

**Aus der Universitätsklinik für Radioonkologie Tübingen  
Abteilung Radioonkologie  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Bamberg  
Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung  
Leiter: Professor Dr. H. P. Rodemann  
Betreuer: PD Dr. K. Dittmann**

**Chemikalien- und strahleninduzierte neoplastische  
Zelltransformation und deren Prävention durch den  
Bowman-Birk Protease Inhibitor und Phospho-Tyrosin**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard- Karls- Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Carmen Bettina Dickewied  
aus Lemgo**

**2005**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. P. Rodemann

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Garbe

	Seite
<b>1. Einleitung</b> .....	7
<b>1.1 Klonale Evolution von Tumoren: Das Mehrstufenmodell der Onkogenese</b> .....	7
<b>1.2 Neoplastische Transformation in vitro durch Strahlung</b> .....	10
<b>1.3 Chemische Karzinogenese</b> .....	14
<b>1.4 In vitro Eigenschaften von Tumorzellen</b> .....	15
<b>1.5 Klassifizierung von Radioprotektoren</b> .....	16
1.5.1 Die Gruppe der passiv wirkenden Radioprotektoren.....	16
1.5.1.1 Aminothiole.....	16
1.5.1.2 Nahrungsbestandteile.....	17
1.5.2 Die Gruppe der aktiv wirkenden Radioprotektoren.....	18
1.5.2.1 Zytokine und Wachstumsfaktoren.....	18
1.5.2.3 Proteinaseinhibitoren.....	18
1.5.2.3 O-Phospho-L-Tyrosin.....	20
<b>1.6 Ziel dieser Arbeit</b> .....	21
<b>2. Material und Methoden</b> .....	22
<b>2.1 Methoden der Zellkultur</b> .....	22
2.1.1 Verwendete Zellen.....	22
2.1.2 Lösungen, Puffer und Medien.....	23
2.1.3 Bestrahlung.....	24
2.1.4 Bestimmung der Zellparameter.....	24
2.1.4.1 Zellzahlbestimmung.....	24

# INHALTSVERZEICHNIS

---

2.1.4.2 Koloniebildungsassay.....	24
2.1.4.3 Transformations Assay.....	25
2.1.4.4 Klonierung (Ringisolationstechnik).....	28
2.1.4.5 Softagarwachstum.....	28
2.1.4.6 Trypanblaufärbung.....	29
2.1.4.7 Vitalitätstests.....	30
<b>2.2 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>32</b>
2.2.1 Differential Display: Gene Array Technik.....	32
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Phänotypisches Erscheinungsbild des in vitro Zellsystems C3H 10T1/2.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Wachstumsverhalten von transformierten Zellen im Softagar am Beispiel der HH4-Wachstumskinetik.....</b>	<b>37</b>
<b>3.3 Test auf Softagarwachstum von potentiell transfor- mierten C3H 10T1/2.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4 Standard Transformations Assay.....</b>	<b>43</b>
3.4.1 Wachstumsverhalten der C3H 10T1/2 .....	44
3.4.1.1 Populationszeitverdopplung.....	44
3.4.1.2 Effekt von BBI bzw. P-Tyrosin auf die Zellproliferation nach ionisierender Strahlung bzw. MCA-Behandlung.....	46
3.4.1.3 Effekt von BBI bzw. P-Tyrosin auf das klonogene Überleben nach Behandlung mit Strahlung / MCA.....	50

# INHALTSVERZEICHNIS

---

3.4.1.4 Klonogenes Überleben von normalen C3H 10T1/2 Fibroblasten nach IR bzw. MCA-Behandlung mit / ohne Präinkubation von BBI / P-Tyrosin.....	52
3.4.1.5 Effekt von ionisierender Strahlung bzw. MCA auf die Lebensfähigkeit von C3H Zellen.....	55
3.4.2 Quantitative Auswertung des Standard Transformations Assays.....	61
3.4.2.1 Transformationsereignisse in Abhängigkeit von dem Zellalter.....	64
3.4.2.2 Berechnung der Transformationsfrequenz.....	67
<b>3.5 Gene Array Technik.....</b>	<b>75</b>
3.5.1 Cell Cycle Array.....	75
3.5.2 Pathwayfinder Array.....	78
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>81</b>
4.1 Übersicht.....	81
4.2 Charakterisierung des Wachstumsverhaltens von C3H 10T1/2 unter fraktionierter Therapie.....	81
4.3 Modulation der Transformationseffizienz durch ionisierende Strahlung und MCA.....	84
4.4 Einfluss von BBI und P-Tyrosin auf den Transformationsprozess.....	86
4.5 Ideen zum molekularen Mechanismus von P-Tyrosin.....	88

# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>4.6 Überlegung zum molekularen Mechanismus der chemikalieninduzierten Zelltransformation.....</b>	<b>89</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>92</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>94</b>
<b>7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>102</b>
<b>8. Abkürzungen.....</b>	<b>105</b>
<b>9. Lebenslauf.....</b>	<b>107</b>
<b>10.Danksagung.....</b>	<b>109</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Klonale Evolution von Tumoren: Das Mehrstufenmodell der Onkogenese

In der Regel sind Tumore monoklonalen Ursprungs, d.h. sie sind aus einer einzelnen normalen Zelle hervorgegangen, die zu einer neoplastischen Zelle mutierte (Nowell, 1976). Unter maligner Transformation versteht man die Entartung einer eukaryotischen Normalzelle (in vitro) zu einer Zelle, die sich durch ihre Morphologie von Normalzellen unterscheidet und die sich außerdem durch Immortalisierung und Tumorigenität auszeichnet. Lehane et al. (1999) definierte Transformation als einen komplexen in mehreren Schritten ablaufenden Prozess, durch den gutartige Zellen nach und nach Charakteristika von Tumorzellen erlangen. Die Transformation einer oder mehrerer Zellen in einem Gewebe repräsentiert den ersten Schritt in Richtung Karzinogenese. Ob sich aus jener Zelle ein invasiver, maligner Tumor entwickelt, hängt von zahlreichen endogenen und exogenen Faktoren ab.

Grundsätzlich sind bei der Karzinogenese besonders zwei Genklassen von Bedeutung: Proto-Onkogene und Tumor-Suppressorgene. Primär haben diese Gene nichts mit Tumoren zu tun, vielmehr handelt es sich um Gene, die für den geregelten Ablauf von Zellteilung notwendig sind. Erst wenn Veränderungen an diesen Genen auftreten, wird der Bezug zum Tumor hergestellt. Mutationen können Proto-Onkogene betreffen, die somit zu Onkogenen aktiviert werden können. Das vom Onkogen codierte Protein beschleunigt die Zellneubildung. Tumorsuppressoren und deren Genprodukte können durch Mutationen eliminiert bzw. funktionsuntüchtig gemacht werden. Das mutierte Tumor-Suppressor-Protein kann die Zellneubildung nicht mehr ausreichend bremsen (Alberts et al., 1995).

Ein gängiges Modell für die Entwicklung von Tumorzellen ist das Mehrstufenmodell der Karzinogenese (Vogelstein, 1993). Demnach läuft die Onkogenese in mehreren Stufen ab:

1. Initiationsphase
2. Promotionsphase
3. Progressionsphase

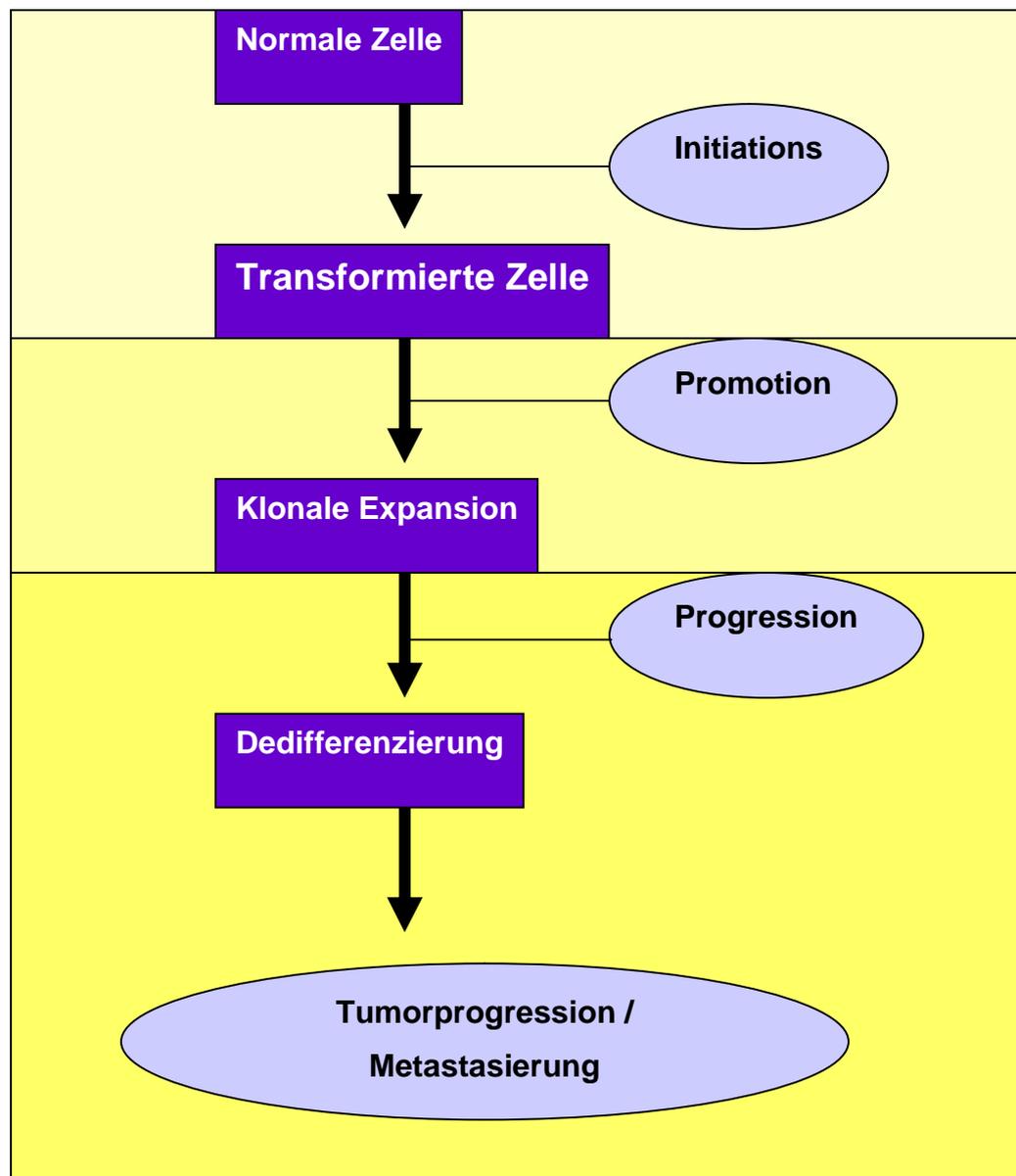
Ein initiales Ereignis, z.B. durch ionisierende Strahlung induziert, führt bei einer Zelle zu einem Wachstumsvorteil gegenüber den Nachbarzellen. Ein Tumorsuppressorgen könnte beispielsweise mutiert sein. In der Promotionsphase wird eine in der Initiationsphase transformierte Zelle durch ein promovierendes Agens (z.B. IR, chemische Karzinogene) so verändert, dass diese durch Expansion zu einem Klon identischer Zellen heranwächst. Der Tumorpromotor hat der veränderten Zelle also einen Wachstumsvorteil verschafft, der zur autonomen, progressiven und überschießenden Proliferation gegenüber dem Normalgewebe führte. Schließlich bildet sich ein lokaler Tumor, der sich sämtlichen Kontrollmechanismen entzogen hat. Bricht der Tumor in fremdes Gewebe ein (Invasion) und bildet dort ein Tochtergeschwulst (Metastasierung), spricht man von Progression (Pschyrembel, 257, 1994; Rodemann, 2000; Wagener, 1999).

Der genaue molekularbiologische Prozess der Onkogenese bzw. die molekulargenetischen Veränderungen, die im Laufe der Entwicklung eintreten, konnte bisher nur am Beispiel des humanen Kolonkarzinoms aufgedeckt werden (Vogelstein, 1993).

Über den tatsächlichen molekularen Mechanismus der strahleninduzierten, malignen Onkogenese existieren Modelle, die allerdings noch nicht bis in jedes Detail geklärt sind. Auf eines dieser Modelle wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

# EINLEITUNG

---



**Abb. 1** Dreistufenmodell der Onkogenese

## **1.2 Neoplastische Transformation in vitro durch Strahlung**

Im Vergleich zur Onkogenese des menschlichen Kolonkarzinoms, bei der die beteiligten molekulargenetischen Veränderungen durch Vogelstein (1993) aufgeklärt wurden, gibt es zur strahleninduzierten neoplastischen Transformation kein einheitliches Modell. Es existieren viele wissenschaftlich belegte Daten über strahlenbedingte Mutationen, die im Verlauf der Zeit zu malignen Tumoren führen. Man spricht bei der strahleninduzierten Karzinogenese im Vergleich zu der chemikalieninduzierten Onkogenese von einem stochastischen Prozess: Es existiert keine Schwellendosis, unter der das Risiko für das Auftreten von Krebs gleich null ist. Prinzipiell kann bei jeder Strahlendosis Krebs ausgelöst werden (Rodemann, 2000). Theoretisch genügt also ein Ereignis, um einen Tumor auszulösen.

Zentrale Bedeutung bei der strahleninduzierten Transformation kommt der Schädigung der DNS zu und damit der resultierenden genetischen Veränderungen am Genom. Ionisierende Strahlung bewirkt an der DNS ein charakteristisches Spektrum molekularer Veränderungen. In Abhängigkeit von der Strahlenart kommt es zu einer Verteilung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen, Basenverlust, Punktmutationen und sogenannten „geclusterten“ Schäden. Strahleninduzierte Mutationen und Rekombinationen in den Körperzellen sind verantwortlich für die Entstehung von transformierten Zellen und malignen Tumoren (Ganten, Ruckpaul, 1998; „Strahlenschutz in Forschung und Praxis“, 2001).

### **1.2.1 Rolle der Onkogene in der strahleninduzierten Mutagenese**

Proto-Onkogene codieren für vier wichtige Protein-Klassen: Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Signalketten-Proteine und Transkriptionsfaktoren. Um einige Beispiele für Proteine zu nennen, die von Proto-Onkogenen codiert werden, seien hier als Wachstumsfaktoren „sis“ und „wnt1“, als Rezeptoren „erbB“ und „neu“, als Signalkettenproteine „ras“, „src“,

„abl“, „raf“ und als Transkriptionsfaktoren „myc“, „myb“, „fos“ und „jun“ genannt („Strahlenschutz in Forschung und Praxis“, 2001).

Strahlenbedingte Mutationen können Protoonkogene betreffen, die auf diese Weise zu Onkogenen aktiviert werden können. Von Onkogenen weiß man sehr genau, dass sie in die strahleninduzierte Zelltransformation involviert sind. Ein aktiviertes Onkogen und das von ihm codierte Protein beschleunigt die Zellneubildung. Welche Rolle die Aktivierung spezieller Onkogene konkret bei der Entwicklung von malignen Tumoren spielen, ist weniger klar (Cox et al., 1992; Bowden et al., 1990). Es gibt allerdings Hinweise, dass das gehäuft bei Kindern nach der Reaktorkatastrophe von Tschernobyl auftretende solide oder follikuläre Schilddrüsenkarzinom aus einer strahlenbedingten RET Onkogenaktivierung resultiert (Simda et al., 1999; Pisarchik et al., 1998; „Strahlenschutz in Forschung und Praxis“, 2001). Das Produkt des RET Gens ist ein Membran-Rezeptor mit Glia Derived Growth Factor als Ligand (Durbec et al., 1996). Ret wird normalerweise auf Zellen endokrin stimulierbarer Organe exprimiert und leitet bei Bindung seines Liganden Wachstumssignale an das Zellinnere. Durch eine unkontrollierte, ligandenunabhängige Aktivierung seiner Tyrosinkinase kommt es in betroffenen Zellen zu ungebremster Zellteilung (Rabes et al., 1997).

Als weiteres Beispiel soll auf die Onkogene myc und ras eingegangen werden. Als Protoonkogen fungiert das Genprodukt Myc als Genregulatorprotein, das Ras-Protein stellt in der normalen Zellphysiologie ein GTP-bindendes Protein dar (Alberts et al., 1995).

Nach der „gene-mutation-cancer-hypothesis“ spielen mutierte zelluläre Protoonkogene wie z.B. das punktmutierte Proto-ras eine dominante Rolle bei der Krebsentstehung (Alberts et al., 1995). Hua et al. (1997) fanden allerdings, dass eine (in vitro) Transformation durch mutiertes humanes ras Gen erst dann induziert wird, wenn jenes Onkogen mehr als 100mal höher in in vitro Zellen exprimiert wurde als vergleichsweise in Karzinomzellen (Hua et al., 1997). Daraus schlossen sie, dass mutiertes, aber auf normalem Niveau exprimiertes ras-Onkogen in menschlichen und tierischen Zellen keine dominante Rolle bei der Krebsentstehung spielen. Interessanterweise fand man eine gemeinsame

Aktivierung von c-Ki-ras und c-myc in einigen strahleninduzierten Hauttumoren von Ratten (Sawey et al., 1987), nicht aber in Hauttumoren von Mäusen (Bowden et al., 1990).

Dies legt den Schluss nahe, dass möglicherweise noch andere, bisher unbekannte Gene im Transformationsprozess involviert sein könnten. Es ist weiterhin unklar, ob eine Onkogenaktivierung eine Konsequenz der direkten Interaktion von Strahlung mit DNS darstellt oder ob diese erst nach komplexen Signalkaskaden eintritt, die durch DNS Schäden getriggert werden (z.B. Onkogenaktivierung durch Punktmutation im kodierenden Bereich des Gens durch fehlerhafte DNS Reparatur). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die ras-Onkogen-Aktivierung spät im Verlauf der radiogenen Transformation stattfindet (Krolewski et al., 1989).

### **1.2.2 Rolle der Tumor-Suppressorgene in der Karzinogenese**

Tumor-Suppressorgene codieren für Proteine, welche die Zellteilung hemmen. „p16“, „p21“, „p53“, „RB“ und „cdc2“ sind einige Beispiele für solche Gene („Strahlenschutz in Forschung und Praxis“, 2001). Ein mutiertes Tumorsuppressorgen führt zu einem Protein, dass die Zellneubildung nicht mehr ausreichend bremst.

Ein Beispiel für ein häufig diskutiertes Tumorsuppressorgen ist das p53 Gen. Das p53 Protein ist eines der wichtigsten bekannten Proteine der Zellantwort auf DNS-Schädigung durch Strahlung und wacht über die Integrität des Genoms (Lane et al., 1992). Obwohl es für das Überleben nicht unbedingt notwendig ist, wie Untersuchungen an p53-Knock-out-Mäusen zeigen, führt sein Verlust doch zu einer stark erhöhten Tumorstärke (Donehower et al. 1992). p53 ist an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Reaktionen nach Bestrahlung beteiligt: Zellzyklusregulation (Hartwell, Kastan, 1994; Murray, 1992), Apoptose (Kruman et al., 1991, Yamada, Ohyama, 1988), DNS-Reparatur, insbesondere Exzisionsreparatur (Sanchez, Ellege, 1995, Smith et al., 1995).

## EINLEITUNG

---

Man findet p53 Mutationen in vielen menschlichen Tumoren, auch in Hauttumoren von Mäusen, die durch Strahlung induziert wurden (Greenblatt et al., 1994). Bei Untertagearbeitern fand man durch  $\alpha$ -Strahlen induzierten Lungenkrebs, der mit Mutationen im p53-Gen assoziiert waren (Hollstein et al., 1997).

Ein gängiges Modell für die strahleninduzierte Transformation von Fibroblasten in tumorigene, sarkombildende Zellen wurde basierend auf Literaturdaten von Rodemann (2000) aufgestellt:

Werden Zellen mit ionisierender Strahlung behandelt, so kommt es auf direktem (durch IR wird DNS direkt geschädigt) oder indirektem Weg (Erzeugung von Radikalen durch IR, die dann die DNS schädigen) zur Schädigung von DNS-Bereichen u.a. auch vom p53 Gen. Ein p53 Protein, das sich durch eine manifestierte p53-Mutation auszeichnet, kann nun nicht wie in normalen Zellen als Reaktion auf DNS-schädigende Noxen (Promotoren) einen G1-Arrest mit Schadensreparatur durchführen. Entweder die transformierte Zelle geht aufgrund eines mitotischen Fehlers zugrunde oder sie proliferiert aufgrund von Selektionsvorteilen stärker als die benachbarten Zellen. Somit kommt es zur klonalen Expansion aneuploider Zellen und Tumorprogression.

In vitro Untersuchungen an radiogen transformierten C3H 10T1/2-Zellklonen von Syljuasen et al.(2001) ergaben, daß p53-Mutationen erst spät im Verlauf des Transformationsprozesses auftreten und kein initiales Event darstellen. Bei den transformierten Fibroblasten trat entweder kein oder ein signifikant reduzierter G1-Block nach IR auf. Dieser G1-Block war unabhängig vom p53-Status des untersuchten Zellklones.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass derzeit kein zusammenhängendes Modell existiert, welches alle genetischen Veränderungen und deren Wechselwirkungen in Laufe der strahlenbedingten Karzinogenese chronologisch berücksichtigt.

### 1.3 Chemische Karzinogenese

Bardelli formulierte in seinem in 2001 veröffentlichten Artikel, dass es eine karzinogenspezifische Induktion von genetischer Instabilität gibt. Das legt die Vermutung nahe, dass sich der molekulare Mechanismus der chemischen Karzinogenese von der strahleninduzierten erheblich unterscheidet.

Der genaue Mechanismus ist auch hier nicht bekannt. Außerdem besitzen die karzinogenen Chemikalien äußerst unterschiedliche Ansatzpunkte in der Zelle, so dass man die Karzinogenese chemikalienspezifisch betrachten muss. Von besonderem Interesse im Zusammenhang mit dieser Doktorarbeit ist 3-Methylcholanthren, welches eine sehr potente Substanz zur Induktion vom transformierten Phänotyp *in vitro* darstellt (Reznikoff et al., 1973). Methylcholanthren bewirkt an der DNS eine Methylierung von Guanin, was zu DNS-Fehlpaarungen in der nächsten Replikation führt. Die Substanz gehört zur Gruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) (Roche Lexikon Medizin). Sie entstehen bei unvollständigen Verbrennungsprozessen organischer Materialien. Schon um 1775 wurde die krebsauslösende Wirkung der PAKs bemerkt. Schornsteinfeger und Teerarbeiter wiesen ein signifikant höheres Krebsrisiko auf. Um 1925 wurden die PAKs als Inhaltstoffe von Ruß und Teer identifiziert. Mittlerweile stehen sie schon lang im öffentlichen Interesse, da Personen beim Rauchen oder Grillen einer PAK-Belastung ausgesetzt ist (Pott und Heinrich, 1993; Delschen et al., 1996).

1989 untersuchten Chen et al. tumorigene MCA transformierte C3H Zellen und fanden eine häufige Veränderung im c-Ki-ras Gen: G—T Transversion an der ersten Position des Codon 12. Diese Veränderung zeigte sich nur in tumorigenen, MCA- transformierten C3H Zellen. Sorrentino et al. (1988) bestätigten dieses Ergebnis, denn sie berichteten von einer karzinogenvermittelten Amplifikation des mutierten ras Genes, das als Promotor in der neoplastischen Transformation fungiert. Coleman et al. untersuchten 1994 das Expressionsniveau von transformierten C3H 10T1/2 Mausfibroblasten im Vergleich zu normalen C3H Zellen. Sie fanden eine relative Überexpression von

c-myc, c-H-ras und TGF  $\beta$  und folgerten daraus, dass diese Gene in den Prozeß der Transformation involviert sein könnten.

An in vivo Studien konnte die Rolle von 3-Methylcholanthren im Verlauf der Karzinogenese des Bronchialkarzinoms ermittelt werden. Durch 3-Methylcholanthren-Applikation wurde die Differenzierung von alveolären Tumorzellen aus Basalzellen des Bronchialtrakts des Hundes ausgelöst, dabei fungierte mutiertes p53 als Promotor für die klonale Expansion der Tumorzellen (TenHave-Opbroek, 2000). An Balb/c Mäusen konnte der teratogen Effekt von MCA demonstriert werden. Transplazentale Applikation von MCA induzierte in dem wachsendem Fötus Lungentumore, wobei MCA nachgewiesen mutagen auf das Ki-ras Gen wirkte und ein frühes Ereignis in der Tumorgenese repräsentierte. Im ras-Gen fand man G—T und G—C Transversionen. Im Gegensatz wurde im Tumorsuppressorgen p16Ink4a eine Inzidenz für Punktmutationen von nur 6% gefunden, p19ARF wies gar keine Mutationen auf (Gressani et al. 1999).

### **1.4 In vitro Eigenschaften von Tumorzellen**

Die in vitro Eigenschaften von Tumorzellen unterscheiden sich erheblich von denen normaler Zellen. Normale Zellen benötigen zum Proliferieren in vitro eine feste Unterlage (Substrat). Gewöhnlich ist dies der Boden einer Kulturschale mit einer extrazellulären Matrix. Die Zellen werden von Kulturmedium bedeckt, so dass sie gut mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren versorgt sind. Ist der Boden eines Kulturgefäßes mit einer einzelligen Schicht von Zellen vollgewachsen (Monolayer), sind die Zellen konfluent und es kommt zum Wachstumsstillstand durch Dichtehemmung, was man auch Kontaktinhibition nennt.

Beim malignen Phänotyp zeigt sich in vitro ein substratunabhängiges Wachstum z.B im Softagar. Durch fehlende Kontaktinhibition kommt es zum ungeordneten mehrschichtigem Wachstum von transformierten Zellen. Dabei benötigen sie weniger Wachstumsfaktoren im Kulturmedium als normale Zellen.

Außerdem zeichnen sich transformierte Zellen durch eine fehlende Alterung aus (sogenannte Immortalisierung). (Alberts et al., 1995, Wagener, 1999, Lodish et al., 1999)

Reznikoff et al. charakterisierten 1973 das phänotypische Erscheinungsbild von in vitro transformierten C3H 10T1/2 Mausfibroblasten in Form von sogenannten Foci (Sg. Focus). Ein Focus wurde definiert als ein Gebiet mit erhöhter Zelldichte in einer konfluenten Monolayerstruktur und / oder veränderten Zellmorphologie. Reznikoff unterschied Foci, die lediglich sehr hohe Zelldichte aufwiesen, von solchen Foci, dessen transformierte Zellen dreidimensional wuchsen und moderat polar waren. Außerdem fand sie noch Foci, dessen Zellen in Multilayern, eng gepackt übereinander in typischer „criss-cross“-Anordnung wuchsen und hochgradig polar waren im Vergleich zu normalen Fibroblasten, die typischerweise lange Zellausläufer aufwiesen und nicht polar waren.

### **1.5 Klassifizierung von Radioprotektoren**

Unter Radioprotektoren versteht man Substanzen, die das Normalgewebe vor strahleninduzierten Schäden schützen und somit das Zellüberleben fördern. Man kann Radioprotektoren in zwei Gruppen einteilen. Passiv wirkende Radioprotektoren absorbieren Strahlungsenergie und schützen zelluläre Moleküle vor radiogenen Schäden. Zu der zweiten Gruppe gehören die aktiv wirkenden Substanzen, die aktiv in den Zellstoffwechsel eingreifen und den Zellen helfen, mit den Strahlenschäden zu überleben.

#### **1.5.1 Die Gruppe der passiv wirkenden Radioprotektoren**

##### 1.5.1.1 Aminothiolen

Die größte klinische Bedeutung hat der Radioprotektor Amifostin, auch WR-2721 oder Ethyol genannt (Bump et al. 1992; Wassermann, 1999). Amifostin

soll gesundes Gewebe gegen die Wirkung von Alkylanthien, Platin-Verbindungen und ionisierender Strahlung schützen. Es handelt sich um eine Vorstufe, die unter Einwirkung membrangebundener alkalischer Phosphatasen besonders bei neutralem pH in das aktive Thiol WR-1065 überführt wird (im Gegensatz zum gesunden Gewebe mit neutralem pH herrscht im Inneren solider maligner Neoplasien ein saures Milieu). Die aktive Form vermag offenbar als Hydrogenionen-Donator radiogen produzierte Radikale, zu inaktivieren und so von einer Reaktion mit der DNS abzuhalten (Murray, 1998). Klinisch findet diese Substanz weniger als Radioprotektor Anwendung sondern vielmehr als Chemoprotektor. Amifostin kann prophylaktisch infundiert werden zum Schutz vor einer Neutropenie unter kombinierter Cyclophosphamid-Cisplatin-Gabe bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom sowie zum Schutz vor einer Nephrotoxizität von Cisplatin in der Therapie solider Tumoren. Nebenwirkungen sind Hypotonie und Hypokalzämie (Lüllmann & Mohr, 1999).

### 1.5.1.2 Nahrungsbestandteile

Ionisierende Strahlung kann durch direkte und indirekte Effekte Zellschädigung verursachen. Bei dem indirekten Effekt z.B. kommt es durch Radiolyse der Wassermoleküle zur Bildung von Radikalen in der Gewebe- oder Zellflüssigkeit, die mit der DNS interagieren und diese schädigen. Dies kann bei fehlender oder unsachgemäßer Reparatur zu einer Tumorentstehung führen (Rodemann, 2000; Wagener, 1999). In einer Vielzahl von Nahrungsmitteln sind Substanzen mit antioxidativer Wirkung enthalten, welche die Fähigkeit als Radikalfänger besitzen. Als Beispiele sind hier Vitamin C und E sowie Selen zu nennen (Felemovicius et al., 1995; Harapanhalli et al., 1996; Patchen et al., 1990).

### **1.5.2 Die Gruppe der aktiv wirkenden Radioprotektoren**

#### 1.5.2.1 Zytokine und Wachstumsfaktoren

Zytokine werden hauptsächlich von Makrophagen und T-Lymphozyten, aber auch von Fibroblasten und NK-Zellen gebildet. Zu den Zytokinen gehören verschiedene Interleukine (IL), Typ-I-Interferone (IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ ), Typ-II-Interferone (IFN- $\gamma$ ), der Tumornekrosefaktor (TNF) und der Koloniestimulierende Faktor (CSF). Die Immunantwort wird wesentlich durch Zytokine beeinflusst.

Durch systemische Applikation von IL-1 (Eastgate et al., 1993), IL-2, IL-3 oder IL-6 kann das Immunsystem im Sinne einer Rekonstitution nach einer Strahlentherapie günstig beeinflusst werden (Malaker, 1998).

Im Tierversuch konnte auch die radioprotektive Wirkung des Wachstumsfaktors GM-CSF (= Granulozyten-, Makrophagen-Kolonien stimulierender Faktor) an Mäusen gezeigt werden. Bei tödlich ganzkörperbestrahlten Mäusen (LD 100/30) kann durch Vorbehandlung mit GM-CSF die Überlebenszeit verlängert werden (Bluhm, 1996). In vitro konnte an menschlichen Knochenmarkvorläuferzellen gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit GM-CSF diese Progenitorzellen weniger strahlensensitiv macht und sublethale Bestrahlungsschäden besser reparieren können (Bluhm, 1996). Allerdings werden aufgrund des Risikos proliferativer Effekte auf Tumorzellen (Murray et al., 1996) diese Substanzen mit äußerster Vorsicht eingesetzt.

#### 1.5.2.2 Proteinaseinhibitoren

Kennedy et al. berichteten 1981 von 3 Proteinaseinhibitoren, Antipain, Leupain und Bowman-Birk Proteaseinhibitor, die einen radioprotektiven Effekt auf in vitro Zellsysteme hatten. Als Modellsystem wurden C3H 10T1/2 Mausfibroblasten verwendet (Reznikoff et al. 1973), bei denen durch Zugabe von Proteinaseinhibitoren eine chemikalien- und strahleninduzierte neoplastische Zelltransformation unterdrückt werden konnte. 1985 zeigten Yavelow et al.,

## EINLEITUNG

---

dass bereits nanomolare Konzentrationen des Bowman-Birk-Proteinaseinhibitors, der aus Sojabohnen extrahiert werden kann, eine strahleninduzierte Zelltransformation *in vitro* inhibieren kann. Für diesen Effekt ist offenbar die Chymotrypsin-inhibitorische Region im Bowman-Birk-Proteinaseinhibitor verantwortlich (Yavelow, 1985). *In vivo* Studien zeigten, dass BBI auch im Mausmodell antikarzinogen wirkte, denn mit BBI-haltiger Nahrung gefütterte Mäuse zeigten nach Behandlung mit chemischen Karzinogenen eine Reduktion der Tumorinduktion (St.Clair et al., 1990).

Billings et al. fanden 1987 eine Serin-Protease, die von BBI inhibiert wurde. Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass BBI eine an dem Prozess der Karzinogenese beteiligte Protease hemmt. Die Funktion des Enzyms und der Zusammenhang mit BBI als antikarzinogenes Agens sind weiterhin ungeklärt.

Mit dem Nachweis, dass BBI die strahleninduzierte Hochregulation der *c-myc* und *c-fos* mRNA reduziert (St.Clair et al. 1991), wurde bewiesen, dass BBI mit der strahleninduzierte Signalkaskade interagiert.

Neuere Studien ergaben, dass BBI photo- und radioprotektive Potenz bei Zellen besitzt, die mit ionisierender Strahlung oder UVB behandelt wurden (Dittmann et al. 1995, 1998; Gueven et al., 1998). Diese Photo- bzw. Radioprotektion besteht selektiv für normalen Fibroblasten mit Wildtyp *p53* und nicht für transformierten Fibroblasten mit mutiertem *p53* (Dittmann et al., 1998). In dem molekularen Mechanismus der BBI-vermittelten Photo- bzw. Radioprotektion sind DNS-Reparatur relevante Gene der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) involviert (Dittmann et al., 1998). Dieser Befund wurde u.a. auch dadurch belegt, dass in Xeroderma pigmentosa Fibroblasten, die einen Defekt in der NER besitzen, der radioprotektive Effekt von BBI nicht beobachtet werden konnte (Dittmann et al., 2000). In weiteren Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die radioprotektive Potenz von BBI unabhängig von seiner Sekundärstruktur und seiner Proteasefunktion ist (Gueven et al., 1998). Interessanterweise zeigte die linearisierte Chymotrypsin-Domäne, ein Nonapeptid, ebenfalls Schutz vor einer strahleninduzierten Zelinaktivierung. Dies legte die Hypothese nahe, dass eine bifunktionale Sequenz innerhalb des

Nonapeptids existiert, die für Radioprotektion und Proteaseinhibition verantwortlich ist (Dittmann et al., 2001). Die neueren Ergebnisse besagen, dass bestrahlte Zellen nach BBI-Präinkubation eine reduzierte Aktivierung des Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR) aufweisen, dafür allerdings eine erhöhte Tyrosin spezifische Phosphatase (PTP) Aktivität in den mit BBI vorbehandelten Zellen zu finden ist (Gueven et al., 1998).

### 1.5.2.3 O-Phospho-L-Tyrosin

Über O-Phospho-L-Tyrosin ist bis heute in der Literatur wenig bekannt. Aus der Physiologie der Zelle weiß man, dass viele Stoffwechselfvorgänge durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert werden. Unter den Aminosäuren, auf die Phosphatgruppen übertragen werden, spielt u.a. Tyrosin eine Rolle (Wagener, 1999). Die Enzyme, die die Tyrosinphosphorylierung katalysieren, werden Protein-Tyrosinkinasen oder kurz Tyrosinkinasen genannt. Tyrosinkinasen und ihre Substrate kommen im Stoffwechsel zentrale Bedeutung z.B. bei Wachstumsprozessen, aber auch bei der malignen Transformation zu. Als Beispiel für eine Tyrosinkinase soll hier der „Epidermal Growth Factor Rezeptor“ (EGFR) genannt werden. Protein Tyrosin Phosphatasen (PTPasen) hingegen sind für die Dephosphorylierung des Phosphotyrosins verantwortlich (Mishra et al., 1993).

Mishra et al. berichteten 1993, dass P-Tyrosin dosisabhängig das Wachstum von Brust- und Nierenkarzinomzellen *in vitro* inhibiert. Als molekularen Mechanismus nahm Mishra eine Aktivierung von zellulären Phosphatasen an. Als Konsequenz fand er eine Hemmung der proliferationsassoziierten EGFR vermittelten Signaltransduktion.

Basierend auf Studien über BBI und auf Versuchen, das aktive Zentrum von BBI einzugrenzen, fanden Dittmann et al. 2001, dass P-Tyrosin in  $\mu\text{M}$  Konzentrationen p53 Wildtyp Zellen gegen ionisierende Strahlung schützte, also radioprotektive Eigenschaften besaß. Humane transformierte Zellen hingegen, die durch ein mutiertes p53 charakterisiert sind, zeigten diesen Effekt nicht. Innerhalb von 3 bis 16 Minuten führte eine P-Tyrosin-Inkubation bei p53

Wildtypzellen zu einer erhöhten CDKN1A Expression. Man vermutet einen ähnlichen molekularen Mechanismus wie bei BBI.

### **1.6 Ziel dieser Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Aufklärung des Effekts des Bowman-Birk Proteinaseinhibitors bzw. P-Tyrosins auf den chemikalien- bzw. strahleninduzierten Transformationsprozess im in vitro Zellsystem C3H 10T1/2. Es geht um die Beantwortung der Frage, welchen Einfluss die oben genannten Substanzen auf die Transformationseffizienz ausüben. Zunächst sollen die phänotypisch erfassbaren Daten quantitativ ausgewertet werden. Im weiteren Verlauf sollen mittels proteinbiochemischer Methoden bekannte Moleküle, die in den Prozess der neoplastischen Transformation involviert sein könnten, im Modellsystem C3H 10T1/2 untersucht werden. Um eine Idee zu bekommen, welche Signaltransduktionswege durch den Transformationsprozess beeinflusst werden könnten, wurden Gen-Expressionsstudien mit Hilfe von Gene Arrays durchgeführt. Dadurch könnten möglicherweise molekulare Marker der Zelltransformation definiert werden, von denen zuvor in diesem Zusammenhang nichts bekannt war.

Darüber hinaus könnten sich neue Ansätze für die Prävention von Tumorerkrankungen ergeben (z.B. bei erhöhter Strahlenexposition bestimmter Berufsgruppen wie Flugpersonal).

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material und Methoden der Zellkultur**

#### **2.1.1 Verwendete Zellen**

##### C3H 10T1/2

Bei dem verwendeten Zellsystem C3H 10T1/2 handelt es sich um eine Fibroblasten-Zelllinie, deren Klon Nr. 8 im Jahr 1972 von Reznikoff et al. von C3H Maus-Embryozellen isoliert wurde. C3H 10T1/2 Zellen reagieren sehr sensitiv auf Konfluenz, indem weitere Zellteilungen inhibiert werden (sog. Kontaktsensitivität). Außerdem weisen sie keine Tumorigenität auf, d.h. in Nacktmäuse injizierte C3H Zellen produzieren keine Tumore. Für den sog. „Standard Transformation Assay“ ist die Zelllinie C3H 10T1/2 das klassisch verwendete Modellsystem. Gewöhnlicherweise werden die Zellen zwischen der 5. und 15. Passage verwendet, da ältere Zellen zur spontanen Transformation neigen. Das Zellpassagieren sollte vor Erreichen der Konfluenz durchgeführt werden, da ansonsten die spontane Transformation ebenfalls gefördert wird.

Die in diesem Projekt verwendeten C3H 10T1/2 Fibroblasten hat freundlicherweise die Arbeitsgruppe Dr. Marlis Frankenberg-Schwager aus der Abteilung Klinische Strahlenbiologie und Strahlenphysik in Göttingen zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in Passage 13 eingefroren angeliefert und standen folglich erst ab Passage 14 zu Versuchszwecken zur Verfügung.

##### HH4

Bei der Zelllinie HH4dd (= human skin) handelt es sich um transformierte humane Fibroblasten. Die Zelllinie HH4dd entstand spontan aus normalen HH4 Fibroblasten und ist durch Softagarwachstum, Aneuploidie und Tumorinduktion in Nacktmäusen charakterisiert. In den vorliegenden Experimenten fungierten diese Zellen als Positivkontrolle beim Test auf Softagarwachstum.

### 2.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

#### Antibiotika-Lösung

Für die bei den Zellen verwendete Antibiotikalösungen wurden 4g Streptomycinsulfat (Sigma Kat. Nr. S-6501) und 12g Penicillin-G (Sigma Kat.-Nr. Pen-K) in 200ml destilliertem Wasser gelöst: Verwendet wurden dann 5ml Antibiotika-Lösung auf 500ml Medium. Hieraus ergibt sich eine Konzentration von 148.000 U/ml Streptomycin und 114.000 U/ml Penicillin. Aliquots wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und zum Ansetzen des Mediums frisch aufgetaut.

#### Zellkulturmedium

Dulbecco`s Mod. Eagle Medium von der Firma Gibco ( Kat. Nr. 52100-039),  
Inhaltsstoffe: W/4500 MG/L Glucose; W/O NA Pyruvate; +NaHCO<sub>3</sub>;  
W/Pyridoxin; Ad 3,76 NaCO<sub>3</sub>/l

#### Fötale Kälberserum (FCS)

Das FCS der Firma Gibco (Kat.Nr. 10270-100) wurde in Aliquots bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und jeweils zum Ansetzen des Mediums frisch aufgetaut.

#### Phosphat-Buffered-Saline (PBS)

Die Zusammensetzung des Puffers besteht in 1000ml destilliertem Wasser aus: 0,8g NaCl, 0,2g KCl, 1,15g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.

#### Lösungen für den Koloniebildungsassay:

-Formaldehyd 3,7%: in PBS lösen

#### -Giemsa-Färbelösung

-Sörensen-Puffer A 38,8ml, pH= 7,2-7,4

-Sörensen-Puffer B 61,2ml, pH= 7,2-7,4

-Giemsa-Lösung 4,0ml (4ml Giemsa pro 100ml Puffer)

- Sörensen A: 9,078 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ad 1000ml Wasser
- Sörensen B: 11,876 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O ad 1000ml Wasser
- Coomassie (0,05%):
  - 20% Methanol 200ml
  - 7,5% Eisessig 75ml
  - Aqua dest. 725ml
  - Coomasie 0,5g

### **2.1.3 Bestrahlung**

Die Standardbestrahlung wurde mit subkonfluenten Kulturen durchgeführt. Hierfür wurde eine 100 KV Röntgenröhre (Dosisleistung 2 Gy / 10 min) benutzt. Um die Wirkung ionisierender Strahlung verschiedener Dosen auf proliferierende Zellpopulationen in vitro zu untersuchen, wurde in vorliegender Arbeit der „Koloniebildungsassay“ als Testverfahren herangezogen. Die Wirkung ionisierender Strahlen auf die Transformationsfrequenz wurde im Transformationsassay getestet.

### **2.1.4 Bestimmung der Zellparameter**

#### 2.1.4.1 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Fibroblasten mit Hilfe von Trypsin (Gibco) abgelöst und Aliquots von je 100 µl entnommen. Die Zellzahl wurde im CASY-Analyser (Schärfe-Systems, Reutlingen) elektronisch oder mittels Hämocytometer (Neubauerkammer) mikroskopisch bestimmt.

#### 2.1.4.2 Koloniebildungsassay

Mit diesem Assay soll die Klonierungseffizienz von Zellen nach unterschiedlichen Behandlungsarten ermittelt werden. Die Klonierungseffizienz ist definiert als Prozentsatz der ausgesäten Zellen, die einen Klon bilden. Dabei muss sichergestellt sein, dass die gebildeten Kolonien aus einer einzigen Zelle stammen. Die Fibroblastenkulturen wurden nach einer Inkubationszeit von 6-8 Stunden („delayed plating“) abtrypsiniert und mit einer Zellzahl von 1200 Zellen

pro 6-Well-Plate in Medium mit 20% FCS ausgesät. Nach 10 Tagen wurden die Klonkulturen durch Zugabe von Formaldehyd (2,5% in PBS) für 10 Minuten und Ethanol (70%) für 10 Minuten fixiert. Für die Färbung wurden die Zellklone mit einer Coomassie-Lösung (0,5 g G250/l in 20% Methanol/7,5% Eisessig) für 1 Minute versetzt und nachfolgend mit Giemsa-Lösung (4 ml Giemsa auf 100 ml Sörensenpuffer) für 40 Minuten gefärbt. Nach dem Trocknen wurden alle Klone gezählt, die aus mehr als 50 Zellen bestanden. Zur statistischen Absicherung wurde jedes Experiment dreimal durchgeführt und jeder Messwert als Mittelwert von fünf Einzelwerten ermittelt.

### 2.1.4.3 Transformations Assay

Die experimentellen Bedingungen des Standard Transformations Assays wurden von Reznikoff et al. im Jahr 1973 festgelegt. Hier wird die Technik mit einigen Variationen beschrieben. Mit den Mausfibroblasten der Zelllinie C3H 10T1/2 wurde ein in vitro System entwickelt, mit dem quantitative Untersuchungen zur induzierten Zelltransformation durchgeführt werden können. Ziel dieses Experimentes war es, mit den hier erhobenen Daten die Transformationsfrequenz der C3H 10T1/2 Mausfibroblasten zu berechnen.

Bei dem Transformationsexperiment wurden 30.000 Zellen pro 12cm<sup>2</sup> Kulturflasche ausgesät (pro Bedingung eine Flasche). Im subkonfluenten Zustand wurden die Zellen drei Tage nach Zellaussaat mit dem zu testenden Agenz behandelt. Die Expositionsdauer mit dem Agenz betrug 24 Stunden, nach dieser Zeit wurden die Zellen trypsiniert und in eine 96er Mikrotiterplatte sowie in 12 cm<sup>2</sup> Flaschen als Erhaltungskultur ausgesät. Die Zelldichte wurde bei der Zellaussaat in die Mikrotiterplatte sehr gering gewählt, damit die Zellen möglichst monoklonalen Ursprunges blieben (100 bzw. 200 Zellen pro Well). Außerdem legte man eine Erhaltungskultur an (30.000 Zellen pro 12 cm<sup>2</sup> Flasche), die man erneut im subkonfluenten Stadium mit dem zu testenden Reagenz behandelte (fraktionierte Behandlung). Der weitere Versuchsablauf entspricht dem oben beschriebenen.

## MATERIAL UND METHODEN

---

Insgesamt wurden die Mausfibroblasten C3H zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von fünf Wochen behandelt, was zehn Passagen entsprachen. Vom Zeitpunkt der Zellaussaat in 96er Mikrotiterplatten an wurden die Zellen acht Wochen lang kultiviert. Ein wöchentlicher Mediumwechsel wurde vorgenommen. Die Auswertung wurde unter mikroskopischer Kontrolle durchgeführt, indem die Anzahl der Foci pro Platte bestimmt wurden.

Als zu testende chemische und physikalische Agenzien wurden 3-Methylcholanthren (MCA) und ionisierende Strahlen (IR) ausgewählt. Außerdem wurde die Rolle des Bowman-Birk-Protease-Inhibitors sowie Phospho-Tyrosins auf die Anzahl der Transformationsereignisse in vitro untersucht. Mausfibroblasten der Zelllinie C3H 10T1/2 wurden zweimal wöchentlich wie folgt behandelt:

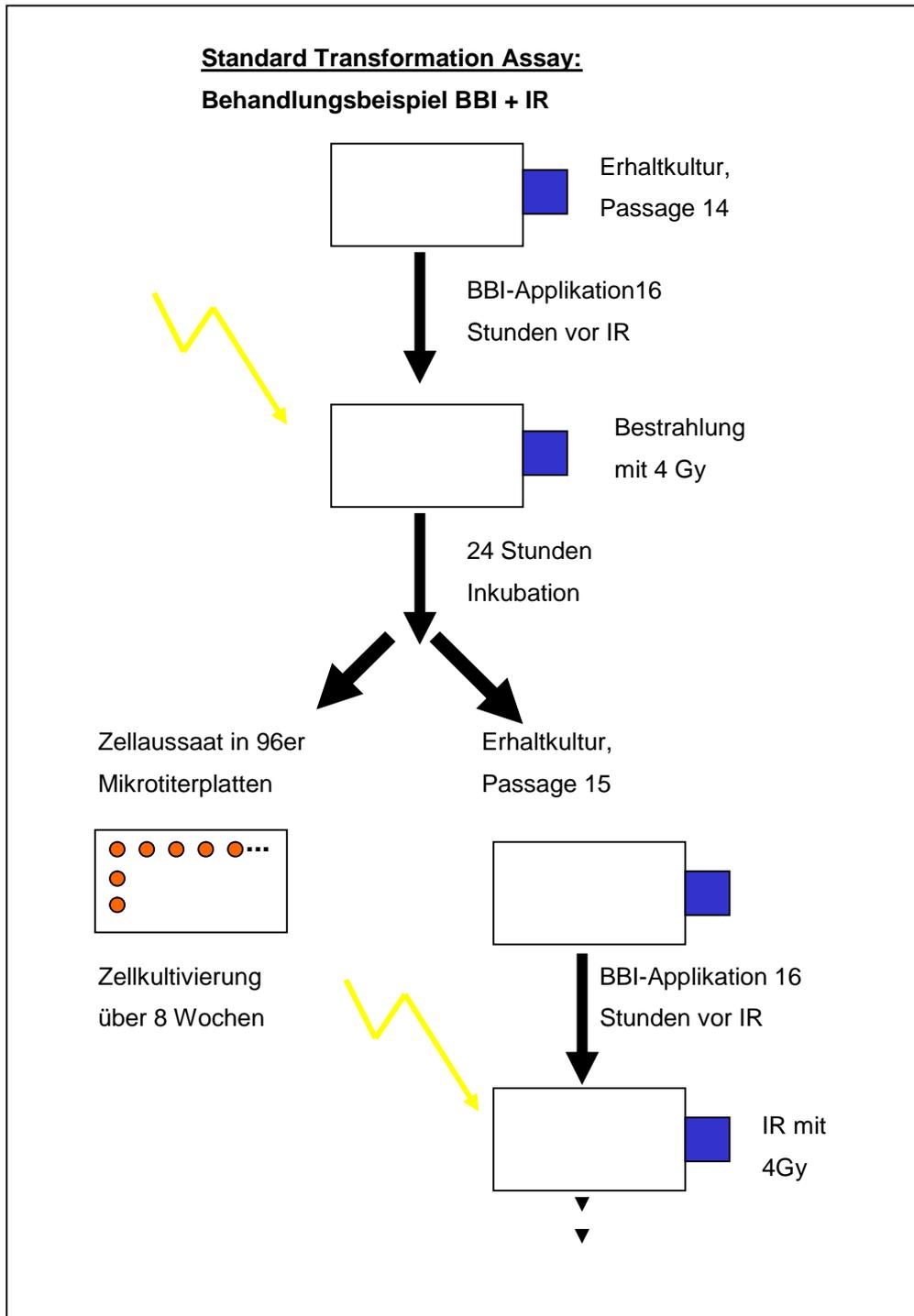
Kontrolle:	keine Behandlung
Ionisierende Strahlen (IR):	Bestrahlung mit 4 Gy (fraktioniert bis max. 40 Gy)
BBI:	BBI-Applikation 10 µg/ml
BBI + IR:	BBI-Applikation 16 Stunden vor IR
Phospho-Tyrosin:	P-Tyrosin-Applikation 10 µg/ml
Phospho-Tyrosin + IR:	P-Tyrosin-Behandlung 16 Stunden vor IR
Methylcholanthren:	MCA-Applikation 2 µg/ml
P-Tyrosin + MCA:	P-Tyrosin-Behandlung 16 Stunden vor MCA-Zugabe

Die Transformationsfrequenz lässt quantitative Rückschlüsse auf die Transformationseffizienz verschiedener Noxen zu. Mit der folgenden Gleichung wurde die Transformationsfrequenz berechnet:

$$\text{Transformationsfrequenz} = \frac{\text{totale Focianzahl}}{\text{totale Anzahl der lebensfähigen Zellen}}$$

Damit wurde die tatsächliche Anzahl an Zellen berücksichtigt, die überhaupt in den Transformationsversuch eingingen (z.B. überlebten über den gesamten Behandlungszeitraum mehr Kontrollzellen als bestrahlte Zellen).

Abb. 2 Behandlungsbeispiel: BBI + IR



### 2.1.4.4 Klonierung (Ringisolationstechnik)

Diese Technik dient der Isolierung von adhärennten Zellklonen. Die zu isolierenden Zellen, z.B. die eines Focus, wurden unter dem Mikroskop mit einem Stift gekennzeichnet. Danach wurde der Klonierungszyylinder gut mit Silikon abgedichtet und der sterile Ring über die Zellen plaziert. Die ausgewählten Zellen wurden trypsiniert und in 48er Mikrotiterplatten bzw. später nach Erreichen der Konfluenz in größere Gefäße überführt.

### 2.1.4.5 Softagarwachstum

Der Softagartest dient der Charakterisierung von Zellkulturen und der Untersuchung von Wachstumsverhalten bestimmter Zellstämme. Normale, nicht transformierte Zellen sind bezüglich der Lebensfähigkeit obligat abhängig von einer Matrixunterlage, wohingegen maligne entartete Zellen über die Fähigkeit verfügen, auch ohne Matrixunterlage im Softagar zu wachsen. Mit dem Softagartest kann also bestimmt werden, ob Zellen transformiert sind oder nicht.

#### Materialien

2fach DMEM + 20% FCS

DMEM + 10% FCS

Agar

#### Vorbereitung

1. Herstellen von 2fach DMEM + 20% FCS

2. Herstellen einer Agarlösung

12,5g Agar (1,25%) werden in 1l destilliertem Wasser durch Erhitzen gelöst.

Nach 30 Minuten Autoklavieren wird die Agarlösung bis zur Verwendung im Wasserbad bei 45° C aufbewahrt.

3. Medium warm stellen

#### Durchführung

Der geschmolzene Agar wurde mit dem zweifach DMEM im Verhältnis 1:1 gemischt (0,625% Agar). Benötigt wurde die doppelte Menge an Medium, die

normalerweise für die Kulturgefäße verwendet wurde. Die Hälfte des Volumens wurde als Basalschicht auf den Platten verteilt (12 ml pro 6 well plate). Bei Raumtemperatur erhärtete die Basalschicht innerhalb von 10 bis 30 Minuten. Nach dem Erhärten kamen die Kulturgefäße in den Brutschrank.

Mit der Basalschicht wurde ein Absetzen der Zellen am Boden der Wells verhindert.

Der Restagar wurde sofort in das Wasserbad gestellt.

Anschließend wurde die 0,625%-ige Agarlösung mit dem konzentrierten Medium im Verhältnis 1:1 gemischt und bei 45°C flüssig gehalten. Nach Abtrypsinieren der gewünschten Zellpopulation wurde die Zellzahl bestimmt und in der Agar-Medium-Lösung die erforderliche Zellzahl eingestellt (250 Zellen / Well in 2.0ml Lösung). Anschließend wurde die Suspension mehrmals durchpipettiert und die Zellen in die 6-Wellplatten mit dem Agarboden gegeben. Die obere Agar-Medium-Schicht enthielt also 0,3% Agar. Durch vorsichtiges Schwenken der Platten erfolgte die homogene Verteilung der Zellen. Nach dem Erhärten des Agars bei Raumtemperatur wurden die Zellen im Brutschrank kultiviert. Nach 10 Tagen konnten die Zellklone unter dem Mikroskop gesehen werden; später erkannte man diese auch makroskopisch. Je nach Malignität wuchsen die Zellen unterschiedlich schnell. Niedrig maligne Zellen benötigten länger, bis sie mit dem Mikroskop auszumachen sind.

### 2.1.4.6 Trypanblaufärbetest

Mit der Trypanblaufärbung kann der Anteil der lebensfähigen Zellen von in vitro Kulturen bestimmt werden. Die Reaktivität von Trypanblau basiert auf der Tatsache, dass die Chromophore negativ geladen ist und nicht mit der Zelle interagiert, es sei denn, die Zellmembran ist beschädigt. Deshalb erkennt man abgestorbene Zellen an der Blaufärbung, wohingegen lebensfähige Zellen Trypanblau nicht aufnehmen.

### Durchführung

Die Zellen wurden nach der Trypsinierung entweder in neuem Wachstumsmedium oder in PBS aufgenommen. Die Zellkonzentration wurde zwischen 100.000 und 1.000.000 Zellen/ml eingestellt. 0,1 ml der Zellsuspension wurde mit 3,6 ml PBS verdünnt. Anschließend wurde die vorgewärmte Trypanblaulösung dazu gegeben (2,7 ml einer 0,5%igen Lösung). Der Testansatz wurde vorsichtig mit der Pipette durchgemischt und 2-5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach wiederholtem Durchmischen der Zellsuspension mit der Pipette wurden die gefärbten und ungefärbten Zellen in der Neubaukammer sofort ausgezählt.

Da Trypanblau zytotoxisch für Zellen ist, wird mit zunehmender Inkubationsdauer mit dem Farbstoff ein Anstieg der toten Zellen beobachtet. Mit Hilfe des Dreisatzes konnte der Prozentsatz der lebenden Zellen errechnet werden.

### 2.1.4.7 Vitalitätstests

#### Quantitative Neutralrotmethode

Diese Methode basiert auf der Beobachtung, dass nur lebende Zellen den Farbstoff Neutralrot aufnehmen, während tote Zellen nicht angefärbt werden.

Materialien:

Geräte und Substanzen zur Zellkultur,

Logarithmisch wachsende Zellen, trypsiniert,

Neutralrotlösung (5 mg Neutralrot auf 100 ml DMEM mit 10% FCS),

Ethanol/Eisessigmischung (50% Ethanol, 1% Eisessig auf 100 ml Aqua dest. aufgefüllt),

96er Mikrotiterplatte für die Zellkultur,

Schüttler,

ELISA-Reader mit 540 nm-Filter

Durchführung:

5000 Zellen einer laufenden Zellkultur wurden pro Well einer 96er Mikrotiterplatte ausgesät (2 ml Medium / Well). Nach 24stündiger Inkubation, in der sich die Zellen absetzen konnten, wurde das ursprüngliche Medium abgesaugt und das Testagenz auf die Zellen gegeben (z.B. oxidierend wirkende Substanz). Die Zellen wurden 24 Stunden mit der Noxe inkubiert.

Nachdem das Medium abgesaugt wurde, wurde dreimal mit PBS gewaschen und Neutralrot dazugegeben. Die Neutralrotlösung wurde drei Stunden auf den Zellen belassen, anschließend wurde sie abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit der Ethanol-Eisessiglösung (0,1 ml / Well) versetzt und die Platte 15 Minuten auf dem Schüttler bewegt, um den Farbstoff quantitativ aus den Zellen zu extrahieren. Die Absorption wurde bei 540 nm auf einem Photometer bzw. auf einem ELISA-Reader gemessen.

Alle Werte wurden als Prozent der untoxischen Kontrolle (=100%) ermittelt.

### Kristallviolett Assay

Dieser Test gibt Auskunft über die relative Dichte von adhärent wachsenden Zellen in Kulturgefäßen. Kristallviolett färbt die Proteine einer Zelle, so dass mittels Spektrometer die Anzahl der gefärbten Zellen einer Monolayerschicht bestimmt werden kann. Der Kristallviolett Assay macht also quantitative Aussagen über die Vitalität einer in vitro Kultur, denn nur lebensfähige Zellen nehmen den Farbstoff auf.

Durchführung

5000 Zellen einer laufenden Zellkultur wurden pro Well einer 96er Mikrotiterplatte ausgesät (2 ml Medium / Well). Nach 24stündiger Inkubation, in der sich die Zellen absetzen konnten, wurde das ursprüngliche Medium

abgesaugt und das Testagenz auf die Zellen gegeben (z.B. oxidierend wirkende Substanz). Die Zellen wurden 24 Stunden mit der Noxe inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurde das Kulturmedium entfernt. Die Kulturplatte wurden vorsichtig mit warmer PBS-Lösung gewaschen (0,2 ml / Well). PBS wurde abgesaugt, Kristallviolett hinzugegeben (50 µl / Well) und für 10 Minuten inkubiert. In einem großen mit PBS gefüllten Becherglas wurden die Platten vorsichtig zweimal gewaschen und durch Abklopfen auf Papiertüchern von der restlichen Waschlösung befreit. Durch Zugabe von 1% SDS löste sich die Färbung quantitativ aus den Zellen (100 µl / Well). Mittels Schütteln verteilte sich die Farbe in den Wells gleichmäßig (ungefähr 10 Minuten). Bei 570 nm wurde die Absorption bestimmt.

Kristallviolett-Lösung:

- Kristallviolett 0,2% (200mg)
- Ethanol 2% (2ml)
- Dest. Wasser 98ml

## **2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.1 Differential Display: Gene Array Technik**

Verwendet wurde GEArray™KIT für radioaktive Detektion der Firma SuperArray, Biomol in Hamburg. Mit diesem System können Genexpressionsprofile erstellt werden. Die totale RNA wird mit SuperArray GEAprimer Mix (reverse Transkriptase Primer) in cDNA Proben umgeschrieben. Die cDNA Proben werden mit genspezifischen cDNA Fragmenten, die auf einer Membran fixiert sind, hybridisiert. Dadurch kann der relative Expressionslevel von verschiedenen Genen, die z.B. in verschiedenen Signaltransduktionswege oder im Zellzyklus involviert sind, determiniert werden.

Benötigte Materialien, die von der Firma Biomol gestellt wurden:

### GEArray™ Membranen

Für die Präparation der cDNA Proben:

- GEAprimer Mix
- 10 X RT Puffer
- RNase-freies Wasser
- 10X Stopplösung
- 10X Denaturierende Lösung
- 2X Neutralisationslösung

GEAhyb Hybridisierungslösung

Benötigte Materialien von anderen Firmen:

Für die cDNA Synthese:

- ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l; 3,000 Ci/ml, Amersham Pharmacia Biotech, Cat.AA0005)
- MMLV Reverse Transkriptase (200 unit/ $\mu$ l; Promega, Cat. M1701)
- RNase Inhibitor (40 units/ $\mu$ l; Promega, Cat.N2511).

Für das Hybridisieren und Waschen

- Sheared Salmon Sperm DNA (Invitrogen/GIBCO BRL, Cat. 15632-011)
- 20XSSC, 20%SDS

### Durchführung:

#### 1. RNA Isolation

Aus  $10^7$  Zellen wurde die RNA mit dem RNeasy® Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Hierfür wurden die Zellen abtrypsiniert, mit PBS gewaschen und in 600  $\mu$ l RLT-Lysepuffer aufgenommen und lysiert. Das Lysat wurde auf die RNeasy-Zentrifugationssäule gegeben und bei 10000 g für 15 s zentrifugiert. Nach 1 x Waschen mit 700  $\mu$ l Waschpuffer RW1 wurde die Säule 2x mit jeweils 500  $\mu$ l Waschpuffer RPE gewaschen. Die RNA wurde mit Aqua bidest. eluiert (3 x 50  $\mu$ l). Die Quantifizierung der isolierten RNA erfolgte photometrisch bei 260 nm.

### 2. Umschreibung der RNA in cDNA

Die totale RNA wurde als Template für (<sup>32</sup>P)cDNA Synthese verwendet. Dies wird in dem folgenden Abschnitt beschrieben:

Für die cDNA Synthese mit ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)dCTP wurde in ein steriles PCR Gefäß die totale RNA (5-10 µg) sowie 2 µl GEAprimer Mix pipettiert und mit RNase-freiem Wasser zu einem Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Durch mehrmaliges Pipettieren und leichtes Zentrifugieren wurde der Inhalt gut vermischt. Das Gefäß wurde in den auf 70 °C erhitzten Cycler für zwei Minuten platziert und für weitere zwei Minuten auf 42 °C heruntergekühlt, bevor die auf 42°C erwärmte Markierungsreagenzien zugefügt und das Gemisch für 25 Minuten bei 42 °C inkubiert wurde. Das Markierungsreagenz bestand aus 5X GEAlabeling Puffer, ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)-dCTPm (10mCi/ml), RNase Inhibitor, MMLV reverse Transkriptase (50 units/µl) und RNase freiem Wasser. Die Markierungsreaktion wurde durch Zufügen von 5 µl 10X Stopp Lösung beendet. Die durch die reverse Transkriptase hergestellte cDNA wurde denaturiert, ehe man die Probe zu der Hybridisierungslösung zufügte. Dazu pipettierte man 10X der Denaturierungslösung zu der markierten cDNA und inkubierte dies bei 68 °C für 20 Minuten. Nachdem man 50 µl der 2X Neutralisationslösung dazugegeben hatte, wurde die Lösung erneut für 10 Minuten bei 68 °C inkubiert.

### 3. Hybridisierung

Zunächst wurde 15 ml der Hybridisierungslösung auf 68 °C vorgewärmt. Die hitzedenaturierte (100 °C, für 5 Minuten+ Eisinkubation) niedermolekulare DNA wurde zu der vorgewärmten GEHyb Hybridisierungslösung (Endkonzentration 100 µg DNS/ml) gegeben und auf 68 °C gehalten. Die Hybridisierungsmembran wurde in deionisiertem Wasser angefeuchtet und in einem Hybridisierungszylinder aufbewahrt. 10ml der GEHyb Hybridisierungslösung wurden in das Gefäß gegeben und für 1-2 Stunden bei 68°C bei ständiger Rotation (5-10 rpm/min) vorhybridisiert. Nach Verwerfen der Vorhybridisierungslösung wurde die denaturierte cDNS (100 µl) mit 5 ml GEHyb Hybridisierungslösung vermischt und über Nacht in dem o.g. Gefäß bei 68 °C unter ständigem Rotieren inkubiert.

## MATERIAL UND METHODEN

---

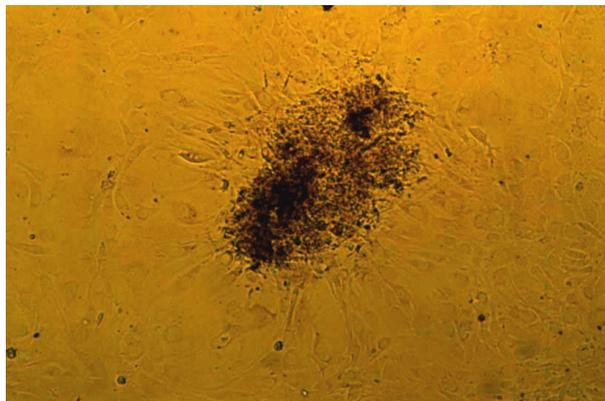
Die Membran wurde je zweimal mit 50-100 ml der vorgewärmter Waschlösung 1 und 2 (1. Lösung: 2X SSC, 1% SDS; 2.Lösung: 0,1X SSC, 0,5% SDS) für 20 Minuten bei 68 °C bei einer Rotation von 30-40 rpm/min gereinigt. Die Membran wurde entweder einem Röntgenfilm exponiert oder mit einem Phospho-Imager eingescannt.

Auf der Membran befanden sich eine Negativkontrolle pUC18 DNS als auch zwei Positivkontrollen:  $\beta$ -Aktin und GAPDH. Die relative Dichte der zu untersuchenden Transkripte wurde durch Vergleich mit der Strahlungsintensität von  $\beta$ -Aktin und GAPDH berechnet.

### 3. Ergebnisse

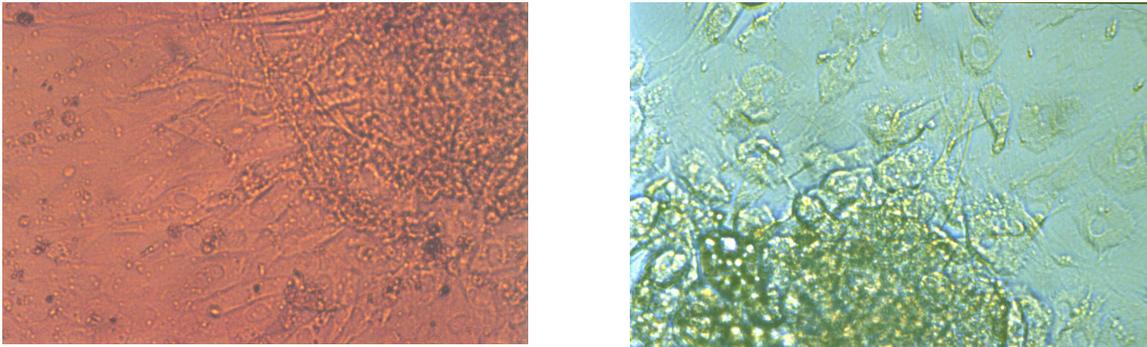
#### 3.1. Phänotypisches Erscheinungsbild des in vitro Zellsystems C3H 10T1/2

Transformierte C3H 10T1/2 Fibroblasten zeigen ein verändertes äußeres Erscheinungsbild im Vergleich zu normalen, nicht transformierten C3H 10T1/2 Zellen. Durch Kontaktinhibition formen normale C3H Zellen Monolayerstrukturen, wenn die Konfluenz erreicht ist. Transformierte Zellen haben die Fähigkeit zur Kontaktinhibition verloren, weshalb sie ungehindert proliferieren können. So wachsen transformierte Zellen übereinander und formen dreidimensionale Zellhaufen, die Foci (Sg. Focus) genannt werden. Diese sind zunächst nur mikroskopisch, später sogar makroskopisch mit bloßem Auge erkennbar.



**Abb. 3** Transformierte Zellen formen einen Focus in einer konfluenten Monolayer-Struktur.  
DMEM+10%FCS; 25x Vergrößerung

Auf der Abbildung 3 ist das mikroskopische Bild eines Focus zu sehen. Sechs bis acht Wochen nach Erreichen der Konfluenz erkennt man das spezielle phänotypische Erscheinungsbild von transformierten Zellen als Zellhaufen. Typisch ist das tumorspezifische „Criss-Cross“ Wachstum, besonders gut an den Ausläufern / Rändern eines Focus auszumachen.



**Abb.4** Ausschnittsvergrößerung aus dem Randbereich eines Focus; Übereinanderwachsen von Zellen; DMEM+10% FCS; 100x Vergrößerung

Normalerweise wachsen (nicht transformierte) Zellen dicht gepackt nebeneinander. Bei transformierten Fibroblasten erscheinen die Zellen, wie dies in Abb. 4 demonstriert wird, unregelmäßig angeordnet und übereinander wachsend. Da diese Zellen matrixunabhängig wachsen, ist das phänotypische Erscheinungsbild der Zellen eher rundlich im Vergleich zu normalen Fibroblasten.

### **3.2 Wachstumsverhalten von transformierten Zellen im Softagar am Beispiel der Zelllinie HH4**

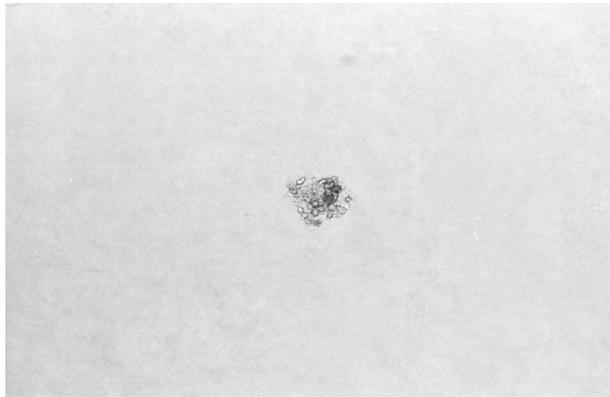
Tumorzellen besitzen die Fähigkeit, auch ohne Matrix proliferieren zu können. Beim Test auf Softagarwachstum wird diese Fähigkeit überprüft. Denn der Softagar verhindert ein Absinken der Zellen auf den Boden des Kulturgefäßes. Somit überleben nur solche Zellen, die auch ohne Matrix wachsen können (also Tumorzellen). Nach ca. 14 Tagen kann man makroskopisch Zellklone von transformierten Zellen im Softagar erkennen.

Hier soll exemplarisch das Verhalten von transformierten Zellen nach Aussaat in Softagar am Beispiel der Zelllinie HH4 demonstriert werden:

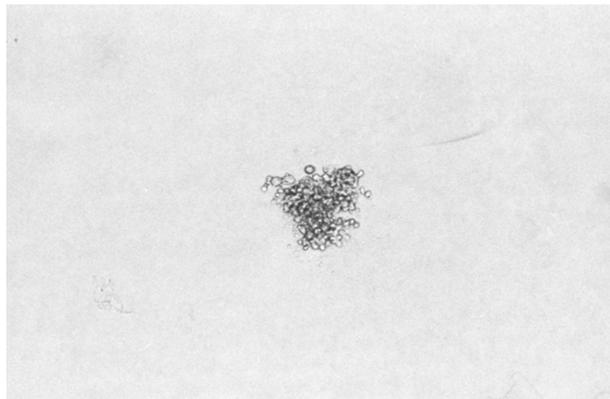
## ERGEBNISSE

---

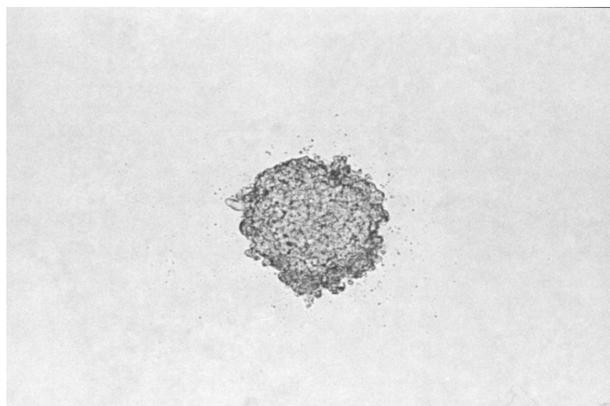
**Abb. 5-11** Mikroskopisches Erscheinungsbild von in Softagar gegossenen HH4-Zellen (Basisagar 0,6%, obere Agarschicht 0,3%). 25x Vergrößerung



**Abb. 5** Softagarklon 8 Tage nach Zellaussaat



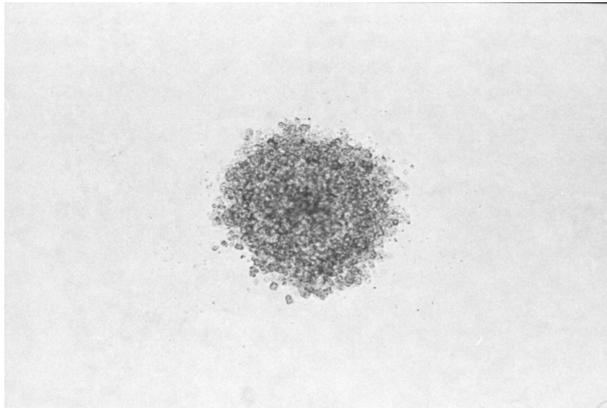
**Abb. 6** Softagarklon 11 Tage nach Zellaussaat



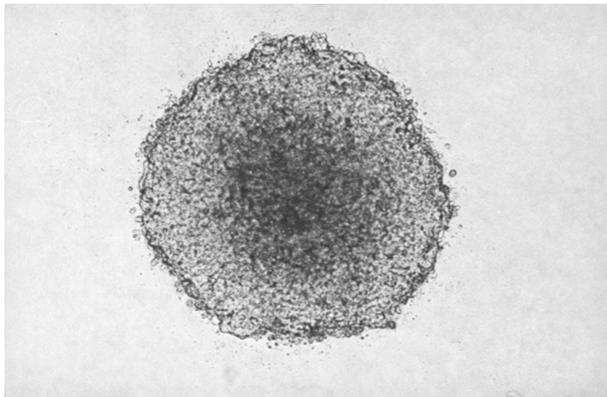
**Abb. 7** Softagarklon 14 Tage nach Zellaussaat

## ERGEBNISSE

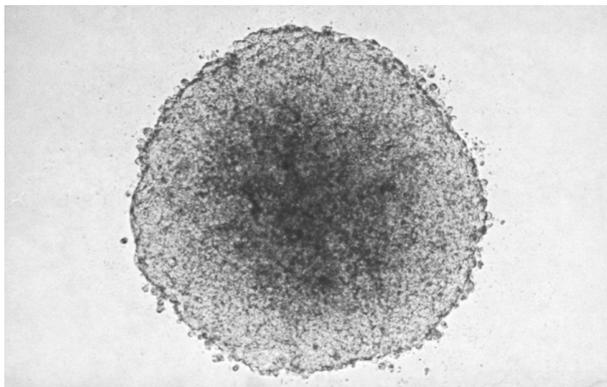
---



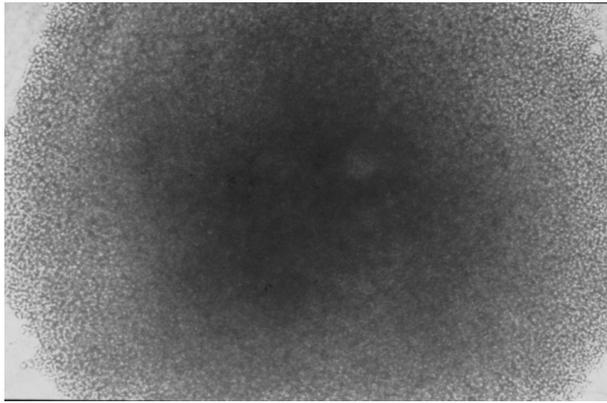
**Abb. 8** Softagarklon 15 Tage nach Zellaussaat



**Abb. 9** Softagarklon 19 Tage nach Zellaussaat



**Abb. 10** Softagarklon 21 Tage nach Zellaussaat



**Abb. 11** Softagarklon 31 Tage nach Zellaussaat

### **3.3 Test auf Softagarwachstum von potentiell transformierten C3H 10T1/2**

Isoliert man mittels Ringisolationstechnik einen Focus und etabliert aus diesen Zellen eine neue Zelllinie, kann mit Aussäen in Softagar das Wachstumsverhalten von jenem Zellklon charakterisiert werden. Normale Zellen und auch solche, die den Transformationsprozess nur teilweise durchlaufen haben, sterben kurze Zeit nach Zellaussaat in Softagar ab. Hingegen überleben Zellen im Softagar, die den Transformationsprozess vollkommen durchschritten haben. Dies ist ein eindeutiger Hinweis, dass diese Zellen Charakteristika transformierter Zellen erworben haben.

Es wurden sukzessiv von jedem Zellklon, der isoliert worden war, das Wachstumsverhalten im Softagar getestet. In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse präsentiert.

#### **Tab. 1 Test auf Softagarwachstum**

Die Tabelle gibt eine Übersicht über alle aus Foci isolierten Zellklone. Die Ursprungszellen der Zellklone wurden unterschiedlich behandelt: Keine Behandlung (Kontrollzellen), MCA-Applikation mit 2 µg / ml, ionisierende Bestrahlung mit 4 Gy. Die Passage gibt das Zellalter des Klones an. Softagarwachstum ist ein hinreichendes Kriterium für maligne Entartung von Zellen.

## ERGEBNISSE

---

Wächst ein Zellklon im Softagar, so haben die Zellen definitiv eine Zelltransformation durchlaufen.

<b>Klon Nr.:</b>	<b>Ursprungszellen:</b>	<b>Passage:</b>	<b>Softagarwachstum:</b>
8	unbehandelte C3H	23	- (negativ)
10	„	21	-
11	„	21	-
13	„	22	-
21	„	25	-
22	„	21	-
29	„	28	-
1.1.25.6	MCA behandelt	21	-
1.2.25.6.	„	21	-
2.2.25.6	„	21	-
2.1.25.6	„	21	-
2.1.25.6	„	33	-
2.1.29.6	„	21	-
2.2.29.6	„	21	-
7	„	24	-
12	„	22	-
14	„	22	-
16	„	29	-
17	„	27	positiv
18	„	22	-
19	„	21	-
20	„	26	positiv
23	„	27	-
25	„	21	-
31	„	21	-
15	bestrahlte C3H	20	-

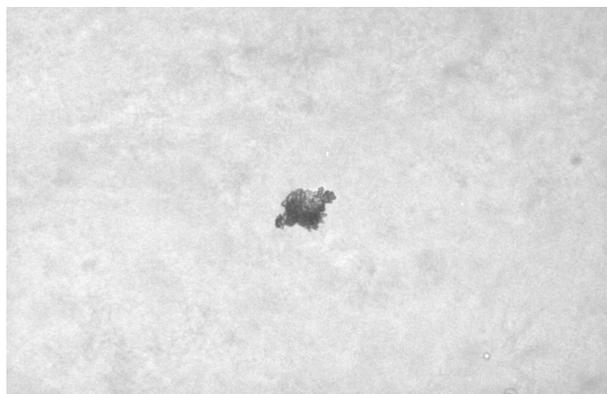
## ERGEBNISSE

---

24	„	28	-
28	„	25	-
30	„	28	-
32	„	22	-
33	„	22	-
34	„	22	-
35	„	22	-
36	„	21	-
37	„	22	-
38	„	23	-
39	„	24	-

Bei jeder Zellaussaat wurden zeitgleich HH4 Zellen als Positivkontrolle in Softagar gegossen.

37 neu etablierte Zelllinien, die je von einem Focus abstammten, wurden auf Softagarwachstum getestet. Davon stammten sieben aus spontan gewachsenen Foci, siebzehn aus Foci, die nach Methylcholanthren-Behandlung entstanden und zwölf aus Foci, die durch ionisierende Strahlung induziert wurden. Bis auf zwei Klone zeigten alle anderen kein Softagarwachstum. Es bildeten sich bei Zellaussaat von Klon 17 und 20 (Ursprungszellen wurden mit MCA behandelt) proliferierende Zellklone im Softagar. Dies ist ein Indiz für einen transformierten Phänotyp von Klon 17 und 20.



**Abb. 12** MCA induzierter Zellklon zeigt Wachstum in Softagar (25x Vergrößerung)

### 3.4 Standard Transformations Assay

Die Idee dieses Versuches ist, quantitative Aussagen über die chemikalien- und strahleninduzierte Zelltransformation und deren Prävention durch den Bowman-Birk-Proteinase-Inhibitor bzw. Phospho-Tyrosin im Modellsystem C3H 10T1/2 zu erheben. Konkret bedeutet dies, dass die sich entwickelnden Foci in Abhängigkeit von der Behandlungsart gezählt werden und als Basis für die quantitative Datenerhebung dienen. Denn man geht davon aus, dass jedem Transformationsereignis ein Focus zuzuordnen ist.

Die Methode von Reznikoff et al. wurde bereits in modifizierter Form im Methodenteil vorgestellt. Als zu testende chemische und physikalische Agenzien wurden 3-Methylcholanthren (MCA) und ionisierende Strahlen (IR) ausgewählt. Außerdem wurde die Rolle des Bowman-Birk-Protease-Inhibitors sowie Phospho-Tyrosin auf die Anzahl der Transformationsereignisse in vitro untersucht. Mausfibroblasten-Erhaltkulturen der Zelllinie C3H 10T1/2 wurden an jedem 3. bzw. 4. Tag fraktioniert mit einer Einzeldosis von 4 Gy bzw. mit 2 µg/ml Methylcholanthren (MCA) behandelt. Insgesamt wurden 10 Behandlungsdurchgänge durchgeführt.

Kontrolle:	keine Behandlung
Ionisierende Strahlen (IR):	Bestrahlung mit 4 Gy (fraktioniert bis max. 40 Gy)
BBI:	BBI-Applikation 10 µg/ml
BBI + IR:	BBI-Applikation 16 Stunden vor IR
Phospho-Tyrosin:	P-Tyrosin-Applikation 10 µg/ml
Phospho-Tyrosin + IR:	P-Tyrosin-Behandlung 16 Stunden vor IR
Methylcholanthren:	MCA-Applikation 2 µg/ml
P-Tyrosin + MCA:	P-Tyrosin-Behandlung 16 Stunden vor MCA-Zugabe

Die folgenden Graphiken charakterisieren das Wachstumsverhalten der Zellen während der fraktionierten Behandlung. Die quantitative Auswertung des Transformationsversuches erfolgt in Teil 3.4.2.

### 3.4.1 Wachstumsverhalten der C3H 10T1/2 Zellen nach unterschiedlicher Behandlung

#### 3.4.1.1 Populationszeitverdopplung

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bzw. des Casy-Analysers kann die aktuelle Zellzahl einer Population nach jedem Zellpassagieren ermittelt werden. Verglichen wurde die Generationszeit von Populationen, die nach dem o.g. Schema fraktioniert behandelt wurden.

Kontrollzellen sowie mit BBI bzw. P-Tyrosin behandelte Zellen benötigen ungefähr einen Tag, um ihre Population zu verdoppeln. Demgegenüber verzögerte Bestrahlung bzw. MCA die Teilungsgeschwindigkeit von einer Teilung pro Tag auf eine Teilung alle 2 Tage. Entscheidend war, dass sich BBI- bzw. P-Tyrosin-Applikation nicht bzw. nur in geringem Maße (vgl. IR vs P-Tyrosin+IR) auf das Proliferationsverhalten von C3H10T1/2 Zellen auswirkten.

**Tab. 2** Die Tabelle zeigt an, wie viele Tage eine Population benötigt, um sich unter der jeweiligen Behandlung einmal zu verdoppeln ( $1 / x = 1$  Teilung pro  $x$  Tage); TA = Transformationsexperiment; Die Ergebnisse der drei Transformationsexperimente wurden gegenübergestellt und der Mittelwert sowie der Standardfehler (= ST.E) ermittelt;

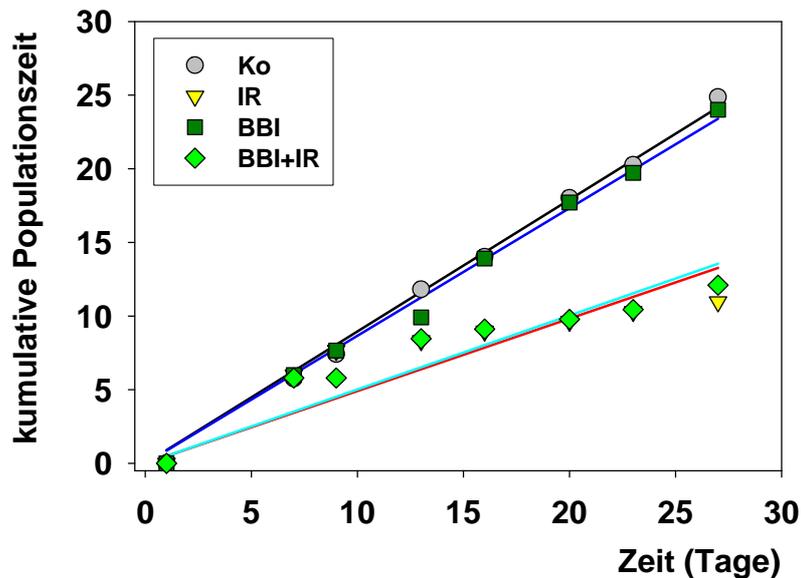
\* = Versuch wurde nur einmal aus Kostengründen durchgeführt; T-Test: Ko vs IR  $p < 0,005 > 0,001$ ; Ko vs MCA  $p < 0,005$ ; Ko vs P-Tyr  $p < 1 > 0,5$ ; IR vs P-Tyr+IR  $p < 0,5 > 0,1$ ; MCA vs P-Tyr+MCA  $p < 1 > 0,5$ ;

## ERGEBNISSE

<b>Behandlung</b>	<b>Durchschnittliche Generationszeit im TA 1; (n=10)</b> (1 Teilung / x Tage)	<b>Durchschnittliche Generationszeit im TA 2; (n=10)</b> (1 Teilung / x Tage)	<b>Durchschnittliche Generationszeit im TA 3; (n=10)</b> (1 Teilung / x Tage)	<b>Mittelwert der Generationszeit</b> (1 Teilung / x Tage)	<b>ST.E</b>
<b>Ko</b>	1 / 1,1	1 / 0,92	1 / 0,87	<b>1 / 0,96</b>	0,07
<b>BBI*</b> (10 µg/ml)	1 / 1,1	-	-	-	-
<b>P-Tyr</b> (10 µg/ml)	1 / 1,03	1 / 0,91	1 / 0,93	<b>1 / 0,96</b>	0,04
<b>IR</b> (Gesamtdosis 40 Gy)	1 / 2,5	1 / 1,96	1 / 2,21	<b>1 / 2,22</b>	0,16
<b>BBI+IR*</b> (Gesamtdosis 40 Gy; 10 µg/ml BBI)	1 / 2,2	-	-	-	-
<b>P-Tyr+IR</b> (Gesamtdosis 40 Gy; P-Tyr 10 µg/ml)	1 / 2,27	1 / 1,92	1 / 1,95	<b>1 / 2,05</b>	0,11
<b>MCA</b> (MCA 2 µg/ml)	1 / 2,27	1 / 1,897	1 / 2,15	<b>1 / 2,11</b>	0,11
<b>P-Tyr+MCA</b> (P-Tyr 10 µg/ml; )	1 / 1,82	1 / 2,07	1 / 2,56	<b>1 / 2,15</b>	0,22

3.4.1.2 Effekt von BBI bzw. P-Tyrosin auf die Zellproliferation nach ionisierender Strahlung bzw. MCA-Behandlung

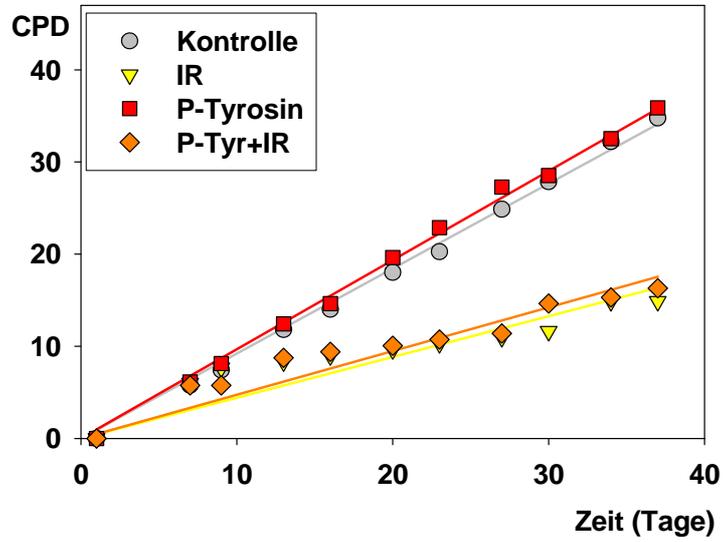
Abb. 13 zeigt nach zehnmaliger fraktionierter Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 4 Gy eine deutliche Verlangsamung der Proliferationskinetik normaler C3H Fibroblasten. Diese strahleninduzierte Proliferationshemmung blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum bestehen. In Gegenwart von BBI war keine schwächere strahleninduzierte Proliferationshemmung nachweisbar. Bei unbestrahlten Kontrollzellen konnte bezüglich des Verlaufs der Wachstumskurven kein Unterschied zwischen Zellen mit bzw. ohne BBI-Inkubation beobachtet werden.



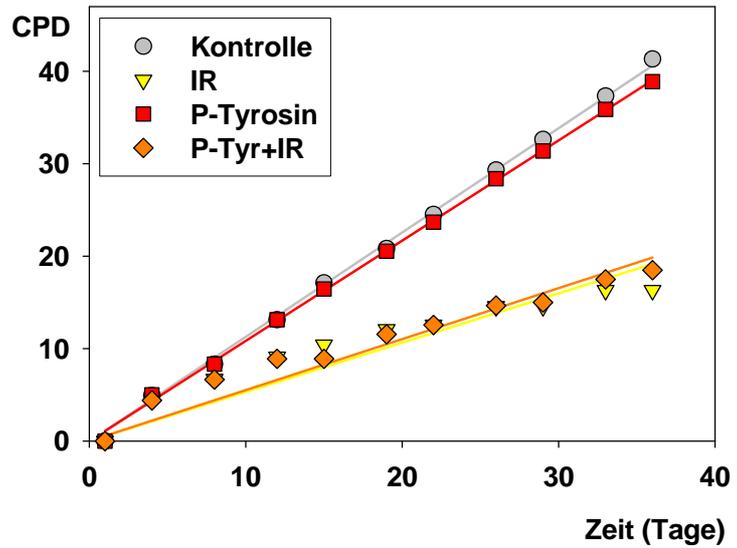
**Abb. 13** Proliferationskinetik normaler C3H Fibroblasten nach Präinkubation bzw. ohne Präinkubation mit BBI (10  $\mu$ M) und nachfolgender Bestrahlung mit 4 Gy, (n=1), Gesamtdosis 40 Gy. Nach jeder fraktionierten Behandlung während des Transformationsexperimentes wurden die Zellen trypsinisiert und die aktuelle Zellzahl bestimmt. Man kann damit feststellen, wie oft sich die Zellen zwischen den Behandlungen geteilt haben.

# ERGEBNISSE

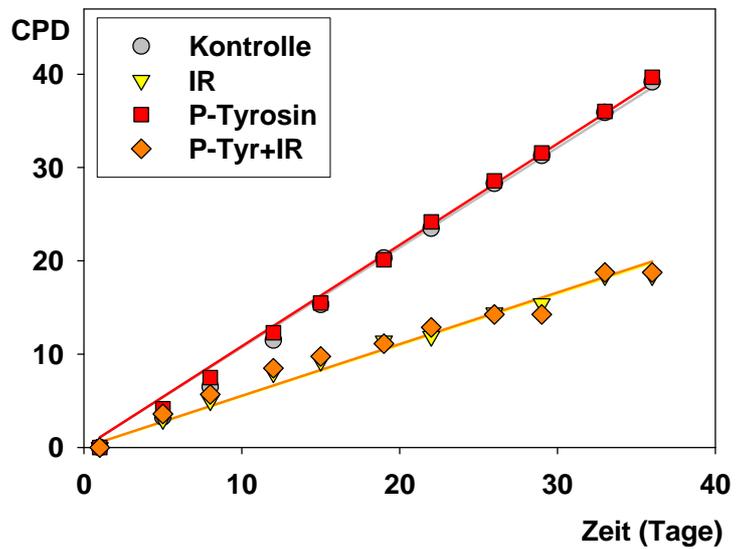
**Abb. 14 a:**  
Transformationsex-  
periment 1



**Abb. 14 b:**  
Transformationsex-  
periment 2



**Abb. 14 c:**  
Transformationsex-  
periment 3



## ERGEBNISSE

---

**Abb. 14 a+b+c** Proliferationskinetik normaler Fibroblasten nach Präinkubation bzw. ohne Präinkubation mit Phospho-Tyrosin (10  $\mu\text{M}$ ) und nachfolgender Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 4Gy (fraktionierte Behandlung, Gesamtdosis 40 Gy). (CPD = kumulative Populationszeitverdopplung)

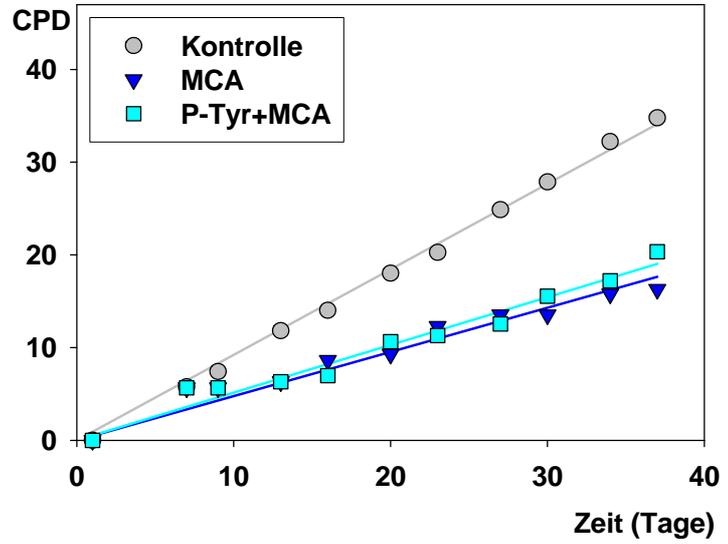
Nach Behandlung von C3H Fibroblastenpopulationen mit ionisierender Strahlung zeigte sich eine Verlangsamung der Proliferationskinetik (Abb. 14). Präinkubation mit Phospho-Tyrosin zeigte keinen Effekt auf die Generationszeit bestrahlter C3H Fibroblasten. Bei unbestrahlten Kontrollzellen konnte nach alleiniger Inkubation mit Phospho-Tyrosin keine Wirkung auf die Proliferationskinetik festgestellt werden.

Fraktionierte MCA-Behandlung von normalen C3H Zellen mit einer Einzeldosis von 2  $\mu\text{g/ml}$  bewirkte eine Reduktion der Proliferationsgeschwindigkeit über den gesamten Beobachtungszeitraum (Abb. 15). Präinkubation von Phospho-Tyrosin zeigte keinen Effekt auf die Generationsgeschwindigkeit MCA behandelte Zellen.

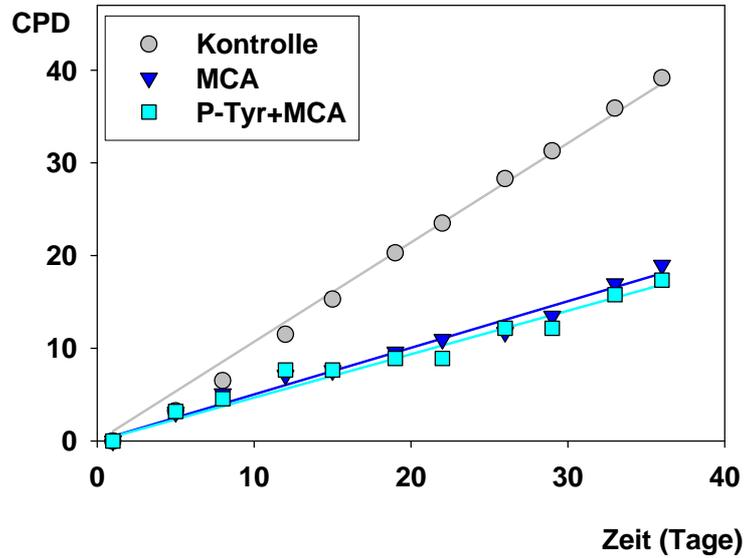
**Abb. 15 a+b+c** Proliferationskinetik normaler Fibroblasten nach Präinkubation bzw. ohne Präinkubation mit Phospho-Tyrosin (10  $\mu\text{M}$ ) und nachfolgender Behandlung mit MCA (2  $\mu\text{g/ml}$ ), (CPD = kumulative Populationszeitverdopplung)

# ERGEBNISSE

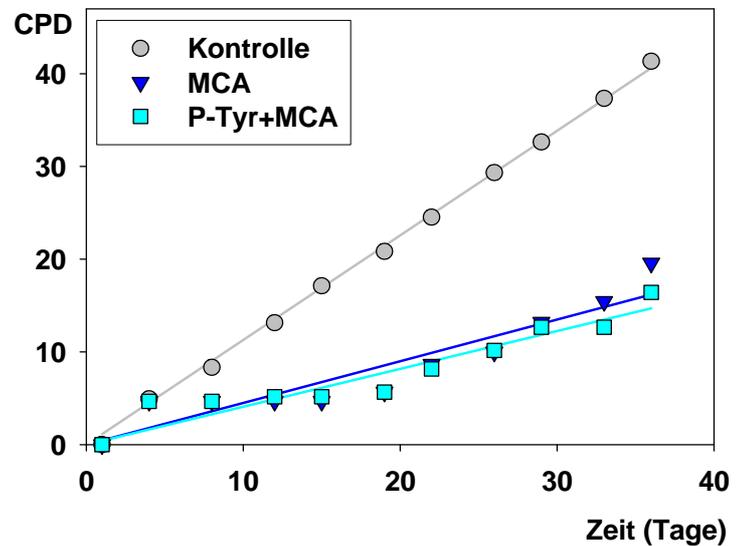
**Abb. 15 a:**  
Transformationsexperiment 1



**Abb. 15 b:**  
Transformationsexperiment 2



**Abb. 15 c:**  
Transformationsexperiment 3



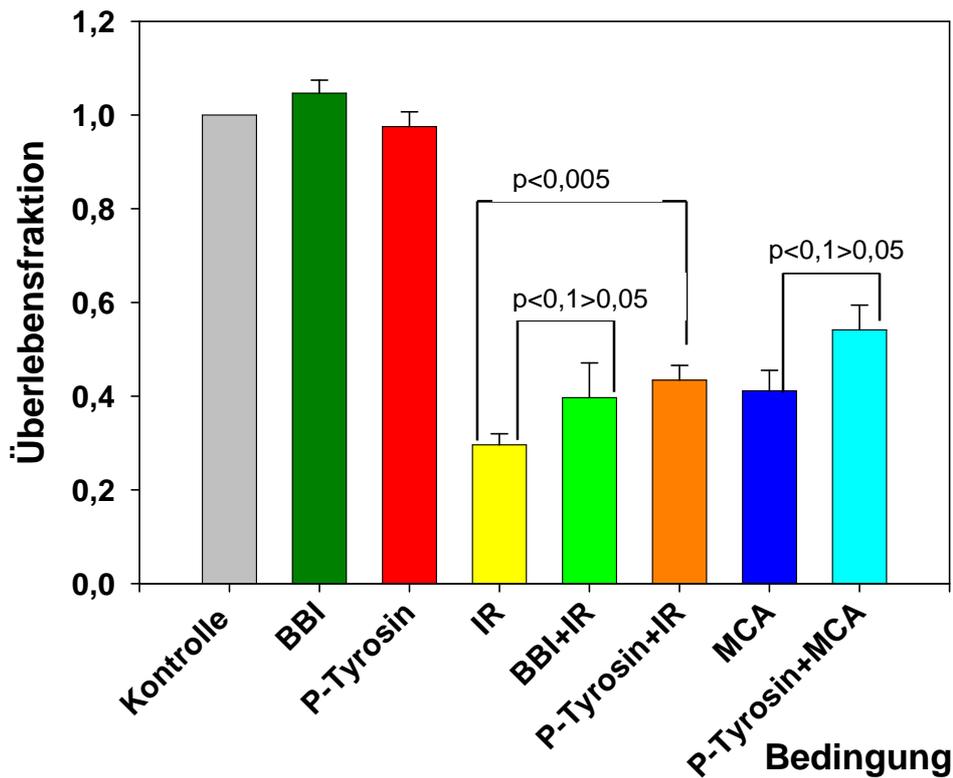
### 3.4.1.3 Effekt von BBI / Phospho-Tyrosin auf das klonogene Überleben nach Behandlung mit ionisierender Strahlung / MCA

Graphik 16 verdeutlicht eine signifikante Reduktion der Überlebensfraktion nach fraktionierter Bestrahlung auf rund 30% im Vergleich zu Kontrollzellen. BBI-Inkubation für 16 Stunden vor der Bestrahlung übte einen radioprotektiven Effekt aus, denn die Fraktion der überlebenden Zellen lag bei ungefähr 40%. Eine P-Tyrosin-Präinkubation von 16 Stunden vor der Bestrahlung resultierte in einer signifikanten Erhöhung der „Surviving Fraction“ auf 43%. D.h. also, dass BBI und P-Tyrosin die C3H Fibroblasten vor dem strahleninduzierten Zelltod schützen konnten.

Nach MCA-Wirkung auf C3H Fibroblasten starben 60% dieser Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen ab. Nach P-Tyrosin-Applikation vor einer MCA-Behandlung wurde die „Surviving Fraction“ von 41% (MCA alleine) auf 54% angehoben.

Interessanterweise überlebten nach alleiniger BBI-Applikation im Koloniebildungsversuch 5% mehr Zellen im Vergleich zu den Kontrollen.

## ERGEBNISSE



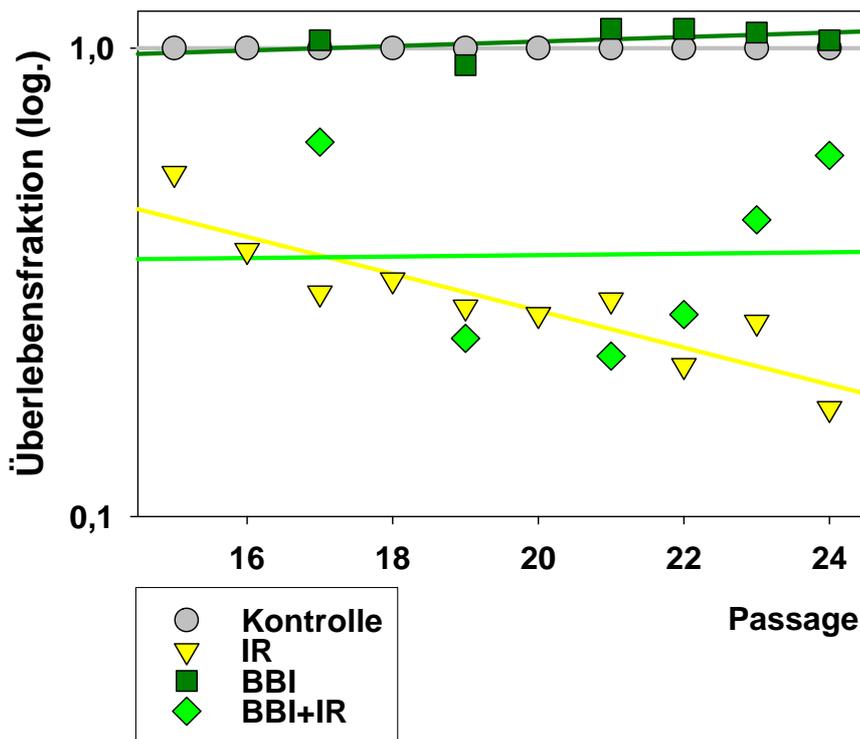
**Abb. 16** Vergleich der „Surviving Fractions“ nach unterschiedlicher Behandlung:

Klonogenes Überleben normaler C3H Fibroblasten nach Behandlung mit ionisierender Strahlung (Einzeldosis 4 Gy) bzw. MCA (2 µg / ml). Subkonfluente Populationen wurden mit BBI (10 µM) bzw. P-Tyrosin (10 µM) inkubiert, bestrahlt bzw. mit MCA (2 mg / ml) behandelt und 24 Stunden nach der IR / MCA Behandlung die Klonkulturen angelegt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± Standardfehler aus 30 unabhängigen Experimenten ( BBI-Vesuche n= 10). Die Mittelwerte aus den Einzelexperimenten wurden aus 6 Einzelwerten ermittelt. Die Mittelwerte wurden mit Hilfe des t-Tests miteinander verglichen:  $p < 0,001$  Ko vs IR;  $p < 0,1 > 0,5$  IR vs BBI+IR;  $p < 0,005 > 0,0009$  IR vs P-Tyr+IR;  $p < 0,001$  Ko vs MCA;  $p < 0,1 > 0,05$  MCA vs P-Tyrosin+MCA .

Es stellt sich die Frage, ob die „Surviving Fraction“ über den gesamten Behandlungszeitraum des Transformationsversuches gleich bleibt oder ob es variierende Werte für das klonogene Überleben in Abhängigkeit von der Passage gibt. Zur Beantwortung dieser Fragestellung sind die Graphiken 17, 18 und 19 dargestellt, die die Überlebensfraktionen in Abhängigkeit von der Passage zeigen.

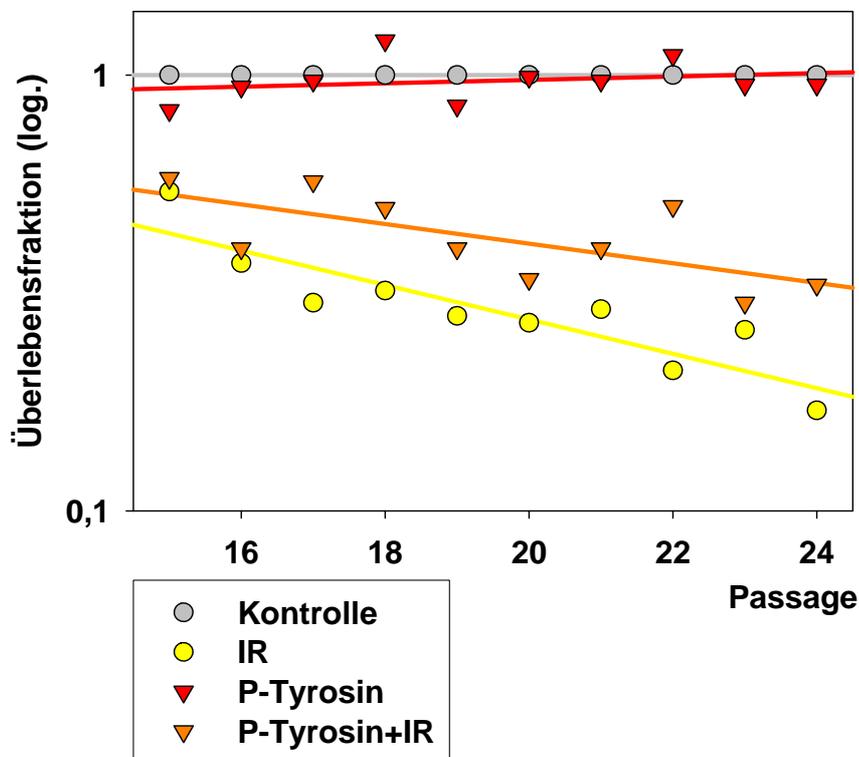
3.4.1.4 Klonogenes Überleben von normalen C3H Fibroblasten nach Bestrahlung bzw. MCA-Behandlung mit / ohne Präinkubation von BBI / P-Tyrosin

Nach fraktionierter Behandlung mit ionisierender Strahlung (Einzeldosis 4 Gy, max. 40 Gy) zeigte sich eine kontinuierliche Reduktion des klonogenen Überlebens von C3H Fibroblasten. Präinkubation mit BBI (10 µM) bewirkte eine stabile Erhöhung der Überlebensfraktion von fraktioniert bestrahlten C3H Zellen über den gesamten Behandlungszeitraum. Alleinige BBI-Inkubation ohne Bestrahlung resultierte in einer geringfügigen Erhöhung des klonogenen Überlebens gegen Ende des Behandlungszyklus.



**Abb. 17** Klonogenes Überleben normaler C3H Fibroblasten nach zehnmaliger fraktionierter Behandlung: Verglichen wurden die Überlebensfraktionen von Kontrollzellen, fraktioniert bestrahlten Zellen (Einzeldosis 4 Gy, max. 40 Gy), mit BBI behandelten Zellen (10 µM) sowie mit BBI und IR behandelten Fibroblasten (10 µM BBI 24 Stunden vor jeder Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 4 Gy, max. 40 Gy). Subkonfluente Populationen wurden verwandt. Aus Kostengründen wurde diese Versuchsreihe nur einmal durchgeführt. Jedes Symbol repräsentiert eine Einzelbehandlung.

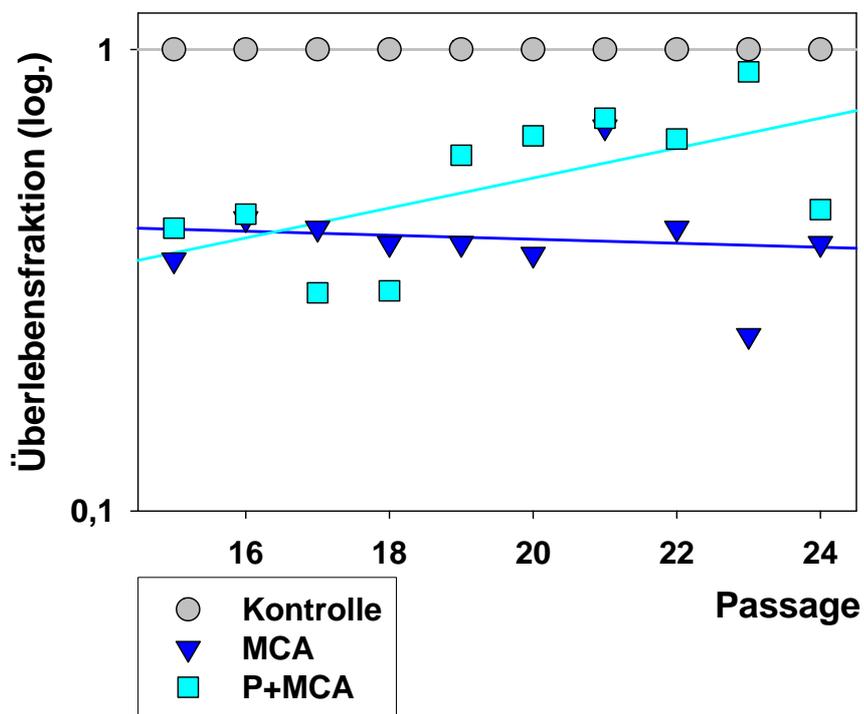
In Abbildung 18 ist der Verlauf des klonogenen Überlebens von C3H Zellen nach fraktionierter Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 4 Gy angegeben. Zu erkennen ist eine kontinuierliche Reduktion der überlebenden Zellen nach Bestrahlung. Präinkubation mit P-Tyrosin (10  $\mu$ M) erhöhte das Überleben im gesamten Dosisbereich allerdings mit nachlassender Wirkung. Alleinige P-Tyrosin–Applikation reduzierte zunächst das klonogene Überleben, im weiteren Behandlungsverlauf zeigte sich zwischen dem Zellüberleben von Normalzellen und nur mit P-Tyrosin behandelten Zellen kein Unterschied.



**Abb. 18** Klonogenes Überleben normaler C3H Fibroblasten nach zehnmaliger fraktionierter Behandlung: Verglichen wurden die Überlebensfraktionen von Kontrollzellen, fraktioniert bestrahlten Zellen (Einzeldosis 4 Gy, max. 40 Gy), mit P-Tyrosin behandelten Zellen (10  $\mu$ M) sowie mit P-Tyrosin und IR behandelten Fibroblasten (10  $\mu$ M P-Tyrosin 24 Stunden vor jeder Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 4 Gy, max. 40 Gy). Von den subkonfluenten Populationen wurden 24 Stunden nach der jeweiligen Behandlung die Klonkulturen angelegt. Jeder Kurvenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten.

## ERGEBNISSE

Wurden C3H Fibroblasten fraktioniert mit Methylcholanthren behandelt (Einzeldosis 2 µg / ml), so äußerte sich dies in einem reduzierten Überleben im klonogenen Assay. P-Tyrosin-Präinkubation (10 µM) bewirkte eine kontinuierliche Zunahme der Überlebensfraktion von MCA behandelten Zellen. Der chemoprotektive Effekt nahm sogar während des Behandlungszyklus zu.



**Abb. 19** Klonogenes Überleben normaler C3H Fibroblasten nach zehnmaliger fraktionierter Behandlung: Verglichen wurden die Überlebensfraktionen von Kontrollzellen, fraktioniert mit MCA behandelten Zellen (Einzeldosis 2 µg / ml) sowie mit P-Tyrosin und MCA behandelten Zellen (10 µM P-Tyrosin 24 Stunden vor jeder MCA-Applikation, 2 µg / ml MCA). Von den subkonfluenten Populationen wurden 24 Stunden nach der jeweiligen Behandlung die Klonkulturen angelegt. Jeder Kurvenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten

3.4.1.5 Effekt ionisierender Strahlen bzw. Methylcholanthren Behandlung auf die Lebensfähigkeit von C3H Zellen

Da mit dem klonogenen Assay nur lebensfähige und proliferierende Zellen erfasst wurden, wurde mit den Vitalitätstests „Neutralrot“ und „Kristallviolett“ sowie indirekt über die Trypanblaumethode die Lebensfähigkeit von Zellen nach Bestrahlung bzw. MCA-Behandlung überprüft. Diese Daten wurden mit den zuvor im klonogenen Assay erhobenen Werten verglichen.

Neutralrotmethode

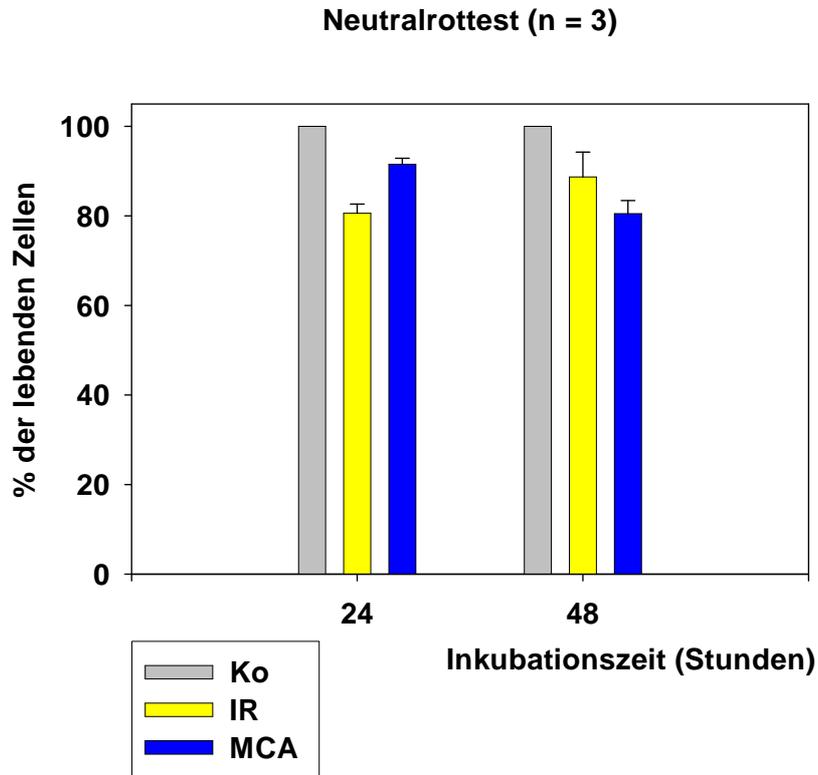
Wurden C3H 10T1/2 Zellen mit 4 Gy ionisierender Strahlung behandelt, so waren nach 24stündiger Inkubationszeit im Vergleich zur Kontrolle rund 20% der Zellen abgestorben. 48 Stunden nach der Bestrahlung nahmen 89% den Farbstoff Neutralrot auf, d.h. 89% der Zellen waren vital.

Methylcholanthren-Einwirkung von 24 Stunden resultierte in einer Reduktion der Zellvitalität auf 92% im Vergleich zur Kontrolle. Nach 48stündiger Inkubation lebten nur noch 81% der Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

Inkubationszeit der Noxe in Stunden	Kontrollzellen (keine Behandlung); % der Zellen, die überlebten	% der Zellen, die Bestrahlung mit 4 Gy überlebten	% der Zellen, die eine MCA- Behandlung (10 µg/ml) überlebten
24	100	80,59 +/-2,06	91,51 +/-1,36
48	100	88,7 +/-5,55	80,51 +/-2,92

**Tab. 3 Neutralrot-Vitalitätstest** ( n = 3); Subkonfluente C3H Populationen wurden mit 4 Gy ionisierender Strahlung oder mit 2 µg / ml MCA behandelt und nach 24 stündiger Inkubation mit Neutralrot angefärbt. Mittels ELISA-Reader wurde die Absorption bei 540 nm gemessen. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der Zellen, die eine bestimmte Behandlung überlebt haben (mit Angabe des Standardfehlers). Dabei wurde die optische Dichte der Kontrollzellen gleich 100 % gesetzt.

(p < 0,005 für Ko vs IR 24 Stunden; p < 0,1 > 0,05 für Ko vs IR 48 Stunden; p < 0,005 > 0,001 für Ko vs MCA 24 Stunden; p < 0,005 > 0,001 für Ko vs MCA 48 Stunden)



**Abb. 20 Neutralrotmethode** (n=3); Bestimmung der lebenden Zellen in % nach unterschiedlicher Behandlung. Logarithmisch wachsende C3H Zellen wurden mit 4 Gy bestrahlt oder mit 10 µg / ml Methylcholanthren behandelt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen (und auch unbehandelte Kontrollzellen) in 96 Well Platten ausgesät und nach weiteren 24 bzw. 48 Stunden mit Neutralrot gefärbt. Die optische Dichte steht im Verhältnis zu der Anzahl an lebenden Zellen.

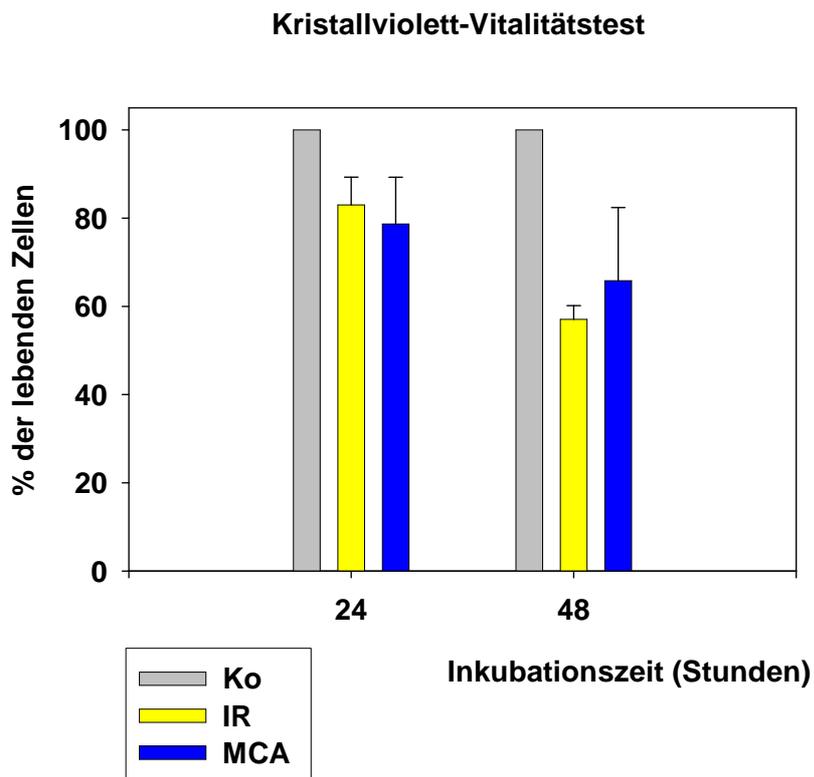
## ERGEBNISSE

### Kristallviolett Assay

Nach der Kristallviolettfärbung überlebten eine ionisierende Strahlung rund 82,99% der Zellen nach 24stündiger und 57,04% nach 48stündiger Inkubation im Vergleich zur Kontrolle. Nach MCA-Applikation für 24 Stunden waren 78,64% der Zellen vital, 48 Stunden nach Behandlung nur noch 65,8% im Vergleich zum Kontrollniveau.

Inkubationszeit der Noxe in Stunden	Kontrollzellen (keine Behandlung); % der Zellen, die überlebten	% der Zellen, die Bestrahlung mit 4 Gy überlebten	% der Zellen, die eine MCA- Behandlung (10 µg/ml) überlebten
24	100	82,99 +/-6,299	78,64 +/-10,59
48	100	57,04 +/-3,14	65,8 +/-16,6

**Tab. 4 Kristallviolett-Vitalitätstest** ( n = 3); Subkonfluente C3H Populationen wurden mit 4 Gy ionisierender Strahlung oder mit 2 µg / ml MCA behandelt und nach 24 stündiger Inkubation mit Kristallviolett angefärbt. Mittels ELISA-Reader wurde die Absorption bei 570 nm gemessen. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der Zellen, die eine bestimmte Behandlung überlebt haben (mit Angabe des Standardfehlers). Dabei wurde die optische Dichte der Kontrollzellen gleich 100 % gesetzt. (p = 0,05 für Ko vs IR 24 Stunden; p < 0,005 > 0,001 für Ko vs IR 48 Stunden; p < 0,15 > 0,1 für Ko vs MCA 24 Stunden; p < 0,1 > 0,05 für Ko vs MCA 48 Stunden)



**Abb. 21 Kristallviolett-Vitalitätstest** (n=3); Log. wachsende C3H Zellen wurden mit 4 Gy bestrahlt oder mit 10 µg / ml Methylcholanthren behandelt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen ( und auch unbehandelte Kontrollzellen) in 96 Well Platten ausgesät und nach weiteren 24 bzw. 48 Stunden mit Kristallviolett gefärbt. Die optische Dichte steht im Verhältnis zu der Anzahl an lebenden Zellen.

Trypanblau-Färbung

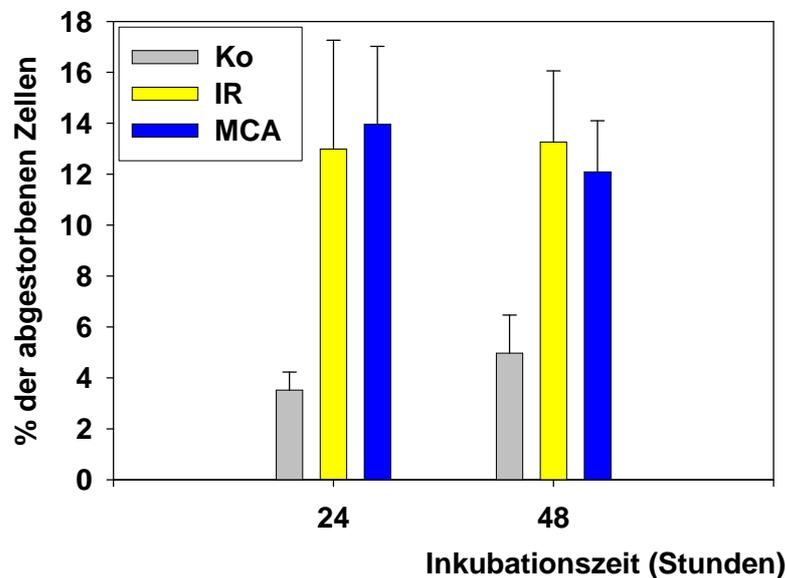
Nach der Trypanblaumethode starben von den Kontrollzellen 3,52% nach 24 Stunden bzw. 4,97% der Zellen nach 48 Stunden ab, obwohl sie weder mit chemischen- noch mit physikalischen Noxen behandelt wurden. Ionisierende Strahlung war für 12,99% bzw. 13,26% der C3H Fibroblasten nach 24 bzw. 48 Stunden letal. Methylcholanthren (MCA) wirkte auf 13,96% bzw. 12,09 (nach 24 bzw. 48 Stunden) tödlich.

## ERGEBNISSE

Inkubationszeit der Noxe in Stunden	Kontrollzellen (keine Behandlung); % der Zellen, die nicht überlebten	% der Zellen, die Bestrahlung mit 4 Gy nicht überlebten	% der Zellen, die eine MCA- Behandlung (10 µg/ml) nicht überlebten
24	3,52 +/-0,71	12,99 +/- 4,27	13,96 +/-3,06
48	4,97 +/-1,495	13,26 +/-2,8	12,04 +/-2,01

**Tab. 5 Trypanblau-Färbung** (n =3); Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der Zellen, die eine bestimmte Behandlung nicht überlebt haben (mit Angabe des Standardfehlers). Mikroskopisch wurde das Gesichtsfeld ausgezählt, um den prozentualen Anteil der gefärbten im Vergleich zu nicht gefärbten Zellen zu ermitteln. (p < 0,1 > 0,05 für Ko 24 vs IR 24 Stunden; p < 0,1 > 0,05 für Ko 48 vs IR 48 Stunden; p < 0,05 > 0,01 für Ko 24 vs MCA 24 Stunden; p < 0,05 > 0,01 für Ko 48 vs MCA 48 Stunden)

**Trypanblau-Färbung (n = 3)**



**Abb. 22 Trypan Blau Färbung;** Bestimmung der abgestorbenen Zellen in % nach unterschiedlicher Behandlung ( IR mit 4 Gy; MCA-Applikation mit 10 µg / ml). Log. wachsende C3H Zellen wurden mit 4 Gy bestrahlt oder mit 10 µg / ml Methylcholanthren behandelt. Nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen (und auch unbehandelte Kontrollzellen) mit Trypanblau versehen und der Anteil der gefärbten Zellen unter dem Mikroskop bestimmt.

## ERGEBNISSE

---

Mit den vorliegenden Ergebnissen lässt sich abschließend das Wachstumsverhalten der C3H 10T1/2 Zellen während der Transformationsexperimente in kurzen Worten charakterisieren:

Fraktionierte Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 4 Gy (bis max. 40 Gy) bzw. Methylcholanthren-Behandlung (10x 10 µg/ml) wirkte sich proliferationshemmend auf C3H 10T1/2 Fibroblasten aus (CPD reduziert) (Abb. 13, 14 und 15).

BBI bzw. P-Tyrosin hatten aber einen positiven Einfluss auf die Überlebensfraktion im Koloniebildungstest, d.h. mehr Zellen überlebten eine fraktionierte Behandlung mit ionisierender Bestrahlung bzw. Methylcholanthren, wenn sie vorher mit BBI- bzw. P-Tyrosin inkubiert wurden (Abb 16). Nach Koloniebildungsassay-Auswertung starben durch Bestrahlung mit 4 Gy bis zu 70%, durch MCA-Applikation bis zu 60% der Zellen ab (Abb. 16).

Neutralrot-, Kristallviolett- und Trypanblau-Färbung zeigten, dass 24 Stunden nach IR zwischen 13 und 19% der Zellen starben und 24 Stunden nach MCA-Inkubation zwischen 9 und 21% (Tab. 2, 3 und 4).

Damit differieren die Ergebnisse des Koloniebildungsassays und der Vitalitätsfärbungen.

In dem folgenden Abschnitt wird der Standard Transformationsversuch quantitativ beschrieben und ausgewertet, denn es stellt sich die Frage, welchen Effekt BBI bzw. P-Tyrosin auf die Transformationsfrequenz ausüben.

### 3.4.2 Quantitative Auswertung des Standard Transformations Assays

Mit diesem Versuch sollte der Effekt des Bowman-Birk-Protease-Inhibitors bzw. Phospho-Tyrosins auf die neoplastische Transformation im Modellsystem C3H 10T1/2 überprüft werden. Dabei ging es besonders um die Inhibition der chemikalien- und strahleninduzierten Zelltransformation. Es sollten quantitative Aussagen über die Effektivität der beiden Substanzen als antikarzinogene Agenzien gewonnen werden.

In drei voneinander unabhängigen Experimenten zeigte sich, dass C3H Mausfibroblasten ohne erkennbare äußere Einflüsse spontan transformierten. BBI bzw. P-Tyrosin-Applikation reduzierte die Anzahl der spontanen Transformationsereignisse. Allerdings war dieses Ergebnis nicht signifikant ( $p < 0,5 > 0,1$  Ko vs BBI;  $p < 1 > 0,5$  Ko vs P-Tyr). Ionisierende Strahlung induzierte das Auftreten von Transformationsereignissen. 3,5 Zellen transformierten nach der Einwirkung ionisierender Strahlung pro Kulturgefäß. BBI- bzw. P-Tyrosin reduzierten die Anzahl der Transformationsereignisse auf 0,1 bzw. 0,8 pro Zellaussaat. Das bedeutete eine Reduktion der Transformationseffizienz nach der Einwirkung von ionisierender Strahlen um den Faktor 35 für BBI bzw. um den Faktor 4 für P-Tyrosin ( $p < 0,5 > 0,1$  IR vs BBI+IR), ( $p < 0,05 > 0,01$  IR vs P-Tyr+IR).

Die größte Potenz als Karzinogen in diesem Experiment besaß Methylcholanthren mit 7,3 transformierten Zellen pro Zellaussaat. P-Tyrosin-Applikation vor MCA-Behandlung verursachte eine Reduktion an maligne entarteten Zellen um den Faktor 4 ( $p < 0,05 > 0,01$  MCA vs P-Tyr +MCA).

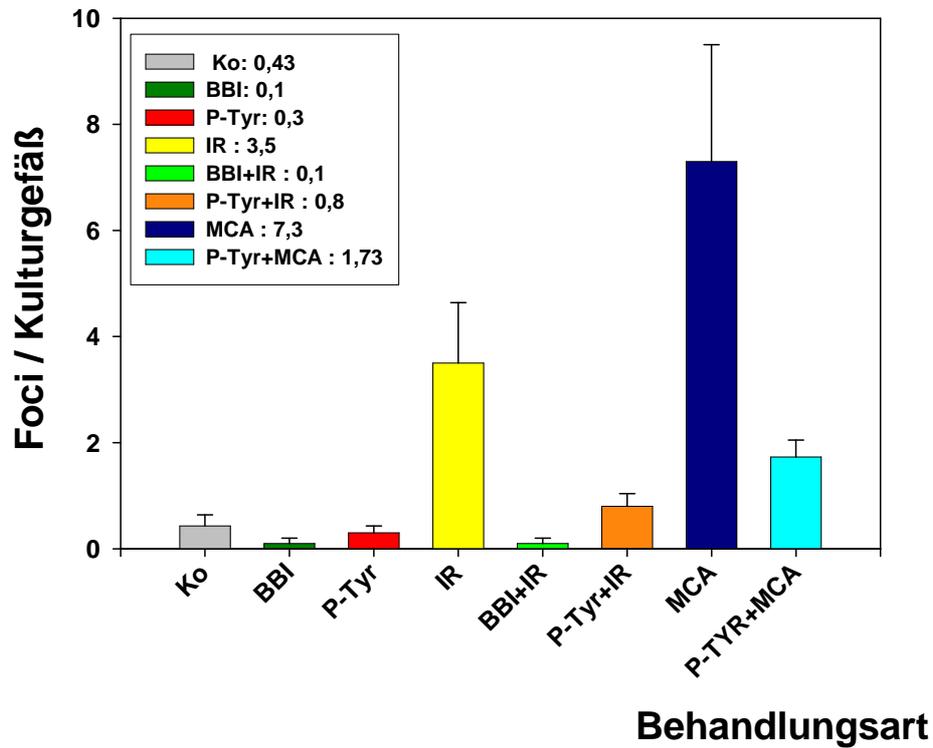
## ERGEBNISSE

Behandlungsart	Ko	BBI	P-Tyr	IR	BBI+IR	P-Tyr+IR	MCA	P-Tyr+MCA
<b>Foci/Kulturgefäß</b>	0,43 ± 0,21	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,13	3,5 ± 1,14	0,1 ± 0,1	0,8 ± 0,24	7,3 ± 2,2	1,7 ± 0,32

**Tab. 6 Quantitative Auswertung des Transformationsversuches;** C3H Fibroblasten-Erhaltkulturen wurden fraktioniert  $\pm$  BBI- bzw. P-Tyrosin-Präinkubation (je 10  $\mu$ M) mit ionisierender Strahlung (Einzeldosis von 4 Gy; max. 40 Gy) oder MCA (2  $\mu$ g / ml) behandelt. 24 Stunden nach der Behandlung mit IR bzw. MCA wurden die Zellen trypsinisiert und in Kulturgefäße ausgesät (6-Well-Plates mit 2000 Zellen / Well). 8 Wochen nach Zellaussaat wurden die Foci in den Kulturen mikroskopisch gezählt ; Die Mittelwerte wurden aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten gebildet und der Standardfehler berechnet. Mit Hilfe des t-Tests wurde auf Signifikanz getestet.  $p < 0,5 > 0,1$  Ko vs BBI;  $p < 1 > 0,5$  Ko vs P-Tyr;  $p < 0,05 > 0,01$  Ko vs IR;  $p < 0,5 > 0,1$  IR vs BBI+IR;  $p < 0,05 > 0,01$  IR vs P-Tyr+IR;  $p < 0,005 > 0,001$  Ko vs MCA;  $p < 0,05 > 0,01$  MCA vs P-Tyr +MCA.

In der Abbildung 23 sind die Ergebnisse der Tabelle 6 graphisch dargestellt. Gut zu erkennen ist die Reduktion der spontanen, strahlen- und chemikalieninduzierten Zelltransformation nach BBI- bzw. P-Tyrosin-Behandlung.

Die Graphik untermauert die Aussagen der vorliegenden Tabelle, dass nämlich ionisierende Strahlung (IR) und die chemische Noxe Methylcholanthren eine hohe Potenz als Karzinogen besaßen. Die Transformationseffizienz von IR und MCA wurde durch die Applikation und Inkubation von BBI bzw. P-Tyrosin über einen Zeitraum von 16 Stunden vor der Behandlung mit IR bzw. MCA signifikant reduziert. Außerdem verminderte alleinige BBI- bzw. P-Tyrosin-Applikation die spontane Transformationseffizienz.



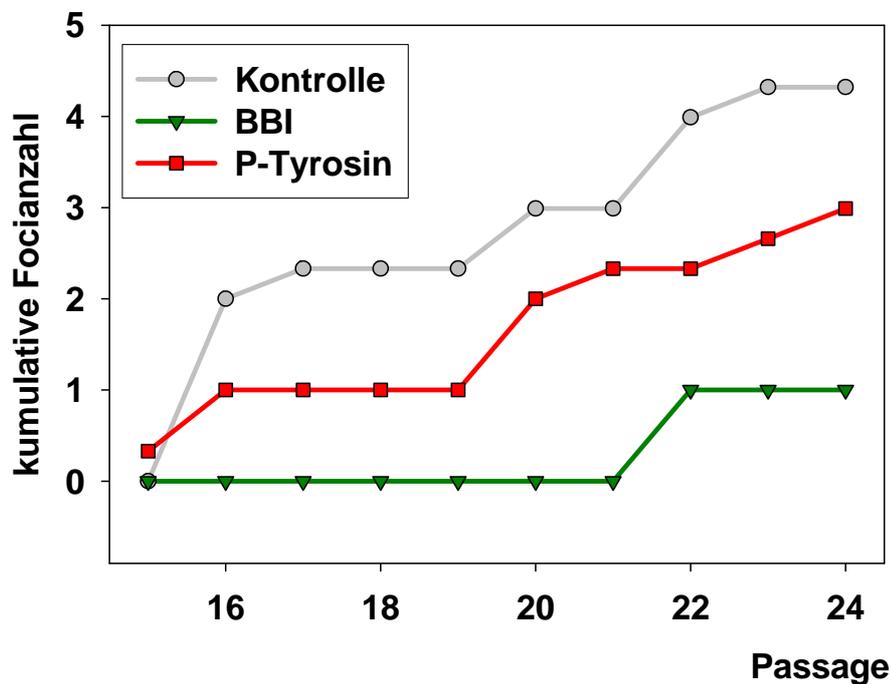
**Abb. 23 Graphische Darstellung des Transformationsversuches**

C3H Fibroblasten-Erhaltkulturen wurden fraktioniert  $\pm$  BBI- bzw. P-Tyrosin-Präinkubation (je 10  $\mu$ M) mit ionisierender Strahlung (Einzeldosis von 4 Gy; max. 40 Gy) oder MCA (2  $\mu$ g / ml) behandelt. 24 Stunden nach der Behandlung mit IR bzw. MCA wurden die Zellen trypsinisiert und in Kulturgefäße ausgesät (6 –Well-Plate mit 2000 Zellen / Well). 8 Wochen nach Zellaussaat wurden die Foci in den Kulturen mikroskopisch gezählt. Die Mittelwerte wurden aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten gebildet und der Standardfehler berechnet. Mit Hilfe des t-Tests wurde auf Signifikanz getestet.  $p < 0,5 > 0,1$  Ko vs BBI;  $p < 1 > 0,5$  Ko vs P-Tyr;  $p > 0,05 > 0,01$  Ko vs IR;  $p < 0,5 > 0,1$  IR vs BBI+IR;  $p < 0,05 > 0,01$  IR vs P-Tyr+IR;  $p < 0,005 > 0,001$  Ko vs MCA;  $p < 0,05 > 0,01$  MCA vs P-Tyr +MCA

3.4.2.1 Transformationsereignisse in Abhängigkeit vom Zellalter

Die vorhergehende Tabelle bzw. Abbildung gibt keine Auskunft über den Zeitpunkt, an dem ein Transformationsereignis stattgefunden hat. Eine interessante Frage ist also, ob die Anzahl der Transformationsereignisse mit dem Zellalter (d.h. mit der Passagenzahl) korreliert. Die nachfolgenden Graphiken sollen diese Frage beantworten.

Spontane Transformationsereignisse, die ohne erkennbare Einflüsse von außen entstanden und phänotypisch als Focus auszumachen waren, ereigneten sich sowohl in niedrigen als auch in hohen Passagen. In Ansätzen war zu erkennen, dass mit Beginn der 20. Passage vermehrt spontane Transformationsereignisse auftraten (Abb. 24). BBI und P-Tyrosin inhibierten zu Beginn des Behandlungszeitraumes sehr effizient die spontane Transformation. Ab Passage 19 traten unter BBI bzw. P-Tyrosin vereinzelt Foci auf, diese lagen zahlenmäßig unterhalb des Kontrollniveaus.

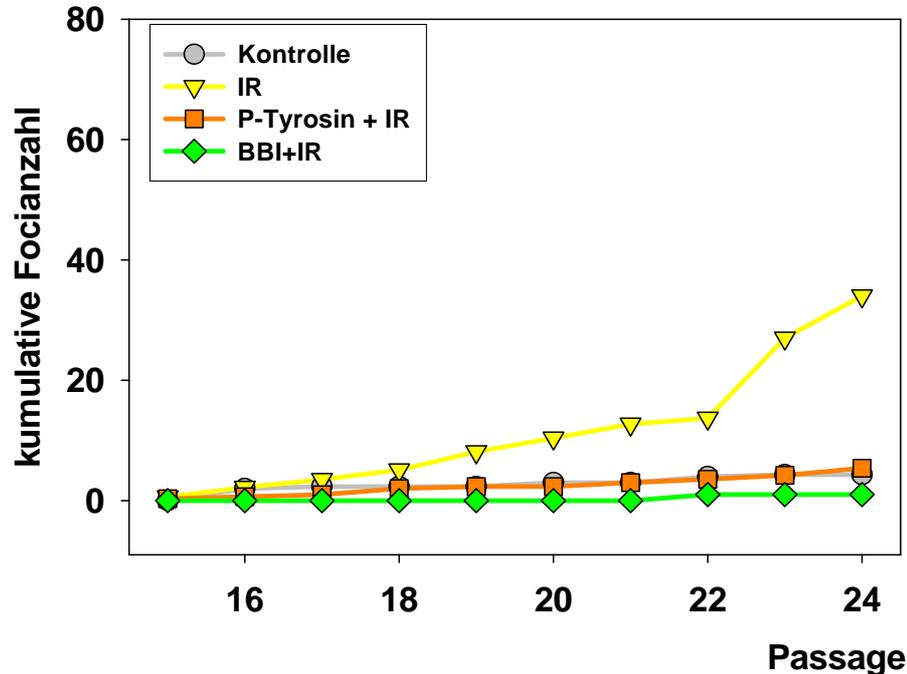


**Abb. 24 Kumulative Focianzahl in Abhängigkeit von der Passage und Behandlungsart;** (n = 3; Experiment mit BBI nur 1x durchgeführt); Verglichen werden die kumulativen Transformationsereignisse der Kontrollzellen mit den Zahlenwerten von BBI bzw. P-Tyrosin

## ERGEBNISSE

behandelten Zellen in Abhängigkeit von der Passage. Vor jedem Passagieren wurden die Zellen erneut mit BBI bzw. P-Tyrosin für 24 Stunden inkubiert (fraktionierte Behandlung; je 10  $\mu\text{M}$ ).

Vergleicht man die Kurve der kumulativen Focianzahl von Kontrollzellen mit der Kurve von Zellen nach fraktionierter Bestrahlung (Einzeldosis 4 Gy, max. 40 Gy), so stellt man fest, dass ionisierende Strahlung unabhängig von der Passagenzahl neoplastische Transformationen induzierte (Abb. 25). Jedoch ereigneten sich trendmäßig in hohen Passagen mehr Transformationsereignisse als in niedrigen. P-Tyrosin-Applikation vor Bestrahlung reduzierte die Anzahl der sich entwickelnden Foci in etwa auf das Kontrollniveau. D.h., die Kontrollkurve und die Kurve der P-Tyrosin behandelten und bestrahlten Zellen verlaufen nahezu identisch. Unter BBI-Einfluss zeigten sich nach Bestrahlung insgesamt sogar weniger Foci als bei den Kontrollzellen (BBI-Inkubation von 16 Stunden vor IR).

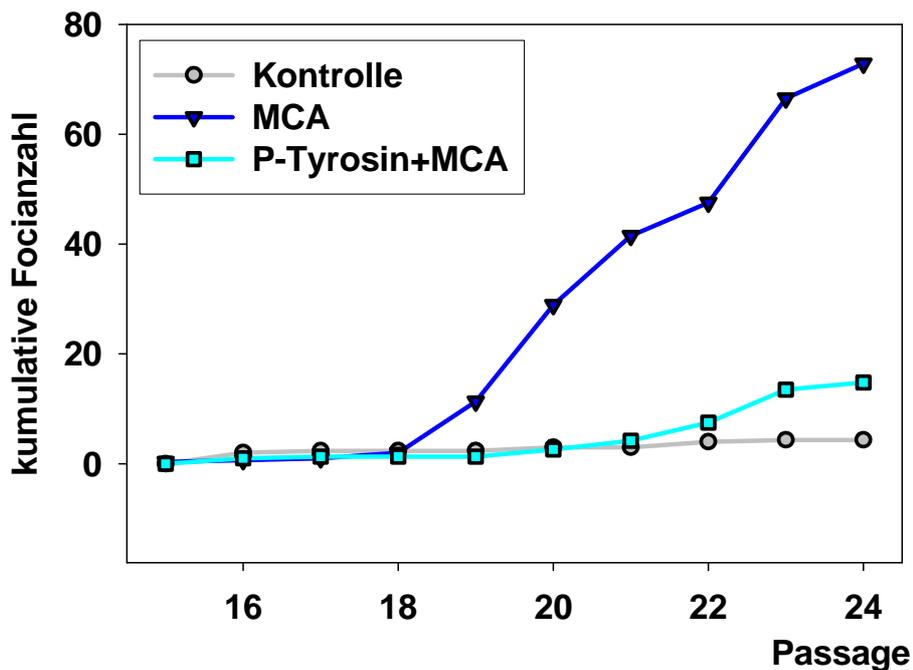


**Abb. 25 Kumulative Focianzahl in Abhängigkeit von der Passage und der Behandlungsart.** Verglichen werden die kumulativen Transformationsereignisse der bestrahlten Zellen (fraktionierte Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 4 Gy vor jeder neuen Zellpassage, max. 40 Gy)  $\pm$  Präinkubation mit P-Tyrosin bzw. BBI (fraktionierte Applikation von

## ERGEBNISSE

je 10  $\mu\text{M}$  P-Tyr bzw. BBI 24 Stunden vor jeder Bestrahlung ). Jeder Punkt in der Graphik repräsentiert einen Mittelwert aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Nach fraktionierter Behandlung mit Methylcholanthren (MCA, 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) stieg die Anzahl der Transformationsereignisse mit Zunahme der Passagenzahl an (Abb. 26). Bei niedriger Passagenzahl (noch geringes Zellalter) ereigneten sich im Schnitt 0,33 Zelltransformationen, die sich in Form von Foci zeigten. Ab Passage 19 stieg die Anzahl der Transformationsereignisse an (zwischen 6 und 19 neoplastische Transformationen pro Passage). Applizierte man 16 Stunden vor einer MCA-Behandlung P-Tyrosin zu den C3H Zellen, so entwickelten sich generell weniger Foci. Die Foci entstanden vermehrt bei hohen Passagen, insgesamt aber geringer in der Anzahl.



**Abb. 26 Kumulative Focianzahl in Abhängigkeit von der Passage und der Behandlungsart.** Verglichen werden die kumulativen Transformationsereignisse der MCA behandelten Zellen (fraktionierte MCA Behandlung mit einer Einzeldosis von 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  vor jeder neuen Zellpassage, max. 10 Behandlungen)  $\pm$  Präinkubation mit P-Tyrosin (fraktionierte Applikation von 10  $\mu\text{M}$  P-Tyr 24 Stunden vor jeder MCA-Behandlung, max. 10 Applikationen). Jeder Punkt in der Graphik repräsentiert einen Mittelwert aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Man kann die Graphiken 24, 25 und 26 abschließend wie folgt zusammenfassen: Alleinige BBI- bzw. P-Tyrosin-Applikation reduzierte besonders in Passagen unter 20 die Anzahl der Transformationsereignisse. Obwohl in höheren Passagen (ab Passage 20) die Focientstehung unter BBI bzw. P-Tyrosin nicht vollkommen supprimiert wurde, traten insgesamt weniger Transformationsereignisse als bei den Kontrollzellen auf.

BBI- bzw. P-Tyrosin-Zugabe vor einer Bestrahlung reduzierte über alle Passagen (hier Passagen 15 bis 24) die Focibildung etwa auf das Kontrollniveau. P-Tyrosin supprimierte bis Passage 21 sehr erfolgreich die MCA-induzierte neoplastische Transformation. Jenseits der 21. Passage wurde die Focientstehung auf 2,6 bis 15 pro Passage reduziert (vgl. MCA alleine zwischen 11 und 73 Transformationsereignisse pro Passage).

### 3.4.2.2 Berechnung der Transformationsfrequenz

Die Transformationsfrequenz ist definiert als Quotient aus der Anzahl der Transformationsereignisse und der absoluten Anzahl der lebensfähigen Zellen.

In den drei Tabellen 7, 8 und 9 sind die einzelnen Ergebnisse für jeden Transformationsversuch aufgeführt. Tabelle 10 vergleicht die Ergebnisse (Transformationsfrequenzen) der drei Experimente im Überblick.

C3H 10T1/2 Zellen transformierten in geringer Anzahl spontan, ohne dass die Fibroblasten irgendeine Behandlung durchgemacht hätten (0,02 transformierte Zellen von 1000 lebensfähigen Zellen). Gab man zu den C3H Fibroblasten BBI hinzu, so äußerte sich dies in einer verminderten spontanen Transformationsfrequenz (Reduktion um den Faktor 3). P-Tyrosin verringerte die Anzahl der spontan auftretenden Transformationsereignisse um die Hälfte. Methylcholanthren und ionisierende Bestrahlung besaßen eine hohe Transformationseffizienz. Dies ließ sich daran erkennen, dass nach Bestrahlung

## ERGEBNISSE

---

im Durchschnitt 4 von 1000 C3H 10T1/2 Fibroblasten maligne entarteten. Nach Inkubation von MCA transformierten im Durchschnitt 7,8 von 1000 Zellen. Applizierte man 16 Stunden vor der Bestrahlung BBI, so erkannte man eine Reduktion der Transformationseffizienz um den Faktor 21 (4,2:1000 nach IR; 0,2:1000 nach BBI+IR).

P-Tyrosin verminderte die strahleninduzierte Zelltransformation um den Faktor 7. Das bedeutet eine signifikante Reduktion der Transformationseffizienz ( $p = 0,05$  IR vs P-Tyr+IR) durch die Präinkubation von P-Tyrosin über einen Zeitraum von 16 Stunden vor Bestrahlung von C3H 10T1/2 Zellen. P-Tyrosin zeigte auch einen protektiven Effekt auf die chemikalieninduzierte Zelltransformation. Die Transformationseffizienz von MCA wurde durch Präinkubation von P-Tyrosin vor MCA Behandlung um den Faktor 7 vermindert. Allerdings beträgt der p-Wert 0,07, was dieses Ergebnis nicht signifikant macht. Zusammenfassend lässt sich also sagen, BBI bzw. P-Tyrosin reduzierten die spontan auftretende, die MCA- und IR-induzierte Zelltransformation.

Die folgenden Tabellen geben die Transformationsfrequenzen jedes einzelnen Transformationsexperimentes wieder:

### **Tab. 7 Ergebnisse des 1. Transformationsexperimentes**

C3H Fibroblasten-Erhaltkulturen wurden fraktioniert  $\pm$  BBI- bzw. P-Tyrosin-Präinkubation (je 10  $\mu$ M) mit ionisierender Strahlung (Einzeldosis von 4 Gy; max. 40 Gy) oder MCA (2  $\mu$ g / ml) behandelt. 24 Stunden nach der Behandlung mit IR bzw. MCA wurden die Zellen trypsiniert und in Kulturgefäße ausgesät (6-Well-Plate mit 2000 Zellen / Well). 8 Wochen nach Zellaussaat wurden die Foci in den Kulturen mikroskopisch gezählt. Die Mittelwerte der „Plating Efficiency“ wurden aus 10 voneinander unabhängigen Experimenten gebildet und der Standardfehler berechnet. Mit der Plating Efficiency lässt sich der Anteil der Zellen ermitteln, der nach Zellaussaat tatsächlich angewachsen ist. Die totale Focianzahl bezieht sich auf die zuvor errechnete Zahl von lebensfähigen Zellen. Bsp.: Nach Bestrahlung zeigten sich 8 Foci, was gleichbedeutend mit 8 Transformationsereignissen ist. D.h. 8 Zellen bildeten je einen Klon identischer Zellen in Form von Foci. Von den 19200 ausgesäten Zellen überlebten 2112 die Bestrahlung. 8 transformierte Zellen bezogen auf 2112 normale, nicht veränderte Zellen ergibt einen Quotienten von 0,0038, was der Transformationsfrequenz entspricht. D.h. 3,8 von 1000 Zellen wurden durch den Einfluß ionisierender Strahlung (IR) transformiert.

## ERGEBNISSE

<b>Behandlung</b>	<b>Plating Efficiency +/- Standard- fehler</b>	<b>Ausgesäte Zellzahl</b>	<b>Lebens- fähige Zellen</b>	<b>Totale Foci- Anzahl</b>	<b>Transfor- mations- frequenz</b>
<b>Kontrolle</b> (keine Behandlung)	0,64 +/-0,02	9.600	6.144	2	0,00032
<b>BBI (10x10µg/ml)</b>	0,67 +/- 0,027	19.200	12.864	1	0,00008
<b>P-Tyrosin</b> (10x10µg/ml)	0,58 +/-0,05	19.200	11.136	0	0
<b>IR</b> (fraktionierte Behandlung mit je 4 Gy, max. 40 Gy)	0,11 +/- 0,018	19.200	2.112	8	0,0038
<b>BBI+IR</b> (10x10µg/ml BBI 24 h vor Bestrahlung mit 4 Gy, max.40Gy)	0,26 +/- 0,039	19.200	4.992	1	0,0002
<b>P-Tyr+IR</b> (10x10µg/ml BBI 24 h vor Bestrahlung mit 4 Gy, max.40Gy)	0,2 +/- 0,057	19.200	3.840	1	0,00026
<b>MCA (10x2µg/ml)</b>	0,18 +/-0,05	19.200	3.456	26	0,0075
<b>P-Tyr+MCA</b> (10x10µg/ml P-Tyr 24 h vor MCA-Appli-kation mit je 10x2µg/ml)	0,35 +/-0,08	19.200	6.720	2	0,000297

**Tab. 7 (Beschreibung siehe oben)**

## ERGEBNISSE

Behandlung	Plating Efficiency +/- Standard- fehler	Ausgesäte Zellzahl	Lebens- fähige Zellen	Totale Foci- Anzahl	Transfor- mations- frequenz
<b>Kontrolle</b> (keine Behandlung)	0,28 +/- 0,04	120.000	33.600	9	0,00027
<b>BBI*</b>	-	-	-	-	-
<b>P-Tyrosin</b> (10x10µg/ml)	0,27 +/- 0,036	120.000	32.400	4	0,00012
<b>IR</b> (fraktionierte Behandlung mit je 4 Gy, max. 40 Gy)	0,09 +/- 0,026	120.000	10.800	71	0,0066
<b>BBI+IR*</b>	-	-	-	-	-
<b>P-Tyr+IR</b> (10x10µg/ml P-Tyr 24 h vor Bestrahlung mit 4 Gy, max.40Gy)	0,13 +/- 0,027	110.907	14.418	6	0,00042
<b>MCA</b> (10x2µg/ml)	0,13 +/-0,05	120.000	15.600	52	0,0033
<b>P-Tyr+MCA</b> (10x10µg/ml P-Tyr 24 h vor MCA-Appli-kation mit je 10x2µg/ml)	0,15 +/-0,07	107.123	16.068	17	0,0012

**Tab. 8 Ergebnisse des 2. Transformationsexperimentes**

Beschreibung siehe oben Tab.7; (\* wurde aus Kostengründen nicht durchgeführt)

## ERGEBNISSE

<b>Behandlung</b>	<b>Plating Efficiency +/- Standard- fehler</b>	<b>Ausgesäte Zellzahl</b>	<b>Lebens- fähige Zellen</b>	<b>Totale Foci- Anzahl</b>	<b>Transfor- mations- frequenz</b>
<b>Kontrolle</b> (keine Behandlung)	0,27 +/-0,03	120.000	32.400	2	0,00006
<b>BBI*</b>	-	-	-	-	-
<b>P-Tyrosin</b> (10x10µg/ml)	0,26 +/- 0,036	120.000	31.200	5	0,00016
<b>IR</b> (fraktionierte Behandlung mit je 4 Gy, max. 40 Gy)	0,09 +/-0,03	120.000	10.800	24	0,0022
<b>BBI+IR*</b>	-	-	-	-	-
<b>P-Tyr+IR</b> (10x10µg/ml P-Tyr 24 h vor Bestrahlung mit 4 Gy, max.40Gy)	0,12 +/-0,02	114.000	13680	17	0,0012
<b>MCA</b> (10x2µg/ml)	0,108+/-0,06	102.192	11.037	141	0,0127
<b>P-Tyr+MCA</b> (10x10µg/ml P-Tyr 24 h vor MCA-Appli-kation mit je 10x2µg/ml)	0,14 +/-0,08	97.742	13.684	26	0,0019

**Tab. 9 Ergebnisse des 3. Transformationsexperimentes**

Beschreibung siehe Tab.7; (\*wurde aus Kostengründen nicht durchgeführt)

## ERGEBNISSE

Bedingung	1.Trans- forma- tions- versuch	2.Trans- forma- tions- versuch	3.Trans- forma- tions- versuch	Mittel- wert	Standard abwei- chung	Standard fehler
<b>Kontrolle</b> (keine Behand- lung)	0,00032	0,00027	0,00006	<b>0,00022</b>	0,00014	0,00008
<b>BBI*</b> (10x10µg/ml)	0,000077	-	-	-	-	-
<b>P-Tyrosin</b> (10x10µg/ml)	0	0,00012	0,00016	<b>0,000093</b>	0,000083	0,000047
<b>IR</b> (fraktionierte Behand- lung mit je 4 Gy, max. 40 Gy)	0,00379	0,0066	0,0022	<b>0,0042</b>	0,0022	0,00127
<b>BBI+IR*</b> (10x10µg/ml BBI 24 h vor Bestrahl-ung mit 4 Gy, max.40Gy)	0,0002	-	-	-	-	-
<b>P-Tyr+IR</b> (10x10µg/ml P-Tyr 24 h vor Bestrahl-ung mit 4 Gy, max.40Gy)	0,00026	0,00042	0,0012	<b>0,00063</b>	0,0005	0,00029
<b>MCA</b> 10x2µg/ml	0,00752	0,0033	0,0127	<b>0,0078</b>	0,0047	0,0027
<b>P-Tyr+MCA</b> (10x10µg/ml P-Tyr 24 h vor MCA-Appli-kation mit je 10x2µg/ml)	0,000297	0,0012	0,0019	<b>0,0011</b>	0,0008	0,00046

**Tab. 10 Transformationsfrequenzen der drei Versuchsreihen im Überblick;**

Die Tabelle zeigt zusammenfassend die Ergebnisse der 3 Transformationsversuche. Der Mittelwert der Transformationsfrequenz  $\pm$  Standardfehler wurde aus je drei Einzelwerten berechnet. Die Transformationsfrequenz gibt den Quotienten aus der totalen Focianzahl und der totalen Anzahl an lebensfähigen Zellen an. Der t-Test wurde zum Überprüfen der Signifikanz verwendet:  $p < 0,5 > 0,1$  Ko vs P-Tyr;  $p < 0,05 > 0,01$  Ko vs IR;  $p = 0,05$  IR vs P-Tyr+IR;  $p < 0,05 > 0,01$  Ko vs MCA;  $p < 0,1 > 0,05$  MCA vs P-Tyr+MCA. \* wurde aus Kostengründen nur einmal durchgeführt

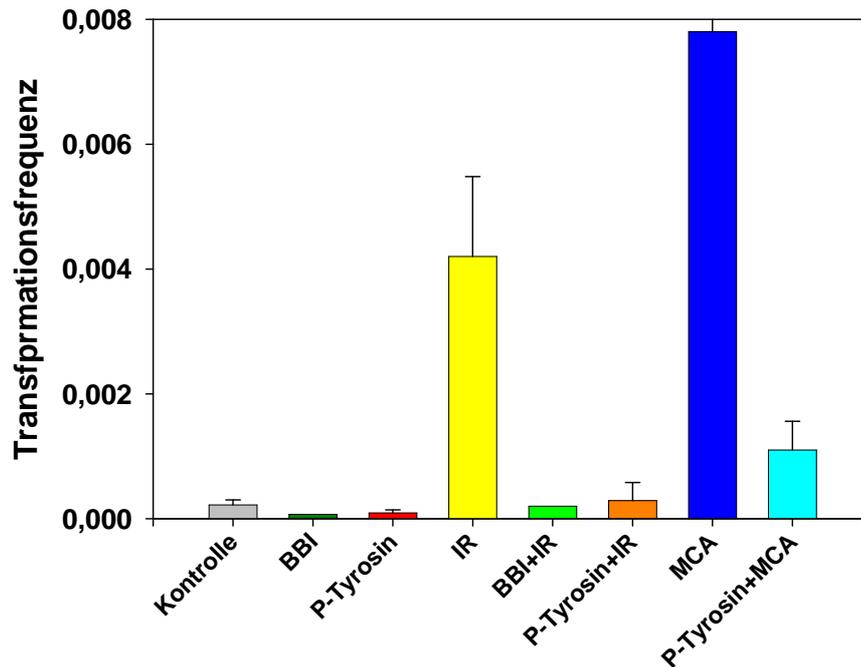
## ERGEBNISSE

Die nachfolgende Tabelle und Graphik zeigen noch einmal explizit die Transformationsfrequenzen in einer anderen Darstellungsweise. Die graphische Darstellung der Transformationsfrequenzen (Abb. 27) verdeutlicht die protektive Wirkung von BBI und P-Tyrosin auf die spontane, strahlen- und chemikalieninduzierte neoplastische Zelltransformation.

<b>Bedingung</b>	<b>Spontane und induzierte Transformations-frequenz</b>	<b>Reduktion der Transformations-frequenz</b>	<b>Steigerung der Transformations-frequenz</b>
<b>Spontane Transformation</b>	0,2 :1000		
<b>BBI</b>	0,07 :1000	Faktor 3	
<b>P-Tyrosin</b>	0,09 :1000	Faktor 2,5	
<b>IR</b>	4,2 :1000		Faktor 20
<b>BBI+IR</b>	0,2 :1000	Faktor 20	
<b>P-Tyr+IR</b>	0,6 :1000	Faktor 7	
<b>MCA</b>	7,8 :1000		Faktor 37
<b>P-Tyr+MCA</b>	1,1 :1000	Faktor 7	

**Tab. 11 Veranschaulichung der Transformationsfrequenz;** Resume der Tab. 10

Die Transformationsfrequenz gibt den Quotienten aus der totalen Focianzahl und der totalen Anzahl an lebensfähigen Zellen an. Die Daten stellen Mittelwerte der Transformationsfrequenzen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten dar. Die Tabelle gibt die Anzahl der Zellen an, die von tausend lebensfähigen Zellen transformierten.



**Abb. 27 Quantitative Auswertung des Transformationsversuches**

C3H Fibroblasten-Erhaltkulturen wurden fraktioniert  $\pm$  BBI- bzw. P-Tyrosin-Präinkubation (je 10  $\mu$ M) mit ionisierender Strahlung (Einzeldosis von 4 Gy; max. 40 Gy) oder MCA (2  $\mu$ g / ml) behandelt. 24 Stunden nach der Behandlung mit IR bzw. MCA wurden die Zellen trypsinisiert und in Kulturgefäße ausgesät (6-Well-Plate mit 2000 Zellen / Well). 8 Wochen nach Zellaussaat wurden die Foci in den Kulturen mikroskopisch gezählt. Die Mittelwerte der Transformationsfrequenz wurden aus 3 in drei voneinander unabhängige Experimente berechnet (siehe Tab.10). Die Transformationsfrequenz gibt den Quotienten aus der totalen Focianzahl und der totalen Anzahl an lebensfähigen Zellen an.

Aus diesen Ergebnissen eröffnen sich interessante Fragestellungen z.B. nach dem molekularen Mechanismus der Zelltransformation.

### 3.5 Gene Array Technik

Mit Hilfe der Microarray Technik sollte das mRNA-Expressionsmuster von MCA-transformierten Zellen (Klon Nr.17) mit dem von Normalzellen (C3H10T1/2 Fibroblasten) verglichen werden. Die Idee war, einige an dem Prozess der neoplastischen Transformation beteiligten Elemente zu identifizieren und in einen Kontext zu bringen. Zur Verfügung standen zwei verschiedene Arrays: Cell Cycle Array und Pathwayfinder Array. Das jeweilige mRNA-Expressionsniveau von normalen und transformierten C3H 10T1/2 Zellen wurde auf die GAPDH-Menge bezogen, so dass eine Quantifikation der Experimente möglich war.

#### 3.5.1 Cell Cycle Array

Auf dem Cell Cycle Array befanden sich die cDNAs für Cycline (A2, B, C, D1, D2, D3, E), Cyclinabhängige Protein-Kinasen (cdk2L, cdk4, cdk6), Cdc2, einige Cyclinabhängige Kinase-Inhibitoren (p15, p16, p18, p19, p21, p27, p57) und andere cDNAs, die für Proteine codieren, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind (E2F1, RB, skp1, skp2). Ein unerwartetes Ergebnis fand man beim Expressionsniveau der Cdks und Cycline des MCA-transformierten Klons: Die relative mRNA Expression aller Cycline und Cdks des MCA Klons war im Vergleich zur mRNA von Kontrollzellen reduziert. Besonders augenfällig war das relative mRNA Expressionniveau von Cdk4 und Cyclin D1. In MCA transformierten Zellen zeigte sich eine um 75% verminderte Cdk4 mRNA Menge und eine um 50% reduzierte Cyclin D1 mRNA Menge.

Für die anderen aufgeführten mRNAs (p15, p16, p18, p19, p21, p27, p57, RB, skp1 und skp2), die in die Zellzyklusregulation involviert sind, kann festgehalten werden: Das relative Expressionsniveau der mRNAs war (mit Ausnahme von p15 und p57) bezogen auf die GAPDH sowohl in den normalen C3H Zellen als auch in transformierten Zellen des Klons 17 gering. Aus dem Rahmen fielen p15 und p57, welche in Normalzellen hoch exprimiert wurden (relative mRNA Expression p15 = 2,7; p57 = 2,25). Allerdings fand man in MCA transformierten

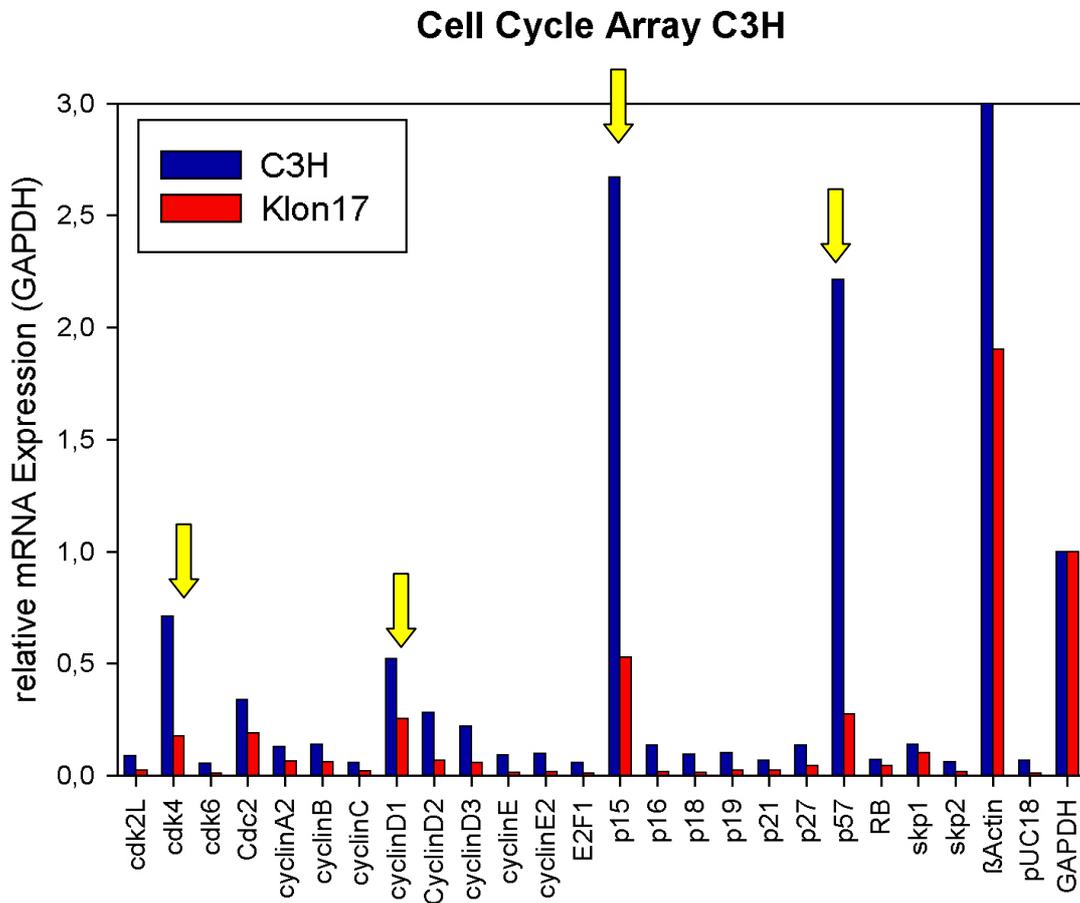
## ERGEBNISSE

---

Zellen eine um 80% reduzierte p15 mRNA Expression und eine um 88% verminderte p57 mRNA Expression. Auch das Expressionsniveau der übrigen o.g. mRNAs (p16,p18) war in MCA transformierten Zellen reduziert (allerdings geringere Reduktion).

Als Ergebnis des Cell Cycle Arrays kann man also festhalten, dass normale C3H Mausfibroblasten relativ betrachtet mehr am Zellzyklus beteiligte mRNAs exprimierten als transformierte C3H. Markant reduziert in Zellen des Klons Nr. 17 waren Cdk4, CyclinD1, p15 und p57. Für die Cycline und Cdks erstaunt das Ergebnis, denn erwartungsgemäß proliferieren transformierte Zellen mehr als normale Zellen. Zum Prozess der Transformation passt die erniedrigte Expression von Inhibitoren des Zellzyklus.

Dieses Experiment konnte nur einmalig durchgeführt werden, weshalb die generelle Aussagekraft in weiteren Experimenten verifiziert werden sollte.



**Abb. 28** Die Grafik veranschaulicht die relative mRNA Expression verschiedener Zellzyklus relevanter Regulatoren von normalen C3H 10T1/2 Zellen im Vergleich zu dem Expressionsniveau von transformierten C3H 10T1/2 Fibroblasten des Klon 17 (MCA induzierter Zellklon). Alle Werte beziehen sich auf die Expressionskontrolle GAPDH. Die relative Expression einer mRNA wurde anhand ihrer radioaktiv markierten cDNAs mittels Phospho-Imager bestimmt. (n=1)

### 3.5.2 Pathwayfinder Array

Im Pathwayfinder Array sind die cDNAs codierender Proteine fixiert, die in verschiedenen Signaltransduktionswegen involviert sind:

Inhibitoren des Zellzyklus: p16, p19, p21, p27, p53, p57

Transkriptionsfaktoren / -regulatoren: egr1, ATF2, NF $\kappa$ B und deren Inhibitoren: I $\kappa$ B

Streßsignalwege: iNOS

Immunregulation: IL2, CD5

Sekretion: NSP86

Synapsen: NSF

DNA-Reparatur: GADD45

Apoptose: FASL, bax

Zellatmung: CYP19

Proto-Onkogene: c-fos, c-jun, c-myc

Die Intention dieses Arrays war es, mögliche in den Prozess der neoplastischen Transformation involvierte Signalwege zu identifizieren. Es wurden mRNAs von normalen C3H 10T1/2 Fibroblasten mit mRNAs von MCA transformierten C3H 10T1/2 Zellen des Klons 17 miteinander verglichen. Zellen dieses Klons bildeten Kolonien in Softagar, weshalb gerade dieser Klon für ein derartiges Experiment ausgewählt wurde.

Die Expressionsmuster der Inhibitoren des Zellzyklus in diesem Assay wichen im Prinzip nicht von denen des Cell Cycle Arrays ab: Die RNAs von p16, p19, p21, p27 und p53 lagen in relativ geringen Konzentrationen vor (Ausnahme p57). Differenziert betrachtet, wurden in den Zellen des MCA induzierten Klons 17 weniger Inhibitoren des Zellzyklus synthetisiert als in den Kontrollzellen. Die p57 Expression war in den transformierten Zellen sogar um 80% reduziert.

Bei den Transkriptionsfaktoren bzw. bei der in die Transkription involvierte mRNA fiel auf, dass in den transformierten Zellen weniger ATF2-, I $\kappa$ B- und

NFKB-mRNA als in den Kontrollzellen exprimiert wurden. Allerdings war das *egr1* Expressionsniveau in MCA transformierten Fibroblasten und in normalen Zellen nahezu identisch. Auch mRNA Expression der induzierbaren Form der Nitric Oxide Synthase (iNOS), die in Zellen für die NO-Produktion verantwortlich ist, war in beiden (normalen und transformierten) Zellen auf fast gleichem Niveau.

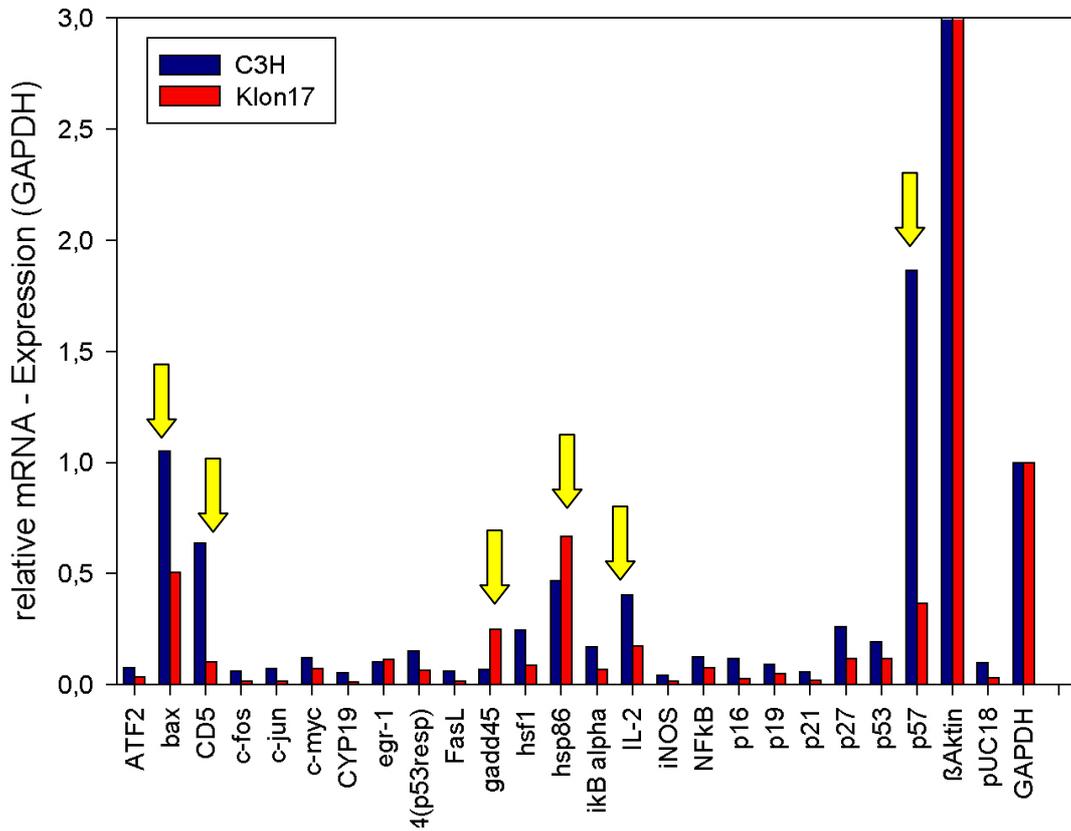
Interessanterweise waren Regulatoren der Immunantwort bzw. deren mRNA um 52% (IL2) und um 85% (CD5) in transformierten Zellen reduziert. Ebenso vermindert exprimiert in gerade genannten Zellen wurden mRNAs, die für Synaptic Vesicle Regulatory Proteins kodieren.

Reparaturrelevante GADD45 mRNA wurde erstaunlicherweise im transformierten Zellklon 17 vermehrt synthetisiert (Faktor 3) als in normalen C3H 10T1/2 Fibroblasten.

Wie für antiapoptotische Zellen zu erwarten ist, waren die apoptoserelevanten mRNAs *bax* und *FasL* in MCA Zellen vermehrt exprimiert (evtl. verminderter programmiertes Zelltod).

Die mRNA Expression der Proto-Onkogene *c-fos*, *c-jun* und *c-myc* waren in dem Zellklon 17 nicht erhöht.

Pathwayfinder-Array C3H vs. Klon 17 (MCA)



**Abb. 29** Die Grafik veranschaulicht die relative mRNA Expression von Komponenten verschiedener Signaltransduktionswege von normalen C3H 10T1/2 Zellen im Vergleich zu dem Expressionsniveau von transformierten C3H 10T1/2 Fibroblasten des Klons 17 (MCA induzierter Zellklon). Alle Werte beziehen sich auf die Positivkontrolle GAPDH. Die relative Expression einer mRNA wurde anhand ihrer radioaktiv markierten cDNAs mittels Phospho-Imager bestimmt. (n=1).

## **4. Diskussion**

### **4.1 Übersicht**

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der chemikalien- und strahleninduzierten neoplastischen Zelltransformation und deren Prävention durch den Bowman-Birk Protease Inhibitor (BBI) und Phospho-Tyrosin (P-Tyr). Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde in mehrere große Themengebiete untergliedert, die weiter unten diskutiert sollen:

- I. Charakterisierung des Wachstumsverhaltens von C3H 10T1/2 Mausfibroblasten unter fraktionierter Therapie
- II. Modulation der Transformationseffizienz durch ionisierende Strahlung und 3-Methylcholanthren
- III. Einfluss von BBI und P-Tyrosin auf den Transformationsprozess
- IV. Überlegungen zum molekularen Mechanismus der chemikalieninduzierten Zelltransformation

Im Gegensatz zu humanen Zellen können Mausfibroblasten relativ leicht durch ionisierende Strahlung und sonstige Noxen transformiert werden (Rodemann, 2000), weshalb das Mausfibroblasten-Modellsystem C3H 10T1/2 und kein humanes verwendet wurde. In diesem System können transformierte Zellen anhand ihres Phänotyps identifiziert werden.

### **4.2 Charakterisierung des Wachstumsverhaltens von C3H unter der fraktionierten Behandlung**

Im Standard Transformations Assay wurden C3H Mausfibroblasten über einen Zeitraum von 5 Wochen fraktioniert mit ionisierender Strahlung (Einzeldosis 4Gy, max. 40 Gy) bzw. MCA (2 µg /ml) behandelt. Zusätzlich wurde in weiteren Ansätzen die Wirkung von BBI bzw. P-Tyrosin auf das Proliferationsverhalten

## DISKUSSION

---

von unbehandelten und mit IR / MCA behandelten C3H Zellen getestet. Unbehandelte Kontrollzellen benötigten einen Tag, um sich zu verdoppeln. BBI bzw. P-Tyrosin-Applikation wirkte sich nicht auf die Teilungsgeschwindigkeit der C3H Zellen aus. Nach Bestrahlung bzw. MCA-Zugabe verdoppelte sich die Zeitspanne, welche die Zellpopulation zum Verdoppeln benötigte. BBI- bzw. P-Tyrosin-Präinkubation veränderte an dieser Teilungsgeschwindigkeit nichts. Laut Reznikoff liegt die Generationszeit von C3H Zellen der Passage 9 in der logarithmischen Phase bei 15,5 Stunden, in höheren Passagen steigert sich die Populationszeitverdopplung auf 16,5 Stunden (Reznikoff et al., 1973). Da die in dieser Arbeit verwendeten Zellen weit älter waren (zwischen Passage 15 und 24), ist es leicht verständlich, dass die Generationszeit verlängert war.

Besonders interessant waren Untersuchungen der Überlebensfraktion von C3H Zellen nach den unterschiedlichen Behandlungsarten im Koloniebildungsassay. Es ließ sich zeigen, dass BBI und P-Tyrosin bei alleiniger Applikation eine minimale Reduktion der „Surviving Fraktion“ im Vergleich zu Kontrollzellen verursachten, im weiteren Verlauf der fraktionierten Behandlung konnte dieser Effekt nicht mehr nachgewiesen werden. Möglicherweise wurden in BBI / P-Tyrosin behandelten Zellen Signalkaskaden aktiviert, die sich auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen auswirkte.

Bestrahlung von C3H Zellen mit 4 Gy resultierte in einer durchschnittlichen Reduktion der Überlebensfraktion auf 30% im Vergleich zu Kontrollzellen. Man erkannte eine klare Dosisabhängigkeit der Surviving Fraction während der fraktionierten Therapie mit ionisierender Strahlung. Ähnliche Resultate wurden auch für normale humane Fibroblasten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen gefunden (Dittmann et al., 1995). Die Daten für den radioprotektiven Effekt von BBI stimmen ebenfalls mit den in der Literatur gefundenen überein (Dittmann et al., 1998, 2000). BBI zeigte bei humanen mit 2 Gy bestrahlten Fibroblasten einen radioprotektiven Effekt von 20 % bis 40 % auf das klonogene Überleben.

P-Tyrosin-Präinkubation vor Bestrahlung von C3H Zellen wirkte signifikant radioprotektiv (durchschnittliche klonogene Überlebensfraktion von 43%).

Ähnliche Werte sind auch aus der Literatur bekannt (Dittmann et al. 2001). Über die Dauer der fraktionierten Behandlung ließ der radioprotektive Effekt von P-Tyrosin etwas nach. Der Grund hierfür ist nicht bekannt.

P-Tyrosin zeigte nach Präinkubation vor einer MCA-Behandlung eine Steigerung der klonogenen Überlebensfraktion von 14% im Vergleich zu alleiniger MCA-Applikation. Während der fraktionierten Therapie steigerte sich der chemoprotektive Effekt. Es existieren hierzu keine weiteren Daten aus der wissenschaftlichen Literatur. Man könnte sich vorstellen, dass P-Tyrosin zunächst eine gewisse Anlaufzeit z.B. zur Expression von bestimmten Effektorproteinen benötigt, um seine volle Wirksamkeit als Chemoprotektor zu entfalten. Wie bereits oben erwähnt, benötigten nur mit P-Tyrosin behandelten Zellen zunächst auch eine gewisse Phase, um auf die gleiche klonogene Überlebensfraktion zu kommen wie Kontrollzellen.

Scheinbar gänzlich widersprüchlich zu den Ergebnissen des Koloniebildungsassays sind die Daten der Vitalitätstests. Wie die Neutralrotmethode, der Trypanblaufärbetest und Kristallviolett-Vitalitätstest ergaben, überlebten in diesen Testverfahren mehr C3H Zellen eine Bestrahlung mit 4 Gy bzw. MCA-Applikation mit 2 µg/ml als im Koloniebildungsassay. Dieses Phänomen lässt sich gut erklären, wenn man bedenkt, dass im Koloniebildungsassay nur die proliferationsfähigen, nicht jedoch die arretierten Zellen erfasst wurden. Es deutet also darauf hin, dass viele Zellen einen noxenbedingten Zellzyklusarrest durchführen, wie dies durch viele Literaturstellen belegt wird (z.B. Syljuasen et al. 2001).

Um zu diesem Abschnitt eine abschließende Bewertung abzugeben: Der chemo- und radioprotektive Effekt von BBI ist schon lange aus der Literatur bekannt (Kennedy et al., 1981, 1984, 1994, Kuroki et al., 1979). P-Tyrosin und seine Funktion als Radioprotektor wurden kürzlich aufgedeckt (Dittmann et al. 2001), P-Tyrosin als chemoprotektive Substanz ist neu. Wenn sich dieser Sachverhalt auf in vivo Modelle übertragen ließe, gäbe es vielfältige Anwendungsmöglichkeiten z.B. im klinischen Alltag. Bis dahin bedarf es jedoch noch weitreichender Forschung.

### **4.3 Modulation der Transformationseffizienz durch ionisierende Strahlung und 3-Methylcholanthren**

Erstmalig konnten 1973 Reznikoff et al. eine in vitro Zelltransformation an C3H 10T1/2 Mausfibroblasten zeigen. Dieses System eignete sich besonders für derartige Studien, weil man anhand ihres Phänotyps transformierte Zellen in der Petrischale erkennen konnte. Mit Hilfe des sog. Standard Transformations Assays konnte in der vorliegenden Arbeit die karzinogene Wirkung von ionisierender Strahlung und 3-Methylcholanthren demonstriert werden. Es zeichnete sich dabei ab, dass MCA im Vergleich zu ionisierender Strahlung der potentere Promotor der Zelltransformation war (IR: 4,2 Transformationen pro 1000 lebensfähiger Zellen; MCA: 7,8 Transformationsereignisse pro 1000 lebensfähiger Zellen; Kontrollzellen: 0,2 spontan maligne veränderte Zellen pro 1000 lebensfähiger Zellen). MCA induzierte nach fraktionierter Behandlung von C3H Zellen mit einer Einzeldosis von 2 µg/ml knapp doppelt so viele transformierte Zellen wie Röntgenstrahlung (ebenfalls fraktionierte Behandlung mit einer Einzeldosis von 4 Gy, max. 40 Gy). Aus der Literatur ist bekannt, dass chemische Agenzien im Vergleich zu Strahlung eine höhere Transformationseffizienz besitzen (Little, 1993). Es eröffnet sich die Frage, wie es zu den spontanen Transformationen kommen konnte. Möglicherweise gibt es Faktoren, die genomischen Veränderungen in C3H Zellen hervorrufen. Dabei sei besonders an Viren gedacht, die eine Tumorinduktion bewirken können (z.B. HPV-Infektion als Ätiologie des Cervix-CA) (Zhao et al., 1995; Vassilandonopoulou et al., 1997).

Lun et al. fanden nach einmaliger Bestrahlung von C3H Zellen mit einer Einzeldosis von 2,5 Gy 0,289 transformierte Zellen pro 1000 lebensfähiger Zellen, spontan entwickelten sich 0,065 maligne veränderte Zellen pro 1000 lebensfähiger Zellen (Lun et al. 1999). Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten z.B., was die strahleninduzierten Foci betrifft, daran liegen, dass Lun keine fraktionierte Behandlung durchführte. In einer von Kuroki initiierten Versuchsreihe, in der es um die chemische Transformation in C3H 10T1/2

## DISKUSSION

---

Fibroblasten ging, fand man eine MCA induzierte Transformationseffizienz von 1:1000 (Kuroki et al. 1979). Auch hier wurde nur einmalig mit MCA (2 µg /ml für 24 Stunden) behandelt, was einen Vergleich erschwert.

Aus den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die im Assay mit MCA fraktioniert behandelten Zellen immer anfälliger bezüglich ihrer Transformierbarkeit wurden, je weiter die Therapie fortgeschritten war. Eine Erklärung könnte eine Dosisabhängigkeit sein: Je häufiger C3H Zellen mit MCA behandelt werden, desto mehr Zellen entarten maligne. Möglicherweise hängt die Transformierbarkeit der Zellen aber auch von dem Zellalter ab: Je älter eine Zelle, desto mehr genetische Defekte häufen sich an, was die Ausbildung eines transformierten Phänotyps erleichtert.

Bei fraktionierter Therapie mit ionisierender Strahlung ist eine Interpretation nicht so einfach. Bis zu acht mal konnten C3H Zellen bestrahlt werden, ohne dass die Anzahl der maligne entarteten Zellen pro Behandlungseinheit (also pro Passage) zugenommen hatte. Selbst nach achtmaliger Bestrahlung (die Gesamtdosis lag also schon bei 32 Gy) entstanden in Passage 22 durchschnittlich genauso viele transformierte Zelle wie nach ein- oder zweimaliger Behandlung. Erst nach einer Gesamtdosis von 36 bis 40 Gy stieg die Focibildung pro Passage rapide an. Demnach ließ sich eine Dosisabhängigkeit erst nach mehreren Bestrahlungszyklen erkennen. Die stochastische Strahlenwirkung macht sich also besonders zu Therapiebeginn bemerkbar, später kommt eine Dosisabhängigkeit zum Tragen.

Eine weitere interessante Interpretation für die scheinbare Dosisabhängigkeit der Focibildung nach MCA- / IR-Behandlung wäre eine noxenbedingte Aktivierung endogener (Retro-) Viren. Man fand z.B. in myeloischen Leukämiezellen, die aus C3H Mäusen isoliert wurden, eine Überexpression von retroviraler RNA, die im kausalen Zusammenhang mit der Entwicklung der akuten myeloischen Leukämie standen (Tanaka et al., 2001). Möglicherweise aktiviert die wiederholte Behandlung der C3H Fibroblasten mit Noxen virale, mutagen wirkende Insertionselemente im Wirtsgenom, so dass sich ein transformierter Phänotyp leichter ausbilden kann.

Diese Befunde könnten klinisch relevant sein, denn Patienten, die eine fraktionierte Therapie im Rahmen ihrer Tumorerkrankung durchlaufen müssen, werden einem immer größerem Risiko für die Induktion eines Sekundärtumors ausgesetzt. Doch sollte zunächst die Übertragbarkeit vom in vitro Tiermodell auf den menschlichen Organismus überprüft werden.

#### **4.4 Einfluss von BBI und Phospho-Tyrosin auf den Transformationsprozess**

Die antitumorigene Wirkung von Protease Inhibitoren ist schon lange bekannt (Kennedy et al. 1981, Billings et al. 1987). Der Bowman-Birk Protease Inhibitor, ein Polypeptid, stammt aus der Sojabohne und spielt dort wahrscheinlich eine Rolle bei der Abwehr gegen Fressinsekten (Brown et al., 1984). Aus Ergebnissen von Kennedy weiß man, dass BBI die durch verschiedene Noxen induzierte Karzinogenese in unterschiedlichen Spezies in verschiedenen Geweben/Organen nach unterschiedlicher Applikationsart supprimiert (Kennedy, 1994). Beim Menschen wird auf der Basis von epidemiologischen Studien davon ausgegangen, dass BBI als traditioneller Nahrungsbestandteil im asiatischen Lebensraum eine Rolle bei der Verhinderung von Tumorerkrankungen der Mamma, des Kolons, des Pankreas und der Prostata spielt (Correa, 1981). Von der antiproliferativen Wirkung des P-Tyrosins auf Tumorzellen wird bisher nur in Artikeln von Mishra et al. berichtet (Mishra et al., 1993). In seinen Studien zeigte er die supprimierende Wirkung von P-Tyrosin auf das Wachstum von humanen Nieren- und Mammatumorzellen. Dittmann et al. fanden in vitro einen radioprotektiven Effekt von P-Tyrosin, der spezifisch bei p53 Wildtyp-Zellen vorzufinden war (Dittmann et al., 2001). Versuche an Mäusen von Dittmann et al. bestätigten den radioprotektiven Effekt von P-Tyrosin bezüglich radiogen erzeugter Fibrose in vivo (Mündliche Mitteilung von Dittmann).

Die aus der Literatur (s.o.) genannten inhibitorischen Effekte von BBI auf die Karzinogenese konnten im Transformationsassay bestätigt werden. Bezüglich

## DISKUSSION

---

P-Tyrosin existieren noch keine vergleichbaren Werte: Alleinige BBI- bzw. P-Tyrosin-Applikation (10  $\mu$ M) konnte in vitro im Modellsystem C3H 10T1/2 die Anzahl der spontanen Transformationsereignisse um den Faktor 3 (BBI) bzw. 2,2 (P-Tyrosin) reduzieren. Obwohl in höheren Passagen (ab Passage 20) die Focientstehung unter BBI bzw. P-Tyrosin nicht vollkommen supprimiert wurde, traten insgesamt weniger Transformationsereignisse als bei Kontrollzellen auf.

BBI- bzw. P-Tyrosin-Zugabe 16 Stunden vor einer Bestrahlung von C3H Zellen mit 4 Gy reduzierte über alle Passagen hinweg (hier Passage 15 bis 24) die Focusbildung. Für BBI errechnete sich eine Reduktion der Transformationsfrequenz um den Faktor 21 (IR: 4,2 transformierte Zellen pro 1000 lebensfähiger Zellen; BBI+IR: 0,2:1000). Yavelow et al. ermittelten 1985 durch Experimente den gleichen BBI-Effekt, allerdings fiel die BBI bedingte strahleninduzierte Reduktion der Focibildung bei der gleichen BBI-Konzentration geringer aus (Faktor 10). Ein direkter Vergleich sollte nicht vorgenommen werden, da Yavelow keine fraktionierte Behandlung der C3H Zellen durchführte.

P-Tyrosin suppressierte die strahleninduzierte Karzinogenese um den Faktor 7 (IR: 4,2 transformierte Zellen pro 1000 lebensfähiger Zellen; P-Tyrosin+IR: 0,6:1000).

Ebenso erwies sich P-Tyrosin im Transformationsversuch als ein potenter Inhibitor der chemikalieninduzierten Transformation. Es ergab sich eine Reduktion der Transformationsfrequenz um Faktor 7 (MCA: 7,8 transformierte Zellen pro 1000 lebensfähiger Zellen).

Dittmann et al. fanden heraus, dass die für die Radioprotektion verantwortliche Sequenz von BBI in der Region für die Anti-Chymotrypsin-Aktivität lokalisiert ist. Die sich im aktiven Zentrum von BBI befindenden Aminosäuren wurden von Dittmann identifiziert (Dittmann et al., 2001). Als essentiell wurde die Aminosäure Tyrosin identifiziert. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die eingesetzten Peptide intrazellulär in ihrer phosphorylierten Form vorlagen (Dittmann, persönliche Mitteilung). Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden Untersuchungen mit der Aminosäure P-Tyrosin unternommen. Es ergab sich ein radioprotektiver Effekt für P-Tyrosin (Dittmann et al., 2001). Durch

Experimente von Misha et al. wurde der antiproliferative Effekt von P-Tyrosin auf Tumorzellen gezeigt. Durch den Standard Transformations Assay konnte nun auch die antikarzinogene Eigenschaft von phosphoryliertem Tyrosin demonstriert werden. Damit wäre ein weiterer Schritt in Richtung klinische Anwendung bei der Therapie von Tumorerkrankungen getan, denn man fürchtet den antiproteolytischen Effekt von BBI, wie dies bereits von Kennedy 1994 in Form einer Pankreashypertrophie nach systemischer Applikation eines Proteaseinhibitors beschrieben wurde (Kennedy, 1994). Mit Phospho-Tyrosin könnte sich die Möglichkeit bieten, von der radioprotektiven und antikarzinogenen Wirkung Gebrauch zu machen, ohne dass es zu den unerwünschten Nebenwirkungen eines Proteaseinhibitors kommt. Durch seine spezifische Wirkung auf p53 Wildtyp Zellen würde Normalgewebe selektiv vor Strahlung geschützt, wohingegen p53 mutierte Tumorzellen von der P-Tyrosinwirkung nicht profitieren (Dittmann et al., 2001). Zudem wäre kein kompliziertes Aufreinigungsverfahren zur Herstellung der Substanz nötig wie dies für BBI der Fall ist (Kennedy et al., 1993). Es wäre z.B. vorstellbar, begleitend zu einer kombinierten Radio- und Chemotherapie P-Tyrosin zu verabreichen, um das Risiko der Entwicklung eines Sekundärtumors für den Patienten zu minimieren. Doch zunächst sollten weitere Studien über P-Tyrosin aufgenommen werden, ehe voreilige Schlüsse gezogen werden.

### **4.5 Ideen zum molekularen Mechanismus von P-Tyrosin**

Dittmann et al. fanden erstmalig eine p53- und CDKN1A-Stabilisierung innerhalb von drei Stunden nach Zugabe von P-Tyrosin zu verschiedenen Zell-Linien (Dittmann et al., 2001). Diese Ergebnisse sind analog zu den von BBI ermittelten Daten (Dittmann et al., 1998). Damit wurde gezeigt, dass P-Tyrosin mit intrazellulären p53-abhängigen Signalkaskaden interagiert, weshalb sie auf einen ähnlichen Wirkungsmechanismus wie BBI schließen, nämlich eine stimulierende Wirkung auf den DNS-Reparaturprozess (Dittmann et al. 1998).

Mishra et al. legten 1993 dar, dass P-Tyrosin die Epidermal Growth Factor (EGF) induzierte EGFRrezeptor Tyrosin Phosphorylierung inhibierte, was mit einer reduzierten EGFR Kinase Aktivität verbunden war. Dieser Effekt wurde nach Präinkubation mit O-Vanadate aufgehoben, welches die Protein Tyrosin Phosphatasen (PTPasen) blockierte. Ferner fand man eine erhöhte PTPase-Aktivität in P-Tyrosin behandelten Zellen, was zu einer schnelleren Dephosphorylierung des EGFR führte. Die Arbeitsgruppe Mishra schloss daraus, dass P-Tyrosin-induzierte Dephosphorylierung des EGFR durch Induktion der zellulären PTPase verursacht werden könnte oder durch indirekte P-Tyrosin Effekte, die andere zelluläre Proteine wie z.B. Protein Tyrosin Kinasen (PTK) betreffen (Mishra et al., 1993).

### **4.6 Überlegungen zum molekularen Mechanismus der chemikalieninduzierten Zelltransformation**

Ziel der molekularbiologischen Untersuchungen war es, mögliche molekulare Marker der Zelltransformation zu identifizieren und deren Rolle im Prozess der neoplastischen Transformation zu ergründen.

Mit Hilfe des Cell Cycle Arrays wurde das Expressionsmuster Zellzyklus relevanter mRNA von normalen C3H Zellen mit dem von transformierten C3H Fibroblasten verglichen. Häufig weisen transformierte Zellen ein gesteigertes Proliferationsverhalten auf (Wagener, 1999). Dies lässt auf eine Dysregulation des Zellzyklus schließen und hätte verschiedene Folgen im Sinne einer Transformation: Zum einen kann die Zellzahl durch die erhöhte Proliferationsrate und/oder durch einen Block der physiologischen Apoptose erhöht werden, und zum anderen können Störungen an den Kontrollpunkten bzw. der dort abgelaufenen Reparaturmechanismen zu einer genomischen Instabilität führen (Crompton et al., 1997). Erstaunlicherweise fand man nach dem Array keine erhöhte Expression von RNAs, die für Cyclinen und CDKs kodieren. Besonders auffällig war u.a. die Reduktion der CDK4,6 sowie der Cyclin D mRNA, die komplexiert für die Progression der Zelle durch die G1-

## DISKUSSION

---

Phase im Zellzyklus verantwortlich ist. Cyclin Kinase Inhibitoren bzw. deren mRNA-Expressionsmuster waren jedoch auch in erheblichen Maß reduziert. Die p15 und p57 mRNA Expression war beispielsweise um 80 bzw. 88% im Vergleich zu dem mRNA Level normaler Zellen reduziert. Im Pathwayfinder Array konnte eine Reduktion der für CKI kodierenden mRNA abgelesen werden. Möglicherweise ist das Verhältnis von CDK-Cyclin-Komplexen zu CKIs entscheidend und so gesehen die inhibitorische Aktivität der CKIs den aktivierenden Komplexen im vorliegenden Experiment zahlenmäßig unterlegen. Somit würde die Progression durch den Zellzyklus in transformierten Zellen insgesamt gefördert. Allerdings könnte die reduzierte mRNA Menge für CKI kodierender Proteine auch aus einer reduzierten mRNA Stabilität transformierter Zellen resultieren.

Speziell bei diesem durch MCA transformierten Zellklon könnte das gesteigerte Proliferationsverhalten nicht nur durch veränderte Expressionsmuster der regulatorischen Elemente des Zellzyklus bedingt sein, sondern vielmehr durch einen Block der physiologischen Apoptose. Damit wäre das Verhältnis von Zellproliferation und Apoptose nicht mehr ausgeglichen, sondern in Richtung Zellneubildung verschoben. Letztere Erklärung wurde im Pathwayfinder-Array angedeutet: Eine Reduktion apoptoseeinleitender Elemente. Im MCA transformierten Klon 17 war der proapoptotische Faktor bax, der als Promotor der Apoptose fungiert, und ebenso der FASLigand reduziert, der für die Transduktion von Apoptosesignalen zuständig ist. Dies lässt auf eine verminderte Fähigkeit der transformierten Zellen schließen, den programmierten Zelltod einzugehen. Das würde eine vermehrte Proliferation im Vergleich zu Normalzellen erklären.

In vielen Tumorzellen sind häufig Proto-Onkogene mutiert, die durch diese Mutation zum Onkogen aktiviert werden (Alberts et al., 1995). In dem untersuchen Klon 17 zeichnete sich im Gegenteil eine leichte Reduktion der Proto-Onkogen mRNA von c-fos, c-jun und c-myc ab. Dies ist verwunderlich, denn es genügt eine Mutation in nur einer Genkopie, um eine Onkogenaktivierung zu bewirken. Auch dieses Ergebnis sollte mit

## DISKUSSION

---

Zurückhaltung betrachtet werden, denn die mRNA Stabilität der transformierten Zellen könnte verändert sein.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich bei der chemischen, durch MCA induzierten Zelltransformation am Beispiel von Klon 17 ein Trend in Richtung reduzierter Apoptose (transformierte Zellen zeigten eine reduzierte Apoptose) und geringfügiger Inhibition negativer Zellzyklusregulatoren abzeichnet (Unbalance zwischen Cyclinen und CKIs).

Mit dem Wissen dieser Experimente könnte der molekularbiologische Mechanismus der chemikalieninduzierten Zelltransformation weiter erforscht werden.

### 5. Zusammenfassung

Zur protektiven Funktion des Bowman-Birk Proteinase Inhibitors (BBI) und Phospho-Tyrosins (P-Tyr) hinsichtlich einer strahlen- und chemikalieninduzierten Zelltransformation wurden zellbiologische Untersuchungen durchgeführt. Das Modellsystem von C3H 10T1/2 Fibroblasten in vitro erlaubt die mikroskopische Identifikation von transformierten Zellen anhand ihres Phänotyps in Form von sogenannten Foci. Dies bildete die Grundlage für den Transformationsassay, durch den quantitative Aussagen zur Transformationsfrequenz gemacht werden konnten.

Interessanterweise bewirkten im Modellsystem C3H 10T1/2 alleinige BBI- bzw. P-Tyrosin-Applikation (je 10  $\mu$ M) eine Reduktion der spontanen Transformationsereignisse um Faktor 3 für BBI bzw. 2,2 für P-Tyrosin.

Im Transformationsversuch erwies sich 3-Methylchoalanthren als der potentere Promoter der Zelltransformation, denn es resultierten mehr maligne entartete Zellen nach MCA-Behandlung als nach Bestrahlung (knapp doppelt so viele). Für BBI errechnete sich eine Reduktion der Transformationsfrequenz um den Faktor 21. P-Tyrosin supprimierte die strahleninduzierte Karzinogenese um den Faktor 7. Ebenso erwies sich P-Tyrosin im Transformationsversuch als ein potenter Inhibitor der chemikalieninduzierten Transformation. Es ergab sich eine Reduktion der Transformationsfrequenz um den Faktor 7. Dieser antikarzinogene Effekt von P-Tyrosin sowohl auf die spontane als auch auf die chemikalien- und strahleninduzierte neoplastische Zelltransformation wurde hier erstmalig beschrieben.

Um erste Anhaltspunkte für an der Zelltransformation beteiligte Elemente zu identifizieren, wurde das mRNA Muster von transformierten C3H Mausfibroblasten untersucht. Der in diesem Experiment verwendete Zellklon wurde durch MCA erfolgreich transformiert, was durch Wachstum in Softagar bestätigt wurde. In den Gene Arrays ließ sich ein Trend in Richtung reduzierter Apoptoseinduktion erkennen. Außerdem erwies sich das Verhältnis von Positiv- und Negativregulatoren des Zellzyklus verschoben in Richtung vermehrter Zellproliferation.

## ZUSAMMENFASSUNG

---

P-Tyrosin scheint eine vielversprechende Substanz als Antikarzinogen für die spontane, chemikalien- und strahleninduzierte Zelltransformation darzustellen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.;  
Molekularbiologie der Zelle. VCH, 3. Auflage, 1995
- Bardelli, A., Cahill, D., Lederer, G., Speicher, M., Kinzler, K., Vogelstein, B.,  
Lengauer, C.; Carcinogen-specific induction of genetic instability. PNAS  
98: 5770-5775, 2001
- Billings, P.C., Carew, J.A., Keller-McGandy, C.E., Goldberg, A.L., Kennedy,  
A.R.; A serine protease activity in C3H 10T1/2 cells that is inhibited by  
anticarcinogenic protease inhibitors. Proc. Natl. Sci. USA 84: 4801-4805,  
1987
- Bluhm, H.H.; Untersuchungen zur potentiellen radioprotektiven Wirkung von  
GM-CSF auf periphere mononukleäre Zellen des hämatopoetischen  
Systems und auf die hämatopoetische Modellzelllinie HL-60.  
Dissertation, 1996
- Bowden, G.T., Jaffe, D., Andrews, K.; Biological and molecular aspects of  
radiation carcinogenesis in mouse skin. Radiation Res 121: 235-241,  
1990
- Brown, W.E., Ryan, C.A.; Isolation and characterization of a wound-induced  
trypsin inhibitor from alfalfa leaves. Biochemistry 23(15) : 3418-22, 1984
- Bump, E.A., Cerce, B.A., al-Sarraf, R., Pierce, S.M., Koch, C.J.; Radioprotection  
of DNS in isolated nuclei by naturally occurring thiols at intermediate  
oxygen tension. Radiat. Res. 132: 94-104, 1992
- Chan, G.L., Little, J.B.; Neoplastic transformation in vitro. Radiation  
Carcinogenesis. Upton AC; Albert, R.E.; Burns; F.J., Shore, R.E.; editors:  
New York: Elsevier, 1986. p 107-136
- Chen, A.C., Herschman, H.R.; Tumorigenic methylcholanthrene transformants  
of C3H/10T1/2 cells have a common nucleotide alteration in the c-Ki-ras  
gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(5) : 1608-11, 1989

- Coleman, W.B., Throneburg, D.B., Grisham, J.W., Smith, G.J.; Overexpression of c-K-ras, c-N-ras and transforming growth factor beta cosegregate with tumorigenicity in morphologically transformed C3H 10T1/2 cell lines. *Carcinogenesis* 15(5): 1005-12, 1994
- Correa, P.; Epidemiological correlations between diet and cancer frequency. *Cancer Res* 41(9 Pt 2 ): 3685-90, 1981
- Cox, R., Little, J.B.; *Oncogenic cell transformation in vitro*. Academic Press 15: 137-158, 1992
- Crompton, N.E., Shi, Y.Q., Wuergler, F., Blattmann, H.; A single low dose of X-rays induces high frequencies of genetic instability (aneuploidy) and heritable damage (apoptosis), dependent on cell type and p53 status. *Mutat Res.* 27;517(1-2 ) : 173-86, 2002
- Delschen, T. A., Hembrock-Heger, Necker; Systematische Untersuchungen zum Verhalten von PAK und PCB im System/Boden/Pflanze auf der Lysimeteranlage Waldfeucht (1989-1994). In *Lysimeterversuche zum Verhalten persistenter organischer Schadstoffe im System. Boden/Pflanze*, Bd. 13, 1996
- Dittmann, K.H., Löffler, H., Bamberg, M., Rodemann, H.P.; Bowman-Birk proeinase inhibitor (BBI) modulates radiosensitivity and radiation-induced differentiation of human fibroblasts in culture. *Radiother. Oncol.* 34: 137-143, 1995
- Dittmann, K.H., Gueven, N., Mayer, C., Ohnseit, P., Zell, R., Begg, A.C., Rodemann, H.P.; The presence of wild-type p53 is necessary for the radioprotective effect of the Bowman-Birk proteinase inhibitor in vitro. *Rad. Res.* 150: 648-655, 1998
- Dittmann, K.H., Gueven, N., Mayer, C., Rodemann, H.P.; The radioprotective effect of BBI is associated with the activation of DNS-repair relevant genes. *Int. J. Rad. Biol.* 74 : 225-230, 1998
- Dittmann, K.H., Dikomey, E., Mayer, C., Rodemann, H.P.; The Bowman-Birk protease inhibitor enhances clonogenic cell survival of ionizing radiation-treated nucleotide excision repair-competent cells but not of xeroderma pigmentosum cells. *Int J Radiat Biol.* 76(2): 223-9, 2000.

- Dittmann, K.H., Mayer, C., Rodemann, H.P.; O-phospho-L-tyrosine protects TP53 wild-type cells against ionizing radiation. *Int J Cancer* 96:1-6., 2001
- Dittmann, K.H., Gueven, N., Mayer, C., Rodemann, H.P.; Characterization of the amino acids essential for the photo- and radioprotective effects of a Bowman-Birk protease inhibitor-derived nonapeptide. *Protein Eng.* 14(3):157-60, 2001
- Donehower, LA., Harvey, M., Slagle, BL., McArthur, MJ., Montgomery, CA Jr., Butel, JS., Bradley, A.; Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* 356: 215-221, 1992
- Durbec, P., Marcos-Gutierrez, C.V., Kilkenny, C., Grigoriou, M., Wartiovaara, K., Suvanto, P., Smith, D., Ponder, B., Costantini, F., Saarma, M., Sariola, H. & Pachnis, V.; GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 381: 789-793, 1996
- Estgate, J., Moreb, J.M., Nick, H.S., Suzuki, K., Taniguchi, N., Zucali, J.R.; A role for manganese superoxide dismutase in radioprotection of hematopoietic stem cells by interleukin 1. *Blood* 81 : 639-646, 1993
- Felemovicius, I., Bonsack, M.E., Baptista, M.L., Delaney, J.P.; Intestinal radioprotection by vitamin E (alpha-tocopherol). *Ann. Surg.* 222: 504-508, 1995
- Fritz, T.A., Contois, D.F., Liu, Y.X., Watt, D.S., Walden, T.L.J.; Interactions of leukotriene C4 and Chinese hamster lung fibroblasts (V79A03). Charakterization of binding. *Prostaglandins* 40 : 417-429, 1990
- Ganten, D., Ruckpaul, K.; *Tumorerkrankungen*. Springer Verlag: 50-61, 1998
- Harapanhalli, R.S., Yaghmai, V., Giuliani, D., Howell, R.W., Rao, D.V.; Antioxidant effects of vitamin C in mice following x-irradiation. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 94 : 271-287, 1996
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., Harris, C.C.; Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54: 4855-4878, 1994

- Gressani, K.M., Leone-Kabler, S., O`Sullivan, M.G., Case, L.D. Strain-dependent lung tumor formation in mice transplacentally exposed to 3-methylcholanthrene and post-natally exposed to butylated hydroxytoluene. *Carcinogenesis* 20(11) : 2159-65, 1999
- Gueven, N.; Strahleninduzierte Signaltransduktion und die radioprotektive Aktivität des Bowman-Birk Protease Inhibitors. Dissertation zur Erlangung des Akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften an der Universität Konstanz, 1997
- Gueven, N., Dittmann, K., Mayer, C., Rodemann, H.P.; The radioprotective potential of the Bowman-Birk protease inhibitor is independent of its secondary structure. *Cancer Letters* 125: 77-82, 1998
- Gueven, N., Dittmann, K., Mayer, C., Rodemann, H.P.; Bowman-Birk protease inhibitor reduces the radiation-induced activation of the EGF receptor and induces tyrosine phosphatase activity. *Int J Radiat Biol.* 73(2) : 157-62, 1998
- Hartwell, L.H., Kastan, M.B.; Cell cycle control and cancer. *Science* 266 : 1821-1828, 1994
- Hill, C. K., Nagy, B., Peraino, C., Grdina, D.J.; 2-[(Aminopropyl)amino]ethanethiol (WR1065) is anti-neoplastic and anti-mutagenic when given during <sup>60</sup>Co gamma-ray irradiation. *Carcinogenesis* 7(4): 665-668
- Hollstein. M., Bartsch, H., Wesch, H., Kure, E.H., Mustonen, R., Muhlbauer, K.R., Spiethoff, A., Wegener, K., Wiethage, T., Muller, K.M.; p53 gene mutation analysis in tumors of patients exposed to  $\alpha$ -particles. *Carcinogenesis* 18: 511-516, 1997
- Hua, V.Y., Wang, W.K., Duesberg, P.H.; Dominant transformation by mutated human ras genes in vitro requires more than 100 times higher expression than is observed in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(18) : 9614-9, 1997
- Kennedy, A.R., Little, J.B.; Effects of protease inhibitors on radiation transformation in vitro. *Cancer Res.* 41: 2103-2108, 1981

- Kennedy, A.R., Radner, B.S., Nagasawa, H.; Protease inhibitors reduce the frequency of spontaneous chromosome abnormalities in cells from patients with Bloom syndrome. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* 81 : 1827-1830, 1984
- Kennedy, A.R., Szuhaj, B.F., Newberne, P.M., Billings, P.C.; Preparation and production of a cancer chemopreventive agent, Bowman-Birk inhibitor concentrate. *Nutr Cancer* 19(3) : 281-302, 1993
- Kennedy, A.R.; Prevention of carcinogenesis by protease inhibitors. *Cancer Res.* 54: 1999-2005, 1994
- Krolewski, B., Little, J.B.; Molecular analysis of DNS isolated from the different stages of x-ray-induced transformation in vitro. *Mol. Carcinogenesis* 2: 27-33, 1989
- Kruman II., Matylevich, NP., Beletsky, IP., Afanasyev, VN., Umansky, SR.; Apoptosis of murine BW 5147 thymoma cells induced by dexamethasone and  $\gamma$ -irradiation. *J. Cell Physiol.* 148 : 267-273, 1991
- Kuroki, T., Drevon, C.; Inhibition of chemical transformation in C3H/10T1/2 cells by protease inhibitors. *Cancer Res.* 39: 2755-2761. 1979
- Lane, DP.; Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358 : 15-16, 1992
- Lehane, M.M., Bryant, P.E. , Riches, A.C., Allen, L.A., Briscoe, C.V., Melville, J., Mill, A.J. ; alpha-particle-induced C3H10T1/2 transformants are less tumorigenic than the X-ray-induced equivalent. *<sup>238</sup>Pu, Carcinogenesis* 20(1) : 35-40, 1999
- Little, J.B.; Cellular, molecular, and carcinogenic effects of radiation. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 7: 337-352, 1993
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. *Molecular Cell Biology.* Freeman Verlag , 4.Auflage, 1999
- Lüllmann, H., Mohr, K.; *Pharmakologie und Toxikologie*, Thieme Verlag, 14. Auflage, 1999
- Lun, M., Wells, R.L., Lang, S., Chawapun, N., Elkind, M.M.; The neoplastic transformation of SCID cells by radiation. *Radiat Res.* 152(2): 180-9, 1999

- Malaker, K.; Clinical experience with radioprotectors. In Radioprotectors, ed. by E.A. Bump und K. Malaker, CRC-Press, London, 1998
- Michalowski, A.S.; On radiation damage to normal tissues and its treatment, II Anti-inflammatory drugs. *Acta Oncol.* 33: 139-157, 1994
- Mishra, S., Hamburger, A.W.; Exogenous phosphotyrosine modulates epidermal growth factor receptor tyrosine phosphorylation. *Carcinogenesis* 14(2): 269-73, 1993
- Mishra, S., Hamburger, A.W.; O-phospho-L-tyrosine inhibits cellular growth by activating protein tyrosine phosphatases. *Cancer Res.* 53(3): 557-63, 1993
- Murray, D.; Amino thiols. In Radioprotectors, ed. by E.A. Bump und K. Malaker, CRC-Press, London, 1998
- Murray, D., McBride, W.H.; Radioprotective agents, in Kirk-Othmer. *Encyclopedia of Chemical Technology*, 4<sup>th</sup> ed., Vol.20 (Chichester: John Wiley & Sons), pp. 963-1006
- Nowell, P.C.; The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23-28, 1976
- Pott, F., Heinrich, U.; Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe. In *Krebsrisiko durch Luftverunreinigungen - Materialienband II, Kapitel 9*, 1993
- Pschyrembel *Klinisches Wörterbuch*. Verlag Walter de Gruyter, 257. Auflage, 1994
- Rabes, H.M., Klugbauer, S.; Strahleninduzierte Schilddrüsenkarzinome bei Kindern: Hohe Prävalenz von RET-Rearrangements. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 81: 139-144, 1997
- Reznikoff, C.A., Brankow, D.W., Heidelberger, C.; Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res.* 33(12): 3231-8, 1973

- Reznikoff, C. A., Bertram, J., Brankow, D.W., Heidelberger, C.; Quantitative and qualitative studies of chemical transformation of cloned C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluent inhibition of cell division. *Cancer Research* 33: 3239-3249, 1973
- Roche Lexikon Medizin, 4.Auflage; © Urban & Fischer Verlag, München  
1984/1987/1993/1999
- Rodemann, H.P. Umweltstrahlung. Klett-Verlag, 2000
- Sanchez, Y., Elledge, S.J.; Stopped for repairs. *Bioassays* 17 : 545-548, 1995
- Sawant, S., Randers-Pehrson, G., Geard, C., Brenner, D., Hall, E.; The bystander effect in radiation oncogenesis: I. Transformation in C3H 10T1/2 cells in vitro can be initiated in the unirradiated neighbors of irradiated cells. *Radiation Research* 155: 397-401, 2001
- Sawant, S., Randers-Pehrson, G., Metting, N., Hall, E.; Adaptive response and the bystander effect induced by radiation in C3H 10T1/2 Cells in Culture. *Radiation Research* 156: 177-180, 2001
- Sawey, M.J., Hood, A.T., Burns, F.J., Garte, S.J; Activation of c-myc and c-K-ras oncogenes in primary rat tumors induced by ionizing radiation. *Mol. Cell Biol.* 7: 932-935, 1987
- Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., O'Connor, P.M., Fornace, A.J. Jr.; Involvement of p53 tumor suppressor in repair of UV-type DNA damage. *Oncogene* 10 : 1053-1059, 1995
- Sorrentino, V., McKinney, M.D., Drozdoff, V., Hume, C.R., Fleissner, E. ; Spontaneous or carcinogen-mediated amplification of a mutated ras gene promotes neoplastic transformation. *Oncogene Res.* 2(2): 189-95, 1988
- St.Clair, W.H., Billings, P.C., Carew, J.A., Keller-McGandy, C., Newberne, P., Kennedy, A.R.; Suppression of dimethylhydrazine-induced carcinogenesis in mice by dietary addition of Bowman-Birk Protease inhibitor. *Cancer Research* 50 : 580-586, 1990
- St.Clair, W.H.; Suppression of 3-methylcholanthrene-induced cellular transformation by timed administration of the Bowman-Birk protease inhibitor. *Carcinogenesis* 12 : 935-937, 1991

Strahlenschutz in Forschung und Praxis. Urban & Fischer Verlag. Band 42:

19-57, 2001

Syljuasen, R., Krolewski, B., Little, J.; Molecular events in radiation

transformation. Radiation Research 155 : 215-221, 2001

Tanaka, I., Ishihara, H.; Enhanced expression of the early retrotransposon in

C3H mouse-derived myeloid leukaemia cells. Virology 280 : 107-14,  
2001

TenHave-Opbroek, A.A., Shi, X.B., Gumerlock, P.H. 3-Methylcholanthrene

triggers the differentiation of alveolar tumor cells from canine bronchial  
basal cells and an altered p53 gene promotes their clonal expansion.  
Carcinogenesis 21(8) : 1477-84, 2000

Vassilandonopoulou, G., Panotopoulou, E., Fotiou, S., Tserkezoglou, A.,

Machera, E. Kottaridis, S.; Human papillomaviruses in cervical cancer I.  
HPV-16 and 18 predominate in the Greek population. Anticancer Res.  
17(1A) : 117-20, 1997

Vogelstein, B., Kinzler, K.W.; The multistep nature of cancer. Trends Genet

9(4) : 138-41, 1993

Wagener, C.; Molekulare Onkologie. Thieme Verlag, 2. Auflage; 1999

Wassermann, T.; Radioprotective effects of amifostine. Seminars in  
Oncology 26: 89-94, 1999

Yamada, T., Ohyama, H.; Radiation-induced interphase death of thymocytes is

internally programmed apoptosis. Int.J.Radiation.Biol. 53 : 65-75, 1988

Yavelow, J., Collins, M., Birk, Y., Troll, W., Kennedy, A.R.; Nanomolar

concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress x-  
ray-induced transformation in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 5395-  
5399, 1985

Zhao, W., Si, J., Li, K.; Human papillomavirus, human cytomegalovirus and p53

gene in cervical carcinoma. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 30(11) : 654-  
7,1995

## 7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>7.1 Abbildungen</b>		<b>Seitenangaben</b>
Abb. 1	Dreistufenmodell der Onkogenese	9
Abb. 2	Behandlungsbeispiel: BBI +IR	27
Abb. 3	Transformierte Zellen in DMEM+10%FCS, mikroskopische Darstellung; 25x Vergrößerung	36
Abb. 4	Ausschnittsvergrößerung aus dem Randbereich eines Focus in DMEM+10% FCS; 100x Vergrößerung	37
Abb. 5-11	Mikroskopisches Erscheinungsbild von in Softagar gegossenen HH4-Zellen (Basisagar 0,6%, obere Agarschicht 0,3%); 25x Vergrößerung	38-40
Abb. 12	Softagarwachstum eines MCA induzierten Zellklones; 25x Vergrößerung	42
Abb. 13	Proliferationskinetik normaler C3H Fibroblasten nach Präinkubation bzw. ohne Präinkubation mit BBI (10 µM) und nachfolgender Bestrahlung mit 4 Gy, (n=1), Gesamtdosis 40 Gy	46
Abb. 14	Proliferationskinetik normaler Fibroblasten nach Präinkubation bzw. ohne Präinkubation mit Phospho-Tyrosin (10 µM) und nachfolgender Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 4Gy (fraktionierte Behandlung)	47
Abb. 15	Proliferationskinetik normaler Fibroblasten nach Präinkubation bzw. ohne Präinkubation mit Phospho-Tyrosin (10 µM) und nachfolgender Behandlung mit MCA (2 µg/ml)	49
Abb. 16	Klonogenes Überleben normaler C3H Fibroblasten nach fraktionierter Behandlung	51

## ANHANG

---

Abb. 17	Klonogenes Überleben normaler C3H Fibroblasten nach zehnmaliger fraktionierter Bestrahlung +/- BBI in Abhängigkeit von der Passage	52
Abb. 18	Klonogenes Überleben normaler C3H Fibroblasten nach zehnmaliger fraktionierter Behandlung mit IR +/- P-Tyrosin in Abhängigkeit von der Passage	53
Abb. 19	Klonogenes Überleben normaler C3H Fibroblasten nach zehnmaliger fraktionierter MCA-Applikation +/- P-Tyrosin	54
Abb. 20	Neutralrotmethode	56
Abb. 21	Kristallviolett-Vitalitätstest	58
Abb. 22	Trypanblau Färbung	59
Abb. 23	Graphische Darstellung des Transformations-Versuches (Balkendiagramm)	63
Abb. 24	Kumulative Focianzahl in Abhängigkeit von der Passage und Behandlungsart (Kontrolle, BBI, P-Tyrosin)	64
Abb. 25	Kumulative Focianzahl in Abhängigkeit von der Passage und der Behandlungsart (IR +/- BBI bzw. P-Tyrosin)	65
Abb. 26	Kumulative Focianzahl in Abhängigkeit von der Passage und der Behandlungsart (MCA +/- P-Tyrosin)	66
Abb. 27	Quantitative Auswertung des Transformations-Versuches (Transformationsfrequenz als Balkendiagramm)	74
Abb. 28	Cell Cycle Array	77
Abb. 29	Pathwayfinder Array	80

<b>7.2 Tabellen</b>	<b>Seitenangaben</b>
Tab. 1	Test auf Softagarwachstum <span style="float: right;">40</span>
Tab. 2	Populationskinetik von C3H 10 T1/2 nach unterschiedlicher Behandlung <span style="float: right;">45</span>
Tab. 3	Neutralrot-Vitalitätstest <span style="float: right;">55</span>
Tab. 4	Kristallviolett-Vitalitätstest <span style="float: right;">57</span>
Tab. 5	Trypanblau-Färbung <span style="float: right;">59</span>
Tab. 6	Quantitative Auswertung des Transformations- versuches <span style="float: right;">62</span>
Tab. 7	Ergebnisse des 1. Transformationsexperimentes <span style="float: right;">69</span>
Tab. 8	Ergebnisse des 2. Transformationsexperimentes <span style="float: right;">70</span>
Tab. 9	Ergebnisse des 3. Transformationsexperimentes <span style="float: right;">71</span>
Tab. 10	Transformationsfrequenzen der drei Versuchs- reihen im Überblick <span style="float: right;">72</span>
Tab. 11	Veranschaulichung der Transformationsfrequenz <span style="float: right;">73</span>

## 8. Abkürzungen

BBI	Bowman Birk Protease Inhibitor
C3H	Mausfibroblasten der Zelllinie C3H 10T1/2
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecos modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	“epidermal growth factor”
EGFR	“epidermal growth factor receptor”
ELISA	“enzyme linked immunosorbent assay”
FCS	“fetal calf serum”
Fos	Onkogen aus dem FB-Mäuse-Osteosarkoma-Virus
g	Gramm oder Zentrifugalbeschleunigung
Gadd 45	„growth arrest and DNS damage inducible protein 45 kda“
Gy	Gray
h	Stunde
IL	Interleukin
IR	ionisierende Strahlung
Jun	Abk. vom japanischen “ju-nana”=17; Onkogen
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
M	molar
MDM2	„mouse double minute 2“; TP53-bindendes Protein
MCA	3-Methylcholanthren
min	Minute
ml	Milliliter
Myc	„myelocytomatosis oncogene“
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PTK	Tyrosinkinase
P-Tyr	O-Phospho-L-Tyosin
RB	“retinoblastoma”
rpm	Umdrehungen pro Minute

## ANHANG

---

s	Sekunde
TNF	„tumor necrosis factor“
Tp53	“tumo suppresso protein 53 kda”
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt

## Lebenslauf

12. Mai 1977	geboren in Lemgo, Kreis Lippe
1983-1987	Besuch der Grundschule Süd in Lemgo
1987-1993	Besuch der Bürgermeister-Gräfer Realschule in Lemgo
1993-1996	Besuch des Engelbert-Kämpfer Gymnasiums in Lemgo
6. Juni 1996	Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife
Oktober 1996	Aufnahme des Studiums der Biologie an der Universität Tübingen
Oktober 1997 bis Februar 1998	Wissenschaftliche Hilfskraft im Botanik-Kurs für Diplombiologen, Tutorin
Februar 1998 bis Juli 1998	Wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgruppe für Pflanzenphysiologie (Prof. Frommer)
Juli 1998	Erlangen des Vordiploms im Fach Biologie an der Universität Tübingen
Oktober 1998	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Universität Tübingen
März 2000	„Ärztliche Vorprüfung“

## ANHANG

---

August 2000	Famulatur im Bereich „Family Medicine“ unter Anleitung von MD T. Arndt an der Universität Toronto, Kanada
März 2001	„Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung“
April 2001 bis April 2002	Promotionsarbeit in der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Abteilung Radioonkologie, Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. H. P. Rodemann und PD Dr. K. Dittmann, unterstützt vom DFG-Graduiertenkolleg „Mechanismen der Entstehung solider Tumoren und Entwicklung experimenteller Therapiekonzepte“
April 2002	Aufnahme des Studiums des zweiten klinischen Abschnitts der Humanmedizin
März 2003	Famulatur im Fachbereich Pädiatrie im Klinikum Lippe Detmold
April 2003	Famulatur im Fachbereich Gynäkologie im Unstrut-Hainich Krankenhaus Mühlhausen, Thüringen
April 2004	„Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung“
April 2004 bis März 2005	Absolvierung des „Praktischen Jahres“ im Mayo General Hospital in Castlebar / Irland, Kantonsspital Bruderholz / Schweiz und Olgahospital / Stuttgart
Mai 2005	„Dritter Ärztlicher Abschnitt der Ärztlichen Prüfung“
Tübingen, den 08.06.05	

## 10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. H. P. Rodemann für die Unterstützung und Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit und für sein Interesse an den Fortschritten meiner Experimente. Er ermöglichte mir, meine Ergebnisse auf Tagungen zu präsentieren, gab Anregungen für Vorträge und zeigte Einsatz beim Graduiertenkolleg.

Ganz herzlich möchte ich mich bei PD K. Dittmann und C. Mayer für das kollegiale Verhältnis, die Hilfsbereitschaft, die produktiven Diskussionen und ihren Humor bedanken. Die Stimmung in unserer Arbeitsgruppe war äußerst angenehm. Besonders hervorheben möchte ich das Engagement von PD Klaus Dittmann im Graduiertenkolleg 686. Für seine Unterstützung bei der Planung und Umsetzung meiner Dissertation, für seine Hilfsbereitschaft und sein positives Denken danke ich ihm.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Sektion Strahlenbiologie bedanken, die zu dem Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben sowie der DFG zur Förderung dieses Projektes im Rahmen des Graduiertenkollegs 686.

Weiterhin danke ich mich bei meinen Eltern sowie meiner Schwester, Dr. K. Diete, T. Drabant, A. Dittes, S. Tank, B. Klein, A. Merkle, und K. Rückert.

Bei M. Arndt bedanke ich mich ganz besonders für seine pragmatische Unterstützung, seine Geduld und seine humorvolle Motivation.

Ferner bedanke ich mich bei allen, deren Namen nicht explizit genannt wurden, die aber dennoch zum Gelingen beigetragen haben.