyten der Ratte	68
4.1.1	Einfluss von PCB 153 auf die Calcium-Homöostase in primären Hepatozyten	68
4.1.1.1	Wirkung auf isolierte Membranfraktionen der Rattenleber	68
4.1.1.2	Mikrofluorimetrische Calcium-Messung in primären Hepatozyten	71
4.1.2	Untersuchungen zur Phosphorylierung von Bad an Serin 136 durch PCB 153	77
4.1.3	Caspase-3-Aktivierung durch Etoposid, Camptothecin und MNNG	82
4.1.3.1	Caspase-3-Aktivierung durch Etoposid	82
4.1.3.2	Caspase-3-Aktivierung durch Camptothecin	83
4.1.3.3	Caspase-3-Aktivierung durch MNNG	84
4.1.3.4	Fluoreszenzmikroskopische Detektion apoptotischer Zellkerne nach MNNG- Behandlung	87

4.1.4	Einfluss von Phenobarbital, PCB 153, TCDD und PCB 126 auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung	88
4.1.4.1	Einfluss von Phenobarbital auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung	89
4.1.4.2	Einfluss von PCB 153 auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung.....	90
4.1.4.3	Einfluss von TCDD auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung	92
4.1.4.4	Einfluss von PCB 126 auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung.....	93
4.1.5	Einfluss von Phenobarbital, PCB 153, TCDD und PCB 126 auf die MNNG-induzierte Ausschüttung von Cytochrom c	94
4.2	Initiations-Promotions-Studie mit PCB 28 und PCB 101.....	96
4.2.1	Futteraufnahme und Gewichtszunahme der Tiere	97
4.2.2	Bestimmung des relativen Lebergewichts.....	99
4.2.3	Bestimmung des PCB-Gehaltes der Leber.....	100
4.2.4	Induktion der EROD und PROD.....	101
4.2.5	Quantifizierung präneoplastischer Läsionen.....	103
4.2.6	Bestimmung der DNA-Synthese in Präneoplasien	108
5	<i>Diskussion</i>	109
5.1	Untersuchungen zur Wirkung von ‚nicht-dioxinartigen‘ PCBs in.....	109
	primären Hepatozyten der Ratte.....	109
5.1.1	Einfluss von PCB 153 auf die Calcium-Homöostase in Hepatozyten	109
5.1.2	Untersuchungen zur Phosphorylierung von Bad an Ser 136 durch PCB 153	112
5.1.3	Caspase-3-Aktivierung durch Etoposid, Camptothecin und MNNG, und.....	113
	fluoreszenzmikroskopische Detektion apoptotischer Zellkerne nach MNNG-Behandlung.....	113
5.1.4	Einfluss von Phenobarbital, PCB 153, TCDD und PCB 126 auf die MNNG-115	
	induzierte Caspase-3-Aktivierung und Ausschüttung von Cytochrom c	115
5.2	Untersuchung der tumorpromovierenden Wirkung von PCB 28	117
	und PCB 101 im Initiations-Promotions-Experiment.....	117
6	<i>Zusammenfassung</i>.....	121
7	<i>Literaturverzeichnis</i>	123
8	<i>Anhang</i>	144
8.1	Toxizitätsäquivalenzfaktoren für PCDD/PCDF und ‚dioxinartige‘	144
	PCBs	144
8.2	IUPAC-Nomenklatur der PCBs.....	145
8.3	Strukturformeln der verwendeten PCBs	146

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1: Vereinfachtes Mehrstufenmodell der Karzinogenese
- Abb. 1.2: Morphologisch sichtbare Zellveränderungen während der Apoptose und Nekrose nach Kerr, 1995
- Abb. 1.3: Vereinfachte Darstellung apoptotischer Signalwege
- Abb. 1.4: Strukturformel von Phenobarbital
- Abb. 1.5: Allgemeine Strukturformel der PCDD und PCDF
- Abb. 1.6: Strukturformel von TCDD
- Abb. 1.7: Schematische Darstellung der AhR-vermittelten Genexpression durch Induktion mit AhR-Liganden
- Abb. 1.8: Allgemeine Strukturformel der PCBs
- Abb. 1.9: Schematische Übersicht über die Ca^{2+} -Homöostase der Zelle
- Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Proteintransfers mit dem ‚semi-dry-Blotting‘
- Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Immunoblots
- Abb. 3.3: Strukturformeln der Spinsonden 5-Doxyl-Stearinsäure und 16-Doxyl-Stearinsäure
- Abb. 3.4: Strukturformel des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2/AM
- Abb. 3.5: Anregungsspektren und Emissionsspektren von freiem Fura-2 und Ca^{2+} -gebundenem Fura-2
- Abb. 3.6: Strukturformeln von Etoposid, Camptothecin und MNNG
- Abb. 3.7: Schematische Darstellung der Substratspaltung durch aktive Caspasen
- Abb. 3.8: Behandlungsschema des Initiations-Promotionsexperiments
- Abb. 3.9: Oxidative Dealkylierung von 7-ER bzw. 7-PR zu Resorufin
- Abb. 4.1: ESR-Spektrum einer mit 16-Doxyl-Stearinsäure markierten Membranfraktion
- Abb. 4.2: ESR-Spektren von 5-Doxyl-Stearinsäure markierten Membranfraktionen
- Abb. 4.3: ESR-Spektren von 16-Doxyl-Stearinsäure markierten Membranfraktionen
- Abb. 4.4 - Abb. 4.5: Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Applikation von ATP
- Abb. 4.6: Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Applikation von ATP und Cyclopiazonsäure
- Abb. 4.7 - Abb. 4.8: Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Applikation von PCB 153
- Abb. 4.9: Einfluss von Tumorpromotoren auf die Phosphorylierung von Bad an Ser 136
- Abb. 4.10: Einfluss von PCB 153 auf die Phosphorylierung von Bad an Ser 136
- Abb. 4.11: Caspase-3-Aktivierung durch Etoposid

-
- Abb. 4.12: Caspase-3-Aktivierung durch Camptothecin
- Abb. 4.13 Caspase-3-Aktivierung durch MNNG
- Abb. 4.16:
- Abb. 4.17: Induktion der Apoptose durch MNNG
- Abb. 4.18 Einfluss von Phenobarbital auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung
- Abb. 4.19:
- Abb. 4.20 Einfluss von PCB 153 auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung
- Abb. 4.21:
- Abb. 4.22 Einfluss von TCDD auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung
- Abb. 4.24:
- Abb. 4.25 Einfluss von PCB 126 auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung
- Abb. 4.26:
- Abb. 4.27: Cytochrom c-Freisetzung durch MNNG
- Abb. 4.28: Futteraufnahme eines Tieres pro Woche bei Behandlung mit PCB 28 und 101 über acht Wochen
- Abb. 4.29: Futteraufnahme eines Tieres pro Woche bei Behandlung mit PCB 28 und 101 über sechzehn Wochen
- Abb. 4.30 Gewichtszunahme der Tiere über den gesamten Behandlungszeitraum
- Abb. 4.31:
- Abb. 4.32: Induktion der EROD-Aktivität
- Abb. 4.33: Induktion der PROD-Aktivität
- Abb. 4.34: Zahl der ATPase-negativen Foci pro cm^3 Leber (Fullman)
- Abb. 4.35: Zahl der ATPase-negativen Foci pro cm^3 Leber (Saltykov)
- Abb. 4.36: ATPase-negatives Focusvolumen
- Abb. 4.37: ATPase-negativer Focus
- Abb. 4.38: Zahl der GSTP-positiven Foci pro cm^3 Leber (Fullman)
- Abb. 4.39: Zahl der GSTP-positiven Foci pro cm^3 Leber (Saltykov)
- Abb. 4.40: GSTP-positives Focusvolumen
- Abb. 4.41: GSTP-positiver Focus
- Abb. 8.1: Strukturformeln der verwendeten PCBs

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Charakteristische morphologische und biochemische Unterschiede von Apoptose und Nekrose
Tabelle 3.1:	Auflistung der verwendeten Chemikalien
Tabelle 3.2:	Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien
Tabelle 3.3:	Herstellung der Grundmedien DMEM und Waymouth
Tabelle 3.4:	Zusammensetzung von ITS und ITS ⁺
Tabelle 3.5:	Zusammensetzung der Kulturmedien NIH _A und NIH _B
Tabelle 3.6:	Zusammensetzung der Kulturmedien HSM und HAM
Tabelle 3.7:	Zusammensetzung der Perfusionslösungen
Tabelle 3.8:	Kultivierung von Hepatozyten auf kollagenierten Gewebekulturschalen
Tabelle 3.9:	Kultivierung von Hepatozyten auf Kollagengelen und im Kollagengelsandwich
Tabelle 3.10:	Pipettierschema AFC-Eichgerade
Tabelle 3.11:	Pipettierschema zur Messung der Caspase-3-Aktivität
Tabelle 3.12:	Behandlung der Versuchsgruppen im Initiation-Promotionsexperiment
Tabelle 3.13:	Pipettierschema zur Bestimmung der EROD- bzw. PROD-Aktivität
Tabelle 4.1:	Phosphorylierung von Bad an Ser 136 durch Insulin und EGF
Tabelle 4.2:	Phosphorylierung von Bad an Ser 136 durch Insulin, EGF und PCB 153
Tabelle 4.3:	Behandlung der Versuchsgruppen und Anzahl der Tiere
Tabelle 4.4:	Relatives Lebergewicht
Tabelle 4.5:	PCB-Gehalte der Leber nach 8 Wochen Behandlungsdauer
Tabelle 4.6:	PCB-Gehalte der Leber nach 16 Wochen Behandlungsdauer
Tabelle 4.7:	Zahl der Foci pro cm ³ Leber und Focusvolumen nach 8 Wochen Behandlungsdauer
Tabelle 4.8:	Zahl der Foci pro cm ³ Leber und Focusvolumen nach 16 Wochen Behandlungsdauer
Tabelle 4.9:	BrdU-positive Zellkerne
Tabelle 8.1:	Toxizitätsäquivalenzfaktoren (TEF) für PCDD und PCDF
Tabelle 8.2:	Toxizitätsäquivalenzfaktoren (TEF) für dioxinartige PCBs
Tabelle 8.3:	IUPAC-Nummern und Position der Chloratome aller PCB-Kongenerne

Abkürzungsverzeichnis

2-AAF	2-Acetylaminofluoren
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
ADP	Adenosintriphosphat
AFC	7-Amino-4-trifluormethyl-cumarin
AhR	aryl hydrocarbon-Rezeptor
AhRE	AhR responsive element
ALDH	Aldehyddehydrogenase
AM	Acetoxymethylester
AP-1	activator protein-1
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor-1
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B cell lymphoma/leukemia-2
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
Bid	Bcl-2 homolog 3 interacting domain death agonist
bp	Basenpaar
BrdU	Bromdeoxyuridin
BSA	bovine serum albumin
CAD	Caspase-activated Dnase
CaMK	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase
CAR	constitutive androstane receptor
Caspase	Aspartat-spezifische Cystein Protease
CDK	cyclin dependent kinase
CHAPS	3-[3-(Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propansulfonat
CHO	Aldehyd
COX 2	Cyclooxygenase 2
CPA	Cyclopiazonsäure
CYP	Cytochrom P450
Cyt c	Cytochrom c
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DD	death domain
DDT	Dichlor-diphenyl-trichlorethan
DED	death effector domain
DEN	Diethylnitrosamin
DEVD	Asp-Glu-val-Asp
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DR	death receptor
DRE	dioxin responsive element
DRL	death receptor ligand
DTT	Dithiotreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
Em	Emission
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EROD	7-Ethoxyresorufin- <i>o</i> -deethylase

ESR	Elektronen Spin Resonanz
Ex	Exzitation
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
GF	growth factor
γGT	γ-Glutamyl-Transpeptidase
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-triphosphat
h	Stunden
HAM	hepatocyte apoptosis medium
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	horse radish peroxidase
HSM	hepatocyte seeding medium
hsp	heat shock protein
IARC	International Agency for Research on Cancer
IP ₃ R	Inositol-1,4,5-triphosphatrezeptor
ITS	Insulin, Transferrin, Selenige Säure
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
mA	Milliampere
MAPKK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase
mdm-2	mouse-double-minute-2
min	Minuten
MNNG	<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -Nitro- <i>N</i> -Nitrosoguanidin
MOCC	mechanically operated Ca ²⁺ channel
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NF-κB	nuclear factor-κB
NIH	National Institute of Health
NP-40	Nonidet P-40
NQO	Chinonoxidoreduktase
8-oxo-dG	Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	per-arrt-sim
PB	Phenobarbital
PBREM	phenobarbital-responsive-enhancer-module
PBS	phosphate buffered saline
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCDD	Polychlorierte Dibenzodioxine
PCDF	Polychlorierte Dibenzofurane
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	cAMP-abhängige Protein Kinase
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PKG	cGMP-abhängige Protein Kinase
PMCA	Plasmamembran Ca ²⁺ -ATPase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PROD	7-Pentoxyresorufin- <i>o</i> -depentylase
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
PTP	permeability transition pore

PVDF	Polyvinylidendifluorid
RACC	receptor activated Ca ²⁺ channel
Rb	Retinoblastom
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
RyR	Ryanodinrezeptor
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERCA	smooth ER Ca ²⁺ -ATPase
Tab.	Tabelle
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
TDI	tolerable daily intake
TEF	TCDD equivalency factors
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TEQ	TCDD equivalence
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
UV	ultraviolette Strahlung
V	Volt
VOCC	voltage operated Ca ²⁺ channel
W	Watt
WHO	World Health Organisation
XAP2	hepatitis B virus X-associated protein
XRE	xenobiotic responsive element

1 *Einleitung*

1.1 Chemische Karzinogenese

1.1.1 Mehrstufenmodell der Karzinogenese

Die Tumorentstehung (Karzinogenese) stellt einen mehrstufigen Prozess dar, der in die Phasen Initiation, Promotion und Progression unterteilt wird (Scherer, 1984).

Im ersten Schritt, der Initiation, kommt es zu einer persistenten Veränderung der DNA durch Einwirkung von Strahlung und genotoxischen chemischen Karzinogenen, wie zum Beispiel *N*-Nitrosoverbindungen, heterozyklischen aromatischen Aminen und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, aber auch durch spontane Mutationen. Erfolgt keine Behebung des DNA-Schadens durch intrazelluläre Reparaturmechanismen und bleibt die Eliminierung der geschädigten Zellen durch den programmierten Zelltod (Apoptose) aus, so wird der Schaden bei einer Zellteilung als Mutation fixiert (Cayama *et al.*, 1974; Pitot und Sirica, 1980). Die DNA-Veränderungen können entweder durch die Chemikalie selbst (direktes Karzinogen) oder durch ihre Metabolite (indirektes oder ultimales Karzinogen) ausgelöst werden.

In der folgenden Phase der Promotion kommt es in Gegenwart von Substanzen mit tumorpromovierender Wirkung zur klonalen Expansion der initiierten Zellen (Schulte-Hermann, 1985). Diese selektive Vermehrung führt in der Leber zur Bildung von sogenannten präneoplastischen Herden (Foci), die sich zu benignen Neoplasien (Noduli) weiterentwickeln (Pitot *et al.*, 1978; Schwarz und Greim, 1986), wobei das Risiko einer Entstehung eines malignen Tumors mit der Anzahl der Präneoplasien und deren relativer Größe korreliert ist (Pitot und Sirica, 1980; Rabes *et al.*, 1982; Schulte-Hermann, 1985).

In der Leber können präneoplastische Läsionen durch veränderte Enzymaktivitäten von normalen Leberzellen histochemisch und immunhistochemisch unterschieden werden, z. B. durch verminderte Aktivität der Adenosin-5'-triphosphatase (ATPase) (Börner und Gössner, 1968), geringere Aktivität der Glukose-6-Phosphatase (Gössner und Friedrich-Frekka, 1964), einer gesteigerten Expression der plazentaren Form der Glutathion-S-Transferase (GSTP) (Pitot *et al.*, 1978; Satoh *et al.*, 1984, 1985) oder einer vermehrten Expression von γ -Glutamyl-Transpeptidase (γ GT) (Kalengayi *et al.*, 1975; Fiala *et al.*, 1984).

Zur Entwicklung präneoplastischer Foci ist die Einwirkung des Tumorpromotors über einen längeren Zeitraum erforderlich. Das promovierende Wachstum bleibt aus, wenn die Dosis des Promotors zu niedrig oder die Dauer nicht ausreichend ist.

Beispiele für Tumorpromotoren der Leber sind 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin, Polychlorierte Biphenyle, Dichlor-diphenyl-trichlorethan (DDT), Lindan, Phenobarbital, Steroidhormone und Peroxisomenproliferatoren. Eine Gemeinsamkeit der genannten Substanzen besteht in einer Wirkung über spezifische zelluläre Rezeptoren, die zur Induktion von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen führen, sowie in einer Vergrößerung der Leber.

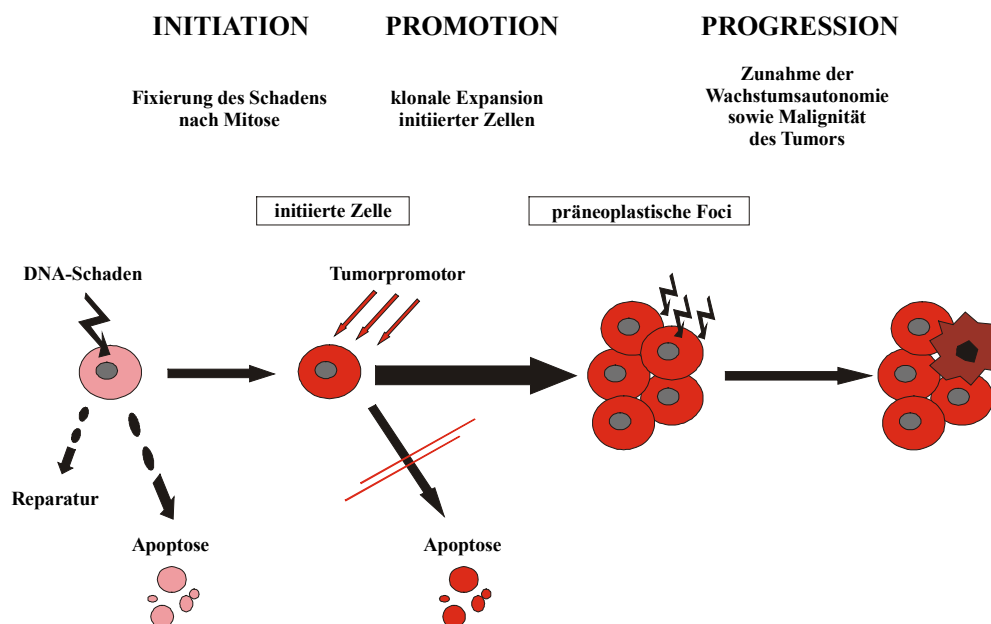


Abb. 1.1: Vereinfachtes Mehrstufenmodell der Karzinogenese. Ein gentoxisches Ereignis führt nach der Zellteilung zur Fixierung einer Mutation (Initiation). Durch die Einwirkung einer Substanz mit tumorpromovierender Wirkung kommt es zum selektiven Wachstum dieser Tumorvorläuferzellen durch Hemmung des programmierten Zelltodes (Promotion). Durch Anhäufung weiterer Mutationen steigt der Malignitätsgrad (Progression).

Substanzen, die sowohl initiiende als auch promovierende Eigenschaften besitzen, bezeichnet man als komplette Karzinogene. Als epigenetische Karzinogene bezeichnet man Stoffe, die nach chronischer Gabe zur Entstehung maligner Tumoren führen können, ohne eine gentoxische Läsion hervorzurufen. Diese nicht-gentoxischen Karzinogene zeigen meist tumorpromovierende Eigenschaften.

Die letzte Phase der Karzinogenese, die Progression, ist durch weitere genetische Veränderungen in präneoplastischen Zellen charakterisiert. Durch Anhäufung von Mutationen kommt es zur Umwandlung von benignen zu malignen Tumoren (Pitot, 1989).

In der Phase der Progression treten gehäuft Chromosomenanomalien auf. Ein selektiver Marker für die Progressionsphase in Hepatozyten scheint nach Pitot *et al.* (1996) eine erhöhte Expression von Transforming Growth Factor α (TGF α) zu sein.

1.1.2 Bedeutung der Apoptose in der Hepatokarzinogenese

Die Apoptose ist eine physiologische Form des Zelltodes, die über die Aktivierung eines genetisch determinierten Selbstmordprogramms initiiert wird. Durch seine charakteristischen morphologischen Veränderungen ist das aktive Sterben der Zelle vom nekrotischen Zelltod abzugrenzen und wurde erstmals 1972 von Kerr *et al.* als ‚Apoptose‘ bezeichnet.

Eine wichtige Rolle spielt die Apoptose sowohl während der embryonalen Entwicklung als auch im erwachsenen Organismus zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase.

Als Gegenspieler zur Mitose übernimmt sie die Aufgabe der Regulation der Zellproliferation in einem Verband von Zellen. Viele Krankheitsbilder wie z. B. AIDS, neurodegenerative Erkrankungen, Autoimmunkrankheiten, Virusinfektionen und Krebs, zeigen eine hoch- oder herabregulierte Apoptoserate (Thompson, 1995).

Im Prozeß der Karzinogenese wird der Hemmung der Apoptose eine wichtige Rolle zugeschrieben. Erfolgt nach genotoxischer Läsion keine Reparatur des DNA-Schadens und keine Eliminierung der geschädigten Zelle, kommt es nach Teilung der Zelle zur Fixierung des Schadens als Mutation (Cayama *et al.*, 1974; Pitot und Sirica, 1980).

Präneoplastische Zellpopulationen zeigen sowohl eine erhöhte Zellteilungsrate als auch eine erhöhte Apoptoserate (Schulte-Hermann *et al.*, 1981, 1990). Eine Vergrößerung dieser Zellpopulationen verläuft ohne Wirkung eines Tumorpromotors nur sehr langsam. Die tumorpromovierende Wirkung wurde zunächst nur auf eine Stimulierung der Zellteilung zurückgeführt.

Am Beispiel des Tumorpromotors Phenobarbital konnte von Schulte-Hermann *et al.* (1982, 1990) und Bursch *et al.* (1984) gezeigt werden, dass auch eine verstärkte Hemmung der Apoptose in Präneoplasien zu einer höheren Nettoproliferation führt.

Tumorpromotoren zeigen sich somit in der Rattenleber als ‚survival factors‘ für präneoplastisch veränderte Zellen, indem sie deren Elimination unterdrücken (Schulte-Hermann *et al.*, 1995). Im Prozeß der Karzinogenese übernimmt die Apoptose somit eine Schlüsselrolle.

1.1.3 Proliferationskontrolle – Protoonkogene und Tumorsuppressorgene

Mit fortschreitender Malignität entziehen sich Tumorzellen einer extrazellulären Wachstumskontrolle. Verantwortlich hierfür sind Mutationen in wachstumsregulierenden Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen.

Protoonkogene oder zelluläre Onkogene (c-Onkogene) kodieren für wachstumsregulierende Proteine wie Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, GTP-bindende Proteine, Proteinkinasen oder Transkriptionsfaktoren. Homologe Onkogene wurden ursprünglich in Retroviren gefunden (v-Onkogene) und sind für deren krebserzeugende Wirkung verantwortlich (Bishop, 1983, 1987).

Die Aktivierung von Protoonkogenen zu Onkogenen durch Mutationen, Amplifikationen oder Translokationen führt zum Verlust der Regulation wichtiger Zellfunktionen.

Beispiele für potentielle Onkogene sind *ras*-Gene, die für GTP-bindende Proteine kodieren und im Falle einer Mutation für die Zelle ein fortlaufendes Proliferationssignal bedeuten (Barbacid, 1987), sowie die für Transkriptionsfaktoren kodierenden *c-jun* und *c-fos* (Ransome und Verma, 1990). Das Protoonkogen *bcl-2* (**B** cell lymphoma/leukemia-2) zeigt eine Überexpression in B-Zell-Lymphomen durch chromosomale Translokation (Payne *et al.*, 1995). Es ist namensgebend für eine große Familie von pro- und antiapoptotischen Proteinen (Nuñez und Clarke, 1994).

Genprodukte von Tumorsuppressorgenen zeigen inhibierende Funktionen in der Wachstumskontrolle von Zellen. Mutationen in diesen Genen führen erst zum Verlust der Proliferationskontrolle, wenn beide Allele davon betroffen sind (Levine, 1993).

Zu den ersten entdeckten Tumorsuppressorgenen gehört *Rb*, das bei einem Gendefekt zum Retinoblastom führt, einem Tumor der Retina, der bei Kindern auftritt. Das **Retinoblastom**protein pRb ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus und bindet Cycline, die regulatorischen Untereinheiten der Cyclin-abhängigen Protein Kinasen (cyclin dependent kinase, CDK). Im hypophosphorylierten Zustand blockiert es den Eintritt in die S-Phase, nach Hyperphosphorylierung durch Cyclin-CDK-Komplexe wird die Replikation eingeleitet (Riley *et al.*, 1994; Taya, 1997).

In 50 % aller menschlichen Karzinome zeigt das Tumorsuppressorgen *p53*, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert, Mutationen (Levine, 1993, 1997). P53 übernimmt im Zellzyklus eine Wächterfunktion und kann die Zellen in der G₁- und G₂-Phase arretieren.

Die Regulation erfolgt über eine vermehrte Bildung des Proteins sowie der Aktivitätssteigerung durch Phosphorylierung. Die Bildung von MDM-2 (**m**ouse **d**ouble **m**inute-**2**) nach Induktion durch p53 führt nach Interaktion beider Proteine zu einem beschleunigten Abbau von p53. Zur Zellzyklusarretierung induziert p53 die Bildung des CDK-Inhibitors p21, die Hyperphosphorylierung von pRb bleibt aus und die Replikation ist blockiert (Liebermann *et al.*, 1995; Graña und Reddy, 1995). Der G₁-Arrest ermöglicht die Reparatur von DNA-Schäden oder die Einleitung des Zelltodes durch die Induktion von Bax, einem proapoptotischen Protein der Bcl-2-Familie.

1.2 Apoptose – der programmierte Zelltod

1.2.1 Morphologische und biochemische Charakteristika

Der Prozeß des physiologischen Zelltodes kann in mehrere Phasen unterteilt werden. In der frühesten Phase erhält die Zelle einen externen oder internen Stimulus, der in der zweiten Phase aufgenommen und über intrazelluläre Signalketten weitergeleitet wird. Die darauf folgende Effektorphase umfasst Proteasen, die während der Apoptose aktiviert werden, sowie ihre positiven und negativen Regulatoren. Für die letzte Phase, die *post-mortem* Phase, ist der Abbau der DNA charakteristisch (Vaux und Strasser, 1996).

Die charakteristischen morphologischen Veränderungen der Apoptose beginnen mit dem Verlust von Zell-Zell-Verbindungen. Zeitgleich setzt eine Kondensation des Zytoplasmas ein und das Chromatin des Zellkerns kondensiert an der Kernmembran (Abb. 1.2, **2**). Zellschrumpfung und Lappung der Zelle („membrane blebbing“) setzen sich fort bis zur vollständigen Fragmentierung der Zelle in membranumschlossene apoptotische Körperchen („apoptotic bodies“), welche noch intakte Organelle und Kernfragmente enthalten (Abb. 1.2, **3**). Anschließend kommt es zur Phagozytose und lysosomalem Verdau der apoptotischen Körperchen durch umliegende Zellen oder Makrophagen (Abb. 1.2, **4-6**) (Schwartzman und Cidlowski, 1993; Kerr, 1995). Diese Beseitigung der Zellbruchstücke verhindert das Auftreten inflammatorischer Prozesse, wie man sie beim nekrotischen Zelltod beobachten kann.

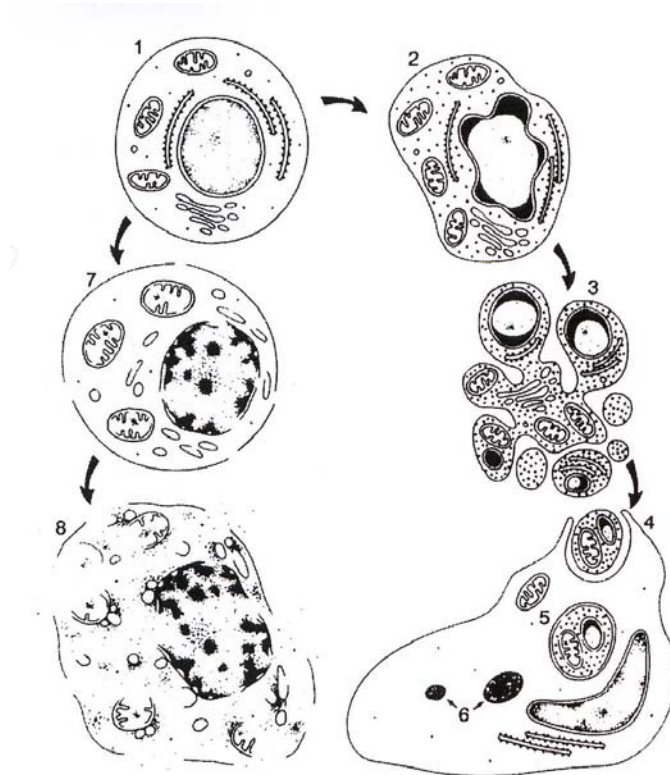


Abb. 1.2: Morphologisch sichtbare Zellveränderungen während der Apoptose (2-6) und Nekrose (7, 8) nach Kerr, 1995. (1) zeigt eine normale Zelle. Das Cytoplasma beginnt sich zu kondensieren und das Chromatin im Zellkern kondensiert an der Kernmembran (2). Die Kondensation setzt sich fort bis zur Fragmentierung der Zelle in apoptotische Körperchen (3), die von anderen Zellen phagozytiert (4) und in Lysosomen verdaut werden (5, 6). Der nekrotische Zelltod beginnt mit einem Anschwellen von Organellen und der gesamten Zelle sowie einer ungeordneten Kondensation des Kernchromatins (7) bis schließlich alle Zellmembranen aufbrechen (8).

Charakteristisch für den nekrotischen Zelltod ist das Anschwellen des Zytoplasmas und der Organellen, vor allem der Mitochondrien, bis zur Zerstörung der Membranen (Abb. 1.2, 7 und 8). Das Kernchromatin kondensiert ungeordnet im gesamten Zellkern. Durch die Zerstörung der Zellmembranen wird der zytosmatische Inhalt freigegeben und eine Entzündungsreaktion ausgelöst (Schwartzman und Cidlowski, 1993).

Der Nachweis der Apoptose in einem frühem Stadium beruht auf dem Verlust der Phospholipid-Asymmetrie der Zellmembran durch Umlagerung von Phosphatidylserin an die Membranaußenseite (Martin *et al.*, 1995). Mit Hilfe von fluoreszierendem Annexin V, das an negativ geladene Phospholipide bindet, kann dieser Vorgang detektiert werden (Vermees *et al.*, 1995).

Die nachstehende Tabelle fasst die wichtigsten Unterschiede der beiden Formen des Zelltodes zusammen.

Tabelle 1.1:
Charakteristische morphologische und biochemische Unterschiede von Apoptose und Nekrose

Apoptose	Nekrose
Tod einzelner Zellen	Tod von Zellgruppen
Dauer nur einige Stunden	Dauer bis zu mehreren Tagen
Kondensation des Zytoplasmas und ‘membrane blebbing’, intakte Organellen	Zellschwellung, Anschwellung von Organellen
intakte Zellmembranen, Phosphatidylserin an der Außenseite	Zerstörung der Zellmembranen
kondensiertes Chromatin an der Kernmembran	kondensiertes, ungeordnetes Chromatin
Bildung einer DNA-Leiter durch Fragmentierung auf Vielfache von 185 Basenpaaren	Fragmentierung der DNA zufällig auf verschiedene Längen (‘Schmier’ im Elektrophoresegelel)
Auftreten von ‘apoptotic bodies’ mit anschließender Phagozytose	Lyse der Zelle und Freigabe des Zellinhalts
keine inflammatorischen Prozesse	inflammatorische Prozesse

Die kaskadenartige Aktivierung von proteolytischen Enzymen, sogenannten Caspasen, ist für die morphologischen Veränderungen im apoptotischen Prozeß verantwortlich. Caspasen gehören zur Familie der **Cystein-Proteasen**, die ihre Zielproteine spezifisch nach einem **Aspartatrest** schneiden (Wolf und Green, 1999). Von den 14 bisher in Säugetieren bekannten Caspasen spielen sieben eine bedeutende Rolle in der Aktivierung der Apoptose (Initiatorcaspasen) und in der Exekutionsphase (Effektorcaspasen). Sie werden als Zymogene mit einer kleinen und großen Untereinheit sowie einer Prodomäne synthetisiert. Zur Aktivierung der Caspasen und Bildung eines Heterotetramers werden die Untereinheiten durch proteolytische Prozessierung voneinander getrennt und die Prodomäne abgespalten.

Die Effektorcaspasen, Caspase-3, -6, und -7, sind in der Lage, eine Vielzahl von Proteinen zu prozessieren, die letztendlich alle funktionellen Bereiche der Zelle erfassen (Stroh und Schulze-Osthoff, 1998). So scheint der Abbau von Proteinen des Zytoskeletts für die morphologisch sichtbare Lappung und anschließende Fragmentierung der Zelle verantwortlich zu sein. Die für die Apoptose typische internukleosomale DNA-Fragmentierung in Fragmente von ca. 185 Basenpaaren, die im Agarosegelel als DNA-Leiter sichtbar wird (Whyllie *et al.* 1980), ist die Folge der durch Caspase-3-Prozessierung aktivierten Endonuklease CAD (**Caspase-activated DNase**) (Enari *et al.*, 1998).

Eine Spaltung von Zielproteinen, die in Zellzykluskontrolle und Replikation, Transkription und Translation, DNA-Reparaturmechanismen, Signaltransduktionswegen und morphologischer Struktur der Zelle eine Rolle spielen, zeigen deutlich die Irreversibilität dieser späten apoptotischen Phase.

1.2.2 Apoptotische Signalwege

Grundsätzlich unterscheidet man zwei apoptotische Signalwege, einen Weg über Todesrezeptoren und einen mitochondrialen Signalweg, wobei zwischen beiden Wegen auch eine Interaktion bestehen kann.

Nach spezifischer Ligandenbindung transmembranärer Todesrezeptoren der TNF- (tumor necrosis factor) Rezeptor-Superfamilie kommt es zur Rezeptortrimerisierung. Diese führt zur Rekrutierung von intrazellulären Rezeptor-assoziierten Proteinen mit sogenannten Todesdomänen (DD, death domain) zur Rezeptorbindung und Effektordomänen (DED, death effector domain) zur Rekrutierung von Procaspase-8 oder -10. Die inaktiven Procaspasen werden unmittelbar nach ihrer Bindung an die DED durch proteolytische Spaltung zu Caspase-8 bzw. -10 aktiviert und können eine Caspase-Kaskade in Gang setzen (Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996).

Neben dieser direkten Aktivierung von Effektorcaspasen durch Caspase-8 kann ein mitochondrialer Apoptoseweg mit einbezogen werden. Caspase-8 prozessiert hierzu Bid, ein proapoptisches Protein der Bcl-2-Familie. Das aktivierte Bid induziert Translokation, Oligomerisierung und den Einbau zweier weiterer proapoptischer Proteine, Bax und Bak, in die äußere Membran der Mitochondrien (Schmitz *et al.*, 1999). Die anschließende Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien führt zur Bildung des Apoptosom-Komplexes, bestehend aus Cytochrom c, Apaf-1 (apoptosis activating factor-1), Procaspase-9 und dATP (Li *et al.*, 1997). Die proteolytische Aktivierung der Caspase-9 führt anschließend zur Prozessierung von Effektorcaspasen.

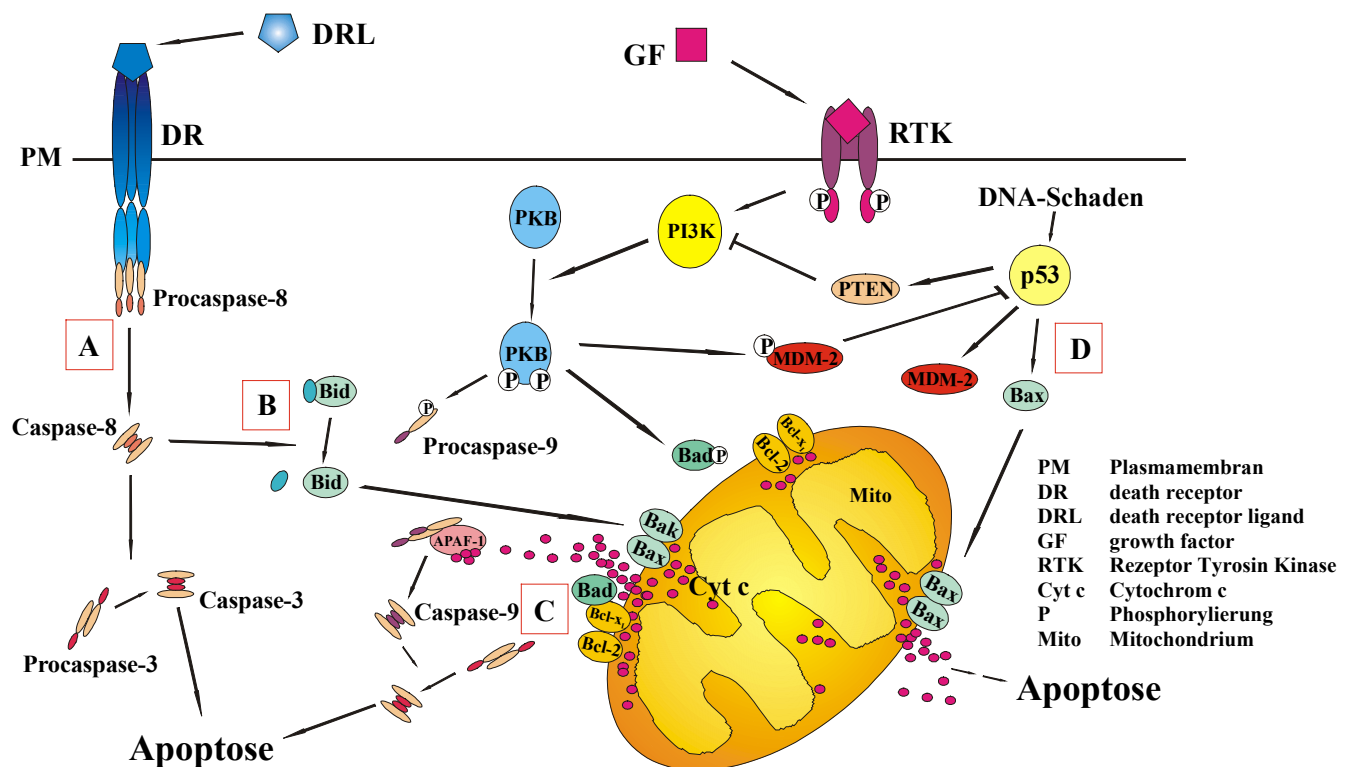


Abb. 1.3: Vereinfachte Darstellung apoptotischer Signalwege. Die Apoptose kann über Todesrezeptoren ausgelöst werden (A), mit der Möglichkeit eines mitochondrialen Seitenweges (B). Der PI3K/PKB-Signalweg (C) und der durch DNA-Schäden ausgelöste Signalweg über p53 (D) induzieren den apoptotischen Zelltod über die Mitochondrien.

Ein weiterer mitochondrialer Signalweg zur Induktion von Apoptose ist der Phosphatidylinositol-3-Kinase/Protein Kinase B (PI3K/PKB)-Weg. Bei Ausbleiben eines extrazellulären Wachstumsstimulus über Wachstumsfaktorrezeptoren der Zellmembran kann die PI3K nicht durch Rezeptortyrosinkinase aktiviert werden. Die Phosphorylierung der PKB findet nicht statt und ihre zahlreichen Zielproteine, zu denen das proapoptotische Bcl-2-Protein Bad und die Caspase-9 gehört, können nicht phosphoryliert und somit nicht inaktiviert werden. Die Zelle erhält das Signal zur Apoptose, denn Bad kann sich an der mitochondrialen Membran an das antiapoptotische Bcl-2 oder Bcl-x_L anlagern und die Homodimerisierung von Bax und die anschließende Freisetzung von Cytochrom c ermöglichen (Yang *et al.*, 1995; Zha *et al.*, 1996).

Die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 durch genotoxischen Stress kann die Bildung von Bax induzieren und ebenfalls auf mitochondrialem Weg zur Elimination von geschädigten Zellen führen (Zhan *et al.*, 1994). P53 greift auch regulierend in den PI3K/PKB-Signalweg ein, indem es die Bildung des PI3K-Inhibitors PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) induziert (Stambolic *et al.*, 2001).

1.3 Tumorpromotoren der Leber

1.3.1 Phenobarbital

Das Barbitursäurederivat Phenobarbital findet Anwendung als sedierendes, narkotisierendes und antikonvulsives Arzneimittel.

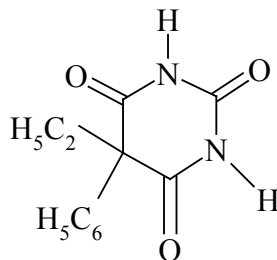


Abb. 1.4: Strukturformel von Phenobarbital

Die chronische Gabe von Phenobarbital führt in der Ratte zu Adenomen der Leber (Rossi *et al.*, 1977), in der Maus zu Adenomen und Karzinomen der Leber (Thorpe und Walker, 1973). Phenobarbital zeigt in der Rattenleber ein starkes tumorpromovierendes Potential, welches organ- und speziesspezifisch ist (Peraino *et al.*, 1971; Kristiansen *et al.*, 1989). In einem Initiations-Promotions-Experiment an der Ratte mit klinisch relevanten Dosen der Substanz wurden Tumoren der Leber gefunden, eine alleinige Behandlung mit Phenobarbital zeigte keine Effekte (Peraino *et al.*, 1975, 1980).

Am Beispiel des Tumorpromotors Phenobarbital konnte von Schulte-Hermann *et al.* (1982, 1990) und Bursch *et al.* (1984) gezeigt werden, dass eine erhöhte Proliferationsrate in präneoplastischen Zellpopulationen nicht nur durch einen mitogenen Stimulus, sondern auch durch eine verstärkte Hemmung der Apoptose erfolgt. Eine erhöhte Proliferation findet man auch im normalen Gewebe.

In vitro-Studien in primären Rattenhepatozyten zeigten eine Hemmung der UV-Licht induzierten Apoptose nach Phenobarbital-Behandlung (Wörner und Schrenk, 1996; Bohnenberger *et al.*, 2001).

Phenobarbital spielt eine wichtige Rolle in der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme, hauptsächlich verschiedener Isoenzyme der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP), die an Funktionalisierungsreaktionen von Fremdstoffen beteiligt sind.

In der Nagerleber sind die Isoenzyme CYP2B1 und CYP2B2 durch Phenobarbital stark induzierbar und können somit den Umsatz von Substraten beeinflussen (Schulte-Hermann *et al.*, 1986). Auch in Rattenhepatozyten in Primärkultur konnte die Induktion dieser Isoenzyme nachgewiesen werden (Bohnenberger *et al.*, 2001).

Die Expression des menschlichen CYP2B6 ist sehr gering und auch durch Phenobarbital kaum induzierbar. CYP2C-Isoenzyme des Menschen, die ein sehr breites Spektrum unterschiedlichster Substrate metabolisieren, zeigen eine Induktion nach Behandlung mit Phenobarbital. Auch das mengenmäßig wichtigste Isoenzym der humanen Leber, CYP3A4, ist durch das Barbiturat induzierbar.

Die Regulation der CYP2B-Genexpression erfolgt in der Nagerleber über den **constitutive androstane receptor (CAR)**, der im inaktiven Zustand gebunden an Hsp90 (**heat shock protein 90**) im Zytoplasma der Zelle lokalisiert ist und in Anwesenheit von Phenobarbital oder ähnlichen Induktoren in den Zellkern transloziert. CAR heterodimerisiert mit dem **retinoid X receptor (RXR)** und der CAR-RXR-Komplex kann als Transkriptionsfaktor mit dem sogenannten **phenobarbital-responsive enhancer module (PBREM)** wechselwirken und die Transkription von CYP2B starten (Sueyoshi und Negishi, 2001).

Kawamoto *et al.* (1999) konnten in einer Mäusestudie nach Phenobarbital-Behandlung die Anreicherung von CAR in Hepatozyten-Zellkernen mit Western-Blot-Analyse nachweisen.

Die Rekrutierung der **Protein Phosphatase 2A (PP2A)** scheint im Prozess der Translokation von CAR eine wichtige Rolle zu spielen, genaue Mechanismen sind jedoch noch nicht geklärt (Yoshinari *et al.*, 2003).

Marc *et al.* (2000) konnten zeigen, daß die **Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase (CaMK)** einen positiven Effekt auf die CYP2B9/10 Induktion in der Maus hat. Längere Behandlungen mit Phenobarbital führten zu einem intrazellulären Ca²⁺-Anstieg. Die **cGMP-abhängige Protein Kinase (PKG)** zeigte ebenfalls einen positiven induzierenden Effekt, wohingegen sich die **cAMP-abhängige Protein Kinase (PKA)** negativ auf die CYP-Induktion auswirkte. **Protein Kinase C (PKC)**, **Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase (MAPKK)** und **PI3K** scheinen in der Induktion von CYP2B keine Rolle zu spielen.

Phenobarbital ist in der Lage in der Rattenleber die Expression des Protoonkogens *c-fos* zu steigern, was im Hinblick auf einen möglichen mitogenen Stimulus von Phenobarbital von Bedeutung sein könnte (Bitsch *et al.*, 1999).

1.3.2 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin

1.3.2.1 Struktur, Eigenschaften und Belastungspfade

Polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine und Dibenzofurane (PCDD/PCDF) bilden eine Gruppe chlorierter organischer Verbindungen, die aus 75 PCDD-Kongeneren und 135 PCDF-Kongeneren besteht. Das Grundgerüst der PCDD besteht aus zwei Benzolringen, die durch zwei Etherbrücken verknüpft sind. Die Unterscheidung der einzelnen Kongenere erfolgt nach dem Chlorierungsgrad und dem Ort der Substitution.

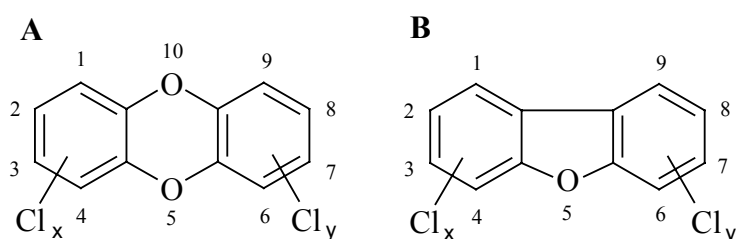


Abb. 1.5: Allgemeine Strukturformel der PCDD (A) und PCDF (B)

Die Verbindungen dieser Substanzklasse wurden niemals gezielt industriell produziert, sondern entstehen bei Verbrennungsprozessen in Anwesenheit von Chlor, sowie als Nebenprodukte bei der Synthese von chlororganischen Verbindungen wie z.B. Pentachlorphenol, Chlorphenoxyessigsäureverbindungen und Polychlorierten Biphenylen (PCB) (IARC, 1997).

Kongenere mit Halogensubstitution in den 2,3,7,8-Positionen zeigen die größte biologische und toxische Wirkung. Zur Bewertung der Wirkungsstärke der einzelnen Verbindungen bzw. Verbindungsgemische wurden sogenannte Toxizitätsäquivalente (TEQ) eingeführt, die sich auf die relativ toxische Wirkung des am stärksten wirksamen Kongeners 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) beziehen und mit Hilfe eines Toxizitätsäquivalenzfaktors (TEF) wiedergegeben werden (van den Berg *et al.*, 1998; s. Anhang 8.1).

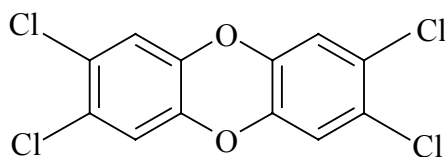


Abb. 1.6: Strukturformel von TCDD

Die Kontamination von Böden und Pflanzen führte weltweit zur Anreicherung von PCDD/PCDF im Fettgewebe von Nutztieren und über die Nahrungskette somit auch zur Belastung des Menschen. Durchschnittlich nimmt der erwachsene Organismus täglich 1-3 pg TEQ/kg Körpergewicht an PCDD, PCDF und dioxinähnlichen PCB auf, was im Bereich der von der WHO festgelegten tolerierbaren täglichen Aufnahme (TDI, tolerable daily intake) von 1-4 pg TEQ/kg Körpergewicht liegt (van den Berg *et al.*, 2000).

Aufgrund der hohen Lipophilie und der langsamen Metabolisierung von TCDD kommt es zur Akkumulation in der Leber und im Fettgewebe (van Birgelen, 2000). Die Halbwertszeit von TCDD liegt in einem Bereich von 5-10 Jahren (Beck *et al.*, 1989). Gesundheitlich bedenklich erscheint vor allem die hohe Belastung von Muttermilch und die daraus resultierende Akkumulation von PCDD/PCDF und PCBs in Säuglingen (Abraham *et al.*, 1994, 1996).

Die allgemeine Belastungssituation ist jedoch rückläufig, nach Untersuchungen von Wittsiepe *et al.* (2000), in denen Konzentrationen von PCDD/PCDF in menschlichen Blutproben von 1989-1998 analysiert wurden, zeigte sich für alle Kongenere eine Reduktion um etwa die Hälfte der Ausgangskonzentration.

1.3.2.2 Toxizität

TCDD zeigt in allen bisher untersuchten Spezies toxische Wirkungen, die jedoch große Speziesunterschiede in der Empfindlichkeit aufweisen. Zielorgane der Toxizität von TCDD sind bei Mensch und Tier vor allem Leber und Haut.

Bei akuten Expositionen des Menschen gegenüber TCDD, wie bei einem Unfall 1976 in einer italienischen Firma in Seveso, bei dem größere Mengen der Substanz freigesetzt wurden, zeigten sich persistente Hautveränderungen in Form von Chlorakne.

Nach Untersuchungen bei Unfällen mit hoher TCDD-Exposition fand man beim Menschen nur eine geringfügig erhöhte Tumorinzidenz (Fingerhut *et al.*, 1991). Als Zielorgane sind hier Leber, Respirationstrakt, das hämatopoetische System und Bindegewebe zu nennen, die Aussagen hierüber sind aber sehr unschlüssig, da andere Karzinogene als Störfaktoren nicht ausgeschlossen werden können. TCDD ist als Krebs erregend für den Menschen eingestuft (Gruppe 1; IARC, 1997).

Tierexperimente zur akuten Toxizität wurden überwiegend an Ratten durchgeführt und bewirken das sogenannte ‚wasting syndrome‘, eine verringerte Nahrungsaufnahme und einen starken Gewichtsverlust bis hin zum Tod der Tiere.

Des Weiteren wurde in tierexperimentellen Studien eine immunsuppressive Wirkung auf lymphoide Organe nachgewiesen, vor allem im heranwachsenden Organismus, die allerdings sehr große Speziesunterschiede aufzeigte (Kerkvliet und Burleson, 1994).

Auch teratogene und embryotoxische Wirkungen wurden in Tieren nach einer TCDD-Exposition beobachtet. Durch seine antiöstrogene Wirkung kann TCDD auch die Reproduktion beeinträchtigen (Gray *et al.*, 1997). Weitere wichtige Angriffspunkte sind die Regulation von Schilddrüsenhormonen und der Vitamin A-Stoffwechsel.

TCDD zeigt im Tierversuch ein erhöhtes hepatokarzinogenes Potential in weiblichen Ratten (Kociba *et al.*, 1978). Im Initiations-Promotions-Modell in der Rattenleber konnte TCDD eine tumorpromovierende Wirkung zugeschrieben werden (Pitot *et al.*, 1980), die durch eine Zunahme von enzym-veränderten Foci und Hepatomen charakterisiert war.

Verglichen mit anderen tumorpromovierenden Substanzen zeigt TCDD in der Nagerleber das stärkste tumorpromovierende Potential (Pitot *et al.*, 1980; Schrenk *et al.*, 1994). In der normalen Leber zeigt TCDD nur eine leicht gesteigerte Proliferation (Fox *et al.*, 1993), was auch für Hepatozyten *in vitro* gilt (Schrenk *et al.*, 1992).

Stinchcombe *et al.* (1995) konnten im Initiations-Promotions-Experiment eine geringfügig angestiegene Mitoserate in Präneoplasien der Leber nachweisen. Die Apoptoserate war im präneoplastischen Lebergewebe jedoch deutlich erniedrigt, das umliegende Normalgewebe zeigte keine Veränderungen.

In vitro-Experimente in primären Rattenhepatozyten zeigten eine Hemmung der durch UV-Licht oder 2-Acetylaminofluoren (2-AAF) induzierten Apoptose durch Zugabe von TCDD (Wörner und Schrenk, 1996). Die hemmende Wirkung von TCDD auf die UV-induzierte Apoptose konnte nicht nur morphologisch, sondern auch biochemisch durch eine Inhibierung der DNA-Fragmentierung und auf Proteinebene durch Verhinderung eines Anstiegs des Tumorsuppressors p53 aufgezeigt werden. Auch die alleinige Behandlung der Hepatozyten mit TCDD führte zu einem leichten Anstieg der Apoptoseinzidenz. Dieser Effekt war assoziiert mit einer leicht erhöhten DNA-Fragmentierung und einem Anstieg im p53-Proteinlevel.

Untersuchungen zur Hemmung der UV-Licht induzierten Apoptose durch TCDD in primären Rattenhepatozyten in der Kollagengel-Sandwichkultur konnten diese Ergebnisse bestätigen (Kunz, 2001). Auch hier zeigte sich durch alleinige TCDD-Gabe eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Apoptoseinzidenz.

Aus diesen Experimenten könnte man auf ein möglicherweise genotoxisches Potential von TCDD schließen, was im Prozess der Karzinogenese eine bedeutende Rolle spielen würde. Bisher konnte noch keine direkte genotoxische Wirkung von TCDD nachgewiesen werden, eine indirekte genotoxische Wirkung durch Induktion von CYP1A-Isoenzymen, in deren katalytischen Zyklus reaktive Sauerstoffspezies entstehen, wird diskutiert (Park *et al.*, 1996).

1.3.2.3 Mechanismen toxischer Wirkungen

Die Bindung von TCDD an einen zytosolischen Rezeptor, den Ah-Rezeptor (AhR, **aryl hydrocarbon receptor**), ist entscheidend für die Wirkung der Substanz. Der AhR gehört zur **per-arnt-sim-** (PAS) Familie der **basic-Helix-Loop-Helix-** (bHLH) Proteine und wurde bei verschiedenen Säugerspezies und Nicht-Säugetieren in zahlreichen Geweben gefunden (Burbach *et al.*, 1992; Ema *et al.*, 1992).

In der Ratte fand man den Rezeptor in Thymus, Lunge, Leber, Niere, Gehirn, Hoden und Skelettmuskel. Im menschlichen Organismus wurde er in Lunge, Leber, Niere, Plazenta, B-Lymphozyten und Tonsillen nachgewiesen (Landers und Bunce, 1991).

Auch andere PCDD/PCDF, einige PCB und polyzyklische Kohlenwasserstoffe wie Benzo[a]pyren und 3-Methylcholanthren, sowie Photooxidationsprodukte von Tryptophan zählen zu den Liganden des AhR (Poellinger *et al.*, 1992).

Der inaktive Rezeptor liegt im Zytosol der Zelle gebunden an Hsp90 und andere Proteine wie XAP2 (hepatitis B virus **X-associated protein 2**) und p23 vor (Kazlauskas *et al.*, 1999, 2000, 2001; Whitelaw *et al.*, 1995; Heid *et al.*, 2000). Nach Ligandenbindung kommt es zum abdissoziieren der Hilfsproteine und zur Translokation in den Zellkern. Das nukleäre Protein ARNT (**Ah receptor nuclear translocator**) dimerisiert mit dem Ligand-AhR-Komplex zu einem DNA-bindenden Transkriptionsfaktor (Abb. 1.7).

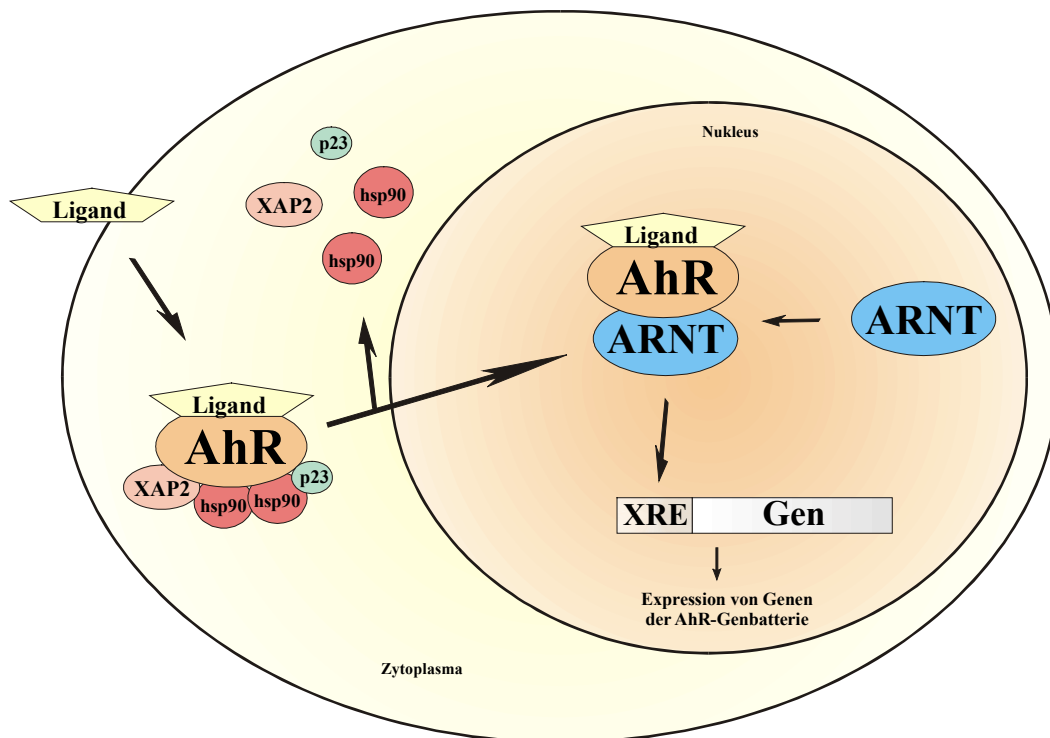


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der AhR-vermittelten Genexpression durch Induktion mit AhR-Liganden. Der zytosolische Rezeptor ist im inaktiven Zustand an Hilfsproteine gebunden, die nach Bindung eines Liganden an den Rezeptor abdissoziieren. Nach Translokation von Ligand-AhR-Komplex in den Zellkern dimerisiert ARNT mit dem Komplex zu einem DNA-bindenden Transkriptionsfaktor und bindet an regulatorische Sequenzen.

Der heterodimere Transkriptionsfaktor bindet an regulatorische DNA-Sequenzen, die als **xenobiotic responsive elements (XREs)**, **dioxin responsive elements (DREs)** oder **AhR responsive elements (AhREs)** bezeichnet werden (Whitlock, 1999). Aus der Interaktion mit DREs resultiert eine Regulation der Transkription von Genen, die als AhR-Genbatterie zusammengefasst werden. Zur AhR-Genbatterie der Maus gehören CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1, des weiteren findet man **Glutathion-S-Transferase A1 (GSTA1)**, **Aldehyd-3-Dehydrogenase (ALDH-3A1)**, **NAD(P)H:Quinone Oxidoreduktase 1 (NQO1)** und **UDP-Glucuronosyltransferase 1A6 (UGT1A6)**, die über den AhR reguliert werden (Nebert *et al.*, 1993; Rowlands und Gustafsson, 1997).

Neben AhR-vermittelten Wirkungen werden auch AhR-unabhängige TCDD-Effekte diskutiert. Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Proteinen spielen eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation. TCDD ist in der Lage, in Mäusen die Tyrosylphosphorylierung von CDKs zu erhöhen. Verbunden mit der erhöhten Phosphorylierung war eine verstärkte Expression der CDKs $p34^{cdc2}$ und $p33^{cdc2}$, die Bedeutung des AhR ist hier noch unklar (Ma und Babish, 1993).

Es ist auch bekannt, dass der AhR mit dem für die Regulation des Zellzyklus wichtigen pRB direkt interagieren kann, ARNT ist für diese Interaktion nicht notwendig (Ge und Elferink, 1998; Puga *et al.*, 2000a).

Die Tyrosinkinase c-src wurde von Enan und Matsumura (1996) als integraler Bestandteil des AhR-Komplexes nachgewiesen. C-src ist ein Protoonkogen, das für eine Kinase kodiert, die Phosphorylierungen von Membranproteinen steuert. Es ist mit dem retroviralen v-src Onkogen aus dem Rous-Sarkoma-Virus verwandt.

TCDD kann c-src AhR-abhängig zur Zellmembran translozieren, ARNT ist hierfür nicht notwendig (Blankenship und Matsumura, 1997; Koehle *et al.*, 1999).

Wörner und Schrenk (1998) konnten zeigen, dass TCDD in primären Rattenhepatozyten zur AhR-abhängigen Phosphorylierung von p53 führt, eine mögliche Beteiligung der src-Kinase ist hier nicht auszuschließen.

In Hepatomzellen der Maus führt die Behandlung mit TCDD zu einem Anstieg der Calcium-Konzentration im Zytosol und zu einer AhR-abhängigen Induktion der Cyclooxygenase 2 (COX 2), die für die Bildung von Prostaglandinen, schmerzauslösenden Mediatoren, verantwortlich ist (Puga *et al.*, 1997).

Ein von Vogel *et al.* (2000) postulierter Mechanismus der COX-2-Induktion durch TCDD ist der Signalweg über c-src. Für die tumorpromovierende Wirkung von TCDD ist dies möglicherweise von großer Bedeutung, denn man findet sowohl in transformierten Zelllinien (Müller-Decker *et al.*, 1995; Subbaramaiah *et al.*, 1996) als auch in menschlichem Tumorgewebe (Sano *et al.*, 1995) eine erhöhte Expression der COX-2.

In Maus-Hepatomzellen wird durch TCDD die Expression der Protoonkogene *c-jun* und *c-fos* induziert, die DNA-bindende Aktivität des daraus entstehenden Transkriptionsfaktors AP-1 (**activator protein-1**) wird erhöht (Puga *et al.*, 1992). Hoffer *et al.* (1996) konnten zeigen, dass durch TCDD die Expression von c-jun AhR-abhängig induziert wird, c-fos kann sowohl auf AhR-vermittelten Wege als auch unabhängig vom Rezeptor induziert werden. Beide Transkriptionsfaktoren sind in der Lage Zellwachstum zu vermitteln.

Park *et al.* (1996) konnten in einer murinen Hepatomzelllinie zeigen, dass die Induktion von CYP1A1 durch TCDD mit einem oxidativen DNA-Schaden, der Basenmodifikation 7,8-Dihydro-**8-oxo-2'-deoxyguanosin** (8-oxo-dG), verbunden ist.

Puga *et al.* (2000b) liefern in ihren Untersuchungen Hinweise auf ein mögliches Auftreten von AhR-Komplex- und CYP1A1-abhängigen oxidativen Signalen nach der Behandlung von Zellen mit TCDD, da eine gesteigerte Aktivierung der für oxidativen Stress relevanten Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B (**nuclear factor- κ B**) gefunden wurde, die man durch Zugabe von CYP-Inhibitoren und Antioxidantien verhindern konnte.

Untersuchungen zur Erhöhung der Apoptoseinzidenz in Primärhepatozyten der Ratte nach TCDD-Behandlung lassen auf eine mögliche Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies im katalytischen Zyklus von CYP in der Induktion der Apoptose schließen, da die TCDD-induzierte Apoptose durch gleichzeitige Gabe des CYP-Inhibitors 8-Methoxypsoralen und das Antioxidans *N*-Acetylcystein hemmbar war (Kunz, 2001).

Die antiöstrogene Wirkung von TCDD konnte auf eine direkte Wechselwirkung des aktivierten AhR mit dem Östrogenrezeptor zurückgeführt werden (Buchanan *et al.*, 2002; Ohtake *et al.*, 2003).

Wyde *et al.* (2001) konnten zeigen, daß das Auftreten von 8-oxo-dG-Addukten nach chronischer TCDD-Verabreichung nur in weiblichen Ratten auftrat und abhängig vom Östrogenmetabolismus war.

1.3.3 Polychlorierte Biphenyle (PCBs)

1.3.3.1 Struktur, Eigenschaften und Belastungspfade

Die Gruppe der polychlorierten Biphenyle umfasst 209 Kongenere, die aus einem Biphenylgerüst bestehen, welches an maximal 10 Positionen chlorierbar ist. Durch Einführung einer fortlaufenden Numerierung der einzelnen Kongenere nach Anzahl der Chloratome und deren Position konnte die Nomenklatur der PCBs stark vereinfacht werden (Ballschmiter und Zell, 1980; s. Anhang 8.2, IUPAC-Nomenklatur).

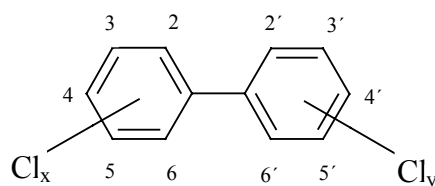


Abb. 1.8: Allgemeine Strukturformel der PCBs

PCBs zeichnen sich durch ihre hohe chemische und thermische Stabilität aus, sowie durch hohe Viskosität und einen hohen Flammpunkt. Sie sind außerdem sehr lipophil und besitzen eine geringe Flüchtigkeit. Die Lipophilie der PCBs nimmt mit steigendem Chlorierungsgrad zu.

Eine breite Anwendung fanden technische PCB-Gemische als Hydraulikflüssigkeit, Wärmetauscher und Transformatorenöl (geschlossene Systeme), sowie als Schmieröle, Flammenschutzmittel und Weichmacher für Kunststoffe (offene Systeme). Sie wurden auch als Zusatzstoffe bei Druckfarben, Lacken und Klebstoffen eingesetzt (IARC, 1978).

Verbrennungsprozesse in Anwesenheit von Chlor tragen wesentlich zum Eintrag von PCBs in die Umwelt bei. Relevant für die Belastung des Menschen ist aber weniger die Aussenluft, sondern eine starke Belastung von Innenräumen und die Anreicherung von PCBs in tierischen Nahrungsmitteln durch ihre hohe Persistenz und Lipophilie.

Der erwachsene Organismus nimmt täglich durchschnittlich 0,2 µg/kg Körpergewicht an PCBs mit der Nahrung auf, was unterhalb des TDI von 1 µg/kg Körpergewicht liegt. Säuglinge sind durch Belastung der Muttermilch höheren Konzentrationen an PCBs ausgesetzt. Wie im Falle von TCDD ist aber auch hier ein Rückgang der Belastung zu verzeichnen (Fürst *et al.*, 1992; Patandin, 1998).

Die Akkumulation der PCBs erfolgt hauptsächlich im Fettgewebe, aber auch in der Leber und im Zentralnervensystem. Die mittlere Halbwertszeit aller PCBs liegt bei ca. 7 Jahren (Yakushiji *et al.*, 1984).

Nach Bekanntwerden der ubiquitären Verbreitung und einer möglichen toxikologischen Relevanz der PCBs wurde zunächst deren Verwendung in offenen Systemen untersagt (1978). In Deutschland wurde 1983 die gesamte PCB-Produktion eingestellt, seit 1989 verbietet eine Verordnung die Herstellung PCB-belasteter Materialien sowie deren Verbreitung (Schrenk, 1994).

Die Analytik von Probenmaterial beschränkt sich meist nur auf sechs ausgewählte Kongenere, sogenannte Leitkongenere oder Indikatorkongenere, die den Hauptanteil der PCBs ausmachen. Hierzu gehören die Kongenere PCB 28, 52, 101, 138, 153 und 180.

Zur Risikobewertung von Kongeneren mit ‚dioxinartiger‘ Wirkung bzw. deren Gemische, d. h. Kongenere mit einer Affinität zum AhR, wird das TEQ-Konzept herangezogen (Kannan *et al.*, 1988). TEF-Werte für einzelne PCBs wurden von der WHO festgesetzt (van den Berg *et al.*, 1998, s. Anhang 8.1).

Für PCB-Gemische gilt unter Annahme der Additivität:

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

1.3.3.2 Toxizität

Untersuchungen zur toxischen Wirkung dieser Substanzklasse beim Menschen beruhen auf Unfällen in Japan (1968) und Taiwan (1979), die als ‚Yusho‘ bzw. ‚Yu-Cheng‘ bekannt wurden (Reisölkrankheit). Durch einen Wärmetauscherdefekt kam es bei der Reisölproduktion zur Verunreinigung des Öls mit PCBs und PCDFs.

Als erste Vergiftungserscheinung zeigten sich Hautveränderungen in Form von Chlorakne und eine Hyperpigmentierung (IARC, 1997; Kuratsune *et al.*, 1987). Eine Vielzahl anderer Symptome wie Atemwegsstörungen, Schwellungen der Augenlider, Sehstörungen, Schwächegefühl, Taubheit in Extremitäten, Kopfschmerz und Erbrechen traten bei den meisten Personen in Erscheinung (Safe, 1992). Des Weiteren war das Immunsystem beeinträchtigt und einige leberspezifischen Enzyme waren im Serum erhöht.

Kinder, deren Mütter während der Schwangerschaft exponiert waren, zeigten ebenfalls Hyperpigmentierung, eine Hyperplasie des Zahnfleisches, frühzeitigen Zahndurchbruch, gestörte Knochenverkalkung und ein signifikant verringertes Geburtsgewicht (fetales PCB-Syndrom). Auffällig war hier auch ein signifikant gestörtes Lernverhalten von Kindern (Rylander *et al.*, 1995; Jacobson und Jacobson, 1997).

Bei männlichen Yusho- und Yu Cheng-Patienten zeigte sich eine erhöhte Krebsmortalität, betroffen waren hauptsächlich Leber, Magen und Lunge. Andere Studien an PCB-exponierten Arbeitern beobachteten ähnliche Vergiftungssymptome und eine Zunahme der Sterblichkeit an Leberkrebs (Brown, 1987).

Die Datenlage ist jedoch zum Teil auch sehr widersprüchlich und zeigt allgemein das Problem, dass Effekte aufgrund der Mischexposition nicht eindeutig den PCBs zugeordnet werden können.

Tierexperimentelle Studien mit PCB-Gemischen zeigten bei Ratten vergleichbare Vergiftungssymptome wie Haarausfall, Rötung der Haut mit Hyperkeratose und subkutane Ödeme. Das Lebergewicht der Tiere war dosisabhängig erhöht, es zeigte sich eine Adenofibrose der Leber und Cholangiofibrose der Gallengänge.

Die Behandlung von Rhesusaffen mit technischen PCB-Gemischen zeigte ähnliche Wirkungen auf die Haut, u. a. auch akneiforme Veränderungen sowie Hypertrophien des Gallengang- und Gallenblasenepithels, nekrotisches Lebergewebe und vergrößerte Hepatozyten (Ahlborg *et al.*, 1992). Nachkommen von Rhesusaffen, die während der Schwangerschaft exponiert waren, zeigten Verhaltensauffälligkeiten und Lernstörungen (Bowman *et al.*, 1981; Levin *et al.*, 1988). Auch Störungen des Immunsystems traten bei Affen auf (Tryphonas *et al.*, 1991).

Ähnlich wie bei TCDD zeigten sich im Versuchstier nach Behandlung mit PCBs eine Beeinflussung der Reproduktion (Sager 1983; Sager und Girard, 1994) und ein verringerter Spiegel an Schilddrüsenhormonen (Morse *et al.*, 1992).

Am häufigsten wurden in Mäusen und Ratten nach Verabreichung von PCBs Tumoren der Leber beobachtet, aber auch des Magens und der Lunge (Norback und Weltman, 1985; Silberhorn *et al.*, 1990).

Technische PCB-Gemische haben sich in der Rattenleber als potente Tumorpromotoren gezeigt (Preston *et al.*, 1981; Oesterle und Deml, 1984). Eine tumorpromovierende Wirkung in der Rattenleber konnte auch für einzelne ‚dioxinartige‘ und ‚nicht-dioxinartige‘ Kongenere bestätigt werden. Die ‚dioxinartigen‘ Kongenere PCB 77 (Buchmann *et al.*, 1986, 1991), PCB 105 (Hemming *et al.*, 1993) und PCB 126 (Hemming *et al.*, 1993) zeigen ein promovierendes Wachstum von präneoplastischen Zellen. Von den ‚nicht-dioxinartigen‘ Kongeneren haben sich bisher PCB 47 (Oesterle und Deml, 1981), PCB 49 (Buchmann *et al.*, 1991), PCB 52 (Preston *et al.*, 1985) und PCB 153 (Hemming *et al.*, 1993) als tumorpromovierend in der Rattenleber gezeigt.

In Rattenhepatozyten in Primärkultur wurde der Einfluß verschiedener Kongenere auf die UV-Licht-induzierte Apoptose untersucht. Für die Kongenere PCB 28, 101, 138, 183 und 187 konnte *in vitro* eine Hemmung der Apoptose nachgewiesen werden (Bohnenberger *et al.*, 2001; Bohnenberger, 2003).

Eine Hemmung der Apoptose nach Induktion mit UV-Licht konnte auch für die ‚dioxinartigen‘ Kongenere 81, 126 und 169 in primären Hepatozyten der Ratte gezeigt werden (Zeiger, 2001). Bei alleiniger Behandlung mit den Kongeneren 81 und 126 war ein Anstieg in der basalen Apoptoseinzidenz zu verzeichnen.

1.3.3.3 Mechanismen toxischer Wirkungen

Eine Einteilung der PCBs in ‚dioxinartige‘ und ‚nicht-dioxinartige‘ PCBs erfolgt aufgrund einer AhR-abhängigen bzw. –unabhängigen Induktion verschiedener CYP-Isoenzyme in der Rattenleber.

Kongeneren mit Chlorsubstituenten in beiden *para*-Positionen sowie mindestens zwei Chlorsubstituenten in *meta*-Position induzieren wie TCDD CYP1A-Isoenzyme (Goldstein *et al.*, 1977; Poland und Glover, 1977). Zu diesen non-*ortho*-substituierten Kongeneren gehören PCB 77, 81, 126 und 169, die eine annähernd planare Struktur annehmen können und toxische Wirkungen wie Chlorakne, Gewichtsverlust, Thymusatropie, Immunsuppression und Hepatotoxizität mit TCDD gemeinsam haben (Safe, 1992, 1994; Peterson *et al.*, 1995).

Mono-*ortho*-substituierte Kongeneren, wie z. B. PCB 105, 118 und 156, sowie einige di-*ortho*-substituierte Kongeneren, wie z. B. PCB 170 und 180, zeigen eine Affinität zum AhR und induzieren CYP1A-Isoenzyme. Da sie aber auch CYP2B-Isoenzyme induzieren, bezeichnet man sie als ‚Gemischttyp-Induktoren‘ (mixed type inducer).

Besitzen Kongeneren mindestens zwei Chlorsubstituenten in *ortho*-Position induzieren sie CYP2B- und CYP3A-Isoenzyme, was sie mit dem strukturell nicht näher verwandten Phenobarbital gemeinsam haben (Parkinson *et al.*, 1983; Safe, 1994; Connor *et al.*, 1995; Ikegwuonu *et al.*, 1996). Vertreter dieser Gruppe sind die Kongeneren PCB 52, 99 und 153. Sie zeigen neurotoxische Wirkungen und endokrine Effekte (Safe, 1994; Giesy und Kannan, 1998; Fischer *et al.*, 1998).

Die Metabolisierung von PCBs führt im ersten Schritt zu hydroxilierten Metaboliten, überwiegend in *para*- und *meta*-Position. Für diesen Schritt sind die induzierten CYP1A- und 2B-Isoenzyme verantwortlich (Kaminsky *et al.*, 1981; Borlakoglu und Wilkins, 1993).

Ein kritischer Punkt ist hier die Bildung von reaktiven Intermediaten, den Arenoxiden, die elektrophile Eigenschaften besitzen und mit Makromolekülen reagieren können. Die Detoxifizierung von Arenoxiden kann durch spontane Umlagerung erfolgen, aber auch über enzymatische Reaktionen, wie der Bildung von Dihydrodiolen durch die Epoxidhydrolase oder Bildung von Glutathionkonjugaten.

Hydroxylierte Metabolite zeigen einen Einfluss auf den Stoffwechsel der Schilddrüse (Lans *et al.*, 1993; Schuur *et al.*, 1998a, 1998b), sowie östrogene Effekte durch Interaktion mit Östrogenrezeptoren und Inhibierung der Östrogen-Sulfotransferase (Kester *et al.*, 2000; Matthews und Zacharewski, 2000).

Die Bildung von elektrophilen Semichinonen und Chinonen aus dihydroxylierten Metaboliten kann zur Adduktbildung mit Makromolekülen führen (Bolton *et al.*, 2000).

Eine Gruppe sehr persistenter PCB-Metabolite bilden die Methylsulfone, die in mehreren Reaktionsschritten aus Glutathion-Konjugaten entstehen. Methylsulfonylmetabolite beeinflussen die Schilddrüsenfunktion, die Reproduktion und zeigen tumorpromovierende Eigenschaften (Letcher *et al.*, 2000).

Die neurotoxische Wirkung von PCBs wird Kongeneren zugeordnet, die Chlorsubstitutionen in *ortho*-Positionen besitzen. Kongenere mit einer annähernd planaren Struktur scheinen diese Wirkung nicht zu zeigen.

Bei Affen konnte in bestimmten Gehirnregionen eine Abnahme der Catecholaminkonzentration nach Behandlung mit *ortho*-substituierten PCB-Kongeneren gezeigt werden. Den gleichen Effekt konnte man auch in einem neuronalen Zelltyp der Ratte (PC12-Zellen) nachweisen (Seegal *et al.*, 1990; Shain *et al.*, 1991).

Kodavanti *et al.* (1993, 1995) führten die Wirkung der *ortho*-substituierten PCBs auf eine Störung der zellulären Ca^{2+} -Homöostase und eine veränderte Aktivität der PKC zurück.

Der Konzentrationsgradient an Calcium-Ionen zwischen dem extrazellulären Bereich und dem Innern der Zelle ermöglicht eine Regulation zellulärer Funktionen durch Ca^{2+} als sekundären Botenstoff. Im Innern der Zelle findet man eine Konzentration an Ca^{2+} die im nano- bis mikromolaren Bereich liegt, die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration kann mehrere mM betragen (Carafoli, 1995; Tsien und Tsien, 1990). Dieser Konzentrationsgradient wird aufrechterhalten durch Pumpen, die Ca^{2+} in den extrazellulären Raum befördern, durch intrazelluläre Ca^{2+} -bindende Proteine und durch Speicherung in intrazellulären Kompartimenten, wie dem Endoplasmatischen/Sarkoplasmatischen Retikulum (ER/SR) und den Mitochondrien.

Die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER erfolgt über Rezeptor-assoziierte Ca^{2+} -Kanäle, dem Inositol-1,4,5-Triphosphat-sensitiven Rezeptor (IP_3R) oder über den Ryanodin-sensitiven Rezeptor (RyR). Der Einstrom von Ca^{2+} aus dem extrazellulären Raum kann je nach Zelltyp über verschiedene Kanäle erfolgen. Man findet hier spannungsaktivierte und mechanosensitive Ca^{2+} -Kanäle, sowie ligandenaktivierte Rezeptoren, die mit Kanälen assoziiert sind (Clapham, 1995). Eine Übersicht über die Regulation der Ca^{2+} -Homöostase der Zelle zeigt Abb. 1.9.

Eine unphysiologische Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kann zum apoptotischen oder nekrotischen Zelltod führen.

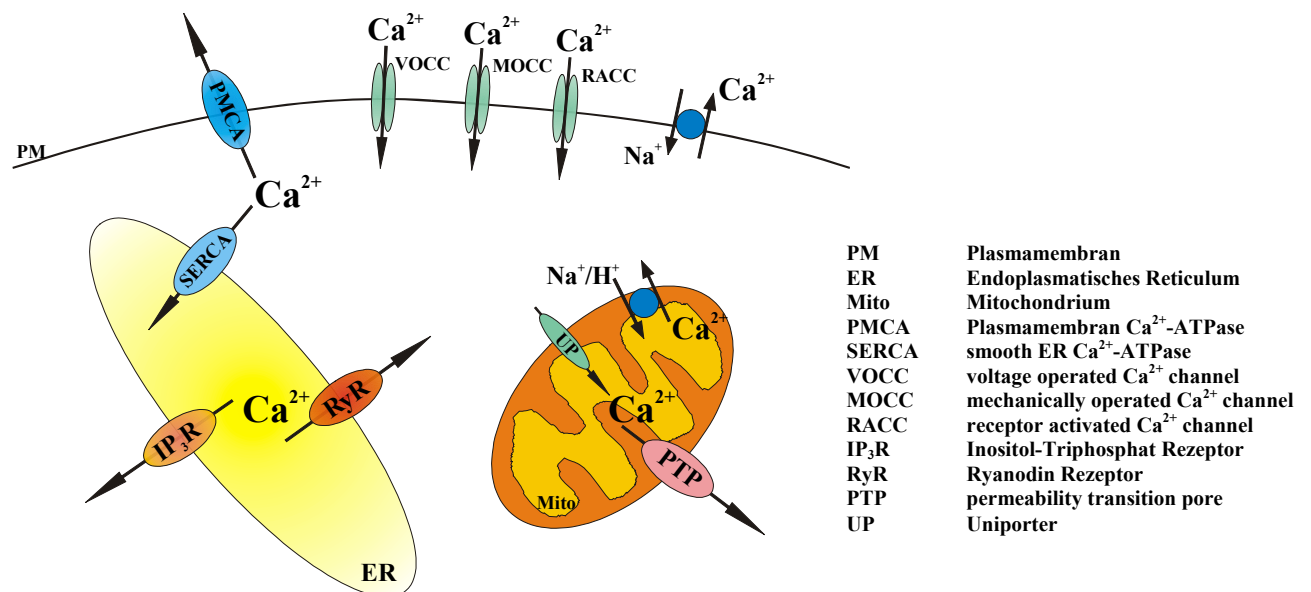


Abb. 1.9: Schematische Übersicht über die Ca^{2+} -Homöostase der Zelle

Es konnte gezeigt werden, dass die Beeinflussung der Ca^{2+} -Homöostase in neuronalen Zellen über eine Entleerung des intrazellulären Ca^{2+} -Speichers ER erfolgt. Verantwortlich für den Ca^{2+} -Anstieg sind RyR-assoziierte Ca^{2+} -Kanäle (Wong und Pessah, 1996; Schantz *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1997a, 1997b; Wong und Pessah, 1997).

PCB 95 und 136 haben von allen untersuchten Kongeneren die größten Effekte gezeigt. Sehr große Wirkung zeigen auch die Kongenere 18, 52 und 187, wohingegen PCB 41, 101 und 110 weniger wirksam waren (Pessah und Wong, 2001). Allgemein lässt sich sagen, dass die Kongenere zur Beeinflussung von RyR-assoziierten Ca^{2+} -Kanälen Chlorsubstitutionen in mindestens zwei *ortho*-Positionen und Substitutionen in *meta*-Position besitzen müssen.

2 Ziel der Arbeit

Ein dem TEQ-Wert für ‚dioxinartige‘ PCB-Kongenere vergleichbares Konzept liegt zur Risikobewertung der ‚nicht-dioxinartigen‘ PCB-Kongenere nicht vor. Die Datenlage dieser Stoffe ist hier noch unzureichend.

Im Rahmen dieser hier vorliegenden Arbeit sollte die Beeinflussung der Calcium-Homöostase durch das ‚nicht-dioxinartige‘ PCB 153 in primären Hepatozyten untersucht werden. In einem Vorversuch wurde zunächst das ‚dioxinartige‘ Kongener PCB 126 mit PCB 153 hinsichtlich einer möglichen direkten Wirkung auf zelluläre Membranen untersucht. Eine mikrosomale Membranfraktion der Rattenleber wurde hierzu mit paramagnetischen Gruppen versehen und diese Membranen nach Behandlung mit den PCB-Kongeneren mit Hilfe der Elektronen Spin Resonanz untersucht. Anschließend sollte die Beeinflussung der Calcium-Homöostase in Hepatozyten nach Behandlung mit PCB 153 durch mikrofluorimetrische Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration überprüft werden. Der Nachweis erfolgte durch die Beladung der Zellen mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fura-2.

Zur Aufklärung der Apoptose-hemmenden Wirkung von PCB 153 sollte der PI3K/PKB-Signalweg untersucht werden. Mit Hilfe der Western Blot Analyse wurde die Phosphorylierung des proapoptotischen Proteins Bad an Serin 136 und die Menge an Gesamtprotein unter verschiedenen Kulturbedingungen erfasst.

In Anlehnung an ein Protokoll von Nicholson et al. (1995) sollte als biochemischer Nachweis der Apoptose ein Caspase-3-Assay etabliert werden und eine geeignete Substanz zur Induktion der Apoptose gefunden werden. Hierzu wurden Hepatozyten mit den Topoisomeraseinhibitoren Etoposid und Camptothecin sowie mit der Nitrosoverbindung *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (MNNG) behandelt. Die Methode sollte zur Charakterisierung des Einflusses von ‚nicht-dioxinartigen‘ und ‚dioxinartigen‘ PCBs und den Referenzverbindungen Phenobarbital und TCDD auf die Apoptose in primären Hepatozyten herangezogen werden. Mit der Freisetzung von Cytochrom c sollte ein zweiter biochemischer Apoptosenachweis mittels Western Blot etabliert werden und die Apoptose-hemmende Wirkung der oben genannten Tumorpromotoren untersucht werden.

Im darauffolgenden Teil dieser Arbeit sollte die tumorpromovierende Wirkung der ‚nicht-dioxinartigen‘ PCB-Kongenere 28 und 101 in einer Initiations-Promotions-Studie in weiblichen Wistar-Ratten analysiert werden. Zur Initiation präneoplastischer Herde in der Rattenleber wurden die Tiere mit Diethylnitrosamin behandelt. Die nachfolgende Behandlung mit PCB 28 und 101 erfolgte in zwei unterschiedlich hohen Dosen über einen Zeitraum von acht bzw. sechzehn Wochen.

Nach Homogenisierung von Lebergewebe und Extraktion der PCBs sollte der Gehalt der unterschiedlichen Kongenere in der Leber bestimmt werden. Der Nachweis präneoplastischer Foci sollte immunhistochemisch durch eine verringerte ATPase-Aktivität und eine gesteigerte Expression der GSTP erfolgen. Die Anzahl der Foci pro cm^3 Leber sollte mit zwei unterschiedlichen stereologischen Berechnungsmethoden (nach Fullman und Saltykov) sowie das Focusvolumen, bezogen auf das Lebervolumen, quantifiziert werden. Durch den Einbau von Bromdeoxyuridin in die DNA sollte die Zahl proliferierender Zellen in GSTP-positiven Foci überprüft werden. Zusätzlich sollte die Induktion von CYP-Isoenzymen durch Erfassung der CYP1A-korrelierten 7-Ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) –Aktivität und der CYP2B-korrelierten 7-Pentoxyresorufin *O*-deethylase (PROD) –Aktivität nach einer Methode von Kennedy und Jones (1994) im Leberhomogenat analysiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Tabelle 3.1:
Auflistung der verwendeten Chemikalien

N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-AFC (Ac-DEVD-AFC)	Biomol, Hamburg
N-Acetyl-Aps-Glu-Val-Asp-aldehyd (Ac-DEVD-CHO)	Biomol, Hamburg
Acrylamid-Bisacrylamid (30:0,8) Rotiphorese Gel	Roth, Karlsruhe
Adenosin 5'-Triphosphat (ATP)	Sigma, Steinheim und Roche, Mannheim
Amidoschwarz	AppliChem, Darmstadt
7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin (AFC)	Sigma, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfid	Merck, Darmstadt
Aprotinin	AppliChem, Darmstadt
anti-Bad	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Bad P136	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Bleinitrat	Serva, Heidelberg
Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU)	Sigma, Steinheim
anti-BrdU	DAKO, Carpinteria, USA
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
n-Butanol	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Camptothecin	Sigma, Steinheim
Caspase-3	Sigma, Steinheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Cholamidopropyltrimethylammoniumpropansulfonat (CHAPS)	AppliChem, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue	AppliChem, Darmstadt
Cyclohexan	Promochem, Wesel
Cyclopiazonsäure	Sigma, Steinheim
anti-Cytochrom c (Klon 7H8.2C12)	Pharmingen, BD, Heidelberg
Dexamethason	Sigma, Steinheim
Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB)	DAKO, Carpinteria, USA
Diaminophenylindol (DAPI)	Sigma, Steinheim
Dichlormethan	Promochem, Wesel
Digitonin	Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Neu-Ulm
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
5-Doxyl-Stearinsäure	Sigma, Steinheim
16-Doxyl-Stearinsäure	Sigma, Steinheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/ Ham's F12 (1 g/l D-Glukose)	PAA, Cölbe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (1 g/l D-Glukose) Trockenmedium	Sigma, Steinheim
Entellan	Merck, Darmstadt
Epidermal Growth Factor (EGF)	Calbiochem, La Jolla, Kalifornien, USA
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethanolamin	Sigma, Steinheim
7-Ethoxyresorufin	Sigma, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma, Steinheim
Etoposid	Sigma, Steinheim
Fluorescamin	AppliChem, Darmstadt

Fötales Kälberserum (FKS) Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz Fura-2	PAA, Cölbe Sigma, Steinheim Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande
Gentamycinsulfat D-Glukose Glutaraldehyd Glycerin Glycin anti-goat-IgG (HRP) anti-GSTP	PAA, Cölbe Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg Biogenex
Heparin Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure (HEPES)	Serva, Heidelberg Roth, Karlsruhe
Ilfospeed Papierentwickler Immunglobulin G (IgG) rabbit Insulin Isopropanol ITS/ITS ⁺	Ilford, Paramus, USA Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg Sigma, Steinheim Riedel-deHaen, Seelze Becton Dickinson, Heidelberg
Kaisers Glyceringelatine Kaleidoscope Polypeptide Standards Kaleidoscope Prestained Standards Kaliumchlorid Kaliumdihydrogenphosphat Kaliumdihydrogensulfat Kaliumhydrogenphosphat Kupfersulfat	Merck, Darmstadt BioRad, München BioRad, München Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt
Leupeptin Linolsäure	AppliChem, Darmstadt Sigma, Steinheim
Magermilchpulver Magnesiumchlorid Magnesiumsulfat Maiskeimöl Maleinsäure D-Mannitol 2-Mercaptoethanol Methanol N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) anti-mouse-IgG (HRP)	Spinnrad Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Mazola Merck, Darmstadt Applichem, Darmstadt Sigma, Steinheim Merck, Darmstadt Fluka, Neu-Ulm Sigma, Steinheim
Natriumcarbonat Natriumchlorid Natriumdesoxycholat Natriumdihydrogenphosphat Natriumdodecylsulfat (SDS) 20% Natriumfluorid Natriumhydrogencarbonat Di-Natriumhydrogenphosphat Natriumhydroxid Natrium-Kalium-Tartrat Natriumorthovanadat Natriumselenit Nikotinamidadenindinukleotidphosphat reduziert (NADPH) Nonidet-P40	Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Sigma, Steinheim Merck, Darmstadt AppliChem, Darmstadt AppliChem, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma, Steinheim Sigma, Steinheim Sigma, Steinheim AppliChem, Darmstadt AppliChem, Darmstadt
Paraformaldehyd Penicillin/Streptomycin Pentobarbital 7-Pentoxyresorufin Pepstatin Phenobarbital Phenylmethylsulfonylfluorid Pluronic-F127 Polychlorierte Biphenyle (PCB)	Sigma, Steinheim PAA, Cölbe Sigma, Steinheim Sigma, Steinheim AppliChem, Darmstadt Sigma, Steinheim AppliChem, Darmstadt Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande Promochem, Wesel & L. Robertson,

Protein A/G Agarose	Universität Iowa, Iowa City, USA Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-rabbit-IgG (β -Gal) Rapid fixer Fixierer Resorufin	American Qualex Ilford, Paramus, USA Sigma, Steinheim
Saccharose Salzsäure Sulforhodamin 101	AppliChem, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma, Steinheim
2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) Transferrin Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) Triton X-100 Trypanblau TWEEN 20	Ökometric, Bayreuth Sigma, Steinheim AppliChem, Darmstadt Roth, Karlsruhe Sigma, Steinheim Sigma, Steinheim Roth, Karlsruhe
Waymouth MD 705/1 Trockenmedium Western Lightning Reagents Williams Medium E Trockenmedium	Sigma, Steinheim Perkin Elmer, Rodgau AppliChem, Darmstadt
Xylol	Fluka, Neu-Ulm

3.2 Geräte und Materialien

Tabelle 3.2:
Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien

Autoklav	Varioklav Typ 500	H+P Labortechnik, München
Brutschrank	Heraeus BB 6220 CU	Heraeus, Hanau
Calcium-Messung	Fluoreszenzmikroskop Xenon-Bogenlampe Objektiv 20x UV-gängig Filterblock SIT-Kamera	Nikon, Japan Osram Nikon, Japan Nikon, Japan Hamamatsu Photonics, Herrsching
Elektrophorese/Proteintransfer	Mini Protean II/III BioRad Power Pac 300 Electrophoresis Power Supply ST 606 T Fast Blot B34 Biometra Power Pack P 25 Semi-dry Blotting Hoeffer TE 77	BioRad, München BioRad, München Gibco BRL, Heidelberg Biometra, Göttingen Biometra, Göttingen Amersham Biosciences, San Francisco, USA
ESR	Elexsys E580	Bruker
Filmmaterial	Hyperfilm MP Fotokassette Kodak X-Omatic	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK Kodak, Stuttgart
Gefrierschrank	Biofreezer MDF-U6086S	Sanyo
Gewebehomogenisation	Homogenisator	Heidolph
Heizblock	Multi-Block-Heater LabLine	American Instruments Exchange, Haverhill, USA
Kulturschalen	Gewebekulturschalen 35 x mm Gewebekulturschalen 60 x 15 mm Gewebekulturschalen 94 x 16 mm 96-Well-Mikroplatten Quadripermschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen Greiner Bio-One, Frickenhausen Greiner Bio-One, Frickenhausen Greiner Bio-One, Frickenhausen Neolab, Heidelberg
Mikroskopie	Lichtmikroskop Phasenkontrastmikroskop DM IRB Fluoreszenzmikroskop Axioskop Objektträger 76 x 26 mm Deckgläschen 24 x 60 mm Deckgläschen 15 mm	Eschenbach Leica, Wetzlar Zeiss, Jena Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe
PCB-Analytik	6890N Network GC/5973N MSD	Agilent

	Probengläschen 50 ml, 20 ml, 10 ml, 1 ml mit Mikroeingang Bördelkappen Mikrolitersprizen Hamilton Einwegrührspatel	VWR, Darmstadt VWR, Darmstadt VWR, Darmstadt Roth, Karlsruhe
Pipetten	Eppendorf Research Einmalpipetten steril 5 ml, 10 ml, 25 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf Roth, Karlsruhe
PH-Meter	P 300 pH-Meter	Beckman, München
Photometer	Spektralphotometer Uvikon 930	Kontron Instruments, Mailand, Italien
Plattenreader	Fluorocan Ascent FL	Labsystems
Rattenleberperfusion	Braunülen Vasocan 14G Braunülen Vasocan 18G Einmal-Injektionskanülen Sterican 26G 0,45 x 12 mm Einmal-Injektionsspritzen Omnifix-F 1 ml Gewebebänder Tesa Luftblasenfalle Präparierbesteck Präpariertisch Schlauchpumpe BVP Seidentuch Silikonschläuche Thermostat T MA 6	B. Braun, Melsungen B. Braun, Melsungen B. Braun, Melsungen B. Braun, Melsungen Beiersdorf AG, Hamburg Ismatec, Glattsbrugg-Zürich, Schweiz Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda, Königshofen
Reaktionsgefäße	PP-Röhrchen 15 ml, 50 ml Reaktionsgefäße 1,5 ml IST-Reaktionsgefäße 2,0 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen Greiner Bio-One, Frickenhausen Beckman, München
Sterilbank	UVF 6.12 S	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Sterilfilter	Rotilabo Spritzenfilter 0,22 µm Rotilabo Spritzenfilter 0,45 µm Sartolab-P20 plus Sterilfilter	Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Sartorius
Transfermembran/Filterpapier	Immobilon-P Whatman Paper 3 MM	Millipore Roth, Karlsruhe
Ultraschallsonde	Labsonic 2000	Braun, Reutlingen
Vortex	Vortex Reax 2000	Heidolph, Frankfurt
Waagen	Grobwaage Precision Standards Feinwaage	OHAUS Sartorius
Wasserbad	GFL 1083 GFL 1003	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal	Brand, Wertheim
Zentrifugen	Beckman GS-6R Beckman Microfuge R Sigma 1 K 15	Beckman, München Beckman, München Sigma, Osterode

3.3 Nährmedien und Zusätze

Nährmedien NIH_A und NIH_B:

Die Spezialminimalmedien für primäre Zellkulturen NIH_A und NIH_B setzen sich zu gleichen Teilen aus den Grundmedien DMEM und Waymouth MD 705/1 zusammen. Die Grundmedien DMEM und Waymouth wurden wie folgt angesetzt:

Tabelle 3.3:
Herstellung der Grundmedien DMEM und Waymouth

DMEM [5 l]	Waymouth MD 705/1 [5 l]
<ul style="list-style-type: none"> • Trockenmedium unter ständigem Rühren in 4,5 l H₂O bidest. lösen • Zugabe von 18,5 g NaHCO₃ • pH Wert auf 7,4 einstellen • auf 5 l mit H₂O bidest. auffüllen • durch Filtration sterilisieren • Lagerung bei +4°C 	<ul style="list-style-type: none"> • Trockenmedium unter ständigem Rühren in 4,5 l H₂O bidest. lösen • Zugabe von 11,2 g NaHCO₃ • pH Wert auf 7,4 einstellen • auf 5 l mit H₂O bidest. auffüllen • durch Filtration sterilisieren • Lagerung bei +4°C

Die Nährmedien NIH_A und NIH_B enthalten als weitere Zusätze noch ITS bzw. ITS⁺:

Tabelle 3.4:
Zusammensetzung von ITS und ITS⁺

Komponenten	ITS	ITS ⁺
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

Die Zusammensetzung von NIH_A und NIH_B zeigt folgende Tabelle:

Tabelle 3.5:
Zusammensetzung der Kulturmedien NIH_A und NIH_B

Komponenten	Aussaatmedium NIH _A [500 ml]	Erhaltungsmilieu NIH _B [500 ml]
Waymouth Medium 705/1	250 ml	250 ml
FKS	50 ml	-
HEPES (1 M, pH 7,4)	5 ml	5 ml
Gentamycinsulfat (50 mg/ml)	500 µl	500 µl
Dexamethason (100 µM)	250 µl	250 µl
ITS	500 µl	-
ITS ⁺	-	5 ml
DMEM Medium	ad 500 ml	ad 500 ml

Nach Fertigstellung der Grundmedien DMEM und Waymouth, sowie der Nährmedien NIH_A und NIH_B erfolgte eine Medienkontrolle über zwei Tage im Brutschrank. Die Petrischalen wurden nach der Kultivierung mikroskopisch auf eventuelle mikrobielle Kontaminationen untersucht. Die Lagerung der Medien erfolgte bei +4°C.

Nährmedien HSM und HAM:

Das Trockenmedium William's Medium E wurde in Lösung gebracht und mit 2,2 g/l NaHCO₃ versetzt. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 konnte das Medium sterilfiltriert werden. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Die Zusammensetzung der Spezialminimalmedien HSM und HAM zeigt Tabelle 3.6.

Tabelle 3.6:
Zusammensetzung der Kulturmedien HSM und HAM

Komponenten	Aussaatmedium HSM [500 ml]	ErhaltungsmEDIUM HAM [500 ml]
FKS	50 ml	-
HEPES (1 M, pH 7,4)	5 ml	5 ml
Gentamycinsulfat (50 mg/ml)	500 µl	500µl
Natriumselenit (100 µM)	500 µl	500µl
Dexamethason (100 µM)	-	500 µl
Insulin (100 µM)	500 µl	50 µl
Ethanolamin (1 mM)	-	500 µl
Transferrin (5 mg/ml)	-	500 µl
Linolsäure (100 mg)/BSA (10 %)	-	2,5 ml
Williams Medium E	ad 500 ml	ad 500 ml

Nährmedienzusätze:

Hepes-Puffer

Hepes 1 M pH 7,4	23,83 g/100 ml
------------------	----------------

Natriumselenit

Stocklösung 10 mM Na-selenit	173 mg/100 ml aliquotieren und bei -20°C lagern
Arbeitslösung 100 µM	Verdünnung der Stocklösung 1:100 Sterilfiltration mit Spritzenfilter (0,22 µm) aliquotieren und bei -20°C lagern

Dexamethason

Stocklösung 10 mM Dexamethason	100 mg/25,2 ml Ethanol Lagerung bei -20°C
Arbeitslösung 100 µM	Verdünnung der Stocklösung 1:100 mit H ₂ O bidest Sterilfiltration mit Spritzenfilter (0,22 µm) aliquotieren und bei -20°C lagern

Insulin

Stocklösung 1 mM Insulin	Zusatz von 3 ml NaCl 0,9 % zu 5 ml einer Fertiglösung der Konzentration 10 mg/ml in HEPES 25 mM (pH 8,2) aliquotieren und bei -20°C lagern
Arbeitslösung 100 µM	Verdünnung der Stocklösung 1:10 mit NaCl 0,9 % Sterilfiltration mit Spritzenfilter (0,22 µm) aliquotieren und bei -20°C lagern

Ethanolamin

Stocklösung 1 mM Ethanolamin	61 mg Fertiglösung/100 ml H ₂ O bidest
Arbeitslösung 100 µM	Verdünnung der Stocklösung 1:10 mit H ₂ O bidest Sterilfiltration mit Spritzenfilter (0,22 µm) aliquotieren und bei -20°C lagern

Transferrin

Transferrin 5 mg/ml	100 mg/20 ml NaCl 0,9 % Sterilfiltration mit Spritzenfilter (0,22 µm) aliquotieren und bei -20°C lagern
---------------------	---

Linolsäure/BSA

Linolsäure	100 mg/100 ml Fertiglösung BSA 10 % Lagerung bei +4°C
------------	--

3.4 Lösungen und PufferIsolierung von Hepatozyten:*Pentobarbitallösung*

Pentobarbital	33 mg/ml H ₂ O bidest.
---------------	-----------------------------------

Heparinlösung

Heparin	1000 U/ml NaCl 0,9 %
---------	----------------------

Perfusionslösungen

Tabelle 3.7:
Zusammensetzung der Perfusionslösungen

Perfusionmedium I [5 l]	Perfusionsmedium II [500 ml]	Waschpuffer [500 ml]
NaCl 31,50 g	Hepes (1 M, pH 7,4) 5ml	Hepes (1 M, pH 7,4) 5ml
KCl 1,6 g	Penicillin (10000 U) /	Penicillin (10000 U) /
MgSO ₄ x 7H ₂ O 1,35 g	Streptomycin (10 mg/ml) 5ml	Streptomycin (10 mg/ml) 5ml
KH ₂ PO ₄ 0,75 g		FKS 100 ml
NaHCO ₃ 9,05 g		
Hepes 17,90 g	DMEM/Ham's F12 (1:1)	DMEM/Ham's F12 (1:1)
Glukose 7,5 g	ad 500 ml	ad 500 ml
EGTA 0,19 g		
H ₂ O bidest ad 5 l		

Die Perfusionslösung I wurde auf pH 7,4 eingestellt und sterilfiltriert. Alle Lösungen wurden bei +4°C gelagert.

Zellkultur:*HPBS pH 7,4*

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	6,5 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
CaCl ₂	0,9 mM
MgCl ₂	0,5 mM
Hepes	10 mM

Kollagengellösung

Kollagenstocklösung 1,65 mg/ml	Verdünnung 1:10 mit Puffergemisch
Puffergemisch: NaOH + Neutralisierungspuffer	Mischung 1+5
Neutralisierungspuffer pH 7,4 [100 ml]	
Na ₂ HPO ₄	164 mM
NaH ₂ PO ₄	36 mM
NaCl	1,5 M
Phenolrot	5 mg
	Sterilfiltration und Lagerung bei RT

Stocklösungen zur Behandlung der Zellen

MNNG 300 mM	Substanz vor Wägung im Exsikkator trocknen 44,127 mg/ml DMSO
Etoposid 80 mM	47,09 mg/ml DMSO
Camptothecin 10 mM	3,48 mg/ml DMSO
Phenobarbital 200 mM	50,84 mg/ml H ₂ O bidest
TCDD 10 ⁻⁴ M	32,2 µg/ml DMSO
PCB 153 2 mM	722 µg/ml DMSO
PCB 126 0,2 mM	65,3 µg/ml DMSO
ATP 5 mM	27,6 mg/10 ml H ₂ O bidest
Cyclopiazonsäure 100 mM	33,64 mg/ml DMSO
Insulin 5 µM	2,87 mg/100 ml HCl 10 mM
EGF	10 µg/ml Essigsäure 10 mM/BSA 0,1%

ESR-Messungen:*Tris-Saccharose-Lösung pH 7,5 [500 ml]*

Tris · HCl 50 mM	3,03 g
Saccharose 250 mM	42,79 g

Kaliumchloridlösung [500 ml]

KCl 150 mM	5,59 g
------------	--------

Spinmarkierte Fettsäuren

5-Doxyl-Stearinsäure 20 mM	7,7 mg/ml Ethanol
16-Doxyl-Stearinsäure 20 mM	7,7 mg/ml Ethanol

Ca²⁺-Messungen:*Ringer-Lösung pH 7,4 [1 l]*

NaCl	8,474 g
KCl	0,373 g
CaCl ₂	0,294 g
MgCl ₂	0,203 g
Hepes	2,383 g
Glukose	1,802 g

Pluronsäure

Pluronic F-127 20 %	2 g/100 ml DMSO Lagerung bei Raumtemperatur
---------------------	--

Fura-2 Acetoxymethylester

Fura-2 AM 5 mM	5 mg/ml DMSO aliquotieren und bei -20°C lagern
----------------	---

Phosphorylierung von Bad:*Lysispuffer [500 ml]*

MgCl ₂ · 6 H ₂ O 3 mM	0,305 g
NaCl 150 mM	4,38 g
Tris · HCl 10 mM	10 ml Tris-Stocklösung 100 mM pH 7,5
EDTA 1 mM	50 ml EDTA-Stocklösung 10 mM pH 8,0
NP-40 0,5 %	2,5 ml

⇒ kurz vor Gebrauch DTT, Proteaseinhibitoren und Na₃VO₄ zusetzen: Stocklösungen der Substanzen (100 mM, 100 µg/ml, 10 mM) werden 1:100 verdünnt

DTT	1 mM
PMSF	1 mM
Aprotinin	1 µg/ml
Leupeptin	1 µg/ml
Pepstatin A	1 µg/ml
Na ₃ VO ₄	0,1 mM

Aktivierung von Natriumorthovanadat

Na ₃ VO ₄ 10 mM	183,91 mg/100 ml H ₂ O bidest pH auf 10 einstellen (Gelbfärbung) Lösung kochen bis zur Farblosigkeit Nach Abkühlung erneut pH 10 einstellen Wiederholung der Schritte bis Lösung bei pH 10 farblos bleibt aliquotieren und bei -20°C lagern
---------------------------------------	---

Proteinbestimmung:*Lowry A (alkalisches Kupferreagenz)*

Natriumcarbonat 2 %	50 ml
Natrium-Kalium-Tartrat 2,7 %	500 µl
Kupfersulfat 1 %	500 µl

Lowry B (Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz)

H ₂ O bidest	2,5 ml
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	2,5 ml

Western Blot Analyse:*Lämmli-Puffer*

Tris 1,2 M pH 6,8/Glycerin-Mix (1:1)	200 µl
SDS 10 %	200 µl
2-Mercaptoethanol	20 µl
Bromphenolblau 0,05 %	40 µl

Tris-Puffer [je 100 ml]

Tris 0,5 M pH 6,8	6,1 g
Tris 1,2 M pH 6,8	14,5 g
Tris 1,5 M pH 8,8	18,2 g

Trenngel [15 %]

H ₂ O bidest	3550 µl
Tris 1,5 M pH 8,8	3750 µl
SDS 10 %	150 µl
Acrylamid/Bis 30:0,8	7500 µl
APS 10 % (frisch ansetzen)	50 µl
TEMED	5 µl

Sammelgel [10 %]

H ₂ O bidest	3970 µl
Tris 0,5 M pH 6,8	2500 µl
SDS 10 %	100 µl
Acrylamid/Bis 30:0,8	3330 µl
APS 10 % (frisch ansetzen)	100 µl
TEMED	5 µl

PAGE Elektrodenpuffer pH 8,3 [5 l]

Tris		30 g
Glycin		144 g
SDS 10 %		50 ml

Anodenpuffer I pH 10,4 [500 ml]

Tris	300 mM	18,15 g
Methanol	10 %	50 ml

Anodenpuffer II pH 10,4 [500 ml]

Tris	25 mM	1,5 g
Methanol	10 %	50 ml

Kathodenpuffer pH 9,4 [500ml]

Glycin	40 mM	1,5 g
Tris	25 mM	1,5 g
Methanol	20 %	100 ml
SDS 10 %	0,005 %	250 µl

TBS-Puffer pH 7,4 [500 ml]

NaCl	140 mM	8,18 g
Tris	10 mM	1,21 g

TBST-Puffer pH 7,4 [500 ml]

NaCl	140 mM	8,18 g
Tris	10 mM	1,21 g
Tween 20	0,05 %	250 µl

Blockierlösung 10 % [50 ml]

Magermilchpulver in TBS (frisch ansetzen)	5 g
--	-----

Coomassie Blau

Coomassie Brilliant Blue R250	0,25 g/90 ml Methanol:H ₂ O (1:1) und 10 ml Eisessig
-------------------------------	---

Coomassie Entfärbelösung

H ₂ O:Ethanol:Eisessig	6:3:1
-----------------------------------	-------

Amidoschwarzlösung

Amidoschwarz 0,1 %	100 mg/100 ml Methanol:Eisessig:H ₂ O (40:10:50)
--------------------	---

Caspase-3-Assay:*Lysispuffer [100 ml]*

Hepes 50 mM pH 7,4	5 ml Hepes-Stocklösung 1 M pH 7,4
EDTA 0,1 mM	20 µl EDTA-Stocklösung 0,5 M
Triton X-100 0,1 %	100 µl
CHAPS 0,1 %	100 mg
	Lagerung bei +4°C

⇒ kurz vor Gebrauch DTT und PMSF zusetzen: Stocklösungen der Substanzen (1 M bzw. 100 mM) werden 1:1000 bzw. 1:100 verdünnt

DTT	1 mM
PMSF	1 mM

Assaypuffer [100 ml]

Hepes 50 mM pH 7,4 EDTA 1 mM NaCl 100 mM CHAPS 0,1 % Glycerol 10 %	5 ml Hepes-Stocklösung 1 M pH 7,4 200 µl EDTA-Stocklösung 0,5 M 0,5844 g 100 mg 10 ml Lagerung bei +4°C
⇒ kurz vor Gebrauch DTT zusetzen: Stocklösung (1 M) 1:100 verdünnen	
DTT	10 mM

Caspase-3-Substrat

Stocklösung 20 mM Ac-DEVD-AFC	5 mg/392 µl DMSO aliquotieren und lichtgeschützt bei –20°C lagern
Arbeitslösung 2 mM	Verdünnung der Stocklösung 1:10 mit Assaypuffer

Fluoreszenz-Standard

Stocklösung 10 mM AFC	5 mg/2,18 ml DMSO aliquotieren und lichtgeschützt bei –20°C lagern
Arbeitslösung 10 µM	Verdünnung der Stocklösung 1:1000 mit Assaypuffer

Caspase-3-Inhibitor

Stocklösung 200 µM Ac-DEVD-CHO	1 mg/400 µl DMSO + 10 ml Assaypuffer aliquotieren und bei –80°C lagern
Arbeitslösung 1 µM	Verdünnung der Stocklösung 1:200

Zellfixierung:*Glutaraldehydlösung 1 % [10 ml]*

Natriumphosphat/ Magnesiumchlorid-Puffer	9,6 ml
Glutaraldehyd 25 %	0,4 ml

Natriumphosphat 100 mM pH 7,0/ Magnesiumchlorid 1 mM – Puffer [500 ml]

Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 58 mM	5,162 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O 42 mM	2,898 g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O 1 mM	500 µl

Zellfärbung:*DAPI/ Sulforhodamin-Lösung [1 l]*

DAPI 8 µM	2,8 mg
Sulforhodamin 101 10 µM	6,3 mg

Cytochrom c:*Schwellpuffer [100 ml]*

D-Mannitol	3,64 g
Saccharose	14 ml Saccharose-Stocklösung 0,5 M
EGTA	0,038 g
Hepes	1 ml Hepes-Stocklösung 1 M pH 7,4

Lysispuffer [100 ml]

D-Mannitol	3,64 g
Saccharose	14 ml Saccharose-Stocklösung 0,5 M
EGTA	0,038 g
Hepes	1 ml Hepes-Stocklösung 1 M pH 7,4
NP-40	1 ml

Initiations-Promotionsexperiment:*Diethylnitrosamin*

DEN	1 g/100 ml H ₂ O
-----	-----------------------------

PCB-Lösungen

Flasche 1 PCB 28 Hochdosis	1,225 g/160 ml Maiskeimöl
Flasche 2 PCB 28 Hochdosis	1,272 g/165 ml Maiskeimöl
Flasche 3 PCB 28 Niedrigdosis	0,440 g/170 ml Maiskeimöl
Flasche 4 PCB 101 Hochdosis	1,454 g/150 ml Maiskeimöl
Flasche 5 PCB 101 Hochdosis	1,546 g/160 ml Maiskeimöl
Flasche 6 PCB 101 Niedrigdosis	0,563 g/170 ml Maiskeimöl

Bromdeoxyuridin

BrdU	1 g/66,7 ml NaCl 0,9 % Zugabe von 467 µl NaOH 1M
------	---

Carnoy-Fixierungslösung

Ethanol abs. : Chloroform : Eisessig	6 : 3 : 1
--------------------------------------	-----------

Tris-Maleat-Puffer 0,2 M pH 7,2 [1 l]

Tris Base	24,2 g
Maleinsäure	23,2 g

Substratinkubationslösung

Tris-Maleat-Puffer 0,2 M	60 ml
H ₂ O bidest	65 ml
Bleinitrat 2 %	10 ml tropfenweise unter Rühren zugeben
MgCl ₂ 0,1 M	15 ml langsam zugeben
Adenosin-5'-triphosphat	75 mg

Fixiergemisch 5 % [250 ml]

Glutaraldehyd 25 %	50 ml
Eisessig	12,5 ml
	mit H ₂ O bidest auffüllen, immer frisch ansetzen

Hämalaun nach Mayer [1 l]

Hämalaun	1 g
NaJO ₃	0,2 g
Kalialaun	50 g
Chloralhydrat	50 g
Zitronensäure	1 g

Mikrosomenpuffer 50 mM NaP_i/1 mM EDTA pH 7,6 [1 l]

Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	7,52 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1,07 g
EDTA	2 ml 0,5 M EDTA-Stocklösung

NaP_i-Puffer 50 mM pH 8,0 [1 l]

Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	8,44 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0,36 g

BSA-Eichlösung

BSA	2 mg/ml NaP _i aliquotieren und bei -20°C lagern
-----	---

Resorufin-Eichlösung

Stocklösung 140 µM	33 mg/l Methanol Lagerung bei +4°C lichtgeschützt
Arbeitslösung	Verdünnung der Stocklösung 1:200 mit NaP _i Lichtgeschützt auf Eis aufbewahren

NADPH

NADPH 13,4 mM	11,2 mg/ml NaP _i aliquotieren und bei -20°C lagern
---------------	--

Ethoxyresorufin

Stocklösung 1,05 mM Ethoxyresorufin	253 µg/ml Methanol aliquotieren und bei -20°C lichtgeschützt lagern
Arbeitslösung	Verdünnung der Stocklösung 1:30 mit NaP _i Lichtgeschützt auf Eis aufbewahren

Pentoxyresorufin

Stocklösung 2,1 mM Pentoxyresorufin	595 µg/ml Methanol aliquotieren und bei -20°C lichtgeschützt lagern
Arbeitslösung	Verdünnung der Stocklösung 1:30 mit NaP _i Lichtgeschützt auf Eis aufbewahren

Fluorescamin-Stopplösung

Fluorescamin	150 µg/ml Acetonitril Lagerung lichtgeschützt bei +4°C
--------------	---

3.5 Wirkung von ‚nicht-dioxinartigen‘ PCBs auf primäre Hepatozyten

3.5.1 Isolierung parenchymaler Leberzellen

3.5.1.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Zur Rattenleberperfusion wurden männliche Ratten des Stammes ‚Wistar‘ von Charles River Deutschland GmbH bezogen. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte im Tierhaus der Technischen Universität Kaiserslautern in Makrolon-Käfigen unter künstlichen Tag-Nacht-Lichtverhältnissen. Den Tieren wurde freier Zugang zu Trinkwasser und pelletiertem Standardfutter (Altromin, Lage) gewährt. Es wurden ausschließlich Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 140-190 g verwendet.

3.5.1.2 *In situ* Perfusion einer Rattenleber und Präparation von Hepatozyten

Die Isolierung parenchymaler Zellen oder Hepatozyten aus der Rattenleber erfolgte mit Hilfe einer zweistufigen *in situ* Perfusion, modifiziert nach Seglen (1976).

Um eine sterile Präparation zu gewährleisten wurde das Präparierbesteck sowie das Schlauchsystem autoklaviert und alle verwendeten Lösungen sterilfiltriert. Vor Beginn und während der Perfusion wurden die Perfusionslösungen im Wasserbad auf 42°C erwärmt, der Waschpuffer wurde auf Raumtemperatur gebracht.

Die Ratte wurde durch eine i.p. Injektion einer Pentobarbitallösung (300 µl pro 100 g Körpergewicht) narkotisiert und auf dem Operationstisch mit Gewebebändern fixiert.

Nach Öffnung des Abdomens und Freilegung der Leber erfolgte eine Injektion des Antikoagulans Heparin (100 µl pro 100 g Körpergewicht) in die untere Hohlvene (Vena cava inferior), um eine vorzeitige Blutgerinnung zu verhindern. Zur späteren Fixierung der Braunüle wurde um die Pfortader (Vena porta hepatica) eine lockere Ligatur gelegt. Eine zweite Ligatur wurde um den unteren Teil der Hohlvene gelegt. Unmittelbar nach Einführen und Fixierung der Braunüle in die Pfortader ermöglichte die Durchtrennung der unteren Hohlvene das Abfließen von Blut und Perfusat aus der Leber.

Die Leber wurde im ersten Perfusionsschritt für ca. 7-10 min mit EGTA-haltigem Perfusionsmedium I bei einer Durchflussrate von 40 ml/min durchspült, um durch den Entzug von Ca²⁺ die Desmosomen zu lösen.

Während diesem Perfusionsschritt wurde eine zweite Braunüle in den oberen Teil der Hohlvene eingeführt und fixiert, die nach Verschließen der unteren Hohlvene mit einem Abflussschlauch versehen wurde.

Der Verdau der extrazellulären Matrix erfolgte anschließend durch 5-10 minütige rezirkulierende Perfusion mit Ca^{2+} -haltigen Perfusionsmedium II, in dem zuvor das Enzym Collagenase gelöst wurde (100 collagenase digestion units/ml), bei einer Durchflussrate von 40 ml/min. Nach erfolgreichem Verdau des Gewebes zeigte sich eine netzartige Oberflächenstruktur des Organs und die Leber wurde vorsichtig herauspräpariert. Die Leberkapsel wurde über einem sterilen Seidentuch geöffnet, die Zellen durch Zugabe von 200 ml Waschwasser herausgeschwemmt und durch das Tuch filtriert.

Anschließend wurde die entstandene Zellsuspension auf vier 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und ca. 2 min bei 350 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert (Beckman GS-6R), um tote Zellen und Zelltrümmer abzutrennen. Das entstandene Zellpellet wurde in jeweils 20-25 ml Waschwasser resuspendiert und erneut 2 min bei 350 rpm zentrifugiert. Danach wurden die Pellets in jeweils 7-8 ml Waschwasser aufgenommen und in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt.

3.5.1.3 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Zellzahlbestimmung erfolgte lichtmikroskopisch in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bei 10-facher Vergrößerung. Hierzu wurde die Zellsuspension 1:100 in Waschwasser verdünnt (990 μl Puffer + 10 μl Zellsuspension). Es wurden 3 Felder mit jeweils 16 Kleinstquadraten ausgezählt und die Anzahl der Zellen pro Milliliter Suspension nach folgender Formel berechnet:

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

GZ : durchschnittlich ausgezählte Gesamtzellzahl
 80; 16 : Faktoren der Zählkammer
 1000 : Umrechnungsfaktor von μl auf ml
 Vf : Verdünnungsfaktor der Zellsuspension (100)

Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mit dem Trypanblau-Ausschlusstest. Bei lichtmikroskopischer Betrachtung konnten tote Zellen durch Eindringen des blauen Farbstoffes von den ungefärbten lebenden Zellen unterschieden werden.

Hierzu wurde ein Aliquot einer 1:100 Verdünnung mit Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:1 versetzt. Der Quotient aus der Anzahl lebender Zellen und der Gesamtzellzahl bildet den Vitalitätsfaktor, mit dessen Hilfe durch Multiplikation mit der Zellzahl/ml die Anzahl lebender Zellen pro Milliliter Zellsuspension berechnet werden kann.

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

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

Um eine erfolgreiche Versuchsdurchführung zu gewährleisten, wurden nur Zellpräparationen mit einer Vitalität von mindestens 85 % eingesetzt.

3.5.2 Zellkultur

3.5.2.1 Herstellung einer Kollagenlösung

Zur Herstellung einer Kollagenlösung wurden ca. 20, bei -20°C gelagerte, Rattenschwänze verwendet. Die aufgetauten Schwänze wurden mit Ethanol (70 %) desinfiziert, unter der Sterilbank gehäutet und die Kollagenfasern von der Schwanzspitze her mit einer Pinzette herausgezogen. Es erfolgte eine Trocknung der Fasern unter UV-Licht über Nacht. Anschließend wurden die Fasern in kleine Stücke geschnitten, durch Reiben zwischen den Fingern aufgespalten und erneut in einer Petrischale unter UV-Licht über Nacht gelagert. Nach dem Abwiegen konnten die Fasern in einer verschlossenen Petrischale bei -20°C aufbewahrt werden.

Zur Herstellung einer Kollagen-Stocklösung wurden ca. 2 g der Fasern unter sterilen Bedingungen in einen Erlenmeyerkolben überführt und unter Rühren für eine Stunde mit H_2O bidest gewaschen. Der Waschschrift wurde anschließend für eine halbe Stunde wiederholt und die gereinigten Fasern in eine Flasche überführt. Das Lösen der Fasern erfolgte über einen Zeitraum von 24 h in 500 ml einer 0,1 %-igen Essigsäure unter Rühren. Nach der Zentrifugation der Lösung bei 3700 rpm (Beckman GS-6R) für 3 h zur Abtrennung der nicht gelösten Fasern wurde der Proteingehalt der Stocklösung bestimmt.

Zur Verwendung in der Kultivierung von Hepatozyten wurden zwei Gebrauchslösungen mit den Konzentrationen 0,5 mg/ml und 1,65 mg/ml angesetzt und zusammen mit der Stocklösung bei 4°C gelagert.

3.5.2.2 Kultivierung von Hepatozyten auf kollagenbeschichteten Gewebekulturschalen

Vor Gebrauch der Gewebekulturschalen wurden sie mit einer dünnen Kollagenschicht überzogen. Hierzu wurde die Schale mit Kollagenlösung (0,5 mg/ml) vollständig bedeckt und die Lösung in die nächste Schale überführt. Die Kulturschalen wurden über Nacht unter UV-Licht in der Sterilbank getrocknet.

Die Kultivierung von Hepatozyten erfolgte auf Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 94 mm. Tabelle 3.8 zeigt die ausgesäte Zellzahl und das Volumen des in den einzelnen Versuchen verwendeten Kulturmediums.

Tabelle 3.8:
Kultivierung von Hepatozyten auf kollagenierten Gewebekulturschalen

Versuch	Zellzahl/cm ²	Zellzahl/Schale 94 mm	Volumen Aussaatmedium	Volumen ErhaltungsmEDIUM
Ca ²⁺ -Messung	30000	280000	2 ml NIH _A	2 ml NIH _B
Bad-Phosphorylierung	85000	6 Mio.	7 ml NIH _A	7 ml NIH _B
Caspase-3-Aktivität	70000	5 Mio.	7 ml HSM	7 ml HAM
Freisetzung von Cyt c	70000	5 Mio.	7 ml HSM	7 ml HAM

Zur Aussaat der Zellen wurde ein serumhaltiges Medium verwendet. Die Anheftungszeit betrug maximal zwei Stunden. Danach wurden die Kulturschalen mit HPBS gewaschen um tote Zellen und Zelltrümmer vom Zellmonolayer zu entfernen. Die weitere Kultivierung der Hepatozyten erfolgte serumfrei bis zum Versuchsende im Brutschrank bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂.

3.5.2.3 Kultivierung von Hepatozyten auf Kollagengelen und im Kollagengelsandwich

Zur Beschichtung von Objektträgern mit Kollagengelen wurden die Objektträger zunächst mit Ethanol (70 %) gereinigt und über Nacht in Quadripermschalen mit UV-Licht bestrahlt.

Unmittelbar nach Ansetzen der gebrauchsfertigen Kollagengellösung auf Eis wurden die Objektträger in den Schalen gleichmäßig mit jeweils 700 µl beschichtet. Die Aushärtung des Gels erfolgte für ca. 1,5 Stunden erschütterungsfrei im Brutschrank bei 37°C. Vor Aussaat der Zellen wurde das Gel mit Erhaltungsmedium vorsichtig gewaschen.

Nach dem Anheften der Zellen wurden die Schalen mit den Objektträgern vorsichtig mit HPBS gewaschen. Unmittelbar danach erfolgte die Applikation der zweiten Gelschicht mit einem Volumen von jeweils 500 µl. Nach der Aushärtung konnte das Sandwichkollagen mit Erhaltungsmedium überschichtet werden.

Tabelle 3.9 zeigt die ausgesäte Zellzahl und das Volumen des verwendeten Kulturmediums. Auch hier wurden die gleichen Kulturbedingungen gewählt, wie in 3.5.2.2 beschrieben.

Tabelle 3.9:
Kultivierung von Hepatozyten auf Kollagengelen und im Kollagengelsandwich

Versuch	Zellzahl/cm ²	Zellzahl/Objektträger bzw. Schale 35 mm	Gelvolumen	Volumen Aussaatmedium	Volumen Erhaltungsmedium
Induktion von Apoptose	60000	1,44 Mio	1. 700 µl 2. 500 µl	4 ml HSM	3 ml HAM
Ca ²⁺ -Messung	30000	280000	340 µl	2 ml NIH _A	2 ml NIH _B

Zur Beschichtung von Deckgläschen mit einem Durchmesser von 15 mm wurden diese zunächst mit Ethanol (70 %) gereinigt, paarweise in eine Gewebekulturschale von 35 mm Durchmesser gelegt und über Nacht in der Sterilbank mit UV-Licht bestrahlt. Die gesamte Kulturschale wurde mit 340 µl gebrauchsfertiger Kollagengellösung beschichtet und im Brutschrank bei 37°C für ca. 1,5 Stunden zur Aushärtung des Gels inkubiert. Nach dem Waschen des Gels mit Erhaltungsmedium konnte mit der Aussaat der Zellen begonnen werden (Tab. 3.9).

3.5.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Der Proteingehalt der hergestellten Homogenate wurde nach Lowry *et al.* (1951) bestimmt. Die Methode beruht auf der Biuret-Reaktion der Peptidbindung mit Kupfer-Ionen in alkalischer Lösung und der Reduktion des Folin-Ciocalteus-Phenolreagenzes. Dieses Reagenz enthält eine Mischung aus Phosphowolframsäure und Phosphomolybdänsäure. Unter Verlust von Sauerstoffatomen des Wolframats bzw. des Molybdats wird das Reagenz hauptsächlich durch die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan reduziert. Die Kupfer-Ionen chelatisieren mit der Peptid-Struktur und erleichtern den Elektronentransfer, es resultiert eine blaue Färbung.

Zur Durchführung wurde das Proteinlysate 1:20 mit Wasser verdünnt. Für den Testansatz vermischte man 100 µl der Proteinverdünung mit 100 µl 1 M NaOH und 1 ml Lowry A-Lösung. Nach kräftigem Schütteln der Reaktionsgefäße wurde der Ansatz 10 min bei RT inkubiert.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Lowry B-Lösung und nach Mischen eine erneute Inkubation von 30 min bei RT. Die Extinktion des gebildeten Farbkomplexes wurde im Spektralphotometer bei 720 nm gegen Wasser vermessen. Zusätzlich zu den Zellhomogenaten wurde ein Leerwert vermessen, der statt Homogenat nur Wasser enthielt und dem über die Auto Zero-Funktion des Gerätes der Meßwert 0 zugeteilt wurde.

Die Proteinkonzentration wurde anhand einer BSA-Eichgeraden ermittelt und folgendermaßen berechnet:

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

E: Extinktion

Vf: Verdünnungsfaktor

3.5.4 Western Blot Analyse

3.5.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Im elektrischen Feld wandert ein Protein zur Elektrode mit entgegengesetzter Ladung, wobei die Größe des Proteins die Wanderungsgeschwindigkeit bestimmt. Da die Gesamtladung des Proteins nicht im Verhältnis zu seiner Größe steht wird häufig die Technik der SDS-PAGE angewandt, um eine Korrelation zwischen Größe und Ladung herzustellen. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) überträgt negative Ladung auf das Protein und maskiert so seine eigentliche Ladung. Die Wanderungsgeschwindigkeit zeigt nun eine lineare Korrelation zur Molekülgröße. Bei der diskontinuierlichen PAGE werden zwei Polyacrylamidgele mit unterschiedlicher Dichte und unterschiedlichem pH übereinandergeschichtet. Das feinporige Trenngel (höherer pH) wird mit einem grobporigen Sammelgel (niederer pH) überschichtet. Nach dem Durchlaufen des Sammelgels konzentriert sich das Proteingemisch in einer dünnen scharfen Bande, bevor im Trenngel die Elektrophorese der Proteine durch den Molekularsiebeffekt erfolgt. Die Konzentration des Trenn- bzw. Sammelgels richtet sich nach der Größe des zu untersuchenden Proteins.

Die Gellösung wurde zusammenpipettiert und in der Gel-Apparatur bis zu $\frac{3}{4}$ der Gesamthöhe luftblasenfrei eingefüllt. Um eine glatte Geloberfläche zu erhalten, wurde das Gel mit wenigen Tropfen n-Butanol überschichtet und ca. 1 Stunde zur Polymerisation bei RT belassen.

Die Überschichtung mit dem Sammelgel erfolgte nach Absaugen des n-Butanols und zwei Waschschrritten mit Wasser bzw. Sammelgellösung. Zur Ausbildung von Geltaschen während der 30 minütigen Polymerisation wurde ein Kamm eingesetzt. In der Elektrophoresekammer erfolgte die vollständige Flutung des Gels mit Elektrodenpuffer und die Entfernung des Taschenkamms. Die Geltaschen wurden mit max. 20 μ l der Proben sowie 3 μ l eines Molekulargewichtsstandards beladen. Der Gellauf erfolgte bei 75-200 V.

3.5.4.2 Protein-Transfer

Da die aufgetrennten Proteine im Gel für Antikörper schlecht zugänglich sind werden sie auf eine Membran eluiert. Diesen Proteintransfer im Spannungsfeld auf Nitrocellulose- oder PVDF (*Polyvinylidendifluorid*)-Membranen bezeichnet man als 'Western Blotting'. Proteine haften über hydrophobe Wechselwirkungen an der Membran und können problemlos mit Antikörpern inkubiert werden. Beim hier verwendeten 'Semidry-Blotting' werden die Proteine aus dem Gel zwischen zwei horizontal angeordneten Graphitplatten auf eine hydrophobe PVDF-Membran übertragen (Abb. 3.1).

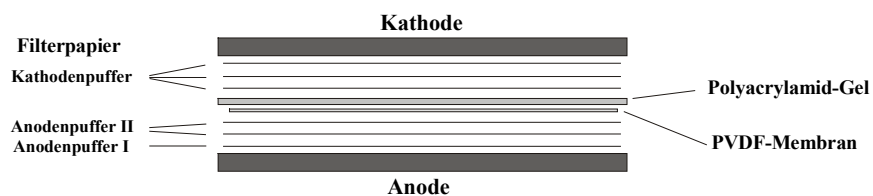


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Proteintransfers mit dem 'semi-dry-Blotting'

Ein in Anodenpuffer I (AP I) getränktes Filterpapier wurde auf die mit AP I benetzte Anode aufgelegt, gefolgt von zwei in Anodenpuffer II (AP II) getränkten Filterpapieren. Die nun aufgelegte Membran wurde zuvor kurz in Methanol geschwenkt, mit Wasser gewaschen und für 10 min in AP II eingeweicht. Um ein Austrocknen der Membran zu verhindern wurde die aufgelegte Membran mit AP II beträufelt. Anschließend wurde das zuvor für mind. 10 min in Kathodenpuffer (KP) eingeweichte Gel auf die Membran aufgelegt und darauf drei weitere mit KP getränkte Filterpapiere.

Zwischen jedem dieser Schritte wurde durch das Rollen eines Glasstabes vorsichtig die Luft entfernt. Nach Aufsetzen des Deckels (Kathode) wurde das Gel bei konstanter Stromstärke von 50 mA pro Gel geblottet.

3.5.4.3 Immunoblot und Detektion

Die Membran wurde nach erfolgreichem Transfer kurz in TBS gewaschen und anschließend für eine Stunde in Blockierlösung bei RT geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Nach mehreren Waschschrinen in TBST (mehrmals kurz, 4 x 5 min) erfolgte eine zweistündige Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper bei RT oder über Nacht bei 4°C unter Schütteln. Danach wurde erneut in TBST gewaschen (mehrmals kurz, 4 x 5 min) und mit dem sekundären Antikörper (gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase) für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Membran wurde nochmals in mehreren Schritten in TBST gewaschen.

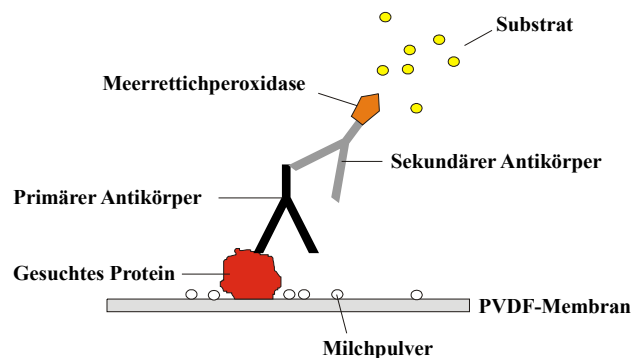


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Immunoblots

Die Detektion erfolgte über die Methode der gesteigerten Chemolumineszenz. Das Western Lightning Chemolumineszenzreagenz besteht aus einem Oxidizing Reagenz und einem Enhanced Luminol Reagenz, die 1:1 gemischt und im Dunkeln auf die Membran aufgetragen wurden (2 ml pro Membran). Im alkalischen Milieu wird Luminol von der Meerrettich-Peroxidase oxidiert und durchwandert dabei einen elektronisch angeregten Zustand. Beim Übergang in den Grundzustand kommt es zur Emission von blaugrünem Licht, das durch Zugabe eines Enhancers verstärkt werden kann.

Nach 1-minütiger Inkubation wurde die Membran in eine Plastikfolie gelegt und in einer Photokassette fixiert. Die Entwicklung des exponierten Röntgenfilms erfolgte nach 15-20 min.

Die Bandenintensitäten wurden mit Hilfe der Software TINA 2.0 quantifiziert.

3.5.5 Einfluss von PCB 153 auf die intrazelluläre Calcium-Homöostase

3.5.5.1 Einfluss von PCB 126 und 153 auf isolierte Membranfraktionen

3.5.5.1.1 Präparation von Rattenlebermikrosomen

Zur Überprüfung der direkten Wirkung von PCBs auf zelluläre Membranen wurden nach einer Vorschrift von Forster (1986) Mikrosomen aus der Rattenleber hergestellt.

Hierzu wurde zunächst die Leber einer männlichen Wistar-Ratte mit NaCl 0,9 % bis zur vollständigen Entblutung perfundiert. Die Leber wurde entnommen und auf Eis in einer geringen Menge Tris-Sucrose-Puffer mit einem Skalpell zerkleinert. Anschließend wurden die Leberstücke in ca. 4-fachem Volumen Puffer maschinell auf Eis homogenisiert.

Durch Zentrifugation bei 500 g für 20 min wurden Zelltrümmer und Zellkerne aus dem Homogenat entfernt. Ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 9000 g für 20 min sollte die Mitochondrien aus dem Homogenat entfernen bis der Überstand schließlich ultrazentrifugiert wurde (100000 g, 30 min, +4°C) um eine mikrosomale Fraktion zu erhalten. Das Pellet wurde in 0,15 M KCl resuspendiert und erneut für 30 min bei 100000 g zentrifugiert.

Die hieraus erhaltene mikrosomale Fraktion wurde in 500 µl Tris-Sucrose-Puffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Messung des Proteingehaltes wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt (s. Kap. 3.5.3).

3.5.5.1.2 Einbau von spinmarkierten Fettsäuren und Messung mit Elektronen Spin Resonanz

Die Elektronen Spin Resonanz (ESR) ist eine Methode zur Messung ungepaarter Elektronen in einem Magnetfeld. Das untersuchte Molekül nimmt Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung auf. ESR-Spektren können Aussagen über strukturelle oder dynamische Änderungen von Molekülen in biologischen Systemen liefern, hierzu muß das Molekül mit paramagnetischen Gruppen (Spinsonden) markiert werden.

Zum Einbau in die Membranen wurde 5-Doxyl-Stearinsäure und 16-Doxyl-Stearinsäure verwendet. Hierzu wurde eine 20 mM ethanolische Lösung der Spinsonden hergestellt, davon ein Aliquot von 10 µl entnommen und der Ethanol mit Stickstoff abgedampft. Zeitgleich wurden mehrere ml der Mikrosomenfraktion aufgetaut und für 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert.

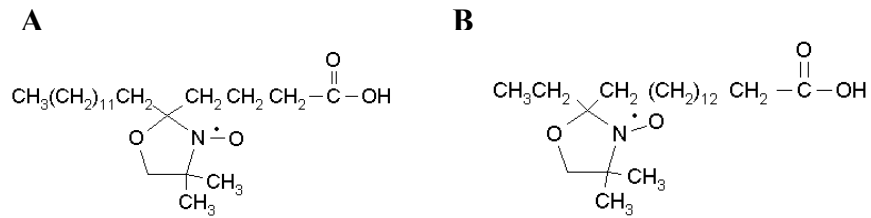


Abb. 3.3: Strukturformeln der Spinsonden 5-Doxyl-Stearinsäure (A) und 16-Doxyl-Stearinsäure (B)

Vom Überstand wurden jeweils 600 µl in die Gefäße mit spinmarkierter Fettsäure überführt und für 10 min auf dem Vortex geschüttelt. Nach 10-minütiger Behandlung im Ultraschallbad wurde die Membranfraktion bei 100000 g für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in Tris-Sucrose-Puffer homogenisiert und erneut bei 100000 g für 30 min zentrifugiert. Zur Messung am ESR wurde das Pellet in 100 µl Puffer aufgenommen und das Signal im ESR mit einem Aliquot von 20 µl überprüft.

War das Signal ausreichend konnte die markierte Probe 1:10 verdünnt werden und es erfolgte eine Zugabe des Lösungsmittels DMSO (0,5 %) bzw. der in DMSO gelösten PCBs in einer Endkonzentration von 10^{-7} M. Nach kurzem vortexen wurden 20 µl-Aliquots im ESR bei Raumtemperatur vermessen.

Um gezielt Effekte in den Spektren zu sehen wurde zusätzlich eine Versuchsreihe mit steigenden DMSO-Konzentrationen vermessen.

3.5.5.2 Einfluss von PCB 153 auf die Calcium-Homöostase in Hepatozyten

3.5.5.2.1 Kultivierung der Zellen und Beladung mit Calcium-sensitiven Farbstoffen

Zur Messung der Calcium-Homöostase in Hepatozyten wurden die Zellen in Gewebekulturschalen (35 mm), die mit zwei runden Deckgläschen (15 mm) versehen waren, auf einer normalen Kollagenbeschichtung oder einer Kollagengelschicht ausgesät. Die Anheftungsphase betrug 2 h, danach wurden die Kulturen gewaschen und mit frischem Erhaltungsmedium überschichtet. Nach einer Kulturdauer von 4-8 h wurden die Zellen mit dem unpolaren Ca²⁺-sensitiven Farbstoff Fura-2 Acetoxymethylester (Fura-2/AM) in einer Konzentration von 5 µM beladen. Acetoxymethylester sind in der Lage Zellmembranen leicht zu passieren und akkumulieren im Zellinnern nach Abspaltung der Estergruppe.

Zur Erleichterung der Diffusion des Farbstoffes in der Inkubationslösung (Ringerlösung) wurde das anionische Detergenz Pluronsäure (Pluronic F-127) während der Farbstoffbeladung in einer Konzentration von 0,02 % zugesetzt.

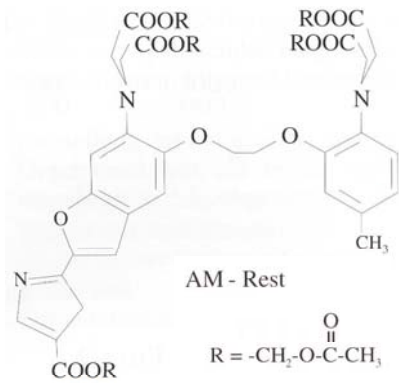


Abb. 3.4: Strukturformel des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2/AM

Auf den Gewebekulturschalen wurde das Erhaltungsmedium durch 2 ml Ringerlösung mit Fura-2/AM und Pluronsäure ersetzt und für 60 min im Brutschrank inkubiert. Nach der Beladung wurden die Hepatozyten mit frischer Ringerlösung überschichtet und bis zur Messung im Brutschrank oder kurzfristig abgedunkelt bei RT aufbewahrt. Die optimale Beladung der Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert. Für die Messung wurden die Deckgläschen herausgenommen und in eine passgenaue abgedichtete Kammer eingebracht mit einem Badvolumen von 250 μ l. Die Deckgläschen mit der darüberliegenden vom Zellmonolayer bewachsenen Kollagengelschicht wurden herausgestanzt. Zum Einbringen von Lösungen in die Kammer war diese an ein zu- und abführendes Schlauchsystem mit Pumpe angeschlossen. Das Totvolumen des zuführenden Schlauchs lag bei ca. 3 ml.

3.5.5.2.2 Mikrofluorimetrische Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentration in Hepatozyten

Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 kann selektiv Ca^{2+} -Ionen chelieren, wodurch sich seine spektralen Eigenschaften verändern. Fura-2 gehört zur Klasse der ‚dual excitation dyes‘, die bei Ionenbindung das Anregungsspektrum verschieben (Grynckiewicz, 1985).

Praktisch bedeutet dies die Möglichkeit der Messung von Ionenkonzentrationen durch Bildung eines Quotienten (Ratio) von Fluoreszenzintensitäten zweier unterschiedlicher Anregungswellenlängen.

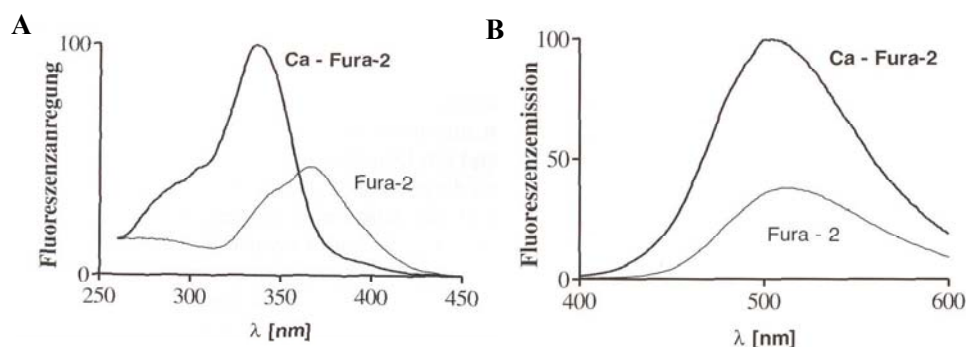


Abb. 3.5: Anregungsspektren (A) und Emissionsspektren (B) von freiem Fura-2 und Ca^{2+} -gebundenem Fura-2

Bindet Fura-2 an Ca^{2+} verschiebt sich das Maximum der Fluoreszenzanregung des Farbstoffs von 380 nm nach 340 nm, d.h. das Ratio der Fluoreszenzintensitäten bei Anregung mit Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm ($R(F_{340}/F_{380})$) nimmt zu mit steigender Ca^{2+} -Konzentration und verringert sich mit abnehmender Ca^{2+} -Konzentration. Die Ratiobildung bedeutet somit eine empfindliche Meßgröße für zytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen.

Licht einer Xenon-Bogenlampe wurde mit Hilfe eines rotierenden Spiegelrades mit einer Frequenz von 50 Hz zu zwei Monochromatoren geleitet. Durch Beugung am optischen Gitter wurde das polychromatische Licht in seine spektralen Anteile zerlegt und nur das Licht einer bestimmten Wellenlänge konnte die Monochromatoren verlassen. Zur Durchführung der Messung wurde von Monochromator I Licht der Wellenlänge 340 ± 5 nm und von Monochromator II Licht der Wellenlänge 380 ± 5 nm erzeugt. Das austretende Licht wurde zu einem inversen Fluoreszenzmikroskop mit Messkammer geleitet und in den Strahlengang gebracht. Ein Filterblock mit dichroischem Spiegel lenkte das Anregungslicht auf das Präparat und ließ das langwelligere Licht passieren. Durch Einbau eines weiteren Filters konnte nur Licht mit einer Wellenlänge von mehr als 480 nm den Detektor erreichen. Zur Detektion wurde eine SIT-Kamera (Silicon-Intensified-Target C2400) herangezogen, die die Daten mit Hilfe eines PCs aufzeichnete und diese auf einem Monitor die anzeigte. Die Monitoransicht zeigte die Fluoreszenzemission der Zellen bei den beiden gewählten Anregungswellenlängen sowie die Ratiobildung beider Wellenlängen an.

Mit Hilfe der Software Image Master (PTI) konnte ein bestimmter Messbereich von Zellen, sogenannte ‚regions of interest‘ (ROI) festgelegt werden. Die Aufnahme­frequenz in den hier durchgeführten Versuchen lag bei 0,2 Hz. Es wurden die Fluoreszenzemissionen der Zellen in den festgelegten ROI nach abwechselnder Anregung mit Licht der Wellenlänge von 340 und 380 nm simultan über die Zeit verfolgt und als Kurven gespeichert, aus denen $R(F_{340}/F_{380})$ berechnet werden konnte.

3.5.6 Untersuchungen zur Phosphorylierung von Bad an Serin 136 durch PCB 153

3.5.6.1 Kultivierung von Primärhepatozyten

Hepatozyten wurden auf kollagenbeschichteten Gewebekulturschalen (94 mm) für ungefähr 20 h kultiviert und nach Erneuerung des Mediums einer Behandlung mit verschiedenen Tumorpromotoren unterzogen. Die Zellen wurden für 6 h und 12 h mit Phenobarbital (0,5 mM), PCB 153 (10^{-6} M), TCDD (10^{-9} M), PCB 126 (10^{-6} M) und DMSO (0,5 %) inkubiert.

Des Weiteren wurden zur gezielten Aktivierung des Signalweges Versuche mit dem Wachstumsfaktor EGF und Insulin durchgeführt. EGF wurde in den Konzentrationen 10 ng/ml und 50 ng/ml eingesetzt, die Insulinkonzentrationen betragen 10 nM und 50 nM. Nach 12 bzw. 24 h Inkubationsdauer wurden die Hepatozyten geerntet.

In weiteren Versuchen wurden die Zellen in einem Minimalmedium inkubiert, das nur während der Anheftungsphase Insulin enthielt und nicht mit HEPES gepuffert wurde.

PCB 153 wurde in den Konzentrationen 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M und 10^{-5} M auf eine mögliche Phosphorylierung von Bad getestet.

Nach Inkubationsende wurden die Gewebekulturschalen mit NaCl 0,9 % gewaschen und die Zellen in 2 ml NaCl heruntergeschabt. Hierbei wurden pro Behandlungspunkt zwei Kulturschalen vereinigt. Die Zellen wurden bei 1000 rpm (Beckman G6-SR) abzentrifugiert und das Pellet bei -20°C eingefroren.

3.5.6.2 Lyse der Zellen und Immunpräzipitation

Das Zellpellet wurde in 300 μl Lysispuffer resuspendiert, für 1 h auf Eis inkubiert und zwischendurch auf dem Vortex geschüttelt. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei 12000 g abzentrifugiert, der Überstand in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Anreicherung des 26 kDa großen Proteins wurden 400 μg Gesamtprotein auf ein Gesamtvolumen von 50 μl gebracht und rotierend bei 4°C für 1 h mit 6 μl Antikörper inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von 2 μl Protein A/G Agarose und eine Inkubation über Nacht. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1000 g und 4°C wurde das Präzipitat vorsichtig mit PBS gewaschen, zur elektrophoretischen Auftrennung in 20 μl Lämmli-Puffer aufgenommen und 10 min auf dem Heizblock bei 70°C denaturiert. Vor Beladung des Gels erfolgte eine kurze Zentrifugation der Proben.

3.5.6.3 Nachweis im Western Blot

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 10 %iges Sammelgel und ein 15 %iges Trenngel hergestellt. Die Elektrophorese wurde bei 200 V für ca. 45 min durchgeführt. Der anschließende Transfer auf die PVDF-Membran dauerte ebenfalls ca. 45 min.

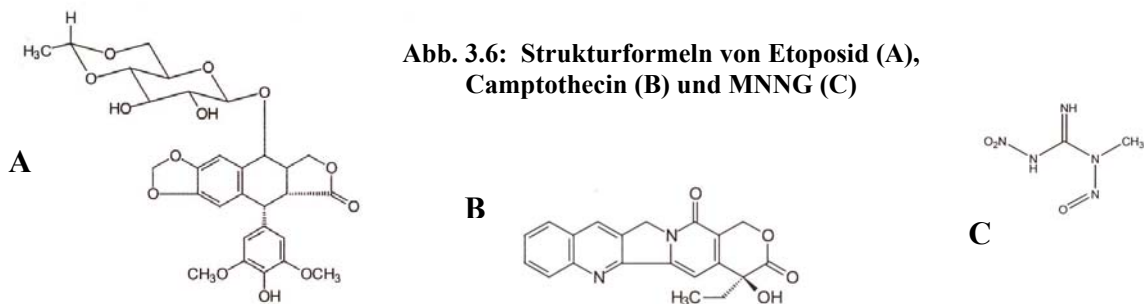
Nach der Blockierung wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit den Primärantikörpern in einer Verdünnung 1:1000 in einer Magermilchpulverlösung (5 %) inkubiert.

Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper anti-goat IgG-HRP in einer Verdünnung 1:5000 in TBST erfolgte bei RT für 1 h. Die Detektion erfolgte wie in 3.5.4.3 beschrieben.

3.5.7 Caspase-3-Aktivierung durch Etoposid, Camptothecin und MNNG

3.5.7.1 Kultivierung von Primärhepatozyten

Die Zellkultur wurde auf kollagenbeschichteten Gewebekulturschalen (94 mm) durchgeführt. Nach der Anheftungsphase in serumhaltigem Kulturmedium wurden die Hepatozyten mit HPBS gewaschen und serumfrei für 20 h weiterkultiviert. Zur Induktion der Caspase-3 wurden die Topoisomeraseinhibitoren Etoposid, ein Podophyllotoxinderivat (Abb. 3.6 A), in den Konzentrationen 200 μM und 400 μM sowie das Alkaloid Camptothecin (Abb. 3.6 B) in den Konzentrationen 10 μM und 15 μM verwendet. Die Inkubation der Substanzen wurde über einen Zeitraum von 1 h, 2 h, 4 h und 6 h durchgeführt.



Das Alkylanz MNNG (Abb. 3.6 C) wurde in den Konzentrationen 300 μM und 500 μM für 2 h inkubiert (alte MNNG-Lösung), anschließend mit HPBS heruntergewaschen und die Zellen mit frischem Erhaltungsmedium für 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h und 12 h weiterkultiviert. Eine während der Versuche frisch angesetzte MNNG-Stocklösung wurde nochmals in den Konzentrationen 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM und 250 μM getestet. Hierzu wurden die Hepatozyten nach einer Kulturdauer von 8 bis 10 h für 30 min, 1 h und 2 h mit der Substanz vorinkubiert, nach Inkubationsende wurde das MNNG-haltige Medium mit HPBS heruntergewaschen und die Zellen für weitere 12 h in frischem Medium weiterkultiviert. Kontrollkulturen wurden mit dem Lösungsmittel DMSO (0,5 %) behandelt. Pro Behandlungspunkt wurden zwei Gewebekulturschalen inkubiert.

Bei Kulturende wurden die Hepatozyten mit dem Kulturmedium abgeerntet und bei 1000 rpm (Beckman GS-6R) für 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml kalter NaCl 0,9 % resuspendiert und erneut zentrifugiert bei 500 g und 4°C für 5 min. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet bei –20°C eingefroren.

3.5.7.2 Lyse der Zellen

Das Zellpellet wurde in 400 µl kaltem Lysispuffer resuspendiert und auf Eis für 30 min, unter gelegentlichem vortexen, inkubiert. Danach erfolgte eine kurze Beschallung mit einer Ultraschallsonde (ca. 2 sec, 50 W) und eine Zentrifugation bei 10000 g für 15 min und 4°C. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und zur Proteinbestimmung (Lowry) sowie zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität herangezogen.

3.5.7.3 Caspase-3-Assay

Aktive Caspase-3 spaltet das Substrat Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-AFC nach Asp-4 und setzt AFC frei, was als Fluoreszenz bei den Wellenlängen 390 nm (Exzitation) und 520 nm (Emission) detektierbar ist (Abb. 3.7).

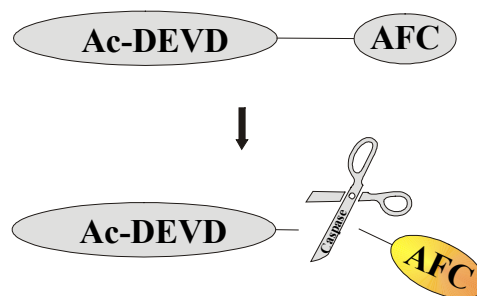


Abb. 3.7: Schematische Darstellung der Substratspaltung durch aktive Caspasen

Zur Bestimmung von unspezifisch arbeitenden Proteasen wurde das entsprechende Aldehyd, Ac-DEVD-CHO, als Caspase-3-Inhibitor eingesetzt, der spezifisch das aktive Zentrum der Caspase-3 blockiert. Zur Überprüfung der Stabilität des Substrates wurde ein Blankwert mit Lysispuffer gemessen. Die fluorimetrische Messung fand in einem Plattenlesegerät für Mikrotiterplatten (Fluoroskan Ascent) statt.

Nach folgendem Pipettierschema wurde eine AFC-Eichgerade erstellt und vermessen:

Tabelle 3.10:
Pipettierschema AFC-Eichgerade

Konzentration [μ M]	AFC-Menge/well [pmol]	Arbeitslösung [μ l]	Assay-Puffer [μ l]
0	0	0	100
0,1	10	1	99
0,3	30	3	97
0,5	50	5	95
0,8	80	8	92
1	100	10	90
2	200	20	80
4	400	40	60
6	600	60	40
8	800	80	20
10	1000	100	0

Es wurden die zugehörigen Fluoreszenzen bestimmt und ein Linearitätsbereich festgelegt. Zur Bestimmung der Caspase-Aktivität in den zu untersuchenden Proben wurde nach folgendem Schema vorgegangen.

Tabelle 3.11:
Pipettierschema zur Messung der Caspase-3-Aktivität

Probe	Assay-Puffer [μ l]	Lysat [μ l]	Inhibitor [μ l]	Substrat [μ l]
Blank	90	-	-	10
Lysat	40	50	-	10
geblocktes Lysat	30	50	10	10

Zunächst wurden die Platten für 10 min bei RT vorinkubiert. Danach erfolgte die Substratzugabe unter Lichtausschluß. Die Messung erfolgte im Minutenintervall über einen Gesamtzeitraum von 60 min. Zur Auswertung wurde die Änderung der relativen Fluoreszenzeinheiten pro min herangezogen, bei Schwankungen wurde nur der lineare Bereich der Kinetik verwendet. Die Fluoreszenzeinheiten der mit Inhibitor geblockten Ansätze wurden von den Fluoreszenzeinheiten der ungeblockten Ansätze abgezogen. Anhand der Eichgerade konnte der Umsatz an AFC pro well berechnet werden:

$$\text{AFC [pmol/min]} = \text{Relative Fluoreszenzeinheiten} \times 181$$

Diese Aktivität wurde zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Caspase in Bezug zur verwendeten Proteinmenge in mg gesetzt.

3.5.8 Fluoreszenzmikroskopische Detektion apoptotischer Zellkerne nach MNNG-Behandlung

3.5.8.1 Kultivierung von Primärhepatozyten

Zur Überprüfung der Apoptoseinzidenz in Rattenhepatozyten in Primärkultur nach MNNG-Behandlung wurden die Zellen in Sandwichkollagen auf Objektträgern kultiviert. Nach einer Kulturdauer von acht Stunden wurden die Hepatozyten für 30 min mit MNNG in einer Konzentration von 200 μ M behandelt, Kontrollkulturen enthielten DMSO (0,5 %). Die Zellen wurden anschließend mit HPBS gewaschen und mit frischem Erhaltungsmedium versehen. Nach einer weiteren Kulturdauer von 12 h wurden die Zellen fixiert.

3.5.8.2 Zellfixierung und Färbung

Die mit Hepatozyten bewachsenen Objektträger wurden in den Quadripermschalen 2-3 mal mit 0,9 % NaCl gewaschen und ca. 30 min mit einer Glutaraldehydlösung (1 %) bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals kurz mit NaCl gewaschen und über Nacht luftgetrocknet. Die getrockneten Objektträger wurden in Färbetröge überführt und in NaCl gewässert. Danach erfolgte eine 7-10 minütige Färbung mit einer DAPI/Sulforhodamin-Lösung. Nach erneutem Waschen in NaCl wurden die Objektträger im Dunkeln luftgetrocknet und mit Kaiser's Glyceringelatine eingedeckelt. Die Aufbewahrung der Präparate fand bei 4°C unter Lichtausschluß statt.

3.5.8.3 Charakterisierung und Quantifizierung apoptotischer Zellkerne

Die Unterscheidung von normalen und apoptotischen Zellkernen erfolgte anhand morphologischer Merkmale. Als apoptotische Zellkerne wurden

- stark kondensierte Kerne,
- fragmentierte Kerne (tropfenförmiges Chromatin)

gewertet.

Die mikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte erst nach Kodierung der Objektträger. Als quantitatives Maß für die Apoptoseinzidenz galt der Anteil apoptotischer Kerne unter 1000 ausgezählten Zellkernen.

Sämtliche Testansätze wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Pro Objektträger wurden jeweils 3 x 1000 Kerne ausgezählt, so daß 6 Auswertungsergebnisse zur Mittelwertberechnung herangezogen werden konnten.

3.5.9 Einfluss von PCBs, Phenobarbital und TCDD auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung

3.5.9.1 Kultivierung von Primärhepatozyten

Die Zellkultur wurde auf kollagenbeschichteten Gewebekulturschalen (94 mm) durchgeführt. Nach der Anheftungsphase in serumhaltigem Kulturmedium wurden die Hepatozyten mit HPBS gewaschen und serumfrei für 8-10 h weiterkultiviert. Zur Induktion der Caspase-3-Aktivität wurden die Primärkulturen für 30 min bzw. 2 h mit 200 µM MNNG behandelt. Das MNNG-haltige Medium wurde mit HPBS heruntergewaschen und die Zellen nach Zugabe von frischem Erhaltungsmedium für weitere 12 h mit Tumorpromotoren in verschiedenen Konzentrationen behandelt:

Phenobarbital	10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M
PCB 153	10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M
TCDD	10^{-12} M, 10^{-11} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M
PCB 126	10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M.

Kontrollkulturen wurden mit dem Lösungsmittel DMSO (0,5 %) behandelt. Pro Behandlungspunkt wurden zwei Gewebekulturschalen inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte wie in Kap. 3.5.8.1 beschrieben.

Das Zellpellet wurde wie in Kap. 3.5.8.2 beschrieben lysiert und die Lysate zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität (Kap. 3.5.8.3) eingesetzt.

3.5.10 Einfluss von Phenobarbital, PCB 153, TCDD und PCB 126 auf die MNNG-induzierte Cytochrom c-Freisetzung

3.5.10.1 Kultivierung von Primärhepatozyten

Nach Anheftung auf kollagenbeschichteten Gewebekulturschalen (94 mm) in serumhaltigem Kulturmedium wurden die Hepatozyten mit HPBS gewaschen und serumfrei für 20 h weiterkultiviert. Die Zellen wurden für 30 min mit MNNG in den Konzentrationen 50 µM, 100 µM, 150 µM, 200 µM und 250 µM behandelt, anschließend mit HPBS gewaschen und in frischem Medium für 4 h, 8 h und 12 h weiterinkubiert. In Experimenten zur Beeinflussung der MNNG-induzierten Ausschüttung von Cytochrom c durch Tumorpromotoren wurden die Hepatozyten für 30 min mit MNNG behandelt und nach dem herunterwaschen der Substanz für weitere 4 h, 8 h und 12 h mit Phenobarbital 10^{-3} M, PCB 153 10^{-5} M, TCDD 10^{-8} M und PCB 126 10^{-7} M inkubiert. Kontrollkulturen erhielten DMSO (0,5 %). Die Ernte der Zellen erfolgte wie in Kap. 3.5.8.1 beschrieben.

3.5.10.2 Lyse der Zellen

Die Aufarbeitung der Proben zum Nachweis von Cytochrom c wurde in Anlehnung an ein Protokoll von Bossy-Wetzel und Green (2000) durchgeführt.

Das Zellpellet wurde in 50 µl Mannitol-Saccharose-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis unter gelegentlichem vortexen inkubiert. Danach wurden die Proben mit einer Ultraschallsonde für ca. 1 s bei 50 W beschallt. Die Zelltrümmer wurden bei 400 g und 4°C für 5 min abzentrifugiert. Den Überstand zentrifugierte man anschließend bei 10000 g und 4°C für 10 min. Das Pellet wurde in 50 µl Mannitol-Saccharose-NP-40-Puffer resuspendiert und als mitochondriale Membranfraktion weiterverwendet. Der Überstand wurde zur Aufreinigung einer Ultrazentrifugation unterworfen (100000 g, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde verworfen und der Überstand als zytosolische Fraktion untersucht. Von beiden hergestellten Fraktionen erfolgte unmittelbar nach der Proteinisolierung eine Proteinbestimmung nach Lowry. Die Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.5.10.3 Nachweis im Western Blot

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 10 %iges Sammelgel und ein 15 %iges Trenngel hergestellt. Die Elektrophorese wurde bei max. 100 V für ca. 2-2,5 h durchgeführt. Der anschließende Transfer auf die PVDF-Membran dauerte ca. 35-40 min.

Nach der Blockierung wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper in einer Verdünnung 1:1000 in TBST inkubiert. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper anti-mouse IgG-HRP in einer Verdünnung 1:10000 in TBST erfolgte bei RT für 1 h. Die Detektion des 15 kDa großen Proteins erfolgte wie in 3.5.4.3 beschrieben.

3.5.11 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde von allen Daten der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Die Überprüfung der Ergebnisse auf Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms ‚InStat 3‘. Ergebnisse zur Hemmung der Apoptose wurden mit Friedman Test und Dunn’s post test auf Signifikanz überprüft, für alle anderen Ergebnisse wurde One-way ANOVA und Dunnett’s post test zur Überprüfung der Signifikanz herangezogen. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten der gefundenen Signifikanzen sind in den Abbildungen angegeben.

3.6 Initiations-Promotions-Studie mit PCB 28 und PCB 101

3.6.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Weibliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 75-100 g wurden von Charles River Deutschland GmbH bezogen. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte im Tierhaus der Universität Kaiserslautern in Makrolonkäfigen unter künstlichen Tag-Nacht-Lichtverhältnissen. Den Tieren wurde freier Zugang zu Trinkwasser und pelletiertem Standardfutter (Altromin, Lage) gewährt.

Nach einer Eingewöhnungsphase von einer Woche wurden die Tiere nach dem Zufallsprinzip in Behandlungsgruppen mit je 12 Tieren eingeteilt (zwei Tiere pro Käfig). Futteraufnahme, Gewicht sowie das Allgemeinbefinden der Tiere wurde während der gesamten Versuchsdauer in regelmäßigen Abständen kontrolliert und protokolliert.

3.6.2 Behandlung der Tiere

Bei Versuchsbeginn zeigten die Ratten ein Gewicht von 126-168 g. Die Aufteilung der Ratten in Behandlungsgruppen zeigt Tab. 3.12.

Tabelle 3.12:
Behandlung der Versuchsgruppen im Initiations-Promotionsexperiment

Versuchsgruppe	Behandlung
1	Wasser / Maiskeimöl
2	DEN [10 mg/kg KG] / Maiskeimöl
3	DEN [10 mg/kg KG] / PCB 28 [150 µmol/kg KG]
4	DEN [10 mg/kg KG] / PCB 28 [50 µmol/kg KG]
5	DEN [10 mg/kg KG] / PCB 101 [150 µmol/kg KG]
6	DEN [10 mg/kg KG] / PCB 101 [50 µmol/kg KG]
7	Wasser / PCB 28 [150 µmol/kg KG]
8	Wasser / PCB 101 [150 µmol/kg KG]

Zur Initiation präneoplastischer Läsionen wurde den Ratten über einen Zeitraum von 10 Tagen eine tägliche Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht (KG) Diethylnitrosamin (DEN) über eine Schlundsonde verabreicht. Die Ratten der Kontrollgruppen erhielten das gleiche Volumen Wasser über eine Schlundsonde (Abb. 3.8). Vor jeder Behandlung wurde das Gewicht der Tiere kontrolliert. Die Bildung von Foci erfolgte während einer achtwöchigen Erholungsphase mit wöchentlicher Gewichts- und Futterkontrolle.

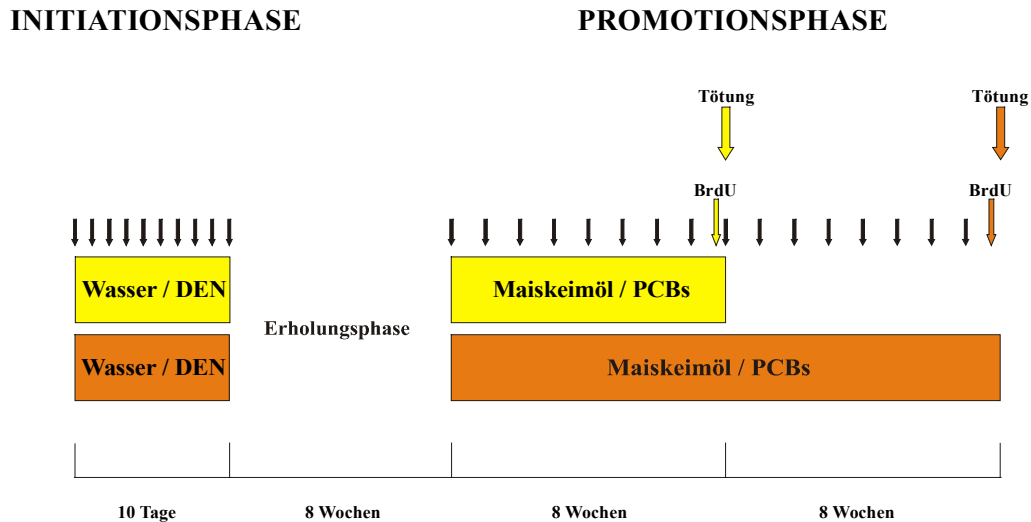


Abb. 3.8: Behandlungsschema des Initiations-Promotionsexperiments

Während der Promotionsphase von 8 bzw. 16 Wochen wurden die Tiere wöchentlich mit Maiskeimöl (Kontrolle) oder PCB (in Maiskeimöl gelöst) in Niedrigdosis ($50 \mu\text{mol/kg KG}$) oder Hochdosis ($150 \mu\text{mol/kg KG}$) behandelt (Abb. 3.8). Die Behandlung erfolgte zunächst über eine Schlundsonde und wurde nach zwei Wochen auf i.p. Injektion umgestellt.

Um kalorische Imbalancen durch das Maiskeimöl zu verhindern, wurde den Tieren ein Tag vor Behandlung das Futter entzogen. Auch hier erfolgte vor jeder Behandlung eine Gewichts- und Futterkontrolle.

Zur Erfassung der DNA-Synthese im präneoplastischen Gewebe wurde den Tieren ca. 24 h, 20 h und 16 h vor Tötung Bromdeoxyuridin (BrdU) in einer Dosis von 30 mg/kg KG durch i.p. Injektion verabreicht.

Nach einer Behandlungsdauer von 8 und 16 Wochen, wurden jeweils die Hälfte der Tiere einer Versuchsgruppe durch Dekapitation getötet und die Lebern entnommen. Das Körpergewicht der Tiere und das Lebergewicht wurde protokolliert.

3.6.3 Fixierung des Lebergewebes

Für die histologische Aufarbeitung wurden mehrere Gewebestücke sofort nach Entnahme auf Trockeneisblöcken tiefgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Ein weiterer Teil der Leber wurde für die Anfertigung von histologischen Schnitten in Carnoy-Lösung fixiert. Die Lösung wurde am zweiten und dritten Tag durch Isopropanol ersetzt und die Gewebestücke konnten darin bei Raumtemperatur gelagert werden.

Das restliche Lebergewebe wurde zerkleinert und portioniert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die PCB-Analytik und Enzymaktivitätsbestimmungen bei -80°C gelagert.

3.6.4 Bestimmung des PCB-Gehaltes in der Leber

Die Experimente zur Bestimmung der PCB-Gehalte in der Leber wurden in Zusammenarbeit mit der ERGO Forschungsgesellschaft mbH in Hamburg durchgeführt.

Zur Herstellung eines Leberhomogenats wurde 1 g Lebergewebe mit 10 g feinem Na_2SO_4 in einem Vorratsgefäß mit einem Teflonpistill zerrieben, bis ein homogenes Pulver entstand mit möglichst wenig Fasern.

Die Extraktion erfolgte in einer mit GC-Watte abgedichteten Pasteurpipette. Hierzu wurde 1 g des hergestellten Leberhomogenats direkt in die Pipette eingewogen und 10 mal mit jeweils 1 ml Lösungsmittelgemisch (Dichlormethan/Cyclohexan in gleichen Teilen) in ein Probenglas eluiert. Das Endvolumen der Probe wurde nach der Elution auf genau 10 ml gebracht. Zur Bestimmung des PCB-Gehaltes wurden 500 μl entnommen und mit 5 μl internem PCB-Standard (PCB 28/101 C^{13} , 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dotiert. Das Probenvolumen wurde auf ca. 50 μl eingengt und das Gefäß sofort mit einer Bördelkappe verschlossen.

Die Analytik erfolgte mittels niedrigauflösender Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC/MS), für die Trennung wurde eine Quarzkapillare, belegt mit Methylsilikon, verwendet. Zur Quantifizierung wurden interne und externe Standards herangezogen.

Eine Doppelbestimmung erfolgte in den unterschiedlichen Versuchsgruppen nur jeweils für eine zufällig ausgewählte Probe. Die Probenaufarbeitung wurde in Vorversuchen mit Mehrfachbestimmung getestet.

Parallel zu den Leberproben des Tierversuchs wurden mehrere Blanks (Na_2SO_4 -Eluat) bestimmt, sowie Pools aus Hühnerleber und PCB 101-belasteten Proben zur Qualitätssicherung. Um eine vollständige Extraktion der PCB zu gewährleisten, wurden einige Proben vor der Elution zusätzlich mit 10 μl nativem PCB (PCB 28/101, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dotiert und nach anschließender Aufarbeitung analysiert.

Zur Bestimmung des Fettgehaltes der Leber wurden 5 g des hergestellten Leberhomogenats in eine große, mit GC-Watte abgedichtete, Glassäule eingewogen und mit 1 x 10 ml sowie anschließend mit 3 x 5 ml Lösungsmittelgemisch in ein vorgewogenes Probenglas eluiert.

Das Lösungsmittel wurde mit Stickstoff eingedampft, die Probengläser im Exsikkator vollständig getrocknet und die Fettmenge im Glas gewogen.

Parallel dazu wurden mehrere Blanks (Na_2SO_4) bestimmt und in einem eluierten Hühnerleberhomogenat zur Qualitätssicherung der Fettgehalt auf gleiche Weise bestimmt.

3.6.5 Herstellung von Gewebeschnitten und immunhistochemische Untersuchung

Die Herstellung von histologischen Schnitten und die im Folgenden genannten Färbungen erfolgten im Institut für Toxikologie der Universität Tübingen, Arbeitsgruppe Prof. M. Schwarz.

3.6.5.1 ATPase-Färbung

Die getrockneten Gefrierschnitte der Rattenlebern wurden für 5 s in Glutaraldehyd (0,5 %) vorfixiert und nach Wässerung mit Substratinkubationslösung für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach Fällung mit Ammoniumsulfid (7,5 %) bis zur deutlichen Braunfärbung des Schnittes wurde erneut 5 min mit Glutaraldehyd/Eisessig fixiert. Die Gegenfärbung erfolgte für 30 s mit Mayer's Hämalaun. Durch Bläuen in fließendem Wasser wurde die Farbe stabilisiert. Nach Entwässerung wurden die Präparate mit Entellan eingedeckt.

3.6.5.2 GSTP/BrdU-Doppelfärbung

Getrocknete Gefrierschnitte wurden für 5 min in Paraformaldehyd (4 % in PBS) vorfixiert. Die Paraffinschnitte (entparaffiniert) und Gefrierschnitte für 15 min mit Methanol/ H_2O_2 und anschließend für 15 min 4 M HCl bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischendurch erfolgten Waschschrte mit PBS. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C mit anti-BrdU Antikörper (1:20 bzw. 1:50 in PBS) inkubiert. Nach kurzem Waschen wurde mit dem an Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörper anti-mouse-IgG (1:20 in PBS) für 20 min inkubiert. Danach erfolgte nach waschen in PBS durch Zugabe des Substrates Diaminobenzidin (DAB) für 30 min die Braunfärbung der BrdU-positiven Zellkerne. Es erfolgten jeweils 5-minütige Behandlungen mit Ethanol (50 %) und Schweinenormalserum (1:30 in PBS). Zum Nachweis der GSTP wurden die Paraffinschnitte mit anti-GSTP Antikörper 1:200 (in PBS/Schweineserum) und die Gefrierschnitte 1:500 (in PBS/Schweineserum) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach Waschen in PBS und Behandlung mit Ethanol (50 %) bzw. PBS/MgCl₂ wurde erneut kurz mit Schweinenormalserum inkubiert (1:30 in PBS/MgCl₂). Der an β -Galaktosidase gekoppelte Sekundärantikörper anti-rabbit (1:20 bzw. 1:40 in PBS/Schweineserum/MgCl₂) wurde für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Eindecken der Präparate nach mehreren Waschschrritten erfolgte mit Kaisers Glyceringelatine.

3.6.6 Quantifizierung präneoplastischer Läsionen und Bestimmung der DNA-Synthese

Die angefärbten Schnitte wurden mikroskopisch begutachtet und auf eine Fläche projiziert. Der Außenrand der Läsionen wurde manuell mit einem Cursor abgefahren und die Inselfläche mit Hilfe des Computers berechnet. Das ATPase-negative bzw. GSTP-positive Focusvolumen, bezogen auf das Lebervolumen, wurde berechnet. Weiterhin wurde die Anzahl der ATPase-negativen und GSTP-positiven Foci pro cm³ Lebergewebe mit Hilfe der stereologischen Berechnungsmethoden nach Fullman (1953) und Saltykov (1967) quantifiziert.

Die Gesamtzahl an BrdU-positiven Zellkernen in GSTP-positiven Läsionen wurde ermittelt und mit Hilfe der Inselfläche in die Kernzahl pro mm² umgerechnet.

3.6.7 Fluorimetrische Bestimmung der EROD- und PROD-Aktivität

Zum Nachweis der CYP1A-Induktion wurde die durch dieses Isoenzym katalysierte 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)- Aktivität herangezogen. Die Reaktion beruht auf der oxidativen Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin (ER) zu Resorufin. Die Induktion von CYP2B1/2 wurde mit Hilfe der 7-Pentoxyresorufin-O-depentylase (PROD)- Aktivität bestimmt (Burke *et al.*, 1985).

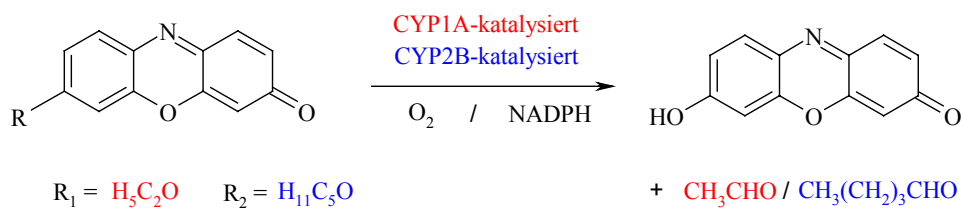


Abb. 3.9: Oxidative Dealkylierung von 7-ER bzw. 7-PR zu Resorufin

Die Herstellung eines Leberhomogenats erfolgte modifiziert nach Melancon (1996). Hierzu wurden ca. 0,5 g der Leber aus den Versuchstieren mit 2 ml Mikrosomenpuffer maschinell bei 1200 rpm auf Eis homogenisiert. Daran schloß sich ein Zentrifugationsschritt bei 11000 g für 20 min an und der daraus resultierende Überstand wurde portioniert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für Vorversuche zur Aktivitätsbestimmung der Enzyme wurde aus der Leber einer unbehandelten männlichen Wistar-Ratte nach gleicher Vorschrift ein Homogenat hergestellt und eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt.

Die Bestimmung der spezifischen EROD- bzw. PROD-Aktivität erfolgte modifiziert nach Kennedy und Jones (1994) auf einer 96-Well-Platte anhand einer Resorufin (Res)-Eichgeraden. Parallel zur Messung der Resorufingehalte der Proben wurde eine Fluorescamin (FC)-Messung durchgeführt und mit Hilfe einer BSA-Eichgeraden der Proteingehalt der Probe bestimmt. Die Homogenate der Leberproben wurden in einer Verdünnung von 1:100 in Dreifachbestimmung eingesetzt.

Tabelle 3.13:
Pipettierschema zur Bestimmung der EROD- bzw. PROD-Aktivität

Probe	NaP _i -Puffer [µl]	ER bzw.PR [µl]	NADPH [µl]	BSA [µl]	Res [µl]	FC [µl]
Blank	85	30	-	-	-	90
Standard 1	70	30	15	-	-	90
Standard 2 20 µg Protein/Well 7 pmol Res/Well	63,5	30	15	5,9	0,6	90
Standard 3 40 µg Protein/Well 28 pmol Res/Well	56	30	15	11,7	2,3	90
Standard 4 60 µg Protein/Well 84 pmol/Well	45,4	30	15	17,6	7,0	90
Standard 5 80 µg Protein/Well 133 pmol/Well	35,5	30	15	23,4	11,1	90
Standard 6 100 µg Protein/Well 175 pmol/Well	26,1	30	15	29,3	14,6	90
Leberhomogenate	70	30	15	-	-	90

Anhand des in Tab. 3.13 gezeigten Pipettierschemas wurde die 96-Well-Platte zunächst ohne NADPH und Fluorescamin-Lsg. befüllt und im Fluorimeter für 15 min bei 37°C vorinkubiert. Der Reaktionsstart mit NADPH erfolgte im Gerät über Zugabe der Lösung durch einen Dispenser. Die Inkubationszeit bei 37°C betrug 8 min. Danach wurde ebenfalls über einen Dispenser die Fluorescamin-Stopplösung zugegeben.

Die Messung der Resorufin-Fluoreszenz erfolgte bei einer Exzitationswellenlänge (Ex) von 544 nm und einer Emissionswellenlänge (Em) von 590 nm, die Werte für Fluorescamin wurden bei den Wellenlängen 390 nm (Ex) und 460 nm (Em) ermittelt.

Aus den Blanks wurde der Mittelwert der Resorufin-Fluoreszenz gebildet und von den Fluoreszenzwerten der gemessenen Leberproben abgezogen. Die Blanks erfassen die CYP-unabhängigen Zerfälle von 7-ER bzw. 7-PR.

Die spezifische EROD- oder PROD-Aktivität konnte folgendermaßen berechnet werden:

$$\text{spezifische Aktivität} \quad [\text{pmol Resorufin/min} \times \text{mg Protein}] = \frac{\text{pmol Resorufin pro Well}}{8 \text{ min} \times \text{mg Protein pro Well}}$$

3.6.8 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde von allen Daten der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Die Überprüfung der Ergebnisse auf Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms ‚InStat 3‘. PCB-Gehalte wurden mit Student’s t-test (Welch corrected) auf signifikante Unterschiede überprüft, für alle anderen Ergebnisse wurde One-way ANOVA und Dunnett’s post test zur Überprüfung der Signifikanz herangezogen. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten der gefundenen Signifikanzen sind in den Abbildungen angegeben.

4 *Ergebnisse*

4.1 Untersuchungen zur Wirkung von ‚nicht-dioxinartigen‘ PCBs in primären Hepatozyten der Ratte

4.1.1 Einfluss von PCB 153 auf die Calcium-Homöostase in primären Hepatozyten

Einige *ortho*-substituierte PCBs zeigen, im Gegensatz zu PCBs mit annähernd coplanarer Struktur, in neuronalen Zellen einen Einfluss auf die zelluläre Calcium-Homöostase (Kodavanti und Tilson, 1997). Der im ER lokalisierte Ryanodinrezeptor ist ein ligandengesteuerter Ca^{2+} -Kanal, der in Gegenwart von *ortho*-substituierten PCBs aktiviert wird und durch Entleerung von Ca^{2+} -Speichern zu einem intrazellulären Anstieg an Ca^{2+} führt (Wong und Pessah, 1996; Wong *et al.*, 1997). In der Leber konnte der Ryanodinrezeptor bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Um die Möglichkeit einer gestörten Ca^{2+} -Homöostase in Hepatozyten zu überprüfen, sollte zusätzlich zu intrazellulären mikrofluorimetrischen Ca^{2+} -Messungen in primären Hepatozyten ein direkter Einfluss von PCBs auf zelluläre Membranen untersucht werden.

4.1.1.1 Wirkung auf isolierte Membranfraktionen der Rattenleber

Das non-*ortho*-substituierte PCB 126, welches annähernd coplanare Struktur annehmen kann, sollte in seiner Wirkung mit dem di-*ortho*-substituierten PCB 153, dessen Phenylringe gegeneinander verdreht sind, auf eine eventuelle direkte Störung der Membran von Leberzellen verglichen werden.

Zur Durchführung des Experimentes wurden Rattenlebermikrosomen isoliert und spinmarkierte Fettsäuren in die Membran eingebaut. Nach Zugabe der verschiedenen PCBs wurde das Signal mit Hilfe der Elektronen Spin Resonanz (ESR) überprüft.

Der Einbau zweier verschiedener spinmarkierter Fettsäuren, 5-Doxyl-Stearinsäure und 16-Doxyl-Stearinsäure, verlief erfolgreich.

Um gezielt einen ‚positiven‘ Effekt auf die Membranen hervorzurufen wurde das Lösungsmittel DMSO in steigenden Konzentrationen zu den mit 16-Doxyl-Stearinsäure markierten Mikrosomen hinzugegeben.

Ein deutlicher Effekt war bei einer Konzentration von 10 % DMSO in der Probe bereits erkennbar. In Abb. 4.1 ist der positive Effekt bei einer DMSO-Konzentration von 20 % gezeigt (Pfeil).

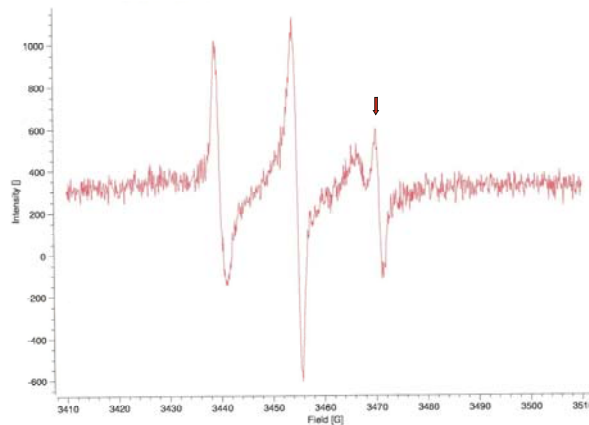


Abb. 4.1: ESR-Spektrum einer mit 16-Doxyl-Stearinsäure markierten Membranfraktion. Die Fraktion wurde mit DMSO 20 % behandelt, um einen positiven Effekt (Pfeil) zu erzielen.

Abb. 4.2 zeigt die Spektren der mit 5-Doxyl-Stearinsäure markierten und mit PCB 126 10^{-7} M (C), PCB 153 10^{-7} M (D) sowie dem Lösungsmittel DMSO (B) inkubierten Mikrosomen.

Beim Vergleich des Spektrums von unbehandelten (A) mit DMSO-behandelten Mikrosomen (B) zeigt sich ein Effekt, der auf die freie Beweglichkeit der Spinsonde im Lösungsmittel DMSO zurückgeführt werden kann. In späteren Messungen stellte sich heraus, dass nur ca. 10 % der eingesetzten Sonde in der Radikalform vorlagen und somit anhand der hier dargestellten Spektren keine Aussage über eine Beeinflussung der Membranen durch PCBs (C, D) getroffen werden kann.

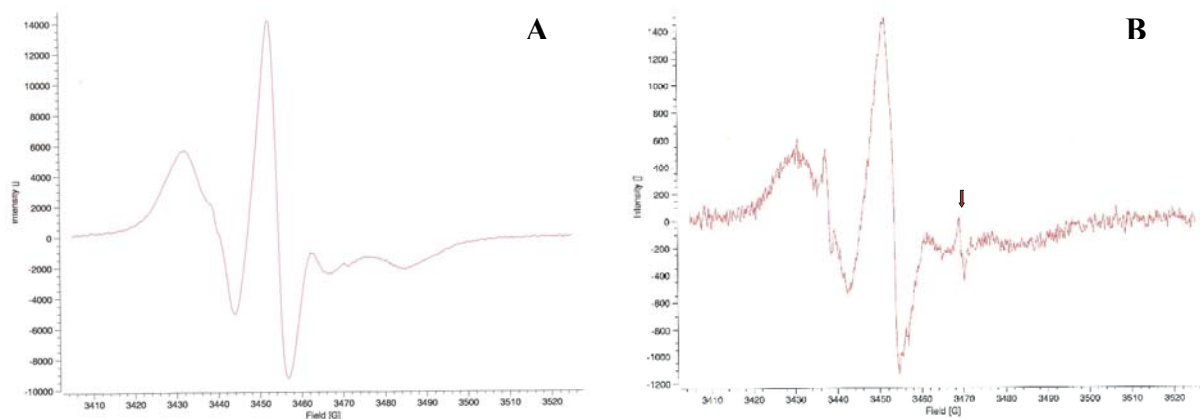


Abb. 4.2: ESR-Spektren von 5-Doxyl-Stearinsäure markierten Membranfraktionen. (A) zeigt die markierte Membranfraktion, in (B) ist die Behandlung mit DMSO (0,5 %) dargestellt, bei der sich ein kleiner Lösungsmittelleffekt zeigt (Pfeil).

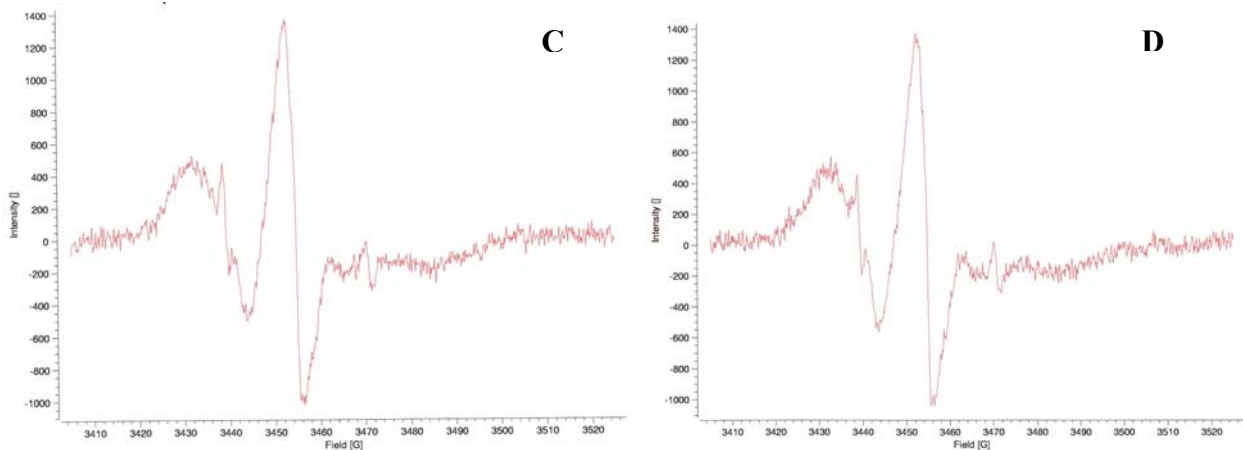


Abb. 4.2: ESR-Spektren von 5-Doxyl-Stearinsäure markierten Membranfraktionen (Fortsetzung). Die Zugabe von PCB 126 (10^{-7} M) (C) und PCB 153 (10^{-7} M) (D) zu den Mikrosomen lässt keine Veränderung erkennen.

Mit 16-Doxyl-Stearinsäure markierte Membranlipide (Abb. 4.3) zeigen aufgrund der Position des Nitroxidradikals generell eine sehr hohe Beweglichkeit. Aufgrund einer zu hoch gewählten Konzentration der Spinsonde und der daraus resultierenden wechselseitigen Spin-Umklappung der Sonden (Heisenberg-Spin-Austausch) zeigte sich im Spektrum eine Linienverbreiterung. Mögliche Wechselwirkungen der PCBs mit Membranlipiden können unter diesen Versuchsbedingungen nur schwer erkannt werden.

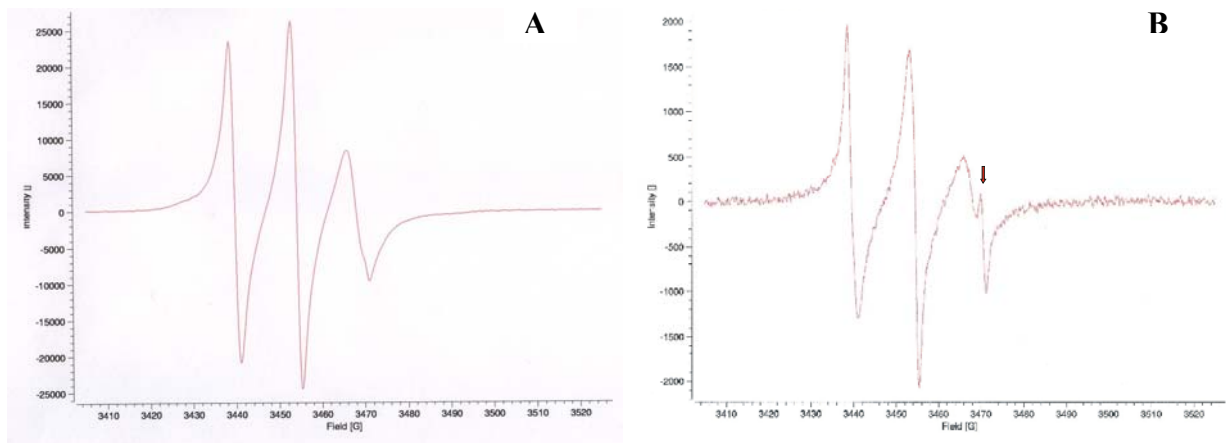


Abb. 4.3: ESR-Spektrum von 16-Doxyl-Stearinsäure markierten Membranfraktionen. Das Spektrum der markierten Mikrosomen ist in (A) dargestellt, (B) zeigt mit DMSO (0,5 %) behandelte Fraktionen. Der Lösungsmittelleffekt ist mit einem Pfeil markiert.

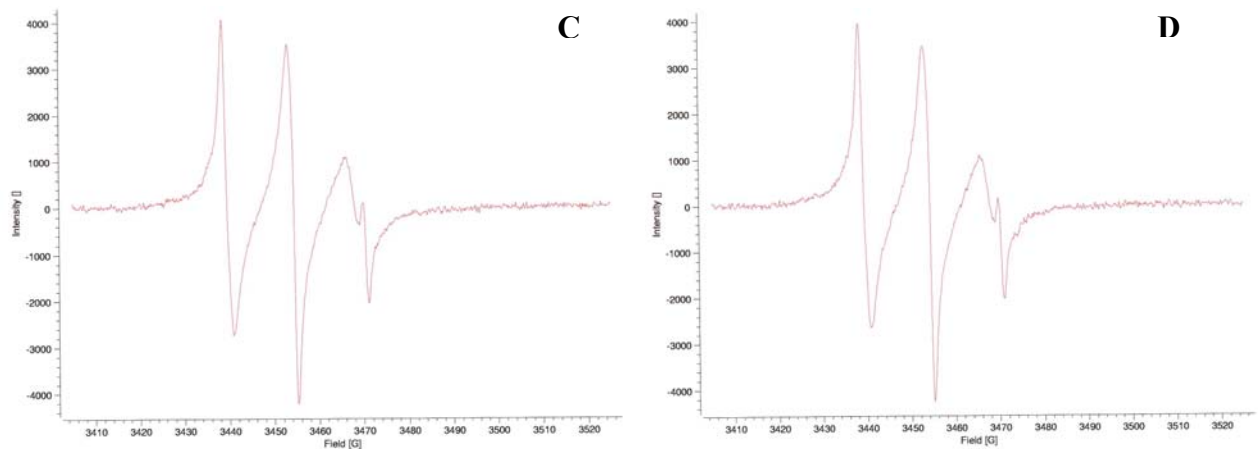


Abb. 4.3: ESR-Spektrum von 16-Doxyl-Stearinsäure markierten Membranfraktionen (Fortsetzung). Die Behandlung mit PCB 126 (10^{-7} M) (C) und PCB 153 (10^{-7} M) (D) zeigt keine spektralen Veränderungen gegenüber der Lösungsmittelkontrolle.

4.1.1.2 Mikrofluorimetrische Calcium-Messung in primären Hepatozyten

Ein möglicher Einfluss von *ortho*-substituierten PCBs auf die Ca^{2+} -Homöostase in Hepatozyten sollte durch mikrofluorimetrische Ca^{2+} -Messungen untersucht werden. Hierzu wurden Hepatozyten auf kollagenierten Deckgläschen und auf Deckgläschen mit Kollagengelen kultiviert und mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2, in Form eines Acetoxymethylesters, beladen. In einer Messkammer wurden die Zellen mit PCB 153 in den Konzentrationen 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, PCB 126 10^{-7} M und Phenobarbital 1 mM und 2 mM für 30 min inkubiert und die Fluoreszenzintensitäten bei den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm verfolgt. Zu Beginn jeder Messung wurde eine Positivkontrolle in Form einer kurzzeitigen Behandlung der Zellen mit ATP 50 μM mitgeführt.

Die Abb. 4.4 und 4.5 zeigen die Veränderung des intrazellulären Calciumspiegels von Hepatozyten auf normalen kollagenbeschichteten Deckgläschen und auf einer Kollagengelschicht nach Zugabe von ATP, das extrazellulär membrangebundene purinerge Rezeptoren besetzt und über diese zur Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher führt.

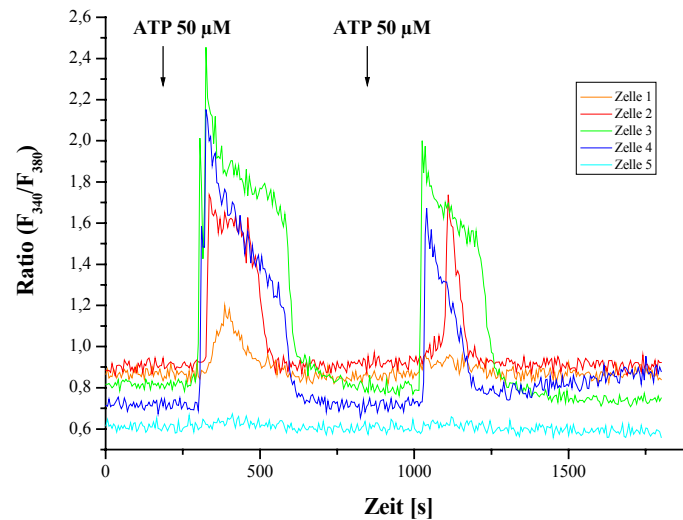


Abb. 4.4: Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Applikation von ATP. Die Zellkultur erfolgte auf kollagenierten Deckgläschen. ATP ($50 \mu\text{M}$) wurde ca. 3 min und 14 min nach Beginn der Messung zugegeben.

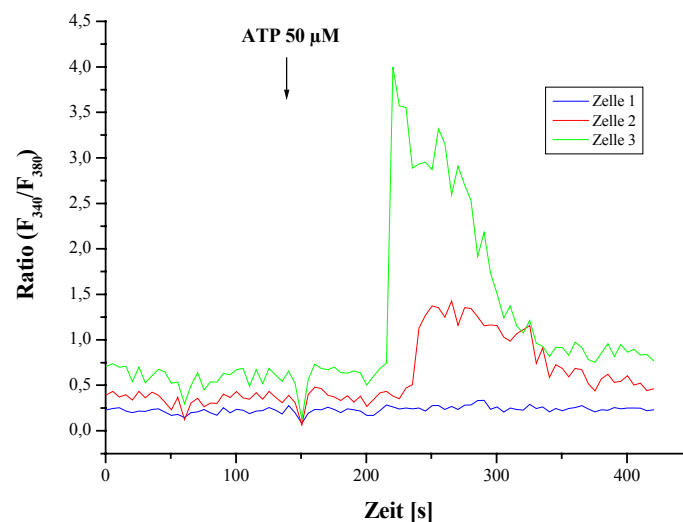


Abb. 4.5: Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Applikation von ATP. Die Zellkultur erfolgte auf Deckgläschen mit einer einfachen Kollagenschicht. ATP ($50 \mu\text{M}$) wurde ca. 2,5 min nach Beginn der Messung zugegeben.

Nicht alle Zellen reagierten auf ATP mit der Ausschüttung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern. Wenn eine Reaktion stattfand, trat diese sehr schnell auf und führte auch zu einer raschen Wiederaufnahme von Ca^{2+} in die Speicherorganellen.

Die Behandlung der Zellen mit Cyclopiazonsäure (CPA), einem spezifischen Ca^{2+} -ATPase-Inhibitor, führte in allen untersuchten Zellen zu einer langsamen reversiblen Entleerung der Ca^{2+} -Speicher (Abb. 4.6).

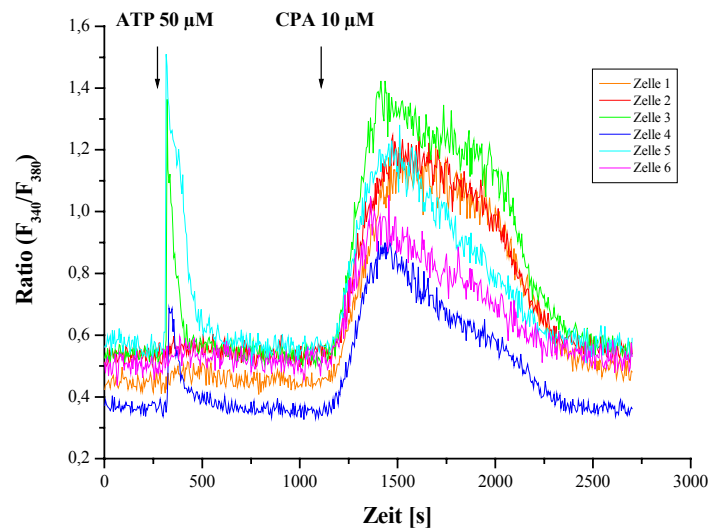


Abb. 4.6: Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Applikation von ATP und Cyclopiazonsäure. Die Zellen wurden auf kollagenierten Deckgläschen kultiviert. ATP ($50 \mu\text{M}$) wurde ca. 4 min nach Beginn der Messung zugegeben und zeigte in drei Zellen eine Reaktion. Durch Zugabe von CPA nach ca. 18 min reagierten alle Zellen mit einem intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg.

PCB 153 zeigte in keiner der verwendeten Konzentrationen einen Effekt auf den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel (Abb. 4.7). Die Hepatozyten zeigten in dem dargestellten Experiment eine sehr gute Reaktion auf die Positivkontrolle ATP.

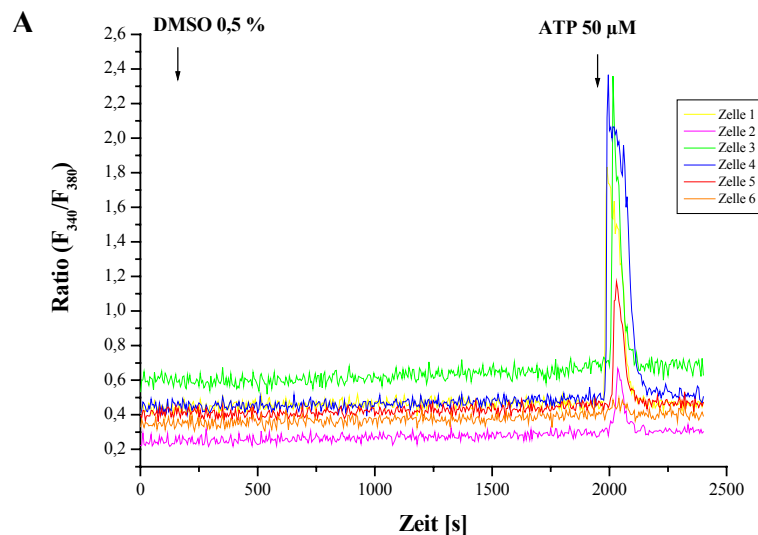


Abb. 4.7: Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Applikation von PCB 153. Die Zellkultur erfolgte auf kollagenierten Deckgläschen. Der Zeitpunkt der Zugabe von ATP ($50 \mu\text{M}$) als Positivkontrolle bzw. DMSO (0,5 %) (A) ist mit einem Pfeil markiert.

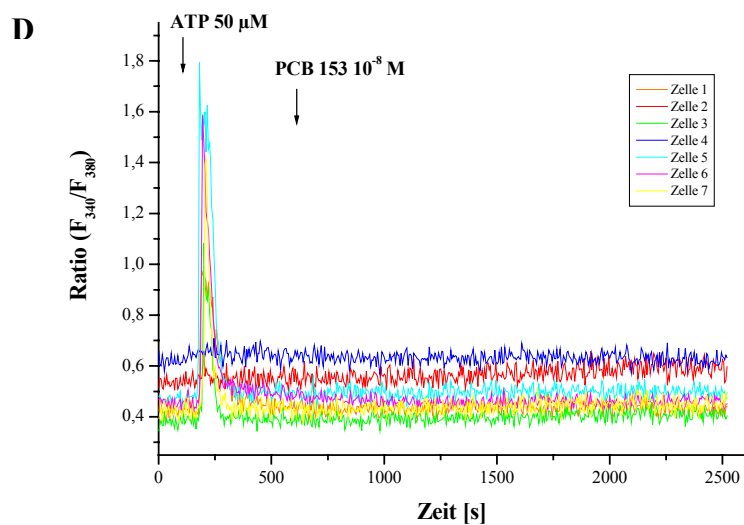
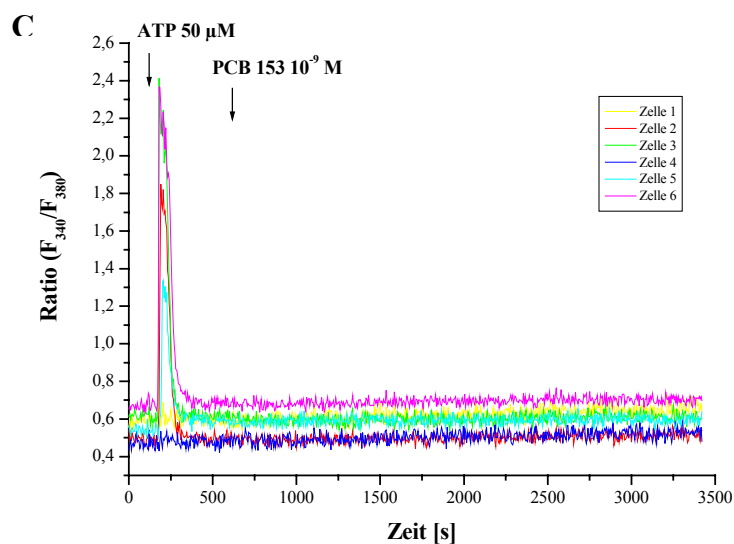
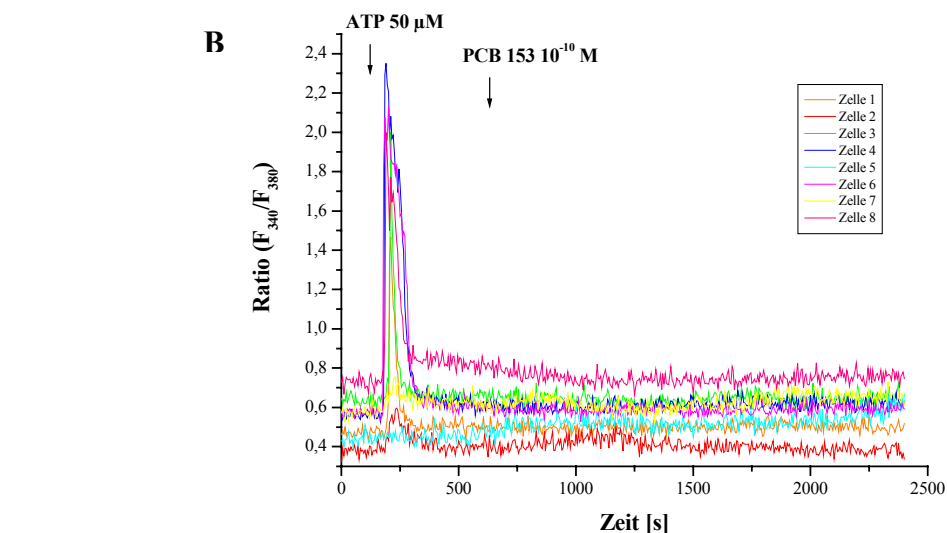


Abb. 4.7: Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Applikation von PCB 153 (Fortsetzung). Die Zellkultur erfolgte auf kollagenierten Deckgläsern. Der Zeitpunkt der Zugabe von ATP (50 μM) als Positivkontrolle und PCB 153 10^{-10} M (B), 10^{-9} M (C) und 10^{-8} (D) ist mit einem Pfeil markiert.

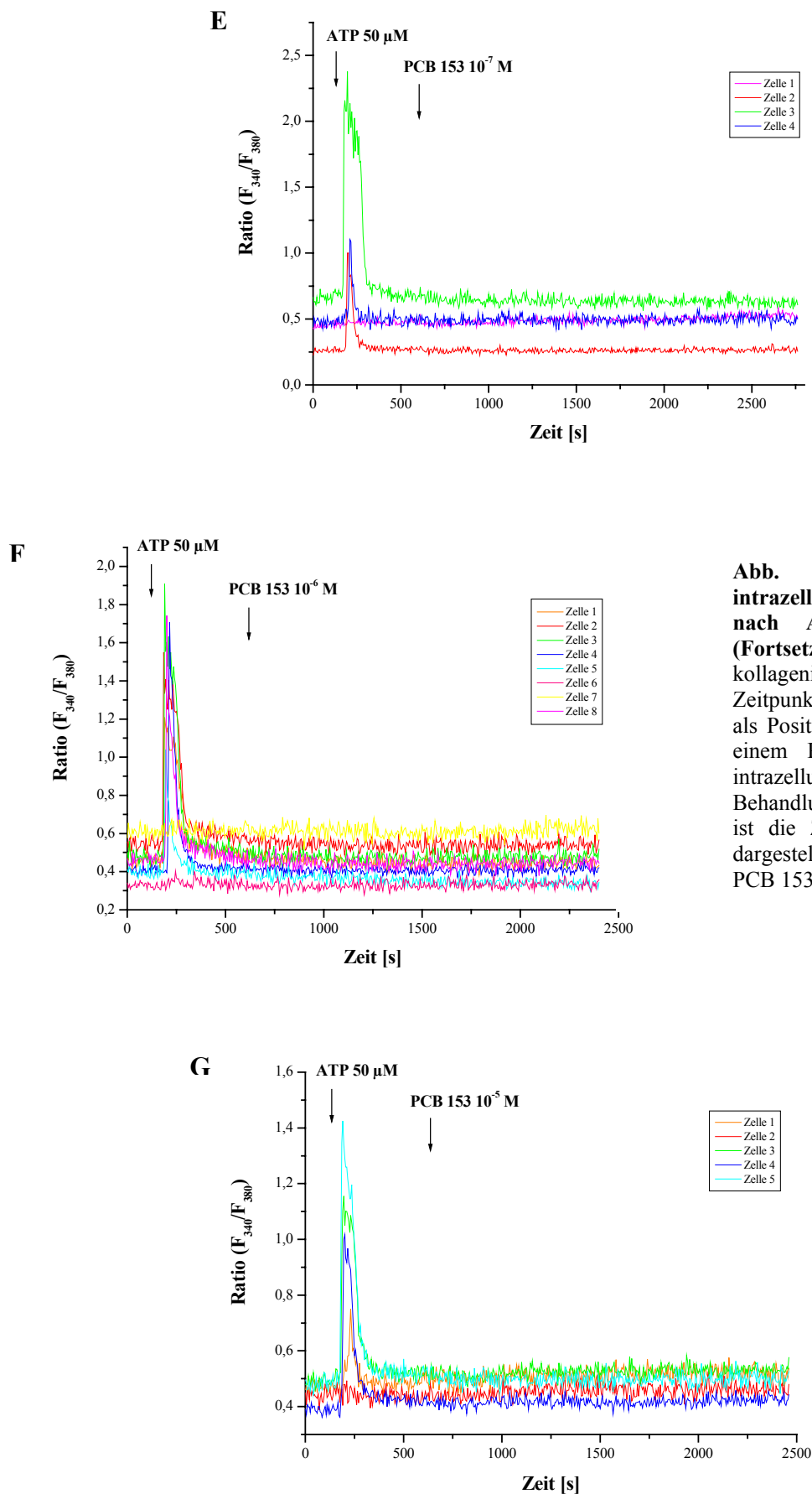


Abb. 4.7: Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Applikation von PCB 153 (Fortsetzung). Die Zellkultur erfolgte auf kollagenierten Deckgläschen. Der Zeitpunkt der Zugabe von ATP (50 μ M) als Positivkontrolle und PCB 153 ist mit einem Pfeil markiert. (E) zeigt den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel nach Behandlung mit PCB 153 10^{-7} M, in (F) ist die Zugabe von 10^{-6} M PCB 153 dargestellt und (G) zeigt die Reaktion auf PCB 153 10^{-5} M.

In einem weiteren Experiment mit Hepatozyten auf Kollagengelen zeigten sich auch bei einer Umkehrung des Versuchsaufbaus, Inkubation mit PCB 153 10^{-5} M für 30 min und anschließender Positivkontrolle mit ATP, keinerlei Veränderungen in der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Abb. 4.8). Eine Beeinflussung der Ca^{2+} -Ausschüttung durch ATP ist ebenfalls nicht feststellbar.

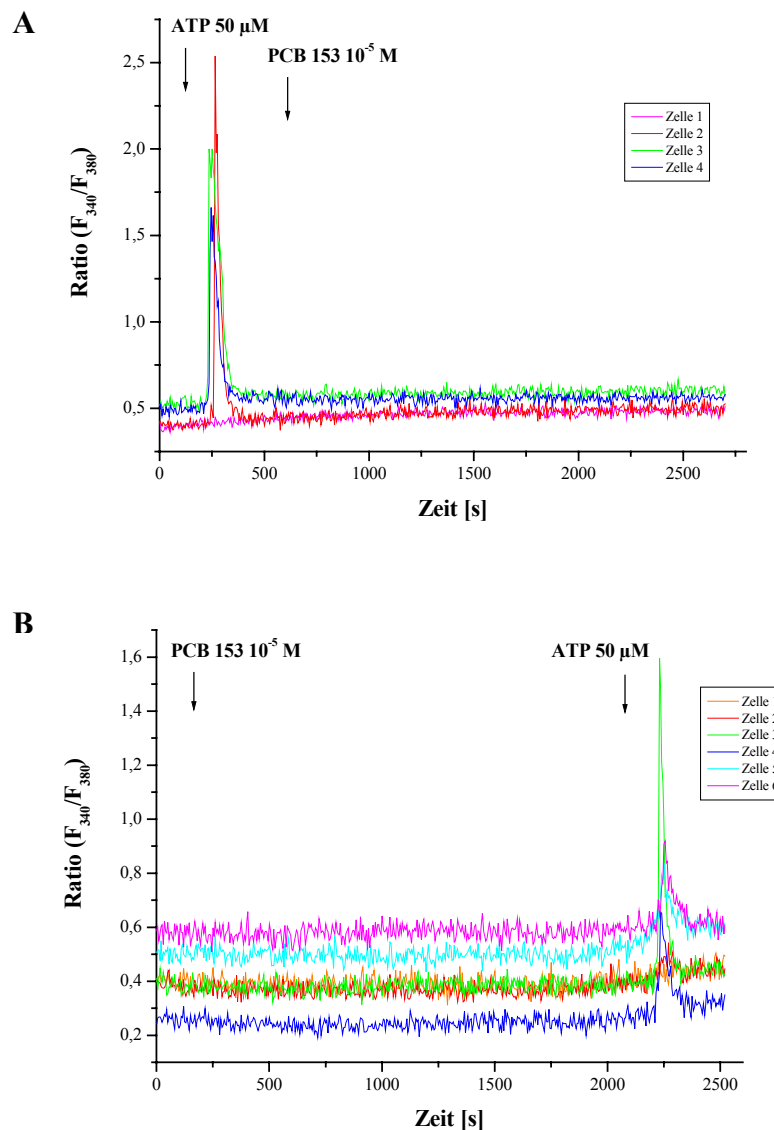


Abb. 4.8: Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Applikation von PCB 153. Die Zellkultur erfolgte auf Deckgläschen mit einer einfachen Kollagengelschicht. (A) Die Zugabe von PCB 153 (10^{-5} M) erfolgte ca. 2 min nach Beginn der Messung, ATP ($50 \mu\text{M}$) ca. 35 min später. (B) zeigt die Umkehrung des Versuchsaufbaus.

In einem einmaligen Versuch mit PCB 126 sowie mehreren Versuchen mit Phenobarbital konnte ebenfalls keine Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Ca^{2+} -Messungen gestalteten sich zum Teil als sehr schwierig, da Hepatozyten unterschiedlicher Zellpräparationen große Unterschiede in der Reaktion auf die Applikation von ATP zeigten.

4.1.2 Untersuchungen zur Phosphorylierung von Bad an Serin 136 durch PCB 153

Das proapoptotische Bad kann an Serin 136 (Ser 136) über den PI3K/PKB-Signalweg phosphoryliert werden und ermöglicht somit ein Überleben der Zellen (Yang *et al.*, 1995). Verschiedene Tumorpromotoren, deren tumorpromovierende Wirkung auf eine Hemmung der Apoptose zurückgeführt wird, wurden auf eine mögliche Phosphorylierung von Bad an Ser 136 mit der Western Blot Analyse nach einer Immunpräzipitation der Proteine untersucht.

Die Werte der Menge an Gesamtprotein (Bad) und phosphoryliertem Protein (BadP) in Abbildungen und Tabellen beziehen sich auf die als 100 % gesetzte Kontrolle (Lösungsmittel).

Hepatozyten wurden für 6 h und 12 h in normalem insulinhaltigem Kulturmedium NIH mit den Tumorpromotoren Phenobarbital, TCDD, PCB 153 und PCB 126 in einer ausgewählten Konzentration inkubiert.

Abb 4.9 zeigt die Bandenintensität von phosphoryliertem Bad sowie an Gesamtprotein Bad. Keiner der Tumorpromotoren zeigte nach einer Inkubationszeit von 6 h und 12 h einen Einfluß auf die Phosphorylierung von Bad.

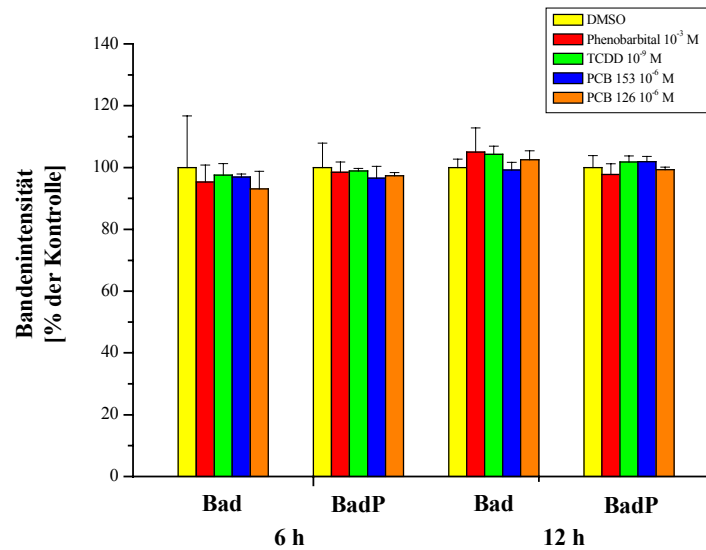


Abb. 4.9: Einfluss von Tumorpromotoren auf die Phosphorylierung von Bad an Ser 136. Hepatozyten wurden für 6 h und 12 h mit DMSO, Phenobarbital (10^{-3} M), TCDD (10^{-9} M), PCB 153 (10^{-6} M) und PCB 126 (10^{-6} M) inkubiert. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus zwei unabhängigen Experimenten berechnet.

In den folgenden Versuchen wurde der PI3K/PKB-Signalweg gezielt durch Zugabe von Insulin und EGF aktiviert. Die Versuche fanden in Erhaltungsmedium mit unterschiedlicher Zusammensetzung statt.

Tabelle 4.1 fasst die Bandenintensitäten von phosphoryliertem Bad und Gesamtprotein an Bad der einzelnen Versuche zusammen.

Hepatozyten, die in normalem insulinhaltigen Erhaltungsmedium NIH_B kultiviert wurden, zeigten eine verstärkte Phosphorylierung von Bad nach Zugabe von Insulin 10 nM und 50 nM nach 24 h. Bei gleichzeitiger Gabe von EGF 10 ng/ml und den beiden Insulinkonzentrationen zeigte sich ebenfalls eine deutliche Phosphorylierung von Bad nach 24 h, die allerdings geringer ausfiel als die alleinige Insulingabe.

Tabelle 4.1:
Phosphorylierung von Bad an Ser 136 durch Insulin und EGF
 Die angegebenen Bandenintensitäten an Gesamtprotein Bad und phosphoryliertem Bad (BadP) beziehen sich auf die als 100 % gesetzte Kontrolle.

Zeit	Behandlung	Versuch 1	NIH _B +Insulin	Versuch 2	Williams Medium E -Insulin -Hepes	Versuch 3	Williams Medium E -Insulin +Hepes
		Bad [%]	BadP [%]	Bad [%]	BadP [%]	Bad [%]	BadP [%]
12 h	Kontrolle	100	100	-	-	100	100
	Insulin 10 nM	101,5	109,4	-	-	86,8	100
	Insulin 50 nM	97	112,4	-	-	85,5	90,6
	EGF 10 ng/ml	-	-	-	-	57,7	96,7
	EGF 50 ng/ml	-	-	-	-	59,6	90,4
	Insulin 10 nM + EGF 10 ng/ml	106,2	103,3	-	-	57	88,2
	Insulin 50 nM + EGF 10 ng/ml	103,1	105,7	-	-	64,9	93,1
Insulin 50 nM + EGF 50 ng/ml	96,4	103,7	-	-	90,4	97,5	
24 h	Kontrolle	100	100	100	100	100	100
	Insulin 10 nM	99,2	163,4	139,5	274,8	95,6	99,4
	Insulin 50 nM	92,6	193,8	137,1	239,7	71,6	90,9
	EGF 10 ng/ml	-	-	54,9	167,7	89,1	103,3
	EGF 50 ng/ml	-	-	137,8	292,7	73,5	95,4
	Insulin 10 nM + EGF 10 ng/ml	115,2	130	148	271,2	128,5	96,6
	Insulin 50 nM + EGF 10 ng/ml	82,5	131,9	108,4	244,6	152	97,9
Insulin 50 nM + EGF 50 ng/ml	71,9	86,4	37,5	29,2	155,2	116,5	

Der Effekt der Phosphorylierung wurde aufgehoben durch gleichzeitige Zugabe von Insulin 50 nM und EGF 50 ng/ml. Nach 12 h Kulturdauer zeigte sich eine leicht erhöhte Phosphorylierung von Bad durch Insulin 50 nM. Der Gesamtproteinlevel zeigte nach 24 h eine deutliche Abnahme bei Hepatozyten mit einer Behandlung von Insulin 50 nM/EGF 10 ng/ml und Insulin 50 nM/EGF 50 ng/ml.

In einem Experiment mit modifiziertem Williams Medium E Kulturmedium ohne Insulin und der Puffersubstanz Hepes konnte nach 24 h eine starke Phosphorylierung von Bad an Ser 136 sowie einem Anstieg an Gesamtprotein nach Behandlung mit Insulin und EGF nachgewiesen werden. Eine Inkubation mit EGF 10 ng/ml zeigte einen geringen Bad-Proteinlevel und eine geringere Phosphorylierung als die anderen Inkubationsbedingungen. Wurden Insulin und EGF gleichzeitig in hohen Konzentrationen gegeben, so hatte dies einen verringerten Gesamtproteinlevel sowie eine vergleichbar geringe Phosphorylierung zur Folge.

Versuch 3 zeigt die Bandenintensitäten von Gesamtprotein Bad und phosphoryliertem Bad in Hepatozyten, die ebenfalls in modifiziertem Williams Medium E ohne Insulin kultiviert wurden, jedoch mit Zugabe von Hepes.

Nach einer Inkubationszeit von 12 h ist ein zum Teil beträchtlicher Rückgang des Gesamtproteinlevels erkennbar. Auch nach 24 h ist der Gesamtproteinlevel bei Insulin- und EGF-behandelten Zellen erniedrigt, der Proteinlevel steigt jedoch an bei gleichzeitiger Gabe von Insulin und EGF. Bei der Phosphorylierung von Bad zeigt sich lediglich bei einer gleichzeitigen Inkubation von Insulin und EGF in hohen Konzentrationen nach 24 h ein kleiner Effekt.

Das PCB-Kongener 153 wurde in einer Konzentrationsreihe auf eine mögliche Beeinflussung der Phosphorylierung von Bad an Ser 136 untersucht. Die Versuche wurden in modifiziertem insulinfreiem Williams Medium E mit Hepes und Hepes-frei durchgeführt.

Tab. 4.2 zeigt die Bandenintensitäten der Western Blot Analyse nach 12 h und 24 h Kulturdauer. Parallel zu PCB 153 wurden auch Hepatozyten mit Insulin oder EGF behandelt.

Der Versuchsansatz mit Hepes-gepuffertem Medium zeigte keine Phosphorylierung von Bad nach Inkubation mit Insulin und EGF für 24 h. Nach Inkubation mit PCB 153 war der Gesamtproteinlevel an Bad konzentrationsabhängig verringert, wobei die niedrigste Bandenintensität bei der höchsten eingesetzten Konzentration 10^{-5} M auftrat. PCB 153 zeigte bei einer Konzentration von 10^{-8} M eine erhöhte Phosphorylierung von Bad, die mit steigender Konzentration abnahm.

Wurde auf Hepes als Puffersubstanz im Medium verzichtet, zeigten Insulin und EGF eine leicht gestiegene Bad-Phosphorylierung nach 12 h. Insulin führte in beiden Konzentrationen zu einem Anstieg des Gesamtproteinlevels. Nach einer Inkubationsdauer von 24 h zeigten sich in den beiden Versuchsansätzen sehr widersprüchliche Ergebnisse, sowohl keine Veränderungen gegenüber der Kontrolle als auch eine starke Abnahme des Gesamtproteinlevels an Bad und an phosphoryliertem Bad.

Tabelle 4.2:
Phosphorylierung von Bad an Ser 136 durch Insulin, EGF und PCB 153
 Die angegebenen Bandenintensitäten an Gesamtprotein Bad und phosphoryliertem Bad (BadP) beziehen sich auf die als 100 % gesetzte Kontrolle.

Zeit	Behandlung	Williams Medium E +Insulin +Hepes		Williams Medium E -Insulin -Hepes		Williams Medium E -Insulin -Hepes	
		Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
		Bad [%]	BadP [%]	Bad [%]	BadP [%]	Bad [%]	BadP [%]
12 h	Kontrolle	-	-	100	100	100	100
	Insulin 10 nM	-	-	139,4	114,8	-	-
	Insulin 50 nM	-	-	133,3	111,2	-	-
	EGF 10 ng/ml	-	-	89,5	117,5	93,6	101,2
	EGF 50 ng/ml	-	-	109,8	109,6	101,5	113,5
	DMSO	-	-	100	100	100	100
	PCB 153 10 ⁻¹⁰ M	-	-	-	-	98,3	97,6
	PCB 153 10 ⁻⁹ M	-	-	-	-	98,2	88,9
	PCB 153 10 ⁻⁸ M	-	-	176,1	136,2	99,1	81,8
	PCB 153 10 ⁻⁷ M	-	-	112,1	103	95,2	75,4
	PCB 153 10 ⁻⁶ M	-	-	98,9	86,5	99,4	105,8
PCB 153 10 ⁻⁵ M	-	-	95,1	80,7	90,1	79,6	
24 h	Kontrolle	100	100	100	100	100	100
	Insulin 10 nM	91,9	98,7	107,7	37,3	-	-
	Insulin 50 nM	93,4	93,4	90	121,6	-	-
	EGF 10 ng/ml	99,2	100,9	105,9	45,5	100,1	101,8
	EGF 50 ng/ml	90	94,2	76,3	53,9	102,6	92,8
	DMSO	100	100	100	100	100	100
	PCB 153 10 ⁻¹⁰ M	-	-	-	-	105,1	102,2
	PCB 153 10 ⁻⁹ M	-	-	-	-	108,1	121,7
	PCB 153 10 ⁻⁸ M	98,3	133,1	87,2	212,9	110,9	134,4
	PCB 153 10 ⁻⁷ M	98,8	114,8	84,5	146	104,4	127,4
	PCB 153 10 ⁻⁶ M	73,3	110,1	67,4	132,8	102,2	102,3
PCB 153 10 ⁻⁵ M	67,6	111	88,7	111,3	112,5	109,7	

Bei Inkubation mit PCB 153 in einer Konzentrationsreihe zeigten sich in beiden, unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchen, ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse. Nach einer Inkubationsdauer von 24 h war jedoch eindeutig eine konzentrationsabhängige Phosphorylierung von Bad an Ser 136 zu verzeichnen, deren Maximum bei einer Konzentration von 10⁻⁸ M lag.

Abb. 4.10 fasst die gefundene Phosphorylierung von Bad durch PCB 153 nach einer Kulturdauer von 24 h unter verschiedenen Kulturbedingungen noch einmal zusammen.

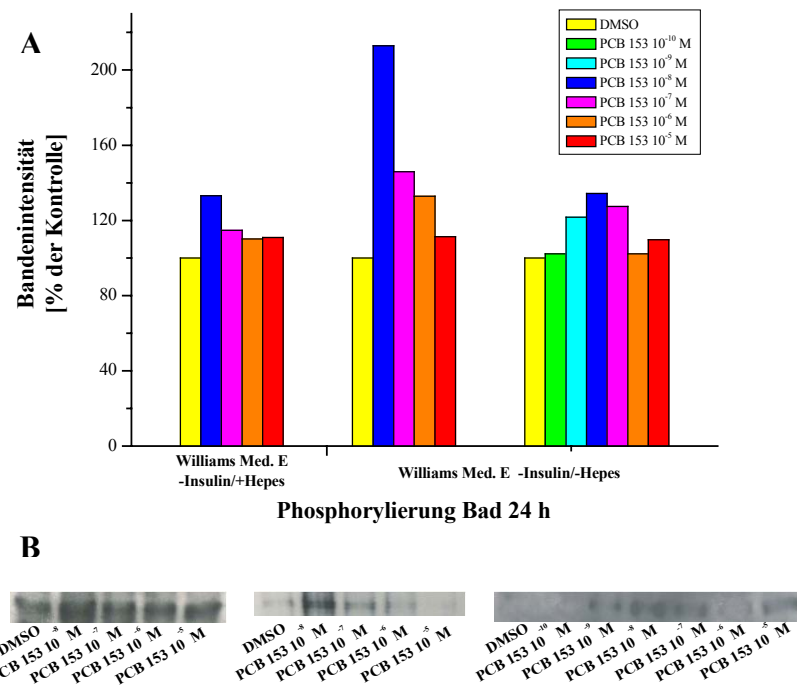


Abb. 4.10: Einfluss von PCB 153 auf die Phosphorylierung von Bad an Ser 136. Hepatozyten wurden für 24 h mit DMSO und PCB 153 inkubiert. Die in (A) dargestellten Bandenintensitäten beziehen sich auf die Kontrolle (100 %). (B) zeigt die zu den einzelnen Versuchen gehörenden Aufnahmen des Western Blots.

4.1.3 Caspase-3-Aktivierung durch Etoposid, Camptothecin und MNNG

Die Aktivierung der Caspase-3 dient als biochemischer Nachweis der Induktion von Apoptose. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Caspase-3-Assay, modifiziert nach Nicholson *et al.*, (1995), etabliert werden und eine geeignete Substanz zur Induktion von Apoptose in Hepatozyten gefunden werden.

Zum Einsatz kamen zwei Topoisomeraseinhibitoren, Etoposid und Camptothecin, die sich in Experimenten von Gomez-Lechon *et al.* (2002) als geeignete Substanzen zeigten, sowie das alkylierende Agens MNNG, ein nachgewiesenes Mutagen. Es sollten verschiedene Konzentrationen der einzelnen Substanzen in einer Zeitverlaufsreihe getestet werden.

4.1.3.1 Caspase-3-Aktivierung durch Etoposid

In einer Zeitverlaufsreihe wurden die Zellen für 1 h, 2 h, 4 h und 6 h mit dem Topoisomeraseinhibitor Etoposid in den Konzentrationen 200 μM und 400 μM inkubiert.

Etoposid zeigte in den durchgeführten Experimenten eine signifikante Induktion der Caspase-3-Aktivität bereits nach einer Inkubationsdauer von 2 h bei einer Konzentration von 200 μM (Abb. 4.11). Es wurde bei 200 μM eine Steigerung der Aktivität um das zweifache der Kontrolle gemessen, dieses Maximum war nach 4 h Inkubationsdauer erreicht.

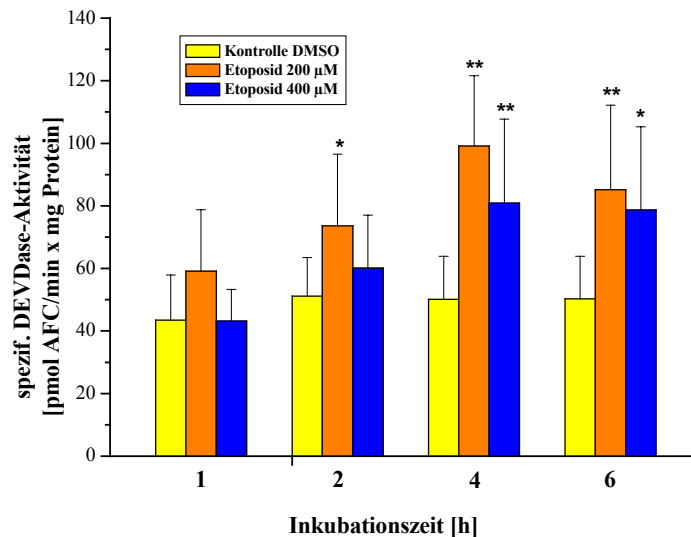


Abb. 4.11: Caspase-3-Aktivierung durch Etoposid. Die Inkubation der Hepatozyten erfolgte in einer Zeitverlaufsreihe mit den Konzentrationen 200 μM und 400 μM . Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die mit Sternen versehenen Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$).

Eine Erhöhung der Konzentration (400 μM) zeigte zwar signifikante Effekte, verglichen mit der niedrigeren Konzentration waren diese Effekte aber deutlich geringer.

4.1.3.2 Caspase-3-Aktivierung durch Camptothecin

Der Topoisomeraseinhibitor Camptothecin wurde ebenfalls in einer Zeitverlaufsreihe für 1 h, 2 h, 4 h und 6 h in den Konzentrationen 10 μM und 15 μM getestet.

Die in Abb. 4.12 dargestellten Ergebnisse zeigten eine signifikante Induktion nach 4 h Inkubationsdauer.

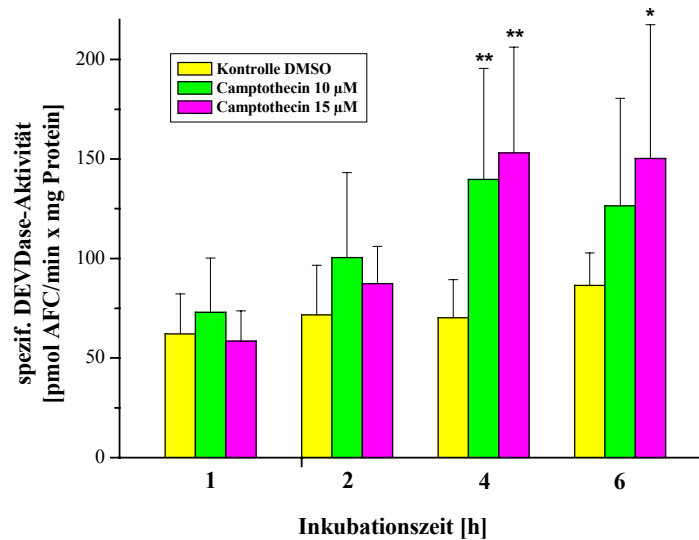


Abb. 4.12: Caspase-3-Aktivierung durch Camptothecin. Die Inkubation der Hepatozyten erfolgte in einer Zeitverlaufsreihe mit den Konzentrationen 10 µM und 15 µM. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die mit Sternen versehenen Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$).

Auch hier lag das Maximum der Induktion nach 4 h bei etwa dem zweifachen Wert der Kontrolle bei einer Konzentration von 10 µM. Eine erhöhte Konzentration der Substanz (15 µM) ließ den Effekt nur geringfügig ansteigen.

4.1.3.3 Caspase-3-Aktivierung durch MNNG

Die Hepatozyten wurden mit dem Alkylanz MNNG, das in Kultur sehr instabil ist, für 2 h in den Konzentrationen 300 µM und 500 µM inkubiert. Nach Entfernen der Substanz wurden die Zellen für 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h und 12 h weiterinkubiert.

Bereits nach einer Inkubationszeit von 2 h konnte mit 500 µM MNNG eine fast zweifach gesteigerte Caspase-3-Aktivität verzeichnet werden (Abb. 4.13). Nach 6 h zeigte eine Konzentration von 300 µM einen signifikanten Anstieg der Caspase-3-Aktivität auf das 2,5-fache.

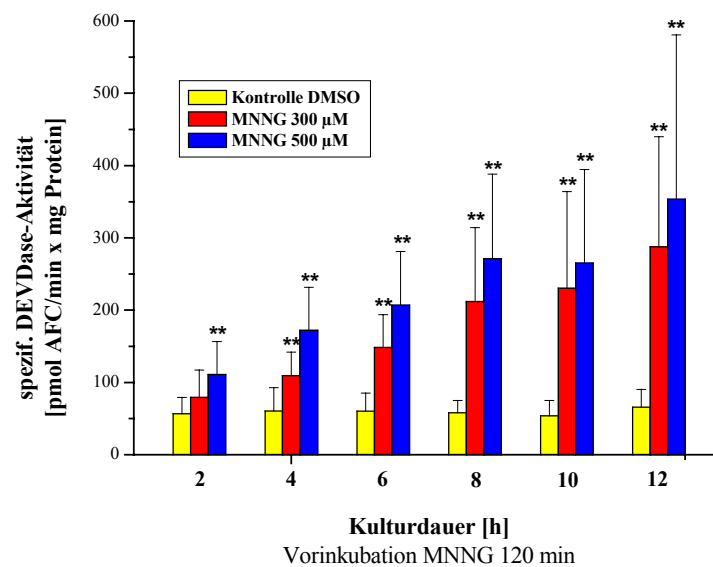


Abb. 4.13: Caspase-3-Aktivierung durch MNNG. Die Hepatozyten wurden mit MNNG in den Konzentrationen 300 µM und 500 µM für zwei Stunden inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgeerntet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die mit Sternen versehenen Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (**P<0,01).

Die Aktivität der Caspase-3 konnte nach einer Inkubationsdauer von 12 h mit MNNG 300 µM auf das vierfache und mit MNNG 500 µM auf das fünffache der Kontrolle gesteigert werden.

Experimente mit einer frisch angesetzten MNNG-Lösung zeigten in den vorher verwendeten Konzentrationen 300 µM und 500 µM sehr starke zytotoxische Effekte und machten somit eine erneute Testung erforderlich. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse dieser Versuche dargestellt.

Hepatozyten wurden mit MNNG in den Konzentrationen 50 µM, 100 µM, 150 µM, 200 µM und 250 µM für 30 min (Abb. 4.14), 1 h (Abb. 4.15) und 2 h (Abb. 4.17) inkubiert. Nach einer weiteren Kulturdauer von 12 h wurde die Aktivität der Caspase-3 bestimmt.

Eine Inkubation der Hepatozyten mit MNNG für 30 min ist zur Aktivierung der Caspase-3 ausreichend, verglichen mit längeren Vorinkubationszeiten zeigt sie die größten erreichbaren Effekte.

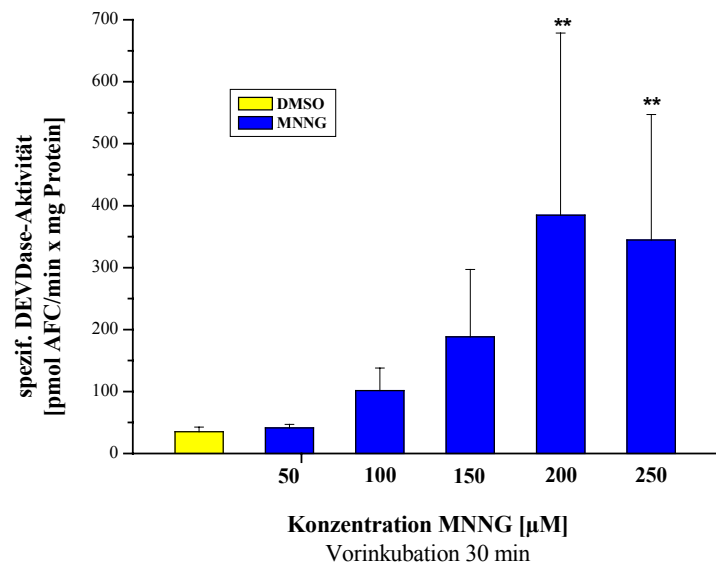


Abb. 4.14: Caspase-3-Aktivierung durch MNNG. Die Hepatozyten wurden mit MNNG in einer Konzentrationsreihe für 30 min inkubiert und nach einer weiteren Kulturdauer von 12 h geerntet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die mit Sternen versehenen Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (** $P \leq 0,01$).

Bei einer Konzentration von 200 μM und Vorinkubation von 30 min konnte die Aktivität signifikant um das 11-fache der Kontrolle gesteigert werden.

Eine Vorinkubation von 1 h führte bei gleicher Konzentration zu einer signifikanten Steigerung um das 7-fache (Abb. 4.15).

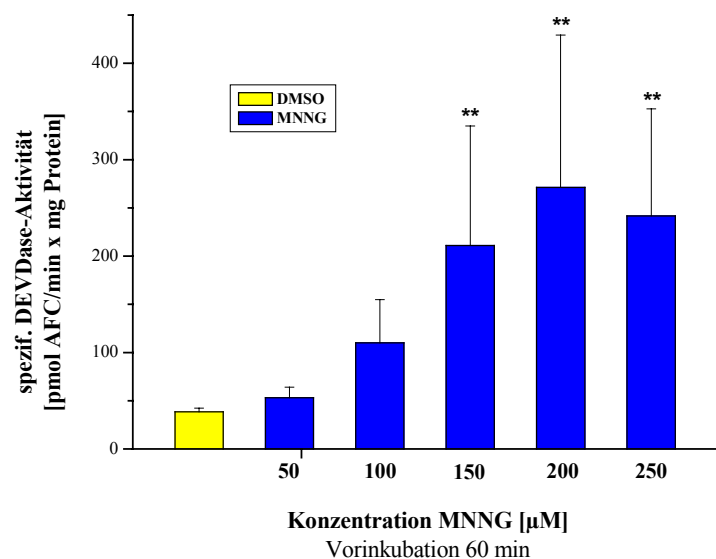


Abb. 4.15: Caspase-3-Aktivierung durch MNNG. Die Hepatozyten wurden mit MNNG in einer Konzentrationsreihe für 60 min inkubiert und nach einer weiteren Kulturdauer von 12 h geerntet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die mit Sternen versehenen Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (** $P \leq 0,01$).

Inkubierte man MNNG 200 μM für 2 h so zeigte sich eine signifikante Steigerung um mehr als das fünffache (Abb. 4.16).

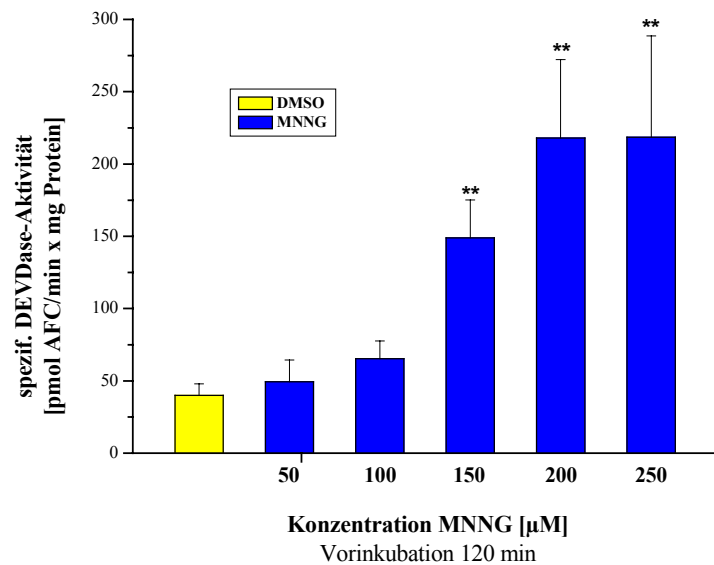


Abb. 4.16: Caspase-3-Aktivierung durch MNNG. Die Hepatozyten wurden mit MNNG in einer Konzentrationsreihe für 120 min inkubiert und nach einer weiteren Kulturdauer von 12 h geerntet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die mit Sternen versehenen Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (** $P \leq 0,01$).

4.1.3.4 Fluoreszenzmikroskopische Detektion apoptotischer Zellkerne nach MNNG-Behandlung

Die gefundene gute Induzierbarkeit der Caspase-3-Aktivierung nach Behandlung mit MNNG sollte durch die Quantifizierung apoptotischer Zellkerne anhand folgender morphologischer Merkmale in einem kleinen Versuch überprüft werden:

- stark kondensierte Kerne und
- fragmentierte Kerne (tropfenförmiges Chromatin).

Eine dazu geeignete Methode ist die Kultivierung von Hepatozyten im Kollagengelsandwich (Bohnenberger et al., 2001; Kunz, 2001). Die für 30 min mit MNNG in einer Konzentration von 200 μM behandelten und für weitere 12 h bzw. 24 h kultivierten Zellen wurden nach Fixierung mit den Fluorochromen 4,6-Diamino-2-phenylindol (DAPI) und Sulforhodamin 101 angefärbt.

DAPI (Emissionsoptimum $\lambda = 485$ nm) färbt bevorzugt AT-reiche DNA und gab dem Kernchromatin eine blaue Färbung. Zur Sichtbarmachung des Zytoplasmas wurde Sulforhodamin (Emissionsoptimum $\lambda = 620$ nm) eingesetzt, da es durch seine Affinität zu Proteinen eine Rotfluoreszenz zeigt.

Die in diesen Versuchen ermittelte Apoptoseinzidenz nach Behandlung mit MNNG 200 μM für 30 min lag bei $21,8 \pm 3,9$ % nach einer Kulturdauer von 12 h (Abb. 4.17).

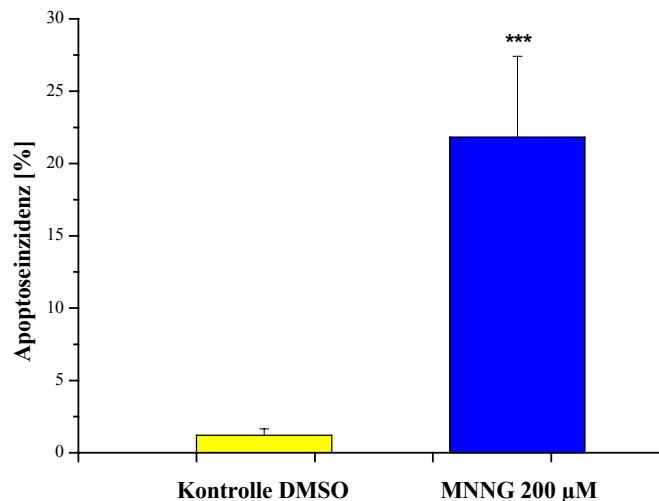


Abb. 4.17: Induktion der Apoptose durch MNNG. Die Hepatozyten wurden mit MNNG 200 μM für 30 min inkubiert und nach einer weiteren Kulturdauer von 12 h geerntet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die mit Sternen versehenen Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (** $P \leq 0,001$).

Eine Kulturdauer von 24 h zeigte sich als nicht mehr auswertbar, da der Monolayer nur noch aus sehr wenigen lebenden Zellen bestand.

4.1.4 Einfluss von Phenobarbital, PCB 153, TCDD und PCB 126 auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung

Zur Untersuchung der Apoptose-inhibierenden Wirkung von Substanzen mit tumorpromovierenden Eigenschaften wurde mit der Caspase-3-Aktivität ein biochemischer Apoptosemarker eingesetzt.

Hepatozyten wurden zur Aktivierung der Caspase-3 mit MNNG in einer Konzentration von 200 μM für 30 min bzw. 2 h inkubiert und anschließend für weitere 12 h mit den folgenden Tumorpromotoren in einer Konzentrationsreihe inkubiert:

Phenobarbital	10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M
PCB 153	10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M
TCDD	10^{-12} M, 10^{-11} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M
PCB 126	10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M.

In den Abbildungen sind die spezifischen DEVDase-Aktivitäten der mit MNNG und den Tumorpromotoren behandelten Hepatozyten bezogen auf MNNG-behandelte Hepatozyten (100%) dargestellt.

4.1.4.1 Einfluss von Phenobarbital auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung

Phenobarbital (PB) zeigte eine konzentrationsabhängige Erniedrigung der MNNG-induzierten Caspase-3-Aktivierung nach Behandlung der Hepatozyten mit MNNG für 30 min und 2 h (Abb. 4.18 und 4.19).

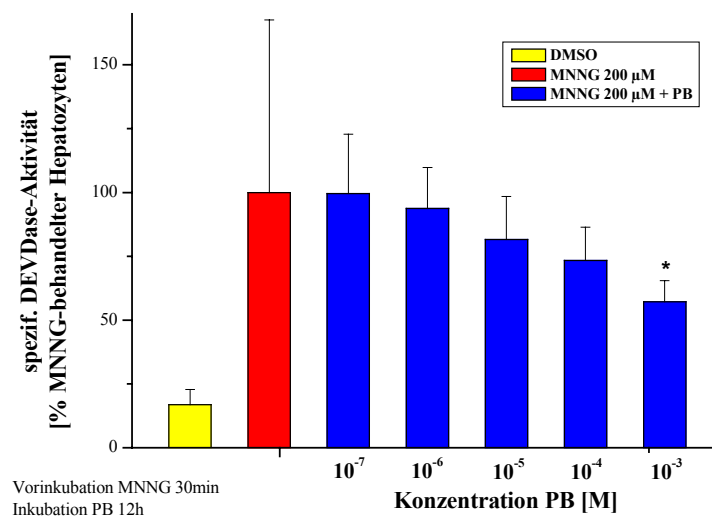


Abb. 4.18: Einfluss von Phenobarbital auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung. Die Hepatozyten wurden für 30 min mit MNNG 200 µM vorinkubiert und nach einer zwölfstündigen Inkubation mit Phenobarbital in verschiedenen Konzentrationen geerntet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten. Die mit Sternen versehenen Werte unterscheiden sich signifikant von MNNG-behandelten Zellen (* $P \leq 0,05$).

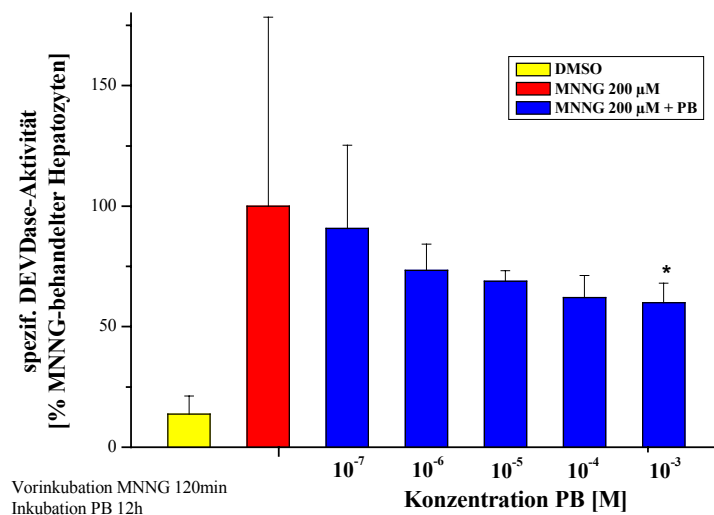


Abb. 4.19: Einfluss von Phenobarbital auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung. Die Hepatozyten wurden für 120 min mit MNNG 200 µM vorinkubiert und nach einer zwölfstündigen Inkubation mit Phenobarbital in verschiedenen Konzentrationen geerntet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die mit Sternen versehenen Werte unterscheiden sich signifikant von MNNG-behandelten Zellen (* $P \leq 0,05$).

Eine signifikante Reduktion der Aktivität um ca. 40 % wurde mit der Konzentration 10^{-3} M Phenobarbital gefunden. Die Konzentrationsreihe der beiden Ansätze zeigten einen ähnlichen Verlauf.

Bei zweistündiger MNNG-Behandlung war der Effekt in den niedrigeren Konzentrationen noch deutlicher erkennbar.

4.1.4.2 Einfluss von PCB 153 auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung

Eine konzentrationsabhängig erniedrigte Aktivität der Caspase-3 war nur nach einer Vorinkubation von MNNG für 2 h zu sehen, zeigte jedoch keine Signifikanz (Abb. 4.21). Bei der höchsten PCB-Konzentration 10^{-5} M war die Aktivität um ca. 30 % gegenüber MNNG reduziert.

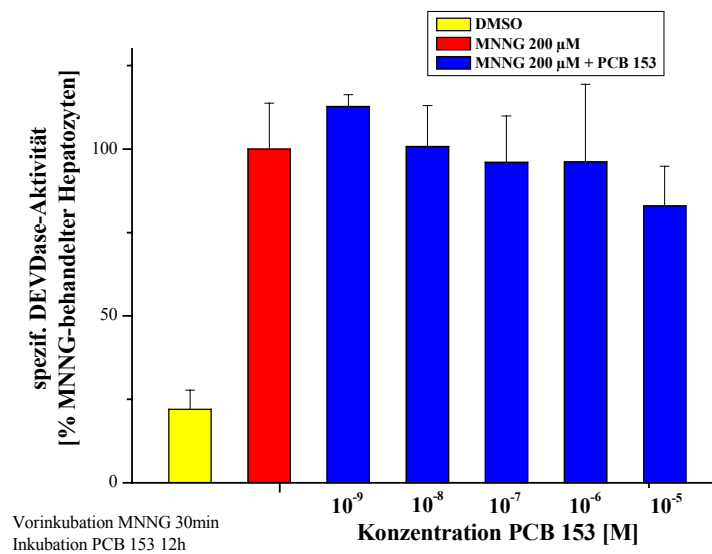


Abb. 4.20: Einfluss von PCB 153 auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung. Die Hepatozyten wurden für 30 min mit MNNG 200 µM vorinkubiert und nach einer zwölfstündigen Inkubation mit PCB 153 in verschiedenen Konzentrationen geerntet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

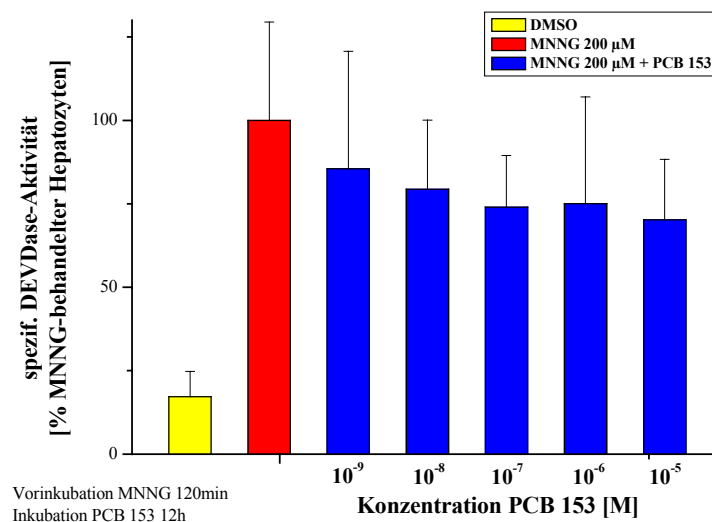


Abb. 4.21: Einfluss von PCB 153 auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung. Die Hepatozyten wurden für 120 min mit MNNG 200 µM vorinkubiert und nach einer zwölfstündigen Inkubation mit PCB 153 in verschiedenen Konzentrationen geerntet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Nach Vorinkubation mit MNNG für 30 min konnte die Caspase-3-Aktivität mit PCB 153 10⁻⁵ M um ca. 17 % erniedrigt werden (Abb. 4.20).

4.1.4.3 Einfluss von TCDD auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung

Nach 12-stündiger Inkubation mit TCDD konnte in beiden Ansätzen keine konzentrationsabhängige Erniedrigung der Caspase-3-Aktivität nach apoptogener MNNG-Behandlung festgestellt werden (Abb. 4.22 und 4.23).

Bei kurzzeitiger MNNG-Behandlung zeigte lediglich TCDD 10^{-11} M eine signifikante Reduktion.

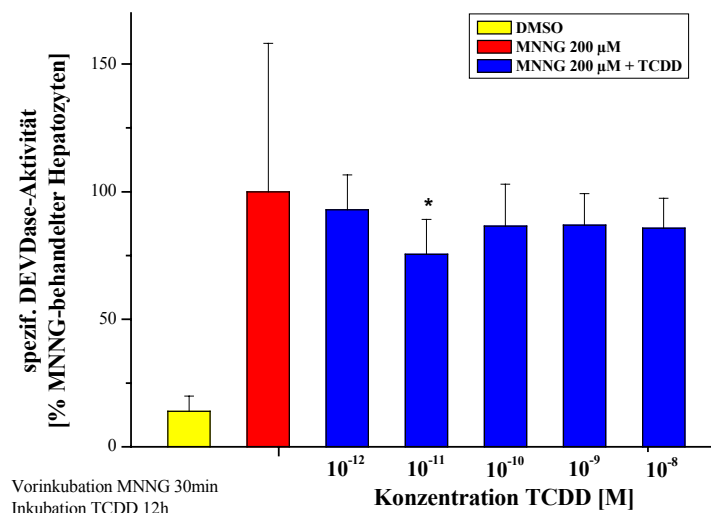


Abb. 4.22: Einfluss von TCDD auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung. Die Hepatozyten wurden für 30 min mit MNNG 200 µM vorinkubiert und nach einer zwölfstündigen Inkubation mit TCDD in verschiedenen Konzentrationen geerntet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Experimenten. Die mit Sternen versehenen Werte unterscheiden sich signifikant von MNNG-behandelten Zellen (* $P \leq 0,05$).

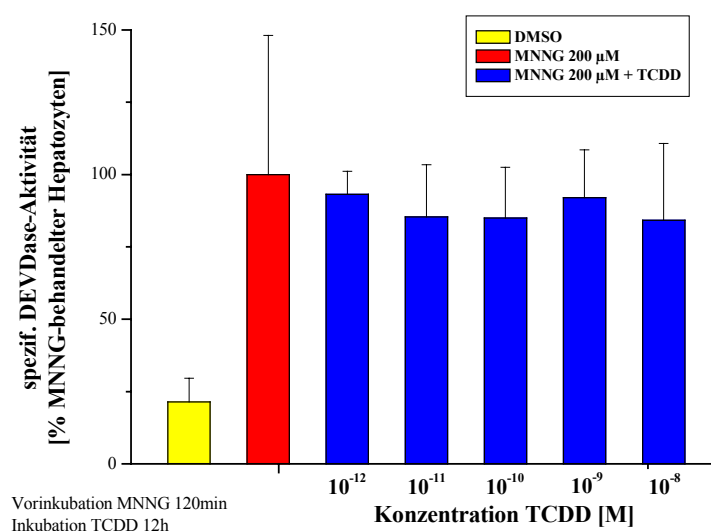


Abb. 4.23: Einfluss von TCDD auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung. Die Hepatozyten wurden für 120 min mit MNNG 200 µM vorinkubiert und nach einer zwölfstündigen Inkubation mit TCDD in verschiedenen Konzentrationen geerntet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Experimenten.

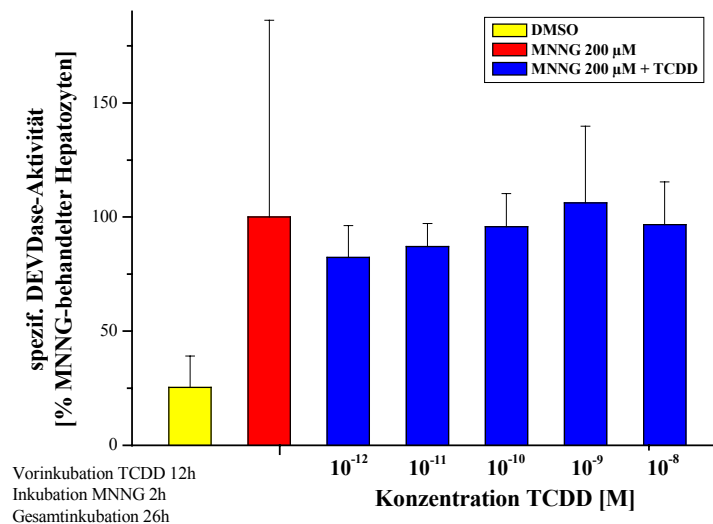


Abb. 4.24: Einfluss von TCDD auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung. Die Hepatozyten wurden für 12 Stunden mit TCDD in verschiedenen Konzentrationen vorinkubiert. Danach erfolgte eine zweistündige Inkubation mit MNNG 200 µM und nach einer Kulturdauer von 12 h wurden die Zellen geerntet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

In einem weiteren Versuch wurden die Zellen zuerst für 12 h mit TCDD und anschließend für 2 h mit MNNG behandelt. Nach weiteren 12 h Kulturdauer wurde die Aktivität der Caspase-3 bestimmt (Abb. 4.24). Auch bei der Umkehrung des Versuchsansatzes ließ sich keine signifikante Erniedrigung nachweisen.

4.1.4.4 Einfluss von PCB 126 auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung

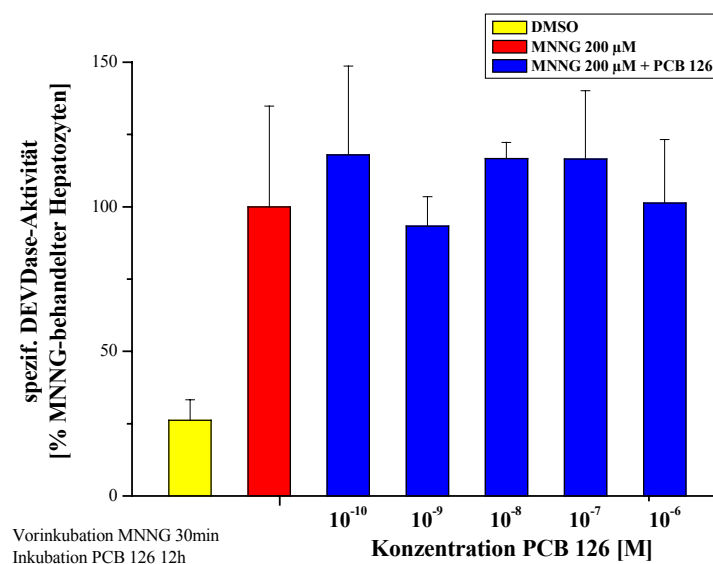


Abb. 4.25: Einfluss von PCB 126 auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung. Die Hepatozyten wurden für 30 min mit MNNG 200 µM vorinkubiert und nach einer zwölfstündigen Inkubation mit PCB 126 in verschiedenen Konzentrationen geerntet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie aus Abb. 4.25 und 4.26 ersichtlich zeigte PCB 126 in beiden Versuchsansätzen keinen Einfluss auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivität.

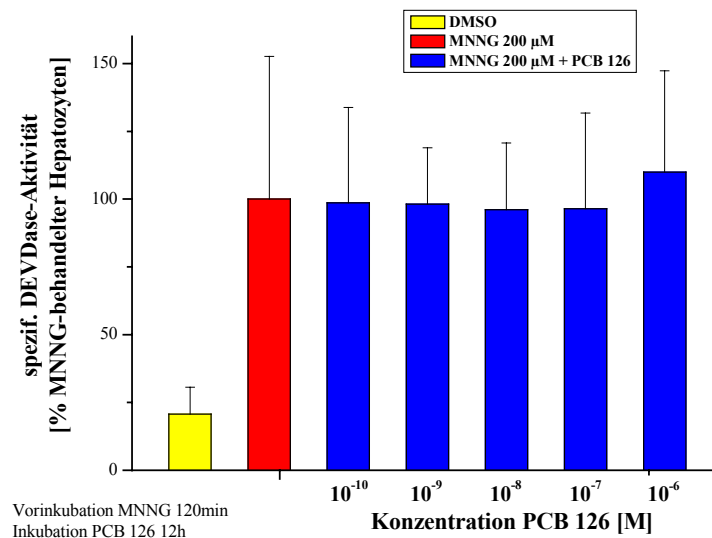


Abb. 4.26: Einfluss von PCB 126 auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung. Die Hepatozyten wurden für 120 min mit MNNG 200 µM vorinkubiert und nach einer zwölfstündigen Inkubation mit PCB 126 in verschiedenen Konzentrationen geerntet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Aktivitäten sind bei kurzzeitiger Behandlung mit MNNG durch die Gabe des PCB-Kongeners zum Teil sogar leicht erhöht.

4.1.5 Einfluss von Phenobarbital, PCB 153, TCDD und PCB 126 auf die MNNG-induzierte Ausschüttung von Cytochrom c

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zur Untersuchung der Apoptose-inhibierenden Eigenschaft von Tumorpromotoren ein weiterer biochemischer Apoptosemarker, die Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytoplasma, in Hepatozyten etabliert werden.

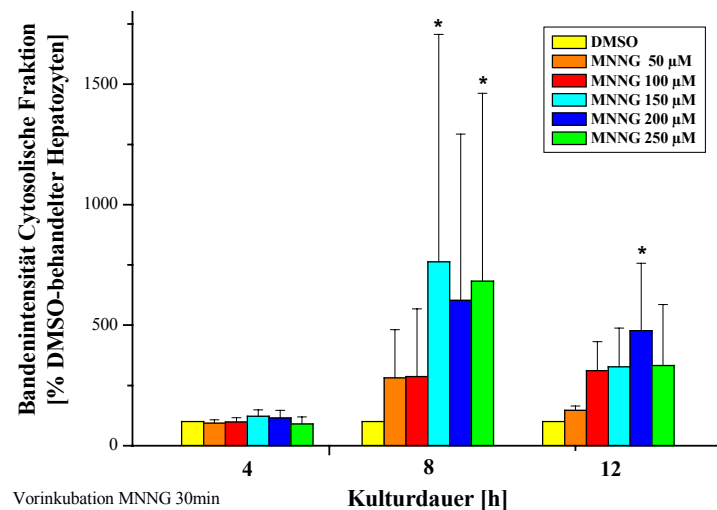
Nach Behandlung der Zellen, die analog zu den Versuchen der Caspase-3-Aktivierung mit kurzzeitiger MNNG-Behandlung durchgeführt wurde, erfolgte die Herstellung einer zytosolischen und mitochondrialen Fraktion nach einem Protokoll von Bossy-Wetzel und Green (2000). Mit Hilfe der Western Blot Analyse wurde Cytochrom c in beiden Fraktionen nach einer Kulturdauer von 4 h, 8 h und 12 h nachgewiesen.

In Abb. 4.27 ist die Bandenintensität der zytosolischen Fraktion bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (100 %) dargestellt, nach Behandlung der Hepatozyten mit MNNG in unterschiedlichen Konzentrationen.

Erst nach 8 h zeigte sich eine signifikante Erhöhung von Cytochrom c in der zytosolischen Fraktion, die zu diesem Zeitpunkt auch ein Maximum aufwies. Die größte Induktion der Cytochrom c-Ausschüttung lag im Konzentrationsbereich von 150 μM – 250 μM .

Nach einer Kulturdauer von 12 h zeigte MNNG 200 μM eine signifikant erhöhte Menge an Cytochrom c in der zytosolischen Fraktion. In der hergestellten mitochondrialen Fraktion ließ sich der erwartete konträre Effekt, eine geringere Menge an Cytochrom c bei steigender MNNG-Konzentration, nicht feststellen.

Abb. 4.27: Cytochrom c-Freisetzung durch MNNG. Die Zellen wurden für 30 min mit MNNG 200 μM vorinkubiert und zu unterschiedlichen Zeiten geerntet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen. Die mit Sternen versehenen Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (* $P \leq 0,05$).



Die Behandlung von Hepatozyten mit den Tumorpromotoren Phenobarbital 10^{-3} M, PCB 153 10^{-5} M, TCDD 10^{-8} M und PCB 126 10^{-7} M nach apoptogener Behandlung mit MNNG 200 μM , zeigte keinen Einfluss auf die Ausschüttung von Cytochrom c. Es gelang allerdings auch nicht, eine Induktion der Cytochrom c-Ausschüttung nach alleiniger MNNG-Behandlung nachzuweisen.

4.2 Initiations-Promotions-Studie mit PCB 28 und PCB 101

Von einigen ‚dioxinartigen‘ und ‚nicht-dioxinartigen‘ PCB-Kongeneren ist aus tierexperimentellen Studien bekannt, dass sie das Wachstum von präneoplastischen Zellen in der Rattenleber fördern können.

Zur Aufklärung einer tumorpromovierenden Wirkung der beiden ortho-substituierten PCB-Kongeneren 28 (2,4,4'-Trichlorbiphenyl) und 101 (2,2',4,5,5'-Pentachlorbiphenyl) wurde ein Initiations-Promotions-Experiment in weiblichen Wistar-Ratten durchgeführt. Hierzu wurde den Tieren zur Initiation präneoplastischer Läsionen das genotoxische Karzinogen DEN mit Hilfe einer Schlundsonde verabreicht. Die tägliche Dosis betrug 10 mg/kg KG über einen Zeitraum von 10 Tagen, Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen Wasser.

Während einer achtwöchigen Erholungsphase erfolgte die Bildung von Foci. In der anschließenden Promotionsphase von 8 bzw. 16 Wochen wurden die Tiere einer wöchentlichen Behandlung mit PCB 28 und PCB 101 in einer niedrigen (50 µmol/kg KG) und hohen (150 µmol/kg KG) Dosis unterzogen. Die Kontrolltiere wurden mit dem gleichen Volumen Maiskeimöl behandelt. Da nach zwei Wochen Schwierigkeiten bei der PCB-Gabe über die Schlundsonde auftraten wurde die Behandlung auf i.p. Injektion umgestellt.

Zur Erfassung der DNA-Synthese in präneoplastischen Foci wurde den Tieren 3 x BrdU in einer Dosis von 30 mg/kg KG 24 h, 20 h und 16 h vor der Tötung i.p. injiziert.

Nach einer Behandlungsdauer mit PCBs von 8 bzw. 16 Wochen wurden die Tiere durch Dekapitation getötet und die Lebern entnommen. In nachfolgender Tabelle sind zum besseren Verständnis die Behandlungsgruppen sowie die Anzahl der in die Auswertung einbezogenen Anzahl der Tiere noch einmal aufgelistet.

Tabelle 4.3:
Behandlung der Versuchsgruppen und Anzahl der Tiere

Gruppe	Anzahl der Tiere 8 Wochen	Anzahl der Tiere 16 Wochen	Behandlung
1	6	6	Wasser / Maiskeimöl
2	5	6	DEN [10 mg/kg KG] / Maiskeimöl
3	6	6	DEN [10 mg/kg KG] / PCB 28 [150 µmol/kg KG]
4	5	5	DEN [10 mg/kg KG] / PCB 28 [50 µmol/kg KG]
5	6	6	DEN [10 mg/kg KG] / PCB 101 [150 µmol/kg KG]
6	6	6	DEN [10 mg/kg KG] / PCB 101 [50 µmol/kg KG]
7	6	6	Wasser / PCB 28 [150 µmol/kg KG]
8	6	6	Wasser / PCB 101 [150 µmol/kg KG]

4.2.1 Futterraufnahme und Gewichtszunahme der Tiere

Während der DEN-Behandlung und einer achtwöchigen Ruhephase wurde das Futter permanent hinzugewogen. Eine wöchentliche Kontrolle der aufgenommenen Futtermenge wurde nur während der acht- bzw. sechzehnwöchigen Behandlung mit den PCBs durchgeführt.

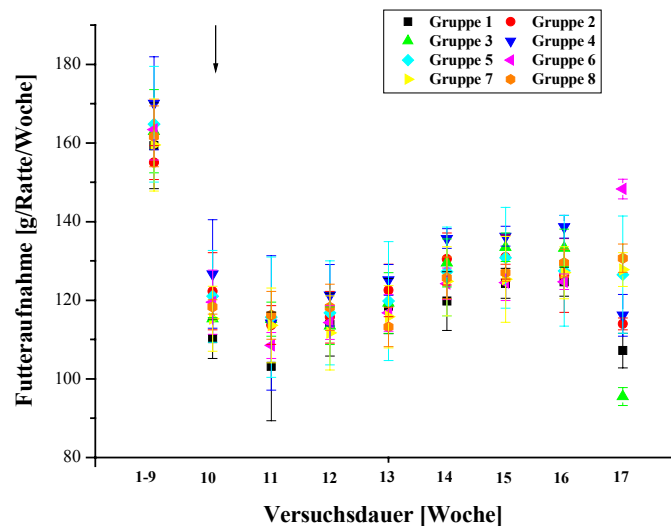


Abb. 4.28: Futterraufnahme eines Tieres pro Woche bei Behandlung mit PCB 28 und 101 über acht Wochen. Der Pfeil zeigt den Behandlungsbeginn mit PCBs in Woche 10. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aller Tiere einer Gruppe.

Die Abb. 4.28 und 4.29 zeigen die aufgenommene Futtermenge pro Tier innerhalb einer Woche, für Wochen 1-9 ist die durchschnittliche Aufnahme pro Woche gezeigt.

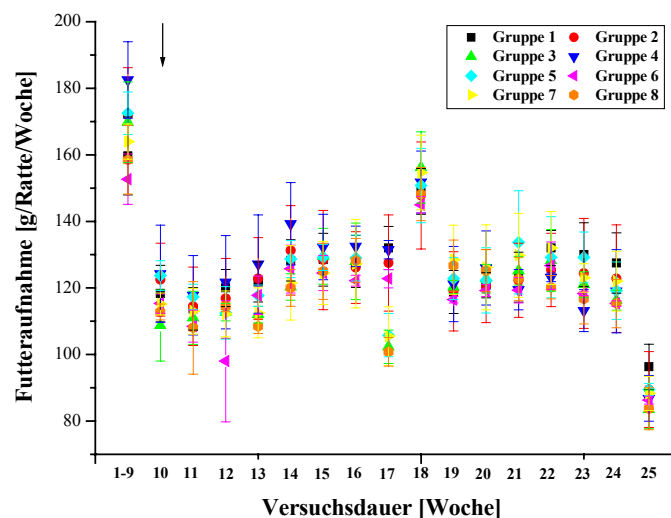


Abb. 4.29: Futterraufnahme eines Tieres pro Woche bei Behandlung mit PCB 28 und 101 über sechzehn Wochen. Der Pfeil zeigt den Behandlungsbeginn mit PCBs in Woche 10. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aller Tiere einer Gruppe.

Während der Behandlung waren keine auffälligen Unterschiede in der Futteraufnahme der Tiere zu sehen. Schwankungen ergaben sich lediglich durch Verlängerung oder Verkürzung der Wochendauer (Abb. 4.29, Woche 18 und 25).

Vor jeder Behandlung wurde das Gewicht der Ratten kontrolliert, während der Ruhephase wurde ebenfalls eine wöchentliche Kontrolle durchgeführt.

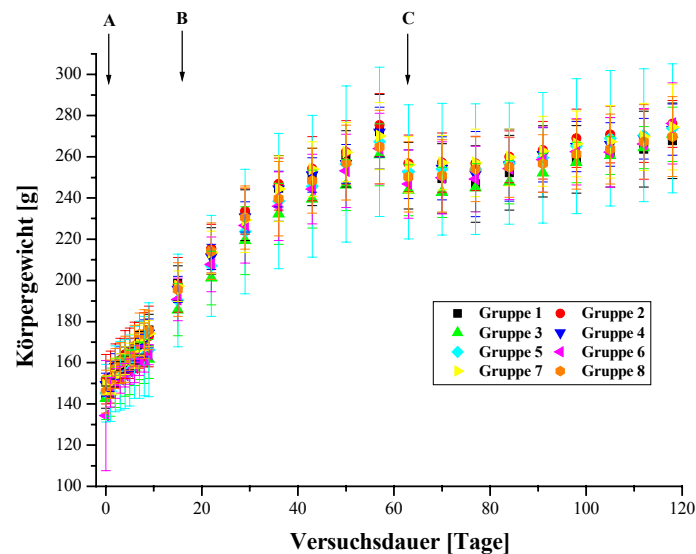


Abb. 4.30: Gewichtszunahme der Tiere über den gesamten Behandlungszeitraum. Die unterschiedlichen Behandlungen sind mit Pfeilen markiert. (A) zeigt die zehntägige Behandlung mit DEN, mit (B) ist der Beginn der achtwöchigen Ruhephase gezeigt und (C) markiert die PCB-Behandlung über acht Wochen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aller Tiere einer Gruppe.

Auch bei der Gewichtszunahme der Tiere zeigten sich keinerlei Auffälligkeiten. Mit Einsetzen der PCB-Behandlung zeigte sich eine Gewichtsreduktion und nachfolgend eine langsamere Gewichtszunahme der Ratten, da den Tieren 24 h vor Behandlung, zur Vermeidung von kalorischen Imbalancen durch das Lösungsmittel Maiskeimöl, das Futter entzogen wurde.

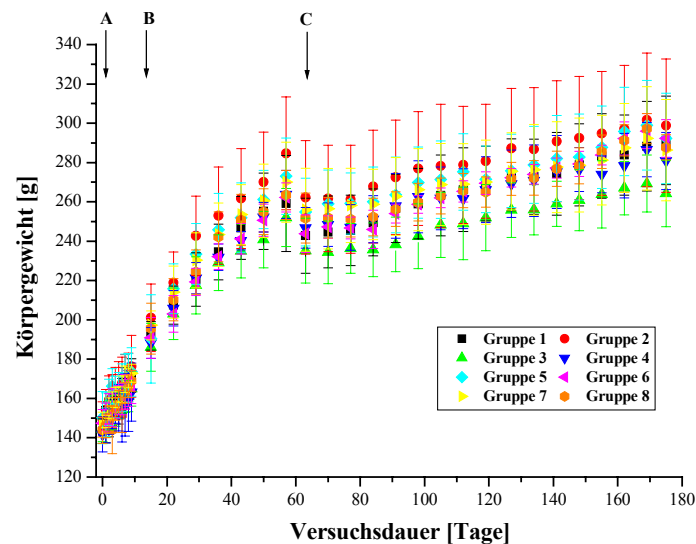


Abb. 4.31: Gewichtszunahme der Tiere über den gesamten Behandlungszeitraum. Die unterschiedlichen Behandlungen sind mit Pfeilen markiert. (A) zeigt die zehntägige Behandlung mit DEN, mit (B) ist der Beginn der achtwöchigen Ruhephase gezeigt und (C) markiert die PCB-Behandlung über sechzehn Wochen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aller Tiere einer Gruppe.

4.2.2 Bestimmung des relativen Lebergewichts

Vor Dekapitation der Tiere wurde das Körpergewicht bestimmt und nach der Organentnahme das Gewicht der Leber. Das relative Lebergewicht für jede Behandlungsgruppe ist in Tab. 4.3 zusammengefasst.

Nach einer PCB-Behandlungsdauer von 8 Wochen war das relative Lebergewicht der Behandlungsgruppe 3 (PCB 28, 150 $\mu\text{mol/kg KG}$) und 4 (PCB 28, 50 $\mu\text{mol/kg KG}$) signifikant gegenüber der DEN-behandelten Gruppe erhöht.

**Tabelle 4.4:
Relatives Lebergewicht**

Behandlungsgruppe	relatives Lebergewicht 8 Wochen [%]	relatives Lebergewicht 16 Wochen [%]
1	2,76 \pm 0,15	2,81 \pm 0,08
2	2,80 \pm 0,20	2,97 \pm 0,23
3	3,29 \pm 0,22**	3,54 \pm 0,46**
4	3,19 \pm 0,17**	3,02 \pm 0,31
5	3,04 \pm 0,15	2,97 \pm 0,17
6	2,89 \pm 0,18	2,76 \pm 0,17
7	2,92 \pm 0,14	2,99 \pm 0,22
8	3,02 \pm 0,29	2,88 \pm 0,19

** signifikant erhöht gegenüber der DEN/Öl-behandelten Gruppe ($P \leq 0,01$)

Das relative Lebergewicht zeigte auch nach 16 Wochen PCB-Behandlung in Gruppe 3 eine signifikante Erhöhung.

Die Behandlung mit PCB 101 zeigte in keiner Behandlungsgruppe einen signifikanten Einfluss auf das relative Lebergewicht.

4.2.3 Bestimmung des PCB-Gehaltes der Leber

Nach Herstellung eines Leberhomogenats und Extraktion der PCBs in Dichlormethan/Cyclohexan wurden die Proben mit einem internen Standard dotiert. Die Analytik erfolgte mit GC/MS, zur Quantifizierung wurden interne und externe Standards herangezogen.

Der Fettgehalt der Leber wurde durch Extraktion des Homogenats in Dichlormethan/Cyclohexan und anschließender Auswaage des Fettes nach Abdampfen des Lösungsmittels bestimmt.

Die in der Tab. 4.5 und 4.6 aufgelisteten PCB-Gehalte beziehen sich auf das Lebergewicht und auf den Fettgehalt der Leber.

Tabelle 4.5:
PCB-Gehalte der Leber nach 8 Wochen Behandlungsdauer

Behandlungsgruppe	PCB 28 [µg/kg Leber]	PCB 28 [µg/g Fett]	PCB 101 [µg/kg Leber]	PCB 101 [µg/g Fett]
1	10,49 ± 2,95	0,20 ± 0,07	28,86 ± 3,89	0,56 ± 0,15
2	19,50 ± 4,76	0,31 ± 0,09	31,83 ± 6,62	0,49 ± 0,08
3	29611,39 ± 11340,39°	565,31 ± 243,07°	29,14 ± 4,06	0,56 ± 0,12
4	10469,33 ± 2819,77*°	217,38 ± 63,41*°	26,33 ± 3,01	0,56 ± 0,17
5	28,86 ± 7,82	0,55 ± 0,22	3098,14 ± 687,70°	58,51 ± 21,66°
6	30,43 ± 12,82	0,59 ± 0,23	2062,29 ± 547,25*°	39,35 ± 11,30*°
7	31165,71 ± 7566,14°	624,05 ± 146,53°	29,14 ± 4,34	0,58 ± 0,10
8	25,71 ± 13,68	0,52 ± 0,28	2997,43 ± 1615,45°	61,51 ± 33,74°

* signifikanter Unterschied zu Behandlungsgruppen mit hoher Dosis an PCBs (P≤0,05)

° signifikanter Unterschied zur DEN/Öl-behandelten Gruppe (P≤0,05)

In allen mit PCBs behandelten Gruppen zeigte sich ein erhöhter Gehalt der Substanz in der Leber. Der PCB-Gehalt war in Behandlungsgruppen mit einer hohen Dosis an PCB 28 gegenüber der niedrigen Dosis um ungefähr das 3-fache erhöht. Bei Behandlung mit PCB 101 in der hohen Dosis lag die gefundene Menge an PCB in der Leber ca. 1,5-fach höher als in der niedrigen Dosisgruppe.

Tabelle 4.6:
PCB-Gehalte der Leber nach 16 Wochen Behandlungsdauer

Behandlungsgruppe	PCB 28 [µg/kg Leber]	PCB 28 [µg/g Fett]	PCB 101 [µg/kg Leber]	PCB 101 [µg/g Fett]
1	29,14 ± 8,99	0,61 ± 0,20	28,00 ± 5,42	0,59 ± 0,13
2	24,71 ± 4,64	0,57 ± 0,15	24,86 ± 3,02	0,57 ± 0,13
3	37247,57 ± 8355,96°	718,30 ± 211,87°	22,14 ± 2,12	0,42 ± 0,07
4	11194,00 ± 2853,11**°	255,55 ± 41,4**°	104,17 ± 199,80	2,34 ± 3,16
5	35,00 ± 21,08	0,81 ± 0,64	2929,43 ± 1201,02°	61,97 ± 31,80°
6	16,00 ± 3,42	0,36 ± 0,07	1461,43 ± 258,92**°	32,94 ± 6,41**°
7	27869,86 ± 9145,68°	644,37 ± 203,75°	28,14 ± 8,93	0,66 ± 0,20
8	58,83 ± 94,55	1,13 ± 1,76	3680,71 ± 714,86°	71,52 ± 20,13°

* signifikanter Unterschied zu Behandlungsgruppen mit hoher Dosis an PCBs (P≤0,05)

° signifikanter Unterschied zur DEN/Öl-behandelten Gruppe (P≤0,05)

Eine Behandlungsdauer von 16 Wochen zeigte keine Veränderung des PCB-Gehaltes gegenüber der Behandlung von 8 Wochen. Die Menge an PCB 28 in der Leber lag 5–13-mal höher als die Menge an PCB 101 in vergleichbarer Dosis.

4.2.4 Induktion der EROD und PROD

Die Induktion EROD- und PROD-Aktivität wurde im Leberhomogenat nach einer Methode von Kennedy und Jones (1994) auf einer Mikrotiterplatte gemessen.

PCB 28 zeigte in beiden Behandlungsdosen nach 8 Wochen eine signifikante Induktion der EROD (Gruppen 3, 4 und 7), nach 16 Wochen war die EROD nur durch die hohe Dosis an PCB 28 (Gruppe 3 und 7) signifikant erhöht (Abb. 4.32).

Nach Behandlung mit der niedrigen Dosis PCB 101 konnte die EROD nach 8 Wochen signifikant induziert werden (Gruppe 5), die Aktivität lag jedoch deutlich unter der mit PCB 28 in vergleichbarer Dosis induzierten EROD-Aktivität.

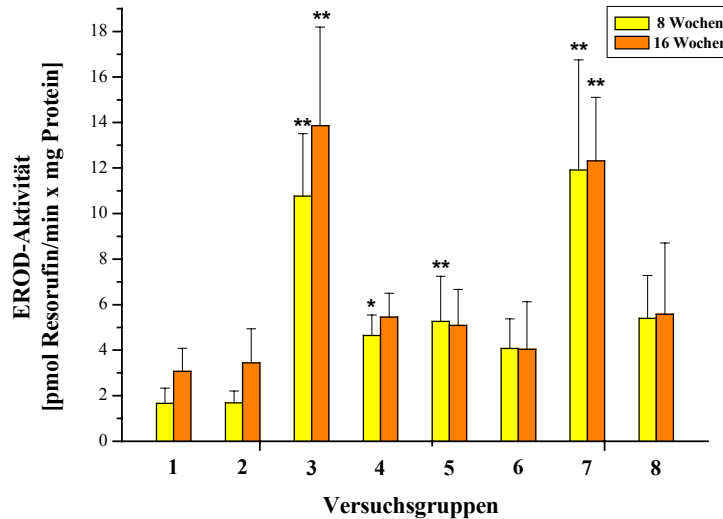


Abb. 4.32: Induktion der EROD-Aktivität. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus einer Dreifachbestimmung der Leberhomogenate von Tieren einer Behandlungsgruppe. Die mit Sternen versehenen Balken unterscheiden sich signifikant von den jeweiligen Kontrollgruppen (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$).

Die PROD konnte durch PCB 28 in der hohen Behandlungsdosis (Gruppe 3 und 7) nach 8 und 16 Wochen signifikant induziert werden, jedoch nicht in der niedrigen Dosis. Eine Behandlung mit PCB 101 zeigte eine signifikante Induktion in beiden Dosen (Gruppen 5, 6 und 8) nach 8 Wochen (Abb. 4.33).

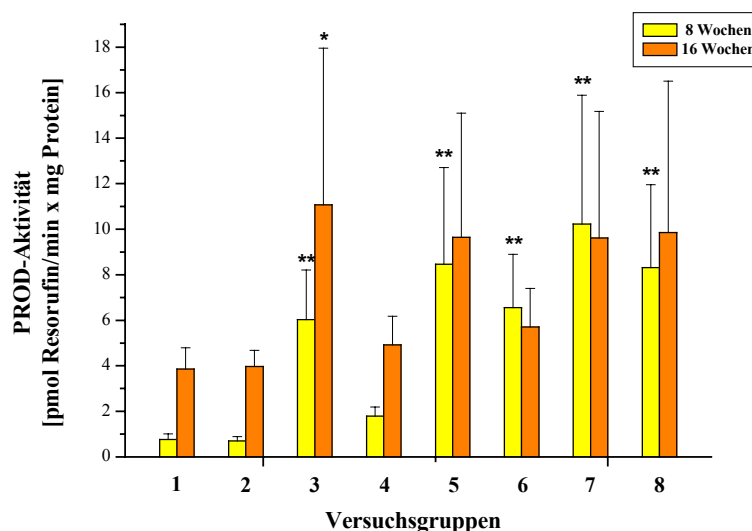


Abb. 4.33: Induktion der PROD-Aktivität. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus einer Dreifachbestimmung der Leberhomogenate von Tieren einer Behandlungsgruppe. Die mit Sternen versehenen Balken unterscheiden sich signifikant von den jeweiligen Kontrollgruppen (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$).

4.2.5 Quantifizierung präneoplastischer Läsionen

Zur Untersuchung von präneoplastischem Gewebe wurden von den fixierten und gefrorenen Leberstücken Paraffin- und Gefrierschnitte angefertigt. Diese wurden histochemisch auf die ATPase-Aktivität sowie immunhistochemisch auf die Expression der GSTP untersucht. Mit Hilfe des Computers wurde die Fläche der gezählten Foci ermittelt, das ATPase-negative und GSTP-positive Focusvolumen, bezogen auf das Volumen der Leber, sowie die Anzahl der Foci pro cm^3 Lebergewebe mit stereologischen Methoden nach Fullman (1953) und Saltykov (1967) berechnet.

Die Zahl der mit DEN initiierten ATPase-negativen Foci/ cm^3 Leber zeigte keine signifikante Erhöhung nach Behandlung mit PCB 28 und PCB 101 in beiden Dosisgruppen nach 8 und 16 Wochen (Abb. 4.34 und 4.35). Beide Berechnungsmethoden kommen zu annähernd gleichen Ergebnissen.

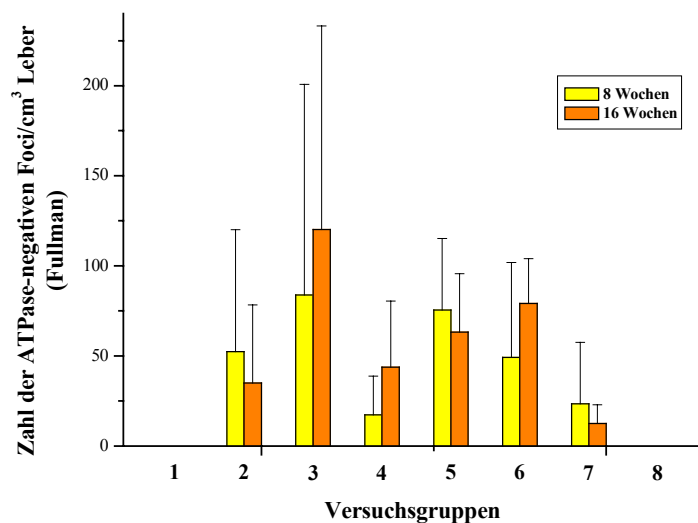


Abb. 4.34: Zahl der ATPase-negativen Foci pro cm^3 Leber (Fullman). Die Berechnung erfolgte nach der Methode von Fullman. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aller Tiere einer Behandlungsgruppe.

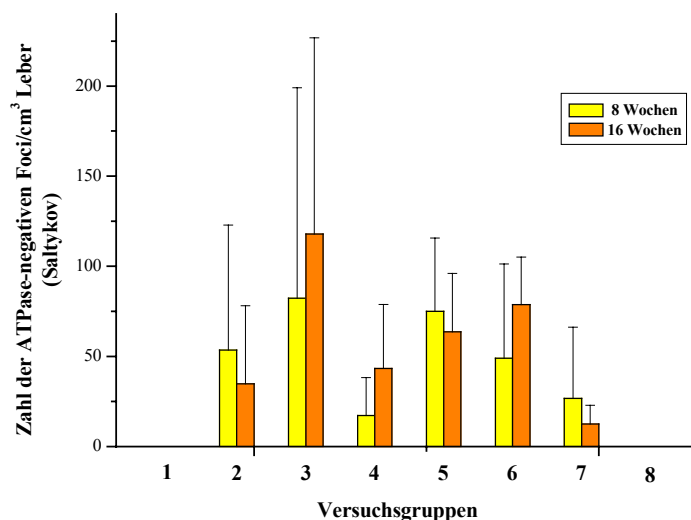


Abb. 4.35: Zahl der ATPase-negativen Foci pro cm³ Leber (Saltykov). Die Berechnung erfolgte nach der Methode von Saltykov. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aller Tiere einer Behandlungsgruppe.

Eine signifikante Erhöhung des ATPase-negativen Focusvolumens wurde nach Behandlung mit PCB 28 in hoher Dosis (Gruppe 3, 150 µmol/kg KG) sowie PCB 101 in niedriger Dosis (Gruppe 6, 50 µmol/kg KG) nach 16 Wochen bei vorangegangener DEN-Behandlung gefunden (Abb. 4.36).

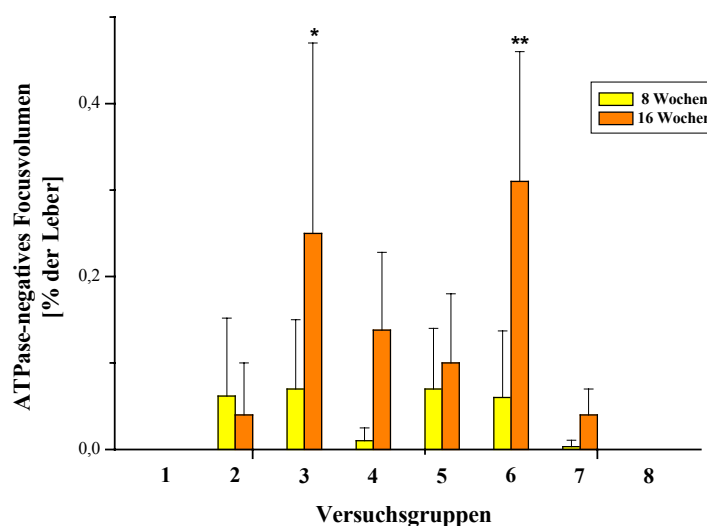


Abb. 4.36: ATPase-negatives Focusvolumen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aller Tiere einer Behandlungsgruppe. Die mit Sternen versehenen Balken unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe DEN/Öl (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$).

Abb. 4.37 zeigt die lichtmikroskopische Aufnahme eines histologischen Schnittes mit ATPase-negativem Focus.

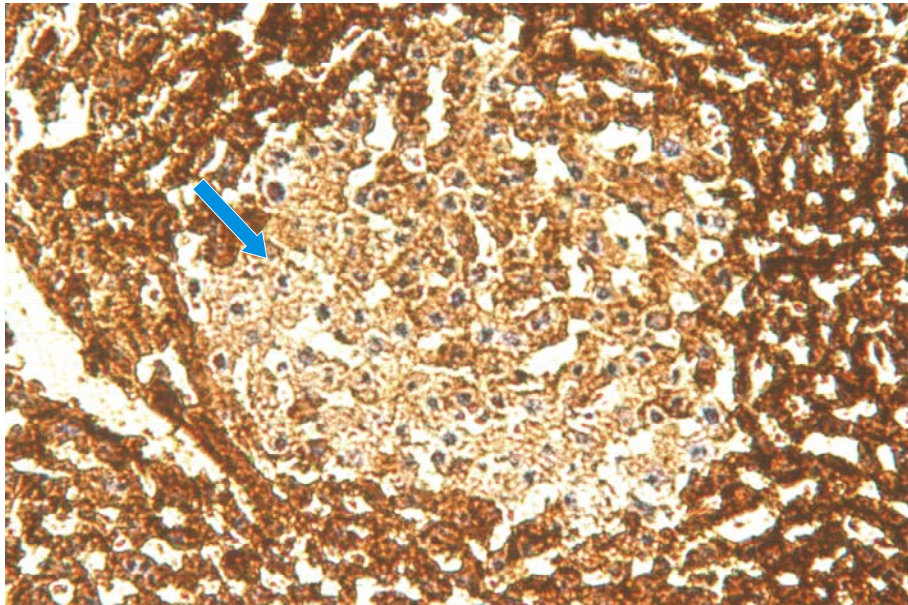


Abb. 4.37: ATPase-negativer Focus. Die lichtmikroskopische Aufnahme zeigt den histologischen Schnitt einer Leber von einer mit DEN und PCB 28 (150 $\mu\text{mol/kg KG}$) über einen Zeitraum von 16 Wochen behandelten Ratte. Das normale Gewebe zeigt eine Braunfärbung, die präneoplastischen Zellen erscheinen mit nur blasser Färbung (Pfeil).

Die Quantifizierung GSTP-positiver Foci/ cm^3 Leber zeigte ebenfalls keine signifikante Erhöhung in beiden Dosisgruppen nach 8 und 16 Wochen (Abb. 4.38 und 4.39).

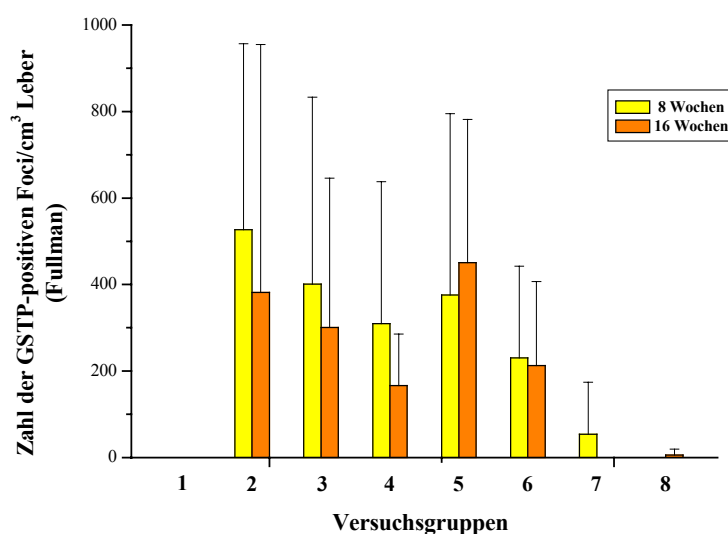


Abb. 4.38: Zahl der GSTP-positiven Foci pro cm^3 Leber (Fullman). Die Berechnung erfolgte nach der Methode von Fullman. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aller Tiere einer Behandlungsgruppe.

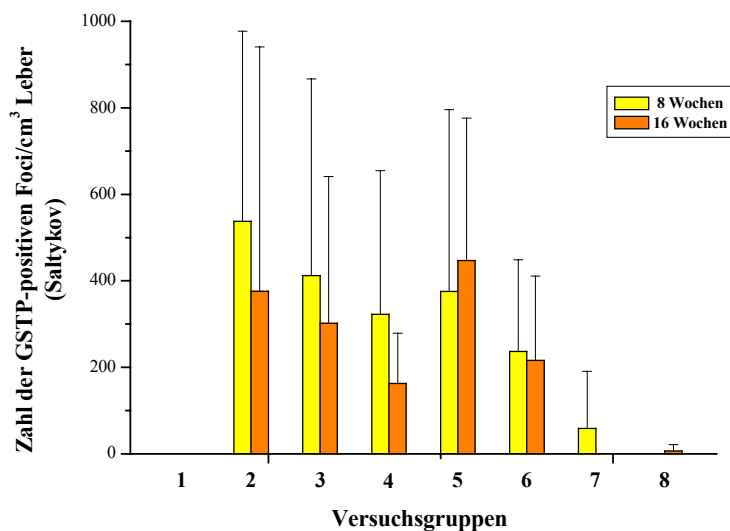


Abb. 4.39: Zahl der GSTP-positiven Foci pro cm^3 Leber (Saltykov). Die Berechnung erfolgte nach der Methode von Saltykov. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aller Tiere einer Behandlungsgruppe.

Auch das GSTP-positive Focusvolumen war nach DEN- und anschließender PCB-Behandlung nicht signifikant erhöht (Abb. 4.40).

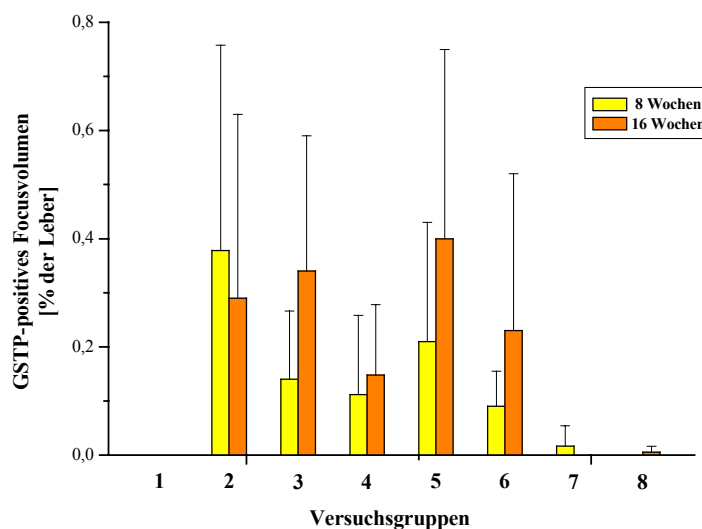


Abb. 4.40: GSTP-positives Focusvolumen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aller Tiere einer Behandlungsgruppe.

In Abb. 4.41 ist die lichtmikroskopische Aufnahme eines histologischen Schnittes mit einem GSTP-positiven Focus zu sehen.

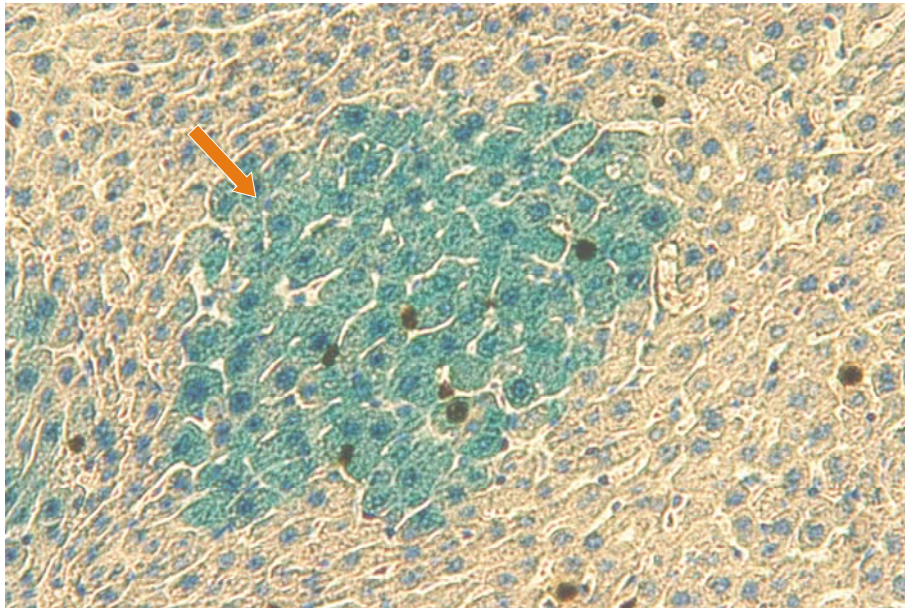


Abb. 4.41: GSTP-positiver Focus. Die lichtmikroskopische Aufnahme zeigt den histologischen Schnitt einer Leber von einer mit DEN und PCB 28 (150 $\mu\text{mol/kg KG}$) über einen Zeitraum von 16 Wochen behandelten Ratte. Das normale Gewebe zeigt eine leichte Blaufärbung, die präneoplastischen Zellen erscheinen intensiv blau gefärbt (Pfeil). Braune Zellkerne sind BrdU-positiv und zeigen somit eine DNA-Synthese.

Die Tabellen 4.6 und 4.7 zeigen die Anzahl der ATPase-negativen und GSTP-positiven Foci/cm³ Leber sowie das Focusvolumen nach 8 und 16 Wochen noch einmal in einer Zusammenfassung.

Tabelle 4.6:
Zahl der Foci pro cm³ Leber und Focusvolumen nach 8 Wochen Behandlungsdauer

Gruppe	Zahl der ATPase-neg. Foci/cm ³ Leber (Saltykov)	Zahl der ATPase-neg. Foci/cm ³ Leber (Fullman)	ATPase-neg. Focusvolumen (% der Leber)	Zahl der GSTP-pos. Foci/cm ³ Leber (Saltykov)	Zahl der GSTP-pos. Foci/cm ³ Leber (Fullman)	GSTP-pos. Focusvolumen (% der Leber)
1	0	0	0	0	0	0
2	53,60 ± 69,30	52,40 ± 67,70	0.062 ± 0.09	537,40 ± 439,40	526,80 ± 429,90	0.378 ± 0.38
3	82,33 ± 116,76	83,83 ± 117,02	0.07 ± 0.08	412,0 ± 454,96	401,00 ± 432,00	0.14 ± 0.126
4	17,20 ± 21,07	17,40 ± 21,33	0.01 ± 0.015	322,60 ± 332,34	309,60 ± 327,98	0.112 ± 0.146
5	75,00 ± 40,62	75,50 ± 39,69	0.07 ± 0.07	375,50 ± 420,06	376,00 ± 419,28	0.21 ± 0.22
6	49,00 ± 52,27	49,17 ± 52,72	0.06 ± 0.077	237,00 ± 211,79	230,50 ± 211,71	0.09 ± 0.065
7	26,67 ± 39,61	23,50 ± 34,01	0.0033 ± 0.0075	58,83 ± 131,56	53,83 ± 120,37	0.01667 ± 0.037268
8	0	0	0	0	0	0

Tabelle 4.7:
Zahl der Foci pro cm³ Leber und Focusvolumen nach 16 Wochen Behandlungsdauer

Gruppe	Zahl der ATPase-neg. Foci/cm ³ Leber (Saltykov)	Zahl der ATPase-neg. Foci/cm ³ Leber (Fullman)	ATPase-neg. Focusvolumen (% der Leber)	Zahl der GSTP-pos. Foci/cm ³ Leber (Saltykov)	Zahl der GSTP-pos. Foci/cm ³ Leber (Fullman)	GSTP-pos. Focusvolumen (% der Leber)
1	0	0	0	0	0	0
2	34,83 ± 43,28	35,00 ± 43,29	0.04 ± 0.06	375,67 ± 565,26	381,83 ± 573,16	0.29 ± 0.34
3	118,00 ± 108,76	120,17 ± 112,96	0.25 ± 0.22*	301,83 ± 339,33	300,67 ± 345,42	0.34 ± 0.25
4	43,40 ± 35,44	43,80 ± 36,65	0.138 ± 0.09	163,00 ± 115,97	166,20 ± 119,07	0.148 ± 0.13
5	63,67 ± 32,34	63,17 ± 32,51	0.10 ± 0.08	446,83 ± 329,51	450,50 ± 331,05	0.40 ± 0.35
6	78,67 ± 26,44	79,17 ± 24,90	0.31 ± 0.15**	216,00 ± 194,85	212,83 ± 194,18	0.23 ± 0.29
7	12,50 ± 10,40	12,50 ± 10,42	0.04 ± 0.03	0	0	0
8	0	0	0	6,67 ± 14,91	6,00 ± 13,42	0.005 ± 0.011

* signifikant erhöht gegenüber der DEN/Öl-behandelten Gruppe (P≤0,05)

** signifikant erhöht gegenüber der DEN/Öl-behandelten Gruppe (P≤0,01)

4.2.6 Bestimmung der DNA-Synthese in Präneoplasien

Zur Analyse der DNA-Synthese im präneoplastischen Gewebe wurde den Tieren vor Versuchsende das Thymidinanalogon Bromdeoxyuridin (BrdU) verabreicht. Der Einbau von BrdU in die DNA wurde immunhistochemisch nachgewiesen (Abb. 4.41). Berechnet wurde die Anzahl der BrdU-positiven Zellkerne/mm² GSTP-positiver Inselfläche. Die Behandlung mit PCB 28 und PCB 101 führte in keiner Gruppe zu einer signifikanten Erhöhung der DNA-Synthese in präneoplastischem Gewebe nach 8 und 16 Wochen (Tab. 4.8).

Tabelle 4.8:
BrdU-positive Zellkerne

Behandlungsgruppe	BrdU-positive Zellkerne/mm ² 8 Wochen	BrdU-positive Zellkerne/mm ² 16 Wochen
1	0	0
2	15,00 ± 28,93	9,11 ± 9,42
3	10,24 ± 16,13	15,55 ± 18,72
4	4,10 ± 7,03	3,87 ± 8,64
5	32,86 ± 33,79	15,34 ± 11,14
6	11,08 ± 20,85	6,45 ± 7,81
7	0	0
8	0	0

5 *Diskussion*

5.1 Untersuchungen zur Wirkung von ‚nicht-dioxinartigen‘ PCBs in primären Hepatozyten der Ratte

5.1.1 Einfluss von PCB 153 auf die Calcium-Homöostase in Hepatozyten

PCBs zeigen aufgrund ihrer Chlorsubstituenten und der damit verbundenen räumlichen Anordnung der beiden Phenylringe charakteristische Unterschiede in ihrer biologischen und toxikologischen Aktivität.

Kongenere ohne Chlorsubstitution in *ortho*-Position mit einer annähernd planaren Struktur stellen Agonisten des Ah-Rezeptors dar und sind in der Lage CYP1A-Isoenzyme in der Leber zu induzieren, sie wirken somit ‚dioxinartig‘. Besitzen Kongenere mindestens zwei Chlorsubstituenten in *ortho*-Position (2,2' und 6,6') können die aromatischen Ringe keine flache räumliche Struktur annehmen. Diese induzieren CYP2B- und 3A-Isoenzyme der Leber, was sie mit dem Barbitursäurederivat Phenobarbital gemeinsam haben.

Von mehrfach *ortho*-substituierten PCBs ist bekannt, dass sie die neuronale Signaltransduktion erheblich beeinflussen können, in dem sie Störungen der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase und des PKC-Signaltransduktionsweges hervorrufen (Kodavanti *et al.*, 1993, 1995; Kodavanti und Tilson, 1997). Verantwortlich für den Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Innern der Zelle ist die Öffnung von RyR-assoziierten Ca^{2+} -Kanälen (Wong und Pessah, 1996; Wong *et al.*, 1997). Der RyR wird hauptsächlich im Gehirn, Herz- und Skelettmuskel exprimiert, eine weitere Form des Rezeptors ist in weniger stark ausgeprägter Form auch in anderen Geweben zu finden (Sorrentino und Volpe, 1993). Die Expression eines RyR in der Leber ist nicht eindeutig geklärt. Es gibt lediglich Hinweise auf Ryanodinsensitive Ca^{2+} -Kanäle, die von IP_3 -sensitiven Kanälen zu unterscheiden sind (Lilly und Gollan, 1995).

Calciumionen spielen als sekundäre Botenstoffe eine wichtige Rolle in der Regulation zellulärer Funktionen, u. a. der Proliferation von Zellen. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration liegt um den Faktor 20000 niedriger als die extrazelluläre Konzentration.

Diese geringe Konzentration an Ca^{2+} im Innern der Zelle wird aufrecht erhalten durch Ca^{2+} -bindende Proteine, Speicherung von Ca^{2+} in ER und Mitochondrien und Herauspumpen von Ca^{2+} in den extrazellulären Raum (Clapham, 1995).

Eine unphysiologische Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kann zum Zelltod führen. Banyard und Tellam (1985) konnten zeigen, dass neoplastische Zelllinien einen deutlich erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel aufweisen. Diese tolerierte Ca^{2+} -Erhöhung könnte für die Zellen einen mitogenen Stimulus bedeuten, da sowohl Ca^{2+} -Ionen als auch Ca^{2+} /Calmodulin den Zellzyklus in verschiedenen Phasen beeinflussen (Lu und Means, 1993).

Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in präneoplastischen Zellen der Leber durch PCBs würde einen interessanten Aspekt im Hinblick auf die tumorpromovierende Wirkung dieser Substanzen darstellen.

Im Zusammenhang mit einer gestörten Ca^{2+} -Homöostase wäre auch eine mögliche direkte Wechselwirkung von Phospholipiden der zellulären Membranen und mehrfach *ortho*-substituierten PCBs denkbar, die durch Störung der Membranintegrität zur Entleerung von intrazellulären Ca^{2+} -Speichern oder zum Einstrom von Ca^{2+} aus dem extrazellulären Milieu führen könnte.

Zur Klärung der Frage, ob PCBs mit unterschiedlichen räumlichen Strukturen eine Störung zellulärer Membranen verursachen, wurde die Methode der Elektronen Spin Resonanz (ESR) gewählt. Voraussetzung für die ESR ist das Vorhandensein von paramagnetischen Gruppen im zu untersuchenden Molekül.

Die im Rahmen dieses Versuchs isolierten Rattenlebermikrosomen wurden mit einer sogenannten Spinsonde, einer paramagnetischen Gruppen in Form eines stabilen Nitroxids, markiert. Zum Einsatz kamen die spinmarkierten Fettsäuren 5-Doxyl-Stearinsäure und 16-Doxyl-Stearinsäure die mit Erfolg in die Membran eingebaut werden konnten.

Die ESR-Spektren ließen nach kurzzeitiger Inkubation mit dem non-*ortho*-substituierten PCB 126 (3,3',4,4',5-Pentachlorbiphenyl) und dem di-*ortho*-substituierten PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl) nicht auf eine direkte Wechselwirkung mit den Phospholipiden der Membran schließen.

Anhand von mikrofluorimetrischen Ca^{2+} -Messungen wurde der Einfluß des di-*ortho*-substituierten PCB 153 auf die Ca^{2+} -Homöostase in Hepatozyten untersucht.

Zur Messung wurden nur Zellen herangezogen, die durch kurzzeitige Behandlung von ATP auf eine reversible Entleerung der Ca^{2+} -Speicher reagierten. Die Qualität der isolierten und kultivierten primären Hepatozyten spielte hier eine große Rolle.

Es zeigte sich kein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Inkubation der mit einem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff beladenen Zellen durch PCB 153 in verschiedenen Konzentrationen. Auch eine Beeinflussung der ATP-induzierten Ca^{2+} -Ausschüttung durch Vorinkubation mit PCB 153 trat nicht auf.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den von Förster (2002) durchgeführten Versuchen an isolierten Mikrosomen. Die mit Ca^{2+} beladenen Membranvesikel der Rattenleber zeigten nur eine sehr geringe Reaktion auf die Zugabe von PCB 153 im Vergleich zur Freisetzung von Ca^{2+} durch IP_3 oder Ryanodin.

Eine Behandlung der Hepatozyten mit Phenobarbital zeigte ebenfalls keinen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels.

Der Einfluß von Tumorpromotoren, wie z. B. TCDD, Phenobarbital und verschiedene Peroxisomenproliferatoren, auf die Ca^{2+} -Homöostase wurde von Leibold (1993) in Hepatozyten untersucht. Außer Phenobarbital war in diesen Versuchen keine der Substanzen in der Lage, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu erhöhen. Bei einer mehrstündigen Vorinkubation der Zellen mit dem Tumorpromotor zeigte die Behandlung einen Rückgang der Zellen mit Phenylephrin-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen, das gleiche Ergebnis wurde bei zwei untersuchten Peroxisomenproliferatoren gesehen.

Der von Marc *et al.* (2000) gefundene intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg durch Phenobarbital in der Maus trat nur bei einer Langzeitbehandlung der Zellen über 1-2 Tage auf, eine Behandlung über wenige Stunden hatte keinen Einfluß.

Die Vorbehandlung der Zellen mit Tumorpromotoren spielt in der Untersuchung hinsichtlich der Beeinflussung der Ca^{2+} -Homöostase vielleicht eine wichtige Rolle, da der Zelle ausreichend Zeit zur Verfügung gestellt wird, um auf diesen Stimulus zu reagieren. Wenn die Zelle nicht mit einem direkt induzierten Ca^{2+} -Anstieg reagiert, so besteht die Möglichkeit, dass Ca^{2+} -abhängige Signalketten beeinflusst werden.

Weiterhin konnte Leibold (1993) zeigen, dass in präneoplastischen γGT -positiven Hepatozyten der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel nicht erhöht war. Möglicherweise spielt die Toleranz von Zellen gegenüber erhöhten Ca^{2+} -Konzentrationen und davon ausgehende mitogene Signale erst in späteren neoplastischen Stadien eine Rolle.

5.1.2 Untersuchungen zur Phosphorylierung von Bad an Ser 136 durch PCB 153

Das Überleben einer Zelle wird durch eine Vielzahl von proapoptotisch und antiapoptotisch wirkenden Proteinen gesteuert. Ein wichtiger Signalweg, der über die Bindung von Wachstumsfaktoren an entsprechende Membranrezeptoren induziert wird, ist der PI3K/PKB-Signalweg. Wachstumsfaktoren wirken über Rezeptor-Tyrosinkinasen aktivierend auf die PI3K. Diese ist in der Lage über Phosphorylierungsschritte die PKB zu aktivieren. Das Überleben der Zelle wird durch eine ganze Reihe von PKB-Zielproteinen gesichert, von denen nachfolgend nur einige diskutiert werden.

Das proapoptotisch wirkende Bad wird nach Phosphorylierung an Ser 136 an einer Bindung und Inaktivierung von Bcl-x_L an der Mitochondrienmembran gehindert. Eine Ausschüttung von Cytochrom c und eine Initiierung der Caspase-Kaskade wird somit verhindert (Yang *et al.*, 1995). Auch die direkte Phosphorylierung von Caspase-9 und somit eine Caspase-initiierte Bildung des Apoptosoms kann auf diesem Weg verhindert werden. Des Weiteren kann durch inaktivierende Phosphorylierung von CDK-Inhibitoren p21 und p27 kein Zellzyklusarrest mehr eingeleitet werden. Auch eine Arretierung des Zellzyklus durch p53 nach DNA-Schaden kann ausgeschaltet werden, da die PKB zur Phosphorylierung des p53-Regulators MDM-2 führt und es zum gesteigerten proteasomalen Abbau von p53 kommt, der somit auch eine p53-induzierte Einleitung des Zelltodes über Bax nicht mehr zulässt (Mayo und Donner, 2002).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Phosphorylierung von Bad an Ser 136 gestaltete sich schon bei der gezielten Aktivierung des PI3K/PKB-Signalweges durch EGF und Insulin als sehr schwierig, da geringe Unterschiede in der Zusammensetzung der Kulturmedien das Ergebnis stark beeinflussten. Es zeigte sich durch Zugabe von Insulin von EGF nicht nur ein Einfluss auf die Phosphorylierung von Bad, sondern auch eine Veränderung im Gesamtproteinlevel.

Versuche mit PCB 153 brachten zum Teil recht unterschiedliche Ergebnisse in einzelnen Zellpräparationen. Es zeigte sich jedoch überall ein Trend zur konzentrationsabhängigen Phosphorylierung von Bad an Ser 136 nach längerer Inkubationsdauer, der in niedrigeren Konzentrationen am höchsten war. Der Gesamtproteinlevel an Bad wurde durch eine Behandlung mit PCB 153 in einigen Versuchen sehr stark reduziert.

Es könnte also möglich sein, dass ein Überleben der Zelle nicht nur durch die inaktivierende Phosphorylierung von Bad gesichert wird, sondern auch über einen verstärkten proteasomalen Abbau des Proteins, einem weiteren wichtigen regulatorischen Faktor in der Entscheidung über Leben und Tod der Zelle (Yang und Yu, 2003).

Aus Zeitgründen konnte auf diese Ergebnisse und auf andere Tumorpromotoren nicht näher eingegangen werden. Sie stellen für die mechanistische Untersuchung von Substanzen mit tumorpromovierender Wirkung aber einen wichtigen Ansatzpunkt dar, der nicht nur im Hinblick auf eine Phosphorylierung von Bad untersucht werden sollte, sondern auch an anderen möglichen Zielproteinen der PKB, sowie einer Aktivierung der PKB und PI3K selbst. Erforderlich wären hierfür auch eine Optimierung der Kulturbedingungen sowie die Untersuchung der Beeinflussung einer Bad-Phosphorylierung durch Tumorpromotoren in Anwesenheit von Insulin im Kulturmedium, das in physiologischen Konzentrationen im Medium vorhanden sein sollte. Eine Verbesserung der Technik der Immunpräzipitation zum Nachweis von Bad im Western Blot scheint sinnvoll, da sich eine vorhergehende Präzipitation des Proteins als unerlässlich gezeigt hat.

5.1.3 Caspase-3-Aktivierung durch Etoposid, Camptothecin und MNNG, und fluoreszenzmikroskopische Detektion apoptotischer Zellkerne nach MNNG-Behandlung

In der Vergangenheit konnte mit der Anwendung der Technik des Sandwichkollagengels zur Kultivierung von Hepatozyten und anschließender fluoreszenzmikroskopischer Detektion apoptotischer Zellkerne anhand morphologischer Merkmale, eine geeignete, aber recht aufwendige Methode zum Nachweis von Apoptose *in vitro* etabliert werden (Bohnenberger *et al.*, 2001; Kunz, 2001).

Beim Einsatz von UV-Licht zur Induktion von Apoptose in Hepatozyten konnte erfolgreich die Hemmung der Apoptose durch tumorpromovierende Substanzen nachgewiesen werden (Wörner und Schrenk, 1996; Bohnenberger *et al.*, 2001; Kunz, 2001).

Die Etablierung anderer apoptotischer Nachweismethoden, wie beispielsweise die durchflußzytometrische Detektion, die DNA-Fragmentierung, der Nachweis von Annexin V und die Aktivierung der Caspase-3, gestaltete sich aufgrund geringer Apoptoseinzidenzen als äußerst schwierig (Grün, 1998; Bohnenberger, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein geeigneter Induktor der Apoptose für Rattenhepatozyten in Primärkultur zur Etablierung eines Caspase-3-Assays gefunden werden.

Die in den Versuchen eingesetzten Topoisomerase-Inhibitoren waren in der Lage, die Caspase-3 in primären Hepatozyten zu aktivieren, eine Aktivierung über das zweifache der Kontrolle hinaus konnte jedoch weder bei Etoposid noch bei Camptothecin, erzeugt werden.

Topoisomerase-Inhibitoren werden als Chemotherapeutika gezielt zur Eliminierung von Tumorzellen eingesetzt. Eine Induktion der Apoptose durch Topoisomerase-Inhibitoren in ständig proliferierenden Tumorzellen läuft sicherlich erfolgreicher ab als in primären Hepatozyten, die normalerweise keine Zellteilung durchführen. Topoisomerase-Inhibitoren könnten einen optimalen Angriffspunkt zur Induktion der Apoptose in Tumorzellen darstellen, da sie eine hohe Aktivität während der DNA-Replikation aufweisen (Champoux, 2001).

Eine erfolgreiche Aktivierung der Caspase-3 in Hepatozyten in Primärkultur konnte mit MNNG erzielt werden. Schon eine 30-minütige Behandlung mit MNNG war ausreichend um die Aktivität der Caspase-3 um das 11-fache der Kontrolle zu steigern.

Allerdings zeigten sich zum Teil sehr große Unterschiede in der Induzierbarkeit der Caspase-3-Aktivität in Hepatozyten der verschiedenen Zellpräparationen.

Um ein Maß für die Apoptoseinzidenz in Hepatozyten nach MNNG-Behandlung zu erhalten, wurden apoptotische Zellkerne fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Die gefundene Apoptoseinzidenz von 21,8 % ($\pm 3,9$ %) zeigt, dass MNNG zur Induktion der Apoptose und nachfolgenden Versuchen zur Apoptosehemmung *in vitro* eingesetzt werden kann.

MNNG, ein im Tierversuch nachgewiesenes Karzinogen, führt ohne vorangehende Metabolisierung zur Alkylierung der DNA (Peto *et al.*, 1985). Bei den entstehenden Addukten handelt es sich hauptsächlich um N⁷-Methylguanin, aber auch N³-Methyladenin und O⁶-Methylguanin treten auf (Peterson und Peterson, 1982).

Der apoptotische Signalweg aller drei hier untersuchten Substanzen läuft über p53. Das Tumorsuppressorprotein p53 bewirkt nach DNA-Schäden einen Zellzyklusstopp zur Beseitigung des Schadens durch intrazelluläre Reparaturmechanismen. Bei irreparablen Schaden kann die Beseitigung der Zelle, durch Induktion des proapoptotischen Bcl-2 Proteins Bax und somit zur mitochondrialen Aktivierung der Caspasen-Kaskade führen (Adamson *et al.*, 2002).

5.1.4 Einfluss von Phenobarbital, PCB 153, TCDD und PCB 126 auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung und Ausschüttung von Cytochrom c

Der Nachweis einer tumorpromovierenden Wirkung von Substanzen kann im Initiations-Promotions-Modell der Rattenleber durch Quantifizierung von Tumorvorläuferzellen, sogenannten präneoplastischen Zellen, sehr gut erfasst werden.

Eine Übertragung dieses Modells auf eine *in vitro*-Situation mit primären Hepatozyten der Ratte ist bisher nicht gelungen. In zahlreichen Studien wurden in *in vivo*-Versuchen präneoplastische Zellen im Versuchstier erzeugt und diese nach Isolierung und Charakterisierung *in vitro* in der Zellkultur eingesetzt (Klose *et al.*, 1989; Leibold, 1993).

Da der Hemmung der Apoptose in der Promotionsphase der Hepatokarzinogenese eine wichtige Rolle zugeschrieben wird, ist die Untersuchung einer Apoptose-inhibierenden Wirkung nach Induktion der Apoptose mit genotoxischen Agentien *in vitro* von großer Bedeutung.

Auf morphologischer Ebene konnte eine Hemmung der Apoptose in Hepatozyten in Primärkultur, nach vorangegangener genotoxischer Läsion durch UV-Licht, bereits für die Tumorpromotoren TCDD, Phenobarbital, die ‚dioxinartigen‘ PCB-Kongener 81, 126, 169 und die ‚nicht-dioxinartigen‘ PCB-Kongener 28, 101, 138, 183, und 187 gezeigt werden (Wörner und Schrenk, 1996; Bohnenberger *et al.*, 2001; Kunz, 2001; Zeiger, 2001; Bohnenberger, 2003).

Unter Verwendung einer biochemischen Nachweismethode der Apoptose, der Aktivierung der Caspase-3, wurden die Tumorpromotoren Phenobarbital, das ‚nicht-dioxinartige‘ Kongener PCB 153, TCDD und PCB 126, ein ‚dioxinartiges‘ Kongener, auf eine mögliche Beeinflussung der MNNG-induzierten Caspase-3-Aktivierung untersucht. Für alle genannten Substanzen konnte eine tumorpromovierende Wirkung *in vivo* bereits bestätigt werden (Pitot *et al.*, 1980; Kristiansen *et al.*, 1989; Hemming *et al.*, 1993).

Die Versuche zeigten eine konzentrationsabhängige Hemmung der Caspase-3-Aktivierung nach Behandlung mit Phenobarbital. Eine signifikante Hemmung wurde mit der höchsten eingesetzten Konzentration 10^{-3} M erreicht, die verglichen mit MNNG um ca. 40 % reduziert war.

Ähnlich verlief die Hemmung der MNNG-induzierten Caspase-3-Aktivierung durch PCB 153. Auch hier war eine konzentrationsabhängige Hemmung erkennbar, mit ca. 30 % Hemmung in der höchsten Konzentration 10^{-5} M, die allerdings keine Signifikanz zeigte.

TCDD und PCB 126 hatten keinen Einfluß auf die Induktion der Caspase-3-Aktivität durch MNNG, es zeigte sich keine Hemmung.

Eine Erklärung für die hier gefundenen Ergebnisse könnte möglicherweise in der unterschiedlichen Wirkungsweise der Substanzen hinsichtlich ihrer Induzierbarkeit von CYP-Isoenzymen liegen.

Phenobarbital induziert in der Rattenleber CYP2B1/2- und 3A-Isoenzyme. Das PCB-Kongener 153 zeigt ebenfalls eine ‚Phenobarbitaltyp‘-Induktion von CYP.

Als Agonisten des AhR zeigen TCDD und PCB 126 jedoch eine Induktion von CYP1A-Isoenzymen in der Rattenleber.

Da eine Aktivierung von Effektorcaspasen im apoptotischen Signalweg den sogenannten ‚point of no return‘ darstellt, der irreversibel zum Zelltod führt, sollte in diesem Stadium ein Nachweis der Apoptosehemmung möglich sein. Möglicherweise müssen hier auch andere Effektorcaspasen, Caspase-6 und -7, zur Untersuchung in Betracht gezogen werden.

TCDD ist selbst in der Lage Apoptose in primären Hepatozyten zu induzieren, was durch fluoreszenzmikroskopische Detektion nachgewiesen werden konnte (Kunz, 2001). Eine Induktion der Caspase-3-Aktivierung konnte nach alleiniger TCDD-Behandlung in den hier durchgeführten Versuchen nicht gezeigt werden, was eine mögliche Rolle anderer Effektorcaspasen für einen AhR-abhängigen Signalweg nicht ausschließt.

Durch den Einsatz eines weiteren biochemischen Apoptosenachweises, der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, sollten die im Caspase-3-Assay gefundenen Ergebnisse eingehender untersucht werden. Die Ausschüttung von Cytochrom c ins Zytoplasma der Zelle bewirkt eine Aktivierung der Caspasen-Kaskade bis hin zur Ebene der Effektorcaspasen.

Nacht acht Stunden zeigte sich durch Behandlung mit MNNG, die in Analogie zu den Versuchen des Caspase-3-Assays durchgeführt wurde, ein konzentrationsabhängiger Anstieg von Cytochrom c in der zytosolischen Fraktion, der nach zwölf Stunden schon wieder deutlich reduziert war. Eine Abnahme von Cytochrom c in der mitochondrialen Fraktion konnte nicht gezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Optimierung der Aufarbeitung in unterschiedliche Fraktionen nicht mehr durchgeführt werden. Versuche zur Hemmung der Freisetzung von Cytochrom c durch Tumorpromotoren zeigte kein verwertbares Ergebnis. Der Grund hierfür könnten in der Qualität der Hepatozyten, der Aufarbeitung von zytosolischer und mitochondrialer Fraktion, aber auch in der langen Lagerung der Proben liegen.

Grundsätzlich stellt die Messung der Freisetzung von Cytochrom c aber eine sinnvolle Methode zur Ergänzung anderer biochemischer Nachweismethoden der Apoptose dar.

5.2 Untersuchung der tumorpromovierenden Wirkung von PCB 28 und PCB 101 im Initiations-Promotions-Experiment

Der Einsatz eines Kurzzeit-Karzinogenitätstests, beruhend auf dem Nachweis schnellwachsender Tumoren oder dem Wachstum von Tumorvorstadien, kann wertvolle Hinweise auf eine karzinogene Wirkung einer Substanz liefern, ersetzt jedoch nicht die Durchführung von chronischen Karzinogenitätsstudien.

Das für die Rattenleber etablierte Initiations-Promotions-Modell beruht auf dem Nachweis von Tumorvorläuferzellen, sogenannten präneoplastischen Zellen, die durch eine veränderte Enzymexpression von normalen Zellen deutlich als inselartige Zellverbände abgegrenzt werden können (Ittrich *et al.*, 2003).

Präneoplastische Zellen der Leber können u. a. durch einen Aktivitätsverlust der ATPase und eine erhöhte Expression der GSTP histochemisch bzw. immunhistochemisch in histologischen Schnitten charakterisiert werden und mit Hilfe von stereologischen Berechnungsmethoden quantifiziert werden.

Es ist möglich in diesem Modell eine Aussage über eine mögliche initiierende und/oder promovierende Wirkung von Testsubstanzen zu treffen.

Eine karzinogene Wirkung von technischen PCB-Gemischen in der Rattenleber konnte von Mayes *et al.* (1998) gezeigt werden, für einzelne PCB-Kongenere liegen jedoch keine Daten vor. Zur Risikobewertung sind tierexperimentelle Daten einzelner PCB-Kongenere unerlässlich, da eine karzinogene Wirkung der PCB auch beim Menschen nicht ausgeschlossen werden kann. Tierexperimentelle Daten zur tumorpromovierenden Wirkung einzelner Kongenere liegen bereits vor und zeigen eine tumorpromovierende Wirkung der ‚dioxinartigen‘ Kongenere PCB 77 (Buchmann *et al.*, 1986, 1991), 105 (Hemming *et al.*, 1993) und 126 (Hemming *et al.*, 1993) sowie für die ‚nicht-dioxinartigen‘ Kongenere PCB 47 (Oesterle und Deml, 1981), 49 (Buchmann *et al.*, 1991), 52 (Preston *et al.*, 1985) und 153 (Hemming *et al.*, 1993).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Initiations-Promotions-Studie an weiblichen Wistar-Ratten sollte zur Aufklärung einer möglichen tumorpromovierenden Aktivität der ‚nicht-dioxinartigen‘ Kongenere PCB 28 und PCB 101 beitragen, die nachweislich in Umweltproben, humanen Gewebeproben und Muttermilch zu einer Belastung beitragen.

Durch Behandlung der Tiere mit DEN wurden präneoplastische Läsionen in der Leber erzeugt, die durch anschließende Behandlung mit einer hohen und niedrigen Dosis der PCB-Kongenere über einen längeren Zeitraum auf ein promovierendes Wachstum analysiert wurden.

Ein wichtiger Parameter der Risikobewertung solcher Substanzen ist die Akkumulation im Gewebe aufgrund ihrer Lipophilie und ihrer außerordentlichen Persistenz durch eine lange Eliminationshalbwertszeit der unveränderten Substanz und ihrer Metabolite.

In der Studie konnte anhand der gemessenen PCB-Gehalte im hepatischen Gewebe eine deutlich höhere Akkumulation von PCB 28 als von PCB 101 festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür kann in einer besseren Aufnahme des kleineren weniger chlorierten und weniger lipophilen Moleküls liegen, aber auch in einer schnelleren Metabolisierung von PCB 101. Die Aufnahme von einzelnen PCB-Kongeneren über den Gastrointestinaltrakt variiert zwischen 66 % und 95 % (Tanabe *et al.*, 1981). Nach Untersuchungen von Bergman *et al.* (1982) werden höher chlorierte PCBs schlechter aufgenommen.

Die Unterschiede in den PCB-Gehalten könnten aber auch durch den Metabolismus der Substanzen erklärt werden. Eine rasche Metabolisierung von PCB 101 konnte von Wehler *et al.* (1996) gezeigt werden. Die Metabolisierung von PCB 101 führt nachweislich zur Entstehung von reaktiven hydroxylierten Metaboliten und den sehr persistenten 3-Methylsulfonyl- und 4-Methylsulfonylmetaboliten (Haraguchi *et al.*, 1992; Bergman *et al.*, 1994; Noren *et al.*, 1996), denen auch eine tumorpromovierende Wirkung zugeschrieben wird (Letcher *et al.*, 2000). Eine Aufklärung des Metabolitenspektrums der behandelten Tiere erscheint sinnvoll.

Ein wichtiger Aspekt der toxikologischen Wirkung von PCBs ist die Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme. Non-*ortho*-substituierte PCBs stellen Agonisten des AhR dar und induzieren CYP1A-Isoenzyme der Rattenleber. Sie zeigen somit eine ‚dioxinartige‘ Wirkung.

Im Gegensatz dazu zeigen mehrfach-*ortho*-substituierte Kongenere keine oder nur eine sehr geringe Affinität zum AhR und induzieren CYP2B- und 3A-Isoenzyme, was sie gemeinsam haben mit dem strukturell nicht näher verwandten Barbitursäurederivat Phenobarbital. Eine exakte Trennung kann jedoch hier nicht gezogen werden, denn es existieren auch sogenannte ‚mixed type inducer‘, die sich nicht auf die Induktion nur eines der genannten CYP-Isoenzyme beschränken.

PCB 28, ein mono-*ortho*-substituiertes Kongener, zeigte eine signifikante Erhöhung der EROD-Aktivität, die mit einer CYP1A-Induktion korreliert ist und eine signifikant gesteigerte Aktivität der PROD, ein Maß für die Induktion von CYP2B-Isoenzymen. Dieser Befund wird gestärkt durch *in vitro*-Ergebnisse in Hepatozyten, bei denen eine Induktion der PROD und bei hohen Konzentrationen an PCB 28 auch eine leicht erhöhte EROD-Aktivität zu sehen war (Bohnenberger *et al.*, 2001). Die gleichen Effekte wurden auch bei PCB 101 beobachtet, wobei hier hauptsächlich eine Induktion der PROD hervorzuheben ist.

Da die Höhe der EROD-Induktion im Vergleich zu einer Induktion mit TCDD jedoch sehr gering ist, kann man die beiden PCB-Kongenere 28 und 101 nicht als ‚mixed type inducer‘ bezeichnen.

Beide PCB-Kongenere führten zu einem signifikanten promovierenden Wachstum von DEN-initiierten ATPase-negativen präneoplastischen Foci, wobei das Focusvolumen, nicht aber die Zahl der Foci signifikant gesteigert wurde. GSTP-positive präneoplastische Läsionen zeigten nach PCB-Behandlung kein promovierendes Wachstum. Die Quantifizierung verschiedener, für Präneoplasien der Rattenleber charakteristischen, Parameter scheint somit bei der Durchführung einer solchen Studie unerlässlich zu sein.

Der promovierende Effekt von PCB 28 ist mit einer Zunahme des relativen Lebergewichts korreliert, der wohl aber eher auf eine Hypertrophie als auf eine Hyperplasie zurückgeführt werden kann, denn eine signifikant erhöhte DNA-Synthese in GSTP-positiven Zellen konnte nicht gefunden werden.

Die klonale Expansion präneoplastischer Zellen durch Substanzen mit tumorpromovierender Wirkung wird u. a. auf eine Hemmung der Apoptose in diesen Zellpopulationen zurückgeführt (Schulte-Hermann *et al.*, 1995). In *in vitro*-Versuchen mit primären Hepatozyten konnte für die beiden hier untersuchten PCB-Kongenere 28 und 101 eine Hemmung der durch eine genotoxische Läsion induzierten Apoptose bereits gezeigt werden (Bohnenberger *et al.*, 2001).

Im Zusammenhang mit dem tumorpromovierenden Potential dieser beiden Kongenere wäre sicherlich auch eine Untersuchung in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Experimente, beispielsweise die Wirkung auf die MNNG-induzierte Caspase-3-Aktivierung oder eine Phosphorylierung von Bad, von großem Interesse. Hier könnte auch an den Einsatz von Methylsulfonylmetaboliten des Kongeners PCB 101 gedacht werden.

Mit Hilfe dieses Initiations-Promotions-Experiments konnte eine schwache tumorpromovierende Wirkung von PCB 28 und PCB 101 nachgewiesen werden, eine chronische Studie zur Karzinogenität können die Befunde jedoch nicht ersetzen.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht verschiedene Aspekte der Wirkung von ‚nicht-dioxinartigen‘ PCBs in Hepatozyten *in vitro* aufzuklären und mit einer *in vivo*-Studie einen Beitrag zur Aufklärung der tumorpromovierenden Wirkung von zwei ‚nicht-dioxinartigen‘ PCB-Kongeneren zu leisten.

Zur Untersuchung der Beeinflussung der intrazellulären Calcium-Homöostase wurden isolierte Membranfraktionen einer Rattenleber nach dem Einbau von spinmarkierten Fettsäuren mit zwei PCB-Kongeneren unterschiedlicher räumlicher Struktur behandelt und mit Hilfe der Elektronen Spin Resonanz vermessen. Weder das ‚dioxinartige‘ PCB 126 noch das ‚nicht-dioxinartige‘ PCB 153 zeigten eine direkte Störung der Membranintegrität. Die Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von Rattenhepatozyten in Primärkultur erfolgte mikrofluorimetrisch nach Beladung der Zellen mit einem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff. Auch hier ergab sich keine Störung der Ca^{2+} -Homöostase nach einer Behandlung mit PCB 153.

Die Beeinflussung eines apoptotischen Signalweges, die Signaltransduktion über PI3K/PKB, wurde anhand der Phosphorylierung des proapoptotischen Proteins Bad in Rattenhepatozyten in Primärkultur überprüft. PCB 153 zeigte in niedrigen Konzentrationen eine Phosphorylierung von Bad an Serin 136. Der Gesamtproteinlevel war nach Behandlung mit PCB 153 in einigen Versuchen sehr stark reduziert. Diese Befunde stellen einen wichtigen Ansatzpunkt für eingehendere mechanistische Untersuchungen der tumorpromovierenden Wirkung dieser Substanzen dar, der im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr verfolgt werden konnte.

Mit einem Caspase-3-Assay konnte in vorliegender Arbeit ein biochemischer Apoptose-Nachweis in primären Hepatozyten etabliert werden. Die Topoisomerase-Inhibitoren Etoposid und Camptothecin zeigten sich zur Aktivierung der Caspase-3 als weniger gut geeignet. Der Einsatz von MNNG als apoptogenem Agens verlief erfolgreich, was durch fluoreszenzmikroskopische Detektion apoptotischer Zellkerne bestätigt werden konnte.

Im weiteren Verlauf wurde die Beeinflussung der MNNG-induzierten Caspase-3-Aktivierung durch verschiedene Tumorpromotoren untersucht. Mit Phenobarbital und dem ‚nicht-dioxinartigen‘ PCB 153 konnte eine Hemmung der MNNG-induzierten Caspase-3-Aktivität gezeigt werden. Dieser Effekt wurde bei Behandlung mit TCDD und dem ‚dioxinartigen‘ PCB 126 jedoch nicht gesehen. Die Überprüfung dieser Ergebnisse in einem weiteren biochemischen Nachweis der Apoptose, der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, konnte nicht mehr in ausreichendem Maße durchgeführt werden.

In einer an weiblichen Wistar-Ratten durchgeführten Initiations-Promotions-Studie zeigte sich eine schwache tumorpromovierende Wirkung der beiden ‚nicht-dioxinartigen‘ PCB-Kongenere 28 und 101. Das promovierende Wachstum wurde anhand zweier charakteristischer Parameter für Präneoplasien der Leber, einer verringerten ATPase-Aktivität und einer erhöhten Expression der GSTP, nach vorangegangener Behandlung mit DEN untersucht. Es konnte für beide Kongenere eine signifikante Zunahme des ATPase-negativen Focusvolumens, nicht aber der Zahl der ATPase-negativen Foci gezeigt werden. GSTP-positive Foci zeigten kein signifikantes promovierendes Wachstum.

Nach Behandlung mit PCB 28 war eine Zunahme des relativen Lebergewichts zu verzeichnen. Eine erhöhte DNA-Synthese in GSTP-positiven Zellen konnte nicht gezeigt werden.

Eine Analyse der PCB-Gehalte im hepatischen Gewebe der Versuchstiere ergab eine 5-13-fach höhere Akkumulation von PCB 28, möglicherweise resultierend aus einer schnelleren Metabolisierung von PCB 101. Entstehende Metabolite wurden im Rahmen dieses Versuchs jedoch nicht analytisch erfasst.

Es zeigte sich eine Induktion der PROD durch PCB 28 und 101, auch die EROD konnte durch beide Kongenere induziert werden, wobei die Induktion durch PCB 28 hier wesentlich höher lag. Da die Induktionshöhe der EROD jedoch sehr gering ist, können die Kongenere nicht als ‚mixed type inducer‘ angesehen werden.

7 Literaturverzeichnis

- Abraham, K., Hille, A., Ende, M. und Helge, H. (1994)
Intake and fecal excretion of PCDDs, PCDFs, HCB and PCBs (138, 153, 180) in a breast-fed and a formula-fed infant.
Chemosphere **29**, 2279-2286
- Abraham, K., Knoll, A., Ende, M., Pöpke, O. und Helge, H. (1996)
Intake, fecal excretion, and body burden of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in breast-fed and formula-fed infants.
Pediatr. Res. **40**, 671-679
- Adamson, A.W., Kim, W.-J., Shangary, S., Baskaran, R. und Brown, K.D. (2002)
ATM is activated in response to *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine-induced DNA alkylation.
J. Biol. Chem. **277**, 38222-38229
- Ahlborg, U.G., Hanberg, A. und Kenne, K. (1992)
Risk Assessment of Polychlorinated Biphenyls (PCBs).
Nordic council of ministers, Copenhagen Nord **26**
- Ahlborg, U.G., Becking, G.C., Birnbaum, L.S., Brouwer, A., Derks, H.J.G.M., Feeley, M., Golor, G., Hanberg, A., Larsen, J.C., Liem, A.K.D., Safe, S.H., Schlatter, C., Waern, F., Younes, M. und Yrjänheikki, E. (1994)
Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs : Report on WHO-ECEH and IPCS consultation, December 1993.
Chemosphere **28**, 1049-1067
- Ballschmiter, K. und Zell, M. (1980)
Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography: Composition of technical Arochlor- and Clophen-PCB mixtures.
Fresenius Z. Anal. Chem. **302**, 20-31
- Banyard, M.R. und Tellam, R.L. (1985)
The free cytoplasmic calcium concentration of tumorigenic and non-tumorigenic human somatic cell hybrids.
Br. J. Cancer. **51**, 761-766
- Barbacid, M. (1987)
Ras genes.
Ann. Rev. Biochem. **56**, 779-827
- 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

- Bergman, Å., Larsen, G.L. und Bakke, J.E. (1982)
Biliary secretion, retention and excretion of five ¹⁴C-labelled polychlorinated biphenyls in the rat.
Chemosphere **11**, 249-253
- Bergman, Å., Klasson-Wehler, E. und Kuroki, H. (1994)
Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood.
Environ. Health Perspect. **102**, 464-469
- Bishop, J.M. (1983)
Cellular oncogenes and retroviruses.
Ann. Rev. Biochem. **52**, 301-354
- Bishop, J.M. (1987)
The molecular genetics of cancer.
Science **235**, 305-310
- Bitsch, A., Duebelbeiss, C. und Greiner, A. (1999)
C-*fos* gene expression in rat liver is induced by phenobarbital.
Cancer Lett. **135**, 215-222
- Blankenship, A. und Matsumura, F. (1997)
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced activation of a protein tyrosine kinase, pp60src, in murine hepatic cytosol using a cell-free system.
Mol. Pharmacol. **52**, 667-675
- Börner, P. und Gössner, W. (1968)
Enzymhistochemische Untersuchungen der Adenosin-Triphosphatase, der alkalischen und sauren Phosphatase sowie der Succinodehydrogenase im Leberparenchym der Ratte während der Einwirkung des Cancerogens Diäthylnitrosamin.
Z. Naturforsch. **23b**, 1085-1091
- 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**, 1601-1606
- Bohnenberger, S.M. (2003)
Apoptose in Rattenhepatozyten in Primärkultur - Einfluss von TCDD und polychlorierten Biphenylen.
Dissertation, Fachbereich Chemie, Universität Kaiserslautern
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. und Wallach, D. (1996)
Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death.
Cell **85**, 803-815
- Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G. und Monks, T.J. (2000)
Role of quinones in toxicology.
Chem. Res. Toxicol. **13**, 135-160

- Borlakoglu, J.T. und Wilkins, J.P. (1993)
Metabolism of di-, tri-, tetra-, penta- and hexachlorobiphenyls by hepatic microsomes isolated from control animals and animals treated with Aroclor 1254, a commercial mixture of polychlorinated biphenyls (PCBs).
Comp. Biochem. Physiol. C. **105**, 95-106
- Bossy-Wetzel, E. und Green, D.R. (2000)
Assays for cytochrome c release from mitochondria during apoptosis.
Methods Enzymol. **322**, 235-242
- Bowman, R.E., Heironimus, M.P. und Barsotti, D.A. (1981)
Locomotor hyperactivity in PCB-exposed rhesus monkeys.
Neurotoxicology **2**, 251-268
- Brown, D.P. (1987)
Mortality of workers exposed to polychlorinated biphenyls: an update.
Arch. Environ. Health **42**, 333-339
- Buchanan, D.L., Ohsako, S., Tohyama, C., Cooke, P.S. und Iguchi, T. (2002)
Dioxin inhibition of estrogen-induced mouse uterine epithelial mitogenesis involves changes in cyclin and transforming growth factor-beta expression.
Toxicol. Sci. **66**, 62-68
- Buchmann, A., Kunz, W., Wolf, C.R., Oesch, F. und Robertson, L.W. (1986)
Polychlorinated biphenyls, classified as either phenobarbital or 3-methylcholanthrene-type inducers of cytochrome P-450, are both hepatic tumor promoters in diethylnitrosamine-initiated rats.
Cancer Lett. **32**, 243-253
- 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, M.D., Thompson, S., Elcombe, C.R., Halpert, J., Haaparanta, T. und Mayer, R.T. (1985)
Ethoxy, pentoxy and benzyloxyphenoxyzones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P450.
Biochem. Pharmacol. **34**, 3337-3345
- 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

-
- Carafoli, E. (1995)
Intracellular calcium homeostasis.
Ann. Rev. Biochem. **56**, 395-433
- Cayama, E., Tsuda, H., Sarma, D.S.R. und Farber, E. (1978)
Initiation of chemical carcinogenesis requires cell proliferation.
Nature **275**, 60-62
- Champoux, J.J. (2001)
DNA topoisomerases : Structure, function, and mechanism.
Ann. Rev. Biochem. **70**, 369-413
- Clapham, D.E. (1995)
Calcium signaling.
Cell **80**, 259-268
- 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
- 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
- Enan, E. und Matsumura, F. (1996)
Identification of c-src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway.
Biochem. Pharmacol. **52**, 1599-1612
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. und Nagata, S. (1998)
A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD.
Nature **391**, 43-50
- Fiala, S., Fiala, A.E. und Dixon, B. (1972)
 γ -Glutamyl transpeptidase in transplantable, chemically induced rat hepatomas and 'spontaneous' mouse hepatomas.
J. Natl. Cancer Inst. **48**, 1393-1401
- Fingerhut, M.A., Halperin, W.E., Marlow, D.A., Piacitelli, L.A., Honchar, P.A., Sweeney, M.H., Greife, A.L., Dill, P.A., Steenland, K. und Suruda, A.J. (1991)
Cancer mortality in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin.
N. Engl. J. Med. **324**, 212-218
- Fischer, L.J., Seegal, R.F., Ganey, P.E., Pessah, I.N. und Kodavanti, P.R. (1998)
Symposium overview: toxicity of non-coplanar PCBs.
Toxicol. Sci. **41**, 49-61
-

- Förster, F. (2002)
Etablierung und Optimierung eines Calcium-Transport-Assays an Lebermikrosomen der Ratte.
Diplomarbeit, Fachbereich Chemie, Universität Kaiserslautern
- Forster, U. (1986)
Stabilität und Induzierbarkeit Cytochrom P-450-abhängiger Monooxygenasen und UDP-Glucuronyltransferasen in Primärkulturen von Hepatozyten.
Dissertation, Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften, Technische Universität München
- 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
- Fullman, R.L. (1953)
Measurement of particle sizes in opaque bodies.
Trans. AIME **197**, 447-452
- Ge, N.L. und Elferink, C.J. (1998)
A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin to the cell cycle.
J. Biol. Chem. **273**, 22708-22713
- 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
- Gössner, W. und Friedrich-Freksa, H. (1964)
Histochemische Untersuchungen über die Glucose-6-Phosphatase in der Rattenleber während der Kanzerisierung durch Nitrosamine.
Z. Naturforsch. **19b**, 862-863
- Goldstein, J.A., Hickman, P., Bergman, H., McKinney, J.D. und Walker, M.P. (1977)
Separation of pure polychlorinated biphenyl isomers into two types of inducers on the basis of induction of cytochrome P-450 or P-448.
Chem. Biol. Interact. **17**, 69-87
- Gomez-Lechon, M.J., O'Connor, E., Castell, J.V. und Jover, R. (2002)
Sensitive markers used to identify compounds that trigger apoptosis in cultured hepatocytes.
Toxicol. Sci. **65**, 299-308

- Graña, X. und Reddy, E.P. (1995)
Cell cycle control in mammalian cells: Role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs).
Oncogene **11**, 211-219
- Gray, L.E., Ostby, J.S. und Kelce, W.R. (1997)
A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male Long Evans Hooded rat offspring.
Toxicol. Appl. Pharmacol. **146**, 11-20
- Grün, A. (1998)
Einfluss von Phenobarbital auf den programmierten Zelltod (Apoptose) in kultivierten Primärhepatozyten der Ratte.
Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Universität Kaiserslautern
- Gryniewicz, G., Poenie, M. und Tsien, R.Y. (1985)
A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties.
J. Biol. Chem. **260**, 3440-3450
- Haraguchi, K., Athanasiadou, M., Bergman, A., et al. (1992)
PCB and PCB methyl sulfones in selected groups of seals from Swedish waters.
Ambio. **21**, 546-549
- Heid, S.E., Pollenz, R.S. und Swanson, H.I. (2000)
Role of heat shock protein 90 dissociation in mediating agonist-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor.
Mol. Pharmacol. **57**, 82-92
- 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
- Hoffer, A., Chang, C.Y. und Puga, A. (1996)
Dioxin induces transcription of fos and jun genes by Ah receptor-dependent and -independent pathways.
Toxicol. Appl. Pharmacol. **141**, 238-247
- IARC (1978)
Polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls.
IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol. 18, Lyon
- IARC (1997)
Polychlorinated dibenzo-*para*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans.
IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol. 69, Lyon
- Ikegwonu, F.I., Ganem, L.G., Larson, M.C., Shen, X. und Jefcoate, C.R. (1996)
The regulation by gender, strain, dose, and feeding status of the induction of multiple forms of cytochrome P450 isozymes in rat hepatic microsomes by 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl.
Toxicol. Appl. Pharmacol. **139**, 33-41

Ittrich, C., Deml, E., Oesterle, D., Kuttler, K., Mellert, W., Brendler-Schwaab, S., Enzmann, H., Schladt, L., Bannasch, P., Haertel, T., Monnikes, O., Schwarz, M. und Kopp-Schneider, A. (2003)

Prevalidation of a rat liver foci bioassay (RLFB) based on results from 1600 rats: a study report.

Toxicol. Pathol. **31**, 60-79

Jacobson, J.L. und Jacobson, S.W. (1997)

Evidence for PCBs as neurodevelopmental toxicants in humans.

Neurotoxicology **18**, 415-424

Kaminsky, L.S., Kennedy, M.W., Adams, S.M. und Guengerich, F.P. (1981)

Metabolism of dichlorobiphenyls by highly purified isozymes of rat liver cytochrome P-450.

Biochemistry **20**, 7379-7384

Kannan, N., Tanabe, S. und Tatsukawa, R. (1988)

Potentially hazardous residues of non-ortho chlorine substituted coplanar PCBs in human adipose tissue.

Arch. Environ. Health **43**, 11-14

Kalengayi, M.M.R., Ronchi, G. und Desmet, V.J. (1975)

Histochemistry of γ -glutamyl transpeptidase in rat liver during aflatoxin B1-induced carcinogenesis

J. Natl. Cancer Inst. **55**, 579-582

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

Kazlauskas, A., Poellinger, L. und Pongratz, I. (1999)

Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor.

J. Biol. Chem. **274**, 13519-13524

Kazlauskas, A., Poellinger, L. und Pongratz, I. (2000)

The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor.

J. Biol. Chem. **275**, 41317-41324

Kazlauskas, A., Sundstrom, S., Poellinger, L. und Pongratz, I. (2001)

The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor.

Mol. Cell. Biol. **21**, 2594-2607

Kennedy, S.W. und Jones, S.P. (1994)

Simultaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein concentration with a fluorescent plate reader.

Anal. Biochem. **222**, 217-223

-
- Kerkvliet, N.I. und Burleson, G.R. (1994)
Immunotoxicity of TCDD and related halogenated aromatic hydrocarbons.
In: *Immunotoxicology and Immunopharmacology*, 2nd ed., 97-121
Raven Press, New York
- 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 Cell Biol. **5**, 55-57
- Kester, M.H., Bulduk, S., Tibboel, D., Meinl, W., Glatt, H., Falany, C.N., Coughtrie, M.W., Bergman, A., Safe, S.H., Kuiper, G.G., Schuur, A.G., Brouwer, A. und Visser, T.J. (2000)
Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated PCB metabolites: a novel pathway explaining the estrogenic activity of PCBs.
Endocrinology **141**, 1897-1900
- Klose, U., Thierau, D., Greim, H. und Schwarz, L.R. (1989)
Centrifugal elutriation of hepatocytes from 2-acetylaminofluorene-treated rats and their characterization by flow cytometry.
Carcinogenesis **10**, 553-556
- 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
- Kodavanti, P.R., Shin, D.S., Tilson, H.A. und Harry, G.J. (1993)
Comparative effects of two polychlorinated biphenyl congeners on calcium homeostasis in rat cerebellar granule cells.
Toxicol. Appl. Pharmacol. **123**, 97-106
- Kodavanti, P.R., Ward, T.R., McKinney, J.D. und Tilson, H.A. (1995)
Increased [³H]phorbol ester binding in rat cerebellar granule cells by polychlorinated biphenyl mixtures and congeners: structure-activity relationships.
Toxicol. Appl. Pharmacol. **130**, 140-148
- Kodavanti, P.R. und Tilson, H.A. (1997)
Structure-activity relationships of potentially neurotoxic PCB congeners in the rat.
Neurotoxicology **18**, 425-441
- Koehle, C., Gschaidmeier, H., Lauth, D., Topell, S., Zitzer, H. und Bock K.W. (1999)
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-mediated membrane translocation of c-Src protein kinase in liver WB-F344 cells.
Arch. Toxicol. **73**, 152-158
-

- 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
- Landers, J.P. und Bunce, N.J. (1991)
The Ah receptor and the mechanism of dioxin toxicity.
Biochem. J. **276**, 273-287
- Lans, M.C., Klasson-Wehler, E., Willemsen, M., Meussen, E., Safe, S. und Brouwer, A. (1993)
Structure-dependent, competitive interaction of hydroxy-polychlorobiphenyls, -dibenzo-*p*-dioxins and -dibenzofurans with human transthyretin.
Chem. Biol. Interact. **88**, 7-21
- Leibold, E. (1993)
Zur Wirkung tumorpromovierender Substanzen auf die interzelluläre Kommunikation, den Aminosäuretransport und die Calcium-Homöostase normaler und präneoplastischer Rattenleberzellen.
Dissertation, Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften, Technische Universität München
- Letcher, R.J., Klasson-Wehler, E. und Bergman, Å. (2000)
Methyl sulfone and hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls.
In: *New types of persistent halogenated compounds, Berlin, Springer Verlag*, **3**, Part K, 317-357
- Levin, E.D., Schantz, S.L. und Bowman, R.E. (1988)
Delayed spatial alternation deficits resulting from perinatal PCB exposure in monkeys.
Arch. Toxicol. **62**, 267-273
- 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

- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. und Wang, X. (1997)
Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.
Cell **91**, 479-489
- Lieberman, D.A., Hoffman, B. und Steinman, R.A. (1995)
Molecular control of growth arrest and apoptosis: P53-dependent and independent pathways.
Oncogene **11**, 199-210
- Lilly, L.B. und Gollan, J.L. (1995)
Ryanodine-induced calcium release from hepatic microsomes and permeabilized hepatocytes.
Am. J. Physiol. **268** (6 Pt 1), G1017-1024
- 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
- Lu, K.P. und Means, A.R. (1993)
Regulation of the cell cycle by calcium and calmodulin.
Endocr. Rev. **14**, 40-58
- Ma, X. und Babish, J.G. (1993)
Acute 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure results in enhanced tyrosylphosphorylation and expression of murine heptic cyclin dependent kinases.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **197**, 1070-1077
- Marc, N., Galisteo, M., Lagadic-Gossmann, D., Fautrel, A., Joannard, F., Guillouzo, A. und Corcos, L. (2000)
Regulation of phenobarbital induction of the cytochrome P450 2b9/10 genes in primary mouse hepatocyte culture. Involvement of calcium- and cAMP-dependent pathways.
Eur J Biochem. **267**, 963-970
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P.M., McGahon, A.J., Rader, A.J., van-Schie, R.C., LaFace, D.M., Green, D.R. (1995)
Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl.
J. Exp. Med. **182**, 1545-1556
- Matthews, J. und Zacharewski, T. (2000)
Differential binding affinities of PCBs, HO-PCBs, and aroclors with recombinant human, rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*), and green anole (*Anolis carolinensis*) estrogen receptors, using a semi-high throughput competitive binding assay.
Toxicol. Sci. **53**, 326-339
- Mayes, B.A., McConnell, E.E., Neal, B.H., Brunner, M.J., Hamilton, S.B., Sullivan, T.M., Peters, A.C., Ryan, M.J., Toft, J.D., Singer, A.W., Brown, J.F., Jr., Menton, R.G. und Moore, J.A. (1998)
Comparative carcinogenicity in Sprague-Dawley rats of the polychlorinated biphenyl mixtures. Aroclors 1016, 1242, 1254, and 1260.
Toxicol. Sci. **41**, 62-76

- Melancon, M.J. (1996)
Development of cytochromes P450 in avian species as a biomarker for environmental contaminant exposure and effect: Procedures and baseline values.
In: *Environmental Toxicology and Risk Assessment: Biomarkers and Risk Assessment*, 5th volume, ASTM STP 1306 (Hrsg.: Bengtson, D.A. und Henshel, D.S.)
American Society for Testing and Materials
- Morse, D.C., Koeter, H.B.W.M., Smits van Prooijen, A.E. und Brouwer, A. (1992)
Interference of polychlorinated biphenyls in thyroid hormone metabolism: Possible neurotoxic consequences in fetal and neonatal rats.
Chemosphere **25**, 165-168
- Müller-Decker, K., Scholz, K., Marks, F. und Fürstenberger, G. (1995)
Differential expression of prostaglandin H synthase isozymes during multistage carcinogenesis in mouse epidermis.
Mol. Carcinog. **12**, 31-41
- Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. und Dixit, V.M. (1996)
FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex.
Cell **85**, 817-827
- Nebert, D.W., Puga, A. und Vasiliou, V. (1993)
Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction.
Ann. NY Acad. Sci. **685**, 624-640
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M. und Lazebnik, Y.A. (1995)
Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis.
Nature **376**, 37-43
- Norback, D.H. und Weltman, R.H. (1985)
Polychlorinated biphenyl induction of hepatocellular carcinoma in the Sprague-Dawley rat.
Environ. Health Perspect. **60**, 97-105
- Noren, K., Lunden, A., Pettersson, E. und Bergman, A. (1996)
Methylsulfonyl metabolites of PCBs and DDE in human milk in Sweden, 1972-1992.
Environ. Health Perspect. **104**, 766-772.
- Nuñez, G. und Clarke, M.F. (1994)
The Bcl-2 family of proteins: Regulators of cell death and survival.
Trends Cell Biol. **4**, 399-403
- Oesterle, D. und Deml, E. (1981)
Promoting effects of various PCBs and DDT on enzyme-altered islands in rat liver.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. **316**, R16

- Oesterle, D. und Deml, E. (1984)
Dose-dependent promoting effect of polychlorinated biphenyls on enzyme-altered islands in livers of adult and weanling rats.
Carcinogenesis **5**, 351-355
- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y. und Kato, S. (2003)
Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor.
Nature **423**, 545-550
- Park, J.-Y.K., Shigenaga, M.K. und Ames, B.N. (1996)
Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin or indolo(3,2-*b*)carbazole is associated with oxidative DNA damage.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 2322-2327
- Parkinson, A., Safe, S.H., Robertson, L.W., Thomas, P.E., Ryan, Reik, L.M.R. und Levin, W. (1983)
Immunochemical quantitation of cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase in liver microsomes from polychlorinated or polybrominated biphenyl-treated rats: A study of structure-activity relationships.
J. Biol. Chem. **258**, 5967-5976
- Patandin, S., Koopman-Esseboom, C., de Ridder, M.A., Weisglas-Kuperus, N. und Sauer, P.J. (1998)
Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on birth size and growth in Dutch children.
Pediatr. Res. **44**, 538-545
- 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, allobarbitol, diphenylhydrantoin 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

- Pessah, I.N. und Wong, P.W. (2001)
Etiology of PCB neurotoxicity: From molecules to cellular dysfunction.
In: *PCBs: Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects* (Hrsg.: Robertson, L.W. und Hansen, L.G.)
University Press of Kentucky
- Peterson, A.R. und Peterson, H. (1982)
Differences in temporal aspects of mutagenesis and cytotoxicity in Chinese hamster cells treated with methylating agents and thymidine.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 1643-1647
- Peterson, R.E., Theobald, H.M. und Kimble, G.L. (1993)
Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: Cross-species comparisons.
CRC Crit. Rev. Toxicol. **23**, 283-335
- Peto, R., Gray, R., Brantom, P. und Grasso P. (1985)
N-nitroso compounds: occurrence, biological effects and relevance to human cancer.
In: *IARC Scientific Publication No. 57, Lyon*, 627-655
- 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**, 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**, 119-128
- Poellinger, L., Göttlicher, M. und Gustavsson, J-Å. (1992)
The dioxin and peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear receptors in search of endogenous ligands.
TiPS **13**, 241-245
- Poland, A. und Glover, E. (1977)
Chlorinated biphenyl induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity: a study of the structure-activity relationship.
Mol. Pharmacol. **13**, 924-938

- Preston, B.D., Van Miller, J.P., Moore, R.W. und Allen, J.R. (1981)
Promoting effects of polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) and polychlorinated dibenzofuran-free Aroclor 1254 on diethylnitrosamine-induced tumorigenesis in the rat.
J. Natl. Cancer Inst. **66**, 509-515
- Preston, B.D., Miller, E.C. und Miller, J.A. (1985)
The activities of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl, its 3,4-oxide metabolite, and 2,2',3,3'-tetrachlorobiphenyl in tumor induction and promotion assays.
Carcinogenesis **6**, 451-453
- Puga, A., Nebert, D.W. und Carrier, F. (1992)
Dioxin induces expression of *c-fos* and *c-jun* proto-oncogenes and a large increase in transcription factor AP-1.
DNA Cell Biol. **11**, 269-281
- Puga, A., Hoffer, A., Zhou, S., Bohm, J.M., Leikauf, G.D. und Shertzer, H.G. (1997)
Sustained increase in intracellular free calcium and activation of cyclooxygenase-2 expression in mouse hepatoma cells treated with dioxin.
Biochem. Pharmacol. **54**, 1287-1296
- Puga, A., Barnes, S.J., Dalton, T.P., Chang, C.Y., Knudsen, E.S. und Maier, M.A. (2000a)
Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest.
J. Biol. Chem. **275**, 2943-2950
- Puga, A., Barnes, S.J., Chang, C.Y., Zhu, H., Nephew, K.P., Khan, S.A. und Shertzer, H.G. (2000b)
Activation of transcription factors activator protein-1 and nuclear factor- κ B by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin.
Biochem. Pharmacol. **59**, 997-1005
- Rabes, H.M., Bücher, T., Hartmann, A., Linke, I. und Dünnwald, M. (1982)
Clonal growth of carcinogen-induced, enzyme-deficient preneoplastic cell populations in mouse liver.
Cancer Res. **42**, 3220-3227
- Ransone, L.J. und Verma, I.M. (1990)
Nuclear proto-oncogenes *fos* and *jun*.
Ann. Rev. Cell Biol. **6**, 539-557
- Riley, D.J., Lee, E.Y.-H.P. und Lee, W.-H. (1994)
The retinoblastoma protein: More than a tumor suppressor.
Ann. Rev. Cell Biol. **10**, 1-29
- Rossi, L., Ravera, M., Repetti, G. und Santi, L. (1977)
Long-term administration of DDT or phenobarbital-Na in Wistar rats.
Int. J. Cancer. **19**, 179-185
- Rowlands, J.C., Gustafsson, J.Å. (1997)
Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction.
Crit. Rev. Tox. **27**, 109-134

- Rylander, L., Stromberg, U. und Hagmar, L. (1995)
Decreased birthweight among infants born to women with a high dietary intake of fish contaminated with persistent organochlorine compounds.
Scand. J. Work Environ. Health **21**, 368-375
- Safe, S. (1992)
Toxicology, structure-function relationships, and human and environmental health impacts of polychlorinated biphenyls (PCBs): Progress and problems.
Environ. Health Perspect. **100**, 259-268
- Safe, S.H. (1994)
Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses and implications for risk assessment.
Crit. Rev. Toxicol. **24**, 87-149
- Sager, D.B. (1983)
Effect of postnatal exposure to polychlorinated biphenyls on adult male reproductive function.
Environ. Res. **31**, 76-94
- Sager, D.B. und Girard, D.M. (1994)
Long-term effects on reproductive parameters in female rats after translactational exposure to PCBs.
Environ. Res. **66**, 52-76
- Saltykov, S. (1967)
The determination of the size distribution of particles in an opaque material from a measurement of the size distribution of their sections.
In: *Proceedings of the 2nd International Congress of Stereology*, 153-173
Springer, Berlin
- Sano, H., Kawahito, Y., Wilder, R.L., Hashiramoto, A., Mukai, S., Asai, K., Kimura, S., Kato, H., Kondo, M. und Hla, T. (1995)
Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer.
Cancer Res. **55**, 3785-3789
- Satoh, K., Kitahara, A., Sato, K., Ishikawa, T., Tatematsu, M. und Ito, N. (1984)
The placental form of glutathione S-transferase as a new marker protein for neoplasia in rat chemical hepatocarcinogenesis.
Gann **75**, 199-202
- Satoh, K., Kitahara, A., Soma, Y., Inaba, Y., Hatayama, I. und Sato, K. (1985)
Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase: a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 3964-3968
- Schantz, S.L., Seo, B.W., Wong, P.W. und Pessah, I.N. (1997)
Long-term effects of developmental exposure to 2,2',3,5',6-pentachlorobiphenyl (PCB 95) on locomotor activity, spatial learning and memory and brain ryanodine binding.
Neurotoxicology **18**, 457-467

- Scherer, E. (1984)
Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis.
Biochim. Biophys. Acta **738**, 219-236
- Schmitz, I., Walckzak, H., Krammer, P.H. und Peter, M.E. (1999)
Differences between CD95 type I and II cells detected with the CD95 ligand.
Cell Death Differ. **6**, 821-822
- 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: *Handbuch der praktischen Umweltmedizin* (Hrsg.: Beyer, A. und Eis, D.)
Springer, 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
- Schulte-Hermann, R., Ohde, G., Schuppler, J. und Timmermann-Trosiener, I. (1981)
Enhanced proliferation of putative preneoplastic cells in rat liver following treatment with the tumor promoters phenobarbital, hexachlorocyclohexane, steroid compounds and nafenopin.
Cancer Res. **41**, 2556-2562
- Schulte-Hermann, R., Schuppler, J., Ohde, G. und Timmermann-Trosiener, I. (1982)
Effect of tumor promoters on proliferation of putative preneoplastic cells in rat liver.
Carcinog. Compr. Surv. **7**, 99-105
- 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**, 1651-1655
- Schulte-Hermann, R., Timmermann-Trosiener, I., Barthel, G. und Bursch, W. (1990)
DNA synthesis, apoptosis, and phenotypic expression as a determinant of growth of altered foci in rat liver during phenobarbital promotion.
Cancer Res. **50**, 5127-5135
- Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Grassl-Kraupp, B., Müllauer, L. und Ruttkay-Nedecky, B. (1995)
Apoptosis and multistage carcinogenesis in rat liver.
Mut. Res. **333**, 81-87

- Schuur, A.G., Legger, F.F., van Meeteren, M.E., Moonen, M.J., van Leeuwen-Bol, I., Bergman, A., Visser, T.J. und Brouwer, A. (1998a)
In vitro inhibition of thyroid hormone sulfation by hydroxylated metabolites of halogenated aromatic hydrocarbons.
Chem. Res. Toxicol. **11**, 1075-1081
- Schuur, A.G., van Leeuwen-Bol, I., Jong, W.M., Bergman, A., Coughtrie, M.W., Brouwer, A. und Visser, T.J. (1998b)
In vitro inhibition of thyroid hormone sulfation by polychlorobiphenyls: isozyme specificity and inhibition kinetics.
Toxicol. Sci. **45**, 188-194
- Schwartzman, R.A. und Cidlowski, J.A. (1993)
Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death.
Endocrine Rev. **14**, 133-151
- Schwarz, L. R. und Greim, H. (1996)
Environmental chemicals in hepatocarcinogenesis: The mechanism of tumor promotion.
In: *Progress in liver diseases* **8**, 581-595 (Hrsg.: Popper, H. und Schaffner, F.)
Grund & Stratton, Orlando, New York
- Seegal, R.F., Bush, B. und Shain, W. (1990)
Lightly chlorinated ortho-substituted PCB congeners decrease dopamine in nonhuman primate brain and in tissue culture.
Toxicol. Appl. Pharmacol. **106**, 136-144
- Seglen, P.O. (1976)
Preparation of isolated rat liver cells.
Meth. Cell. Biol. **13**, 29-83
- Shain, W., Bush, B. und Seegal, R. (1991)
Neurotoxicity of polychlorinated biphenyls: structure-activity relationship of individual congeners.
Toxicol. Appl. Pharmacol. **111**, 33-42
- Silberhorn, E.M., Glauert, H.P. und Robertson, L.W. (1990)
Carcinogenicity of polyhalogenated biphenyls: PCBs and PBBs.
Crit. Rev. Toxicol. **20**, 439-496
- Sorrentino, V. und Volpe, P. (1993)
Ryanodine receptors: how many, where and why?
TiPS **14**, 98-103
- Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S. und Mak, T.W. (2001)
Regulation of PTEN transcription by p53.
Mol. Cell **8**, 317-325
- 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

- Stroh, C. und Schulze-Osthoff, K. (1998)
Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates.
Cell Death Differ. **5**, 997-1000
- Subbaramaiah, K., Telang, N., Ramonetti, J.T., Araki, R., DeVito, B., Weksler, B.B. und Dannenberg, A.J. (1996)
Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells.
Cancer Res., **56**, 4424-4429
- Sueyoshi, T. und Negishi, M. (2001)
Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., **41**, 123-43
- Tanabe, S., Nakagawa, Y. und Tatsukawa, R. (1981)
Absorption efficiency and biological half-life of individual chlorobiphenyls in rats treated with Kanechlor products.
Agric. Biol. Chem. **45**, 717-726
- Taya, Y. (1997)
Rb-kinases and Rb-binding proteins: New points of view.
TiBS **22**, 14-17
- Thompson, C.B. (1995)
Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.
Science **267**, 1456-1462
- Thorpe, E. und Walker, A.I. (1973)
The toxicology of dieldrin (HEOD). II. Comparative long-term oral toxicity studies in mice with dieldrin, DDT, phenobarbitone, and -BHC.
Food. Cosmet. Toxicol. **11**, 433-442
- Tryphonas, H., Luster, M.I., Schiffman, G., Dawson, L.L., Hodgen, M., Germolec, D., Hayward, S., Bryce, F., Loo, J.C. und Mandy, F. (1991)
Effect of chronic exposure of PCB (Aroclor 1254) on specific and nonspecific immune parameters in the rhesus (*Macaca mulatta*) monkey.
Fundam. Appl. Toxicol. **16**, 773-786
- Tsien, R.W. und Tsien, R.Y. (1990)
Calcium channels, stores, and oscillations.
Ann. Rev. Cell Biol. **6**, 715-760
- Van Birgelen, A. und van den Berg, M. (2000)
Toxicokinetics.
Food Add. Contam. **17**, 267-273
- 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

- Van den Berg, M., van Birgelen, A., Birnbaum, L. et al. (2000)
Consultation on assessment of the health risk of dioxins; re-evaluation of the tolerable daily intake (TDI): Executive summary.
Food Add. Contam. **17**, 223-240
- 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
- Vogel, C., Boerboom, A.M., Baechle, C., El-Bahay, C., Kahl, R., Degen, G.H. und Abel, J. (2000)
Regulation of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 induction by dioxin in rat hepatocytes: possible c-Src-mediated pathway.
Carcinogenesis **21**, 2267-2274
- Wehler, E.K., Hovander, L. und Lund, B.O. (1996)
2,2',4,5,5'-Pentachlorodiphenyl: comparative metabolism in mink (*Mustela vison*) and mouse.
Chem. Res. Toxicol. **9**, 1340-1349
- Whitelaw, M.L., McGuire, J., Picard, D., Gustafsson, J.A. und Poellinger, L. (1995)
Heat shock protein hsp90 regulates dioxin receptor function in vivo.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 4437-4441
- Whitlock, J.P. (1999)
Induction of cytochrome P4501A1.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. **39**, 103-125
- Wittsiepe, J., Schrey, P., Ewers, U., Selenka, F. und Wilhelm, M. (2000)
Decrease of PCDD/F levels in human blood from Germany over the past ten years (1989-1998).
Chemosphere **40**, 1103-1109
- Wolf, B.B. und Green, D.R. (1999)
Suicidal tendencies: Apoptotic cell death by caspase family proteinases.
J. Biol. Chem. **274**, 20049-20052
- Wyde, M.E., Wong, V.A., Kim, A.H., Lucier, G.W. und Walker, N.J. (2001)
Induction of hepatic 8-oxo-deoxyguanosine adducts by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in Sprague-Dawley rats is female-specific and estrogen-dependent.
Chem. Res. Toxicol. **14**, 849-855
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. und Currie, A.R. (1980)
Cell death: the significance of apoptosis.
Int. Rev. Cytol. **68**, 251-306

- Wong, P.W. und Pessah, I.N. (1996)
Ortho-substituted polychlorinated biphenyls alter calcium regulation by a ryanodine receptor-mediated mechanism: structural specificity toward skeletal- and cardiac-type microsomal calcium release channels.
Mol. Pharmacol. **49**, 740-751
- Wong, P.W., Brackney, W.R. und Pessah, I.N. (1997)
Ortho-substituted polychlorinated biphenyls alter microsomal calcium transport by direct interaction with ryanodine receptors of mammalian brain.
J. Biol. Chem. **272**, 15145-15153
- Wong, P.W., Joy, R.M., Albertson, T.E., Schantz, S.L. und Pessah, I.N. (1997)
Ortho-substituted 2,2',3,5',6-pentachlorobiphenyl (PCB 95) alters rat hippocampal ryanodine receptors and neuroplasticity in vitro: evidence for altered hippocampal function.
Neurotoxicology **18**, 443-456
- Wong, P.W. und Pessah, I.N. (1997)
Noncoplanar PCB 95 alters microsomal calcium transport by an immunophilin FKBP12-dependent mechanism.
Mol. Pharmacol. **51**, 693-702
- 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 β 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
- Yakushiji, T., Watanabe, I., Kuwabara, K., Tanaka, R., Kashimoto, T., Kunita, N. und Hara, I. (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
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B. und Korsmeyer, S.J. (1995)
Bad, a heterodimeric partner for Bcl-X_L and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death.
Cell **80**, 285-291
- Yang, Y. und Yu, X. (2003)
Regulation of apoptosis: the ubiquitous way.
FASEB J. **17**, 790-799
- Yoshinari, K., Kobayashi, K., Moore, R., Kawamoto, T. und Negishi, M. (2003)
Identification of the nuclear receptor CAR:HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital.
FEBS Lett. **548**, 17-20

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

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. und Korsmeyer, S.J. (1996)

Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X_L.

Cell **87**, 619-628

Zhan, Q., Fan, S., Bae, I., Guillouf, C., Liebermann, D.A., O'Connor, P.M. und Fornace, A.J. Jr. (1994)

Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis.

Oncogene **9**, 3743-3751

8 Anhang

8.1 Toxizitätsäquivalenzfaktoren für PCDD/PCDF und ‚dioxinartige‘ PCBs

Tabelle 8.1:
Toxizitätsäquivalenzfaktoren (TEF) für PCDD und PCDF
(Van den Berg *et al.*, 1998)

Kongener	TEF
TCDD	1
1,2,3,7,8-PentaCDD	1
2,3,7,8-substituierte HexaCDD	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	0,01
OCDD	0,0001
2,3,7,8-TCDF	0,1
1,2,3,7,8-PentaCDF	0,05
2,3,4,7,8-PentaCDF	0,5
2,3,7,8-substituierte HexaCDF	0,1
2,3,7,8-substituierte HeptaCDF	0,01
OCDF	0,0001

Tabelle 8.2:
Toxizitätsäquivalenzfaktoren (TEF) für ‚dioxinartige‘ PCB
(Ahlborg *et al.*, 1994)

Typ	IUPAC Nr.	Kongenerstruktur	TEF
Non-ortho	77	3,3',4,4' - TetraCB	0,0005
	126	3,3',4,4',5 - PentaCB	0,1
	169	3,3',4,4',5,5' - HexaCB	0,01
Mono-ortho	105	2,3,3',4,4' - PentaCB	0,0001
	114	2,3,4,4',5 - PentaCB	0,0005
	118	2,3',4,4',5 - PentaCB	0,0001
	123	2',3,4,4',5 - PentaCB	0,0001
	156	2,3,3',4,4',5 - HexaCB	0,0005
	157	2,3,3',4,4',5' - HexaCB	0,0005
	167	2,3',4,4',5,5' - HexaCB	0,00001
Di-ortho	189	2,3,3',4,4',5,5' - HeptaCB	0,0001
	170	2,2',3,3',4,4',5 - HeptaCB	0,0001
	180	2,2',3,4,4',5,5' - HeptaCB	0,00001

8.2 IUPAC-Nomenklatur der PCBs

Tabelle 8.3:
IUPAC-Nummern und Position der Chloratome aller PCB Kongenere
 (Ballschmiter und Zell, 1980)

Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur
1	2	56	2,3,3',4'	111	2,3,3',5,5'	166	2,3,4,4',5,6
2	3	57	2,3,3',5	112	2,3,3',5,6	167	2,3',4,4',5,5'
3	4	58	2,3,3',5'	113	2,3,3',5',6	168	2,3',4,4',5',6
4	2,2'	59	2,3,3',6	114	2,3,4,4',5	169	3,3',4,4',5,5'
5	2,3	60	2,3,4,4'	115	2,3,4,4',6	170	2,2',3,3',4,4',5
6	2,3'	61	2,3,4,5	116	2,3,4,5,6	171	2,2',3,3',4,4',6
7	2,4	62	2,3,4,6	117	2,3,4',5,6	172	2,2',3,3',4,5,5'
8	2,4'	63	2,3,4',5	118	2,3',4,4',5	173	2,2',3,3',4,5,6
9	2,5	64	2,3,4',6	119	2,3',4,4',6	174	2,2',3,3',4,5,6'
10	2,6	65	2,3,5,6	120	2,3',4,5,5'	175	2,2',3,3',4,5',6
11	3,3'	66	2,3',4,4'	121	2,3',4,5',6	176	2,2',3,3',4,6,6'
12	3,4	67	2,3',4,5	122	2',3,3',4,5	177	2,2',3,3',4',5,6
13	3,4'	68	2,3',4,5'	123	2',3,4,4',5	178	2,2',3,3',5,5',6
14	3,5	69	2,3',4,6	124	2',3,4,5,5'	179	2,2',3,3',5,6,6'
15	4,4'	70	2,3',4',5	125	2',3,4,5,6'	180	2,2',3,4,4',5,5'
16	2,2',3	71	2,3',4',6	126	3,3',4,4',5	181	2,2',3,4,4',5,6
17	2,2',4	72	2,3',5,5'	127	3,3',4,5,5'	182	2,2',3,4,4',5,6'
18	2,2',5	73	2,3',5',6	128	2,2',3,3',4,4'	183	2,2',3,4,4',5',6
19	2,2',6	74	2,4,4',5	129	2,2',3,3',4,5	184	2,2',3,4,4',6,6'
20	2,3,3'	75	2,4,4',6	130	2,2',3,3',4,5'	185	2,2',3,4,5,5',6
21	2,3,4	76	2',3,4,5	131	2,2',3,3',4,6	186	2,2',3,4,5,6,6'
22	2,3,4'	77	3,3',4,4'	132	2,2',3,3',4,6'	187	2,2',3,4',5,5',6
23	2,3,5	78	3,3',4,5	133	2,2',3,3',5,5'	188	2,2',3,4',5,6,6'
24	2,3,6	79	3,3',4,5'	134	2,2',3,3',5,6	189	2,3,3',4,4',5,5'
25	2,3',4	80	3,3',5,5'	135	2,2',3,3',5,6'	190	2,3,3',4,4',5,6
26	2,3',5	81	3,4,4',5	136	2,2',3,3',6,6'	191	2,3,3',4,4',5',6
27	2,3',6	82	2,2',3,3',4	137	2,2',3,4,4',5	192	2,3,3',4,5,5',6
28	2,4,4'	83	2,2',3,3',5	138	2,2',3,4,4',5'	193	2,3,3',4',5,5',6
29	2,4,5	84	2,2',3,3',6	139	2,2',3,4,4',6	194	2,2',3,3',4,4',5,5'
30	2,4,6	85	2,2',3,4,4'	140	2,2',3,4,4',6'	195	2,2',3,3',4,4',5,6
31	2,4',5	86	2,2',3,4,5	141	2,2',3,4,5,5'	196	2,2',3,3',4,4',5,6'
32	2,4',6	87	2,2',3,4,5'	142	2,2',3,4,5,6	197	2,2',3,3',4,4',6,6'
33	2',3,4	88	2,2',3,4,6	143	2,2',3,4,5,6'	198	2,2',3,3',4,5,5',6
34	2',3,5	89	2,2',3,4,6'	144	2,2',3,4,5',6	199	2,2',3,3',4,5,6,6'
35	3,3',4	90	2,2',3,4',5	145	2,2',3,4,6,6'	200	2,2',3,3',4,5',6,6'
36	3,3',5	91	2,2',3,4',6	146	2,2',3,4',5,5'	201	2,2',3,3',4',5,5',6
37	3,4,4'	92	2,2',3,5,5'	147	2,2',3,4',5,6	202	2,2',3,3',5,5',6,6'
38	3,4,5	93	2,2',3,5,6	148	2,2',3,4',5,6'	203	2,2',3,4,4',5,5',6
39	3,4',5	94	2,2',3,5,6'	149	2,2',3,4',5',6	204	2,2',3,4,4',5,6,6'
40	2,2',3,3'	95	2,2',3,5',6	150	2,2',3,4',6,6'	205	2,3,3',4,4',5,5',6
41	2,2',3,4	96	2,2',3,6,6'	151	2,2',3,5,5',6	206	2,2',3,3',4,4',5,5',6
42	2,2',3,4'	97	2,2',3',4,5	152	2,2',3,5,6,6'	207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'
43	2,2',3,5	98	2,2',3',4,6	153	2,2',4,4',5,5'	208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'
44	2,2',3,5'	99	2,2',4,4',5	154	2,2',4,4',5,6'	209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'
45	2,2',3,6	100	2,2',4,4',6	155	2,2',4,4',6,6'		
46	2,2',3,6'	101	2,2',4,5,5'	156	2,3,3',4,4',5		
47	2,2',4,4'	102	2,2',4,5,6'	157	2,3,3',4,4',5'		
48	2,2',4,5	103	2,2',4,5',6	158	2,3,3',4,4',6		
49	2,2',4,5'	104	2,2',4,6,6'	159	2,3,3',4,5,5'		
50	2,2',4,6	105	2,3,3',4,4'	160	2,3,3',4,5,6		
51	2,2',4,6'	106	2,3,3',4,5	161	2,3,3',4,5',6		
52	2,2',5,5'	107	2,3,3',4',5	162	2,3,3',4,5,5'		
53	2,2',5,6'	108	2,3,3',4,5'	163	2,3,3',4',5,6		
54	2,2',6,6'	109	2,3,3',4,6	164	2,3,3',4',5',6		
55	2,3,3',4	110	2,3,3',4',6	165	2,3,3',5,5',6		

8.3 Strukturformeln der verwendeten PCBs

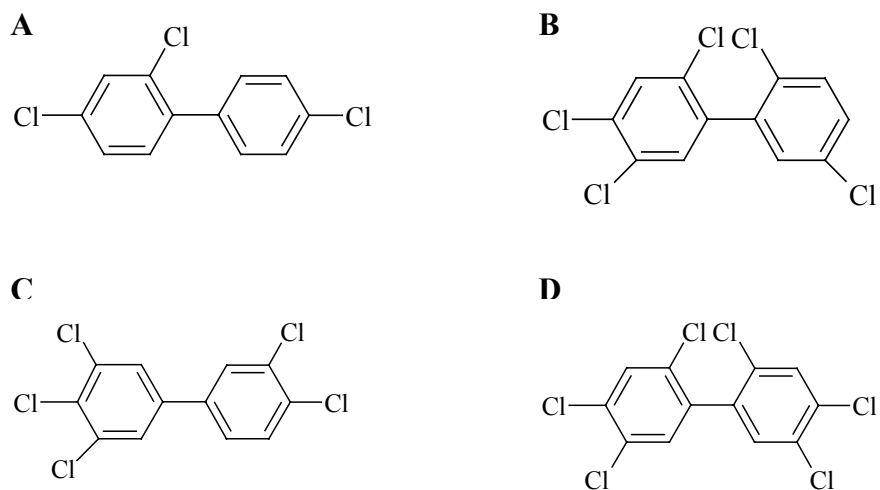


Abb. 8.1: Strukturformeln der verwendeten PCBs. PCB 28 (A), PCB 101 (B), PCB 126 (C) und PCB 153 (D).

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und des interessanten Themas, seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und Motivation.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Trommer möchte ich für die Übernahme des Koreferates danken, sowie für die Möglichkeit einige Messungen am ESR durchzuführen.

Herrn Prof. Dr.-Ing. Stefan Ernst danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Dr. Hans-Joachim Schmitz sei für die gute Teamarbeit bei der Durchführung des Tierversuchs und für die Durchsicht der Arbeit gedankt.

Meinen Kolleginnen und Kollegen danke ich für eine sehr schöne Zeit im Labor, in der Mensa, mit Sekt (o. ä.) im Kaffeezimmer, beim Würstchen grillen, bei IKEA, auf Fachtoxkursen und sonstigen lustigen Dingen. Allen fleißigen Helfern der etwas größeren Schlachtaktion sei hier noch einmal besonders gedankt, denn ohne Euch hätten wir das niemals in so kurzer Zeit geschafft.

Der ‚guten Seele‘ des Labors, Frau Monika Groß, danke ich recht herzlich für Ihre stetige Hilfsbereitschaft im Labor und ganz besonders für Ihre Unterstützung bei der Durchführung des Tierversuchs. Es war harte Arbeit, aber ich glaube wir hatten trotzdem auch viel Spaß!

Frau Christine Pohl danke ich für eine sehr erheiternde Zeit in Labor und Büro und vor allem für Ihre Unterstützung bei allen Rechnerproblemen, denn ich bin ja der Super-DAU. Danke auch für die schnelle Korrekturlesung. Die Anrufe Ihrer Großmutter bleiben mir unvergesslich.

Auch bei Frau Stefanie Knerr möchte ich mich für die sehr schnelle Korrektur der Arbeit in den Tagen der langweiligen Einzelhaft bedanken.

Ein großes Dankeschön an Frau Melanie Schmidt, die den PC vor einem Rauswurf aus dem Fenster bewahrt hat. Ihre Tipps waren für mich sehr wertvoll!

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Trommer danke ich für die Bereitstellung der Spinsonden und die Durchführung der Messungen am ESR.

Herrn Prof. Dr. Joachim Deitmer, Fachbereich Biologie, danke ich für die Bereitstellung der Geräte zur Calcium-Messung und seine ständige Diskussionsbereitschaft. Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe sei für Ihre gute Unterstützung bei technischen Problemen gedankt.

Mein Dank gilt auch Herrn HD Dr. Andreas von Knethen, Fachbereich Biologie Arbeitsgruppe Prof. Brüne, für die bereichernde Diskussion über Apoptose und den zur Verfügung gestellten Cytochrom c-Antikörper. Die Versuche sind leider unvollendet!

Ganz besonders danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Michael Schwarz, Universität Tübingen, und seinem Team, das im Rahmen des Tierversuchs die Herstellung der histologischen Schnitte und die aufwendige Quantifizierung der Präneoplasien übernommen hat. Und ich habe auch zweimal die Stadt Tübingen kennengelernt!

Ich danke der ERGO Forschungsgesellschaft mbH und ihren Mitarbeitern in Hamburg für die Möglichkeit durch eigenes ‚mit anpacken‘ die Analyse der PCB-Gehalte etwas kostengünstiger zu gestalten. Die für mich völlig neuen analytischen Methoden haben mich sehr bereichert. Die Stadt Hamburg habe ich etwas besser kennengelernt!

An dieser Stelle soll auch die schöne Zeit mit den Diplomanden und Forschungspraktikanten nicht vergessen werden. Die Betreuung Eurer Arbeit machte sehr viel Spaß, mich und meine Arbeit hat es sehr bereichert. Ich habe Euch immer sehr gefordert, aber ich denke Ihr habt bei mir auch viel gelernt!

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, ohne die gar nichts ginge, sowie Stefan und dem ganzen Zoo für die schönsten Stunden des Tages ‚after work‘.

Teile aus dieser Arbeit wurden publiziert:

Kunz, S., Schmitz, H.-J. und Schrenk, D. (2004)

Modulation of caspase-3-activation by liver tumor promoters in primary rat hepatocytes.
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology **369** Suppl. 1, R 130

Kunz, S., Schmitz, H.-J. und Schrenk, D. (2004)

Effects of liver tumor promoters on apoptosis in rat hepatocytes in primary culture.
Proceedings 95th Ann. Meeting of AACR **45**, Orlando, FL, USA

Schrenk, D., Kunz, S. und Schmitz, H.-J. (2004)

Modulation of caspase-3-activation by liver tumor promoters in primary rat hepatocytes.
Toxicol. Appl. Pharmacol. **197** (3), 374

Kunz, S., Schmitz, H.-J., Buchmann, A., Schwarz, M., Schilling, B., Pöpke, O., Robertson, L., Lehmler, H.-J. und Schrenk, D. (2004)

Analysis of the tumor-promoting potency of 2,4,4'-trichlorobiphenyl and 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl in rat liver.
Organohalogen compounds **66**, 3603-3609

Lebenslauf und Bildungsgang

Name: Susanne Kunz
Anschrift: Kurt-Schumacher-Str. 34/102
67663 Kaiserslautern
geboren: 24. Mai 1970 in Birkenfeld/Nahe

Schulbildung

09.1976-06.1980 Grundschole Niederbrombach
08.1980-05.1989 Göttenbach-Gymnasium Idar-Oberstein
17.05.1989 Abiturprüfung

Praktikum

09.1989-06.1990 Verbandsgemeindewerke Birkenfeld
Betriebszweig Abwasserentsorgung

Ausbildung

10.1990-03.1993 Naturwissenschaftliches Technikum Landau/Pfalz
Ausbildung zur Biologisch-Technischen Assistentin
04.03.1993 Abschlußprüfung

Berufstätigkeit

06.1993-10.1996 Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung
Oberschleissheim, Institut für Toxikologie
Arbeitsgruppe Dr. L. Schwarz

Studium

ab WS 1996/97 Studium der Biologie an der Universität Kaiserslautern
17.09.1998 Diplom-Vorprüfung in Biologie
29.03.2001 Diplom-Hauptprüfung in Biologie

Diplomarbeit von Juni 2000 bis März 2001 am Fachbereich Chemie
der Universität Kaiserslautern, Abteilung für Lebensmittelchemie und
Umwelttoxikologie

Promotion

seit 04.2001 Anfertigung einer experimentellen Dissertation am Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern, Abteilung für Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie unter der Anleitung von Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Zusatzqualifikation

seit 09.2002 Weiterbildungskurse zum Fachtoxikologen (DGPT):

Klinische Toxikologie
Chemische Kanzerogenese und Mutagenese
Molekulare Zelltoxikologie
Fremdstoffmetabolismus und Toxikokinetik
Lebensmitteltoxikologie
Organtoxikologie und -pathologie Teil I / II
Epidemiologie
