

**Untersuchungen zur chemischen Transformation
von intestinalen Epithelzellen der Ratte
und des Menschen durch
2-Hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo (4,5-*b*)
pyridin**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin Ernährungstoxikologie**

**eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam**

**von
Iris Judith Fuchs**

Tag der Disputation: 12. Dezember 2006

Die interessantesten Fragen bleiben immer Fragen. Sie bergen ein Geheimnis. Jeder Antwort muß man ein „vielleicht“ hinzufügen. Nur uninteressante Fragen haben eine endgültige Antwort.

Eric-Emmanuel Schmitt

Meinen Eltern gewidmet

DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation entstand am Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam im Arbeitskreis von Herrn Professor Dr. rer. nat. Pablo Steinberg.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Steinberg für die Überlassung des Dissertationsthemas zur selbstständigen Bearbeitung, die zahlreichen wertvollen Ratschläge und Anregungen im Verlauf dieser Arbeit sowie für die Förderung meiner toxikologischen Weiterbildung.

Für die freundliche Übernahme der gutachterlichen Tätigkeit bedanke ich mich sehr herzlich bei allen Gutachtern.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Monika Haseloff und Frau Ingrid Zschaler für die freundliche und familiäre Atmosphäre bedanken. Allen anderen Mitarbeitern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Steinberg danke ich für das immerwährend offene, kollegiale und entspannte Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Wera Teubner für das in mich gesetzte Vertrauen, ihr immerwährendes Interesse und die vielen kritischen Hinweise während dieser Zeit.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, mich an dieser Stelle besonders bei Frau Dr. Heli Hollnagel (DIfE, Abteilung Ernährungstoxikologie) für die HPLC-Untersuchungen und die Durchführung der Postlabelling-Untersuchung zu bedanken.

Herrn Privatdozenten Dr. Frank Neuschäfer-Rube (Universität Potsdam, IEW, Abteilung Biochemie und Pathobiochemie der Ernährung) danke ich für die Durchführung der Sequenzierungsuntersuchungen sehr herzlich.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei den Wissenschaftlern des Nestlé Research Centre Lausanne für die Überlassung der patentierten humanen Kolonepithelzelllinie HCEC.

Der deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) sei gedankt, die dieses Projekt gefördert hat.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir das Studium der Lebensmittelchemie ermöglicht haben und dadurch die Voraussetzung schufen, dass diese Arbeit entstehen konnte. Sie haben mich stets unterstützt und bestärkt.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	2-AMINO-1-METHYL-6-PHENYLIMIDAZO[4,5-B]PYRIDIN (PHIP)	1
1.2	GENETISCHE VERÄNDERUNGEN WÄHREND DER KOLONKANZEROGENESE	6
1.3	TRANSFORMATION VON ZELLEN	10
1.4	APC UND β -CATENIN IM WNT-SIGNALWEG	11
1.5	RAS-SIGNALWEGE	15
1.6	AKTIVITÄT UND REGULATION DER STABILITÄT VON P53	16
1.7	IEC-18 UND HCEC ALS ZELLKULTURMODELL	19
2	AUFGABENSTELLUNG	20
3	MATERIAL UND METHODEN	21
3.1	MATERIAL	21
3.1.1	<i>Geräte</i>	21
3.1.2	<i>Verbrauchsmaterial</i>	22
3.1.3	<i>Chemikalien, Reagenzien, Lösungen und Puffer</i>	22
3.1.4	<i>Feinchemikalien, Reagenzien und Enzyme</i>	22
3.1.5	<i>Lösungen und Puffer</i>	24
3.1.5.1	Zellkultur	24
3.1.5.2	Bakterienkultur	28
3.1.5.3	Immunfärbung	28
3.1.5.4	GST-Bestimmung	28
3.1.5.5	Agarose-Gelelektrophorese	28
3.1.5.6	Herstellung von Zellhomogenat	29
3.1.5.7	SDS-PAGE	29
3.1.5.8	Western-Blotting	30
3.1.5.9	Immunochemische Detektion	30
3.1.6	<i>Enzyme, Plasmide, Oligonukleotide und Antikörper</i>	30
3.1.7	<i>Biologisches Material</i>	32

3.2	METHODEN	33
3.2.1	<i>Zellbiologische Methoden</i>	33
3.2.1.1	Kultivierung von Zellen	33
3.2.1.2	Subkultivierung der Zellen	34
3.2.1.3	Ermittlung der Zellzahl mit einem elektronischen Zählgerät („CASY“)	35
3.2.1.4	Kryokonservierung von Zellen	35
3.2.1.5	Rekultivierung kryokonservierter Zellen	36
3.2.1.6	Selektieren von Phoenix Zellen	36
3.2.1.7	Behandlung von Zellen mit N ² -OH-PhIP	37
3.2.1.8	Ermittlung von Wachstumskurven	39
3.2.1.9	Bestimmung der akuten Toxizität mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenol-tetrazoliumbromid (MTT)	39
3.2.1.10	Transfektion von IEC-18 Zellen	40
3.2.1.11	Isolierung der Plasmide von Filterpapier (Lewinsky-Methode)	43
3.2.1.12	Restriktion von Plasmiden und PCR-Produkten	44
3.2.1.13	Herstellen von konditioniertem Kulturmedium	44
3.2.1.14	Wachstum im Softagar	44
3.2.1.15	Isolierung selektierter Zellklone und Anzucht unter Selektionsdruck	45
3.2.1.16	Immunzytochemischer Nachweis (Immunfärbung) in HCEC-Zellen	45
3.2.2	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	46
3.2.2.1	Herstellung von Zellhomogenat	46
3.2.2.2	Präparation subzellulärer Fraktionen mittels Ultrazentrifugation	47
3.2.2.3	Proteinbestimmung mit der Methode nach Bradford	47
3.2.2.4	Ermittlung der GST-Aktivität im Zytosol von Zellen	47
3.2.2.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
3.2.2.6	Western Blotting	49
3.2.2.7	Immunochemische Detektion	50
3.2.3	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	50
3.2.3.1	Kultivierung von Bakterien	50
3.2.3.2	Anlegen von Bakterienstammkulturen	50
3.2.3.3	Transformation von Bakterien	51

3.2.3.4	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren _____	51
3.2.3.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren_	52
3.2.3.6	DNA-Aufbereitung mittels Präzipitation _____	52
3.2.3.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) _____	52
3.2.3.8	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) zum Nachweis von GST-T2 _____	55
3.2.3.9	Agarose-Gelelektrophorese _____	57
3.2.3.10	Postlabelling _____	57
3.2.3.11	Sequenzierung _____	57
3.2.4	<i>In vivo Methoden</i> _____	58
3.2.4.1	Untersuchungen zur Tumorigenität von in vitro chemisch transformierten Human-Darmepithelzellen _____	58
3.2.5	<i>Histologische und Immunohistochemische Untersuchungen</i> _____	58
4	ERGEBNISSE _____	59
4.1	EXPRESSION RELEVANTER ENZYME DES PHIP-METABOLISMUS IN IEC-18 UND HCEC ZELLEN _____	59
4.1.1	<i>Immundetektion</i> _____	59
4.2	BEHANDLUNG VON IEC-18-ZELLEN MIT N ² -OH-PHIP _____	62
4.3	NACHWEIS VON DNA-ADDUKTEN NACH N ² -OH-PHIP-BEHANDLUNG _____	64
4.4	RESISTENZ VON IEC-18-ZELLEN GEGENÜBER N ² -OH-PHIP _____	64
4.4.1	<i>Nachweis der Resistenz von IEC-18-Zellen gegenüber N²-OH-PhIP</i> _____	64
4.4.2	<i>Nachweis der Induktion von Glutathion-S-Transferasen in IEC-18-Zellen</i> _____	69
4.4.3	<i>Nachweis der Expression von GST-T2</i> _____	74
4.4.4	<i>Quantifizierung der Expression von GST-T2 mittels semiquantitativer RT-PCR</i> _____	76
4.5	TRANSFEKTIONEN DER IEC-18-ZELLINIE _____	78
4.5.1	<i>Etablierung einer hSULT 1A1 exprimierenden IEC-18-Zelllinie</i> _____	78
4.5.2	<i>Transfektion von IEC-18-Zellen mit β-Catenin</i> _____	79
4.5.3	<i>Transfektion von IEC-18-pcMV-hum-p53 MT mit β-Catenin</i> _____	80
4.5.4	<i>Behandlung der Transfektanten mit N²-OH-PhIP</i> _____	81
4.6	WACHSTUMSVERHALTEN UND TUMORIGENITÄT DER PARENTALEN UND TRANSFIZIERTEN IEC-18-ZELLEN NACH N ² -OH-PHIP-BEHANDLUNG IN VITRO _____	83
4.6.1	<i>Wachstumsverhalten der parentalen und transfizierten IEC-18-Zellen nach N²-OH-PhIP-Behandlung</i> _____	83

4.6.2	<i>Tumorigenes Potential der N²-OH-PhIP behandelten IEC-18-Zellen in vitro</i>	87
4.7	WACHSTUMSVERHALTEN UND TUMORIGENITÄT DER HCEC-ZELLEN NACH N ² -OH-PHIP-BEHANDLUNG	88
4.7.1	<i>Transformation der HCEC-Zellen nach fünf Behandlungszyklen mit N²-OH-PhIP</i>	88
4.7.2	<i>Wachstumsverhalten der HCEC-Zellen nach N²-OH-PhIP-Behandlung</i>	89
4.7.3	<i>Immunchemische Detektion von APC-Protein in HCEC-Zellen</i>	90
4.7.4	<i>Tumorigenes Potential der transformierten HCEC-Zellen in vivo</i>	91
5	DISKUSSION	92
6	ZUSAMMENFASSUNG	102
7	SUMMARY	103
8	LITERATURVERZEICHNIS	104
9	ANHANG	127

1 Einleitung

1.1 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhIP)

Entstehung und Vorkommen

Bei der Zubereitung proteinreicher Lebensmittel entstehen an der Oberfläche neben Farb- und Aromastoffen auch toxische heterozyklische aromatische Amine (HAA). Durch Pyrolyse von Proteinen werden verschiedene Carbolin-Derivate gebildet, die sich als mutagen und im Tierversuch als kanzerogen erwiesen. Aus Kreatinin, Aminosäuren und Kohlenhydraten entstehen während der Maillard-Reaktion bereits bei Temperaturen um 100 °C Aminoimidazoverbindungen, wie Derivate von Chinolin, Chinoxalin oder Pyridin (Manabe et al. 1992, Skog et al. 1998).

Zu den bekanntesten Vertretern dieser Stoffgruppe zählen neben 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhIP) weiterhin 3,8-Dimethyl-3H-imidazo[4,5-f]chinoxalin-2-amin (MeIQx), 3,4,8-Trimethyl-3H-imidazo[4,5-f]chinoxalin-2-amin (DiMeIQx) und 3-Methyl-3H-imidazo[4,5-f]chinolin-2-amin (IQ) (Sugimura 1997) (Strukturformeln siehe Anhang Abbildung A1).

Die Konzentration der heterozyklischen aromatischen Amine ist abhängig von der Temperatur sowie von Dauer und Art der Zubereitung (Lang et al. 1994). In scharf gegrilltem Fleisch oder Fisch sind daher bis zu 0,7 ppm dieser Stoffe zu finden. Die mit der Nahrung aufgenommene Dosis an HAA hängt von den Ernährungsgewohnheiten ab, die mittlere täglich aufgenommene Dosis wird auf etwa 7 ng beim Erwachsenen und 11 ng bei Kindern pro Kilogramm Körpergewicht geschätzt.

Die höchsten Gehalte an PhIP, dem am häufigsten und in größter Menge vorkommenden Vertreter der HAA, wurden in gegrilltem Hühnerfleisch (bis 480 ng/g) und Brathuhn (bis 226ng/g) gefunden (Sinha et al. 1995, Holder et al. 1997), jedoch zählen auch Tabakrauchkondensat, Wein und Bier zu den Expositionsquellen für PhIP (Manabe et al. 1993, Nagao and Sugimura 2000). Der Nachweis der humanen Belastung kann über die Bestimmung der heterozyklischen aromatischen Amine und ihrer Metaboliten im Urin sowie von Albumin- und DNA-Addukten geführt werden (Kulp et al. 2000, Pfau 2000).

Metabolismus und Bioaktivierung

Wie alle heterozyklischen aromatischen Amine erhält PhIP erst durch seine metabolische Aktivierung sein genotoxisches Potential (Turesky et al. 1991). Als risikoreichste Metabolite werden 2-Hydroxyamino-PhIP (N^2 -OH-PhIP) und seine Acetat- und Sulfoxyester betrachtet (Buonarati et al. 1990, Buoranati and Felton et al. 1990, Wallin et al. 1990).

Die Metabolisierung von PhIP verläuft in zwei Schritten. Der initiale Oxidationsschritt erfolgt durch verschiedene Cytochrome P450, während an der Veresterung in Phase II UDP-Glucuronosyltransferasen, Glutathion-S-Transferasen, N-Acetyltransferasen und Sulfotransferasen beteiligt sind. Abbildung 1 zeigt die Angriffspunkte bei PhIP, N^2 -OH-PhIP sowie C^4 -OH-PhIP für die verschiedenen Enzyme des Fremdstoffmetabolismus. Die Strukturformeln einiger Reaktionsprodukte sind im Anhang in Abbildung A2 aufgeführt.

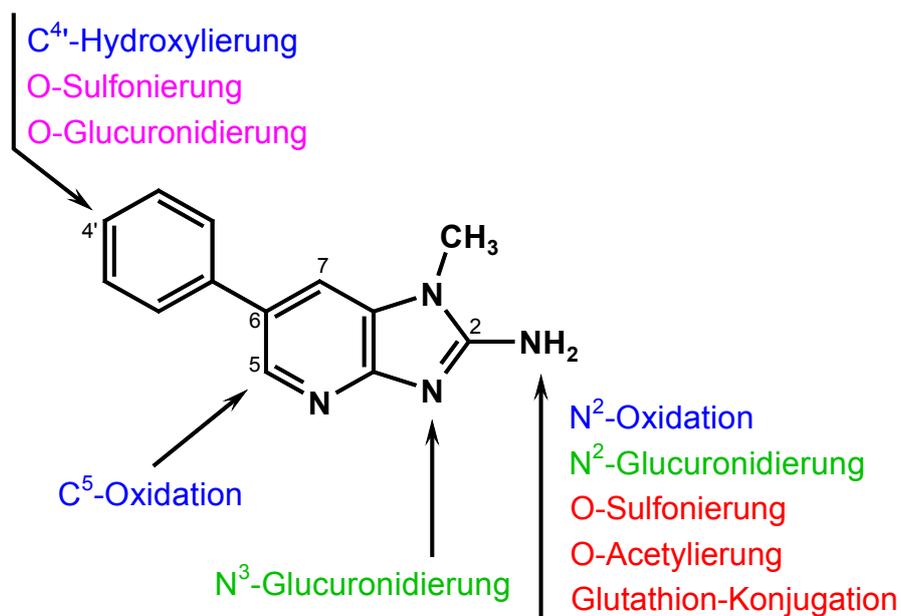


Abb. 1 Angriffspunkte und Reaktionen verschiedener Enzyme mit **PhIP**, **N^2 -OH-PhIP**, **C^4 -OH-PhIP** oder an **PhIP** und **N^2 -OH-PhIP**

In der Phase I erfolgt bevorzugt durch Katalyse von CYP 1A2 die Oxidation der exozyklischen Aminogruppe von PhIP zu N²-OH-PhIP. Diese Oxidation findet sowohl beim Menschen (Lin et al. 1994, Malfatti et al. 1999, Kulp et al. 2000) als auch bei der Ratte hauptsächlich in der Leber statt, wo die Aktivität von CYP 1A2 am höchsten ist (Shimada et al. 1994, Turesky et al. 1998 und 1991, Turteltaub et al. 1995, Mc Manus et al. 1989).

CYP 1A1 und CYP 1B1 werden in extrahepatischen Organen wie zum Beispiel dem Dünndarm, Kolon oder Rektum exprimiert und sind ebenfalls in der Lage, PhIP durch N-Hydroxylierung zu aktivieren (Mercurio et al. 1995, Zhang et al. 1997). Aus in vitro Studien mit der mikrosomalen Fraktion von Lebergewebe verschiedener Spezies ist bekannt, dass die Oxidation von PhIP zu drei Reaktionsprodukten führt: N²-OH-PhIP, 4'-OH-PhIP und 5-OH-PhIP (Crofts et al. 1997). 4'-OH-PhIP, das Produkt der Oxidation durch CYP 1A1 und CYP 1B1, ist vornehmlich als Detoxifizierungsprodukt bei Mäusen und Ratten von Bedeutung.

In der Phase II der Metabolisierung von PhIP fungiert die N-Glucuronidierung, katalysiert von UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs), als Hauptweg der Detoxifizierung und führt somit zur Ausscheidung des Glucuronids von N²-OH-PhIP. Frühere Modelle (Kaderlik 1994 a) der PhIP-induzierten Karzinogenese postulierten für die Tumorentstehung in extrahepatischen Organen eine Glucuronidierung der Aminogruppe von N²-OH-PhIP an Position 2 oder 3 unter Bildung stabiler Reaktionsprodukte und biliärem Transport in den Kolon. Es wurde vermutet, dass N²-OH-PhIP-N²-Glucuronid durch β -Glucuronidasen zu N²-OH-PhIP umgewandelt und für die Resorption und Aktivierung zum reaktiven Metaboliten zur Verfügung steht.

Neuere Untersuchungen belegen jedoch die Hypothese, dass reaktive PhIP-Metabolite über die Blutbahn zu extrahepatischen Geweben gelangen (Kaderlik et al. 1994 b), wo sie dann DNA-Addukte bilden (Takayama et al. 1989). Nach intravenöser oder oraler Gabe von PhIP und dem Abklemmen des Gallenganges wurde die Bildung von Kolon-, Pankreas-, Herz-, Lungen- und Lebertumoren beobachtet (Kaderlik et al. 1994 a). Ein Transport von N²-OH-PhIP über die Blutbahn ist um so wahrscheinlicher, da die Resistenz des vorrangig gebildeten N²-OH-PhIP-N²-Glucuronids gegenüber β -Glucuronidase und saurer Hydrolyse in Studien nachgewiesen werden konnte (Kaderlik et al. 1994 a). N²-OH-PhIP-N²-Glucuronid ist der humane Hauptmetabolit und wird daher als Biomarker zur Messung der PhIP-Exposition verwendet, bei der Ratte überwiegt PhIP-4'-Sulfat (Malfatti et al. 1999).

Durch Acetylierung und Sulfatierung kann N²-OH-PhIP in der Phase II der Biotransformation zu sehr instabilen, hochreaktiven Veresterungsprodukten umgewandelt werden. Sowohl die O-Sulfonierung als auch die O-Acetylierung finden in Leber und Kolon statt (Turesky et al. 1991, Chou et al. 1995 a). Die Acetyl-Coenzym A-abhängige O-Acetylierung, katalysiert von N-Acetyltransferasen (NAT), führt zum Beispiel zu dem sehr reaktionsfreudigen N-Acetoxy-PhIP. Es kann mit reduziertem Glutathion Konjugate bilden, die spontan zu 5-OH-PhIP zerfallen und schließlich mit dem Urin ausgeschieden werden. 5-OH-PhIP wird ebenfalls als Biomarker zur Messung der PhIP-Exposition beim Menschen herangezogen (Reistad et al. 1994, Frandsen and Alexander 2000).

Weiterhin kann N-Acetoxy-PhIP direkt zu hochreaktiven elektrophilen Nitreniumionen zerfallen, die in der Lage sind, kovalent an die C8-Position des Guanins der DNA zu binden, DNA-Addukte zu bilden und zur Tumorentstehung zu führen (Shut and Snyderwine 1999, Buonarati et al. 1990, Turteltaub et al. 1995). Nitreniumionen reagieren mit Desoxyguanosin zu dem am häufigsten detektierten PhIP-DNA-Addukt, dem N-(2-desoxyguanosin-8-yl)-3'-monophosphat-PhIP.

Bei Säugern sind zwei verwandte Formen der N-Acetyltransferasen bekannt, die als NAT 1 und NAT 2 bezeichnet werden und bisher als entscheidend bei der Metabolisierung von N²-OH-PhIP angesehen wurden. Neuere Studien ergaben, dass beim Menschen insbesondere die O-Sulfonierung durch Sulfotransferasen eine entscheidende Rolle bei der Metabolisierung von N²-OH-PhIP spielt (Muckel et al. 2002). Die PAPS-abhängige Aktivierung von N²-OH-PhIP durch die humanen Sulfotransferasen 1A1 und 1A2 ist fünf mal größer als die von der aus Ratten stammende Sulfotransferase 1C1 (Ozawa et al 1994 and 1995) und führt über die Bildung von N-Sulfonyloxy-Derivaten ebenfalls zu DNA-Adduktbildung (Chou et al 1995 a und b, Ozawa et al. 1994).

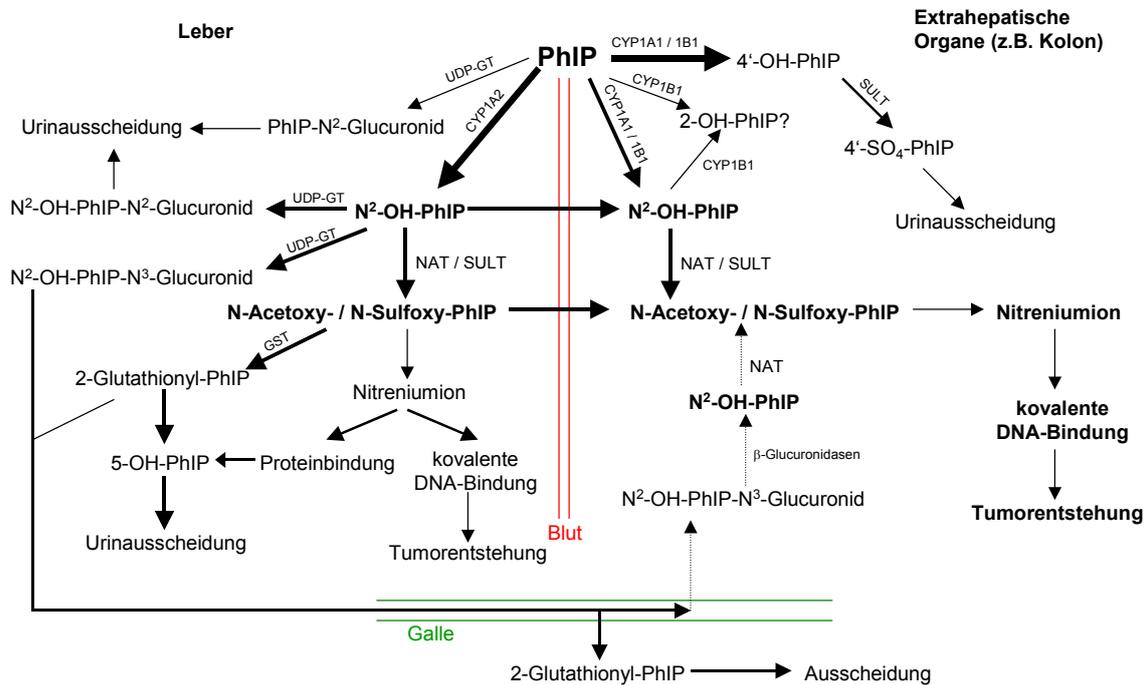


Abb. 2 Vermuteter Metabolismus von PhIP, modifiziert nach Angaben von Kaderlik (1994 b), Malfatti (1996), Frandsen and Alexander (2000)

Mutagenität und Kanzerogenität im Tierversuch und beim Menschen

In weiblichen Ratten erzeugt PhIP bevorzugt Mammakarzinome, bei männlichen Ratten Kolonkrebs (Ito et al. 1991, Schut and Snyderwine 1999). Männliche Ratten, denen PhIP mit der Nahrung verabreicht wurde, wiesen einen hohen Adduktspiegel im Kolon auf (Schut and Dashwood 1995). In Kolontumoren von Ratten wurden Mutationen im *APC*-Gen gefunden, so dass vermutet wird, dass PhIP an der Induktion der Kolonkanzerogenese beteiligt ist (Kakiuchi et al. 1995). Außerdem wurden in PhIP-induzierten Kolontumoren von Ratten zwei Mutationen entdeckt, die direkten Einfluß auf die Phosphorylierungsstellen der GSK-3 β -Konsensus-Sequenz des β -Catenin-Gen haben. In beiden Fällen führt eine C \rightarrow G Missense-Mutation zu einem Austausch von Serin zu Cystein (Dashwood et al. 1998).

Aufgrund der kanzerogenen Wirkung in Tiermodellen (Adamson et al. 1990; Shirai et al. 1995) wurden epidemiologische Studien über den Zusammenhang zwischen der alimentären HAA-Aufnahme und dem Kolonkrebsrisiko durchgeführt. Während in einigen dieser Studien Zusammenhänge zu verschiedenen Tumorarten gefunden wurden (Sinha et al. 2000 a und b, Sinha et al. 2001, De Stefani et al. 1997 a, b, De Stefani et al. 1998 a, b), war dies in anderen Studien nicht nachweisbar (Norrish et al. 1999; Delfino et al 2000; Augstsson et al. 1999; Lyon et al. 1988).

1.2 Genetische Veränderungen während der Kolonkanzerogenese

Der sporadische Tumor des Dick- und Mastdarms ist nach Lungenkrebs bei Männern und Brustkrebs bei Frauen unabhängig vom Geschlecht die zweithäufigste Krebsform in den westlichen Industrienationen. Über 10 % der Krebsmortalität werden durch Kolorektalkarzinome (KRK) bedingt (Ahlquist et al. 2000). In Deutschland wird die Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr für Männer auf über 27.000, für Frauen auf etwa 30.000 geschätzt. Die Inzidenz steigt in Abhängigkeit vom Alter logarithmisch an. Insbesondere bei jüngeren Patienten und bei familiären Tumorhäufungen besteht der Verdacht auf eine autosomal-dominant hereditäre Form des KRK (Hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinome [HNPCC], Familiäre adenomatöse Polyposis coli [FAP], Peutz-Jeghers-Syndrom [PJS], Juvenile Poliposis coli [JPC]). Bis zu 10 % der KRK sind einer im engeren Sinne hereditären, autosomal-dominant erblichen Form zuzuordnen (Ganten und Ruckpaul 2001). Die häufigste erbliche Erkrankungsform unter den KRK sind die HNPCC, die auf Mutationen im DNA-Reparatursystem basieren (Anwar et al. 2000; Peltomaki et al. 2001). Das Risiko für die Entwicklung eines KRK ist bei einer Colitis ulcerosa deutlich, bei Morbus Crohn nicht signifikant erhöht (Askling et al. 2001, Tanaka et al. 2000). Etwa 85-90 % aller KRK sind den sporadischen kolorektalen Karzinomen zuzuordnen, für die eine multifaktorielle Genese anzunehmen ist (Lichtenstein et al. 2000).

Die Kolonkanzerogenese ist ein Mehrstufen-Prozess, bei der man die Tumorprogression *in vivo* als Abfolge sichtbarer Strukturveränderungen nachvollziehen und diese mit bestimmten molekularen Vorgängen in Verbindung bringen kann. Für die Bildung eines malignen Tumors werden multiple somatische Mutationen in vier bis fünf Genen als notwendig angenommen (Fearon and Vogelstein 1990). Dies wird durch die Tatsache untermauert, dass die meisten spontanen Tumoren bei Menschen im fortgeschrittenen Lebensalter auftreten (Vogelstein and Kinzler 1993).

Die Entwicklung histopathologisch erkennbarer vereinzelter Kryptenläsionen (aberrante Kryptenherde = aberrant crypt foci) über die Stufe benigner Tumore bis zum malignen Tumor (Karzinom) resultiert aus einer Folge genetischer Veränderungen, die die Aktivierung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen beinhaltet (Fearon and Vogelstein 1990, Kinzler and Vogelstein 2002, Kinzler and Vogelstein 1996); dabei hat sich die Mutationsfolge als kritisch herausgestellt.

Die Initiation des Prozesses erfolgt vermutlich durch eine genetische Veränderung im *APC*-Gen, wodurch der adenomatöse Zustand initiiert wird und der im klonalen Wachstum einer Zelle resultiert. Siebzig Prozent aller KRK weisen Mutationen im *APC*-Gen auf. Eine derart hohe Mutationsrate eines an der Tumorigenese beteiligten Genes ist einzigartig (Chung 2000). Ausgehend von initialen Mutationen resultiert ein kleiner Polyp, der meist über Jahre symptomlos und unentdeckt bleibt. Im Mehrstufenprozess der Kanzerogenese wird die Akquisition weiterer genetischer Alterationen als Stadium der Progression bezeichnet, das häufig eng mit Mutationen im *K-ras*-Onkogen assoziiert ist und durch Überwucherung der Schwesterzellen in einer Vergrößerung der Tumormasse resultiert. Weitere Mutationen, insbesondere in den Tumorsuppressorgenen auf Chromosom 18q und im *p53*-Gen, führen zu klonaler Expansion. Eine ausreichende Anzahl an Mutationen befähigt eine Zelle zur Invasivität und Metastasierung, was im klinischen Befund mit dem Begriff Malignität bezeichnet wird.

Die Häufigkeit von Mutationen des *APC*-Gens in spontanen Adenomen und Karzinomen ist vergleichbar. Selbst in Adenomen mit einem Durchmesser von weniger als ein Zentimeter und mit geringer Dysplasie sind *APC*-Mutationen in einer Häufigkeit nachweisbar, die derjenigen von Karzinomen entspricht (Miyaki et al. 1994, Powell et al. 1992). In solch frühen Tumorstadien sind Mutationen von *Ras*-Genen selten und Mutationen des *p53*-Gens in der Regel nicht vorhanden. Dies bedeutet, dass Mutationen des *APC*-Gens im Rahmen der kolorektalen Karzinogenese im Verlauf der Adenom-Karzinom-Sequenz sehr früh und vor Mutationen der *Ras*- und *p53*-Gene auftreten. Die Häufigkeit von Mutationen und deren frühes Auftreten in der kolorektalen Karzinogenese ist der Grund dafür, dass das *APC*-Gen als *gatekeeper* der kolorektalen Karzinogenese bezeichnet wird (Kinzler and Vogelstein 1996).

Möglicherweise kann sich die Akkumulation genetischer Alterationen durch einen Zustand beschleunigen, der als genetische Instabilität bezeichnet wird (Schulmann und Schmiegel 2002). Man unterscheidet einerseits die genetische Instabilität auf chromosomaler Ebene, die bei den meisten sporadischen und FAP-assoziierten KRK nachweisbar ist und durch den Verlust ganzer Chromosomenarme oder -stücke, numerischer Chromosomenabberationen, Translokationen oder Genamplifikationen gekennzeichnet ist, andererseits die Mikrosatelliteninstabilität (MSI), die aufgrund defekter DNA-Mismatch-Reparatur-Gene zustande kommt. Bei etwa 90 % aller HNPCC-Patienten und ca. 15 % aller Patienten mit sporadischen KRK sind MSI zu beobachten (Schulmann und Schmiegel 2002).

Das in Abbildung 3 dargestellte Schema beschreibt letztlich sieben mögliche genetische Alterationen, die für die Tumorigenese entscheidend sein könnten (betroffen sind das *RAS*-Onkogen und drei Tumorsuppressorgene: *APC* auf Chromosom 5q, *p53* auf 17p, und ein Kandidat aus *DCC*, *SMAD4/DPC4*, *SMAD2* auf 18q). Es wird weiterhin angenommen, dass sich die Akkumulation genetischer Veränderungen durch einen Zustand beschleunigen kann, der als genetische Instabilität beschrieben wird (Schulmann und Schmiegel 2002). Grundsätzlich werden zwei Formen einer genetischen Instabilität unterschieden. Zum einen die genetische Instabilität auf chromosomaler Ebene, die bei den meisten Tumoren (85 % aller sporadischer und FAP-assoziiierter KRK) nachweisbar ist und sich meist äußert durch Verlust ganzer Chromosomenarme oder -stücke, numerischer Chromosomenaberrationen, Translokationen oder Genamplifikationen. Zum anderen ist die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) zu nennen, welche durch defekte DNA-MMR-Gene zustande kommt. *Bat-26* ist ein Marker für MSI. MSI ist bei ca. 90 % der HNPCC-Betroffenen und etwa 15 % der Patienten mit sporadischen KRK zu beobachten (Schulmann und Schmiegel 2002). Bei diesen Tumoren findet man eine erhöhte Rate an Mutationen, die den neoplastischen Prozess fördern können (Kinzler and Vogelstein 2002). An der Tumorigenese beteiligte Gene betreffen alle zelluläre Komponenten (*RAS* die innere Oberfläche der Zellmembran, *APC* im Zytoplasma und *p53* im Zellkern). Dies lässt den Schluss zu, dass menschliche Zellen mehrere Ebenen zellulären Schutzes gegen Neoplasien besitzen, wobei für die vollständige Entstehung von KRK viele dieser Schutzmechanismen außer Kraft gesetzt werden müssen. Für die sporadische Entwicklung eines KRK vom Auftreten eines kleinen adenomatösen Tumors bis zur Invasion durch das Karzinom sind etwa 20 bis 40 Jahre anzunehmen. Es bleibt festzustellen, dass es abweichend von diesem Entstehungsmodell andere Erkenntnisse bezüglich der Tumorigenese gibt (Jass et al. 2002a u. 2002b, Jass 2001, Hamilton 2001, Rashid et al. 2000).

Nicht jeder Tumor trägt z.B. die aufgeführten Mutationen. So sind nur etwa die Hälfte aller KRK im *RAS*-Gen mutiert. Es ist anzunehmen, dass andere, bisher nicht identifizierte Genmutationen die Wirkung von *RAS*-Mutationen übernehmen könnten. Zunehmend werden aber auch epigenetischen Aspekten wie z.B. der expressionsregulierenden DNA-Methylierung eine erhöhte Aufmerksamkeit in der Kolonkanzerogenese eingeräumt (Iacopetta 2003, Herman et al. 1998, Lee et al. 1996). Es ist nicht auszuschließen, dass andere genetische Veränderungen für die KRK-Entstehung verantwortlich sind. So wurde bspw. in voneinander unabhängigen Studien herausgearbeitet, dass auf den Chromosomen 8p und 22q LOH für weitere Tumorsuppressorgene vermutet werden (Castells et al. 1999, Vogelstein et al. 1989). Parallel zu den genetischen Veränderungen ist die Überexpression der Cyclooxygenase 2 (COX-2), eines Enzyms der Prostaglandinbiosynthese, in bis zu 90 % aller KRK und etwa 40 % aller kolorektalen Adenome nachweisbar. (Subbaramaiah und Dannenberg 2003, Eberhart et al. 1994). Erhöhte COX-2-Konzentrationen spielen bspw. eine Rolle in der Regulation der Angiogenese und Apoptose (Chung 2000).

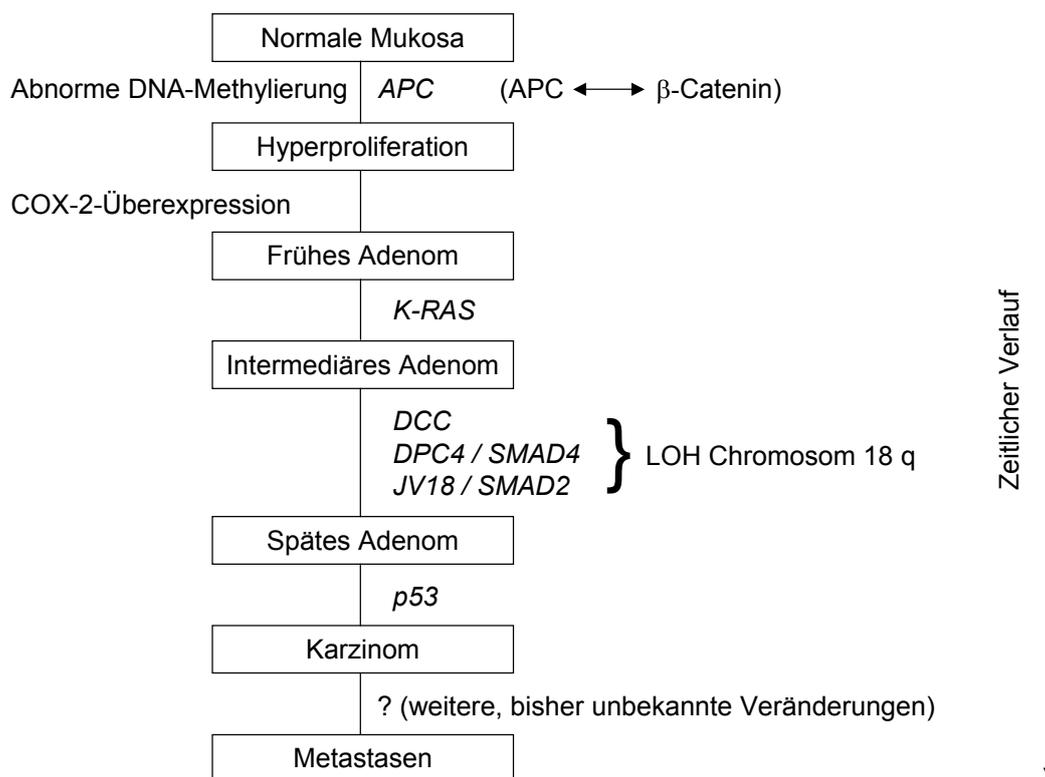


Abb. 3 Progressionsmodell der sporadischen kolorektalen Kanzerogenese. Stadien und genetische Veränderungen (nach Kinzler und Vogelstein 2002, Schulmann und Schmiegel 2002, Srivastava et al. 2001, Fenoglio-Preiser 1999)

1.3 Transformation von Zellen

Die permanente Änderung des Phenotyps einer Zelle, die aus vererbaren Veränderungen der DNA und der Genexpression resultiert, wird als Transformation bezeichnet. Zeichen einer Transformation im oben genannten Sinne sind die Immortalisierung, eine Verlängerung der Lebensdauer der Zellen, Alterationen in der Wachstumskontrolle aufgrund des Verlustes der Kontakthemmung, Wachstum ohne Verankerung an einem festem Untergrund und daraus resultierendes tumorigenes Potential.

Unter Immortalisierung versteht man eine dauerhafte Zellteilung ohne Zeichen von Zellalterung. Immortalisierte, aber nicht transformierte Zellkulturen stellen ihr Wachstum bei Erreichen der Konfluenz ein. Ihre Kultivierung in Abwesenheit einer festen Matrix, die für das adhärenzte Wachstum der Zellen notwendig ist, ist nicht möglich; die Zellen gehen dann in den apoptotischen Zustand über (Frisch 1994, Stoker 1968).

Eine Transformation kann spontan auftreten oder aber durch Viren und genetische Transfektionen induziert werden. Auch eine Exposition von Zellen mit radioaktiver Strahlung oder mit chemischen Kanzerogenen kann eine Transformation bewirken. Nicht transformierte kultivierte Zellen stellen bei Subkonfluenz ihr Wachstum ein, transformierte Zellen werden durch Zell-Zell-Kontakt oder hohe Zelldichte nicht in ihrem Wachstum gehemmt. Außerdem sind sie aufgrund der Produktion autokriner Wachstumsfaktoren unabhängig von Wachstumsfaktoren ihrer Mikroumwelt und wachsen daher in Medium mit geringsten Serummengen.

Transformierte Zellen besitzen häufig eine Telomeraseaktivität, so dass sie nicht der Seneszenz unterliegen, sondern eine unbegrenzte Lebensspanne aufweisen (Engelhardt and Martens 1998, Hayflick 1997). Normale Zellen dagegen können nur eine begrenzte Anzahl von Zellzyklen durchlaufen, da bei jeder Replikation die Telomerenenden verkürzt werden. Es wird vermutet, dass in Karzinomzellen mindestens sechs Veränderungen des Genotyps stattfinden müssen, damit eine Zelle entartet (Hanahan and Weinberg 2000). Karzinomzellen sind nur in geringem Maße abhängig von Wachstumsfaktoren. Wahrscheinlich sind sie aufgrund einer Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren in der Lage, bei der Ausschüttung kleinster Mengen von Wachstumsfaktoren zu proliferieren (Hanahan and Weinberg 2000).

**Tabelle 1 Kriterien zur Beurteilung der Transformation von Zellen
(nach Baserga 1997)**

Minimale Transformation	Intermediäre Transformation	Vollständige Transformation
unbegrenzt Wachstumspotential	Herdbildung in Monolayer-Kulturen	tumorigenes Potential in Tieren
minimierter Bedarf an Wachstumsfaktoren	Koloniebildung in Softagar	
hohe Sättigungsdichte		

1.4 APC und β -Catenin im Wnt-Signalweg

Das Multidomain-Protein APC (adenomatöse polyposis coli) ist in den Wnt-Signalweg integriert und spielt eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion, der Stabilität des mikrotubulären Zytoskeletts, der Zellzyklus-Regulation und möglicherweise bei der Apoptose (Fearnhead et al. 2001).

β -Catenin, das Genprodukt des *CTNNB1*-Gens, ist ebenfalls in zwei wichtige zelluläre Prozesse involviert; es fungiert als Komponente des Wnt-Signalweges und ist für die Cadherin vermittelte Zell-Adhäsion essentiell. β -Catenin verbindet Cadherine mit α -Catenin und dem Aktin-Zytoskelett und führt somit zur Bildung der „adherens junctions“ (Orford 1997).

Der APC- β -Catenin-Signalweg ist in 90 % aller sporadischen KRK inaktiviert und daher von grundlegender Bedeutung bei der Pathogenese kolorektaler Karzinome (Kinzler and Vogelstein 1996). Mehr als 70 % aller spontanen KRK weisen Mutationen im *APC*-Tumorsuppressorgen auf, es überwiegen Frameshift- und Nonsense-Mutationen. In den meisten Fällen ist für die Tumorentstehung die Inaktivierung beider Allele des *APC*-Genes notwendig, in seltenen Fällen können allerdings auch Mutationen im *β -Catenin*-Gen die gleichen Wirkungen ausüben wie die Mutationen im *APC*-Gen.

Das *APC*-Gen ist auf dem Chromosom 5q21 lokalisiert und besteht aus 15 Exons mit 8538 Basenpaaren (Grodin et al. 1991, Joslyn et al. 1991). Es kodiert ein aus 2861 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 310 kDa (Bodmer et al. 1987, Kinzler et al. 1991), das in spezifischen Epithel- und Mesenchymzellen verschiedener menschlicher Gewebe exprimiert wird.

Das *β-Catenin*-Gen ist auf dem Chromosom 3p22 lokalisiert, einer Region, die im humanen Genom bei malignen Tumoren häufig mutiert ist (Trent et al 1995). Das Protein besitzt ein Molekulargewicht von 92 kDa und ist ebenso wie APC ein Mitglied der Armadillo-Superfamilie.

Die Stabilität von *β-Catenin* wird durch die Assoziation mit drei zellulären Proteinen beeinflusst. Einerseits handelt es sich um das Enzym Glykogensynthasekinase-3 β (GSK-3 β), das auf dem Wnt-Signalweg vor *β-Catenin* liegt. Das zweite Protein ist das Tumorsuppressorprotein APC. Sowohl *β-Catenin* als auch APC sind Substrate der GSK-3 β . Bei dem dritten Protein handelt es sich um ein Protein, das je nach Zelltyp als Axin oder Conductin bezeichnet wird (Behrens et al. 1998, Ben-Ze'ev and Geiger 1998). Die Bindung von *β-Catenin* durch APC ist eine notwendige Voraussetzung für die intrazelluläre Degradation von *β-Catenin*.

APC fungiert als Regulator des *β-Catenin*-Abbaus (Aberle et al. 1996, Akiyama 2000), indem es mit Axin einen Komplex bildet, an den *β-Catenin* gebunden wird. APC besitzt zwei *β-Catenin*-Bindungsstellen, die für die Degradation von *β-Catenin* verantwortlich sind; eine Bindungsstelle besteht aus drei repetitiven Sequenzen, die jeweils 15 Aminosäuren umfassen, die andere Bindungsstelle besteht aus sieben repetitiven Sequenzen, die jeweils zwanzig Aminosäuren umfassen. Die zwanzig Aminosäure-langen Sequenzen besitzen jeweils eine SXXXS-Konsensusstelle, wobei S für die Aminosäure Serin steht und X einer beliebigen Aminosäure entspricht. Diese Konsensusstellen werden durch die GSK-3 β phosphoryliert. Auch *β-Catenin* besitzt solche Konsensusstellen.

Die Phosphorylierung der Serin- und Threoninreste des *β-Catenin* durch die GSK-3 β führt zur Degradation des *β-Catenin* durch das Ubiquitin-Proteasom-System (Damalas 1999 a, Aberle 1997, Sieber et al. 2000, Fearnhead et al. 2001).

Die Aktivierung von *β-Catenin* zum Onkogen kann aus der Inaktivierung des Tumorsuppressorgenes *APC* resultieren, durch direkte Mutation in dem für *β-Catenin* codierenden Gen *CTNNB1* oder durch Aktivierung des Wnt-Signalweges und daraus resultierender Inhibierung der GSK-3 β (Polakis 1999, Morin 1997, Korinek 1997).

Mutationen in beiden Genen, die zu Veränderungen der Phosphorylierungsstellen der GSK-3 β von APC und β -Catenin führen, resultieren in der Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma und im Nukleus (Kobayashi et al. 2000).

Mutationen im *CTNNB1*-Gen führen zur Akkumulation von β -Catenin, wenn die für die β -Catenin-Degradation wichtigen Aminosäurereste betroffen sind, codiert durch die Codons 32, 33, 34, 35, 37, 41 und 45 des Exon 3 im *CTNNB1*-Gen (Aberle 1997, Orford 1997).

Mutationen im *APC*-Gen führen zur Akkumulation von β -Catenin und zu verstärkter β -Catenin/Tcf-vermittelter Transkription wachstumsfördernder Gene wie zum Beispiel das *c-MYC* Onkogen (Kinzler and Vogelstein 2002).

β -Catenin ist assoziiert mit einer als Tcf/Lef bezeichneten Gruppe von Transkriptionsfaktoren (T cell factor-lymphoid enhancer factor). Die Akkumulation und Translokation von β -Catenin in den Nukleus und die Interaktion mit Tcf/Lef hat Veränderungen in der Expression verschiedener Zielgene zur Folge, wie zum Beispiel *c-Myc*, *Cyclin D1*, *Connexin 43*, *c-jun* und *Fibronectin*, die die Zellproliferation fördern (Easwaran 2003).

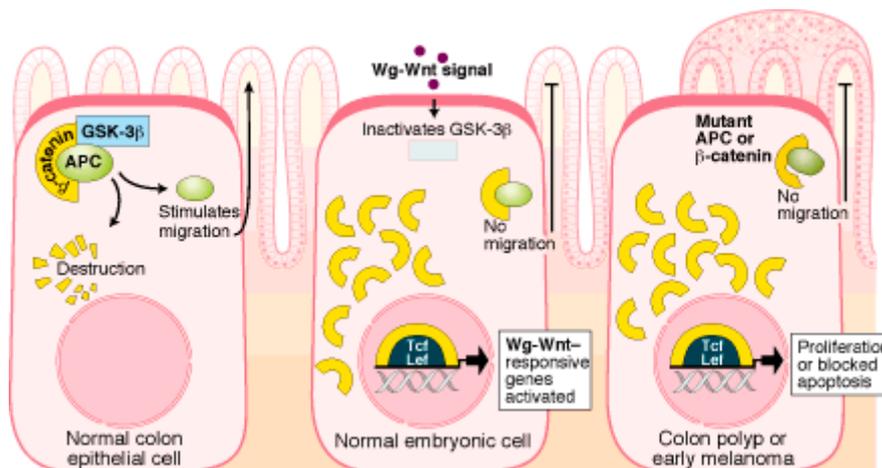


Abb. 4 Bedeutung von APC und β -Catenin im Wnt-Signalweg (Peifer 1997)

In normalen Kolonzellen regulieren GSK-3 β und APC die Degradation von β -Catenin. In normalen embryonalen Zellen und in Zellen von Kolonpolyphen wird β -Catenin nicht degradiert, akkumuliert und bindet schließlich an Tcf/Lef. Dies resultiert in der Expression bestimmter proliferationsfördernder oder apoptoseinhibierender Zielgene.

APC-Mutationen treten in der Mehrheit der sporadischen kolorektalen Tumore auf (Powell et al. 1992). Diese APC-Mutationen resultieren in einem Verlust des Carboxyl-Terminus des APC-Proteins (Kinzler and Vogelstein 1996).

Bei der Untersuchung von humanen Kolonkarzinom-Zelllinien wurden meist derartige Mutationen im *APC*-Gen gefunden, dass entweder ein trunkiertes Protein oder kein APC Protein nachgewiesen werden konnte (Dihlmann et al. 1997). β -Catenin wurde in normalen Kolonozyten hauptsächlich an der Plasmamembran, in adenomatösen Polypen noch zusätzlich im Nukleus gefunden (Iwamoto et al. 2000). Keimbahn- und somatische Mutationen sind über einen weiten Bereich des *APC*-Gens verstreut. Etwa 90 % der Mutationen liegen in der ersten Hälfte des kodierenden Genabschnitts (Miyaki et al. 1994, Miyoshi et al. 1992). Zwischen 60 und 80 % der somatischen Mutationen liegen in einem relativ kleinen Bereich des Gens zwischen Codon 1280 und 1500.

Als Hot Spots für somatische Mutationen im *APC*-Gen werden Codon 1309, 1450 und 1554 genannt, die mit einer Häufigkeit von ungefähr 7 %, 8 % und 5 % aller somatischen Mutationen auftreten. Die meisten Keimbahnmutationen und somatische Mutationen sind Transitionen in CpG Dinukleotiden, die aufgrund von Desaminierungen des methylierten Cytosins entstehen. Diese C \rightarrow T Transitionen treten zu 97 % in der Gensequenz CGA auf, die dadurch in das Stopcodon TGA umgewandelt wird (Beroud and Soussi 1996). Diese Mutationen führen zu einem verkürzten APC-Protein, das aufgrund des Verlustes des Carboxyl-Terminus nicht mehr als negativer Regulator von β -Catenin funktioniert (Polakis et al. 1999). Solche Mutationen treten sehr häufig bei Kolonkarzinomen auf.

Doch nicht nur Mutationen des *APC*-Gens führen zu einer verminderten Bindung von β -Catenin, sondern auch Mutationen im *CTNNB1*-Gen, welches für das Protein β -Catenin kodiert, führen zur Akkumulation von β -Catenin im Nukleus (Polakis et al. 1999). In humanen kolorektalen Karzinomzelllinien und in primären Tumoren wurden Mutationen in Codons, die für die Phosphorylierung des β -Catenins durch GSK-3 β wichtig sind, detektiert (Morin et al. 1997). In einer Studie wurde die Rolle des Tcf/Lef-Signalweges in Ratten untersucht, bei denen die Kolonkanzerogenese durch Methylazoxymethanolacetat und 1-Hydroxyanthrachinon induziert wurde. Neunzig Prozent der untersuchten Kolontumore enthielten Mutationen im *CTNNB1*-Gen. Alle Mutationen waren G:C \rightarrow A:T Transitionen, welche überwiegend im Codon 34 (Gly \rightarrow Glu), aber auch im Codon 32 (Asp \rightarrow Asn) und im Codon 41 (Thr \rightarrow Ile) auftraten. Nur die Mutationen im Codon 41 betrifft eine der drei potentiellen GSK-3 β -Phosphorylierungsstellen (Suzui et al. 1999). Es wird vermutet, dass die anderen Mutationen relevant für die Tumorentwicklung durch Aktivierung des β -Catenin-Tcf-Signalweges sind. Eine einzige Punktmutation im Codon 37 des *CTNNB1*-Gens führt zu einem Austausch von Serin gegen Alanin und resultiert in einer Akkumulation von β -Catenin (Rubinfeld et al. 1997).

1.5 Ras-Signalwege

Das Fortschreiten der Kolonkanzerogenese wird durch Mutationen der *RAS*-Protoonkogene begleitet (Kinzler and Vogelstein 1996). Ras-Proteine sind membrangebundene monomere Proteine mit einem Molekulargewicht von 21 kDa, die zur Superfamilie der GTPasen gehören (Barbacid 1987). Ras vermittelt proliferation- und differenzierungsinduzierende extrazelluläre Signale. Sie sind an der Signalübertragung von der Zellmembran zum Zellkern beteiligt. Binden z.B. Wachstumsfaktoren an spezifischen Rezeptoren der Plasmamembran, wird *Ras* über eine Signalkaskade aktiviert.

Ras-Protein kann in der inaktiven GDP-gebundenen Form und in der aktiven GTP-gebundenen Form vorliegen, wobei die aktive Form durch eine intrinsische GTPase nach der Signaltransduktion umgehend in die inaktive Form überführt wird. Durch das GTPase-aktivierende Protein GAP wird die GTPase-Aktivität verstärkt; bestimmte Mutationen im *Ras*-Gen minimieren die Affinität des Proteins zu GAP und führen somit zur Stabilisierung von Ras in der aktiven GTP-gebundenen Form (Anderson 1992, Marshall 1996). Die Stabilisierung von Ras in seinem aktiven Zustand führt zu einer kontinuierlichen Signaltransduktion und resultiert in einigen Zelllinien in der malignen Transformation der Zellen.

In seinem aktiven Zustand aktiviert Ras eine Reihe von Signalwegen, zum Beispiel den mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase) Signalweg (Waldmann and Rabes 1996). Ras führt nach Assoziation mit der Serin-Kinase Raf-1 zu deren Aktivierung; Raf-1 phosphoryliert anschließend die MAP Kinase Kinase, auch MAPKK oder MEK genannt. Die MAP Kinase wird nach ihrer Aktivierung in den Zellkern transloziert und wirkt auf die Expression verschiedener Gene modulierend (Webb 1998).

Die Induktion transformierender Eigenschaften wird bei Säuger-*RAS*-Genen bereits durch einzelne Punktmutationen in kodierenden Sequenzen erreicht. Die onkogene Aktivierung resultiert aus Mutationen in den Codonen 12, 13, 59 und 61 und ist auf den Austausch eines Glycinrestes an Position 12 der Ras-Proteine gegen eine andere Aminosäure zurückzuführen. Mit Ausnahme der Aminosäure Prolin wird dadurch die Ausbildung der α -helikalen Struktur der aminoterminalen Domäne und letztlich die korrekte Faltung des Proteins verhindert (Barbacid 1987).

In Tiermodellen werden *Ras*-Gene reproduzierbar und zum Teil in hoher Frequenz durch chemische Karzinogene aktiviert. Bei denjenigen Karzinogenen, deren Wirkmechanismus aufgeklärt ist, stimmt die Art des Basenaustauschs in *Ras*-Genen mit dem Wirkmechanismus des jeweiligen Karzinogens überein. So wurden zum Beispiel bei der Induktion muriner Leberkarzinome mit N-Hydroxy-2-Acetyl-Aminofluorid regelmäßig C-A-Transversionen in der ersten Base von Codon 61 beobachtet. Dies stimmt mit der Wirkung verwandter Karzinogene überein, die G:C → T:A-Transversionen bewirken. Diese experimentellen Daten zeigen, dass mutagene Karzinogene direkt auf zelluläre *Ras*-Gene einwirken. Die relativ hohe Selektivität und Spezifität der induzierten Mutationen hängt mit dem Wirkungsmechanismus des jeweiligen Karzinogens, mit dem onkogenen Potential von Basenposition und Basenaustausch sowie möglicherweise auch mit der Fehlerrate von DNA-Reparaturmechanismen zusammen (Balmain and Brown 1988, Barbacid 1987).

1.6 Aktivität und Regulation der Stabilität von p53

Das *p53*-Gen kodiert für das Phosphoprotein p53, welches als Transkriptionsfaktor und als Regulator des Zellwachstums fungiert (Deppert 1994, Harris 1993, Lin et al. 1992, Mercer et al. 1990) und wurde als zelluläres Bindungsprotein des großen T-Antigen von SV40-Viren entdeckt (Lane and Crawford 1979). Neben dem großen T-Antigen binden und inaktivieren das *E1B*-55kD-Onkoprotein von Adenoviren und das *E6*-Onkoprotein von Papillomaviren p53. Nach Klonierung der *p53*-cDNA wurde das Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 kartiert (van Tuinen et al. 1987). Anfänglich wurde *p53* als Protoonkogen klassifiziert, da man in Tumoren häufig eine Überexpression beobachtete, die mit der Immortalisierung und Transformation von primären Nagerzellen in Verbindung gebracht wurde (Jenkins et al. 1984, Eliyahu et al. 1984). Schließlich belegten weitere Untersuchungen, dass in den bisherigen Studien unwissentlich mutierte Formen von *p53* genutzt wurden und dass Wildtyp-p53 die Transformation inhibieren kann (Finlay et al. 1989).

Heute wird p53 als Tumorsuppressor-Protein und als eines der wichtigsten Proteine zur Prävention der Krebsentstehung angesehen, da es als Antwort auf zahlreiche Arten von Stress entweder Zellzyklus-Arrest oder Apoptose auslösen kann.

Die häufigen Mutationen in menschlichen Tumoren und die Inaktivierung durch DNA-Tumorviren dokumentieren die zentrale Bedeutung, die p53 für die Karzinogenese besitzt. Die Progression der Kolonkanzerogenese vom Adenom zum Karzinom wird mit Mutationen im Tumorsuppressorgen *p53* assoziiert (Fearon and Vogelstein 1990, Kinzler and Vogelstein 1996). Das *p53*-Gen ist etwa in der Hälfte aller Tumoren des Menschen mutiert und ist daher dasjenige Tumorgen, das in Tumoren am häufigsten verändert ist (Prives 1999, Hollstein et al. 1991). Es ist in mehr als 80 % aller kolorektalen Tumore mutiert (Baker et al. 1989). Das p53-Protein ist in normalen Zellen nur in geringen Konzentrationen vorhanden. Eine Stimulation der Expression des *p53*-Gens bewirkt in vielen Zellen Wachstumshemmung bzw. Apoptose (Liebermann et al. 1995, Vogelstein and Kinzler 1992).

Mutiertes *p53* kann aufgrund der fehlenden Zellzyklussteuerung in kolorektalen Tumorzellen einen Wachstumsvorteil bewirken, der dann zur Tumorprogression führt (Fearon and Vogelstein 1990). In β -Catenin-mutierten Zellen wurde ein erhöhter p53-Spiegel entdeckt (Damalas et al. 1999). Auch in frühen Adenomen von FAP-Patienten wurde eine p53-Überexpression gefunden (Damalas et al. 1999, Kashiwagi et al. 1997).

Das humane p53-Genprodukt ist ein aus 393 Aminosäuren bestehendes nukleäres Phosphoprotein mit fünf evolutionär konservierten Regionen (Cadwell and Zambetti 2001). Innerhalb des p53-Proteins wurden verschiedene Domänen mit Schlüsselfunktionen identifiziert. Der N-Terminus von p53 enthält eine saure Transaktivierungsdomäne, die mit Transkriptionsfaktoren wie z. B. TBP (TATA-Box-bindendes Protein) und TBP-assoziiierenden Faktoren (TAF) interagiert, wobei diese Interaktionen die Grundlage für die transkriptionelle Aktivität von p53 darstellen (Seto et al. 1992, Xiao et al. 1994, Lu and Levine 1995). Zudem fungiert der N-Terminus als Bindungsstelle für den p53- Negativregulator MDM2 (Chen et al. 1993).

An die Transaktivierungsdomäne schließt sich eine prolinreiche Region an, die aus fünf repetitiven Sequenzen besteht (Walker and Levine 1996) und an der Regulation der Apoptose beteiligt ist (Sakamuro et al. 1997, Venot et al. 1998). Die zentrale Kerndomäne ist für die sequenzspezifische DNA-Bindung notwendig (El-Deiry et al. 1992), die Oligomerisierungsdomäne für die Bildung von p53-Tetrameren (Wang et al. 1994). Die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 erfolgt typischerweise in Form eines Tetramers (Friedman et al. 1993). Der C-Terminus von p53 beinhaltet eine nukleäre Lokalisierungssequenz sowie eine nukleäre Exportsequenz und hat die Fähigkeit zur unspezifischen DNA- und RNA-Bindung, was möglicherweise der direkten Detektion von DNA-Schäden dient (Lee et al. 1995, Reed et al. 1995).

Die Oligomerisierung von p53 ist für die spezifische DNA-Bindung und Tumorsuppressor-Funktion entscheidend. Mehr als 90 % der in menschlichen Tumoren gefundenen Mutationen betreffen die DNA-Bindungsdomäne. Mutiertes p53 kann untereinander und mit Wildtyp-p53 Oligomere bilden. In Oligomeren aus mutiertem und Wildtyp-p53 ist die Konformation von Wildtyp-p53 verändert und die Interaktion mit der DNA gestört. Dies erklärt, dass bei Mutation eines Allels das Produkt des nicht-mutierten Allels ausgeschaltet wird.

In gesunden, proliferierenden Zellen ist die Menge des p53-Proteins aufgrund der effizienten Proteasom-vermittelten Degradation von p53 sehr niedrig, und seine Halbwertszeit beträgt nur fünf bis zwanzig Minuten (Giaccia and Kastan 1998, Maki et al. 1996). Einen wichtigen Beitrag hierzu leistet das Protein MDM2. Wesentlich für die Regulation von p53 durch MDM2 ist dessen Fähigkeit, an den Amino-Terminus von p53 zu binden (Chen et al. 1993) und als Ubiquitin-Protein-Ligase zu fungieren (Joazeiro and Weissman 2000). Zum einen führt die Ubiquitinierung von p53 durch MDM2 zur Markierung des Protein für die Proteasom-vermittelte Degradation (Fang et al. 2000), zum anderen trägt sie zum effizienten nukleären Export von p53 bei, der von der nukleären Exportsequenz (NES) im C-Terminus von p53 abhängt (Geyer et al. 2000). Es ist möglich, dass p53 durch die Ubiquitinierung in eine monomere Form überführt wird, wodurch es zu einer Freilegung der NES kommt, zu der die nukleäre Exportmaschinerie dann Zugang hat (Stommel et al. 1999). Der gesteigerte nukleäre Export fördert wiederum die effiziente Proteasom-vermittelte Degradation von p53 im Zytosol der Zelle. Des Weiteren blockiert MDM2 durch Bindung innerhalb des N-Terminus von p53 dessen Interaktion mit transkriptionellen Koaktivatoren und inhibiert auf diese Weise die Transaktivierungsaktivität von p53 (Momand et al. 1992). Das *MDM2*-Gen ist selbst ein Zielgen des Transkriptionsfaktors *p53* (Barak et al. 1993). Dadurch wird eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife geschaffen, in der p53 die Transkription seines eigenen Negativregulators aktiviert (Wu et al. 1993).

1.7 IEC-18 und HCEC als Zellkulturmodell

In zahlreichen Untersuchungen zur Identifizierung molekularer Mechanismen der Kolonkanzerogenese wurden IEC-Zellen der Ratte als Zellkulturmodell eingesetzt, da bislang weder eine menschliche noch eine tierische nicht transformierte Kolonzelllinie etabliert war.

Bei IEC-18 Zellen handelt es sich um eine spontan immortalisierte Epithelzelllinie, die aus dem Ileum männlicher Sprague Dawley Ratten (keimfreier Auszuchtstamm CrI:CD(SD)GN) etabliert wurde (Quaroni 1979, Quaroni and Isselbacher 1981). IEC-18 Zellen benötigen 16,6 Stunden zur Verdopplung der Population. Sie besitzen einen diploiden Karyotyp, zeigen kein Wachstum im Softagar und sind im Tierversuch nicht tumorigen. IEC-18 Zellen besitzen keine Mutationen in den für die Kolonkanzerogenese bedeutenden Genen *p53*, *K-ras* und *H-ras* und exprimieren das APC-Protein in voller Länge (Höhne 2001, Mann 2001). Diese Eigenschaften ermöglichen die Verwendung der IEC-18 Zellen als Kulturmodell für Untersuchungen zur chemisch induzierten Kolonkanzerogenese.

Durch eine Kooperation mit dem Nestlé Research Centre Lausanne wurde es ermöglicht, die patentierte und nicht käuflich erwerbbar Zelllinie HCEC (Human Colon Epithelial Cells) für Forschungszwecke zu nutzen. Die mit dem Similian Virus 40 (SV40) large-T-Antigen immortalisierte, nicht transformierte Kolonzelllinie ist in serumfreiem Medium kultivierbar und ermöglicht die Generierung eines humanen nicht-tumorigenen Kolonepithelzellkulturmodells. HCEC-Zellen exprimieren die für Darmepithelzellen charakteristischen fremdstoffmetabolisierenden Enzyme und die kolonspezifischen Gene. Lediglich die Cytochrom P450-Isoformen werden von HCEC-Zellen nicht in signifikanten Mengen auf Proteinniveau exprimiert (Blum et al. 2001). HCEC-Zellen weisen eine epitheliale Morphologie auf, wachsen als Monolayer und weisen eine Populationsverdopplungszeit von 24 Stunden auf. Zur Überprüfung ihrer tumorigenen Eigenschaften wurden die Zellen Nacktmäusen injiziert. Da sich innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 12 Monaten keine Tumore entwickelten, wird die Zelllinie als nicht tumorigen betrachtet.

2 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die chemische Transformation von Zellen durch Behandlung mit dem aktiven Metaboliten N²-OH-PhIP des in der Nahrung vorkommenden Kolonkanzerogens PhIP. Als Zellkulturmodelle dienten die Zelllinie IEC-18, eine aus dem Ileum von Ratten isolierte, nicht transformierte und spontan immortalisierte Zelllinie, und die Zelllinie HCEC, eine von Nestlé patentierte, nicht transformierte und mit SV40 large T-Antigen immortalisierte humane Kolonepithelzelllinie.

Da sich in früheren Untersuchungen (Kirchner 2002) gezeigt hatte, dass die für die metabolische Aktivierung des N²-OH-PhIP bedeutsame Sulfotransferase in IEC-18 Zellen nicht exprimiert wurde, war es ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, das Gen für die humane Sulfotransferase 1A1 mit Hilfe des Vektors pSI-hSULT1A1 durch stabile Transfektion in IEC-18 Zellen einzubringen. Die derart transfizierte, neu generierte Zelllinie sollte ebenfalls durch Behandlung mit N²-OH-PhIP chemisch transformiert werden. Über eine anschließende Analyse der Mutationsspektren der Onkogene *H-ras*, *K-ras* und *β-Catenin* sollten Erkenntnisse über molekulare Mechanismen der chemischen Transformation gewonnen werden.

Da die Transformation von Zellen als mehrstufiges Mutationsereignis angesehen wird, war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, die stabile Überexpression des als Onkogen geltenden *β-Catenin* in parentalen IEC-18 Zellen und die Kotransfektion von *β-Catenin* in eine bereits existierende IEC-18 Transfektante, die den Tumorsuppressor *p53* stabil überexprimierte. Derart transfizierte Zellen sollten im Folgenden durch Behandlung mit N²-OH-PhIP chemisch transformiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Blotting-Apparatur	Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad (Richmond, CA, USA)
Brutschrank	Steri-Cult 200 [®] Incubator	Forma Scientific (Marietta, OH, USA)
Sequenzierer	CEQ 2000	Beckmann Coulter Bioresearch
Chemolumineszenz	Chemi Doc Gel	Bio-Rad (Richmond, CA, USA)
Detektionsgerät	Documentation System mit QuantityOne Software	Bio-Rad (Richmond, CA, USA)
Elektrophoresesystem	Trans-Blot SD	Bio-Rad (Richmond, CA, USA)
	Mini-Sub [®] Cell GT	Bio-Rad (Richmond, CA, USA)
	Power Pac 1000	Bio-Rad (Richmond, CA, USA)
Mikrophotographie	Coolpix 990	Nikon (Düsseldorf)
	Eclipse TE 300 mit Lucia Image-Software	Nikon (Düsseldorf) Nikon
	Mastercycler gradient	Eppendorf (Köln)
PCR-Gerät	Mastercycler gradient	Eppendorf (Köln)
Spektralphotometer	UVIKON 9X2	Biotek (Neufarn)
UV-Detektionsgerät	Fluorescent Combi-Light	LTF (Wasserburg/B)
	mit BioCapt-Software	LTF (Wasserburg/B)
Zellzählgerät	Casy 1 TT	Schärfe (Reutlingen)
Plattenphotometer	iEMS Reader MF mit Ascent Software	Labsystems (Helsinki/ Finnland)
	Biofuge fresco	Heraeus (Hanau)
Zentrifugen	CR3	Jouan (Unterhaching)
	Universal 16R	Hettick (Tuttlingen)
	Labofuge 100	Heraeus (Berlin)
	Centrifuge 5415C	Eppendorf (Hamburg)
	Centrifuge 5403	Eppendorf (Hamburg)
	Ultrazentrifuge Optima TLX	Beckman (München)

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Für die Zellkulturarbeiten wurde vorwiegend steril verpacktes Kunststoffmaterial verwendet, wie z.B. Kulturflaschen, Kulturschalen, serologische Pipetten, Kryoröhrchen und Sterilfilter, die von den Firmen Sarstedt (Nürnberg) und Biochrom (Berlin) bezogen wurden.

Für die Zellkultur verwendete Glasmaterialien (Pasteurpipetten, Vorratsflaschen) oder metallische Gegenstände (Pinzetten, Klonierringe) wurden vor der Benutzung bei 121 °C für mindestens 30 Minuten autoklaviert.

3.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden ausschließlich mit destilliertem Wasser hergestellt, welches im folgenden abgekürzt als dest. Wasser, Wasser oder H₂O bezeichnet wird.

Kulturmedien sowie Lösungen, die bei zellbiologischen oder molekularbiologischen Arbeiten Verwendung fanden, wurden vor Benutzung entweder autoklaviert oder sterilfiltriert (Sterilfilter mit Porengröße 0,45 µm).

Anorganische Säuren, Basen und Salze sowie organischen Lösungsmittel wurden vorwiegend von den Firmen Sigma (St. Louis, MO, USA) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

3.1.4 Feinchemikalien, Reagenzien und Enzyme

A52 Medium	Biofluids (Rockville, MD, USA)
Agarose	AppliChem (Darmstadt)
Agar Oxoid	Basingstoke (England)
Ampicillin Na-Salz	Biomol (Hamburg)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA)
Bradford-Reagenz (Roti [®] -Quant)	Roth (Karlsruhe)
Bovine Pituitary Extract (BPE)	Biofluids (Rockville, MD, USA)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Casein-Hydrolysat (Peptone No. 140)	Gibco (Paisley, Schottland)
CDNB (1-Chlor-2,4-dinitrobenzol)	Sigma (St. Louis, MO, USA)

Complete TM Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche (Mannheim)
Dako EnVision + TM Peroxidase, Maus	DAKO (Carpinteria, CA, USA)
Dako Liquid DAB + Substrate-Chromogen	DAKO (Carpinteria, CA, USA)
Dexamethason	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe)
Diphtherietoxin	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Dulbecco's MEM mit Phenolrot	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma (St. Louis, MO, USA)
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Einfriermedium HCEC, Lösung A und B	Biofluids (Rockville, MD, USA)
ECL Western-Blotting Detektionsreagenzien	Amersham (Braunschweig)
Fötales Bovines Serum (FBS)	Biochrom KG (Berlin)
Gene-Ruler TM DNA-Ladder (100bp)	MBI-Fermentas (St. Leon-Rot)
Geneticinsulfat (G418 [®])	AppliChem (Darmstadt)
L-Glutamin	Gibco (Paisley, Schottland)
Hefe-Extrakt	Gibco (Paisley, Schottland)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
HotStar Taq TM DNA Polymerase	Qiagen [®] (Hilden)
HighSpeed TM Plasmid (50) Midi Kit	Qiagen [®] (Hilden)
Hydrocortison	Sigma (St. Louis, MO, USA)
25-Hydroxycholesterol	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Hygromycin	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Insulin	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Kit zur Isolierung genomischer DNA	Qiagen [®] (Hilden)
Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> Marker	Promega (Madison, WI, USA)
Magermilchpulver	Sucofin (Zeven)
Matrigel Basement Membrane Mix	Collaborative Biomedical Products (Bedford, MA, USA)
Microcon [®] PCR Centrifugal Filter Devices	Millipore (Eschborn)
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethan-sulfonsäure (BES)	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat	Roth (Karlsruhe)

OneStep RT-PCR Kit	Qiagen [®] (Hilden)
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma (St. Louis, USA)
Prestained SDS-PAGE Standards	Bio-Rad (Richmond, CA, USA)
Penicillin (10.000 U/ml)-Streptomycin (10 mg/ml)-Lösung	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Plasmid (50)Midi Kit	Qiagen [®] (Hilden)
Ponceau S	Roth (Karlsruhe)
Proteinmolekulargewichtsmarker	Amersham (Braunschweig)
Retinoic Acid (RA)	Biofluids (Rockville, MD, USA)
Rneasy [®] Mini Kit (50)	Qiagen [®] (Hilden)
Rotiphorese [®] Gel 30	Roth (Karlsruhe)
Serum neugeborener Kälber (NCS)	Biochrom KG (Berlin)
N ² -OH-PhIP	Midwest Research Institute (Kansas City, MO, USA)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad (Richmond, CA, USA)
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Trypsin Neutralisierungslösung (TNS)	Promocell (Allschwil)
Vitamin C	Sigma (St. Louis, MO, USA)

3.1.5 Lösungen und Puffer

3.1.5.1 Zellkultur

Kultivierung von Zellen

IEC-18-Medium

0,95 x DMEM (4,5 g/l Glucose, mit Gln)

20 mM HEPES

44,6 mM NaHCO₃ (w/v)

0,1 U/ml Insulin (28 USP* U/mg)

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

5 % FBS

USP* - genügt den Standards der United States Pharmacopeia XXII

Aus DMEM, HEPES und NaHCO_3 wurde zunächst ein Grundmedium mit pH 7,4 hergestellt und sterilfiltriert. Vor Gebrauch wurde dieses Medium durch Zusatz von FBS, Insulin und Penicillin-Streptomycin komplettiert.

HCEC-Medium B50

A52 Medium (500 ml)

2 mM L-Glutamin

100 n Retinolsäure (RA)

1 nM Dexamethason

30 $\mu\text{g/ml}$ BPE

38 $\mu\text{g/ml}$ Vitamin C

Das patentierte A52 Medium wurde bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Nach dem Auftauen bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ wurde dem Medium L-Glutamin, RA, Dexamethason, BPE und Vitamin C zugesetzt. Das Komplettmedium wurde vor Gebrauch sterilfiltriert.

V79-Medium

0,95 x DMEM (4,5 g/l Glukose, mit L-Gln)

20 mM HEPES

44,6 mM NaHCO_3 (w/v)

100 U/ml Penicillin

100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin

5 % FBS

Aus DMEM, HEPES und NaHCO_3 wurde zunächst ein Grundmedium mit pH 7,4 hergestellt und sterilfiltriert. Vor Gebrauch wurde dieses Medium durch Zusatz von FBS und Penicillin-Streptomycin komplettiert.

Phoenix-Medium

0,95 x DMEM (4,5 g/l Glucose, mit L-Gln)

20 mM HEPES

44,6 mM NaHCO₃ (w/v)

20 mM L-Glutamin

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

10 % FBS

Aus DMEM, HEPES und NaHCO₃ wurde zunächst ein Grundmedium mit pH 7,4 hergestellt und sterilfiltriert. Vor Gebrauch wurde dieses Medium durch Zusatz von L-Glutamin, FBS und Penicillin-Streptomycin komplettiert.

Phoenix-Selektionsmedium

Kulturmedium komplettiert

300 µg/ml Hygromycin

1 mg/ml Diphtherietoxin

Dem komplettierten Phoenix Medium wurden Hygromycin und Diphtherietoxin zugesetzt.

PBS, pH 7,4

137 mM NaCl

5,36 mM KCl

1,47 mM KH₂PO₄

8 mM Na₂HPO₄

Kryokonservierung**Einfriermedium für IEC-18-Zellen**

70 % Kulturmedium komplettiert

20 % FBS

10 % DMSO

Einfriermedium für HCEC-Zellen

Einfriermedium A (= L 15-Medium enthält pro Milliliter

- 20 mM HEPES
- 20 % FBS
- 200 U Penicillin
- 200 µg Streptomycin

Einfriermedium B (= L 15-Medium enthält pro Milliliter

- 20 mM Hepes
- 15 % DMSO
- 2 % PVP

Einfriermedium für Phoenix-Zellen

70 % Kulturmedium komplettiert

20 % FBS

10 % DMSO

Transfektion

Transfektion mittels Kalziumphosphat

- 2,5 M CaCl₂ in H₂O
- 2 x BBS-Puffer (50 mM BES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄ in H₂O, pH 6,95)
- Transfektionsmedium: IEC-18-Grundmedium
 - Insulin
 - 5 % NCS
 - 2,5 µg/ml 25-Hydroxycholesterol (Stammlösung: 2,5 mg/ml in Ethanol)
- Selektionsmedien: IEC-18-Medium mit 1 mg/ml Geneticindisulfat (G418)
IEC-18-Medium mit 5 mg/ml Puromycin

3.1.5.6 Herstellung von Zellhomogenat

- Mucosa-Homogenisationspuffer 50 mM Tris-HCl, 1,15 % KCl, pH 7,8 mit Complete Protease-Inhibitor Cocktail nach Herstellervorschrift

3.1.5.7 SDS-PAGE

- Acrylamid/Bis-Lösung Fertiglösung (Rotiphorese[®] Gel 30, Roth)
- APS-Lösung (10 %) 0,1 g APS in 1 ml Wasser lösen
- Laemmli-Auftragspuffer (3x) 9 ml Glycerol, 9 ml Tris-HCl (pH 6,8), 9 ml SDS (20 %) in H₂O, 0,2 ml 0,5 % (w/v) Bromphenolblau mischen und 9:1 mit 1 M DTT verdünnen
- DTT (1M) 3,1 g DTT, 20 ml H₂O vermischen, bei -20 °C lagern
- 3x Auftragspuffer 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10 % Glycerol, 10 % SDS, 5 % Mercaptoethanol, 0,05 % Bromphenolblau
- 5x Laufpuffer 3 % Tris, 14,4 % Glycin, 0,5 % SDS in Wasser
- Sammelgelpuffer 6,06 g Tris, 2 ml 20 % SDS, pH 6,8 mit konzentrierter HCl einstellen, ad 100 ml mit Wasser
- Trenngelpuffer 18,2 g Tris, 2 ml 20 % SDS, pH 8,8 mit konzentrierter HCl einstellen, ad 100 ml mit Wasser
- TEMED Fertiglösung (Bio-Rad)
- SDS-Lösung (20 %) 20 g SDS in 100 ml Wasser
- Ponceau S-Lösung 0,2 % Ponceau S in Trichloressigsäure (3 %)

3.1.5.8 *Western-Blotting*

- Anodenpuffer I 0,3 M Tris in 20 % igem Methanol
- Anodenpuffer II 25 mM Tris in 20 % igem Methanol
- Kathodenpuffer 40 mM ϵ -Aminocaprinsäure und 0,01 % SDS in 20 %-igem Methanol

3.1.5.9 *Immunochemische Detektion*

- 10x TBS-T 200 mM Tris, pH 7,6, 1,37 M NaCl, 1 % Tween 20
- Blockierungslösung 1 % Milchpulver, 1 % BSA in 1 x TBS-T

3.1.6 Enzyme, Plasmide, Oligonukleotide und Antikörper

Restriktionsendonukleasen

Gibco (Karlsruhe)

(komplettes Set inklusive Puffer)

Plasmide

Nähere Angaben zu den Plasmiden sind den Vektorkarten im Anhang zu entnehmen.

pSI-hSULT 1A1

Arbeitsgruppe H.R. Glatt, Abt. Ernährungstoxikologie,
DIfE, Potsdam-Rehbrücke

pBSdeltapac

Invitrogen (Karlsruhe)

pcDNA3-h-b-Catenin-WT

konstruiert von F. F. Kolligs, von Arbeitsgruppe

pcDNA3-h-b-Catenin-MT

E. R. Fearon überlassen

Retrovirale Vektoren

pBabe-Puro Avri Ben-Ze'ev (Weizmann Institute of
 pBabe-Puro- β -Catenin-S33Y Science, Rehovot, Israel)

pBabe-Neo W. Teubner, Abt. Ernährungstoxikologie, IEW,
 pBabe-Neo-p53 MU Universität Potsdam
 pBabe-Neo-p53 WT

Oligonukleotide

rGST T2-S	5'-CTCTTGGCTGTAATCTGTTT-3'	Bio TeZ Berlin-Buch GmbH
rGST T2-R	5'-TGCTAAGGATAGGTGGTGTC-3'	Bio TeZ Berlin-Buch GmbH
rat-betaAct-4R	5'-GATATCGCTGCGCTCGTCGTC-3'	Bio TeZ Berlin-Buch GmbH
rat-betaAct-3F	5'-CCTCGGGGCATCGGAACC-3'	Bio TeZ Berlin-Buch GmbH
Kras-hum-utr-S	5'-ACT GGT GGA GTA TTT GAT AG-3'	Roth (Karlsruhe)
Kras-hum-i1-R	5'-TGT ATC AAA GAA TGG TCC TG-3'	Roth (Karlsruhe)
Kras-hum-i1-S	5'-TTG AAG TAA AAG GTG CAC TG-3'	Roth (Karlsruhe)
Kras-hum-i2-R	5'-GGC ATT AGC AAA GAC TCA AA-3'	Roth (Karlsruhe)
h-b-cat-F2	5'-GGA GTT GGA CAT GGC CAT GG-3'	Roth (Karlsruhe)
h-b-cat-E3-R	5'-CTT GTT CTT GAG TGA AGG AC-3'	Roth (Karlsruhe)
r- β -Cat Ex3/692 as	5'-CTT GCT CTT GCG TGA AGG AC-3'	Roth (Karlsruhe)

AntikörperPrimäre Antiseren:

Kaninchen-Anti-Flag	Sigma (Deisenhofen)
β -Catenin monoklonal	Transduction (Lexington, UK)
p53 (Ab-6), monoklonal aus Maus	Oncogene (San Diego, CA, USA)
Ab-1 monoklonal aus Maus (IgG-Fraktion)	Calbiochem (Schwalbach)
rGST (A1, A3, A4, M1, P1) aus Kaninchen	Dr. J. Hayes (Dundee, Schottland)
hSULT1A1 aus Kaninchen	Dr. C. E. Engelke (DifE, Potsdam-Rehbrücke)
NAT-2 aus Kaninchen	Dr. E. Muckel (DifE, Potsdam-Rehbrücke)
Anti-HA, monoklonal aus Maus, Klon 12 CA5)	Roche (Mannheim)
Anti-human Cytokeratin 19, monoklonal aus Maus	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA

Sekundäre Antiseren:

anti-Kaninchen (PO-gekoppelt) aus Ziege	Sigma (Deisenhofen)
Dako EnVision+™ Peroxidase, anti Maus	DAKO (Carpinteria, CA, USA)
Anti Maus IgG polyklonaler AK HRP., SO81 Aus Schaf (IgG-Fraktion)	Abcam (Cambridge, GB)
Anti Maus aus Ziege (IgG Peroxidase Konjugat)	Sigma (Deisenhofen)

3.1.7 Biologisches Material**Bakterienstämme**

<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Stratagene (Heidelberg)
--------------------------------------	-------------------------

Zelllinien

IEC-18	Rattendünndarmepithelzellen, ATCC (Manassas-Virginia, USA)
V79	SubZelllinie V79Mz (Universität Mainz) der ursprünglich aus Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters gewonnenen Zelllinie V79 (Wölfel et al., 1991)

SW480	metastasierende Kolonkarzinomzelllinie,	Abteilung Ernährungstoxikologie, IEW, Universität Potsdam
Phoenix	Transfizierte HEK Zelllinie	Dr. Nolan (Stanford University, USA)
HCEC	Humane Kolonepithelzellen	Nestlé Research Centre (Lausanne)
HEK-293	Humane embryonale Nierenzellen	DSMZ (Braunschweig)
IEC-18- pcMV- hum p53 MT	mutiertes humanes p53 überexprimierender IEC-18-Zellklon	W. Teubner, Abteilung Ernährungs- toxikologie, IEW, Universität Potsdam

Gewebeproben aus Ratten

Die verwendeten Mukosa- und Leberproben stammen von ca. 50 Tage alten Shoe Wistar und Sprague-Dawley Ratten männlichen und weiblichen Geschlechts, die aus der Tierzucht Schönwalde bezogen wurden.

SCID-Mäuse

Die verwendeten Nacktmäuse waren männlichen Geschlechts und wurden von Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld, bezogen.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Zelllinien kultiviert.

IEC-18	V79	SW480	HCEC	Phoenix	HEK-293
--------	-----	-------	------	---------	---------

Die verwendeten Zelllinien wurden in sterilen Kunststoffgefäßen in den unter 3.1.5.1 genannten Medien bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Zur Kultivierung der humanen Kolonozyten (HCEC) war eine Beschichtung der Kulturschalen notwendig. Pro 10 cm² Kulturfläche wurden die Kulturgefäße mit 250 µl Matrigel Basement Membrane Matrix beschichtet und zur Polymerisierung des Gels mindestens 15 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, anschließend wurde der Matrigelüberstand entfernt.

3.2.1.2 Subkultivierung der Zellen

Alle für die vorliegende Arbeit verwendeten Zelllinien wuchsen adhärent, d.h. mit Anheftung an die Oberfläche der Zellkulturgefäße.

IEC-18, V79

Die Zellen wurden bei Erreichen der Subkonfluenz alle zwei bis drei Tage subkultiviert. Zum Ablösen der Zellen von den Kulturgefäßen wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden zweimal mit vorgewärmtem PBS (3.1.5) gewaschen und pro 25 cm² Wachstumsfläche mit 0,5 ml Trypsin (3.1.4) versetzt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C ca. drei bis fünf Minuten inkubiert. Nachdem das vollständige Ablösen der Zellen von der Kulturschale mikroskopisch überprüft wurde, wurde ein ausreichend großer Überschuß an serumhaltigem Kulturmedium zugesetzt, um die proteolytische Wirkung des Trypsins zu inhibieren. Die Zellsuspension wurde nach dem Resuspendieren 1:6 verdünnt und die Zellen in neuen Kulturgefäßen weiterkultiviert.

Phoenix, SW-480, HEK-293

Diese Zellen sollten nicht bis zur Konfluenz wachsen und wurden daher bei ca. 70-80 % Konfluenz alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:4 verdünnt und subkultiviert.

HCEC

Die HCEC Zellen wurden bei Erreichen der Subkonfluenz alle drei bis vier Tage subkultiviert.

Zum Ablösen der Zellen von den Kulturgefäßen wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden zweimal mit PBS (3.1.5) gewaschen und pro 25 cm² Kulturfläche mit 0,25 ml Trypsin (3.1.4) versetzt. Die Zellen wurden im Brutschrank nicht länger als 1 min inkubiert. Um die proteolytische Wirkung des Trypsins zu inhibieren, wurde 1 ml TNS zugesetzt und die Zellsuspension bei 1100 rpm und 22 °C drei min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das entstandene Zellsediment in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nach dem Resuspendieren 1:3 verdünnt und in neuen, mit Matrigel beschichteten Kulturgefäßen, weiterkultiviert.

3.2.1.3 Ermittlung der Zellzahl mit einem elektronischen Zählgerät („CASY“)

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden je 100 µl der Zellsuspension in einem partikelfreien Probenbecher mit 10 ml CASYTON-Lösung verdünnt und durch mehrmaliges Schwenken gemischt. Die Bestimmung der Zellzahl wurde entsprechend der CASY-Betriebsanleitung durchgeführt.

3.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen

IEC-18, V79, Phoenix, SW-480, HEK-293

Nach Ablösen, Resuspendieren und Bestimmen der Zellzahl wurde die erhaltene Zellsuspension 10 min bei 1100 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in Einfriermedium (3.1.5.1) resuspendiert und in geeigneten Schraubröhrchen kryokonserviert. Die Zellen wurden für einige Tage bei -80 °C und anschließend zur langfristigen Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt.

HCEC

Bei HCEC Zellen wurde nach Ablösen, Resuspendieren und Bestimmen der Zellzahl die erhaltene Zellsuspension 3 min bei 1100 rpm und 22 °C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit einer Dichte von 3×10^6 Zellen/ml in Einfriermedium resuspendiert und in geeigneten Schraubröhrchen kryokonserviert. Für das Einfriermedium der HCEC-Zellen wurden Lösung A und Lösung B (3.1.5.1) zu gleichen Teilen unmittelbar vor der Verwendung gemischt. Die Zellen wurden für einige Tage bei -80 °C und anschließend zur langfristigen Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt.

3.2.1.5 Rekultivierung kryokonservierter Zellen

Zur Rekultivierung der kryokonservierten Zellen wurden die Kryokonserven bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt, in das auf 37 °C temperiertes Kulturmedium vorgelegt war, verdünnt und 10 min bei 4 °C und 1100 rpm (IEC-18, V79, HEK-293, FHC, Phoenix-Zellen) bzw. 3 min bei 22 °C und 1100 rpm (HCEC-Zellen) zentrifugiert, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO rasch zu entfernen. Das so entstandene Zellsediment wurde anschließend in Kulturmedium (3.1.5.1.) resuspendiert und in einem 75 cm² Zellkulturgefäß (bei HCEC-Zellen mit Matrigel (3.1.4) beschichtet) kultiviert.

3.2.1.6 Selektieren von Phoenix Zellen

Die Phoenix-Zellen wurden als Verpackungszelllinie für den retroviralen Gentransfer verwendet. Als Selektionsmarker für diese Zelllinie, ursprünglich HEK-Zellen, die mit der genetischen Information für das Hüllprotein transfiziert wurden, dienten Hygromycin (3.1.4) und Diphtherietoxin (3.1.4). Nach dem Rekultivieren der Kryokonserven (3.2.1.5) wurden die Zellen über zwei Passagen in Kulturmedium (3.1.5.1) kultiviert und anschließend mit Selektionsmedium (3.1.5.1) mindestens zwei Passagen (ca. eine Woche) selektiert. Von den selektierten Zellen wurden Kryokonserven angefertigt (3.2.1.4).

3.2.1.7 *Behandlung von Zellen mit N²-OH-PhIP*

Stammlösung N²-OH-PhIP 5,5 mg in 400 µl DMSO gelöst

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Zelllinien mit verschiedenen Konzentrationen N²-OH-PhIP unterschiedlich oft (Behandlungszyklen) behandelt.

Tabelle 2 Behandlungszyklen mit N²-OH-PhIP

IEC-18	HCEC	IEC-18-pSI- hSULT 1A1	IEC-18-pcMV- hum p53 MT	IEC-18-pcMV- hum p53 MT- pBabe-Puro- β-Catenin S33Y
25 Zyklen	5 Zyklen	5 Zyklen	5 Zyklen	5 Zyklen
5-20 µM	1,5-3 µM	5 µM	5 µM	5 µM

24 h vor der Behandlung der Zellen mit N²-OH-PhIP (3.1.4) bzw. DMSO (3.1.4) wurden 5 x 10⁵ Zellen in 10 ml Kulturmedium auf einer 10 cm Kulturschale eingesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Behandlung 70-80 % subkonfluentes Wachstum erreicht hatten. Zur Behandlung der Zellen wurde das jeweilige Kulturmedium (3.1.5.1) durch Behandlungsmedium (Kulturmedium mit N²-OH-PhIP gelöst in DMSO, zur Behandlung der Lösungsmittelkontrollen mit entsprechenden Mengen DMSO) ersetzt. Die korrespondierenden Mengen an Lösungsmittel (DMSO) überschritten in keinem Fall die Konzentration von 0,1 %.

Nach 24 stündiger Behandlung mit dem Kanzerogen bzw. mit dem Lösungsmittel wurde das Behandlungsmedium entfernt, die Zellen zweimal mit Kulturmedium zum Entfernen der Behandlungssubstanzen gewaschen und anschließend weitere 24 h mit Kulturmedium inkubiert. Während der Behandlung und in den folgenden 24 h war ein vermehrtes Absterben der Zellen zu beobachten, so dass erst nach Erreichen der Subkonfluenz eine genügend große Menge an Zellen zur Kryokonservierung (3.2.1.4) und zur Zelleinsaat für den nächsten Behandlungszyklus zur Verfügung stand.

Wie oben beschrieben, wurden bei den IEC-18-Zellen 25 Behandlungszyklen durchgeführt. Bei den ersten 15 Behandlungen wurde das Kulturmedium gegen Behandlungsmedium mit 5 μM $\text{N}^2\text{-OH-PhIP}$ und 5 % FBS ersetzt. Ab der 16. Behandlung wurde die Kultur in drei Behandlungsstränge gesplittet. Ein Behandlungsstrang wurde unter den bisherigen Bedingungen weiterbehandelt. Um den Selektionsdruck zu verstärken wurde die FBS-Konzentration des Kulturmediums bei dem zweiten Behandlungsstrang schrittweise auf 0,6 % FBS reduziert, in einem dritten Behandlungsstrang wurde die $\text{N}^2\text{-OH-PhIP}$ -Konzentration schrittweise auf bis zu 20 μM erhöht; alle anderen Parameter wurden konstant gehalten. Die jeweiligen Lösungsmittelkontrollen wurden mit entsprechenden DMSO-Konzentrationen analog durchgeführt. Eine detaillierte Auflistung der Behandlungsbedingungen während der Behandlungszyklen der drei Behandlungsstränge ist Tabelle A1 (Anhang) zu entnehmen.

Bei Beginn der Behandlungen wurden IEC-18-Zellen der Passage 4 verwendet. Die anschließenden Untersuchungen wurden mit den Zellen des entsprechenden Behandlungszyklus und daher höheren Passagezahlen durchgeführt (Passage 4 bis 70). IEC-18-pSI-h SULT1A1, IEC-18-pcMV-hum p53 MT und IEC-18-pcMV-hum p53 MT-pBabe-Puro- β -Catenin S33Y wurden in analoger Form jeweils 5 Behandlungszyklen unterworfen (5 μM $\text{N}^2\text{-OH-PhIP}$, 5 % FBS im jeweiligen Medium).

Die HCEC Zellen wurden über 5 Zyklen mit dem Kanzerogen $\text{N}^2\text{-OH-PhIP}$ behandelt. Sechsenddreißig Stunden vor der Behandlung mit $\text{N}^2\text{-OH-PhIP}$ wurden 1×10^6 Zellen in 10 ml Kulturmedium auf einer mit Matrigel (3.1.4) beschichteten 10 cm Kulturschale eingesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Behandlung 70-80 % subkonfluentes Wachstum erreicht hatten. Zur Behandlung wurde Medium einer Konzentration von 0,5 μM und 1 μM $\text{N}^2\text{-OH-PhIP}$ verwendet. Nach 24-stündiger Behandlung wurde verfahren wie bereits beschrieben. Nach dem jeweils zweiten Behandlungszyklus wurden die $\text{N}^2\text{-OH-PhIP}$ -Konzentrationen von 0,5 μM auf 1,5 μM und von 1 μM auf 3 μM gesteigert.

3.2.1.8 Ermittlung von Wachstumskurven

Zur Ermittlung der Wachstumseigenschaften der verwendeten Zellen wurde das Wachstum über einen längeren Zeitraum mittels Gesamtzellzahlbestimmung verfolgt. Nach Ablösen der Zellen von der Kulturfläche und Zellzahlbestimmung (3.2.1.3) erfolgte die Zelleinsaat, indem pro Zeitpunkt jeweils in drei Kavitäten einer 6-Well-Platte je 50.000 Zellen in 2 ml Kulturmedium (3.1.5) eingesät wurden. Die Platten wurden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. An den darauffolgenden zehn Tagen wurde zu einem definierten Zeitpunkt nach Entfernen des Mediums, zweimaligem Waschen mit PBS (3.1.5.1), Ablösen der Zellen und Resuspendieren in Kulturmedium die Gesamtzellzahl mittels des Zelläzählgerätes Casy 1 TT ermittelt. Die Zellzählung jeder Kavität mittels Casy 1 TT (3.1.1) wurde jeweils dreimal durchgeführt, so dass pro Zählzeitpunkt neun Gesamtzellzahlwerte erhalten wurden. Die Zellzahlbestimmung wurde an den folgenden Tagen so lange wiederholt, bis die Plateauphase der Wachstumskurve erreicht war.

Für die graphische Darstellung der Wachstumskurve wurde die Gesamtzellzahl gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Zur Ermittlung der Populationsverdopplungszeit wurde die Wachstumskurve halblogarithmisch dargestellt, indem der Logarithmus zur Basis 2 der Gesamtzellzahl gegen die Inkubationszeit aufgetragen wurde. Der Kehrwert des Anstieges $1/m$ entsprach der Populationsverdopplungszeit. Die Wachstumskurven wurden in drei unabhängigen Untersuchungen für die verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen durchgeführt.

3.2.1.9 Bestimmung der akuten Toxizität mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenol-tetrazoliumbromid (MTT)

Zur Bestimmung der akuten Toxizität des in dieser Arbeit verwendeten Kanzerogens N²-OH-PhIP (3.1.4) wurde das schwach gelbe, membrangängige Tetrazoliumsalz MTT (3.1.4) verwendet. Es wird von intakten, lebenden Zellen endozytotisch aufgenommen und durch Oxidoreduktasen der Mitochondrien, des endoplasmatischen Retikulums und des Cytosols zu blauvioletter Formazan, unter Bildung nadelförmiger Kristalle, reduziert. Diese werden in Zellvesikeln gespeichert und exozytotisch aus der Zelle entfernt. Nach dem Lösen der Formazankristalle in organischem Lösungsmittel kann die Extinktion photometrisch bestimmt werden und als Maß für die Bestimmung der akuten Toxizität einer Substanz herangezogen werden.

Da tote Zellen nicht in der Lage sind, MTT zu Formazan umzusetzen, ist die gemessene Extinktion gleichzeitig ein Maß für die Anzahl der überlebenden Zellen. Für die Experimente zur chemischen Transformation der IEC-18-Zellen (3.1.7) wurde der MTT-Test zunächst durchgeführt, um eine geeignete Behandlungskonzentration für das verwendete Kanzerogen N²-OH-PhIP zu finden. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden die mehrfach behandelten Zellen mittels MTT-Test auf eine zunehmende Resistenz gegenüber der Behandlungssubstanz N²-OH-PhIP untersucht.

Die Durchführung des MTT-Testes erfolgte auf 96-Well-Platten als Achtfach-Bestimmung. Am Tag 1 wurden pro Kavität einer 96-Well-Platte 2000 Zellen in 200 µl Kulturmedium (3.1.5.1) eingesät und 24 h im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24 h hatten die Zellen zu 70-80 % konfluentes Wachstum erreicht. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit Behandlungsmedium verschiedener Konzentrationen versetzt. Die Behandlung (3.2.1.7) wurde über verschiedene Zeiträume durchgeführt. Drei Stunden vor Beendigung der Behandlung wurde das Behandlungsmedium zusätzlich mit MTT-Lösung versetzt, so dass sich im Medium eine MTT-Konzentration von 1,2 mM ergab. Am Ende des Behandlungszeitraumes wurde das Medium vorsichtig von den Zellen entfernt, der gebildete blaue Formazanniederschlag mit 100 µl DMSO (3.1.4) pro Well gelöst und die Viabilität der Zellen photometrisch mittels eines Elisa-Plate-Readers (3.1.1) bestimmt. Die Messung fand bei zwei Wellenlängen statt (540 nm und 690 nm); die bei 690 nm erhaltenen Absorptionswerte wurden von den bei 540 nm gemessenen Werten subtrahiert und gemittelt. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde prozentual zur Lösungsmittelkontrolle berechnet. Für die im Anhang in Tabelle A2 aufgeführten Zelltypen wurde die Viabilität bestimmt.

3.2.1.10 Transfektion von IEC-18 Zellen

Eine stabile Transfektion führt zum Einbau der eingeschleusten fremden DNA in das Genom der Empfängerzellen. Dieser Gentransfer kann über verschiedene physikalische Methoden (z.B. Kalziumphosphat-Kopräzipitation) oder unter Zuhilfenahme von Viren (z.B. Retroviren) erfolgen. In der vorliegenden Arbeit kamen beide Methoden zur Anwendung. Es wurden IEC-18-Zellen (3.1.7) mit verschiedenen Plasmiden (3.1.6), die unterschiedliche Antibiotikaresistenzen als Selektionsmarker trugen, transfiziert (3.2.1.10). Nähere Informationen zu den verwendeten Plasmiden sind den Plasmidkarten im Anhang (Abbildung A3 und A4) zu entnehmen.

Transfektion mittels Kalziumphosphat

Für die Kalziumphosphat-vermittelte Transfektion wurde die gereinigte DNA (3.2.3.4) mit Kalziumchlorid in Gegenwart von Phosphat gemischt, so dass ein feinkörniges DNA-Kalzium-Phosphat-Präzipitat entstand, das endozytotisch in die Empfängerzellen aufgenommen wurde. Vierundzwanzig Stunden vor der Transfektion wurden 7×10^5 IEC-18-Zellen in eine 10 cm Kulturschale eingesät, so dass sie am Tag der Transfektion 70-80 % Konfluenz erreicht hatten.

Zur Transfektion wurde ein Transfektionsansatz aus 600 μ l 2 x BBS-Puffer, 60 μ l CaCl_2 -Lösung und 15 μ g Plasmid-DNA in einem Polystyrolröhrchen unter leichtem Schwenken vermischt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 μ l ergänzt. Der Transfektionsansatz wurde zur Bildung des Kalziumphosphat-Präzipitates 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, bis eine leichte Trübung sichtbar wurde. Währenddessen wurde das Kulturmedium von den zu transfizierenden Zellen entfernt, die Zellen wurden mit Grundmedium (3.1.5.1) gewaschen und anschließend mit 12 ml Transfektionsmedium versetzt. Der Transfektionsansatz wurde auf die so behandelten Zellen getropft und durch leichtes Schwenken auf den Zellen verteilt. Die erfolgreiche Präzipitatbildung wurde als kristalliner Niederschlag im Medium mikroskopisch kontrolliert. Nach dreistündiger Inkubation bei 5 % CO_2 und 37 °C wurde das Transfektionsmedium entfernt, die Zellen mit Kulturmedium (3.1.5.1) gewaschen, weitere 24 h mit Kulturmedium inkubiert und anschließend auf fünf 10 cm Kulturschalen subkultiviert (3.2.1.2). Nach weiteren 48 h wurde das Kulturmedium gegen Selektionsmedium (3.1.5.1) ausgetauscht. Unter dem Selektionsdruck des Antibiotikums wachsen nur die Zellen klonal heran, die die Fremd-DNA inkorporiert haben, alle anderen Zellen sterben unter dieser Behandlung ab. Nach ca. 2 Wochen konnten mit bloßem Auge Zellklone deutlich erkannt werden. Diese wurden mittels steriler Klonierringe von den Kulturschalen einzeln abtrypsinisiert und in 6-Well-Platten unter andauerndem Selektionsdruck subkultiviert (3.2.1.2).

Transfektion mittels Retrovirus

Diese Methode eignet sich besonders für das Einschleusen fremder genetischer Information in ein Säuger genom, da Viren ein effektives System besitzen, um ihre DNA ins Wirtsgenom zu integrieren. Nur so können sie Zellen erfolgreich infizieren und sich vermehren.

Das retrovirale Gentransfersystem umfaßt zwei Komponenten, den retroviralen Vektor und die Verpackungszelllinie. Der retrovirale Vektor ist ein Plasmid, das in der Regel von pBR328 aus einem MoMuLV (moloney murine leukemia virus) abgeleitet ist. Er kodiert nicht für retrovirale Proteine, sondern verfügt nur über das Verpackungssignal und die retroviralen 5'- und 3'-LTR (long terminal repeat), die eine Insertionsstelle für das zu übertragende Gen sowie ggf. einen Selektionsmarker flankieren.

Die Verpackungszelllinie stellt die retroviralen Proteine zur Verfügung, die für die Verpackung der Vektor-RNA und somit für die Erzeugung retroviraler Partikel notwendig sind. Dabei handelt es sich um gag (Proteine des Viruskerns), pol (Reverse Transkriptase und Integrase) und env (Hüllproteine). Sie befinden sich hinter unterschiedlichen Promotoren, um eine Rekombination zu intaktem Virus auszuschließen und das System biologisch sicher zu machen. Zur Entstehung von replikationskompetenten Viren sind mindestens drei unabhängige Rekombinationsereignisse nötig.

Die Verpackungszelllinie wird hergestellt, indem Nukleinsäure (Helfergenom), welche für die retroviralen Strukturproteine kodiert, in eine Zelllinie eingeführt wird. Bei diesem Helfergenom ist das Verpackungssignal deletiert, so dass virale RNA, die in der Verpackungszelllinie von dem Helfergenom abgelesen wird, nicht in Virionen verpackt wird. Transfiziert man den retroviralen Vektor in die Verpackungszelllinie, erhält man ein komplementäres System, das replikationsdefekte Viren herstellt. Durch Zusammenbringen zweier getrennt defekter Teilsysteme, die sich aber gegenseitig ergänzen, können Viren erzeugt werden, die nur ein einziges Mal infektiös wirken. Je nach Art der vom Helfergenom exprimierten retroviralen Hüllproteine wird zwischen ecotropen und amphotropen Verpackungszelllinien unterschieden.

Bei der retroviralen Transfektion wird zunächst Vektor-DNA mittels Kalziumphosphat-vermittelter Transfektion (3.2.1.10) in eine Helferzelllinie (Verpackungszelllinie) eingeführt, so dass von der Vektor-DNA genomische RNA transkribiert werden kann. Da diese ein Verpackungssignal aufweist, wird sie mit den in der Helferzelle gebildeten viralen Proteinen zu rekombinanten Viruspartikeln zusammengebaut, die aus der Zelle in das Kulturmedium abgegeben werden. Diese rekombinante Viruspopulation wird im zweiten Schritt zum effizienten Gentransfer per Infektion in ausgewählte Zielzellen eingesetzt. In die Zielzellen wird die rekombinante DNA durch virale Mechanismen aufgenommen und in das zelluläre Genom eingebaut.

Zur retroviralen Transfektion von IEC-18-Zellen (3.1.7) wurden unterschiedliche Plasmide (Tabelle A3 im Anhang) und die sogenannte Helferzelllinie Phoenix Ψ (3.1.7) verwendet. Die Phoenix-Zellen wurden über zwei Passagen in einem hygromycinhaltigen Kulturmedium selektiert (3.2.1.6).

Vierundzwanzig Stunden vor der Transfektion der Helferzelllinie wurden 7×10^5 Phoenix-Zellen in einer 10 cm Kulturschale eingesät, so dass sie am Tag der Transfektion 70-80 % Konfluenz erreicht hatten. Die Transfektion der Phoenix-Zellen mit unterschiedlicher Plasmid-DNA wurde wie oben beschrieben (3.2.1.10, Transfektion mittels Kalziumphosphat) durchgeführt. Nach 24-stündiger Inkubation des Transfektionsansatzes bei 5 % CO_2 und 37 °C wurde das Transfektionsmedium entfernt, die Zellen mit Kulturmedium (3.1.5.1) gewaschen und weitere 24 Stunden mit Kulturmedium inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurden 3×10^5 IEC-18-Zellen in einer 6 cm Kulturschale eingesät, so dass sie am Tag der viralen Transfektion 70-80 % Konfluenz erreicht hatten. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion der Phoenix-Zellen wurde der Viruspartikel enthaltende Überstand abgenommen, durch einen 0,45 μm Sterilfilter gegeben und mit Polybren zu einer Endkonzentration von 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ versetzt. Das Kulturmedium der mittlerweile subkonfluenten IEC-18-Zellen wurde entfernt, die Zellen mit 2 ml Kulturmedium und 2 ml Virusüberstand mit Polybren versetzt und 48 h inkubiert. Anschließend wurden die infizierten Zellen mit Trypsin (3.1.4) von der Kulturschale gelöst und in Selektionsmedium mit Puromycin (3.1.5.1) im Verhältnis 1:3 subkultiviert.

3.2.1.11 Isolierung der Plasmide von Filterpapier (Lewinsky-Methode)

Zur Versendung per Post wurde DNA-Lösung auf sauberes Filterpapier aufgetropft, die betreffende Stelle mit einem Stift eingekreist und getrocknet. Zur Reaktivierung der DNA wurde die Stelle ausgeschnitten, in H_2O eluiert und mit der Lösung eine Transformation durchgeführt.

3.2.1.12 Restriktion von Plasmiden und PCR-Produkten

Mit Hilfe spezieller Restriktionsendonukleasen (3.1.6) wurden Plasmid-DNA sowie PCR- und RT-PCR-Produkte in spezifische Fragmente geschnitten. Auf diese Weise wurde die Identität der isolierten Nukleinsäuren überprüft. Die Enzyme wurden mit den entsprechenden Reaktionspuffern von der Firma Gibco bezogen und entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Die restringierte DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid (3.1.5.5) detektiert.

3.2.1.13 Herstellen von konditioniertem Kulturmedium

Vierhunderttausend Zellen wurden in einer 10 cm Kulturschale eingesät und 24 Stunden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der Medienüberstand abgenommen und zur Entfernung von Zellen bei 4 °C 10 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Das so gewonnene konditionierte Medium wurde im Kühlschrank bei 4 °C nicht länger als 1 Woche gelagert.

3.2.1.14 Wachstum im Softagar

Das tumorigene Potential der chemisch behandelten und/oder transfizierten Zellen wurde mittels Softagar-Assay untersucht. Das auf 37 °C temperierte doppelt konzentrierte konditionierte Kulturmedium (3.2.1.13) wurde im Verhältnis 1:1 mit 2 %-igem und auf 45 °C temperiertem Bactoagar (3.1.4) gemischt. Pro Kavität einer 6-Well-Platte wurden 2 ml dieser Mischung ausgebracht, so dass der Gefäßboden gleichmäßig bedeckt war. Die so beschichteten Platten verblieben ca. 15 min nicht abgedeckt unter der Sterilbank bis zum Festwerden des Bodenagars. In der Zwischenzeit wurden die zu untersuchenden Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS (3.1.5.1), Trypsinieren, Resuspendieren und Bestimmen der Zellzahl (3.2.1.3) auf eine Zellmenge von 2×10^4 Zellen/ml in doppelt konzentriertem, konditioniertem Kulturmedium eingestellt und sofort mit dem auf 45 °C temperierten 0,7 %-igen Bactoagar im Verhältnis 1:1 gemischt. Jeweils 2 ml dieser Agar-Zellsuspension wurden pro Kavität der 6-Wellplatte auf den vorbereiteten Grundagar gegeben. Einmal wöchentlich wurden 400 µl des jeweiligen doppelt konzentrierten, konditionierten Kulturmediums in jede Kavität pipettiert.

3.2.1.15 Isolierung selektierter Zellklone und Anzucht unter Selektionsdruck

Die Selektion der Zellen, die die gewünschten Plasmide in ihr Genom integriert hatten, erfolgte über die entsprechenden Antibiotikaresistenzen (G418 oder Puromycin). Die transfizierten Zellen (3.2.1.10) wuchsen nach etwa drei Wochen Kultivierung unter Selektionsdruck klonal. Zur Isolierung der einzelnen mit dem Auge erkennbaren Zellklone wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS (3.1.5.1) gewaschen und ein, in Klonierfett getauchter Metallkloniererring aufgesetzt. Anschließend wurden die Zellen innerhalb des Klonierendes mit 50 µl Trypsin (3.1.5.10) von der Schale abgelöst, die proteolytische Reaktion mit 100 µl Kulturmedium (3.1.5.10) beendet, die Zellen resuspendiert und in je eine Kavität einer 6-Well-Platte mit zwei ml Medium überführt. Die Zellen wurden unter Selektionsdruck subkultiviert (3.2.1.2) und kryokonserviert (3.2.1.4).

3.2.1.16 Immunzytochemischer Nachweis (Immunfärbung) in HCEC-Zellen

Der immunzytochemische Nachweis von mutiertem p53 und mutiertem β -Catenin erfolgte bei den mit N²-OH-PhIP (3.1.4) chemisch behandelten HCEC-Zellen (3.1.7). Als Positivkontrolle wurden SW-480 Zellen (3.1.7) für β -Catenin und die p53 überexprimierende Transfektante IEC-18-pcMV-hum-p53MT (3.1.7) für p53 verwendet. Die p53-Transfektante wurde zur Stabilisierung von p53 über 24h mit 40 mM LiCl behandelt (Langheinrich 2003).

Es wurden 250.000 Zellen auf 6-cm-Kulturschalen eingesät, nach 24 h mit PBS (3.1.5.1) gewaschen und mit Methanol (-20 °C) fixiert. Der immunzytochemische Nachweis wurde unmittelbar nach der Fixierung durchgeführt. Mit einem Wachsstift wurden auf jeder Schale drei Bereiche des Zellrasens kreisförmig umgrenzt, von denen später zwei mit jeweils einem Primärantikörper (3.1.6) behandelt wurden, der Dritte nur mit dem Sekundärantikörper (3.1.6) zur Überprüfung der unspezifischen Bindung.

Für die finale Färbung ist die Peroxidaseaktivität des Sekundärantikörpers ausschlaggebend. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität wurden die Zellen zunächst fünf Minuten mit 0,03 % (v/v) Wasserstoffperoxid behandelt, fünf Minuten mit PBS-T (3.1.5.9) gewaschen und 30 Minuten mit Blockierungslösung (3.1.5.9) aus 1 % Milchpulver und 1 % BSA in PBS-T inkubiert. Bei Raumtemperatur wurde anschließend ein Zellrasenbereich mit dem monoklonalen p53-Primärantikörper (3.1.6; 5 µg/ml) inkubiert, ein weiterer Bereich mit dem monoklonalen β -Catenin Primärantikörper (3.1.6, 1 µg/ml), während die Negativkontrolle weiterhin mit Blockierungslösung behandelt wurde.

Nach einer Stunde Inkubation wurde fünf mal fünf Minuten mit PBS-T gewaschen und anschließend die drei Zellrasenbereiche eine Stunde mit dem Sekundärantikörper (DAKO Envision + TM, Peroxidase, Maus) inkubiert. Zur Entfernung des überschüssigen Sekundärantikörpers wurden die Zellen fünf mal fünf Minuten mit PBS-T gewaschen und anschließend entsprechend der Herstellerangaben mit 3,3'-Diaminobenzidin (3.1.4; DAKO Liquid DAB + Substrate-Chromogen System) gefärbt. Die Umsetzung von 3,3'-Diaminobenzidin durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase zu einem rostroten Farbstoff, ermöglichte die lichtmikroskopische Auswertung der p53- bzw. β -Catenin-Antigen-Präzipitation. Die gefärbten Zellen wurden unter dem Mikroskop im Phasenkontrast betrachtet und mit der angeschlossenen Digitalkamera fotografiert.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Herstellung von Zellhomogenat

Die Zellen wurden zur Gewinnung von Zellhomogenat zweimal mit kaltem PBS (3.1.5.1) gewaschen, das Kulturgefäß auf Eis gestellt und pro cm² Wachstumsfläche mit 2 μ l Mucosa-Homogenisationspuffer (3.1.5.6) versetzt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Gefäßboden abgelöst, die Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß überführt und weiterhin auf Eis gelagert. Die Zellsuspension wurde durch Sonifizieren (3 Zyklen à 10 sec , Power 85 %, dazwischen je 30 sec Kühlung im Eisbad) homogenisiert. Das Zellhomogenat wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C kryokonserviert.

3.2.2.2 *Präparation subzellulärer Fraktionen mittels Ultrazentrifugation*

Die abtrypsinierten Zellen wurden in Kulturmedium (3.1.5.1) resuspendiert und deren Zellzahl bestimmt (3.2.1.3). Von der Zellsuspension wurden entsprechend 10^7 Zellen 10 min bei 1000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment zweimal mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 200 µl Mucosa-Homogenisationspuffer (3.1.5.6) resuspendiert und durch Sonifizieren aufgeschlossen (3 Zyklen à 10 sec, Power 85 %, dazwischen je 30 sec Kühlung im Eisbad). Anschließend wurde die zytosolische Fraktion durch eine einstündige Ultrazentrifugation bei 100 000 x g (45.000 rpm) und 4 °C von Membranen und anderen Zellorganellen getrennt. Der die löslichen Bestandteile enthaltende Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C kryokonserviert.

3.2.2.3 *Proteinbestimmung mit der Methode nach Bradford*

Zur Proteinbestimmung des Zellhomogenates und des Zytosols wurde die Methode von Bradford verwendet. Die Durchführung erfolgte mit Bradford-Reagenz (3.1.4; Roti®-Quant) nach dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll. Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurde BSA in Konzentrationen von 50-1000 µg/ml verwendet. Die photometrische Bestimmung der Extinktion erfolgte bei 595 nm.

3.2.2.4 *Ermittlung der GST-Aktivität im Zytosol von Zellen*

Die Aktivität der Glutathion-S-Transferasen wurde mit Hilfe von CDNB bestimmt. CDNB ist ein Substrat, das mit Ausnahme der Formen der Theta-Klasse von allen GST mit sehr hoher katalytischer Aktivität zu S-(2,4-Dinitrobenzyl)-Glutathion umgesetzt wird, welches photometrisch nachweisbar ist. Es dient daher als Maß für die Gesamtaktivität der im Zytosol enthaltenen GST-Isoformen.

Die kinetische Messung des Produktes erfolgte über einen Zeitraum von 2 min bei 340 nm. Der Nullabgleich wurde mit jeweils 0,8 ml Phosphatpuffer durchgeführt. Vor und nach der Messung der Proben wurden jeweils drei Reagenzienleerwerte ermittelt, da CDNB auch nichtenzymatisch umgesetzt werden kann, was zu falsch positiven Werten führt. Bei den Reagenzienleerwerten vor und nach der Probenmessung wurde eine Extinktionsänderung von bis zu 0,005 toleriert, bei stärkeren Abweichungen wurden die Messungen wiederholt.

Die verwendeten Proben der chemisch behandelten Zellen wurden 1:4 mit Phosphatpuffer verdünnt.

Die Reagenzienleerwerte und Proben wurden nach folgendem Schema direkt in Quarzküvetten pipettiert, gemischt und sofort gemessen.

Tabelle 3 Pipettierschema zur Messung der GST-Aktivität

	Probe	Reagenzienleerwert
0,1 M Phosphatpuffer	660 µl	740 µl
Glutathionlösung	40 µl	40 µl
Verdünntes Zytosol	80 µl	-
CDNB-Lösung	20 µl	20 µl
Ansatz mischen und sofort Kinetik messen		

Der verwendete Phosphatpuffer wurde auf 37 °C temperiert, alle anderen Lösungen wurden auf Eis gelagert.

Die GST-Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivität [nmol/mg Protein/min]} = (\Delta E / \text{min} \times V_{\text{Probe}} \times 1000 \times F) / (\varepsilon \times V_{\text{Cyt}} \times P \times d)$$

$$\Delta E / \text{min} = \Delta E / \text{min}_{\text{Probe}} - \Delta E / \text{min}_{\text{Leerwert}}$$

$$\Delta E / \text{min}_{\text{Leerwert}} = \text{Mittelwert aus den drei Reagenzienleerwerten am Ende der Messung}$$

$$V_{\text{Probe}} = \text{Endvolumen des Probenansatzes in ml (bzw. cm}^3\text{)}; V_{\text{Probe}} = 0,8 \text{ ml}$$

$$F = \text{Verdünnungsfaktor der Zytosolverdünnung}$$

$$\varepsilon = \text{Extinktionskoeffizient des GSH-Konjugates; } \varepsilon = 9,6 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$$

$$V_{\text{Cyt}} = \text{zur Analyse eingesetztes Volumen des Zytosols in ml}$$

$$P = \text{Proteingehalt des unverdünnten Zytosols in mg/ml}$$

$$d = \text{Schichtdicke der Küvette; } d = 1 \text{ cm}$$

$$10^6 = \text{Umrechnung von mmol auf nmol}$$

Als Grundlage diente das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$E = \log I_0/I = \epsilon \times c \times d \quad \text{bzw. } c = E/(\epsilon \times d)$$

3.2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteinfractionen unterschiedlicher Zellhomogenate unter denaturierenden Bedingungen wurde das diskontinuierliche System nach Laemmli (1970) mit einem 11 %-igen Trenngel (3.1.5.7) und einem 4 %-igen Sammelgel (3.1.5.7) verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel zur Denaturierung der Proteine mit 0,5 Volumen 3x Auftragspuffer (3.1.5.7) versetzt und fünf Minuten bei 96 °C erhitzt. Die Geltaschen wurden jeweils mit 50 µg Protein sowie mit 10 µl des Proteinmolekulargewichtsmarkers (3.1.4) befüllt. Die Gelelektrophorese wurde zunächst bei 50 mA, nach Erreichen des Trenngels bei 70 mA durchgeführt.

3.2.2.6 Western Blotting

Die im Polyacrylamidgel (3.1.5.7) aufgetrennten Proteine wurden mittels *Semi-Dry-Blotting*-Verfahren nach Kyhse-Andersen (1984) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Transfer wurde 80 min bei 200 mA durchgeführt. Zur Markierung der Referenzproteine und zur Überprüfung des gelungenen Transfers wurde die Membran kurz in Ponceau S-Färbelösung (3.1.5.7) inkubiert. Die rosa gefärbten Proteinbanden wurden mit der Digitalkamera des Eagle-Eye fotografiert. Durch Waschen in Wasser und 1x TBS-T (3.1.5.9) wurde die Membran entfärbt.

3.2.2.7 *Immunochemische Detektion*

Zum immunologischen Nachweis der Proteine wurden zunächst alle freien Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation mit der Blockierungslösung (3.1.5.9) für mindestens 1 h bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4 °C) abgesättigt. Die Membran wurde anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken mit primärem Antikörper (3.1.6) inkubiert, fünfmal 5 min mit 1x TBS-T (3.1.5.9) gewaschen, um nicht gebundene Antikörper-Moleküle zu entfernen, und danach 1 h mit sekundärem Antikörper (3.1.6) inkubiert. Primär- und Sekundärantikörper wurden in Blockierungslösung verdünnt. Vor der Detektion der nachzuweisenden Antigene mittels verstärkter Chemolumineszenz mit ECL-Detektionsreagenz (3.1.4) gemäß der Herstellerangaben wurde die Membran fünfmal 5 min mit 1x TBS-T gewaschen.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 *Kultivierung von Bakterien*

E.coli-Bakterien des Stammes DH5 α , die mit unterschiedlichen Plasmiden (3.1.6) transformiert worden waren, wurden als Startkulturen zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe dieser Startkulturen erfolgte die weitere Kultivierung in Ampicillin-haltigem LB-Medium (75 μ g Ampicillin/ml LB-Medium) (3.1.5.2) bei 37 °C und unter Schütteln (220 rpm) im Schüttelinkubator.

3.2.3.2 *Anlegen von Bakterienstammkulturen*

Zur Bakterienvermehrung wurden je 3 ml ampicillinhaltiges LB-Medium (3.1.5.2) in einem 15-ml Schraubröhrchen mit 100 μ l Bakterienstartkultur angeimpft und 3 h bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde der Bakteriensuspension Glycerin zugesetzt, bis eine Endkonzentration von 30 % erreicht war. Die Bakteriensuspension-Glycerin-Mischung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.2.3.3 Transformation von Bakterien

Einhundert Mikroliter einer kompetenten Bakterienkultur (*E. coli* DH5 α) wurden in ein auf Eis gelagertes Eppendorfgefäß pipettiert und mit maximal 5 μ l DNA-Volumen vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Mischung für 45 Sekunden auf 42 °C erwärmt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 1 ml LB-Medium vermischt und 1 h bei 250 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 100 μ l der Mischung auf Agarplatten (mit Selektionsmarker Ampicillin) ausplattiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die über Nacht gewachsenen Bakterienklone wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte abgehoben und in ein steriles Röhrchen mit 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (3.1.5.2) überführt. Der Deckel wurde lose aufgesetzt, und die Bakteriensuspension bei 37 °C und 220 rpm ca. 6 h inkubiert.

3.2.3.4 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen (3.2.3.3) wurde mit Hilfe des Plasmid Midi Kit von QIAGEN (3.1.4) entsprechend der Herstellerangaben isoliert und aufgereinigt. Genomische DNA und RNA aus kultivierten tierischen Zellen wurde mit Hilfe des Genomic DNA Kit (3.1.4) bzw. des Rneasy[®] Mini-Kit (3.1.4) von QIAGEN entsprechend der Herstellerangaben isoliert. Für die Reinigung der DNA aus Agarosegelen wurde das Qiaquick-Gelextration Kit[®] (3.1.4) von QIAGEN verwendet.

3.2.3.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur photometrischen Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Plasmid-DNA, genomischer DNA und RNA wurde die Extinktion der Nukleinsäurelösungen bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm gemessen. Die Extinktionen der bei 260 nm absorbierenden Basen der Nukleinsäuren wurden zur Berechnung der Nukleinsäurekonzentration verwendet, wobei für DNA bzw. RNA der Extinktionswert einer DNA- bzw. RNA-Konzentration von 50 µg/ml bzw. 40 µg/ml entsprach. Die Extinktionen der bei 280 nm absorbierenden Seitenketten der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin waren ein Maß für den Proteingehalt der photometrisch vermessenen Proben. Um für die sich anschließenden Untersuchungen mit DNA und RNA eine ausreichende Reinheit der Nukleinsäurelösung zu gewährleisten, sollte der Wert des Quotienten aus den bei 260 nm und 280 nm bestimmten Extinktionen über 1,7 liegen.

3.2.3.6 DNA-Aufbereitung mittels Präzipitation

Für die Transfektion tierischer Kulturzellen wurde die verwendete DNA mittels Präzipitation sterilisiert. Alle Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Ein Volumen DNA wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (3.1.4) und 3 Volumen Ethanol (96-100 %) durch mehrmaliges Invertieren vermischt, bei -80 °C über Nacht gefällt und anschließend 30 Minuten bei 13 000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die sedimentierte DNA mit 1,5 Volumen eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen, und die Zentrifugation wiederholt. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das DNA-Sediment an der Luft getrocknet, in TE-Puffer (3.1.4) oder Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR-Reaktionen wurde die BIOTAQ™ DNA-Polymerase der Firma BIOLINE und die mitgelieferten Lösungen 10x NH₄-PCR-Puffer, MgCl₂ (50 mM) verwendet. Die Herstellung des PCR-Ansatzes erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Bei jeder Reaktion wurde eine Negativkontrolle ohne Template-DNA mitgeführt, um eine Kontamination auszuschließen.

Tabelle 4 Pipettierschema bei Verwendung der BIOTAQ™ DNA-Polymerase

Komponente	Volumen/Reaktion	Finalkonzentration
<u>Mastermix</u>		
10x NH ₄ -Puffer (ohne MgCl ₂)	10 µl	1x
MgCl ₂ (50 mM)	8 µl	4 mM
dNTP-Mix (je 1 mM)	10 µl	100 µM/dNTP
Primer S (10 µM)	1 µl	1 µM
Primer R (10 µM)	1 µl	1 µM
<hr/>		
BIOTAQ™ DNA-Polymerase	1 µl	2 Units
dest. Wasser	variabel	-
<u>Template-DNA</u>	variabel	≤ 1µg
Gesamtvolumen	100 µl	

Nach Herstellung der PCR-Ansätze wurden die Reaktionsgefäße in das vorgeheizte PCR-Gerät überführt und das entsprechende Programm für das verwendete Primerpaar und die gewählte Zielsequenz gestartet (Tabelle 5). Die Abfolge der PCR-Programme war vom Hersteller der PCR-Kits vorgegeben, wobei die Annealing-Temperatur, die Extensionszeit und die Zyklenzahl variabel waren (Tabelle 6).

Tabelle 5 PCR-Grundprogramm bei Verwendung der BIOTAQ™ DNA-Polymerase

Schritt	Dauer	Temperatur
Initialer Aktivierungsschritt	5 min	95 °C
3-Schritt-Zyklus:		
Denaturierung	1 min	95 °C
Annealing	1 min	siehe Tabelle 6
Extension	1 min	72 °C
Abschließende Extension	5 min	72 °C
Zyklenzahl: 36		

Tabelle 6 Spezifikationen der durchgeführten PCR-Reaktionen

PCR zum Nachweis von	Primer	Annealing-Temperatur
β-Catenin Exon 3	h-b-cat-F2	61 °C
	h-b-cat-E3-R	
Hras Exon 1	Hras-hum-utr-S	68 °C
	Hras-hum-i1-R	
Hras Exon 2	Hras-hum-i1-S	61 °C
	Hras-hum-i2-R	
Kras Exon 1	Kras-hum-utr-S	58 °C
	Kras-hum-i1-R	
Kras Exon 2	Kras-hum-i1-S	61 °C
	Kras-hum-i2-R	

3.2.3.8 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) zum Nachweis von GST-T2

Die Verwendung des One Step RT-PCR-Kit der Firma QIAGEN (3.1.4) erlaubte bei der Durchführung der RT-PCR-Reaktionen die reverse Transkription der RNA in cDNA und die Amplifizierung der cDNA mittels PCR innerhalb eines Reaktionsansatzes.

Die Isolierung der RNA sowie die Gewinnung der cDNA wurden nach dem jeweiligen Protokoll des entsprechenden Kits der Firma QIAGEN durchgeführt (3.1.4) (siehe Tabelle 7-9).

Tabelle 7 Pipettierschema bei Verwendung des QIAGEN One Step RT-PCR Kit

Komponente	Volumen/Reaktion	Finalkonzentration
<u>Mastermix</u>		
5x QIAGEN One Step RT- PCR-Puffer	5 µl	1x
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl	400 µM/dNTP
Primer S (s. Tabelle 9)	1 µl	
Primer R (s. Tabelle 9)	1 µl	
Q-Solution	5 µl	1x
QIAGEN One Step RT-PCR- Enzymmix	1 µl	
Rnase-freies Wasser	variabel	
<u>Template-RNA</u>	variabel	1 µg
Gesamtvolumen	25 µl	

Tabelle 8 RT-PCR-Grundprogramm bei Verwendung des QIAGEN One Step RT-PCR Kit

Schritt	Dauer	Temperatur
Reverse Transkription	45 min	50 °C
Initialer PCR Aktivierungsschritt	15 min	95 °C
3-Schritt-Zyklus:		
Denaturierung	1 min	94 °C
Annealing	1 min	siehe Tabelle 9
Extension	1 min	72 °C
Abschließende Extension	10 min	72 °C

Zyklenzahl: 28-35

Tabelle 9 Spezifikationen der durchgeführten RT-PCR-Reaktionen

RT-PCR zum Nachweis von	Primer-Konzentration	Annealing-Temperatur	Probeentnahme nach Zyklus
GST-T2	rGST-T2-S (30 µM) rGST-T2-R (30 µM)	53 °C	33
β-Actin	rat-betaAct-4R (100 µM) rat-betaAct-3F (100 µM)	59 °C	33

3.2.3.9 Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis der Produkte aus PCR, RT-PCR und Restriktionsanalysen wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Zunächst wurde eine 2 %-ige Agaroselösung in 1x TAE-Puffer (3.1.5.5) in eine Gelkammer (3.1) mit eingesetztem Gelkamm gegossen. Nach Erkalten der Agarose wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer (3.1) überführt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Nach dem Entfernen des Kammes wurden die Geltaschen mit einer Mischung aus DNA-Lösung (1 Volumenteil) und Bromphenolblaupuffer (5 Volumenteile) (3.1.5.5) befüllt. Außerdem wurde ein variables Volumen DNA-Marker (3.1.4) zur Größenbestimmung der aufzutrennenden DNA-Banden auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 Volt so lange durchgeführt, bis der Blaupuffer etwa 1,5 cm vom unteren Rand des Geles entfernt war. Nach Beenden der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel für etwa 20 min in einer Ethidiumbromid-Lösung inkubiert. Da Ethidiumbromid zwischen die Basen der DNA-Doppelstränge interkaliert, konnten die DNA-Banden im Detektionsgerät (3.1.1) durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Gele wurden fotografisch dokumentiert und mittels geeigneter Software densitometrisch ausgewertet.

3.2.3.10 Postlabelling

Der Nachweis von DNA-Addukten in den für 24 Stunden mit 5 μM N²-OH-PhIP behandelten IEC-18-Zellen wurde freundlicherweise von Frau Dr. Heli Hollnagel in der Abteilung Ernährungstoxikologie des DIfE durchgeführt.

3.2.3.11 Sequenzierung

Zur Sequenzierung der PCR-Produkte wurde die Methode nach Sanger (Sanger 1977) verwendet. Die Sequenzierungen der DNA-Fragmente Hras Exon 1 und Exon 2, Kras Exon 1 und Exon 2 sowie β -Catenin Exon 3 wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Neuschäfer-Rube (Abteilung Biochemie und Pathobiochemie der Ernährung, IEW, Universität Potsdam) mit dem CEQ 2000 von Beckmann Coulter Bioresearch (3.1.1) sowie den dazugehörigen Reaktionslösungen durchgeführt.

3.2.4 *In vivo* Methoden

3.2.4.1 *Untersuchungen zur Tumorigenität von in vitro chemisch transformierten Human-Darmepithelzellen*

Zur Untersuchung der Tumorigenität der mit dem Kanzerogen N²-OH-PhIP *in vitro* behandelten humanen Zelllinie HCEC wurde ein Tierversuch durchgeführt. Konfluente N²-OH-PhIP-behandelte und lösungsmittelbehandelte HCEC Zellen wurden trypsinisiert und die abgelösten Zellen in phosphatgepufferter Salzlösung (3.1.5.1) resuspendiert. Eine Million Zellen jeder Behandlungsgruppe wurde subkutan in 7-8 Wochen alte SCID-Mäuse (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) injiziert. Pro Behandlungsgruppe wurden 8 Mäuse verwendet.

Die Mäuse wurden unter konventionellen Bedingungen in Käfigen mit Filterhauben gehalten und vor Versuchsbeginn 7 Tage adaptiert. Die Umgebungstemperatur betrug 22 °C, das Licht/Dunkel-Regime 12/12 Stunden. Zur Fütterung wurde ein Standardfutter verwendet (Altromin 1224) und Trinkwasser ohne Zusätze. Die Mäuse wurden nach der Injektion einmal pro Woche auf sichtbare Veränderungen untersucht, palpiert, und gewogen. Als die Tumore einen Durchmesser von 1 cm erreicht hatten, wurden die Tiere mittels Ethylether-Anästhesie getötet und das Tumorgewebe vorsichtig entfernt. Für die histologische Untersuchung wurde ein Teil jedes Tumors in 10 %-iger Formalinlösung (in phosphatgepufferter Salzlösung) fixiert, der Rest wurde bei -150 °C in Isopentan tiefgefroren und bei -80 °C für immunhistochemische Färbungen aufbewahrt. Mäuse, in denen Tumore nicht palpiert werden konnten, wurden 6 Monate nach Injektion der Zellen getötet.

3.2.5 *Histologische und Immunhistochemische Untersuchungen*

Teile der formalin-fixierten Tumorproben wurden mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und für die lichtmikroskopische Untersuchung der Tumorstruktur verwendet. Kryostatproben von 6 µm Dicke wurden in eiskaltem Aceton fixiert und mit monoklonalem Antiserum aus Maus gegen humanes Cytokeratin 19 gefärbt und anschließend mit dem korrespondierenden Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper behandelt. Die Peroxidasebindung wurde mittels 3,3'-Diaminobenzidin detektiert (Graham and Karnovsky, 1966).

4 Ergebnisse

4.1 *Expression relevanter Enzyme des PhIP-Metabolismus in IEC-18 und HCEC Zellen*

4.1.1 Immundetektion

Um Zellen mit N²-OH-PhIP transformieren zu können, müssen diese entweder Sulfotransferasen oder N-Acetyltransferasen besitzen. Daher wurde die Expression der SULT und NAT in IEC-18- und HCEC-Zellen mittels Western-Blotting (3.1.5.8) und immunchemischer Detektion (3.1.5.9) untersucht. Die Proteinfractionen wurden mittels SDS-PAGE getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit spezifischen Antikörpern (3.1.6) inkubiert. Die Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (3.1.6) wurden zur Detektion mittels Chemolumineszenz verwendet. Die verwendeten Proteinmengen wurden so gewählt, dass Signale vergleichbarer Intensität detektiert wurden. Als Positivkontrolle wurde Leberzytosol verwendet.

Sulfotransferasen

In früheren Arbeiten (Kirchner 2002) konnte bereits gezeigt werden, dass parentale IEC-18-Zellen keine Sulfotransferasen exprimieren. Um bei der Behandlung mit N²-OH-PhIP eine stärkere Bioaktivierung zum Sulfoxyester zu gewährleisten, wurden die IEC-18-Zellen mit dem pSI-hSULT 1A1 Plasmid stabil transfiziert (3.1.6). Für die weitere Behandlung mit N²-OH-PhIP und sich anschließende Untersuchungen wurde ein Klon, der die humane Sulfotransferase 1A1 stark exprimiert (IEC-18-pSI-hSULT 1A1), ausgewählt (Abbildung 5). Das Antiserum gegen rSULT 1A1 erkennt alle Sulfotransferase-Formen der Familie 1 der Ratte, wie bereits gezeigt werden konnte (Teubner 2001). In Abbildung 5 sind drei Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von 33 kD, 34,7 kD und 35 kD im Leberzytosol erkennbar; es handelt sich dabei um verschiedene Formen der SULT 1. Die Sulfotransferase 1A1 wurde von humanen Kolonepithelzellen (HCEC) deutlich exprimiert. Die mit hSULT 1A1 transfizierten IEC-18-Zellen exprimierten das Protein noch stärker.

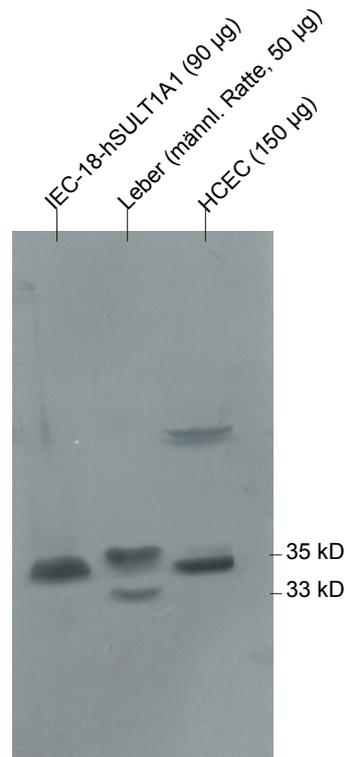


Abb. 5 Immundetektion von rSULT 1 in zytosolischen Fraktionen von IEC-18-pSI-hSULT 1A1, HCEC-Zellen und Leberzytosol der Ratte mittels Western-Blotting und immunchemischer Detektion.

Nach Gewinnung der zytosolischen Fraktionen aus IEC-18-pSI-hSULT 1A1 und HCEC-Zellen wurden unterschiedliche Proteinmengen der Proben (IEC-18-pSI-hSULT1A1: 90 µg; HCEC: 150 µg) mittels SDS-PAGE aufgetrennt; als Positivkontrolle wurden 50 µg Protein der zytosolischen Fraktion von Rattenleber verwendet. Die aufgetrennten Proteinfractionen wurden anschließend mittels Western-Blotting auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch einstündige Inkubation in 5 % (w/v) Lösung aus Magermilchpulver und 1 % (w/v) BSA in TBS-T blockiert. Nach fünfmaligem Waschen in TBS-T erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem rSULT 1A1-Antiserum aus Schaf. Nach dem sich anschließenden Waschen der Membran erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem Peroxidasegekoppelten Anti-Schaf-Antikörper. Die Detektion der Sulfotransferasen erfolgte mittels Chemolumineszenz. Die Sulfotransferasen der Familie 1 waren ausschließlich bei der Positivkontrolle im Bereich von 30-35 kD nachweisbar.

N-Acetyltransferasen

Abbildung 6 zeigt die Immundetektion der NAT2 im Zytosol der untersuchten Zellen IEC-18-pSI-hSULT 1A1 und HCEC sowie in Leberzytosol. Die Positivkontrolle zeigt eine deutliche Immunreaktion bei einem apparenten Molekulargewicht von 33 kD und 38 kD.

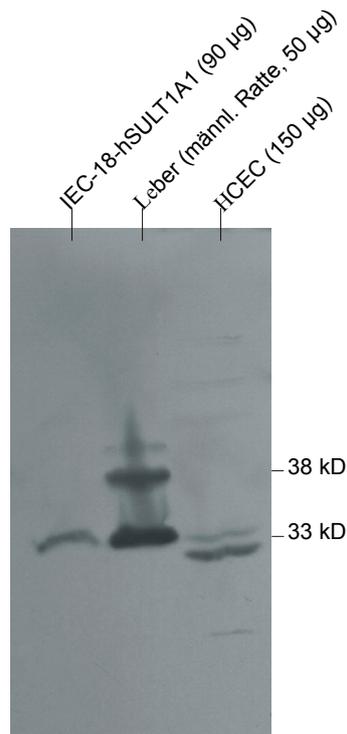


Abb. 6 Immundetektion von NAT2 in zytosolischen Fraktionen von IEC-18-pSI-hSULT 1A1, HCEC-Zellen und Leberzytosol der Ratte mittels Western-Blotting und immunchemischer Detektion

Nach Gewinnung der zytosolischen Fraktionen aus IEC-18-pSI-hSULT1A1, HCEC-Zellen wurden unterschiedliche Proteinmengen der Proben (IEC-18-pSI-hSULT1A1: 90 µg, HCEC: 150 µg) mittels SDS-PAGE aufgetrennt, als Positivkontrolle wurden 50 µg Protein der zytosolischen Fraktion von Rattenleber verwendet. Die aufgetrennten Proteinfractionen wurden anschließend mittels Western-Blotting auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch einstündige Inkubation in 5 % (w/v) Lösung aus Magermilchpulver und 1 % (w/v) BSA in TBS-T blockiert. Nach fünfmaligem Waschen in TBS-T erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem NAT2-Antiserum aus Kaninchen, welches mit NAT1 kreuzreagiert. Nach dem sich anschließenden Waschen der Membran erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörper. Die Detektion der N-Acetyltransferase 2 erfolgte mittels Chemolumineszenz. NAT2 war bei einem apparenten Molekulargewicht von 33 kD zu erkennen, NAT1 bei etwa 38 kD. Die Sulfotransferasen der Familie 1 waren ausschließlich bei der Positivkontrolle im Bereich von 30-35 kD nachweisbar.

Die untere Bande bei 33 kD stellt die NAT2 dar; die obere Bande bei 38 kD die NAT1, die mit dem Antiserum kreuzreagiert, dar. Die NAT2 wurde von den humanen Kolonepithelzellen und den mit hSULT 1A1 transfizierten IEC-18-Zellen exprimiert.

4.2 Behandlung von IEC-18-Zellen mit N²-OH-PhIP

Zur chemischen Transformation wurden IEC-18-Zellen über 25 Behandlungszyklen in drei Behandlungssträngen (siehe Tabelle A1 im Anhang) unterschiedlichen Konzentrationen N²-OH-PhIP und Serum ausgesetzt.

Einfluß der N²-OH-PhIP-Konzentration

Das morphologische Erscheinungsbild der parentalen Zelllinie ist durch die typische kopfsteinpflasterartige Zellform gekennzeichnet (Abbildung 7A). Die Behandlung der parentalen IEC-18-Zelllinie mit einer Konzentration von 15 µM N²-OH-PhIP über einen Zeitraum von etwa drei Stunden führte zum gänzlichen Absterben und Ablösen aller Zellen. Die Behandlung der Zellen mit Konzentrationen >5µM N²-OH-PhIP führte zum Absterben der Zellen innerhalb des Behandlungszeitraumes von 24 Stunden (Abbildung 7D). Bei der Behandlung mit 5 µM N²-OH-PhIP war ebenfalls eine Schädigung der Zellen nach 3-4 Stunden deutlich erkennbar (Abbildung 7B); es veränderte sich die Zellform, die Zellen nahmen eine langgestreckte Form an, ein Großteil starb ab. Im Vergleich zu der parentalen Zelllinie veränderten die überlebenden Zellen durch ein starkes Anwachsen des Cytoplasmas das Plasma-Kern-Verhältnis deutlich und zeigten im mikroskopischen Bild eine starke Transparenz (Abbildung 7C).

Nach einer Erholungsphase von 2-3 Tagen wuchsen diese Zellen zur Konfluenz heran (Abbildung 7E). Nach Erreichen der Konfluenz und anschließender erneuter Aussaat wuchsen die Zellen wieder kopfsteinpflasterartig.

Lediglich ab der 22. Behandlung mit hohen N²-OH-PhIP-Konzentrationen (15-20 µM) war eine Herdbildung im nichtkonfluenten Zustand zu erkennen (Abbildung 7F). Die Zellen dieser Herde ließen sich jedoch im Softagar nicht kultivieren. Eine Transformation der Zellen durch die Behandlungen mit dem Kanzerogen und daraus resultierende tumorigene Eigenschaften der herdbildenden Zellen kann daher ausgeschlossen werden. Die herdbildenden Zellen wuchsen nach erneuter Zelleinsaat kopfsteinpflasterartig wie die parentale Zelllinie und ohne Bildung von Herden (vgl. Abbildung 7A).

Im Vergleich zu den vorherigen Behandlungen wurde jedoch beobachtet, dass eine Konzentration von 5 μM $\text{N}^2\text{-OH-PhIP}$ nach etwa 12 Behandlungszyklen einen geringeren zytotoxischen Effekt auf die behandelten IEC-18-Zellen ausübte. Es starben weniger Zellen während und nach der Behandlung ab; die überlebenden Zellen erholten sich schneller und wuchsen in kürzerer Zeit wieder zur Konfluenz heran (vgl. Bestimmung der Viabilität 3.2.1.9).

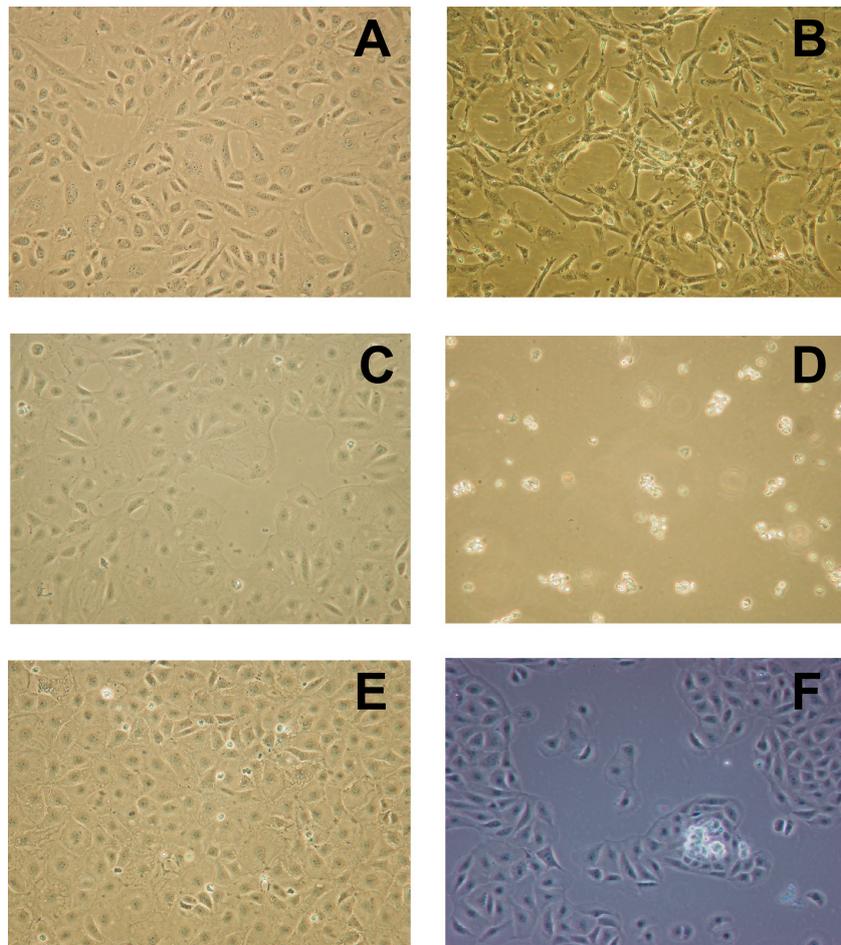


Abb. 7 Stadien des Zellwachstums von IEC-18-Zellen während der Behandlung mit $\text{N}^2\text{-OH-PhIP}$

(A) Parentale IEC-18 mit typisch kopfsteinpflasterartigem Wachstum; (B) IEC-18-Zellen während der Behandlung mit 5 μM $\text{N}^2\text{-OH-PhIP}$; (C) IEC-18-Zellen mit verändertem Plasma-Kern-Verhältnis nach $\text{N}^2\text{-OH-PhIP}$ -Behandlung; (D) abgestorbene IEC-18-Zellen während der ersten Behandlung mit 15 μM $\text{N}^2\text{-OH-PhIP}$; (E) konfluente, kopfsteinpflasterartige IEC-18-Zellen nach Behandlung mit $\text{N}^2\text{-OH-PhIP}$; (F) IEC-18-Zellen nach der 22. Behandlung mit ansteigenden $\text{N}^2\text{-OH-PhIP}$ -Konzentrationen wachsen kopfsteinpflasterartig und bilden Herde.

Einfluß des Serumgehaltes

Zur Erhöhung des Selektionsdruckes während der durch N²-OH-PhIP-Behandlung angestrebten Transformation der Zellen wurde der FBS-Gehalt bei einem Behandlungstyp schrittweise auf 0,6 % FBS minimiert (siehe Tabelle A1 im Anhang). Bei niedrigeren Serumgehalten oder serumfreiem Medium starben die Zellen ab und lösten sich von der Anheftungsfläche der Kulturschale ab (vgl. Abbildung 7D). Die Reduzierung des Serumgehaltes auf 0,6 % FBS führte nicht zu mikroskopisch erkennbaren morphologischen Veränderungen. Die Zellen wuchsen lediglich langsamer zur Konfluenz heran. Zellen, die in 0,6 % FBS-haltigem Medium kultiviert wurden, wuchsen auch nicht im Softagar. Die Transformation derartig behandelte und kultivierter IEC-18-Zellen kann also ausgeschlossen werden.

4.3 Nachweis von DNA-Addukten nach N²-OH-PhIP-Behandlung

Zum Nachweis von DNA-Addukten in den mit unterschiedlichen Konzentrationen N²-OH-PhIP behandelten IEC-18-Zellen wurden die kultivierten Zellen nach einer 24-stündigen Behandlung mit 5 µM N²-OH-PhIP mittels Postlabelling untersucht. DNA-Addukte konnten eindeutig nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung, H. Hollnagel, Abteilung Ernährungstoxikologie des DIfE).

4.4 Resistenz von IEC-18-Zellen gegenüber N²-OH-PhIP

4.4.1 Nachweis der Resistenz von IEC-18-Zellen gegenüber N²-OH-PhIP mit Hilfe eines Zytotoxizitätstests

Nach 12 Behandlungszyklen über jeweils 24 h mit einer Konzentration von je 5 µM N²-OH-PhIP im Kulturmedium starben während der Behandlung mit dem Kanzerogen sichtlich weniger Zellen ab als während und nach den bisherigen Behandlungszyklen. Aus diesem Grund wurden die Behandlungsbedingungen für die chemische Transformation der Zellen so variiert, dass drei unterschiedliche Behandlungstypen entstanden (vgl. Tabelle A1 im Anhang).

Zur Bestätigung des subjektiven Eindrucks eines verlangsamten Zellwachstums wurden die Zellen nach 15 und 25 Behandlungszyklen mit N²-OH-PhIP einem *in-vitro*-Zytotoxizitätstest (3.2.1.9) unterzogen und die Überlebensrate der Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit verschiedenen N²-OH-PhIP-Konzentrationen ermittelt (vgl. Tabelle A2 im Anhang). Zur Auswertung wurde die Viabilität der Zellen relativ zur Lösungsmittelkontrolle, die als 100 % betrachtet wurde, dargestellt.

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests nach 15 Behandlungen mit N²-OH-PhIP dargestellt. Parentale IEC-18-Zellen, behandelte IEC-18-Zellen (15 Zyklen, je 5 µM N²-OH-PhIP, 24 Stunden) und die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen wurden Konzentrationen von 1, 2,5, 5 und 10 µM N²-OH-PhIP über einen Zeitraum von 24 Stunden ausgesetzt, und die Viabilität der Zellen erfasst. Mit steigender Kanzerogenkonzentration sank die Viabilität der parentalen Zelllinie deutlich ab. Die 15-mal mit DMSO behandelten Kontrollzellen verhalten sich ebenso wie die parentalen Zellen. Hingegen ist bei den bereits 15-mal mit 5 µM N²-OH-PhIP behandelten IEC-18-Zellen eine deutliche Resistenz gegenüber N²-OH-PhIP zu beobachten. Die Viabilität der Zellen bleibt bei N²-OH-PhIP-Konzentrationen von 1 bis 10 µM unverändert.

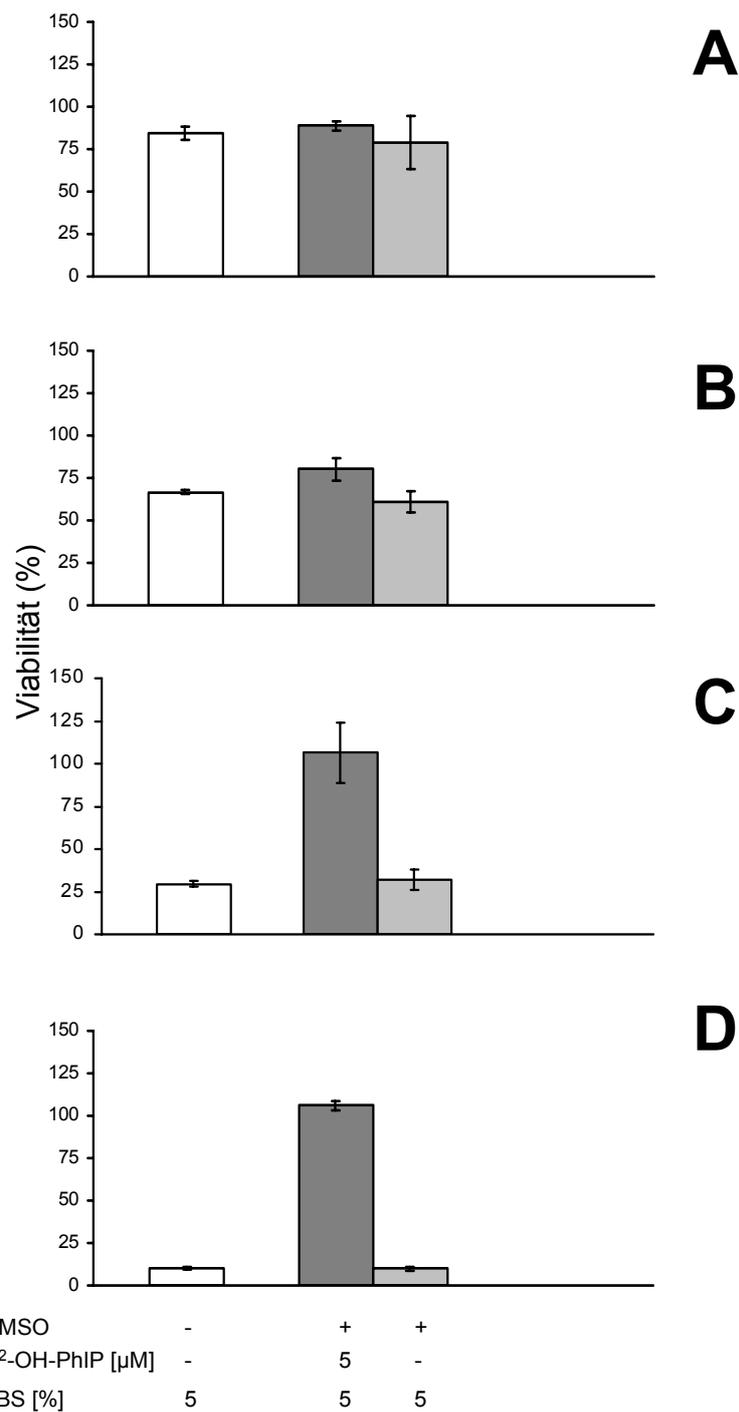


Abb. 8 Entwicklung einer Resistenz in IEC-18-Zellen gegenüber N²-OH-PhIP

Die Viabilität von IEC-18-Zellen (parental □, 15-mal N²-OH-PhIP-behandelt ■ und Lösungsmittelkontrolle ◐) wurde bei N²-OH-PhIP-Konzentrationen von 1 μM (A), 2,5 μM (B), 5 μM (C) und 10 μM (D) mittels eines *in-vitro*-Zytotoxizitätstests (MTT-Test) bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Untersuchungen, pro untersuchtem Zelltyp wurde eine 8-fach Bestimmung durchgeführt. Die Standardabweichungen sind dargestellt.

Abbildung 9 zeigt die Entwicklung einer Resistenz von IEC-18-Zellen gegenüber N²-OH-PhIP nach einer 25-maligen Behandlung mit N²-OH-PhIP, dargestellt im Vergleich zur Transfektante IEC-18-pSI-hSULT 1A1 und den jeweils dazugehörigen Lösungsmittelkontrollen.

Behandelte IEC-18-Zellen (25 Zyklen, je 5-20 µM N²-OH-PhIP, 0,6-5 % FBS, 24 Stunden; vgl. Tabelle A1 im Anhang), die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen und der SULT 1A1 exprimierende Klon IEC-18-pSI-hSULT 1A1 wurden zur Bestimmung der Viabilität mit 1, 2,5, 5 und 10 µM N²-OH-PhIP über einen Zeitraum von 24 Stunden behandelt.

Bei den niedrigen N²-OH-PhIP-Konzentrationen von 1 und 2,5 µM sind kaum Unterschiede in der Viabilität der behandelten Zellen (25 Zyklen N²-OH-PhIP) und der DMSO-Kontrollen erkennbar. Die Viabilität der 25-mal mit N²-OH-PhIP unterschiedlich behandelten Zellen (vgl. Tabelle A1 im Anhang) wird mit steigenden N²-OH-PhIP (5 und 10 µM) nicht reduziert, die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen zeigen jedoch mit steigender N²-OH-PhIP-Konzentration deutlich verminderte Viabilität im Test. Die 25-mal mit DMSO behandelten Lösungsmittelkontrollen zeigen bei ansteigender N²-OH-PhIP-Konzentration vergleichbares Verhalten wie die Lösungsmittelkontrollen der 15-mal mit DMSO behandelten Zellen und die parentale Zelllinie (vgl. Abbildung 8).

Ab einer N²-OH-PhIP-Konzentration von 5 µM war die erhöhte Viabilität der 25-mal behandelten Zellen im Vergleich zu den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen signifikant, ein noch stärkerer Effekt zeigte sich bei einer Konzentration von 10 µM N²-OH-PhIP. Der Vergleich der 25-mal behandelten Zellen untereinander zeigt, dass bei einer Konzentration von 10 µM N²-OH-PhIP der Zelltyp mit reduziertem Serum im Medium (25 Zyklen, 5 µM N²-OH-PhIP, FBS reduziert bis auf 0,6 %) eine niedrigere Viabilität besitzt als der Zelltyp mit gleichbleibenden Behandlungsbedingungen (25 Zyklen, 5 µM N²-OH-PhIP, 5 % FBS). Der Zelltyp mit ansteigenden N²-OH-PhIP-Konzentrationen während der Behandlung (25 Zyklen, 5-20 µM N²-OH-PhIP, 5 % FBS) zeigt bei 10 µM N²-OH-PhIP eine Viabilität von über 100 %, das heißt, die Zellen haben nicht nur die Behandlung überlebt sondern zeigen auch einen Proliferationsschub.

Der SULT 1A1 exprimierende Klon IEC-18-pSI-hSULT 1A1 zeigte im Test keine erhöhte Viabilität nach 5 Behandlungen mit 5 µM N²-OH-PhIP im Vergleich zur entsprechenden Lösungsmittelkontrolle. Die Transfektante verhält sich bei steigenden N²-OH-PhIP-Konzentrationen ebenso wie die Lösungsmittelkontrollen aller mehrfach behandelten IEC-18-Zellen (15 Zyklen oder 25 Zyklen) und vergleichbar der parentalen Zelllinie.

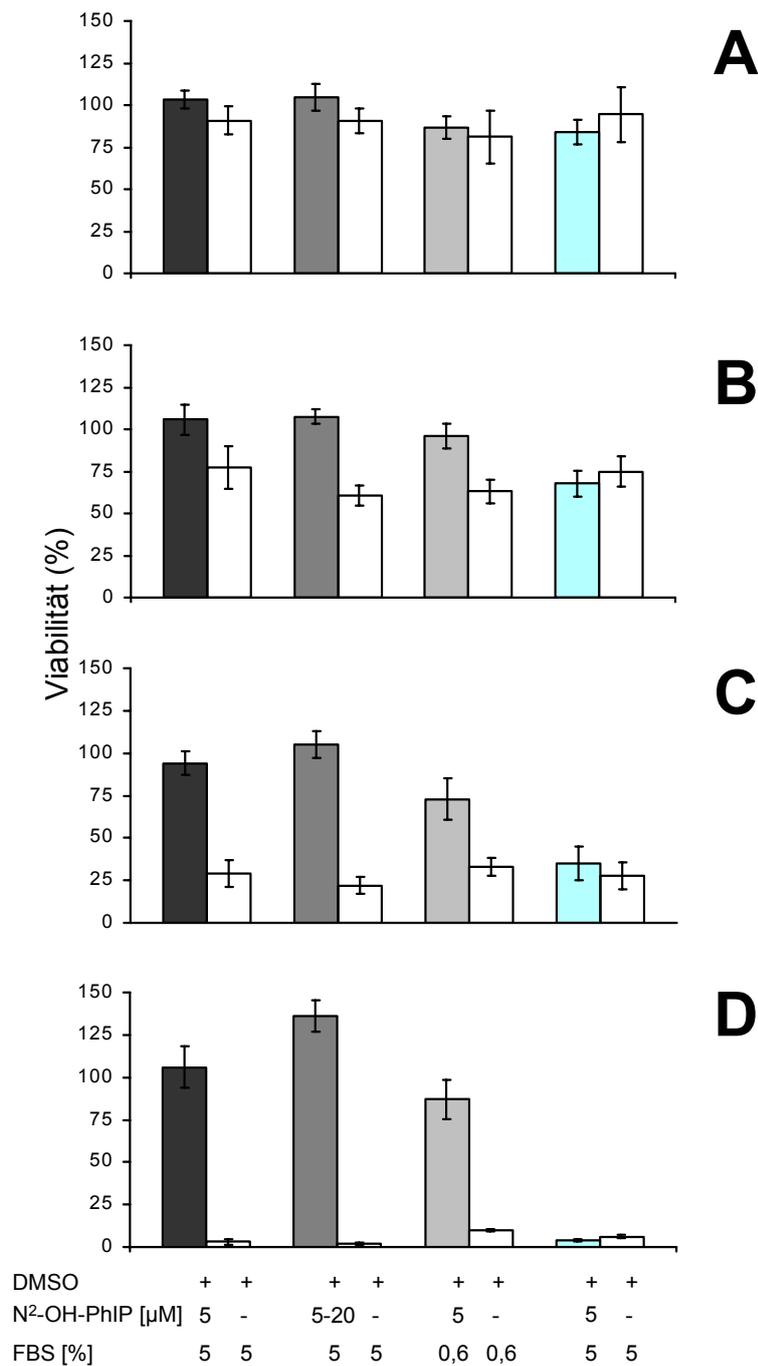


Abb. 9 Entwicklung einer Resistenz gegenüber N²-OH-PhIP in IEC-18-Zellen nach 25 Behandlungszyklen und in IEC-18-pSI-hSULT 1A1-Zellen nach 5 Behandlungszyklen

Die Viabilität der N²-OH-PhIP-behandelten IEC-18-Zellen (25-mal 5 μM ■, 25-mal 5-20 μM ■, 25-mal 5 μM mit reduziertem Serum ■) und IEC-18-pSI-hSULT 1A1-Transfektante (5-mal 5 μM ■) wurde bei N²-OH-PhIP-Konzentrationen von 1 μM (A), 2,5 μM (B), 5 μM (C) und 10 μM (D) mittels eines *in-vitro*-Zytotoxizitätstests (MTT-Test) bestimmt. Die Viabilität der entsprechenden Lösungsmittelkontrollen ist jeweils mit einem transparentem Balken dargestellt. Es handelt sich um Mittelwerte aus 3 unabhängigen Untersuchungen, pro untersuchtem Zelltyp wurde eine 8-fach Bestimmung durchgeführt. Die Standardabweichungen sind dargestellt.

4.4.2 Nachweis der Induktion von Glutathion-S-Transferasen in N²-OH-PhIP-behandelten IEC-18-Zellen

In den zytosolischen Fraktionen der mit N²-OH-PhIP behandelten IEC-18-Zellen wurde die GST-Aktivität gegenüber CDNB photometrisch bestimmt (3.2.2.4). Die nichtenzymatische Reaktion des Glutathion mit dem Substrat CDNB wurde bei der Berechnung der GST-Aktivität berücksichtigt. In vorherigen Arbeiten (Kirchner 2002) wurde die GST-Aktivität in zytosolischen Fraktionen parentaler IEC-18-Zellen bestimmt. Da es sich bei den IEC-18-Zellen um eine aus dem Ileum isolierte Zelllinie handelt, wurde die GST-Aktivität auch in zytosolischen Fraktionen von Rattenileum zum Vergleich bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass die GST-Aktivität der parentalen IEC-18-Zellen der im Rattenileum entsprach und in Leber etwa 20-fach höher war. In Übereinstimmung mit diesen bereits erhobenen Daten (Kirchner 2002) wurden die GST-Aktivitäten der zytosolischen Fraktionen der parentalen IEC-18-Zellen in dieser Arbeit mit vergleichbar niedrigen Werten bestimmt.

Abbildung 10 zeigt die signifikante Erhöhung der GST-Aktivität in den mit N²-OH-PhIP behandelten IEC-18-Zellen im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrollen und zur parentalen Zelllinie. Die GST-Aktivität der Zellen, die 25-mal mit 5 µM N²-OH-PhIP und bei 5 % FBS inkubiert worden sind, ist höher als die von Zellen, die mit steigenden N²-OH-PhIP-Konzentrationen behandelt worden sind (25 Zyklen, 5-20 µM N²-OH-PhIP, 5 % FBS). Beide besitzen eine höhere GST-Aktivität als Zellen, die mit reduziertem Serumgehalt in Kultur gehalten worden sind (25 Zyklen, 5 µM N²-OH-PhIP, FBS reduziert bis auf 0,6 %). Die GST-Aktivität der Lösungsmittelkontrollen entspricht der der parentalen Zelllinie ebenso wie der der unbehandelten SULT1A1-Transfektante (IEC-18-pSI-hSULT 1A1), der behandelten Transfektante (IEC-18-pSI-hSULT1A1, 5 Zyklen N²-OH-PhIP, 5 µM, 5 % FBS, 24h) und der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle. IEC-18-Zellen, die die Sulfotransferase 1A1 nach erfolgreicher Transfektion exprimieren (IEC-18-pSI-hSULT 1A1), zeigten eine mit der parentalen Zelllinie vergleichbare GST-Aktivität. Die GST-Aktivität dieses Zellklons blieb auch nach fünfmaliger Behandlung mit 5 µM N²-OH-PhIP auf dem Niveau der dazugehörigen Lösungsmittelkontrolle, der parentalen SULT 1A1-Transfektante und der parentalen Zelllinie IEC-18.

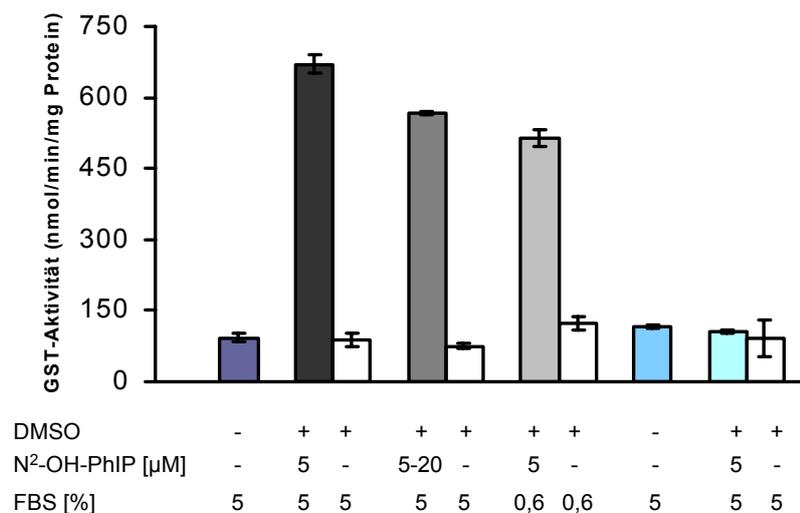


Abb. 10 Glutathion-*S*-Transferase Aktivität in N²-OH-PhIP-behandelten IEC-18-Zellen und IEC-18-pSI-hSULT 1A1-Zellen

Dargestellt ist die GST-Aktivität von IEC-18-Zellen: parental ■, N²-OH-PhIP-behandelt (■, ■, ■) und von der IEC-18-pSI-hSULT 1A1-Transfektanten: parental ■ bzw. N²-OH-PhIP-behandelt ■. Die Viabilität der entsprechenden Lösungsmittelkontrollen ist jeweils mit einem transparentem Balken dargestellt. Die zytosolischen Fraktionen der Zellen wurden aus dem postmitochondrialen Überstand durch Ultrazentrifugation gewonnen. Alle zytosolischen Fraktionen wurden nach Ermittlung der Proteingehalte nach Bradford auf einen äquilibrierten Proteingehalt von 5 mg/ml mit 0,1 M Na-K-Phosphatpuffer verdünnt und zur photometrischen GST-Aktivitätsmessung eingesetzt. Der Reaktionsansatz bestand aus der jeweils verdünnten Zytosolprobe, einer 0,2 mM GSH-Lösung und 0,1 M Na-K-Phosphatpuffer. Die Reaktion wurde mit 0,04 mM CDNB-Lösung gestartet und bei 340 nm über 2 min verfolgt. Pro Zelltyp wurden drei Zytosolfractionen isoliert, für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt (n=9). Die Standardabweichungen sind dargestellt.

Mittels spezifischer Antikörper gegen die einzelnen GST-Isoformen wurde weiterhin überprüft, welche Untereinheiten der Glutathion-*S*-Transferase durch die Behandlung mit N²-OH-PhIP induziert worden waren.

Zur Verfügung standen primäre Antiseren gegen folgende Untereinheiten der GST-Klassen:

Tabelle 10 Spezifische Antikörper gegen GST-Isoformen

Antikörper	GST-Klasse	Untereinheit (Nomenklatur nach Mannervik 1992)
Anti GST Y α	A (Alpha)	rGSTA1, rGSTA2
Anti GST Yc1	A (Alpha)	rGSTA3, rGSTA4
Anti GST Yb1	M (My)	rGSTM1
Anti GST Yf	Π (Pi)	rGSTP1

Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung der GST-Expression auf Proteinebene mittels Western-Blotting (3.2.2.6) und anschließender immunchemischer Detektion (3.2.2.7). Da die Glutathion-S-Transferasen nicht nur in Leberzytosol sondern auch in anderen Geweben der Ratte exprimiert werden (Kirchner 2002), wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zytosolische Fraktionen vom proximalen Jejunum und Kolon als Positivkontrollen verwendet. Außerdem wurden zytosolische Fraktionen aus dem Ileum der Ratte zum Vergleich untersucht, da es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinie IEC-18 um eine aus dem Rattenileum isolierte Zelllinie handelt. Um Signale mit vergleichbarer Intensität zu erlangen, wurden von allen Zytosolfraktionen der parentalen IEC-18-Zellen und der Mukosaproben 150 μ g Protein, von den zytosolischen Fraktionen der mit N²-OH-PhIP behandelten IEC-18-Zellen 40 μ g Protein, von den Zytosolen der entsprechenden Lösungsmittelkontrollen 150 μ g und 10 bzw. 50 μ g Protein des Leberzytosols eingesetzt.

In der parentalen Zelllinie IEC-18 konnten mittels Western-Blotting-Analyse (3.2.2.6) und anschließender immunchemischer Detektion (3.2.2.7) keine GST-Isoenzyme detektiert werden (Abbildung 12, Spur A).

In Übereinstimmung mit bisherigen Untersuchungen (Kirchner 2002) zeigte die Western-Blot-Analyse, dass die A-Klasse der GST am stärksten in der Leber zu finden ist und die Antiseren gegen die Untereinheiten A1, A3 und A4 dort auch am stärksten binden (Abbildung 11, Spur A und B).



Abb. 11 Immundetektion verschiedener GST-Untereinheiten in zytosolischen Fraktionen von IEC-18-hSULT 1A1-Zellen nach 5 Behandlungszyklen mit N^2 -OH-PhIP mittels spezifischer Antiseren und anschließender Luminol-Peroxidase-Reaktion.

(A) Leber, 50 μ g; (B) Leber, 10 μ g; (C) Kolon, 150 μ g; (D) IEC-18-hSULT 1A1, 150 μ g; (E) Molekulargewichtsmarker; (F) DMSO-Kontrolle zu G, 150 μ g; (G) IEC-18-hSULT 1A1, 150 μ g (5 Zyklen, 5 μ M N^2 -OH-PhIP, 5 % FBS); (H) Proximales Jejunum, 150 μ g; (I) Ileum, 150 μ g

Die zytosolische Fraktion des Kolons zeigte mit den Antiseren rGST-A1 und rGST-A3 eine äußerst geringe Reaktion, mit dem Antiserum rGST-A4 jedoch eine deutliche Reaktion (Abbildung 11, Spur C und Abbildung 12, Spur J). In der Western-Blot-Analyse zeigte die zytosolische Fraktion des proximalen Jejunums (Abbildung 11 Spur H und Abbildung 12 Spur G) mit den Antiseren rGST-A1 und rGST-A4 eine starke Reaktion, die bei rGST-A3 vollständig ausblieb. Die Antiseren rGST-A1 und rGST-A3 reagierten mit dem Zytosol des Ileums (Abbildung 11 Spur I) nicht, hingegen war eine starke Reaktion von rGST-A4 zu erkennen.

Die SULT 1A1 exprimierende IEC-18-Transfektante zeigt nach 5-facher Behandlung mit 5 μ M N²-OH-PhIP und nach 5-facher Behandlung mit DMSO keine Reaktion mit den Antiseren gegen die GST-A1 und GST-A3 (Abbildung 11, Spuren G und F), jedoch eine geringe Reaktion mit rGST-A4 (Abbildung 11, Spuren G und F). Die parentale Transfektante zeigte mit dem Antiserum gegen die GST-A1 keine Reaktion; mit den Antiseren gegen die GST-A3 und die GST-A4 war nur eine sehr leichte Reaktion zu beobachten (Abbildung 11, Spur D).

Die 25-fach N²-OH-PhIP-behandelten IEC-18-Zellen zeigten mit allen eingesetzten Antiseren der A-Klasse starke Reaktionen (Abbildung 12, Spuren B, E und H).



Abb. 12 Immundetektion verschiedener GST-Untereinheiten in zytosolischen Fraktionen von IEC-18-Zellen nach 25 Behandlungszyklen mit N²-OH-PhIP mittels spezifischer Antiseren und anschließender Luminol-Peroxidase-Reaktion.

(A) IEC-18-Zellen parental, 40 μ g; (B) IEC-18-Zellen, 40 μ g (25 Zyklen, 5 μ M N²-OH-PhIP, 5 % FBS); (C) DMSO-Kontrolle zu B, 150 μ g; (D) Molekulargewichtsmarker; (E) IEC-18-Zellen, 40 μ g (25 Zyklen, 5-20 μ M N-OH-PhIP, 5 % FBS); (F) DMSO-Kontrolle zu E, 150 μ g; (G) Proximales Jejunum, 150 μ g; (H) IEC-18-Zellen, 40 μ g (25 Zyklen, 5 μ M N²-OH-PhIP, 0,6 % FBS); (I) DMSO-Kontrolle zu H, 150 μ g; (J) Kolon, 150 μ g

Eine Ausnahme bezüglich der Expression in der Leber bildet die Pi-Klasse der Glutathion-S-Transferasen, da diese Enzyme beim Menschen vornehmlich im Urogenital-, Verdauungs- und Respirationstrakt exprimiert werden (Terrier et al. 1990) und nicht oder in vernachlässigbaren Mengen in der Leber. Bei einem apparenten Molekulargewicht von etwa 23 kD ist eine deutliche Reaktion des Antiserums in der zytosolischen Fraktion des proximalen Jejunums (Abbildung 11, Spur H und Abbildung 12 Spur G), des Kolons (Abbildung 11, Spur C und Abbildung 12 Spur J) und des Ileums (Abbildung 11 Spur I) zu sehen. In der löslichen Fraktion der Leber (Abbildung 11, Spur A und B) ist dagegen gar kein Signal zu erkennen, ebenso wie in den zytosolischen Fraktionen der parentalen IEC-18-Zellen (Abbildung 12, Spur A). Außerdem weisen die Proteine der zytosolischen Fraktionen aller mit N²-OH-PhIP behandelte IEC-Zellen deutliche Reaktionen mit dem Antiserum rGST-Pi auf (Abbildung 12, Spuren B, E, H). Die IEC-18-pSI-hSULT1A1-Transfektante zeigt parental und nach 5-facher Behandlung mit 5 µM N²-OH-PhIP eine deutlich verstärkte Reaktion mit dem Antiserum rGST-Pi (Abbildung 11, Spuren D und G).

Die Inkubation der Blotmembran mit dem Antiserum gegen rGST-M1 führte bei der zytosolischen Fraktion von Leber (Abbildung 11, Spur A und B) und Kolon (Abbildung 12, Spur J) zu einer starken Reaktion, die bei Proximalem Jejunum (Abbildung 11, Spur H) und Ileum (Abbildung 11, Spur I) vollständig ausblieb. Die zytosolischen Fraktionen der 25-fach N²-OH-PhIP-behandelten Zellen (Abbildung 12, Spuren B, E, H) führten bei der Inkubation mit rGST-M1 zu einer starken Reaktion, ebenso wie die 5-fach N²-OH-PhIP-behandelte SULT 1A1-Transfektante (Abbildung 11, Spur G). Hingegen zeigte die parentale und 5-mal mit DMSO behandelte SULT 1A1-Transfektante (Abbildung 11, Spuren D, F) keine Reaktion mit dem Antiserum.

4.4.3 Nachweis der Expression von GST-T2

Die T2-Isoform der GST konnte ausschließlich mittels RT-PCR nachgewiesen werden (3.2.3.8). Aus den zu untersuchenden Zellen wurde RNA isoliert (3.2.3.4) und in eine RT-PCR Reaktion (3.2.3.8) mit spezifischen Oligonukleotiden (3.1.6) eingesetzt. Zur Gewährleistung einer semiquantitativen Auswertung der GST-T2-mRNA-Expression wurde während der exponentiellen Phase der Amplifizierung der aus der RNA-Matrize gebildeten GST-T2-cDNA eine Probe entnommen, da in dieser Phase unterschiedliche Ausgangsmengen an Template-RNA in unterschiedlichen Produktmengen resultieren.

Zur Verifizierung der Ergebnisse der GST-T2-RT-PCR war der Nachweis gleicher RNA-Ausgangsmengen in der RT-PCR zu erbringen. Als interner Standard wurde β -Actin-mRNA mittels β -Actin-spezifischer Oligonukleotide (3.1.6) in einer separaten RT-PCR-Reaktion amplifiziert, wobei RNA aus jeweils denselben Proben und in derselben Menge eingesetzt wurde wie bei der GST-T2-RT-PCR. Während der exponentiellen Amplifizierungsphase wurde ebenfalls je eine Probe aus den Reaktionsgefäßen entnommen.

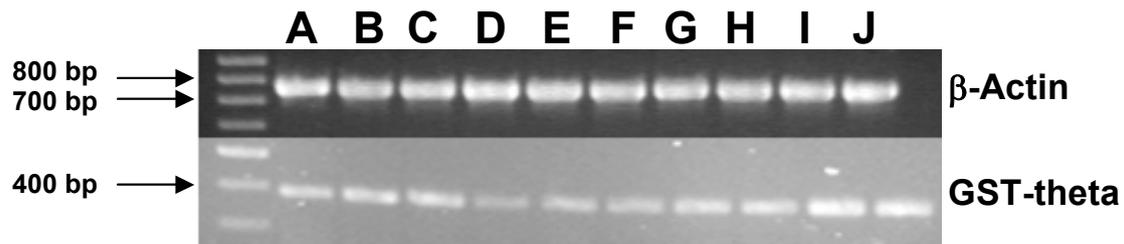


Abb. 13 Nachweis der Expression von GST-T2 und β -Actin als Standard in N^2 -OH-PhIP behandelten IEC-18-Zellen und IEC-18-pSI-hSULT 1A1

(A) IEC-18-pSI-hSULT 1A1; (B) DMSO-Kontrolle zu E; (C) IEC-18-Zellen, 25-mal behandelt mit $5 \mu\text{M}$ N^2 -OH-PhIP, 0,6 % FBS; (D) IEC-18 parental; (E) IEC-18-pSI-hSULT 1A1, 5-mal behandelt mit $5 \mu\text{M}$ N^2 -OH-PhIP, 5% FBS; (F) DMSO-Kontrolle zu J; (G) DMSO-Kontrolle zu I; (H) DMSO-Kontrolle zu C; (I) IEC-18-Zellen, 25-mal behandelt mit $5 \mu\text{M}$ N^2 -OH-PhIP, 5 % FBS; (J) IEC-18-Zellen, 25-mal behandelt mit 5-20 μM N^2 -OH-PhIP, 5 % FBS.

Mittels eines RNA-Isolierungskits (Qiagen) wurde nach Vorschrift des Herstellers die Gesamt-RNA aus den zu untersuchenden Zellen isoliert. Für den Nachweis von GST-T2 und β -Actin auf mRNA-Ebene wurden an die Matritze die jeweiligen spezifischen Oligonukleotide hybridisiert, mittels Reverser Transkriptase (RT) die cDNA erzeugt und diese durch sich anschließende PCR amplifiziert. Da die Annealingtemperaturen der beiden Primerpaare stark variierten, wurde für die Reaktionen der gleiche Mastermix verwendet, die jeweiligen RT-PCR-Programme jedoch in getrennten PCR-Cyclern durchgeführt. Die gewonnenen RT-PCR Produkte wurden nach 28 und 33 Zyklen auf einem 2 %-igen Agarosegel elektrophoretisch separiert und nach Inkubation in Ethidiumbromidlösung mit Hilfe eines UV-Detektionssystems und dazugehöriger Software detektiert und ausgewertet. Als Standard diente der Molekulargewichtsmarker der Firma Fermentas.

Abbildung 13 zeigt das Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese der in der exponentiellen Phase entnommenen RT-PCR-Produkte. In allen Proben konnte GST-T2-mRNA nachgewiesen werden. Es wurde eine Bande mit einer Länge von etwa 400 bp detektiert. Die Produktlänge stimmt mit der von Ogura publizierten (Ogura 1994) und in der Genbank vorhandenen GST-T2-cDNA-Sequenz der Ratte von 383 bp überein (Genbank-Nr. D-38556).

Die mit N²-OH-PhIP behandelten IEC-18-Zellen zeigen eine deutlich erhöhte (Abbildung 13, Spuren I und J) beziehungsweise leicht erhöhte (Abbildung 13, Spur E) Expression von GST-T2 im Vergleich zu der parentalen Zelllinie (Abbildung 13, Spur D). Die zu den unterschiedlichen Behandlungen gehörenden Lösungsmittelkontrollen (Abbildung 13, Spuren F, G und H) exprimierten GST-T2 in etwa vergleichbarem Maße wie IEC-18-pSI-hSULT 1A1 parental (Abbildung 13, Spur A). Die Expression nach fünf Behandlungszyklen mit N²-OH-PhIP ist bei IEC-18-pSI-hSULT 1A1 (Abbildung 13, Spur E) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 13, Spur B) leicht erhöht. β -Actin-RNA (RT-PCR-Produkt mit der erwarteten Länge von 768 Basenpaaren) konnte ebenfalls in allen Proben nachgewiesen werden.

4.4.4 Quantifizierung der Expression von GST-T2 mittels semiquantitativer RT-PCR

Zur Abschätzung des Expressionsniveaus des GST-T2 wurden die Agarosegele mit der entsprechenden Software densitometrisch ausgewertet. Die optische Dichte der Banden wurde zur optischen Dichte der Fragmente eines DNA-Massenmarkers ins Verhältnis gesetzt.

Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der semiquantitativen RT-PCR sind in Tabelle 11 aufgeführt. Die Behandlung der IEC-18 und IEC-18-pSI-hSULT 1A1 mit N²-OH-PhIP bewirkte eine Induktion der mRNA von GST-T2. Besonders stark ist die Expression der GST-T2-mRNA bei den drei unterschiedlich behandelten IEC-18-Zelltypen. In parentalen IEC-18, parentalen IEC-18-pSI-hSULT 1A1 und den jeweiligen Lösungsmittelkontrollen ist die Expression deutlich niedriger. Die densitometrische Auswertung der β -Actin-Banden ergab, dass in allen Proben die Menge an β -Actin-mRNA vergleichbar war, ein Beleg für den Einsatz gleicher RNA-Ausgangsmengen in den Reaktionsansätzen.

Tabelle 11 Densitometrische Auswertung der semiquantitativen RT-PCR zum Nachweis von GST-T2

Die nach densitometrischer Auswertung erhaltenen Werte $OD_{\beta\text{-Actin}}$ und $OD_{\text{GST-T2}}$ der gelelektrophoretisch separierten RT-PCR Produkte wurden zur Basis 2 logarithmiert und durch Quotientenbildung $\log_2(OD_{\text{GST-T2}})/\log_2(OD_{\beta\text{-Actin}})$ auf β -Actin normiert.

	$\text{Log}_2(OD_{\text{GST-T2}})^1$	$\text{Log}_2(OD_{\beta\text{-Actin}})^1$	$\text{Log}_2(OD_{\text{GST-T2}})/\text{Log}_2(OD_{\beta\text{-Actin}})$
IEC-18 25-mal 5 μ M N ² -OH-PhIP 5 % FBS im Medium DMSO-Kontrolle	7,54	8,17	0,92
IEC-18 25-mal 5 μ M N ² -OH-PhIP 0,6 % FBS im Medium DMSO-Kontrolle	7,21	7,94	0,91
IEC-18 25-mal 5-20 μ M N ² -OH-PhIP 5 % FBS im Medium DMSO-Kontrolle	7,26	8,16	0,89
IEC-18 DMSO-Kontrolle	5,55	8,14	0,68
IEC-18-pSI-hSULT 1A1 DMSO-Kontrolle	5,89	7,97	0,74
IEC-18-pSI-hSULT 1A1 5-mal 5 μ M N ² -OH-PhIP DMSO-Kontrolle	6,28	8,15	0,77
	6,84	7,83	0,87

Die densitometrische Auswertung der RT-PCR bestätigte den optischen Eindruck der Gelelektrophorese. Die RNA der Zellen, die mit N²-OH-PhIP behandelt waren, zeigte im Vergleich zu den mit DMSO-behandelten und den parental Zellen stärker ausgeprägte Banden, die sich in leicht erhöhten Werten in der Quantifizierung widerspiegeln.

4.5 Transfektionen der IEC-18-Zelllinie

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die verwendete Zelllinie IEC-18 mit verschiedenen Methoden und unterschiedlichen Plasmiden transfiziert. Eine Aufstellung der durchgeführten Transfektionen an IEC-18-Zellen ist in Tabelle A3 im Anhang zu finden. Die zur Verfügung gestellte Transfektante IEC-18-pcMV-hum-p53MT wurde ebenfalls transfiziert (Tabelle A4 im Anhang). Die Vektorkarten sind ebenfalls im Anhang dargestellt (Abbildung A3 und A4).

4.5.1 Etablierung einer hSULT 1A1 exprimierenden IEC-18-Zelllinie

In vorherigen Arbeiten wurde die Enzymausstattung der Zelllinie IEC-18 eingehend untersucht. Es konnte keine Expression von Sulfotransferasen nachgewiesen werden (Kirchner 2002). Um bei der Behandlung mit N²-OH-PhIP eine verstärkte Bioaktivierung zum N-Sulfoxyester zu erzielen, wurde das pSI-hSULT 1A1-Plasmid (Abbildung A3 im Anhang) mittels Kalziumphosphat-vermittelter Transfektion stabil in IEC-18-Zellen transfiziert. Die Transfektion wurde als Kotransfektion mit dem Plasmid pBSdelta-pac, das eine Puromycinresistenz trug, durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden HCEC-Zellen (humane Kolonepithelzellen) verwendet. Anders als in früheren Arbeiten, in denen diese Transfektion nicht gelang (Kirchner 2002), wurde die Transfektion im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgreich durchgeführt. Abbildung 5 zeigt den immunchemischen Nachweis von humaner Sulfotransferase 1A1 in IEC-18-Zellen, die mit pSI-hSULT 1A1 mittels Kalziumphosphat-vermittelter Transfektion erfolgreich transfiziert wurden. Die Sulfotransferasen der Familie 1 waren ausschließlich im Bereich von 30-35 kD nachweisbar.

4.5.2 Transfektion von IEC-18-Zellen mit β -Catenin

Um das humane β -Catenin in IEC-18-Zellen stark zu exprimieren, wurde die Zelllinie IEC-18 mit dem Plasmid pcDNA3-h- β -Catenin bzw. β -Catenin-MT (Abbildung A4 im Anhang) einer Kalziumphosphat-vermittelten Transfektion unterzogen. Die Plasmide haben eine Länge von 7778 bp, wobei der Vektor 5446 bp und das Insert 2332 bp umfaßt. Das Plasmid pcDNA3-h- β -Catenin-MT besitzt eine Punktmutation (S33Y) in Codon 33 (Exon 3). Das Codon 33 ist hier von „TCT“ zu „TAT“ verändert, was bei der Proteinexpression in einem Austausch der Aminosäure Serin gegen Tyrosin resultiert.

Zum Nachweis der stabilen Integration der Plasmide pcDNA3-h- β -Catenin bzw. -MT in das Genom von IEC-18-Zellen wurde eine PCR mit den Primern r- β -Cat-F2 und r- β -Cat-Ex3/692as durchgeführt. Die verwendeten Primer führten zur Amplifizierung des Exon 3 des r- β -Catenin- und des h- β -Catenin-Gens; unter den angegebenen Bedingungen (3.2.3.7) war ein PCR-Produkt mit der erwarteten Länge von 212 bp zu beobachten (Abbildung 14). Abbildung 14 zeigt die PCR-Produkte mehrerer Transfektanten nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pcDNA3-h- β -Catenin verwendet.

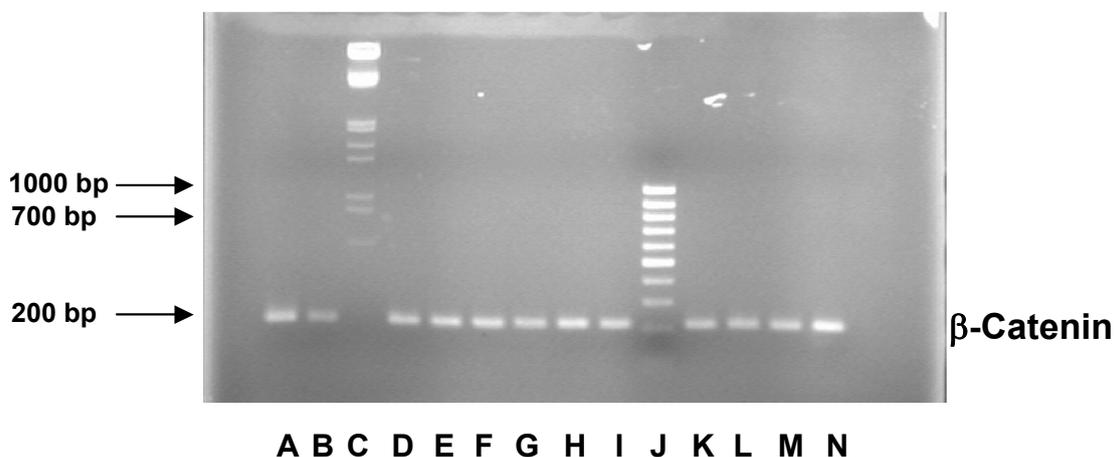


Abb. 14 Nachweis der Integration von β -Catenin in IEC-18-Zellen

Mittels PCR wurde genomische DNA der Transfektanten amplifiziert. Je 10 μ l der PCR-Produkte wurden in einem 2 %-igen Agarosegel elektrophoretisch separiert und mit Ethidiumbromid unter UV-Licht detektiert. Als Positivkontrolle wurden das Plasmid pcDNA3-h- β -Catenin in die PCR-Reaktion eingesetzt. (A, B, D, E, F) pcDNA3-h- β -Catenin-Transfektanten, (C, J) Marker, (G, H, I, K, L, M) pcDNA3-h- β -Catenin-MT-Transfektanten, (N) Positivkontrolle (Plasmid pcDNA3-h- β -Catenin)

Zum Nachweis der stabilen Expression des β -Catenins wurden die Transfektanten mittels Western-Blotting (3.2.2.6) und anschließender Immundetektion (3.2.2.7) untersucht. Verwendet wurde ein gegen β -Catenin gerichteter monoklonaler Antikörper (3.1.6) und ein gegen das FLAG-Epitop des FLAG-markierten Fusionsproteins gerichtetes primäres Antiserum (3.1.6). Die Inkubation mit den spezifischen Antiseren führte zu keinem immunchemisch detektierbaren Ergebnis. Desweiteren zeigten die transfizierten Zellen keinerlei morphologische Abweichungen von den parentalen Zellen; sie wuchsen unter Selektionsdruck in antibiotikumhaltigem Kulturmedium. Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurden die IEC-18-Zellen retroviral mit pBabe-Puro- β -Catenin S33Y (3.1.6) transfiziert (Anhang Tabelle A3).

Nach Infektion der IEC-18-Zellen mit dem virushaltigen Mediumüberstand der Phönixzellen wuchsen die IEC-18-pBabe-Puro- β -Catenin-S33Y-Transfektanten ohne morphologische Abweichungen von der parentalen Zelllinie unter Selektionsdruck in antibiotikumhaltigem Kulturmedium. Zum Nachweis des Hämagglutinin-markierten (HA) Fusionsproteins wurde die Proteinfraction der Transfektanten gelelektrophoretisch separiert, auf Nitrozellulose immobilisiert und anschließend mit einem spezifisch gegen HA gerichteten primären Antiserum inkubiert. Dies führte zu keinem immunchemisch detektierbaren Ergebnis.

4.5.3 Transfektion von IEC-18-pcMV-hum-p53 MT mit β -Catenin

Um das humane β -Catenin in IEC-18-Zellen stark zu exprimieren, wurde die neu etablierte p53-überexprimierende Zelllinie IEC-18-pcMV-hum p53 MT (unveröffentlichte Daten, Teubner 2003) einer retroviralen Transfektion mit mutiertem β -Catenin unterzogen. Die auf diese Art entstandene Doppel-Transfektante IEC-18-pcMV-hum-p53 MT-pBabe-Puro- β -Catenin-S33Y exprimierte mutiertes humanes p53 (unveröffentlichte Daten, Teubner 2003) und enthielt außerdem die Geninformation für mutiertes β -Catenin aus der Maus (98% Homologie zu Mensch).

4.5.4 Behandlung der Transfektanten mit N²-OH-PhIP

Die transfizierten Zelllinien IEC-18-pSI-hSULT1A1, IEC-18-pBabe-Puro- β -Catenin-S33Y und IEC-18-pcMV-hum-p53-MT pBabe-Puro β -Catenin-S33Y wurden fünf Behandlungszyklen mit 5 μ M N²-OH-PhIP, jeweils für 24 h, unterzogen. Dies führte nicht zu sichtbaren morphologischen Veränderungen der Zellen und nicht zur chemischen Transformation. Die behandelten Transfektanten wurden einem Zytotoxizitätstest (3.2.1.9) zur Bestimmung der Viabilität bei unterschiedlichen Konzentrationen N²-OH-PhIP unterzogen. Die fünfmal mit jeweils 5 μ M N²-OH-PhIP behandelten Transfektanten IEC-18-pSI-hSULT 1A1 und IEC-18-pcMV-hum-p53-MT pBabe-Puro β -Catenin-S33Y starben während des Zytotoxizitätstests vollständig ab. Lediglich die Behandlung der IEC-18-pBabe-Puro- β -Catenin-S33Y-Transfektante mit verschiedenen Konzentrationen an N²-OH-PhIP und DMSO führte zu auswertbaren Ergebnissen.

Bei allen verwendeten N²-OH-PhIP-Konzentrationen verhalten sich die untersuchten Zellen sehr ähnlich. Es ist kein Unterschied in der Viabilität und keine Entwicklung einer Resistenz zwischen der mit N²-OH-PhIP- oder mit DMSO-behandelten IEC-18-pBabe-Puro- β -Catenin-S33Y-Transfektante und der parentalen Zelllinie zu erkennen.

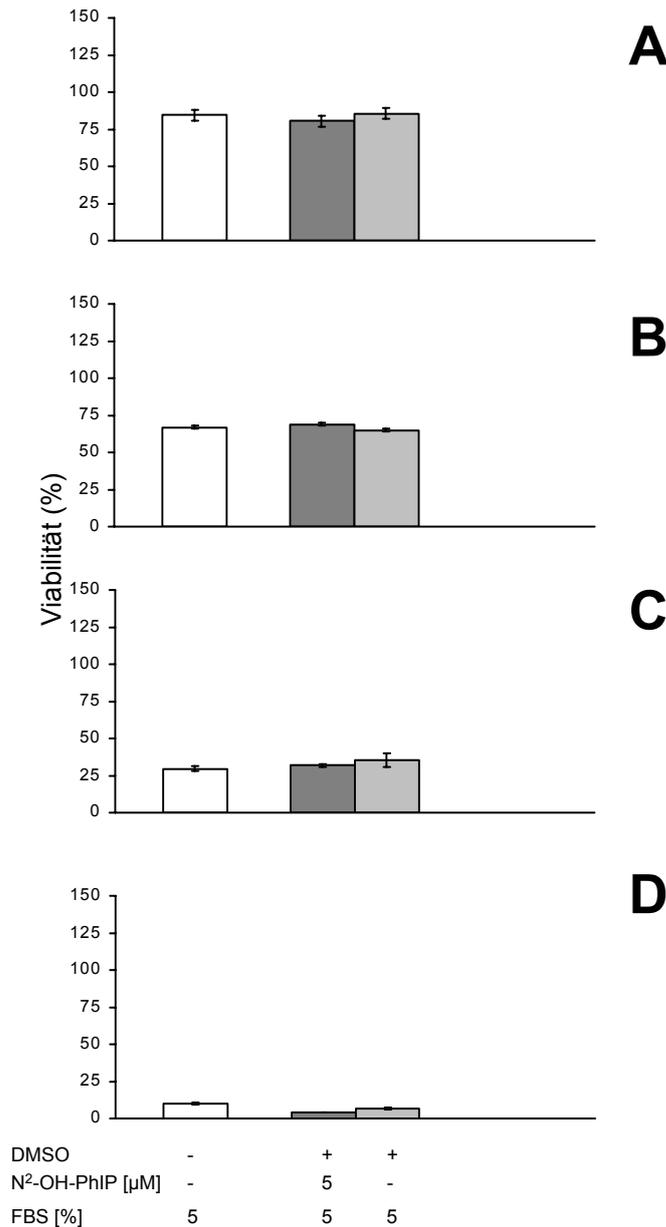


Abb. 15 Viabilität von pBabePuro β-CateninS33y nach 5 Behandlungszyklen mit N²-OH-PhIP

Die Viabilität von parental IEC-18-Zellen □, 5-mal N²-OH-PhIP-behandelten pBabePuro β-CateninS33y ■ und 5-mal DMSO-behandelten pBabePuro β-CateninS33y ■ wurde bei N²-OH-PhIP-Konzentrationen von 1 μM (A), 2,5 μM (B), 5 μM (C) und 10 μM (D) mittels eines *in-vitro*-Zytotoxizitätstests (MTT-Test) bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Untersuchungen, pro untersuchtem Zelltyp wurde eine 8-fach Bestimmung durchgeführt. Die Standardabweichungen sind dargestellt.

4.6 Wachstumsverhalten und Tumorigenität der parentalen und transfizierten IEC-18-Zellen nach N²-OH-PhIP-Behandlung in vitro

4.6.1 Wachstumsverhalten der parentalen und transfizierten IEC-18-Zellen nach N²-OH-PhIP-Behandlung

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens der mit N²-OH-PhIP behandelten Zellen im Vergleich zu den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen und den parentalen Zelllinien wurden Wachstumskurven erstellt. Zu jedem Zeitpunkt wurde eine Dreifachbestimmung der Gesamtzellzahl vorgenommen und der log₂ der Gesamtzellzahl gegen die Zeit aufgetragen (Abbildungen 16-19). Durch graphische Auftragung des log₂ (Zellzahl) gegen die Zeit wurde mathematisch eine Linearisierung der exponentiellen Phase des Zellwachstums erreicht. Aus dem Anstieg der Geraden in der exponentiellen Phase wurde die Populationsverdopplungszeit t_v durch Bildung des Reziproks ($1/m$) ermittelt. Alle Ergebnisse sind in Tabelle A5 im Anhang zusammengefasst. Alle Zelllinien zeigen eine exponentielle Phase des Wachstums, die in eine Sättigungsphase übergeht, gefolgt vom Absterben der Zellen.

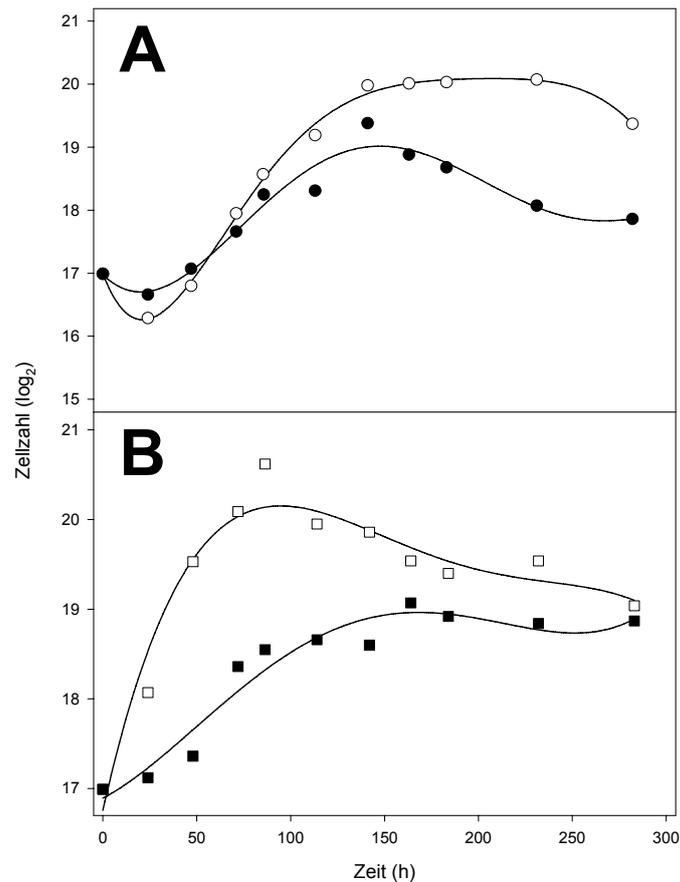


Abb. 16 Wachstumskurve der IEC-18-Zellen nach 15 Behandlungszyklen mit N²-OH-PhIP

Dargestellt werden Wachstumskurven von IEC-18-Zellen nach 15 Behandlungszyklen mit N²-OH-PhIP, (A) kultiviert in 1,25 % Serum (FBS), 15-mal behandelt mit 5 μM N²-OH-PhIP (●) oder 15-mal behandelt mit DMSO (○, Lösungsmittelkontrolle). (B) kultiviert in 5 % Serum (FBS), 15-mal behandelt mit 5 μM N²-OH-PhIP (■) oder 15-mal behandelt mit DMSO (□, Lösungsmittelkontrolle).

Es wurden jeweils 50.000 Zellen pro Kavität einer 6-Well-Platte eingesät. Zu definierten Zeitpunkten nach Zelleinsaat wurden jeweils die Zellen in 4 Kavitäten mit Trypsin abgelöst, und aus jeder Kavität drei Probevolumen von 100 μl für die Zellzahlbestimmung entnommen. Aus den pro Zeitpunkt erhaltenen 12 Werten für die aktuelle Zellzahl wurden Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen gebildet und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit graphisch dargestellt.

Die 15-mal mit 5 μM N²-OH-PhIP behandelten IEC-18-Zellen (Abbildung 16) zeigten im Vergleich zu den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen eine deutlich verlängerte Populationsverdopplungszeit, die exponentielle Phase blieb jedoch unverändert. Dies gilt für die Zellen mit reduziertem Serumgehalt (1,25 % FBS im Medium; Abbildung 16A) ebenso wie für die Zellen, bei denen der Serumgehalt des Mediums nicht vermindert wurde (5 % FBS im Medium; Abbildung 16B).

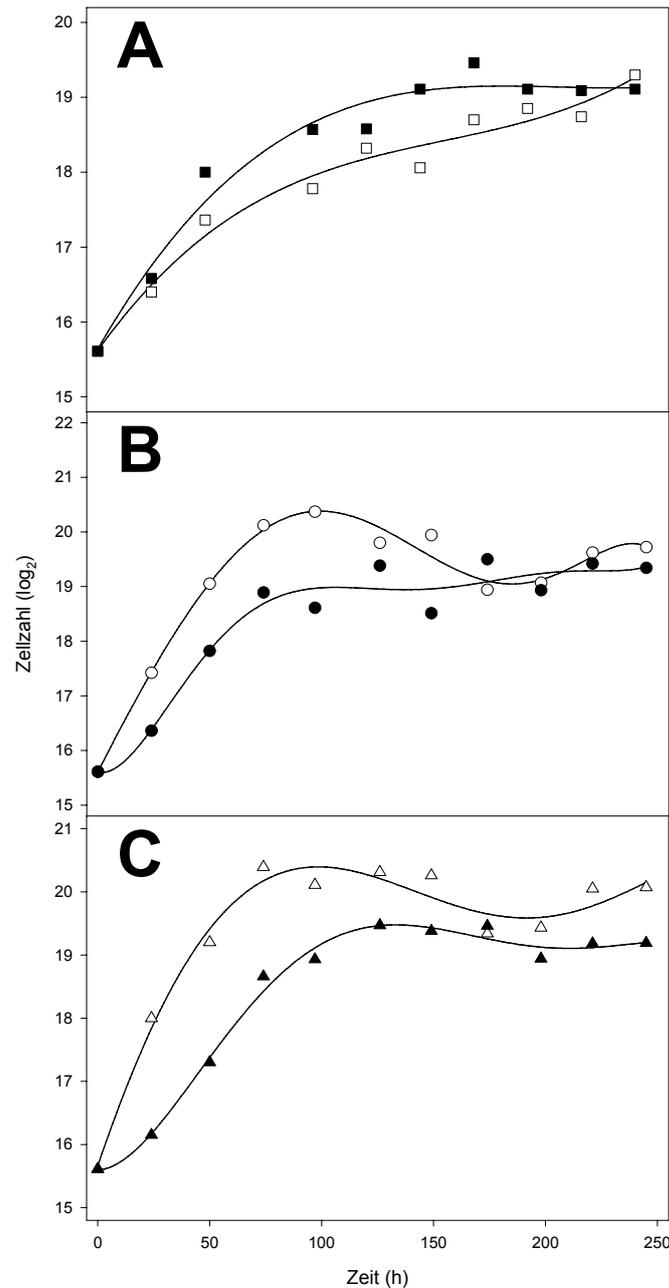


Abb. 17 Wachstumskurve der IEC-18-Zellen nach 25 Behandlungszyklen mit N²-OH-PhIP

Dargestellt werden Wachstumskurven von IEC-18-Zellen nach 25 Behandlungszyklen mit N²-OH-PhIP, (A) kultiviert in 0.6 % Serum (FBS), 25-mal behandelt mit 5 μM N²-OH-PhIP (■) oder 25-mal behandelt mit DMSO (□, Lösungsmittelkontrolle). (B) kultiviert in 5 % Serum (FBS), 25-mal behandelt mit 5 μM N²-OH-PhIP (●) oder 25-mal behandelt mit DMSO (○, Lösungsmittelkontrolle). (C) kultiviert in 5 % Serum (FBS), 25-mal behandelt mit ansteigenden Konzentrationen von 5 bis 20 μM N²-OH-PhIP (▲) oder 25-mal behandelt mit DMSO (△, Lösungsmittelkontrolle).

Lediglich die Erhöhung der N²-OH-PhIP-Konzentrationen während der 25 Behandlungszyklen auf bis zu 20 µM (Abbildung 17C) führte im Vergleich zu den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen zu verkürzten Populationsverdopplungszeiten.

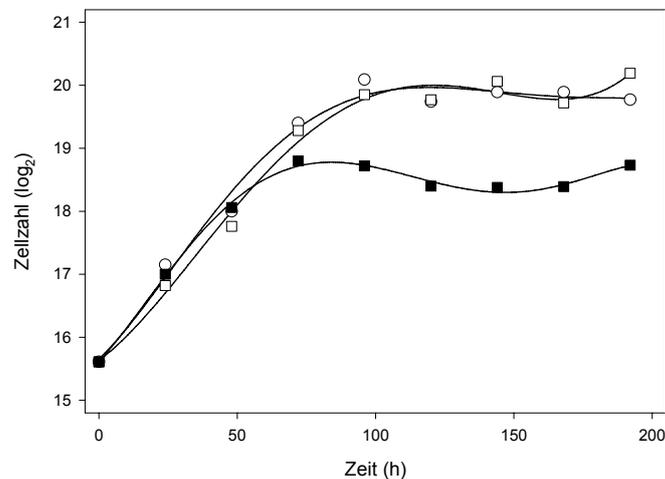


Abb. 18 Wachstumskurve der Transfektante IEC-18-pSI-h-SULT 1A1

Dargestellt werden Wachstumskurven der IEC-18-pSI-h-SULT 1A1-Transfektante, kultiviert in Selektionsmedium mit 5 % Serum (FBS); unbehandelt (O), 5-mal behandelt mit 5 µM N²-OH-PhIP (■) und 5-mal behandelt mit DMSO (□, Lösungsmittelkontrolle).

Der SULT exprimierende IEC-18-pSI-h-SULT 1A1-Klon (Abbildung 18) zeigte nach fünf Behandlungen mit 5 µM N²-OH-PhIP im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle eine um 24 h verkürzte exponentielle Phase und eine um etwa 12 h verlängerte Populationsverdopplungszeit.

Die mit dem Leervektor pBabe-Puro retroviral transfizierten IEC-18-Zellen (IEC-18-pBabe-Puro, Abbildung 19A) wurden als Referenz zu den anderen Retrovirus-Transfektanten betrachtet. IEC-18-pBabe-Puro-β-Catenin S33Y (Abbildung 19B) weist eine längere Populationsverdopplungszeit auf. IEC-18-pcMV-hum p53 MT-pBabe-Puro-β-Catenin S33Y (Abbildung 19C) und IEC-18-pcMV-hum p53 MT (Abbildung 19D) zeigten eine deutlich verkürzte Populationsverdopplungszeit und auch eine verkürzte exponentielle Wachstumsphase.

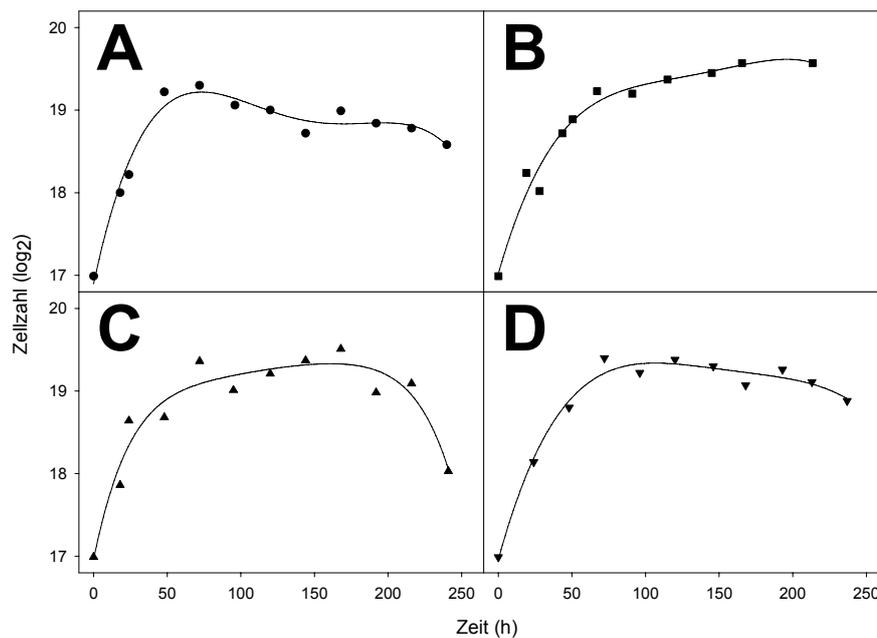


Abb. 19 Wachstumskurven der retroviralen IEC-18-Transfektanten

Dargestellt werden Wachstumskurven der IEC-18-Transfektanten, kultiviert in Selektionsmedium mit 5 % Serum (FBS). (A) IEC-18-pBabe-Puro. (B) IEC-18-pBabe-Puro- β -Catenin S33Y. (C) IEC-18-pcMV-hum p53 MT-pBabe-Puro- β -Catenin S33Y. (D) IEC-18-pcMV-hum p53 MT.

4.6.2 Tumorigenes Potential der N²-OH-PhIP behandelten IEC-18-Zellen *in vitro*

Zur Überprüfung des tumorigenen Potentials der mit N²-OH-PhIP behandelten IEC-18-Zellen und IEC-18-Transfektanten (Tabelle A2 im Anhang) wurde, der sogenannte Softagar-Assay (3.2.1.14) durchgeführt. Die mit N²-OH-PhIP behandelten IEC-18-Zellen und IEC-18-Transfektanten wurden im Softagar auf ihre Wachstumseigenschaften ohne Anheftung getestet. Wachsen Zellen in Softagar ohne Anheftung, so ist dies ein Hinweis auf Transformation und potentiell tumorigene Eigenschaften. Alle untersuchten Zellen konnten im Softagar nicht kultiviert werden. Als Positivkontrolle wurden HEK-Zellen verwendet (Abbildung 20A). Abbildung 20B zeigt stellvertretend eine Schale mit Softagar mit den behandelten IEC-18-Zellen. Die vollständige Transformation der behandelten Zellen und der Transfektanten kann daher ausgeschlossen werden.

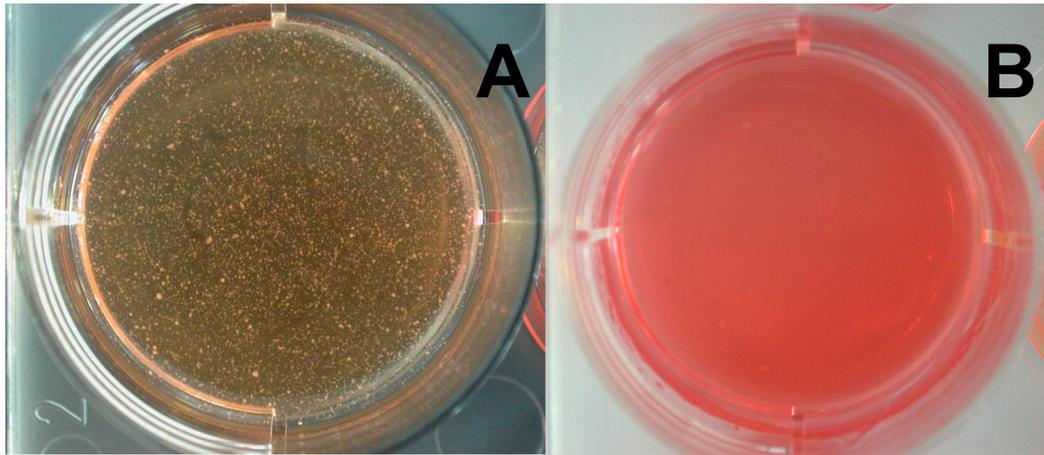


Abb. 20 Wachstum im Softagar

HEK-Zellen wurden als Positivkontrolle im Softagar verwendet (A), die mit N^2 -OH-PhIP behandelten IEC-18-Zellen konnten im Softagar nicht kultiviert werden (B).

4.7 Wachstumsverhalten und Tumorigenität der HCEC-Zellen nach N^2 -OH-PhIP-Behandlung

4.7.1 Transformation der HCEC-Zellen nach fünf Behandlungszyklen mit N^2 -OH-PhIP

In Vorexperimenten wurden HCEC-Zellen mit PhIP-haltigem Medium behandelt. Die Zellen zeigten keine Zeichen von toxischer oder maligner Transformation. Zur chemischen Transformation der HCEC-Zellen wurde daher N^2 -OH-PhIP (1,5 und 3 μ M) verwendet.

Nach 4 Behandlungszyklen mit der hohen oder niedrigen Konzentration des Kanzerogens (Tabelle A1 im Anhang) wurden deutliche morphologische Unterschiede sichtbar. Die langgestreckte Form der parentalen HCEC-Zellen (Abbildung 21A) variierte zu pflastersteinartiger Form. Im Gegensatz zur Parentalzelllinie wuchsen die Zellen übereinander („piling up“) und bildeten Zellherde. Die Zellen bildeten auch nach der Subkultivierung und Ausbringung auf neue Kulturschalen in frischem Kulturmedium weiterhin Zellherde. Die Abbildungen 21B und 21C zeigen das koloniebildende Wachstum der nicht konfluent gewachsenen Zellen. Die mit entsprechenden Mengen DMSO behandelten Lösungsmittelkontrollen (Abbildung 21A) zeigten kein verändertes Wachstum und keine morphologischen Abweichungen von den parentalen Zellen. Besonders hervorzuheben ist, dass die N^2 -OH-PhIP-behandelten Zellen im Gegensatz zur unbehandelten parentalen HCEC-Zelllinie auch ohne die Matrigelbeschichtung wuchsen.

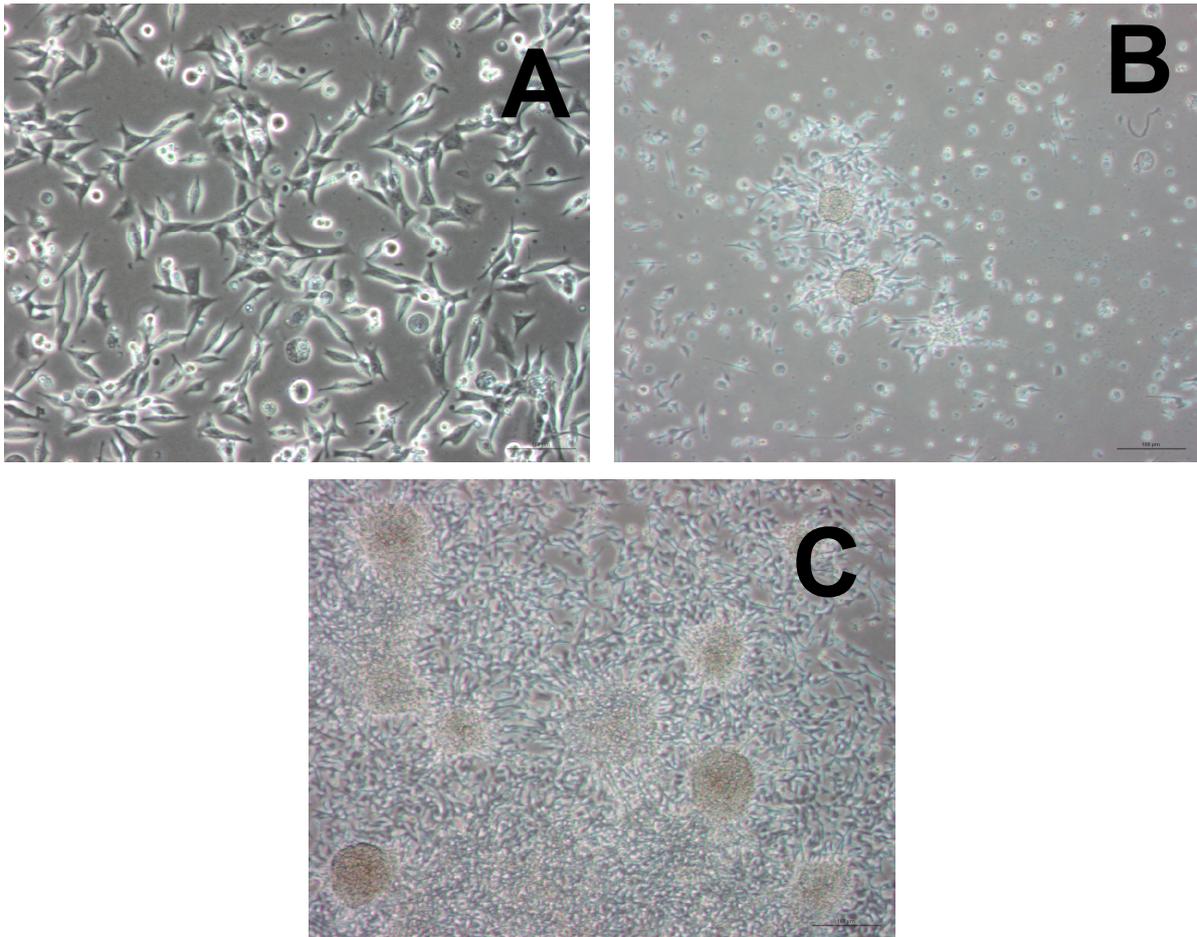


Abb. 21 Stadien des Zellwachstums von HCEC-Zellen

Die mit DMSO behandelten Lösungsmittelkontrollen der HCEC-Zellen (A) zeigen keine morphologischen Abweichungen von der parentalen Zelllinie. Nach 5 Behandlungszyklen mit N^2 -OH-PhIP wurde klonales Wachstum in nicht konfluentem Zustand (B) und konfluentem Zustand (C) beobachtet.

4.7.2 Wachstumsverhalten der HCEC-Zellen nach N^2 -OH-PhIP-Behandlung

Von den N^2 -OH-PhIP behandelten HCEC-Zellen und den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen wurden Wachstumskurven erstellt. Die Populationsverdopplungszeit der behandelten HCEC-Zellen ist proportional zur Anzahl der N^2 -OH-PhIP-Behandlungen.

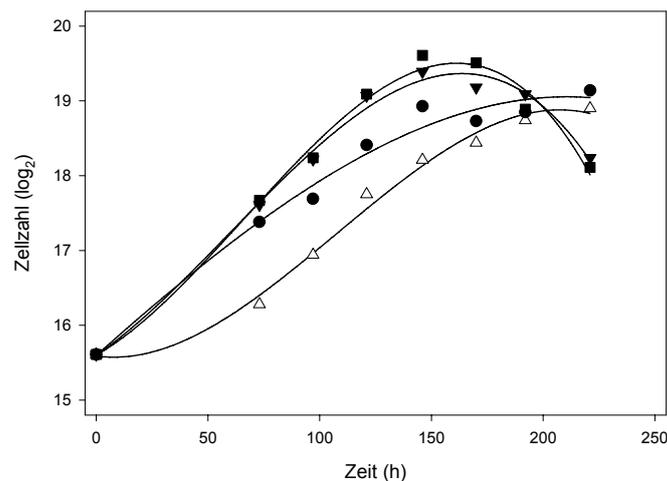


Abb. 22 Wachstumskurve der Zelllinie HCEC

Dargestellt werden die Wachstumskurven der HCEC-Zellen, die dreimal mit 1,5 μM N²-OH-PhIP (▼), viermal mit 1,5 μM N²-OH-PhIP (■), dreimal mit 1,5 μM und anschließend zweimal mit 3 μM N²-OH-PhIP (●) oder fünfmal mit DMSO (Δ, Lösungsmittelkontrolle) behandelt wurden.

4.7.3 Immunchemische Detektion von APC-Protein in HCEC-Zellen

Um etwaige Unterschiede im APC-Protein-Expressionsniveau zwischen der parentalen HCEC-Zelllinie und den mit 1,5 und 3 μM N²-OH-PhIP behandelten Zellen und der Lösungsmittelkontrolle zu erfassen, wurde die Expression des APC-Proteins mittels gelelektrophoretischer Auftrennung (3.2.2.5), Western-Blotting (3.2.2.6) und sich anschließender immunchemischer Detektion (3.2.2.7) mit dem gegen den N-Terminus des APC-Proteins gerichteten monoklonalen Antikörper Ab1 (3.1.6) untersucht.



Abb. 23 Immundetektion von APC in zytosolischen Fraktionen von HCEC-Zellen nach N²-OH-PhIP-Behandlung.

(A) dreimal mit 1,5 μM und zweimal mit 3 μM N²-OH-PhIP behandelte HCEC-Zellen, (B) viermal mit 1,5 μM N²-OH-PhIP behandelte HCEC-Zellen, (C) dreimal mit 1,5 μM N²-OH-PhIP behandelte HCEC-Zellen, (D) fünfmal mit DMSO behandelte HCEC-Zellen (Lösungsmittelkontrolle), (E) Molekulargewichtsstandard, (F) SW-480-Zellen, (G) HEK-Zellen.

Als Positivkontrollen dienten HEK-Zellen, die das APC-Protein in voller Länge exprimieren (Abbildung 23, Spur G) und SW-480-Zellen, die trunkeiertes APC-Protein exprimieren (Abbildung 23, Spur F). Die N²-OH-PhIP-behandelten HCEC-Zellen (Abbildung 23, Spuren A, B und C) zeigen deutlich zwei Banden, das heißt, ein Teil der behandelten HCEC-Zellen exprimiert das APC-Protein in voller Länge, ein anderer Teil in verkürzter Form. Mit zunehmender Zahl der N²-OH-PhIP-Behandlungszyklen wurde vermehrt die verkürzte Form des APC-Proteins exprimiert. Die Lösungsmittelkontrolle hingegen exprimiert nur APC-Protein in voller Länge.

4.7.4 Tumorigenes Potential der transformierten HCEC-Zellen *in vivo*

Zur Überprüfung des tumorigenen Potentials von HCEC-Zellen, die nach Behandlung mit N²-OH-PhIP deutlich veränderte Wachstumseigenschaften zeigten, wurde ein Tumorigenitätstest im Ganztier (3.2.4) durchgeführt. Die Zellen wurden subkutan in die Hinterläufe von SCID-Mäusen injiziert.

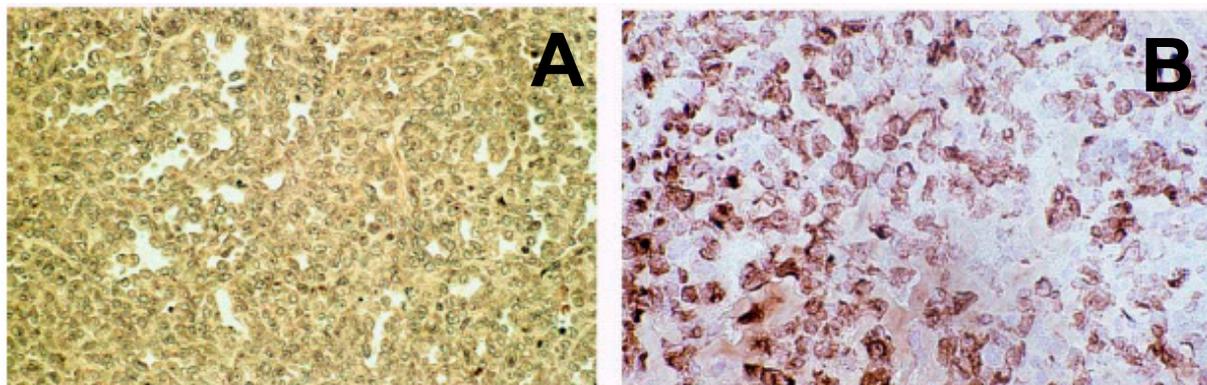


Abb. 24 Tumore, die durch chemisch transformierte HCEC-Zellen in SCID-Mäusen induziert werden

Mikrophotographien von Tumoren aus SCID-Mäusen, die mit chemisch transformierten HCEC Zellen behandelt wurden: (A) Hämatoxylin/ Eosin Färbung eines induzierten Tumors; (B) Cytokeratin 19 Färbung eines induzierten Tumors.

Innerhalb von 6 Wochen nach Injektion der N²-OH-PhIP-behandelten HCEC-Zellen, entwickelten 8 von 8 Tieren Tumore. Nach 8 Wochen hatten die soliden, undifferenzierten Tumore einen Durchmesser von 1 cm erreicht (Abbildung 24A). Die Zellen der Tumore waren epithelialen Ursprungs, wie die positive Cytokeratin 19-Färbung der Tumore zeigt (Abbildung 24B).

5 Diskussion

Die Kolonkanzerogenese ist ein mehrstufiger Prozess, der von normalen Kolonmukosazellen über prä-maligne Läsionen, wie zum Beispiel veränderte Krypten und Adenome, zur Bildung von Karzinomen führt. In etwa 90 % der Fälle gibt es keine familiäre Vorbelastung für Kolonkarzinome, so dass sporadisch auftretende Gendefekte zur Entwicklung dieser Karzinome führen. Seit einigen Jahren wird postuliert, dass bestimmte Ernährungsfaktoren und Umwelteinflüsse für die Entstehung sporadischer Gendefekte verantwortlich sind und somit bei der Induktion sporadischer Kolonkarzinome eine wichtige Rolle spielen (Potter, 1996; World Cancer Fund and the American Institute for Cancer Research, 1997).

In diesem Zusammenhang werden die heterozyklischen aromatischen Amine (HAAs), die bei der Erhitzung proteinreicher Nahrungsmittel wie Fleisch und Fisch entstehen, als wichtige Faktoren bei der Kolonkarzinogenese postuliert (Norat et al. 2002). Das am häufigsten vorkommende heterozyklische aromatische Amin, 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-*b*]pyridin, hat sich in verschiedenen Studien und Toxizitätstests als mutagen und kanzerogen erwiesen (Felton et al. 1986; Esumi et al. 1989; Ito et al. 1991; Wakabayashi et al. 1992; Kakiuchi et al. 1995; Dashwood et al. 1998; Schut and Snyderwine, 1999; Burnouf et al. 2001).

Die meisten heterozyklischen aromatischen Amine sind potente Kanzerogene, PhIP ist jedoch das einzige nahrungsrelevante Kanzerogen, das im Kolon und nicht in der Leber von Nagern Tumore verursacht (Pfau et al. 1997). Die Entstehung von Kolontumoren wurde bisher nur in männlichen Ratten beschrieben, in weiblichen Ratten verursacht PhIP Brustkrebs, in Mäusen Tumore im lymphatischen Gewebe (Schut et al. 1997; Kakiuchi et al. 1995). In Kolongewebeproben von Patienten, die sich einer Operation zur Entfernung von Kolonkarzinomen unterziehen mussten und die zuvor nahrungsrelevanten PhIP-Konzentrationen ausgesetzt wurden, wurden mittels Massenspektrometrie DNA-Addukte detektiert (Dingley et al. 1999). Dies macht die Annahme wahrscheinlich, dass PhIP auch beim Menschen die Kolonkanzerogenese begünstigt (Dingley et al. 1999).

In dieser Studie wurde untersucht, ob bei den *in vitro* Zellkultur-Modellen IEC-18 und HCEC durch N²-OH-PhIP, den reaktiven Metaboliten des heterozyklischen aromatischen Amins PhIP, eine chemisch induzierte Transformation erzielt werden kann. Es wurde erstmals gezeigt, dass der Metabolit N²-OH-PhIP tatsächlich in der Lage ist, humane Kolonepithelzellen *in vitro* zu malignen Zellen vollständig zu transformieren.

Generell kann die Zelltransformation entweder spontan erfolgen oder aber durch Viren oder Chemikalien induziert werden; sie verändert Eigenschaften der Zelllinie, insbesondere Wachstumsrate, Genexpression und Tumorigenität. Die Transformation ist assoziiert mit Veränderungen des Genotyps, denen phänotypische Veränderungen folgen, die sich durch Immortalisierung, verändertes Wachstumsverhalten (Verlust der Kontakthemmung, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Faktoren) und Malignität der Zelllinie darstellen (Freshney 2000). Zur Erforschung der chemischen Transformation von Epithelzellen werden Zellen benötigt, die nicht transformiert und nicht tumorigen sind.

IEC-18-Zellen besitzen keine Mutationen in den für die Kolonkanzerogenese bedeutenden Genen, exprimieren das APC-Protein in voller Länge (Höhne 2001, Mann 2001) und produzieren keine Tumore, wenn sie in syngene Tiere injiziert werden (Quaroni et al. 1979; Quaroni and Isselbacher 1981). Diese Eigenschaften ermöglichten die Verwendung der IEC-18-Zellen als Kulturmodell für Untersuchungen zur chemisch induzierten Kolonkanzerogenese. Die zu einem späteren Zeitpunkt zusätzlich verwendete patentierte und nicht käuflich erwerbbar humane Kolonzelllinie HCEC (Human Colon Epithelial Cells) ermöglichte die Generierung eines humanen nicht tumorigenen Kolonkrypten-Zellkulturmodells. HCEC-Zellen werden als nicht tumorigen betrachtet, da sich innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 12 Monaten nach Injektion der Zellen in Nacktmäuse keine Tumore entwickelten.

Viele Studien belegen, dass PhIP metabolisiert werden muss, bevor es mutagen wirkt (Holme et al. 1989; McManus et al. 1989; Crofts et al. 1997). Beim Menschen wird PhIP durch die mikrosomalen Cytochrome P450 1A2 und 1B1 N-hydroxyliert und anschließend durch Konjugation der exozyklischen N-Hydroxylgruppe an Acetat oder Sulfat (Buonarati et al., 1990), katalysiert durch N-Acetyltransferase (hNAT) (Minchin et al. 1992) und Sulfotransferase (hSULT) (Chou et al. 1995), zum entsprechenden N-Acetyloxy- oder N-Sulfonyloxy-Derivat metabolisiert. Diese instabilen Verbindungen führen nach Deacetylierung oder Desulfatierung zur Bildung von Nitreniumionen, die grundsätzlich als genotoxische Spezies betrachtet werden (Guengerich et al. 1995; Kadlubar 1994; Turesky et al 1992).

Die Phase II-Bioaktivierung spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von PhIP zu DNA-schädigenden Metaboliten in Nager und Mensch (Turteltaub et al. 1995). Da beide Zelllinien Cytochrom P450 nicht oder nicht in signifikanten Mengen auf Proteinniveau exprimieren (Blum et al. 2001; Zhang et al. 1997), wurde in dieser Studie zur Behandlung der aktivierte Metabolit N²-OH-PhIP sowohl zur Behandlung von IEC-18-Zellen der Ratte als auch von HCEC-Zellen des Menschen verwendet.

IEC-18-Zellen, die 25-mal mit 5 µM N²-OH-PhIP-Lösung behandelt wurden, zeigten sowohl unter Reduzierung des Serumgehaltes als auch bei schrittweiser Erhöhung der Kanzerogenkonzentration auf bis zu 20 µM keinerlei Anzeichen der Transformation. Die Morphologie der Zellen blieb unverändert pflastersteinartig und die Zellen zeigten keinen Verlust der Kontakthemmung.

Da unter der Behandlung mit N²-OH-PhIP eine Resistenz der Zellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung des Kanzerogens lichtmikroskopisch beobachtet wurde, wurde der zytotoxische Effekt auf die Zellen mittels MTT-Test überprüft. Die Exposition gegenüber N²-OH-PhIP führte nach 15 und nach 25 Behandlungszyklen mit dem Kanzerogen eindeutig zur Resistenzentwicklung; die zytotoxische Wirkung unterschiedlicher N²-OH-PhIP-Konzentrationen (1 bis 10 µM) wurde um etwa 90 % verringert. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen lässt sich schließen, dass detoxifizierende Enzyme die chemische Transformation der IEC-18 Zellen nach wiederholter Gabe von N²-OH-PhIP effektiv unterbinden.

Zunächst wurde die Expression von Phase II-Enzymen in den verwendeten und behandelten Zelllinien überprüft, da N²-OH-PhIP einer Phase-II-Metabolisierung durch Acetylierung oder Sulfonierung zu einem reaktiven Metaboliten bedarf, bevor es mit der DNA reagieren kann (Turesky et al. 1991; Chou et al. 1995). Untersuchungen zur Aktivität fremdstoff-metabolisierender Enzyme im PhIP-Metabolismus in IEC-18-Zellen beschränkten sich bislang fast ausschließlich auf Enzyme mit detoxifizierender Wirkung, wie Epoxidhydrolasen, UDP-Glukuronosyltransferasen, Glutathion-S-Transferasen sowie Katalasen (Glatt et al. 1987, Glatt et al. 1990). Die für die Aktivierung von PhIP wichtigen Schlüsselenzyme, die Cytochrome P450 1A2, 1A1 und 1B1, sowie Sulfotransferasen und N-Acetyltransferasen konnten in IEC-18-Zellen entweder nicht detektiert werden (Zhang et al. 1997) oder wurden bislang nicht untersucht.

Frühere Ergebnisse von Kirchner (2002) zeigten bereits die fehlende Expression von SULT 1-Isoformen in IEC-18 Zellen und in den oberen Darmabschnitten der Ratte. Dieses Ergebnis stimmt mit Angaben in der Literatur überein, dass sich die Expression von SULT in der Ratte zum größten Teil auf die Leber beschränkt und nur in geringen Mengen in Magen und Dickdarm zu finden ist (Dunn and Klaassen 1998). Beim Menschen hingegen wird eine Vielzahl von SULT-Isoformen exprimiert und diese sogar viermal stärker als bei der Ratte (Teubner 2001). Dies unterstreicht die Bedeutung der O-Sulfonierung von N²-OH-PhIP beim Menschen.

Eine vom Kosubstrat der Sulfotransferase (PAPS) abhängige und durch die lösliche Fraktion menschlicher Kolonmukosa katalysierte DNA-Bindung von N²-OH-PhIP in humanem Kolonzytosol wurde 1995 durch Chou et al. beschrieben. Beim Menschen hat die O-Sulfonierung von N²-OH-PhIP eine weitaus größere Bedeutung als die N-Acetylierung, wie neueste *in vitro* Untersuchungen an rekombinanten *Salmonella typhimurium* Stämmen, welche die humanen SULT1A1 sowie NAT1 und NAT2 exprimieren, verdeutlichen (Muckel et al. 2002).

Da es im Rahmen dieser Arbeit gelungen ist, die genetische Information der humanen SULT 1A1 durch Kalziumphosphat vermittelte Transfektion in IEC-18-Zellen zu integrieren und stabil zu exprimieren (Abbildung 5), steht jetzt eine leicht kultivierbare Zelllinie mit entsprechender Enzymausstattung zur Verfügung, die in dieser Arbeit aber auch für weiterführende Untersuchungen verwendet wurde. Die Expression von humaner SULT 1A1 in der IEC-18-Transfektante ist vergleichbar mit dem Grad der Expression in den humanen HCEC Zellen (Abbildung 20). Die Aktivierung von N²-OH-PhIP durch SULT 1A1 sollte also in der Transfektante stärker sein als in der parentalen Zelllinie und vergleichbar sein mit der in HCEC-Zellen.

Malfatti et al. (1996) konnten bei der Inkubation von PhIP mit dem postmitochondrialen Überstand von Rattenkolongewebe keine mutagenen Metaboliten nachweisen, was für die geringe Aktivität bzw. das gänzliche Fehlen der initial aktivierenden Oxygenasen spricht. Im Gegensatz dazu besitzt die zytosolische Fraktion aus Kolonmukosagewebe der Ratte bei Zusatz der Kosubstrate für N-Acetyltransferasen und Sulfotransferasen die Fähigkeit, N²-OH-PhIP zu einer DNA-reaktiven Verbindung zu aktivieren (Davis et al. 1993). Die Beteiligung von Phase II-Enzymen an der Aktivierung von PhIP bzw. dessen N²-OH-Derivat wurde auch belegt durch die zytotoxische Wirkung von N²-OH-PhIP während der Behandlung von IEC-6-Zellen (Höhne 2001). Die Expression von NAT2 konnte in den parentalen Zelllinien IEC-18 und IEC-6 nachgewiesen werden, jedoch nicht die Expression der NAT1 (Kirchner 2002).

In dieser Arbeit wurde in der SULT 1A1 exprimierenden IEC-18-Transfektante und in den humanen HCEC-Zellen die Expression der NAT2 deutlich nachgewiesen (Abbildung 5). Es wird daher von einer vergleichbaren Aktivierung der IEC-18-Zellen, der IEC-18-SULT 1A1-Transfektante und der humanen Kolonzellen HCEC ausgegangen. Die Verteilung der N-Acetyltransferasen im Gastrointestinaltrakt von Mensch und Ratte ist sehr unterschiedlich. Während NAT1 und NAT2 in der menschlichen Leber, dem Dün- und Dickdarm, dem Ösophagus und dem Magen unterschiedlich stark exprimiert werden (Windmill et al. 1997), ist die Aktivität der beiden NAT-Formen im Gastrointestinaltrakt der Ratte relativ homogen verteilt (Ware and Svensson 1996).

Da die für die Veresterung von N²-OH-PhIP notwendige NAT2 in den IEC-18-Zellen vorhanden ist, kann davon ausgegangen werden, dass es zu einer Bildung von N-Acetoxy-PhIP in den Zellen kommt und durch den Zerfall des instabilen Esters das mutagene Nitreniumion gebildet wird. Die Veresterung von N²-OH-PhIP durch N-Acetyltransferasen als auch durch Sulfotransferasen führt zu Produkten, die zum Nitreniumion zerfallen und daher dasselbe Adduktmuster an der DNA hervorrufen (Buonarati et al. 1990).

In dieser Arbeit führte die Behandlung mit dem Kanzerogen N²-OH-PhIP bei der Zelllinie IEC-18 eindeutig zur Bildung von DNA-Addukten, die mittels ³²P-Postlabelling detektiert werden konnten. Dies zeigt, dass die ausgewählte Behandlung der Zellen mit dem Kanzerogen zu einer ausgeprägten Genotoxizität führt, so dass alle Zelllinien und -typen in dieser Arbeit analog behandelt wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die verwendete Zelllinie IEC-18 hinsichtlich ihrer GST-Expression untersucht. Die GST sind eine große Enzymfamilie, die aus sechs verschiedenen Klassen besteht, welche die instabilen N-Acetoxyester in unterschiedlichem Maße detoxifizieren. Einzelne GST-Isoformen des Menschen und der Ratte sind in der Lage, die Bindung von N-Acetoxy-PhIP an die DNA zu verhindern (Lin et al. 1994; Coles et al. 2001). Von den GST des Menschen zeigte die Isoform A1-1 mit Abstand den größten inhibitorischen Effekt. Die Wirkung von hGSTA2-2, P1-1, M1-1, T1-1 und T2-2 war in diesem Zusammenhang schwächer ausgeprägt (Coles et al. 2001).

Bei den GST der Ratte zeigte sich ein ähnliches Bild. Hier ist insbesondere die rGSTA1-2 Isoform, als auch die rGST 12-12 von Bedeutung (Lin et al. 1994). Die homologen Formen des Menschen sind hGSTA1-1 und hGST T2-2.

Mit der in dieser Arbeit verwendeten Immunblotanalyse konnten nur die einzelnen Untereinheiten der GST nachgewiesen werden. Parentale IEC-18-Zellen zeigten mit keinem der Antiseren eine Reaktion, im Vergleich dazu konnte bei den N²-OH-PhIP behandelten IEC-18-Zellen sogar mit wesentlich weniger Protein eine sehr starke Reaktion mit den Antiseren der Untereinheiten A1, A3 und Pi beobachtet werden (Abbildungen 11 und 12). Die T2-Untereinheit der GST, welche sich lediglich mittels RT-PCR nachweisen ließ, wurde in den N²-OH-PhIP-behandelten IEC-18-Zellen um etwa ein Drittel stärker exprimiert als in parentalen IEC-18-Zellen (Abbildung 13 und Tabelle 11).

Die quantitative Bestimmung der Glutathion-S-Transferase-Aktivität mittels photometrischer Messung zeigt die signifikante Erhöhung der GST-Aktivität in N²-OH-PhIP behandelten IEC-18-Zellen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Western-Blotanalyse zeigen die Zellen bei vermindertem Serumgehalt im Kultur- und Behandlungsmedium (0,6 % FBS) die geringste GST-Aktivität unter den behandelten Zellen. Die Lösungsmittelkontrollen und die parentalen IEC-18-Zellen weisen außerdem vergleichbare GST-Proteinaktivität auf. Ebenso zeigt sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Western-Blotanalyse, dass die N²-OH-PhIP Behandlung der pSI-hSULT 1A1-Transfektante die GST-Aktivität nicht erhöht.

Aus den Ergebnissen der GST-Untersuchungen lässt sich schließen, dass die Detoxifizierung von entstandenen N-Acetoxyestern ein Grund für die ausbleibende Transformation der IEC-18-Zellen und auch der hSULT 1A1-IEC-18-Transfektante nach Gabe von N²-OH-PhIP ist. Insbesondere wird diese Hypothese dadurch bestätigt, dass die Expression der GST-Untereinheiten A1, A3, T2 und P1, die das N-Acetoxy-PhIP detoxifizierenden, durch die Behandlung mit N²-OH-PhIP in den IEC-18-Zellen stark induziert war.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte Nelsson et al. (2001) in LNCaP-Zellen (humane Prostata-Adenom-Zelllinie), dass die Hemmung der GST-P1-Expression bei gleichzeitiger Exposition gegenüber PhIP-Metaboliten zu verstärkter Vulnerabilität, Zytotoxizität und DNA-Adduktbildung führt (Nelsson et al. 2001). Die cDNA für die GST-P1 wurde in die humane Prostata-Adenom-Zelllinie LNCaP, die das GSTP1-Gen in inaktiver Form enthält, transfiziert; so wurde die GST-P1 überexprimierende Zelllinie LNCaPGSTP1 generiert. Mittels MTT-Test wurde nach Exposition beider Zelllinien gegen N²-OH-PhIP gezeigt, dass der PhIP-Metabolit auf die GST-P1-überexprimierenden Zellen bis zu 40% weniger zytotoxisch wirkte, als auf die parentale, nicht transfizierte Prostata-Adenom-Zelllinie LNCaP mit dem inaktiven GST-P1-Gen. Die DNA-Adduktbildung durch aktivierte PhIP-Metabolite kann also durch die Induktion der GST-Expression verhindert werden.

Die Exposition der IEC-18-hSULT 1A1-Transfektante gegenüber N²-OH-PhIP (fünf Behandlungszyklen) führte nicht zur Transformation. Als Ursache wurde die gesteigerte Expression detoxifizierender Enzyme (GST) in der Zelllinie IEC-18 nach N²-OH-PhIP-Behandlung angenommen (Abbildung 10). Bei der SULT 1A1-Transfektante konnte jedoch keine Resistenz gegenüber N²-OH-PhIP nach fünf Behandlungszyklen festgestellt werden (Abbildung 9); die zytotoxische Wirkung von N²-OH-PhIP auf die Transfektante war vergleichbar mit der auf parentale IEC-18-Zellen. Da die GST-Aktivität der IEC-18-hSULT 1A1-Transfektante vergleichbar niedrig ist, wie die der parentalen Zelllinie (Abbildung 10), kann eine Detoxifizierung des Sulfoxyesters von N²-OH-PhIP durch GST mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Die Expression der humanen SULT 1A1 scheint in IEC-18-Zellen die Induktion von GST-Isoformen durch N²-OH-PhIP-Exposition, wie bei behandelten parentalen IEC-18-Zellen beobachtet, zu unterdrücken. Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse muss unbedingt berücksichtigt werden, dass die parentale Zelllinie IEC-18 25 Behandlungszyklen unterzogen wurde, die SULT 1A1-Transfektante nur fünf Behandlungszyklen. Eine weitere Behandlung mit N²-OH-PhIP hätte möglicherweise doch zur chemischen Transformation der SULT 1A1-Transfektante führen können; allerdings konnte aufgrund der sehr hohen Kosten von N²-OH-PhIP diese Behandlung nicht weitergeführt werden.

PhIP zeigt ein spezifisches Mutationsspektrum an Genen, die für die Entstehung von Kolonkarzinomen essentiell sind. Mutationen in den Genen *APC* und *β-Catenin*, deren Genprodukte in den Wnt-Signalweg involviert sind, schließen sich meist aus. In Tumorstufen und Tumoren werden meist entweder *APC*- oder *β-Catenin*-Mutationen nachgewiesen (Morin et al. 1997; Dashwood et al. 1998). Mutationen in beiden Genen werden als frühe Ereignisse in der Kolonkarzinogenese betrachtet (Powell et al. 1992).

Im Rahmen der vorliegenden Studie sollte eine Überexpression des mutierten humanen *β-Catenin*-Proteins in IEC-18-Zellen durch Transfektion mit dem Plasmid pcDNA3-h-*β-Catenin*-MT einen frühen Schritt im mehrstufigen Prozess der Kolonkarzinogenese darstellen. Die Integration des transfizierten mutierten *β-Catenin* war mittels PCR nachweisbar (Abbildung 14), die Expression des Proteins ließ sich jedoch nicht nachweisen. In Übereinstimmung mit anderen Studienergebnissen ist die Überexpression von *β-Catenin* nicht möglich (unveröffentlichte Daten, Ben-Ze éy). Wahrscheinlich führt eine *β-Catenin*-Überexpression zur p53-Akkumulation, infolge deren die *β-Catenin*-überexprimierenden Zellen im Zellzyklus in der G1-Phase arretieren oder in die Apoptose gehen (Damalas 1999).

Die gleichzeitige Überexpression von mutiertem p53-Protein und mutiertem β -Catenin-Protein in IEC-18-Zellen konnte in dieser Studie nicht erreicht werden. Zwar konnte in der IEC-18-Zelllinie, die mutiertes p53-Protein exprimiert (W. Teubner, unveröffentlichte Daten), die Integration des mutierten β -Catenin-Plasmids mittels PCR festgestellt werden. Der Nachweis auf Proteinebene konnte jedoch nicht erbracht werden. Möglicherweise könnte eine Überexpression des p53-Negativregulators MDM2 zur vermehrten Degradation des p53-Proteins führen und dadurch die Überexpression von β -Catenin ermöglichen.

Um die chemisch induzierte maligne Transformation von Humandickdarmepithelzellen *in vitro* zu untersuchen, wurde außerdem in dieser Arbeit die humane Kolonzelllinie HCEC verwendet. Da die humanen Kolonozyten nicht entsprechende Mengen an Cytochrom P450-Protein, das zur Bioaktivierung von PhIP notwendig ist, exprimieren (Blum et al. 2001), wurde zur chemischen Transformation N^2 -OH-PhIP verwendet. Der N-hydroxylierte Metabolit kann in einem Schritt durch hSULT 1A1 zum entsprechenden N-Sulfonyloxyderivat metabolisiert werden (Muckel et al. 2002). Da die HCEC-Zellen hSULT 1A1 in entsprechenden Mengen exprimieren (Abbildung 5), kann durch anschließende Desulfatierung ein Nitreniumion entstehen, das zweifelsfrei mit der DNA reagiert.

Bei den HCEC führte eine dreimalige Behandlung mit N^2 -OH-PhIP unmittelbar zu klonalem Wachstum und sogenanntes „pilling up“ (Abbildung 21). Die Zellen wuchsen dreidimensional, unter Verlust der Zell-Zell-Kontakthemmung und zeigten mit zunehmender Zahl der Behandlungszyklen schnelleres Wachstum, d.h. kürzere Populationsverdopplungszeiten, im Vergleich zu den DMSO-behandelten Lösungsmittelkontrollen (Abbildung 22 und Tabelle A5 im Anhang). Sie wuchsen ohne Matrigelbeschichtung und zeigten somit alle charakteristischen Eigenschaften der Zelltransformation.

Die Kolonkanzerogenese ist ein Mehrstufenprozess, der von mehreren genetischen Veränderungen begleitet wird (Kinzler and Vogelstein 1996). Auf der Suche nach Mutationen, die für die Entstehung von Kolonkarzinomen ursächlich sind, zeigte sich ein durch das Kanzerogen PhIP erzeugtes spezifisches Genmutationsspektrum. PhIP bildet vorzugsweise DNA-Addukte an der C8-Position der Base Guanin (Kakiuchi et al., 1995). Es handelt sich hauptsächlich um GC \rightarrow TA Transversionen und Deletionen von Guanin in der Basensequenz 5'-GGGA-3' (Yadollahi-Farsani et al. 1996).

Häufig beginnt der Prozeß der Kolonkanzerogenese mit einer Mutation im *APC*-Gen. Mutationen im *APC*-Gen von Kolontumoren wurden von diversen Autoren beschrieben und in den Codons 635, 868-869 und 1413 gefunden. Diese wurden als Mutations-„hot spots“ im *APC*-Gen beschrieben (Kakiuchi et al. 1995), führen zu einer Leserahmenverschiebung („frameshift“) und resultieren in einem verkürzten („trunkierten“) APC-Protein. Alle *APC*-Mutationen resultieren in einem Verlust des Carboxyl-Terminus des APC-Proteins (Kinzler and Vogelstein 1996). Deshalb wurde in dieser Studie untersucht, ob die klonal wachsenden HCEC-Zellen das APC-Protein in voller Länge exprimieren, oder ob es in trunkierter Form vorliegt.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass das APC-Protein von N²-OH-PhIP-behandelten HCEC-Zellen in trunkierter Form exprimiert wird (Abbildung 23), das heißt die Behandlung mit dem Kanzerogen N²-OH-PhIP hat zu Mutationen geführt, die in der Expression des verkürzten Proteins resultieren.

Zur Untersuchung der tumorigenen Eigenschaften der klonal wachsenden HCEC-Zellen wurden die Zellen in SCID-Mäuse injiziert. Nach sechs Wochen wurden bei 8 von 8 Tieren solide, undifferenzierte Tumore mit einem Durchmesser von 1 cm an der Injektionsstelle beobachtet, die einen Beweis für das hohe tumorigene Potential der chemisch maligne transformierten Zellen darstellen (Abbildung 24A). Der epitheliale Ursprung der Zellen wurde mittels positiver Cytokeratin 19-Färbung gezeigt (Abbildung 24B). Die injizierten Zellen der Lösungsmittelkontrolle führten nach einem Beobachtungszeitraum von 6 Monaten, wie erwartet, nicht zur Bildung von Tumoren.

Ausblick

Die Tatsache, dass in dieser Studie die maligne Transformation von HCEC-Zellen durch Exposition gegenüber N²-OH-PhIP erzielt wurde, lässt die Frage offen, ob weitere PhIP-Metabolite, die *in vivo* gebildet und in dieser Studie nicht untersucht wurden, ebenfalls eine entscheidende Rolle in der malignen Transformation von Zellen spielen. Weitere Untersuchungen an HCEC-Zellen mit synthetisch erzeugten Metaboliten von PhIP könnten zusätzliche Erkenntnisse über die Rolle des mit der Nahrung aufgenommenen heterozyklischen aromatischen Amins geben.

Außerdem könnten HCEC-Zellen, die spezifische Cytochrom P450 Isoformen exprimieren, für zukünftige Untersuchungen zum Thema chemisch-induzierte maligne Transformation von Humandickdarmepithelzellen sehr wertvoll sein.

Die Isolierung von DNA aus den chemisch maligne transformierten Zellen und anschließende Sequenzierung von Genen, die am Prozess der Kolonkanzerogenese beteiligt sind, mittels DNA-Chip-Technologie könnte weitere wichtige Informationen über die einzelnen Schritte des mehrstufigen Prozesses der Kolonkarzinogenese liefern.

6 Zusammenfassung

Die Zahl der Kolonkarzinome in den westlichen Industrieländern steigt in den letzten Jahren stetig an. Zu den Verbindungen, die mit der Zubereitung der Nahrung entstehen, mit ihr aufgenommen werden und die Kolonkanzerogenese möglicherweise begünstigen, gehört das heterozyklische aromatische PhIP, das bei der Erhitzung proteinreicher Nahrungsmittel entsteht.

Neben zahlreichen Fütterungsversuchen an Nagern existieren auch Zellkulturmodelle zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der PhIP-induzierten Kolonkanzerogenese. Die chemische Transformation von Zellen sollte durch wiederholte Exposition gegenüber dem hydroxylierten Metaboliten des Kanzerogens (N^2 -OH-PhIP) erzielt werden. Es wurden IEC-18-Zellen der Ratte und HCEC-Zellen des Menschen zur Untersuchung verwendet. Die Behandlung der IEC-18-Zellen führt nach 25 Behandlungszyklen mit Konzentrationen von 5 bis 20 μ M nicht zur Transformation der Zellen. Die Anwesenheit von N^2 -OH-PhIP führt zu einer zehnfach erhöhten Induktion der GST-Aktivität, insbesondere der Untereinheiten GST-A1, -A3, -Pi und -T2, die für die effiziente Detoxifizierung des N-Acetoxy-Metaboliten vom N^2 -OH-PhIP verantwortlich sind.

Bereits nach drei Behandlungen mit 1,5 μ M N^2 -OH-PhIP konnte eine maligne Transformation der HCEC-Zellen erzielt werden. Die Zellen zeigten die charakteristischen Zeichen der Transformation: veränderte Wachstumseigenschaften wie klonales dreidimensionales Zellwachstum („pilling up“), Hemmung der Zell-Zell-Kontaktinhibierung, verkürzte Populationsverdopplungszeiten und tumorigene und metastasierende Eigenschaften. Außerdem exprimierten die N^2 -OH-PhIP-exponierten humanen Kolonzellen mit steigender Anzahl der Behandlungen größere Mengen des trunkierten APC-Proteins. Die bekannten PhIP-spezifischen Mutationen im *APC*-Gen resultieren in der Expression eines trunkierten Proteinproduktes und werden als frühe Ereignisse in der Kolonkanzerogenese betrachtet.

Die zusammenfassende Betrachtung aller Ergebnisse zeigt, dass die IEC-18-Zelllinie zur chemischen Transformation durch N^2 -OH-PhIP ungeeignet ist. Dagegen wurde erstmalig eine vollständige chemische Transformation von Humandickdarmepithelzellen *in vitro* durch Exposition der humanen Kolonepithelzelllinie HCEC gegenüber dem Kolonkarzinogen N^2 -OH-PhIP erzielt.

7 Summary

In the last few years a strong increase in the incidence of colorectal cancer has been observed. As to the specific components in processed food responsible for the induction of colon cancerogenesis, it has been suggested that heterocyclic aromatic amines (HAA), e.g. the most abundant HAA 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP), which is formed in protein rich food, when it is cooked at high temperatures or over an open flame, might be involved in this process.

Whereas a number of *in vivo*-models to study PhIP-mediated colon carcinogenesis are known, only a limited number of cell culture systems to study the HAA-mediated transformation of intestinal epithelial cells do in fact exist.

In the present study IEC-18 cells (rat intestinal epithelial cells) and HCEC cells (human colon epithelial cells) were incubated with N²-OH-PhIP, the N-hydroxylated metabolite of PhIP. The IEC-18 cells could not be transformed despite 25 treatment cycles with 5 to 20 μM N²-OH-PhIP. This might be due to the fact that GST activity as well as the expression of the GST -A1, -A3, -Pi and -T2 units, which are responsible for the detoxication of the N-acetoxy derivative of PhIP were strongly induced by N²-OH-PhIP.

In contrast, HCEC cells were malignantly transformed when exposed three times to 1.5 μM N²-OH-PhIP. The chemically-treated cells showed a reduced population doubling time, they lost cell-cell contact inhibition and started pilling up. Furthermore, if HCEC cells were injected subcutaneously into SCID mice tumors developed at the site of injection in all animals tested. The transformed HCEC cells also express high amounts of truncated APC protein, which *in vivo* appears at an early stage of colon cancerogenesis.

Taken together, it has been shown that IEC-18 cells are not suitable for chemical transformation studies with the HAA metabolite N²-OH-PhIP. For the first time it has been shown that the HAA metabolite N²-OH-PhIP is indeed able to malignantly transform human colon epithelial cells *in vitro*.

8 Literaturverzeichnis

Aberle H., Bauer A., Stappert J., Kispert A., Kemler R.; β -Catenin is target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* **16** (1997), 3797-3804.

Aberle H., Schwartz H. and Kemler R.; Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J. Cell Biochem.* **61** (1996), 514-523.

Adamson R.H., Thorgeirsson U.P., Snyderwine E.G., Thorgeirsson S.S. Reeves J., Dalgard D.W., Takayama S., Sugimura T.; Carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-*f*]quinoline in nonhuman primates: induction of tumors in three macaques. *Jpn. J. Cancer Res.* **81** (1990), 10-14.

Ahlquist D.A., Skoletsky J.E., Boynton K.A., Harrington J.J., Mahoney D.W., Pierceall W.E., Thibodeau S.N., Shuber A.P.; Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* **119** (2000), 1219-1227.

Akiyama T.; Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* **11** (2000), 273-282.

Anderson M.W., Reynolds S.H., You M, Maronpot R.M.; Role of protooncogene activation in carcinogenesis. *Environ. Health Persp.* **98** (1992), 13-24.

Anwar S., Hall C., White J., Deakin M., Farrell W., Elder J.B.; Hereditary non-polyposis colorectal cancer: an updated review. *Eur. J. Surg. Oncol.* **26** (2000), 635-645.

Askling J., Dickman P.W., Karlen P., Brostrom O., Lapidus A., Lofberg R., Ekblom A.; Colorectal cancer rates among first-degree relatives of patients with inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Lancet* **357** (2001), 262-266.

Augustsson K., Skog K., Jagerstad M.M., Dickman P. W., Steineck G.; Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: a population-based study. *Lancet* **353** (1999), 703-707.

Baker S.J., Fearon E.R., Nigro J.M., Hamilton S.R., Preisinger A.C., Jessup J.M., van Tuinen P., Ledbetter D.H., Barker D.F., Nakamura Y., et al.; Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* **244** (1989), 217-221.

Balmain A, Brown K.; Oncogene activation in chemical carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.* **51** (1988), 147-182.

Barak Y., Juven T., Haffner R., Oren M.; Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* **12** (1993), 461-468.

Barbacid M.; Ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* **56** (1987), 779-827.

Baserga R.; The price of independence. *Exp. Cell Res.* **236** (1997), 1-3.

Blum S., Pfeiffer A., Tromvoukis Y.; Immortalized adult human colon epithelial cell line. US Patent 6,194,203 B1. 2001

Behrens J., Jerchow B.A., Wurtele M., Grimm J., Asbrand C., Witz R., Kuhl M., Wedlich D., Birchmeier W.; Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC and GSK3beta. *Science* **280** (1998), 596-599.

Ben-Ze'ev A., Geiger B.; Differential molecular interactions of beta-catenin and placoglobin in adhesion, signaling and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10** (1998), 629-639.

Beroud C., Soussi T.; APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* **24** (1996), 121-124.

Blum C.A., Tanaka T., Zhong X., Li Q., Dashwood W.M., Pereira C., Xu M., Dashwood R.H.; Mutational analysis of Ctnnb1 and Apc in tumors from rats given 1,2-dimethylhydrazine or 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline: mutational 'hotspots' and the relative expression of beta-catenin and c-jun. *Mol. Carcinog.* **36** (2003), 195-203.

Bodmer W.F., Bailey C.J., Bodmer J., Bussey H.J.R., Ellis A., Gorman P., Lucibello F.C., Murday V.A., Rider S.H., Scambler P., Sheer D., Solomon E., Spurr N.K.; Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* **328** (1987), 614-616.

Buonarati M.H., Turteltaub K.W., Shen N.H., Felton J.S.; Role of sulfation and acetylation in the activation of 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine to intermediates which bind DNA. *Mutat. Res.* **245** (1990), 185-190.

Buonarati M.H., Felton J.S.; Activation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) to mutagenic metabolites. *Carcinogenesis* **11** (1990), 1133-1138.

Burnouf D., Miturski R., Nagao M., Nakagama H., Nothisen M., Wagner J. and Fuchs R.P.; Early detection of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine(PhIP)-induced mutations within the Apc gene of rat colon. *Carcinogenesis* **22** (2001), 329-335.

Cadwell C., Zambetti G.P.; The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene* **277** (2001), 15-30.

Castells A., Ino Y., Louis D.N., Ramesh V., Gusella J.F., Rustgi A. K.; Mapping of a target region of allelic loss to a 0.5-cM interval on chromosome 22q13 in human colorectal cancer. *Gastroenterology* **117** (1999), 831-837.

Chen J., Marechal V., Levine A.J.; Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol. Cell Biol.* **13** (1993), 4107-4114.

Chou H.C., Lang N.P., Kadlubar F.F.; Metabolic activation of N-hydroxy arylamines and N-hydroxy heterocyclic amines by human sulfotransferase(s). *Cancer Res.* **55** (1995 a), 525-529.

Chou H.C., Lang N.P., Kadlubar F.F.; Metabolic activation of the N-hydroxy derivative of the carcinogen 4-aminobiphenyl by human tissue sulfotransferases. *Carcinogenesis* **16** (1995 b), 413-417.

Chung D.C.; The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* **119** (2000), 854-865.

Coles B., Nowell S. A., MacLeod S. L., Sweeney C., Lang N. P., Kadlubar F. F.; The role of human glutathione S-transferases (hGSTs) in the detoxification of the food-derived carcinogen metabolite N-acetoxy-PhIP, and the effect of a polymorphism in hGSTA1 on colorectal cancer risk. *Mutat. Res.* **482** (2001), 3-10.

Crofts F.G., Strickland P.T., Hayes C.L., Sutter T.R.; Metabolism of 2- amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) by human cytochrome P4501B1. *Carcinogenesis* **18** (1997), 1793-1798.

Damalas A., Ben-Ze'ev A., Simcha I., Shtutman M., Leal J.F., Zhurinsky J., Geiger B., Oren M.; Excess β -catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *EMBO J.* **18** (1999 a), 3054-3063.

Damalas A., Kahan S., Shtutman M., Ben-Ze'ev A., Oren M.; Deregulated β -Catenin induces a p53- and ARF-dependent growth arrest and cooperates with Ras in transformation. *EMBO J.* **20** (1999 b), 4912-4922.

Dashwood R.H., Suzui M., Nakagama H., Sugimura T., Nagao M.; High frequency of beta-catenin (ctnnb1) mutations in the colon tumors induced by two heterocyclic amines in the F344 rat. *Cancer Res.* **58** (1998), 1127-1129.

Davis C.D., Farb A., Thorgeirsson S.S., Virmani R., Snyderwine E.G.; Cardiotoxicity of heterocyclic amine food mutagens in cultured myocytes and in rats. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **124** (1994), 201-11.

Davis C.D., Schut H.A., Snyderwine E.G.; Adduction of the heterocyclic amine food mutagens IQ and PhIP to mitochondrial and nuclear DNA in the liver of Fischer-344 rats. *Carcinogenesis* **15** (1994), 641-645.

Davis C.D., Schut H.A. and Snyderwine E.G.; Enzymatic phase II activation of the N-hydroxylamines of IQ, MeIQx and PhIP by various organs of monkeys and rats. *Carcinogenesis* **14** (1993), 2091-2096.

Delfino R.J., Sinha R., Smith C., West J., White E., Lin H.J., Liao S.Y., Gim J.S., Butler J., Anton-Culver H.; Breast Cancer, heterocyclic amines from meat and N-acetyltransferase 2 genotype. *Carcinogenesis* **21** (2000), 607-615.

Deppert W.; The yin and yang of p53 in cellular proliferation. *Semin Cancer Biol* **5** (1994), 187-202.

De Stefani E., Boffetta P., Mendilaharsu M., Carzoglio J., Deneo-Pellegrini H.; Dietary nitrosamines, heterocyclic amines and risk of gastric cancer: A case-control study in Uruguay. *Nutr. Cancer* **30** (1998 a), 158-162.

De Stefani E., Deneo-Pellegrini H., Mendilaharsu M., et al.; A meat intake, heterocyclic amines and risk of colorectal cancer: a case-control study in Uruguay. *Int. J. Oncol.* **10** (1997 b), 573-580.

De Stefani E., Ronco A., Mendilaharsu M., Deneo-Pellegrini H.; Case-control study on the role of heterocyclic amines in the etiology of upper aerodigestive cancers in Uruguay. *Nutr. Cancer* **32** (1998 b), 43-48.

De Stefani E., Ronco A., Mendilaharsu M., Guidobono M., Deneo-Pellegrini H.; Meat intake, heterocyclic amines and the risk of breast cancer : a case-control study in Uruguay. *Cancer Epidem. Biom. Prev.* **6** (1997 a), 573-581.

Dihlmann S., Amler L.C., Schwab M., Wenzel A.; Variations in the expression of the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene in human cancer cell lines of different tissue origin. *Oncol. Res.*, **9** (1997), 119-127.

Dingley K.H., Curtis K.D., Nowell S., Felton J.S., Lang N.P., Turteltaub K.W.; DNA and protein adduct formation in the colon and blood of humans after exposure to a dietary-relevant dose of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **8** (1999), 507-512.

Dunn R.T., Klaassen C.D.; Tissue-specific expression of rat sulfotransferase messenger RNAs. *Drug Metab. Dispos.* **26** (1998), 598-604.

Dong S.M., Traverso G., Johnson C., Geng L., Favis R., Boynton K., Hibi K., Goodman S.N., D'Allesio M., Paty P., Hamilton S.R., Sidransky D., Barany F., Levin B., Shuber A., Kinzler K.W., Vogelstein B., Jen J.; Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets. *J. Natl. Cancer Inst.* **93** (2001), 858-865.

Eberhart C.E., Coffey R.J., Radhika A., Giardiello F.M., Ferrenbach S., DuBois R.N.; Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* **107** (1994), 1183-1188.

Easwaran V., Lee S.H., Inge L., Guo L., Goldbeck C., Garrett E., Wiesmann M., Garcia P.D., Fuller J.H., Chan V., Randazzo F., Gundel R., Warren R.S., Escobedo J., Aukerman S.L., Taylor R.N., Fantl W.J.; β -Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res.* **63** (2003), 3145-3153.

El-Deiry W.S., Kern S.E., Pietenpol J.A., Kinzler K.W., Vogelstein B.; Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.* **1** (1992), 45-49.

Eliyahu D., Raz A., Gruss P., Givol D., Oren M.; Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* **312** (1984), 646-649.

Engelhardt M., Martens U.M.; The implication of telomerase activity and telomere stability for replicative aging and cellular immortality. *Oncol. Rep.* **5** (1998), 1043-1052.

Esumi H., Ohgaki H., Kohzen E., Takayama S., Sugimura T.; Induction of lymphoma in CDF1 mice by the food mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Jpn. J. Cancer Res.* **80** (1989), 1176-1178.

Fang S., Jensen J.P., Ludwig R.L., Vousden K.H., Weissman A.M.; Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem.* **275** (2000), 8945-8951.

Fearnhead N.S., Britton M.P., Bodmer W.F.; The ABC of APC. *Hum. Mol. Genet.* **10** (2001), 721-733.

Fearon E.R., Vogelstein B.; A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61** (1990), 759-767.

Felton J.S., Knize M.G., Shen N.H., Lewis P.R., Andresen B.D., Happe J., Hatch F.T.; The isolation and identification of a new mutagen from fried ground beef: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis* **7** (1986), 1081-1086.

Finlay C.A., Hinds P.W., Levine A.J.; The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57** (1989), 1083-1093.

Freshney R.I.; In: *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. Wiley List, 4th ed. (2000), 269-339.

Frandsen H., Alexander J.; N-acetyltransferase-dependent activation of 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine: formation of 2-amino-1-methyl-6-(5-hydroxy)-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, a possible biomarker for the reactive dose of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Carcinogenesis* **21** (2000), 1197-1203.

Friedman P.N., Chen X., Bargonetti J., Prives C.; The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (1993), 3319-3323.

Frisch S.M., Francis H.; Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* **124** (1994), 619-626.

Ganten D., Ruckpaul K. (Hrsg.); *Molekularmedizinische Grundlagen von hereditären Tumorerkrankungen*. Springer: Berlin, Heidelberg, New York (2001).

Geyer R.K., Yu Z.K., Maki C.G.; The Mdm2 RING finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nat. Cell Biol.* **2** (2000), 569-573.

Giaccia A.J., Kastan M.B.; The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Gene Dev.* **12** (1998), 2973-2983.

Glatt H., Gemperlein I., Setiabudi F., Platt K. L., Oesch F.; Expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in propagatable cell cultures and induction of micronuclei by 13 compounds. *Mutagenesis* **5** (1990), 241-249.

Glatt H., Gemperlein I., Turchi G., Heinritz H., Doehmer J., Oesch F.; Search for cell culture systems with diverse xenobiotic-metabolizing activities and their use in toxicological studies. *Mol. Toxicol.* **1** (1987), 313-334.

Groden J., Thliveris A., Samowitz W., Carlson M., Gelbert L., Albertsen H., Joslyn G., Stevens J., Spirio L., Robertson M. et al.; Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* **66** (1991), 589-600.

Guengerich F.P., Humphreys W.G., Yun C.-H., Hammons G.-J., Kadlubar F.F., Seto Y., Okazaki O., Martin M.V.; Mechanisms of cytochrome P450 1A2-mediated formation of N-hydroxy arylamines and heterocyclic aromatic amines and their reaction with guanyl residues. In: *Heterocyclic Amines in Cooked Foods: Possible Human Carcinogens*. (Eds.: Adamson R.H., Gustafsson J.A., Ito N., Nagao M., Sugimura T., Wakabayashi K., Yamazoe Y.), Princeton Scientific Publishers, Princeton (1995), 78– 84.

Graham Jr. R.C., Karnovsky M.J.; The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* **14** (1966), 291– 302.

Hamilton S. R.; Origin of colorectal cancers in hyperplastic polyps and serrated adenomas: another truism bites the dust. *J. Natl. Cancer I.* **93** (2001), 1282-1283.

Hanahan D., Weinberg R.A.; The hallmarks of cancer. *Cell* **100** (2000), 57-70.

Hayflick L.; Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)* **62** (1997), 1180-1190.

Herman J.G., Umar A., Polyak K., Graff J.R., Ahuja N., Issa J.P., Markowitz S., Willson J.K., Hamilton S.R., Kinzler K.W., Kane M.F., Kolodner R.D., Vogelstein B., Kunkel T.A., Baylin S.B.; Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (1998), 6870-6875.

Holme J.A., Wallin H., Brunborg G., Soderlund E.J., Hongslo J.K., Alexander J. ; Genotoxicity of the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP): formation of 2- hydroxamino-PhIP, a directly acting genotoxic metabolite. *Carcinogenesis* **10** (1989), 1389-1396.

Höhne A.; Molekular- und zellbiologische Charakterisierung der Zelllinie IEC-6: ein geeignetes *in vitro* Modell zum Studium der chemisch induzierten Dickdarmkrebsentstehung. *Diplomarbeit Universität Potsdam* 2001.

Holder C.L., Preece S.W., Conway S.C., Pu Y.M., Doerge D.R.; Quantification of heterocyclic amine carcinogens in cooked meats using isotope dilution liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.* **11** (1997), 1667-1672.

Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C.C.; p53 mutations in human cancers. *Science* **253** (1991), 49-53.

Iacopetta B.; Aberrant DNA methylation: have we entered the era of more than one type of colorectal cancer?. *Am. J. Pathol.* **162** (2003), 1043-1045.

Ito N., Hasegawa R., Sano M., Tamano S., Esumi H., Takayama S., Sugimura T.; A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis* **12** (1991), 1503-1506.

Iwamoto M., Ahnen D.J., Franklin W.A., Maltzman T.H.; Expression of beta-catenin and full-length APC protein in normal and neoplastic colonic tissues. *Carcinogenesis* **21** (2000), 1935-1940.

Jass J.R.; Serrated route to colorectal cancer: back street or super highway? *J. Pathol.* **193** (2001), 283-285.

Jass J.R., Young J., Leggett B.A.; Evolution of colorectal cancer: change of pace and change of direction. *J. Gastroen. Hepatol.* **17** (2002 a), 17-26.

Jass J.R., Whitehall V.L., Young J., Leggett B.A.; Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* **123** (2002 b), 862-876.

Jenkins J., Rudge K., Currie G.; Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation associated phosphoprotein p53. *Nature* **312** (1984), 651-654.

Joazeiro C.A., Weissman A.M.; RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102** (2000), 549-552.

Joslyn J., Carlson M., Thliveris A., Albertsen H., Gelbert L., Samowitz W., Groden J., Stevens J., Spirio L., Robertson M., et al.; Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell* **66** (1991), 601-613.

Kadlubar F.F.; DNA adducts of carcinogenic aromatic amines. In: *DNA Adducts: Identification and Biological Significance, Vol. 125*. (Eds.: Hemminki K., Dipple A., Shuker D.E.G., Kadlubar F.F., Segerback D., Bartsch H.), IARC Scientific Publications, Lyon (1994) 199-216.

Kaderlik K.R., Mulder G.J., Turesky R.J., Lang N.P., Teitel C.H., Chiarelli M.P., Kadlubar F.F.; Glucuronidation of N-hydroxy heterocyclic amines by human and rat liver microsomes. *Carcinogenesis*, **15** (1994 a), 1695-1701.

Kaderlik K.R., Minchin R.F., Mulder G.J., Ilett K.F., Daugaard-Jenson M., Teitel C.H., Kadlubar F.F.; Metabolic activation pathway for the formation of DNA adducts of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in rat extrahepatic tissues. *Carcinogenesis* **15** (1994 b), 1703-1709.

Kakiuchi H., Watanabe M., Ushijima T., Toyota M., Imai K., Weisburger J.H., Sugimura T., Nagao M.; Specific 5'-GGGA-3'→5'-GGA-3' mutation of the Apc gene in rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (1995), 910-914.

Kashiwagi H., Spigelman A.D., Talbot I.C., Debinski H.S., McKie A.B., Lemoine N.R., Phillips R.K.; p53 and K-ras status in duodenal adenomas in familial adenomatous polyposis. *Brit. J. Surg.* **84** (1997), 826-829.

Kinzler K.W., Vogelstein B.; Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87** (1996), 159-170.

Kinzler K.W., Vogelstein B. Chapter IV; Colorectal Tumors. In: *The genetic basis of cancer*. Mc. Graw-Hill: New York, USA (2002), 583-612.

Kinzler K.W., Nilbert M.C., Su L.K., Vogelstein B., Bryan T.M., Levy D.B., Smith K.J., Preisinger A.C., Hedge P., McKechnie D., et al.; Identification of FAP locus genes from Chromosome 5q21. *Science* **253** (1991), 661-665.

Kirchner S.; Bioaktivierung von 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin in intestinalen Epizthelzellen. *Diplomarbeit Universität Potsdam* 2002.

Korinek V., Barker N., Morin P.J., van Wichen D., de Weger R., Kinzler K.W., Vogelstein B., Clevers H.; Constitutive transcriptional activation by a β -Catenin-Tcf-complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* **275** (1997), 1784-1787.

Kulp K.S., Knize M.G., Malfatti M.A., Salmon C.P., Felton J.S.; Identification of urine metabolites of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine following consumption of a single cooked chicken meal in humans. *Carcinogenesis* **21** (2000), 2065-2072.

Laemmli U.K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (1970), 680-685.

Lane D.P., Crawford L.V.; T antigen is bound to a host protein in SV40- transformed cells. *Nature* **278** (1979), 261-263.

Lang N.P., Butler M.A., Massengill J., Lawson M., Stotts R.C., Hauer-Jensen M., Kadlubar F.F.; Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidem. Biom. Prev.* **3** (1994), 675-682.

Langheinrich C.; Untersuchungen zur Inhibierung von p53 in intestinalen Rattenepithelzellen (IEC-18). *Diplomarbeit Universität Potsdam* 2003.

Lee P.J., Washer L.L., Law D.J., Boland C.R., Horon I.L., Feinberg A.P.; Limited up-regulation of DNA methyltransferase in human colon cancer reflecting increased cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996), 10366-10370.

Lee S., Elenbaas B., Levine A., Griffith J.; p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* **81** (1995), 1013-1020.

Lichtenstein P., Holm N.V., Verkasalo P.K., Iliadou A., Kaprio J., Koskenvuo M., Pukkala E., Skythe A., Hemminki K.; Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark and Finland. *N. Engl. J. Med.* **343** (2000), 78-85.

Liebermann D.A., Hoffman B., Steinman R.A.; Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways. *Oncogene* **11** (1995), 199-210.

Lin D., Meyer D.J., Ketterer B., Lang N.P., Kadlubar F.F.; Effects of human and rat glutathione S-transferases on the covalent DNA binding of the N-acetoxy derivatives of heterocyclic amine carcinogens in vitro: a possible mechanism of organ specificity in their carcinogenesis. *Cancer Res.* **54** (1994), 4920-4926.

Lin D., Kaderlik K.R., Turesky R.J., Miller D.W., Lay Jr. J.O., Kadlubar F.F.; Identification of N-(Deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine as the major adduct formed by the food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, with DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **5** (1992), 691-697.

Lu H., Levine A.J.; Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (1995), 5154-5158.

Lyon J.L., Mahoney A.W.; Fried foods and the risk of colon cancer. *Am. J. Epidemiol.* **128** (1988), 1000-1006.

Maki C.G., Huibregtse J.M., Howley P.M.; In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Res.* **56** (1996), 2649-2654.

Manabe S., Kurihara N., Wada O., Tohyama K., Aramaki T.; Formation of PhIP in a mixture of creatinine, phenylalanine and sugar or aldehyde by aqueous heating. *Carcinogenesis* **13** (1992), 827-830.

Manabe S., Suzuki H., Wada O., Ueki A.; Detection of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in beer and wine. *Carcinogenesis* **14** (1993), 899-901.

Mannervik B., Awasthi Y.C., Board P.G., Hayes J.D., di Ilio C., Ketterer B., Listowsky I., Morgenstern R., Muramatsu M., Pearson W.R., et al.; Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem. J.* **282** (1992), 305-306.

Mann P.; Molekular- und zellbiologische Charakterisierung der Zelllinie IEC-18: ein geeignetes in vitro Modell zum Studium der chemisch induzierten Dickdarmkrebsentstehung. *Diplomarbeit Universität Potsdam* 2001.

Marshall C.J.; Ras effectors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8** (1996), 197-204.

McManus M.E., Felton J.S., Knize M.G., Burgess W.M., Roberts-Thomson S., Pond S.M., Stupans I., Veronese M.E.; Activation of the food-derived mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine by rabbit and human liver microsomes and purified forms of cytochrome P-450. *Carcinogenesis* **10** (1989), 357-363.

Mercurio M.G., Shiff S.J., Galbraith R.A., Sassa S.; Expression of cytochrome P450 mRNAs in the colon and the rectum in normal human subjects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210** (1995), 350-355.

Minchin R. F., Reeves P. T., Teitel C. H., McManus M. E., Mojarrabi B., Ilett K. F., Kadlubar F.F.; N- and O-acetylation of aromatic and heterocyclic amine carcinogens by human monomorphic and polymorphic acetyltransferases expressed in COS-1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185** (1992), 839-844.

Miyaki M, Konishi M., Kikuchi-Yanoshita R., Enomoto M., Igari T., Tanaka K., Muraoka M., Takahashi H., Amada Y., Fukayama M., Maeda Y., Iwama T., Mishima Y., Mori T., Koike M.; Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res.* **54** (1994), 3011-3020.

Miyoshi Y., Ando H., Nagase H., Nishisho I., Horii A., Miki Y., Mori T., Utsunomiya J., Baba S., Petersen G., Hamilton S.R., Kinzler K.W., Vogelstein B., Nakamura Y.; Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (1992), 4452-4456.

Momand J., Zambetti G.P., Olson D.C., George D., Levine A.J.; The mdm2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69** (1992), 1237-1245.

Morin P.J., Sparks A.B., Korinek V., Barker N., Clevers H., Vogelstein B., Kinzler K.W.; Activation of β -Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in β -Catenin or APC. *Science* **275** (1997), 1787-1790.

Muckel E., Frandsen H., Glatt H.; Heterologous expression of human N-acetyltransferases 1 and 2 and sulfotransferase 1A1 in *Salmonella typhimurium* for mutagenicity testing of heterocyclic amines. *Food Chem. Toxicol.* **40** (2002), 1063-1068.

Nagao M., Sugimura T. Chapter 3: Heterocyclic Amines. In: *Food borne carcinogens*. John Wiley&Sons, Ltd.: Chichester (2000).

Norrish A.E., Ferguson L.R., Knize M.G., Felton J.S., Sharpe S.J., Jackson R.T.; Heterocyclic amine content of cooked meat and risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer I.* **91** (1999), 2038-2044.

Norat T., Lukanova A., Ferrari P., Riboli E.; Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int. J. Cancer* **98** (2002), 241-256.

Ogura K., Nishiyama T., Hiratsuka A., Watabe T.; Isolation and characterization of the gene encoding rat class theta glutathione S-transferase subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205** (1994), 1250-1256.

Orford K., Crockett C., Jensen J.P., Weissman A.M., Byers S.W.; Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of β -Catenin. *J. Biol. Chem.* **272** (1997), 24735-24738.

Ozawa S., Chou H.C., Kadlubar F.F., Nagata K., Yamazoe Y., Kato R.; Activation of 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine by cDNA-expressed human and rat arylsulfotransferases. *Jpn. J. Cancer Res.* **85** (1994), 1220-1228.

Ozawa S., Nagata K., Yamazoe Y., Kato R.; Formation of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline- and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline-sulfamates by cDNA-expressed mammalian phenol sulfotransferases. *Jpn. J. Cancer Res.* **86** (1995), 264-269.

Peifer M.; β -Catenin as Oncogene: The Smoking Gun. *Science* **275** (1997), 1752-1753

Peltomaki P.; Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum. Mol. Genet.* **10** (2001), 735-740.

Pfau W.; Heterocyclic aromatic amines, genotoxicity and DNA adduct formation. In: *Carcinogenic and Anticarcinogenic Factors in Food* (Eds.: DFG Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln), Wiley-VCH: Weinheim, Berlin, New York (2000).

Pfau W., Brockstedt U., Shirai T., Ito N., Marquardt H.; Pancreatic DNA adducts formed in vitro and in vivo by the food mutagens 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) and 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-*b*]indole (MeA alphaC). *Mutat. Res.* **378** (1997), 13-22.

Potter, J.D.; Nutrition and colorectal cancer. *Cancer Causes Control* **7** (1996), 127–146.

Polakis P., Hart M., Rubinfeld B.; Defects in the regulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **470** (1999), 23-32.

Powell S.M., Zilz N., Beazer-Barclay Y., Bryan T.M., Hamilton S.R., Thibodeau S.N., Vogelstein B., Kinzler K.W.; APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* **359** (1992), 235-237.

Prives C., Hall P.A.; The p53 pathway. *J. Pathol.* **187** (1999), 112-126.

Quaroni A., Isselbacher K.; Cytotoxic effects and metabolism of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in duodenal and ileal epithelial cell cultures. *J. Natl. Cancer I.* **67** (1981), 1353-1362.

Quaroni A., Wands J., Trelstad R.L., Isselbacher K.J.; Epitheloid cell cultures from rat small intestine. *J. Cell Biol.* **80** (1979), 248-265.

Rashid A., Houlihan P.S., Booker S., Petersen G.M., Giardiello F.M., Hamilton S.R.; Phenotypic and molecular characteristics of hyperplastic polyposis. *Gastroenterology* **119** (2000), 323-332.

Reed M., Woelker B., Wang P., Wang Y., Anderson M.E., Tegtmeier P.; The C-terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (1995), 9455-9459.

Reistad R., Frandsen H., Grivas S., Alexander J.; In vitro formation and degradation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) protein adducts. *Carcinogenesis* **15** (1994), 2547-2552.

Rubinfeld B., Robbins P., El-Gamil M., Albert I., Porfiri E., Polakis P.; Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* **275** (1997), 1790-1792.

Sakamuro D., Sabbatini P., White E., Prendergast G.C.; The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* **15** (1997), 887-898.

Sambrook J.R.D.; Calcium-phosphate-mediated transfection of eukaryotic cells with plasmid DNAs. In: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Laboratory Press: New York, Cold Spring Harbor. (2001), **3**, 16.14-16.18.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.; DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** (1977), 5463-5467.

Schröder, I.; Toxikologische Untersuchungen von Isothiocyanat-Proteinderivaten. *Dissertation Universität Potsdam*. 1999.

Schulmann K., Schmiegel W.; Kolorektales Karzinom. In: *Nicht-hereditäre Tumorerkrankungen* (Hrsg.: Ganten D., Ruckpaul K.), Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg (2002), 231-256.

Schut H.A., Herzog C.R.; Formation of DNA adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in male Fischer-344 rats. *Cancer Lett.* **67** (1992), 117-124.

Schut H.A., Cummings D.A., Smale M.H., Josyula S., Friesen M.D.; DNA adducts of heterocyclic amines: formation, removal and inhibition by dietary components. *Mutat. Res.* **376** (1997), 185-194.

Schut H.A., Dashwood R.H.; Inhibition of DNA adduct formation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) by dietary indole-3-carbinol (I3C) in the mammary gland, colon, and liver of the female F-344 rat. *Ann. NY. Acad. Sci.* **768** (1995), 210-214.

Schut H.A., Snyderwine E.G.; DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis* **20** (1999), 353-368.

Seto E., Usheva A., Zambetti G.P., Momand J., Horikoshi N., Weinmann R., Levine A.J., Shenk T.; Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (1992), 12028-12032.

Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Inui Y., Guengerich F.P.; Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270** (1994), 414-423.

Shirai T., Tamano S., Sano M., Masui T., Hasegawa R., Ito N.; Carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in rats: dose-response studies. *Princess Takamatsu Symposia* **23** (1995), 232-239.

Sieber O.M., Tomlinson I.P., Lamlum H.; The adenomatous polyposis coli (APC) tumour suppressor—genetics, function and disease. *Mol. Med. Today* **6** (2000), 462-469.

Sinha R., Kulldorff M., Swanson C.A., Curtin J., Brownson R.C., Alavanja M.C.; Dietary heterocyclic amines and the risk of lung cancer among Missouri women. *Cancer Research* **60** (2000 a), 3753-3757.

Sinha R., Gustafson D.R., Kulldorff M., Wen W.Q., Cerhan J.R., Zheng W.; 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, a carcinogen in high-temperature-cooked meat and breast cancer risk. *J. Natl. Cancer I.* **92** (2000 b), 1352-1354.

Sinha R., Kulldorff M., Chow W.H., Denobile J., Rothman N.; Dietary intake of heterocyclic amines, meat-derived mutagenic activity and risk of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol. Biom. Prev.* **10** (2001), 559-562.

Sinha R., Rothman N., Brown E.D., Salmon C.P., Knize M.G., Swanson C.A., Rossi S.C., Mark S.D., Levander O.A., Felton J.S.; High concentrations of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-*b*]pyridine (PhIP) occur in chicken but are dependent on the cooking method. *Cancer Res.* **55** (1995), 4516-4519.

Skog K.I., Johansson M.A., Jagerstad M.I.; Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food Chem. Toxicol.* **36** (1998), 879-896.

Sparks A.B., Morin P.J., Vogelstein B., Kinzler K.W.; Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.* **58** (1998), 1130-1134.

Stoker M., O'Neill C., Berryman S., Waxman V.; Anchorage and growth regulation in normal and virus-transformed cells. *Int. J. Cancer* **3** (1968), 683-693.

Stommel J.M., Marchenko N.D., Jimenez G.S., Moll U.M., Hope T.J., Wahl G.M.; A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* **18** (1999), 1660-1672.

Subbaramaiah K., Dannenberg A.J.; Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol Sci* **24** (2003), 96-102.

Sugimura T.; Overview of carcinogenic heterocyclic amines. *Mutat. Res.* **376** (1997), 211-219.

Suzui M., Ushijima T., Dashwood R.H., Yoshimi N., Sugimura T., Mori H., Nagao M.; Frequent mutations of the rat beta-catenin gene in colon cancers induced by methylazoxymethanol acetate plus 1-hydroxyanthraquinone. *Mol. Carcinog.* **24** (1999), 232-237.

Takahashi M., Mutoh M., Kawamori T., Sugimura T., Wakabayashi K.; Altered expression of beta-catenin, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **21** (2000), 1319-1327.

Takayama K., Yamashita K., Wakabayashi K., Sugimura T., Nagao M.; DNA modification by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in rats. *Jpn. J. Cancer. Res.* **80** (1989), 1145-1148.

Tanaka T., Kohno H., Murakami M., Shimada R., Kagami S.; Colitis-related rat colon carcinogenesis induced by 1-hydroxy-anthraquinone and methylazoxymethanol acetate (Review). *Oncol. Rep.* **7** (2000), 501-508.

Terrier P., Townsend A.J., Coindre J.M., Triche T.J., Cowan K.H.; An immunohistochemical study of pi class glutathione S-transferase expression in normal human tissue. *Am. J. Pathol.* **137** (1990), 845-853.

Teubner W.; Charakterisierung von Sulfotransferasen im Gastrointestinaltrakt von Mensch und Ratte und Aktivierung von Promutagenen in V79 Zellen, die eine intestinale Form (1B1) des Menschen und der Ratte exprimieren. *Dissertation Universität Potsdam* 2001.

Trent J.M., Wiltshire R., Su L.K., Nikolaides N.C., Vogelstein B, Kinzler K.W.; The gene for the APC-binding protein β -catenin (CTNNB1) maps to chromosome 3p22, a region frequently altered in human malignancies. *Cytogenet. Cell Genet.* **71** (1995), 343-344.

Turesky, R.J., Rossi, S.C., Welti, D.H., Lay Jr., J.O., Kadlubar, F.F.; Characterization of DNA adducts formed in vitro by reaction of N-hydroxy-2-amino-3-methylimidazo [4,5-*f*]quinoline and N-hydroxy-2- amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline at the C-8 and N-2 atoms of guanine. *Chem. Res. Toxicol.* **5** (1992), 479– 490.

Turesky R.J., Constable A., Richoz J., Varga N., Markovic J., Martin M.V., Guengerich F.P.; Activation of heterocyclic aromatic amines by rat and human liver microsomes and by purified rat and human cytochrome P450 1A2. *Chem. Res. Toxicol.* **11** (1998), 925-936.

Turesky R.J., Lang N.P., Butler M.A., Teitel C.H., Kadlubar F.F.; Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon. *Carcinogenesis* **12** (1991), 1839-1845.

Turteltaub K.W., Vogel J.S., Frantz C., Felton J.S., McManus M.; Assessment of the DNA adduction and pharmacokinetics of PhIP and MeIQx in rodents at doses approximating human exposure using the technique of accelerator mass spectrometry (AMS) and ³²P-postlabeling. *Princess Takamatsu Symposia* **23** (1995), 93-102.

Van Tuinen P., Rich D.C., Summers K.M., Ledbetter D.H.; Regional mapping panel for human chromosome 17: application to neurofibromatosis type 1. *Genomics* **1** (1987), 374-381.

Venot C., Maratrat M., Dureuil C., Conseiller E., Bracco L., Debussche L.; The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *EMBO J.* **17** (1998), 4668-4679.

Vogelstein B., Kinzler K.W.; The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* **9** (1993), 138-141.

Vogelstein B., Kinzler K.W.; p53 function and dysfunction. *Cell* **70** (1992), 523-526.

Wakabayashi, K., Nagao, M., Esumi, H., Sugimura, T.; Food-derived mutagens and carcinogens. *Cancer Res.* **52** (1992), 2092S– 2098S.

Ware J.A., Reilly T.P., Svensson C.K.; Cellular distribution of N-acetyltransferase activity in the rat small intestine. *Biochem. Pharmacol.* **55** (1998), 1475-1479.

Ware J.A., Svensson C.K.; Longitudinal distribution of arylamine N-acetyltransferases in the intestine of the hamster, mouse, and rat. Evidence for multiplicity of N-acetyltransferases in the intestine. *Biochem. Pharmacol.* **52** (1996), 1613-1620.

Walker K.K., Levine A.J.; Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996), 15335-15340.

Wallin H., Mikalsen A., Guengerich F.P., Ingelman-Sundberg M., Solberg K.E., Rossland O.J., Alexander J.; Differential rates of metabolic activation and detoxication of the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine by different cytochrome P450 enzymes. *Carcinogenesis* **11** (1990), 489-492.

Wang P., Reed M., Wang Y., Mayr G., Stenger J.E., Anderson M.E., Schwedes J.F., Tegtmeyer P.; p53 domains: structure, oligomerization, and transformation. *Mol. Cell Biol.* **14** (1994), 5182-5191.

Webb C.P., van Aelst L., Wigler M.H., van de Woude G.F.; Signaling pathways in ras-mediated tumorigenicity and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (1998), 9773-9778.

Windmill K.F., McKinnon R.A., Zhu X., Gaedigk A., Grant D.M., McManus M.E.; The role of xenobiotic metabolizing enzymes in arylamine toxicity and carcinogenesis: functional and localization studies. *Mutat. Res.* **376** (1997), 153-160.

World Cancer Fund and the American Institute for Cancer Research; Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. American Institute for Cancer Research, Washington 1997

Wu X., Bayle J.H., Olson D., Levine A.J.; The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Gene Dev.* **7** (1993), 1126-1132.

Xiao H., Pearson A., Coulombe B., Truant R., Zhang S., Regier J.L., Triezenberg S.J., Reinberg D., Flores O., Ingles C.J., Greenblatt J.; Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol. Cell Biol.* **14** (1994), 7013-7024.

Yadollahi-Farsani M., Gooderham N.J., Davies D.S., Boobis A.R.; Mutational spectra of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine(PhIP) at the Chinese hamsters hprt locus. *Carcinogenesis* **17** (1996), 617-624.

Yamada Y., Oyama T., Hirose Y., Hara A., Sugie S., Yoshida K., Yoshimi N., Mori H.; β -Catenin mutation is selected during malignant transformation in colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **24** (2003), 91-97.

Zhang Q.Y., He W., Dunbar D., Kaminsky L.; Induction of CYP1A1 by beta-naphthoflavone in IEC-18 rat intestinal epithelial cells and potentiation of induction by dibutyl cAMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233** (1997), 623-626.

9 Anhang

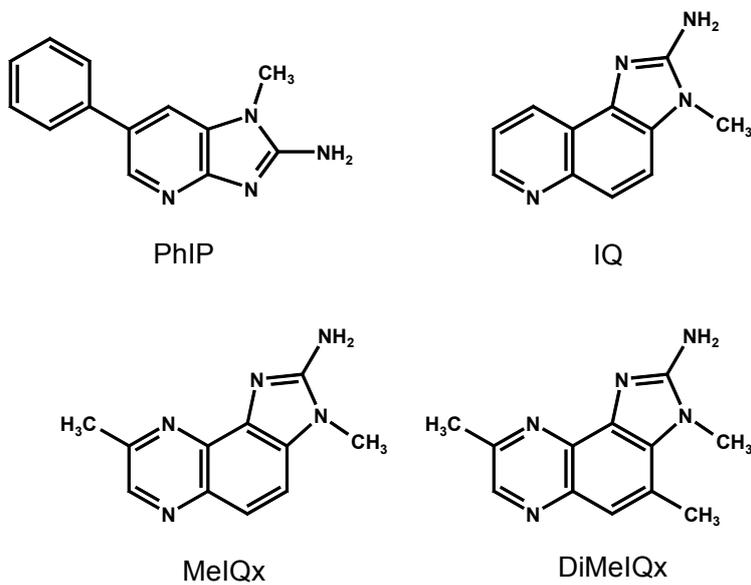


Abbildung A1

Strukturformeln wichtiger heterozyklischer aromatischer Amine

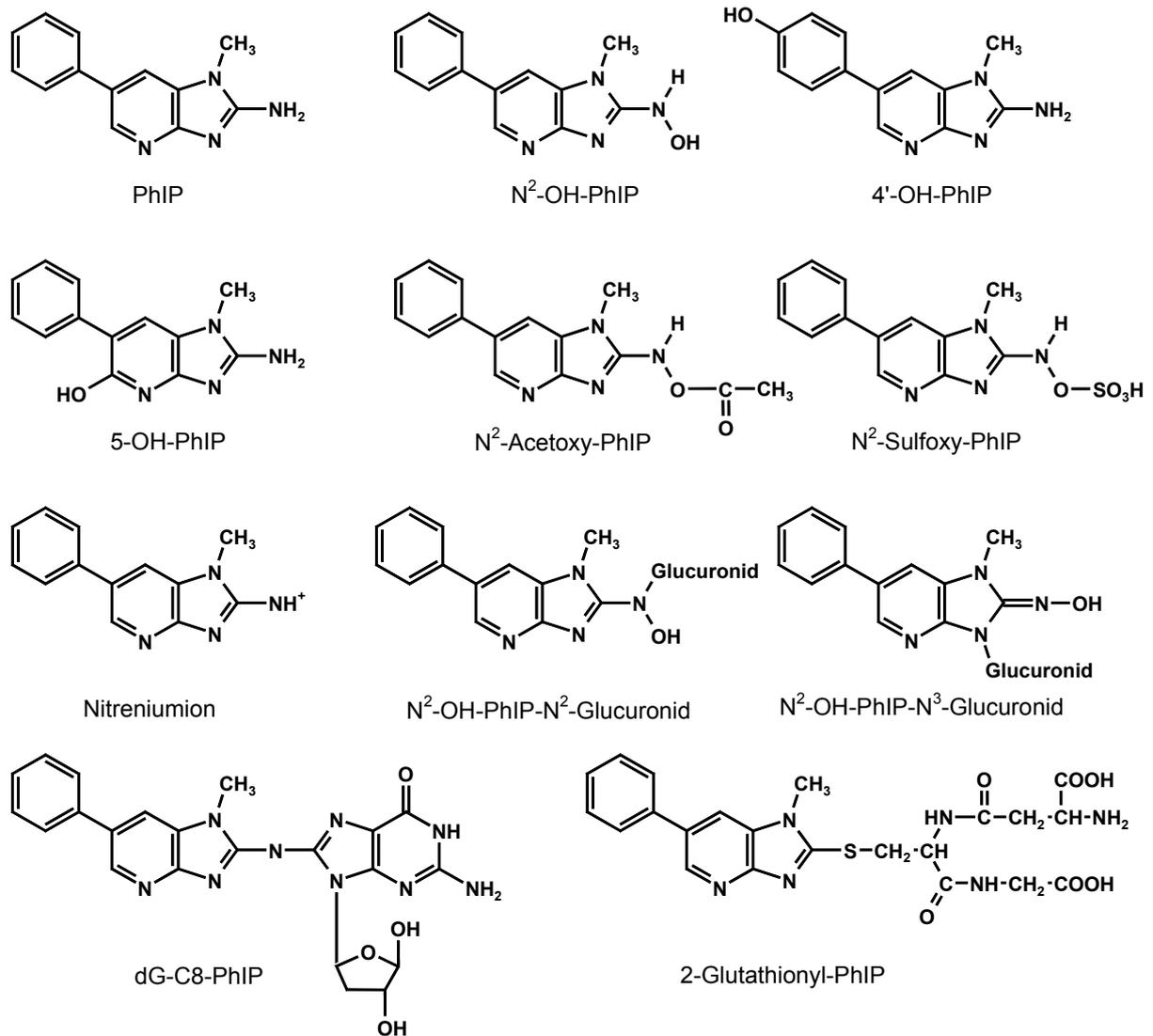


Abbildung A2 Strukturformeln wichtiger Metabolite von PhIP und N²-OH-PhIP

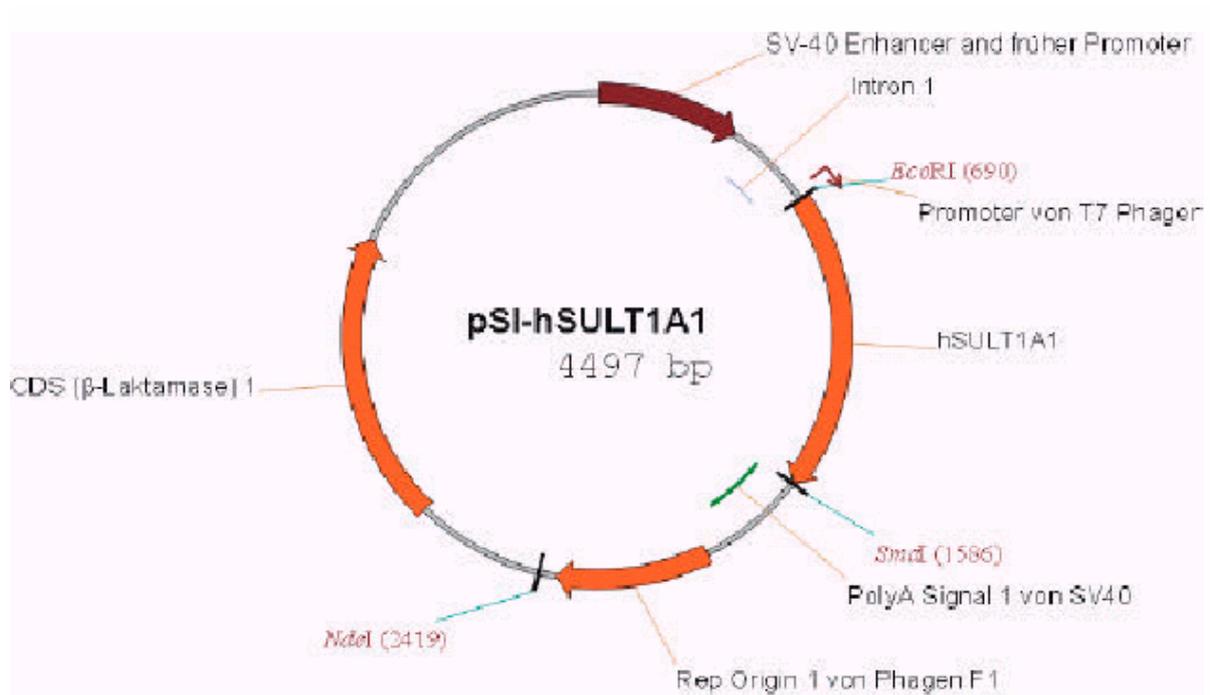


Abbildung A3 Das pSI-hSULT1A1 Plasmid wurde in Form von bereits transformierten *E. coli* XI1 Blue-pSIhSULT1A1 von der Arbeitsgruppe H.R. Glatt der Abteilung Ernährungstoxikologie des Dife zur Verfügung gestellt

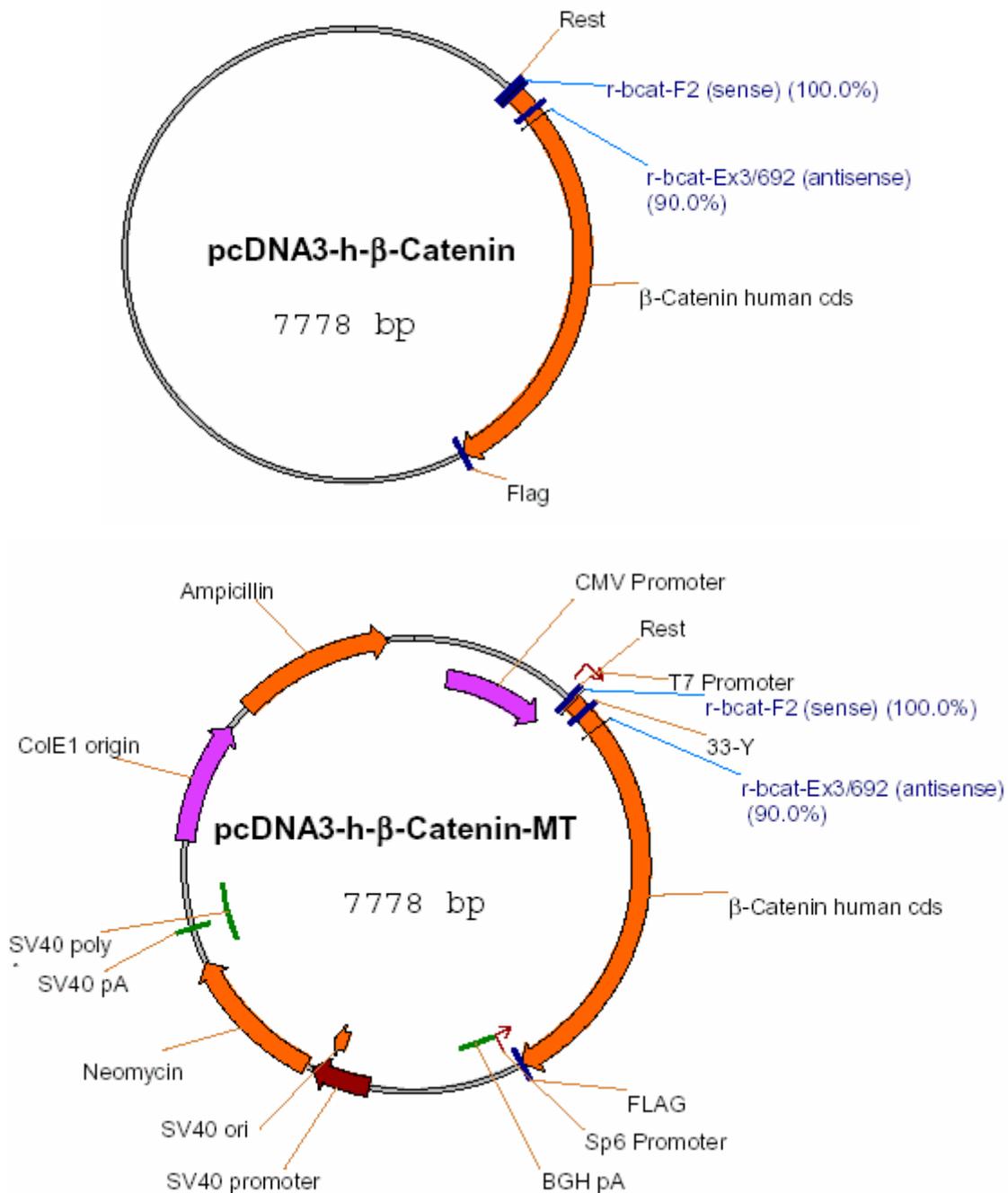


Abbildung A4

Die Plasmide pcDNA3-h-β-Catenin und pcDNA3-h-β-Catenin-MT wurden zur Amplifizierung von Sequenzen des humanen β-Catenin-Gens in die PCR eingesetzt

Die Plasmide haben eine Länge von 7778 bp, wobei der Vektor 5446 bp und das Insert 2332 bp groß ist. Das Plasmid pcDNA3-h-β-Catenin-MT besitzt eine Punktmutation (S33Y) in Codon 33 (Exon 3). Das Codon 33 ist hier von „TCT“ zu „TAT“ verändert, was bei der Expression in einem Austausch der Aminosäure Serin gegen Tyrosin resultiert. Die Plasmide wurden im Februar 1998 von F. F. Kolligs konstruiert und freundlicherweise von der Arbeitsgruppe E. R. Fearon überlassen [vgl. a. Kolligs *et al.* 1999].

Abbildung A5 Sequenzen**cDNA-Sequenz des p53-Gens der Ratte**

(Hulla and Schneider 1993)

```

ATGGAGGATT CACAGTCGGA TATGAGCATC GAGCTCCCTC TGAGTCAGGA
GACATTTTCA TGCTTATGGA AACTTCTTCC TCCAGATGAT ATTCTGCCCA
CCACAGCGAC AGGGTCACCT AATTCCATGG AAGATCTGTT CCTGCCCCAG
GATGTTGCAG AGTTGTTAGA AGGCCCAGAG GAAGCCCTCC AAGTGTGAGC
TCCTGCAGCA CAGGAACCTG GAACTGAGGC CCCTGCACCC GTGGCCCTG
CTTCAGCTAC ACCGTGGCCT CTGTCATCTT CCGTCCCTTC TCAAAAAACT
TACCAAGGCA ACTATGGCTT CCACCTGGGC TTCCTGCAGT CAGGGACAGC
CAAGTCTGTT ATGTGCACGT ACTCAATTTT CCTCAATAAG CTGTTCTGCC
AGCTGGCGAA GACATGCCCT GTGCAGTTGT GGGTCACCTC CACACCTCCA
CCTGGTACCC GTGTCCGTGC CATGGCCATC TACAAGAAGT CACAACACAT
GACTGAGGTC GTGAGACGCT GCCCCACCA TGAGCGTTGC TCTGATGGTG
ACGGCCTGGC TCCTCCCAA CATCTTATCC GGGTGAAGG AAATCCGTAT
GCTGAGTATC TGGACGACAG GCAGACTTTT CGGCACAGCG TGGTGGTACC
GTATGAGCCA CCTGAGGTCG GCTCCGACTA TACCACTATC CACTACAAGT
ACATGTGCAA CAGCTCCTGC ATGGGGGGCA TGAACCGCCG GCCATCCTT
ACCATCATCA CGCTGGAAGA CTCCAGTGGG AATCTTCTGG GACGGGACAG
CTTTGAGGTT CGTGTTTGTG CCTGTCCTGG GAGAGACCGT CGGACAGAGG
AAGAAAATTT CCGCAAAAAA GAAGAGCATT GCCCGGAGCT GCCCCAGGG
AGTGCAAAGA GAGCACTGCC CACCAGCACA AGCTCCTCTC CCCAGCAAAA
GAAAAAACCA CTCGATGGAG AATATTTTAC CCTTAAGATC CGTGGGCGTG
AGCGCTTCGA GATGTTCCGA GAGCTGAATG AGGCCTTGGG ATTAAGGAT
GCCCGTGCTG CCGAGGAGTC AGGAGACAGC AGGGCTCACT CCAGTACCC
GAAGACCAAG AAGGGCCAGT CTACGTCCCG CCATAAAAAA CCAATGATCA
AGAAAGTGGG GCCTGACTCA GACTGA

```

Genomische DNA-Sequenz des Ha-ras Gens der Ratte

(Ruta, Wolford et al. 1986)

```

GGATCCGGAA TTCGGCCACT GGCTTGCTTG CCTACTCAGT GCTGGAGAGA
GCCCTTGGGT TAGGCATCTA TTAGCAGTCT CAAGTGGCTA GGGCTGGCTA
AGTGTGATTC TCATTGGCAG GTGGGGCAGG AGCTCCTGGT TTGGCAACCC
CTGTAGAAGC GATGACAGAA TACAAGCTTG TGGTGGTGGG CGCTGGAGGC
GTGGGAAAGA GTGCCCTGAC CATCCAGCTG ATCCAGAACC ATTTTGTGGA
CGAGTATGAT CCCACTATAG AGGTGAGCTC TGACTACCTG CCAGAGGTGG
GCTCTGGCAG TGGTCAATGGG TTAGAGTCCC AAACAACCTAG GTCTTGAAGT
TGGTATGGGC CTGATTCCTA CCTGATCCTA TCCATCAGGG TATGAGAGGT
GCAAGGGTAG GCGGATTCTC TGTCTAAGAA GAGGTAGGAC CCTTAAGCTG
TGTTCTTTTG CAGGACTCCT ACCGAAACA GGTAGTCATT GATGGGGAGA
CGTGTTTACT GGACATCTTA GACACAGCAG GTCAAGAAGA GTATAGTGCC
ATGCGGGACC AGTACATGCG CACAGGGGAG GGCTTCCTCT GTGTATTTGC
CATCAACAAC ACCAAGTCCT TTGAAGACAT CCATCAGTAC AGGTGACCAC
CTATGGCTAG CCCGTGGCCC ATGGCATATG TGAGGAAGGT TCTGTGTGCA
CACTGAGGCT TTATGTCTTT TTTTGAATGT CATGGACACG TCAGGCCTGC
AGTCTGCTAG CTGGCTCATA TACAACCCCA TCCCCCTCCA GGGAGCAGAT
CAAGCGGGTG AAAGATTCAG ATGATGTGCC AATGGTGCTG GTGGGCAACA
AGTGTGACCT GGCTGCTCGC ACTGTTGAGT CTCGGCAGGC CCAGGACCTT
GCTCGCAGCT ATGGCATCCC CTACATTGAA ACATCAGCCA AGACCCGCA

```

```

GGTGTGAGCT TGTTCCTCCTC TCCACAAGCT AGTCAGGGAT TCACCATAACC
CCACCCCAGC CGGAGCGAGC TCATCGCCCT CTCCCTCAAC ACAGGGCAGC
CGCTCTGGCT CTGGCTCCAG CTCTGGACCC TCTGGGACCC CCCC GG GACC
CATGTGACCC ATGTGACCCA GCGGCCCTCA TGCTGTAAGT CTTC CG CAGG
CCGCAGGCTG GAGGGAGGCA AGGGCCAGGG TCTGGGCTTA TGCCAAAGTT
CTGGGTTGAC ACATAGCTCC AGGGCAGGAT GGGGTCCATG GAGAGAGCTG
CCCTGAGCAG GCCGGAGCGG TGACCCAGGG GCCTAGTTCT TCTTGTCTCC
AGTGTCTTAT GGAGATTTGC TATTTTAAGC CCTTAAGTGT TGTTAGGTTG
TTAACCTTGA GACATACTGG GGGTCTGGGA GAGTCTGAGC TAAGTGGCTC
TGATTTTTTCA GTGGTATTTA GGAGTGAACC TACTTAAAGA GAGTGGCCTG
TACTTTTTTAG ATGGCCAGAG CCCAGCTCCC TATTATTTTG GTTTTGCAGC
TGAGGAAGGG AGCCTCCAGC ATGGGGTGTT ACCTGATCCA GTCAGGGAGT
TTCTTACCCA GAGAGCAGAG CACCCCTTTC CTCCTCAGAG TCCTCTCTGA
TCCAGTCCCT CTGTCCCCAG GGTGTGGAGG ATGCCTTCTA CACACTAGTA
CGTGAGATTC GGCAGCATAA ACTGCGGAAA CTGAACCCGC CTGATGAGAG
TGGCCTTGGC TGCATGAGCT GCAAGTGTGT GCTGTCTCTGA CACTAGGTGA
GGCAGGGACC AGCAAGACAT CTGGGGCAGT GGCCTCAGCT AGCCAGATGA
ACTTCATATC CACTTTGATG TCCCTGCTCC CCCAATTCTG CCAATCCCCC
TGCCTGCAGG CATCAGTCAT GTCCTTTGTG CCCGTCCCGC AGGCTCAAGG
ACGAGGAGGT GCCGGATGCA GGGAGGAGGA GGTGCTGTCTG GAAGGAAGGA
AAGAGGAGGG AAGGAAGGAA ACGATGCTGG AGCCAGTTCA AGGATGGTGG
ACAGATGTGC CAAGCCTTCG CATGGACAAT TTGAACAGAC TGTCATGAAC
TATCCCGTTG CCACGCCACC CAAGTCCTCC GCCCCCTCTC AGCTCCCTTG
GGCGCCTATG AGGGCACATG TTGAATCACA GTAAATTATT TGATGGACTT
GACTTGTCTC TGGGCTGG

```

cDNA-Sequenz des *Ki-ras* Gens der Ratte

(Higinbotham, Rice et al. 1994)

```

ATGACTGAGT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGGTGGCG TAGGCAAGAG
TGCCTTGACG ATACAGCTAA TTCAGAATCA CTTTGTGGAT GAATATGATC
CTACGATAGA GGACTCCTAC AGGAAACAAG TAGTAATTGA TGGAGAAACC
TGTCTCTTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT
GAGGGACCAG TACATGAGAA CTGGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTTGCCA
TAAATAATAC TAAATCATTT GAAGATATTC ACCATTATAG AGAACAAATT
AAAAGAGTAA AGGACTCTGA AGATGTGCCT ATGGTCCTAG TAGGGAATAA
GTGTGACTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC GAAACAGGCT CAGGAGTTAG
CAAGGAGTTA TGGGATTCCA TTCATTGAGA CCTCAGCGAA GACAAGACAG
GGTGTTGACG ATGCCTTCTA TACATTAGTC CGAGAAATTC GAAAACATAA
AGAAAAGATG AGCAAAGATG GGAAAAAGAA GAAGAAGAAG TCAAGGACAA
GGTGTATAGT CATGTGA

```

DNA-Sequenz des *Ki-ras* Gens der Ratte: Introns und Exon 1

(van Kramen, 1993)

```
CTGTACAAC  GCAGTCACTG  AATTCAGAAT  GCCTTAGAGT  TTTACAGACA
AAGGTGAGTG  TTAACATACT  GATAAAGTAC  TTGATAATCT  TGTGTGGAAC
ATGTTCTAAT  TTAGTTATAT  TTTATTATTT  TTATTATAAG  GCCTGCTGAA
AATGACTGAG  TATAAACTTG  TGGTAGTTGG  AGCTGGTGGC  GTAGGCAAGA
GTGCCTTGAC  GATACAGCTA  ATTCAGAATC  ACTTTGTGGA  TGAATATGAT
CCTACGATAG  AGGTAAATGC  TGCTTTATAT  TCTATGTACA  ATTTGTAAAG
GGTGGCAGTC  ATCCTTTGTT  TGAAAAAGAT  ATCTCTTATT  TTTATGTTTG
TTAGAAAATT  ATATATGATG  TCCTTAAGTT  CCAAGGCTTT  AACTGAGTA
ATAGGGAACC  ATCGGTACAG  GAACCCCACT  TCTTTTGAGA  ACATGTCACA
GAGAATAAGG  TCCAAGATGC  C
```

DNA-Sequenz des β -Catenin Gens der Ratte: Exon 3

(Suzui, Ushijima et al. 1999)

```
AGCTGACCTC  ATGGAGTTGG  ACATGGCCAT  GGAGCCAGAC  AGAAAGGCCG
CTGTCAGCCA  CTGGCAGCAG  CAATCTTACC  TGGATTCTGG  AATCCACTCT
GGTGCCACCA  CCACAGCTCC  TTCCCTGAGT  GGCAAGGGCA  AT
```

Tabelle A1: Behandlungsbedingungen von IEC-18 Zellen und HCEC-Zellen mit N²-OH-PhIP. Die Lösungsmittelkontrollen wurden mit den jeweils entsprechenden DMSO-Mengen analog behandelt

Zelltyp	Behandlungszyklus	Konzentration N ² -OH-PhIP	Konzentration FBS
IEC-18 5 µM N ² -OH-PhIP 5 % FBS	1-25	5 µM	5 %
IEC-18 5-20 µM N ² -OH-PhIP 5 % FBS	1-15 16-19 20-22 23-25	5 µM 10 µM 15 µM 20 µM	5 % 5 % 5 % 5 %
IEC-18 5 µM N ² -OH-PhIP 5 - 0,6 % FBS	1-15 16-18 19-21 22-23 24-25	5 µM 5 µM 5 µM 5 µM 5 µM	5 % 2,5 % 1,25 % 1 % 0,6 %
HCEC	1-3	1,5 µM	
HCEC	1-4	1,5 µM	
HCEC	1-3 4-5	1,5 µM 3,0 µM	

Tabelle A2 Bestimmung der Viabilität mittels MTT bei folgenden Zelltypen
Die Viabilität der entsprechenden Lösungsmittelkontrollen wurden
ebenfalls mittels MTT untersucht

IEC-18	parentale Zelllinie, unbehandelt		
IEC-18	15 Zyklen	5 μ M N ² -OH-PhIP	5 % FBS
IEC-18	25 Zyklen	5 μ M N ² -OH-PhIP	5 % FBS
IEC-18	25 Zyklen	5-20 μ M N ² -OH-PhIP	5 % FBS
IEC-18	25 Zyklen	5 μ M N ² -OH-PhIP	5 - 0,6 % FBS
IEC-18-pSI SULT 1A1	5 Zyklen	5 μ M N ² -OH-PhIP	5 % FBS
IEC-18- pBabe-Puro- β -Catenin S33Y	5 Zyklen	5 μ M N ² -OH-PhIP	5 % FBS

Tabelle A3 **Durchgeführte Transfektionen mit IEC-18 Zellen**

Alle in der Tabelle aufgeführten Vektoren wurden zusätzlich als Kontrollen separat transfiziert.

Plasmid-DNA	Vektor	Transfektions- methode	Antibiotika- Resistenz	TAG
Human SULT1A1	pSI	Kalziumphosphat	Puromycin	-
Human β-Catenin MT/ β-Catenin WT	pcDNA3	Kalziumphosphat	G 418	FLAG
Maus β-Catenin-S33Y	pBabe	Retroviral	Puromycin	HA

Tabelle A4 **Durchgeführte Transfektionen mit p53 exprimierendem Zellklon (IEC-18-pcMV-hum-p53MT)**

Alle in der Tabelle aufgeführten Vektoren wurden zusätzlich als Kontrollen separat transfiziert.

Plasmid-DNA	Vektor	Transfektions- methode	Antibiotika- Resistenz	TAG
Maus β-Catenin-S33Y	pBabe	Retroviral	Puromycin und G418	HA

Tabelle A5 Wachstumseigenschaften der Zelllinien IEC-18, IEC-18 hSULT1A1, IEC-18-pBabe-Puro- β -Catenin-S33Y, IEC-18-pcMV-hum-p53-MT-pBabe-Puro- β -Catenin-S33Y und HCEC vor und nach Behandlung mit N²-OH-PhIP

	Dauer der lag-Phase	linearer Bereich der Wachstumskurve	Populationsver- dopplungszeit t_v
Abbildung 16 (A)			
IEC-18 15-mal 5 μ M N ² -OH-PhIP 1,25 % FBS im Medium	24h	141h	47 \pm 72h
DMSO-Kontrolle	24h	141h	31 \pm 2h
Abbildung 16 (B)			
IEC-18 15-mal 5 μ M N ² -OH-PhIP 5% FBS im Medium	24h	86h	45 \pm 1h
DMSO-Kontrolle	24h	86h	26 \pm 1h
Abbildung 17 (A)			
IEC-18h 25-mal 5 μ M N ² -OH-PhIP 0,6 % FBS im Medium	24h	168h	58 \pm 2h
DMSO-Kontrolle	24h	120h	56 \pm 1h

	Dauer der lag-Phase	linearer Bereich der Wachstumskurve	Populationsver- dopplungszeit t_v
Abbildung 17 (B)			
IEC-18 25-mal 5 μ M N ² -OH-PhIP 5 % FBS im Medium	24h	74h	37 \pm 3h
DMSO-Kontrolle	24h	74h	24 \pm 2h
Abbildung 17 (C)			
IEC-18 25x 5-20 μ M N ² -OH-PhIP 5 % FBS im Medium	24h	126h	30 \pm 2h
DMSO-Kontrolle	24h	126h	46 \pm 3h
Abbildung 18			
IEC-18-pSI-hSULT1A1	24h	96h	23 \pm 1h
IEC-18-pSI-hSULT1A1 5x 5 μ M N ² -OH-PhIP	24h	72h	42 \pm 7h
DMSO-Kontrolle	24h	96h	30 \pm 3h

	Dauer der lag-Phase	linearer Bereich der Wachstumskurve	Populationsver- dopplungszeit t_v
Abbildung 19 (A-D)			
IEC-18-pBabe-Puro	18h	96h	60±4h
IEC-18-pBabe-Puro- β-CatS33Y	28h	91h	66±7h
IEC-18-pcMV- hum p53MT-pBabe-Puro- β-CatS33Y	18h	72h	49±6h
IEC-18-pcMV- hum-p53MT	24h	72h	38±1h

Abbildung 22

HCEC 3x 1,5 μM N ² -OH-PhIP 72h		144h	39±3h
HCEC 4x 1,5 μM N ² -OH-PhIP 72h		144h	36±1h
HCEC 3x 1,5 μM; 2x 3,0 μM N ² -OH-PhIP	73h	146h	40±4h
HCEC DMSO-Kontrolle	73h	146h	55±3h

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1	Angriffspunkte und Reaktionen verschiedener Enzyme	2
Abb. 2	Vermuteter Metabolismus von PhIP	5
Abb. 3	Progressionsmodell der sporadischen kolorektalen Kanzerogenese. Stadien und genetische Veränderungen	9
Abb. 4	Bedeutung von APC und β -Catenin im Wnt-Signalweg	13
Abb. 5	Immundetektion von rSULT 1 in zytosolischen Fraktionen von IEC-18-pSI-hSULT 1A1, HCEC-Zellen und Leberzytosol der Ratte	60
Abb. 6	Immundetektion von NAT2 in zytosolischen Fraktionen von IEC-18-pSI-hSULT 1A1, HCEC-Zellen und Leberzytosol der Ratte	61
Abb. 7	Stadien des Zellwachstums von IEC-18-Zellen während der Behandlung mit N ² -OH-PhIP	63
Abb. 8	Entwicklung einer Resistenz in IEC-18-Zellen gegenüber N ² -OH-PhIP	66
Abb. 9	Entwicklung einer Resistenz gegenüber N ² -OH-PhIP in IEC-18-Zellen und in IEC-18-pSI-hSULT 1A1-Zellen	68
Abb. 10	Glutathion-S-Transferase Aktivität in N ² -OH-PhIP-behandelten IEC-18-Zellen und IEC-18-pSI-hSULT 1A1-Zellen	70
Abb. 11	Immundetektion verschiedener GST-Untereinheiten in zytosolischen Fraktionen von IEC-18-hSULT 1A1-Zellen nach 5 Behandlungszyklen	72
Abb. 12	Immundetektion verschiedener GST-Untereinheiten in zytosolischen Fraktionen von IEC-18-Zellen nach 25 Behandlungszyklen	73
Abb. 13	Nachweis der Expression von GST-T2 und β -Actin in behandelten IEC-18-Zellen und IEC-18-pSI-hSULT 1A1	75
Abb. 14	Nachweis der Integration von β -Catenin in IEC-18-Zellen	79
Abb. 15	Viabilität von pBabePuro β -CateninS33y nach 5 Behandlungszyklen	82
Abb. 16	Wachstumskurve der IEC-18-Zellen nach 15 Behandlungszyklen	84
Abb. 17	Wachstumskurve der IEC-18-Zellen nach 25 Behandlungszyklen	85
Abb. 18	Wachstumskurve der Transfektante IEC-18-pSI-h-SULT 1A1	86
Abb. 19	Wachstumskurven der retroviralen IEC-18-Transfektanten	87
Abb. 20	Wachstum im Softagar	88
Abb. 21	Stadien des Zellwachstums von HCEC-Zellen	89
Abb. 22	Wachstumskurve der Zelllinie HCEC	90
Abb. 23	Immundetektion von APC in zytosolischen Fraktionen von HCEC-Zellen	90

Abb. 24	Tumore, die durch chemisch transformierte HCEC-Zellen in SCID-Mäusen induziert werden	91
---------	---	----

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Kriterien zur Beurteilung der Transformation von Zellen (nach Baserga 1997)	11
Tabelle 2	Behandlungszyklen mit N ² -OH-PhIP	37
Tabelle 3	Pipettierschema zur Messung der GST-Aktivität	48
Tabelle 4	Pipettierschema bei Verwendung der BIOTAQ™ DNA-Polymerase	53
Tabelle 5	PCR-Grundprogramm bei Verwendung der BIOTAQ™ DNA-	54
Tabelle 6	Spezifikationen der durchgeführten PCR-Reaktionen	54
Tabelle 7	Pipettierschema bei Verwendung des QIAGEN One Step RT-PCR Kit	55
Tabelle 8	RT-PCR-Grundprogramm bei Verwendung des QIAGEN One Step RT-PCR Kit	56
Tabelle 9	Spezifikationen der durchgeführten RT-PCR-Reaktionen	56
Tabelle 10	Spezifische Antikörper gegen GST-Isoformen	71
Tabelle 11	Densitometrische Auswertung der semiquantitativen RT-PCR zum Nachweis von GST-T2	77

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APS	Ammoniumpersulfat
ACF	aberrant crypt foci
Bp	Basenpaare
BPA	Bovine Pituitary Extract (Rinderhypophysenextrakt)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
cDNA	complementary (komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
CDNB	(1-Chlor-2,4-dinitrobenzol)
CYP	Cytochrom P450
DifE	Deutsches Institut für Ernährungsforschung
DiMeIQx	3,4,8-Trimethyl-3H-imidazo[4,5-f]chinoxalin-2-amin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilo-N,N,N',N'-Tetraacetat (Ethylendiamintetraacetat)
EH	Epoxidhydrolase (mEH, mikrosomale; cEH, cytosolische)
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
FBS	Fetal Bovine Serum (Fötales Rinderserum)
GST	Glutathion-S-Transferase
HAA	Heterozyklische aromatische Amine
IEW	Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam
IQ	3-Methyl-3H-imidazo[4,5-f]chinolin-2-amin
KD	Kilodalton
MeIQ	3,8-Dimethyl-3H-imidazo[4,5-f]chinolin-2-amin
MeIQx	3,8-Dimethyl-3H-imidazo[4,5-f]chinoxalin-2-amin
NAT	N-Acetyltransferase
Od _{xxx}	Absorption (Optische Dichte) bei einer Wellenlänge von xxx nm
N ² -OH-PhIP	2-Hydroxy-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridin
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PBS	„phosphate buffered saline“

PCR	Polymerasekettenreaktion
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin
P/S	Penicillin/ Streptomycin
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RA	Retinoic Acid (Retinolsäure)
Rpm	revolutions per minute
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SULT	Sulfotransferase
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TNS	Trypsin Neutralizing Solution (Trypsin Neutralisierungs-lösung)
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
w/w	weight per weight

Erklärung zur Dissertation

Ich versichere hiermit, dass ich die von mir vorgelegte Arbeit mit dem oben genannten Titel selbstständig ohne fremde Hilfe und ohne Zuhilfenahme unerlaubter Hilfsmittel angefertigt wurde. Außerdem erkläre ich, dass diese Arbeit an keiner anderen Hochschule eingereicht wurde.

Iris Judith Fuchs

München, den 05.05.2006