



Klinikum rechts der Isar  
der Technischen Universität München  
Klinik für Unfallchirurgie

**Apoptoseinduktion und Proliferationshemmung von  
Hepatomazelllinien  
mittels Antihypertensiva**

Eva Katharina Rippel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzende(r): Prof. Dr. Ernst J. Rummeny  
Prüfer der Dissertation:  
1. Prof. Dr. Andreas K. Nüssler  
2. Prof. Dr. Roland M. Schmid

Die Dissertation wurde am 30.10.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.07.2015 angenommen.

**1 Inhaltsverzeichnis**

	<b>1 Inhaltsverzeichnis</b>	<b>2</b>
5	<b>2 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
	<b>3 Einleitung</b>	<b>8</b>
	<b>3.1 Die Leber</b>	<b>8</b>
10	<b>3.2 Hepatobiliäre Tumore</b>	<b>10</b>
	<b>3.3 Tumorzelllinien</b>	<b>16</b>
	3.3.1 AKN1	16
	3.3.2 HCC-M	16
	3.3.3 HCC-T	17
15	3.3.4 Hep3B	17
	3.3.5 HepG2	18
	3.3.6 Huh-7	18
	3.3.7 SkHep1	19
	<b>3.4 Physiologische Kontrolle entarteter Zellen</b>	<b>19</b>
20	3.4.1 Wächter des Genoms p53	19
	3.4.2 Das Protein p21	20
	3.4.3 Das Protein ki-67	20
	<b>3.5 Hypertonie – Regulation und Therapie</b>	<b>21</b>
	3.5.1 Körper eigene Blutdruckregulation	21
25	3.5.2 Therapie der Hypertonie	23
	3.5.2.1 Kalziumantagonisten	23
	3.5.2.2 ACE-Hemmer	24
	3.5.2.3 Schleifendiuretika	25
	3.5.2.4 Betablocker	26

	3.5.2.5 Antagonisten am Aldosteronrezeptor	27
	<b>3.6 Fragestellung der Doktorarbeit</b>	<b>28</b>
	<b>4 Materialien und Methoden</b>	<b>30</b>
5		
	<b>4.1 Verbrauchsmaterialien</b>	<b>30</b>
	<b>4.2 Geräte</b>	<b>34</b>
	<b>4.3 Zelltypen und Zellmedium</b>	<b>36</b>
	<b>4.4 Isolation von primären Hepatozyten</b>	<b>37</b>
10	4.4.1 Lösungen	37
	4.4.2 Versuchsaufbau	38
	<b>4.5 Zellbehandlung</b>	<b>40</b>
	4.5.1 Zellen auftauen	40
	4.5.2 Passagieren von Zelllinien	41
15	4.5.3 Zellen zählen	41
	<b>4.6 Viabilitätstest mittels Messung der Resazurinumsetzung</b>	<b>43</b>
	<b>4.7 Toxizitätsbestimmung mittels LDH-Messung</b>	<b>44</b>
	<b>4.8 Proteinanalyse mittels Western Blot</b>	<b>45</b>
	4.8.1 Hintergrund	45
20	4.8.2 Lösungen	45
	4.8.3 Versuchsaufbau	47
	<b>4.9 Zelltodanalyse mittels Fluorescence activated cell sorting</b>	<b>50</b>
	4.9.1 Hintergrund	50
	4.9.2 Lösungen	51
25	4.9.3 Versuchsaufbau	51
	<b>4.10 Proliferationsmessung</b>	<b>52</b>
	<b>4.11 Statistische Auswertung</b>	<b>52</b>

	<b>5 Ergebnisse</b>	<b>53</b>
	<b>5.1 Amlodipin</b>	<b>53</b>
5	5.1.1 Viabilitätsmessung - Abnahme der Viabilität bei Hepatomazellen	53
	5.1.2 Zunahme der LDH-Freisetzung bei HCC-T und SkHep1	55
	5.1.3 Fluorescence activated cell sorting Analyse	56
	5.1.3.1 HCC-T – Anstieg des Apoptoseanteils	57
	5.1.3.2 SkHep1 – Anstieg des Apoptoseanteils	59
10	5.1.4 Proteinanalyse mittels Western Blot	61
	5.1.4.1 AKN1, HCC-M, Huh-7, Hep3B – keine signifikanten Veränderungen	63
	5.1.4.2 HepG2 – Anstieg der p21-Expression	67
	<b>5.2 Spironolacton</b>	<b>68</b>
15	5.2.1 Viabilitätsmessung - Abnahme der Viabilität der Hepatomazellen	68
	5.2.2 Zunahme der LDH-Freisetzung bei SkHep1 und Hep3B	70
	5.2.3 Fluorescence activated cell sorting Analyse	71
	5.2.4 Proteinanalyse mittels Western Blot	73
20	5.2.4.1 AKN1, HCC-T, Hep3B und HepG2 – keine signifikanten Veränderungen	74
	5.2.4.2 Huh-7 und HCC-M – veränderte Proteinexpression	77
	<b>5.3 Furosemid</b>	<b>79</b>
	5.3.1 Viabilitätsmessung - Zunahme bestimmter Hepatomazelllinien	79
25	5.3.2 Proliferationstest	80
	5.3.2.1 AKN1 – keine proliferationsfördernde Wirkung	81
	5.3.2.2 HCC-M – keine proliferationsfördernde Wirkung	82
	5.3.2.3 HCC-T – keine proliferationsfördernde Wirkung	83
	5.3.2.4 Hep3B – keine proliferationsfördernde Wirkung	84
30	5.3.2.5 HepG2 – keine proliferationsfördernde Wirkung	85

	5.3.2.6 Huh-7 – keine proliferationsfördernde Wirkung	86
	5.3.2.7 SkHep1 – leichte Proliferationsförderung messbar	87
	<b>5.4 Metoprolol – keine signifikante Viabilitätsbeeinflussung</b>	<b>88</b>
	<b>5.5 Propranolol – Abnahme der Viabilität der Hepatomazellen und der humanen Hepatozyten</b>	<b>90</b>
5	<b>5.6 Captopril - keine signifikante Viabilitätsbeeinflussung</b>	<b>92</b>
	<b>6 Diskussion</b>	<b>94</b>
10	<b>7 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>106</b>
	<b>8 Verzeichnisse</b>	<b>109</b>
	8.1 Tabellenverzeichnis	109
15	8.2 Abbildungsverzeichnis	109
	8.3 Literaturverzeichnis	112

**2 Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
%	Prozent
μ	Mikro
γ-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
A.	Arterie
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin converting enzyme
AFP	Alpha-Fetoprotein
AP	alkalische Phosphatase
c	Konzentration
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
Cl <sup>-</sup>	Chloridionen
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
Em	Emission
Ex	Exikation
FACS	Fluorescence activated cell sorting
g	Gramm
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunden
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
hHeps	humane Hepatozyten
INR	International Normalized Ratio
K <sup>+</sup>	Kaliumionen

l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Molar
m	Milli
Mg	Magnesium
min	Minute
N	Anzahl der Versuchsdurchgänge
n	Anzahl der Replikate
Na <sup>+</sup>	Natriumionen
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
rpm	Rounds per minute
Sek	Sekunden
Stk.	Stückzahl
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
V.	Vena
Vv.	Venae
VGEF	Vascular Endothelial Growth Factor

### 3 Einleitung

#### 3.1 Leber

5

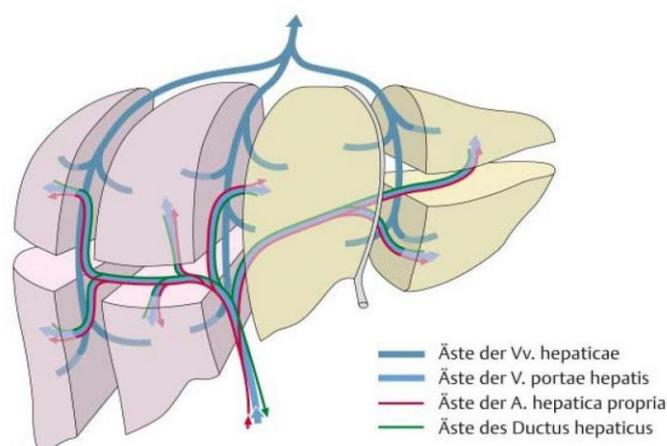
Die im rechten Oberbauch gelegene Leber ist mit ca. 2,5 % des Körpergewichts das größte innere Organ und außerdem die größte Drüse des menschlichen Körpers. Sie liegt intraperitoneal und wird auf Grund ihres Aussehens in vier Lappen eingeteilt: Lobus dexter, sinister, quadratus und caudatus.

10

Eine andere, für die Klinik relevantere Gliederung der Leber entsteht durch die Anordnung der Blutgefäße und der Gallengänge. Die A. hepatica propria aus der Aorta sichert die Sauerstoffversorgung, während die Pfortader (V. portae hepatis) nährstoffreiches, aber sauerstoffarmes Blut aus dem Verdauungstrakt und der Milz zur Leber befördert.

15 Gemeinsam mit diesen Gefäßen verlaufen die Gallengänge durch die Leberpforte, die sich außerhalb der Leber zum Ductus hepaticus communis vereinen. Der venöse Abfluss erfolgt unabhängig vom oben beschriebenen Trias durch die Vv. Hepaticae, die herznah in die untere Hohlvene münden. Durch die Trias und die venösen Gefäße lässt sich die Leber in acht Segmente einteilen, wobei die Segmente I - IV zur linken und V - VIII zur rechten Leberhälfte gezählt werden [Aumüller et al. 2010, Henne-Bruns et al. 2012].

20



**Abb. 1: Gefäßversorgung und Segmenteinteilung der Leber [Aumüller et al. 2010]**

Mikroskopisch besteht die Leber aus einem geringen Anteil von Bindegewebe und 1 - 1,5 Millionen Leberläppchen. In der Mitte jedes dieser sechseckigen Läppchen verläuft eine Zentralvene, die in ihrer Gesamtheit die Vv. Hepaticae bilden. Die Eckpunkte bilden Äste des Ductus hepaticus, der A. hepatica propria und der V. portae hepatis, die gemeinsam als Glisson-Trias bezeichnet werden und von Bindegewebe umgeben sind. Eine direkte Verbindung zwischen der Glisson-Trias und der Zentralvene bilden Kapillare, die sogenannten Lebersinusoide, in denen nährstoffreiches Blut aus der V. portae hepatis und sauerstoffreiches Blut aus der A. hepatica propria zusammenfließt. Zwischen dem gefensterten Endothel der Kapillaren und dem umliegenden Gewebe liegt ein ca. 0,3 µm breiter, mit Blutplasma gefüllter Raum, der Disse-Raum. Zum einen kann man dort Vitamin A speichernde Ito-Zellen und zum anderen dem Endothel anhaftende, leberspezifische Makrophagen (Kupffer-Zellen) finden [Lüllmann-Rauch et al. 2012].

Über den Disse-Raum findet außerdem der Stoffaustausch mit den angrenzenden Hepatozyten statt. Diese bilden das eigentliche Parenchym der Leber und sind für die Funktion der Leber zuständig. Sie besteht zum einen aus Aufgaben in der Synthese und der Metabolisierung im Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidstoffwechsel und zum anderen aus der Entgiftung von körpereigenen oder -fremden giftigen Substanzen [Kühnel et al. 2002]. Zum Beispiel können Cholesterin, Gallenfarbstoffe und -säuren und andere, körperfremde, in den Hepatozyten metabolisierte Substanzen (Medikamente) durch die Synthese und Exkretion von Galle in die zwischen den Hepatozyten liegenden Gallengänge (Canaliculus biliferus) ausgeschieden werden [Henne-Bruns et al. 2012, Dancygier 2003]. Auch speichert die Leber Kohlenhydrate in Form von Glykogen.

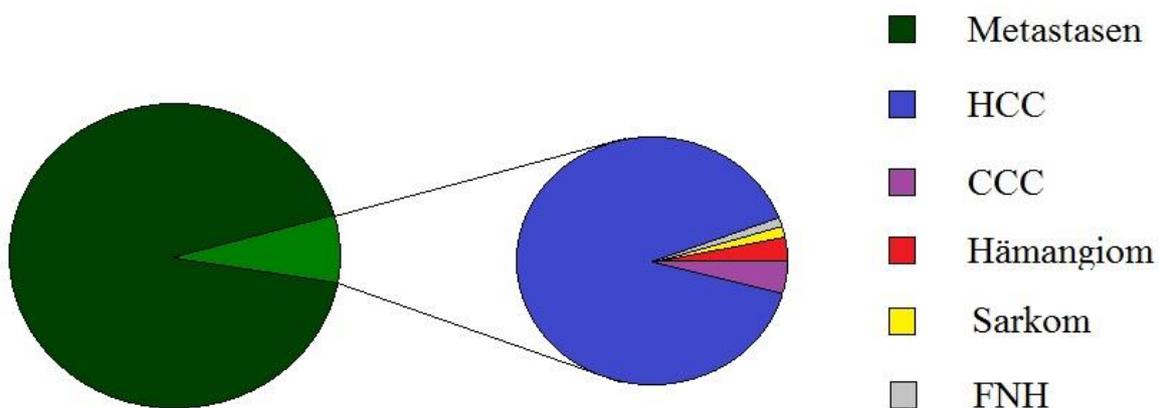
**Tabelle 1: Übersicht der Leberzellen**

Leberzellen	Charakteristika
Hepatozyten	20 – 30 µm, polyedrisch, besitzt reichlich Organellen, Überlebensdauer: 150 – 180 Tage, starke Regenerationsfähigkeit [Aumüller et al. 2010, Lüllmann-Rauch et al. 2012, Dancygier 2003]
Kupffer-Zellen	leberspezifische, antigenpräsentierende Makrophagen [Lüllmann-Rauch et al. 2012]
Pit-Zellen	leberspezifische Lymphozyten an den Endothelzellen [Aumüller et al. 2010]
Ito-Zellen	fettspeichernde Sternzellen im Disse-Raum, die im Zytoplasma Vitamin A anreichern [Aumüller et al. 2010]

### 3.2 Hepatobiliäre Tumore

5

Das Auftreten von Veränderungen im Parenchym der Leber und des Gallengangsystems kann aus den unterschiedlichsten Gründen vorkommen. Prinzipiell müssen zwischen benignen und malignen Neubildungen unterschieden werden, die je nach Ursprungsgewebe als primär oder sekundär bezeichnet werden.



10 **Abb. 2: Verteilung der häufigsten hepatobiliären Tumoren**

HCC: Hepatozelluläres Karzinom, CCC: Cholangiozelluläres Karzinom, Hämangiom: kavernoöses Hämangiom, FNH: Fokal noduläre Hyperplasie [Layer et al. 2007]

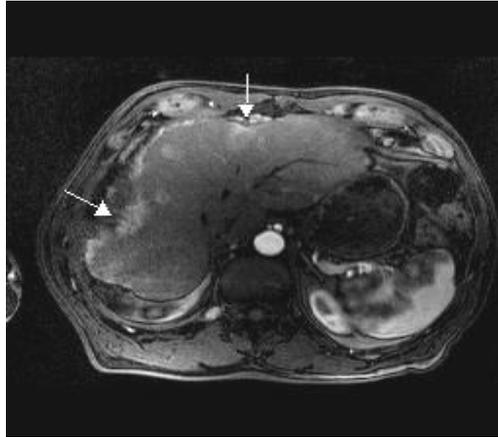
Von benignen Neoplasien geht kaum eine Gefahr für den Patienten aus und Kontrollen sind oftmals überflüssig. Trotzdem ist es unumgänglich, ungeklärte Neubildungen näher zu untersuchen. Das Risiko, das von malignen Tumoren ausgeht, ist sehr groß, weswegen eine sehr genaue Diagnostik zwingend notwendig ist. Diese stützt sich auf die folgenden vier Säulen: die Klinik des Patienten, laborchemische Analysen, die Histopathologie und bildgebende Verfahren [Dörner et al. 2013].

Dabei besteht das Problem, dass ein Großteil der malignen Tumore der Leber lange Zeit symptomlos bleiben und erst in fortgeschrittenen Stadien Allgemeinsymptome wie Oberbauchschmerzen, eine tastbare Raumforderung und B-Symptomatik hervorrufen [Caspary et al. 2001]. Aus diesem Grund werden Patienten mit Risikofaktoren zu jährlichen Kontrollen angehalten, die unter anderem aus laborchemischen Analysen und Ultraschalluntersuchungen des Bauches bestehen [Denk et al. 1999].

Im Labor wird vor allem das Alpha 1-Fetoprotein untersucht, das von Lebertumorzellen vermehrt gebildet wird. Es dient als Tumormarker und besitzt eine Sensitivität von 90 % und eine Spezifität von 95 %. Allerdings kann der Wert auch während einer Schwangerschaft erhöht sein, da das AFP bei Feten das Albumin ersetzt und somit vielfältige Aufgaben besitzt. Zusätzlich sollten immer leberspezifische Parameter wie GOT, GPT,  $\gamma$ -GT, AP, INR und Albumin überprüft werden, da diese Hinweise auf die Leberfunktion geben [Dörner et al. 2013].

Wie oben erwähnt, sind die bildgebenden Verfahren ein wichtiger Teil der Diagnostik. Meist genügt schon eine Oberbauchsonographie, um das Vorhandensein von Neoplasien auszuschließen. Sollte es jedoch nötig sein, die Lokalisation und Ausdehnung existenter Neubildungen zu bestimmen, empfiehlt sich eine kontrastmittelgestützte Computertomographie oder Kernspintomographie. Die Art und Herkunft der Zellen kann allerdings erst durch die Histopathologie, die vierte Säule der Diagnostik, geklärt werden. Zur Materialgewinnung muss letztendlich eine CT- oder Sonographie-gesteuerte Biopsie durchgeführt werden.

Die Prognose und das Überleben hängen genau wie die einzuleitende Therapie von der Art und Herkunft des Tumors ab. Deshalb ist es wichtig, die grundlegenden Charakteristika zu kennen, um die Neoplasie anhand der oben genannten Diagnostik zu unterscheiden.



5

### Abb. 3: Metastasen

Zu sehen sind in der arteriellen Phase der kontrastmittelunterstützten MRT-Aufnahme des Oberbauches mehrere, kontrastmittelanreichernde Herde (Pfeile) [RZM 2013].

- 10 Mit rund 80 % der Gesamtzahl sind Metastasen mit Abstand die häufigsten Tumoren [Herold 2014]. Bei den Primärtumoren handelt es sich um Karzinome des Pankreas, des Ösophagus, des Magens, der Lunge, der Mamma, des Darmes und maligne Melanome [Böcker et al. 2012].

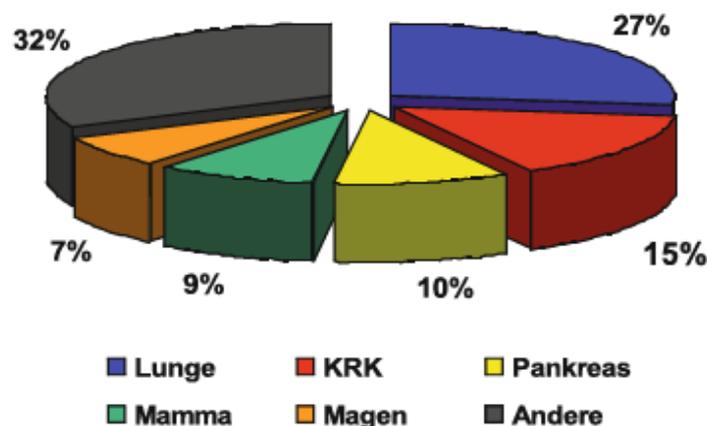


Abb. 4: Darstellung der Verteilung der Primärtumoren bei Lebermetastasen [Siewert et al. 2009].

- 15 KRK: Kolorektale Karzinome

Die Metastasen selbst treten als singuläre oder multiple Knoten auf (Abbildung 3), die scharf begrenzt und im Zentrum oberflächlich eingedellt sind, was als Krebsnabel bezeichnet wird. Bei sehr großen oder vielen Knoten kann es zu einer Lebervergrößerung und Gewichtsanstieg kommen, wobei andere Symptome vom Primärtumor abhängig sind [Böcker et al. 2012]. Der wichtigste Hinweis auf diesen gibt das histologische Bild [Krams et al. 2013].

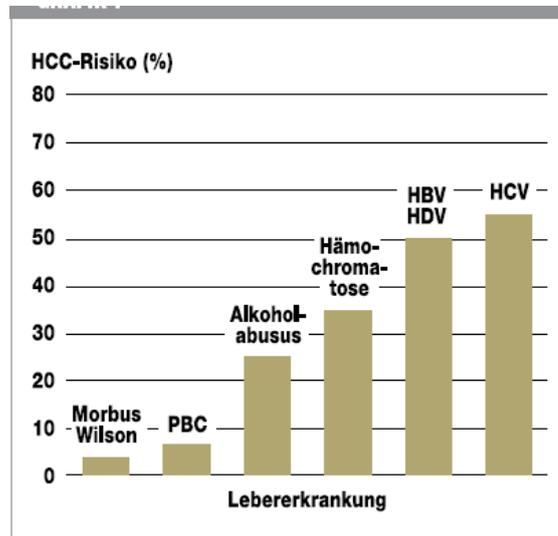


**Abb. 5: Hepatozelluläres Karzinom**

Dargestellt ist ein kontrastmittelunterstütztes CT-Bild des Oberbauches. Das hepatozelluläre Karzinom stellt sich als einzelner, kontrastmittelanreicherender Rundherd dar (Pfeil) [Hinshaw et al. 2008].

Das am häufigsten auftretende, primäre Leberkarzinom ist mit fast 90 % das hepatozelluläre Karzinom (HCC) [Böcker et al. 2012]. Es zeigt sowohl in Europa als auch in Entwicklungsländern eine steigende Inzidenz von 5/100 000 bzw. 30/100 000 [Herold 2014]. Damit ist es weltweit das fünft häufigste Karzinom und es tritt dreimal öfter bei Männern als bei Frauen auf [Spangenberg et al. 2009]. Es kann vor allem im Verlauf einer Leberzirrhose beobachtet werden, wobei diese oft in Assoziation zu chronischen Hepatitiden (meist Hepatitis B), Alkoholabusus, Medikamenten wie Steroiden und Stoffwechselerkrankungen wie die Hämochromatose, der Alpha-1-Antitrypsinmangel, die Glykogenspeicherkrankheit Typ 1 und die hereditäre Tyrosinämie steht [Schmidt et al. 2000, Herold 2014]. Makroskopisch lassen sich solitäre, multinoduläre und diffuse Typen unterscheiden, die je nach Differenzierungsart des Tumors eine grauweiße, braunrote oder grünliche Farbe aufweisen. Im Gegensatz zu eventuell vorkommenden zentralen Nekrosen und Blutungen sind Gefäßeinbrüche häufig. Histologisch ordnen sich die Zellen in trabekuläre, tubuläre oder papilläre Strukturen an [Böcker et al. 2012]. Mögliche

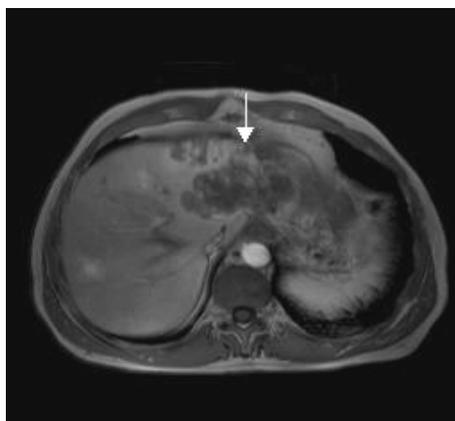
Symptome bestehen unter anderem aus Oberbauchschmerzen, einem Ikterus bei Gallengangverschluss und einer rapiden Verschlechterung des Allgemeinzustandes mit starkem Gewichtsverlust [Herold 2014].



5 **Abb. 6: Risiko eines hepatozellulären Karzinoms in Abhängigkeit der Grunderkrankung**

PBC: primäre biliäre Zirrhose, HBV: Hepatitis B, HCV: Hepatitis C, HDV: Hepatitis D; HCC: hepatozelluläres Karzinom [Spangenberg et al. 2009].

Eine Sonderform des hepatozellulären Karzinoms ist das fibrolamelläre Karzinom. Es  
 10 betrifft meist Frauen mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 2. und 4. Lebensjahrzehnt  
 [Böcker et al. 2012]. Bis heute konnte keine Assoziation zu Hepatitiden oder  
 Leberzirrhosen festgestellt werden [Denk et al. 1999].



15 **Abb. 7: Cholangiozelluläres Karzinom**

Die Abbildung zeigt eine kontrastmittelunterstützte MRT-Aufnahme des Oberbauches. Das  
 15 cholangiozelluläre Karzinom stellt sich als unscharf begrenzte Raumforderung (Pfeil) dar [RZM 2013].

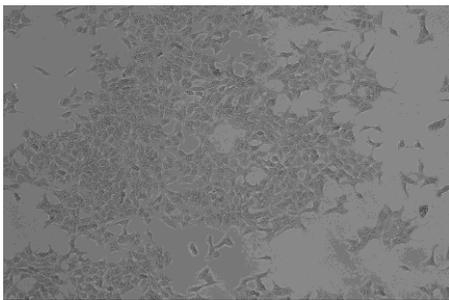
5 – 10 % der primären, malignen Tumoren der Leber macht das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) aus [Denk et al. 1999]. Es handelt sich dabei um Neoplasien, die aus Gallengangepithel entstehen und bevorzugt bei Männern zwischen 50 und 60 Jahren auftreten [Schmidt et al. 2000]. Als Risikofaktoren konnten Choledochuszysten, Cholelithiasis, Colitis Ulcerosa, die primär sklerosierende Cholangitis und parasitäre Erkrankungen durch Trematoden und Opisthorchis identifiziert werden [Schmidt et al. 2000, Krams et al. 2013]. Außerdem wurde bei einigen Patienten eine Genmutation im Ras-Protoonkogen gefunden, was eine Rolle in der Pathogenese spielen könnte [Böcker et al. 2012]. Makroskopisch tritt der Tumor in massiven, nodulären oder diffusen Formen auf, wobei es sich histologisch um ein mäßig bis hoch differenziertes Adenokarzinom mit viel Stroma handelt [Denk et al. 1999]. Wiederum treten nur allgemeine Symptome wie Oberbauchschmerzen, ein schmerzloser Ikterus oder eine eitrige Cholangitis auf. Frühsymptome werden nicht beobachtet [Gerok et al. 2007].

### 3.3 Tumorzelllinien

Im Anschluss werden einige etablierte Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms beschrieben, die auch für die späteren Untersuchungen verwendet wurden.

5

#### 3.3.1 AKN1

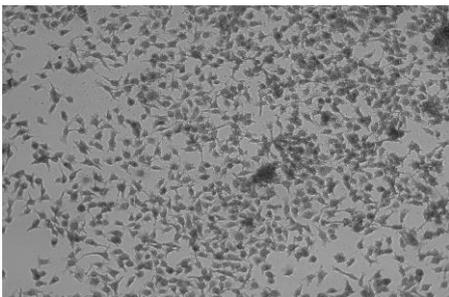


**Abb. 8: AKN1 in 100-facher Vergrößerung**

1991 wurden Zellen der AKN1-Zelllinie erstmals in Pittsburgh (USA) aus humanen Leberzellen gewonnen. Es handelt sich um eine heterogene Zellpopulation, die Eigenschaften von biliären Epithelien zeigt. Auf der Oberfläche der Zellen können die epithelialen Zytokeratinpolypeptide (CK) 8, 18 und 19 nachgewiesen werden. Außerdem exprimieren die Zellen das antihumane, epithelial

15 bezogene Antigen (MOC-31), das humane, epitheliale Antigen (HEA), die Gamma-Glutamyl-Transpeptidase, den hämatopoetischen Wachstumsfaktor, Stammzellfaktoren, sowie deren Rezeptoren. Obwohl Hinweise auf die Fähigkeit, Albumin zu synthetisieren, gefunden werden können, nutzen die Zellen diese nicht [Nüssler et al. 1999].

#### 20 3.3.2 HCC-M

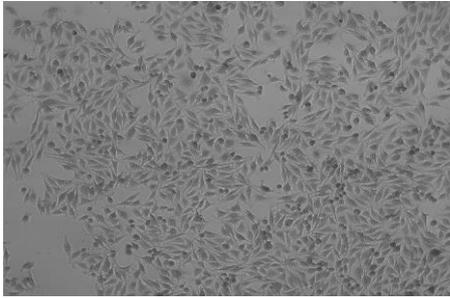


**Abb. 9: HCC-M in 100-facher Vergrößerung**

Die Zelllinie wurde aus dem HbsAg-positiven, hepatozellulären Karzinom eines männlichen Japaners isoliert. Die Zellen besitzen eine epitheliale, einschichtige Morphologie und beim Wachstum adhärente Eigenschaften. Es wird kein Anhalt auf eine Hepatitis B-Infektion gefunden und die Zellen zeigen keine AFP-Sekretion. Im Gegensatz dazu ist übergangsweise die Fähigkeit, Albumin zu

30 24 h [Watanabe et al. 1983, Seow et al. 2000].

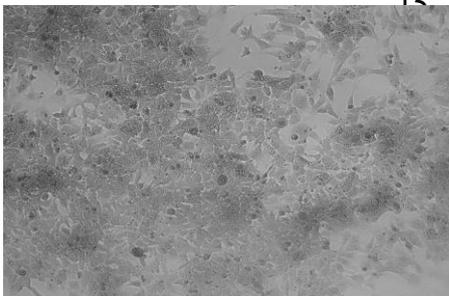
### 3.3.3 HCC-T



**Abb. 10: HCC-T in 100-facher  
Vergrößerung**

10 Die HCC-T-Zellen wurden aus dem Leberteileresektat eines 69-jährigen Japaners entnommen, welcher, trotz negativer Alkoholabusus-Anamnese, an einem hepatozellulärem Karzinom mit einer komplizierten Leberzirrhose litt. Zum Zeitpunkt der Operation lag der gemessene AFP-Wert bei 570 ng/ml. Die Zellen stellen sich als polygonal, mit einer typischen, epithelialen Zellmorphologie mit adhären-  
ten Wachstumscharakteristika dar. Es kann kein Hinweis auf das Vorhandensein einer Hepatitis A- oder B-Infektion, noch auf die Fähigkeit, Albumin zu produzieren, gefunden werden. Die Zellverdopplung dauert ca. 24 h [Saito et al. 1989].

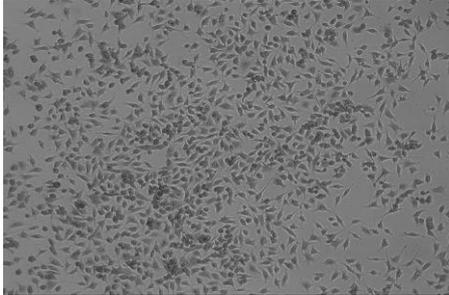
### 3.3.4 Hep3B



**Abb. 11: Hep3B in 100-facher  
Vergrößerung**

15 Die Hep3B-Zelllinie wurde 1976 in Deutschland aus dem Leberteileresektat eines 8-jährigen Jungen mit afrikanischem Hintergrund isoliert. Die Zellen zeigen eine epitheliale, einschichtige Morphologie mit adhären-  
ten Eigenschaften, die einem hepatozellulärem Karzinom entsprechen. Es können Fragmente eines Hepatitis B-Genoms gefunden werden, wes-  
wegen die ZKBS (Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit) sie in die Risikogruppe 1 einstuft. Außerdem zeigen die Zellen die Fähigkeit AFP, Albumin, Transferrin, Alpha2-Makroglobulin, Alpha1-Antitrypsin,  
25 Haptoglobin, Ceruloplasmin und Plasminogen zu synthetisieren. Zur Zellverdopplung benötigt diese Zelllinie ca. 40 – 50 h [LGC Standards 2013, DSMZ 2013].

### 3.3.5 HepG2



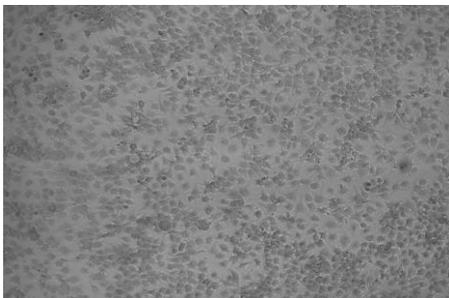
**Abb. 12: HepG2 in 100-facher  
Vergrößerung**

1975 wurde die Zelllinie HepG2 in Argentinien während der Biopsie der Leber eines 15 Jahre alten Jungen mit einem hepatozellulären Karzinom isoliert. Wie auch die Hep3B-Zelllinie zeigt HepG2 eine epitheliale, einschichtige Morphologie mit adhärenen Wachstumseigenschaften. Allerdings wachsen die

Zellen in kleinen Aggregaten und es wurden keine Anhaltspunkte für ein Hepatitis B-Virusgenom

10 gefunden. Eine weitere Gemeinsamkeit ist die Fähigkeit verschiedene Proteine, wie AFP, Albumin, Transferrin, Alpha2-Makroglobulin, Alpha1-Antitrypsin, Haptoglobin, Ceruloplasmin und Plasminogen zu produzieren. Zur Verdopplung der Zellzahl werden 50 bis 60 Stunden benötigt [LGC Standards 2013, DSMZ 2013].

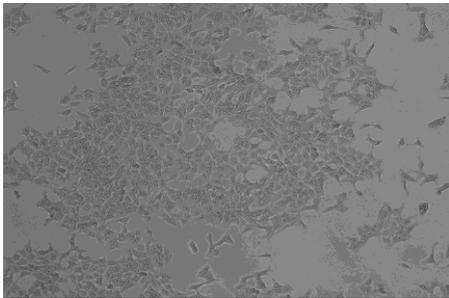
### 15 3.3.6 Huh-7



**Abb. 13: Huh-7 in 100-facher  
Vergrößerung**

Diese Zelllinie wurde 1982 in Okayama aus dem Leberkarzinom eines 57 Jahre alten Japaners entnommen. Auch diese Zellen besitzen eine endotheliale, einschichtige Zellmorphologie und adhärenente Eigenschaften beim Wachstum. Es kann kein Hinweis auf Virus DNA oder RNA gefunden werden [Public Health England 2013, JCRB 2013].

### 3.3.7 SkHep1



**Abb. 14: SkHep1 in 100-facher Vergrößerung**

1972 wurden Zellen der SkHep1-Zelllinie in den USA erstmals aus dem Leberteilresektat eines 52-jährigen Mannes, der an einem Adenokarzinom mit schwerer Aszites litt, isoliert. Die Zellen besitzen einen hyperdiplo bis hypertriploiden Karyotypen und eine endotheliale, einschichtige Zellmorphologie mit adhärennten Eigenschaften. Wiederum kann kein Hinweis auf das Vorhandensein von Virus DNA oder RNA gefunden

10 werden. Zur Zellzahlverdopplung benötigt die SkHep1-Zelllinie ca. 30 Stunden [DSMZ 2013].

## 3.4 Physiologische Kontrolle entarteter Zellen

15

Bevor ein Tumor entstehen kann, muss zuerst die körpereigene Zellkontrolle ausgeschaltet werden. Dieser Schutz vor Entartungen besteht aus mehreren Mechanismen, die auf den unterschiedlichsten zellulären Ebenen ablaufen.

### 20 3.4.1 Wächter des Genoms p53

Der „Wächter des Genoms“ p53 spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Tumoren. Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor, der bei DNA-Schäden den Zellzyklus in verschiedenen Phasen des Zellzyklus über unterschiedlichste Mechanismen anhalten und bei Irreparabilität dieser Schäden zu Apoptose führen kann. Normalerweise  
 25 wird das Protein p53 kurz nach der Synthese über verschiedene Wege aus dem Zellkern, dem Ort seines Wirkens, ausgeschleust und abgebaut. Sollten allerdings DNA-Schäden aufgetreten sein, akkumuliert p53 im Zellkern und fördert so die Transkription von anderen Proteinen (u.a. p21), die wiederum über mehrere Schritte zu einem Zellzyklusarrest und Reparatur der Schäden oder einer Apoptose führen [Weinberg 2014].  
 30 Da p53 eine so entscheidende Rolle in der Zellentartungskontrolle spielt [Toledo et al. 2006], wurde das Protein vor allem in der Tumorforschung immer wieder untersucht, um

über eine gezielte Aktivierung die überschießende Proliferation von Tumorzellen zu kontrollieren [Xue et al. 2007, Chen et al. 2011]. In der Onkologie fiel p53 erstmals durch seine Überexpression in malignen Tumoren auf [Lane 1992], wobei hier allerdings erwähnt werden muss, dass bis zu 50 % dieser entarteten Zellen eine mutierte und somit wirkungslose Form von p53 exprimieren [Lowe et al. 2004, Xue et al. 2007]. Ein Anstieg von p53 bei Zelllinien, die bei vorheriger Fluoreszenzmessung eine verminderte Anzahl metabolisch aktiver Zellen zeigten, weist also auf einen Zellarrest hin.

### 3.4.2 Das Protein p21

10 In jeder Phase des Zellzyklus gibt es verschiedene Zyklin-abhängige Kinasen, ohne die ein Übergang in die nächste Phase und somit letztendlich eine Zellteilung unmöglich ist. Bei p21 handelt es sich um einen Inhibitor dieser Zyklin-abhängiger Kinasen, wie z.B. CDK2, wodurch es eine große Rolle in der Zellzykluskontrolle spielt.

15 Das Protein p21 wirkt nur im Nukleus, wo es bei Registrierung von DNA-Schäden und toxischen Stoffen vermehrt exprimiert wird und den Zellzyklus durch seine inhibitorische Wirkung arrestiert. Allerdings kann das Protein p21 keine Apoptose einleiten, sondern induziert den Zellzyklusarrest, bis die Schäden durch Reparaturmechanismen behoben werden [Weinberg 2014].

20

### 3.4.3 Das Protein ki-67

Das Protein ki-67 hat keine Kontrollfunktion bei der Tumorentstehung. Ganz im Gegenteil zu p53 und p21 wird es in allen aktiven Phasen des Zellzyklus, nämlich der G(1)-, S-, G(2)- Phase und der Mitose, exprimiert. Nicht zu finden ist es in ruhenden Zellen, also in 25 der G(0)- Phase; während der Interphase wird es nur im Zellkern exprimiert. Es ist also ein Nachweis von sich proliferierenden Zellen [Scholzen et al. 2000].

### 3.5 Hypertonie – Regulation und Therapie

Die deutsche Hochdruckliga definiert die Hypertonie als „die Blutdruckhöhe [...], ab welcher Diagnostik und Behandlung für den Patienten von Vorteil sind“ [DHL 2008]. In der Praxis müssen also alle kardiovaskulären Risikofaktoren berücksichtigt und der Zielblutdruck diesen angepasst werden. Tabelle 2 zeigt die Blutdruckwerte, welche bei ansonsten gesunden Patienten eine Hypertonie darstellen.

Kategorie	Systolisch	Diastolisch
Optimal	< 120	< 80
Normal	120-129	80-84
Hoch Normal	130-139	85-89
Grad 1 Hypertonie (leicht)	140-159	90-99
Grad 2 Hypertonie (mittelschwer)	160-179	100-109
Grad 3 Hypertonie (schwer)	≥ 180	≥ 110
Isolierte systolische Hypertonie	≥ 140	<90

**Tabelle 2: Definition und Klassifikation der Blutdruckwerte (mm Hg) [DHL 2008]**

10

Als kardiovaskuläre Risikofaktoren werden Komorbiditäten wie z.B. Diabetes mellitus bezeichnet, aber auch von der Norm abweichende Blutwerte wie Hypercholesterinämie. Außerdem gelten Adipositas, Alter und Rauchen als risikoerhöhend. Nach Einbeziehung dieser und anderer Faktoren können fünf Risikostufen (durchschnittlich, leicht, mäßig, stark und sehr stark) unterschieden werden. Allgemein anerkannt ist ein Zielblutdruck von unter 140/90 bei sonst gesunden Patienten [DHL 2008].

15

#### 3.5.1 Körpereigene Blutdruckregulation

Es gibt eine Reihe unterschiedlicher Wege des Körpers, den Blutdruck zu regulieren. Dazu gehört zentral sowohl die neurogene als auch die hormonale Signalübermittlung, während diese in der Peripherie durch myogene und humorale Einflüsse ersetzt werden [Stimpel 2001].

20

Es kann zwischen kurzfristigen (Sekunden – Minuten), mittelfristigen (Stunden – Tage) und langfristigen (Wochen – Monate) Regulationsvorgängen unterschieden werden, wobei die neurogene Signalvermittlung schnell und die hormonale langsam verläuft.

- 5 Die über vegetative Nerven vermittelte Regulation besteht hauptsächlich aus Veränderungen der Herztätigkeit und dem Gefäßtonus, was durch verschiedene Kreislaufreflexe zu Stande kommt. Dabei sind vor allem die am Karotissinus liegenden Barorezeptoren von Bedeutung, die einen durchgehend inhibitorischen Einfluss auf Sympathikus-regulierende Kerne im Hirnstamm besitzen. Weitere beeinflussende
- 10 Dehnungsrezeptoren sitzen im Niederdrucksystem, wie den Lungengefäßen und den Vv. Cavae. Kommt es durch den Abfall des arteriellen Druckes oder des Schlagvolumens zu einer verminderten Aktivierung, so sinkt auch die inhibitorische Wirkung und es kommt letztendlich zu einer Aktivierung des Sympathikus, was zu einer Erhöhung der Herzfrequenz, des Schlagvolumens und des peripheren Widerstandes führt. Außerdem
- 15 besitzen die Barorezeptoren direkte, stimulierende Afferenzen zu den Motoneuronen vagaler Efferenzen des Ncl. ambiguus. Dadurch kann die Herzfrequenz innerhalb weniger Sekunden gesteigert werden.

- Für die mittel- und langfristige Regulation des Blutdruckes spielt das Renin-Angiotensin-
- 20 Aldosteron-System eine große Rolle. Durch dieses wird bei einem Absinken des Arteriendruckes in der Niere aus dem juxtaglomerulären Apparat die Protease Renin freigesetzt, welches wiederum das Plasmaprotein Angiotensinogen in Angiotensin I spaltet. Dieses wird durch das in der Lunge auf Endothelzellen befindliche Angiotensin-
- 25 converting-Enzyme (ACE) zum biologisch aktiven Angiotensinogen II transformiert, welches dann zum einen eine negative Rückkopplung auf die Reninsekretion zeigt und zum anderen an einen der beiden möglichen Rezeptoren AT<sub>1</sub> und AT<sub>2</sub> binden kann. Die beiden Rezeptoren haben mehrere Funktionen, wie z.B. die Stimulation der Aldosteronbiosynthese, die Konstriktion glatter Gefäßmuskelzellen, die Steigerung der Natriumresorption und die Stimulation der Sekretion des antidiuretischen Hormons
- 30 (ADH). Da auch Aldosteron die Natriumresorption erhöht, hat Angiotensin II also sowohl einen direkten als auch einen indirekten Einfluss auf die Natriumrückresorption. Alle der

oben genannten Wirkungen führen zu einem Anstieg des extrazellulären Volumens bzw. einer Erhöhung des peripheren Widerstandes, was eine Blutdruckerhöhung bedeutet [Klinke et al. 2005].

### 5 3.5.2 Therapie der Hypertonie

Bevor eine medikamentöse Therapie der Hypertonie eingeleitet wird, ist es eine Standardmaßnahme, zu versuchen, den Blutdruck durch Ernährungs- und Lebensstiländerung zu verbessern. Dies hat vor allem bei grenzwertig oder leicht erhöhtem Blutdruck Aussicht auf Erfolg, ist aber immer Basis jeder folgenden Therapie mit Medikamenten [Braun et al. 2010].

Zu diesen Allgemeinmaßnahmen gehören die Gewichtsnormalisierung, das Umstellen auf eine salzarme, wenn möglich mediterrane Kost und die Integration von dynamischen Ausdauertrainings. Außerdem sollten andere Risikofaktoren wie Rauchen, Alkohol und bestimmte Medikamente (z.B. Kortikosteroide) identifiziert und nach Möglichkeit vermieden werden [Werdan et al. 2003]. Sollten diese Maßnahmen zu keinem Erfolg führen, müssen Medikamente zur Senkung des Blutdruckes und damit des kardiovaskulären Risikos eingesetzt werden [Kumar et al. 2012]. Im Folgenden wird eine kleine Auswahl von Medikamentengruppen erläutert, welche auch für die in dieser Arbeit gemachten Versuche verwendet wurden.

#### 3.5.2.1 Kalziumantagonisten

Zur Behandlung der Hypertonie können selektive Kalziumkanalblocker eingesetzt werden. Diese wirken im Gegensatz zu den nicht-selektiven speziell nur auf Kalziumkanäle vom L-Typ [Graefe et al. 2011]. Es können bei diesen nach den unterschiedlichen chemischen Strukturen drei Arten unterschieden werden: Phenylalkylaminderivate, 1,4-Dihydropyridinderivate und Benzothiazepinderivate [Strödter 2009]. Amlodipin, welches in den hier beschriebenen Versuchen verwendet wurde, ist ein Medikament der 1,4-Dihydropyridinderivat-Gruppe.

Im Normalfall wird die Kalziumhomöostase von drei Strukturen gesteuert: potenzialabhängige, spezifische Kalziumkanäle, Rezeptor-regulierte Kalziumkanäle und dem  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, dessen Aktivität wiederum von einer  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase reguliert wird. Bei Patienten mit primärer Hypertonie konnte eine Verminderung der Aktivität der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase festgestellt werden. Die darauffolgende intrazellulär erhöhte Natriumkonzentration und geringere Kaliumkonzentration vermindert das Membranruhepotenzial, wodurch es zu einem vermehrten Einstrom von Kalzium durch potenzialabhängige, spezifische Kalziumkanäle kommt. Dies bedingt eine Vasokonstriktion und somit eine Blutdruckerhöhung [Graefe et al. 2011].

10

Die spezifischen Kalziumkanalblocker hemmen die potenzialabhängigen Kanäle und senken die intrazelluläre Kalziumkonzentration und damit auch den Blutdruck [Karow et al. 2013]. Die Stärke der Wirkung hängt vom Ausgangswert des Blutdruckes ab. Amlodipin ist ein langsam anflutendes Medikament der dritten Generation mit einer längeren Halbwertszeit und einer konstanteren Senkung des Blutdruckes. Es kommt also im Gegensatz zu Medikamenten der ersten Gruppen nicht zu einer reflektorischen Aktivierung des Sympathikotonus und damit zu einem Anstieg der Herzfrequenz [Lemmer et al. 2007].

20 Bei der Behandlung muss auf eine strikte Vermeidung einer Kombination mit Betablocker geachtet werden, da sonst eine höhergradige AV-Blockierung bis hin zur Asystolie auftreten kann [DHL 2008]. Ansonsten kann es vor allem zu Beginn der Therapie zu Kopfschmerzsymptomatik kommen. Außerdem können eine Flush-Symptomatik und periphere Ödeme beobachtet werden [Lüllmann et al. 2010].

25

### **3.5.2.2 ACE-Hemmer**

ACE-Hemmer sind Medikamente, die eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem C-Ende von Angiotensin I aufweisen und somit an das aktive Zentrum des Angiotensin-converting-Enzymes binden können und dieses reversibel blockieren. Die dadurch verminderte Produktion von Angiotensin II verursacht eine geringere Vasokonstriktion und eine Hemmung der renalen Natrium- und Wasserabsorption. Da das gehemmte Enzym neben

der Herstellung von Angiotensin II auch die, durch NO-Freisetzung vasodilatatorisch aktiven Peptide Bradykinin, Kallidin und Substanz P weiterverarbeitet, steigt deren Konzentration nach Gabe von ACE-Hemmern an. Die Wirkung besteht also nicht nur aus der verminderten Vasokonstriktion durch weniger Angiotensin II, sondern zusätzlich aus einer Vasodilatation durch die oben genannten Peptide [Aktories et al. 2013]. Die Wirkungsstärke ist abhängig von dem Beitrag, den das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System zur Blutdruckregulation bei den einzelnen Patienten leistet [Lüllmann et al. 2010].

Captopril war der erste ACE-Hemmer auf dem Markt und besitzt im Gegensatz zu den neueren Varianten eine Sulfhydrylgruppe, an Hand derer er an das Zink im aktiven Zentrum des Enzyms binden kann. Außerdem handelt es sich dabei um eine bereits bei Einnahme aktive Substanz im Kontrast zu den veresterten Pro-Drugs, die erst in der Leber zu aktiven Carbonsäuren hydrolysiert werden müssen [Aktories et al. 2013].

Kontraindiziert sind ACE-Hemmer bei Patienten mit beidseitiger Nierenarterienstenose, da die Niere auf die vasokonstriktive Wirkung von Angiotensin II angewiesen ist. Die Kinine haben eine vasodilatatorische Wirkung, sind aber trotzdem auch inflammatorische Mediatoren, wodurch bei bis zu 10 % der Patienten ein trockener Husten und sehr selten ein Angioödem als Nebenwirkung auftritt [Karow et al. 2013]. Besonders bei Captopril sind auf Grund der Sulfhydrylgruppe unerwünschte Wirkungen wie Neutropenie, das nephrotische Syndrom, Hautausschläge und Geschmacksstörungen zu beobachten. Diese treten vor allem bei Patienten mit Niereninsuffizienz und nach der Gabe von hohen Dosen auf [Aktories et al. 2013].

### 25 3.5.2.3 Schleifendiuretika

Die Wirkung dieser Substanzgruppe beruht auf der Hemmung der Natriumchloridresorption im aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife durch eine reversible Bindung an den  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter. Dadurch werden die hypertonen Verhältnisse des Nierenmarkes aufgehoben und die passive Wasserresorption unterbunden [Katzung et al. 2009].

Schleifendiuretika fluten sehr schnell an und können eine Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate um bis zu 25 % bewirken. Aus diesem Grund ist eine intravenöse Gabe von Furosemid kombiniert mit einem anderen schnell wirksamen Antihypertensiva besonders geeignet zur Behandlung einer hypertensiven Krise [Aktories et al. 2013].

5

Nebenwirkungen der Schleifendiuretika bestehen aus einer Hypokaliämie, einer Hyperglykämie, -urikämie und -lipidämie. Bei einer Langzeittherapie muss die Wirkung der Substanzklasse auf die Zusammensetzung der Endolymphe beachtet werden, die zu einer Verschlechterung des Hörvermögens führen kann [Lüllmann et al. 2010].

10

#### **3.5.2.4 Betablocker**

Betablocker werden für die Langzeittherapie der Hypertonie eingesetzt. Die Wirkung tritt allerdings erst nach vier Wochen in vollem Maß auf, weswegen sie für die schnelle, akute Behandlung nicht geeignet sind. Bei einmaliger Gabe senken sie die Herzfrequenz und den peripheren Widerstand über den  $\beta_1$ -Rezeptor. Diese Effekte normalisieren sich allerdings bei einer langfristigen Gabe wieder [Graefe et al. 2011]. Wie die Betablocker letztendlich die Senkung des Blutdruckes bewirken, ist noch nicht sicher nachgewiesen; es wird allerdings eine Hemmung der Reninfreisetzung aus dem juxtaglomerulären Apparat und der Noradrenalinfreisetzung aus den sympathischen Neuronen angenommen [Lüllmann et al. 2010].

20

Man teilt die Betablocker in unselektive, also an beiden Rezeptoren wirkende Antagonisten (Propranolol), und selektive Blocker, die nur an  $\beta_1$ -Rezeptoren wirken (Metoprolol), ein [Karow et al. 2013]. Letztere werden bevorzugt, da sie zum einen gezielt auf die Herzfrequenz, Reninsekretion und den peripheren Widerstand wirken und die häufigsten Nebenwirkungen zum anderen über  $\beta_2$ -Rezeptoren vermittelt werden [Lemmer et al. 2007]. Diese Selektivität nimmt aber bei einer Dosissteigerung ab, weswegen bestimmte Kontraindikationen auch für selektive Betablocker als absolut gelten (u.a. Asthma bronchiale, AV-Block Grad II und III) [Karow et al. 2013].

30

Bei beiden Antagonisten auftretende Nebenwirkungen sind vor allem initial Kopfschmerz, Schwindel, Müdigkeit, gastrointestinale Beschwerden und Impotenz. Außerdem kann eine Sinusbradykardie, eine Verlangsamung der AV-Überleitung und eine Gewichtszunahme beobachtet werden. Nicht-selektive Antagonisten können auch zu Bronchokonstriktion, einer Verstärkung der Hypoglykämie bei Diabetikern und zu einer Abschwächung der durch den Sympathikus vermittelten Symptome einer Hypoglykämie führen [Lüllmann et al. 2010].

### **3.5.2.5 Antagonisten am Aldosteronrezeptor**

10 Die als Aldosteronantagonisten bezeichneten Medikamente wie Spironolacton hemmen die spezifischen Rezeptoren im distalen Tubulus kompetitiv und heben somit die Wirkung von Aldosteron auf [Karow et al. 2013]. Die dadurch verursachte Natriurese und Diurese wird nicht von einer erhöhten Kaliumausscheidung begleitet, weshalb diese Gruppe von Medikamenten auch als Kalium-sparende Diuretika bezeichnet wird. Die Wirksamkeit  
15 hängt von der körpereigenen Sekretion von Aldosteron ab, welche bei bestimmten Krankheiten, wie z.B. Hyperaldosteronismus, deutlich erhöht ist [Lüllmann et al. 2010]. So können Aldosteronantagonisten sowohl bei primärer als auch sekundärer Hypertonie eingesetzt werden und helfen, in Kombination mit anderen Antihypertensiva, die oftmals auftretende Nebenwirkung der Hypokaliämie abzuschwächen. Auch bei einer  
20 Leberzirrhose kann es durch den verminderten Abbau des Mineralokortikoids Aldosteron zu einer sekundären Hypertonie kommen, welche leicht durch Spironolacton therapiert werden kann [Karow et al. 2013].

Bei höheren Dosen können unerwünschte Wirkungen wie Impotenz und Gynäkomastie  
25 auftreten, während eine eingeschränkte Nierenfunktion auf Grund des gesteigerten Risikos einer Hyperkaliämie als absolute Kontraindikation gilt. Diese kann allerdings auch bei guter Nierenfunktion auftreten und muss deshalb beobachtet werden [Graefe et al. 2011].

### 3.6 Fragestellung der Doktorarbeit

Die Hypertonie ist eine sehr weit verbreitete Krankheit, die ungefähr 50 % aller Schlaganfälle und 45 % aller kardiovaskulären Erkrankungen bedingt [WHO 2012].

5 Immer mehr Patienten müssen mit Antihypertensiva behandelt werden und die direkten und indirekten Kosten der Behandlung zeigen eine steigende Tendenz.

Außer zur Therapie des Bluthochdruckes können diese Medikamente noch sehr weiträumig eingesetzt werden. Je nach Substanzgruppe können sie bei Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz und vielen anderen kardiovaskulären

10 Erkrankungen verordnet werden.

In mehreren Studien konnten außerdem Effekte auf humane Pankreastumorzelllinien und auf Pankreasfibrose bewiesen werden [Weddle et al. 2001, Sakurai et al. 2011, Guo et al. 2009]. Die Substanzklassen besitzen noch viele, bisher unentdeckte Wirkungen. So konnte

15 2013 in einem Abstract auch eine positive Wirkung der Antihypertensiva auf eine Leberfibrose bei der alkoholischen Leberkrankheit festgestellt werden [Ehnert et al. 2013].

In Hinblick auf eine Kombination dieser beiden Erkenntnisse stellte sich die Frage, ob Antihypertensiva auch eine Wirkung auf humane Hepatomazelllinien besitzen.

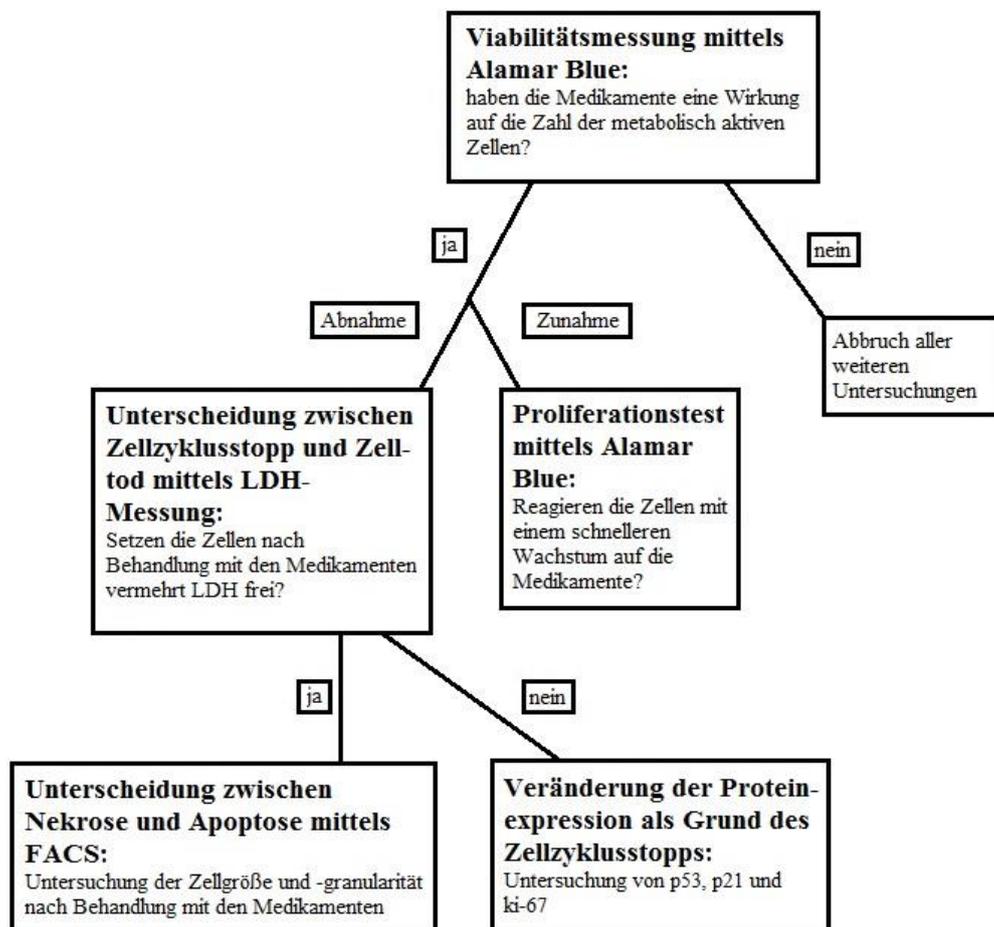
20

Die Wahl der Antihypertensiva fiel auf die Leitsubstanzen der verschiedenen Substanzgruppen, die zum Teil bereits auch in anderen Studien Effekte zeigten und die auf Grund ihres häufigen Gebrauches die wichtigsten Wirkstoffe ihrer Wirkungsgruppe darstellen. Dabei wurde darauf geachtet, dass jeweils ein Medikament von ACE-Hemmern, Aldosteronantagonisten, Schleifendiuretika und Kalziumkanalblocker

25 verwendet wurden. Bei der Gruppe der Betablocker wurden wegen der unterschiedlichen Zielrezeptoren zwei Medikamente untersucht. Somit fiel die Wahl auf folgende Medikamente: Amlodipin, Captopril, Furosemid, Metoprolol, Propranolol und Spironolacton.

30 Es werden folgende Ziele formuliert, um die Wirkung der Antihypertensiva zu zeigen:

- Gewinnung und Kultivierung von humanen Hepatozyten aus einzelnen Leberteileresektaten;
- Kultivierung der Lebertumorzelllinien;
- Untersuchung der Reaktion der Zelllinien auf die Medikamente und des Einflusses der Konzentrationen auf das Zellwachstum;
- 5
- Unterscheidung zwischen Zellzyklusstopp und Zellsterben;
- Untersuchung der den Zellzyklus beeinflussenden Proteine;



- Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose.

10 **Abb. 15: Darstellung der Versuchsreihenfolge**

FACS: Fluorescence activated cell sorting Analyse

## 4 Materialien und Methoden

Im folgenden Kapitel werden alle benötigten Geräte und Materialien aufgelistet und die Durchführung der Versuche erklärt. Allgemein benötigte Hilfsmittel werden im Gegensatz zu versuchsspezifischen, die bei den jeweiligen Experimenten erwähnt werden, in der Tabelle unter Punkt 4.1 angegeben.

### 4.1 Verbrauchsmaterialien

10

Hersteller	Materialien
3M Deutschland GmbH, Neuss (Deutschland)	Steri-Drape 2 Inzisionsfolie, 600mm x 450mm
Apotheke, MRI München (Deutschland)	Ethanol 70 % Ethanol 99,8 % Isopropanol Papierhandtücher Steriles Wasser
AppliChem GmbH, Darmstadt (Deutschland)	CAPS Staurosporin
Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (Deutschland)	Konische Röhrchen, Polypropylen, steril, 15 ml, 50 ml
Biocon Foundation, Bangalore (Indien)	Kit Fluitest LDH-L
Biozol GmbH Eching (Deutschland)	Alamer Blue
B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)	ddH <sub>2</sub> O Einmalspritzen, 2-teilig, steril, 10 ml, 20 ml Gefäßkleber
Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, (Deutschland)	β-Mercaptopurinol Dimethylsulfoxid (DMSO)

	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) Hydroxymethyl-Aminomethan (TRIS) Kanülen Kollagenase P Methanol Natriumchlorid (NaCl) Natriumcitrat Natriumlaurylsulfat (SDS) Nitrozellulosemembran Pefabloc® Propidiumiodid Sterilfilter Triton X-100 Whatman Paper
DeltaSelect GmbH, Taufkirchen (Deutschland)	Aqua Spüllösung (ddH <sub>2</sub> O)
Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)	Eppendorfgefäß Pipettenspitzen T.I.P.S. Standard 0,1-10 µl, 2-200 µl, 50-1000 µl Safe-Lock Reaktionsgefäße, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml
Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied (Deutschland)	Gaze
Materiallager, MRI München (Deutschland)	Skalpell Tape
Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)	Kaliumchlorid (KCl) Natriumhydroxid (NaOH) Trypanblau

neoLab Migge, München (Deutschland)	Aquacare Pasteurpipetten Glas groß, 230mm, 150mm Pinzette
Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz (Deutschland)	Aminosäuren
PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)	Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup> mit Filterkappe DMEM Medium Glukose angereichert (4,5d/l) D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) FCS Gold Glutamin HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) humanes Insulin Kryoröhrchen Penizillin Petrischale Rubber policeman Streptomycin Trypsin Zellkulturplatte 48 Vertiefungen, Flachboden mit Deckel Zellkulturplatte 6 Vertiefungen, Flachboden mit Deckel Zellkulturplatte 96 Vertiefungen, Flachboden mit Deckel
PAN-Biotech GmbH, Aidenbach (Deutschland)	Williams Medium E
Pfizer Deutschland GmbH, Berlin	Hydrokortison

Roche Diagnostics Deutschland GmbH	Protease Inhibitor Complete Mini Tablet
Schott AG, Mainz (Deutschland)	500 ml Flaschen (steril)
Semperit Technische Produkte GmbH, Wien (Österreich)	Handschuhe, sempercareedition, puderfrei, unsterile
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (Deutschland)	Albumin Amlodipin Besylat Brom Phenol Blau Buchner Trichter Captopril Desoxycholinsäure Furosemid Glycin Glycerol (99 %) Kalziumchlorid (CaCl) Luminol Metoprolol Natriumorthovanadat N-Acetyl-L-Cystein Natriumpyruvat Nonident P-40 p-Coumarinsäure Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) Propranolol Spironolacton Tween-20 Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
SPL Life Science, Gyeonggi-do (Südkorea)	Glaspipette, serologisch, steril, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml Zellkulturflasche 25 cm <sup>2</sup> , 50 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> mit Filterkappe

## 4.2 Geräte

Hersteller	Geräte
BDK (Luft- und Reinraumtechnik GmbH) Sonnebühl-Genkingen (Deutschland)	Bench
BMG LabTech GmbH, Ortenberg (Deutschland)	ELISA-Reader: FluoStar OMEGA
BioRad Laboratories GmbH, München (Deutschland)	Gel Kammer: Wide Mini Sub Call 6R Gießständer Glas, dick mit Spacer Glasplatten, dünn Kamm, 10, 15 Wells Powereinheit PowerPac <sup>®</sup> HC Power Supply
Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (Deutschland)	Peristaltikpumpe
Carl Zeiss AG, Oberkochen (Deutschland)	Mikroskope: Axiovert 40 CFL
Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)	1-Kanal Pipette Research <sup>®</sup> (variabel) 2,5 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl 8-Kanal Pipette Research <sup>®</sup> (variable) 300 µl Mastercyclerepgradient S Photometer: Bio Photometer Thermostat Zentrifugen: Centrifuge 5904R, Centrifuge 5517R
Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf (Deutschland)	Gefrierschrank: -80 °C
Fermentas GmbH, Leon-Rot (Deutschland)	PageRuler Prestained Protein Ladder

Haereur Holding GmbH, Hanau (Deutschland)	Inkubator: Hera Cell 150
Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach (Deutschland)	Magnet Mixer: MR Hei-Mix L
Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt (Deutschland)	Pipetus® Pipettierhilfe
IBS Integra Biosciences, Fernwald (Deutschland)	Absaugpumpe: Vacusafe comfort
Kern und Sohn GmbH, Balingen (Deutschland)	Waage: EG 220-3 NM
Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze (Deutschland)	Abzug
Labinco BV, Breda (Holland)	Shaker
Liebher-Holding GmbH, Biberach an der Riss (Deutschland)	Kühlschränke: -20 °C No Frost Premium +4° C Profiline
Materiallager, MRI München (Deutschland)	Luer-Zange
Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach (Deutschland)	Wasserbad
Niko, Tokio (Japan)	Eclipse TS 100
Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen (Deutschland)	Neubauer-Zählkammer
Sartorius AG, Göttingen (Deutschland)	PH-Meter: PB-11
Scientific Industries, New York (USA)	Vortexer: Vortex Genie 2
Systec GmbH, Wettengel (Deutschland)	Sterilisator: 2530 SL
TechnoStar, Hannhofen (Deutschland)	Mikrowelle

### 4.3 Zelltypen und Zellmedium

Zelltyp	Zellmedium	Herkunft
AKN1	DMEM, Glukose angereichert (4,5 g/l) mit L-Glutamin 2 mM; +20 ml FCS (10 %ig) +10 ml Penizillin/Streptomycin (1 %ig)	Forschungsgruppe Unfallchirurgie an der Eberhard-Karls- Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Andreas Nüssler
HCC-M HCC-T	DMEM, Glukose angereichert (4,5 g/l) mit L-Glutamin 2 mM; +20 ml FCS (10 %ig) +10 ml Penizillin/Streptomycin (1%ig)	Forschungsgruppe Molekulare Hepatologie des Universitätsklinikums Mannheim, Fakultät für Klinische Medizin unter Leitung von Prof. rer. nat. Steven Dooley
Hep3B HepG2 SkHep1	DMEM, Glukose angereichert (4,5 g/l) mit L-Glutamin 2mM; +20 ml FCS (10 %ig) +10 ml Penizillin/Streptomycin (1 %ig)	Health Protection Agency Culture Collections [Public Health England 2013]
Huh-7	DMEM, Glukose angereichert (4,5 g/l) mit L-Glutamin 2mM; +20 ml FCS (10 %ig) +10 ml Penizillin/Streptomycin (1 %ig)	Leibniz-Institut DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH [DSMZ 2013]

#### 4.4 Isolation von primären Hepatozyten

##### 4.4.1 Lösungen

Lösungen	Materialien	Endkonzentration
Perfusionslösung 1 (10x; pH 7,5)	NaCl KCl HEPES  Volumen mit ddH <sub>2</sub> O auf 1000 ml Gesamtvolumen auffüllen und den pH 7,5 einstellen	1,42 M 67 mM 100 mM
Perfusionslösung 1 (1x; pH 7,4)	Perfusionslösung 1 (10x) EGTA N-Acetyl-L-Cystein  Volumen mit ddH <sub>2</sub> O auf 450 ml Gesamtvolumen auffüllen und den pH 7,4 einstellen	50 ml 2,4 M 5 mM
Perfusionslösung 2 (1x) Lösung A (pH 7,6)	NaCl KCl HEPES Albumin  Volumen mit ddH <sub>2</sub> O auf 1300 ml Gesamtvolumen auffüllen und den pH 7,6 einstellen	67 mM 6,7 mM 100 mM 0,5 %

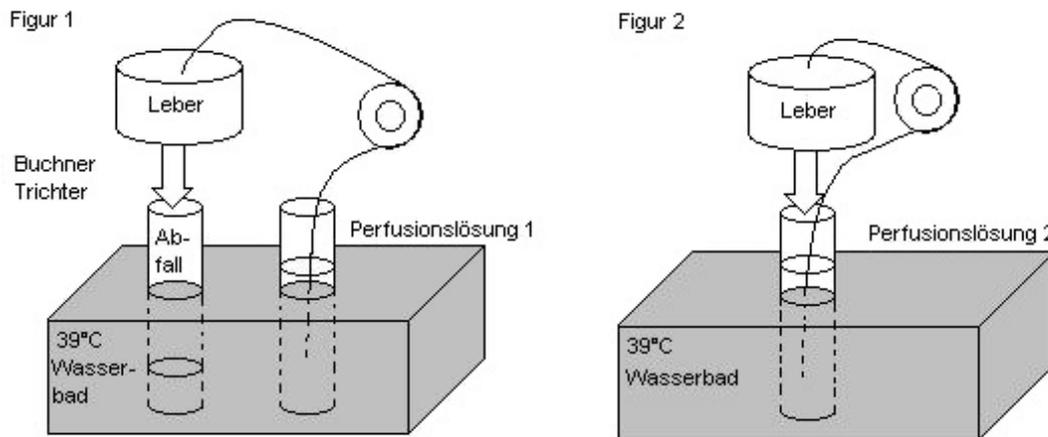
Lösung B (pH 7,6)	CaCl <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O  Volumen mit ddH <sub>2</sub> O auf 150 ml Gesamtvolumen auffüllen und den pH 7,6 einstellen	4,8 mM
Stopplösung (1x)	FCSg D-PBS	20 % 80 %
25 % Percoll- Lösung	D-PBS Percoll-Lösung	75 % 25 %
Hepatozyten Zellmedium	Williams Medium E Glutamin Penicillin/ Streptomycin Hydrokortison HEPES Natriumpyruvat Humanes Insulin FCSg Aminosäuren	1 % 100 U/100 mg 0,8 µg/ml 15 mM 1 mM 1 mM 10 % 1 %

#### 4.4.2 Versuchsaufbau

Die in dieser Arbeit verwendeten Hepatozyten wurden durch Isolationen aus Resektaten des Klinikums rechts der Isar gewonnen. Ein durch den Ethikrat der Technischen  
5 Universität München bewilligter Ethikantrag und die Einverständniserklärungen der Patienten zur Probeentnahme liegen vor.

Der Vorgang der Isolierung von Hepatozyten beruht auf zwei aufeinander folgenden Perfusionsschritten. Als Vorbereitung wurden die Perfusionslösungen und das Wasserbad  
10 auf 39 °C vorgeheizt, da die Kollagenase zwischen 37 und 40 °C maximale Aktivität aufweist. Der pH-Wert der Perfusionslösungen musste vor der Isolation überprüft werden.

Für den ersten Perfusionsschritt wurde die Perfusionslösung 1 in das Wasserbad gestellt und über einen Schlauch mit einer Pumpe und der mit Leber gefüllten Petrischale verbunden. Der an einer Petrischale befestigte Buchner Trichter mündet in ein, im Wasserbad stehendes Abfallgefäß (siehe Abbildung 16; Figur 1).



5

**Abb. 16: Perfusionsschema des Leberteilresektats**

Figur 1 stellt den Versuchsaufbau für den Perfusionsschritt 1 dar, der der Entfernung des Blutes von der Leber dient.

Figur 2 zeigt den Aufbau für den Perfusionsschritt 2, bei dem die Hepatozyten von dem restlichen Gewebe getrennt und weggespült werden.

10

Zuerst musste der Schlauch mit der Perfusionslösung 1 vollständig gefüllt werden, so dass sich dort keine Luft mehr befand. Nachdem das Teilresektat der Leber von Blutresten befreit wurde, wurden einige Gefäße mit Hilfe von Kanülen sondiert, während die restlichen Gefäße mit Gefäßkleber verschlossen wurden, so dass eine ausreichende Perfusion hergestellt wurde. Um alles Blut aus der Leber zu entfernen, wurde sie mit mindestens 500 ml Perfusionslösung (1x) für 20 - 30 Minuten ausgespült (siehe Abbildung 16; Figur 1).

15

Der zweite Perfusionsschritt erforderte einen Umbau, da die nun verwendete Perfusionslösung 2 mitsamt der hinzugefügten Kollagenase P durch die Pumpe immer wieder rezirkulieren sollte (siehe Abbildung 16; Figur 2). Dieser Kreislauf wurde

20

aufrechterhalten, bis das Teilresektat der Leber ihre natürliche Elastizität verlor, was nach ungefähr 13 - 30 Minuten der Fall war. Anschließend wurde die Leber in eine neue Petrischale gelegt, mit einem Skalpell sternförmig inzidiert und danach mit der Stopplösung ausgespült, um alle Hepatozyten abzulösen. Das in der Stopplösung enthaltene FCS Gold verhindert die weitere Gewebszersetzung durch die Kollagenase P. Die durch Sieben von Gewebsresten befreite Lösung wurde erst für 5 Minuten bei 4 °C und 70 G zentrifugiert und im Anschluss in D-PBS resuspendiert und bei 4 °C gelagert. Um noch übriggebliebene Zellreste und Erythrozyten zu entfernen, wurde der Percoll-Gradient angewendet. Es handelt sich hierbei um eine Dichte-Zentrifugation, die die Trennung von lebenden Zellen von toten Zellen und Zelltrümmern ermöglicht, um geschädigte Zellen zu entfernen und somit die Viabilität der Präparation zu erhöhen. Dazu wurden 20 ml der 25 % Percoll-Lösung vorbereitet, mit 4 – 5 ml Zelllösung versetzt und bei 4 °C und 1278 x G ohne Bremsen für 12 Minuten zentrifugiert. Die so entstandene obere Schicht mit toten Zellen und Zelltrümmern wurde verworfen und die untere Schicht mit den lebenden Zellen in D-PBS resuspendiert. Um die Viabilität der Hepatozyten zu überprüfen, wurden sie mit Trypanblau behandelt. Lag diese bei über 80 %, wurden sie auf Kollagen beschichtete Zellkulturplatten ausgesät und mit Hepatozyten Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert [Knobeloch et al. 2012, Nüssler et al. 2009].

20

## **4.5 Zellbehandlung**

### **4.5.1 Zellen auftauen**

Zum Auftauen wurde das jeweils geeignete Medium auf 37 °C erwärmt, bevor 40 ml davon zusammen mit dem aus dem Gefrierschrank entnommenen Inhalt eines Kryoröhrchens in ein 50 ml Falcon gegeben wurden. Die Lösung wurde bei 600 x G und Raumtemperatur sieben Minuten zentrifugiert, der Überstand zügig abgesaugt und das Zellisolat in frischem, geeignetem Medium resuspendiert. Diese Lösung konnte dann in neue Zellkulturflaschen umgefüllt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert werden. Eine Kontrolle wurde am nächsten Tag lichtmikroskopisch durchgeführt [Lindl et al. 2002].

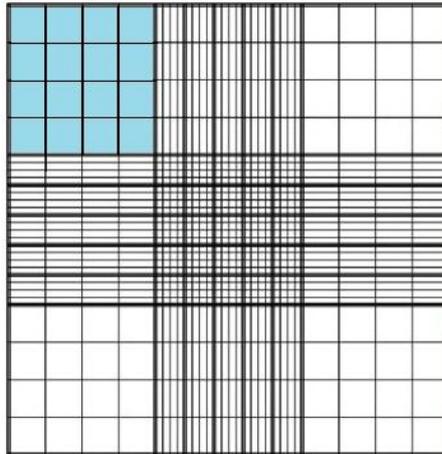
30

#### 4.5.2 Passagieren von Zelllinien

Nach der lichtmikroskopischen Kontrolle der Zelllinie wurde das Medium abgesaugt und durch steriles PBS ersetzt. Das PBS dient der kompletten Entfernung des Mediums, damit dieses nicht die Wirkung des Trypsins aufhebt. 1 ml Trypsin wurde nach Absaugen des  
5 PBS hinzugefügt und die Zellkulturflasche bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in den Inkubator gestellt. Nach fünf Minuten wurde die Zellablösung und -morphologie lichtmikroskopisch beurteilt und die Zellkulturflasche entweder, bei weiter am Grund anhaftenden Zellen, nochmals inkubiert, oder es wurden 10 ml eines vorher vorbereiteten Mediums hinzugefügt, um einen möglichen schädlichen Effekt von Trypsin zu unterbinden. Es  
10 folgte wiederum eine Zentrifugierung der, in ein 50 ml Falcon gefüllte Zelllösung für sieben Minuten bei 600 x G bei Raumtemperatur. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellisolat in neuem Medium aufgelöst. Die Zelllösung konnte dann in neue Zellkulturflaschen verteilt und wieder bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert werden. Am nächsten Tag erfolgte die lichtmikroskopische Kontrolle des Erfolges des Passagierens  
15 [Lindl et al. 2002].

#### 4.5.3 Zellen zählen

Die Zellisolation wurde, wie unter 4.5.2 beschrieben, durchgeführt. Nach Zugabe von 10 ml geeigneten Mediums wurden 40 µl der Zelllösung mit 10 µl Trypanblau gemischt und  
20 jeweils 10 µl dieser Lösung in jedes Quartal der Neubauer-Zählkammer gegeben. Zum Anfärben der Lösung diente Trypanblau, da der Farbstoff die Membran lebender Zellen auf Grund seiner Größe ( $M = 960,8 \text{ g/mol}$ ) nicht durchdringen kann und diese dann, im Gegensatz zu toten, sich blau darstellenden Zellen, hell leuchten [Schmitz et al. 2011].



**Abb. 17: Neubauer-Zählkammer [LO 2013]**

Gezählt werden alle Zellen im blauen Quadrat samt der Zellen, die auf der linken und unteren Begrenzung liegen.

5

Abbildung 17 zeigt eine Neubauer-Zählkammer. Gezählt werden alle Zellen, die innerhalb eines Quadrates und auf dessen linken und unteren Begrenzung liegen. Dadurch werden Doppelzählungen vermieden. Um einen genaueren Mittelwert zu erhalten, wurden immer alle vier Quadranten ausgezählt. Das Ergebnis wurde zuerst mit dem Faktor 5

10 (Verdünnungsfaktor) und danach mit dem Faktor  $10^4$  (Volumen der Zählkammer) multipliziert. Dadurch erhielt man die Zellmenge pro Milliliter, die man durch Multiplikation mit dem Faktor 10 (Menge des beigefügten Mediums) in die Gesamtzellzahl umrechnen konnte [Lindl et al. 2002].

15 **Tabelle 3: Formel zur Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer**

$\text{Mittelwert der vier Quadranten} \times 5 \times 10^4 = \text{Zellen / ml Zellsuspension}$
--

#### 4.6 Viabilitätstest mittels Messung der Resazurinumsetzung

Pro Medikament wurde eine 96-Well-Zellkulturplatte durch das Ausplattieren von 10 000 Zellen in 100 µl geeignetem Medium pro Well vorbereitet. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde das Medium abgesaugt und durch eine vorbereitete Medikamentenlösung ersetzt. Diese wurde durch eine Verdünnungsreihe mit DMSO hergestellt. Jedes Medikament wurde siebenmal verdünnt, bis es mit geeignetem Medium vermengt und zu den Zellen gegeben wurde. In Tabelle 4 werden die benutzten Höchstkonzentrationen aufgelistet. Neben den Wells mit der Medikamenten-Medium-Lösung wurde jeweils ein Well als Kontrolle mit reinem Medium weiter untersucht. Nach einer weiteren Inkubation von 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> ersetzte man diese Lösung durch 60 µl einer 50 µl PBS- und 10 µl Alamar-Blue-Lösung. Nach 1 h Inkubation wurde die aktive Zellzahl über die Fluoreszenz bei 554 nm Exzitation und 590 nm Emission gemessen.

15

**Tabelle 4: Übersicht der Medikamentenkonzentrationen**

Medikament	Höchste Konzentration
Amlodipin	4 mM
Captopril	10 mM
Furosemid	10 mM
Metoprolol	10 mM
Propranolol	4 mM
Spirolacton	10 mM

Das Prinzip der Fluoreszenzmessung beruht auf der Umwandlung von Resazurin in den Mitochondrien von lebenden und metabolisch aktiven Zellen in das fluoreszierende Resofurin. Dabei muss beachtet werden, dass die Inkubation im Dunkeln erfolgen sollte, da UV-Licht die oben beschriebene Umwandlung beeinflusst [O'Brien et al. 2000]. Die Menge des gebildeten Resofurin wird also als Indikator für Zellproliferation und Zytotoxizität genutzt.

20

#### 4.7 Toxizitätsbestimmung mittels LDH-Messung

Nachdem die Zellen wie in 4.6 ausplattiert, mit den Medikamenten versetzt und zum zweiten Mal inkubiert worden sind, wurde für die LDH-Messung jeweils 75  $\mu\text{l}$  des Mediums der drei höchsten Konzentrationen (25 – 100 mM bzw. 10 – 40 mM) und der unbehandelten Kontrolle auf eine neue 96-Well-Zellkulturplatte übertragen. Zur Positivkontrolle behandelte man die jeweiligen Zellen mit Triton X-100, sodass diese in der Auswertung als Grundwert genutzt werden konnten. Weiterhin musste eine Verdünnungsreihe aus dem Kit-Fluoreszenz-LDH-L hergestellt werden. Danach wurden 50  $\mu\text{l}$  der Verdünnungsreihe, die von einer Konzentration von 245 U/l bis 3,828 U/l in Halbierungsschritten reicht und eine Kontrolle aus destilliertem Wasser beinhaltet, den mit Medium gefüllten Wells beigemischt und die Absorption unverzüglich bei 334, 340 und 365 nm im Minutenabstand gemessen.

Der Reaktionsmechanismus beruht auf der Umwandlung von Pyruvat und  $\text{NADH}/\text{H}^+$  durch das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) in Laktat und  $\text{NAD}^+$ . Ein Abfall von  $\text{NADH}/\text{H}^+$  ist also direkt proportional zur Aktivität der Laktatdehydrogenase. Es handelt sich hierbei um ein Enzym, das bei Zelltod freigesetzt wird und deshalb ein guter Indikator für Apoptose und Nekrose von Zellen ist [Snodgrass et al. 1959, Rassow et al. 2012].

20

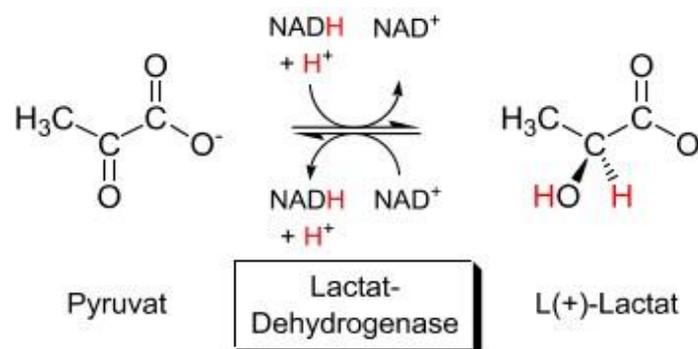


Abb. 18: Darstellung der LDH-Aktivität [Chemgaroo 2013]

## 4.8 Proteinanalyse mittels Western Blot

### 4.8.1 Hintergrund

Mittels des Western Blot kann die Quantität der Proteinexpression bei den untersuchten Zelllinien überprüft werden. Je nach Fragestellung können unterschiedliche Proteine untersucht werden, wodurch z.B. Hinweise auf den Mechanismus eines Proliferationsstopps gewonnen werden können.

### 4.8.2 Lösungen

Lösungen	Materialien	Endkonzentration
Lysepuffer (ph 7.6)	TRIS-Base	10 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA in H <sub>2</sub> O	10 mM
	Nonident P-40	0,5 %
	Desoxycholinsäure	0,5 %
	ddH <sub>2</sub> O	50 ml
	Nach Anpassen des pH-Wertes auf 7.6, mit ddH <sub>2</sub> O auf 100 ml auffüllen	
Complete-Lösung	Protease Inhibitor Complete Mini Tablet	1 Stück
	ddH <sub>2</sub> O	1,5 ml
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)-Lösung	PMSF	50 mM
	Isopropanol	10 ml
Pefabloc-Lösung	Pefabloc SC-Protease-Inhibitor	50 mM
	ddH <sub>2</sub> O	8,34 ml

Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )-Lösung (pH 10)	Natriumorthovanadat ddH <sub>2</sub> O  Lösung erhitzen und an pH 10 anpassen. Schritt bis zur Farblosigkeit wiederholen	100 mM 24 ml
Lämmli Ladepuffer 5x	TRIS (ph 6,8) EDTA SDS β – Mercaptoethanol 99 % Glycerol Brom Phenol Blue	300 mM 5 mM 10 % 12,5 % 50 % 0,05 %
Elektrophoresepuffer 5x	TRIS SDS Glycin  Volumen mit ddH <sub>2</sub> O auf 1000 ml Gesamtvolumen auffüllen	125 mM 0,5 % 1 M
Laufpuffer	Elektrophoresepuffer 5x ddH <sub>2</sub> O	80 % 20 %
TRIS Caps	TRIS CAPS  Volumen mit ddH <sub>2</sub> O auf 1000 ml Gesamtvolumen auffüllen	0,25 M

5xTransferpuffer (Anodenpuffer)	TRIS Caps 5x Methanol  Volumen mit ddH <sub>2</sub> O auf 500 ml Gesamtvolumen auffüllen	0,05 M 20 %
Transferpuffer (Kathodenpuffer)	TRIS Caps 5x 10 % SDS  Volumen mit ddH <sub>2</sub> O auf 500 ml Gesamtvolumen auffüllen	20 %
Milchpulverlösung	5% in TBS-T Puffer	
ECL (enhanced chemilumineszenz- reaction)- Lösung	TRIS-Puffer (ph 8,5) Luminol p-Coumarinsäure 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,25 mM 0,3 mM 0,04 %

#### 4.8.3 Versuchsaufbau

Die zu bearbeitenden Zelllinien wurden wie in Punkt 4.6.2 isoliert und gezählt. Im Anschluss an die Ausplattierung von jeweils 300 000 Zellen pro Well auf einer 6-Well-Zellkulturplatte, folgte eine Inkubation über 12 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Zur Fertigstellung des Lysepuffers wurden pro Milliliter jeweils 40 µl Complete-Lösung, 20 µl Pefabloc-Lösung, 20 µl PMSF-Lösung und 10 µl Natriumorthovanadat-Lösung hinzugegeben. Um die Wirkung der enthaltenen Protease- und Phosphatase-Inhibitoren zu garantieren, musste dies kurz vor Anwendung geschehen. Nach der 24-stündigen Einwirkzeit der drei höchsten Medikamentenkonzentrationen (25 – 100 mM bzw. 10 – 40 mM) und der Kontrolle (Punkt 4.8) wurde das Medium der Wells abgesaugt und die Zellen durch die Zugabe von 120 µl fertigen Lysepuffers pro Well abgetötet. Nach dem Umfüllen

des Lysepuffers mitsamt den abgelösten, lysierten Zellen in Eppendorfgefäße wurden diese für zehn Minuten bei 4 °C und 10 000 x G zentrifugiert. Die ausgefallenen Zellreste wurden verworfen und der Überstand zur quantitativen Bestimmung von Proteinen mittels der Lowry Methode weiterverwendet.

5

Der Mechanismus der Proteinquantifizierung mittels der Lowry Methode beruht auf zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen [Lowry et al. 1951], die in der Reduktion der gelben Folin-Ciocalteu-Reagenz in das intensive Molybdanblau enden. Das Molybdanblau kann dann mittels eines Photometers bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen werden.

10

**Tabelle 5: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels**

Trenngel	Sammelgel
Acrylamid Lösung 40 % (37,5:1)	Acrylamid Lösung 40 % (37,5:1)
1,5 M TRIS (pH 8,8)	0,4 M TRIS (pH 6,8)
ddH <sub>2</sub> O	ddH <sub>2</sub> O
10 % SDS Lösung	10 % SDS Lösung
TEMED	TEMED
10 % APS Lösung	10 % APS Lösung

Zur weiteren Analyse wurden 50 µg Protein pro Probe verwendet. Diese wurden, nach Beimengung eines Ladepuffers für zehn Minuten bei 99 °C erhitzt und im Anschluss auf die vorher vorbereiteten 12 %igen Acrylamidgele aufgetragen. So trennten sich die Proteine während der 60-minütigen Gelelektrophorese bei 200 V der Größe nach auf.

Zur Übertragung der Proben auf eine Nitrozellulosemembran mithilfe der Transferpuffer ließ man sie bei 250 mA 30 Minuten lang laufen. Zur Kontrolle der Übertragung wurde die Nitrozellulosemembran fünf Minuten in Ponceau S-Lösung eingelegt, da der darin enthaltene Azofarbstoff die positiv geladenen Proteine auf der Membran darstellen kann. Im Anschluss wurde der Farbstoff durch H<sub>2</sub>O wieder abgewaschen und die Membran für eine Stunde in einer 5 %igen Milchpulverlösung (siehe 4.10.2) bei Raumtemperatur geblockt. Daraufhin konnte die Membran mit dem, in 1 %iger Milchpulverlösung

verdünnten Erstantikörper bei 4 °C inkubiert werden und am nächsten Tag der Zweitantikörper für zwei Stunden zugegeben werden. Um die markierten Proteine auf einem Röntgenfilm darstellen zu können, musste die Membran eine Minute in der ECL-Lösung (siehe 4.10.2) eingelegt werden.

5

Während der Chemilumineszenz-Reaktion wird das Luminol von der an den Zweitantikörper gebundenen Meerrettichoxidase oxidiert und ermöglicht somit die Darstellung der Proteinbanden auf Röntgenfilmen [Burnette 1981].

10 **Tabelle 6: Verwendete Erstantikörper**

Antikörper	Sek. Antikörper	Verdünnung	Größe	Hersteller
GAPDH	Rabbit	1:5000	37 kDa	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (Deutschland)
p53	Mouse	1:5000	53 kDa	
p21	Mouse	1:2000	21 kDa	Cell Signaling Technology, Inc, Danvers (USA)
ki-67	Rabbit	1:10 000	359 kDa	Abcam Discover More, Cambridge (UK)

**Tabelle 7: Verwendete Zweitantikörper**

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Goat anti Rabbit	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (Deutschland)
Goat anti Mouse	1:5000	

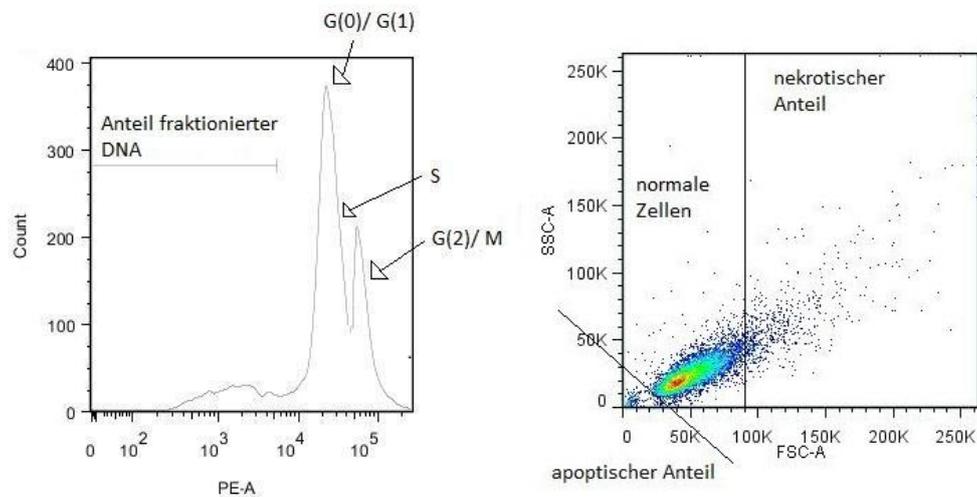
## 4.9 Zelltodanalyse mittels Fluorescence activated cell sorting

### 4.9.1 Hintergrund

Das Prinzip der Durchflusszytometrie besteht darin, Zellen durch einen Laserstrahl strömen zu lassen. Die auftretende Streuung wird durch mehrere Photodetektoren gemessen und erlaubt es, Schlüsse bezüglich Größe, Art und Granularität der Zellen zu ziehen. Um Rückschlüsse auf den DNA-Gehalt der Zellen zu gewinnen, müssen die Zellen vor der Laseranregung mit einem fluoreszierenden Farbstoff, das an die Guanin-Cytosin-Basenpaare bindet (z.B. Propidiumiodid), behandelt werden [Freshney 2011, Wink 2011].

10

Abbildung 19 zeigt die Daten und Informationen in graphischer Form. Im Falle einer Apoptose oder Nekrose kommt es zu einer Änderung des Zellvolumens bzw. zur Auflösung der DNA, die mittels der FACS (Fluorescence activated cell sorting)- Methode dargestellt werden kann.



15

**Abb. 19: Schematische Darstellung der Ergebnisse FACS-Analyse**

links: Gezeigt werden die Zellzyklusphasen, in denen sich die Zellen zum Zeitpunkt der Messung befinden. Zusätzlich kann der Anteil der fraktionierten DNA abgelesen werden, der im Falle einer Apoptose oder Nekrose ansteigt.

20

rechts: Graph, an dem die Zellgröße (FSC-A) und -granularität (SSC-A) abgelesen werden kann und anhand dessen somit die Einteilung in Nekrose und Apoptose stattfindet.

### 4.9.2 Lösungen

Lösung	Materialien	Endkonzentration
HFS Lösung	Triton X-100	0,1 %
	Natriumcitrat	0,1 %
	Propidiumiodid	50 µg/ml

### 4.9.3 Versuchsaufbau

Die Zellen wurden wie unter 4.6.2 isoliert und gezählt. Nachdem jeweils 300 000 Zellen pro Well mit 0,5 ml geeignetem Medium in eine 24-Well-Zellkulturplatte ausgesät wurden, wurden die Zellen nach 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Inkubation mit den drei höchsten Konzentrationen (25 – 100 mM bzw. 10 – 40 mM), einer Positiv- und einer Negativkontrolle weitere 24 h inkubiert. Als negative Kontrolle behandelte man jeweils ein Well nur mit DMSO (Lösungsmittelkontrolle), während man bei der positiven Kontrolle jeweils einem Well 1 µl Staurosporin hinzugab, da dieses eine Apoptose induziert [Chae et al. 2000]. Jede Medikamentenkonzentration und die Kontrollen wurden in dreifacher Ausführung vorbereitet und durchgeführt.

Am dritten Tag überführte man den gesamten Überstand der Wells in einzelne FACS-Röhrchen. Die anhaftenden Zellen wurden nach 5-minütiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit 250 µl Trypsin in das jeweilige Röhrchen gefüllt. Nach dem zehnmütigen Zentrifugieren der Röhrchen bei 600 x G und 4 °C wurde der Überstand verworfen und die Röhrchen, nach Befüllen und sorgfältigem Mischen mit 1 ml kalten PBS, erneut bei 600 x G und 4 °C zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen und die Röhrchen nach dem Befüllen und sorgfältigem Mischen mit 0,5 ml der zuvor vorbereiteten HFS-PI Lösung für 24 h bei 4 °C und Dunkelheit inkubiert.

Am nächsten Tag konnten die Proben am FACS-Gerät vermessen werden: Dot-Plot SSC vs. FSC; Histogramm Plot FL-2H oder FL2A für Zellzyklusmessungen mit 10 000 counts/Messung.

#### 4.10 Proliferationsmessung

Aus einer Zelllösung wurden jeweils 5 000 Zellen zusammen mit 100 µl des geeigneten Mediums pro Well für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in 96-Well-Zellkulturplatten inkubiert, um eine Adhäsion der Zellen zu gewährleisten.

Da die Zellproliferation über fünf Tage gemessen wurde, legte man pro Medikament fünf Platten an, die nach der ersten Inkubationszeit mit den drei höchsten, unter Punkt 4.8 angegebenen Konzentrationen (25 – 100 mM bzw. 10 – 40 mM) nochmals zwischen 24 h und 120 h inkubiert wurden. Die Medikamentenlösung wechselte man jeden zweiten Tag bei den noch nicht weiterverwendeten Platten und inkubierte sie weiter.

Nach der entsprechenden Inkubationszeit (Bsp. 24 h) wurde die Proliferation, wie unter Punkt 4.7 beschrieben, gemessen.

15

#### 4.11 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung und Berechnung aller Werte wurde das Programm GraphPadPrism verwendet.

20

Der EC<sub>50</sub>-Wert zeigt, ab welcher Konzentration der Medikamente die Zellzahl um 50 % sinkt. Zum Vergleich wurden auch die humane Hepatozyten mit den Medikamenten versetzt, um eine mögliche Schädigung der Leberzellen zu überprüfen. Die Graphen der Viabilitätsmessung wurden ebenfalls mit dem Programm GraphPadPrism erstellt. Die restlichen Auswertungen erfolgten auf Grund von biologischen und technischen Replikaten mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), nach der Bonferronis multipler Vergleichstest folgte. Ab einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  wurde das Ergebnis als statistisch signifikant bewertet.

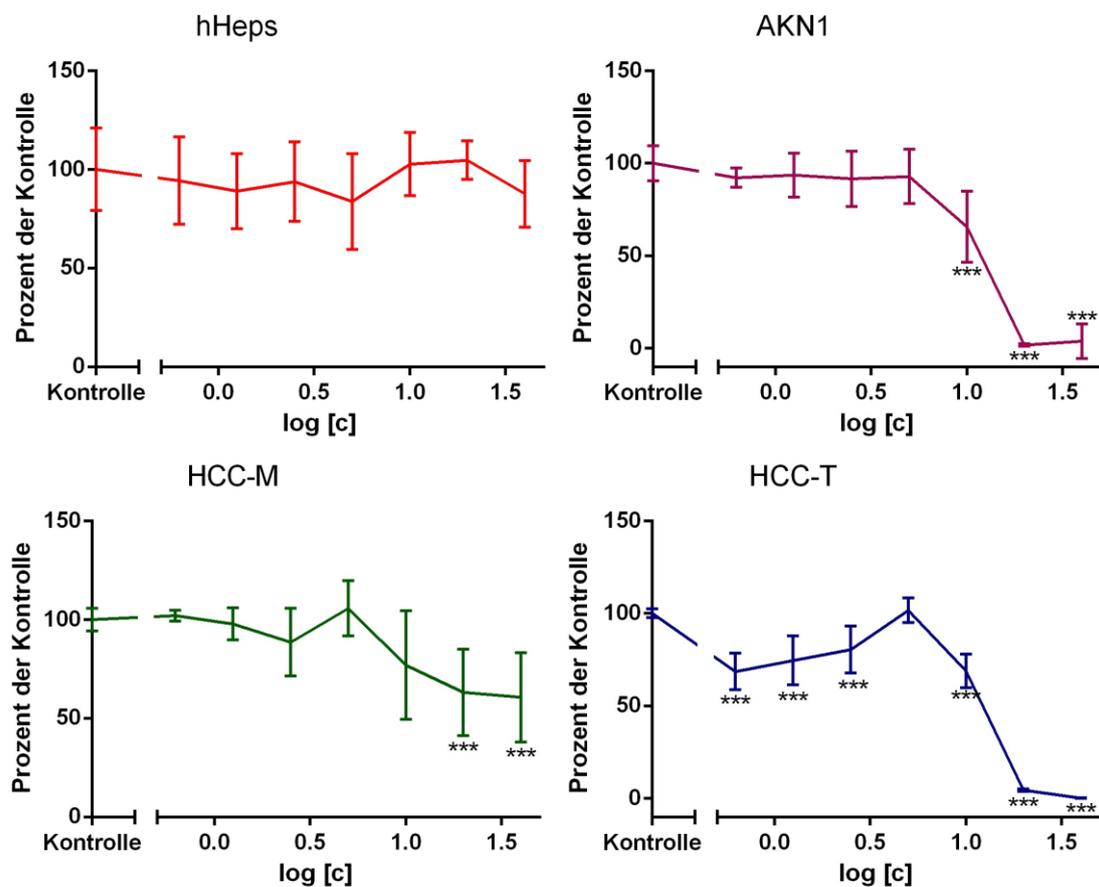
## 5 Ergebnisse

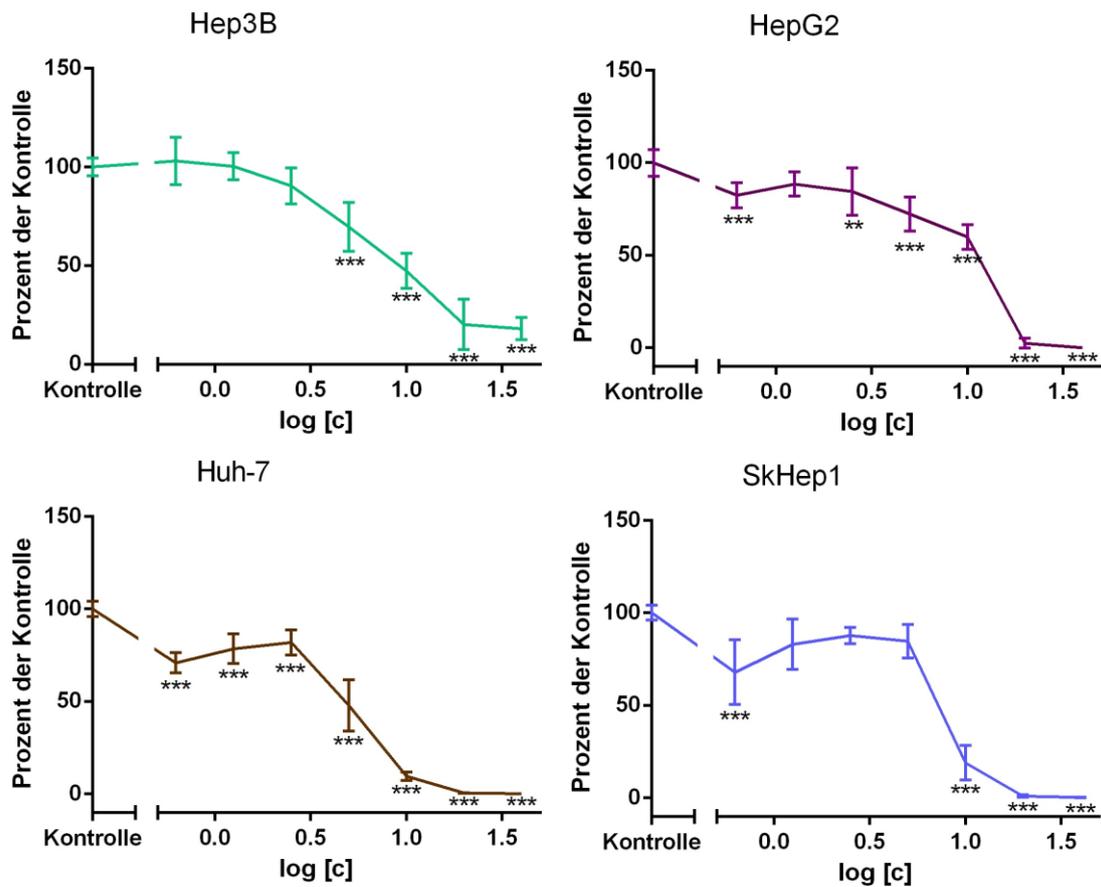
### 5.1 Amlodipin

5

#### 5.1.1 Viabilitätsmessung - Abnahme der Viabilität bei Hepatomazellen

Um die Wirkung von Amlodipin auf die humanen Hepatozyten und die Lebertumorzelllinien zu überprüfen, wurde zuerst eine Fluoreszenzmessung mittels des Resazurinumsatzes nach einer 24 h Inkubationszeit mit Konzentrationen zwischen 0 – 40 mM durchgeführt. Diese erlaubte Rückschlüsse auf die Quantität der noch lebenden, aktiven Zellen und somit indirekt auf die Toxizität der Medikamente auf die Zellen.





**Abb. 20: Proliferationsverhalten nach Behandlung mit Amlodipin**

Dargestellt ist der Anteil metabolisch aktiver Zellen nach Behandlung der Zellen mit Amlodipin über 24 h.

\*\* $p < 0,0089$ ; \*\*\* $p < 0,0001$

N: 3, n: 9

5

Für alle Lebertumorzellen wurde ein signifikanter Abfall der Fluoreszenz gemessen, wohingegen sich bei den humanen Hepatozyten keine signifikante Veränderung aufzeichnen ließ.

Bei allen Hepatomazelllinien, ausgenommen HCC-M und Hep3B, stellte man ab einer Konzentration von 20 mM eine nahezu 100 %ige Abnahme fest. Bei der Zelllinie HCC-M hingegen fand man überhaupt erst ab einer Konzentration von 20 mM einen signifikanten Abfall auf ungefähr 60 %. Ab einer Konzentration von 5 mM konnte eine signifikante Abnahme der Zellen bei der Zelllinie Hep3B festgestellt werden, wobei auch hier ab einer Konzentration von 20 mM eine Senkung um maximal 80 % auffiel. Die humanen

Hepatozyten hingegen zeigten auch bei den höchsten Konzentrationen einen linearen Verlauf, woraus zu schließen ist, dass Amlodipin keinen negativen Einfluss auf das Überleben der Zellen hat.

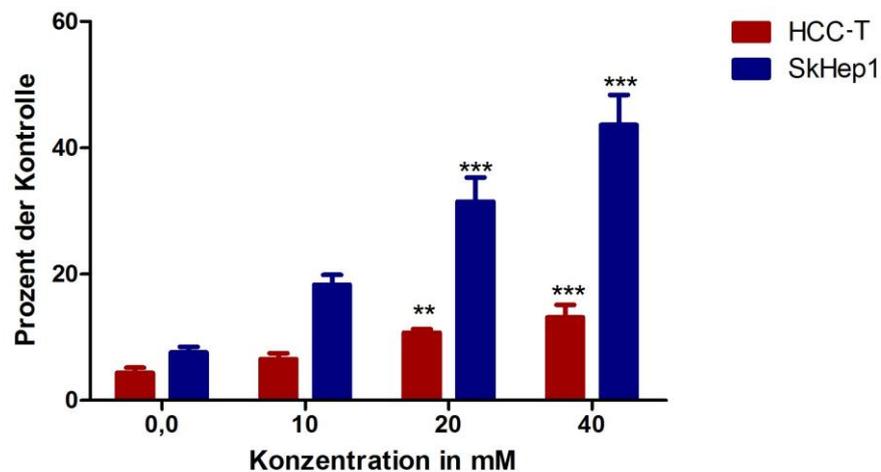
5 **Tabelle 8: Amlodipin - Konzentrationen, ab denen die Viabilität auf 50 % sinkt**

Zelllinie	EC <sub>50</sub>	Zelllinie	EC <sub>50</sub>
AKN1	31,00 mM	HepG2	12,01 mM
HCC-M	23,41 mM	Huh-7	5,45 mM
HCC-T	12,28 mM	SkHep1	9,27 mM
Hep3B	11,07 mM	hHeps	--

Zu klären bleibt, auf welche Weise Amlodipin seine Wirkung entfaltet. Da alle Hepatomazelllinien eine deutliche Abnahme aufwiesen, wurden die fortführenden Versuche mit ihnen allen weiter durchgeführt. Allerdings wurde entschieden, dass nur die  
 10 höchsten drei Konzentrationen (10, 20 und 40 mM) weiterverwendet werden sollten, da diese den größten Einfluss zeigten.

### 5.1.2 Zunahme der LDH-Freisetzung bei HCC-T und SkHep1

Um zwischen einem Wachstumsarrest und einem Zellsterben (Apoptose oder Nekrose)  
 15 unterscheiden zu können, wurde die LDH-Freisetzung nach Inkubation mit den drei höchsten Konzentrationen (10, 20 und 40 mM) gemessen.



**Abb. 21: LDH-Freisetzung bei SkHep1 und HCC-T nach Behandlung mit Amlodipin über 24 h**

100 % entspricht der LDH-Freisetzung von durch Triton X-100 abgetöteten Zellen.

5 \*\*\*:  $p < 0,0001$ ; \*\*:  $p < 0,0089$

N: 3, n: 9

Abbildung 21 zeigt den stetigen Anstieg der LDH-Freisetzung bei den Zelllinien HCC-T und SkHep1 bis zu 300 bzw. 450 % des Ausgangswertes. Wenn auch bei beiden Zelllinien erst ab einer Konzentration von 20 mM Amlodipin eine signifikante Steigung der Freisetzung messbar war, konnte auch bei 10 mM schon eine steigende Tendenz beobachtet werden. Alle anderen Zelllinien inklusive der humanen Hepatozyten veränderten ihr Verhalten nicht.

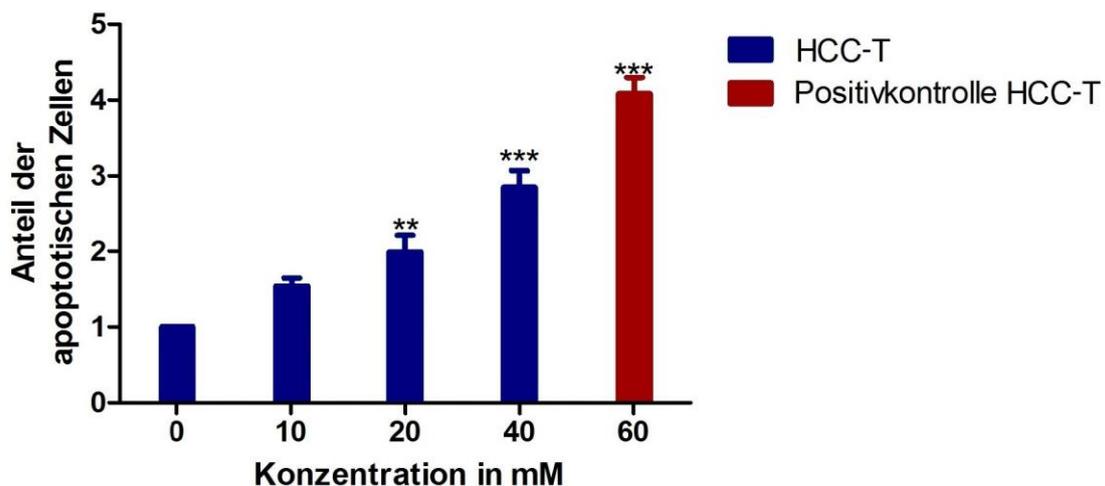
15 Aus diesem Grund wurden SkHep1 und HCC-T mittels der FACS-Analyse in Hinblick auf Apoptose und Nekrose weiter untersucht, während die anderen Hepatomazelllinien per Western Blot auf eine veränderte Proteinexpression hin erforscht wurden.

### 5.1.3 Fluorescence activated cell sorting Analyse

20 Nach dem Gewinn der Erkenntnisse aus der LDH-Messung musste nun geklärt werden, ob es sich bei der Abnahme der Zellzahl bei HCC-T und SkHep1 um einen programmierten Zelltod (Apoptose) oder um eine pathologische Zellzerstörung (Nekrose) handelt. Dazu wurde die Durchflusszytometrie verwendet, da diese durch Analyse der Zellgröße, -art und -granularität die beiden Vorgänge unterscheiden kann.

Bei einer Apoptose würde sich die Zellgröße und Granularität vermindern, wohingegen die Nekrose vor der Fragmentierung und Auflösung des Zellkerns zuerst vergrößerte Zellvolumina aufweisen würde.

### 5 5.1.3.1 HCC-T – Anstieg des Apoptoseanteils



**Abb. 22: Ergebnisse der FACS-Analyse für HCC-T nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h**

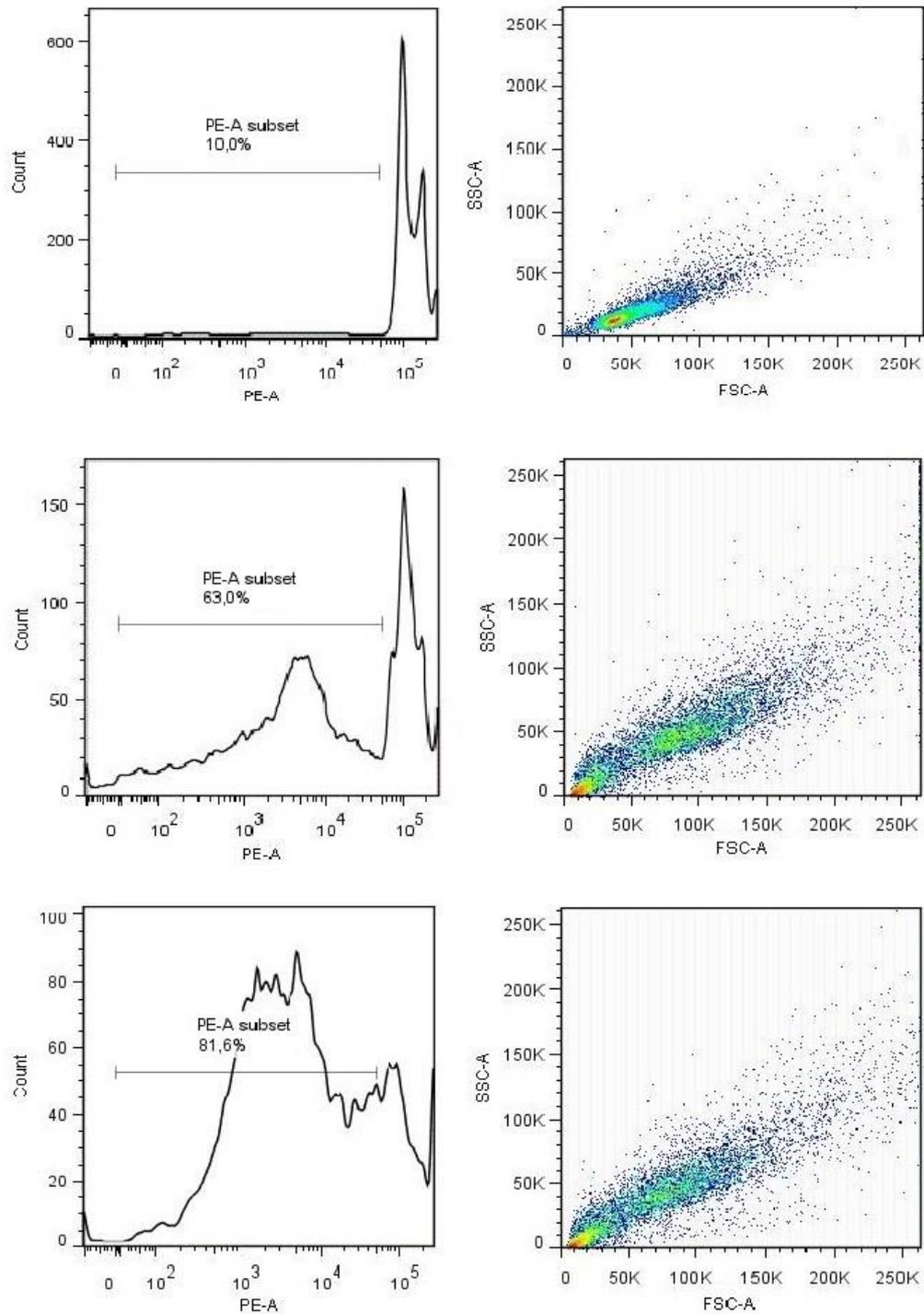
10 Dargestellt ist der Anstieg der fraktionierten DNA bei HCC-T-Zellen nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h. Die Ergebnisse wurden auf den Wert der unbehandelten Zellen normiert. Bei der Positivkontrolle handelt es sich um mit Staurosporin behandelte Zellen.

\*\*\*:  $p < 0,0001$ , \*\*:  $p < 0,0089$

N: 3, n: 12

15

Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, zeigte sich bei den mit 40 mM Amlodipin behandelten Zellen ein Anstieg des Anteils der fraktionierten DNA um ca. 300 %. Schon ab einer Konzentration von 10 mM war eine klare Erhöhung des fraktionierten Anteils um fast 50 % zu erkennen. Die Positivkontrolle mit Staurosporin zeigte wie erwartet eine noch  
20 deutlichere Steigerung um rund 400 %.



**Abb. 23: Repräsentative Dot-Plots und Graphen von HCC-T nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h**

Die erste Zeile stellt die unbehandelten Zellen dar. Nur 10 % der DNA ist fragmentiert (links) und passend dazu haben die meisten Zellen im Dot-Plot (rechts) eine normale Größe und Granularität, was auf lebende Zellen hinweist.

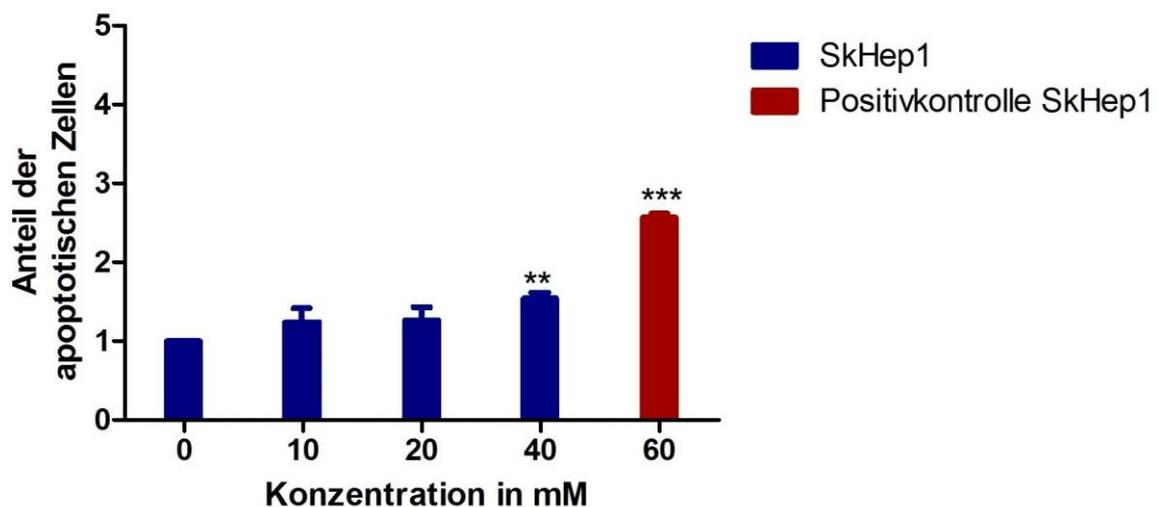
In der zweiten Zeile können die mit 40 mM behandelten Zellen betrachtet werden, bei denen eine Fragmentierung von 63 % stattfand. Im Dot-Plot kann eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen erkannt werden, wobei auch die Zahl der Nekrosen leicht ansteigt.

Die dritte Zeile zeigt die mit Staurosporin behandelten Zellen als Positivkontrolle. 81,6 % sind fragmentiert und passend dazu findet sich im Dot-Plot der Großteil im apoptotischen Bereich wieder.

Die Frage, ob es sich hierbei um eine Nekrose oder Apoptose handelte, konnte mithilfe des Dot-Plots in Abbildung 23 beantwortet werden. Der Anteil der Zellen, die apoptotisch zu Grunde gegangen waren, stieg deutlich an, aber es konnten auch einige Zellen beobachtet werden, deren Zellgröße und Granularität zunahm. Dies deutet auf eine Nekrose hin. Insgesamt konnte jedoch anhand des Graphen gesehen werden, dass der Großteil der fraktionierten DNA aus einer Apoptose entstand.

### 5.1.3.2 SkHep1 – Anstieg des Apoptoseanteils

15



**Abb. 24: Ergebnisse der FACS-Analyse für SkHep1 nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h**

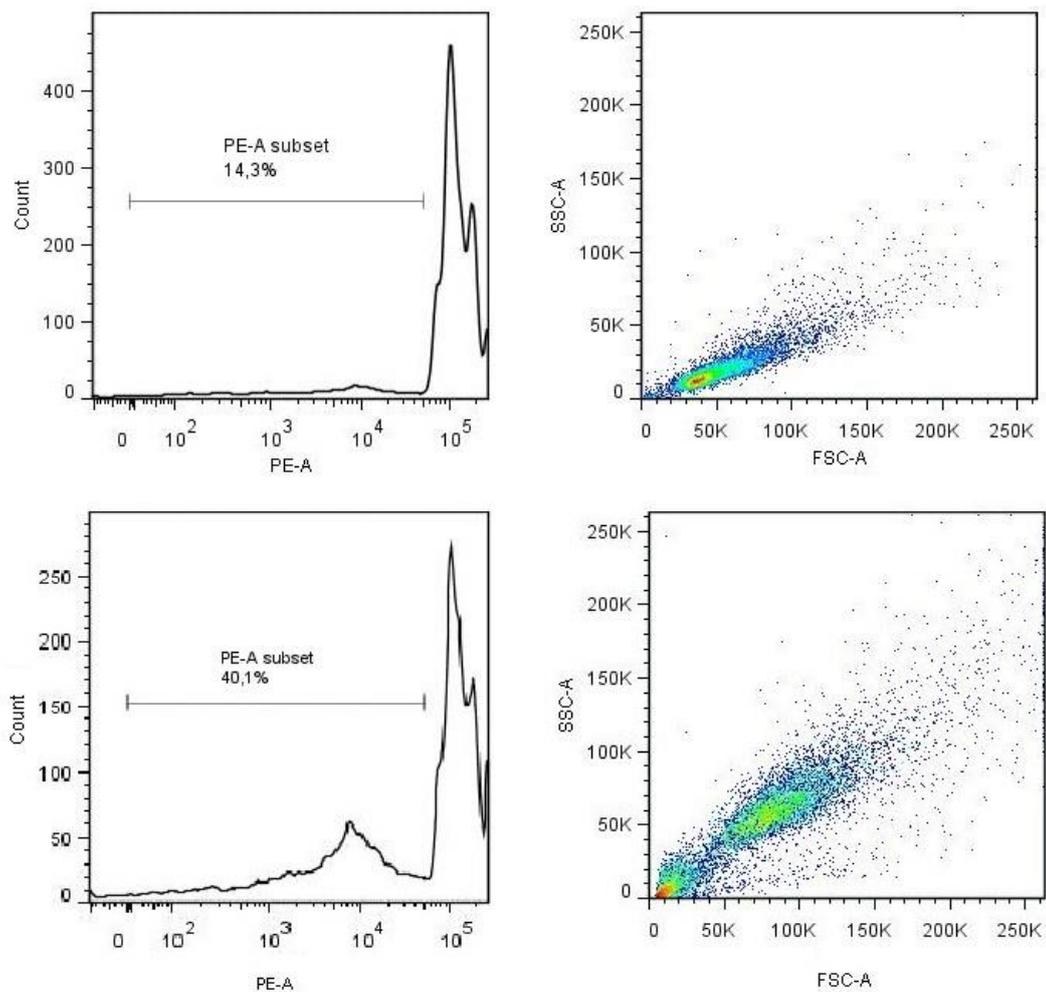
Dargestellt ist der Anstieg der fraktionierten DNA bei SkHep1-Zellen nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h. Die Ergebnisse wurden auf den Wert der unbehandelten Zellen normiert. Bei der Positivkontrolle handelt es sich um mit Staurosporin behandelte Zellen.

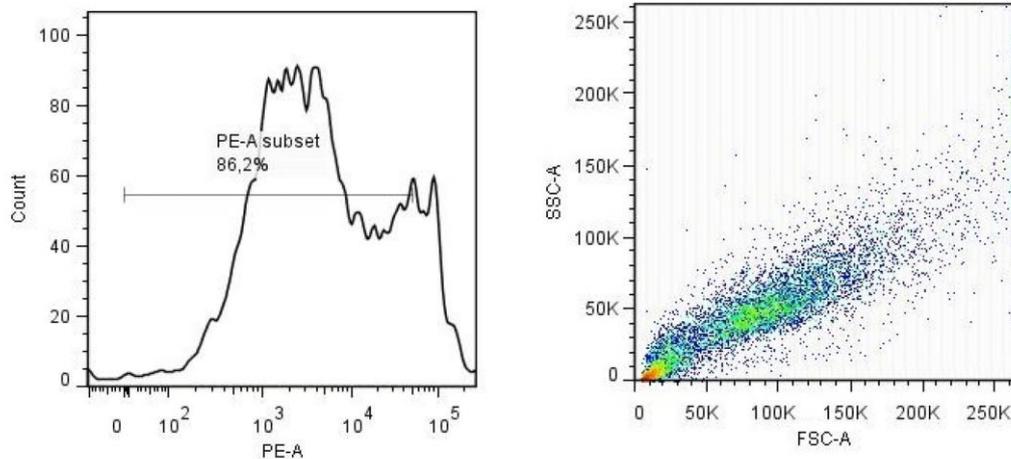
\*\*\*:  $p < 0,0001$ , \*\*:  $p < 0,0089$

N: 3, n: 12

Die Ergebnisse der FACS-Analyse sind in Abbildung 24 dargestellt. Wie schon bei der Zelllinie HCC-T konnte wiederum ein Anstieg des fraktionierten DNA-Anteils gemessen werden, wobei es sich um eine diskretere Erhöhung um insgesamt maximal 50 % bei einer Konzentration von 40 mM handelte. Auch davor ließ sich ein tendenzieller Anstieg messen, der sich aber als nicht signifikant herausstellte. Die mit Staurosporin behandelten Kontrollzellen zeigten eine gesteigerte Fraktionierung um ca. 150 %.

10





**Abb. 25: Repräsentative Dot-Plots und Graphen von SkHep1 nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h**

Die erste Zeile stellt die unbehandelten Zellen dar. Nur 14,3 % der DNA sind fragmentiert (links); passend dazu haben die meisten Zellen im Dot-Plot (rechts) eine normale Größe und Granularität, was auf lebende Zellen hinweist.

In der zweiten Zeile können die mit 40 mM behandelten Zellen betrachtet werden, bei denen 40,1 % fragmentiert sind. Im Dot-Plot kann eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen erkannt werden, wobei auch die Zahl der Nekrosen leicht ansteigt.

Die dritte Zeile zeigt die mit Staurosporin behandelten Zellen als Positivkontrolle. 86,2 % sind fragmentiert und passend dazu findet sich im Dot-Plot der Großteil im apoptotischen Bereich wieder.

Wieder musste das Dot-Plot zur Unterscheidung einer Nekrose von einer Apoptose zu Hilfe gezogen werden. Da sich der Graph ähnlich wie der bei HCC-T darstellte, konnten wieder Hinweise auf eine Apoptose und eine Nekrose gefunden werden. Wiederum war der Anteil der apoptotischen Zellen jedoch um ein Vielfaches höher (Abbildung 25).

#### 5.1.4 Proteinanalyse mittels Western Blot

Um eine mögliche veränderte Proteinexpression der Zelllinien auf Grund von Amlodipin zu untersuchen, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Bei dieser werden elektrophoretisch, nach Größe aufgeteilte Proteinfragmente durch spezifische Antikörper in Banden nachgewiesen und dargestellt. Nach dem ermittelten Hinweis, dass es sich bei

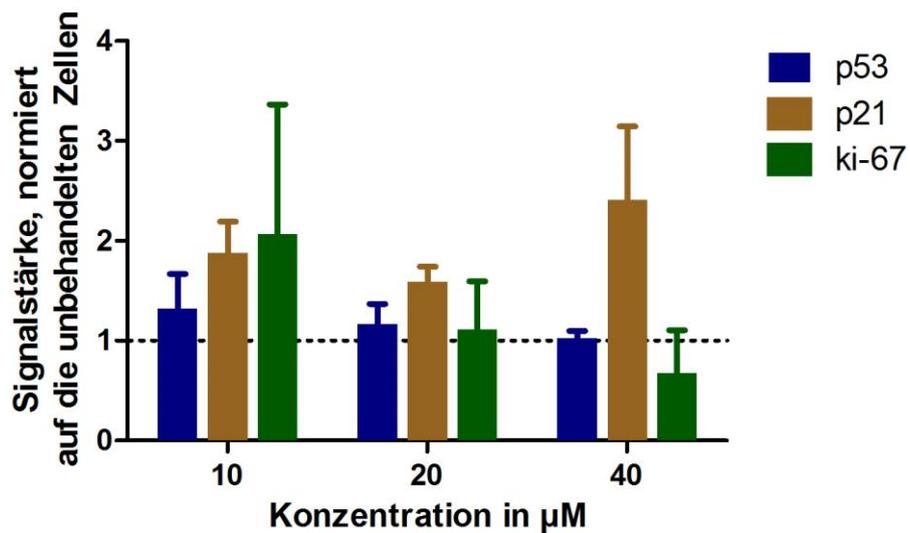
dem Proliferationsstopp bestimmter Zelllinien nicht um eine Nekrose oder Apoptose handelte, untersuchte man ausgewählte Proteine, da diese Einfluss auf den Zellzyklus nehmen können.

5 **Tabelle 9: Zusammenfassung der Proteinfunktion für den Western Blot**

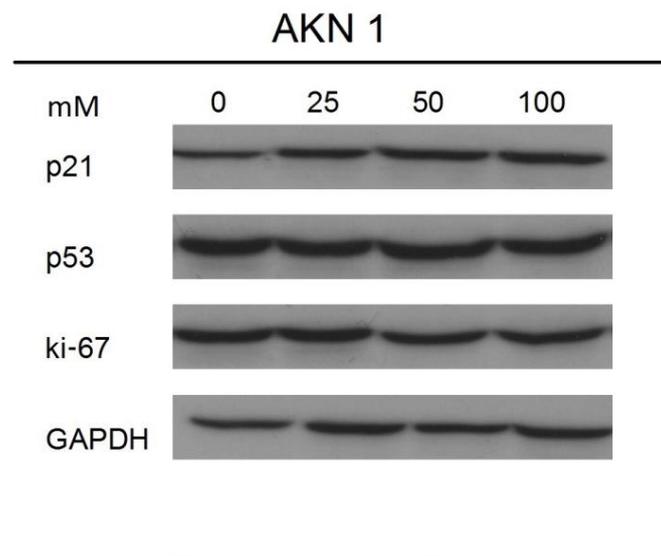
Protein	Funktion
p53	Zellzyklusstopp bis hin zur Apoptose-induktion
p21	Zellzyklusstopp
ki-67	nur in mitotisch aktiven Zellen zu finden.

#### 5.1.4.1 AKN1, HCC-M, Huh-7, Hep3B – keine signifikanten Veränderungen

Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse waren alle nicht signifikant, es handelte sich also einzig um erkennbare Tendenzen.



5



**Abb. 26: Ergebnisse des Western Blots für AKN1 nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h**

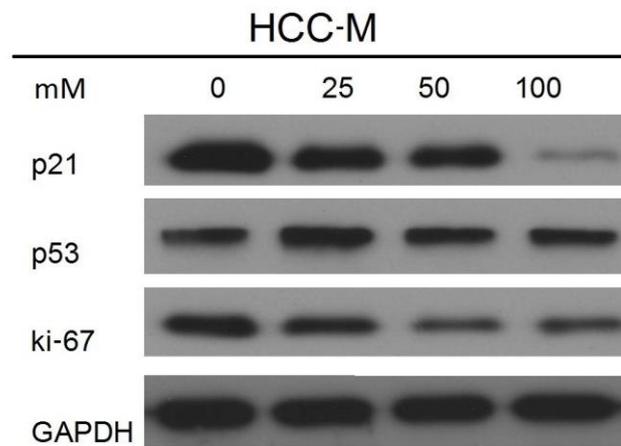
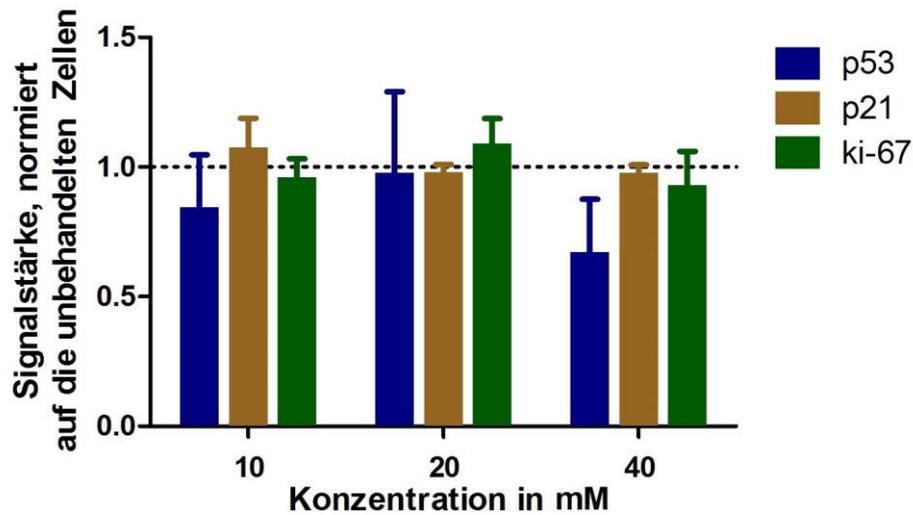
oben: Ergebnisse des Western Blot für AKN1 nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h; die Werte von p21, p53 und ki-67 wurden durch Normierung an densitometrisch ermittelten Werten von GAPDH gewonnen und außerdem auf den Wert der unbehandelten Zellen normiert.

unten: Repräsentative Darstellung der Proteinexpression von p21, p53, ki-67 und GAPDH.

N: 3; n: 3

10

Wie Abbildung 26 zeigt, konnte bei der Zelllinie AKN1 bei ki-67 zuerst eine deutliche Zunahme gemessen werden, bevor es zu einer stetigen Abnahme kam.



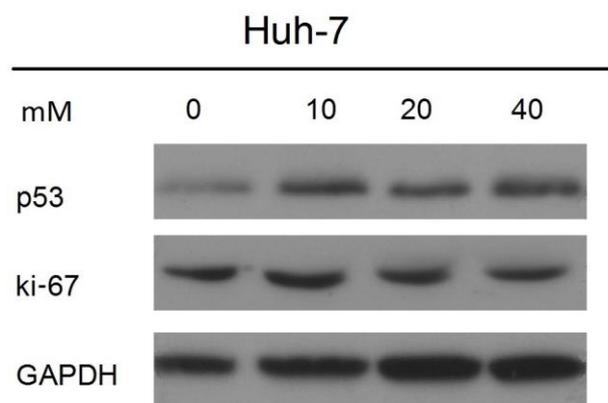
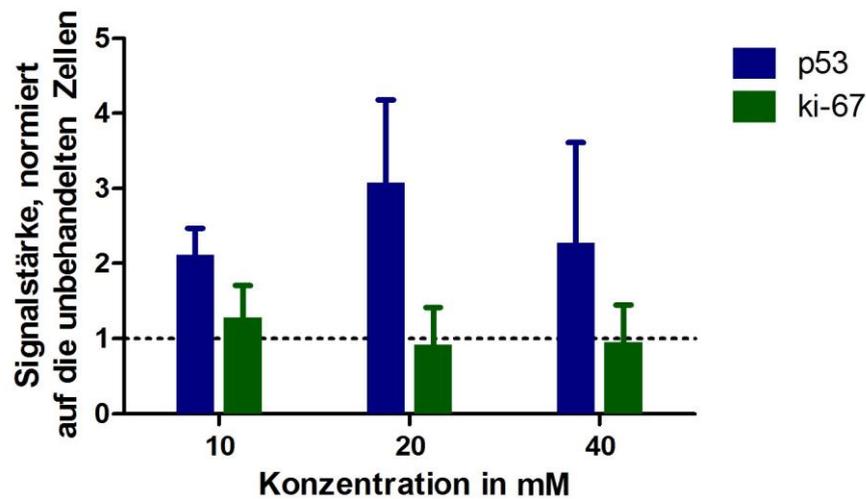
5

**Abb. 27: Ergebnisse des Western Blots für HCC-M nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h**

oben: Ergebnisse des Western Blot für HCC-M nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h; die Werte von p21, p53 und ki-67 wurden durch Normierung an densitometrisch ermittelten Werten von GAPDH gewonnen und außerdem auf den Wert der unbehandelten Zellen normiert.

unten: Repräsentative Darstellung der Proteinexpression von p21, p53, ki-67 und GAPDH.

N: 3, n: 3



**Abb. 28: Ergebnisse des Western Blots für Huh-7 nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h**

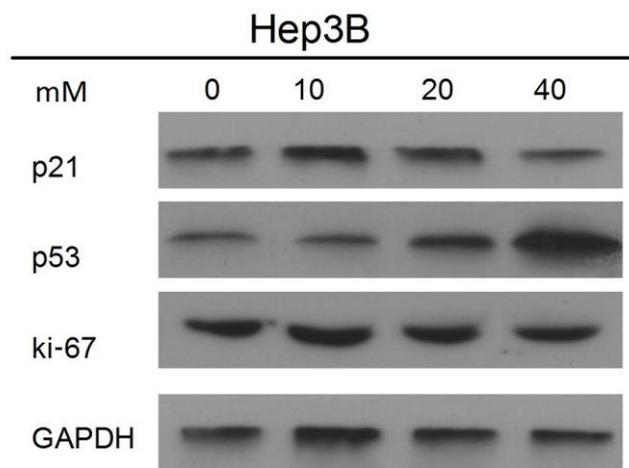
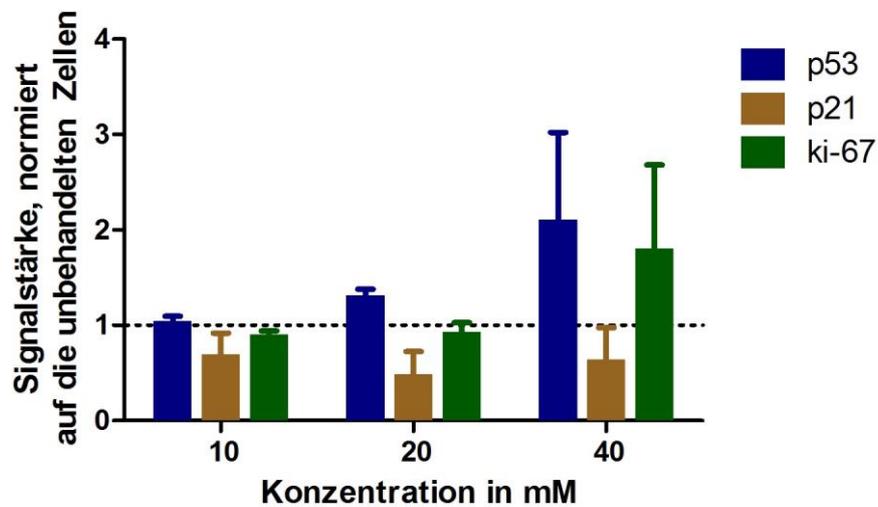
5 oben: Ergebnisse des Western Blot für Huh-7 nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h; die Werte von p53 und ki-67 wurden durch Normierung an densitometrisch ermittelten Werten von GAPDH gewonnen und außerdem auf den Wert der unbehandelten Zellen normiert.

unten: Repräsentative Darstellung der Proteinexpression von p53, ki-67 und GAPDH.

N: 3, n: 3

10

Auch für HCC-M und Huh-7 waren keine signifikanten Veränderungen messbar, wobei ein leichter Anstieg der Expression von p53 zu beobachten ist. Dargestellt wurden die Ergebnisse in Abbildung 27 und 28.



**Abb. 29: Ergebnisse des Western Blots für Hep3B nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h**

5 oben: Ergebnisse des Western Blot für Hep3B nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h; die Werte von p21, p53 und ki-67 wurden durch Normierung an densitometrisch ermittelten Werten von GAPDH gewonnen und außerdem auf den Wert der unbehandelten Zellen normiert.

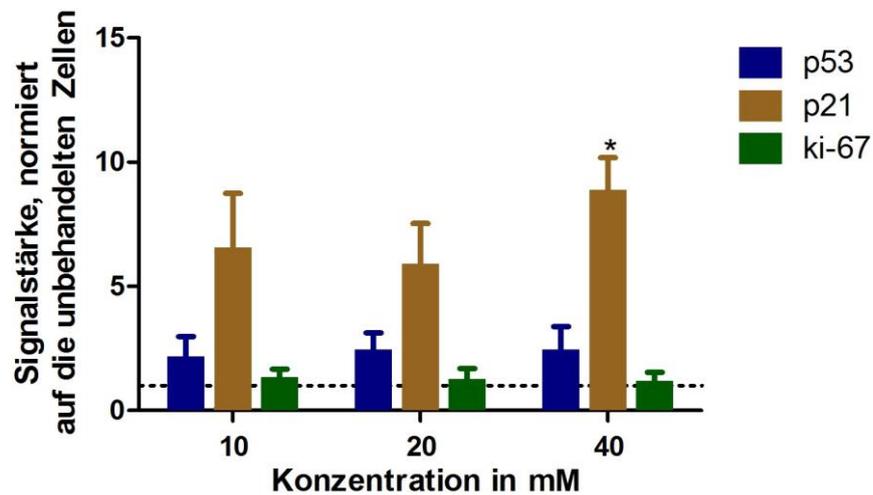
unten: Repräsentative Darstellung der Proteinexpression von p53 und GAPDH.

N: 3, n: 3

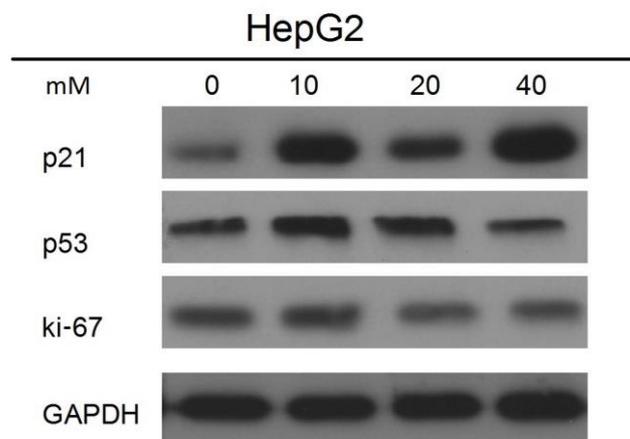
10

Abbildung 29 stellt die Ergebnisse für Hep3B dar. Auch hier waren keine signifikanten Änderungen erkennbar, wobei bei p53 und ki-67 tendenziell ein Anstieg der Expression zu verzeichnen war.

## 5.1.4.2 HepG2 – Anstieg der p21-Expression



5



**Abb. 30: Ergebnisse des Western Blot für HepG2 nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h**

10 oben: Ergebnisse des Western Blot für HepG2 nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h; die Werte von p21, p53 und ki-67 wurden durch Normierung an densitometrisch ermittelten Werten von GAPDH gewonnen und außerdem auf den Wert der unbehandelten Zellen normiert.

unten: Repräsentative Darstellung der Proteinexpression von p21, p53 und ki-67 und GAPDH.

\*:  $p < 0,05$ ; N: 3, n: 3

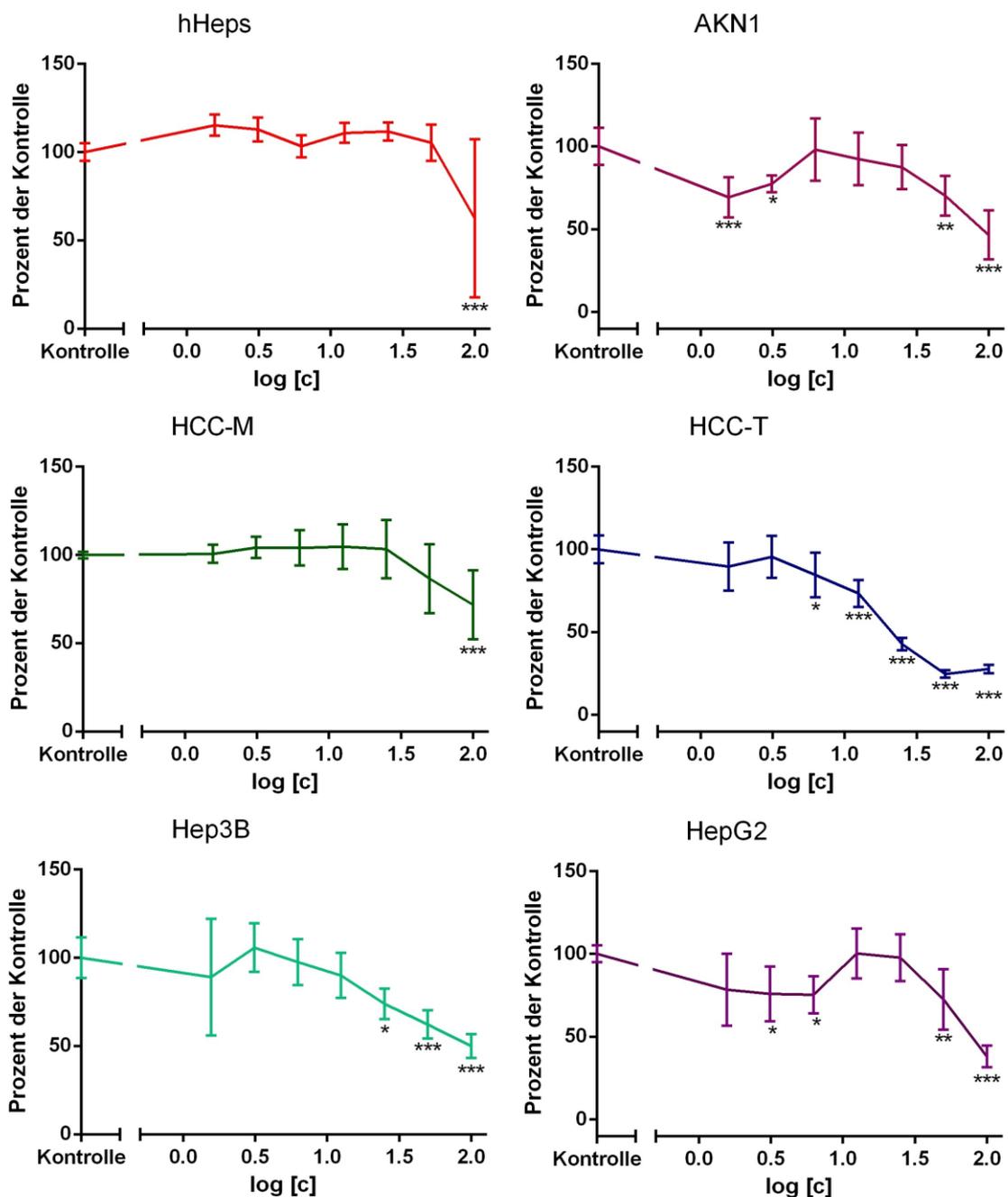
15

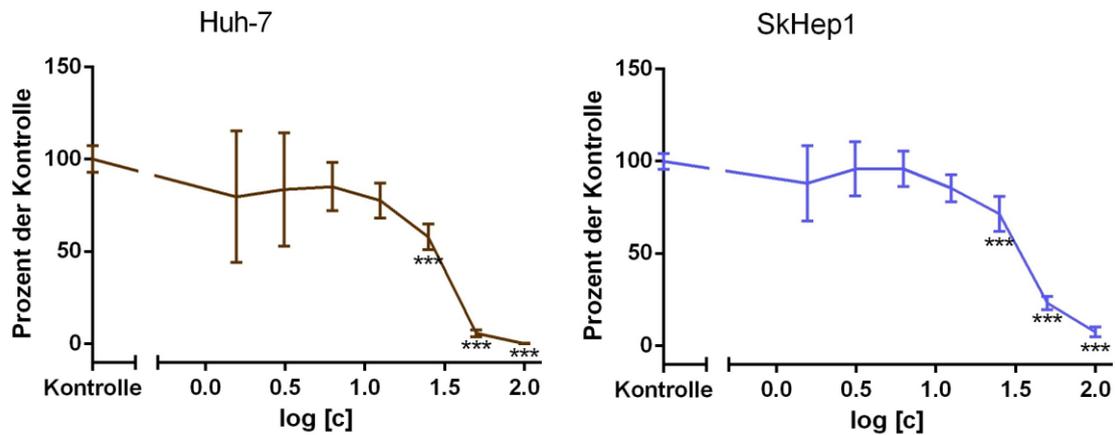
Wie Abbildung 30 zeigt, stieg die p21-Konzentration mit Erhöhung der Medikation stetig an. Bei 40 mM Amlodipin war eine maximale Steigerung um das Neunfache des Ausgangswertes messbar. Bei allen anderen Proteinen war keine Änderung zu verzeichnen.

5

## 5.2 Spironolacton

### 5.2.1 Viabilitätsmessung - Abnahme der Viabilität der Hepatomazellen





**Abb. 31: Proliferationsverhalten nach Behandlung mit Spironolacton**

Dargestellt ist der Anteil metabolisch aktiver Zellen nach Behandlung der Zellen mit Spironolacton über 24 h.

5 \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,0089$ ; \*\*\*:  $p < 0,0001$

N: 3, n: 9

Spironolacton zeigte auf alle Zelllinien eine deutliche Wirkung, die aus der Abnahme der metabolisch aktiven Zellen um bis zu 95 % (Huh-7, SkHep1) bestand. Allerdings konnte  
 10 nicht bei allen Zellarten eine solch drastische Verringerung festgestellt werden, da z.B. die HCC-M-Zellzahl nur um 30 % abnahm. Die humanen Hepatozyten zeigten ein lineares Verhalten, bis bei einer Konzentration von 100 mM einen Zellzahlabfall um 40 % erkennbar war (Abbildung 31).

15 **Tabelle 10: Spironolacton - Konzentrationen, ab denen die Viabilität auf 50 % sinkt**

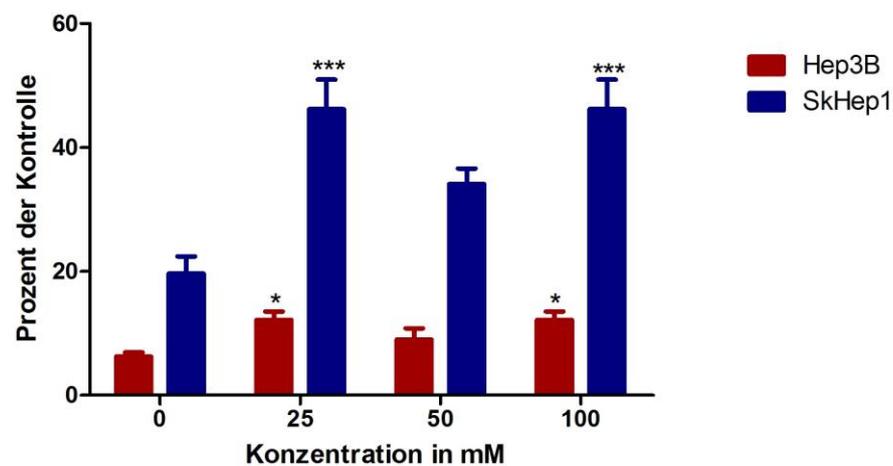
Zelllinie	EC <sub>50</sub>	Zelllinie	EC <sub>50</sub>
AKN1	52,55 mM	HepG2	51,96 mM
HCC-M	--	Huh-7	29,74 mM
HCC-T	16,77 mM	SkHep1	34,19 mM
Hep3B	27,50 mM	hHeps	--

Trotz des leichten Abfalls der humanen Hepatozyten bei der höchsten Konzentration wurde die Wirkung von Spironolacton weiter untersucht. Alle folgenden Versuche führte

man mit allen sechs Hepatomazelllinien durch, da sie alle eine Reaktion auf das Medikament zeigten. Allerdings wurde entschieden, dass nur die höchsten drei Konzentrationen (25, 50 und 100 mM) weiterverwendet wurden, da diese das größte Potenzial bewiesen.

5

### 5.2.2 Zunahme der LDH-Freisetzung bei SkHep1 und Hep3B



10 **Abb. 32: LDH-Freisetzung bei SkHep1 und HCC-T nach Behandlung mit Spironolacton über 24 h**

100 % entspricht der LDH-Freisetzung von durch Triton X-100 getöteten Zellen.

\*\*\*:  $p < 0,0001$ ; \*:  $p < 0,05$

N: 3, n: 9

15 Wie in Abbildung 32 dargestellt, konnte bei SkHep1 und zusätzlich bei Hep3B ein Anstieg der LDH-Freisetzung um 250 bzw. 200 % des Ausgangswertes festgestellt werden. Bei beiden Zelllinien ließ sich die Steigung vor allem bei 25 und 100 mM nachweisen. Bei der Konzentration von 50 mM zeigte sich sowohl bei SkHep1 als auch bei Hep3B eine Regression der Freisetzung um rund 100 %. Bei allen anderen Zelllinien einschließlich der  
20 humanen Leberzellen fanden sich keinerlei Veränderungen.

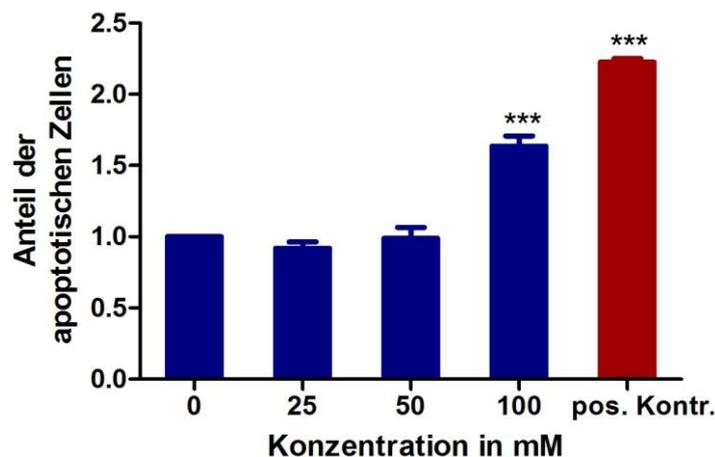
Nach diesem Erkenntnisgewinn konnten die Zelllinien wieder in unterschiedliche Untersuchungen aufgeteilt werden, so dass SkHep1 durch die FACS-Analyse weiter untersucht wurde, während die restlichen Zelllinien durch den Western Blot getestet

wurden. Hep3B wurde auf Grund der geringen Signifikanz und aus zeitlichen Gründen mittels Western Blot weiter untersucht.

### 5.2.3 Fluorescence activated cell sorting Analyse

5

Wiederum stellte sich die Frage, ob es sich bei dem Anstieg der LDH-Freisetzung um ein Zeichen der Apoptose oder Nekrose handelte. Daher wurde für die Zelllinie SkHep1 eine FACS-Analyse durchgeführt.



10

#### Abb. 33: Ergebnisse der FACS-Analyse für SkHep1 nach Behandlung mit Spironolacton für 24 h

Dargestellt ist der Anstieg der fraktionierten DNA bei den SkHep1-Zellen nach Behandlung mit Spironolacton für 24 h. Die Ergebnisse wurden auf den Wert der unbehandelten Zellen normiert. Bei der

15

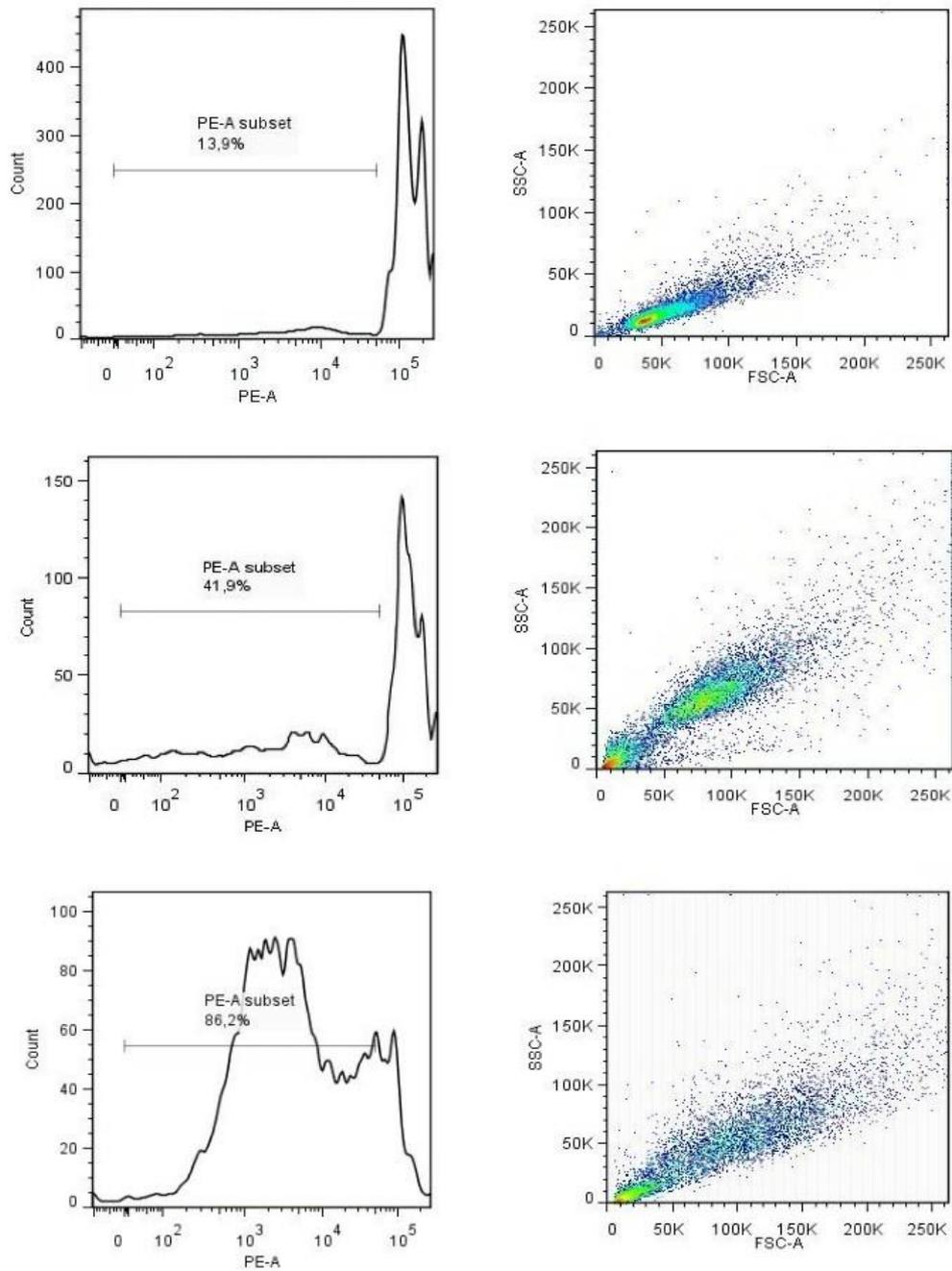
Positivkontrolle handelt es sich um mit Staurosporin behandelte Zellen.

\*\*\*:  $p < 0,0001$

N: 3, n: 12

Wie in Abbildung 33 gezeigt, war bei der Zelllinie SkHep1 nach 24-stündiger Behandlung mit Spironolacton erst ab einer Konzentration von 100 mM ein signifikanter Anstieg des fraktionierten DNA-Anteils messbar. Dabei handelte es sich um eine Erhöhung um rund 75 %. Wie erwartet, zeigte sich nach einer Behandlung mit Staurosporin eine deutliche Steigerung um ca. 125 %. Bei den niedrigeren Konzentrationen zeigte sich keine Veränderung des fraktionierten DNA-Anteils.

20



**Abb. 34: Repräsentative Dot-Plots und Graphen von SkHep1 nach Behandlung mit Spironolacton für 24 h**

Die erste Zeile stellt die unbehandelten Zellen dar. Nur 13,9 % der DNA ist fragmentiert (links) und passend dazu haben die meisten Zellen im Dot-Plot (rechts) eine normale Größe und Granularität, was auf lebende Zellen hinweist.

In der zweiten Zeile können die mit 100 mM behandelten Zellen betrachtet werden, bei denen sich eine Fragmentierung von 41,9 % zeigte. Im Dot-Plot kann eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen erkannt werden, wobei auch die Zahl der Nekrosen leicht ansteigt.

Die dritte Zeile zeigt die mit Staurosporin behandelten Zellen als Positivkontrolle. 86,2 % sind fragmentiert und passend dazu findet sich im Dot-Plot der Großteil im apoptotischen Bereich wieder.

Wie schon unter Punkt 5.1.3 musste das Dot-Plot in Abbildung 19 in Bezug auf die Art der Fraktionierung zu Rate gezogen werden. Auch hier ließen sich beide Arten des Zelltodes finden, wobei sich die Apoptose abermals als Hauptgrund für die LDH-Freisetzung herausstellte.

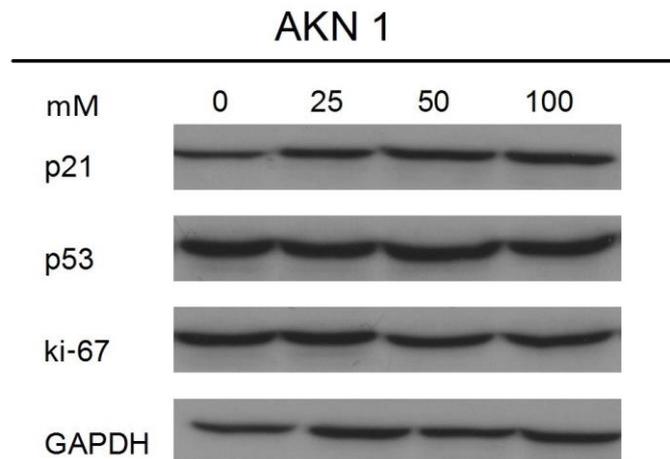
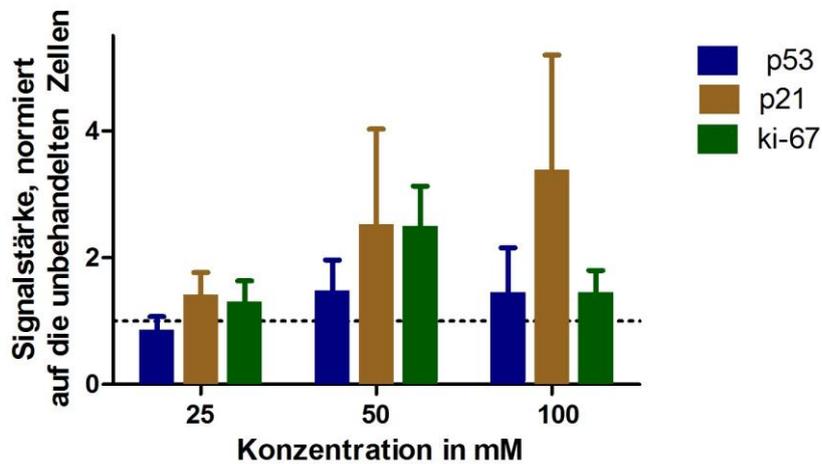
#### 5.2.4 Proteinanalyse mittels Western Blot

Da nicht bei allen Zelllinien eine Zunahme bei der LDH-Freisetzung gemessen wurde, musste die Möglichkeit einer veränderten Proteinexpression als Grund für den Proliferationsstopp in Betracht gezogen werden. Wiederum wurden nur Proteine untersucht, die einen Einfluss auf den Zellzyklus haben.

**Tabelle 11: Zusammenfassung der Proteinfunktion für den Western Blot**

Protein	Funktion
p53	Zellzyklusstopp bis hin zur Apoptose-induktion
p21	Zellzyklusstopp
ki-67	nur in mitotisch aktiven Zellen zu finden.

### 5.2.4.1 AKN1, HCC-T, Hep3B und HepG2 – keine signifikanten Veränderungen



5

#### Abb. 35: Ergebnisse des Western Blot für AKN1 nach Behandlung mit Spironolacton für 24 h

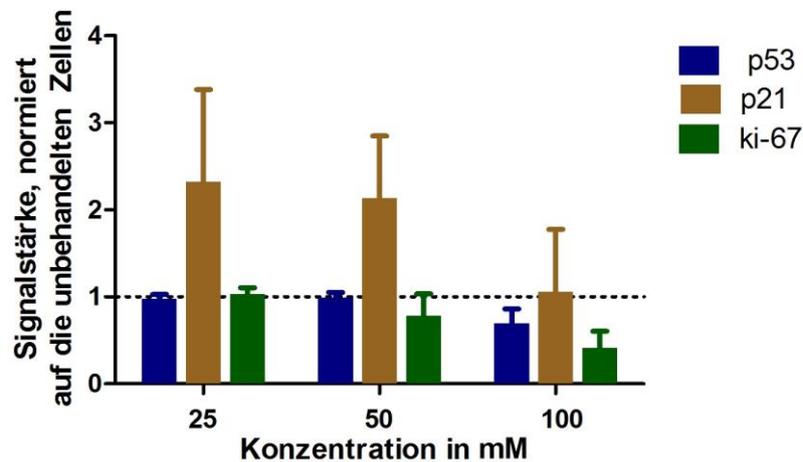
oben: Ergebnisse des Western Blot für AKN1 nach Behandlung mit Spironolacton für 24 h; die Werte von p21, p53 und ki-67 wurden durch Normierung an densitometrisch ermittelten Werten von GAPDH gewonnen und außerdem auf den Wert der unbehandelten Zellen normiert.

unten: Repräsentative Darstellung der Proteinexpression von p21, p53, ki-67 und GAPDH.

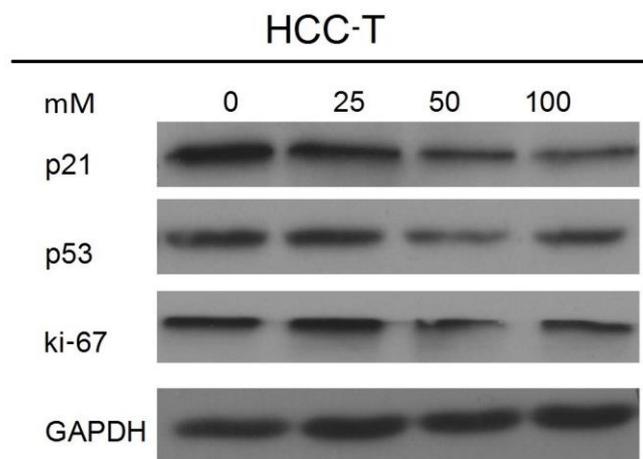
N: 3, n: 12

15 Abbildung 35 stellt die Ergebnisse für AKN1 dar. Wie zu sehen ist, war sowohl bei p53 als auch p21 mit zunehmender Konzentration eine Tendenz der steigenden Proteinexpression

auffindbar. Bei ki-67 ließ sich zuerst eine Zunahme feststellen, bis es bei 100  $\mu\text{M}$  zu einem deutlichen Abfall kam.



5



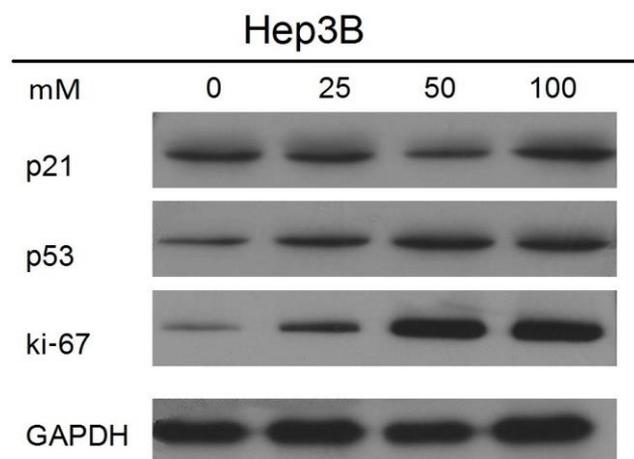
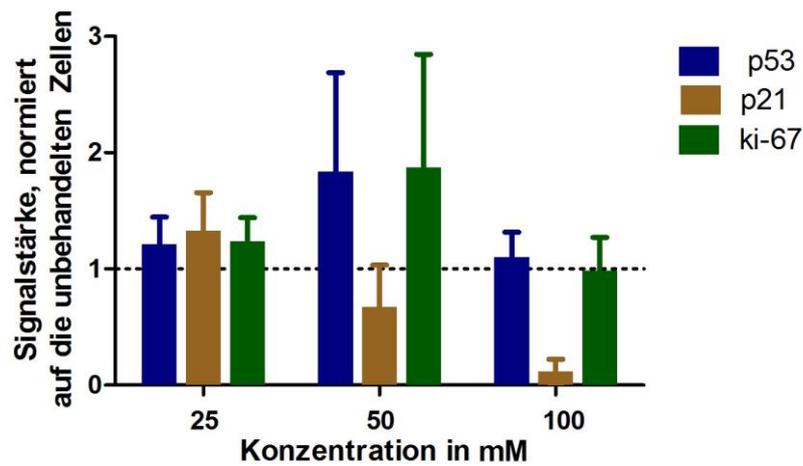
**Abb. 36: Ergebnisse des Western Blot für HCC-T nach Behandlung mit Spironolacton für 24 h**

10 oben: Ergebnisse des Western Blot für HCC-T nach Behandlung mit Spironolacton für 24 h; die Werte von p21, p53 und ki-67 wurden durch Normierung an densitometrisch ermittelten Werten von GAPDH gewonnen und außerdem auf den Wert der unbehandelten Zellen normiert. Die Ergebnisse von p21 wurden zur Erleichterung der graphischen Darstellung bei den Konzentrationen 25 - 100 mM durch den Quotienten 10 geteilt.

15 unten: Repräsentative Darstellung der Proteinexpression von p21, p53, ki-67 und GAPDH.

N: 3, n: 12

Bei der Zelllinie HCC-T zeigte sich bei der Untersuchung von p21 schon bei 25 mM ein deutlicher Anstieg, der aber mit steigender Konzentration wieder abnahm und nicht signifikant war. Dagegen war bei ki-67 mit steigender Medikation eine Tendenz zur stetigen Senkung der Proteinexpression erkennbar.



10 **Abb. 37: Ergebnisse des Western Blot für Hep3B nach Behandlung mit Spironolacton für 24 h**

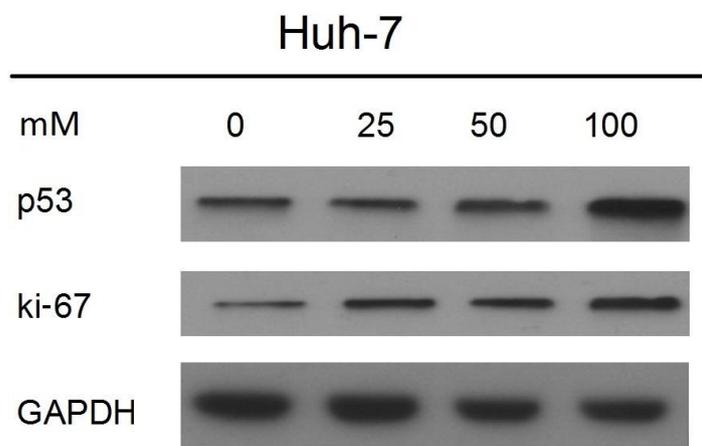
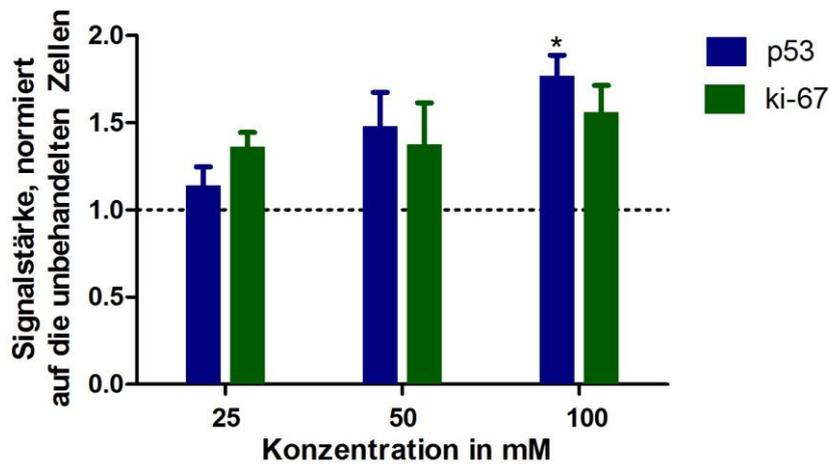
oben: Ergebnisse des Western Blot für Hep3B nach Behandlung mit Spironolacton für 24 h; die Werte von p21, p53 und ki-67 wurden durch Normierung an densitometrisch ermittelten Werten von GAPDH gewonnen und außerdem auf den Wert der unbehandelten Zellen normiert.

unten: Repräsentative Darstellung der Proteinexpression von p21, p53, ki-67 und GAPDH.

15 N: 3, n: 12

Bei der Zelllinie Hep3B konnte zum einen ein deutlicher Anstieg der Expression von ki-67 und p53, zum anderen aber eine genauso deutliche Abnahme der p21 Expression bei einer Konzentration von 100 mM gemessen werden.

#### 5 5.2.4.2 Huh-7 und HCC-M – veränderte Proteinexpression



**Abb. 38: Ergebnisse des Western Blots für Huh-7 nach Behandlung mit Spironolacton für 24 h**

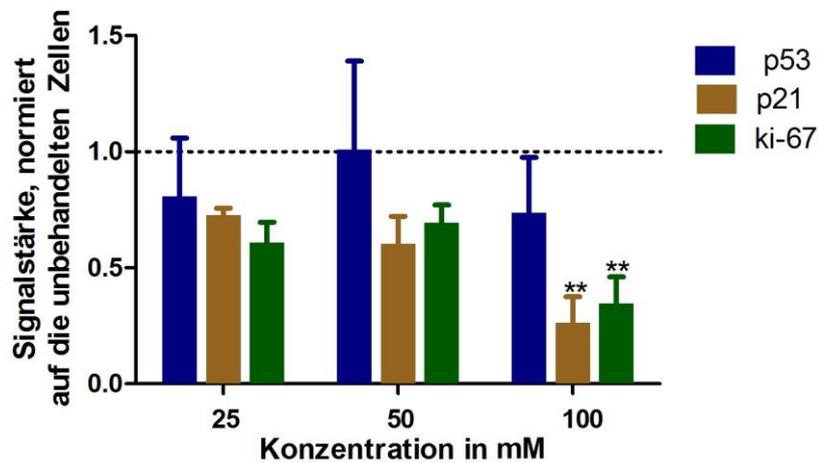
10 oben: Ergebnisse des Western Blot für Huh-7 nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h; die Werte von p53 und ki-67 wurden durch Normierung an densitometrisch ermittelten Werten von GAPDH gewonnen und außerdem auf den Wert der unbehandelten Zellen normiert.

unten: Repräsentative Darstellung der Proteinexpression von p53, ki-67 und GAPDH.

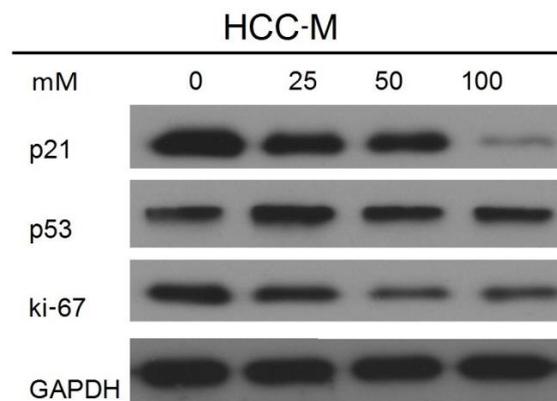
\*:  $p < 0,05$

15 N: 3, n: 12

Die Zelllinie Huh-7 zeigt nur durch die Veränderung der Expression bei p53 eine Reaktion auf die Behandlung mit Spironolacton, die sich in der 1,8-fachen Expression des Proteins darstellt.



5



**Abb. 39: Ergebnisse des Western Blot für HCC-M nach Behandlung mit Spironolacton für 24 h**

oben: Ergebnisse des Western Blot für HCC-M nach Behandlung mit Spironolacton für 24 h; die Werte von p21, p53 und ki-67 wurden durch Normierung an densitometrisch ermittelten Werten von GAPDH gewonnen und außerdem auf den Wert der unbehandelten Zellen normiert.

unten: Repräsentative Darstellung der Proteinexpression von p21, p53, ki-67 und GAPDH.

\*\* :  $p < 0,0089$

N: 3, n: 12

15

Abbildung 39 zeigt die Veränderungen in den Proteinbanden von ki-67 und p21 bei der Zelllinie HCC-M nach Behandlung mit Spironolacton. Hier fiel zum einen die Abnahme

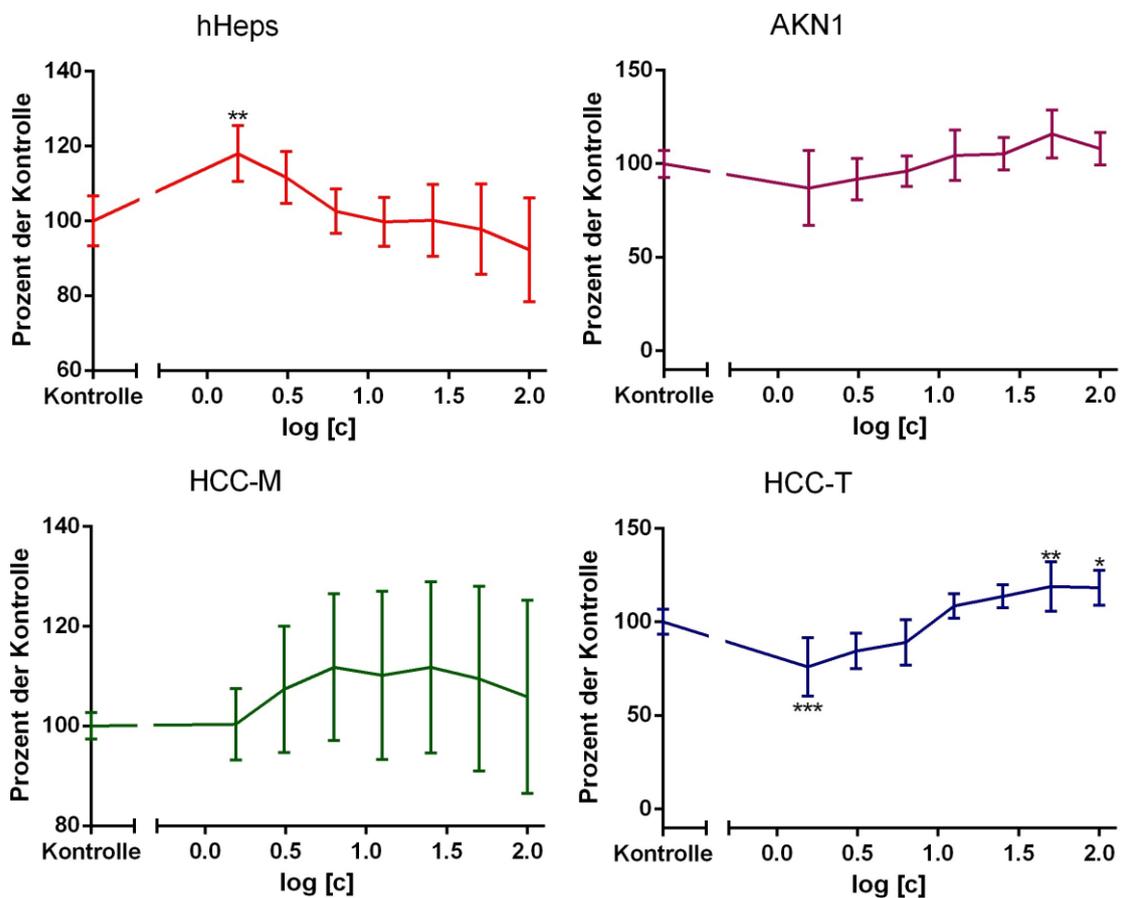
von ki-67 auf ein Drittel des Ausgangswertes bei 100 mM auf, wobei es bei einer Konzentration von 50 mM zu einem leichten Anstieg der Expression kam. Zum anderen konnte ein stetiger Abfall der p21-Expression beobachtet werden, der bei einer Konzentration von 100 mM 25 % des Grundwertes betrug.

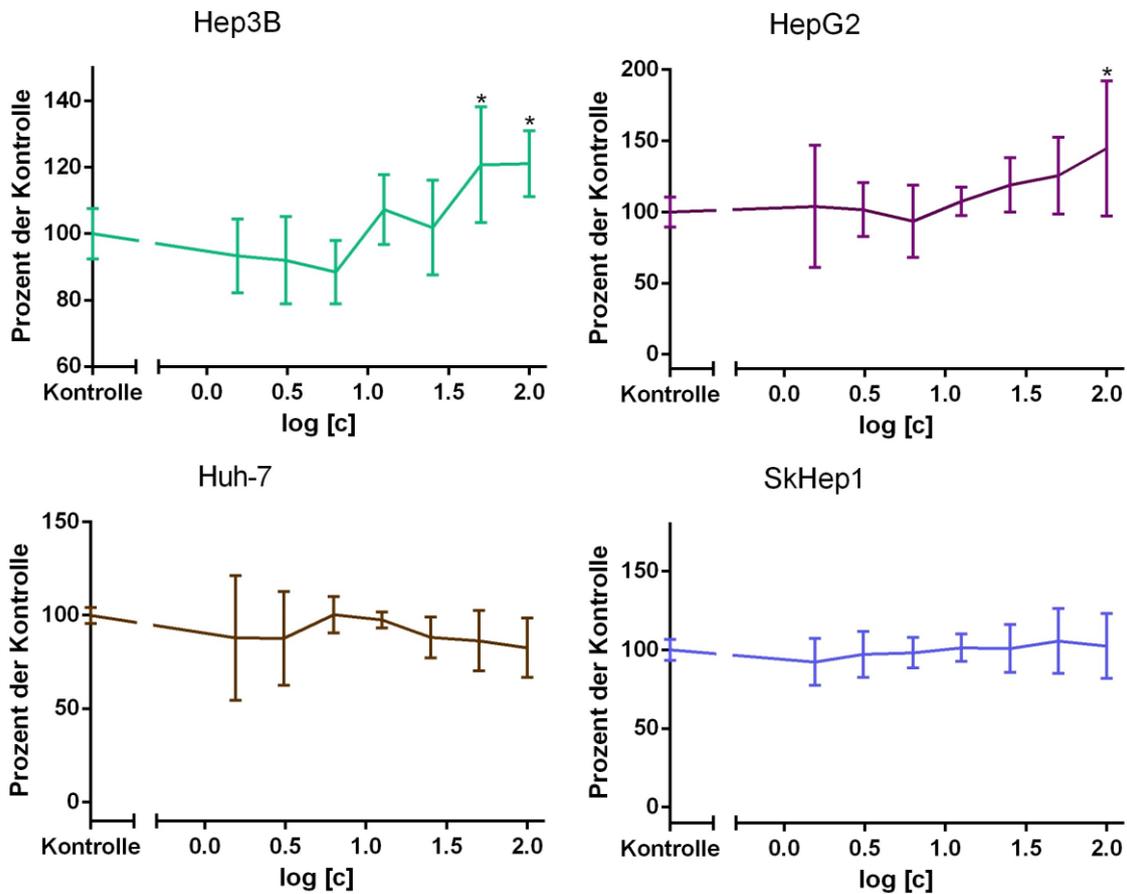
5

### 5.3 Furosemid

#### 5.3.1 Viabilitätsmessung - Zunahme bestimmter Hepatomazelllinien

10





**Abb. 40: Proliferationsverhalten nach Behandlung mit Furosemid**

Dargestellt ist der Anteil metabolisch aktiver Zellen nach Behandlung der Zellen mit Furosemid über 24 h.

\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,0089$

N: 3; n: 9

5

Es konnte keine signifikante Wirkung von Furosemid auf die Zelllinien HCC-M, SkHep1, Huh-7, AKN1 und die humanen Hepatozyten festgestellt werden. Für HCC-T, Hep3B und HepG2 wurde eine signifikante Zunahme der aktiven Zellzahlen um bis zu 45 % aufgezeichnet.

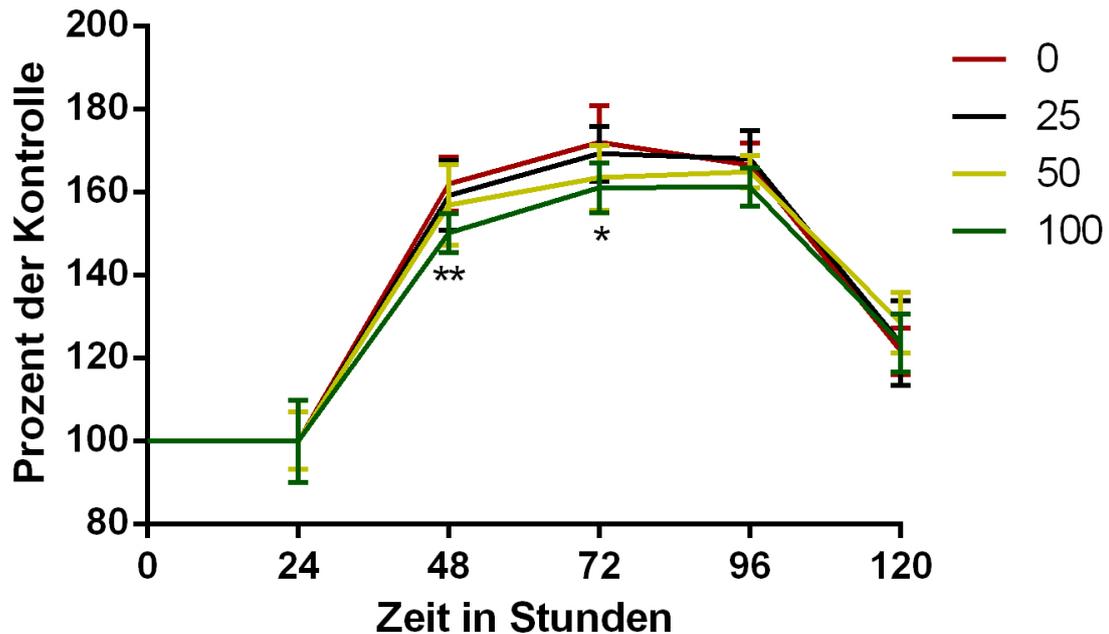
10

### 5.3.2 Proliferationstest

Um eine mögliche proliferationsfördernde Wirkung von Furosemid zu untersuchen, wurden die Zelllinien auf jeweils fünf 96-Well-Zellkulturplatten kultiviert und mit den höchsten drei Konzentrationen (25, 50 und 100 mM) inkubiert. Die Fluoreszenz wurde in

Abständen von 24 h gemessen und die Ergebnisse zur unbehandelten Kontrolle von Tag 1 normiert.

### 5.3.2.1 AKN1 – keine proliferationsfördernde Wirkung



5

**Abb. 41: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung von AKN1 nach Behandlung mit Furosemid über 120 h**  
Gemessen wurde alle 24 h, nachdem die Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen (25, 50 und 100 mM) behandelt wurden, wobei die Signifikanz an den einzelnen Tagen zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen berechnet wurde.

10 \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,0089$  für die Konzentration von 100 mM

N: 3; n: 9

Wie Abbildung 41 darstellt, zeigte sich bei AKN1 kein Hinweis auf eine proliferationsfördernde Wirkung von Furosemid. Im Gegenteil nahm die Zahl der metabolisch aktiven Zellen bei den Zellen mit der höchsten Konzentration im Vergleich zu den unbehandelten signifikant weniger zu. Vor allem nach 48 und 72 h zeigte sich eine deutliche Differenz von ca. 10 %, wobei sich diese nach 120 h fast wieder ausglich.

15

## 5.3.2.2 HCC-M – keine proliferationsfördernde Wirkung

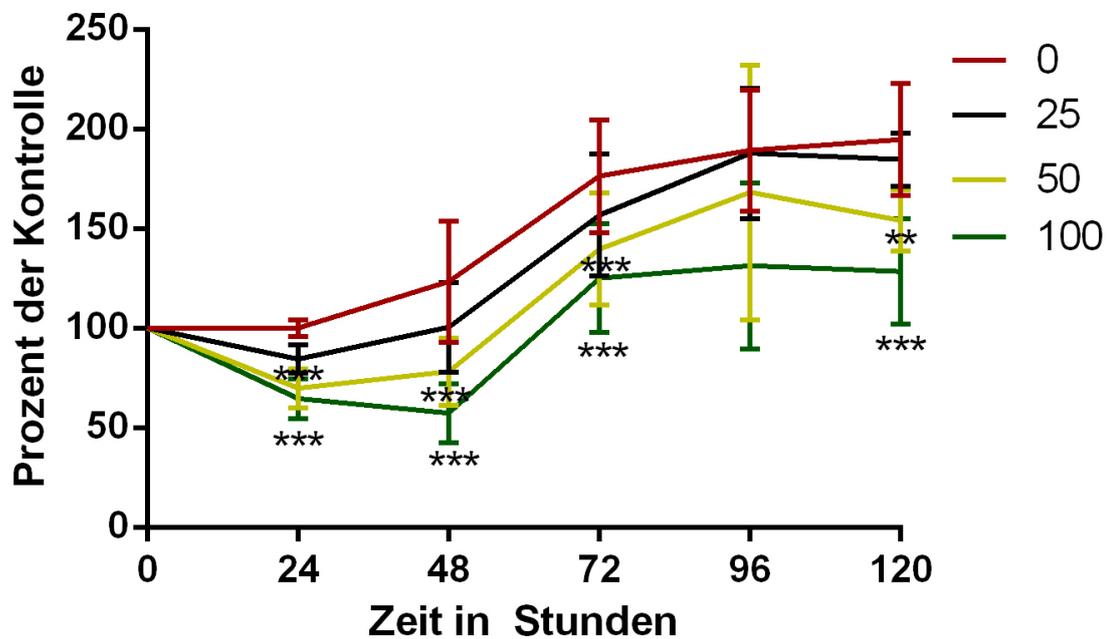


Abb. 42: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung von HCC-M nach Behandlung mit Furosemid über 120 h

- 5 Gemessen wurde alle 24 h, nachdem die Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen (25, 50 und 100 mM) behandelt wurden, wobei die Signifikanz an den einzelnen Tagen zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen berechnet wurde.

\*\* :  $p < 0,0089$ ; \*\*\* :  $p < 0,0001$  für die Konzentration von 100 mM

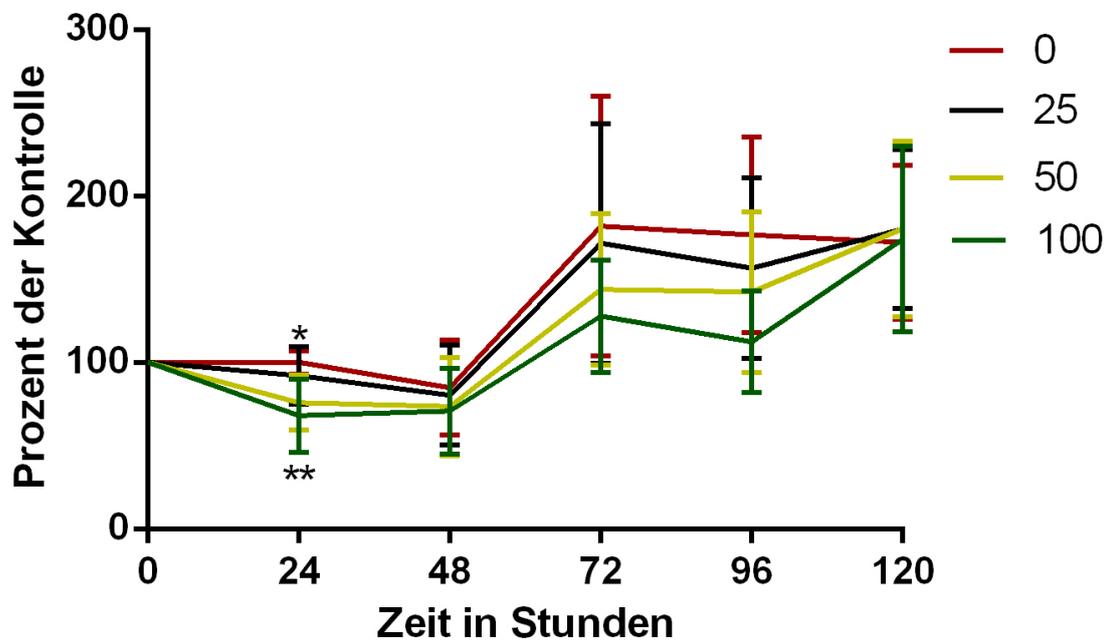
N: 3; n: 9

10

Auch bei HCC-M gab es keinen Hinweis auf eine proliferationsfördernde Wirkung von Furosemid. Im Gegenteil dazu ließ sich feststellen, dass mit einer höheren Konzentration die Zahl der metabolisch aktiven Zellen abnahm. In Abbildung 42 ist klar erkennbar, dass die unbehandelten Zellen im Gegensatz zu den mit Furosemid behandelten Zellen einen deutlicheren Anstieg der Zellzahl verzeichnen konnten. Schon ab 24 h war diese Tendenz zu erkennen, wobei sie nach einer kleinen Regression nach 96 h bis zum Untersuchungsende weiterhin so verlief, so dass nach 120 h die Versuchsreihe mit 100 mM Furosemid bis zu 66 % weniger metabolisch aktive Zellen vorwies.

15

## 5.3.2.3 HCC-T – keine proliferationsfördernde Wirkung



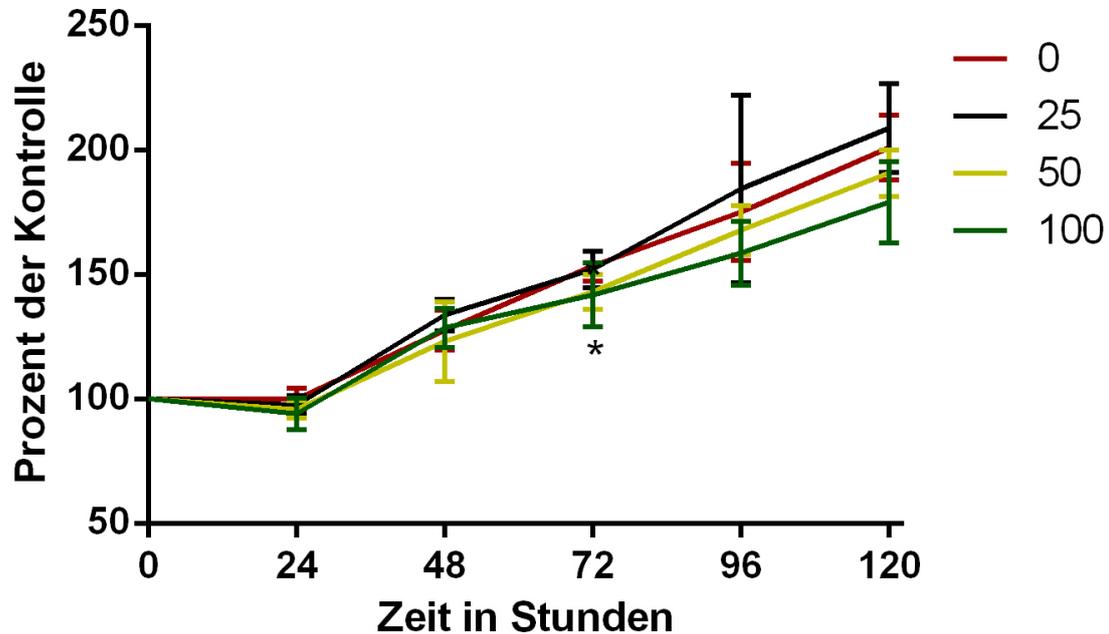
**Abb. 43: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung von HCC-T nach Behandlung mit Furosemid über 120 h**  
 Gemessen wurde alle 24 h, nachdem die Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen (25, 50 und 100 mM) behandelt wurden, wobei die Signifikanz an den einzelnen Tagen zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen berechnet wurde.

\*:  $p < 0,05$  für die Konzentration von 50 mM; \*\*:  $p < 0,0089$  für die Konzentration von 100 mM

N: 3; n: 9

- 10 Abbildung 43 zeigt die Ergebnisse der Viabilitätsbestimmung für HCC-T. Die einzigen signifikanten Unterschiede zwischen den Konzentrationen waren nach 24 h erkennbar, wobei sich die mit 100 mM behandelten Zellen um 32 % weniger metabolisch aktiv zeigten. Diese Tendenz konnte bis zur Messung nach 96 h beobachtet werden, während sich die Zellzahl nach 120 h bei allen Konzentrationen als gleich herausstellte, sodass eine
- 15 proliferationsfördernde Wirkung von Furosemid auf HCC-T ausgeschlossen werden konnte.

## 5.3.2.4 Hep3B – keine proliferationsfördernde Wirkung



**Abb. 44: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung von Hep3B nach Behandlung mit Furosemid über 120 h**

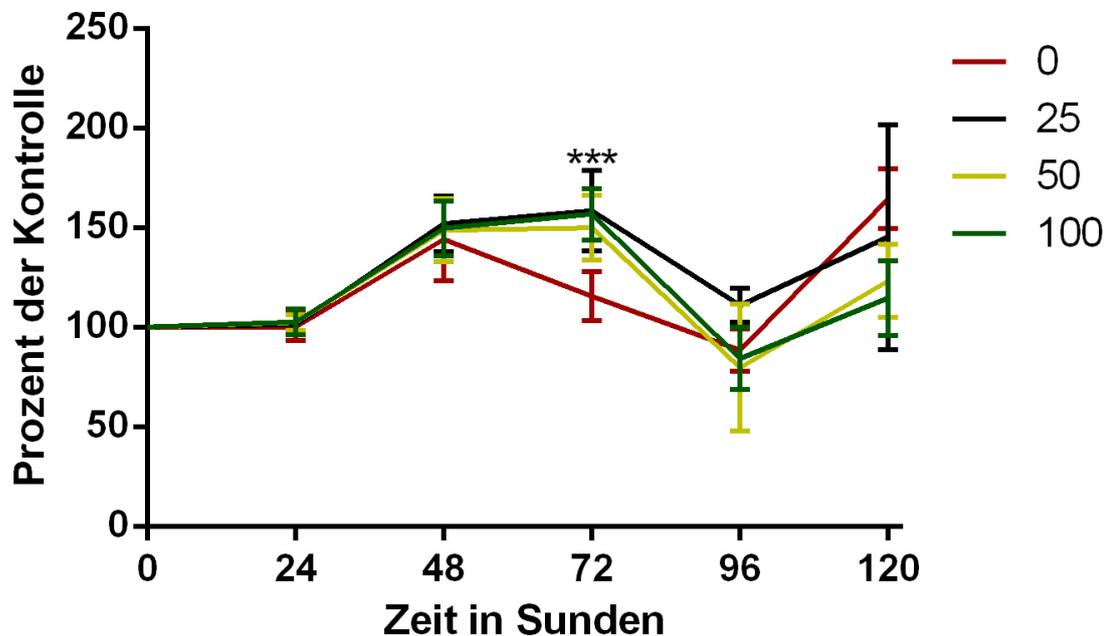
Gemessen wurde alle 24 h, nachdem die Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen (25, 50 und 100 mM) behandelt wurden, wobei die Signifikanz an den einzelnen Tagen zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen berechnet wurde.

\*:  $p < 0,05$  für die Konzentration von 100 mM

N: 3; n: 9

- 10 Während der 120-stündigen Untersuchungszeit wurde nur nach 72 und 120 h eine minimale Veränderung festgestellt, bei der es sich um einen Abfall der aktiven Zellzahl bei den mit 100 mM behandelten Zellen um 12 bzw. 21 % handelte. Auch hier konnte eine proliferationsfördernde Wirkung ausgeschlossen werden.

## 5.3.2.5 HepG2 – keine proliferationsfördernde Wirkung



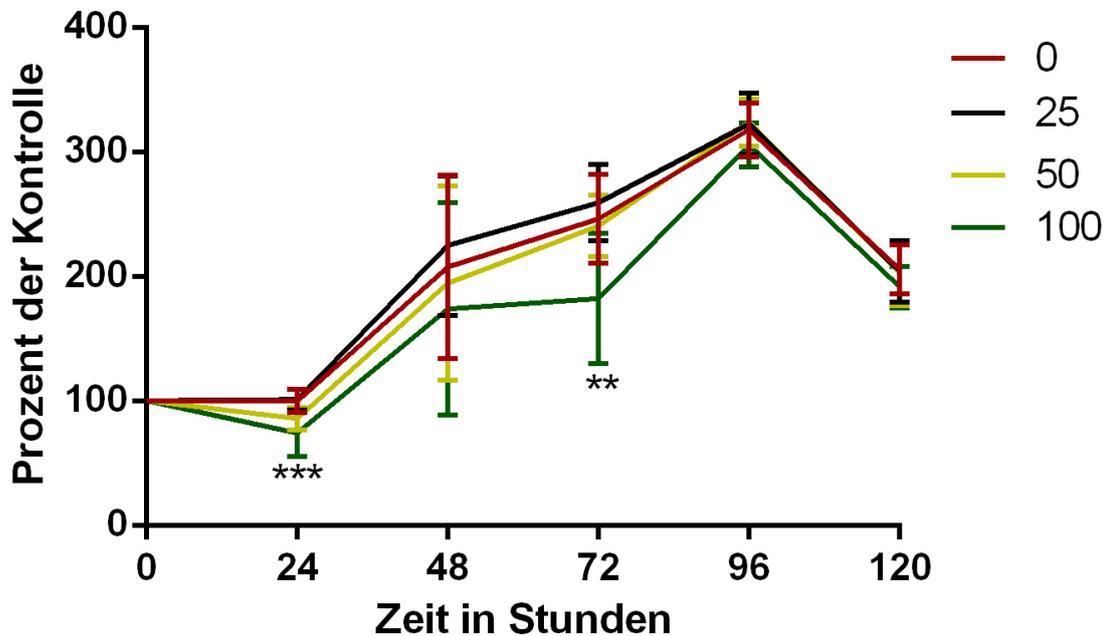
**Abb. 45: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung von HepG2 nach Behandlung mit Furosemid über 120 h**  
Gemessen wurde alle 24 h, nachdem die Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen (25, 50 und 100 mM) behandelt wurden, wobei die Signifikanz an den einzelnen Tagen zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen berechnet wurde.

\*\*\*:  $p < 0,0001$  für die Konzentration von 100 mM

N: 3; n: 9

- 10 Wie auch die anderen Zelllinien zuvor, zeigte HepG2 nur eine geringe Reaktion auf die Behandlung mit Furosemid. Nach 72 h war ab einer Konzentration von 25 mM eine deutliche Zunahme der aktiven Zellen um 40 % zu erkennen, wobei diese Erhöhung 24 h später nicht mehr zu finden war und die aktive Zellzahl nach 120 h bei 100 mM sogar 50 % niedriger war als bei den unbehandelten Zellen.

## 5.3.2.6 Huh-7 – keine proliferationsfördernde Wirkung



**Abb. 46: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung von Huh-7 nach Behandlung mit Furosemid über 120 h**

Gemessen wurde alle 24 h, nachdem die Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen (25, 50 und 100 mM) behandelt wurden, wobei die Signifikanz an den einzelnen Tagen zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen berechnet wurde.

\*\* $p < 0,0089$ ; \*\*\* $p < 0,0001$  für die Konzentration von 100 mM

N: 3; n: 9

- 10 Wie Abbildung 46 zeigt, fand sich nur nach 24 und 72 h eine signifikante Veränderung, die sich in der Abnahme der metabolisch aktiven Zellen bei einer Konzentration von 100 mM um 25 bzw. 65 % darstellte. Nach 96 h waren keinerlei Unterschiede zwischen den Reihen mehr messbar. Diese Entwicklung setzte sich auch nach 120 h in geringerem Maß fort, so dass eine proliferationsfördernde Wirkung ausgeschlossen werden konnte.

## 5.3.2.7 SkHep1 – leichte Proliferationsförderung messbar

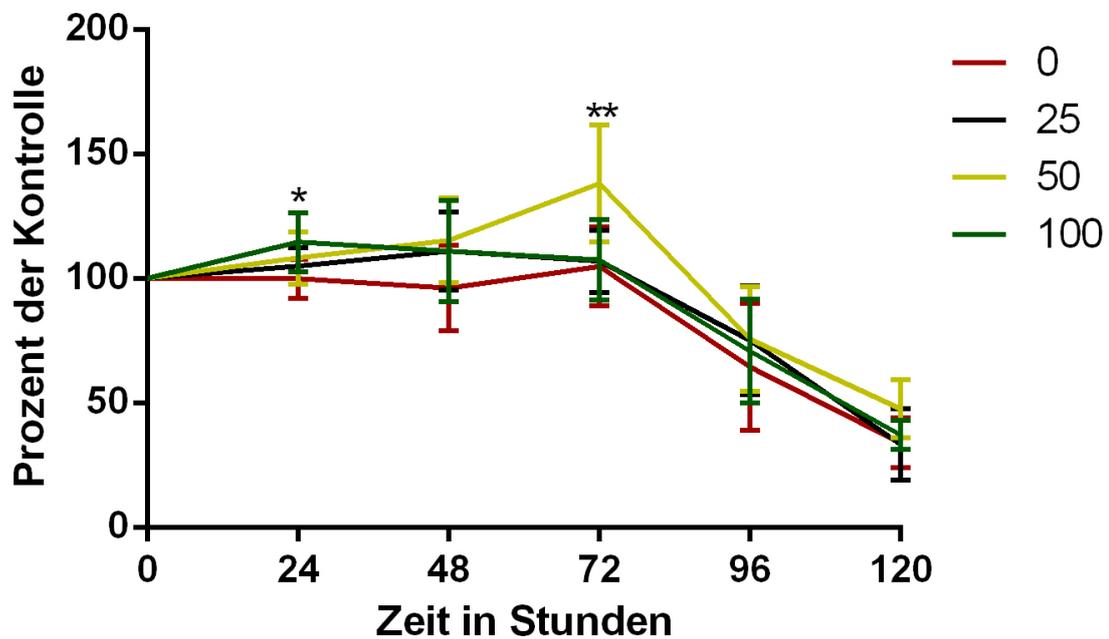


Abb. 47: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung von SkHep1 nach Behandlung mit Furosemid über 120 h

5 Gemessen wurde alle 24 h, nachdem die Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen (25, 50 und 100 mM) behandelt wurden, wobei die Signifikanz an den einzelnen Tagen zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen berechnet wurde.

\*:  $p < 0,05$  für die Konzentration von 100 mM; \*\*:  $p < 0,0089$  für die Konzentration von 50 mM

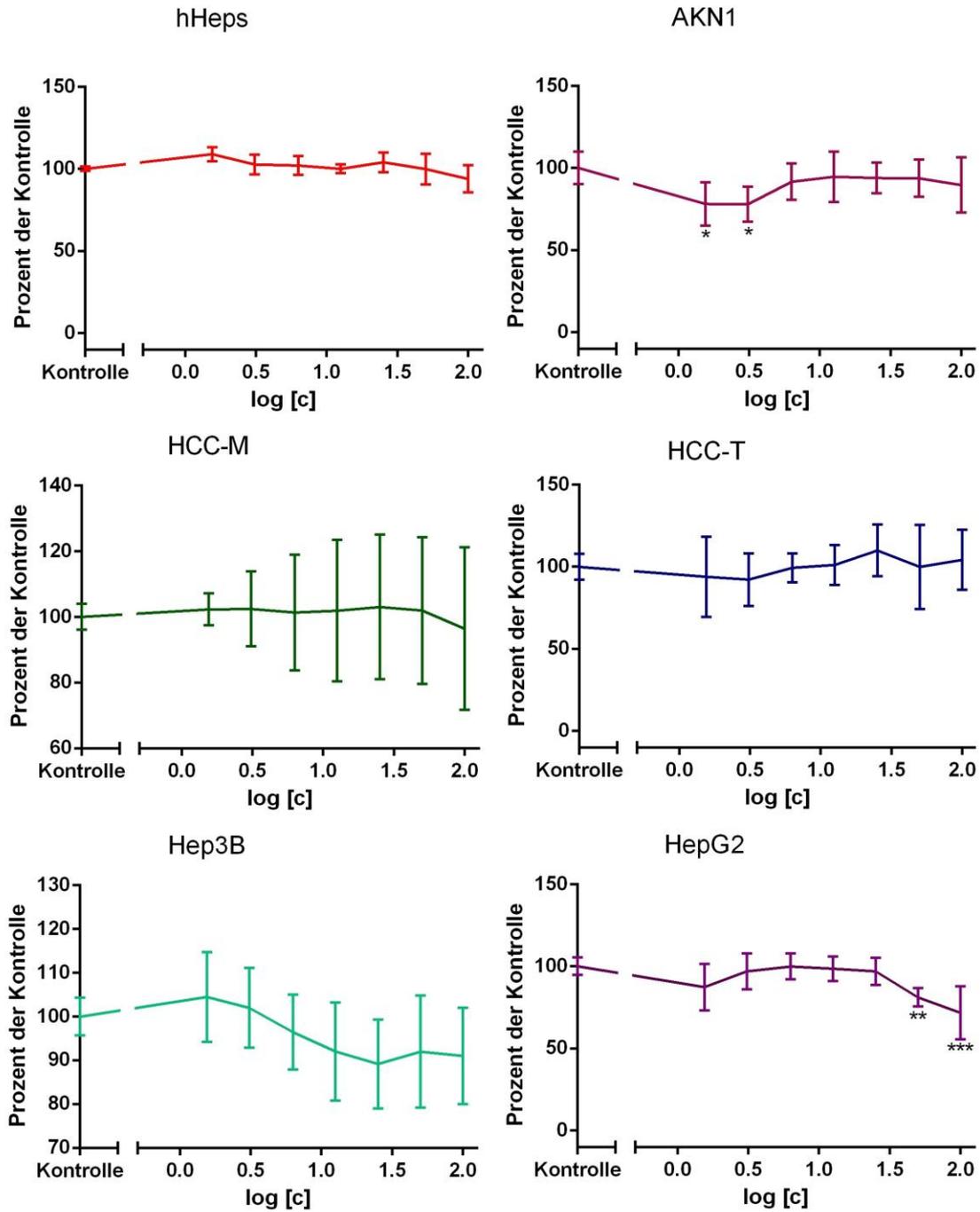
N: 3; n: 9

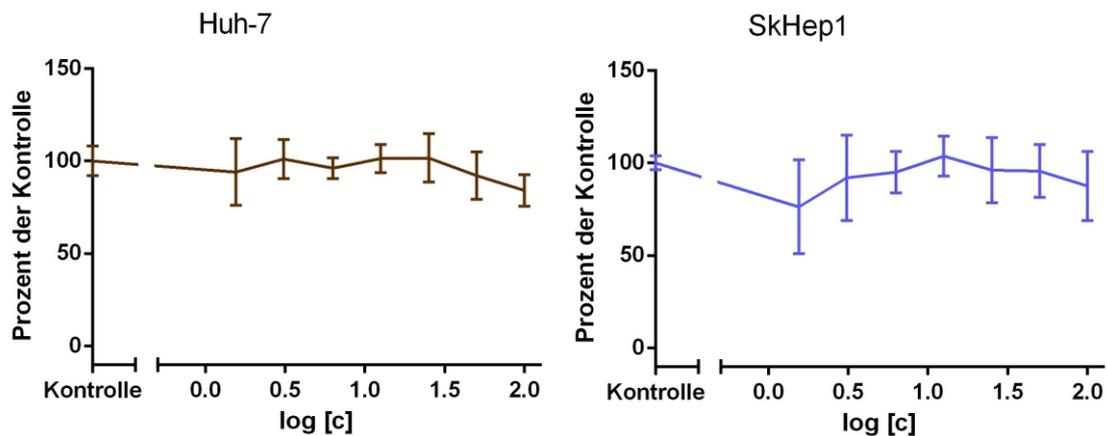
10

Bei SkHep1 ließ sich vor allem bei der Konzentration 50 mM eine Tendenz zur Proliferationsförderung feststellen. Allerdings erwies sich diese Veränderung in der Zahl metabolisch aktiver Zellen nur nach 24 und 72 h als signifikant. Dabei handelte es sich um einen Anstieg von 15 bzw. 33 %, der nach 120 h nach einer kleinen Regression mit 13 %

15 endete. In Abbildung 47 wird diese tendenzielle Förderung dargestellt, wobei beachtet werden muss, dass die allgemeine Zellzahl mit der Zeit deutlich um bis zu 60 % abnahm.

5.4 Metoprolol – keine signifikante Viabilitätsbeeinflussung





**Abb. 48: Proliferationsverhalten nach Behandlung mit Metoprolol**

Dargestellt ist der Anteil metabolisch aktiver Zellen nach Behandlung der Zellen mit Metoprolol über 24 h.

\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,0089$ ; \*\*\*:  $p < 0,0001$

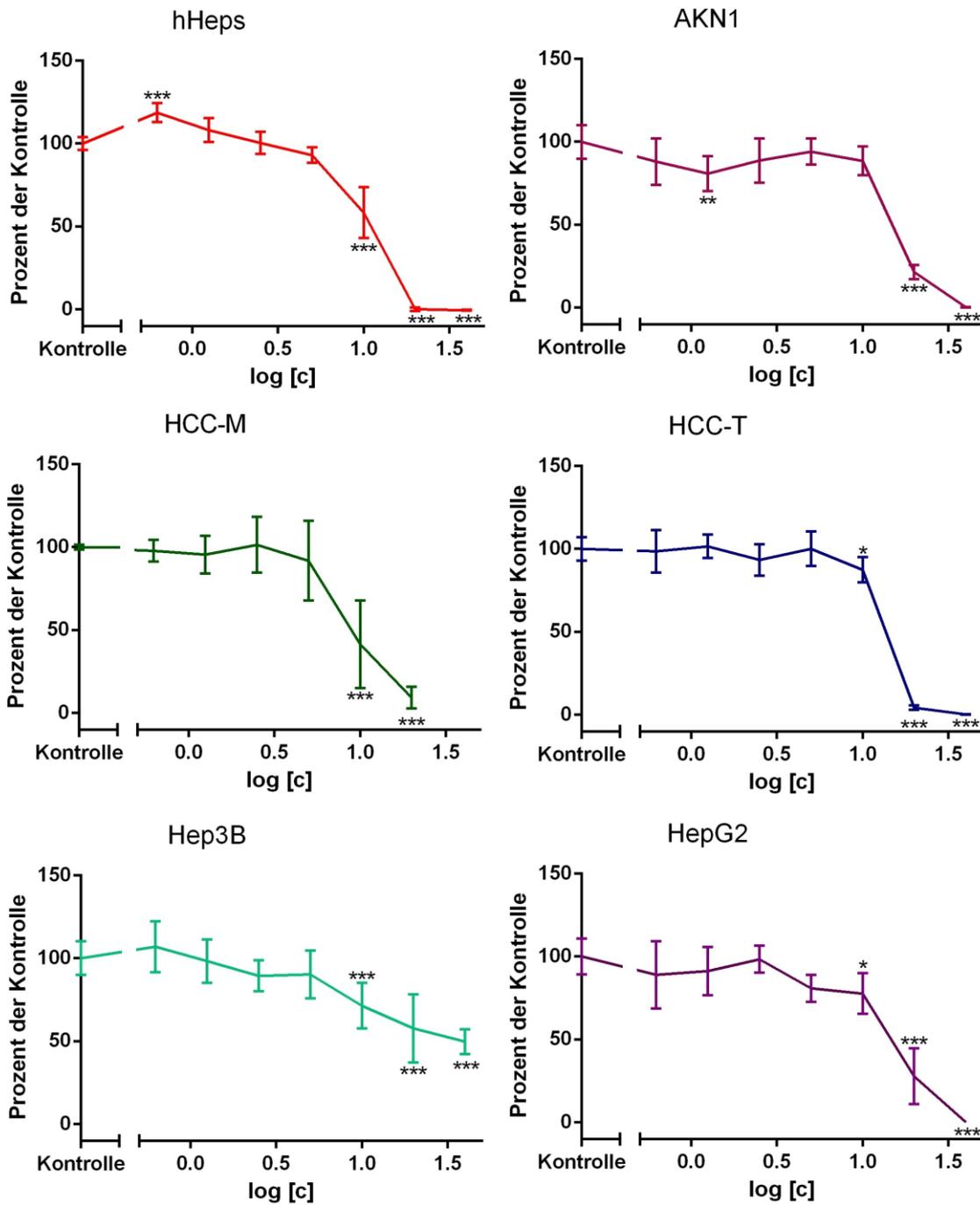
5 N: 3; n: 9

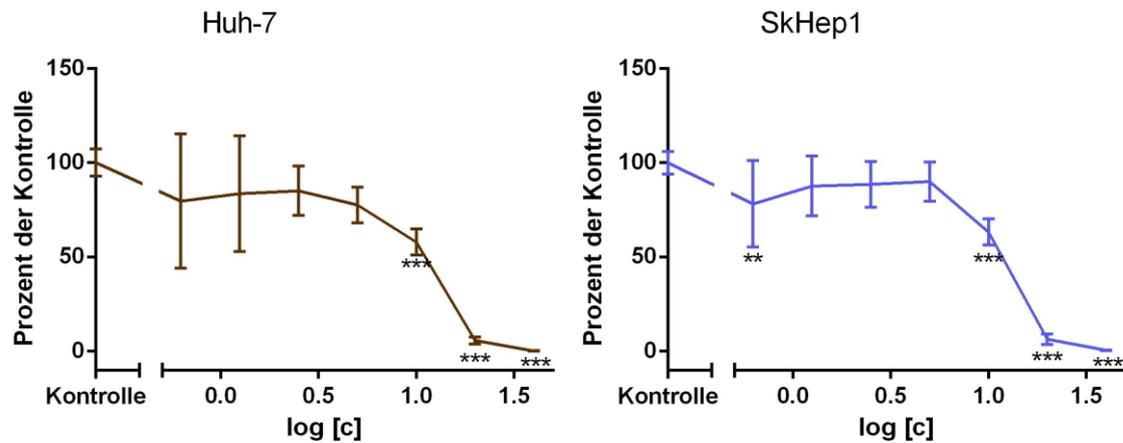
Metoprolol zeigte nur auf HepG2 eine signifikante Wirkung, die ab einer Konzentration von 50 mM aus einer leichten Abnahme der metabolisch aktiven Zellen auf ca. 70 % bestand. Bei allen anderen Hepatomazelllinien sowie den humanen Hepatozyten war keine

10 Veränderung festzustellen.

Deshalb wurde auf die weitere Untersuchung der Wirkung von Metoprolol auf die Lebertumorzelllinien verzichtet.

### 5.5 Propranolol - Abnahme der Viabilität der Hepatomazellen und der humanen Hepatozyten





**Abb. 49: Proliferationsverhalten nach Behandlung mit Propranolol**

Dargestellt ist der Anteil metabolisch aktiver Zellen nach Behandlung der Zellen mit Propranolol über 24 h.

5 \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,0089$ ; \*\*\*:  $p < 0,0001$

N: 3; n: 9

Alle Zelllinien einschließlich der humanen Hepatozyten zeigten ab einer Konzentration von 10 mM einen deutlichen Abfall der aktiven Zellzahl um bis zu fast 100 %. Einzig bei Hep3B ließ sich nur eine Abnahme auf maximal 50 % feststellen.

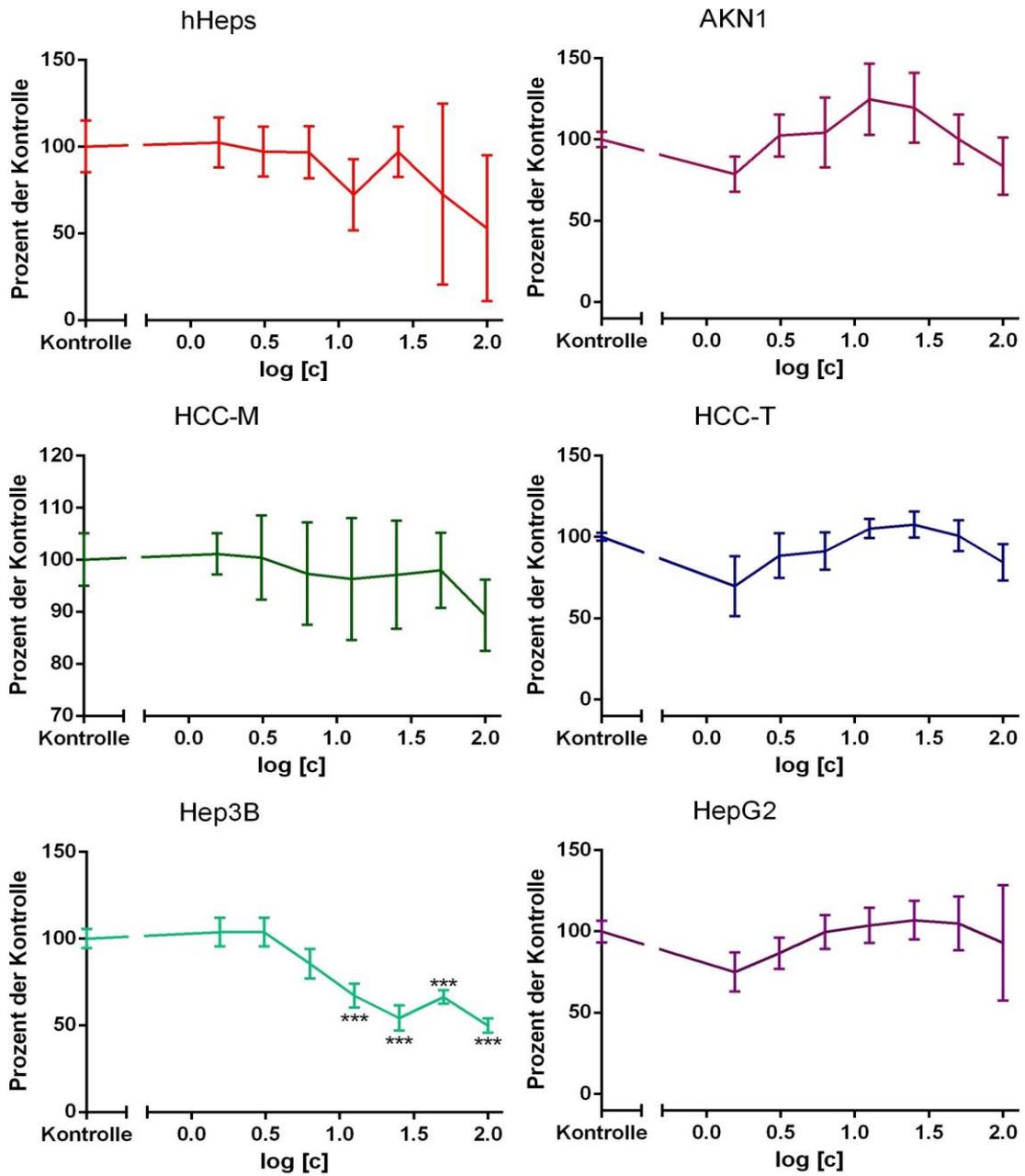
**Tabelle 12: Propranolol - Konzentrationen, ab denen die Viabilität auf 50 % sinkt**

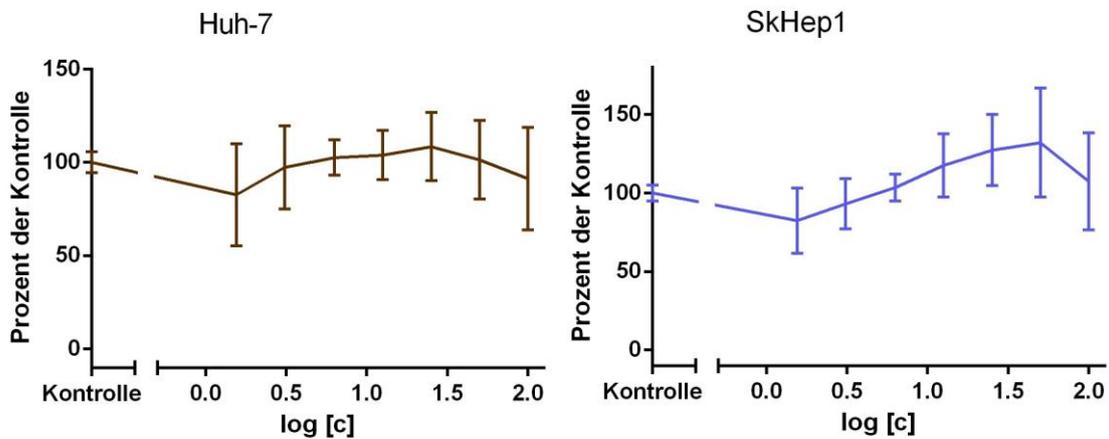
Zelllinie	EC <sub>50</sub>	Zelllinie	EC <sub>50</sub>
AKN1	17,02 mM	HepG2	16,55 mM
HCC-M	17,82 mM	Huh-7	11,84 mM
HCC-T	13,11 mM	SkHep1	11,85 mM
Hep3B	10,22 mM	hHeps	10,51 mM

15 Da die humanen Hepatozyten ähnlich auf Propranolol reagierten wie die Hepatomazelllinien, wurde die Wirkung nicht weiterverfolgt.

**5.6 Captopril - keine signifikante Viabilitätsbeeinflussung**

5





**Abb. 50: Proliferationsverhalten nach Behandlung mit Captopril**

Dargestellt ist der Anteil metabolisch aktiver Zellen nach Behandlung der Zellen mit Captopril über 24 h.

5 \*\*\*:  $p < 0,0001$

N: 3; n: 9

Captopril zeigte bei den Zelllinien HepG2, Huh-7, HCC-M und HCC-T erst ab einer Konzentration von 100 mM eine Wirkung, die aus einer leichten Abnahme der aktiven Zellzahl um ca. 10 % bestand. Bei AKN1 und SkHep1 hingegen kam es erst zu einem leichten Anstieg von ungefähr 30 %, bis die Zellzahl bei 100 mM jedoch wieder auf die ursprüngliche Zellzahl abfiel. Keines der bisher beschriebenen Ergebnisse war signifikant, wohingegen sich der bei Hep3B und den humanen Hepatozyten zu beobachtende Abfall um ungefähr 50 % der Zellen als signifikant erwies.

15

Da die humanen Hepatozyten aber ähnlich auf Captopril reagierten wie Hep3B, wurde Captopril nicht weiter untersucht.

## 6 Diskussion

In dieser Studie wurde die Wirkung verschiedener Antihypertensiva auf Lebertumorzellen und humane Hepatozyten untersucht. Von besonderem Interesse waren dabei die Veränderungen der proliferativen Eigenschaften der Zellen nach Stimulation mit den Antihypertensiva.

Die Höhe des Blutdrucks ist ein wichtiger Indikator und Risikofaktor für später auftretende Zwischenfälle, wie zum Beispiel ein Schlaganfall oder Myokardinfarkt. Aus diesem Grund ist es wichtig, darauf zu achten, bei jedem Patienten den Blutdruck individuell auf den richtigen Zielwert einzustellen. Die physiologische Regulation des Blutdrucks wird langfristig über die Veränderung des Blutvolumens und kurzfristig über die Umstellung des peripheren Widerstandes und der Herzfrequenz geregelt. Die wichtigsten Organe stellen hierfür die Nieren mittels des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und das Herz durch die Beeinflussung der Schlagfrequenz und des Schlagvolumens und die Widerstandsgefäße dar. Im Falle einer fehlgeschlagenen körpereigenen Regulation, können Antihypertensiva eingesetzt werden, um das gesteigerte Risiko von Herzinfarkten und Schlaganfällen zu senken. Diese modifizieren die oben genannten körpereigenen Mechanismen, um den Zielblutdruck wiederherzustellen. Bei diesen Medikamenten unterscheidet man zwischen verschiedenen Substanzgruppen, die wiederum an unterschiedlichen Stellen im Körper eingreifen. In dieser Studie wurden Kalziumkanalblocker (Amlodipin), ACE-Hemmer (Captopril), Schleifendiuretika (Furosemid), Betablocker (Metoprolol, Propranolol) und Antagonisten am Aldosteronrezeptor (Spironolacton) eingesetzt. Während Furosemid und Spironolacton mittels direkter Einflussnahme auf die Nieren ihre Wirkung erfüllen, hat Amlodipin einen vasodilatierenden Effekt auf die Widerstandsgefäße. Captopril bewirkt auf Grund seines weitreichenden Einflusses sowohl eine Vasodilatation als auch eine Hemmung der renalen Natrium- und Wasserabsorption. Der genaue, vollständige Wirkmechanismus der Betablocker ist noch ungeklärt, man geht jedoch, neben dem sicheren Einfluss auf die Herzfrequenz und das Schlagvolumen, von einer zusätzlichen Verringerung der

Reninsekretion aus. Neben dem Einsatz der Antihypertensiva bei Bluthochdruck finden sie auch, je nach Wirkmechanismus, Verwendung bei anderen Erkrankungen. So können zum Beispiel Captopril bei einer Herzinsuffizienz und einem vorangegangenen Myokardinfarkt, Furosemid bei Aszites und Spironolacton bei einem sekundären 5 Hyperaldosteronismus eingesetzt werden [Baumann et al. 2010].

Trotz dieser weiträumigen Einsatzgebiete sollte nicht vergessen werden, dass die Zahl der Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen immer weiter steigt und Antihypertensiva deshalb immer häufiger verschrieben werden müssen. Nachdem die unerwünschten 10 Nebenwirkungen ausgiebig untersucht wurden, richtet die Forschung inzwischen mehr und mehr ihr Augenmerk auf mögliche weitere Wirkungen, um das Einsatzspektrum dieser Medikamentengruppe zu erweitern.

In dieser Studie sollte deshalb herausgefunden werden, welchen Einfluss die oben 15 genannten Antihypertensiva auf humane Hepatozyten und Lebertumorzellen besitzen. Zuerst wurde deshalb die zytotoxische Wirkung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Zahl der metabolisch aktiven humanen Hepatozyten bei den Medikamenten Captopril, Propranolol und Spironolacton negativ beeinflusst wurde. Vor allem bei Propranolol war der starke, schon bei geringen Konzentrationen beginnende Abfall auffällig und gänzlich 20 unerwartet. Diese Ergebnisse widersprechen denen aus einer vorangegangenen Studie, in der gar ein protektiver Effekt derselben Antihypertensiva bewiesen werden konnte [Ehnert et al. 2013]. Dort konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Medikamente, außer Furosemid, in geringeren Konzentrationen einen durch Ethanol und rhTGF- $\beta_1$  bewirkten möglichen Zellschaden verringern und die humanen Hepatozyten schützen.

25

Bei Betrachtung der Wirkung auf die Hepatomazelllinien fiel auf, dass vor allem Amlodipin, Propranolol und Spironolacton bei steigender Konzentration einen zytotoxischen Einfluss auf alle verwendeten Lebertumorzellen haben. Da der negative Einfluss von Propranolol auf humane Hepatozyten jedoch in dieser Arbeit schon ab 30 niedrigen Konzentrationen so deutlich zu Tage trat, wurde auf eine weitere Untersuchung dieses Medikamentes verzichtet.

Ein Effekt der Blutdruckregulatoren auf Hepatomazelllinien ist zur Zeit in der Literatur nicht zu finden, jedoch gibt es mehrere Studien, in denen eine proliferationsinhibierende Wirkung der Antihypertensiva auf andere Tumorarten beschrieben wird.

- 5 Sowohl in Tierversuchen als auch in vitro an menschlichen Zellen konnte die Beeinflussung von Pankreastumoren durch Betablocker bewiesen werden. Im Tierversuch sank die Expression von VEGF, EGF und des  $\alpha 7$ -nAcetylCholin-Rezeptors, die in Tumorzellen vermehrt zu finden ist, unter Behandlung von Propranolol wieder auf normale Werte, wodurch die Entstehung und Proliferation der Tumorzelllinien verhindert wird [Al-Wadei et al. 2009]. In einer weiteren Studie zeigte sich in vitro, dass der unselektive Betablocker Propranolol im Gegensatz zum  $\beta_1$ -selektiven Metaprolol eine weitaus stärkere Proliferationsinhibition der humanen Pankreastumorzelllinien MIA PaCa-2 und BxPC-3 hervorrufen [Zhang et al. 2010]. Auch für ACE-Hemmer und Angiotensin II-Subtyp I-Rezeptorblocker ließ sich ein proliferationshemmender Effekt auf Pankreastumoren in Tierversuchen nachweisen, wobei primär bei Anwendung dieser Medikamente gleichzeitig weniger Tumore entstanden [Sakurai et al. 2011]. Diese Studien bewiesen eine proliferationshemmende Wirkung der Medikamente bei anderen Tumoren. In der vorliegenden Arbeit konnte nun auch ein solcher Effekt bei Hepatomazelllinien gezeigt werden. Des Weiteren konnte in einer Studie aus dem Jahr 2008 bewiesen werden, dass sowohl ACE-Hemmer als auch Angiotensin I-Blocker bei Mäusen einen protektiven Effekt im Bezug auf die Bildung einer Leberfibrose haben [Toblli et al. 2008]. Dies widerspricht wiederum den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da bei Captopril vor allem bei höheren Konzentrationen tendenziell eher eine Schädigung der humanen Hepatozyten zu beobachten war. Grund hierfür könnte der Unterschied zwischen humanen Hepatozyten und denen von Mäusen sein. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit nur der direkte Effekt auf die Leberzellen untersucht, weswegen eine Aussage über eine mögliche protektive Wirkung gegenüber einer Leberfibrose nicht möglich ist.

- Um die Art und den Grund der Proliferationshemmung zu untersuchen, wurden die Zelllinien im nächsten Schritt ein weiteres Mal mit den Medikamenten stimuliert, damit nach 24 h Inkubationszeit die LDH-Freisetzung zur Unterscheidung eines

Zellzyklusarrests und eines Zelluntergangs gemessen werden konnte. Auf Grund der vorherigen Ergebnisse wurden nur noch Amlodipin und Spironolacton weiter untersucht. Die hierbei entstandenen Resultate legten die weitere Vorgehensweise fest. Bei einer erhöhten LDH-Freisetzung kann von einem Zellverlust, entweder einer Apoptose oder einer Nekrose, ausgegangen werden, wohingegen eine gleichbleibende LDH-Freisetzung auf einen Wachstumsarrest durch veränderte Proteinexpression hinweist. Sterbende Zellen setzen ihren gesamten Zellinhalt frei, unabhängig von der Art des Unterganges, ob es sich nun um eine Nekrose oder einen programmierten Zelltod, eine Apoptose, handelt [Wyllie 2010]. Da es sich bei der Lactatdehydrogenase um ein wichtiges Enzym des Stoffwechsels handelt, ist es in jeder Zelle vorhanden [Rassow et al. 2012]. Aus diesem Grund ist eine erhöhte Freisetzung von LDH ein sicheres Zeichen für sterbende Zellen, während sich das LDH-Level bei Zellzyklusarrest nicht verändert. So wurde die Zelllinie SkHep1 für beide Medikamente und HCC-T bei Amlodipin wegen der erhöhten LDH-Freisetzung auf die Ursache des Zelluntergangs untersucht, während die restlichen Zelllinien in Hinblick auf eine veränderte Proteinexpression erforscht wurden.

Zur Unterscheidung einer Apoptose von einer Nekrose wurde die Fluorescence-activated-cell-sorting-Analyse durchgeführt. Dabei werden sowohl die Größe als auch die Granularität der Zellen nach Inkubation mit den Medikamenten untersucht. Bei einem programmierten Zelltod, der Apoptose, schrumpft die Zelle und es kommt zur Auflösung der Zelle und dem zügigen Abbau der DNA. Bevor sie in Gang gesetzt werden kann, müssen eine Vielzahl von intra- und extrazellulären Signalen wahrgenommen werden. Dabei kann es sich um Veränderungen in der Temperatur oder dem Sauerstoffgehalt oder um physikalisch-chemische Reize handeln [Wyllie 2010]. Im Gegensatz dazu schwillt die Zelle bei der Nekrose stark an und die DNA wird erst nach Verlust der Membranintegrität zeitversetzt abgebaut [Modrow et al. 2010, Thomas 2006]. Für beide Mechanismen muss eine aufwendige Aktivierungskaskade durchlaufen werden [Portt et al. 2011]. Bei der FACS-Analyse werden fluoreszierende Farbstoffe wie Propidiumiodid verwendet, die an freie Guanin-Cytosin-Basenpaare binden und so über eine Detektion der Fluoreszenzemission die Quantifizierung des DNA-Gehalts ermöglichen [Freshney 2010, Wink 2011]. Hierbei zeigte sich, dass sowohl Amlodipin bei SkHep1 und HCC-T als auch

Spironolacton bei SkHep1 eine Apoptose induzieren. Obwohl auch ein kleiner Teil der Zellen durch eine Nekrose zugrunde ging, kann insgesamt von einer Apoptose gesprochen werden, da auch bei den unbehandelten Zellen eine kleine nekrotische Fraktion nachweisbar war. Diese Apoptoseinduktion wird bestätigt durch eine Studie an humanen Pankreastumorzellen, in der der  $\beta_2$ -selektive Blocker ICI 118551 in Kombination mit Gemcitabine nicht nur eine Proliferationshemmung induzierte, sondern auch die Apoptoserate ansteigen ließ. Als mögliche Erklärung konnte eine verringerte Aktivierung der NF- $\kappa$ B und eine erhöhte Proteinexpression von Bax und Bcl-2, pro-apoptotischer Proteine, festgestellt werden [Shan et al. 2011]. Dies könnte auch auf die in dieser Arbeit untersuchten Hepatomazelllinien HCC-T und SkHep1 zutreffen und sollte deswegen in einer folgenden Studie näher untersucht werden.

Da nicht bei allen Zelllinien ein Zelluntergang für den Proliferationsstopp verantwortlich war, wurde der Mechanismus des Zellzyklusarrests näher untersucht. Nachweislich gibt es mehrere physiologische Substanzen, die mittels einer Proliferationshemmung eine Tumorgößenreduktion bewirken. Für den Östrogenmetaboliten 2-Methoxyestradiol konnte erstmals 1994 eine wachstumshemmende Wirkung auf solide Tumore festgestellt werden [Fotsis et al. 1994]. Inzwischen konnten auch Phase I- und II-Studien zur Erforschung der Wirkung auf solide Tumore, wie Mamma- oder Prostatakarzinomen, durchgeführt werden [James et al. 2006, Dahut et al. 2006, Sweeney et al. 2005]. So konnte ein deutlicher Benefit für Patienten mit hormon-sensiblen Prostatakarzinom nach Behandlung mit 2-Methoxyestradiol im Vergleich zur Placebo-Gruppe nachgewiesen werden [Sweeney et al. 2005]. Auch wurde in einer weiteren Studie eine starke Proliferationshemmung durch einen Östrogenmetaboliten bei hepatozellulären Karzinomen festgestellt. Bei dieser in-vitro-Untersuchung zeigte sich ein deutlicher Anstieg der p53-Expression, der zu einem Zellzyklusarrest führte und apoptoseinduzierend wirkte [Schumacher et al. 2006]. Wie bei der Zelllinie Huh-7 in der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von p53 durch eine verabreichte, physiologische Substanz dahingehen beeinflusst, dass es zu einem Proliferationsstopp kam. Allerdings bewirkte Spironolacton hier keine Apoptoseinduktion, sondern führt im Gegensatz zu 2-Methoxyestradiol zu einer fast 100 % Abnahme der metabolisch aktiven

Zellen. Die erhöhte Expression von p53 gibt Hinweise auf den Mechanismus dieser Wirkung, konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden.

Das Protein p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der bei DNA-Schäden den Zellzyklus in  
5 verschiedenen Phasen des Zellzyklus über unterschiedlichste Mechanismen anhalten kann  
und bei Irreparabilität dieser Schäden zu Apoptose führen kann. Normalerweise wird es  
kurz nach der Synthese über verschiedene Mechanismen aus dem Zellkern, dem Ort seines  
Wirkens, ausgeschleust und abgebaut [Weinberg 2014]. Sollten allerdings DNA-Schäden  
aufgetreten sein, akkumuliert p53 im Zellkern und fördert so die Transkription von  
10 anderen Proteinen (u.a. p21), die wiederum über mehrere Schritte zu einem  
Zellzyklusarrest und Reparatur der Schäden führen [Lowe et al. 2004]. Im Falle einer  
Apoptoseinduktion auf Grund von irreparablen Schäden sammelt sich p53 in den  
Mitochondrien, permeabilisiert deren Membran und löst eine Cytochrom c-Ausschüttung  
aus [Erster et al. 2004]. Je nach Art der Zellen zeigen sich unterschiedliche Reaktionen  
15 zum Anstieg von p53 [Leu et al. 2007]. So reagieren Zellen des Thymus, der Nieren und  
der Hoden wesentlich früher auf den Anstieg des p53 mit einer Apoptose als Leberzellen  
[Erster et al. 2004], bei denen das Protein im Allgemeinen eher einen Zellzyklusarrest  
bewirkt [Ringshausen et al. 2006]. Auch sollte beachtet werden, dass sich in fast 50 % der  
malignen Zellen eine Genmutation im Gen von p53 feststellen lässt, so dass dieses  
20 inaktiviert wird [Aktories et al. 2013]. Ein mutiertes p53 konnte auch bei  
Lebertumorzellen entdeckt werden [Staib et al. 2003], so kommt es bei dieser mutierten  
Form zu einer ungehinderten Proliferation der Tumorzellen. Diese Erkenntnisse könnten  
die Reaktion einiger Zelllinien auf die Medikamente erklären. Beispielsweise kam es nach  
der Behandlung der Hepatomazelllinie Huh-7 mit Spironolacton zu einer um 80 %  
25 erhöhten Expression von p53, diese endete jedoch nicht in einer Apoptoseinduktion.  
Möglicherweise reagiert Huh-7 erst bei höheren p53-Spiegeln mit dem programmierten  
Zelltod. Auch wäre es möglich, dass es sich um ein mutiertes p53 handelt, wobei in  
diesem Fall eine andere Erklärung für den Zellzyklusarrest gefunden werden müsste. Die  
Zelllinien HCC-T und SkHep1, die in dieser Arbeit mit einer Apoptoseinduktion auf die  
30 Medikamente Amlodipin und Spironolacton reagierten, wurden nicht auf die Expression

von p53 untersucht. Es besteht die Möglichkeit, dass der programmierte Zelltod durch einen erhöhten Proteinspiegel ausgelöst wurde.

Natürlich gibt es noch andere Proteine, die Einfluss auf den Zellzyklus nehmen und einen Zellzyklusarrest bewirken können. Aus diesem Grund wurde sowohl die Expression von p21 als auch von ki-67 untersucht. Bei ki-67 handelt es sich allerdings um ein Protein, das in allen aktiven Phasen des Zellzyklus zu finden ist und stellt somit einen Indikator für sich proliferierende Zellen dar [Scholzen et al. 2000]. Da es sich also um einen Proliferationsmarker handelt, wird es in der Klinik oft zur Bestimmung des Therapieerfolges angewandt. Bei Prostata- und Mammakarzinomen wurde die Messung der Konzentration von ki-67 während der Behandlung schon in mehreren Studien als wegweisender Indikator für einen positiven Effekt bewiesen [Urruticoechea et al. 2005].

Ein weiteres, in den Zellzyklus eingreifendes Protein ist p21. Es handelt sich dabei um einen Inhibitor Zyklin-abhängiger Kinasen, das im Falle von DNA-Schäden vermehrt exprimiert wird und den Zellzyklus durch seine inhibitorische Wirkung arrestiert [Weinberg 2014]. Allerdings kann das Protein p21 keine Apoptose einleiten, sondern induziert den Zellzyklusarrest bis die Schäden durch Reparaturmechanismen behoben werden [Abbas et al. 2009]. Trotzdem kann auch eine Repression der p21-Expression eine inhibierende Wirkung auf die Entwicklung von Tumoren haben. Da p21 nicht nur keine Apoptose induzieren kann, sondern diese vielmehr verhindert, kann eine Repression die Möglichkeit einer Apoptoseinduktion durch andere Faktoren erschaffen [Gartel et al. 2005]. In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass die Art der Veränderung der p21-Expression ein wichtiger Faktor für die Prognose des Patienten darstellt. Beispielsweise ist ein vermindertes p21 bei einem kolorektalen Karzinom ein Hinweis auf Lymphknoten- und Lebermetastasen [Zirbes et al. 2000, Mitomi et al. 2005]. Beim Multiplen Myelom deutet eine p21-Lokalisation im Zellkern auf einen schlimmeren Verlauf und Schwere der Krankheit hin [Ohata et al. 2005]. Auch beim hepatozellulären Karzinom wurde die Bedeutung von p21 schon mehrfach untersucht. In niedrig oder mäßig differenzierten Karzinomen wurde eine deutlich höhere Überexpression gefunden [Schoninger-Hekele et al. 2005], bei der sich das Protein hauptsächlich im Zytoplasma,

also nicht an seinem Wirkungsort, akkumuliert [Shiraki et al. 2006]. Niedrig differenzierte Karzinome bedeuten im Normalfall eine schlechtere Prognose und eine kürzere Überlebensdauer.

5 Da die oben beschriebenen Proteine, p21, p53 und ki-67, eine so wichtige Rolle für den Zellzyklus und das Zellüberleben spielen, wurde ihre Expression in der vorliegenden Arbeit nach einer 24 h Inkubation mit Amlodipin und Spironolacton untersucht. Allerdings bewirkte Amlodipin nur bei der Hepatomazelllinie HepG2 eine signifikante Veränderung der Expression von p21. Es handelte sich hierbei um einen Anstieg um das Neunfache, der  
10 den Zellzyklusarrest erklärt. Es konnte jedoch nicht unterschieden werden, ob sich das Protein im Zellkern oder Zytoplasma akkumulierte. Sollte es sich im Zytoplasma gesammelt haben, was bei hepatozellulären Karzinomen schon beobachtet werden konnte [Gartel et al. 2005] und als Zeichen einer schlechten Prognose dient [Schoninger-Hekele et al. 2005], bliebe die Frage des Mechanismus des Zellzyklusarrestes ungeklärt. Dies sollte  
15 in einer weiteren Arbeit näher untersucht werden. Ansonsten ließ sich für das Medikament Amlodipin keine Modifikation der Proteinexpression von p53 oder ki-67 feststellen. Bei Huh-7 wurde in keiner der Versuchsreihen die Expression von p21 untersucht, da diese Zelllinie nachweislich kein p21 exprimiert [Wu et al. 2012]. Spironolacton beeinflusste wiederum auch eine Zelllinie. Bei HCC-M ließ sich sowohl ein Abfall von p21 als auch  
20 von ki-67 nachweisen. Die Verringerung der detektierbaren Menge von ki-67 weist auf eine Verminderung der metabolischen Aktivität und somit auf einen Proliferationsstopp hin. Der Abfall der p21-Expression kann jedoch mehrere Bedeutungen haben. Es könnte sich um die Gegenregulation des Tumors gegen die gestörte Proliferation handeln oder um eine unfreiwillige Reaktion der Tumorzellen auf die Medikamente, was auf längere Sicht  
25 eine Apoptose und somit eine weitere Tumorgößenreduktion bedeuten könnte [Gartel et al. 2005].

Unklar bleibt, über welchen Signalweg die Medikamente auf die Zellen Einfluss nehmen. Auch konnte nicht bei allen Zelllinien ein Grund für den Proliferationsstopp gefunden  
30 werden, so dass in einigen Fällen der Wirkungsmechanismus gänzlich ungeklärt bleibt. Es bleiben noch viele Proteine und Enzyme mit Einfluss auf den Zellzyklus, die in dieser

Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht beachtet werden konnten. Außerdem gibt es eine Vielzahl von Mediatoren, die nur indirekt, beispielsweise über die Interaktion mit solchen Proteinen, eine Wirkung auf die Zellproliferation besitzen. Um ein solches handelt es sich bei Mortalin. Es gehört zur Familie der Heatshockproteine 70 (Hsp70) und hat vielfältige Aufgaben. Unter anderem moduliert es die Antwort der Zelle auf Stressstimuli, hilft, den Zellzyklus zu kontrollieren und spielt eine große Rolle in der Tumorgenese [Wadhwa et al. 2002]. Es wird in allen Zellen gebildet und ist für die Inaktivierung des Proteins p53 zuständig. In normalen Leberzellen wird es nur in geringem Maße exprimiert, während es in vielen Tumoren, beispielsweise dem hepatozellulären Karzinom, vermehrt zu finden ist, so dass es inzwischen als Tumormarker für dieses gilt [Yi et al. 2008]. Der Vorteil, den der Tumor durch die vermehrte Konzentration von Mortalin erhält, äußert sich in dessen Eigenschaft, an p53 binden zu können und dieses an seiner Aufgabe der Apoptoseinduktion und Zellzykluskontrolle zu hindern [Yi et al. 2008, Lu et al. 2011]. Durch diesen Mechanismus kann die Tumorzelle einen wichtigen Apoptoseinduktor und Kontrolleur des Zellzyklus ausschalten. Kommt es aber zu einer gezielten Inaktivierung von Mortalin, akkumuliert p53 und induziert letztendlich eine Apoptose der Zellen. Auch bei einer mutierten Form von p53 konnte eine Interaktion festgestellt werden und die sh-RNA von Mortalin war in der Lage, eine Apoptose durch das mutierte p53 zu induzieren [Lu et al. 2011]. Das Heatshockprotein könnte also ein wichtiger, für die Therapie relevanter Einflussfaktor werden.

Auch die Histon-Deacetylase-Inhibitoren dienen als Beispiel für eine medikamentöse Beeinflussung des Zellzyklus. Mehrere Studien weisen darauf hin, dass die Inhibitoren nicht, wie zuvor angenommen, nur für die Hemmung der Histon-Deacetylase zuständig sind, sondern auch vielseitige Aufgaben in der Zellzyklusregulierung übernehmen [Gregoretto et al. 2004, Marks et al. 2007]. Das Enzym Histon-Deacetylase bewirkt unter anderem eine Deacetylierung des N-terminalen Lysins und sorgt somit für einen engeren Kontakt zwischen Histonen und DNA, sodass die DNA an dieser Stelle für Transkriptionsfaktoren blockiert und die Transkription heruntergefahren wird [Rassow et al. 2012]. In einer in-vivo Studie konnte eine starke Wachstumsminde-  
30 rung von Mammakarzinomzellen durch den Inhibitor Trichostatin A bei Ratten festgestellt werden.

Durch die Inhibition der Histon-Deacetylase wurde die Transkription von p21 deutlich gesteigert, was ein Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>- Phase bewirkte [Vigushin et al. 2001]. Des Weiteren konnte eine vermehrte Transkription von Bax, einem Co-Faktoren von p53, gemessen werden [Ho et al. 2009]. Auch fand man Hinweise, dass die wachstumshemmende und Apoptose-induzierende Wirkung der Histon-Deacetylase-Inhibitoren nur bei neoplastisch veränderten Zellen und nicht bei gesunden Zellen nach zu weisen ist [Mitsiades et al. 2004, Brinkmann et al. 2001]. Zu beachten ist aber, dass dies nur Beispiele für die Vielzahl an Mediatoren sein sollen, die auch eine Wirkung auf den Zellzyklus zeigen.

10

Der letzte Versuch widmete sich der Wirkung von Furosemid. Nachdem in der ersten Proliferationsmessung ein leichter Anstieg der metabolisch aktiven Zellen zu finden war, sollte nun in einer Langzeitmessung dieser Effekt genauer beobachtet werden. Dazu wurden die Zellen wiederum mit dem Medikament inkubiert, wobei in diesem Fall über einen Zeitraum von 120 Stunden die Proliferation immer wieder im Abstand von 24 Stunden gemessen wurde. Es zeigte sich nur bei der Zelllinie SkHep1 eine proliferationsfördernde Wirkung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen und auch nur nach 72 Stunden. Beachtet werden sollte allerdings, dass die Gesamtzahl der Zellen bei allen Reihen, ob mit oder ohne Medikament, nach 120 Stunden insgesamt abnahm. Das könnte darauf hinweisen, dass die Zellen keinen ausreichenden Raum zum weiteren Wachstum hatten. Dies konnte jedoch in diesem Versuchsaufbau aus zeitlichen Gründen nicht mehr geändert werden. Da dieses Medikament ein sehr häufig eingesetztes Antihypertensivum ist, sollte diese mögliche proliferationsfördernde Eigenschaft unbedingt näher untersucht werden.

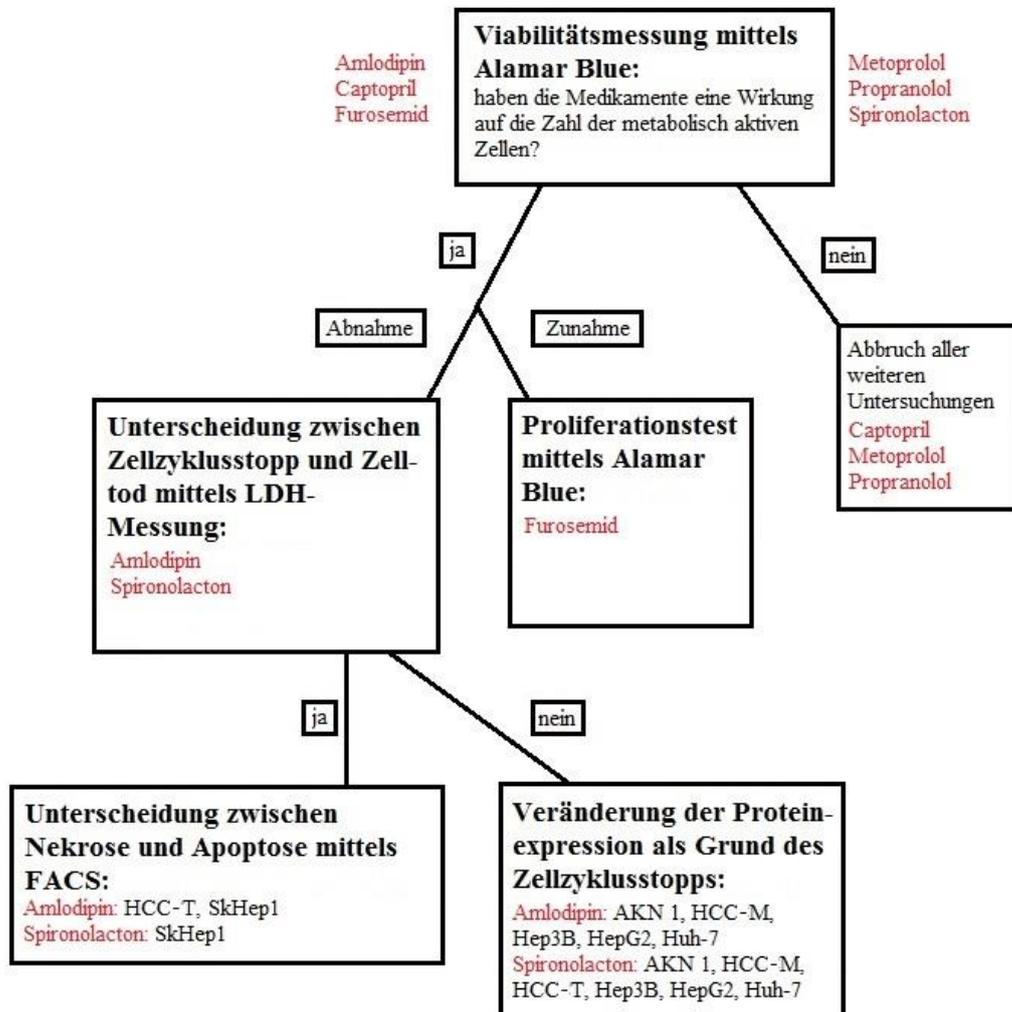


Abb. 51: Übersicht über den Versuchsablauf und die Ergebnisse

- 5 Obwohl der erste Schritt in der Untersuchung der Wirkung von Antihypertensiva auf Hepatomazelllinien getan ist, bleibt der genaue Signalweg, der die Wirkung der Medikamente vermittelt, in der vorliegenden Arbeit ungeklärt und benötigt weitere Erforschung. Es ist deutlich zu sehen, dass es noch weiteren Klärungsbedarf hinsichtlich der vielen unerforschten Wirkungen der viel verschriebenen Medikamente gibt. Nachdem
- 10 man mit ihrer Wirkung auf die Pankreastumore einen wichtigen Indikator für weitere Einsatzmöglichkeiten gefunden hat, war es unabdingbar, die Antihypertensiva auch an Leberzelltumoren zu testen. Nachdem dies nun geschehen ist und ein Einsatz bei der

Therapie möglich scheint, wird es nötig sein, gerade hinsichtlich der schlechten Prognose und begrenzten Therapiemöglichkeit, diese Art der Therapie noch näher zu untersuchen. Der Einsatz der Antihypertensiva als Injektion, ähnlich wie bei der perkutanen Alkoholinjektion, kann in der Zukunft ein weiteres wichtiges Puzzleteil in der Behandlung dieser schweren Krankheit darstellen.

## 7 Zusammenfassung und Ausblick

Antihypertensiva sind weit verbreitete Medikamente, die vielseitige Wirkungen besitzen.

- 5 In der Klinik werden sie im Moment hauptsächlich zur Beeinflussung und Regulation des Herz-Kreislauf-Systems angewandt. In den letzten Jahren konnten jedoch in mehreren Studien Effekte außerhalb des normalen Anwendungsgebietes nachgewiesen werden. So wurde unter anderem eine Wirkung von Antihypertensiva auf verschiedene Tumorarten belegt, weshalb ein großes Interesse daran besteht, zu überprüfen, ob diese auch bei
- 10 Hepatomazelllinien gefunden werden kann.

- Um dies heraus zu finden, wurden sechs Medikamente mit unterschiedlichen Wirkmechanismen und sieben Lebertumorzelllinien ausgewählt. Außerdem wurden humane Hepatozyten untersucht. Zuerst wurde die Zytotoxizität der Medikamente durch
- 15 die Beobachtung der Zellzahl mittels einer Fluoreszenzmessung untersucht. Im Anschluss wurde zur Unterscheidung zwischen Zelluntergang und Zellzyklusarrest die Freisetzung von LDH gemessen. Abhängig vom Ergebnis wurde im Verlauf entweder die DNA der Zellen mittels Größen- und Granularitätsbestimmung durch die Fluorescence-activated-cell-sorting-Analyse begutachtet oder eine Proteinquantifizierung mittels Western Blot
- 20 durchgeführt. Bei Furosemid wurde auf Grund einer möglichen proliferationsfördernden Wirkung eine Langzeit-Proliferationsmessung vorgenommen.

- In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Medikamente Amlodipin, Spironolacton und Propranolol eine Abnahme der Anzahl der metabolisch aktiven Hepatomazellen um
- 25 nahezu 100 % bewirken. Im Gegensatz zu den anderen beiden Antihypertensiva konnte bei Propranolol zusätzlich dazu auch eine Verringerung der Anzahl der metabolisch aktiven humanen Hepatozyten beobachtet werden, sodass eine weitere Untersuchung dieses Medikamentes unterlassen wurde. Anhand der erhöhten LDH-Freisetzung konnte bei den Zelllinien SkHep1 bei beiden Medikamenten und bei HCC-T bei Amlodipin ein Hinweis
- 30 auf Zelluntergang gefunden werden. In der anschließenden Begutachtung der DNA mittels Fluorescence-activated-cell-sorting-Analyse zeigte sich als Grund hierfür eine

stattgefundene Apoptose. Bei den LDH-Messungen der anderen Zelllinien zeigte sich keine Veränderung, weshalb im Verlauf eine Veränderung der Proteinexpression für p53, p21 und ki-67 vorgenommen wurde. Bei Spironolacton zeigte sich bei der Zelllinie Huh-7 passend zur verminderten Proliferation eine Zunahme des Proteins p53, was auf die Induktion eines Zellzyklusarrests hinweist. Bei HCC-M konnte eine verringerte Expression von ki-67 als Ausdruck der Abnahme der Anzahl mitotisch aktiver Zellen und von p21 als Zeichen einer möglichen Gegenregulation der Hepatomazelllinie beobachtet werden. Bei Amlodipin zeigte sich nur bei der Zelllinie HepG2 ein Anstieg der p21 Expression, was eine Erklärung für den Zellzyklusstopp darstellen könnte. Insgesamt ließ sich also beweisen, dass Amlodipin bei SkHep1 und HCC-T und Spironolacton bei SkHep1 eine Apoptose induzieren und bei den anderen untersuchten Hepatomazelllinien einen Zellzyklusstopp bewirken. Dieser war teilweise durch eine Veränderung der Proteinexpression zu erklären. Als Abschluss wurde noch eine fünftägige Proliferationsmessung mit Furosemid durchgeführt, bei welcher nur bei SkHep1 ein minimaler Anstieg nachzuweisen war. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Zahl der metabolisch aktiven Zellen bei allen Konzentrationen sowie der Kontrolle nach 72 h abnahm.

Es folgt ein Ausblick auf die Möglichkeiten der weiteren Analyse der Ergebnisse. Dabei ist zu berücksichtigen, dass nicht alle untersuchten Antihypertensiva Wirkung auf die Hepatomazelllinien zeigten. Auch muss vor allem der negative Effekt von Propranolol auf die humanen Hepatozyten beachtet werden. Dieser sollte in weiteren Untersuchungen nachverfolgt werden, um Bluthochdruckpatienten vor möglichen schädlichen Nebenwirkungen auf die Leber zu schützen. Auch konnten nicht alle Wirkungsmechanismen geklärt werden, so dass einige Zelllinien zwar mit einem Proliferationsstopp auf die Medikamente reagierten, dies aber nicht auf eine Veränderung der Expression der untersuchten Proteine zurückzuführen ist. Selbst bei einer variierten Expression konnten der genaue Signalweg und die Zielstrukturen in dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Alle Ergebnisse wurden in einer in-vitro Studie gesammelt, weswegen es im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung wichtig ist, sie in Mausmodellen in-vivo zu bestätigen. Weiterhin müsste die Wirkung der Antihypertensiva

bei einer systemischen Gabe oder einer perkutanen Injektion beachtet werden. Die Medikamente haben neben der Blutdruckregulation vielseitige Effekte, wie die Beeinflussung des Herzrhythmus. Auch die verschiedenen Nebenwirkungen müssen bei einer systemischen Gabe mit erhöhten Konzentrationen beachtet werden. Aus diesem Grund müssen zur Beurteilung des Potenzials von Antihypertensiva als eventuell „neoadjuvante“ Therapie für Lebertumoren umfassende, klinische Studien durchgeführt werden.

## 8 Verzeichnisse

### 8.1 Tabellenverzeichnis

5		
	Tabelle 1: Übersicht der Leberzellen	10
	Tabelle 2: Definition und Klassifikation der Blutdruckwerte (mmHg)	21
	Tabelle 3: Formel zur Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer	42
	Tabelle 4: Übersicht der Medikamentenkonzentrationen	43
10	Tabelle 5: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels	48
	Tabelle 6: Verwendete Erstantikörper	49
	Tabelle 7: Verwendete Zweitantikörper	49
	Tabelle 8: Amlodipin - Konzentrationen, ab denen die Viabilität auf 50 % sinkt	55
15	Tabelle 9: Zusammenfassung der Proteinfunktion für den Western Blot	62
	Tabelle 10: Spironolacton - Konzentrationen, ab denen die Viabilität auf 50 % sinkt	69
	Tabelle 11: Zusammenfassung der Proteinfunktion für den Western Blot	73
	Tabelle 12: Propranolol - Konzentrationen, ab denen die Viabilität auf 50 % sinkt	91
20		

### 8.2. Abbildungsverzeichnis

25	Abb. 1: Gefäßversorgung und Segmenteinteilung der Leber	8
	Abb. 2: Verteilung der häufigsten hepatobiliären Tumoren	10
	Abb. 3: Metastasen	12
	Abb. 4: Darstellung der Verteilung der Primärtumoren bei Lebermetastasen	12
	Abb. 5: Hepatozelluläres Karzinom	13
30	Abb. 6: Risiko eines hepatozellulären Karzinoms in Abhängigkeit der Grunderkrankung	14

	Abb. 7: Cholangiozelluläres Karzinom	15
	Abb. 8: AKN1 in 100-facher Vergrößerung	16
	Abb. 9: HCC-M in 100-facher Vergrößerung	16
	Abb. 10: HCC-T in 100-facher Vergrößerung	17
5	Abb. 11: Hep3B in 100-facher Vergrößerung	17
	Abb. 12: HepG2 in 100-facher Vergrößerung	18
	Abb. 13: Huh-7 in 100-facher Vergrößerung	18
	Abb. 14: SkHep1 in 100-facher Vergrößerung	19
	Abb. 15: Darstellung der Versuchsreihenfolge	29
10	Abb. 16: Perfusionsschema des Leberteilresektats	39
	Abb. 17: Neubauer-Zählkammer	42
	Abb. 18: Darstellung der LDH-Aktivität	44
	Abb. 19: Schematische Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse	50
	Abb. 20: Proliferationsverhalten nach Behandlung mit Amlodipin	54
15	Abb. 21: LDH-Freisetzung bei SkHep1 und HCC-T nach Behandlung mit Amlodipin über 24 h	56
	Abb. 22: Ergebnisse der FACS-Analyse für HCC-T nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h	57
	Abb. 23: Repräsentative Dot-Plots und Graphen von HCC-T nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h	58
20	Abb. 24: Ergebnisse der FACS-Analyse für SkHep1 nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h	59
	Abb. 25: Repräsentative Dot-Plots und Graphen von SkHep1 nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h	61
25	Abb. 26: Ergebnisse des Western Blots für AKN1 nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h	63
	Abb. 27: Ergebnisse des Western Blots für HCC-M nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h	64
	Abb. 28: Ergebnisse des Western Blots für Huh-7 nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h	65
30		

	Abb. 29: Ergebnisse des Western Blots für Hep3B nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h	66
	Abb. 30: Ergebnisse des Western Blot für HepG2 nach Behandlung mit Amlodipin für 24 h	67
5	Abb. 31: Proliferationsverhalten nach Behandlung mit Spironolacton	69
	Abb. 32: LDH-Freisetzung bei SkHep1 und HCC-T nach Behandlung mit Spironolacton über 24	70
	Abb. 33: Ergebnisse der FACS-Analyse für SkHep1 nach Behandlung mit Spironolacton für 24 h	71
10	Abb. 34: Repräsentative Dot-Plots und Graphen von SkHep1 nach Behandlung mit Spironolacton für 24 h	72
	Abb. 35: Ergebnisse des Western Blot für AKN1 nach Behandlung mit Spironolacton für 24 h	74
	Abb. 36: Ergebnisse des Western Blot für HCC-T nach Behandlung mit Spironolacton für 24 h	75
15	Abb. 37: Ergebnisse des Western Blot für Hep3B nach Behandlung mit Spironolacton für 24 h	76
	Abb. 38: Ergebnisse des Western Blots für Huh-7 nach Behandlung mit Spironolacton für 24 h	77
20	Abb. 39: Ergebnisse des Western Blot für HCC-M nach Behandlung mit Spironolacton für 24 h	78
	Abb. 40: Proliferationsverhalten nach Behandlung mit Furosemid	80
	Abb. 41: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung von AKN1 nach Behandlung mit Furosemid über 120 h	81
25	Abb. 42: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung von HCC-M nach Behandlung mit Furosemid über 120 h	82
	Abb. 43: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung von HCC-T nach Behandlung mit Furosemid über 120 h	83
	Abb. 44: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung von Hep3B nach Behandlung mit Furosemid über 120 h	84
30		

	Abb. 45: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung von HepG2 nach Behandlung mit Furosemid über 120 h	85
	Abb. 46: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung von Huh-7 nach Behandlung mit Furosemid über 120 h	86
5	Abb. 47: Ergebnisse der Fluoreszenzmessung von SkHep1 nach Behandlung mit Furosemid über 120 h	87
	Abb. 48: Proliferationsverhalten nach Behandlung mit Metoprolol	89
	Abb. 49: Proliferationsverhalten nach Behandlung mit Propranolol	91
	Abb. 50: Proliferationsverhalten nach Behandlung mit Captopril	93
10	Abb. 51: Übersicht über den Versuchsablauf und die Ergebnisse	104

### 8.3 Literaturverzeichnis

- 15 Abbas, T., Dutta, A., p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature*. 9  
(2009) 400 – 410
- Aktories, K., Förtstermann, U., Hofmann, F., Starke, K., *Pharmakologie des  
kardiovaskulären Systems: das Herz, die Bultgefäße*. In „Allgemeine und spezielle  
Pharmakologie und Toxikologie“, Aktories, K., Förtstermann, U., Hofmann, F., Starke,  
20 K. (Hrsg.), Elsevier GmbH, München, 2013, 11. Auflage, 449 – 481
- Al-Wadei, H.A.N., Al-Wadei, M.H., Schuller, H.M., Prevention of pancreatic cancer by the  
beta-blocker propranolol. *Anticancer drugs*. 20 (2009) 477 – 482
- Aumüller, G., Aust, G., Doll, A., Engele, J., Kirsch, J., Mense, S., Reißig, D., Salvetter, J.,  
Schmidt, W., Schmitz, F., Schulte, E., Spanel-Borowski, K., Wolff, W., Wurzinger, L.J.,  
25 Zilch, H., *Hepatobiliäres System und Pankreas*. In „Duale Reihe Anatomie“, Bob, A.,  
Bob, K. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2010, 2. Auflage, 656 – 684
- Baumann, P., Beuschlein, F., Brodmann, D., Bruckbauer, H., Bschor, T., Clasing, D.,  
Endres, S., Fuchs, A., Haberl, R., Helbig, S., Heppner, H.J., Humpich, M., Jakob, M.,  
Karl, S., Kimmig, R., Kloos-Drobner, B., Meurer, A., Schmidmaier, R., Schmidt-  
30 petruschkat, S., Stuckrad-Barre, S., *Kardiologie*. In „Arzneimittel Pocket Plus 2011“,

- Ruß, A., Endres, S. (Hrsg.), Börm Bruckmeier Verlag, Grünwald, 2010, 7. Auflage, 42 – 72
- Böcker, W., Denk, H., Heitz, P.U., Moch, H., Höfler, G., Kreipe, H., Leber und intrahepatische Gallenwege. In „Pathologie“, Böcker, W., Denk, H., Heitz, P.U., Moch, H. (Hrsg.), Urban & Fischer, München, 2012, 5. Auflage, 623 – 666
- Braun, J., Dormann, A.J., Clemens, W., Gefäßerkrankungen. In „Klinikleitfaden Innere Medizin“, Braun, J., Dormann, A.J. (Hrsg.), Elsevier Urban & Fischer, München, 2010, 11. Auflage, 179 – 218
- Brinkmann, H., Dahler, A.L., Popa, C., Serewko, M.M., Parsons, P.G., Gabrielli, B.G., Burgess, A.J., Saunders, N.A., Histone hyperacetylation induced by histone deacetylase inhibitors is not sufficient to cause growth inhibition in human dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 22491 – 22499
- Burnette, W.N., “Western Blotting“: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 112 (1981) 195 – 203
- Caspary, W.F., Leuschner, U., Zeuzem, S., Tumoren der Leber, Gallenblase und Gallenwege. In „Therapie von Leber- und Gallekrankheiten“, Caspary, W.F., Leuschner, U., Zeuzem, S. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 2001, 2. Auflage, 349 – 398
- Chae, H.J., Kang, J.S., Byun, J.O., Han, K.S., Kim, D.U., Oh, S.M., Kim, H.M., Chae, S.W., Kim, H.R., Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacol. Res.* 42 (2000) 373 – 381
- Chemgaroo (2013), Enzymklassen, (<http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/4/cm/kinetik/enzymklassen.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/biokatalyse/ldh.vscml.html>), Stand: 02.10.2013
- Chen, S., Chen, J., Xi, W., Xu, W., Yin, G. (2011), Clinical Therapeutic Effect on Biological Monitoring of p53 Gene in Advanced Hepatocellular Carcinoma,

([http://journals.lww.com/amjclinicaloncology/Abstract/publishahead/Clinical\\_Therapeutic\\_Effect\\_and\\_Biological.99716.aspx](http://journals.lww.com/amjclinicaloncology/Abstract/publishahead/Clinical_Therapeutic_Effect_and_Biological.99716.aspx)), Stand: 02.10.2013

- Dahut, W.L., Lakhani, N.J., Gulley, J.L., Arlen, P.M., Kohn, E.C., Kotz, H., McNally, D., Parr, A., Nguyen, D., Yang, S.X., Steinberg, S.M., Venitz, J., Sparreboom, A., Figg, W.D., Phase I Clinical Trial of Oral 2-Methoxyestradiol, an Antiangiogenic and Apoptotic Agent, in Patients with Solid Tumors. *Cancer Biol. Ther.* 5 (2006) 22 – 27
- Dancygier, H., Struktur und Funktion. In „klinische Hepatologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen“, Dancygier, H. (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 2003, 1. Auflage, 5 – 123
- 10 Denk, H., Dienes, H.P., Düllmann, J., Fischer, H.-P., Klinge, O., Lierse, W., Meyer zum Büschenfelde, K.-H., Pfeifer, U., Preisegger, K.H., Ramadori, G., Tannapfel, A., Wittekind, C., Wulfhekel, U., Zhou, H., Tumorartige Erkrankungen der Leber. In „Pathologien der Leber und Gallenwege“, Seifert, G. (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1999 Auflage, 834 – 864
- 15 DHL; Deutsche Hochdruckliga e.V., Deutsche Hypertonie Gesellschaft, „Leitlinien zur Behandlung der Hypertonie“, Deutsche Hochdruckliga e.V., Deutsche Hypertonie Gesellschaft, Heidelberg, 2008
- Dörner, K., Deufel, T., Kiehntopf, M., Maligne Erkrankungen, Leberdiagnostik. In „klinische Chemie und Hämatologie“, Dörner, K. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2013, 8. Auflage, 424 – 436, 457 – 478
- 20 DSMZ; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (2013), Hep-3B, HepG2, SkHep1, (<http://www.dsmz.de>), Stand: 02.10.2013
- Ehnert, S., Lukoschek, T., Bachmann, A., Martinez, S., Mueller, S., Sooley, S., Nuessler, N., Stöckle, U., Nüssler, A.K., The right choice of antihypertensives might positively affect progression of chronic/alcoholic liver disease. *Hepat. Med.* 5 (2013) 31 – 41
- 25 Erster, S., Mihara, M., Kim, R.H., Petrenko, O., Moll, U.M., In Vivo Mitochondrial p53 Translocation Triggers a Rapid First Wave of Cell Death in Response to DNA Damage That Can Precede p53 Target Gene Activation. *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 6728 – 6741

- Fotsis, T., Zhang, Y., Pepper, M.S., Adlercreutz, H., Montesano, R., Nawroth, P.P., Schweigerer, L., The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestadiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature*. 368 (1994) 237 – 239
- 5 Freshney, R.I., Chapter 15: Characterization. In „Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques and Specialized Applications“, Freshney, R.I. (Hrsg.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2011, 6. Auflage, 239 – 268
- Gartel, A.L., Radhakrishnan, S.K., Lost in Transcription: p21 Repression Mechanisms, and Consequences. *Cancer Res.* 65 (2005) 3980 – 3985
- 10 Gerok, W., Huber, C., Meinertz, T., Zeidler, H., Krankheiten der Verdauungsorgane, Krankheiten der Leber und des biliären Systems. In „Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt“, Gerok, W., Huber, C., Meinertz, T., Zeidler, H. (Hrsg.), Schattauer GmbH, Stuttgart, 2007, 11. Auflage, 606 – 714
- 15 Graefe, K.H., Lutz, W.L., Bönisch, H., Ionenkanäle, Autonomes Nervensystem, Gefäßsystem, Arterielle Hypertonie. In „Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie“, Bob, A., Bob, K. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2011, 1. Auflage, 73 – 111, 138 – 177, 478 – 488
- Gregoretti, I.V., Lee, Y.M., Godson, H.V., Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J. Mol. Biol.* 338 (2004) 17 – 31
- 20 Guo, K., Ma, Q., Wang, L., Hu, H., Li, J., Zhang, D., Zhang, M., Norepinephrine-induced invasion by pancreatic cancer cells is inhibited by propranolol. *Oncol. Rep.* 22 (2009) 825 – 830
- 25 Henne-Bruns, D., Dürig, M., Kremer, B., Braun, F., Becker, T., Bröring, D., Heller, M., Leber. In „Duale Reihe Chirurgie“, Bob A., Bob K. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2012, 4. Auflage, 460 – 485
- Herold, G., Lebererkrankungen. In „Innere Medizin“, Herold G. (Hrsg.), Herold, G., Köln, 2014, 511 – 562

- Hinshaw, J., Laeseke, P., Lee, F. (2008), The Role of Image-guided Tumor Ablation in the Management of Liver Cancer, (<http://www.cancernews.com/printer.asp?aid=504>), Stand: 02.10.2013
- 5 Ho, E., Clarke, J.D., Dashwood, R.H., Dietary Sulforaphane, a Histone Deacetylase Inhibitor for Cancer Prevention. *J. Nutr.* 139 (2009) 2393 – 2396
- James, J., Murry, D.L., Treston, A.M., Storniolo, A.M., Sledge, G.W., Sidor, C., Miller, K.D., Phase I safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of 2-methoxyestradiol alone or in combination with docetaxel in patients with locally recurrent or metastatic breast cancer. *Invest New Drugs.* 25 (2006) 41 – 48
- 10 JCRB; Japanese Collection of Research Bioresources (2013), Huh-7, (<http://cellbank.nibio.go.jp/>), Stand: 02.10.2013
- Karow, T., Lang-Roth, R., kardiovaskuläre Pharmaka – Kardiologie. In „Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie“, Karow, T. (Hrsg.), Karow, T., Köln, 2013, 21. Auflage, 85 – 91, 112 – 116, 127 – 137, 450 – 451
- 15 Katzung, B.G., Masters, S.B., Trevor, A.J., Cardiovascular – renal drugs. In „Basic and clinical pharmacology“, Katzung, B.G., Masters, S.B., Trevor, A.J. (Hrsg.), McGraw Hill Companies, Maine, 2009, 11. Auflage, 167 – 270
- Klinke, R., Pape, H., Silbernagl, S., das Kreislaufsystem. In „Physiologie“, Klinke, R., Pape, H., Silbernagl, S. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, New York, 2005, 20 5. Auflage, 198 – 206
- Knobeloch, D., Ehnert, S., Schyschak, L., Büchler, P., Schoenberg, M., Kleeff, J., Thasler, W.E., Nüssler N., Godoy, P., Hengstler, J., Nüssler, A.K., Human hepatocytes: isolation, culture and quality procedures. *Methods Mol. Biol.* 806 (2012) 99 – 120
- Krams, M., Frahm, S.O., Kellner, U., Mawrin, C., Hepatobiliäres System. In 25 „Kurzlehrbuch Pathologie“, Krams, M., Frahm, S.O., Kellner, U., Mawrin, C., Schüller, S. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 2013, 2. Auflage, 285 – 318
- Kühnel, W., Verdauungsapparat. In „Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie“, Kühnel, W. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2002, 11. Auflage, 272 – 340

- Kumar, P., Clark, M., Camm, A.J., Bunce, N.H., Cardiovascular disease. In „Clinical Medicine“, Kumar, P., Clark, M. (Hrsg.), Saunders Elsevier, Edinburgh-London-New York-Oxford-Philadelphia-St. Louis-Sydney-Toronto, 2012, 8. Auflage, 669 – 790
- Lane, D.P., Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 358 (1992) 15 – 16
- 5 Layer, G., Kaick, V.G., Delorme, S., Lebermetastasen. In „Radiologische Diagnostik in der Onkologie: Band 2: Gastrointestinaltrakt, Urogenitaltrakt, Retroperitoneum“, Layer, G., Kaick, V.G., Delorme, S. (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 2007, 640
- Lemmer, B., Brune, K., Arterielle Hypertonie. In „Pharmakotherapie: klinische  
10 Pharmakologie“, Brune, K. (Hrsg.), Springer-Verlag, Heidelberg, 2007, 13. Auflage, 209 – 228
- Leu, J.I.-J., George, D.L., Hepatic IGFBP1 is a prosurvival factor that binds to BAK, protects the liver from apoptosis, and antagonizes the proapoptotic action of p53 at mitochondria. *Genes Dev*. 21 (2007) 3095 – 3109
- 15 LGC Standards (2013), Hep3B, HepG2, (<http://www.lgcstandards-atcc.org>), Stand: 02.10.2013
- Lindl, T., „Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen“, Lindl, T. (Hrsg.), Spektrum Akademische Verlag, Stuttgart, 5. Auflage, 2002
- 20 LO; Laboroptik (2013), Neubauer Zählkammer  
(<http://www.zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html>), Stand: 02.10.2013
- Lowe, S.W., Cepero E., Evan, G. Intrinsic Tumour suppression. *Nature*. 432 (2004) 307 – 315
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., Protein measurement with the  
25 Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem*. 193 (1951) 265 – 275
- Lu, W.-J., Lee, N.P., Kaul, S.C., Lan, F., Poon, R.T.P., Wadhwa, R., Luk, J.M., Induction of mutant p53-dependent apoptosis in human hepatocellular carcinoma by targeting stress protein mortalin. *Int. J. Cancer*. 129 (2011) 1806 – 1814

- Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L., Herz und Kreislauf. In „Pharmakologie und Toxikologie“, Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2010, 17. Auflage, 143 – 186
- Lüllmann-Rauch, R., Paulsen, F., Anhangsdrüsen des Verdauungssystems. In 5 „Taschenlehrbuch Histologie“, Lüllmann-Rauch, R. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2012, 4. Auflage, 393 – 413
- Marks, P.A., Breslow, R., Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat. Biotechnol.* 25 (2007) 84 – 90
- Mitomi, H., Mori, A., Kanazawa, H., Nishiyama, Y., Ihara, A., Otani, Y., Soda, M., 10 Kobayashi, K., Igarashi, M., Venous invasion and down-regulation of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> are associated with metastasis in colorectal carcinomas. *Hepato-Gastroenterology.* 52 (2005) 1421 – 1426
- Mitsiades, C.S., Mitsiades N.S., McMullan, C.J., Poulaki, V., Shringarpure, R., Hideshima, T., Akiyama, M., Chauhan, D., Munshi, N., Gu, X., Bailey, C., Joseph, M., Libermann, 15 T.A., Richon, V.M., Marks, P.A., Aderson, K.C., Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* 101 (2004) 540 – 545
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., Schätzl, H., Zellschädigung. In „Molekulare Virologie“. Modrow, S. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Berlin-Heidelberg, 20 2010, 3. Auflage, 37 – 43
- Nüssler, A.K., Nüssler, N.C., Merk, V., Brulport, M., Schormann, W., Yao, P., Hengstler J.G., the holy grail of hepatocyte culturing and therapeutic use. In „Regenerative Medicine Today“, Santin, M. (Hrsg.), Springer New York, New York, 2009, 283 – 320
- Nüssler, A.K., Vergani, G., Gollin, S.M., Dorko, K., Gansauge, S., Morris Jr., S.M., 25 Demetris, A.J., Nomoto, M., Beger, H.G., Strom, S.C., Isolation and characterization of a human hepatic epithelial-like cell line (AKN-1) from a normal liver. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Anim.* 35 (1999) 190 – 197

- O'Brien, J., Wilson, J., Orton, T., Pognan, F., Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 5267 – 5656
- Ohata, M., Nakamura, S., Fujita, H., Isemura, M., Prognostic implications of p21  
5 (Waf1/Cip1) immunolocalization in multiple myeloma. *Biomed. Res.* 26 (2005) 91 – 98
- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M., Greenwood, M.T., Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochim. Biophys. Acta.* 1813 (2011) 238 - 259
- Public Health England (2013), Huh-7, (<http://www.hpacultures.org.uk/>), Stand: 02.10.2013
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R., Abbau der Kohlenhydrate zu Pyruvat  
10 bzw. Lactat – Die Lactat-Dehydrogenase (LDH), Genexpression – Transkription. In „Duale Reihe Biochemie“, Bob, A., Bob, K. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2012, 3. Auflage, 86 – 87, 4323 – 449
- Ringshausen, I., O'Shea, C.C., Finch, A.J., Swigart, L.B., Evan, G.I., Mdm2 is critically and continuously required to suppress lethal p53 activity in vivo. *Cancer Cell.* 10  
15 (2006) 501 – 514
- Saito, H., Morizane, T., Watanabe, T., Kagawa, T., Iwabuchi, M.N., Kumagai, N., Inagaki, Y., Tsuchimoto, K., Tsuchiya, M., Establishment of a human cell line (HCC-T) from a patient with hepatoma bearing no evidence of hepatitis B or A virus infection. *Canc.* 64 (1989) 1054 – 1060
- 20 Sakurai, T., Kudo, M., Fukuta N., Nakatani, T., Kimura, M., Park, A.-M., Munakata, H., Involvement of Angiotensin II and Reactive Oxygen Species in Pancreatic Fibrosis. *Pancreatology.* 11 (2011) 7 -13
- Schmidt, E., Schmidt, F.W., Manns, M.P., Tumoren der Leber. In „Lebererkrankungen: Pathophysiologie – Diagnostik – Therapie“, Schmidt, E., Schmidt, F.W., Manns, M.P.  
25 (Hrsg.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH Stuttgart, Stuttgart, 2000, 1. Auflage, 1125 – 1207
- Schmitz, S., „Der Experimentator: Zellkultur“, Schmitz, S. (Hrsg.), Springer Verlag, Stuttgart, 3. Auflage, 2011, 267

- Scholzen, T., Gerdes, J., The ki-67 Protein: from the Known and the Unknown. *J. Cell. Phys.* 182 (2000) 311 – 322
- Schoninger-Hekele, M., Hanel, S., Wrba, F., Müller C., Hepatocellular carcinoma – survival and clinical characteristics in relation to various histologic molecular markers in Western patients. *Liver Int.* 25 (2005) 62 – 69
- Schumacher, G., Scheunert, S., Rueggeberg, A., Bachem, M.G., Nüssler, A.K., Spinelli, A., Mukhopadhyay, T., Pratschke, J., Neuhaus, P., A very low toxic agent induces apoptosis and reduces growth of human hepatocellular carcinoma cells. *J. Gastroen. Hepatol.* 21 (2006) 1207 – 1212
- 10 Seow, T.K., Ong, S., Liang, R.C.M.Y., Ren, E., Chan, L., Ou, K., Chung, M.C.M., Two-dimensional electrophoresis map of the human hepatocellular carcinoma cell line, HCC-M, and identification of the seperated proteins by mass spectrometry. *Electr.* 21 (2000) 1787 – 1813
- Shan, T., Ma, Q., Zhang, D., Guo, K., Liu, H., Wang, F., Wu, E.,  $\beta_2$ -adrenoceptor synergizes with gemcitabine to inhibit the proliferation of pancreatic cancer cells via apoptosis induction. *Eur. J. Pharmacol.* 665 (2011) 1 – 7
- 15 Shiraki, K., Wagayama, H., Cytoplasmic p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression in human hepatocellular carcinomas. *Liver Int.* 26 (2006) 1018 – 1019
- Siewert, J.R., Rothmund, M., Schumpelick, V., Lebermetastasen. In “Praxis der 20 Viszeralchirurgie: Onkologische Chirurgie“, Siewert, J.R. (Hrsg.), Springer-Verlag Gmbh, Berlin, Heidelberg, 2010, 3. Auflage, 640
- Snodgrass, P.J., Wacker, W.E.C., Eppinger, E.C., Vallee, B.L., Metalloenzymes and myocardial infarction III. Lactic dahydrogenase activity of serum-a determinate diagnostic measure. *N. Engl. J. Med.* 261 (1959) 1259 - 1266
- 25 Spangenberg, H., Thimme, R., Blum, H. (2009), der Leberrundherd, (<http://www.aerzteblatt.de/archiv/64644>), Stand: 02.10.2013
- Staib, F., Hussain, S.P., Hofseth, L.J., Wang, X.W., Harris, C.C., TP53 and Liver Carcinogenesis. *Hum. Mutat.* 21 (2003) 201 – 216
- Stimpel, M., „Arterielle Hypertonie“, Steinkopff Verlag Darmstadt, Darmstadt, 2001

- Strödter, D., Die Antihypertensiva, Therapie bei stabiler KHK und bei Postinfarktpatienten. In „Evidenz-basierte Therapie in der Kardiologie“, Stödter, D. (Hrsg.), UNI-MED Verlag, Bremen, 2009, 78 – 84, 118 – 153
- 5 Sweeney, C., Liu, G., Yiannoutsos, C., Kolesar, J., Horvath, D., Staab, M.J., Fife, K., Armstrong, V., Treston, A., Sidor, C., Wilding, G., A Phase II Multicenter, Randomized, Double-Blind, Safety Trial Assessing the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Efficacy of Oral 2-Methoxyestradiol Capsules in Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* 11 (2005)
- 10 Thomas, C., Leber. In „Histopathologie“, Thomas, C. (Hrsg.), Schattauer GmbH, Stuttgart, 2006, 176 – 179
- Toblli, J.E., Munoz, M.C., Cao, G., Mella, J., Pereyra, L., Mastai, R., ACE Inhibition and AT1 Receptor Blockade Prevent Fatty Liver and Fibrosis in Obese Zucker Rats. *Obesity.* 16 (2008) 770 – 776
- 15 Toledo, F., Wahl, G.M., Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat. Rev. Cancer.* 6 (2006) 909 – 923
- Urruticoechea, A., Smith, I.E., Dowsett, M., „Proliferation Marker ki-67 in Early Breast Cancer“, *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 7212 – 7220
- 20 Vigushin, D.M., Ali, S., Pace, P.E., Mirsaidi, N., Ito, K., Adcock, I., Coombes, R.C., Trichostatin A Is a Histone Deacetylase Inhibitor with Potent Antitumor Activity against Breast Cancer in Vivo. *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 971 – 976
- Wadhwa, R., Taira, K., Kaul, S.C., Mortalin: a potential candidate for biotechnology and biomedicine. *Histol. Histopathol.* 17 (2002) 1173 – 1177
- 25 Watanabe, T., Morizane, T., Tsuchimoto, K., Inagaki, Y., Munakata, Y., Nakamura, T., Kumagai, N., Tsuchiya M., Establishment of a cell line (HCC-M) from a human hepatocellular carcinoma. *Int. J. Canc.* 32 (1983) 141 – 146
- Weddle, D.L., Tithoff, P., Williams, M., Schuller, H.M.,  $\beta$ -adrenergic growth regulation of human cancer cell lines derived from pancreatic ductal carcinomas. *Carcinogenesis.* 22 (2001) 473 – 479

- Weinberg, R.A., Chapter 8: pRb and Control of the Cell Cycle Clock, Chapter 9: p53 and Apoptosis: Master Guardian and Executioner. In „the biology of cancer“, Weinberg, R.A. (Hrsg.), Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York, Abingdon, 2. Auflage, 2014, 275 – 390
- 5 Werdan, K., Trappe, H.-J., Zerkowski, H.-R., Herz und Hochdruck. In „Das Herzbuch: Praktische Herz - Kreislauf - Medizin“, Werdan, K., Trappe, H.-J., Zerkowski, H.-R.(Hrsg.), Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 2003, 1. Auflage, 758 – 827
- WHO; World Health Organization, „World Health Statistics – a snapshot of global health“, Genf, 2012, 6
- 10 Wink, M., „Molekulare Biotechnologie: Konzepte, Methoden und Anwendungen“, Wink, M. (Hrsg.), Wiley-VCH, Weinheim, 2011
- Wu, C.-W., Farrell, G.C., Yu, J., „ Functional role of peroxisome-proliferator-activated receptor in hepatocellular carcinoma“. *J. Gastroen. Hepatol.* 27 (2012) 1665 – 1669
- Wyllie, A.H., „Where, O Death, Is Thy Sting?“ A Brief Review of Apoptosis Biology. *Mol. Neurobiol.* 42 (2010) 4 – 9
- 15 Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature.* 445 (2007) 656 – 660
- Yi, X., Luk, J.M., Lee, N.P., Peng, J., Leng, X., Guan, X.-Y., Lau, G.K., Beretta, L., Fan, S.-T., Association of Mortalin (HSPA9) with Liver Cancer Metastasis and Prediction for Early Tumor Recurrence. *Mol. Cell. Proteomics.* 7 (2008) 315 - 325
- 20 Zhang, D., Ma, Q.-Y., Hu, H.-T., Zhang, M.,  $\beta_2$ -adrenergic antagonists suppress pancreatic cancer cell invasion by inhibiting CREB, Nf $\kappa$ B and AP-1. *Cancer Biol. Ther.* 10 (2010) 19 – 29
- 25 Zirbes, T.K., Baldus, S.E., Moenig, S.P., Nolden, S., Kunze, D., Shafizadeh, S.T., Schneider, P.M., Thiele, J., Hoelscher, A.H., Dienes, H.P., Prognostic impact of p21/waf1/cip1 in colorectal cancer. *Int. J. Cancer.* 89 (2000) 14 – 18