## Molekulare Mechanismen phenolischer und tumorpromovierender Substanzen aus dem Tabakrauch

- Untersuchungen zum Einfluss von Tabakrauchkomponenten auf den programmierten Zelltod -

# Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaft des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg

#### Dezember 2005

vorgelegt von

**Katrin Thomas** 

Die vorliegende Arbeit mit dem Titel "Molekulare Mechanismen phenolischer und tumorpromovierender Substanzen aus dem Tabakrauch - Untersuchungen zum Einfluss von Tabakrauchkomponenten auf den programmierten Zelltod -" wurde in der Zeit von Februar 2003 bis Dezember 2005 am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologe des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Betreuung von JProf. Dr. Dorothee Dartsch (Institut für Pharmazie, Fachgebiet Klinische Pharmazie, Universität Hamburg) angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Chris Meier

- 1. Gutachter: JProf. Dr. Dorothee Dartsch
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Heisig

Tag der mündlichen Prüfung: 23.02.2006

# Inhaltsverzeichnis

Inha	altsverze	ichnis	. V	
Abk	ürzungs	verzeichnis	IX	
1	Einleitu	ng	. 1	
1.1	Das Tabakrauchen als Ursache von Lungenkrebs			
1.2	Die ch	emischen Eigenschaften von Tabakrauch	. 2	
1.3	Tumo	rpromotion und Tumorpromotoren im Tabakrauch	. 4	
1.4	Pheno	blische Substanzen im Tabakrauch	. 6	
15	Forme	en des zellulären Untergangs		
1.0	Molok	ularo Abläufo dos programmiorton Zolltods	. <i>'</i> 10	
1.0			10	
	1.0.1	Proteine der Bcl-2-Familie	12 13	
	1.6.3	Die Rolle der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Rahmen des programmierten	10	
		Zelltods	15	
1.7	Tumo	rpromotoren und Apoptose	17	
2	Material	und Methoden	21	
2.1	Chem	ikalien	21	
22	Geräte		- · 25	
2.2	Metho	den	25	
2.0	2 2 1	Zallkultur	25	
	2.3.1	Mikroskonische Untersuchungen	20	
	2.3.3	Untersuchungen auf tumorpromovierende Eigenschaften mittels Transformationstes	st.	
			26	
	2.3.4	Bestimmung der Toxizität (colony formation assay)	27	
	2.3.5	Bestimmung der Proliferation und DNA-Neusynthese mittels Proliferations-Assay/5-		
		Bromo-2´-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III	27	
	2.3.6	Bestimmung der Phosphatidylserin (PS)-Externalisierung an der Zellmembran mit		
		Hilfe des Annexin-V Fluos Kit	28	
	2.3.7	Untersuchung der DNA-Fragmentierung	29	
	2.3.8	Proteinbestimmung nach Bradford	31	
	2.3.9	Western-Blot Untersuchungen der Proteine Bax, Bcl-2 und ICAD	31	
	2.3.10	Methode zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität	33	
	2.3.11	Methode zur Bestimmung von Veränderungen im Mitochondrienpotential mittels		
		MitoCapture™ Apoptosis Detection Kit	34	
	2.3.12	Detektion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mit dem Farbstoff CM-H <sub>2</sub> DCFDA	35	
	2.3.13	Statistik	35	
	2.3.14	Kondensat	36	

3	Ergebnisse der Untersuchungen mit C3H-M2-Mausfibroblasten37				
3.1	Transformationstest				
3.2	Morph	ologische Veränderungen in M2-Fibroblasten nach Behandlung mit den			
	Testsu	ubstanzen o-Cresol und Phenol			
3.3	Einfluss der Testsubstanzen auf die Proliferation der C3H-M2-Fibroblasten.				
3.4	Unters	suchungen zur DNA-fragmentierenden Wirkung von o-Cresol. Phenol			
	und Ti	PA in M2-Fibroblasten 41			
4	Fraebni	Frachnicco dor Untorsuchungen mit PEAC 3D Zellen			
- Д 1	Versu	chsreihen mit o-Cresol 47			
7.1	4.1.1	Ermittlung der effektiven Konzentrationen der Testsubstanz o-Cresol in BEAS-2B- Zellen			
	4.1.2	Analyse der Proliferation mit Hilfe des BrdU-Assay nach Behandlung der BEAS-2B-			
	413	Apontose vs. Nekrose 49			
	4.1.3.1	Untersuchungen zur DNA-fragmentierenden Wirkung unterschiedlicher Substanzen in den BEAS-2B-Zellen			
	4.1.3.2	Untersuchungen mit o-Cresol auf seine DNA-abbauende Wirkung in BEAS-2B- Zellen			
	4.1.3.3	Phosphatidylserin-Externalisierung in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit o-			
	4.1.3.4	Morphologische Veränderungen in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit o-Cresol			
	4.1.4	Weitere Betrachtungen der durch o-Cresol hervorgerufenen apoptotischen Vorgängen in BEAS-2B-Zellen			
	4.1.4.1	Untersuchung zur Wirkung von o-Cresol auf den Gehalt charakteristischer pro- und			
		anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie in der Zelle			
	4.1.4.2	Untersuchungen zu Veränderungen des Membranpotentials ( $\Delta \Psi_{ m m}$ ) der			
		Mitochondrien in BEAS-2B-Zellen unter Einfluss von o-Cresol			
	4.1.4.3	Untersuchungen der Caspase-3-Aktivität in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit o-Cresol			
	4.1.4.4	Untersuchungen zu der Wirkung von o-Cresol auf den Proteingehalt des Inhibitors der Endonuklease CAD (ICAD)64			
	4.1.4.5	Untersuchungen zur Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in BEAS-2B- Zellen nach Behandlung mit o-Cresol			
4.2	Versu	chsreihen mit Phenol			
	4.2.1	Ermittlung der Zytotoxizität und der effektiven Konzentrationen der Testsubstanz			
		Phenol in BEAS-2B-Zellen			
	4.2.2	Untersuchung der Proliferation mittels BrdU-Assay von BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit Phenol			

	4.2.3	Apoptose vs. Nekrose
	4.2.3.1	Morphologische Veränderungen in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit Phenol 69
	4.2.3.2	Untersuchungen zur DNA-abbauenden Wirkung von Phenol in BEAS-2B-Zellen. 71
	4.2.3.3	Phosphatidylserin-Externalisierung in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit Phenol
	4.2.4	Weitere Betrachtung der durch Phenol hervorgerufenen apoptotischen Vorgänge in
	4.2.4.1	Ditersuchung zur Wirkung von Phenol auf den intrazellulären Gehalt
		charakteristischer pro- und anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie
	4.2.4.2	Veränderungen im Membranpotential ( $\Delta\Psi_{m}$ ) der Mitochondrien in BEAS-2B-Zellen
		nach Behandlung mit Phenol77
	4.2.4.3	Untersuchungen der Caspase-3-Aktivität in BEAS-2B-Zellen behandelt mit Phenol.
	4.2.4.4	Untersuchung zur Wirkung von Phenol auf den Proteingehalt von ICAD
	4.2.4.5	Untersuchungen zur Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in BEAS-2B-
		Zellen nach Behandlung mit Phenol
4.3	Versu	chsreihen mit Kondensat
	4.3.1	Ermittlung zur Zytotoxizität von Tabakrauchkondensat in BEAS-2B-Zellen mittels
		colony formation assay
	4.3.2	Morphologische Veränderungen in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit Kondensat.
	4.3.3	Untersuchungen zur DNA-abbauenden Wirkung von Kondensat in BEAS-2B-Zellen 85
	4.3.4	Phosphatidylserin-Externalisierung in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit
		Tabakrauchkondensat
	4.3.5	Untersuchungen der Caspase-3-Aktivität in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit Kondensat
4.4	Versu	chsreihen mit Tetradecanovlphorbolacetat (TPA)
	4.4.1	Untersuchung der Proliferation in BEAS-2B-Zellen mittels BrdU-Assay nach
		Behandlung mit TPA
	4.4.2	Untersuchungen zur DNA-abbauenden Wirkung von TPA in BEAS-2B-Zellen
	4.4.3	Untersuchungen der Caspase-3-Aktivität in mit TPA behandelten BEAS-2B-Zellen . 90
5	Diskuss	sion92
5.1	Betrad	chtung der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit C3H-M2-Zellen 94
	5.1.1	Nachweis einer Transformation von M2-Fibroblasten durch o-Cresol und Phenol 94
	5.1.2	Wirkungen der Tumorpromotoren auf Merkmale des programmierten Zelltods
	5.1.2.1	Untersuchungen zur Proliferation
	5.1.2.2	Analyse der Merkmale des programmierten Zelltods unter Einfluss der
<b>Б</b> О	Potro	resisubsianzen
<i>э</i> .2	Della	Shung der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit BEAS-ZB-Zellen. 96

8	Anhang		XXIII
7	Literatu	rverzeichnis	XII
6	Zusamn	nenfassung	.108
	5.2.5	Die Ergebnisse aus den Versuchsreihen mit Kondensat	105
		Tetradecanoylphorbolacetat	105
	5.2.4	Gegenüberstellung der bisherigen Ergebnisse zu den Versuchsreihen mit	
		Phenol	104
	5.2.3	Klinische Bedeutung der Ergebnisse aus den Versuchsreihen mit o-Cresol und	
	5.2.2	Die Ergebnisse aus den Versuchsreihen mit Phenol	100
	5.2.1	Die Ergebnisse aus den Versuchsreihen mit o-Cresol	96

# Abkürzungsverzeichnis

Ac-DEVD-AMC	N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcumarin
AIF	apoptosis inducing factor
AK	Antikörper
AMC	7-Amino-4-methylcumarin
ANT	Adenin-Nukleotid-Transporter
Apaf	apoptotic protease activating factor-1
As	Natriumarsenit
ATP	Adenosintriphosphat
B[a]P	Benz[a]pyren
BEBM	Bronchial Epithelial Cell Basal Medium
BH	Bcl-2 homology region
BPE	bovine pituitary extract
BrdU	5-Bromo-2´-deoxy-uridin
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAD	caspase-activated DNAse
CM-H <sub>2</sub> DCFDA	5-(und-6-)-Chlormethyl-2´,7´-dichlorodihydrofluorescin-diacetat- acetylester
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CSC	cigarette smoke condensate, Tabakrauchkondensat
DCF	2',7'-Dichlorofluorescin
DFF40	DNA-fragmentierender Faktor (40kD)
DFF45	DNA-fragmentierender Faktor (45kD)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiotreitol
ECACC	European Collection of Cell Cultures
ECL <sup>®</sup>	enhanced chemiluminescence

EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ETS	environmental tobacco smoke
FACS	fluorescence activated cell sorting
FADD	FasR-assoziiertes Protein mit Todesdomäne
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinthiocyanat
hEGF	epidermal growth factor, human, rekombinant
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N´-2-ethan-sulfonsäure
IAP	inhibitor of apoptosis proteins
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC <sub>50</sub>	50 % Hemmkonzentration, inhibitory concentration
ICAD	inhibitor of caspase-activated DNAse
ICE	Interleukin-1β-konvertierendes Enzym
I. E.	Internationale Einheit
IgG	Immunglobulin G
k. A.	keine Angaben
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MCA	Methylcholanthren
MMP	Mitochondrienmembranpotential
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
MOMP	Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran
NNK	4-(Methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
NNN	N'-Nitrosonornicotin
NP-40	Nonylphenoxypolyethoxyethanol
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCD	programmed cell death
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNPP	p-Nitrophenyl phosphat Dinatrium
PS	Phosphatidylserin

PTP	permeability transition pore
PVDF	Polyvinyldendifluorid
RIPA	Radio-Immunoprecipitation-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
RPA	12-o-Retinoylphorbol-13-acetat
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMAC	second mitochondria-derived activator of caspase
s. u.	siehe unten
Т	Teile
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TNF	Tumornekrosefaktor
ТРА	o-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
u. a.	unter anderem
VDAC	voltage-dependent anion channel
VS.	versus
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

Eine der Hauptursachen für die Entstehung von Lungenkrebs ist das Rauchen von Tabak. Trotz intensiver Forschung in diesem Bereich war es bisher nicht möglich, die für die Entstehung von Tumoren verantwortlichen Substanzen aus dem Tabakrauch zu identifizieren und die zu Grunde liegenden pathobiochemischen Mechanismen im Einzelnen zu klären. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit phenolischen und tumorpromovierenden Substanzen aus dem Tabakrauch und deren Einfluss auf molekulare Mechanismen des programmierten Zelltods, der unter anderem bei der Krebsentstehung eine Rolle spielen kann.

## 1.1 Das Tabakrauchen als Ursache von Lungenkrebs

Derzeit gibt es weltweit ca. 1,2 Milliarden Raucher, jährlich sterben ca. 4 Millionen Raucher aufgrund von Krankheiten, die auf den Gebrauch von Tabak zurückzuführen sind. Während in den Industriestaaten die Zahl der Raucher rückläufig ist, nimmt sie in vielen Entwicklungsländern weiter zu (Edwards 2004). Die Häufigkeit des Tabakgebrauchs in verschiedenen Gruppen der Gesellschaft in früheren Zeiten spiegelt sich noch heute in der Verteilung der durch Tabakrauch verursachten Erkrankungen und Sterberaten wieder. So erkranken z. B. derzeit mehr Männer an Lungenkrebs als Frauen (Alberg et al. 2005). In den Industriestaaten wird für die nächsten Jahrzehnte allerdings eine Angleichung der tabakrauchbedingten Erkrankungen bei Männern und Frauen prognostiziert, da die Zahl der Raucherinnen vor allem aus sozialen Schichten mit geringem Einkommen in den letzten Jahren zugenommen hat (WHO 2003).

Die durch Tabakrauch hauptsächlich verursachten Krankheiten sind chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (chronic obstructive pulmonary disease, COPD), Krebs (z. B. Lunge, Atemwegsorgane, Speiseröhre, Urogenitaltrakt) und Herzkreislauferkrankungen (z. B. Myokardinfarkt) (Dautzenberg 2004, IARC 2002, Whitrow et al. 2003). In den 1950er Jahren wurden erstmals Forschungsergebnisse veröffentlicht, die einen Zusammenhang zwischen dem Tabakrauchen und der Erkrankung an Lungenkrebs präsentierten (Doll und Hill 1950, Thun 2005). Rauchen gilt heute als Hauptursache von Lungenkrebs, weitere Ursachen können Umweltfaktoren wie Passivrauchen, Umweltverschmutzung oder ein früherer Kontakt mit Kanzerogenen wie Asbest, Arsen oder Chrom z. B. am Arbeitsplatz sein (Alberg et al. 2005, Das 2003).

In Deutschland ist Lungenkrebs bei beiden Geschlechtern die dritthäufigste Krebserkrankung mit jährlich etwa 31.800 Neuerkrankungen bei Männern und 10.400 bei Frauen, zudem sind fast 30 % der Krebstodesfälle auf Lungenkrebs zurückzuführen. Damit liegt Deutschland im europäischen Vergleich bei der Häufigkeit von Lungenkrebs in einem mittleren Bereich. In den USA sind Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache, für die neben dem Tabakrauchen auch andere so genannte Lifestyle-Faktoren wie falsche Ernährung und Bewegungsmangel verantwortlich gemacht werden (Barnard 2004).

Die zu Grunde liegenden Mechanismen der Tumorentstehung und anderer durch Tabakrauch hervorgerufener Erkrankungen wurden in den letzten Jahren detailliert untersucht. Es konnte bis heute jedoch nicht festgestellt werden, welche der kanzerogenen Inhaltsstoffe des Tabakrauchs den größten Einfluss auf das Krebsrisiko beim Menschen haben (Richter und Scherer 2004). Bisher war es möglich, durch Untersuchungen in Tiermodellen oder Zellsystemen aufgrund unterschiedlich gewählter Versuchsbedingungen zu einer Reihe wichtiger Erkenntnisse zu gelangen. So wurde z. B. deutlich, dass die einzelnen Kanzerogene im Tabakrauch in zu geringer Konzentration vorliegen, um allein Krebs auszulösen. Vielmehr scheint eine Kombination aus anwesenden Kanzerogenen, Co-Kanzerogenen und Tumorpromotoren zu neoplastischen Veränderungen zu führen (Rubin 2001). Jedoch sind die Ergebnisse von Untersuchungen mit Tiermodellen nicht uneingeschränkt auf menschlichen Gegebenheiten übertragbar, da z. B. Nager sehr viel empfindlicher auf Kanzerogene reagieren als andere Tiermodelle oder Menschen. Trotzdem sind die Daten aus derartigen Versuchsreihen für das Verständnis des kanzerogenen Potentials von Tabakrauch beim Menschen unverzichtbar (IARC 2002). Einige der dort beschriebenen Mechanismen beinhalten Mutagenität, Genotoxizität und DNA-Schädigungen durch Tabakrauchkondensat in kultivierten menschlichen Zellen und in Tiermodellen (DeMarini 2004, Husgafvel-Pursiainen 2004).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit molekularen Mechanismen von phenolischen Substanzen und von Tumorpromotoren aus dem Tabakrauch. Die durchgeführten Untersuchungen sollten klären, ob die eingesetzten Testsubstanzen einen Einfluss auf den programmierten Zelltod haben und inwiefern sie mit diesem zellulären Programm interagieren.

## 1.2 Die chemischen Eigenschaften von Tabakrauch

Für die Gewinnung von Tabak sind zwei *Nicotiana*-Arten (Solanaceae) von Bedeutung: *Nicotiana rustica* und *Nicotiana tabacum*. Beide Arten kommen ausschließlich als Kulturpflanzen vor, von ihnen existieren mehrere Varietäten und Bastarde. Der geerntete Tabak wird während der Verarbeitung mit unterschiedlichen Zusätzen behandelt, die eine bestimmte Funktion im fertigen Tabakprodukt haben sollen. Bei der Aufbereitung der Tabakblätter entwickeln sich dann nach monatelangem Trocknen und Fermentieren die typischen Aromastoffe des Tabaks. Unterschieden wird beim Tabak zwischen Tabakinhaltsstoffen, also Substanzen, die natürlicherweise im Tabak vorhanden sind, und Tabakzusätzen. Die Tabakzusätze lassen sich in Aromastoffe und Zusatzstoffe unterteilen und geben dem Tabakprodukt einen charakteristischen Geschmack oder haben eine bestimmte Funktion wie z. B. das Speichern von Feuchtigkeit oder den Schutz des Produkts vor mikrobiologischem Verfall.

Tabak besteht aus mindestens 3.800 unterschiedlichen chemischen Komponenten. Bei bis zu 950°C entsteht in Gegenwart unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen bei der Verbrennung von Tabak Rauch, in dem bis 1996 4.800 verschiedene chemische Substanzen identifiziert wurden, unter ihnen eine Vielzahl toxischer, hoch reaktiver Substanzen (Baker et al. 2004b).

Tabakrauch ist ein Aerosol, das sich aus einer Gasphase und einer Partikelphase zusammensetzt. Die Gasphase ist diejenige Phase, die einen Cambridge-Glasfaserfilter passieren kann. Die Partikelphase oder das Kondensat ist der Rückstand im Filter. Sie hat eine Partikelgröße von 0,1 bis < 1,0  $\mu$ m.

Beim Tabakrauch wird unterschieden zwischen dem während des Rauchens eingezogenen Hauptstromrauch und dem in den Zugpausen entstehenden Nebenstromrauch. Als Tabakrauch in der Raumluft (environmental tobacco smoke, ETS) wird das Gemisch aus ausgeatmetem Hauptstromrauchanteil und dem verdünnten Nebenstromrauch in der Umgebung bezeichnet (Richter und Scherer 2004).

Die Gasphase des Tabakrauchs setzt sich hauptsächlich aus Stickstoff (56-64 %), Sauerstoff (11-14 %), Kohlendioxid (9-13 %) und Kohlenmonoxid (2,8-4,2 %) zusammen. Eine bedeutende toxikologische Rolle spielen hier unter anderem Substanzen wie Kohlenmonoxid, Stickstoffoxide, Blausäure, Formaldehyd, Benzol und flüchtige Amine.

Die Partikelphase, das Kondensat des Tabakrauchs, enthält als Hauptkomponenten *Nicotiana*-Alkaloide mit Nicotin als wichtigste Substanz dieser Klasse, auf das die psychoaktiven und suchtmachenden Eigenschaften des Rauchens zurückgeführt werden.

Die Partikeldurchschnittsgröße im Hauptsstromrauch einer Zigarette beträgt 0,4 µm. Aufgrund ihrer geringen Größe werden die Partikel nicht durch Impaktion oder Sedimentation in den oberen Teilen der Atemwege zurückgehalten werden und sind daher lungengängig.

Zu den toxischen pathogenen Verbindungen im Tabakrauchkondensat zählen die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK). Sie galten lange Zeit als Hauptverantwortliche für die kanzerogene Wirkung von Tabakrauch. Diese Meinung wurde revidiert, als sich herausstellte, dass der Gehalt der PAK im Tabakrauch für eine Tumorinitiation allein nicht ausreicht (Rubin 2002). Die am besten untersuchte Substanz dieser Klasse ist das Benz[a]pyren (B[a]P). Ebenfalls von Bedeutung im Kondensat sind Phenole und kanzerogene *N*-Nitrosamine, wie *N*'-Nitrosonornicotin (NNN) und 4-(Methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK).

Neben aliphatischen Kohlenwasserstoffen und aromatischen Aminen (4-Aminobiphenyl, 2-Naphthylamin) enthält das Kondensat auch Alkohole, anorganische Substanzen und Metalle (Hoffmann et al. 2001). Unter den bisher identifizierten Komponenten im Tabakrauch befinden sich insgesamt 69 anerkannte kanzerogene Verbindungen, verschiedene Tumorpromotoren und Co-Kanzerogene (Hoffmann et al. 2001). In Tabelle 1 sind einige dieser Kanzerogene aufgelistet. Eine Exposition gesunder Zellen mit Kanzerogenen kann zur malignen Transformation der Zellen führen. Nach einer oftmals viele Jahre dauernden Latenzzeit kann sich dann in Anwesenheit von Tumorpromotoren in einem mehrstufigen Prozess ein Tumor im Gewebe manifestieren.

Verbindungen	Konzentration im Tabakrauch pro Zigarette (ohne Filter)	IARC-Gruppe
polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe		
Benz[a]anthrazen	20-70 ng	2A
Benzo[a]pyren	20-40 ng	2A
Dibenz[a,h]anthrazen	4 ng	2A
<i>N</i> -Nitrosamine		
N-Nitrosodimethylamin	2-1000 ng	2A
N-Nitrosopyrrolidin	3-110 ng	2B
N-Nitrosodiethanolamin	bis 68 ng	2B
Aromatische Amine		
o-Toluidin	30-337 ng	2B
4-Aminobiphenyl	2-5,6 ng	1
2-Naphtylamin	1-334 ng	1
tabakspezifische Nitrosamine		
4-(Methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK)	80-770 ng	2B
N'-Nitrosonornicotin	120-3700 ng	2B
N'-Nitrosoanabsin	nachgewiesen	3
Sonstige		
Benzol	28-106 ng	1
Vinylchlorid	11-15 ng	1
Formaldehyd	1,1-283 ng	2A
Ethylenoxid	7 µg	1
Acrylamid	nachgewiesen	2A
Metalle		
Cadmium	12-222 ng	1
Arsen	1,6-25 ng	1
Nickel	bis 510 ng	1
Chrom	0,2-2,6 ng	1

Tabelle 1: Kanzerogene Verbindungen im Tabakrauch (nach Hoffmann, 2001). Die IARC unter-<br/>teilt Kanzerogene in folgende Untergruppen: Gruppe 1: kanzerogen für den Men-<br/>schen; Gruppe 2A: wahrscheinlich kanzerogen für den Menschen; Gruppe 2B: mög-<br/>licherweise kanzerogen für den Menschen; Gruppe 3: nicht klassifizierbar.

## 1.3 Tumorpromotion und Tumorpromotoren im Tabakrauch

Die Tumorentstehung ist eine Abfolge unterschiedlicher biologischer Vorgänge, die als Initiation, Promotion und Progression bezeichnet werden. Initiation wird der erste Schritt zur malignen Entartung genannt, sie erfolgt nur in proliferationsfähigen Zellen, betrifft nur einzelne Zellen und ist ein sehr seltenes Ereignis. Die Initiation ist irreversibel. Der Prozess, der nach der Initiation die Entstehung des Tumors verstärkt und beschleunigt, wird als Tumorpromotion bezeichnet. Ihr charakteristisches Merkmal ist die selektive Vermehrung initiierter Zellen.

Kanzerogene sind in der Lage, initiierend zu wirken. Tumorpromotoren alleine können dies nicht. Zur Tumorentstehung bedarf es daher stets des Zusammenspiels der Initiation durch Kanzerogene und im weiteren Verlauf der Tumorpromotion durch entsprechende Substanzen über einen längeren Zeitraum. Co-Kanzerogene können die Empfindlichkeit gegenüber initiierenden Einwirkungen verstärken, ohne selbst kanzerogen zu sein (Schulte-Hermann 2004). Durch weitere genetische und epigenetische Faktoren wie z. B. eine Proto-Onkogen-Aktivierung entsteht dann in der Progressionsphase die maligne Zelle mit der Fähigkeit zu invasivem Wachstum und Metastasierung (Marquardt und Pfau 2004).

Als Tumorpromotoren im Tabakrauch gelten die als Kondensat bezeichnete Partikelphase des Rauchs, phenolische Komponenten, ungesättigte Kohlenwasserstoffe, Ölsäure, Phenol und o-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) als wohl bekanntester Tumorpromotor. Außerdem werden Mezerein und 12-o-Retinoylphorbol-13-acetat (RPA) als "second stage promoters" erwähnt, die aber eine wesentlich geringere Promoteraktivität zeigen als TPA (Colburn et al. 1980, Hecht et al. 1975, Hoffmann et al. 1983, Hoffmann et al. 2001, Rubin 2002, Van Duuren und Goldschmidt 1976). Weiterhin wird angenommen, dass auch freie Radikale im Tabakrauch an Tumorinitiation und –promotion mitwirken können (Shishodia et al. 2003). Vorstellbar ist in diesem Zusammenhang, dass ein Gleichgewicht von Semichinonen, Hydrochinonen und Chinonen den größten Komplex an freien Radikalen im Tabakrauch bildet (Hecht 1999).

Eine eindeutige, klare Abgrenzung einzelner tumorpromovierender Substanzen im Tabakrauch scheint allerdings schwierig.

Die meisten Versuchsreihen zu dieser Thematik wurden Mitte der 1970er Jahre durchgeführt. Dabei konnte nachgewiesen werden, welche Fraktionen von Tabakrauchkondensat tumorpromovierende Eigenschaften haben. Die tumorpromovierende Wirkung von Einzelsubstanzen dagegen wurde nur selten genauer beschrieben. Allein für TPA, Phenol und Ölsäure konnte diese Eigenschaft nachgewiesen werden (Hecht et al. 1975, Van Duuren und Goldschmidt 1976). Eine Übersicht über einige bisher bekannte Tumorpromotoren und deren bevorzugte Signalwege ist in Tabelle 3 in Abschnitt 1.7 dargestellt.

Einige Arbeiten zeigten, dass den substituierten Phenolen aus dem Tabakrauch nicht immer tumorpromovierende Eigenschaften zugeordnet werden können. Die Substanzen 4-Methoxyphenol, Resorcinol und auch Phenol sind in der Lage, den Effekt des Kanzerogens Benz[a]pyren (B[a]P) unter bestimmten Umständen abzuschwächen oder zu hemmen (Smith et al. 2002). Auch eine orale Gabe von o-Cresol vor oder nach der Gabe von Benzo[a]pyren zeigte eine Abschwächung des kanzerogenen Effekts von B[a]P. Nach gleichzeitiger oraler Gabe von o-Cresol und B[a]P in niedrigen Konzentrationen traten vermehrt Tumoren bei Mäusen auf (Yanysheva et al. 1993). Trotz dieser teilweise hemmenden Wirkung der Phenole auf B[a]P wird derzeit angenommen, dass eine Reduktion der biologischen Aktivität der Phenole im Tabakrauch im Hinblick auf eine Krebsentstehung von Vorteil ist (Smith et al. 2002). Aus den zahlreichen im Tabakrauch vorkommenden phenolischen Substanzen wurden für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen Phenol und o-Cresol als Testsubstanzen ausgewählt.

### 1.4 Phenolische Substanzen im Tabakrauch

Im Zigarettenrauch sind ca. 380 unterschiedlich substituierte Phenole vorhanden, von denen 253 Verbindungen durch Aufklärung ihrer chemischen Struktur bereits identifiziert worden sind. In einer Auflistung dieser identifizierten Phenole nach Toxizität aufgrund ihrer Bildung von Phenoxyradikalen zeigte sich für o-Cresol (2-Methylphenol) ein größeres Potential, Radikale zu bilden, als für Phenol. Bei der Bestimmung der Lipophilie mittels des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten stellte sich o-Cresol als lipophiler heraus, was auf eine höhere Toxizität, bedingt durch eine bessere Membrangängigkeit, im Vergleich zu Phenol schließen lässt (Smith et al. 2002).

In Deutschland und in den USA werden für gewöhnlich den gefertigten Tabakprodukten unterschiedliche Zusätze zugefügt, um z. B. einen bestimmten Geschmack zu erhalten. In den 1960er Jahren wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass solche Tabakzusätze die Toxizität des Tabakrauchs erhöhen würden. Erst kürzlich wurde diese Hypothese von mehreren Arbeitsgruppen nach erneuter Betrachtung der bis dahin durchgeführten Studien zu diesem Themenkomplex in Frage gestellt. Zwar wurde deutlich, dass es an Wissen über chemische Effekte der Tabakzusätze mangelt, von einer erhöhten biologischen Aktivität wie Mutagenität, Zytotoxizität oder Kanzerogenität des Tabakrauchs durch diese Zusätze wird allerdings nicht ausgegangen (Paschke et al. 2002). Einige der als toxisch, kanzerogen oder tumorpromovierend geltenden, natürlich vorkommenden Inhaltsstoffe des Tabakrauchs entstehen nach der Verbrennung von Tabakzusätzen. Substanzen wie Cresol und Phenol, die im Tabakrauch natürlich vorkommen entstehen zusätzlich z. B. bei der Pyrolyse der Geschmackszusätze Anisylphenylacetat, Benzylbenzoat oder Salicylaldehyd. Eine Erhöhung der biologischen Aktivität des Tabakrauchs ist durch diese Pyrolyseprodukte jedoch nicht zu erwarten, da die entstehenden Mengen von Phenol und Cresol weit unter dem normalen Gehalt der Substanzen im Tabakrauch liegen (Baker et al. 2004a). Im Tabakrauch beträgt die Konzentration von Phenol ca. 80 bis 160 µg/Zigarette und die von o-Cresol ca. 9 bis 40 µg/Zigarette. Unter den Begriff der biologischen Aktivität fällt auch die Wirkung von o-Cresol und Phenol auf molekulare Mechanismen in der Zelle. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Substanzen auf den programmierten Zelltod, eine mögliche Form des zellulären Untergangs, untersucht.

## 1.5 Formen des zellulären Untergangs

Generell werden in mehrzelligen Organismen verschiedene Formen des zellulären Untergangs unterschieden. Neben Eliminierungsmechanismen wie Autophagozytose, mitotischer Katastrophe, dem dunklen Zelltod oder Paraptosis sind der programmierte Zelltod, oftmals synonym als Apoptose bezeichnet, und die Nekrose wohl die bekanntesten und am besten untersuchten Mechanismen (Philchenkov 2004).

Der programmierte Zelltod (programmed cell death, PCD) ist eine aktive, intrazellulär gesteuerte, genetisch programmierte Form des Zelltods, bei der es zu unterschiedlichen biochemischen und morphologischen Veränderungen in der Zelle kommt. Eine einzelne Zelle hat hier die Möglichkeit, einen altruistischen, kontrollierten Selbstmord einzuleiten und sich somit selbst zum Wohle des gesamten Organismus zu eliminieren. Dadurch wird im Organismus gewährleistet, dass Zellen nur dann weiterleben, wenn sie gebraucht werden (Häcker 1995). Einteilen lässt sich der programmierte Zelltod in drei Unterkategorien. Das sind die klassische Form der Apoptose, ein apoptoseähnlicher programmierten Zelltod und ein nekroseähnlicher Zelltod. Einige wesentliche morphologische und biochemische Merkmale der unterschiedlichen Zelluntergänge im Vergleich zur zufällig eintretenden Nekrose sind in Tabelle 2 aufgezeigt (Dartsch 2004, Jäättelä 2004, Jäättelä 2001, Wyllie et al. 1980).

	Zelltod	Merkmale		
erter Zelltod	Apoptose	<ul> <li>Externalisierung von Phosphatidylserin</li> <li>Caspase-3-Aktivierung</li> <li>oligonukleosomale Fragmentierung der DNA</li> <li>Chromatinkondensation</li> <li>Schrumpfen des Zytoplasmas</li> <li>Ausbildung apoptotischer Körperchen</li> <li>Zellmembran bleibt intakt</li> </ul>		
programmie	apoptoseähnlicher Zelltod	<ul> <li>weniger kompakte, klumpige Chromatinkondensation</li> <li>Auslagerung von Molekülen zur Phagozytoseerkennung be es zur Lyse der Membran kommt</li> <li>oftmals Caspase-unabhängiger Zelltod</li> </ul>		
	nekroseähnlicher Zelltod	<ul> <li>keine Chromatinkondensation</li> <li>Auftreten variabler Apoptosemerkmale, wie PS- Externalisierung vor Zelllyse</li> <li>Caspase-unabhängige Signalwege</li> </ul>		
zufälliger Zelltod	Nekrose	<ul> <li>Anschwellen und Versagen der Mitochondrien</li> <li>Anschwellen der Zelle</li> <li>Membranschädigung</li> <li>Freisetzung des Zellinhalts</li> <li>zufällige, ungerichtete DNA-Fragmentierung</li> </ul>		

Tabelle 2: Merkmale der unterschiedlichen Arten des programmierten Zelltods und der<br/>Nekrose. Aufgezeigt sind biochemische (Phosphatidylserin-Externalisierung,<br/>Caspase-3-Aktivierung) und morphologische (Ausbildung apoptotischer Körper-<br/>chen, Chromatinkondensation) Veränderungen in der Zelle.

Der Begriff Apoptose wurde erstmals von Kerr, Wyllie und Currie verwendet und beschreibt den finalen Teil des programmierten Zelltods, bei dem es zu charakteristischen morphologischen Veränderungen der Zelle kommt (Kerr 1972). Weil der Begriff "Apoptose" ursprünglich nur diesen letzten Abschnitt des programmierten Zelltods mit seinen morphologischen Veränderungen beschreibt, wird im Kontext dieser Arbeit der Begriff "programmierter Zelltod" für die Bezeichnung des gesamten Ablaufs dieses zellulären Selbstmordprogramms verwendet. Bei einer Apoptose zeigen sich folgende morphologische Veränderungen: Die Zelle löst sich aus dem Zellverband, es kommt zur Kondensation des Chromatins und im weiteren Verlauf zur Ausbildung und Abschnürung apoptotischer Körperchen, die von einer intakten Zellmembran umgeben sind und eine kompakte Auswahl der verschiedenen Zellorganellen enthalten. Die apoptotischen Körperchen können anschließend von umliegenden Zellen phagozytiert werden. Da die Zellmembran während der Apoptose intakt bleibt, kann der Zellinhalt nicht in den extrazellulären Raum gelangen und dort keine entzündlichen Reaktionen hervorrufen (Wyllie 1997).

Im Gegensatz zum programmierten Zelltod handelt es sich bei der Nekrose um einen zufälligen Zelltod, der durch ein Anschwellen der Zellorganellen gekennzeichnet ist. Die wichtigsten morphologischen und biochemischen Merkmale der Nekrose sind in Tabelle 2 aufgelistet. Im weiteren Verlauf der Nekrose reißt die Plasmamembran, der Zellinhalt wird ins umliegende Gewebe freigesetzt und kann dort Entzündungsreaktionen hervorrufen (Israels und Israels 1999, Wyllie et al. 1980). In Abbildung 1 sind die morphologischen Veränderungen während der Apoptose im Vergleich zur Nekrose schematisch dargestellt.



Abbildung 1: Morphologische Veränderungen beim apoptotischen (e bis h) und nekrotischen (a bis d) Zelluntergang in schematischer Darstellung nach Cameron und Feuer. Bei der Nekrose (a) kommt es zum Anschwellen des Zellvolumens, gefolgt von Vakuolisierung, erhöhter Membranpermeabilität und schließlich einem Aufreißen der Zellmembran mit Abgabe des Zellinhalts in das Gewebe (d). Bei der Apoptose (e) nimmt das Zellvolumen ab, es kommt zur Chromatinkondensation (f) und Ausbildung apoptotischer Körperchen, die anschließend von Nachbarzellen phagozytiert werden (h) (nach Cameron und Feuer, 2000).

Physiologisch gesehen ist der programmierte Zelltod für das Überleben des Organismus essentiell, da er die Zellteilung ausgleicht und zur Gewebshomöostase beiträgt, z. B. in intestinalen Epithelien, im Thymus, in der Leber oder in lymphatischen Geweben (Häcker 1995, Israels und Israels 1999, Wyllie et al. 1980). Auch bei pathologischen Prozessen im Rahmen einer gestörten Apoptoseregulation spielt der programmierte Zelltod eine wichtige Rolle. So werden maligne neoplastische Veränderungen im Gewebe mit einer verminderten Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Auslösersignalen des programmierten Zelltods in Verbindung gebracht. Ein übermäßiger programmierter Zelltod kann mitverantwortlich gemacht werden für eine Reihe neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer- und Parkinson-Krankheit. Bei der Immunschwäche AIDS wird angenommen, dass das vermehrte Auslösen der Apoptose in CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu deren starkem Rückgang beiträgt. Verschiedene Autoimmunerkrankungen werden ebenfalls mit einer beeinträchtigten Regulation des programmierten Zelltods in Verbindung gebracht (Bar 1996, Cameron und Feuer 2000, Dartsch 2004, Nicholson und Thornberry 2003).

## 1.6 Molekulare Abläufe des programmierten Zelltods

Apoptose kann in der Zelle durch äußere Einflüsse ausgelöst werden oder ist während der Gewebeentwicklung in der Zelle programmiert und führt zum Tod der einzelnen Zelle. Der programmierte Zelltod kann in der Zelle auf unterschiedliche Art und Weise ausgelöst werden, z. B. durch radioaktive oder UV-Strahlung, DNA-Schädigung, Chemikalien oder Zytostatika. Auch oxidativer Stress, der Entzug von Wachstumsfaktoren und Autoimmunreaktionen können den programmierten Zelltod auslösen (Cameron und Feuer 2000, Strasser et al. 2000). Der Prozess verläuft vor allem über zwei Übertragungswege: Der so genannte extrinsische Signalweg geht über verschiedene Todesrezeptoren (CD95/Fas; TNF-Rezeptor), der als intrinsisch bezeichnete Signalweg läuft über die Mitochondrien ab und involviert die Proteine der Bcl-2-Familie. Bei den Signalwegen werden Caspasen aktiviert und spezifische Substrate gespalten, die für die morphologischen und biochemischen Veränderungen in der Zelle während der Apoptose verantwortlich sind (Schultz und Harrington 2003, Zimmermann und Green 2001).

Einen Überblick über den molekularen Ablauf der Apoptose gibt Abbildung 2.



Abbildung 2: Signalwege des programmierten Zelltods im Überblick. Zentral reguliert wird der programmierte Zelltod von den Caspasen, einer Gruppe von Cystein-Proteasen. Der Aktivierung der Initiator-Caspasen (Caspase-2, -8, -9, -10, -12) folgt die Weiterleitung pro-apoptotischer Signale in der Zelle und eine Aktivierung von Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7), die wiederum unterschiedliche Substrate spalten können und zum programmierten Zelltod mit apoptotischem Ende führen können. Ausgelöst werden kann diese Signalkaskade über einen extrinsischen Weg durch Rezeptoren (TNF, Fas) oder über intrinsische Signale wie oxidativen Stress (Cell Signaling Technology 2005).

Vier verschiedene Molekülgruppen sind für den Ablauf des programmierten Zelltods hauptsächlich verantwortlich, das sind Adapterproteine, welche die Aktivierung der Inititator-Caspasen regulieren, Mitglieder der Tumornekrosefaktor- (TNF) Rezeptor-Familie, Caspasen und Mitglieder der Bcl-2-Protein-Familie. Auf die beiden letzten Gruppen soll im weiteren Verlauf dieser Arbeit genauer eingegangen werden.

#### 1.6.1 Caspasen

Eine Gruppe cysteinhaltiger, Asparaginsäure-spezifischer Proteasen, die Caspasen, regulieren den Ablauf der Apoptose an verschiedenen Stellen in der Zelle. Nummeriert in der Reihenfolge ihrer Entdeckung, sind mittlerweile 14 verschiedene Caspasen bekannt, die allesamt Isoenzyme des Interleukin-1 $\beta$ -konvertierenden Enzyms (ICE) sind. ICE ist der Prototyp der Caspasen und wird auch als Caspase-1 bezeichnet. Bei Untersuchungen zum Zelluntergang im Nematoden *Caenorhabditis elegans* stellte sich heraus, dass das für den programmierten Zelltod verantwortliche Gen in *C. elegans ced-3* strukturhomolog ist mit dem humanen ICE (Nicholson et al. 1995). Caspasen sind Proenzyme, die drei Domänen enthalten: ein NH<sub>2</sub>-terminales Ende, eine große Untereinheit (~ 20 kD) und eine kleinere Untereinheit mit ~ 10 kD. Wird eine Caspase aktiviert, heterodimerisieren nach der Spaltung der Untereinheiten die kleine und die große Untereinheit. Die so gebildeten Heterodimere können sich dann zu einem Tetramer mit zwei aktiven Zentren zusammenschließen und bilden so die aktive Caspase (Thornberry und Lazebnik 1998).

Durch zwei unterschiedliche Mechanismen lassen sich die Caspasen aktivieren, zum einen autokatalytisch und zum anderen durch Spaltung mittels anderer, bereits aktivierter Caspasen. Die drei wichtigsten Gruppen der Caspasen sind im Folgenden aufgezeigt (Philchenkov 2004, Zimmermann et al. 2001):

1. Initiator-Caspasen:	Zu ihnen zählen Caspase-2, -8, -9, -10 und -12. Sie können durch Adapterproteine aktiviert werden und dann im weiteren Verlauf der Apoptose ihrerseits die Effektor-Caspasen aktivieren.
2. Effektor-Caspasen:	Caspase-3, -6 und -7 sind für die Spaltung unter- schiedlicher Substrate beim Ablauf des program- mierten Zelltods verantwortlich.
3. Inflammatorische Caspasen:	Caspase-1, -4, -5, -13 spielen eine Rolle bei der Bereitstellung inflammatorischer Zytokine, sie ha-

Beim programmierten Zelltod spielen nur die ersten beiden Gruppen eine ausschlaggebende Rolle, vor allem jedoch Caspase-3 unterstützt von Caspase-6 und -7. Diese drei Caspasen sind durch Spaltung verschiedener Substrate und Strukturproteine wie Lamin A, Actin oder Gelsolin unter anderem verantwortlich für die typischen morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen. Gehemmt werden kann die autokatalytische Caspasekaskade durch zelluläre Caspaseinhibitoren, die IAPs (inhibitors of apoptosis proteins) (Sprick und Walczak 2004, Zimmermann et al. 2001).

ben keinen Einfluss auf apoptotische Vorgänge.

Caspase-3 aktiviert unter anderem im weiteren Verlauf der Signalkaskade die Caspase-aktivierte DNAse CAD/DFF40 (Caspase-activated DNAse/ DNA Fragmentation Factor 40), eine Endonuklease. In der Zelle liegt CAD/DFF40 in einem Komplex mit ihrem Inhibitor ICAD/ DFF45 vor. Vom Inhibitor freigesetztes CAD

bildet katalytisch aktive Homo-Oligomere, die dann wiederum verantwortlich sind für den oligonukleosomalen Abbau der DNA. Vorstellbar ist, dass Caspase-3 ICAD durch Spaltung inaktiviert. Daraufhin wird CAD freigesetzt und kann im Kern die DNA abbauen (Enari et al. 1998, Sakahira et al. 1998).

Neben den Caspasen involviert der häufig in Vertebratenzellen vorkommende Signalweg des programmierten Zelltods die Mitochondrien und die Proteine der Bcl-2-Familie.

#### 1.6.2 Proteine der BcI-2-Familie

Identifiziert wurde das Proto-Onkogen bcl-2 in Patienten mit B-Zell-Lymphom. Später wurde entdeckt, dass es ein humanes Homolog zu dem in *C. elegans* identifizierten Repressor des programmierten Zelltods, ced-9, ist. Das exprimierte Bcl-2-Protein ist in der Lage, den programmierten Zelltod in der Zelle zu unterdrücken. Die Proteine der Bcl-2-Familie enthalten mindestens eine von vier konservierten Regionen, den "Bcl-2 homology regions" (BH), die als BH1 bis BH4 bezeichnet werden (Strasser et al. 2000). Unterteilt werden die Proteine dieser Familie nach Funktion und Struktur in drei Untergruppen. Die Gruppe der anti-apoptotischen Proteine umfasst Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, A1, Mcl-1 und Boo (Diva). Diese Proteine sorgen für das Überleben der Zelle und enthalten strukturell wenigstens BH1 und BH2. Den Mitgliedern der Gruppe der pro-apoptotischen Proteine wie Bax, Bak, oder Bok fehlt die BH4-Domäne und sie sind in der Lage, den programmierten Zelltod auszulösen. Ebenfalls zu den pro-apoptotischen Proteinen zählt die Gruppe der "BH3-only"-Proteine, die unter anderem Bid, Bad, Bim, Bik und Noxa umfasst. Sie enthalten nur die kurze, zentrale BH3-Region (Zimmermann et al. 2001).

Die Proteine der Bcl-2-Familie sind an dem über die Mitochondrien regulierten programmierten Zelltod beteiligt, jedoch wird der zu Grunde liegende biochemische Mechanismus noch kontrovers diskutiert (Kaufmann et al. 2004, Sprick und Walczak 2004). Beim Ablauf des programmierten Zelltods wird die Überexpression von Bax assoziiert mit einem Verlust des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \Psi_m$ ) und einer Caspase-3-Aktivierung. Die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran hat großen Anteil am Ablauf des apoptotischen Zelluntergangs, sie kann spontan auftreten und sorgt für die Freisetzung unterschiedlicher löslicher Proteine wie Cytochrom *c*, AIF (apoptosis inducing factor) und SMAC/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspase), die sich für gewöhnlich zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran befinden. Die freigesetzten Proteine können dann im weiteren Verlauf des programmierten Zelltods Caspasen aktivieren oder Endonukleaseaktivitäten im Kern stimulieren. Freigesetztes Cytochrom c z. B. veranlasst die Bildung des Apoptosoms, eines aus dem Adapterprotein Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1), ATP und Cytochrom c zusammengesetzten Moleküls, das nach Rekrutierung von Caspase-9 in der Signalkaskade schließlich Caspase-3 aktiviert und so zum apoptotischen Zelluntergang führt (vgl. Abbildung 2 und Abbildung 3) (Henry-Mowatt et al. 2004).



Abbildung 3: Darstellung des intrinsischen, zellautonomen Signalwegs des programmierten Zelltods, modifiziert nach Igney und Krammer (2002). Eine zentrale Rolle spielt hier die Bildung des Apoptosoms nach Freisetzung löslicher Moleküle wie Cytochrom c aus den Mitochondrien. Effektor-Caspasen werden aktiviert und es kommt zum apoptotischen Zelluntergang. Das aus den Mitochondrien freigesetzte Protein SMAC/Diablo ist in der Lage, die Caspase-inhibierenden IAPs zu antagonisieren und so seine pro-apoptotische Wirkung zu entfalten. Zum Überleben benötigt die Zelle Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone. Sie können den Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt Signalweg in der Zelle aktivieren, der einem programmierten Zelltod entgegenwirkt.

Diskutiert wird in diesem Zusammenhang unter anderem der folgende Mechanismus. Verschiedene Bcl-2-Proteine können direkt an der äußeren Mitochondrienmembran interagieren, dabei blockieren z. B. die anti-apoptotischen Proteine eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran. Für die pro-apoptotischen Proteine wird angenommen, dass sie auch in Kombination mit anderen Proteinen die Bildung von Poren in der äußeren Mitochondrienmembran hervorrufen und somit Proteine aus dem Zwischenraum der Mitochondrienmembran freigesetzt werden können (Green und Kroemer 2004). Beteiligt an diesem Mechanismus ist Bid, ein "BH3-only"-Mitglied der Bcl-2-Familie, das in Kombination mit Bax für dessen Oligomerisation und Einlagerung in die äußere Mitochondrienmembran mit nachfolgender Freisetzung von Cytochrom c sorgt. Für diesen Ablauf wird auch die Anwesenheit des Lipids Cardiolipin diskutiert (Henry-Mowatt et al. 2004). Eine vom ATP-Gehalt abhängige Abnahme des Mitochondrienmembranpotentials ( $\Delta \Psi_m$ ) scheint ebenfalls bevor eine Translokation des zytosolischen Proteins Bax zur notwendia. Mitochondrienmembran stattfinden kann (Smaili et al. 2001). Wie Bax die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien genau regelt, bleibt jedoch ungeklärt, da der Einfluss von Bax und anderen pro-apoptotischen Proteinen auf die Mitochondrienmembranpore (permeability transiton pore, PTP), auf den Adenin-Nukleotid-Transporter (ANT) an der inneren Mitochondrienmembran und auf den spannungsabhängigen Anionenkanal (voltage-dependent anion channel, VDAC) an der äußeren Mitochondrienmembran im Zusammenhang mit einer durch Bax induzierten Apoptose ebenfalls noch nicht abschließend geklärt ist (Green und Kroemer 2004, Henry-Mowatt et al. 2004, Ly et al. 2003). Angenommen wird jedoch, dass beim mitochondrialen Ablauf des programmierten Zelltods reaktive Sauerstoffspezies (ROS) die Proteine VDAC und ANT verändern und auf diesem Wege zur pro-apoptotischen Permeabilisierung der Mitochondrienmembran beitragen können (Le Bras et al. 2005).

### 1.6.3 Die Rolle der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Rahmen des programmierten Zelltods

Der Begriff ROS bezeichnet eine ganze Reihe kurzlebiger Verbindungen wie Hydroxyl- (HO•), Alkoxyl- (RO•) oder Peroxylradikale (ROO•), das Superoxid- (O<sub>2</sub>•) und das Nitroxylradikal (NO•), außerdem gehören sauerstoffhaltige Verbindungen wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dazu. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies kann endogen z. B. im Rahmen der Atmungskette erfolgen, ferner kann die Menge natürlich vorkommender ROS in der Zelle durch exogene Faktoren wie z. B. UV-Strahlung erhöht werden. Die so gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies können zum einen zur oxidativen Schädigung biologischer Moleküle in der Zelle führen und dienen zum anderen als kurzlebige second messenger in einer Reihe intrazellulärer Signalkaskaden (Forman et al. 2004, Sauer et al. 2001). Auch der programmierte Zelltod involviert die Beteiligung von ROS (Bar 1996, Buccellato et al. 2004, Tan et al. 1998). In verschiedenen Systemen wurde gezeigt, dass eine intrazelluläre Zunahme an ROS einen induzierten apoptotischen Zelluntergang begleitet, der zu Grunde liegende molekulare Mechanismus dieser Zunahme wurde jedoch bisher nicht vollständig geklärt, eine Beteili-

gung der Mitochondrien wird jedoch angenommen (vgl. dazu auch Abschnitt 1.6.2) (Kang et al. 2005b, Le Bras et al. 2005, Su et al. 2005, Wu et al. 2005). Es zeigte sich, dass die Mitochondrien sowohl Herkunftsort reaktiver Sauerstoffspezies sein können als auch deren bevorzugtes Angriffsziel im Verlauf des programmierten Zelltods (Simon et al. 2000). Je nach Konzentration der reaktiven Sauerstoffspezies und Exposition einer Zelle mit ROS kann eine erhöhte Proliferation oder ein Zelltod eintreten, dabei können unterschiedliche zelluläre Signalwege aktiviert werden. Während niedrige Dosen ROS eine Mitogenese und Zellproliferation veranlassen können, induzieren hohe Dosen reaktiver Sauerstoffspezies eine Nekrose oder einen programmierten Zelltod (Martindale und Holbrook 2002).

Für die Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle stehen eine Vielzahl antioxidativer Mechanismen zur Verfügung. Die Verhinderung und Beseitigung oxidativer Schäden kann enzymatisch z. B. mit Hilfe der Superoxiddismutase und nichtenzymatisch z. B. mittels  $\alpha$ -Tocopherol oder Glutathion erfolgen.

Eine Ursache zytotoxischer und genotoxischer Effekte von phenolischen Substanzen kann die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Form von Phenoxyradikalen sein. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass o-Cresol leichter Phenoxyradikale bilden kann als Phenol (Smith et al. 2002).

Diese Radikale können z. B. als Zwischenprodukte bei Ein-Elektronenoxidationen in der Zelle entstehen. Eine weitere Möglichkeit zur Bildung von Phenoxyradikalen ist ein Redoxzyklus in der Zelle. Dabei wird die phenolische Substanz unter Katalyse eines entsprechenden Enzyms zu seinem Phenoxyradikal oxidiert. Durch Oxidation eines zellulären Thiols (RSH) kann das Phenoxyradikal anschließend wieder zu seiner Ausgangsverbindung reduziert werden. Die phenolische Verbindung steht dann erneut als Substrat für eine Oxidation zur Verfügung, die Thiole werden in dieser Reaktion zu Thiylradikalen (RS•) oxidiert. Im weiteren Verlauf sind die Thiylradikale dann in der Lage, Disulfidanionradikale (RS-S\*R) zu bilden, die wiederum als Elektronendonatoren für intrazellulären Sauerstoff dienen. So werden in der Zelle Superoxidradikale und nach weiteren Reaktionsschritten Hydroxylradikale gebildet, die in der Lage sind, unter anderem die DNA zu schädigen und dadurch zu zytotoxischen und genotoxischen Effekten führen können (Kagan und Tyurina 1998).

Bei Untersuchungen zur Kanzerogenese konnte gezeigt werden, dass sowohl Kanzerogene als auch Tumorpromotoren die Bildung freier Radikale und reaktiver Sauerstoffspezies hervorrufen können (Curtin et al. 2004).

### 1.7 Tumorpromotoren und Apoptose

Den Versuchsreihen dieser Arbeit lag die folgende Arbeitshypothese zu Grunde: Tumorpromotoren aus dem Tabakrauch können die Empfindlichkeit von Zellen gegenüber dem programmierten Zelltod herabsetzen oder steigern, indem sie mit den Regulatoren des programmierten Zelltods interagieren. Beide Effekte können zur Krebsentstehung beitragen, da ein vermehrt auftretender Zelltod regeneratives Wachstum im Zellverband hervorrufen kann und ein vermindertes Absterben von Zellen einen möglichen selektiven Proliferationsvorteil für Tumorzellen bietet (Marquardt und Pfau 2004). Einen Überblick über Wirkmechanismen von Tumorpromotoren bietet Abbildung 4.



Abbildung 4: Wirkmechanismen von Tumorpromotoren im Zellverband. Einerseits ist eine Induktion der Mitose möglich, andererseits eine Hemmung des programmierten Zelltods. In beiden Fällen kann ein präneoplastischer Zellverband entstehen, der sich durch einen Proliferationsvorteil letztendlich als Tumor manifestieren kann (modifiziert nach Marquardt, 2004).

Im Zusammenhang mit Tumorpromotoren und dem programmierten Zelltod sind mehrere Ergebnisse aus der Literatur zu berücksichtigen. Einige Tumorpromotoren wie z. B. die Okadarsäure können unter bestimmten Bedingungen einen programmierten Zelltod auslösen (Dwyer-Nield et al. 1998, Lin et al. 2004, Morimoto et al. 2004). In vielen Fällen können Tumorpromotoren aber auch den Mechanismus des programmierten Zelltods blockieren und somit einer unter normalen Umständen stattfindenden apoptotischen Eliminierung geschädigter Zellen entgegenwirken (Bursch et al. 1984, Christensen et al. 1999, Schrenk et al. 2004, Volkova et al. 2005). Bei der Entstehung von Krebs ist der Wegfall oder die Hemmung des programmierten Zelltods z. B. durch Mutationen von Signalgenen von entscheidender Bedeutung. Dadurch erlangen diejenigen Zellen einen Selektionsvorteil, deren Bedürfnisse an Wachstumsfaktoren und Nährstoffen gering sind. Tumorzellen entstehen aus Normalzellen durch Kumulation von Mutationen und Selektion derjenigen Mutanten, die optimale Voraussetzungen für ein autonomes Wachstum im Organismus erworben haben (Kroemer 2004, Schulte-Hermann 2004). Die Fähigkeit, einen programmierten Zelltod einzugehen, ist bei Tumorzellen oftmals defekt und kann zu malignen neoplastischen Veränderungen im Körper führen. Daher ist nicht nur eine überhöhte Proliferation für die Tumorentstehung ausschlaggebend, sondern auch ein vermindertes Absterben von Zellen ist in diesem Zusammenhang wesentlich (Dartsch 2004). Eine Übersicht über bekannte Tumorpromotoren, deren Effekte auf den programmierten Zelltod sowie deren bevorzugte Zielstrukturen und Signalwege sind in Tabelle 3 dargestellt (Bursch et al. 2005, Calfee-Mason et al. 2002, Chen et al. 2002, Christensen et al. 1999, Kang et al. 2005a, Leira et al. 2001, Morimoto et al. 2004, Schrenk et al. 2004, Sunil et al. 2002, Takada et al. 2005).

Tumorpromotor	Zellsystem / Tiermodell	Signalweg	Effekt auf den programmierten Zelltod
ТРА	Magenkrebszellen	Aktivierung von JNK über Proteinkinase C	Induktion
	Jurkat-Zellen	NFκB und ERK	Hemmung
	A549-Zellen	NFκB	k. A.
	Lunge	Proteinkinase C, NFκB, p38, MAPK	Hemmung
Okadarsäure	Lungenfibroblasten (NHLF)	Mitochondrien, Caspase-3	Induktion
	MG63, humane Osteo- sarkom-Zelllinie	RNA-abhängige Protein- kinase, NFκB	Induktion
	humane Neuroblastom- zellen	k. A.	Induktion
Phenobarbital	Nagerhepatozyten	NFκB, p53, bax	Hemmung
TCDD	Rattenhepatozyten	p53	Hemmung

#### Tabelle 3: Bekannte Zielstrukturen und Signalwege unterschiedlicher Tumorpromotoren.

Im Vergleich dazu wirken auch einige Inhibitoren von Tumorpromotoren in unterschiedlichen Zellsystemen Apoptose-induzierend (Islam et al. 2000, Nomura et al. 2001). Die Betrachtung der molekularen Einflüsse von Tumorpromotoren auf die Signalkaskade des programmierten Zelltods ist daher interessant in Bezug auf Entstehung und Ausbildung neoplastischer Veränderungen im Gewebe.

Untersuchungen zum programmierten Zelltod sind in den letzten Jahren wesentlich umfangreicher und aufwendiger geworden. Bei verschiedenen Experimenten zu dieser Thematik stellte sich heraus, dass es nicht ausreicht, ein einzelnes Apoptoseoder Nekrosemerkmal herauszugreifen und zu untersuchen, um je nach Untersuchungsergebnis zu unterscheiden, ob ein programmierter Zelltod in Form einer Apoptose oder ein Zelluntergang in Form einer Nekrose vorliegt (Wickenden et al. 2003). Aufgrund der Komplexität der Mechanismen ist es notwendig, mehrere Merkmale des programmierten Zelltods zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit sollten zum einen die tumorpromovierenden Eigenschaften der phenolischen Phase des Tabakrauchs berücksichtigt werden, wobei für die Testsubstanz Phenol bereits eine tumorpromovierende Wirkung nachgewiesen wurde (Hecht et al. 1975, Hoffmann 1999, Rubin 2002, Van Duuren und Goldschmidt 1976). Darüber hinaus sollte den aus anderen Untersuchungen bekannten unterschiedlichen Effekten von Tumorpromotoren auf den Mechanismus des programmierten Zelltods Rechnung getragen werden (siehe Tabelle 3).

Trotz der zahlreichen Untersuchungen zu dem Thema mit Inhaltsstoffen des Tabakrauchs gibt es nur wenige Erkenntnisse über Tumorpromotoren aus der phenolischen Phase des Tabakrauchkondensats und deren möglichen Einfluss auf den programmierten Zelltod. Daher sollte in dieser Arbeit die tumorpromovierende Wirkung dieser Phase des Tabakrauchs im Mittelpunkt stehen. Als Substanzen aus der phenolischen Phase wurden Phenol und o-Cresol ausgewählt. Parallel dazu sollte der Einfluss von TPA auf molekulare Mechanismen in den zur Verfügung stehenden Zellsystemen untersucht werden. Verschiedene Arbeitsgruppen haben für TPA bereits eine Apoptoseinduktion nachgewiesen an der ein Signalweg über mitogenaktivierte-Proteinkinasen (MAPK) beteiligt ist (Chen et al. 2002, Lee und Rosson 2001, Li et al. 2003). Der programmierten Zelltod kann jedoch auch durch TPA gehemmt werden.

Auch mit Tabakrauchkondensat wurden in der Vergangenheit bereits von unterschiedlichen Arbeitsgruppen diverse Untersuchungen durchgeführt. Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse mit Tabakrauchkondensat sind im Hinblick auf molekulare Mechanismen des programmierten Zelltods oftmals variabel abhängig von den gewählten Untersuchungsbedingungen (Carnevali et al. 2003, Liu et al. 2005, Wickenden et al. 2003). So zeigte eine Arbeit von Hoshino, dass eine Konzentration von 5 % eines Tabakrauchextrakts Apoptose in A549-Zellen induzieren kann, Konzentrationen von 10 % und mehr des gleichen Extrakts hingegen eine Nekrose in den Zellen auslösen (Hoshino et al. 2001). Eine Untersuchung von Carnevalli zeigte die konzentrationsabhängige Induktion von oxidativem Stress und Apoptose in humanen Lungenfibroblasten, die mit 1 % bis 10 % eines Tabakrauchextrakts behandelt wurden (Carnevali et al. 2003). Diesen Beobachtungen stehen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Wickenden gegenüber, welche die Induktion einer Nekrose in Lungenzellen (A549) und die Hemmung eines mit Staurosporin induzierten programmierten Zelltods nach der Behandlung mit Tabakrauchkondensat feststellen konnten (Wickenden et al. 2003). Die Untersuchung von Hellermann hingegen zeigte, dass in der Lungenzelllinie NHBE eine konzentrationsabhängige Zunahme apoptotischer Zellen nach Behandlung mit Kondensat zu verzeichnen war, unter den gleichen Bedingungen blieb der Anteil apoptotischer A549-Zellen jedoch unverändert. Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass der MAPKinase-Signalweg sowie NF<sub>K</sub>B nach Behandlung mit Kondensat aktiviert wurden (Hellermann et al. 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen zusätzlich zu den Versuchsreihen mit o-Cresol, Phenol und TPA *in-vitro* Versuchsreihen mit Tabakrauchkondensat in den zur Verfügung stehenden Zellsystemen durchgeführt werden.

Untersucht werden soll, ob und wenn ja welche Effekte verschiedene Tumorpromotoren aus der phenolischen Fraktion des Tabakrauchs auf den Ablauf des programmierten Zelltods haben und ob sich Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten im Vereinem bekannten Tumorpromotor (TPA) und zum Kondensat aleich zu herausarbeiten lassen. Anzumerken ist hier, dass die Tumorpromotion ein sehr langwieriger Prozess ist, der durch in vitro-Kurzzeittests nicht in seinem vollen Ausmaß simuliert werden kann. Auch ist eine dauerhafte, kumulierende Exposition der Lungenzellen mit den Testsubstanzen, wie es unter in vivo-Umständen bei einem Raucher der Fall wäre hier nicht möglich. In der Vergangenheit wurde jedoch deutlich, dass die Krebsentstehung durch Tabakrauch beim Menschen umso besser verstanden wird, je mehr Details über mögliche molekulare Abläufe beim Rauchen, Wirkmechanismen von Tumorpromotoren und den Ablauf des programmierten Zelltods bekannt sind (vgl. dazu die Übersichtsarbeit von (DeMarini 2004)). Mit Hilfe neuer Details des Ablaufs des programmierten Zelltods ist es unter anderem möglich, verbesserte Angriffspunkte in der Krebstherapie zu entwickeln (Fulda und Debatin 2004, Gerl und Vaux 2005, Reed 2004). So bietet z. B. die Entwicklung von Molekülen, welche die anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie hemmen, einen neuen vielversprechenden Ansatz in der Krebstherapie (O'Neill et al. 2004).

## 2 Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Substanzen und Geräte sind in Abschnitt 2.1 und 2.2 aufgelistet und werden der Übersichtlichkeit halber bei der Methodenbeschreibung im Einzelnen nicht wiederholt. Wenn nicht anders angegeben, werden alle Lösungen in Aqua dest. angesetzt.

## 2.1 Chemikalien

Substanz	Herkunftsort	R- und S-Sätze	
Ac-DEVD-AMC	Bachem, Weil am Rhein	-	-
Acrylamid	Biomol GmbH, Hamburg	R: 24/25-45- 46- 48/23/24/25	S: 45-53
Agarose (Biorad Certified Molecular Biology Agarose)	Bio-Rad, München	-	-
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München	R: 8-22- 36/37/38- 42/43	S: 22-24-26- 37
7-Amino-4-methylcumarin	Bachem, Weil am Rhein	-	-
Annexin-V Fluos Kit	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg	-	-
anti-mouse IgG	Sigma-Aldrich, Steinheim	-	-
anti-rabbit IgG	Sigma-Aldrich, Steinheim	-	-
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim	R: 42/33	S: 36
Bax (N-20) Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg	-	-
Bcl-2 (C-2) Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg	-	-
Bronchial Epithelial Cell Basal Medium, serumfrei	Cambrex Bioscience, Walkersville, USA	-	-
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Steinheim	R: 36/37/38	S: 26-36
Basal Medium Eagle	ICN Biomedicals, Aurora, USA	-	-

Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim	R: 34-20/21/22	S: 24-26-45- 36/37/39
BrdU Labeling and Detection Kit	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg	R: 46-61- 20/21/22	S: 45- 36/37/39
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim	-	-
BSA Albumin Bovine	Sigma-Aldrich, Steinheim	-	-
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt	-	-
Chloroform	Merck, Darmstadt	R: 22-3840- 48/20/22	S: 36/37
CM-H <sub>2</sub> DCFDA	MoBiTec, Göttingen	-	-
Coomassie Brilliant Blue	Sigma-Aldrich, Steinheim	-	S: 22-24/25
o-Cresol	Fluka, Buchs, Schweiz	R: 24/25-34	S: 36/37/39- 45
Desoxycholsäure-Na-Salz	Sigma-Aldrich, Steinheim	R: 22-37	S: 22-26-36
Dithiotreitol (DTT)	ICN Biomedicals, Aurora, USA	R: 20/21/22- 36/37/38	S: 26-36
Dimethylsulfoxid, Uvasol	Merck, Darmstadt	-	S: 24/25
ECL Western Blotting Detection	Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK	-	-
Ethylenglycol-bis(2- aminoethylether)- <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N'</i> , <i>N'</i> - tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim	-	-
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt	R: 10-35	S: 23-26-45
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt	R: 11	S: 7-16
Ethidiumbromid 10mg/ml	ICN Biomedicals, Aurora, USA	R: 46-36/37/38	S: 45-26-22- 36/37/39
Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot	-	-
Ficoll 400	Sigma-Aldrich, Steinheim	-	-
Giemsa-Azur-Eosin Methylenblau-Lösung für die Mikroskopie	Merck, Darmstadt	R: 11- 23/24/25-39	S: 7-16- 36/37-45
Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim	-	-

Glycerol, wasserfrei	Merck, Darmstadt	-	-
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim	-	-
Glycin	Roth, Karlsruhe	-	-
ICAD (B-6) Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg	-	-
High-Range Rainbow Molecular Weight Markers (14300-220000)	Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK	-	-
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N´-2- ethan-sulfonsäure (HEPES)	Serva, Heidelberg	-	-
Imobilon-P Transfer Membran	Milipore Co., Bedford, USA	-	-
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt	R: 10-20	S: 24/25
Isopropanol	Roth, Karlsruhe	R: 11	S: 7-16
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt	-	-
Kaliumdichromat	Merck, Darmstadt	R: 23/24/25- 33-35	S: 26- 36/37/39-45
Kaliumdihydrogensulfat	Merck, Darmstadt	R: 34-37	S: 26- 36/37/39-45
Kaliuwa huudua widu läteraha u	Marak Darmatadt	D: 25	S. 2.26
Kallumnydroxidplatzchen	Merck, Darmstaut	R. 30	5. 2-20
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim	-	-
Leupeptin Low-Range Molecular Weight Markers (2500-45000)	Sigma-Aldrich, Steinheim Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK	-	-
Leupeptin Low-Range Molecular Weight Markers (2500-45000) Magermilchpulver Naturaflor	Sigma-Aldrich, Steinheim Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK Töpfer, Allgäu	- -	-
Kallumnydroxidplat2chenLeupeptinLow-Range Molecular Weight Markers (2500-45000)Magermilchpulver Naturaflor Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK Töpfer, Allgäu Merck, Darmstadt	- - -	- -
KallumnydroxidplatzchenLeupeptinLow-Range Molecular Weight Markers (2500-45000)Magermilchpulver NaturaflorMagnesiumchloridMercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK Töpfer, Allgäu Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt	- - - R: 23/24/25-36	- - - - S: 26-28-36- 44
KaliumnydroxidplatzchenLeupeptinLow-Range Molecular Weight Markers (2500-45000)Magermilchpulver NaturaflorMagnesiumchloridMercaptoethanolMethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK Töpfer, Allgäu Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt	- - - R: 23/24/25-36 R: 11-23/25	- - - S: 26-28-36- 44 S: 7-16-24- 25
Kaliumnydroxidplat2chenLeupeptinLow-Range Molecular Weight Markers (2500-45000)Magermilchpulver NaturaflorMagnesiumchloridMercaptoethanolMethanolMitoCapture™ Apoptosis Detection Kit	Sigma-Aldrich, Steinheim Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK Töpfer, Allgäu Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt UKE Apotheke MoBiTec, Göttingen	- - - R: 23/24/25-36 R: 11-23/25 -	- - - S: 26-28-36- 44 S: 7-16-24- 25 -
Kaliumnydroxidplat2chenLeupeptinLow-Range Molecular Weight Markers (2500-45000)Magermilchpulver NaturaflorMagnesiumchloridMercaptoethanolMethanolMitoCapture™ Apoptosis Detection KitNatriumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK Töpfer, Allgäu Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt UKE Apotheke MoBiTec, Göttingen Merck, Darmstadt	- - - R: 23/24/25-36 R: 11-23/25 -	- - - S: 26-28-36- 44 S: 7-16-24- 25 -
Kaliumnydroxidplat2chenLeupeptinLow-Range Molecular Weight Markers (2500-45000)Magermilchpulver NaturaflorMagnesiumchloridMercaptoethanolMethanolMitoCapture™ Apoptosis Detection KitNatriumacetatNatriumarsenit	Sigma-Aldrich, Steinheim Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK Töpfer, Allgäu Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt UKE Apotheke MoBiTec, Göttingen Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt	<ul> <li>R: 23/24/25-36</li> <li>R: 11-23/25</li> <li>-</li> <li>R: 45</li> </ul>	- - S: 26-28-36- 44 S: 7-16-24- 25 - - S: 53-37-45
Kaliumnydroxidplat2chen         Leupeptin         Low-Range Molecular Weight         Markers (2500-45000)         Magermilchpulver Naturaflor         Magnesiumchlorid         Mercaptoethanol         Methanol         MitoCapture™ Apoptosis         Detection Kit         Natriumacetat         Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK Töpfer, Allgäu Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt UKE Apotheke MoBiTec, Göttingen Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Steinheim	<ul> <li>R: 35</li> <li>-</li> <li>-</li> <li>R: 23/24/25-36</li> <li>R: 11-23/25</li> <li>-</li> <li>-</li> <li>R: 45</li> <li>R: 28-32</li> </ul>	- - - S: 26-28-36- 44 S: 7-16-24- 25 - - S: 53-37-45 S. 28-45

Natriumcitrat	Merck, Darmstadt	-	-
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim	R: 25-32- 35/36	S: 22-36-34
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt	-	-
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt	R: 35	S: 26-37/39- 45
Natriumhydroxid (c= 2mol*l <sup>-1</sup> )	Merck, Darmstadt	R: 35	S: 2-26-27- 37/39
Natriumlaurylsulfat SDS	Bio-Rad, München	R: 20/22-42- 36/37/38-41	S: 26-36-22
Natriumpyrophosphat	ICN Biomedicals, Aurora, USA	R: 36/37/38	S: 26-36
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim	R: 25-36/37/38	S: 26- 36/37/39-45
<i>p</i> -Nitrophenylphosphat-dinatrium (pNPP)	Sigma-Aldrich, Steinheim	-	S: 22-24/25
NP-40 (Nonylphenoxypolyethoxyethanol)	Sigma-Aldrich, Steinheim	R: 37-41	S: 26-39
Phenol, Festsubstanz	Fluka, Buchs, Schweiz	R: 23/24/25- 34- 48/20/21/22- 68	S: 24/25-26- 28-36/37/38- 45
Phenol	Sigma-Aldrich, Steinheim	siehe oben	siehe oben
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim	R: 26/27/28- 34-15	S: 45- 36/37/39-22
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim	R: 46-36/37/38	S: 45-26- 36/37/39-22
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim	-	-
RNAse A	Sigma-Aldrich, Steinheim	-	-
Salzsäure rauchend	Merck, Darmstadt	R: 34-37	S: 26- 36/37/39-45
Soybean Trypsin Inhibitor	Worthington, CellSystems, St. Katharinen	-	-
TEMED	Roth, Karlsruhe	-	-
o-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)	ICN, Aurora, USA	R: 26/27/28- 36/37/38-41- 40	S: 45-26- 36/37/39

Titriplex III für die Molekularbiologie	Sigma-Aldrich, Steinheim	R: 36	-
Trizma <sup>®</sup> base (2-Amino-2- (hydroxymethyl)-1,3-propanediol)	Sigma-Aldrich, Steinheim	R: 36/38	S: 26-36
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim	R. 45-61- 20/21/22- 36/37/38	S: 45-26- 36/37/39
Tween-20 <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich, Steinheim	-	-
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt	R: 34	S: 3-28- 36/39
Xylencyanol	Merck, Darmstadt	R: 36	S: 24

#### 2.2 Geräte

Gerät	Herkunftsort
Bio-Rad Mini Protean 3 Cell	Bio-Rad, München
Bio-Rad Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad, München
Bio-Rad Power PacBasic Power Supply	Bio-Rad, München
ELISA Reader	SLT Labinstruments, Crailsheim
FACSCalibur	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
Gelprint 2000i	BioPhotonics Corporation, Ann Arbor, MI, USA
Horizon 58 Gibco BRL Horizontal Gel Elektrophoresis Apparatus	Life Technologies, Gran Island, N.Y., USA
Mikroskop Olympus IX 51	Olympus, Hamburg
Mikroskop Zeiss, Axiovert 135	Zeiss, Göttingen
Packard Fluoro Count	Bioscience Company, Dowiners Grove, IL, USA

## 2.3 Methoden

#### 2.3.1 Zellkultur

Der M2-Klon von C3H-Mausfibroblasten wurde von Marquardt in den 1970er Jahren nach einer Methode von Chen und Heidelberger hergestellt (Chen und Heidelberger 1969). Die Zellen zeigten sich als geeignet für Transformationsstudien (Marquardt et al. 1974). C3H-M2-Fibroblasten wurden kultiviert bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in ICN's Basal Medium Eagle, versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (100000 I. E./10000 µg/ml), 1 % Glutaminlösung

(100 x) und Natriumhydrogencarbonat. Die Zellen wurden einmal pro Woche transferiert, das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Zum Passagieren wurden die Zellen mit Typsin-EDTA abgelöst.

Die Zelllinie BEAS-2B ist eine humane bronchioepitheliale Zelllinie, die aus den Bronchialepithelzellen eines gesunden Spenders isoliert und mittels SV40-Transformation immortalisiert wurde. Die BEAS-2B-Zellen wurden von der European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, Wiltshire, UK) bezogen und nach ECACC-Vorschrift in serumfreien Bronchial Epithelial Cell Basal Medium (BEBM) bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das BEBM enthält Zusätze von BPE, Hydrocortison, hEGF, Epinephrin, Transferrin, Insulin, Triiodothyronin, Gentamicinsulfat und Retinoinsäure. Das Passagieren der Zellen erfolgte einmal wöchentlich, das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Abgelöst wurden die Zellen mit Typsin-EDTA, im Anschluss wurde die Trypsinwirkung mit einem Inhibitor (Soybean Trypsin Inhibitor) gestoppt. Da der ECACC die tatsächliche Passagenummer der BEAS-2B-Zellen nicht bekannt ist, wurden die Zellpassagen fortlaufend, beginnend bei +1 gekennzeichnet. Für sämtliche Versuchsreihen wurden ausschließlich Zellpassagen von +5 bis +20 verwendet.

#### 2.3.2 Mikroskopische Untersuchungen

Für die mikroskopischen Aufnahmen wurden die BEAS-2B-Zellen in 75 ml-Kulturflaschen ausplattiert und alle zwei Tage mit frischem Medium versehen. Nach vier Tagen wurden sie mit den Testsubstanzen behandelt. Nach Inkubationszeiten von 24 bis 72 Stunden wurden die BEAS-2B-Zellen im Phasenkontrast (Ph1) bei einhundertfacher Vergrößerung mikroskopiert (Mikroskop Olympus IX51) und fotografiert mit einer Color-View-Kamera (Soft Imaging System, Münster). Die Bilder wurden mit Hilfe der Software analySIS Version 3.1 (Soft Imaging System, Münster) ausgewertet.

Nach Ausplattieren der C3H-M2-Fibroblasten in 6 cm-Kulturschalen erfolgte eine Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen. Im Anschluss an eine maximale Inkubationszeit von 168 Stunden wurden sie mit Methanol fixiert und mit verdünnter Giemsa-Lösung gefärbt. Die Bilder der C3H-M2-Fibroblasten wurden mit einem Zeiss Axiovert 135-Mikroskop und bei einer Vergrößerung von 200 x mit einer Zeiss Axicam aufgenommen.

verwendete Reagenzien:

Giemsa-Lösung 1:10 verdünnte Giemsa-Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung für die Mikroskopie

#### 2.3.3 Untersuchungen auf tumorpromovierende Eigenschaften mittels Transformationstest

Der Transformationstest wurde von der Arbeitsgruppe Marquardt am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums 26
Hamburg-Eppendorf durchgeführt und dient der Untersuchung von tumorpromovierenden Eigenschaften ausgewählter Testsubstanzen. Verwendet wurde dazu der M2-Klon von C3H-Mausfibroblasten, kultiviert in 6 cm-Kulturschalen wie oben beschrieben. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit Lösungsmittel (Negativkontrolle), N-Methyl-N´-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) und Methylcholanthren (MCA) behandelt. Anschließend wurde neues Wachstumsmedium dazugegeben und die zu untersuchenden Substanzen wurden hinzu pipettiert. Danach wurde inkubiert mit zweimal wöchentlichem Mediumwechsel alle zwei bis drei Tage. Acht Wochen nach Beginn des Versuchs wurden die Zellen mit Methanol fixiert und mit Giemsa-Lösung gefärbt. Die Morphologie der Zellen wurde lichtmikroskopisch bestimmt und vorhandene Foci wurden gezählt.

#### 2.3.4 Bestimmung der Toxizität (colony formation assay)

Diese Methode gibt Aufschluss über die Zytotoxizität von Testsubstanzen in einem Zellsystem.

Für den Toxizitätstest wurden 100 Zellen pro 6 cm Kulturschale ausplattiert und für 24 Stunden kultiviert. Danach wurde die zu untersuchende Substanz in entsprechender Konzentration hinzu pipettiert und der Ansatz wurde für 24 Stunden inkubiert. Das Medium wurde ohne weitere Substanzzugabe erneut gewechselt, die Zellen wurden über weitere sieben bis zehn Tage inkubiert bei regelmäßigem Austausch des Kulturmediums alle zwei bis drei Tage. Waren im Lichtmikroskop in der Kulturschale ausreichend Kolonien erkennbar (> 50 Kolonien bei einem unbehandelten Kontrollansatz), wurden die Zellen mit Methanol fixiert und anschließend mit Giemsa-Lösung gefärbt. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch (Zhu et al. 2004).

verwendete Reagenzien:

Giemsa-Lösung 1:10 verdünnte Giemsa-Azur-Eosin Methylenblau-Lösung für die Mikroskopie

# 2.3.5 Bestimmung der Proliferation und DNA-Neusynthese mittels Proliferations-Assay/5-Bromo-2´-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III

Eine vermehrte Zellproliferation und DNA-Synthese kann mit Hilfe von 5-Bromo-2'deoxy-uridin (BrdU) sichtbar gemacht werden. Dazu wird das BrdU-Molekül anstelle der Base Thymidin in die frisch synthetisierte DNA eingebaut. Durch die Bindung eines mit peroxidase-gekoppeltem monoklonalen Antikörpers an das BrdU kann die Menge an eingebautem BrdU bestimmt werden, sie entspricht der Menge neu synthetisierter DNA in der Zelle. Nach Zugabe und Spaltung des Peroxidasesubstrats wird das farbige Endprodukt photometrisch bestimmt. Je intensiver die Farbgebung, desto mehr DNA wurde synthetisiert. Für den BrdU-Assay wurden 6 x  $10^3$  Zellen in 100 µl Zellmedium auf 96well-Platten ausplattiert und für 24 Stunden wachsen gelassen. Im Anschluss wurden die Testsubstanzen in entsprechender Konzentration hinzugefügt und es wurde erneut für 24 Stunden inkubiert. Der weitere Verlauf des Tests erfolgte nach Herstelleranweisung für das 5-Bromo-2´-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III der Firma Roche Diagnostics für adhärente Zellen. Dabei wurde das BrdU in einer Konzentration von 10 µM für 18 Stunden zugesetzt. Nach mehreren Wasch-, Markierungs- und Inkubationsschritten erfolgte die Messung der Absorption in einem ELISA-Reader mit einem Messfilter von 405 nm und einem Referenzfilter von 490 nm. Berechnet wurde der Einbau an BrdU wie folgt: BrdU-Inkorporation =  $A_{405}$  nm –  $A_{490}$  nm. Sämtliche Waschschritte wurden mit 1 x PBS durchgeführt, auf die Verwendung des Substratverstärkers konnte verzichtet werden.

verwendete Reagenzien:

1 x PBS	50 mM K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	150 mM NaCl
	pH 7,2
Fixierlösung	70 % Ethanol in HCl (c = 0,5 mol* $1^{-1}$ )

# 2.3.6 Bestimmung der Phosphatidylserin (PS)-Externalisierung an der Zellmembran mit Hilfe des Annexin-V Fluos Kit

Mit dem Annexin-V Fluos Kit der Firma Roche Diagnostics lassen sich apoptotische und nekrotische Zellen aufgrund einer Phosphatidylserin(PS)-Externalisierung an der Mitochondrienmembran unterscheiden.

Phosphatidylserin befindet sich normalerweise an der Innenseite der Plasmamembran von Zellen, umgeben von Membranlipiden der Lipiddoppelschicht. Beim Eintritt einer Apoptose wird PS zur Außenseite der Plasmamembran exponiert (Externalisierung), wo es von Annexin-V, einem Phospholipidbindungsprotein, gebunden werden kann. Die Plasmamembran bleibt bei der Apoptose intakt. PS ist an der Oberfläche apoptotischer Körperchen nachweisbar und signalisiert beim programmierten Zelltod den Nachbarzellen, dass die Zellfragmente phagozytiert werden sollen. Das Protein Annexin-V ist an den Farbstoff Fluos gebunden und zeigt dadurch eine grüne Fluoreszenz.

Sterben Zellen durch Nekrose, kommt es zu Schädigungen der Zellmembran und die an der Innenseite der Membran liegenden PS-Moleküle können von Annexin-V gebunden werden. Zur Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose ist daher eine weitere Färbung notwendig. Mit Hilfe des DNA-Farbstoffs Propidiumiodid (PI) (rote Fluoreszenz), der nur die geschädigte durchlässige Plasmamembran nekrotischer Zellen passieren kann, ist eine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen im insgesamt von Annexin-V Fluos positiv gefärbten Zellcluster möglich. Nekrotische Zellen werden von PI und Annexin-V Fluos gefärbt, sie fluoreszieren rot, apoptotische Zellen werden nur von Annexin-V Fluos angefärbt und zeigen grüne Fluoreszenz. Beide Farbstoffe können durchflusszytometrisch analysiert werden.

Für die Versuchreihen wurden je nach Inkubationszeit zwischen 5 x 10<sup>5</sup> und 2 x 10<sup>5</sup> BEAS-2B-Zellen in 75 ml-Kulturflaschen ausplattiert und mit den Testsubstanzen behandelt. Nach entsprechender Inkubation wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin-EDTA abgelöst. Für den weiteren Versuch wurden 1 x 10<sup>6</sup> Zellen ausgezählt. Die entsprechende Menge an Zellsuspension wurde weiter aufgearbeitet wie in der von Roche beigefügten Vorschrift beschrieben (waschen mit 1x PBS, abzentrifugieren, in Markierungspuffer resuspendieren) und bis zur Messung am Durchflusszytometer FACSCalibur lichtgeschützt auf Eis aufbewahrt. Kurz vor der Messung wurden die Proben mit 400 µl Inkubationspuffer versetzt und zügig am FACS vermessen. Für die grüne Fluoreszenz wurde der FITC-Filter verwendet, für die rote der PI-Filter. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CellQuest Software in Dot-Plots. Dabei wurde die Anzahl rotfluoreszierender Zellen mit PI (Ordinate) gegen die Anzahl der grünfluoresziender Zellen mit Annexin-V FITC (Abzisse) aufgetragen.

verwendete Reagenzien:

Vol Mollaoto i toagolizio	
Inkubationspuffer	10 mM HEPES/ NaOH, pH 7,4
	140 mM NaCl
	5 mM CaCl <sub>2</sub>
Propidiumiodidlösung	50 μg/ml
Markierungspuffer	20 µl Annexin-V-Fluos Markierungsreagenz
	20 µl Propidiumiodidlösung
	1 ml Inkubationspuffer

#### 2.3.7 Untersuchung der DNA-Fragmentierung

Der oligonukleosomale Abbau der DNA kann zum Nachweis des programmierten Zelltods herangezogen werden. In eukaryontischen Zellen ist die DNA-Doppelhelix um Histonproteine gewickelt, diese bilden zusammen die Untereinheiten der Nukleosomen. Während der Apoptose wird die DNA in definierte Bruchstücke geschnitten. Verantwortlich für diesen Effekt ist eine spezifische Endonuklease, sie zerschneidet die DNA nur zwischen den Nukleosomen. So entstehen DNA-Fragmente einheitlicher Länge von 180 - 200 Basenpaaren oder deren Vielfache, die nach gelelektrophoretischer Auftrennung ein leiterähnliches Muster bilden (Israels und Israels 1999).

Findet hingegen eine Nekrose in der Zelle statt, so werden die DNA und die Histonproteine willkürlich abgebaut und es entstehen Fragmente unterschiedlicher Größe, die dann im Agarose-Gel kein Leitermotiv ergeben, sondern einen durchgehenden, nicht strukturierten Streifen bilden.

Die Methode von Vermes (Vermes et al. 1995) zur gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA-Basenfragmenten wurde für die Untersuchungen zur DNA-Fragmentierung leicht modifiziert. Für die Versuchsreihen mit M2-Fibroblasten wurden je nach Inkubationszeit zwischen 3.5 x  $10^5$  und 6 x  $10^5$  Zellen in 10 cm Kulturschalen ausplattiert, für die BEAS-2B-Versuchsreihen wurden zwischen 3 x 10<sup>5</sup> und 6 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Kulturschale benötigt. Nach mindestens vier Tagen wurden die Zellen mit den Testsubstanzen behandelt und nach Ablauf der Inkubationszeit mit Hilfe eines Gummiwischers geerntet, mit 1 x PBS gewaschen und abzentrifugiert (10 min, 20.000 g). Das Zellpellet wurde in 600 µl Digestionspuffer aufgenommen und mit 15 µl Proteinase K-Lösung sowie 40 µl SDS-Lösung versetzt. Die Proben wurden im Anschluss bei 37°C im Inkubator für mindestens zwei Stunden aufgeschlossen und die Nukleinsäuren mit absolutem Ethanol bei –20°C gefällt. Nach 30 Minuten konnte das Pellet abzentrifugiert (10 min, 20.000 g) werden und in 300 µl TE-Puffer und 100 µl NaCI-Lösung aufgenommen werden. Im Anschluss erfolgte die Extraktion der Nukleinsäuren mit Hilfe einer Phenol-Chloroform-Extraktion. Dazu wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen PCI-Gemisch versetzt, zwei Minuten geschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation (10 min, 20.000 g) getrennt. Die obere Phase wurde abgenommen und mit dem 0,1-fachen Volumen Natriumacetat-Lösung, sowie dem 2,5-fachen Volumen Ethanol versetzt. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte für 30 Minuten bei –20°C. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 50 µl TE-Puffer aufgenommen, mit 2 µl RNAse A-Lösung (10 mg/ml) versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 250 µl TE-Puffer erfolgte eine weitere PCI-Extraktion wie oben beschrieben. Nach Zentrifugation wurde das erhaltene Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in Abhängigkeit von der Pelletgröße in TE-Puffer aufgenommen. Die Gehalts- und Reinheitsbestimmung der isolierten DNA erfolgte photometrisch bei 260 nm und 280 nm. Für die anschließende gelelektrophoretische Auftrennung der DNA wurde pro Ansatz eine Menge von 5 µg DNA mit Probenpuffer versetzt und in einem 1,8 %igen Agarosegel in 1 x TAE für 30 Minuten bei 30 V und weitere zwei Stunden bei 40 V aufgetrennt. Nach Fixierung der DNA auf dem Gel mit 5 mM Natronlauge wurde das Gel mit Ethidiumbromid-Lösung gefärbt, mit destilliertem Wasser entfärbt und unter UV-Licht fotografiert und ausgewertet.

verwendete Reage	enzien:		
Digestionspuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8	Ethidiumbromid-	0,1 M Tris-HCI
	150 mM NaCl	Lösung	0,1 M NaCl
	5 mM EDTA		5 µg/ml Ethidiumbromid
Natriumacetat- Lösung	3 M Na-acetat, pH 5,2	1 x PBS	50 mM K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
			150 mM NaCl
			pH 7,2
		1	

6 x Probenpuffer	0,25 % Bromphenolblau	Proteinase K	10 mg/ml	
	0,25 % Xylencyanol			
	15 % Ficoll 400			
PCI	Phenol 25Teile	SDS	20 %	
	Chloroform 24Teile			
	Isoamylalkohol 1Teil			
1 x TAE	40 mM Tris-actetat	TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,6	
	1 mM EDTA		1 mM EDTA	

### 2.3.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford handelt es sich um ein colorimetrisches Verfahren, das zur Quantifizierung von Gesamtproteinmengen dient. Dabei geht der blaue Säurefarbstoff Coomassie Brilliant Blue in saurer Lösung eine Bindung mit dem vorhandenen Protein ein. Die Proteinbindung verschiebt das Absorptionsmaximum des Farbstoffs nach 595 nm.

Für die photometrische Doppelbestimmung des Proteingehalts wurden 500  $\mu$ l Aqua dest. mit ein bis zwei  $\mu$ l Zelllysat versetzt und 500  $\mu$ l Bradford-Reagenz hinzugefügt wie in der Herstelleranleitung angegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Proteingehalt gemessen. Aus Lösungen mit 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5 und 10  $\mu$ g/ml BSA wurde eine Kalibrierkurve ermittelt, der Proteingehalt der Proben wurde dann über die Regressionsgerade berechnet.

## 2.3.9 Western-Blot Untersuchungen der Proteine Bax, Bcl-2 und ICAD

Mit Hilfe der Western-Blot-Technik werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend mittels spezifischer Antikörper detektiert.

Die in dieser Arbeit zu untersuchenden Proteine (Bax, Bcl-2 und ICAD; vgl. Abschnitt 1.6.1 und 1.6.2) wurden dazu isoliert, in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die Proteinisolierung erfolgte in Lysispuffer unter Zusatz von verschiedenen Protease-Inhibitoren, nach einer 10-minütigen Behandlung mit Ultraschall wurde die Proteinmenge nach Bradford bestimmt. Dann wurden die Proben mit Laemmli-Puffer 1:3 verdünnt und auf 100°C erhitzt. Für die SDS-PAGE wurden 40 µg Protein aufgetragen. Nach der Elektrophorese bei 27 mA für 80 Minuten in einem 12 %igen Polyacrylamidgel wurden die Proteine auf die PVDF-Membran durch Tank-Blotting bei 250 mA für 110 Minuten transferiert. Die anschließende Coomassie-Färbung des Gels diente zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen. Nach dem die Membran für eine Stunde inkubiert worden war, wurde sie in die entsprechende Antikörper-Lösung (Bax in Verdünnung 1:1.000, Bcl-2 in

Verdünnung 1:80, ICAD in Verdünnung 1:5.000) gelegt und je nach AK zwischen einer Stunde bei Raumtemperatur (für Bax und ICAD) oder zwölf Stunden (für Bcl-2) bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit TBS wurde in Blockierlösung mit spezifischem Zweitantikörper (anti-Maus IgG in Verdünnung 1:6.000; anti-Kaninchen IgG in Verdünnung 1:10.000) für eine Stunde inkubiert. Danach wurde erneut gründlich gespült, um den überschüssigen Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde dann mit ECL-Entwickler behandelt und die Lichtreaktion auf einem Röntgenfilm festgehalten. Um eine Vergleichbarkeit der Blots für unterschiedliche Proteine zu gewährleisten, musste die Membran mehrmals entwickelt werden. Dazu wurde die vorhandene, an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase durch Waschen der Membran in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung zerstört, die Membran konnte dann wieder analog der ersten Antikörper-Reaktion mit einem ersten (Bax, Bcl-2) und zweiten Antikörper anderer Spezies (anti-Maus IgG, anti-Kaninchen IgG) behandelt werden. Die entwickelten Röntgenfilme wurden fotografiert und die Intensität der entstanden Banden miteinander verglichen.

verwendete Rea	genzien:		
RIPA-	0,15 M NaCl	Laemmli-Puffer III	5,5 % SDS
Lysisputter	1 mM EGTA		41 % Glycerin
	5 mM Tris-OH		0,2 M Tris, pH 7,0
	1 % NP-40		6,9 % Mercaptoethanol
	0,25 % Desoxycholsäure-		1,4 mM EDTA
	Na-Salz		0,001 % Bromphenolblau
RIPA-Mix	0,01 mg/ml Aprotinin	12 % SDS-	
	0,01 mg/ml Leupeptin	Polyacrylamid-Gel	
	1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>		
	1 mM NaF		
	1 mM PMSF		
	40 mM $\beta$ -Glycerolphosphat		
	10 mM Benzamidin		
	1 mM PNPP		
	1 mM Na-pyrophosphat		
Elektrophorese- Puffer	25 mM Tris-OH	Blot-Puffer	50 mM Tris-OH
	0,2 M Glycin		0,2 M Glycin
	0,1 % SDS		20 % Methanol

Blockierlösung	5 % Milchpulver	TBS	10 mM Tris-Cl
	0,1 % Tween-20		150 mM NaCl
	0,02 % Na-azid		pH 7,5
	in 1x TBS		

#### 2.3.10 Methode zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität

Caspase-3 zählt im Ablauf des programmierten Zelltods zu den Effektor-Caspasen, die im weiteren Verlauf dieses Prozesses eine Vielzahl an Substraten spalten können. Die Aktivität der Caspase-3 kann anhand der Umsetzung eines mit einem Fluorochrom konjugierten spezifischen Substrats (Ac-DEVD-AMC) bestimmt werden. Nach Spaltung des Substrats durch die aktive Caspase wird das Fluorochrom AMC freigesetzt und die Menge an emittiertem Licht gemessen (Kohler et al. 2002, Pennington und Thornberry 1994, Thornberry et al. 1997).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode zur Aktivitätsbestimmung der Caspase-3 wurde nach der Methode von Schäfer und Dartsch modifiziert (Dartsch et al. 2002). Je nach Inkubationszeit der Versuchsansätze wurden zwischen 9 x 10<sup>5</sup> und 2,5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Kulturschale ausplattiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in der Schale mit kaltem Lysispuffer aufgenommen, 15 Minuten bei 4°C lysiert und anschließend eine Minute bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf Eis aufbewahrt. In der Zwischenzeit wurde die Proteinmenge des Zelllysats nach Bradford bestimmt. Für den Caspase-Assay wurden in einer 96well-Platte pro Ansatz 200 µg Protein mit Caspase-3-Substrat (Ac-DEVD-AMC) versetzt (Endkonzentration 36,6 µM) und mit 1 x HEPES-Puffer auf ein Volumen von 200 µl verdünnt. Eine Doppelbestimmung wurde durchgeführt. Die 96well-Platte wurde mit Folie abgeklebt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Es wurde im FluoroCount bei Anregungs-/Emissionswellenlängen 360 nm und 460 nm gemessen. Aus Lösungen mit 1 µM, 5 µM, 10 µM und 30 µM AMC wurde eine Kalibrierkurve ermittelt, die in den Proben umgesetzte Menge an Caspase-3-Substrat wurde dann über die Regressionsgerade berechnet.

verwendete Reagenz	zien:		
2 x HEPES-Puffer	40 mM HEPES	Ac-DEVD-AMC	1 mg/ml in DMSO
	20 % Glycerol		
	4 mM DTT		
Lysispuffer	10 mM HEPES	I	
	2 mM EDTA		
	1 % NP-40		
	5 mM DTT		
	1 mM PMSF		
	20 µg/ml Leupeptin		
	10 µg/ml Aprotinin		

# 2.3.11 Methode zur Bestimmung von Veränderungen im Mitochondrienpotential mittels MitoCapture<sup>™</sup> Apoptosis Detection Kit

Veränderungen im Mitochondrienmembranpotential ( $\Delta \Psi_m$ ) können eine wichtige Rolle beim Ablauf des programmierten Zelltods spielen (Henry-Mowatt et al. 2004). Zur Untersuchung derartiger Veränderungen wurde das MitoCapture<sup>TM</sup> Mitochondrial Apoptosis Detection Kit (MoBiTec, Göttingen) eingesetzt. Der kationische Fluoreszenzfarbstoff MitoCapture<sup>TM</sup> fluoresziert unterschiedlich in gesunden und apoptotischen Zellen. In gesunden Zellen wird der Farbstoff in den Mitochondrien aggregiert, rote Fluoreszenz ist vorherrschend. Aufgrund eines veränderten Mitochondrienpotentials kann der Farbstoff in apoptotischen Zellen nicht aggregieren und liegt daher grün-fluoreszierend als Monomer in der Zelle vor (Chen et al. 2001).

Für die Versuchsreihen wurden je nach Inkubationsdauer zwischen 5 x  $10^5$  und 2 x  $10^5$  BEAS-2B-Zellen in 75 ml-Kulturflaschen ausplattiert. Nach dem Abtrypsinieren und Auszählen der Zellen wurden 1 x  $10^6$  Zellen nach Anleitung des Herstellers aufbereitet und am FACSCalibur vermessen, wobei für die grüne Fluoreszenz der FITC-Filter und für die rote Fluoreszenz der PI-Filter am Gerät eingestellt wurden. Die Messung wurde mittels CellQuest Software in Histogramm-Plots ausgewertet. Dabei wurden die gezählten Ereignisse (events) gegen die Menge an Fluoreszenz aufgetragen und die mittlere gemessene Fluoreszenz bestimmt (Kobayashi et al. 2004, Mancini et al. 1997).

### 2.3.12 Detektion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mit dem Farbstoff CM-H<sub>2</sub>DCFDA

Die Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) spielt eine wichtige Rolle beim Ablauf des programmierten Zelltods. ROS sind beteiligt beim Auslösen und Vermitteln apoptotischer Signale, die Mitochondrien können hier als Angriffsziel und Herkunftsquelle für ROS dienen (Buccellato et al. 2004, Saran 2000). Die Umsetzung des nicht fluoreszierenden, oxidationsempfindlichen Farbstoffs 5-(und-6-)-Chlormethyl-2´,7´-dichlorodihydrofluorescin-diacetat-acetylester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probes, Eugene, USA) in sein fluoreszierendes Derivat DCF durch Oxidation detektiert in der Zelle vorhandene reaktive Sauerstoffspezies. Der Farbstoff diffundiert in die Zelle, wo er durch anschließende Oxidation in ein fluoreszierendes Produkt umgewandelt wird, das in der Zelle verbleibt. Eine durchflusszytometrisch bestimmte Zunahme der Fluoreszenz geht einher mit einer zunehmenden Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies.

Die Fluoreszenz wurde für diese Arbeit mit dem FITC-Filter am FACSCalibur bestimmt. Für die Versuchsreihen wurden je nach Inkubationszeit zwischen 5 x 10<sup>5</sup> und 2 x 10<sup>5</sup> Zellen in 75 ml-Kulturflaschen ausplattiert. Die Proben wurden nach Herstellergebrauchsanweisung kombiniert mit der Methode von Oslund aufbereitet (Oslund et al. 2004). Die Zellen wurden nach entsprechender Inkubation mit den Testsubstanzen mit PBS gewaschen, mit 1 µM CM-H<sub>2</sub>DCFDA versetzt und für 15 Minuten bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Der Farbstoff wurde abgenommen, die Zellen wurden gewaschen und mit Medium ohne Zusätze versetzt. Als Positivkontrolle wurden zu einem nicht behandelten Kontrollansatz 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 %ige Stammlösung) hinzugegeben, alle Ansätze wurden erneut für 30 Minuten inkubiert. Das Medium wurde anschließend entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA aus der Kulturflasche abgelöst. Für die Messung am FACSCalibur wurden 1 x 10<sup>6</sup> Zellen ausgezählt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und die Proben am Durchflusszytometer vermessen. Die Messung wurde mit der CellQuest Software ausgewertet. Aus den Histogramm-Plots wurde anschließend die mittlere Fluoreszenzintensität der Proben bestimmt (Limoli et al. 2003).

verwendete Reagenzien: CM-H<sub>2</sub>DCFDA 0,5 mg/ml in Ethanol absolut

#### 2.3.13 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Testreihen wurden eine einfaktorielle ANOVA und ein Vergleich der Mittelwerte mit Tukey's Post Hoc Test unter Annahme der Normalverteilung der Zufallsvariablen durchgeführt. Die p-Werte wurden auf einem Signifikanzniveau von 95 % mit der Software SPSS (Version 11.5) für Windows berechnet.

### 2.3.14 Kondensat

Eine maschinell hergestellte Lösung mit 25 mg/ml Kondensat gelöst in Isopropanol wurde von der Philip Morris GmbH, München zur Verfügung gestellt.

# 3 Ergebnisse der Untersuchungen mit C3H-M2-Mausfibroblasten

Untersucht wurden im ersten Abschnitt dieser Arbeit die Testsubstanzen o-Cresol, Phenol und TPA in C3H-M2-Mausfibroblasten auf ihre Eigenschaften hinsichtlich der Beeinflussung der Signaltransduktionskaskade des programmierten Zelltods. Im weiteren Verlauf wurden die zu untersuchenden Substanzen in humanen Lungenepithelzellen (BEAS-2B) eingesetzt und auftretende Veränderungen bei Merkmalen des programmierten Zelltods analysiert (vgl. dazu Abschnitt 1).

### 3.1 Transformationstest

Bereits vor Beginn der Untersuchungen zu dieser Arbeit wurden von der Arbeitsgruppe Marquardt zwei unabhängige Transformationstests mit den zu untersuchenden Substanzen o-Cresol, Phenol und o-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) durchgeführt. Die Zahl der gebildeten Foci morphologisch transformierter Zellen wurde bestimmt und das Ergebnis ausgewertet. Es wurde eine transformierende Aktivität für TPA und Phenol festgestellt, für o-Cresol war eine nur schwache Aktivität erkennbar (vgl. Tabelle 4). Die C3H-M2-Fibroblasten wurden für 24 Stunden mit MCA, MNNG und DMSO (Negativkontrolle) initiiert und anschließend mit den Testsubstanzen wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben, behandelt. Für Phenol und o-Cresol wurden Konzentrationen von 10 ng/ml bis 1 µg/ml eingesetzt, eine Ansatzreihe mit 250 ng/ml TPA diente als Positivkontrolle in diesem Experiment. Ein mit DMSO behandelter Negativ-Kontrollansatz zeigte bei allen Testsubstanzen keinerlei transformierende Aktivität in den Zellen. Nach Zugabe von o-Cresol waren Foci nur in mit MNNG initiierten Zellen erkennbar. Nach Behandlung mit Phenol ließen sich Foci für MCA und MNNG initiierte M2-Zellen erkennen. Für den bekannten Tumorpromotor TPA wurden Foci in MCA und MNNG initiierten Zellen festgestellt. Tabelle 4 zeigt die Auswertung eines Transformationstests.

Testsubstanzen	Kanzerogene	Kontrollansatz mit DMSO	Behandlung mit MNNG	Behandlung mit MCA
Substanz	Konzentration	[Anzahl der Kultursch Foci/Gesamtmenge d	alen mit transformierte ler pro Ansatz behand	en lelten Kulturschalen]
Kontrolle		0/13	0/15	0/15
ТРА	250 ng/ml	0/15	3/15	4/14
o-Cresol	10 ng/ml	0/13	1/15	0/15
o-Cresol	100 ng/ml	0/11	1/15	0/15
o-Cresol	1000 ng/ml	0/15	1/15	0/15
Phenol	10 ng/ml	0/9	1/15	1/15
Phenol	100 ng/ml	0/15	2/8	2/15
Phenol	1000 ng/ml	0/9	1/15	2/15

Tabelle 4: Auswertung des Transformationstests in M2-Fibroblasten mit den Testsubstanzen. Dargestellt ist ein repräsentatives von insgesamt zwei Testergebnissen. Die Tabelle zeigt die Anzahl der Kulturschalen mit gebildeten Foci im Verhältnis zu der Gesamtanzahl der pro Ansatz behandelten Kulturschalen. Die Kontrollansätze wurden mit DMSO versetzt, die mit TPA behandelten Ansätze dienten als Positivkontrolle.

# 3.2 Morphologische Veränderungen in M2-Fibroblasten nach Behandlung mit den Testsubstanzen o-Cresol und Phenol

Abbildung 5a) und b) zeigen unbehandelte M2-Fibroblasten und im Vergleich dazu Zellen, die mit 50 µM Natriumarsenit (As) behandelt wurden. Nach 24-stündiger Behandlung mit Arsenit zeigten sich toxische Effekte, die Zellen verloren Kontakte zu Nachbarzellen, es waren überwiegend Zelltrümmer erkennbar.



Abbildung 5a): Diese Abbildung zeigt unbehandelte M2-Fibroblasten gefärbt mit Giemsa-Lösung.

#### Abbildung 5b):Gezeigt sind M2-Fibroblasten, die über 24 Stunden mit 50 µM Natriumarsenit behandelt wurden, gefärbt mit Giemsa-Lösung.

Da nach 48 Stunden keine morphologischen Veränderungen unter Einfluss der Testsubstanzen o-Cresol und Phenol (je 100 µg/ml) erkennbar waren, wurden in einer weiteren Versuchsreihe die Zellen für 168 Stunden mit 100 µg/ml der Substanzen inkubiert. Wie aus Abbildung 6a) und b) ersichtlich ist, lassen sich auch hier keine morphologischen Veränderungen erkennen, der Zellrasen bleibt homogen und unverändert wie bei einem unbehandelten Kontrollansatz.



Abbildung 6a): Diese Abbildung zeigt eine Aufnahme von M2-Zellen, die mit 100 µg/ml o-Cresol über 168 h behandelt wurden. Die Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit mit Methanol fixiert und anschließend mit Giemsa-Lösung gefärbt. Vergrößerung 200 x.

Abbildung 6b):Gezeigt sind M2-Fibroblasten nach 168-stündiger Behandlung mit 100 µg/ml Phenol. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und im Anschluss mit Giemsa-Lösung gefärbt. Vergrößerung 200 x.

## 3.3 Einfluss der Testsubstanzen auf die Proliferation der C3H-M2-Fibroblasten

Die Proliferation der M2-Fibroblasten unter Einfluss von o-Cresol, Phenol und TPA zeigt Abbildung 7. Die Zellen wurden über 24 Stunden mit den Testsubstanzen behandelt und anschließend für 18 Stunden mit BrdU markiert. Allein nach Behandlung mit Phenol war eine schwache Erhöhung des Zellwachstums für Konzentrationen von 0,001  $\mu$ g/ml und 0,1  $\mu$ g/ml Substanz erkennbar. Unter Einfluss von o-Cresol blieb das Wachstum der Zellen bis 1  $\mu$ g/ml unverändert und verminderte sich anschließend. Bei einer TPA-Konzentration von 1  $\mu$ g/ml, war eine starke Abnahme der Zellproliferation zu verzeichnen.



Abbildung 7: In dieser Abbildung sind die verschiedenen Proliferationskurven der M2-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit den Testsubstanzen gezeigt. Um die logarithmische Darstellung zu ermöglichen, musste für die unbehandelten Zellen ein Konzentrationswert von 0,000001 angegeben werden.

# 3.4 Untersuchungen zur DNA-fragmentierenden Wirkung von o-Cresol, Phenol und TPA in M2-Fibroblasten

In den Versuchsreihen mit M2-Fibroblasten wurden die Zellen mit der Testsubstanz o-Cresol über 24 und 48 Stunden inkubiert, die o-Cresolkonzentrationen betrugen 0,1 ng/ml bis 100  $\mu$ g/ml. Nach 48 Stunden trat dabei in einigen Ansätzen eine oligonukleosomale Fragmentierung der DNA auf, dieser Effekt konnte jedoch abhängig von der Passage der Zellen und deren Zustand nicht reproduziert werden. Abbildung 8 zeigt die Aufnahme eines Gels und das typische Leitermotiv der fragmentierten DNA bei einer o-Cresolkonzentration von 100  $\mu$ g/ml nach 48 Stunden. In geringerer Konzentration zeigte o-Cresol in den M2-Zellen keine DNA-abbauende Wirkung.

Als Positivkontrolle in allen Experimenten zum oligonukleosomalen Abbau der DNA in den M2-Zellen diente Natriumarsenit (As), das über 24 Stunden in einer Konzentration von 50 µM auf die Zellen einwirkte.



Abbildung 8: Gezeigt ist die Fragmentierung der DNA nach Behandlung der M2-Fibroblasten mit o-Cresol über 48 Stunden. Bei einer Konzentration von 100 µg/ml o-Cresol fand ein oligonukleosomaler Abbau der DNA statt.

Die M2-Fibroblasten wurden mit der zweiten Testsubstanz Phenol ebenso behandelt wie mit o-Cresol. Über einen Inkubationszeitraum von 24 und 48 Stunden zeigte sich nach der Behandlung der Zellen mit Phenolkonzentrationen von 0,1 ng/ml bis 100 µg/ml jedoch keine DNA-abbauende Wirkung in den Zellen (Abbildung 9).



Abbildung 9: Diese Abbildung zeigt die DNA der M2-Fibroblasten nach Behandlung mit Phenol für 48 Stunden. Phenol zeigte keine DNA-abbauende Wirkung.

In weiteren Experimenten wurde dann eine kombinierte Behandlung der Zellen mit Arsenit und o-Cresol durchgeführt um festzustellen, ob o-Cresol als Tumorpromotor die DNA-abbauende Wirkung von As hemmt.

Die Zellen wurden zuerst für 24 Stunden mit o-Cresol behandelt, anschließend wurden 50  $\mu$ M Natriumarsenit hinzu gegeben. Danach wurde erneut für 24 Stunden inkubiert. Ein entsprechender Versuch wurde mit Phenol durchgeführt. Es zeigte sich in mehreren Experimenten, dass nach Gabe sowohl von 100  $\mu$ g/ml o-Cresol als auch von 100  $\mu$ g/ml Phenol jeweils in Kombination mit Arsenit, eine Verstärkung der DNA-Fragmentierung verglichen mit Zellen eingetreten war, die nur mit 50  $\mu$ M Arsenit behandelt wurden. Ein direkter Vergleich dieser Ergebnisse ist in Abbildung 10 dargestellt. Deutlich wurde hier auch der DNA-abbauende Effekt von 100  $\mu$ g/ml o-Cresol allein. Konzentrationen von 200  $\mu$ g/ml o-Cresol und Phenol führten nur zu einem schwach abgegrenzten Leitermotiv auf dem Agarosegel ähnlich wie die Behandlung von M2-Zellen mit 100  $\mu$ g/ml o-Cresol und 100  $\mu$ g/ml Phenol zusammen.



Abbildung 10: Gezeigt ist die DNA-abbauende Wirkung von o-Cresol, Phenol und Arsenit in M2-Zellen. Die Fibroblasten wurden über 48 h mit 100 μg/ml (Bande 3 bis 6 und 9) oder 200 μg/ml o-Cresol und Phenol (Bande 7 und 8) behandelt. Nach 24stündiger Inkubation mit 100 μg/ml o-Cresol oder Phenol wurde je ein Ansatz für weitere 24 h mit Arsenit behandelt (Bande 4 und 6). Bande 9 zeigt ein Leitermotiv, das nach 48-stündiger Behandlung der M2-Zellen mit je 100 μg/ml o-Cresol und Phenol entstanden ist. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit 50 μM As behandelt wurden (Bande 2). Bande 1 zeigt einen unbehandelten Kontrollansatz.

Nach jeweils 48-stündiger Inkubation der Zellen mit dem Tumorpromotor TPA in Konzentrationen von 0,1 ng/ml bis 1 µg/ml zeigte sich kein oligonukleosomaler Abbau der DNA. In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob TPA auf eine durch Natriumarsenit ausgelöste DNA-Fragmentierung inhibierend wirkt. Die M2-Zellen wurden dazu für 24 Stunden mit TPA-Konzentrationen von 0,1 ng/ml bis 1 µg/ml behandelt und im Anschluss mit 50 µM Arsenit versetzt und weitere 24 Stunden inkubiert. Der durch Arsenit verursachte oligonukleosomale Abbau der DNA war für alle TPA-Konzentrationen deutlich erkennbar und ließ sich nicht durch die vorherige Behandlung der Zellen mit TPA beeinflussen. (Ergebnisse sind nicht gezeigt.)

Aus den bisherigen Ergebnissen wurde deutlich, dass die Testsubstanzen in den M2-Fibroblasten einerseits eine anderweitig induzierte DNA-Fragmentierung nicht hemmen können, aber andererseits mit Ausnahme von o-Cresolkonzentrationen ab 100  $\mu$ g/ml selbst keine DNA-fragmentierende Wirkung in den Zellen haben. Da aus der Literatur mehrere Möglichkeiten zur Induktion des programmierten Zelltods bekannt sind, wurde in einer weiteren Versuchsreihe untersucht, ob die Substanzen o-Cresol und TPA auf eine physiologisch induzierte Apoptose Einfluss haben. Für diese Versuchsreihe wurden die M2-Fibroblasten mit Medium gefüttert, das lediglich 2 % FCS enthielt. Nach Zugabe der Testsubstanzen wurde für 120 Stunden inkubiert. Ein oligonukleosomaler Abbau der DNA war danach für alle Substanzkonzentrationen mit Ausnahme von 100  $\mu$ g/ml o-Cresol erkennbar. Bei dieser Konzentration war in zwei unabhängigen Versuchen keine DNA-Fragmentierung zu beobachten (Abbildung 11). Eine Fragmentierung der DNA war nach Zusatz von TPA für alle Konzentrationen (0,1 ng/ml bis 0,1  $\mu$ g/ml) sichtbar. (Ergebnisse nicht gezeigt.)



Abbildung 11: Diese Abbildung zeigt die Fragmentierung der DNA in M2-Fibroblasten nach Zusatz von Medium mit 2 % FCS und unterschiedlichen Konzentrationen von o-Cresol. Die Zellen wurden insgesamt für 120 Stunden inkubiert.

Es stellte sich während dieser Versuchsreihe heraus, dass sich abhängig von der Zellcharge, der Passage und dem Alter der M2-Zellen die Ergebnisse in behandelten Zellen und Kontrollansätzen unterschieden. Vorhandene Ergebnisse mit den Testsubstanzen ließen sich nicht mehr reproduzieren, daher gibt es in dieser Versuchsreihe keine auswertbaren Ergebnisse mit der Testsubstanz Phenol.

Bei der Durchführung weiterer Versuchsreihen mit den M2-Fibroblasten konnten in den Western-Blot-Versuchen, in den Untersuchungen zur Caspase-3-Aktivität und in der morphologischen Betrachtung keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden. Zum Beispiel zeigte sich in vier unabhängigen Untersuchungen zur Caspase-3-Aktivität in den M2-Zellen, die als Doppelbestimmungen durchgeführt wurden, für Arsenitkonzentrationen von 25  $\mu$ M bis 50  $\mu$ M in einigen Ansätzen eine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität, in anderen blieb die Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unverändert. Die unterschiedlichen Caspase-3-Aktivitäten traten innerhalb der Doppelbestimmung und zwischen den einzelnen Versuchen auf.

Aufgrund der Variabilität und der mangelnden Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse in M2-Zellen wurden sämtliche Versuchsreihen mit den M2-Fibroblasten abgebrochen.

# 4 Ergebnisse der Untersuchungen mit BEAS-2B-Zellen

#### 4.1 Versuchsreihen mit o-Cresol

#### 4.1.1 Ermittlung der effektiven Konzentrationen der Testsubstanz o-Cresol in BEAS-2B-Zellen

Um festzustellen, in welchem Konzentrationsbereich toxische Effekte für die Testsubtanz o-Cresol zu erwarten sind, wurde in einem colony formation assay ein Konzentrationsspielraum untersucht, der sowohl Konzentrationen umfasst, denen Lungenzellen beim Rauchen einer Zigarette ausgesetzt sind (0,1 ng/ml bis 1 ng/ml o-Cresol) bis hin zu Konzentrationen, die aufgrund der Giftigkeit der Substanz im toxischen Bereich liegen (ab 100  $\mu$ g/ml) (Boatto et al. 2004). Dazu wurden 100 Zellen ausplattiert und für 24 Stunden mit der entsprechenden Konzentration o-Cresol behandelt, es folgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden anschließend für weitere sieben bis zehn Tage inkubiert. Nach Fixierung und Färbung mit Giemsa-Lösung wurden die Kolonien gezählt.



Abbildung 12: Gezeigt ist die mittlere Anzahl (± StabwN) der entstandenen BEAS-2B-Kolonien nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen o-Cresol. Im Anschluss an die Behandlung mit o-Cresol wurden die Zellen für mehrere Tage inkubiert, die entstandenen Kolonien mit Giemsa-Lösung gefärbt und ausgezählt. Für die logarithmische Darstellung aller Werte musste für den unbehandelten Kontrollansatz ein Konzentrationswert von 0,00001 μg/ml angegeben werden (n = 3).

Aus Abbildung 12 wird deutlich, dass Konzentrationen bis zu 10  $\mu$ g/ml o-Cresol unter den gegebenen Bedingungen keine toxischen Effekte auf die Zellen hatten. Bei Behandlung mit höheren Konzentrationen von 10  $\mu$ g/ml bis 1 mg/ml zeigten sich jedoch deutlich toxische Effekte. Die Anzahl der Kolonien nahm stark ab, wobei die IC<sub>50</sub> (inhibitory concentration) für o-Cresol bei etwa 140  $\mu$ g/ml lag. Für weitere Versuchsreihen wurden o-Cresolkonzentrationen aus dem toxischen Bereich der Substanz ausgewählt, da hier am ehesten Effekte in den Zellen zu erwarten waren.

Zu berücksichtigen ist bei den folgenden Versuchen, dass aus den Ergebnissen weder auf Effekte einer Langzeitexposition von Rauchern mit den Testsubstanzen noch auf eine tumorpromovierende Wirkung geschlossen werden kann, da die Tumorpromotion im Organismus ein langwieriger Prozess ist. Die Ergebnisse dieser Kurzzeitexperimente können daher nur Hinweise auf mögliche Effekte geben, aber keine exakte *in-vivo*-Situation darstellen.

### 4.1.2 Analyse der Proliferation mit Hilfe des BrdU-Assay nach Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit o-Cresol

Eine vermehrte DNA-Synthese unter Einfluss der Testsubstanzen im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrollansatz kann wie in Abschnitt 2.3.5 beschrieben mit

Hilfe des BrdU-Proliferationsassay festgestellt werden. Die über 24 Stunden mit 0,01  $\mu$ g/ml und 1  $\mu$ g/ml o-Cresol behandelten BEAS-2B-Zellen zeigten eine signifikant erhöhte DNA-Synthese im Vergleich zum Kontrollansatz (p = 0,023). Nach der Behandlung mit höheren Konzentrationen o-Cresol (ab 1  $\mu$ g/ml bis 100  $\mu$ g/ml) nahm das Wachstum wieder ab. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zu den unbehandelten Zellen der Kontrolle (Abbildung 13).



Abbildung 13: Diese Abbildung zeigt die DNA-Neusynthese in BEAS-2B-Zellen, die über 24 h mit o-Cresol behandelt wurden, dargestellt als mittlere Absorption ( $\pm$  StabwN) gegen die eingesetzte o-Cresolkonzentration. Die Zellen wurde laut Herstelleranleitung des BrdU-Detection Kits behandelt und die Absorption mittels ELISA-Reader gemessen. Für die logarithmische Darstellung aller Werte musste für den unbehandelten Kontrollansatz ein Konzentrationswert von 0,00001 µg/ml angegeben werden. Durchgeführt wurden die Versuche in vierfacher Parallele (n = 2).

#### 4.1.3 Apoptose vs. Nekrose

## 4.1.3.1 Untersuchungen zur DNA-fragmentierenden Wirkung unterschiedlicher Substanzen in den BEAS-2B-Zellen

In einer ersten Versuchsreihe galt es, für die BEAS-2B-Zellen eine Substanz zu finden, welche die DNA der Zellen oligonukleosomal fragmentiert und für weitere Versuche als Positivkontrolle dienen kann. Die Arbeitsgruppe von Nichols zeigte, dass sich in BEAS-2B-Zellen die DNA nach Zugabe von 1 mM 3-Methylindol bereits nach 12 Stunden fragmentiert (Nichols et al. 2003). Die Ergebnisse von Nichols konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden, auf die entsprechenden Untersuchungenen soll jedoch nicht im Einzelnen eingegangen werden. Arbeiten von Waisberg und Shin ergaben, dass das Schwermetall Cadmium (Cd) Apoptose in Lungenzellen auslösen kann (Shin et al. 2004, Waisberg et al. 2003). Mit verschiedenen Konzentrationen Cd unter ähnlichen Bedingungen konnte jedoch auch in dieser Versuchsreihe keine DNA-Fragmentierung in BEAS-2B-Zellen hervorgerufen werden. Auch das für die M2-Zellen als Positivkontrolle verwendete Natriumarsenit konnte keine DNA-Fragmentierung in BEAS-2B-Zellen auslösen. (Ergebnisse nicht dargestellt.)

Abbildung 14a) zeigt, dass auch die Behandlung der Zellen mit sechswertigem Chrom als Kaliumchromat  $K_2CrO_4$  nicht zu einem oligonukleosomalen Abbau der DNA führte (Pascal und Tessier 2004, Wang et al. 2004).



Abbildung 14a): Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA aus BEAS-2B-Zellen, die mit  $K_2$ CrO<sub>4</sub> behandelt wurden.

Abbildung 14b): Gezeigt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA aus BEAS-2B-Zellen. Die Zellen wurden mit UV-Licht ( $\lambda$  = 254 nm) einer Dosis von 0,005 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt und im Anschluss unterschiedlich lange inkubiert.

UV-Strahlen ( $\lambda$  = 254 nm) sind in der Lage, in unterschiedlichen Zellen einen programmierten Zelltod zu induzieren. In BEAS-2B-Zellen fragmentierte sich nach UV-Behandlung die DNA oligonukleosomal. Die Zellen wurden mit einer Strahlendosis von 0,005 J/cm<sup>2</sup> behandelt und im Anschluss für weitere zwei bis 24 Stunden inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von sechs bis acht Stunden war eine fragmentierte DNA auf dem Agarose-Gel deutlich erkennbar. Wie in Abbildung 14b) zu erkennen, nahm der Effekt nach 18 Stunden Inkubationszeit wieder ab, hier zeigte sich eine diffuse Bande der DNA auf dem Gel. Für die nachfolgenden Testreihen dienten BEAS-2B-Zellen, die mit 0,005 J/cm<sup>2</sup> behandelt und anschließend für weitere sieben Stunden inkubiert wurden, als Positivkontrolle für die DNA-Fragmentierungsversuche.

# 4.1.3.2 Untersuchungen mit o-Cresol auf seine DNA-abbauende Wirkung in BEAS-2B-Zellen

Nach der Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit o-Cresolkonzentrationen von 0,1 ng/ml bis 100 µg/ml über Zeitspannen von 24 und 48 Stunden war in den Zellen keine DNA-Fragmentierung erkennbar. (Ergebnisse nicht dargestellt.)

Wurden die Zellen über 96 Stunden mit o-Cresol behandelt, so zeigte sich für eine Konzentration von 100 µg/ml eine eindeutige oligonukleosomale Fragmentierung der DNA. Dabei wurden die Zellen am Tag der Behandlung vor Zugabe der Testsubstanz mit frischem Medium versetzt. Um eventuellen Einflüssen durch verbrauchtes Medium oder Hunger vorzubeugen, erfolgte nach zwei Tagen Inkubation ein Mediumwechsel und eine erneute Substanzzugabe. In Abbildung 15 lässt sich die Fragmentierung der DNA nach Zugabe von o-Cresol für 96 Stunden deutlich erkennen.



Abbildung 15: Gezeigt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA nach einer 96stündigen Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit 100 μg/ml o-Cresol (n = 3). Die nicht beschrifteten Banden in dieser Abbildung gehören zu einer Versuchsreihe mit Phenol (s. u.).

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Zellen mit Konzentrationen von 250  $\mu$ g/ml bis 1 mg/ml o-Cresol unterschiedlich lange behandelt. Es stellte sich heraus, dass nach einer Inkubationszeit von mehr als 24 Stunden ein Großteil der Zellen

abgestorben war. Die BEAS-2B-Zellen wurden daher für maximal 24 Stunden mit hohen o-Cresolkonzentrationen behandelt. Wie aus Abbildung 16 erkennbar, fragmentierte sich die DNA in Zellen, die mit Konzentrationen von 250  $\mu$ g/ml bis 500  $\mu$ g/ml behandelt wurden. Der Effekt trat bei höheren Konzentrationen jedoch nicht mehr auf und es waren nur diffuse Streifen der DNA auf dem Gel zu erkennen.



Abbildung 16: Gezeigt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA nach einer 24stündigen Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit 250 μg/ml bis 1 mg/ml o-Cresol (n = 3). Die nicht beschrifteten Banden in dieser Abbildung gehören zu einer Versuchsreihe mit Phenol (s. u.).

Für eine Konzentration von 500 µg/ml o-Cresol konnte in einer zeitabhängigen Versuchsreihe eine DNA-fragmentierende Wirkung bereits nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden nachgewiesen werden. (Ergebnisse hier nicht dargestellt.)

## 4.1.3.3 Phosphatidylserin-Externalisierung in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit o-Cresol

Charakteristisch für den programmierten Zelltod ist die frühe Externalisierung von Phosphatidylserin (PS) in die äußere Membranschicht der Zelle.

Die BEAS-2B-Zellen wurden bei dieser Untersuchung mit o-Cresol behandelt und anschließend mit Annexin-V Fluos und Propidiumiodid gefärbt (Abschnitt 2.3.6). Es wurden nur Versuchsbedingungen berücksichtigt, die nach Interpretation der bisherigen Ergebnisse zu aussagekräftigen Ergebnissen führen könnten. Da eine Behandlung der BEAS-2B-Zellen in den verwendeten Kulturflaschen aufgrund der Undurchlässigkeit des Materials mit UV-Licht nicht möglich war, dienten Zellen, die mit 50 µM Arsenit (As) über 24 Stunden behandelt wurden als zusätzlicher Kontrollansatz für

apoptotische und nekrotische Zelluntergänge. In einem Vorversuch hatte sich gezeigt, dass in den mit As behandelten Zellen der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen höher war als in unbehandelten Kontrollzellen. Arsenit wurde daher als Positivkontrolle ausgewählt, obwohl As bei den Versuchen zum oligonukleosomalen Abbau der DNA keine DNA-fragmentierende Wirkung hatte.

In einer ersten Testreihe wurden o-Cresolkonzentrationen von 10  $\mu$ g/ml und 100  $\mu$ g/ml über eine Inkubationszeit von 96 Stunden eingesetzt. Das Auftreten von apoptotischen und nekrotischen Zelluntergängen unter diesen Bedingungen ist aus Abbildung 17 ersichtlich. Wie aufgrund der Ergebnisse zur Untersuchung der DNA-Fragmentierung zu erwarten war, traten unter Einfluss vom 100  $\mu$ g/ml o-Cresol signifikant vermehrt apoptotische Zelluntergänge auf (p = 0,041). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle stieg der Anteil der apoptotischen Zellen um den Faktor 1,5. Unter gleichen Bedingungen war der Anteil nekrotischer Zellen dreimal größer als bei einem unbehandelten Kontrollansatz, auch dieser Unterschied ist signifikant (p = 0,024).



Abbildung 17: Dargestellt ist die mittlere Anzahl (± StabwN) nekrotischer und apoptotischer BEAS-2B-Zellen nach 96-stündiger Behandlung mit o-Cresol in unterschiedlicher Konzentration (n = 3). Die Zellen wurden mit Annexin-V Fluos und PI gefärbt und am Durchflusszytometer vermessen. Mit \* gekennzeichnete Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle.

Der Einfluss von o-Cresolkonzentrationen von 250 µg/ml bis 1 mg/ml auf die PS-Externalisierung ist in Abbildung 18 dargestellt. Aus der Grafik ist ersichtlich, dass im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrollansatz nach 24 Stunden unter Einfluss von 750 µg/ml und 1 mg/ml o-Cresol vornehmlich nekrotische Zelluntergänge auftraten. Die Anzahl der nekrotischen Zellen ist bei dieser Konzentration im Vergleich zu allen anderen Werten signifikant erhöht (p < 0,001). Für den Konzentrationsbereich von 250  $\mu$ g/ml bis 1 mg/ml konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen o-Cresolkonzentrationen im Hinblick auf das Auftreten apoptotischer Zellen festgestellt werden.



Abbildung 18: Gezeigt ist die mittlere Anzahl (± StabwN) nekrotischer und apoptotischer BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit o-Cresol über 24 Stunden (n = 3). Die Zellen wurden mit Annexin-V Fluos und PI gefärbt und am Durchflusszytometer vermessen. Mit \* gekennzeichnete Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle. Signifikante Unterschiede zu allen anderen dargestellten Werten zeigen die mit \*\* gekennzeichneten Werte.

# 4.1.3.4 Morphologische Veränderungen in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit o-Cresol

Die Abbildungen 19 bis 21 zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen im Phasenkontrast von BEAS-2B-Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von o-Cresol über 24 und 96 Stunden behandelt wurden.

Nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden mit 100 µg/ml o-Cresol war, verglichen mit einem Kontrollansatz unbehandelter Zellen, ein Großteil unverändert aussehender Zellen erkennbar, die vermehrt kleine Körperchen ausgebildet hatten sowie Zellen, die sich aus dem Zellverband gelöst hatten (vgl. dazu Abbildung 19a und b).



Abbildung 19a): Diese Aufnahme zeigt unbehandelte BEAS-2B-Zellen nach 96 Stunden Inkubation. Die Phasenkontrast-Aufnahme entstand bei einer Vergrößerung von 100 x.

Abbildung 19b): Gezeigt sind BEAS-2B-Zellen, die über 96 Stunden mit 100 µg/ml o-Cresol behandelt wurden. Die Zellen stammen aus dem gleichen Ansatz wie die in 19a) dargestellten unbehandelten Zellen. Die Phasenkontrast-Aufnahme entstand bei einer Vergrößerung von 100 x.

BEAS-2B-Zellen, die mit 50 µM Natriumarsenit behandelt wurden, sind in Abbildung 20b) dargestellt. Zu erkennen sind morphologisch stark veränderte Zellen, die von kleineren Zellkörperchen umgeben sind. Ein Großteil der Zellen war abgestorben und schwamm abgelöst im Medium.







Abbildung 20a):

Gezeigt sind unbehandelte BEAS-2B nach 24 Stunden Inkubation. Die Phasenkontrast-Aufnahme entstand bei einer Vergrößerung von 100 x.

Abbildung 20b): Die Aufnahme zeigt mit 50 µM Arsenit behandelte BEAS-2B-Zellen nach 24h Inkubationszeit. Die Phasenkontrast-Aufnahme entstand bei einer Vergrößerung von 100 x.

Auffällig war der konzentrationsabhängig zunehmende Anteil toter, abgelöster BEAS-2B-Zellen nach einer Behandlung mit o-Cresol über 24 Stunden. Im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrollansatz waren bei einer o-Cresolkonzentration von

750 µg/ml nach 24 Stunden die meisten der Zellen abgelöst und tot (Abbildung 21c). Zusätzlich nahm das Vorkommen kleinerer Körperchen um die Zellen stark zu. Nach der Behandlung der Zellen mit 1mg/ml o-Cresol zeigte sich die toxische Wirkung der Substanz durch eine noch geringere Anzahl lebender BEAS-2B-Zellen in der Kulturschale (Abbildung 21d).



Abbildung 21a):	Abgebildet sind BEAS-2B-Zellen, die über 24 h mit 250 $\mu$ g/ml o-Cresol behandelt wurden. Die Phasenkontrast-Aufnahme entstand bei einer Vergrößerung von 100 x.
Abbildung 21b):	BEAS-2B-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 500 $\mu$ g/ml o-Cresol. Die Phasenkontrast-Aufnahme entstand bei einer Vergrößerung von 100 x.
Abbildung 21c):	In dieser Abbildung sind BEAS-2B-Zellen gezeigt, die mit 750 $\mu$ g/ml o-Cresol für 24 Stunden behandelt wurden. Die Phasenkontrast-Aufnahme entstand bei einer Vergrößerung von 100 x.
Abbildung 21d):	BEAS-2B-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 1 mg/ml o-Cresol. Die Phasenkontrast-Aufnahme entstand bei einer Vergrößerung von 100 x.

# 4.1.4 Weitere Betrachtungen der durch o-Cresol hervorgerufenen apoptotischen Vorgängen in BEAS-2B-Zellen

In den vorangegangenen Versuchen zur DNA-Fragmentierung und Phosphatidylserinexternalisierung in BEAS-2B-Zellen wurde deutlich, dass sowohl nekrotische als auch apoptotische Zelluntergänge nach einer o-Cresolbehandlung auftreten können. Im Folgenden sollte nun das Auftreten apoptotischer Vorgänge detaillierter untersucht werden.

## 4.1.4.1 Untersuchung zur Wirkung von o-Cresol auf den Gehalt charakteristischer pro- und anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie in der Zelle

In diesem Abschnitt wurde die Wirkung von o-Cresol auf den Gehalt an Proteinen der Bcl-2-Familie mit Hilfe der Western-Blot-Methode untersucht. Unter den pro-apoptotischen Proteinen wurde Bax und unter den anti-apoptotischen Proteinen Bcl-2 ausgewählt.

Für diese Versuchsreihe wurden die Zellen mit o-Cresol in einer Konzentration von 0,1 ng/ml bis 100 µg/ml für unterschiedlich lange Zeiten (24 bis 96 Stunden) behandelt. Im Anschluss wurden wie in Abschnitt 2.3.9 beschrieben die Proteine isoliert und die Western-Blots durchgeführt. Nach die Proteine mittels dem Gelelektrophorese aufgetrennt waren, wurden die Proteinbanden mit Coomassie-Brilliant Blue angefärbt um zu kontrollieren, ob die Proteinproben gleichmäßig aufgetragen wurden. Der Gehalt von Bax wie auch von Bcl-2 und die Bestimmung von ICAD (siehe unten) wurden jeweils auf dem gleichen Blot determiniert, um eine direkte Vergleichbarkeit des Gehalts der verschiedenen Proteine zu gewährleisten. Auf diese Weise ließe sich erkennen, ob bei einem erhöhten Bax-Gehalt z. B. gleichzeitig der Bcl-2-Gehalt abgenommen hat. Als Positivkontrolle wurde eine Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit 50 µM Natriumarsenit über 24 Stunden ausgewählt, da nach UV-Behandlung keine Veränderungen der Proteingehalte im Western-Blot erkennbar waren.

Nach 24 und 48 Stunden zeigten sich für Bax und Bcl-2 in den o-Cresolkonzentrationsbereichen von 0,1 g/ml bis 100 µg/ml keine veränderten Proteingehalte. (Ergebnisse nicht dargestellt.) Nach einer Behandlungszeit von 96 Stunden war ein erhöhter Proteingehalt des pro-apoptotischen Proteins Bax bei einer o-Cresolkonzentration von 100 µg/ml deutlich erkennbar (Abbildung 22). Zum Bcl-2-Gehalt konnten in dieser Versuchsreihe keine Aussagen getroffen werden, da das Protein in den BEAS-2B-Zellen für eine Detektion mit Hilfe des Western-Blots zu gering exprimiert ist. Als Positivkontrolle zur Bcl-2-Detektion diente in diesem Fall das Lysat unbehandelter HL-60-Zellen, die Bcl-2-Protein überexprimieren. Der Gehalt an Bcl-2 in HL-60-Zellen konnte stets einwandfrei detektiert werden. (Ergebnisse nicht dargestellt.)



Abbildung 22: Gezeigt ist eine Western-Blot-Analyse des Proteins Bax aus BEAS-2B-Zellen, die über 96 h mit o-Cresol behandelt wurden (n = 3).

Bei einer Behandlung von BEAS-2B-Zellen über 24 Stunden mit Konzentrationen von 250  $\mu$ g/ml bis zu 1 mg/ml o-Cresol ließ sich ab einer Konzentration von 500  $\mu$ g/ml o-Cresol ein erhöhter Gehalt des Proteins Bax feststellen (Abbildung 23). Der in Abbildung 23 dargestellte Blot zeigt für 250  $\mu$ g/ml eine Bande geringerer Intensität als die Kontrollbande. Dieser Effekt war nicht reproduzierbar. In zwei weiteren unabhängigen Untersuchungen war die Intensität der Bax-Bande bei einer Behandlung mit 250  $\mu$ g/ml o-Cresol identisch mit der Bande der unbehandelten Zellen. Der Bcl-2-Proteingehalt konnte nicht detektiert werden.





In einer Zeitreihenuntersuchung von drei bis 24 Stunden zeigte sich, dass für 500 µg/ml o-Cresol bereits nach 18 Stunden der Bax-Gehalt erhöht war. Die schwache Intensität der 24-Stunden-Bande konnte in zwei weiteren Versuchen nicht reproduziert werden (Abbildung 24a). Die Coomassie-Färbung des Gels zeigte einen gleichmäßigen Proteinauftrag.

Bei einer Konzentration von 1 mg/ml o-Cresol war ein erhöhter Gehalt an Bax bereits nach sechs Stunden erkennbar (vgl. dazu Abbildung 24b).



Abbildung 24: Die Abbildung zeigt Western-Blot-Analysen des Proteins Bax aus BEAS-2B-Zellen nach einer Behandlung mit a) 500 µg/ml und b) 1 mg/ml zu unterschiedlichen Zeitpunkten (n = 3).

Die in Abbildung 24 scheinbar erhöhten Proteingehalte für Bax nach drei Stunden Inkubationszeit waren nicht reproduzierbar. Es handelt sich hierbei also nicht um einen tatsächlichen Effekt.

# 4.1.4.2 Untersuchungen zu Veränderungen des Membranpotentials ( $\Delta \Psi_m$ ) der Mitochondrien in BEAS-2B-Zellen unter Einfluss von o-Cresol

Um festzustellen, ob und in welchem Ausmaß die Mitochondrien an den apoptotischen Vorgängen in den BEAS-2B-Zellen beteiligt sind, wurden mit Hilfe des MitoCapture<sup>TM</sup> Apoptosis Detection Kit Veränderungen im Membranpotential ( $\Delta \Psi_m$ ) der Mitochondrien mittels Durchflusszytometrie untersucht. Der in normalen Zellen in den Mitochondrien rot-fluoreszierende Farbstoff akkumuliert und verändert seine Fluoreszenz in apoptotischen Zellen nach grün, in denen eine Aggregation des Farbstoffs aufgrund des veränderten  $\Psi_m$  nicht möglich ist, da die MitoCapture<sup>TM</sup>-Monomere dann frei im Cytoplasma vorliegen (Chen et al. 2001). Die Veränderung des Membranpotentials ( $\Delta \Psi_m$ ) ist im Folgenden dargestellt als das Verhältnis der berechneten mittleren Fluoreszenz aus rot-fluoreszierenden Zellen zu grün-fluoreszierenden Zellen ( $\Delta \Psi_m$  = mittlere Fluoreszenz rot/ mittlere Fluoreszenz grün) (Mancini et al. 1997). Die mittlere Fluoreszenz ist der aus dem jeweiligen Histogramm-Plot der Versuche errechnete Median.

Im Rahmen dieser Versuchsreihe und unter Berücksichtigung der bereits vorhandenen Ergebnisse wurden BEAS-2B-Zellen für 24 Stunden mit o-Cresol in einer Konzentrationsreihe von 250 µg/ml bis 1 mg/ml behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen entsprechend der MitoCapture<sup>™</sup> Apoptosis Detection Kit-Anleitung aufgearbeitet und die mit dem Fluoreszenzfarbstoff markierten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Aus Abbildung 25 lässt sich erkennen, dass eine Behandlung der Zellen mit o-Cresol über 24 Stunden einen konzentrationsabhängigen Verlust des Membranpotentials nach sich zog. Deutlich wurde dies insbesondere bei o-Cresolkonzentrationen von 750  $\mu$ g/ml und 1 mg/ml, bei denen das Membranpotential zusammenbrach. Die hohe Standardabweichung für die o-Cresolkonzentrationen von 250  $\mu$ g/ml und 500  $\mu$ g/ml kam durch höher liegende Messwerte in einem der insgesamt drei durchgeführten Untersuchungen zustande.



Abbildung 25: Diese Abbildung zeigt die mittleren Veränderungen (± StabwN) im Membranpotential dargestellt als Quotient aus roter zu grüner Fluoreszenz. Für diesen Versuch wurden die BEAS-2B-Zellen über 24 Stunden mit verschiedenen o-Cresolkonzentrationen behandelt, mit dem MitoCapture™ Farbstoff gefärbt und am Durchflusszytometer vermessen.

Abbildung 26 zeigt die Histogramm-Plots einer repräsentativen von insgesamt drei unabhängigen Messungen, die unter identischen Versuchsbedingungen durchgeführt wurden. Dargestellt sind hier die Anzahl der auftretenden Ereignisse (events) im Bereich der grünen und roten Fluoreszenz.

BEAS-2B-Zellen, die mit o-Cresol in einer Konzentrationsreihe von 250 µg/ml bis 1 mg/ml über 24 Stunden behandelt wurden, zeigten nur für eine Konzentration von 250 µg/ml eine leichte Verlagerung der grünen Fluoreszenz (vgl. dazu Abbildung 26). Mit zunehmender o-Cresol Konzentration nahm die rote Fluoreszenz des Farbstoffs in den Zellen ab. Eine Messung der Zellen, die mit 1 mg/ml o-Cresol behandelt wurden, war auf Grund der stark zytotoxischen Effekte nicht möglich. Für diese o-Cresolkonzentration wurden bei der Messung weniger als 30.000 Zellen gezählt.



Abbildung 26: Hier dargestellt sind Histogramm-Plots der mit MitoCapture™ gefärbten BEAS-2B-Zellen, die über 24 Stunden mit unterschiedlichen o-Cresolkonzentrationen behandelt und anschließend am Durchflusszytometer vermessen wurden. Die Verschiebung der grünen Fluoreszenz bei 250 µg/ml o-Cresol ist mit einem Pfeil gekennzeichnet (n = 3).

# 4.1.4.3 Untersuchungen der Caspase-3-Aktivität in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit o-Cresol

Zur Untersuchung der Caspase-3-Aktivität in den BEAS-2B-Zellen wurden in einer ersten Versuchsreihe die BEAS-2B-Zellen über 24 und 48 Stunden mit o-Cresolkonzentrationen von 0,1 ng/ml bis 100 µg/ml behandelt. Als Positivkontrolle für eine Aktivierung der Caspase-3 dienten in dieser Versuchsreihe BEAS-2B-Zellen, die genau wie bei den Versuchen zur DNA-Fragmentierung mit 0,005 J/cm<sup>2</sup> UV-Licht behandelt und im Anschluss weitere sechs Stunden inkubiert wurden.

Es zeigte sich in mehreren unabhängigen Versuchen ausschließlich nach 48-stündiger Behandlung mit einer o-Cresolkonzentration von 100  $\mu$ g/ml eine signifikante Erhöhung der Caspase-3-Aktivität im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrollansatz (Abbildung 27).



Abbildung 27: Dargestellt ist die mittlere Caspase-3-Aktivität (± StabwN) nach 48-stündiger Behandlung der BEAS-2B mit o-Cresol als Substratumsetzungsrate [μM/h] pro μg Protein. Die Zellen wurden lysiert und nach Zusatz des Substrats Ac-DEVD-AMC wurde die Fluoreszenzintensität im FluoroCount vermessen. Signifikante Unterschiede in der Caspase-3-Aktivität sind mit \* gekennzeichnet (p < 0,001) (n = 3).

Um eine eventuell auftretende hemmende Wirkung der Testsubstanz o-Cresol auf die Caspase-3-Aktivität zu überprüfen, wurden in einer weiteren Versuchsreihe die Zellen erst für 42 Stunden mit o-Cresol (0,1 ng/ml bis 100 µg/ml) behandelt, anschließend mit UV-Licht bestrahlt und erneut für sechs Stunden inkubiert. In mehreren unabhängigen Tests zeigte sich, dass die durch UV-Licht induzierte Aktivierung der Caspase-3 durch die vorherige Behandlung der Zellen mit o-Cresol in keiner Weise beeinträchtigt wurde. (Ergebnisse nicht dargestellt.)

Wie bereits aus den Experimenten zur DNA-fragmentierenden Wirkung von o-Cresol und aus den Western-Blots zu erkennen war, schien eine Konzentration von 100  $\mu$ g/ml o-Cresol über eine Einwirkzeit von 96 Stunden apoptotische Vorgänge auszulösen. Zur genaueren Untersuchung dieses Mechanismus wurde die Aktivierung der Caspase-3 überprüft. BEAS-2B-Zellen wurden mit o-Cresol behandelt, nach zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel und eine erneute Substanzzugabe. Die Untersuchung der Caspase-3-Aktivität wurde wie in Abschnitt 2.3.10 beschrieben nach Lyse der Zellen durchgeführt. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konnten in drei unabhängigen Versuchen für 100  $\mu$ g/ml o-Cresol nach 96 Stunden keine signifikanten Unterschiede in der Caspase-3-Aktivität festgestellt werden (Abbildung 28).


Abbildung 28: Dargestellt ist die mittlere Caspase-3-Aktivität (± StabwN) nach 96-stündiger Behandlung der BEAS-2B mit o-Cresol als Substratumsetzungsrate [μM/h] pro μg Protein. Die Zellen wurden lysiert und nach Zusatz des Substrats Ac-DEVD-AMC wurde die Fluoreszenzintensität im FluoroCount vermessen. Signifikante Unterschiede in der Caspase-3-Aktivität wurden für die Positivkontrolle festgestellt und sind mit \* gekennzeichnet (p < 0,001) (n = 3).

Nach einer Behandlung der BEAS-2B-Zellen über 24 Stunden mit höheren o-Cresolkonzentrationen (250 µg/ml bis 1 mg/ml) war ein Anstieg der Caspase-3-Aktivität in den Zellen erkennbar (Abbildung 29). Im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrollansatz zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Caspase-3-Aktivität in den BEAS-2B-Zellen bei einer Konzentration von 500 µg/ml o-Cresol in drei unabhängigen Versuchen (p < 0,001). Ab einer Konzentration von 750 µg/ml o-Cresol nahm die Aktivität der Caspase-3 wieder ab und unterschied sich nicht von der im Kontrollansatz. Eine Caspase-3-Aktivität war für eine Konzentration von 1 mg/ml nicht bestimmbar, da aus diesen Proben in allen durchgeführten Versuchen nicht die für die Bestimmung notwendige Menge an Protein isoliert werden konnte.



Abbildung 29: Gezeigt ist die mittlere Caspase-3-Aktivität ( $\pm$  StabwN) in BEAS-2B-Zellen behandelt über 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von o-Cresol. Die Zellen wurden lysiert. Nach Zusatz des Substrats Ac-DEVD-AMC wurde die Fluoreszenzintensität im FluoroCount gemessen. Der Wert der Positivkontrolle (UV) unterscheidet sich signifikant von allen anderen Proben (p = 0,002). Sonstige signifikante Unterschiede zum Kontrollansatz sind mit \* gekennzeichnet (n = 3).

# 4.1.4.4 Untersuchungen zu der Wirkung von o-Cresol auf den Proteingehalt des Inhibitors der Endonuklease CAD (ICAD)

Für den oligonukleosomalen Abbau der DNA während des programmierten Zelltods ist vor allem die Nuklease DNA-Fragmentierungsfaktor 40/caspase-activated desoxyribonuclease (DFF40/CAD) verantwortlich. Es wurde daher untersucht, in welchem Ausmaß die Testsubtanz o-Cresol Einfluss auf diese Endonuklease hat, bestimmt durch die Detektion von DFF45/ICAD, dem Inhibitor von CAD. Da der Abbau von ICAD zur Aktivierung von CAD führt, kann anhand der Abbaurate von ICAD das Ausmaß der Aktivierung von CAD abgeleitet werden. Der Proteingehalt von ICAD wurde in den BEAS-2B-Zellen mit Hilfe des Western-Blots bestimmt.

In einer Zeitreihe von 24 bis 96 Stunden mit einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ml o-Cresol nahm der Proteingehalt an ICAD bereits nach 48 Stunden ab. Die Reproduzierbarkeit dieses Effekts hing jedoch von der Zellpassage der BEAS-2B-Zellen ab. Der Proteingehalt von ICAD nahm auch nach Inkubation mit 100  $\mu$ g/ml o-Cresol über 96 Stunden ab, dieser Effekt konnte in drei unabhängigen Versuchen bestätigt werden. Abbildung 30 zeigt einen repräsentativen Blot aus dieser Versuchsreihe.



Abbildung 30: Dargestellt ist eine Western-Blot-Analyse des Proteins ICAD aus BEAS-2B-Zellen. Die Zellen wurden mit 100 µg/ml o-Cresol unterschiedlich lange inkubiert und der Proteingehalt im Anschluss detektiert, wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben. Die nicht beschrifteten Banden des Blots gehören zu Untersuchungen mit anderen Testsubstanzen und sind an entsprechender Stelle in der Arbeit wieder gezeigt (n = 3).

In einer Zeitreihe von drei bis 24 Stunden für o-Cresolkonzentrationen von 500  $\mu$ g/ml und 1 mg/ml zeigte sich eine Abnahme des Proteingehalts von ICAD. Bei einer Konzentration von 500  $\mu$ g/ml verringerte sich der ICAD-Proteingehalt bereits nach 18 Stunden Inkubationszeit. Proben, die mit 1 mg/ml o-Cresol behandelt wurden, zeigten verringerte Proteingehalte von ICAD bereits nach 12 Stunden Inkubation (Abbildung 31).





In einer zweiten Versuchsreihe mit o-Cresolkonzentrationen von 250 µg/ml bis 1 mg/ml wurde beobachtet, dass ab einer Konzentration von 500 µg/ml nach 24 Stunden der ICAD-Proteingehalt abnahm (vgl. dazu Abbildung 32). Dieser Effekt war reproduzierbar in drei unabhängigen Versuchen.



Abbildung 32: Dargestellt ist eine Western-Blot-Analyse des Proteins ICAD aus BEAS-2B-Zellen nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit o-Cresol in verschiedenen Konzentrationen (n = 3).

## 4.1.4.5 Untersuchungen zur Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit o-Cresol

Eine Versuchsreihe, in der die behandelten Zellen mit dem oxidationsempfindlichen Farbstoff 5-(und-6-)-Chlormethyl-2´,7´-dichlorodihydrofluorescin-diacetat-acetylester CM-H<sub>2</sub>DCFDA (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) inkubiert wurden, sollte Aufschluss über die Menge anwesender ROS in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit den Testsubstanzen geben. Da phenolische Substanzen ROS-Generatoren sind, könnte in Abhängigkeit vom jeweiligen Stoffwechselprozess mit zunehmender Konzentration an Testsubstanz auch eine höhere Menge an ROS in der Zelle vorliegen (vgl. dazu Abschnitt 1.6.3). Dazu wurde o-Cresol in diesem Versuch über 24 Stunden in Konzentrationen von 250 µg/ml bis 1 mg/ml verwendet, die Proben wurden wie in Abschnitt 2.3.12 beschrieben aufgearbeitet und am Durchflusszytometer vermessen. Mit steigender Konzentration von o-Cresol nahm die grüne Fluoreszenzintensität in den Zellen zu, dass heißt die Menge an ROS vergrößerte sich (Abbildung 33). So zeigte sich eine signifikante Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität, definiert als aus dem Histogramm-Plot berechneter Median, in BEAS-2B-Zellen ab einer o-Cresol Konzentration von 750  $\mu$ g/ml (p < 0,025). Bei der Interpretation der Ergebnisse ist jedoch zu berücksichtigen, dass bei einer Konzentration von 1 mg/ml o-Cresol nur weniger als 30.000 Zellen (events) durchflusszytometrisch bestimmt werden konnten.



Abbildung 33: Anwesenheit reaktiver Sauertsoffspezies in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit o-Cresol über 24 Stunden. Die Zellen wurden mit dem Farbstoff CM-H<sub>2</sub>DCFDA wie unter "Material und Methoden" beschrieben behandelt und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. Dargestellt ist der aus dem Histogramm-Plot ermittelte Median als mittlere Fluoreszenzintensität. Signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet (n = 3).

#### 4.2 Versuchsreihen mit Phenol

# 4.2.1 Ermittlung der Zytotoxizität und der effektiven Konzentrationen der Testsubstanz Phenol in BEAS-2B-Zellen

Für die Testsubstanz Phenol galten die gleichen Bedingungen und Voraussetzungen wie für die Versuchsreihen, die wie bereits in Abschnitt 4.1 beschrieben mit der Testsubstanz o-Cresol durchgeführt wurden.

Auch für Phenol wurde der colony formation assay wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben, durchgeführt. Die Anzahl der Kolonien in Abhängigkeit von der Konzentration an Phenol ist in Abbildung 34 dargestellt. Es zeigte sich, dass bei einer Konzentration von 250  $\mu$ g/ml Phenol nur noch halb so viele BEAS-2B-Kolonien auftraten wie im Kontrollansatz. Die ermittelte IC<sub>50</sub> lag für Phenol bei etwa 270  $\mu$ g/ml. Es konnte nicht festgestellt werden, dass sich bei Phenolkonzentrationen von 0,1 ng/ml bis 100  $\mu$ g/ml die Anzahl an Kolonien verringerte.



Abbildung 34: Dargestellt ist die mittlere Anzahl ( $\pm$  StabwN) der Kolonien BEAS-2B-Zellen, die nach 24-stündiger Behandlung von 100 Zellen mit Phenol im Anschluss gewachsen sind. Für die logarithmische Darstellung aller Werte musste für den unbehandelten Kontrollansatz ein Konzentrationswert von 0,00001 µg/ml angegeben werden (n = 3).

#### 4.2.2 Untersuchung der Proliferation mittels BrdU-Assay von BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit Phenol

Die Ergebnisse des BrdU-Proliferationsassay für einen unbehandelten Kontrollansatz und für mit verschiedenen Phenolkonzentrationen behandelte Ansätze wurden verglichen. Dabei zeigte sich, dass es bei Phenolkonzentrationen von 0,001  $\mu$ g/ml bis 10  $\mu$ g/ml zu einem leichten, aber dennoch signifikanten Anstieg des Zellwachstums kam (p = 0,022). Es wurde in diesen Ansätzen mehr DNA synthetisiert als im unbehandelten Kontrollansatz (Abbildung 35).



Abbildung 35: Diese Abbildung zeigt die mittlere DNA-Neusynthese ( $\pm$  StabwN) in BEAS-2B-Zellen, die über 24 h mit Phenol behandelt wurden. Für die logarithmische Darstellung aller Werte musste für den unbehandelten Kontrollansatz ein Konzentrationswert von 0,000001 µg/ml angegeben werden. Durchgeführt wurden die Versuche in vierfacher Parallele (n = 2).

#### 4.2.3 Apoptose vs. Nekrose

# 4.2.3.1 Morphologische Veränderungen in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit Phenol

Die morphologischen Veränderungen in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen Phenol über verschieden lange Zeiträume (24 bis 96 Stunden) sind in den Abbildung 36 bis 37 dokumentiert. Die Phasenkontrastaufnahmen zeigten in einer Versuchsreihe über 96 Stunden keine morphologischen Veränderungen in den BEAS-2B-Zellen.



Abbildung 36a): Die Abbildung zeigt unbehandelte BEAS-2B-Zellen nach 96-stündiger Inkubation. Die Phasenkontrast-Aufnahme entstand bei einer Vergrößerung von 100 x.

Abbildung 36b): Die Aufnahme zeigt BEAS-2B-Zellen, die mit 100 µg/ml Phenol über 96 Stunden behandelt wurden. Die Phasenkontrast-Aufnahme entstand bei einer Vergrößerung von 100 x.

In einer weiteren Versuchreihe mit Phenolkonzentrationen von 250  $\mu$ g/ml bis 1 mg/ml und nach 24 Stunden Inkubation nahm abhängig von der Konzentration die Menge abgelöster, toter Zellen und runder Körperchen um die Zellen zu. Nach der Behandlung der Zellen mit 250  $\mu$ g/ml Phenol war der BEAS-2B-Zellrasen ähnlich wie bei dem unbehandelten Kontrollansatz weitgehend intakt. Von den adhärenten Lungenzellen hatten sich nur einige wenige abgelöst. Von den in Abbildung 37b) dargestellten, mit 500  $\mu$ g/ml Phenol behandelten Zellen ist bereits ein Teil abgestorben und schwimmt frei im Medium, es hatten sich einige Körperchen um die Zellen gebildet.

Deutliche toxische Effekte sind für Phenolkonzentrationen ab 750 µg/ml aus den Mikroskopaufnahmen in Abbildung 37c) und d) erkennbar. Unter dem Einfluss der höheren Konzentrationen bildeten sich vermehrt kleine, runde Körperchen. Ein Großteil der Zellen hatte sich abgelöst und schwamm frei im Medium, gesunder Zell-rasen war kaum noch vorhanden.



- Abbildung 37a): Die Aufnahme zeigt BEAS-2B behandelt mit 250 µg/ml Phenol über 24 Stunden. Die Phasenkontrast-Aufnahme entstand bei einer Vergrößerung von 100 x.
- Abbildung 37b): Die Aufnahme zeigt Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 500 µg/ml Phenol. Die Phasenkontrast-Aufnahme entstand bei einer Vergrößerung von 100 x.
- Abbildung 37c): Gezeigt sind BEAS-2B-Zellen, die über 24 h mit 750 µg/ml Phenol behandelt wurden. Die Phasenkontrast-Aufnahme entstand bei einer Vergrößerung von 100 x.
- Abbildung 37d): Die Aufnahme zeigt BEAS-2B-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 1 mg/ml Phenol. Die Phasenkontrast-Aufnahme entstand bei einer Vergrößerung von 100 x.

#### 4.2.3.2 Untersuchungen zur DNA-abbauenden Wirkung von Phenol in BEAS-2B-Zellen

In einer ersten Testreihe wurden die BEAS-2B-Zellen mit Phenolkonzentrationen von 0,1 ng/ml bis 100 µg/ml über 24 und 48 Stunden behandelt. In mehreren, unabhängigen Experimenten wurde deutlich, dass unter diesen Konzentrationen und Inkubationszeiten keine DNA-abbauende Wirkung auftrat (Ergebnisse nicht dargestellt). Deshalb wurden dann für weitere Experimente mit Phenol als Testsubstanz längere Inkubationszeiten bis zu 96 Stunden oder höhere Substanzkonzentrationen bis 1mg/ml gewählt.

Zunächst wurden Phenolkonzentrationen von 1 µg/ml bis 100 µg/ml über 96 Stunden eingesetzt. Die Zellen wurden genauso wie bei den o-Cresolexperimenten aus Abschnitt 4.1.3.1 behandelt. Aufgrund der langen Inkubationszeit wurde nach zwei Tagen das Medium gewechselt und erneut Phenol hinzugegeben.

Mehrere unabhängige Versuche wurden mit einer Konzentration von 100 µg/ml Phenol durchgeführt. Dabei kam es hin und wieder zu einem oligonukleosomalen Abbau der DNA. Der Effekt war jedoch nicht reproduzierbar (Abbildung 38).



Abbildung 38: Die Abbildung zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA aus BEAS-2B-Zellen nach Behandlung der Zellen mit 100 μg/ml Phenol über 96 h. Die nicht beschrifteten Banden gehören zu einer Versuchsreihe mit o-Cresol.

Auch bei einer Behandlung mit 250  $\mu$ g/ml bis 1 mg/ml Phenol über 24 Stunden zeigte sich eine variable DNA-Fragmentierung. Der oligonukleosomale Abbau der DNA trat nur in jeweils einem Experiment bei Phenolkonzentrationen von 750  $\mu$ g/ml und 1 mg/ml nach 24 Stunden auf (Abbildung 39). Nach der Phenolbehandlung entstand anders als bei den mit UV-Licht behandelten Zellen kein klar abgegrenztes Leitermotiv, sondern es gab diffuse Banden bis hin zu einem durchgehenden Streifen. Auch nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden mit Phenolkonzentrationen von 250  $\mu$ g/ml bis 1 mg/ml konnte keine DNA-abbauende Wirkung der Testsubstanz in den Zellen festgestellt werden, obwohl unter diesen Bedingungen nach 24 Stunden und nach 48 Stunden toxische Effekte mikroskopisch sichtbar waren.



Abbildung 39: Diese Abbildung zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA aus BEAS-2B-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Phenol. Die nicht beschrifteten Banden gehören zu einer Versuchsreihe mit o-Cresol (n = 3).

#### 4.2.3.3 Phosphatidylserin-Externalisierung in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit Phenol

Für die Testsubstanz Phenol wurde die Phosphatidylserin-Externalisierung in BEAS-2B-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurden Konzentrationen der Testsubstanz von 10  $\mu$ g/ml und 100  $\mu$ g/ml über 96 Stunden und Konzentrationen von 250  $\mu$ g/ml bis 1 mg/ml über 24 Stunden eingesetzt. Nach 96 Stunden zeigte sich der prozentuale Anteil apoptotischer BEAS-2B-Zellen im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrollansatz nicht verändert (vgl. dazu Abbildung 40). Ein signifikanter Unterschied bestand bei der Anzahl nekrotischer Zellen nach der Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit 100  $\mu$ g/ml über 96 Stunden (p = 0,047). Die Anzahl der nekrotischen Zellen hatte sich unter Einfluss von Phenol verdoppelt.



Abbildung 40: Dargestellt ist die mittlere Anzahl (± StabwN) apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Färbung mit Annexin-V Fluos und Propidiumiodid. Eine Behandlung mit Phenol erfolgte über einen Zeitraum von 96 Stunden. Signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet (n = 3).

Abbildung 41 zeigt den prozentualen Anteil apoptotischer und nekrotischer BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit 250  $\mu$ g/ml bis 1 mg/ml Phenol über 24 Stunden. Mit zunehmender Phenolkonzentration stieg der Anteil nekrotischer Zellen an. Signifikante Unterschiede hinsichtlich der nekrotischen Zellen im Vergleich zum unbehandelten Kontrollansatz bestehen allerdings nur für die Konzentration von 1 mg/ml Phenol (p < 0,048). Die Anzahl apoptotischer Zellen veränderte sich kaum, signifikante Unterschiede konnten hier nicht festgestellt werden.



Abbildung 41: Dargestellt ist die mittlere Anzahl (± StabwN) apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Färbung mit Annexin-V Fluos und Propidiumiodid. Die Zellen wurden für 24 h mit Phenol behandelt. Signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet (n = 3).

# 4.2.4 Weitere Betrachtung der durch Phenol hervorgerufenen apoptotischen Vorgänge in BEAS-2B-Zellen

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde nun ähnlich wie für die Testsubstanz o-Cresol der Ablauf des programmierten Zelltods anhand charakteristischer Merkmale detaillierter untersucht.

#### 4.2.4.1 Untersuchung zur Wirkung von Phenol auf den intrazellulären Gehalt charakteristischer pro- und anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie

Ähnlich wie bei den Versuchsreihen mit o-Cresol (vgl. dazu Kapitel 4.1.4.1) hatte Phenol erst in hohen Konzentrationen Einfluss auf den Gehalt des pro-apoptotischen Proteins Bax. Sämtliche Effekte waren jedoch schwächer ausgeprägt als bei o-Cresol.

So veränderten sich in mehr als drei unabhängigen Experimenten mit Phenolkonzentrationen von 0,1 ng/ml bis 100  $\mu$ g/ml nach 24 Stunden und 48 Stunden wie bei o-Cresol die Bax-Proteingehalte nicht. (Ergebnisse nicht dargestellt.) Nach einer Einwirkzeit von 96 Stunden war teilweise der Bax-Gehalt bei Konzentrationen bis 100  $\mu$ g/ml leicht erhöht (vgl. dazu Abbildung 42). Dieser Effekt konnte in mehreren unabhängigen Experimenten jedoch nicht reproduziert werden.



Abbildung 42: Gezeigt ist eine Western-Blot-Analyse des Proteins Bax aus BEAS-2B-Zellen, die mit einer Konzentration von 100 μg/ml Phenol über unterschiedliche Zeiträume behandelt wurden (n = 3).

In einem weiteren Experiment wurden in Anlehnung an die bereits mit o-Cresol durchgeführten Versuche Phenolkonzentrationen von 250 µg/ml bis 1 mg/ml über 24 Stunden eingesetzt. Nach Auswertung der Ergebnisse wurde eine Versuchsreihe mit Inkubationszeiten von drei bis 24 Stunden für die Konzentrationen 500 mg/ml und 1 mg/ml durchgeführt. Bei einer Konzentration von 500 µg/ml zeigten sich erhöhte Bax-Gehalte nach 24 Stunden und bei 1 mg/ml bereits nach 18 Stunden (Abbildung 43). Abbildung 43 zeigt je einen repräsentativen von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Western-Blots.





Die Bcl-2-Gehalte aus den gleichen Versuchsreihe ließen sich nicht detektieren. Aus der Abbildung 44 wird deutlich, dass das Protein in den BEAS-2B-Zellen in zu geringem Maße exprimiert wird und sich daher kaum detektieren ließ. Es ist dagegen eindeutig nachweisbar, dass Bcl-2 in den zum Vergleich aufgetragenen HL-60-Zellen vorhanden ist, so dass ein methodischer Fehler beim Blotten und der Detektion ausgeschlossen werden kann.



Abbildung 44: Die hier dargestellte Western-Blot-Analyse zeigt das Protein Bcl-2 aus BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit Phenol zu verschiedenen Zeitpunkten (n = 3).

### 4.2.4.2 Veränderungen im Membranpotential ( $\Delta \Psi_m$ ) der Mitochondrien in

#### BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit Phenol

Unter Berücksichtigung der vorangegangenen Ergebnisse und Versuchsbedingunwurden in einer weiteren Versuchsreihe Veränderungen gen im Mitochondrienmembranpotential ( $\Delta \Psi_m$ ) in BEAS-2B-Zellen unter Einfluss hoher Phenolkonzentrationen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit 250 µg/ml bis 1 mg/ml über 24 Stunden behandelt und im Anschluss wie in Abschnitt 2.3.11 dargestellt mit Hilfe des MitoCapture™ Apoptosis Detection Kit durchflusszytometrisch vermessen. Abbildung 45 zeigt den konzentrationsabhängigen Verlust des Membranpotentials der Zellen unter Einfluss von Phenol dargestellt als Quotient aus der mittleren roten und mittleren grünen Fluoreszenz. Die mittlere Fluoreszenz ergab sich aus den Histogramm-Plots der jeweiligen Versuchsansätze.



Abbildung 45: Diese Abbildung zeigt die mittleren Veränderungen ( $\pm$  StabwN) im Membranpotential, dargestellt als Quotient aus roter zu grüner Fluoreszenz (n = 3).

Die Ergebnisse (events) im Bereich der roten und der grünen Fluoreszenz wurden in drei unabhängigen Bestimmungen und unter identischen Bedingungen gemessen. Mit zunehmender Konzentration an Phenol nahm nach 24 Stunden Inkubationszeit die rote Fluoreszenzintensität des Farbstoffs ab. Die Intensität der grünen Fluoreszenz verlagerte sich unter Einfluss von Phenol in den behandelten BEAS-2B-Zellen nicht (Abbildung 46).



#### Abbildung 46: Gezeigt sind Histogramm-Plots der mit MitoCapture gefärbten Zellen. Die Abbildung zeigt eine von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten Untersuchungen.

#### 4.2.4.3 Untersuchungen der Caspase-3-Aktivität in BEAS-2B-Zellen behandelt mit Phenol

Die Aktivität der Effektor-Caspase-3 wurde wie in Abschnitt 2.3.10 beschrieben mit Hilfe des synthetischen Substrates Ac-DEVD-AMC bestimmt. In einer ersten Versuchsreihe wurden die BEAS-2B-Zellen über 24 und 48 Stunden mit Phenolkonzentrationen von 0,1 ng/ml bis 100 µg/ml behandelt. Die Caspase-3-Aktivität in den Zellen blieb dabei im Vergleich zu unbehandelten BEAS-2B-Zellen unverändert. Es konnte ebenfalls nicht festgestellt werden, dass Phenol unter diesen Versuchsbedingungen nach 48 Stunden die durch UV-Licht ausgelöste Caspase-3-Aktivierung hemmt (Ergebnisse nicht dargestellt).

Phenolkonzentrationen von 1, 10 und 100  $\mu$ g/ml wurden in einem weiteren Versuch über 96 Stunden in BEAS-2B-Zellen eingesetzt. Nach der ersten Behandlung mit der Substanz wurde nach zwei Tagen das Medium gewechselt und Phenol wurde erneut in entsprechender Konzentration zu den Zellen pipettiert. Nach weiteren zwei Tagen wurde die Caspase-3-Aktivität wie bereits beschrieben gemessen. Nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden war die Caspase-3-Aktivität bei einer Phenolkonzentration von 100  $\mu$ g/ml doppelt so hoch wie in den unbehandelten Zellen (Abbildung 47). Die Erhöhung der Caspaseaktivität bei dieser Konzentration ist signifikant (p < 0,001) verglichen mit allen anderen Versuchsbedingungen.



Abbildung 47: Dargestellt ist die mittlere Caspase-3-Aktivität (± StabwN) nach 96-stündiger Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit Phenol als Substratumsetzungsrate [μM/h] pro μg Protein. Die Zellen wurden lysiert und nach Zusatz des Substrats Ac-DEVD-AMC wurde die Fluoreszenzintensität im FluoroCount vermessen. Signifikante Unterschiede in der Caspase-3-Aktivität sind mit \* gekennzeichnet (p < 0,001) (n = 3).

Die Aktivität der Caspase-3 wurde ebenfalls für Phenolkonzentrationen von 250  $\mu$ g/ml bis 1 mg/ml bestimmt. Nach 24 Stunden wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Caspase-3-Aktivität in BEAS-2B-Zellen verzeichnet (Abbildung 48). Bei einer Konzentration von 1 mg/ml Phenol war die Aktivität in den Zellen viermal höher als im unbehandelten Kontrollansatz. Signifikante Unterschiede sind für Konzentrationen ab 750  $\mu$ g/ml Phenol festgestellt worden (p < 0,007).



Abbildung 48: Gezeigt ist die mittlere Caspase-3-Aktivität (± StabwN) in BEAS-2B-Zellen behandelt über 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Phenol. Die Zellen wurden lysiert und nach Zusatz des Substrats Ac-DEVD-AMC wurde die Fluoreszenzintensität im FluoroCount gemessen. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit \* gekennzeichnet. Werte, die sich signifikant zu allen anderen Werten unterscheiden, sind mit \*\* gekennzeichnet (n = 3).

# 4.2.4.4 Untersuchung zur Wirkung von Phenol auf den Proteingehalt von ICAD

In einer Zeitreihe von 24 Stunden bis 96 Stunden mit einer Phenolkonzentration von 100 µg/ml hatte der Proteingehalt von ICAD/DFF45 deutlich abgenommen und war geringer als im Kontrollansatz. Dieses Ergebnis konnte in drei unabhängigen Experimenten festgestellt werden. Nach 24 und 48 Stunden hingegen hatte sich der ICAD-Proteingehalt in keinem Experiment verringert (Abbildung 49).



Abbildung 49: Dargestellt ist eine Western-Blot-Analyse von dem Protein ICAD aus BEAS-2B-Zellen. Die Zellen wurden mit 100  $\mu$ g/ml Phenol unterschiedlich lange inkubiert (n = 3).

Aus den bisher gewonnenen Ergebnissen zur Caspase-3-Aktivität unter Einfluss von Phenol und aus den Western-Blots wurde deutlich, dass Konzentrationen von 250  $\mu$ g/ml bis 1 mg/ml der Testsubstanz den programmierten Zelltod auslösen konnten. In einer weiteren Versuchsreihe zum Proteingehalt von ICAD wurden die BEAS-2B-Zellen über 24 Stunden mit Phenolkonzentrationen von 250  $\mu$ g/ml bis 1 mg/ml behandelt. In drei unabhängigen Versuchen nahm der Proteingehalt von ICAD ab einer Phenolkonzentration von 250  $\mu$ g/ml im Vergleich zur Kontrolle ab.



Abbildung 50: Gezeigt ist in dieser Abbildung eine Western-Blot-Analyse von ICAD aus BEAS-2B-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Phenol (n = 3).

Um den zeitlichen Verlauf der Phenolwirkung auf ICAD zu untersuchen, wurde der Proteingehalt für Phenolkonzentrationen von 500  $\mu$ g/ml und 1 mg/ml über eine Zeitreihe von drei bis 24 Stunden bestimmt. In zwei unabhängigen Versuchsreihen nahm der ICAD-Proteingehalt nach Behandlung mit 500  $\mu$ g/ml und 1 mg/ml Phenol bereits nach zwölf Stunden ab. Nach drei und sechs Stunden Inkubation mit Phenol blieb der Proteingehalt an ICAD hingegen unverändert (Abbildung 51).



Abbildung 51: Dargestellt ist eine Western-Blot-Analyse von ICAD aus BEAS-2B-Zellen, die mit 500  $\mu$ g/ml und 1 mg/ml Phenol unterschiedlich lange behandelt wurden (n = 3).

# 4.2.4.5 Untersuchungen zur Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit Phenol

Die Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit Phenol konnte mit Hilfe des Farbstoffs CM-H<sub>2</sub>DCFDA nachgewiesen werden. Die mittlere Fluoreszenzintensität des durch Oxidation gespaltenen Farbstoffs nahm nach Behandlung mit Phenolkonzentrationen von 250 µg/ml bis 1 mg/ml konzentrationsabhängig zu (Abbildung 52). Die Inkubationszeit mit der Testsubstanz betrug jeweils 24 Stunden. Nach Behandlung der Zellen mit 1 mg/ml Phenol fanden

sich signifikant mehr ROS als in den Ansätzen mit niedrigeren Konzentrationen und im unbehandelten Kontrollansatz (p = 0,004).



Abbildung 52: Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit Phenol über 24 Stunden. Die Zellen wurden mit dem Farbstoff CM-H<sub>2</sub>DCFDA wie unter "Material und Methoden" beschrieben behandelt und anschließend durchflusszytometrisch vermessen. Dargestellt ist der aus dem Histogramm-Plot ermittelte Median als mittlere Fluoreszenzintensität (± StabwN). Signifikante Unterschiede sind mit \* gekennzeichnet (n = 3).

#### 4.3 Versuchsreihen mit Kondensat

Für die im Folgenden beschriebenen Versuchsreihen stand eine Lösung von 25 mg/ml maschinell hergestellten Kondensats gelöst in Isopropanol zur Verfügung. Diese Lösung wurde unter O<sub>2</sub>-armen Bedingungen aliquotiert und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Für jede Kondensatzugabe wurde ein frisches Aliquot der Kondensatlösung verwendet, um die Oxidation der Inhaltstoffe durch Luftsauerstoff möglichst gering zu halten. Bei der Auswahl der Versuchsbedingungen für die folgenden Experimente wurden Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen mit Kondensat in Lungenzellen berücksichtigt (Hellermann et al. 2002, Laan et al. 2004, Wickenden et al. 2003).

### 4.3.1 Ermittlung zur Zytotoxizität von Tabakrauchkondensat in BEAS-2B-Zellen mittels colony formation assay

Zur Untersuchung der Toxizität der Kondensatlösung in BEAS-2B-Zellen wurden die Zellen für 24 Stunden mit Kondensat inkubiert. Nach einem Mediumwechsel und

weiterer Inkubation für sieben bis zehn Tage, Fixierung und Färbung wurden die entstandenen Kolonien ausgezählt.

In einer Versuchsreihe mit Kondensatkonzentrationen von 1,6  $\mu$ g/ml bis 100  $\mu$ g/ml führten Konzentrationen ab 50  $\mu$ g/ml zu einem stark verminderten Wachstum der BEAS-2B-Zellen (Abbildung 53). Die IC<sub>50</sub> lag bei einer Konzentration von ca. 35  $\mu$ g/ml. Parallel zu der Versuchsreihe mit Kondensat wurden die BEAS-2B-Zellen mit entsprechender Menge Isopropanol behandelt, um einen möglichen Einfluss des Lösungsmittels auf das Wachstum der Kolonien auszuschließen. Hier verringerte sich die Anzahl an BEAS-2B-Kolonien nicht.



Abbildung 53: Gezeigt ist die mittlere Anzahl (± StabwN) der entstandenen BEAS-2B Kolonien nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit verschiedenen Kondensatkonzentrationen. Im Anschluss an die Behandlung mit Kondensat wurden die Zellen für mehrere Tage inkubiert, die entstandenen Kolonien mit Giemsa-Lösung gefärbt und ausgezählt (n = 3).

#### 4.3.2 Morphologische Veränderungen in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit Kondensat

Nach Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Kondensat (50  $\mu$ g/ml bis 200  $\mu$ g/ml) veränderten die Zellen sich bei Inkubationszeiten von 72 Stunden morphologische nur wenig. Der Zellrasen war überwiegend gesund. Nach 72-stündiger Inkubation mit 200  $\mu$ g/ml Kondensat traten vermehrt Zellen auf, die morphologische Merkmale eines programmierten Zelltods in Form der Apoptose zeigten wie z. B. die Bildung apoptotischer Körperchen (Abbildung 54a und b). Parallel wurde eine Konzentrationsreihe mit Isopropanol angesetzt, um Effekte des Lösungsmittels auszuschließen.



Abbildung 54a): Die Abbildung zeigt unbehandelte BEAS-2B-Zellen nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden. Die Phasenkontrast-Aufnahme entstand bei einer Vergrößerung von 100 x.

Abbildung 54b): Gezeigt sind BEAS-2B-Zellen, die über 72 Stunden mit 200 µg/ml Kondensat behandelt wurden. Die Phasenkontrast-Aufnahme entstand bei einer Vergrößerung von 100 x.

### 4.3.3 Untersuchungen zur DNA-abbauenden Wirkung von Kondensat in BEAS-2B-Zellen

Es wurden mehrere Versuchsreihen zur DNA-fragmentierenden Wirkung von Kondensat durchgeführt. Dazu wurden Kondensatkonzentrationen von 50  $\mu$ g/ml bis 200  $\mu$ g/ml über 24, 48 und 72 Stunden eingesetzt. Um Einflüsse des Lösungsmittels auszuschließen, wurden parallel BEAS-2B-Zellen mit entsprechenden Mengen Isopropanol behandelt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe variierten und konnten nicht reproduziert werden. Nach einer 24-stündigen Behandlung der Zellen traten keine Effekte auf. Nach 72 Stunden zeigte sich sowohl unter Einfluss von Kondensat (50  $\mu$ g/ml bis 200  $\mu$ g/ml) als auch nach Isopropanolbehandlung ein Leitermotiv der DNA im Agarose-Gel, dieser Effekt war jedoch nicht reproduzierbar. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden ließ sich ebenfalls keine DNA-abbauende Wirkung von Kondensat bestimmen (Ergebnisse nicht dargestellt).

#### 4.3.4 Phosphatidylserin-Externalisierung in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit Tabakrauchkondensat

In einer Zeitreihe über 24, 48 und 72 Stunden stieg der prozentuale Anteil an nekrotischen Zellen wie aus den Abbildungen 55 bis 57 zu erkennen ist, nach einer Behandlung der Zellen mit 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml Kondensat stark an. Der Anteil apoptotischer Zellen veränderte sich durch die Behandlung nicht. Auch niedrigere Kondensatkonzentrationen wurden in verschiedenen Versuchansätzen untersucht, hierbei zeigten sich jedoch keine Veränderungen in der Anzahl der nekrotischen und apoptotischen Zellen im Vergleich mit einem unbehandelten Kontrollansatz (Ergebnisse hier nicht dargestellt). Parallel zur Kondensatbehandlung wurden Zellen mit

den entsprechenden Mengen Lösungsmittel behandelt, um Effekte des Isopropanols auszuschließen. Dabei erhöhte sich weder der Anteil apoptotischer noch der Anteil nekrotischer Zellen (Abbildung 55 bis Abbildung 57). Ein statistischer Vergleich der Werte war aufgrund der Inhomogenität der Varianzen nicht möglich.



Abbildung 55: Dargestellt ist die mittlere Anzahl (± StabwN) apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Färbung mit Annexin-V Fluos und Propidiumiodid. Eine Behandlung mit Kondensat erfolgte über einen Zeitraum von 24 Stunden (n = 2).



Abbildung 56: Dargestellt ist die mittlere Anzahl (± StabwN) apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Färbung mit Annexin-V Fluos und Propidiumiodid. Eine Behandlung mit Kondensat erfolgte über einen Zeitraum von 48 Stunden (n = 2).



Abbildung 57: Dargestellt ist die mittlere Anzahl (± StabwN) apoptotischer und nekrotischer Zellen nach Färbung mit Annexin-V Fluos und Propidiumiodid. Eine Behandlung mit Kondensat erfolgte über einen Zeitraum von 24 Stunden (n = 2).

# 4.3.5 Untersuchungen der Caspase-3-Aktivität in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit Kondensat

Für die Untersuchungen der Caspase-3-Aktivität unter Einfluss von Kondensat (CSC) wurden Konzentrationen von 50 µg/ml bis 200 µg/ml CSC über 24, 48 und 72 Stunden untersucht. In drei unabhängigen Versuchen zeigte sich ein leichter Anstieg der Caspase-3-Aktivität in den Zellen, die mit 50 µg/ml und 100 µg/ml über 72 Stunden behandelt wurden. Die entsprechende Menge an Lösungsmittel zeigte nach dieser Zeit keine veränderte Caspase-3-Aktivität (Abbildung 58). Als Positivkontrolle dienten BEAS-2B-Zellen, die mit UV-Licht (0,005 J/cm<sup>2</sup>) bestrahlt und anschließend für sechs Stunden inkubiert wurden. Ein statistischer Vergleich der Ergebnisse war aufgrund der Inhomogenität der Varianzen in diesem Fall nicht möglich.



Abbildung 58: Gezeigt ist die mittlere Caspase-3-Aktivität (± StabwN) in BEAS-2B-Zellen, behandelt mit unterschiedlichen Konzentrationen an Kondensat. Die Zellen wurden lysiert und nach Zusatz des Substrats Ac-DEVD-AMC wurde die Fluoreszenzintensität im FluoroCount gemessen (n = 3).

#### 4.4 Versuchsreihen mit Tetradecanoylphorbolacetat (TPA)

Um die Ergebnisse aus den Versuchsreihen mit o-Cresol, Phenol und Kondensat mit der Wirkung eines bekannten Tumorpromoters auf die Signalkaskade des programmierten Zelltods vergleichen zu können, wurden analog zu den bisherigen Experimenten Untersuchungen mit dem Tumorpromoter TPA durchgeführt. In unterschiedlichen Versuchsreihen zur Morphologie der BEAS-2B-Zellen und bei Untersuchungen auf veränderte Apoptosecharakteristika unter Einfluss von TPA zeigten sich keine Effekte, wie aus den nachfolgenden Ergebnissen zur DNA-Fragmentierung, Caspase-3-Aktivität und im Western-Blot deutlich wird. Von weiteren detaillierten Versuchsreihen mit der Testsubstanz TPA wurde daher abgesehen.

#### 4.4.1 Untersuchung der Proliferation in BEAS-2B-Zellen mittels BrdU-Assay nach Behandlung mit TPA

Nach Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen TPA zwischen 0,1 ng/ml und 1 µg/ml zeigte sich im Proliferationsassay bei 0,1 ng/ml ein signifikanter Anstieg der BrdU-Inkorporation (p = 0,013). Bei einer Konzentration von 0,001 µg/ml TPA nahm die DNA-Synthese der Zellen wieder signifikant ab wie aus Abbildung 59 deutlich wird (p < 0,001).





### 4.4.2 Untersuchungen zur DNA-abbauenden Wirkung von TPA in BEAS-2B-Zellen

Über einen Zeitraum von 24 und 48 Stunden wurde der Einfluss von TPA in BEAS-2B-Zellen auf die DNA untersucht. Die eingesetzten Konzentrationen betrugen 0,1 ng/ml bis 1  $\mu$ g/ml. Aus Abbildung 60 wird deutlich, dass TPA nach 48 Stunden Inkubation keine oligonukleosomale DNA-Fragmentierung in den Zellen bewirkte.



Abbildung 60: Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA aus BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen TPA über 48 Stunden (n = 3).

#### 4.4.3 Untersuchungen der Caspase-3-Aktivität in mit TPA behandelten BEAS-2B-Zellen

Die BEAS-2B-Zellen wurden in dieser Versuchsreihe über 24 Stunden und 48 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 ng/ml bis 0,1 µg/ml) des Tumorpromotors TPA behandelt. Nach Behandlung über 48 Stunden zeigte sich keine Veränderung in der Caspase-3-Aktivität in den Zellen (Abbildung 61).



Abbildung 61: Dargestellt ist die mittlere Caspase-3-Aktivität (± StabwN) nach 48-stündiger Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit TPA als Substratumsetzungsrate [μM/h] pro μg Protein. Die Zellen wurden lysiert und nach Zusatz des Substrats Ac-DEVD-AMC wurde die Fluoreszenzintensität im FluoroCount vermessen (n = 3).

Auch hemmende Effekte der Testsubstanz auf eine durch UV-Licht induzierte Caspase-3-Aktivierung konnten in mehreren Versuchsreihen nicht festgestellt werden.

### 5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Bestandteilen des Tabakrauchs auf die Signaltransduktionskaskade des programmierten Zelltods untersucht. Dazu wurden die Wirkungen von Phenol und o-Cresol als Substanzen aus der phenolischen Phase des Tabakrauchkondensats auf Merkmale der molekularen Mechanismen des programmierten zellulären Untergangs bestimmt. Den Ergebnissen wurden die Wirkungsweise des Kondensats insgesamt wie die Effekte des bekannten Tumorpromoters TPA gegenübergestellt. Bei Untersuchungen zum programmierten Zelltod ist es notwendig, ein breites Spektrum der Merkmale molekularer Mechanismen zu untersuchen, um wie in diesem Fall spezifische Aussagen über den Eintritt von Apoptose oder Nekrose machen zu können. So wurden im experimentellen Teil der Arbeit folgende Merkmale des programmierten Zelltods untersucht:

- Es ist üblich eine Apoptose von einer Nekrose anhand morphologischer Merkmale wie z. B. der Ausbildung apoptotischer Körperchen der Zellen zu unterscheiden. Hierbei ist die Betrachtung einzelner Zellen möglich. Die Mikroskopie bietet dabei den Vorteil, dass sie eine wenig aufwendige Methode ist und mögliche Fehlerquellen einer umfangreicheren Analytik wie z. B. eine unvollständige Zelllyse nicht bestehen.
- 2. Ein oligonukleosomaler Abbau der DNA ist das Hauptmerkmal des programmierten Zelltods. Das nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA charakteristische Leitermotiv unterscheidet den programmierten Zelltod von der Nekrose, bei der die DNA in kleine Bruchstücke geschnitten wird, die auf dem Gel dann einen durchgehenden DNA-Streifen bilden.
- Die Detektion einer Phosphatidylserin-Externalisierung bietet die Möglichkeit, in einer Probe gleichzeitig die Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zellen in einem Zellverband feststellen zu können. Die Methode macht sich dabei die unterschiedliche Membranpermeabilität apoptotischer und nekrotischer Zellen zu Nutze.
- 4. Die Bestimmung des Gehalts pro-apoptotischer Proteine aus dem Zelllysat lässt Aussagen über den Signalweg des programmierten Zelltods zu und bietet einen zusätzlichen Nachweis für dessen Eintritt.
- Eine Abnahme des Mitochondrienmembranpotentials gilt als eines der frühen Merkmale des programmierten Zelltods. Sie lässt sich mit Hilfe eines in gesunden und apoptotischen Zellen unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoffs ermitteln und ermöglicht eine Charakterisierung des Signalwegs der Apoptose.
- 6. Die Caspase-3 spielt eine zentrale Rolle beim programmierten Zelltod. Eine Erhöhung in der Caspaseaktivität kann als Nachweis des programmierten

Zelltods dienen und gibt zusätzlich Aufschluss, über welchen Mechanismus er abläuft.

- 7. Das Protein CAD bildet im Ablauf des programmierten Zelltods das Bindeglied zwischen einer aktivierten Caspase-3 und der oligonukleosomalen Fragmentierung der DNA. Anhand einer detektierbaren Abnahme des Inhibitorproteins von CAD kann der Mechanismus des programmierten Zelltods zusätzlich im Einzelnen charakterisiert werden.
- 8. Der Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle erfolgt mit Hilfe eines oxidierbaren Farbstoffs. Die Teilnahme von ROS an einem über die Mitochondrien ablaufenden programmierten Zelltod gilt als wahrscheinlich. Der Nachweis von ROS ist daher ein weiterer möglicher Hinweis auf den ablaufenden Mechanismus des programmierten Zelltods.

Für die durchgeführten Versuchsreihen wurden verschiedene Konzentrationen der Testsubstanzen eingesetzt, die sich erstens aus dem durchschnittlichen Gehalt an o-Cresol und Phenol in Zigarettenrauch einer Zigarette und zweitens aus einer Expositionsabschätzung mit diesen Substanzen für einen durchschnittlichen Raucher über ca. 40 Jahre berechneten. Begonnen wurden die Experimente mit niedrigen Testsubstanzkonzentrationen von 0,1 ng/ml bis 100 µg/ml. Da bei Rauchern jedoch eine oftmals dauerhafte Exposition mit den Testsubstanzen stattfindet, war es für die hier durchgeführten Kurzzeitexperimente sinnvoll, zusätzlich höhere o-Cresol-, Phenol-, TPA- und Kondensat-Konzentrationen zu nutzen, denn eine Behandlung der Zellsysteme mit den Testsubstanzen über Monate oder Jahre ist nicht möglich.

In den ersten Versuchsreihen sollten die tumorpromovierenden Eigenschaften von o-Cresol und Phenol untersucht werden. Dazu wurde ein transformierbares Zellsystem benötigt, das in Form von M2-Fibroblasten der Maus zur Verfügung stand. Zusätzlich wurden bei diesen Zellen auch Apoptosemerkmale untersucht, um die Auswirkungen der Tumorpromotoren auf diesen Signalweg zu dokumentieren. Daneben sollten Versuchsbedingungen des Rauchens geschaffen werden, die dem tatsächlichen Rauchen möglichst nahe kommen. Die Untersuchungen zum programmierten Zelltod wurden daher ebenso in einer humanen bronchioepithelialen Zelllinie (BEAS-2B) durchgeführt. Obwohl die tumorpromovierenden Eigenschaften der Testsubstanzen in diesem Zellsystem nicht direkt nachgewiesen werden können, war es über einen Vergleich der Veränderungen in den Apoptosemerkmalen mit den M2-Fibroblasten doch möglich, die Wirkung von Tumorpromotoren aus dem Tabak zu beschreiben.

#### 5.1 Betrachtung der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit C3H-M2-Zellen

#### 5.1.1 Nachweis einer Transformation von M2-Fibroblasten durch o-Cresol und Phenol

Der Nachweis der tumorpromovierenden Eigenschaften von o-Cresol und Phenol wurde mit Hilfe eines Transformationsassays vorgenommen. Solche Testsysteme können nicht-genotoxische Kanzerogene und Tumorpromotoren erfassen. Für diese Tests werden Nagerzellkulturen verwendet, da menschliche Zellkulturen bisher praktisch nicht transformiert werden können (Marquardt und Pfau 2004, Marquardt et al. 1974). Neben o-Cresol und Phenol wurde der bekannte Tumorpromotor TPA als Positivkontrolle eingesetzt. Die beiden Testsubstanzen Phenol und o-Cresol sind Bestandteil der phenolischen Phase des Tabakrauches, für die bereits in ihrer Gesamtheit eine starke tumorpromovierende Wirkung beschrieben wurde (Hecht et al. 1975, Hoffmann et al. 1983, Rubin 2002).

Phenol konnte durch das Transformationsassay als stärkerer Tumorpromoter bestätigt werden. Bei o-Cresol ergab sich nur eine schwächere transformierende Aktivität. Dieses Ergebnis diente als Ausgangspunkt für die weiteren Untersuchungen.

#### 5.1.2 Wirkungen der Tumorpromotoren auf Merkmale des programmierten Zelltods

#### 5.1.2.1 Untersuchungen zur Proliferation

Tumorpromotoren können einen stimulierenden Einfluss auf die Mitoseaktivität der Zelle nehmen. Eine direkte Wirkung der Testsubstanzen auf das Wachstum der M2-Fibroblasten wurde mit Hilfe des BrdU-Proliferationsassays getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass es unter Einfluss niedriger Konzentrationen von 0,1 ng bis 1 ng/ml der Testsubstanzen o-Cresol, Phenol und TPA in den C3H-M2-Fibroblasten vermehrt zur Proliferation kommt. Bei höheren Konzentrationen, die diese Expositionswerte um bis zu ein 100.000-faches übersteigen, verminderte sich das Wachstum, da die toxischen Effekte der Substanzen in diesem Konzentrationsbereich überwiegen und einen nekrotischen Zelluntergang auslösen könnten (vgl. 5.2.3).

# 5.1.2.2 Analyse der Merkmale des programmierten Zelltods unter Einfluss der Testsubstanzen

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss der Testsubstanzen auf Merkmale des programmierten Zelltods in den M2-Zellen untersucht. Bei den morphologischen Untersuchungen der M2-Fibroblasten zeigte sich im Mikroskop nach 168stündiger Behandlung der Zellen mit je 100 µg/ml o-Cresol und Phenol ein unveränderter Zellrasen im Vergleich zum unbehandelten Kontrollansatz. Bei den mit Natriumarsenit (Positivkontrolle) behandelten M2-Zellen waren mikroskopisch nach 24 Stunden nur noch Zelltrümmer erkennbar.

Um einen möglichst schnellen und zuverlässigen Hinweis auf einen programmierten Zelltod unter Einfluss von Phenol oder o-Cresol zu erhalten, wurde zuerst die bei der Apoptose charakteristische Fragmentierung der DNA untersucht. Über 24 und 48 Stunden wirkten die niedrigen Konzentrationen beider Substanzen (bis 100  $\mu$ g/ml) nicht DNA-fragmentierend. Bei o-Cresolkonzentrationen von 100  $\mu$ g/ml und 200  $\mu$ g/ml fragmentierte sich die DNA nach 48 Stunden, der Effekt konnte jedoch nicht stetig reproduziert werden. Unter Einfluss niedriger Konzentrationen TPA (bis Konzentrationen von 1  $\mu$ g/ml TPA) zeigte sich ebenfalls kein DNA-abbauender Effekt.

Eine Kombination aus Natriumarsenit und einer vorherigen 24-stündigen Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen verstärkte die DNA-Fragmentierung für o-Cresolund Phenol-Konzentrationen von je 100 µg/ml. Somit konnte ein hemmender Effekt der Testsubstanzen auf den durch Arsenitzugabe ausgelösten programmierten Zelltod vorerst ausgeschlossen werden, da die oligonukleosomale Fragmentierung der DNA für alle Substanzkonzentrationen und -kombinationen nach gelelektrophoretischer Auftrennung sichtbar blieb.

In einem weiteren Experiment wurde ein apoptotischer Zelluntergang in den M2-Fibroblasten durch Serumentzug hervorgerufen. Die DNA fragmentierte sich unter Mediumzugabe mit 2 % FCS nach 120-stündiger Inkubation der Zellen. Die jeweilige Zugabe von o-Cresol und TPA zu den Versuchsansätzen zeigte für TPA keine Veränderungen im oligonukleosomalen Abbau der DNA. Allein für eine o-Cresolkonzentration von 100 µg/ml verminderte sich der fragmentierende Effekt. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass o-Cresol in dieser Konzentration im Ablauf des programmierten Zelltods die DNA-Fragmentierung hemmt. Da in einer Zelle jedoch für gewöhnlich der schnellste und effektivste Zelltod eintritt (Bursch et al. 1996), ist es ebenfalls denkbar, dass die durch den langen Serumentzug bereits geschwächten Zellen nach Zugabe der hohen o-Cresolkonzentration durch Nekrose sterben und ein oligonukleosomaler Abbau der DNA daher ausbleibt.

Bei Untersuchungen zur Caspase-3-Aktivität in den M2-Zellen variierten die Testergebnisse. Nach Ausschluss möglicher systematischer Fehler konnte festgestellt werden, dass M2-Zellen unterschiedlichen Alters, unterschiedlicher Zellcharge und Passagenummer variabel mit Natriumarsenit und den Testsubstanzen reagierten. Nach Auswertung der Testergebnisse zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität konnte aber als Tendenz festgehalten werden, dass in den M2-Fibroblasten nach 48stündiger Behandlung mit o-Cresol, Phenol oder TPA in einem Konzentrationsbereich von 0,1 ng/ml bis 100  $\mu$ g/ml (bei TPA nur bis 1  $\mu$ g/ml) die Aktivität der Caspase-3 im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrollansatz unverändert war. Nach Behandlung der M2-Fibroblasten mit 25  $\mu$ M Arsenit über 24 Stunden erhöhte sich die Caspase-3-Aktivität in den Zellen. In einer weiteren Versuchsreihe wurden die M2-Zellen zunächst für 24 Stunden mit den Testsubstanzen behandelt, es folgte eine Zugabe von 25  $\mu$ M As, anschließend wurde erneut für 24 Stunden inkubiert. Aufgrund der Variabilität der Ergebnisse konnte hier lediglich als Tendenz festgestellt werden, dass die Caspase-3-Aktivität durch Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen in Kombination mit Arsenit weder erhöht noch vermindert wurde im Vergleich zu einem mit 25  $\mu$ M As behandelten Versuchsansatz.

Bei den Western-Blot-Untersuchungen auf pro- und anti-apoptotische Proteine konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden. Ein Trend konnte nicht festgestellt werden.

Zum Ausschluss systematischer Fehler wurden die Untersuchungen von zwei weiteren Personen wiederholt, die Ergebnisse der unabhängigen Versuchsreihen blieben jedoch auch hier variabel. Aufgrund der kontrastierenden Verhaltensweise der C3H-M2-Fibroblasten gegenüber den Testsubstanzen und dem als Positivkontrolle eingesetzten Natriumarsenit wurde auf weitere Experimente verzichtet, statt dessen konzentrierten sich die Untersuchungen zum programmierten Zelltod auf die Wirkung der Testsubstanzen in den humanen Lungenepithelzellen BEAS-2B.

#### 5.2 Betrachtung der Ergebnisse aus den Untersuchungen mit BEAS-2B-Zellen

#### 5.2.1 Die Ergebnisse aus den Versuchsreihen mit o-Cresol

Zunächst wurden Veränderungen in ausgewählten Merkmalen des programmierten Zelltods nach Zugabe von o-Cresol zu den BEAS-2B-Zellen betrachtet. Wie bei den M2-Fibroblasten führte der Einfluss niedriger Konzentrationen zu einer vermehrten Proliferation der Zellen, was z. B. bei bereits initiierten Tumorzellen im Körper deren Wachstum verstärken könnte.

In einem hohen Konzentrationsbereich der Testsubstanz von 100 µg/ml bis 500 µg/ml wurden apoptotische Vorgänge in den BEAS-2B-Zellen beobachtet, bei noch höheren Konzentrationen bis 1 mg/ml hingegen starben die Zellen durch Nekrose. Durch den vermehrten Zelltod kann es im Zellverband zu einem verstärkten regenerativem Wachstum kommen. Vorstellbar ist eine durch Zellverluste im Gewebe hervorgerufene erhöhte Produktion und Freisetzung von Wachstumsfaktoren der umliegenden Zellen, die wiederum die Zellproliferation anregt und somit promovierend auf das Wachstum von initiierten Tumorzellen wirken kann. Zusätzlich könnten die bei der Nekrose freigesetzten Entzündungsmediatoren und Radikale DNA-Schäden im Zellverband hervorrufen und so indirekt zur Krebsentstehung beitragen.

Eine zusammenfassende Auflistung der o-Cresolergebnisse ist in Tabelle 5 dargestellt.

o-Cresolergebnisse			
Konzentration Merkmal	100 µg/ml (96 h)	250 μg/ml bis 500 μg/ml (24 h)	750 µg/ml bis 1 mg/ml (24 h)
DNA-Abbau	oligonukleosomal	oligonukleosomal	diffuser DNA-Streifen
PS-Externalisierung	apoptotische und nekrotische Zellen	unverändert	nekrotische Zellen
Proteingehalt Bax	Zunahme	Zunahme bei 500 µg/ml	Zunahme
MMP	k. A.	Abnahme	starke Abnahme
Caspase-3-Aktivität	unverändert	erhöht bei 500 µg/ml	unverändert
Proteingehalt ICAD	Abnahme	Abnahme	starke Abnahme
ROS	k. A.	unverändert	Zunahme

 

 Tabelle 5: Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit der Testsubstanz o-Cresol.

So wurde nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden bei einer o-Cresolkonzentration von 100 µg/ml die DNA oligonukleosomal fragmentiert. In der Versuchsreihe zur Phosphatidylserin-Externalisierung mit Annexin-V trat bei dieser Konzentration eine signifikante Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen auf. Gleichzeitig nahm aber auch die Anzahl nekrotischer Zellen signifikant zu.

Mikroskopisch betrachtet blieb ein Großteil der BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit 100 µg/ml über 96 Stunden unverändert, vereinzelt hatten sich jedoch Zellen aus dem Verband gelöst und kleine runde Körperchen gebildet. Auch eine Erhöhung des Gehalts des pro-apoptotischen Proteins Bax unter diesen Versuchsbedingungen lässt auf einen programmierten Zelltod durch o-Cresol in den BEAS-2B-Zellen schließen.

Die Caspase-3 wurde unter diesen Versuchsbedingungen nicht aktiviert. Eine mögliche Ursache dafür wäre, dass zum Zeitpunkt der Untersuchung das Stadium einer erhöhten Caspase-3-Aktivität in den Zellen überschritten war, da bereits nach einer 48-stündigen Behandlung der Zellen mit 100 µg/ml o-Cresol ein leichter, aber signifikanter Anstieg in der Caspase-3-Aktivität ermittelt wurde. Unter diesen Versuchsbedingungen wurden nach 48 Stunden keine weiteren Anzeichen für einen programmierten Zelltod festgestellt. Die gleichzeitige Anwesenheit nekrotischer Zellen in dem über 96 Stunden behandelten Ansatz lässt aber auch die Möglichkeit zu, dass hier ein programmierter Zelltod in Form von parallel ablaufender Apoptose und Nekrose, unabhängig von einer Caspaseaktivierung stattfindet. Untersuchungen zum programmierten Zelltod smöglich sind (Borner C 1999, Jun, Broker et al. 2005, Sperandio et al. 2000, Xiang et al. 1996). Ebenso wird heute das gleichzeitige Auftre-

ten von Nekrose und Apoptose in einem Zellverband als eine spezielle Variante des programmierten Zelltods angesehen (Proskuryakov et al. 2003). Unter bestimmten Bedingungen können sogar apoptotische und nekrotische Merkmale nebeneinander in einer Zelle vorkommen (Unal-Cevik et al. 2004). Ein Caspase-unabhängiger Ablauf des programmierten Zelltods ist zwar möglich, tritt aber relativ selten auf. Daher ist es wahrscheinlicher, dass nach einer 96-stündigen Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit 100 µg/ml o-Cresol ein programmierter Zelltod abläuft, jedoch der Zeitpunkt einer erhöhten Caspase-3-Aktivität überschritten war und sich deshalb nichts dergleichen detektieren ließ.

Im Vorfeld der eigentlichen Untersuchungen zum programmierten Zelltod war im Toxizitätstest ab einer o-Cresolkonzentration von 100 µg/ml bereits ein starker Rückgang der Zellkolonien erkennbar. Aufschluss über die Art des massiven Zelluntergangs im Konzentrationsbereich von 250 µg/ml bis 1 mg/ml o-Cresol sollten die nachfolgenden Experimente geben.

Ein apoptotischer Zelluntergang in BEAS-2B-Zellen zeigte sich nach Behandlung der Zellen mit 250 µg/ml und 500 µg/ml o-Cresol über 24 Stunden. Dies wurde aus den Ergebnissen zur Untersuchung der DNA-Fragmentierung deutlich, die eines der wichtigsten Merkmale für die Charakterisierung von Apoptose ist (Bar 1996). Unter den genannten Bedingungen wurde die DNA oligonukleosomal abgebaut. Unter Einfluss höherer Substanzkonzentrationen (750 µg/ml und 1 mg/ml) zeigte sich die DNA in einem diffusen Streifen auf dem Agarose-Gel. Bei diesen Konzentrationen könnte der Abbau der DNA bereits so weit fortgeschritten sein, dass sich keine klar abgegrenzten Fragmente mehr auf dem Agarose-Gel nachweisen lassen. Denkbar wäre aber auch ein anderer als der apoptotische Zelluntergang für diesen Konzentrationsbereich in den BEAS-2B-Zellen.

In den Untersuchungen zur PS-Externalisierung zeigte sich keine Zunahme an apoptotischen Zellen im Konzentrationsbereich von 250 µg/ml und 500 µg/ml - anders als aus den Ergebnissen zur DNA-Fragmentierung zu erwarten wäre. Die Externalisierung von Phosphatidylserin ist ein früh auftretendes Merkmal des programmierten Zelltods. Daher erscheint es möglich, dass die einzelnen Zellen in der Kaskade des Zelltods nach 24-stündiger Behandlung mit 250 µg/ml und 500 µg/ml o-Cresol bereits weiter fortgeschritten sind und eine Detektion dieses Merkmals daher ausbleibt. Die signifikante starke Zunahme an Propidiumiodid-positiven Zellen nach Behandlung mit 1 mg/ml o-Cresol lässt die Annahme zu, dass bei dieser Konzentration bereits ein nekrotischer Zelluntergang abläuft und keine Apoptose mehr stattfindet, was auch die fehlende Fragmentierung der DNA erklären würde.

Bei den Untersuchungen der Proteine der Bcl-2-Familie war in den Zellen ein Anstieg des Gehalts des pro-apoptotischen Proteins Bax nach 24-stündiger Behandlung ab einer o-Cresolkonzentration von 500 µg/ml zu verzeichnen. Der Proteingehalt blieb auch bei Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit 750 µg/ml und 1 mg/ml der Substanz
erhöht. Der Gehalt an Bcl-2 konnte nicht detektiert werden, da das Protein in den BEAS-2B-Zellen in zu geringer Menge exprimiert wird. Obwohl der genaue Mechanismus noch kontrovers diskutiert wird (vgl. dazu auch Abschnitt 1.6.2), wird davon ausgegangen, dass Bax in der Lage ist, durch Interaktion mit den Mitochondrien die Freisetzung löslicher Proteine wie Cytochrom *c* aus dem Zwischenraum der Mitochondrienmembran zu regulieren (Breckenridge und Xue 2004, Green und Kroemer 2004, Orrenius 2004). Dabei kann es in der Zelle zu Veränderungen im Mitochondrienmembranpotential ( $\Delta \Psi_m$ ) kommen (Henry-Mowatt et al. 2004, Jurgensmeier et al. 1998, Smaili et al. 2001). Die Versuchsreihen mit o-Cresol zu Veränderungen im Mitochondrienmembranpotential zeigten eine konzentrationsabhängige, starke Abnahme des Membranpotentials, was einen zusätzlichen Hinweis auf den mechanistischen Ablauf des durch o-Cresol ausgelösten programmierten Zelltods gibt.

Der durch o-Cresol induzierte programmierte Zelltod in den BEAS-2B-Zellen scheint also wie die meisten Formen des durch chemische Substanzen induzierten programmierten Zelluntergangs über die Mitochondrien abzulaufen (Green 2000, Zimmermann und Green 2001). Um den Ablauf des programmierten Zelltods weiter zu charakterisieren, wurde außerdem die Aktivität der Caspase-3 unter Einfluss von o-Cresol untersucht. Nach einer Behandlung der Zellen mit 500 µg/ml o-Cresol über 24 Stunden stieg die Caspase-3-Aktivität signifikant an. Bei höheren Konzentrationen nahm die Aktivität der Caspase-3 jedoch wieder ab. Dieses Ergebnis bestätigt den apoptotischen Ablauf des programmierten Zelltods bei einer o-Cresolkonzentration von 500 µg/ml, da vor allem die Caspase-3 unterstützt von Caspase-6 und -7 verantwortlich ist für eine Vielzahl an Vorgängen, die zum apoptotischen Untergang der Zelle führen (Zimmermann et al. 2001). Die Caspase-3 kann beim Ablauf des programmierten Zelltods durch Spaltung des Inhibitors ICAD dessen hemmende Wirkung auf die Endonuklease CAD aufheben (Sakahira et al. 1998). Anschließend kann freigesetztes CAD dann im Kern der Zelle die DNA in Fragmente definierter Größe spalten (Widlak 2000). In den BEAS-2B-Zellen konnte eine Abnahme des Proteins ICAD bei einer o-Cresolkonzentration von 500 µg/ml bereits nach 18 Stunden festgestellt werden. Bei Konzentrationen von 750 µg/ml und 1 mg/ml nahm der Proteingehalt an ICAD nach 24-stündiger Behandlung ebenfalls deutlich ab. Die Annahme, dass ein programmierter Zelltod in Form der Apoptose in BEAS-2B-Zellen unter Einfluss von 500 µg/ml o-Cresol stattfindet, wird durch dieses Ergebnis zusätzlich bestärkt.

In einer letzten Versuchsreihe wurde die Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle nach Zugabe von o-Cresol untersucht. Es war ein signifikanter Anstieg an ROS für o-Cresolkonzentrationen von 750 µg/ml und 1 mg/ml zu verzeichnen. Eine mögliche Erklärung für den konzentrationsabhängigen Anstieg der ROS nach o-Cresolzugabe bietet der intrazelluläre Redoxzyklus phenolischer Substanzen. Während dieses Prozesses können eine ganze Reihe reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle entstehen (vgl. dazu Abschnitt 1.6.3). Dadurch würde sich die Zunahme an

ROS mit steigender o-Cresolkonzentration erklären. Die erhöhte Menge an reaktiven Sauerstoffspezies könnte dann in den BEAS-2B-Zellen eine Nekrose auslösen (Los et al. 2002, Martindale und Holbrook 2002). Eine Zunahme der ROS in Form von intermediär gebildeten second messenger im Apoptose-Signalweg ist ebenfalls denkbar, erscheint in diesem Zusammenhang jedoch unwahrscheinlich, da bei einer o-Cresolkonzentration von 750  $\mu$ g/ml und 1 mg/ml kein programmierter Zelltod ab-läuft.

Zusammenfassend sind für die Versuchsreihen mit o-Cresol in Abhängigkeit von Konzentration und Expositionsdauer apoptotische und nekrotische Zelluntergänge in BEAS-2B-Zellen festzustellen. Bei einer o-Cresolkonzentration von 500 µg/ml läuft in den BEAS-2B-Zellen der programmierte Zelltod über einen Signalweg ab, der die Mitochondrien involviert. Da jedoch bereits auch unter Einfluss von 250 µg/ml o-Cresol nekrotische Ereignisse feststellbar waren, lassen sich apoptotischer und nekrotischer Zelluntergang hinsichtlich der Konzentration nicht eindeutig abgrenzen, die Übergänge scheinen fließend. Dies ist durchaus kein unbekanntes Phänomen bei Betrachtungen zum programmierten Zelltod, da auch beide Arten von Zelluntergang oftmals von identischen biochemischen Zwischenprodukten wie z. B. ATP, Ca<sup>2+</sup> oder ROS reguliert werden (Dartsch 2004, McConkey 1998). Dennoch kann für Konzentrationen ab 750 µg/ml o-Cresol festgemacht werden, dass der nekrotische Zelltod vorherrscht, da hier die von Jäättelä beschriebenen Merkmale eines nekroseähnlichen programmierten Zelltods auftreten (Jäättelä 2004). Bezeichnend für einen derartigen Zelltod ist eine durch Bax induzierte Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran, charakterisiert durch den Verlust des Mitochondrienmembranpotentials  $(\Psi_m)$  sowie die erhöhte Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies. Eine z. B. durch TNF induzierte Nekrose kann über die Anwesenheit von ROS und oxidativem Stress vermittelt werden (Los et al. 2002). Die Anwesenheit von ROS kann jedoch sowohl bei der Apoptose als auch bei der Nekrose eine wichtige Rolle spielen. Dass Apoptosemerkmale wie eine erhöhte Caspase-3-Aktivität und ein oligonukleosomaler Abbau der DNA fehlen, unterstützt die Hypothese, dass nach Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit o-Cresolkonzentrationen von 750 µg/ml und 1 mg/ml ein nekroseähnlicher programmierter Zelltod eintritt. Eine zusätzliche Bestätigung dieser Annahme liefern die aus den Annexin-V-Untersuchungen hervorgehenden Ergebnisse, in denen bei diesen Konzentrationen vorwiegend das Auftreten nekrotischer Zellen verzeichnet wurde.

### 5.2.2 Die Ergebnisse aus den Versuchsreihen mit Phenol

Analog zu den Versuchsreihen mit o-Cresol wurde der Einfluss von Phenol auf die Kaskade des programmierten Zelltods untersucht.

Bei der Ermittlung der zytotoxischen Konzentrationen von Phenol in den BEAS-2B-Zellen mittels colony formation assay zeigte sich ein Rückgang der Zellkolonien bei einer Phenolkonzentration von 250 µg/ml. Die Anzahl der Kolonien verringerte sich auf die Hälfte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei Konzentrationen von 750 µg/ml und 1 mg/ml waren keine Kolonien mehr sichtbar. Bei niedrigen Phenolkonzentrationen von 0,1 ng/ml bis 10 µg/ml zeigte sich zusätzlich im BrdU-Proliferationsassay eine signifikante Zunahme der DNA-Synthese. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass Phenol eine direkte Wirkung auf das Wachstum der Zellen hat und die Mitose in den Zellen stimuliert oder den Mechanismus des programmierten Zelltods insofern beeinflusst, als dass dieser nicht mehr einwandfrei ablaufen kann und so eine ungehinderte Proliferation der Zellen möglich wäre.

Einen Überblick über die Untersuchungsergebnisse zum programmierten Zelltod mit der Testsubstanz Phenol sind in Tabelle 6 dargestellt.

Phenolergebnisse				
Konzentration Merkmal	100 µg/ml (96 h)	250 μg/ml bis 500 μg/ml (24 h)	750 µg/ml bis 1 mg/ml (24 h)	
DNA-Abbau	variabel	unverändert	oligonukleosomal, variabel	
PS-Externalisierung	nekrotische Zellen	unverändert	nekrotische Zellen bei 1 mg/ml	
Proteingehalt Bax	Zunahme	Zunahme bei 500 µg/ml	Zunahme	
MMP	k. A.	Abnahme	Abnahme	
Caspase-3-Aktivität	erhöhte Aktivität	unverändert	erhöhte Aktivität	
Proteingehalt ICAD	Abnahme	Abnahme	Abnahme	
ROS	k. A.	unverändert	Zunahme bei 1 mg/ml	

 

 Tabelle 6: Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse in BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit der Testsubstanz Phenol.

Bei den Untersuchungen zum programmierten Zelltod in den BEAS-2B-Zellen zeigte sich bei Versuchsreihen über eine Inkubationszeit von 96 Stunden keine morphologischen Veränderungen nach Behandlung der Zellen mit 100 µg/ml Phenol. Ein oligonukleosomaler Abbau der DNA unter diesen Bedingungen konnte in mehreren unabhängigen Experimenten nicht reproduziert werden. Die Variabilität dieses Resultats ist insofern erklärbar, als dass die Phenolkonzentration von 100 µg/ml eine Schwellendosis für die oligonukleosomale DNA-Fragmentierung sein könnte und der Abbau der DNA deshalb nur in einigen Experimenten auftrat. Die Erhöhung des Proteingehalts des pro-apoptotischen Proteins Bax war ebenfalls variabel. Im Gegensatz dazu konnte eine signifikant erhöhte Caspase-3-Aktivität in den BEAS-2B-Zellen unter diesen Versuchsbedingungen stets reproduziert werden. Auch eine Abnahme des Proteingehalts von ICAD konnte wiederholt festgestellt werden. Bei den beschriebenen Versuchsbedingungen scheint für Phenol eine Schwellendosis zur Auslösung des programmierten Zelltods erreicht zu sein. Allein die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur PS-Externalisierung konnten diese Annahme nicht bestätigen. Hier wurde eine signifikante Zunahme nekrotischer Zellen und eine unveränderte Anzahl apoptotischer Zellen ermittelt.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden Phenolkonzentrationen von 250 µg/ml bis 1 mg/ml in BEAS-2B-Zellen eingesetzt. Nach Auswertung der ersten Versuchsreihen zur DNA-Fragmentierung und PS-Externalisierung mit diesen hohen Phenolkonzentrationen zeigten sich keine Merkmale eines programmierten Zelltods. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur DNA-Fragmentierung variierten bei Phenolkonzentrationen von 750 µg/ml und 1 mg/ml, es zeigten sich in einigen Versuchen diffuse Banden im Agarose-Gel, was auf eine Nekrose hindeuten könnte. Bei der Kennzeichnung apoptotischer und nekrotischer Zellen mit Annexin-V wiesen die Ergebnisse auf einen nekrotischen Zelluntergang hin. Der Anteil nekrotischer Zellen nahm nach Behandlung mit 1 mg/ml Phenol über 24 Stunden signifikant zu.

Bei der morphologischen Betrachtung der behandelten BEAS-2B-Zellen waren toxische Effekte erkennbar. So zeigten sich mit zunehmender Phenolkonzentration (250 µg/ml bis 1 mg/ml) mehr abgelöste, tote Zellen im Mikroskop.

Sowohl die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur DNA-Fragmentierung als auch die Markierung nekrotischer und apoptotischer Zellen mit Annexin-V bzw. Propidiumiodid deuteten auf eine Nekrose in den BEAS-2B-Zellen nach Zugabe hoher Phenolkonzentrationen hin. Um aber trotzdem die Vergleichbarkeit der Testsubstanzen o-Cresol und Phenol im Rahmen dieses Projektes zu gewährleisten, wurden weitere Untersuchungen (Proteine der Bcl-2-Familie, Caspase-3-Aktivität, Veränderungen im Mitochondrienmembranpotential etc.) zum programmierten Zelltod mit Phenol durchgeführt, da wie bereits erwähnt erst die Untersuchung mehrerer Merkmale darüber Aufschluss geben kann, ob es zu einem programmierten Zelltod kommt.

Die Ergebnisse zeigten einen Ablauf apoptotischer Ereignisse unter Einfluss von Phenol. So zeigte sich in den Western-Blot-Untersuchungen des pro-apoptotischen Proteins Bax, dass der Proteingehalt nach Behandlung mit 500 µg/ml Phenol über 24 Stunden und mit 1 mg/ml Phenol bereits nach 18 Stunden zunahm. Ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Caspase-3-Aktivität konnte für Phenol nachgewiesen werden. Nach 24-stündiger Behandlung konnte eine signifikante Erhöhungen der Aktivität ab einer Konzentration von 750 µg/ml festgestellt werden. Unter Einfluss von Phenolkonzentrationen ab 250 µg/ml nahm der Gehalt des Inhibitorproteins ICAD konzentrationsabhängig ab. Dieses Ergebnis lässt den Rückschluss zu, dass es unter Einfluss von Phenol zum programmierten Zelltod in den BEAS-2B-Zellen kommt.

Eindeutig abgrenzen lassen sich Apoptose und Nekrose jedoch auch hier nicht, da bei den Untersuchungen zur Phosphatidylserin-Externalisierung überwiegend nekrotische Zellen und bei den Untersuchungen zur DNA-Fragmentierung keine klar abgegrenzten Fragmente erkennbar waren, sondern diffuse Banden, die für eine Nekrose kennzeichnend sind. Für Phenol scheinen die Einflüsse der Substanz auf den programmierten Zelltod in den BEAS-2B-Zellen fließend zwischen Nekrose und Apoptose. Einige der erzielten Ergebnisse sind unter Berücksichtigung der Definitionen der unterschiedlichen Arten vom programmierten Zelltod nach Leist und Jäättelä für einen programmierten Zelltod in Form der Apoptose kennzeichnend (Jäättelä 2001). Unter Einfluss von Phenol erhöht sich der Bax-Proteingehalt, Caspase-3 wird aktiviert und der Gehalt des CAD-Inhibitorproteins ICAD nimmt ab, allein das Ausbleiben der DNA-Fragmentierung spricht hier gegen einen programmierten Zelltod. Nach Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit 1 mg/ml Phenol nahm die Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) signifikant zu. Eine Ursache für einen derartigen Anstieg könnte die Bildung von ROS als second messenger während des programmierten Zelltods sein. Zusätzlich könnte auch der Redoxzyklus des anwesenden Phenols Grund für das vermehrte Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies sein (vgl. dazu 1.6.3). Im Vergleich zu dem Ergebnis dieser Versuchsreihe mit der Testsubstanz o-Cresol spiegelt sich in diesem Ergebnis die unterschiedliche Tendenz der beiden Substanzen, Phenoxyradikale zu bilden, wieder. o-Cresol bildet leichter Phenoxyradikale als Phenol, dies zeigte sich in einem signifikanten Anstieg der anwesenden ROS bereits bei einer Konzentration von 750 µg/ml. Für Phenol war erst ab einer Konzentration von 1 mg/ml ein derartiger Anstieg zu verzeichnen.

Die fließenden Übergänge zwischen Apoptose und Nekrose bei der Betrachtung des programmierten Zelltods in BEAS-2B-Zellen können im ersten Moment irritieren, da das Eintreten des programmierten Zelltods unter Einfluss von o-Cresol und Phenol keiner der klassischen Kategorien der Apoptose oder Nekrose entspricht. Es treten nicht alle typischen Merkmale dieser Arten von Zelluntergang gemeinsam auf. Da sich aber bei der Apoptose und der Nekrose einige Signalwege überlappen können und die Signalwege teilweise identisch sind, können Zellen, die einen programmierten Zelltod eingehen, während des Untergangs viele Grade und Kombinationen der Apoptose- und Nekrosemerkmale aufzeigen (Jäättelä 2004). Für gewöhnlich ist der am schnellsten und effektivsten ablaufende Zelltod in seinen Merkmalen vorherrschend, es ist jedoch auch möglich, dass Zellen Charakteristika der unterschiedlichen Zelltode gleichzeitig aufweisen oder aber einige Merkmale nicht auftreten (Bursch et al. 1996).

Eine sehr große Rolle im Ablauf programmierter Zelltode spielt die Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran. Die der Permeabilisierung vorgeschalteten Signalwege werden bis auf wenige Ausnahmen von den Proteinen der Bcl-2-Familie kontrolliert (Green und Reed 1998). So ist Bax eines der wichtigsten Proteine, die eine Pore durch die Mitochondrienmembran bilden und für die Freisetzung unterschiedlicher Moleküle (Produktion von ROS, Freisetzung von Cytochrom *c*) im weiteren Verlauf des programmierten Zelltods verantwortlich sind (Hirsch et al. 1997, Mishra und Kumar 2005). Da der Proteingehalt von Bax sowohl unter Einfluss von o-Cresol als auch von Phenol stark ansteigt, kann für die BEAS-2B-Zellen angenommen werden, dass der Ablauf des programmierten Zelltods über die Mitochondrien reguliert wird. Auch der Anstieg von ROS und die Abnahme des

Mitochondrienpotentials nach Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen weisen darauf hin (Henry-Mowatt et al. 2004).

Auf einen apoptotischen Ablauf des programmierten Zelltods deutet die Aktvierung der Caspase-3 hin, wobei nicht nur die Aktivierung an sich, sondern auch das Ausmaß der Aktivierung eine entscheidende Rolle spielt. Es bleibt jedoch unklar, in welchem Ausmaß die Caspase aktiviert werden muss, um einen Zelluntergang hervorzurufen. Eine weitere wichtige Rolle beim Ablauf des programmierten Zelltods spielt die Umwandlung von ATP in den Zellen, je nach umgesetzter Energie kann der Zelltod vornehmlich apoptotisch oder nekrotisch ablaufen (Nicotera und Melino 2004).

### 5.2.3 Klinische Bedeutung der Ergebnisse aus den Versuchsreihen mit o-Cresol und Phenol

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Testsubstanzen o-Cresol und Phenol als typische Substanzen der phenolischen Phase des Tabakrauchkondensat in der Lage waren, abhängig von Konzentration und Inkubationszeitraum sowohl nekrotische als auch apoptotische Vorgänge in den BEAS-2B-Zellen auszulösen.

Diese Erkenntnisse können im Zusammenhang mit der Krebsentstehung durch Tabakrauch von klinischer Bedeutung sein, da apoptotische und nekrotische Zelluntergänge als endogene Risikofaktoren eine wichtige Ursache sein können. Der Prozess der Krebsentstehung wird meist durch exogene Risikofaktoren in Gang gesetzt, kann dann aber autonom weiter verlaufen. Chemische Substanzen wie PAK oder Nitrosamine als Bestandteile des Tabakrauchs sind in der Lage, die Entstehung von Krebs durch Auslösen von Zellschäden und Entzündungen zu begünstigen. Finden entzündliche Prozesse statt, z. B. durch Zellnekrose, so können Sauerstoffradikale im Körper entstehen, diese gelten als wichtige endogene Krebsursache (Schulte-Hermann 2004). Es wurde jedoch auch beobachtet, dass eine akute Entzündung der Krebsentstehung entgegen wirken kann, dass eine chronische Entzündung hingegen die Krebsentwicklung im Körper fördert (Philip et al. 2004). Charakteristisch für den nekrotischen Untergang von Zellen ist, dass anders als bei der Apoptose die Zelle ihre Membranintegrität verliert, was wiederum eine Entzündung induzieren kann (Wyllie 1997). Diese wird hervorgerufen durch freigesetzte Zytokine aus den umliegenden Makrophagen, die mit der Entfernung der beschädigten Zellen beschäftigt sind (Blagosklonny 2000, Israels und Israels 1999).

Auch vermehrte Zellverluste im Körper, hervorgerufen durch nekrotische Vorgänge oder Apoptose, können zur Krebsentstehung beitragen, weil Zellverluste meist ein regeneratives Wachstum zur Folge haben, das wiederum tumorpromovierend wirken kann (Schulte-Hermann 2004).

## 5.2.4 Gegenüberstellung der bisherigen Ergebnisse zu den Versuchsreihen mit Tetradecanoylphorbolacetat

Der bekannte Tumorpromoter TPA kann Einfluss auf den programmierten Zelltod nehmen. Dabei kann er sowohl eine Apoptose induzieren (Champelovier et al. 2000, Engedal und Blomhoff 2003, Lee und Rosson 2001, Meinhardt et al. 2000) als auch einen z. B. durch Sauerstoff induzierten programmierten Zelltod hemmen (Zhuang et al. 2001). Die Wirkungen von TPA auf den programmierten Zelltod hängen hierbei von Zellsystem, Konzentration und Expositionsdauer ab (vgl. dazu auch Abschnitt 1.7).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mögliche induzierende bzw. hemmende Effekte des Tumorpromoters TPA auf die Kaskade des programmierten Zelltods in BEAS-2B-Zellen untersucht. Betrachtet wurden dazu eine mögliche DNA-fragmentierende Wirkung von TPA und die Caspase-3-Aktivität in den Zellen nach TPA-Zugabe sowie eine mögliche hemmende Wirkung des Tumorpromotors auf eine durch UV-Licht aktivierte Caspase-3.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte keine Wirkung von TPA auf die Kaskade des programmierten Zelltods festgestellt werden. Die eingesetzten Konzentrationen an TPA und die verwendeten Inkubationszeiten entsprachen den effektiven TPA-Konzentrationen aus der Literatur (Lim et al. 2003). Daraus kann gefolgert werden, dass TPA in diesem Fall in den BEAS-2B-Zellen keinen Einfluss auf den programmierten Zelltod hat. Da aber bei der Untersuchung zur Zellproliferation ein Anstieg der DNA-Synthese bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml TPA zu verzeichnen war, ist es denkbar, dass TPA als Tumorpromoter in diesem Zellsystem durch eine gesteigerte Mitoseaktivität einen Beitrag zur Krebsentstehung leisten könnte.

## 5.2.5 Die Ergebnisse aus den Versuchsreihen mit Kondensat

Den Untersuchungen mit Substanzen der phenolischen Phase des Tabakrauchkondensats anhand von Nagerfibroblasten und humanen Lungenzellen wurden Untersuchungen mit der gesamten Partikelphase des Tabakrauchs gegenübergestellt. Aufgrund der großen Variabilität der Ergebnisse in den Vorversuchen mit M2-Zellen (vgl. 5.1.2.2) wurde der Fokus auf die Untersuchungen mit Kondensat in BEAS-2B-Zellen gelegt.

Bei Kondensatkonzentrationen von 50 µg/ml und 100 µg/ml kam es in den Untersuchungen zur PS-Externalisierung bereits nach 24 Stunden zum nekrotischen Zelluntergang. Der Anteil nekrotischer Zellen stieg mit zunehmender Inkubationszeit an. Bei niedrigeren Konzentrationen zeigten sich zwischen den Ergebnissen dieses Experiments und aus den zusätzlichen Vorversuchen zur Morphologie und Zellproliferation für diesen Konzentrationsbereich keine signifikanten Unterschiede.

Außerdem wurde der Einfluss von Kondensat auf die Caspase-3-Aktivität untersucht sowie eine DNA-fragmentierende Wirkung des Kondensats. Eine leichte Erhöhung

der Caspase-3-Aktivität konnte nach 72 Stunden Inkubationszeit für 100 µg/ml Kondensat ermittelt werden, nach 24-stündiger Behandlung der Zellen zeigten sich keine veränderten Aktivitäten. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde deutlich, dass die Ergebnisse nicht reproduzierbar waren. Das war vor allem bei den Versuchen zur DNA-Fragmentierung der Fall. So traten nicht reproduzierbare oligonukleosomale Fragmentierungen der DNA unter Einfluss von Kondensat nach 48 und 72 Stunden auf. Zu diesen Zeitpunkten war in einigen Versuchsansätzen jedoch auch ein oligonukleosomaler Abbau der DNA durch das Lösungsmittel Isopropanol erkennbar. Deshalb können keine fundierten Rückschlüsse auf eine DNA-fragmentierende Wirkung von Kondensat gezogen werden. Ursachen für derartige Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Diese Erkenntnisse erschweren eine Interpretation der vorliegenden Ergebnisse auch im Vergleich mit anderen Arbeiten, die Kondensat als Testsubstanz verwendet haben. Bei einem Vergleich sind insbesondere die Komplexität der Kondensatzusammensetzung, die verschiedenen Versuchsbedingungen und die bisher nicht standardisierte Herstellungsmethode von Tabakrauchkondensat zu berücksichtigen.

In der Literatur werden Einflüsse von Tabakrauchkondensat in Lungenzellen im Bezug auf Lungenkrankheiten und Krebs unterschiedlich diskutiert. So werden neben den tumorpromovierenden Eigenschaften (Curtin et al. 2004, Gaworski et al. 1999, Hecht 1999, Rubin 2002) auch apoptotische und nekrotische Wirkungen in Abhängigkeit von der Konzentration auf unterschiedliche Zellen beschrieben (D'Agostini et al. 2001, Hoshino et al. 2001, Piperi C 2003, Wang et al. 2001). Dabei scheint ein nekrotischer Zelluntergang durch Kondensat vorherrschend zu sein (vgl. auch Abschnitt 1.7). Der Aspekt, dass eine Charakterisierung des programmierten Zelltods durch umfangreiche Untersuchungen stattfinden sollte und die alleinige Untersuchung eines einzelnen Apoptosemerkmals eine Aussage zum programmierten Zelltod nicht zulässt, sollte bei der Durchführung von Versuchsreihen mit Tabakrauchkondensat berücksichtigt werden (Wickenden et al. 2003). Auch mögliche molekulare Abläufe einer durch Kondensat ausgelösten Nekrose sind bereits beschrieben. So untersuchte die Arbeitsgruppe um Hellermann den Einfluss von Kondensat in Lungenzellen (A549 und NHBE Zellen). Sie kam zu dem Ergebnis, dass über eine Aktivierung von NF<sub>K</sub>B und die MAPKinase-Kaskade durch die Freisetzung entzündungsfördernder Zytokine entzündliche Prozesse in den Lungenzellen hervorgerufen werden, die schließlich zum nekrotischen Untergang des Gewebes führen (Hellermann et al. 2002). Sowohl NF<sub>K</sub>B als auch die MAPKinasen spielen beim Ablauf des programmierten Zelltods eine wichtige Rolle. So kann der aktivierte Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B eine anti-apoptotische Funktion beim programmierten Zelltod übernehmen. Er ist in der Lage, durch Translokation in den Zellkern die Expression verschiedener Signale zu unterdrücken, die zum Zelltod führen würden, eine Aktivierung der Caspase-8 zu hemmen und die Expression von IAPs (inhibitors of apoptosis proteins) zu fördern. Auch die Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies kann durch Phosphorylierung und proteosomalen Abbau des NF<sub>K</sub>B-Inhibitorprotein IκB dazu führen, dass der im Zytoplasma vorhandenen Transkriptionsfaktor freigesetzt und aktiviert wird (Pessayre et al. 2000, Zimmermann et al. 2001). Das im Tabakrauchkondensat enthaltene Kanzerogen NNK aktiviert NFκB ebenfalls und kann damit eine Proliferation von Lungenzellen auslösen (Ho et al. 2005).

Die genannten Arbeiten mit Tabakrauchkondensat stehen im Kontrast zu Untersuchungen von Liu et al., in denen weder apoptotische noch nekrotische Abläufe in Lungenzellen (BEAS-2B und HBEC) nach Exposition mit Tabakrauchextrakten beobachtet wurden. Vielmehr wurden hier Schädigungen durch DNA-Strangbrüche unter Einfluss von Tabakrauch festgestellt. Die Zellen waren allerdings in der Lage, die DNA-Schäden unter tabakrauchfreien Bedingungen wieder zu reparieren (Liu et al. 2005).

Die teilweise kontrastierenden Erkenntnisse im Hinblick auf den Einfluss von Tabakrauchkondensat auf den programmierten Zelltod verdeutlichen die Komplexität der zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen. Auch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten keine grundlegend neuen Erkenntnisse in diesem Zusammenhang erzielen. Jedoch zeichnete sich ein deutlicher Trend dahingehend ab, dass mit steigender Konzentration und Dauer der Exposition mit Kondensat zunehmend Nekrose in den BEAS-2B-Zellen stattfindet. Für die klinische Interpretation bedeutet dies, dass bei lange anhaltender Tabakrauchexposition verstärkt die entzündlichen Prozesse beim nekrotischen Zelluntergang und die daraus resultierenden Spätfolgen im Rahmen einer Kanzerogenese an Bedeutung gewinnen könnten.

# 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss tumorpromovierender und phenolischer Substanzen aus dem Tabakrauch auf molekulare Mechanismen in zwei verschiedenen Zelllinien unter anderem auch auf die Signalkaskade des programmierten Zelltods untersucht. Die Anwesenheit von Tumorpromotoren im Allgemeinen kann sich in unterschiedlichster Art und Weise auf den Ablauf des programmierten Zelltods auswirken. So sind sowohl eine Induktion als auch eine Hemmung dieses intrazellulären Programms möglich. Die Folgen einer derartigen Beeinflussung des programmierten Zelltods können in beiden Fällen neoplastische Veränderungen im Gewebe sein, die sich letztendlich als Krebszellen manifestieren können. Ebenso kann eine im Gewebe hervorgerufene Nekrose zur Entstehung von Tumorzellen beitragen. Für die Versuchsreihen in C3H-M2-Mausfibroblasten und der humanen Lungenepithelzelllinie BEAS-2B wurden die Substanzen o-Cresol, Phenol, der bekannte Tumorpromotor TPA sowie Tabakrauchkondensat verwendet. Mit Hilfe eines Transformationstests konnte eine tumorpromovierende Aktivität sowohl für Phenol als auch in abgeschwächter Form für o-Cresol nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich, dass o-Cresol und Phenol in Abhängigkeit ihrer jeweiligen Konzentration einen programmierten Zelltod und eine Nekrose in BEAS-2B-Zellen hervorrufen können. Der durch diese Substanzen ausgelöste programmierte Zelltod läuft mechanistisch über die Mitochondrien ab und beinhaltet unter anderem eine Erhöhung des Gehalts des pro-apoptotischen Proteins Bax, den Zusammenbruch des Mitochondrienmembranpotentials, die Aktivierung der Caspase-3 sowie einen oligonukleosomalen Abbau der DNA und die Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies. Im Vergleich dazu zeigten sich nach Behandlung der BEAS-2B-Zellen mit dem Tumorpromotor TPA unter den gewählten Versuchsbedingungen keinerlei apoptotische oder nekrotische Veränderungen in den Zellen. Mit Tabakrauchkondensat konnte in den BEAS-2B-Zellen ein nekrotischer Untergang induziert werden, apoptotische Veränderungen waren nicht erkennbar. Obwohl eine direkte Übertragbarkeit von in-vitro Untersuchungsergebnissen auf in-vivo Situationen selten möglich ist, können die hier erzielten Ergebnisse durchaus klinisch relevante Hinweise auf das Verständnis der Entstehung von Lungenkrebs durch Rauchen von Tabak geben.

# Summary

In the present study the influence of tumour-promoting and phenolic constituents from tobacco smoke on molecular mechanisms such as the programmed cell death were investigated in two different cell lines. In general, the presence of tumour promoters can have widely varying effects on programmed cell death. Tumour promoters can both stimulate or inhibit this intra-cellular programme. In both cases the results of these types of influence on programmed cell death can be neoplastic changes in the tissue which can result in the formation of cancer cells. Similarly, necrosis which has been induced in tissue can contribute to the appearance of tumour cells. The comparative experiments were carried out in C3H-M2 mouse fibroblasts and in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) with o-cresol, phenol and the known tumour-promoter TPA as well as with cigarette smoke condensate. With the aid of a M2 transformation assay it was possible to prove tumour-promoting activity for phenol, as well as to a lesser extent for o-cresol. Further investigations indicated that o-cresol and phenol were capable of inducing programmed cell death and necrosis in BEAS-2B cells depending on concentration of the test substances and incubation time. The achieved results showed that the induced programmed cell death routinely involves induction of the pro-apoptotic protein Bax, breakdown of mitochondrial membrane potential, activation of caspase-3, as well as oligonucleosomal DNA-fragmentation and the increasing presence of reactive oxygen species. No apoptotic or necrotic changes were observed, however, when BEAS-2B cells were treated with TPA. The application of cigarette smoke condensate to BEAS-2B cells resulted in necrotic cell death; programmed cell death was not observed. Although a direct comparison between the results obtained in-vitro and an *in-vivo* situation is not possible, the experimental data obtained from this work may contribute details of clinical relevance to the further understanding of the initial stages of lung cancer caused by tobacco smoking.

## 7 Literaturverzeichnis

- Alberg, A. J., M. V. Brock, and J. M. Samet. 2005. Epidemiology of Lung Cancer: Looking to the Future. *J Clin Oncol* 23: 3175-3185.
- Baker, R. R., E. D. Massey, and G. Smith. 2004a. An overview of the effects of tobacco ingredients on smoke chemistry and toxicity. *Food and Chemical Toxicology* 42: 53-83.
- Baker, R. R., J. R. Pereira da Silva, and G. Smith. 2004b. The effect of tobacco ingredients on smoke chemistry. Part I: Flavourings and additives. *Food and Chemical Toxicology* 42: 3-37.
- Bar, P. 1996. Apoptosis--the cell's silent exit. Life Sciences 59: 369-78.
- Barnard, R. J. 2004. Prevention of Cancer Through Lifestyle Changes. *Evidence*based Complementary and Alternative Medicine: eCAM 1: 233-239.
- Blagosklonny, M. 2000. Cell death beyond apoptosis. Leukemia 14: 1502-8.
- Boatto, G., M. Nieddu, A. Carta, A. Pau, S. Lorenzoni, P. Manconi, and D. Serra. 2004. Determination of phenol and o-cresol by GC/MS in a fatal poisoning case. *Forensic Science International* 139: 191-194.
- Borner C, M. L. 1999, Jun. Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death and differantiation* 6: 497-507.
- Breckenridge, D. G., and D. Xue. 2004. Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases. *Current Opinion in Cell Biology* 16: 647-652.
- Broker, L. E., F. A. E. Kruyt, and G. Giaccone. 2005. Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clin Cancer Res* 11: 3155-3162.
- Buccellato, L. J., M. Tso, O. I. Akinci, N. S. Chandel, and G. R. S. Budinger. 2004. Reactive Oxygen Species Are Required for Hyperoxia-induced Bax Activation and Cell Death in Alveolar Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 279: 6753-6760.
- Bursch, W., M. Chabicovsky, U. Wastl, B. Grasl-Kraupp, K. Bukowska, H. Taper, and R. Schulte-Hermann. 2005. Apoptosis in Stages of Mouse Hepatocarcinogenesis: Failure to Counterbalance Cell Proliferation and to Account for Strain Differences in Tumor Susceptibility. *Toxicol. Sci.* 85: 515-529.
- Bursch, W., A. Ellinger, H. Kienzl, L. Torok, S. Pandey, M. Sikorska, R. Walker, and R. S. Hermann. 1996. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* 17: 1595-1607.
- Bursch, W., B. Lauer, I. Timmermann-Trosiener, G. Barthel, J. Schuppler, and R. Schulte-Hermann. 1984. Controlled death (apoptosis) of normal and putative

preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters. *Carcinogenesis* 5: 453-458.

- Calfee-Mason, K. G., B. T. Spear, and H. P. Glauert. 2002. Vitamin E Inhibits Hepatic NF-{kappa}B Activation in Rats Administered the Hepatic Tumor Promoter, Phenobarbital. *J. Nutr.* 132: 3178-3185.
- Cameron, R., and G. Feuer. 2000. Incidence of Apoptosis and Its Pathological and Biochemical Manifestations in G. F. R. G. Cameron, ed. *Apoptosis and Its Modulation by Drugs*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Carnevali, S., S. Petruzzelli, B. Longoni, R. Vanacore, R. Barale, M. Cipollini, F. Scatena, P. Paggiaro, A. Celi, and C. Giuntini. 2003. Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L955-963.
- Cell Signaling Technology, I. 2005. Pathway: Apoptosis Overview. http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Ovrvw\_apop.asp, Cell Signaling Technology, Inc., Zugriffsdatum: 01.12.2005
- Champelovier, P., M. Richard, and D. Seigneurin. 2000. Autocrine regulation of TPAinduced apoptosis in monoblastic cell-line U-937: role for TNF-alpha, MnSOD and IL-6. *Anticancer Research* 20: 451-458.
- Chen, T. T., and C. Heidelberger. 1969. Cultivation in vitro of cells derived from adult C3H mouse ventral prostate. *Journal of the National Cancer Institute* 42: 903-914.
- Chen, Y., D. L. Kramer, P. Diegelman, S. Vujcic, and C. W. Porter. 2001. Apoptotic Signaling in Polyamine Analogue-treated SK-MEL-28 Human Melanoma Cells. *Cancer Res* 61: 6437-6444.
- Chen, Y., Q. Wu, S. Song, and W. Su. 2002. Activation of JNK by TPA promotes apoptosis via PKC pathway in gastric cancer cells. *World Journal of Gastroenterology* 8: 1014-1018.
- Christensen, J., T. Goldsworthy, and R. Cattley. 1999. Dysregulation of apoptosis by c-myc in transgenic hepatocytes and effects of growth factors and nongenotoxic carcinogens. *Molecular carcinigenesis* 25: 273-284.
- Colburn, N., B. Koehler, and K. Nelson. 1980. A cell culture assay for tumorpromoter-dependent progression toward neoplastic phenotype: detection of tumor promoters and promotion inhibitors. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 1: 87-96.
- Curtin, G. M., M. Hanausek, Z. Walaszek, A. T. Mosberg, and T. J. Slaga. 2004. Short-Term In Vitro and In Vivo Analyses for Assessing the Tumor-Promoting Potentials of Cigarette Smoke Condensates. *Toxicol. Sci.* 81: 14-25.
- D'Agostini, F., R. M. Balansky, A. Izzotti, R. A. Lubet, G. J. Kelloff, and S. De Flora. 2001. Modulation of apoptosis by cigarette smoke and cancer chemopreventive agents in the respiratory tract of rats. *Carcinogenesis* 22: 375-380.

- Dartsch, D. C. 2004. Mechanismen der Toxizität: Programmierter Zelltod (Apoptose). Pages 271-286 in H. Marquardt and S. Schäfer, eds. *Lehrbuch der Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Stuttgart.
- Dartsch, D. C., A. Schaefer, S. Boldt, W. Kolch, and H. Marquardt. 2002. Comparison of anthracycline-induced death of human leukemia cells: Programmed cell death versus necrosis. *Apoptosis* 7: 537-548.
- Das, S. K. 2003. Harmful health effects of cigarette smoking. *Molecular and Cellular Biochemistry* 253: 159-165.
- Dautzenberg, B. 2004. Tobacco-related diseases. *La Revue du praticien* 54: 1877-1882.
- DeMarini, D. M. 2004. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 567: 447-474.
- Doll, R., and A. B. Hill. 1950. Smoking and carcinoma of the lung. *British Medical Journal* 2: 739-748.
- Dwyer-Nield, L., J. Thompson, G. Peljak, M. Squier, T. Barker, A. Parkinson, J. Cohen, D. Dinsdale, and A. Malkinson. 1998. Selective induction of apoptosis in mouse and human lung epithelial cell lines by the tert-butyl hydroxylated metabolite of butylated hydroxytoluene: a proposed role in tumor promotion. *Toxicology* 130: 115-127.
- Edwards, R. 2004. The problem of tobacco smoking. BMJ 328: 217-219.
- Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, and S. Nagata. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50.
- Engedal, N., and H. K. Blomhoff. 2003. Combined Action of ERK and NFkappa B Mediates the Protective Effect of Phorbol Ester on Fas-induced Apoptosis in Jurkat Cells. *J. Biol. Chem.* 278: 10934-10941.
- Forman, H. J., J. M. Fukuto, and M. Torres. 2004. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C246-256.
- Fulda, S., and K.-M. Debatin. 2004. Apoptosis Signaling in Tumor Therapy. *Ann NY Acad Sci* 1028: 150-156.
- Gaworski, C., J. Heck, M. Bennett, and M. Wenk. 1999. Toxicologic evaluation of flavor ingredients added to cigarette tobacco: skin painting bioassay of cigarette smoke condensate in SENCAR mice. *Toxicology* 139: 1-17.
- Gerl, R., and D. L. Vaux. 2005. Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis* 26: 263-270.
- Green, D., and G. Kroemer. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626-629.

- Green, D., and J. Reed. 1998. Mitochondria and apoptosis. Science 281: 1309-1312.
- Green, D. R. 2000. Apoptotic Pathways: Paper Wraps Stone Blunts Scissors. *Cell* 102: 1-4.
- Häcker, G. V., David L. 1995. The Medical Significance of Physiological Cell Death. *Medicinal Research Reviews* 15: 299-311.
- Hecht, S., R. Thorne, R. Maronpot, and D. Hoffmann. 1975. A study of tobacco carcinogenesis. XIII. Tumor-promoting subfractions of the weakly acidic fraction. *Journal of the National Cancer Institute* 55: 1329-1336.
- Hecht, S. S. 1999. Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. J Natl Cancer Inst 91: 1194-1210.
- Hellermann, G., S. Nagy, X. Kong, R. Lockey, and S. Mohapatra. 2002. Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. *Respiratory Research* 3: 22.
- Henry-Mowatt, J., C. Dive, J. Martinou, and D. James. 2004. Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene* 23: 2850-2860.
- Hirsch, T., I. Marzo, and G. Kroemer. 1997. Role of the mitochondrial permeability transition pore in apoptosis. *bioscience reports* 17: 67-76.
- Ho, Y.-S., C.-H. Chen, Y.-J. Wang, R. G. Pestell, C. Albanese, R.-J. Chen, M.-C. Chang, J.-H. Jeng, S.-Y. Lin, and Y.-C. Liang. 2005. Tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) induces cell proliferation in normal human bronchial epithelial cells through NF[kappa]B activation and cyclin D1 up-regulation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 205: 133-148.
- Hoffmann, D., S. Hecht, and E. Wynder. 1983. Tumor promoters and cocarcinogens in tobacco carcinogenesis. *Enviromental health perspectives* 50: 247-257.
- Hoffmann, D., I. Hoffmann, and K. El-Bayoumy. 2001. The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. *Chemical Research in Toxicology* 14: 767-790.
- Hoffmann, D. W. E. 1999. Active and Passive Smoking. Pages 879-897 in H. e. a. Marquardt, ed. *Toxicology*. Academic Press, San Diego.
- Hoshino, Y., T. Mio, S. Nagai, H. Miki, I. Ito, and T. Izumi. 2001. Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L509-516.
- Husgafvel-Pursiainen, K. 2004. Genotoxicity of environmental tobacco smoke: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 567: 427-445.
- IARC. 2002. Tobacco Smoking and Tobacco Smoke, IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 83. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

- Islam, S., N. Islam, T. Kermode, B. Johnstone, H. Mukhtar, R. W. Moskowitz, V. M. Goldberg, C. J. Malemud, and T. M. Haqqi. 2000. Involvement of Caspase-3 in Epigallocatechin-3-gallate-Mediated Apoptosis of Human Chondrosarcoma Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 270: 793-797.
- Israels, L. G., and E. D. Israels. 1999. Apoptosis. Oncologist 4: 332-339.
- Jäättelä, M. 2004. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 23: 2746-2756.
- Jäättelä, m. L. M. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 589-598.
- Jurgensmeier, J. M., Z. Xie, Q. Deveraux, L. Ellerby, D. Bredesen, and J. C. Reed. 1998. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *PNAS* 95: 4997-5002.
- Kagan, V. E., and Y. Y. Tyurina. 1998. Recycling and Redox Cycling of Phenolic Antioxidants. *Ann NY Acad Sci* 854: 425-434.
- Kang, E., H. Kim, K. Paek, H. Jang, K. Chang, J. Lee, T. Nishinaka, C. Yabe-Nishimura, and H. Seo. 2005a. Phorbol ester up-regulates aldose reductase expression in A549 cells: a potential role for aldose reductase in cell cycle modulation. *Cellular and molecular life science: CMLS* 62: 1146-1155.
- Kang, K., S. Chae, K. Lee, M. Park, S. Lee, Y. Lee, and J. Hyun. 2005b. Cytotoxic effect of 7beta-hydroxycholesterol on human NCI-H460 lung cancer cells. *Biological & pharmaceutical bulletin* 28: 1377-1380.
- Kaufmann, T., A. Schinzel, and C. Borner. 2004. Bcl-w(edding) with mitochondria. *Trends in Cell Biology* 14: 8-12.
- Kerr, J. F. R. W., A.H. ; Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with widerangung implications in tissue kinetics. *The British Journal of Cancer* 26: 239-57.
- Kobayashi, T., Y. Ogawa, Y. Watanabe, M. Furuya, S. Kataoka, E. Garcia del Saz, S. Tsunawaki, M. C. Dinauer, and H. Seguchi. 2004. Mitochondrial transmembrane potential is diminished in phorbol myristate acetate-stimulated peritoneal resident macrophages isolated from wild-type mice, but not in those from gp91-phox-deficient mice. *Histochemistry and Cell Biology* 122: 323-332.
- Kohler, C., S. Orrenius, and B. Zhivotovsky. 2002. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *Journal of Immunological Methods* 265: 97-110.
- Kroemer, G. 2004. Cell death and cancer: an introduction. Oncogene 23: 2744-2745.
- Laan, M., S. Bozinovski, and G. P. Anderson. 2004. Cigarette Smoke Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Production of Inflammatory Cytokines by Suppressing the Activation of Activator Protein-1 in Bronchial Epithelial Cells. *J Immunol* 173: 4164-4170.

- Le Bras, M., M. Clement, S. Pervaiz, and C. Brenner. 2005. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histology and Histopathology* 20: 205-219.
- Lee, R. G., and D. Rosson. 2001. 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate Induces Apoptosis in Renal Epithelial Cells through a Growth Signal Conflict Which Is Prevented by Activated ras1. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385: 378-386.
- Leira, F., J. M. Vieites, M. R. Vieytes, and L. M. Botana. 2001. Apoptotic events induced by the phosphatase inhibitor okadaic acid in normal human lung fibroblasts. *Toxicology in Vitro* 15: 199-208.
- Li, J., C. Ma, Y. Huang, J. Luo, and C. Huang. 2003. Differential requirement of EGF receptor and its tyrosine kinase for AP-1 transactivation induced by EGF and TPA. *Oncogene* 22: 211-219.
- Lim, K.-T., S.-J. Lee, K.-S. Heo, and K. Lim. 2003. Effects of glycoprotein isolated from Rhus verniciflua stokes on TPA-induced apoptosis and production of cytokines in cultured mouse primary splenocytes. *Toxicology Letters* 145: 261-271.
- Limoli, C. L., E. Giedzinski, W. F. Morgan, S. G. Swarts, G. D. D. Jones, and W. Hyun. 2003. Persistent Oxidative Stress in Chromosomally Unstable Cells. *Cancer Res* 63: 3107-3111.
- Lin, Y. P., B. Z. Zhu, M. C. Yang, B. Frei, M. Pan, J. K. Lin, and Y. J. Wang. 2004. Bcl-2 overexpression inhibits tetrachlorohydroquinone-induced apoptosis in NIH3T3 cells: A possible mechanism for tumor promotion. *Molecular Carcinogenesis* 40: 24-33.
- Liu, X., H. Conner, T. Kobayashi, H. Kim, F. Wen, S. Abe, Q. Fang, X. Wang, M. Hashimoto, P. Bitterman, and S. I. Rennard. 2005. Cigarette Smoke Extract Induces DNA Damage but Not Apoptosis in Human Bronchial Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33: 121-129.
- Los, M., M. Mozoluk, D. Ferrari, A. Stepczynska, C. Stroh, A. Renz, Z. Herceg, Z.-Q. Wang, and K. Schulze-Osthoff. 2002. Activation and Caspase-mediated Inhibition of PARP: A Molecular Switch between Fibroblast Necrosis and Apoptosis in Death Receptor Signaling. *Mol. Biol. Cell* 13: 978-988.
- Ly, J. D., D. R. Grubb, and A. Lawen. 2003. The mitochondrial membrane potential in apoptosis; an update. *Apoptosis* 8: 115-128.
- Mancini, M., B. O. Anderson, E. Caldwell, M. Sedghinasab, P. B. Paty, and D. M. Hockenbery. 1997. Mitochondrial Proliferation and Paradoxical Membrane Depolarization during Terminal Differentiation and Apoptosis in a Human Colon Carcinoma Cell Line. J. Cell Biol. 138: 449-469.
- Marquardt, H., and W. Pfau. 2004. Chemische Kanzerogenese. Pages 157-193 in H. Marquardt and S. Schäfer, eds. *Lehrbuch der Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Stuttgart.

- Marquardt, H., M. Sapozink, and M. Zedeck. 1974. Inhibition by cysteamine-HCl of oncogenesis induced by 7,12-dimethylbenz(alpha)anthracene without affecting toxicity. *Cancer Research* 34: 3387-3390.
- Martindale, J. L., and N. J. Holbrook. 2002. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology* 192: 1-15.
- McConkey, D. J. 1998. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicology Letters* 99: 157-168.
- Meinhardt, G., J. Roth, and G. Totok. 2000. Protein kinase C activation modulates pro- and anti-apoptotic signaling pathways. *European Journal of Cell Biology* 79: 824-833.
- Mishra, N., and S. Kumar. 2005. Apoptosis: a mitochondrial perspective on cell death. *Indian journal of experimental biology* 43: 25-34.
- Morimoto, H., H. Okamura, K. Yoshida, S. Kitamura, and T. Haneji. 2004. Okadaic Acid Induces Apoptosis through Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase/Eukaryotic Initiation Factor-2{alpha} Pathway in Human Osteoblastic MG63 Cells. *J Biochem (Tokyo)* 136: 433-438.
- Nichols, W. K., R. Mehta, K. Skordos, K. Mace, A. M. A. Pfeifer, B. A. Carr, T. Minko, S. W. Burchiel, and G. S. Yost. 2003. 3-Methylindole-Induced Toxicity to Human Bronchial Epithelial Cell Lines. *Toxicol. Sci.* 71: 229-236.
- Nicholson, D., and N. Thornberry. 2003. Apoptosis. Life and death decisions. *Science* 299: 214-215.
- Nicholson, D. W., A. Ali, N. A. Thornberry, J. P. Vaillancourt, C. K. Ding, M. Gallant, Y. Gareau, P. R. Griffin, M. Labelle, Y. A. Lazebnik, N. A. Munday, S. M. Raju, M. E. Smulson, T.-T. Yamin, V. L. Yu, and D. K. Miller. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. 376: 37-43.
- Nicotera, P., and G. Melino. 2004. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 23: 2757-65.
- Nomura, M., A. Kaji, W. Ma, K. Miyamoto, and Z. Dong. 2001. Suppression of cell transformation and induction of apoptosis by caffeic acid phenethyl ester. *Molecular Carcinogenesis* 31: 83-89.
- O'Neill, J., M. Manion, P. Schwartz, and D. M. Hockenbery. 2004. Promises and challenges of targeting Bcl-2 anti-apoptotic proteins for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1705: 43-51.
- Orrenius, S. 2004. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicology Letters* 149: 19-23.
- Oslund, K. L., L. A. Miller, J. L. Usachenko, N. K. Tyler, R. Wu, and D. M. Hyde. 2004. Oxidant-Injured Airway Epithelial Cells Upregulate Thioredoxin but Do Not Produce Interleukin-8. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30: 597-604.

- Pascal, L., and D. Tessier. 2004. Cytotoxicity of chromium and manganese to lung epithelial cells in vitro. *Toxicology Letters* 147(2):: 143-51.
- Paschke, T., G. Scherer, and W. Heller. 2002. Effects of Ingredients on Cigarette Smoke Composition and Biological Activity: A Literature Overview. *Beiträge zur Tabakforschung International/ Contributuions to Tobacco Research* 20.
- Pennington, M., and N. Thornberry. 1994. Synthesis of a fluorogenic interleukin-1 beta converting enzyme substrate based on resonance energy transfer. *Peptide research* 7: 72-76.
- Pessayre, D., G. Feldmann, D. Haouzi, D. Fau, A. Moreau, and M. Neuman. 2000. Hepatocyte apoptosis triggered by natural substances (cytokines, other endogenous molecules and foreign toxins). Pages 60-108 in R. G. C. G. Feuer, ed. *Apoptosis and Its Modulation by Drugs*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Philchenkov, A. 2004. Caspases: potential targets for regulating cell death. *Journal of cellular and molecular medicine* 8: 432-444.
- Philip, M., D. A. Rowley, and H. Schreiber. 2004. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Seminars in Cancer Biology* 14: 433-439.
- Piperi C, P. A., Katerelos NA, Hatzinikolaou DG, Stavridou A, Psallidopoulos MC. 2003. Study of the mechanisms of cigarette smoke gas phase cytotoxicity. *Anticancer Research* 23: 2185-2190.
- Proskuryakov, S., A. Konoplyannikov, and V. Gabai. 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* 283: 1-16.
- Reed, J. 2004. Apoptosis mechanisms: implications for cancer drug discovery. Oncology (Williston Park, N.Y.) 18: 11-20.
- Richter, E., and G. Scherer. 2004. Aktives und passives Rauchen. Pages 897-918 in H. Marquardt, ed. *Lehrbuch der Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Stuttgart.
- Rubin, H. 2001. Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis* 22: 1903-1930.
- 2002. Selective clonal expansion and microenvironmental permissiveness in tobacco carcinogenesis. Oncogene 21: 7392-7411.
- Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96-99.
- Saran, G. B. S. D. I. E. A. S. M. 2000. Reactive Oxygen Species and Apoptosis. Pages 275-318 in R. g. C. G. Feuer, ed. *Apoptosis and Its Modulation by Drugs*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Sauer, H., M. Wartenberg, and J. Hescheler. 2001. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cellular*

physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology 11: 173-186.

- Schrenk, D., H.-J. Schmitz, S. Bohnenberger, B. Wagner, and W. Worner. 2004. Tumor promoters as inhibitors of apoptosis in rat hepatocytes. *Toxicology Letters* 149: 43-50.
- Schulte-Hermann, R. M., B. ; Bursch, W. ; Grasl-Kraupp, B. 2004. Tumorpromotion. Pages 195-242 in H. Marquardt and S. Schäfer, eds. *Lehrbuch der Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Stuttgart.
- Schultz, D., and W. J. Harrington. 2003. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Seminars in Athritis and Rheumatism* 32: 345-369.
- Shin, H.-J., B.-H. Lee, M. G. Yeo, S.-H. Oh, J.-D. Park, K.-K. Park, J.-H. Chung, C.-K. Moon, and M.-O. Lee. 2004. Induction of orphan nuclear receptor Nur77 gene expression and its role in cadmium-induced apoptosis in lung. *Carcinogenesis* 25: 1467-1475.
- Shishodia, S., P. Potdar, C. G. Gairola, and B. B. Aggarwal. 2003. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates cigarette smoke-induced NF-{kappa}B activation through inhibition of I{kappa}B{alpha} kinase in human lung epithelial cells: correlation with suppression of COX-2, MMP-9 and cyclin D1. *Carcinogenesis* 24: 1269-1279.
- Simon, H.-U., A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer. 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5: 415-418.
- Smaili, S., Y. Hsu, K. Sanders, J. Russell, and R. Youle. 2001. Bax translocation to mitochondria subsequent to a rapid loss of mitochondrial membrane potential. *Cell Death and Differantiation* 8: 909-920.
- Smith, C. J., T. A. Perfetti, M. J. Morton, A. Rodgman, R. Garg, C. D. Selassie, and C. Hansch. 2002. The Relative Toxicity of Substituted Phenols Reported in Cigarette Mainstream Smoke. *Toxicol. Sci.* 69: 265-278.
- Sperandio, S., I. de Belle, and D. E. Bredesen. 2000. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *PNAS* 97: 14376-14381.
- Sprick, M. R., and H. Walczak. 2004. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research* 1644: 125-132.
- Strasser, A., L. O'Connor, and V. Dixit. 2000. Apoptosis signaling. *Annual Review of Biochemistry* 69: 217-245.
- Su, Y.-T., H.-L. Chang, S.-K. Shyue, and S.-L. Hsu. 2005. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen speciesdependent mitochondrial signaling pathway. *Biochemical Pharmacology* 70: 229-241.
- Sunil, V. R., A. J. Connor, N. Lavnikova, C. R. Gardner, J. D. Laskin, and L. D. Laskin. 2002. Acute endotoxemia prolongs the survival of rat lung neutrophils

in response to 12-<I>O</I>-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate. *Journal of Cellular Physiology* 190: 382-389.

- Takada, Y., A. Murakami, and B. B. Aggarwal. 2005. Zerumbone abolishes NF-[kappa]B and I[kappa]B[alpha] kinase activation leading to suppression of antiapoptotic and metastatic gene expression, upregulation of apoptosis, and downregulation of invasion.
- Tan, S., Y. Sagara, Y. Liu, P. Maher, and D. Schubert. 1998. The Regulation of Reactive Oxygen Species Production during Programmed Cell Death. J. Cell Biol. 141: 1423-1432.
- Thornberry, N., and Y. Lazebnik. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316.
- Thornberry, N. A., T. A. Rano, E. P. Peterson, D. M. Rasper, T. Timkey, M. Garcia-Calvo, V. M. Houtzager, P. A. Nordstrom, S. Roy, J. P. Vaillancourt, K. T. Chapman, and D. W. Nicholson. 1997. A Combinatorial Approach Defines Specificities of Members of the Caspase Family and Granzyme B.
   FUNCTIONAL RELATIONSHIPS ESTABLISHED FOR KEY MEDIATORS OF APOPTOSIS. J. Biol. Chem. 272: 17907-17911.
- Thun, M. J. 2005. When truth is unwelcome: the first reports on smoking and lung cancer. *Bulletin of the World Health Organization* 83: 144-145.
- Unal-Cevik, I., M. Kilinc, A. Can, Y. Gursoy-Ozdemir, and T. Dalkara. 2004. Apoptotic and Necrotic Death Mechanisms Are Concomitantly Activated in the Same Cell After Cerebral Ischemia. *Stroke* 35: 2189-2194.
- Van Duuren, B., and B. Goldschmidt. 1976. Cocarcinogenic and tumor-promoting agents in tobacco carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* 56: 1237-1242.
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutellingsperger. 1995. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* 184: 39-51.
- Volkova, T., I. Malysheva, and N. Nemova. 2005. Phorbol 12-myristate 13-acetate inhibits apoptosis in erythroleukemia K562 cells induced by some nucleosides. *Ontogenez* 36: 18-25.
- Waisberg, M., P. Joseph, B. Halea, and D. Beyersmann. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 5: 95-117.
- Wang, J., D. E. L. Wilcken, and X. L. Wang. 2001. Cigarette Smoke Activates Caspase-3 to Induce Apoptosis of Human Umbilical Venous Endothelial Cells. *Molecular Genetics and Metabolism* 72: 82-88.
- Wang, S., F. Chen, Z. Zhang, B. Jiang, L. Jia, and X. Shi. 2004. NF-kappaB prevents cells from undergoing Cr(VI)-induced apoptosis. *molecular and cellular biochemistry* 255: 129-37.

- Whitrow, M., B. Smith, L. Pilotto, D. Pisaniello, and M. Nitschke. 2003. Environmental exposure to carcinogens causing lung cancer: epidemiological evidence from the medical literature. *Respirology* 8: 513-521.
- WHO. 2003. Gender, Health and Tobacco. World Health Organization, Genf.
- Wickenden, J. A., M. C. H. Clarke, A. G. Rossi, I. Rahman, S. P. Faux, K. Donaldson, and W. MacNee. 2003. Cigarette Smoke Prevents Apoptosis through Inhibition of Caspase Activation and Induces Necrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29: 562-570.
- Widlak, P. 2000. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta biochimica Polonica* 47: 1037-44.
- Wu, X.-J., F. Kassie, and V. Mersch-Sundermann. 2005. The role of reactive oxygen species (ROS) production on diallyl disulfide (DADS) induced apoptosis and cell cycle arrest in human A549 lung carcinoma cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* In Press, Corrected Proof.
- Wyllie, A. 1997. Apoptosis: an overview. British Medical Bulletin 53: 451-465.
- Wyllie, A., J. Kerr, and A. Currie. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. International Review of Cytology 68: 251-306.
- Xiang, J., D. T. Chao, and S. J. Korsmeyer. 1996. BAX-induced cell death may not require interleukin 1beta -converting enzyme-like proteases. *PNAS* 93: 14559-14563.
- Yanysheva, N., N. Balenko, I. Chernichenko, and V. Babiy. 1993. Peculiarities of carcinogenesis under simultaneous oral administration of benzo(a)pyrene and o-cresol in mice. *Enviromental health perspectives* 101 Suppl 3: 341-344.
- Zhu, G., R. Gilchrist, N. Borley, H. W. Chng, M. Morgan, J. F. Marshall, R. S. Camplejohn, G. H. Muir, and I. R. Hart. 2004. Reduction of TSG101 protein has a negative impact on tumor cell growth. *International Journal of Cancer* 109: 541-547.
- Zhuang, S., J. Demirs, and I. Kochevar. 2001. Protein kinase C inhibits singlet oxygen-induced apoptosis by decreasing caspase-8 activation. *Oncogene* 20: 6764-6776.
- Zimmermann, K., and D. Green. 2001. How cells die: apoptosis pathways. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108: 99-103.
- Zimmermann, K. C., C. Bonzon, and D. R. Green. 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics* 92: 57-70.

# 8 Anhang

### R- und S-Sätze

### Gefahrenhinweise (R-Sätze)

- R 1 In trockenem Zustand explosionsgefährlich.
- R 2 Durch Schlag, Reibung, Feuer und andere Zündquellen; explosionsgefährlich.
- R 3 Durch Schlag, Reibung, Feuer und andere Zündquellen; besonders explosionsgefährlich.
- R 4 Bildet hochempfindliche explosionsgefährliche Metallverbindungen.
- R 5 Beim Erwärmen explosionsfähig.
- R 6 Mit und ohne Luft explosionsfähig.
- R 7 Kann Brand verursachen.
- R 8 Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen.
- R 9 Explosionsgefahr bei Mischung mit brennbaren Stoffen.
- R 10 Entzündlich.
- R 11 Leichtentzündlich.
- R 12 Hochentzündlich.
- R 14 Reagiert heftig mit Wasser.
- R 15 Reagiert mit Wasser unter Bildung leicht entzündlicher Gase.
- R 16 Explosionsgefährlich in Mischung mit brandfördernden Stoffen.
- R 17 Selbstentzündlich an der Luft.
- R 18 Bei Gebrauch Bildung explosionsfähiger /leicht-entzündlicher Dampf-Luftgemische möglich.
- R 19 Kann explosionsfähige Peroxide bilden.
- R 20 Gesundheitsschädlich beim Einatmen.
- R 21 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut.
- R 22 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
- R 23 Giftig beim Einatmen.
- R 24 Giftig bei Berührung mit der Haut.
- R 25 Giftig beim Verschlucken.
- R 26 Sehr giftig beim Einatmen.
- R 27 Sehr giftig bei Berührung mit der Haut.

XXIII

R 28	Sehr giftig beim Verschlucken.
R 29	Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase.
R 30	Kann bei Gebrauch leicht entzündlich werden.
R 31	Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.
R 32	Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
R 33	Gefahr kumulativer Wirkungen.
R 34	Verursacht Verätzungen.
R 35	Verursacht schwere Verätzungen.
R 36	Reizt die Atmungsorgane.
R 38	Reizt die Haut.
R 39	Ernste Gefahr irreversiblen Schadens.
R 40	Verdacht auf krebserzeugende Wirkung.
R 41	Gefahr ernster Augenschäden.
R 42	Sensibilisierung durch Einatmen möglich.
R 43	Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.
R 44	Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss.
R 45	Kann Krebs erzeugen.
R 46	Kann vererbbare Schäden verursachen.
R 47	Kann Missbildungen verursachen.
R 48	Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition.
R 49	Kann Krebs erzeugen beim Einatmen.
R 50	Sehr giftig für Wasserorganismen.
R 51	Giftig für Wasserorganismen.
R 52	Schädlich für Wasserorganismen.
R 53	Kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
R 54	Giftig für Pflanzen.
R 55	Giftig für Tiere.
R 56	Giftig für Bodenorganismen.
R 57	Giftig für Bienen.
R 58	Kann längerfristig schädliche Wirkungen auf die Umwelt haben.
R 59	Gefährlich für die Ozonschicht.
R 60 XXIV	Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen.

- R 61 Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
- R 62 Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen.
- R 63 Kann das Kind im Mutterleib möglicherweise schädigen.
- R 64 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
- R 65 Gesundheitsschädlich: Kann beim Verschlucken Lungenschäden verursachen.
- R 66 Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.
- R 67 Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
- R 68 Irreversibler Schaden möglich.

#### Kombination der R-Sätze

- R 14/15 Reagiert heftig mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase.
- R 15/29 Reagiert mit Wasser unter Bildung giftiger und hochentzündlicher Gase.
- R 20/21 Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R 20/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken.
- R 20/21/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R 21/22 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.
- R 23/24 Giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R 23/25 Giftig beim Einatmen und Verschlucken.
- R 23/24/25 Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R 24/25 Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.
- R 26/27 Sehr giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R 26/28 Sehr giftig beim Einatmen und Verschlucken.
- R 26/27/28 Sehr giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R 27/28 Sehr giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.
- R 36/37 Reizt die Augen und die Atmungsorgane.
- R 36/38 Reizt die Augen und die Haut.
- R 36/37/38 Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut.
- R 37/38 Reizt die Atmungsorgane und die Haut.
- R 39/23 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen.
- R 39/24 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut.

- R 39/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Verschlucken.
- R 39/23/24 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R 39/23/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken.
- R 39/24/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
- R 39/23/24/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
- R 39/26 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen.
- R 39/27 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut.
- R 39/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Verschlucken.
- R 39/26/27 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R 39/26/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken.
- R 39/27/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
- R 39/26/27/28 Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
- R 42/43 Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich.
- R 48/20 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen.
- R 48/21 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut.
- R 48/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Verschlucken.
- R 48/20/21 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Berührung mit der Haut.
- R 48/20/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken.
- R 48/21/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

- R 48/20/21/22 Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
- R 48/23 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen.
- R 48/24 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut.
- R 48/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Verschlucken.
- R 48/23/24 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Berührung mit der Haut.
- R 48/23/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken.
- R 48/24/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
- R 48/23/24/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
- R 50/53 Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
- R 51/53 Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
- R 52/53 Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
- R 68/20 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen.
- R 68/21 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut.
- R 68/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Verschlucken.
- R 68/20/21 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
- R 68/20/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken.
- R 68/21/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
- R 68/20/21/22 Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.

#### Sicherheitsratschläge (S-Sätze)

S 1 Unter Verschluss aufbewahren. S 2 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen. S 3 Kühl aufbewahren. S 4 Von Wohnplätzen fernhalten. S 5 Unter ... aufbewahren. (geeignete Flüssigkeit vom Hersteller anzugeben) S 5.1 Unter Wasser aufbewahren. S 5.2 Unter Petroleum aufbewahren. S 5.3 Unter Paraffinöl aufbewahren. S 6 Unter ... aufbewahren. (inertes Gas vom Hersteller anzugeben) S 6.1 Unter Stickstoff aufbewahren. S 6.2 Unter Argon aufbewahren. S 7 Behälter dicht geschlossen halten. S 8 Behälter trocken halten. S 9 Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren. S 12 Behälter nicht gasdicht verschließen. S 13 Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten. S 14 fernhalten. (inkompatible Substanzen vom Hersteller Von ... anzugeben) S 14.1 Von Reduktionsmitteln, Schwermetallverbindungen, Säuren und Alkalien fernhalten. Von oxidierenden und sauren Stoffen sowie Schwermetallverbindungen S 14.2 fernhalten. S 14.3 Von Eisen fernhalten. S 14.4 Von Wasser und Laugen fernhalten. S 14.5 Von Säuren fernhalten. S 14.6 Von Laugen fernhalten. S 14.7 Von Metallen fernhalten. S 14.8 Von oxidierenden und sauren Stoffen fernhalten. S 14.9 Von brennbaren organischen Substanzen fernhalten. S 14.10 Von Säuren, Reduktionsmitteln und brennbaren Materialien fernhalten. S 14.11 Von brennbaren Stoffen fernhalten. XXVIII

S16	Von Zündquellen fernhalten - nicht rauchen.
S 17	Von brennbaren Stoffen fernhalten.
S 18	Behälter mit Vorsicht öffnen und handhaben.
S 20	Bei der Arbeit nicht essen und trinken.
S 21	Bei der Arbeit nicht rauchen.
S 22	Staub nicht einatmen.
S 23	Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen. (geeignete Bezeichnungen vom Hersteller anzugeben)
S 23.1	Gas nicht einatmen.
S 23.2	Dampf nicht einatmen.
S 23.3	Aerosol nicht einatmen.
S 23.4	Rauch nicht einatmen.
S 23.5	Dampf/Aerosol nicht einatmen.
S 24	Berührung mit der Haut vermeiden.
S 25	Berührung mit den Augen vermeiden.
S 26	Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
S 27	Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen.
S 28	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel (vom Hersteller anzugeben)
S 28.1	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser.
S 28.2	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und Seife.
S 28.3	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und Seife, möglichst auch mit Polyethylenglycol 400.
S 28.4	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglycol 300 und Ethanol (2:1) und anschließend mit viel Wasser und Seife.
S 28.5	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglycol 400.
S 28.6	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglycol 400 und anschließend Reinigung mit viel Wasser.
S 28.7	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und saurer Seife.

S 15

Vor Hitze schützen.

S 29	Nicht in die Kanalisation gelangen lassen.	
S 30	Niemals Wasser hinzu gießen.	
S 33	Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladung treffen.	
S 34	Schlag und Reibung vermeiden.	
S 35	Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden.	
S 36	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.	
S 37	Geeignete Schutzhandschuhe tragen.	
S 38	Bei unzureichender Belüftung Atemschutzgerät anlegen.	
S 39	Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.	
S 40	Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit reinigen. (Material vom Hersteller anzugeben)	
S 40.1	Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit viel Wasser reinigen.	
S 41	Explosions- und Brandgase nicht einatmen.	
S 42	Beim Räuchern/Versprühen geeignetes Atemschutzgerät anlegen. (Bezeichnung vom Hersteller anzugeben)	
S 43	Zum Löschen verwenden. (vom Hersteller anzugeben)(wenn Wasser die Gefahr erhöht, anfügen: Kein Wasser verwenden)	
S 43.1	Zum Löschen Wasser verwenden.	
S 43.2	Zum Löschen Wasser oder Pulverlöschmittel verwenden.	
S 43.3	Zum Löschen Pulverlöschmittel, kein Wasser verwenden.	
S 43.4	Zum Löschen Kohlendioxid kein Wasser verwenden.	
S 43.6	Zum Löschen Sand, kein Wasser verwenden.	
S 43.7	Zum Löschen Metallbrandpulver, kein Wasser verwenden.	
S 43.8	Zum Löschen Sand, Kohlendioxid oder Pulverlöschmittel, kein Wasser verwenden.	
S 44	Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).	
S 45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).	
S 46	Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.	
S 47	Nicht bei Temperaturen über°C aufbewahren. (vom Hersteller anzugeben)	
S 47.1	Nicht bei Temperaturen über 25°C aufbewahren.	

XXX

- S 48 Feucht halten mit ... (vom Hersteller anzugeben)
- S 48.1 Feucht halten mit Wasser.
- S 49 Nur im Originalbehälter aufbewahren.
- S 50 Nicht mischen mit ... (vom Hersteller anzugeben)
- S 50.1 Nicht mischen mit Säuren.
- S 50.2 Nicht mischen mit Laugen.
- S 50.3 Nicht mischen mit starken Säuren, starken Basen, Buntmetallen und deren Salzen.
- S 51 Nur in gut belüfteten Bereichen verwenden.
- S 52 Nicht großflächig für Wohn- u. Aufenthaltsräume zu verwenden.
- S 53 Exposition vermeiden vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. Nur für den berufsmäßigen Verwender -.
- S 56 Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.
- S 57 Zur Vermeidung einer Kontamination der Umwelt geeigneten Behälter verwenden.
- S 59 Information zur Wiederverwendung/ Wiederverwertung beim Hersteller/Lieferanten erfragen.
- S 60 Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen.
- S 61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
- S 62 Bei Verschlucken kein Erbrechen herbeiführen. Sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder dieses Etikett vorzeigen.
- S 63 Bei Unfall durch Einatmen: Verunfallten an die frische Luft bringen und ruhigstellen.
- S 64 Bei Verschlucken Mund mit Wasser ausspülen (Nur wenn Verunfallter bei Bewusstsein ist).

#### Kombination der S-Sätze

- S 1/2 Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren
- S 3/7 Behälter dicht geschlossen halten und an einem kühlen Ort aufbewahren
- S 3/9/14 An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von ... \*) aufbewahren
- S 3/9/14/49 Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von ... \*) aufbewahren

S 3/9/49	Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort aufbewahren		
S 3/14	An einem kühlen, von *) entfernten Ort aufbewahren		
S 7/8	Behälter trocken und dicht geschlossen halten		
S 7/9	Behälter dicht geschlossen an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren		
S 7/47	Behälter dicht geschlossen und nicht bei Temperaturen über *) °C aufbewahren		
S 20/21	Bei der Arbeit nicht essen, trinken, rauchen		
S 24/25	Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden		
S 27/28	Bei Berührung mit der Haut beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen und Haut sofort abwaschen mit viel *)		
S 29/35	Nicht in die Kanalisation gelangen lassen; Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden		
S 29/56	Nicht in die Kanalisation gelangen lassen; dieses Produkt und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen		
S 36/37	Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen		
S 36/37/39	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen		
S 36/39	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.		
S 37/39	Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen		
S 47/49	Nur im Originalbehälter bei einer Temperatur von nicht über *) °C aufbewahren		

\*) vom Hersteller anzugeben

### Eidesstattliche Versicherung gemäß §3 Buchstabe c) und d) der Promotionsordnung des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die an der Universität Hamburg eingereichte Dissertation mit dem Titel "Molekulare Mechanismen phenolischer und tumorpromovierender Substanzen aus dem Tabakrauch - Untersuchungen zum Einfluss von Tabakrauchkomponenten auf den programmierten Zelltod -" am Institut Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologe für des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Betreuung von JProf. Dr. Dorothee Dartsch (Institut für Pharmazie, Fachgebiet Klinische Pharmazie, Universität Hamburg) selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt und die den benutzten wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen pharmazeutischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hamburg, den

### Persönliche Daten

Katrin Thomas

geboren am 03.03.1974 in Hamburg

### Schulausbildung

1984 – 1994	Kreisgymnasium Bargteheide I
1990 – 1991	High School Abschluss, Ursuline Academy, Springfield, Illinois, USA

# Studium und Berufsausbildung

Ausbildung zur Chemielaborantin, GlaxoWellcome GmbH, Bad Oldesloe
Studium der Pharmazie an der Universität Regensburg
Diplomarbeit bei Prof. Dr. Achim Göpferich am Institut für Pharmazeutische Technologie, Universität Regensburg, verteidigt an der Martin-Luther-Universität, Halle- Wittenberg. Titel: "Three generations of Cyclosporine A formulations - an in vitro comparison -"
Pharmaziepraktikantin in der Rathaus-Apotheke, Bargteheide
Approbation als Apothekerin
Doktorarbeit am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf bei JProf. Dr. D. Dartsch (Fachbereich Pharmazie, Fachgebiet Klinische Pharmazie, Universität Hamburg)

## Danksagungen

Mein Dank gilt Frau JProf. Dr. Dorothee Dartsch, unter deren Leitung diese Arbeit entstand, für Ihr großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit, für viele wertvolle Anregungen und hilfreiche Diskussionen sowie für den großen Freiraum bei der Durchführung.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Heisig für seine Bereitschaft, als Gutachter zur Verfügung zu stehen.

Herrn Prof. Dr. Hans Marquardt möchte ich an dieser Stelle für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in den Laborräumen des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologe des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf danken.

Bei den Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologe des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf möchte ich mich für Ihre permanente Hilfsbereitschaft und großartige Unterstützung in Rat und Tat beim Anfertigen dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn und Herrn Dr. Patrick Ziegelmüller vom Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie der Universität Hamburg danke ich für die Möglichkeit, am Durchflusszytometer arbeiten zu können.

Ganz besonderer Dank gilt Kirstin Drenkhahn, Susanne Knauer und Niels Stahlke sowie meiner Schwester und meinen Eltern, die mich stets uneingeschränkt unterstützt haben.