

**Untersuchungen zum Einfluss von Retinoiden,
Flavonoiden und Menadion auf die interzelluläre
Kommunikation über Gap Junctions**

Inaugural-Dissertation

zur

*Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*

vorgelegt von

Niloofar Ale-Agha

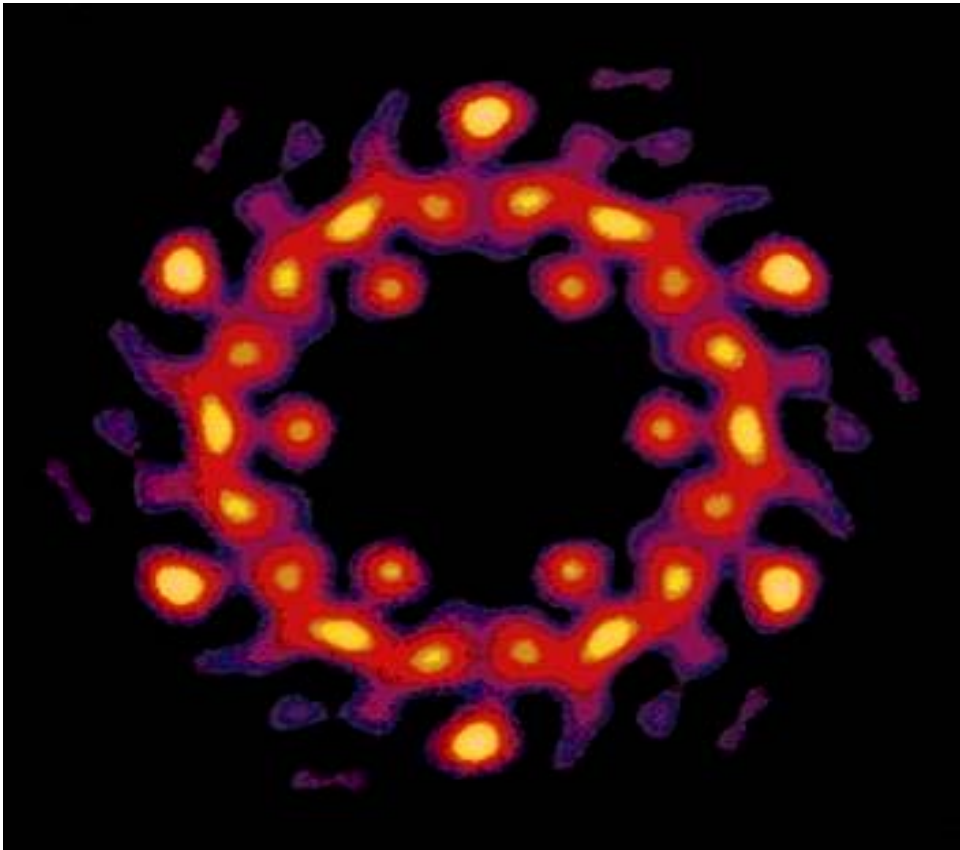
Düsseldorf 2003

**Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**Referent: Prof. Dr. Wilhelm Stahl
Koreferent: Prof. Dr. Hans-Dieter Martin**

**Tag der Prüfungen: 15.07.2003
 17.07.2003
 18.07.2003**

Kommunikation ist Leben



Gap Junctions

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 1 |
| 1. Einleitung | 2 |
| 1.1 Interzelluläre Kommunikation | 2 |
| 1.1.1 Interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions | 2 |
| 1.1.2 Funktion der Zell-Zellkommunikation über Gap Junctions | 6 |
| 1.1.3 Regulation der Zell-Zellkommunikation | 7 |
| 1.1.4 Zusammenhang zwischen Zell-Zellkommunikation, Teratogenese und Embryogenese | 9 |
| 1.2 Retinoide | 10 |
| 1.2.1 Definition, Vorkommen, Funktion und Metabolismus | 10 |
| 1.2.2 Retinoid Bindungsproteine, Rezeptoren und responsive Elemente | 14 |
| 1.2.3 Therapeutische Anwendungen und Teratogenität | 19 |
| 1.3 Flavonoide | 22 |
| 1.3.1 Definition, Vorkommen, Metabolismus und Funktion | 22 |
| 1.4 Vitamin K (Menadion) | 25 |
| 1.4.1 Definition, Vorkommen, Metabolismus und Funktion | 25 |
| 1.5 Zielsetzung | 27 |
| 2. Material und Methoden | 28 |
| 2.1 Geräte, Materialien und Chemikalien | 28 |
| 2.2 Strukturen der Substanzen | 30 |
| 2.2.1 Retinoide | 30 |
| 2.2.2 Flavonoide | 32 |
| 2.2.3 Menadion | 32 |
| 2.3 Herstellung der Stammlösungen | 33 |
| 2.4 HPLC-System zur Retinoidanalytik | 34 |
| 2.5 Zellkultur | 35 |
| 2.5.1 Charakteristika der Zelllinien | 35 |
| 2.5.2 Stammhaltung und Anzucht der Zellen | 36 |
| 2.5.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen | 37 |

| | |
|--|----|
| 2.5.4 Inkubation der Testsubstanzen | 37 |
| 2.5.4.1 Inkubationsbedingungen für Zell-Zellkommunikation | 37 |
| 2.5.4.2 Inkubationsbedingungen für F9 RAR β -Lac Z | 38 |
| 2.5.4.3 Toxizitätsbestimmung | 38 |
| 2.5.4.4 Inkubationsbedingungen für die immunohistochemische Untersuchung von Connexin43 | 39 |
| 2.6 Kommunikationsassay | 39 |
| 2.7 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität | 41 |
| 2.7.1 Herstellung der Zellextrakte | 41 |
| 2.7.2 Bestimmung der Enzymaktivität | 41 |
| 2.7.3 Proteinbestimmung | 42 |
| 2.8 Immunohistochemische Untersuchungen | 42 |
| 2.8.1 Westernblot-Analyse | 42 |
| 2.8.1.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten | 42 |
| 2.8.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 43 |
| 2.8.1.3 Semi-Dry-Blotting | 44 |
| 2.8.1.4 Immunologischer Nachweis von Connexin43 | 45 |
| 2.8.2 Immunohistochemischer Nachweis von Connexin43 | 46 |
| 2.8.2.1 DAPI-Färbung | 46 |
| 3. Ergebnisse | 47 |
| 3.1 Retinoide | 47 |
| 3.1.1 Einfluss der Retinoide auf die Zell-Zellkommunikation | 47 |
| 3.1.1.1 Allgemeines | 47 |
| 3.1.1.2 A-E: Ergebnisse der Messungen der Zell-Zellkommunikation | 50 |
| 3.1.2 Einfluss der Retinoide auf das Connexin43-Protein | 62 |
| 3.1.3 Der Einfluss der Retinoide auf die subzelluläre Lokalisierung von Connexin43 | 66 |
| 3.1.4 Einfluss der Retinoide auf die Aktivierung des Retinsäurerezeptors RAR β | 74 |
| 3.1.5 Einfluss der Retinoide auf die Kommunikation anderer Zellarten | 77 |
| 3.2 Flavonoide | 81 |
| 3.2.1 Einfluss von (-)-Epicatechin und Genistein auf die Zell- | |

| | |
|---|-----|
| Zellkommunikation | 81 |
| 3.2.2 Einfluss von (-)-Epicatechin auf das Connexin43-Protein | 84 |
| 3.2.3 Interaktion zwischen Phorbol ester (TPA) und (-)-Epicatechin | 84 |
| 3.2.4 Einfluss von TPA / (-)-Epicatechin auf das Connexin43-Protein | 88 |
| 3.2.5 Einfluss von TPA / (-)-Epicatechin auf die Lokalisation des Connexin43-Proteins | 89 |
| 3.3 Menadion (Vitamin K3) | 91 |
| 4. Diskussion | 94 |
| 4.1 Retinoide | 94 |
| 4.1.1 Bestimmung des Einflusses der Retinoide auf die interzelluläre Kommunikation im Farbstoff-Transfer-Assay | 94 |
| 4.1.2 Wirkung der Retinoide auf das Connexin43-Protein | 97 |
| 4.1.3 Einfluss der Retinoide auf die subzelluläre Connexin43-Verteilung | 99 |
| 4.1.4 Einfluss der Retinoide auf den Retinsäurerezeptoren | 103 |
| 4.1.5 Einfluss der Retinoide auf die interzelluläre Kommunikation andere Zellarten | 104 |
| 4.2 Flavonoide und Tumorpromotor TPA | 106 |
| 4.3 Menadion | 109 |
| 5. Zusammenfassung | 111 |
| 6. Literatur | 113 |
| Danksagung | 125 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| AA | Acrylamid |
| AP | aktivierendes Protein |
| APS | Ammoniumperoxydisulfat |
| BAA | N,N'-Methylenbisacrylamid |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| Cx | Connexin |
| DAG | Diacylglycerol |
| DAPI | 4',6'-Diamidino-2-Phenylindolhydrochlorid |
| db-cAMP | Dibutyryl- zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat |
| DDT | Dichlor-diphenyl-trichlorethan |
| DMEM | Dulbecco's modification of Eagle's minimal essential medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| EGF | Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor) |
| ERK1/2 | Extrazellulär regulierte Kinasen 1/2 |
| FCS | Fötales Kalbserum |
| FGF | Fibroblast Growth Factor |
| fos | Protooncogen |
| GJIC | Gap Junctional Intercellular Communication |
| GJs | Gap Junctions |
| HPLC | Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie |
| jun | Protooncogen |
| kD | kilo Dalton |
| LBD | Ligandenbindedomäne |
| mRNA | Messenger-Ribonukleinsäure |
| MAPK | mitogen aktivierte Proteinkinasen |
| ONPG | Ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktosidase |
| ONP | Ortho-Nitrophenol |
| PBS | Natriumphosphatpuffer |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |
| PPAR | Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor |
| RAR | Retinsäurerezeptor |
| RARE | Retinsäurespezifisches responsives Element |
| RXR | Retinoid-x-Rezeptor |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| TATA-Box | At-reiche Stelle vor Startpunkt der Transkription |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TPA | 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat |
| TR | Schilddrüsenhormonrezeptor |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| TTNPB | 4-[(E)-2-(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-1-propenyl]benzoesäure |
| VDR | Vitamin D-Rezeptor |
| ZNS | Ziegennormalserum |
| ZZK | Zell-Zellkommunikation |

1. Einleitung

1.1 Interzelluläre Kommunikation

Im Laufe der Evolution haben sich in mehrzelligen Organismen hoch komplexe Signalübertragungsmechanismen entwickelt, die eine Kommunikation und Koordination zwischen den verschiedenen Zellen und Geweben ermöglichen. Es werden zwei Arten der interzellulären Kommunikation unterschieden:

Eine Form beinhaltet die Sekretion von Signalsubstanzen (Neurotransmittern, Hormonen, Lymphokinen) in den Extrazellulärraum und die rezeptorvermittelte Umsetzung dieser Signale durch die Zielzelle.

Die andere, direkte Form der Kommunikation zwischen Zellen beruht auf der Diffusion niedermolekularer Substanzen durch Zell-Zellkanäle (Gap junctions: GJ), die eine direkte cytosolische Verbindung zwischen benachbarten Zellen und somit eine funktionelle Kopplung des Zellverbandes herstellen. Diese Form der Kommunikation wird als „Gap Junctional Intercellular Communication“ (GJIC) oder interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions (Zell-Zellkommunikation: ZZK) bezeichnet [Evans et al. 2002; Paul et al 1995].

Im Folgenden wird eine Übersicht über den Aufbau von GJ und deren Funktionen gegeben.

1.1.1 Interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions

Gap Junctions bestehen aus einer variablen Anzahl transmembraner wassergefüllter Kanäle, die das Cytoplasma benachbarter Zellen miteinander verbinden und die Diffusion von Molekülen bis zu 1 kDa, z.B. Zuckern, Aminosäuren, Nukleotiden oder Signalstoffen erlauben. Die einzelnen Kanäle bestehen aus je zwei Hemikanälen, den so genannten Connexonen, die aus je 6 Untereinheiten gebildet werden. Diese Untereinheiten werden als Connexine bezeichnet und anhand ihres Molekulargewichts unterschieden. Die Bezeichnung Connexin 43 bedeutet z.B., dass

dieses Connexin-Protein ein Molekulargewicht von 43 kD aufweist. Der Durchmesser der Kanäle beträgt 2-4nm (**Fig. 1**). Bisher wurden ca. 20 homologe Produkte der Connexingene in Mensch und Maus identifiziert [Willecke et al., 2002].

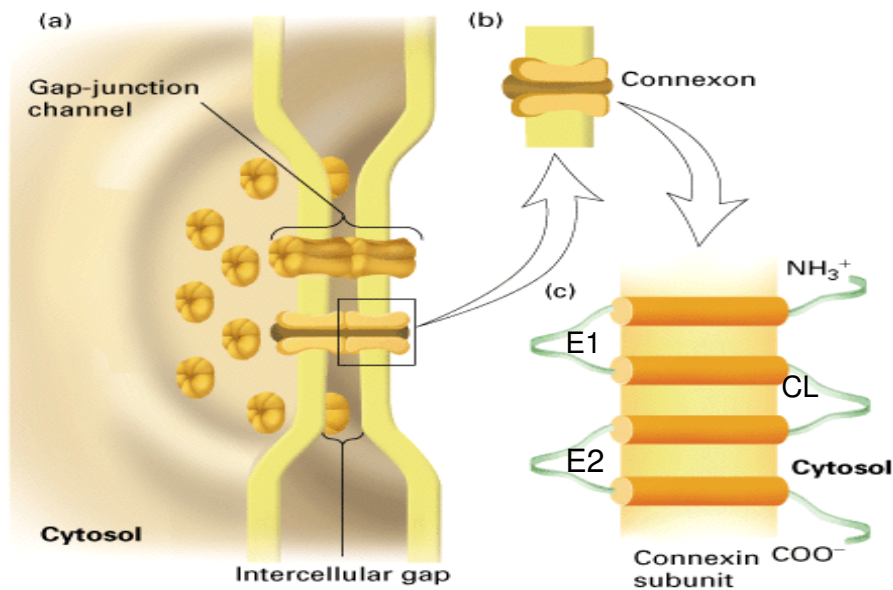


Fig. 1

a-b) Schematische Darstellung der Gap Junctions; jeweils 6 Untereinheiten (Connexine) bilden einen Halbkanal (Connexon); c) Membrantopologie der Connexine

In Säugetieren sind Connexine in nahezu allen Geweben nachweisbar. Es gibt 2 Hauptconnexinklassen, α und β . Da die meisten Zelltypen mehr als eine Connexinisoform exprimieren, können die hexameren Hemikanäle homomerisch oder heteromerisch aufgebaut sein. Damit können die Gap Junctions homotypisch oder heterotypisch gestaltet sein [Jiang and Goodenough 1996] (**Fig. 2**).

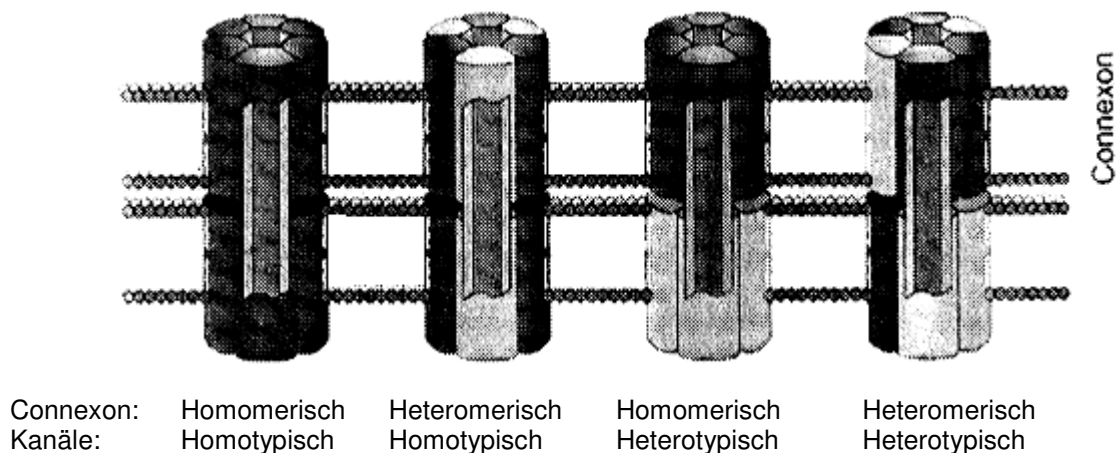


Fig. 2: Mögliche Konfigurationen funktioneller Zell-Zellkanäle [Evans et al., 2002].

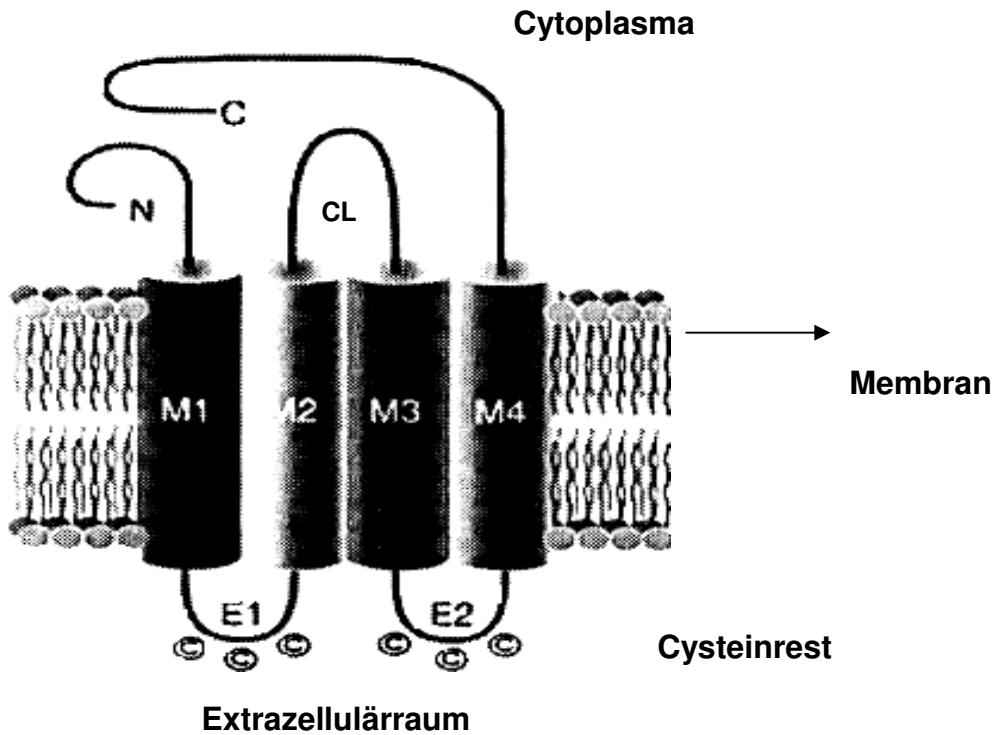


Fig. 3: Membrantopologie der Connexine mit den unterschiedlichen Domänen [Evans et al., 2002].

Allgemein kann davon ausgegangen werden, dass heteromere Gap Junctions nur zwischen Connexinen der gleichen Klasse gebildet werden. Nicht alle Connexine lassen sich zu funktionellen Kanälen kombinieren, so sind z.B. Connexin40 und Connexin43 nicht kompatibel [Evans et al. 2002; Haubrich et al., 1996].

Alle Connexine zeigen eine ähnliche Membrantopologie. Die Polypeptidkette der Connexine umschließt viermal die Plasmamembran in einer M-Form mit den amino- und carboxyterminalen Regionen sowie der zentralen Schleife im Cytoplasma (**CL**). Die vier Transmembranbereiche (**Fig. 3: M1-M4**), die zwei extrazellulären Schleifen (**E1-E2**) sind hoch konserviert, dagegen sind die intrazellulären cytoplasmatischen Schleifen und carboxyterminalen Regionen im Cytoplasma variabel (**Fig. 1C und Fig. 3**). Die intrazelluläre aminoterminalen Region (**N**) zeigt bei allen Connexinen die gleiche Länge (**Fig. 3**) [Simon and Goodenough 1998; Trosko and Ruch 1998]. Es befinden sich drei Cysteinreste in den zwei extrazellulären Schleifen, die wahrscheinlich bei der Bildung funktionsfähiger Kanäle mitbeteiligt sind [Hennemann et al., 1992]. Diese Cysteinreste kommen in fast allen Connexinproteinen außer in Connexin31 vor.

Der große Unterschied zwischen den Connexinen liegt in der Länge und Sequenz der intrazellulären carboxyterminalen Region (**C**). Es wird angenommen, dass diese Region in die Regulierung der GJ-Bildung und Kanalpermeabilität involviert ist.

In eukaryotischen Zellen wird die strukturelle und biochemische Zusammensetzung der Membranbestandteile und Organellen durch Transportproteine bestimmt. Die Funktionsfähigkeit der GJ ist abhängig vom korrekten Ein- und Aufbau der Connexine. Die meisten Plasmamembranproteine werden in membrangebundenen Ribosomen synthetisiert und durch Vesikel vom ER zum Golgi-Apparat befördert. Bisher wurde angenommen, dass Connexinuntereinheiten im Golgi-Apparat zu Connexonen oligomerisiert und anschließend durch Adhäsionsmoleküle zur Membran transportiert werden [Musil and Goodenough 1993]. Neuere Daten zeigen jedoch, dass die Oligomerisation der Connexine ein fortlaufender Prozess ist, der im ER oder dem entsprechenden ERGIC („Endoplasmic-golgi-intermediate compartment“) beginnt und nach Erreichen des Golgi-Apparates abgeschlossen wird [Diez et al., 1999; Georg et al., 1999; Samar et al., 2001].

Es gibt verschiedene Faktoren, die den Connexin-Transport und Umsatz (turnover) beeinflussen [Paulson et al., 2000]. Mit unterschiedlichen Halbwertszeiten (2-5 Std.) werden Connexine aus der Membran ausgebaut und von Lysosomen oder Proteasomen abgebaut [Laird et al., 1996; Laing and Beyer 2000]. Es wird angenommen, dass Endosomen beim Transport des Connexins32 von der Plasmamembran zu den Lysosomen und somit beim Abbau (Autophagie) der Connexine eine Rolle spielen [Pol et al., 1997; Haftek et al., 1999; Jordan et al. 2001]. In Säugetieren sind Connexine in nahezu allen Geweben nachweisbar, mit der Ausnahme von einigen Nervenzellen, Erythrozyten und Spermien.

Connexin43 ist das am häufigsten vorkommende Connexin, z.B. in der Epidermis, im Rückenmark, im Myokard und in den Endothelzellen [Di et al., 2001; Kiehn and Tresch 2002; Evans and Martin 2002]. Die Verteilung der Connexine ist gewebe-spezifisch, z.B. kommt Connexin32 vorwiegend in der Leber, Connexin43 im Herzen, Niere, Haut, Gehirn, Intestinaltrakt und auch in der Gallenblase vor [Bennett et al., 1991; Willecke et al., 1991; Vorge et al., 1999; Vaney et al., 1999, Ruch und Trosko 1999, Willecke et al., 2002]. Zusätzlich zu der Gewebespezifität konnte auch eine zeitabhängige Expression während der Entwicklungsphase beobachtet werden [Delome et al., 1995].

1.1.2 Funktion der Zell-Zellkommunikation über Gap Junctions

Eine der wichtigsten Funktionen der Gap Junctions ist die Regulierung von Proliferations- und Differenzierungsprozessen über den Austausch von Ionen und niedermolekularen Substanzen zwischen benachbarten Zellen. Durch den Stoffaustausch über GJ wird die Gewebemöostase während der embryonalen Entwicklung und im multizellulären Organismus reguliert [Krutovskikh und Yamasaki 1997]. Je nach Zelltyp und Gewebe werden der GJIC besondere Funktionen zugeordnet. Bei Neuronen, Cardiocyten und Zellen der glatten Skelettmuskulatur dienen Gap Junctions der Übertragung elektrischer Signale [Jongsma et al., 1993].

Die besondere Bedeutung der Connexine wird auch bei Krankheiten deutlich, die durch Funktionsstörungen von Gap Junctions hervorgerufen werden. Als erste genetische Abnormität von GJ wurden die Mutationen des Connexin32-Gens bei Patienten mit Charcot-Marie-Tooth-X Syndrom (CMT-X) beschrieben [Bergoffen et al., 1993]. Inzwischen wurden über 200 Connexin32 Mutationen bei CMT-X identifiziert [Nelis et al., 1999]. Diese Krankheit zeichnet sich durch eine degenerative Änderung der peripheren Nerven mit Hypertrophie der Schwannschen Scheide aus, die sich klinisch als chronisch fortschreitende Muskeldystrophie äußert.

Einige der humanen hereditären Erkrankungen werden durch Connexinmutationen hervorgerufen. Mutationen im Connexin26 sind mit der Inzidenz von Hautkrankheiten korreliert [Kelsell et al 2001]. Das Auftreten zweier unterschiedlicher Formen der Augenlinsentrübung wird mit der Mutation von Connexin46 und 50 Genen in Verbindung gebracht [Pal et al., 2000].

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Connexin43-Expression in Astroglialzellen eine wichtige neuroprotektive Rolle spielt. So korreliert z.B. bei der Alzheimer Erkrankung ein Anstieg der β A4-Amyloidplaques mit einer erhöhten Connexin43-Expression oder einer erhöhten Connexin30 Immunreaktivität [Nagy et al., 1999].

1.1.3 Regulation der Zell-Zellkommunikation

Die Connexinproteine haben im Organismus eine relativ kurze Halbwertszeit von zwei bis fünf Std., wobei zahlreiche Faktoren ihren kontinuierlichen Auf- und Abbau beeinflussen können. Es wird angenommen, dass sich die Connexinmenge als Reaktion auf ein rezeptor-aktiviertes Signalsystem ändert. Viele toxikologisch und pharmakologisch aktive Substanzen sind in der Lage, sowohl die direkte als auch die verzögerte Regulation der Connexinmenge zu beeinflussen. Endogene Substanzen sind auch an der Regulation beteiligt. In Abhängigkeit vom Gewebe- und Connexintyp können dabei erhebliche Unterschiede in der Auswirkung auf dieselben Regulationswege beobachtet werden.

Zu den wichtigsten Faktoren, die die interzelluläre Kommunikation beeinflussen, gehören:

- pH-Wert: die Senkung des zellulären pH-Wertes von ca. 7,4 auf 6,5 bis 6,8 führt in vielen Zellen zu einer Abnahme der ZZK [Spray et al., 1985]
- Calcium: die Erhöhung der cytoplasmatischen Konzentration an freiem Calcium führt zu einer Abnahme der Kommunikation. Höhere Konzentrationen um $0,05 \mu\text{M Ca}^{2+}$ führen sogar zu einer vollständigen Hemmung der ZZK [Bruzzone et al., 1996]
- cAMP: die Wirkungsweise von cAMP ist abhängig vom Gewebe- und Connexintyp. Die Exposition von Zellen kann sowohl zu einer Erhöhung als auch einer Senkung der GJIC führen. Die Auswirkung des cAMP wird teils mit einer vermehrten Expression der Connexingene, teils mit der Phosphorylierung des Connexin32 an einem Serinrest durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) erklärt [Hotz-Wagenblatt et al., 1993].

Es sind auch andere Möglichkeiten der Beeinflussung der interzellulären Kommunikation bekannt. So führt die Exposition der Zellen mit Tumorpromotoren (Phorbolester, Lindan, DDT), Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF) und Onkogenen (ras, raf, scr) zu einer Inhibition der ZZK [Trosko and Ruch 1998; Hu et al., 1995].

Für die meisten Connexine wird eine posttranslationale Modifikation als molekularer Mechanismus der Hemmung angenommen.

Ein basales Niveau an posttranslationaler Phosphorylierung ermöglicht den Zusammenbau funktioneller Kanäle und die Aktivierung der GJIC [Musil et al., 1990]; eine Hyperphosphorylierung des Connexin-Proteins an den Aminosäuren Serin und Threonin führt dagegen zu einer Hemmung der Kommunikation.

Die Phosphorylierung von Aminosäureresten der carboxyterminalen Region durch Proteinkinasen stellt somit eine Möglichkeit der Beeinflussung der Kommunikation dar. Die serin-, threonin- und tyrosinspezifischen Kinasen gehören zu den wichtigsten Kinasen mit Einfluss auf die ZZK. Proteinkinase A (PKA reguliert durch cAMP), Proteinkinase C (PKC reguliert durch DAG) und mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) gehören zu den serin- und threoninspezifischen Kinasen. In der Sequenz des Connexin43-Proteins gibt es mehrere Positionen, die von PKA, PKC und MAPK phosphoryliert werden können [Yamasaki et al., 1997]. Zum Beispiel führt die Phosphorylierung des Ser368-Restes im Connexin43-Protein der Ratte durch PKC *in vivo* zur Abnahme der interzellulären Kommunikation [Lampe et al., 2000].

Phorbolster sind in der Lage, über die Aktivierung der PKC eine Phosphorylierung des Connexin43 am Serin- oder Threoninrest zu vermitteln und dadurch die ZZK zu hemmen. Es wird jedoch angenommen, dass die PKC *in vivo* nicht der eigentliche Phosphorylierungsvermittler bei Connexin43 ist [Saez et al., 1997]. In einem *in vivo* Versuch unter Einwirkung eines Wachstumsfaktors konnte gezeigt werden, dass MAPK Connexin43 an 3 verschiedenen Serinresten phosphorylieren kann [Warn-Cramer et al., 1998]. Es wird zudem noch angenommen, dass MAPK von der PKC aktiviert werden kann.

Die Regulation der ZZK findet auch durch die Veränderung der Connexin-Expression statt [Bex et al., 1995; Clairmont et al., 1996], wobei auch die stabilisierende Effekte auf die Connexin-mRNA eine Rolle spielen.

Die Charakterisierung von regulatorischen Elementen in der Promotorregion zeigt für Connexin 43, dass es sowohl eine TATA-Box, als auch AP-1 (Activator Protein 1) und AP-2 Bindungsstellen gibt [Chen et al., 1995]. Die AP-1 Bindungsstellen, an die die Transkriptionsfaktoren Fos und Jun binden, kommen in Connexinen von Mensch, Maus und Ratte vor. Die transkriptionale Aktivierung des Connexin43-Gens scheint eine wichtige Rolle zu spielen. Die Aktivierung der PKC in kultivierten Muskelzellen der menschlichen Gebärmutter, die Connexin43 exprimieren, führt zu einem Anstieg von c-Jun und c-Fos. Dadurch wird eine Hochregulation der Connexin43-Transkription durch ein AP-1 Element im Promotorbereich des Connexin 43

ausgelöst und eine Vermehrung der Connexin43 Proteinmenge verursacht [Geimonen et al., 1996]. Einige Substanzen wie Retinoide können durch die Erhöhung der Connexin43-Proteinmenge die ZZK beeinflussen [Clairmont et al., 1996]. Ebenso sind auch Flavone, Vitamin D, Melatonin, Schilddrüsenhormone und Thalidomid in der Lage die ZZK zu stimulieren [Chaumontet et al. 1994; Stahl et al., 1994; Ubeda et al., 1995, Stock et al., 1998 und Nicolai et al., 1997].

1.1.4 Zusammenhang zwischen ZZK, Teratogenese und Embryogenese

In der pränatalen Entwicklung der Säugetiere gibt es vier Phasen: Gametogenese, Blastogenese, Embryogenese und Fetogenese. Dabei erfolgt während der Gametogenese die Entwicklung der Keimzellen, die Blastogenese stellt die ersten Teilungen der Zygote bis zur Differenzierung des Keimes in Embryoblast und Trophoblast dar. Die Embryogenese umfasst die Anlage von Organen und Organsystemen sowie die Organdifferenzierung (Morphogenese). Morphogene (Signalmoleküle) lösen eine Entwicklungskaskade in den Zielzellen aus. In vielen Fällen ist der erste Schritt die Aktivierung von Homöobox-Genen (Entwicklungskontrollgenen). Weiteres Wachstum und Ausreifung des Keimes findet während der Fetogenese statt. Die höheren Lebewesen beginnen in der frühen Embryonalentwicklung sich dreidimensional auszurichten [Rogers et al. 1997]. Die Ausbildung von GJ wurde auch in embryonalem Gewebe beobachtet. Es wird angenommen, dass GJIC am Entwicklungsprozess beteiligt ist [Goodenough et al., 1996]. Connexin43 ist mitverantwortlich für die Morphogenese der Extremitäten von Hühnerküken während der frühen embryonalen Entwicklung [Dealy et al., 1994, Makarenkova and Patel 1999]. An Embryonen von Mäusen und Insekten wurde gezeigt, dass die interzelluläre Kommunikation über GJ auf Zelldomänen desselben Entwicklungspotentials beschränkt ist [Damen und Dictus 1993]. Bereiche zellulärer Kommunikation stimmen in der frühen Embryogenese sowohl zeitlich als auch räumlich mit Entwicklungskompartimenten überein. Zellen innerhalb dieser Kompartimente zeigen eine hohe Kommunikation, während die Zellkopplung über GJ an den Grenzen verschiedener Kompartimente niedrig ist.

Mit dem Begriff der Teratogenese bezeichnet man die Entstehung pränataler Fehlbildungen. Die Teratogenität wird als die Fähigkeit von chemischen Substanzen

(z.B. Retinoide, Thalidomid) und physikalischen Faktoren (z.B. ionisierende Strahlung) oder biologischen Noxen kongenitale Fehlbildungen hervorzurufen, beschrieben. Teratogene Substanzen weisen eine Phasenspezifität auf. Missbildungen entstehen nur dann, wenn der Embryo in einer definierten Entwicklungsphase dem Teratogen ausgesetzt ist [Mast et al., 1985]. Die GJIC wird durch einige teratogene Substanzen wie Retinsäure [Metha et al., 1989, Stahl et al., 1998] und Thalidomid [Nicolai et al., 1997] stimuliert. Retinsäure führt zu verschiedenen kongenitalen Defekten, von offener Gaumenspalte bis zu einer Missbildung der Extremitäten.

1.2 Retinoide

1.2.1 Definition, Vorkommen, Funktion und Metabolismus der Retinoide

Definition

Vitamin A und seine Derivate werden nach der IUPAC Nomenklatur unter dem Begriff *Retinoide* zusammengefasst. Somit gehören Retinoide zu einer Klasse von Verbindungen, die aus einem hydrophoben β -Iononring, einer konjugierten Tetraseitenkette und einer polaren Endgruppe bestehen.

All-trans-Retinol, all-trans-Retinal und all-trans-Retinsäure und ihre *cis*-Isomere sind einige Beispiele natürlich vorkommender Retinoide (**Fig. 4**).

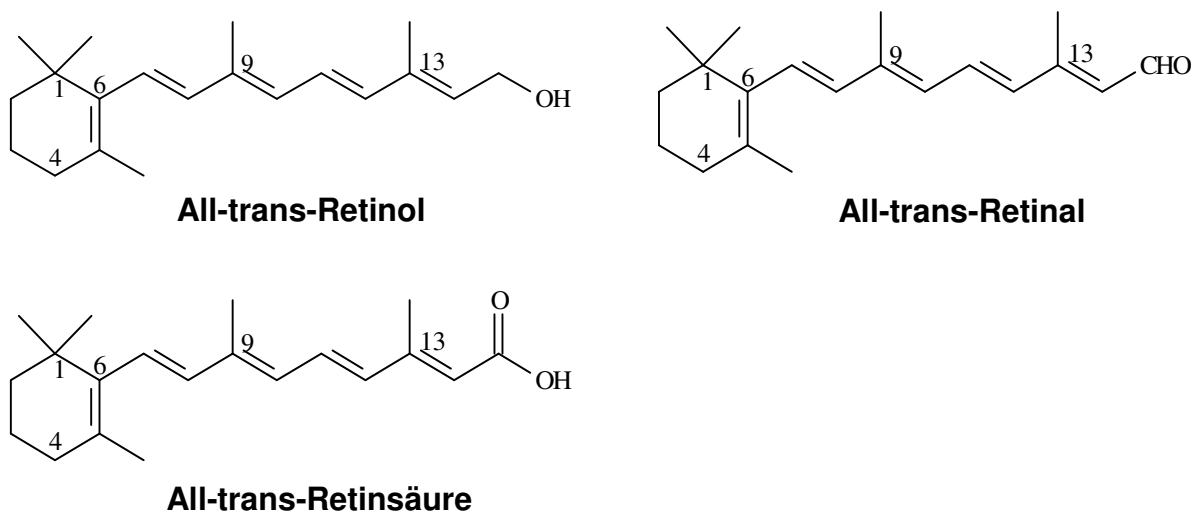


Fig. 4: Struktur von einigen natürlich vorkommenden Retinoiden

In den 80er Jahren wurden synthetische Verbindungen, z.B. TTNPB hergestellt (**Fig. 5**), die sich strukturell von den natürlichen Retinoiden unterscheiden, aber trotzdem eine ähnliche biologische Aktivität aufweisen wie Retinol oder Retinsäure [Newton et al. 1980]. Die Definition der Retinoide wurde daraufhin erweitert: Retinoide sind eine Klasse von Substanzen, die spezifische biologische Antworten durch die Bindung an und Aktivierung von Retinsäure-Rezeptoren hervorrufen. Das Ersetzen des β -Iononrings durch einen substituierten Benzolring führt zu aromatischen Verbindungen, von denen einige einen höheren therapeutischen Index als die natürlichen Retinoide aufweisen (z.B. Etreinat) (**Fig. 5**).

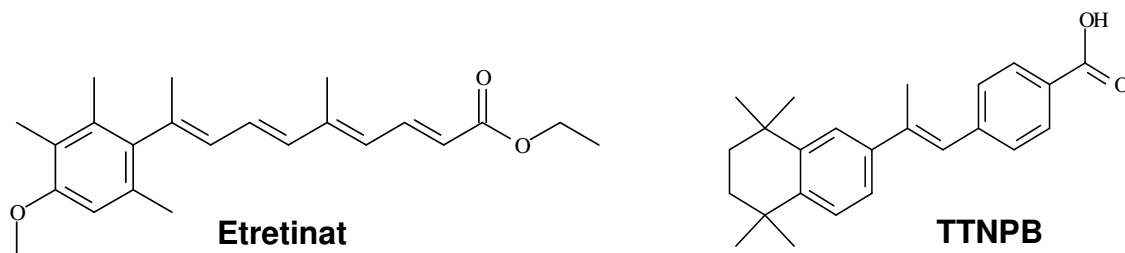


Fig. 5: Struktur von einigen synthetischen Retinoiden

Vorkommen, Metabolismus und Funktion:

Das Vitamin A gehört zu den Vertretern der fettlöslichen Vitamine und ist ein Bestandteil der Nahrung. Vitamin A wird entweder in Form von Carotinoiden (Provitamine) aus pflanzlichen oder als Retinylester aus tierischen Nahrungsmitteln aufgenommen. Carotinoide sind rote, gelbe oder orangefarbene fettlösliche Pigmente, die von Pflanzen und photosynthetisch aktiven Mikroorganismen synthetisiert werden. Die Grundstruktur der Carotinoide besteht aus 8 Isopreneinheiten. Es gibt über 400 Carotinoide, von denen jedoch nur wenige zu Vitamin A metabolisiert werden können und somit eine Provitamin-A-Aktivität aufweisen. Bei den Carotinoiden zeigt β -Carotin die höchste Provitamin-A-Aktivität. Die Spaltung der Provitamin-A aktiven Carotinoide erfolgt in der Darmmucosa und zu einem geringen Teil in Leber und Niere.

Für den enzymatischen Abbau der Carotinoide zu den Retinoiden sind zwei Wege bekannt:

a) Durch zentrale Spaltung mittels des Enzyms 15-15'- β -Carotin-Oxygenase entstehen zwei Moleküle Retinal, die nachfolgend zu Retinol oder Retinsäure umgewandelt werden können.

b) Durch exzentrische Spaltung an verschiedenen Doppelbindungen werden Carotinoide in verschiedene β -Apo-Carotenale überführt. Daraus kann in Folgereaktionen auch Retinol gebildet werden.

Das freie oder an spezifische Transportproteine gebundene Retinol wird im Darm (Enterozyten) enzymatisch mit langkettigen Fettsäuren (meist Palmitin und Stearinsäure) verestert. Verestertes Retinol wird in Chylomikronen eingebaut, die über die Lymphbahnen in das Blut gelangen. Im Blut werden die Chylomikronen zu Chylomikronenremnants abgebaut. Während dieser Umwandlung durch Lipoproteinlipasen (LPL) werden die Retinylester freigesetzt und können in verschiedene Gewebe aufgenommen werden. Dieser Aufnahmeweg führt zu einer direkten Versorgung der Zielzelle unabhängig vom Transfer des Vitamins über die Transportproteine. Wenn die Chylomikronenremnants die Leber erreichen, werden die aufgenommenen Retinylester zu Retinol hydrolysiert und in den Speicherzellen (Stellatumzellen) der Leber wieder verestert und dann gespeichert. Bei Bedarf werden die Ester zu Retinol hydrolysiert, das an spezifische Transportproteine gebunden transportiert und beim Erreichen der Zielzelle zu Retinsäure metabolisiert wird. Es wird angenommen, dass spezifische Enzyme die Metabolisierung von Retinol zu Retinsäure katalysieren. Retinsäure wird intrazellulär in einer Reihe von Oxidations- und Isomerisierungsreaktionen metabolisiert; auch die Metaboliten können teils die nukleären Retinsäurerezeptoren aktivieren. Zu diesen Metaboliten gehören 4-Oxo-Retinsäure und 9-*cis*-Retinsäure [Malik et al. 2000] (**Fig. 6.**). Auch die Aldehyde des Retinols haben eine wichtige Funktion. Das 11-*cis*-Retinal spielt beim Sehprozess eine zentrale Rolle (Rhodopsinzyklus), auf die hier im Detail nicht eingegangen werden soll.

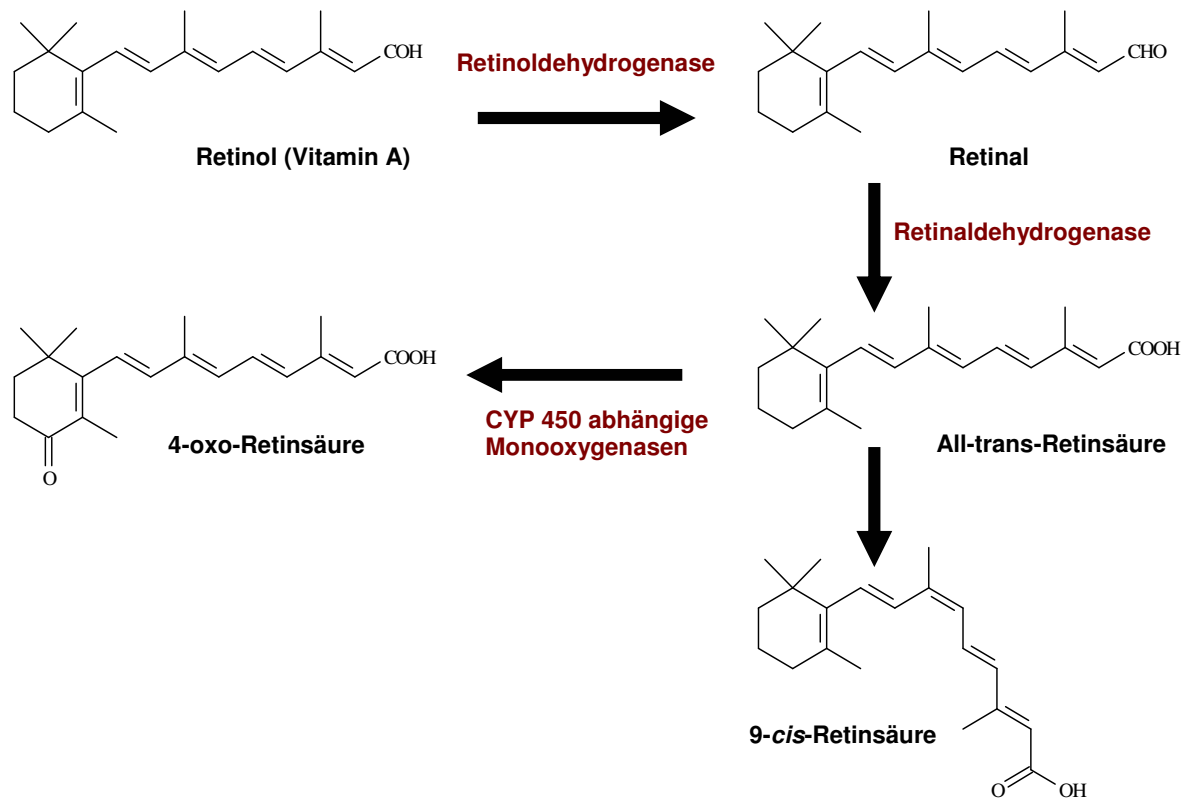


Fig. 6: Metabolisierung von Vitamin A und Retinsäure.

Retinsäure selbst findet sich nur in sehr geringen Konzentrationen im Plasma [Napoli et al., 1986, Randolph et al., 1997].

Die *cis/trans* Isomerisierung - insbesondere von Retinsäure - stellt eine wichtige Reaktion dar. Auch von Retinol und Retinylestern sind Stellungsisomere bekannt [Brinkmann et al., 1995]. Andere Metabolisierungsprodukte des Retinols sind 3,4-didehydroretinol (3,4-ddROH), das als Vitamin A 2 bekannt ist. Auch 14-hydroxy-4,14-retro-retinol (14-HRR) konnte als ein Hauptmetabolit des Vitamin A in Plasma von Nagetieren nach oraler Aufnahme einer pharmakologischen Dosis von Vitamin A nachgewiesen werden. Oral verabreichte Retinoide wie die therapeutisch wirksame all-*trans*-Retinsäure und 13-*cis*-Retinsäure (Isotretionin) werden durch passive Diffusion vom Dünndarmepithel aufgenommen und anschließend nach Passage der Leber gebunden an Albumin im Blutkreislauf transportiert [Blaner and Olson 1994]. Vitamin A und seine natürlichen Derivate sind für eine große Anzahl biologischer Prozesse wie Wachstum, Sehvorgang, Zelldifferenzierung- und proliferation, Reproduktion und Embryonalentwicklung zuständig.

1.2.2 Retinoid Bindungsproteine, Rezeptoren und responsive Elemente

Zelluläre Bindungsproteine

Auf Grund der sehr geringen Wasserlöslichkeit der Retinoide müssen sie in der wässrigen Umgebung des Organismus zum Transport an spezielle Proteine gebunden werden. Es gibt für Retinol die „cellular retinol binding proteins“ CRBP, CRBPI und CRBP II und für Retinsäure, „cellular retinoic acid binding proteins“ CRABP, CRABPI, und CRABPII [Napoli et al., 1999]. CRBPI ist ubiquitär im Organismus und kommt in höchsten Konzentrationen in Leber und Niere vor. CRBP II findet sich ausschließlich in den Darmepithelzellen. CRBPI und II können Retinol und Retinal binden, wobei CRABPI und II Retinsäure und seine Metaboliten (4-hydroxy-Retinsäure; 4-oxo-Retinsäure) binden [Napoli et al., 1995]. Während die wesentliche Aufgabe des CRABP darin besteht, Retinsäure im wässrigen Kompartiment des Plasmas zu transportieren, besteht die Aufgabe des CRBP darin, verschiedene Blutgewebescheiden für Retinoide passierbar zu machen [McDonald et al. 1990].

Nukleäre Retinoid Rezeptoren

Zahlreiche Wirkungen der Retinoide werden über kernständige ligandenabhängige Rezeptoren vermittelt. Es sind 2 Familien nukleärer Retinoid-Rezeptoren bekannt: die Retinsäure-Rezeptoren (*Retinoic Acid Receptor*) *RAR* und die Retinoid X Rezeptoren (*Retinoid X Receptor*) *RXR*. Sie gehören zu der Superfamilie der Hormonrezeptoren, zu denen auch der Thyroidhormon-Rezeptor (TR), der Vitamin D-Rezeptor (VDR) und die peroxisomenproliferatoraktivierten Rezeptoren (PPAR) zählen. Bei den Liganden der Rezeptoren handelt es sich um lipophile Hormone wie z.B. Steroidhormone, Schilddrüsenhormone, Vitamin A- und D-Derivate, die die Membran passieren können.

Alle Rezeptoren aus der Familie der liganden-aktivierbaren Transkriptionsfaktoren enthalten sechs verschiedene Domänen. Die aminoternale A- und B-Region haben eine transkriptionsaktivierende Funktion. Die C-Region enthält 2 Zinkfinger Elemente, die bei der DNA-Bindung auch eine Rolle spielen. Die D-Region ist für die Bindung der Corepressoren verantwortlich. Die konservative E-Region enthält die Ligandenbindungsdomäne. Die F Region ist die Stelle der Derepression und CBP [Chambon et al., 1996] (**Fig. 7**).

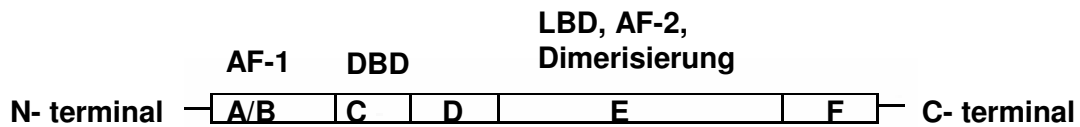


Fig. 7: Übersicht über die Domänen der nukleären Rezeptoren

A/B: Aktivierung der Genexpression, AF-1

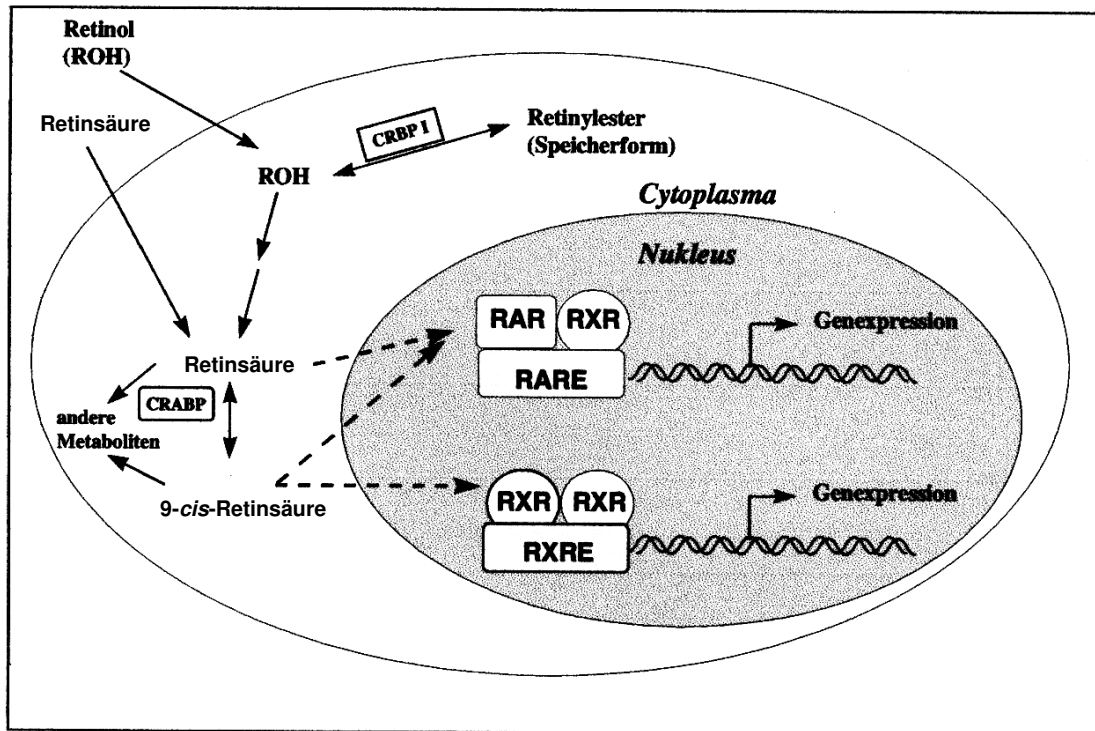
C: DBD (DNA-Bindungsdomäne), 2 Zinkfinger motive, Dimerisierung

D: Scharnierregion (C und E sind durch D miteinander verbunden)

E: LBD: (Ligandenbindungsdomäne)

All-*trans*-Retinsäure und einige ihrer Derivate sind natürliche Liganden von RAR. 9-*cis*-Retinsäure zeigt nur eine sehr geringe Affinität zu RAR, jedoch eine hohe Affinität zu RXR.

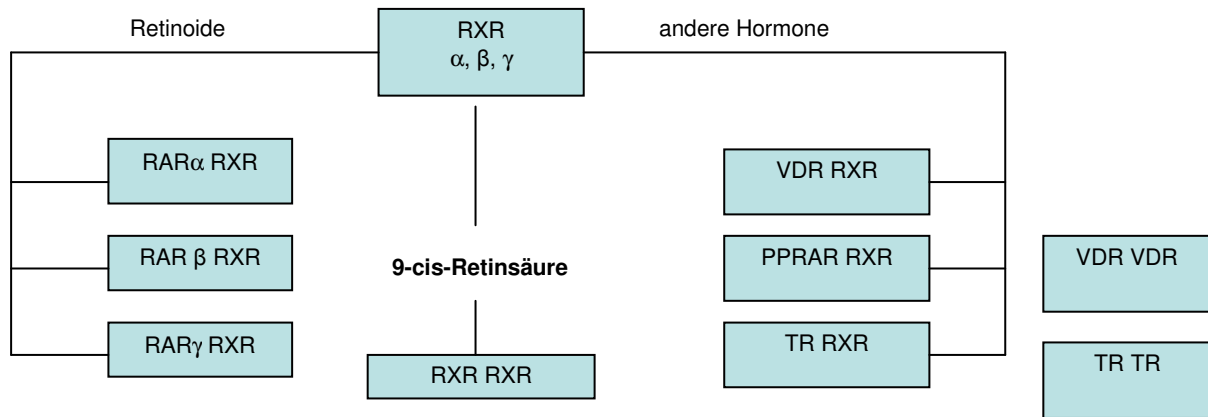
Beide Rezeptorfamilien haben jeweils drei Subtypen, die als α , β und γ bezeichnet werden. Die durch Ligandenbindung aktivierten Rezeptoren binden an eine spezifische DNA-Sequenz - das sogenannte responsive Element - in Form von Homo- oder Heterodimeren. Damit RAR an *RARE* (*Retinoic acid-Responsive Element*) binden kann, ist es notwendig, dass RAR mit RXR vorher einen heterodimeren Komplex bildet. RXR hingegen kann nicht nur als Heterodimer sondern auch als Homodimer agieren (**Fig. 8 A/B**).



(Fig. 8 A): Schematische Darstellung der Wirkung von Retinoiden in der Zielzelle über Retinsäurerezeptoren.

RXR ist auch in der Lage mit dem TR und VDR Heterodimere zu bilden. RXR fungiert einerseits bei Abwesenheit des Liganden als stiller Partner, andererseits mit gebundenen Liganden als aktiver Partner in der Signaltransduktion. Daher ist der RXR als Co-Regulator von vielen nukleären Rezeptoren von Bedeutung. Dies unterstreicht zudem die Rolle der Retinoide in der Steuerung biologischer Prozesse [Chambon et al., 1996] (Fig. 8 B).

Die Expression der Retinoidrezeptoren ist sowohl gewebe- als auch entwicklungspezifisch. RAR α kommt ubiquitär vor. Der RAR β weist ein sehr spezifisches Expressionsmuster auf. RAR γ findet man vorzugsweise in der Haut [Fisher und Voorhees 1996].



(Fig. 8 B): Interaktion zwischen nukleären Rezeptoren (Dimerenbildung)

Die retinsäurespezifischen responsiven Elemente (RARE; RXRE) und AP1

Die Regulierung der Genexpression durch Retinoide und ihre Rezeptoren kann entweder transkriptional oder posttranskriptional erfolgen. Auf der transkriptionalen Ebene können Effekte durch die Wechselwirkung eines aktivierten Retinsäurerezeptors mit RARE oder RXRE eines Gens vermittelt werden [Tzimas et al. 2001].

Die Retinsäurerezeptoren binden als Heterodimer an eine spezifische DNA-Sequenz, die als RARE bezeichnet wird. Das RARE im RAR β – Promotor, das die retinsäureinduzierte RAR β 2 Genexpression in vielen Zelltypen reguliert, bindet nur RAR-RXR Heterodimere. Gene, die RAREs in ihrer Promotorsequenz enthalten, sind sowohl an der Embryogenese als auch der Regulation von Wachstum und Differenzierungsprozessen beteiligt [Deluca et al., 1991]. Unter den retinsäure-responsiven Genen mit einem RARE in der Promotorregion gibt es auch eine große Anzahl, die für retinoid-bindende Proteine kodieren. Weitere Gene mit RARE kodieren für das humane Laminin B1 und die ADH-3 (Alkoholdehydrogenase Klasse 3) und die Proteine der Homöoboxgene, die in der Embryonalentwicklung eine zentrale Rolle spielen [Deluca et al., 1991]. Bei einer hohen Konzentration an 9-cis-Retinsäure bildet sich ein RXR/RXR Homodimer, das an RXRE bindet. Die Gene von Ratten CRBP II, Maus CRABP II und das menschliche Apolipoprotein A1 weisen in ihrem Promotor RXRE auf. Die Transaktivierung der retinsäurespezifischen responsiven Elemente durch Retinsäurerezeptoren scheint einer der wichtigsten Mechanismen bei der Induktion der Zelldifferenzierung zu sein.

Die Retinsäure-Rezeptoren können außer mit RARE auch mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 (Activator Protein 1) reagieren. AP-1 ist ein Dimer aus den c-jun und c-fos, deren Aktivität durch Tumorpromotoren und Wachstumsfaktoren stimuliert wird. Die Tumorpromotoren können AP-1 durch Bindung an die AP-1-Bindungsstelle in der Promotorregion des Zielgens aktivieren.

Es werden 2 Wege der Interaktion zwischen Retinsäurerezeptoren und AP-1 angenommen:

- a) RAR und c-jun- Protein bilden durch direkte Protein-Proteininteraktion ein Heterodimer [Pfahl et al., 1993],
- b) bei Anwesenheit von retinsäureaktiviertem RAR und zellspezifischen Faktoren kann eine c-jun und c-fos Heterodimerisierung nicht stattfinden [Zhou et al., 1999]. Retinsäure kann die Transkription von c-jun und c-fos hemmen [Li et al., 1994]. Die AP-1 Transrepression durch die Retinoide gilt als wichtiger Mechanismus, der für die inflammatorischen und antineoplastischen Eigenschaften der Retinoide verantwortlich ist (**Fig 9**) [Fischer und Voorhees 1996; Göttlicher et al., 1998; Li et al., 1999].

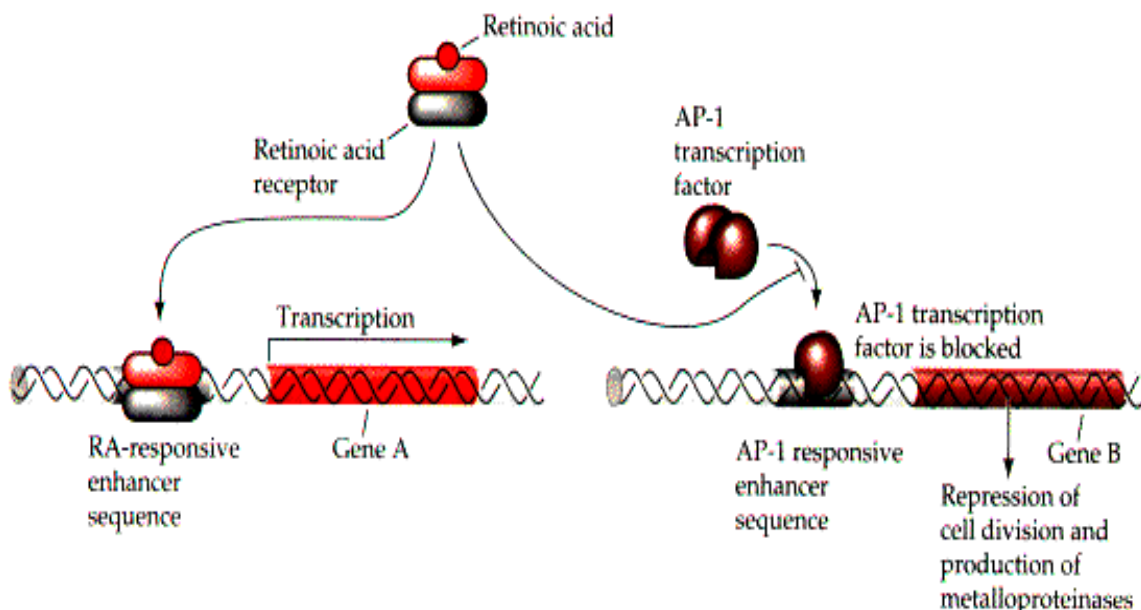


Fig. 9: Regulation der Genexpression, AP-1 abhängige Gene durch Retinoide

1.2.3 Therapeutische Anwendungen und Teratogenität

Retinoide und Analoge der Retinsäure werden bei der Behandlung dermatologischer Erkrankungen wie Akne und Psoriasis, in der Krebstherapie und Chemoprävention eingesetzt. [Depalo et al., 1995].

Es wurden viele Retinoide synthetisiert und auf ihre biologische Aktivität untersucht. Tazaroten (Zorac) ist ein rezeptorselektives Retinoid, das zur Behandlung der Psoriasis eingesetzt wird. Es ist ein Ester, der im Körper rasch in die aktive freie Säure umgesetzt wird. Bei der Therapie der Akne werden auch all-trans-Retinsäure und 13-cis-Retinsäure verwendet. Neben der Therapie von Hauterkrankungen werden Vitamin A-Derivate bei der Prävention und Behandlung bestimmter Krebserkrankungen eingesetzt. Klinische Untersuchungen haben gezeigt, dass Retinoide die Bildung einiger Zweitumoren vermindern können. Z.B. werden zur Prävention der Zweittumorbildung beim Lungenkrebs 13-cis-Retinsäure (Isotretinoin) und Retinoylpalmitat eingesetzt. Acyclische Retinoide hemmen die Bildung von sekundären Hepatozellulärkarzinomen nach einer Resektion von primären Leberkrebs [Konstantin et al., 2000].

Es zeigte sich, dass ein VitaminA-Mangel Plattenepithelmetaplasien im oberen Atemtrakt auslösen kann, die einer Präkanzerose von Rauchern ähnelt. Zudem findet man beim VitaminA-Mangel ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko [Zhang et al., 1994; Zou et al., 1998; Lotan et al. 1997]. Die Expression von RAR β ist während der frühen Phase der Karzinogenese verringert. Eine Absenkung der RAR β -Expression wurde bei der Pathogenese des Brust-, Lungen- Hals-, Bauchspeicheldrüsen- und Kehlkopfkrebsses gefunden [Kaiser et al., Castillo et al., 1997]. Diese Abnahme an RAR β in frühen malignen Zellen könnte die Entwicklung von Tumorgewebe fördern [Lotan et a., 1996]. Es konnte gezeigt werden, dass Retinsäure spezifisch die maligne Umwandlung während der Karzinogenese hemmt, da Retinsäure die RAR β -Expression hochreguliert. Es scheint daher, dass RAR β als Tumorrepressor agiert.

Retinoide zeigen eine ausgeprägte Wirkung bei Präkanzerosen und der Verhinderung von Zweittumorbildung, wohingegen sie in der Therapie solider maligner Tumoren weniger effektiv sind [Lotan et al. 1997b]. Eine besondere Wirksamkeit der Retinsäure konnte bei der Behandlung von promyeloischer Leukämie nachgewiesen werden [Varghese et al., 1999].

Unter der Therapie mit Retinoiden wird eine Reihe von Nebenwirkungen beobachtet. Besonders problematisch ist das teratogene Potential der Verbindungen.

Ihre Wirksamkeit ist an eine ständige Einnahme gebunden, da bei einer Unterbrechung der Therapie der Effekt reversibel ist [Lotan et al., 1996].

Die teratogenen Eigenschaften der Retinoide schränken ihre Einsatzmöglichkeiten ein. Die Exposition von Patienten mit 13-cis-Retinsäure während des ersten Drittels der Schwangerschaft (1-2 mg/kg/Tag zwischen der dritten und neunten Woche der Schwangerschaft) führt zu vielfältigen kongenitalen Missbildungen bei Neugeborenen, wie z.B. Defekten des zentralen Nervensystems, Fehlbildungen von Gehirn, Herz und Thymus [Collins et al., 1999; Rizzo et al., 1991]. Es gibt zahlreiche Untersuchungen und daraus folgende Theorien zum Mechanismus der teratogenen Wirkung der Retinoide. Als allgemein anerkannt gilt, dass die Retinoide wichtige regulatorische Funktionen in Wachstums- und Differenzierungsprozessen besitzen, und dass ein ausgeglichener Retinolhaushalt eine wichtige Rolle spielt. Sowohl ein Vitamin A-Mangel als auch ein Überschuss führen zu Störungen in der Embryonalentwicklung.

Die Retinsäure fungiert vermutlich als ein Morphogen bei der Gliedmaßenentwicklung. Es wird auch angenommen, dass Retinsäure die Expression einer Reihe von Genen wie z.B. Hox-Gene, FGF-Gene (fibroblast growth factor) reguliert, die für die embryonale Entwicklung wichtig sind. Interessant ist, dass Null-Mutation von einigen Hox-Genen in Mäusen Phänotypen induziert, die den retinsäureinduzierten teratogenen Phänotypen ähneln. Dies stützt die Annahme, dass eine Veränderung der Expression der Hox-Gene ein möglicher Mechanismus der Retinsäureteratogenität sein kann [Soprano et al., 1995; Gudas et al., 1994]. Es wurde gezeigt, dass CRABPI während der ersten Tage der embryonalen Entwicklung von Küken gewebespezifisch sehr hohe oder niedrige Expression aufweist; z.B. ist die Expression in den Flügelgliedmaßen deutlich erhöht [Maden, et al.1994]. Bei einer Blockierung von CRABPI durch eine erhöhte Exposition mit Retinsäure kann es zu einer unkontrollierten Genexpression kommen. Somit könnte zwischen CRABPI und der Teratogenität dieser Substanzen ein direkter Zusammenhang bestehen. Es wird angenommen, dass durch die Bindung von CRABPI an cytoplasmatische Retinsäure eine unverhältnismäßige Genexpression verhindert werden kann und somit eine präventive Funktion von CRABPI möglich ist (**Fig.10**) [Morriss-Kay et al., 1993].

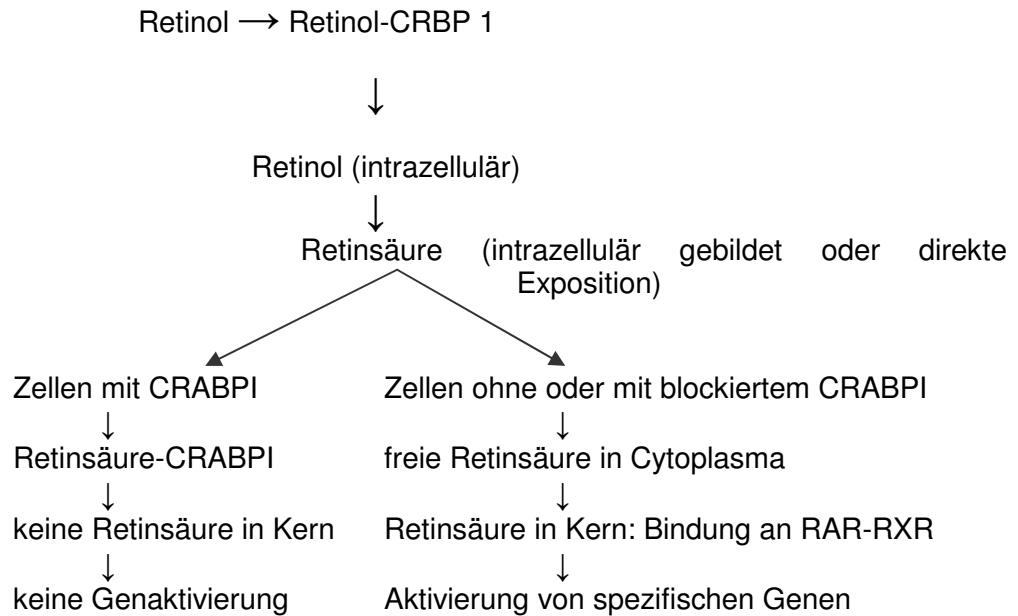


Fig. 10: schematische Darstellung der CRABPI, Retinsäureinteraktion (Modifiziert nach Morriss-Kay et al., 1993).

Die Retinsäurerezeptoren sind an den Prozessen auch maßgebend beteiligt. Jiang et al. konnten zeigen, dass die retinsäureinduzierte Teratogenität mit RAR β -Überexpression in Verbindung steht [Jiang et al. 1994]. Dabei sind Gewebe mit einer hohen RAR β - Expressionsrate zugleich Zielgewebe retinsäureinduzierter Missbildungen. Es wird angenommen, dass die durch retinsäurevermittelte Teratogenität letztendlich von den RAR/RXR- Reaktionswegen abhängt [Tziams et al., 2001].

1.3 Flavonoide

1.3.1 Definition, Vorkommen, Metabolismus und Funktion

Definition und Vorkommen:

Die Flavonoide leiten sich vom Flavan (2-Phenyl-benzodihydropyran) ab. Sie bestehen aus drei Kohlenstoffringen mit 2 aromatischen (A und B) und einem O-heterozyklischen Ring (C) (**Fig. 11A**). Aufgrund struktureller Unterschiede am heterozyklischen Ring werden die Flavonoide in 6 Gruppen eingeteilt: Flavonole, Flavanole, Flavone, Flavanone, Anthocyane und Isoflavonoide. Flavonoide stellen die in der Nahrung am häufigsten vorkommende Gruppe der Polyphenole dar. Die meisten Flavonoide kommen in der Natur nicht frei (Aglykon), sondern glykosidisch gebunden vor.

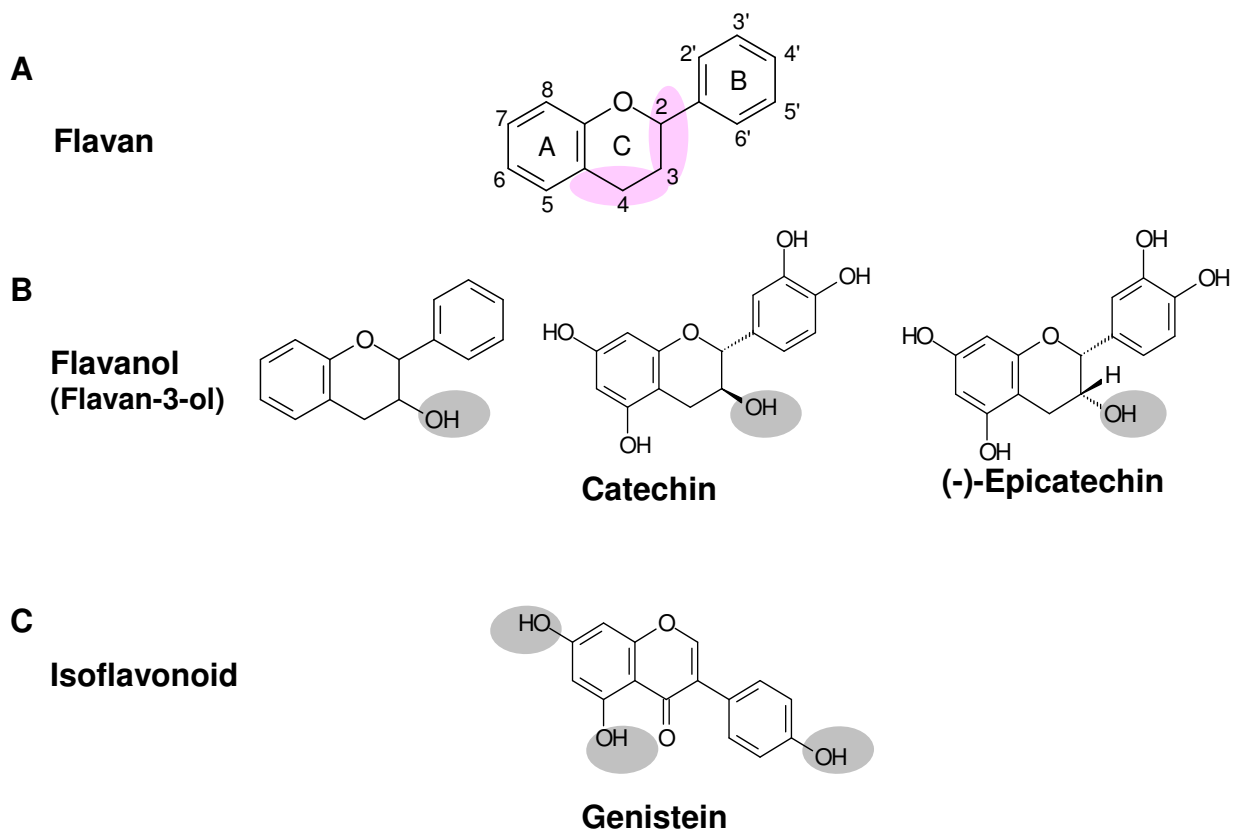


Fig. 11(A-C): Struktur einiger Flavonoide; **A:** Grundstruktur der Flavonoide, **B:** Flavanole; **C:** Isoflavonoid

Flavanole (Flavan-3-ole) kommen primär in Tee, Früchten, Kakao und Kakaoprodukten vor. Zu der Gruppe der Flavan-3-ole gehören Catechin und (-)-Epicatechin und einige Oligomere des (-)-Epicatechin (**Fig. 11B**). Generell lässt sich sagen, dass Flavan-3-ole ((Epi-)Catechin, Gallo(epi)catechin) in Pflanzen zu Proanthocyanidinen oligomerisieren können (Procyanidin, Prodelphinidin, Profisetinidin, Prorobetinidin).

Metabolisierung

Die Metabolisierung der Flavonoide findet hauptsächlich in der Leber statt. Der Hauptmetabolit von Epicatechin ist 3-ortho-Methylepicatechin. Flavanololigomere können durch die Magensäure zu Epicatechinmonomeren- und dimeren gespalten und über den Dünndarm absorbiert werden [Watzl et al. 2001].

Funktion:

Es gibt eine große Anzahl an in vitro, tierexperimentellen und epidemiologischen Studien, die die physiologische Wirkung der Flavonoide z.B. der aus dem grünen Tee, beschreiben. Einige Studien bestätigen die Annahme, dass Flavonoide vorbeugend gegen kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs wirken können. In anderen Untersuchungen wurde keine Wirkung nachgewiesen, und einige wenige Studien zeigen eine mögliche schädliche Wirkung der Flavonoide auf [Chung, et al. 2002].

Zu den biologischen Aktivitäten der Flavonoide gehören antioxidative, antiproliferative, antiinflammatorische und antikarzinogene Wirkungen.

Viele Studien haben gezeigt, dass einige Flavonoide wie Flavonole, Flavone, Isoflavonoide, Flavanole, Anthocyane eine antioxidative Aktivität aufweisen. Die antioxidative Eigenschaft der Flavonoide ist strukturabhängig. Eine wesentliche Rolle bei der antioxidativen Wirkung spielen ortho-ständige Hydroxylgruppen am B-Ring sowie eine Kohlenstoff-Kohlenstoffdoppelbindung und eine 3-Hydroxylgruppe am C-Ring (**Fig. 11A**). (-)-Epicatechin erfüllt demnach nur 2 der 3 Voraussetzungen für eine optimale antioxidative Wirkung (**Fig. 11B**). Die Fähigkeit der Flavonoide, durch Abgabe von Wasserstoffatomen aus den phenolischen Hydroxylgruppen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen abzufangen, steht im Mittelpunkt ihrer antioxidativen Wirkung. Dabei sind die Flavonoide wie Quercitin und Epigallocatechingalat besonders effektiv [Watzl et al. 2001; Chung, et al. 2002].

Epicatechin kommt als Hauptflavonoid in Kakao und in aus Kakao hergestellten Produkten wie Schokolade vor. Dabei enthält die dunkle Schokolade einen höheren Flavonoidanteil als die Milkschokolade. Es wurde gezeigt, dass der Verzehr von 80 g dunkler Schokolade den Plasmaepicatechinspiegel von ca. 22 nM auf ca. 250 nM erhöht. Dies ging mit einer Steigerung der antioxidativen Kapazität des Plasmas einher. Auch die Aufnahme von Flavan-3-olen über Tee korrelierte mit einer Verbesserung des antioxidativen Status. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass eine hohe Flavonoidzufuhr mit einer Abnahme des Risikos für Herz-Kreislauf Erkrankungen in Verbindung steht. In Tierexperimenten schützen Flavonoide vor Dickdarm-, Brust- und Hautkrebs. In diesem Zusammenhang werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Dazu gehört auch die Hemmung spezifischer Enzyme wie CYP 450-abhängige Monooxygenasen oder Induktion von Apoptose. Zudem können einige Flavonoide Schlüsselsignale der Signaltransduktion (PKC, Tyrosinkinase) beeinflussen, die an der Regulation von Proliferation, Angiogenese und Apoptose beteiligt sind [Watzl et al. 2001; Gamet-Payraastre et al. 1999; Arts et al., 2000; Ross et al., 2002,].

Isoflavonoide (Genistein): Vorkommen, Funktion:

Genistein (**Fig. 11B**) ist ein Sekundärpflanzeninhaltsstoff, der zu der Gruppe der Isoflavonoide gehört und hauptsächlich in Soja und Sojaprodukten (nicht in Sojasoße) vorkommt. Genistein wird den Phytoöstrogenen zugeordnet. Phytoöstrogene sind Sekundärpflanzeninhaltsstoffe, die eine Bindungsaffinität zu den Östrogenrezeptoren zeigen. Genistein kann östrogen oder antiöstrogen wirken. Es wird daher angenommen, dass Genistein bei der Chemoprävention bzw. bei der Prävention der hormonabhängigen Krebsentwicklung in Brust und Prostata eine wichtige Rolle spielt. In epidemiologischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine signifikante Korrelation zwischen einer sojareichen Ernährung und einem verminderten Auftreten von Brustkrebs und der Sterblichkeit durch Prostatakrebs existiert [Dixon et al. 2002]. Es wird angenommen, dass Genistein nicht nur das Krebszellwachstum, sondern auch die Angiogenese (die Gefäßneubildung innerhalb des Tumors) hemmen kann. Genistein kann zudem Tyrosinkinase, EGF und PDGF-Aktivität inhibieren [Fotsis et al. 1995; Wilcox et al., 1995; Dixon et al. 2002; Akyjama et al. 1989]. Andererseits können Isoflavonoide wie Genistein und Daidzein als Antioxidantien wirken.

1.4 Vitamin K 3 (Menadion)

1.4.1 Definition, Vorkommen, Metabolismus und Funktion

Definition und Vorkommen:

Die Vitamin K- Familie besteht aus natürlich vorkommendem Vitamin K1 (Phyllochinon), K2 (Menachinon) und synthetisch hergestelltem Vitamin K3 (Menadion). Sie alle weisen das gleiche Grundgerüst 1,4-Naphthochinon auf. Für die spezifische biologische Wirksamkeit von Vitamin K ist die Methylgruppe an Position 2 verantwortlich. Die K Vitamine unterscheiden sich in der Länge der Seitenkette, die für das Löslichkeitsverhalten und andere Eigenschaften verantwortlich ist (**Fig. 12**) Vitamin K1 kommt in pflanzlichen Lebensmitteln vor. Vitamin K1 ist z. B. in Sojabohnen, Milch und Milchprodukten, Muskelfleisch, Tomaten, Hagebutten, grünem Gemüse und Kartoffeln enthalten, während Vitamin K2 von Darmbakterien synthetisiert wird.

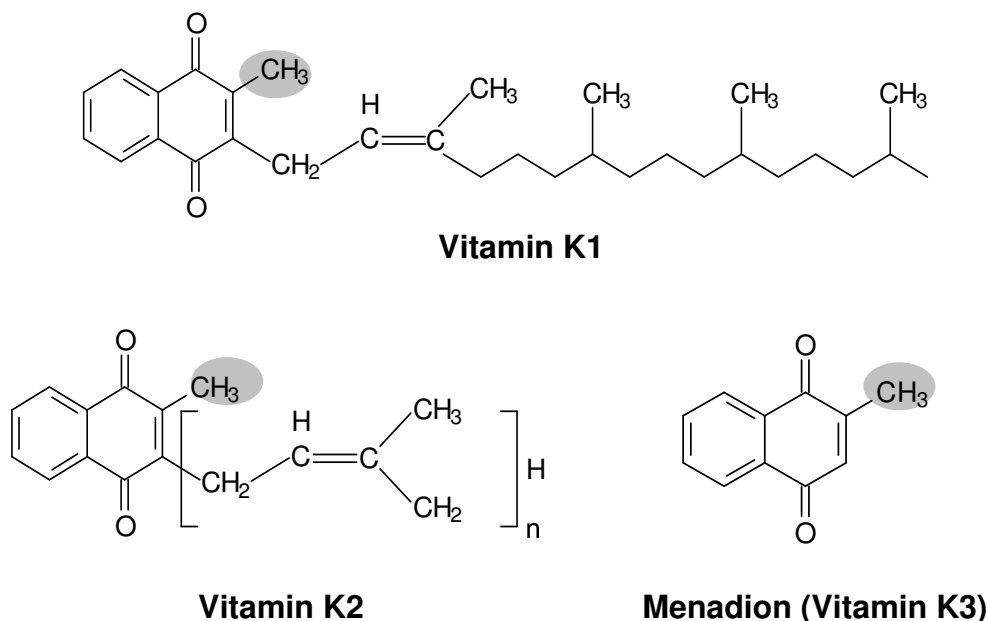


Fig.12: Struktur der Vitamin K1, K2 und Menadion (Vitamin K3).

Metabolisierung und Funktion:

Vitamin K1 kann nur mit Hilfe von Gallensäure resorbiert werden, da das Vitamin K fettlöslich ist. Daher kann die Resorption durch gleichzeitige Aufnahme von Fetten gesteigert werden. Im Körper ist Vitamin K im Blutplasma vorhanden und wird in Leber und Milz gespeichert. Hydroxyliertes Vitamin K1 (biologisch aktivierte Form)

fungiert als Cofaktor für γ -Glutamylcarboxylasen und spielt eine entscheidende Rolle bei der γ -Carboxylierung der Gerinnungsproteine. Weiterhin ist Vitamin K beteiligt an der Biosynthese von Proteinen im Knochen, in der Niere und im Plasma. Menadion zeigt im Vergleich zu Vitamin K1 und K2 eine niedrigere antihämorrhagische Wirkung auf.

K-Vitamine sind in der Lage, das Wachstum vieler Tumorzellen zu hemmen [Kar and Carr, 2000; Kar et al. 2002]. Der Mechanismus des inhibitorischen Effekts von Vitamin K1 und K2 ist bisher nicht geklärt. Für Menadion konnte gezeigt werden, dass die inhibitorischen Effekte sowohl durch Arylierung als auch durch Redoxcycling ausgelöst werden. In Anwesenheit von Reduktionsmitteln durchlaufen Menadion und andere Chinone Redoxcycling. Es sind 2 Wege bekannt:

a) eine 1-Elektronen- Reduktion und b) die 2-Elektronen- Reduktion. Durch die 1-Elektronen- Reduktion - vermittelt durch verschiedene Enzyme wie Cytochrom P450, Cytochrom P450 Reduktase u.s.w. - entstehen Semichinone, die instabil sind und schnell mit Sauerstoff unter Bildung von reaktiven Sauerstoff Verbindungen reagieren. Die 2 Elektronen- Reduktion führt zur Bildung von Hydrochinon. Hydrochinon weist eine niedrigere Reaktivität als Semichinon auf, da es durch Konjugation mit Glukuroniden oder Sulfaten eine Detoxifikation durchläuft. Andererseits kann es durch Autoxidation von Hydrochinonen auch zu Bildung von ROS kommen.

Menadion weist zwar einen starken Antitumoreffekt bei Nagetier-, und Humantumoren auf, ist dafür aber auch stark zelltoxisch und verursacht Nebenwirkungen, wie Cardiotoxizität und Anämien [Carr et al. 2002; Munday et al., 1998; Tzeng et al., 1992].

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Wirkung von Retinsäure, Retinsäurederivaten, ausgewählten Flavonoiden und Menadion auf die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions untersucht werden. Die Untersuchungen sind auf das Protein Connexin43 fokussiert und sollen zur Aufklärung folgender Fragestellungen beitragen:

1. Haben Retinsäuremethylester und seine Derivate einen der Retinsäure vergleichbaren Einfluss auf die Zell-Zellkommunikation (ZZK)? Sind die Effekte der Retinoide auf die ZZK konzentrations- und zeitabhängig? Kann unter Retiniodbehandlung eine Veränderung der Connexin43-Proteinmenge und der subzellulären Verteilung des Connexin-Proteins beobachtet werden? Sind Retinsäuremethylester und Derivate an der Transaktivierung des RAR β 2-Promotors beteiligt?
2. Haben die Flavonoide (-)-Epicatechin und Genistein einen Einfluss auf die ZZK über Gap Junctions? Sind die Verbindungen in der Lage, inhibitorischen Effekten des Tumorpromotors TPA auf die ZZK entgegenzuwirken? Stehen solche Effekte mit einer Veränderung der Connexin 43-Proteinmenge und der subzellulären Verteilung des Connexin-Proteins in Verbindung?
3. Welchen Einfluss hat das synthetische Vitamin K Analog Menadion auf die ZZK.

Die funktionellen Untersuchungen zur ZZK sollen mit dem Farbstoff-Transfer-Assay erfolgen. Zur Abklärung der molekularen Mechanismen sollen molekularbiologische und immunologische Methoden eingesetzt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte, Materialien und Chemikalien

Während dieser Arbeit wurden folgende Geräte, Materialien und Chemikalien verwendet.

Geräte:

| | | |
|----------------------------------|--------------|----------------|
| Mikromanipulator (Typ S 170) | Eppendorf | Hamburg |
| Mikroinjektor (Typ 5242) | Eppendorf | Hamburg |
| Fluoreszenzmikroskop (Typ IM 35) | Zeiss | Köln |
| Femtotips | Eppendorf | Hamburg |
| Microloader | Eppendorf | Hamburg |
| InjectMan (Prog. V4) | Eppendorf | Hamburg |
| FemtoJet | Eppendorf | Hamburg |
| Fluoreszenzmikroskop (Axiovert) | Zeiss | Köln |
| Camera ORCA II | Hamamatsu | |
| Begasungsbrutschrank | Binder GmbH | Tuttlingen |
| Elektrophoresekammer | Novex | Frankfurt |
| Semi-Dry Blotting Maschine | Pharmacia | Freiburg |
| Integrator | Merck | Darmstadt |
| UV-Vis Detektor L 4200 | Merck | Darmstadt |
| Pumpe 655 A liquid Chromatograph | Merck | Darmstadt |
| HPLC-Säule | Merck | Darmstadt |
| Spektrophotometer | Perkin Elmer | Überlingen |
| Chemikalien und Materialien: | | |
| <i>Zellkulturmaterialien</i> | | |
| Objektträger | Greiner | Solingen |
| Glasplättchen | Greiner | Solingen |
| WB-F344 | (‡) | |
| HFFF2-Zellen (No. 86031405) | EACC | Salisbury, GB. |
| HDF | (*) | |
| SCL-1 | (*) | |
| F9 β -Lac Z | (#) | |

He-La

Antikörper:

| | | |
|--|------------------|------------------|
| Alexa 546 goat anti rabbit IgG (H+L) | Molecular probes | Göttingen |
| Rabbit anti-Connexin43 | Zymed | California, USA. |
| Anti-Rabbit IgG HRP | Dianova | |
| Milchpulver | Biorad, | California, USA. |
| Hybond-N-Nylonmembran(PVDF) | Amersham, | Braunschweig |
| Penicillin/Streptomycin-Lösung | Sigma | Deisenhofen |
| FCS ¹ | Greiner | Solingen |
| DMEM-Medium | Greiner | Solingen |
| Lucifer Yellow CH dilithium | Sigma | Deisenhofen |
| Chemilumineszenz-Detektionskit (LumiGlo) | Biolabs | Schwalbach |
| MG-Marker (30-120 MG prestained) | BioRad | |
| MTT | Sigma | Deisenhofen |
| ZNS | Vector | California, USA. |
| Fluoromount G | Shandon | |
| DAPI | Sigma | Deisenhofen |

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten synthetischen Retinoide Retinsäuremethylester (**RSME**); 4-Oxo3-acetoxy-Retinsäuremethylester (**M1**); 3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester (**M2**) und 4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester (**M3**) wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Ernst (BASF) zur Verfügung gestellt.

(‡): Die Zelllinie WB-F344 wurde von Prof. Dr. Trosko (Washington, USA), die Zelllinie (#) F9β-LacZ von Herrn Dr. P. van der Saag zur Verfügung gestellt.

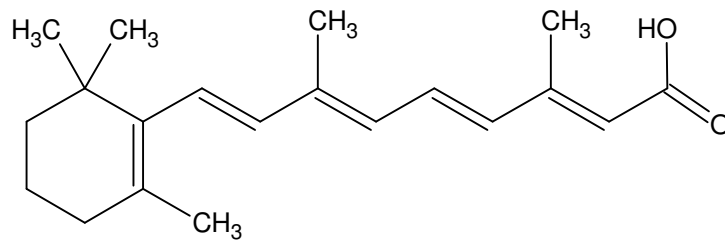
(*): Beide Zelllinien HDF und SCL-1 wurden uns freundlicherweise von Herrn Priv. Doz. Dr. Brenneisen für zusätzliche Untersuchungen überlassen.

Andere verwendete Substanzen und Standardchemikalien wurden von Sigma (Deisenhofen) Merck (Darmstadt) oder Aldrich (Steinheim) bezogen.

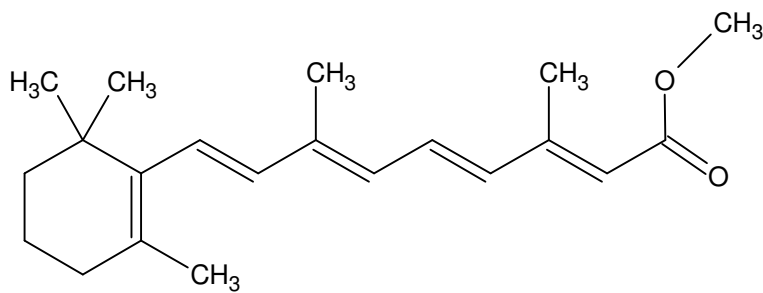
1: Das fötale Kalbserum wurde vor der Zugabe in das Kulturmedium 30 min. bei 56°C hitzeinaktiviert. Überschüssiges Material wurde portioniert und bei -20°C aufbewahrt.

2.2 Strukturen der Testsubstanzen

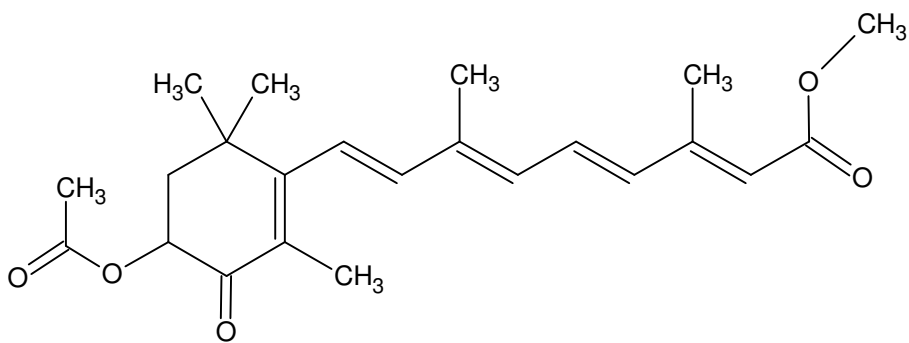
2.2.1 Retinoide



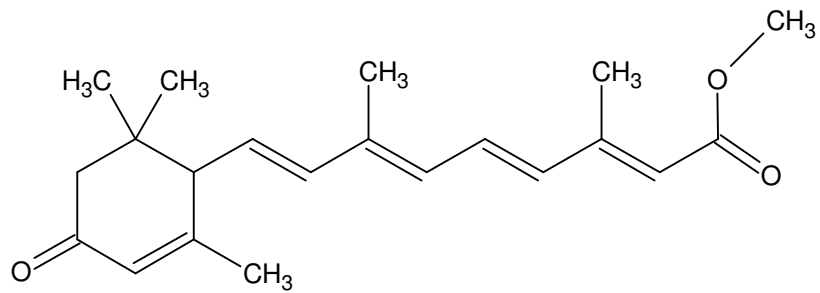
Retinsäure (RS)



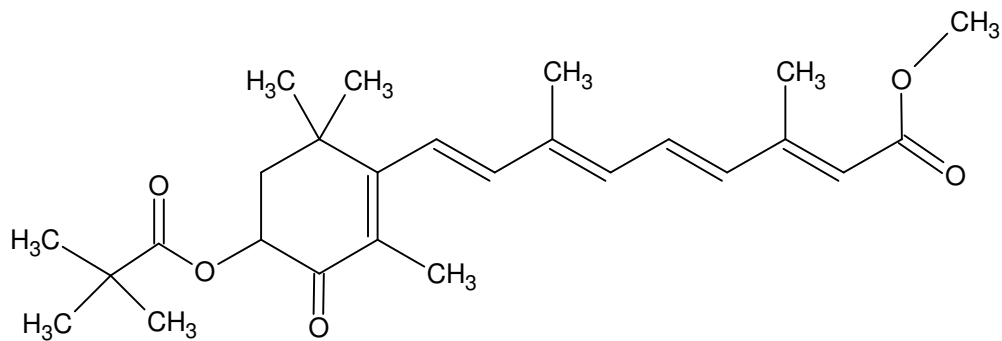
Retinsäuremethylester (RSME)



4-Oxo-3-acetoxy-Retinsäuremethylester (M1)

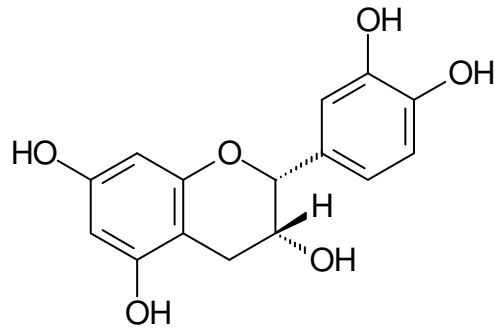


3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester (M2)

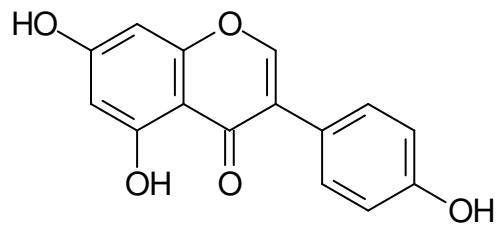


4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester (M3)

2.2.2 Flavonoide

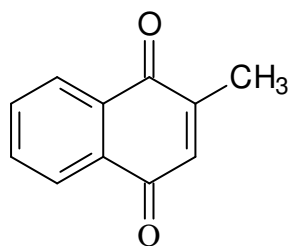


(-)-Epicatechin



Genistein

2.2.3 Menadion



Menadion

2.3 Herstellung der Stammlösungen

Folgende Stammlösungen wurden für die zu untersuchenden Substanzen angesetzt, wobei die Herstellung der Retinoidlösungen wegen ihrer hohen Lichtempfindlichkeit in verdunkelten Räumen durchgeführt wurde. Die Stammlösungen wurden in der Regel bei -20 °C, und die übrigen Substanzen bei 4 °C aufbewahrt.

| Substanzen | Konzentration | Lösungsmittel |
|----------------------|----------------------|--|
| All-trans-Retinsäure | 50 mM | Ethanol |
| RSME | 50 mM | Ethanol |
| M1 | 50 mM | Ethanol |
| M2 | 50 mM | Ethanol |
| M3 | 50 mM | Ethanol |
| Epicatechin | 40 mM | DMSO |
| Genistein | 40 mM | DMSO |
| TPA | 10 mM | DMSO |
| Menadion | 100 mM | DMSO |
| ONPG | 0,1 M | 0,1 M Na ₂ HPO ₄ |
| db-cAMP | 10 mM | Milli-Q H ₂ O |
| BSA | 2 mg/ml | Tris/HCl (pH=8,2) |

| | | |
|------|-----------|-----|
| MTT | 5 mg/ml | PBS |
| DAPI | 500 mg/ml | PBS |

Pufferzusammensetzung:

PBS: 137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 6,4 mM Na₂HPO₄ und 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,4

Magnesiumpuffer: 100 mM MgCl₂, 5 M 2-Mercaptoethanol

Natriumphosphatpuffer: 0,1 M Na₂HPO₄ mit 0,1 M NaH₂PO₄ auf pH 7,3 eingestellt.

2.4 HPLC-System zur Retinoidanalytik

Die Retinoide wurden vor der Bestimmung der biologischen Aktivität mittels HPLC auf ihre Reinheit überprüft.

Säule: Suplex pKb 100 (250x4,6 mm) 5 µm Korngröße

Vorsäule: Suplex pKb 100 (20x4,6 mm) 5 µm, Supelco, PA, USA

Fließmittel: Acetonitril/Methanol/Wasser/Essigsäure (64,5/20/15/0,5)

Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min

Detektion: 350 nm

Probenvolumen: 50 µl

2.5 Zellkultur

2.5.1 Charakteristika der Zelllinien

- WB-F344

Hierbei handelt es sich um Rattenleber-Epithelzellen, die phenotypisch von normaler Leber einer erwachsenen Ratte stammen und eine diploide Zelllinie darstellen [Tsao et al., 1984]. Sie zeichnet sich durch eine sehr hohe Connexin43-Expression aus [Zhang and Thorgeirsson, 1994]. Die Zellen wurden bis zu Passage 17 kultiviert.

- HFFF 2

Diese humanen Hautfibroblasten stammen von dem Praeputium eines 14-18 Wochen alten kaukasischen Fötus. Diese Zellen wurden bis zu Passage 20 kultiviert.

- HDFF(DO4)

HDFF Zellen sind humane primäre Hautfibroblasten, die von Praeputien 5-12 Jahre alter kaukasischer Jungen stammen.

- SCL-1

Die SCL-1 Zellen sind wenig differenzierte menschliche Haut-Plattenepithelkarzinomzellen [Boukamp et al. 1982].

- HDFF+SCL-1

Diese Zellen wurden in einem Verhältnis von 2:1 HDFF:SCL-1 Zellen als Cokultur herangezogen.

- F9 RAR β -Lac Z

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Teratokarzinomalinie der Maus, aus einem 4 Tage alten Embryo eines Inzuchtstammes 129/SV [Guenet et al. 1974]. Sie sind stabil mit einem Genkonstrukt aus RAR β 2-Promotor und LacZ (β -Galaktosidase)-Reporter gen transfiziert [Shen et al, 1992]. Die Zellen wurden bis zu Passage 20 kultiviert.

- He-La-Zellen

Hierbei handelt es sich um eine humane, besonders stark wachsende Zelllinie aus Zervixkarzinomen einer kaukasischen Frau.

2.5.2 Stammhaltung und Anzucht der Zellen

Die oben genannten Zellen wurden in Duplecco`s modified Eagle`s Medium (DMEM-Medium), das mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS, 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin (Komplettmedium) suplementiert ist, in einer wasserdampfgesättigten, 37°C warmen Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid kultiviert.

Nach Erreichen einer 80-90% Konfluenz wurden sie zu erst mit PBS gewaschen und nach Abnahme des Waschpuffers mit einer Trypsin-EDTA: PBS Lösung (1:3) abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde nach 2-5 min. mit dem Anzuchtmedium abgestoppt, die Zellen resuspendiert und auf die entsprechende Anzahl Kulturflaschen oder -schalen überführt.

Dabei wurden die WB-F344, HFFF 2, F9 RAR β -Lac Z und Hela Zellen entweder 1:10 oder 1:5 passagiert; bei den HFFF und SCL-1 Zellen wurden vor dem Aussähen der Zellen in einer neuen Kulturflasche- oder schale mittels einer Neubauer Zellkammer die Zellzahl bestimmt und bei der Cokulturherstellung ein Verhältnis von 2:1 HFFF:SCL-1 eingestellt.

Die Kulturflaschen und -schalen für die Anzucht der Teratogenkarzinomazellen (F9 RAR β -Lac Z) wurden einen Tag vorher mit Gelatine (0,1%) beschichtet.

2.5.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden möglichst in früheren Passagen verwendet. Nach dem Abstoppen der Trypsinaktivität (s.o.) wurde die Zellsuspension zentrifugiert und das Zellpellet in Einfriermedium (DMEM-Medium mit 20% FCS und 10% DMSO) wieder aufgenommen und mit einer Dichte von ca. 10^6 Zellen/ml in speziellen Kryotubes bei -80°C eingefroren.

Eingefrorene Zellen wurden schnell aufgetaut und in eine 75 cm^2 Kulturflasche mit Kompletmedium überführt. Um den DMSO-Gehalt in dem Medium auf unter 1% zu reduzieren und dadurch einer Membranschädigung vorzubeugen, wurde sowohl nach 4-5 Std. als auch nach 24 Std. ein Mediumwechsel vorgenommen.

2.5.4 Inkubationsbedingungen der Testsubstanzen

2.5.4.1 Inkubationsbedingungen für Zell-Zellkommunikation

Zellen wurden in Petrischalen (Durchmesser 35 mm) bis zu 70-90% Konfluenz mit Kompletmedium herangezogen. Sie wurden für 24 Std. mit einem FCS-freien Medium inkubiert, um eine durch FCS erhöhte Grundkommunikation zu reduzieren (Aushungern). Die Testsubstanzen wurden in den entsprechenden Verdünnungen dem FCS freien Inkubationsmedium zugesetzt und nach einem Mediumwechsel auf die Zellen gegeben. Für die Inkubation der HDFF, SCL-1 und HFFF 2 Zellen wurden die Testsubstanzen in einem 3% FCS-haltigen Medium aufgenommen. Sie wurden anschließend je nach der Substanzklasse für 90 min oder 24 und 72 Std. bei 37°C und 5% Kohlendioxid im Brutschrank inkubiert. Die Endkonzentrationen der Substanzen sind dem Ergebnisteil zu entnehmen; die Konzentration des als Kontrolle verwendeten Lösungsmittels betrug für das Ethanol 0,2% und für DMSO 0,1%.

2.5.4.2 Inkubationsbedingungen für F9 RAR β -Lac Z

F9 RAR β -Lac Z Zellen wurden auf mit 0,1%iger Gelatine beschichteten Petrischalen (60 mm) ausgesät und während des gesamten Experiments mit 10% FCS-haltigem Medium inkubiert. Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit den Testsubstanzen für 24 Std. inkubiert, wobei das Inkubationsmedium zusätzlich mit 50 μ M db-cAMP versetzt wurde.

2.5.4.3 Toxizitätsbestimmung

Um sicherzustellen, dass die inhibitorischen Effekte auf die ZZK und nicht auf die allgemeine Zellschädigung oder Absterben der Zellen zurückzuführen sind, wurden die Zellen in 6-well Platten, wie in 2.4.4.1 beschrieben, behandelt. Nach der Inkubation mit den Testsubstanzen wurden die Zellen für 4 Std. mit 0,4 ml 1 mg/ml MTT Lösung in ascorbatfreiem Medium verdünnt und im Brutschrank inkubiert.

Die He-La Zellen wurden mit 0,5 mg/ml MTT versetzt und nur 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Lebende Zellen sind in der Lage, MTT mittels mitochondrialer und mikrosomaler Dehydrogenase zu Formazan (schwarz-blauer Farbstoff) umzusetzen. Danach wurde die MTT -Reaktion mit 10% SDS + 0,1% HCl gestoppt und die Lösung über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die so entstandene Zellsuspension wurde sonifiziert und bei 570 nm und 700 nm gemessen. Als Negativkontrolle wurde MTT Lösung im Medium verwendet. Die Absorption der Schwebeteilchen wurde durch die Messung bei 700 nm berücksichtigt. Die Auswertung erfolgte durch Subtrahieren der Extinktion bei 570nm und 700nm.

2.5.4.4 Inkubationsbedingungen für die immunohistochemische Untersuchung von Connexin 43

Die WB-F344 Zellen wurden auf einem Glasplättchen in einer Petrischale mit dem Durchmesser von 35 mm bis zu 70-90% Konfluenz herangezogen. Die weiteren Behandlungen wurden wie in 2.4.4.1 beschrieben durchgeführt.

2.6 Kommunikationsassay

Für die Bestimmung der Zell-Zellkommunikation durch Transfer eines fluoreszierenden Farbstoffes sind folgende Methoden bekannt:

1. Mikroinjektion
2. Scrape loading

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Mikroinjektion des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow angewandt. Die Messung der ZZK erfolgte durch eine Gerätekombination aus einem axioverten Fluoreszenzmikroskop, Mikromanipulator (FemtoJet) und Mikroinjektor (InjectMan). 50 bis 200 Femtoliter einer 10 %igen Lösung (0,33 M LiCl) des Fluoreszenzfarbstoffes (Lucifer Yellow CH) wurden mittels Femtotips bei einem Druck von 50 hPa und bei einer Injektionsdauer von 0,5 Sek. intrazellulär in eine Zielzelle injiziert. Die angewendete Lucifer Yellow-Konzentration ist nicht zelltoxisch.

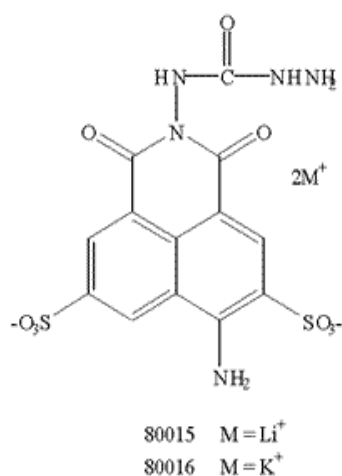


Abb. 2: Struktur des Fluoreszenzfarbstoffes **Lucifer Yellow**

Das Prinzip der Farbstoff-Transfer-Assays beruht auf der Diffusion des injizierten Farbstoffes Lucifer Yellow über die Zell-Zellkanäle von der injizierten Zielzelle in die benachbarten Zellen. Dadurch lässt sich eine Aussage über den Kopplungsgrad des Zellenverbandes und den relativen Öffnungsgrad der Gap junction (Zellkanäle) treffen. Aufgrund des niedrigen pK-Wertes der beiden Sulfonatgruppen (Abb.2), die bei physiologischen pH-Werten ionisiert vorliegen, sind intakte Membranen für diesen wasserlöslichen Farbstoff impermeabel, so dass eine unspezifische Membrandiffusion ausgeschlossen wird [Steward et al., 1978]. Die Anregungswellenlänge von Lucifer Yellow liegt bei 426 nm und das Emissionswellenlängenmaximum bei 540 nm. Dieser Farbstoff zeichnet sich im Vergleich zu anderen Farbstoffen durch eine relativ hohe Quantenausbeute von 0,2 aus, die im pH-Bereich 1-10 nahe zu konstant ist.

Für die Messung der ZZK wurde bei jeder Testreihe pro Kulturschale jeweils in 10 zufällig ausgewählte Zellen der Farbstoff Lucifer Yellow injiziert. Die Anzahl der benachbarten, fluoreszierenden Zellen wurde ca.1 min. nach der Injektion der Zielzelle ermittelt (Abb.3) [Bertram and Zhang 1994].

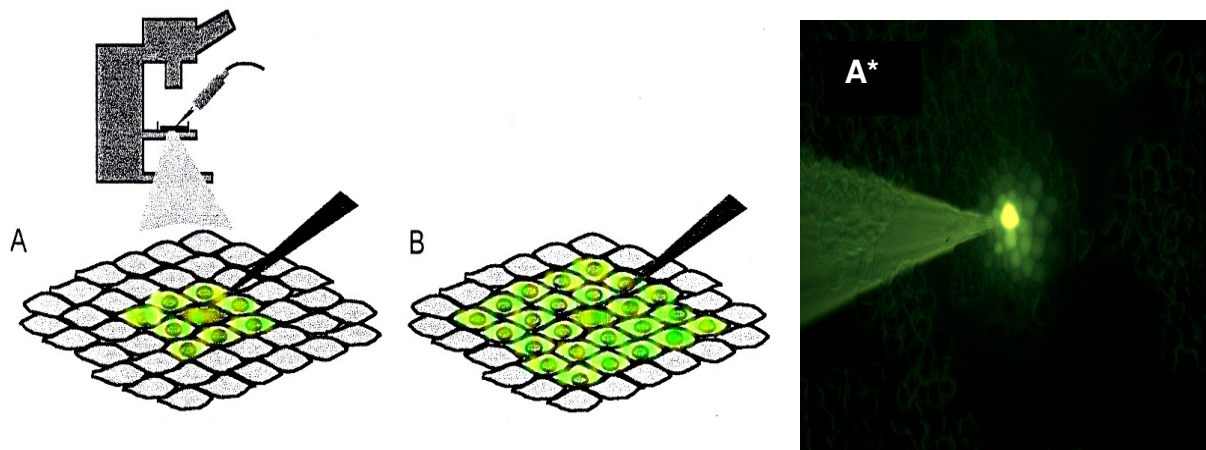


Abb. 3 Farbstoff-Transfer-Assay (Dye Transfer Assay)

Schematische Darstellung der Quantifizierung der interzellulären Kommunikation über Gap Junctions

A: Kontrolle; A*: mikroskopisches Bild der Kontrolle B: nach der Behandlung mit ZZK Stimulans.

2.7 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

2.7.1 Herstellung der Zellextrakte

Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde in Zellextrakten der Zelllinie F9 RAR β -Lac Z nach der 24 stündigen Inkubation mit den Testsubstanzen bestimmt.

Die Zellen wurden nach der Behandlung (s. 2.4.4.1) dreimal mit kaltem PBS gewaschen, mechanisch von der Petrischale gelöst und in Eppendorfgefäße überführt. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 12000 U/min wurde das Zellpellet in 150 μ l Trispuffer resuspendiert und bei -20 °C eingefroren.

Anschließend wurde die Zellsuspension wieder aufgetaut, ca. 30 Sek. lang sonifiziert und erneut bei 5000 U/min zentrifugiert. Danach konnte der Überstand sowohl zur Bestimmung der Enzym-Aktivität als auch zur Proteinbestimmung eingesetzt werden. Der Überstand kann mehrere Tage bei -40 °C aufbewahrt werden.

2.7.2 Bestimmung der Enzymaktivität

ONPG wurde als Substrat der β -Galaktosidase verwendet (Rosenthal, 1987).

Dabei wurden 20 bzw. 30 ml Zellextrakt mit 3 μ l Magnesium-Mercaptoethanolpuffer, 66 μ l ONPG und 211 μ l Natriumphosphatpuffer gemischt und bei 37 °C 1Std inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit 0,5 ml Natriumcarbonat unterbrochen. Nach dem Abkühlen der Lösung erfolgte die photometrische Bestimmung bei 420 nm gegen den Leerwert. Die Einheit der Enzymaktivität U wurde als 1 μ M gebildetes o-Nitrophenol/min bei 37 °C definiert.

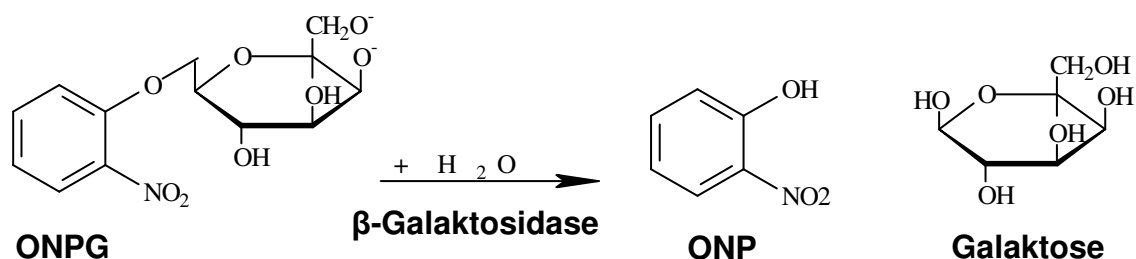


Abb. 4 Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität durch Umsatz von ONPG mit der entstandenen β -Galaktosidase zu ONP.

2.7.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach Lowry [Lowry et al. 1951] unter Verwendung kommerziell erhältlicher Lösungen von BioRad, Protein Assay und DC-Protein Assay durchgeführt. Dabei erfolgte die Proteinbestimmung durch Vergleich mit einer BSA Kalibrationsreihe von 0-1 mg/ml. Die Proben wurden bei 570 nm gegen den Leerwert gemessen.

2.8 Immunohistochemische Untersuchungen

2.8.1 Westernblot-Analyse

2.8.1.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Aus den WB-F344 Zellen wurde Gesamtprotein zum Nachweis von Connexin43 extrahiert. Dazu wurden die Zellen nach der Behandlung zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in 2X Probenpuffer lysiert und vor der weiteren Behandlung bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen der Lysate auf Eis wurden die Proben einige Sek. sonifiziert, 5 min bei 95°C aufgekocht und anschließend 5 min bei 12000 U/min abzentrifugiert. Diese Extrakte wurden kurzfristig bei -20°C, langfristig bei -80°C gelagert.

Lösungen:

4x Probenpuffer:

8% (w/v) SDS

20% (v/v) Glycerin

250 mM Tris/HCl

0,2% Bromphenolblau

40 mM DTT (wurde immer frisch dazugegeben)

2.8.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die hier eingesetzte SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach der von Laemli et al 1970 entwickelten Methode durchgeführt.

Folgende Lösungen wurden bei der Gelelektrophorese eingesetzt:

5x SDS-Laufpuffer:

60 g Tris
288 g Glycin
50 ml 20% SDS → ad 2 l

TBST:

20 mM Tris
137 mM NaCl
0,1% (v/v) Tween-20

Zusammensetzung der Gele

2,5x Trenngelpuffer:

277 g Tris (MG 112,4 g/mol)
2,5 g SDS (MG 288,38 g/mol)
→ in 1 l H₂O dest. pH 8,9

5x Sammelgelpuffer:

18,15 g Tris (MG 112,4 g/mol)
2,5 g SDS (MG 288,38 g/mol)
→ in 500 ml H₂O dest. pH 6,7

10% APS: Amoniumperoxydisulfat (MG 228,20) 1g/10 ml H₂O dest.

AA/BAA: 30% Acrylamid (w/v), 0,8% N,N-Methylen-bis-Acrylamid

| <u>Trenngel 10%</u> | | <u>Sammelgel 5%</u> | |
|---------------------|-----------|---------------------|-----------|
| AA/BAA | 26,7 ml | AA/BAA | 5 ml |
| H ₂ O | 21,3 ml | H ₂ O | 18,8 ml |
| Trenngelpuffer | 32 ml | Sammelgelpuffer | 6 ml |
| APS/TEMED | 800/80 µl | APS/TEMED | 300/30 µl |

Gesamtvolumen: (80 ml)

10%ige Gele wurden wie folgt hergestellt: zuerst wurde das Trenngel gegossen und während der Polymerisierung mit etwas Ethanol überschichtet, nach der Polymerisierung wurde die Ethanolschicht entfernt und das Trenngel mit Sammelgel überschichtet. Die polymerisierten Gele sind mehrere Tage bei 4 °C haltbar.

Zellextrakte wurden vor dem Aufragen sonifiziert, bei 95 °C 5 min erhitzt, 5 min zentrifugiert und davon jeweils 5 µl auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte über 5-6 Std. in einer Minigelkammer bei 15 mA pro Gel.

Um den gleichmäßigen Auftrag der Proteine zu überprüfen, wurden Kontrollgele für 10 min in Comassie Blau-Lösung gefärbt und der Gelhintergrund durch mehrmaliges Waschen in Entfärberlösung wieder entfärbt.

Comassie Blau- Lösung:

45% Methanol (v/v)

45% H₂O (v/v)

10% Eisessig (v/v)

0,2% Comassie Blau (w/v)

Entfärberlösung:

45% Methanol (v/v)

45% H₂O (v/v)

10% Eisessig (v/v)

2.8.1.3 Semi-Dry-Blotting

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Proteine aus dem SDS-PA-Gel mittels Semi Dry Blotting auf eine PVDF-Membran (Hyobond N) übertragen.

Dazu wurde zuerst die Membran zum Aktivieren in Methanol gelegt, in Anodepuffer 2 äquilibriert, danach die untere erste Lage Filterpapier in Anodenpuffer 1, die 2 Lage Filterpapier in Anodenpuffer 2 eingelegt. Das Gel und die oberen Filterpapier wurden in Kathodenpuffer äquilibriert. Der Blot wurde wie folgt von Anode zu Kathode aufgebaut:

Kathode ↑ 2 Lagen Filterpapier (in 2 eingelegt)

↑ Gel (in 2 eingelegt)

↑ Nylonmembran (in Methanol aktiviert und in 2 äquilibriert)

↑ 1 Lagen Filterpapier (in 2 eingelegt)

Anode ↑ 1 Lagen Filterpapier (in 1 eingelegt)

Transferpuffer:

1. Anodenpuffer I: 300 mM Tris, 10 %Methanol → pH 10,4
2. Anodenpuffer II: 25 mM Tris, 10 %Methanol → pH 10,4
3. Kathodenpuffer: 25 mM Tris, 10 %Methanol, 40 mM Glycin → pH 9,4

TBST:

Tris-HCl 10 mM, pH=8,0

NaCl 150 mM

Blocklösung

5% fettfreies Milchpulver in TBST

Der Transfer wurde für ca. 60 min bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA pro Membran (0.9 mA/cm²) durchgeführt.

2.8.1.4 Immunologischer Nachweis von Connexin43

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran kurz mit TBST gewaschen und mit einer 5%igen Blocklösung über Nacht bei 4°C inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen mit dem TBST-Puffer wurde die Membran für 2 Std. bei RT mit dem Erstantikörper (polyclonaler Rabbit anti Cx 43) (1:1000 in 5%iger Milchpulver-TBST-Lösung) inkubiert. Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen je 10 min mit TBST, um unspezifisch gebundene Erstantikörper zu entfernen.

Die Membran wurde mit dem Meerrettichperoxidase-gekoppelten anti-Rabbit-sek. Antikörper (1:5000 in 5%igen Milchpulver-TBST-Lösung) 90 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal je 10 min mit dem Waschpuffer TBST gewaschen und 5 min mit der Chemilumineszenzlösung (LumiGlo Kit) inkubiert, die sich mit der Meerrettichperoxidase der gebundenen sek. Antikörper umsetzt und dabei chemiluminesziert. Diese Signale wurden durch 1-15 minütige Filmexposition (Kodak) sichtbar gemacht.

2.8.2. Immunohistochemischer Nachweis von Connexin43

Zellen wurden wie in 2.4.1 und 2.4.4 beschrieben mit den Testsubstanzen behandelt, danach zweimal mit kaltem PBS gewaschen und für 10 min mit -20°C kaltem Methanol fixiert. Danach wurde das Methanol entfernt und die Zellen zweimal mit PBS erneut gewaschen. Die Zellen wurden mit der Blocklösung (3% Ziegennormalserum (ZNS) und 0,3% Triton X-100 in PBS) für 45 min bei RT behandelt. Anschließend wurde der primäre Antikörper Rabbit anti-Connexin43 (1:1500 in PBS mit 1% ZNS) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen für je 5 Minuten mit PBS wurden die fixierten Zellen mit sek. Antikörper Alexa 546 goat anti rabbit IgG (H+L) (1:800 in PBS) für 45 min bei 37°C inkubiert.

Sie wurden erneut mit dem PBS dreimal je 5 min gewaschen, mit einem Tropfen Immunomount auf einem Objektträger befestigt und mit dem Fluoreszenzmikroskop, das mit einer Kamera verbunden ist, ausgewertet.

2.8.2.1 DAPI-Färbung:

Um die Wirkung der Substanzen auf den Zellkern der WB-F344 Zellen zu beobachten, wurden die Zellen vor dem Fixieren auf dem Objektträger mit ca. 1ml 0,5 mg/ml DAPI-Lösung für 5 min bei RT Inkubiert und anschließend dreimal je 5 min mit PBS gewaschen. Danach wurde wie in 2.8.2 beschrieben weiter verfahren.

3. Ergebnisse

3.1 Retinoide

Retinoide sind lipophile biologisch hochaktive Substanzen, die durch ihre Bindung an spezifische nukleäre Rezeptoren bestimmte Transkriptionsprozesse auslösen. Sie spielen eine große Rolle in der Regulierung von Wachstum und Differenzierung. Retinoide sind in der Lage, *in vitro* die Zelltransformation zu unterdrücken. Sie können die Karzinogenese in verschiedenen Tiermodellen inhibieren und werden bei der Behandlung prä-maligner humaner Epithelialläsionen eingesetzt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Retinsäuremethylester und einige seiner Derivate untersucht. Die Strukturen der untersuchten Retinoide sind in 2.4 dargestellt.

3.1.1 Einfluss der Retinoide auf die Zell-Zellkommunikation

3.1.1.1 Allgemeines

In der Literatur werden verschiedene Methoden zur Bestimmung der zellulären Kommunikation beschrieben [Budunova and Williams 1994, Yamasaki et al, 1997]

1. Metabolische Kooperation
2. Interzellulärer Farbstofftransfer
 - Mikroinjektion
 - Scrape loading
3. elektrische Kopplung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Retinsäure und einiger synthetisch hergestellter Retinsäuremethylester auf die interzelluläre Kommunikation durch den Farbstofftransfer mittels Mikroinjektion untersucht. Aufgrund des niedrigen Molekulargewichtes kann der Farbstoff Lucifer Yellow durch Gap Junctions in benachbarte Zellen diffundieren. Die Anzahl der Nachbarzellen, die den Farbstoff aufnehmen, ist ein Maß für den Kopplungsgrad der Zellverbände und damit ihrer

Fähigkeit zur Zell-Zellkommunikation (ZZK) über die Gap Junctions. Die ZZK wird hier in der Zelllinie der WB-F344 untersucht. Die Zelllinie WB-F344 wurde aus der Leber erwachsener „Fischer-Ratten“ F-344 isoliert und kultiviert [Jou et al. 1995]. Diese Rattenleberepithelzelllinie zeigt entsprechend den vorhandenen biochemischen Markern eine Ähnlichkeit zu „Oval-Zellen“ in vivo. Es gibt eine kontroverse Diskussion über die Eigenschaften dieser „Oval-Zellen“. Es wird angenommen, dass diese Zellen fakultative Leberstammzellen sind. Die „Oval-Zellen“ entstehen wahrscheinlich aus den Stammzellen und akkumulieren in der Portalregion der regenerierenden Leber, wenn die Proliferation der Hepatozyten blockiert ist. Sie können in vivo sowohl zu Gallenblasenepithelzellen als auch zu Hepatozyten differenzieren und dementsprechend Connexin43 oder Connexin32 exprimieren. Somit entstehen entweder Hepatozyten oder Gallenblasenepithelzellen. Während der Hepatokarzinogenese kommt es zum Verlust der ZZK, wobei der fortschreitende Verlust des Connexin-Proteins der Leber mit einer Weiterentwicklung der präneoplastischen Zellen zum Hepatoadenom- und Karzinom in Verbindung gebracht wird [Ruch et al 1999].

Die WB-F344 Zellen dienen aufgrund ihrer hohen Basiskommunikation häufig als Modellsystem für die Untersuchung von Testsubstanzen (z.B. Phorbol ester) mit inhibitorischen Wirkungen auf die ZZK [Oh et al., 1991]. Das Hauptconnexin in den Rattenleberepithelzellen ist Connexin43.

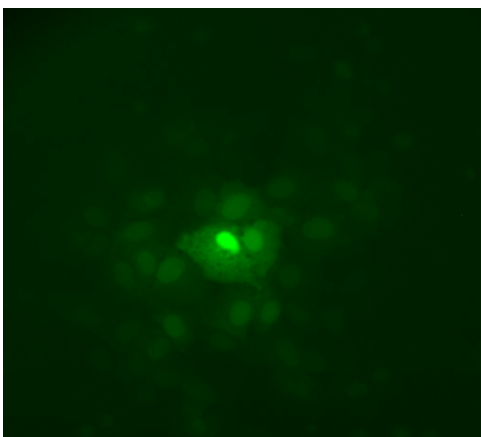
Im Rahmen dieser Arbeit wird der Einfluss der Substanzen auf die ZZK der WB-F344 Rattenleberepithelzellen und HDFF (primäre menschliche Hautfibroblasten) untersucht. Die hier untersuchten Zelllinien WB-F344 und HDFF zeigen unterschiedliche basale Kommunikationsraten. Die basale Kommunikationsrate beträgt unter den hier gewählten Bedingungen bei den WB-F344 22 ± 4 Zellen und bei HDFF 16 ± 3 ca. 1 min. nach der Injektion der Zellen. Die Injektionen erfolgen in jeweils zehn zufällig ausgewählte Zellen pro Ansatz und Zeitpunkt. Alle Ergebnisse wurden 3-5-mal reproduziert.

Die Zytotoxizität aller hier untersuchten Substanzen wurde in den jeweils angewendeten Zelllinien mittels MTT-Test (s. 2.5.4.3) überprüft. Die höchste bei WB-F-344 Zellen und HDFF Zellen nicht toxisch wirkende Konzentration der Retinoide betrug $20 \mu\text{M}$. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass die ZZK in WB-F344 Zellen durch Retinsäure schon nach einem Tag stimuliert wird und nach drei Tagen sich

dieser Effekt noch verstärkt. Daher wurden diese beiden Zeitpunkte für die Untersuchungen ausgewählt. Die Wirkung der Substanzen wurde in Konzentrationen von 0,001 μM bis 20 μM in Rattenleberepithelzellen (WB-F344) über 24 Std. und 72 Std. gemessen. Pro Testreihe wurden eine Lösungsmittelkontrolle und eine Positivkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle bzw. Vergleichsubstanz wurde Retinsäure untersucht. Die Stammlösungen der Retinoide wurden in Ethanol angesetzt, daher wurde Ethanol als Lösungsmittelkontrolle verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildungen und Tabellen dargestellt. Zum einen werden die Absolutwerte der ZZK angegeben, zum anderen wird ZZK im Verhältnis zur Kontrolle in einer Tabelle dargestellt; die Kontrolle entspricht 100%. Die Daten wurden mittels Student's t-Test statistisch ausgewertet.

In **Abb. 3.1.1.1a/b** sind Beispiele für die verschiedenen Effekte unterschiedlicher Substanzen auf die ZZK der WB-F344 Zellen dargestellt. Die **Abb. 3.1.1.1a** zeigt den Effekt der 24 stündigen Inkubation der Rattenleberepithelzellen mit 0,1 μM Retinsäure und die dazugehörige Kontrolle. Während bei der Kontrolle 21 Zellen um die injizierte Zelle fluoreszieren, erhöht sich die Anzahl fluoreszierender Zellen nach der 24 stündigen Inkubation mit Retinsäure auf ca. 35 Zellen. In **Abb. 3.1.1.1b** wird der Effekt einer 90 minütigen Inkubation der WB-F344 Zellen mit 100 nM TPA (Phorbol ester) und dazugehörigen Kontrolle dargestellt. Während bei der Kontrolle ca. 24 Zellen kommunizieren, fluoresziert bei der mit TPA behandelten Probe nur die mikroinjizierte Zelle.

A:



B:

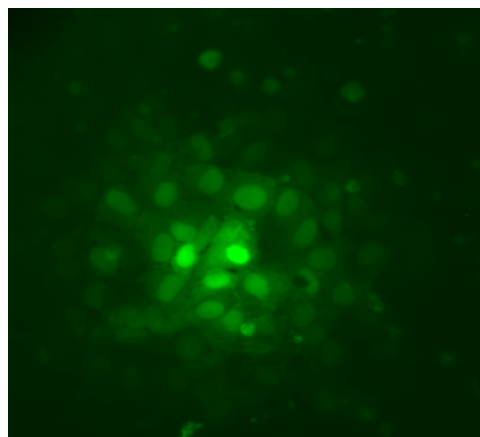
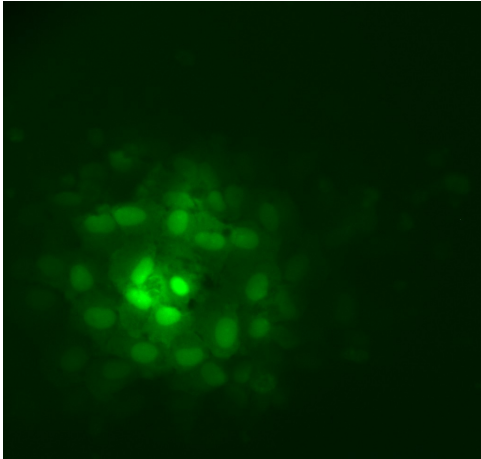


Abb. 3.1.1.1a

Bestimmung der ZZK in WB-F344 Zellen durch Mikroinjektion des fluoreszierenden Farbstoffes Lucifer Yellow nach einer 24 stündigen Inkubation mit **A: 0,2% Ethanol als Kontrolle; B: 1 μM Retinsäure als Positivkontrolle.**

A:



B:

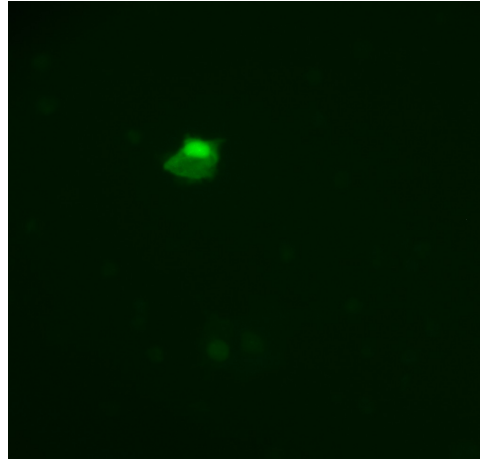


Abb. 3.1.1.1b

Bestimmung der ZZK in WB-F344 Zellen durch Mikroinjektion des fluoreszierenden Farbstoffes Lucifer Yellow nach einer 90 minütigen Inkubation mit **A: 0,1% DMSO als Kontrolle; B: 100 nM TPA.**

3.1.1.2 A-E Ergebnisse der Messung der Zell-Zellkommunikation

Der konzentrations- und zeitabhängige Einfluss der Substanzen auf die interzelluläre Kommunikation der WB-F344 Zellen wurde in den Versuchsreihen **A** bis **E** untersucht.

A) Konzentrationsbereich 0,001 μM :

Retinsäure ist in der Lage, in verschiedenen Zelllinien die ZZK zu stimulieren. Dabei liegt die niedrigste Konzentration, bei der eine stimulierende Wirkung auf die Zellkommunikation zu beobachten ist, bei 0,001 μM [Hossain et al., 1993]. Aus diesem Grund wurden die Rattenleberepithelzellen (WB-F344) zunächst mit 0,001 μM Retinsäure, Retinsäuremethylester und seinen Derivaten behandelt. In **Abb. 3.1.1.2** sind die Ergebnisse der ZZK-Untersuchungen mit WB-F344 Zellen dargestellt. Die Retinsäure selbst bewirkt unter den gewählten Bedingungen keine Stimulation der ZZK. Dagegen führt die Behandlung der Zellen mit RSME bei beiden Zeitpunkten zu einer geringeren aber signifikante Erhöhung ($p < 0,01$) der ZZK. Nach der Inkubation mit M1 und M3 wurde erst zum Zeitpunkt $t = 72$ Std. eine signifikant erhöhte ZZK gemessen. Bei der Behandlung der Zellen mit M2 war die stimulierende Wirkung nur wenig ausgeprägt. Retinsäure 0,1 μM wurde hier als Positivkontrolle mitgeführt und induzierte nach 24 Std. einen Anstieg der ZZK auf das 1,4-fache der Kontrolle. Nach einer 72 stündigen Inkubation erhöhte sich die ZZK auf das 1,7-fache des Kontrollansatzes ($p < 0,001$).

A) Konzentrationsbereich 0,001 μM

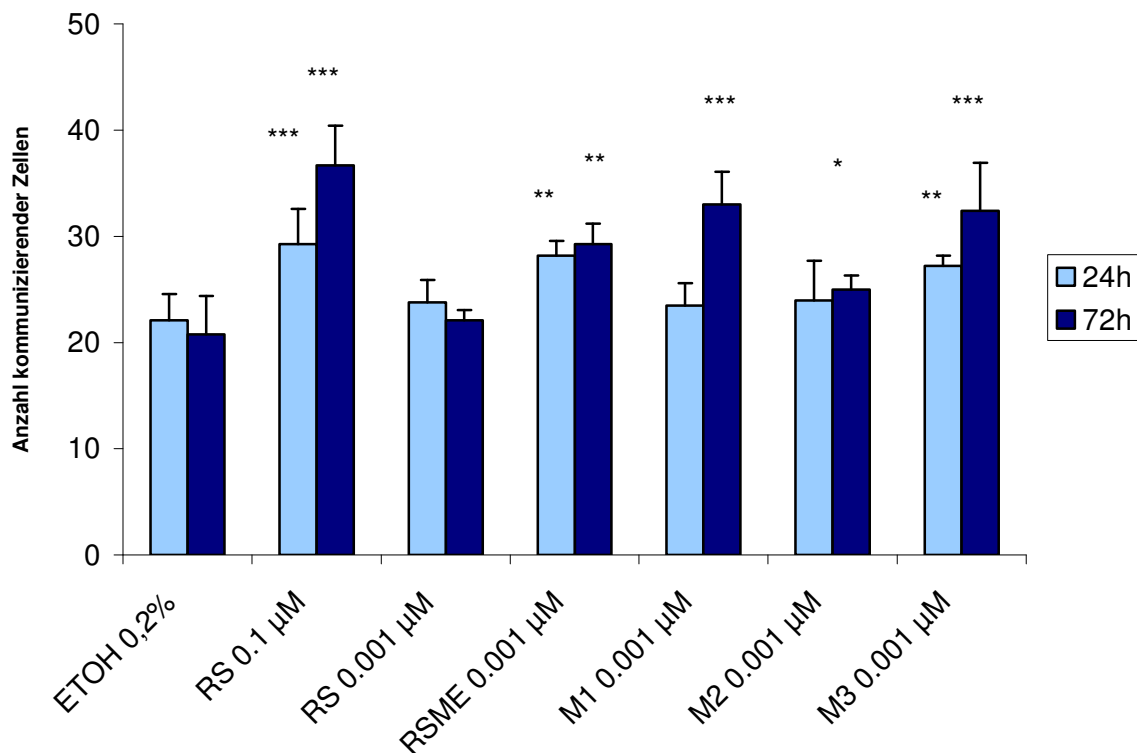


Abb. 3.1.1.2

Interzelluläre Kommunikation der WB-F344 Zellen nach 24 und 72 stündiger Behandlung mit 0,001 μM RS: *Retinsäure*, RSME: *Retinsäuremethylester*, M1: *4-Oxo-3-acetoxy-Retinsäuremethylester*, M2: *4-Oxo-4-dehydro-5,6-acetoxy-Retinsäuremethylester*, M3: *4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester*

Hierbei wurden die Mittelwerte von 5 unabhängigen Testreihen bestimmt. [* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$].

| | 24 Std. | 72 Std. |
|--------------------------|-----------------|------------------|
| Kontrolle (0,2% ETOH) | 100 \pm 11 | 100 \pm 17 |
| RS 0,1 μM | 140 \pm 5 *** | 177 \pm 17 *** |
| RS 0,001 μM | 108 \pm 9 | 110 \pm 5 |
| RSME 0,001 μM | 124 \pm 6 ** | 141 \pm 9 ** |
| M1 0,001 μM | 107 \pm 9 | 159 \pm 15 *** |
| M2 0,001 μM | 118 \pm 17 | 122 \pm 6 * |
| M3 0,001 μM | 128 \pm 4 * | 156 \pm 22 *** |

Tab 3.1.1.2 zu Abb. 3.1.1.2: ZZK (%) Bezogen auf Kontrolle (0,2% ETOH)

B) Konzentrationsbereich 0,01 μM

In **Abb. 3.1.1.3** werden die Ergebnisse der ZZK-Messung im Konzentrationsbereich 0,01 μM dargestellt. Die eintägige Inkubation von WB-F344 Zellen mit 0,01 μM RSME bewirkt eine signifikante Erhöhung der ZZK um das 1,3-fache der Kontrolle ($p < 0,01$). Am dritten Tag der Messung konnte kein signifikanter Unterschied zu der Kontrolle festgestellt werden.

Die Behandlung mit 0,01 μM M1, M2 und M3 führte bei allen 3 Substanzen zu den jeweiligen Zeitpunkten zu einer Stimulierung der ZZK. Dabei zeigte M1 nach der 24 Std. Inkubation eine 1,4-fache ($p < 0,001$), M2 eine 1,3-fache ($p < 0,01$) und M3 eine 1,3-fache ($p < 0,01$) Erhöhung der ZZK gegenüber der Kontrolle. Durch die 72-stündige Inkubation mit M1 und M2 wurde eine Steigerung der ZZK auf das 1,5-fache und mit M3 sogar noch auf ca. 1,7-fache der Kontrollgruppe gemessen ($p < 0,001$). Im Vergleich dazu war der Effekt nach der Behandlung mit RSME weniger ausgeprägt.

Die Behandlung der Zellen mit 0,01 μM Retinsäure führte jedoch nicht zur Steigerung der ZZK; die Anzahl der kommunizierenden Zellen war mit der Kontrolle vergleichbar. Wurden die Zellen mit 0,1 μM Retinsäure (Positivkontrolle) inkubiert, konnte eine Stimulation der ZZK induziert werden. Hier konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der WB-F344 Zellen mit 0,01 μM M1; M2; und M3 unter den hier vorliegenden Inkubationsbedingungen eine im Bereich der 0,1 μM Retinsäure liegende Induktion der ZZK hervorrufen kann.

B) Konzentrationsbereich 0,01 µM

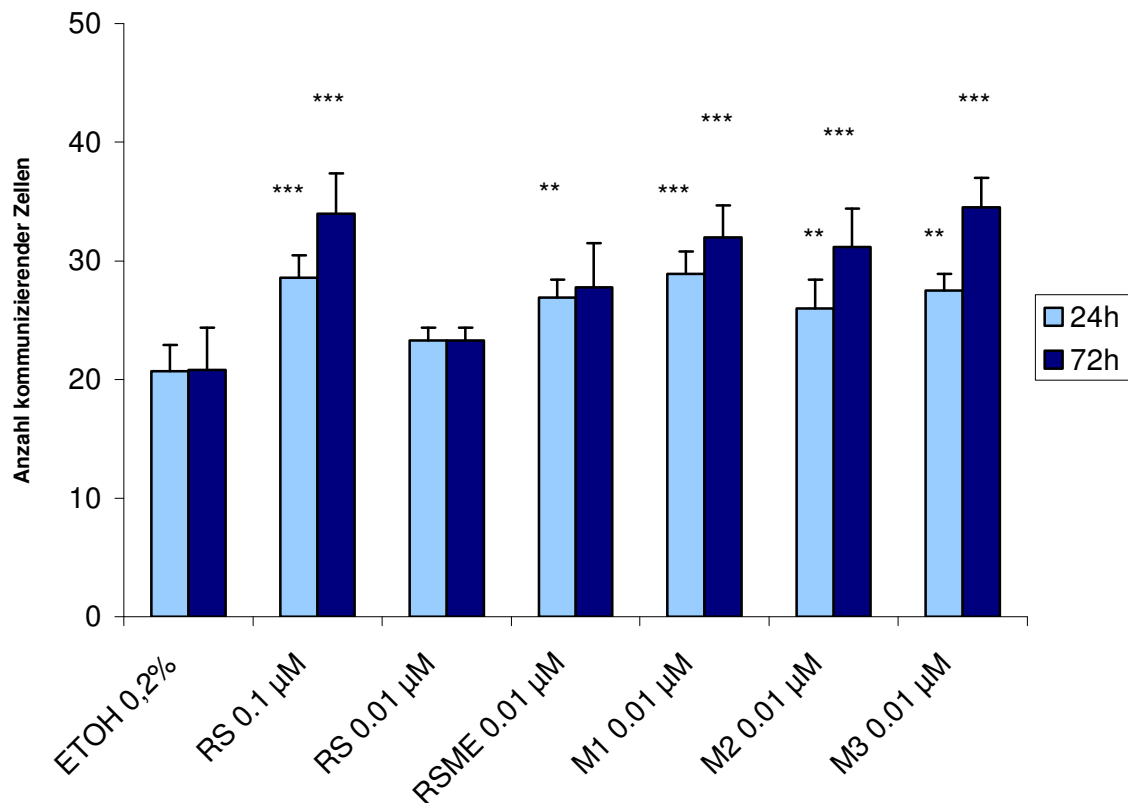


Abb. 3.1.1.3

Interzelluläre Kommunikation der WB-F344 nach 24 und 72 stündiger Behandlung mit 0,01 µM *RS*: Retinsäure, *RSME*: Retinsäuremethylester, *M1*: 4-Oxo-3-acetoxy-Retinsäuremethylester, *M2*: 3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester, *M3*: 4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester
 Hier bei wurden die Mittelwerte von 5 unabhängigen Testreihen bestimmt. [*p<0,05, **p<0,01; ***p<0,001]

| | 24 Std. | 72 Std. |
|-----------------------|--------------|--------------|
| Kontrolle (0,2% ETOH) | 100 ± 13 | 100 ± 11 |
| RS 0,1 µM | 138 ± 9 *** | 158 ± 17 *** |
| RS 0,01 µM | 112 ± 5 | 117 ± 11 |
| RSME 0,01 µM | 133 ± 7 ** | 130 ± 23 |
| M1 0,01 µM | 137 ± 9 *** | 152 ± 7 *** |
| M2 0,01 µM | 126 ± 11 *** | 150 ± 15 *** |
| M3 0,01 µM | 128 ± 8 *** | 166 ± 12 *** |

Tab 3.1.1.3 zu Abb. 3.1.1.3: ZZK (%) Bezogen auf Kontrolle (0,2% ETOH).

C) Konzentrationsbereich 0,1 μ M

In der **Abb. 3.1.1.4** sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit 0,1 μ M Retinsäure, RSME M1, M2 und M3 dargestellt. Die Behandlung der Zellen mit Retinsäure führt zu beiden Zeitpunkten zur signifikanten Induktion der ZZK ($p < 0,001$). Die Inkubation der Zellen mit RSME führt dagegen bei beiden Zeitpunkten zur geringeren aber noch signifikanten Erhöhung der Kommunikation ($p < 0,01$). Im Konzentrationsbereich 0,1 μ M waren die stimulatorischen Effekte der Derivate auf die ZZK in den WB-F344 insgesamt schwächer als bei 10-fach niedrigerer Konzentration. Erst bei 72 stündiger Inkubation der Zellen mit M1 und M2 konnte im Vergleich zur Kontrolle eine 1,3- 1,4-fache Steigerung der ZZK ($p < 0,01$) erzielt werden.

Die Behandlung der WB-F344 Zellen mit 0,1 μ M M3 führt dagegen zu einem 1,4- 1,5-fachen Anstieg der ZZK ($p < 0,001$). Die etwas stärkere Induktion der ZZK in den Zellen wurden erst nach der 72 stündigen Inkubation mit den Retinsäure Derivaten beobachtet, wobei die Behandlung der Zellen mit dem RSME und seinen Derivaten nicht so effektiv war, wie bei der Inkubation der Zellen mit der 0,1 μ M Positivkontrolle Retinsäure.

C) Konzentrationsbereich 0,1 µM

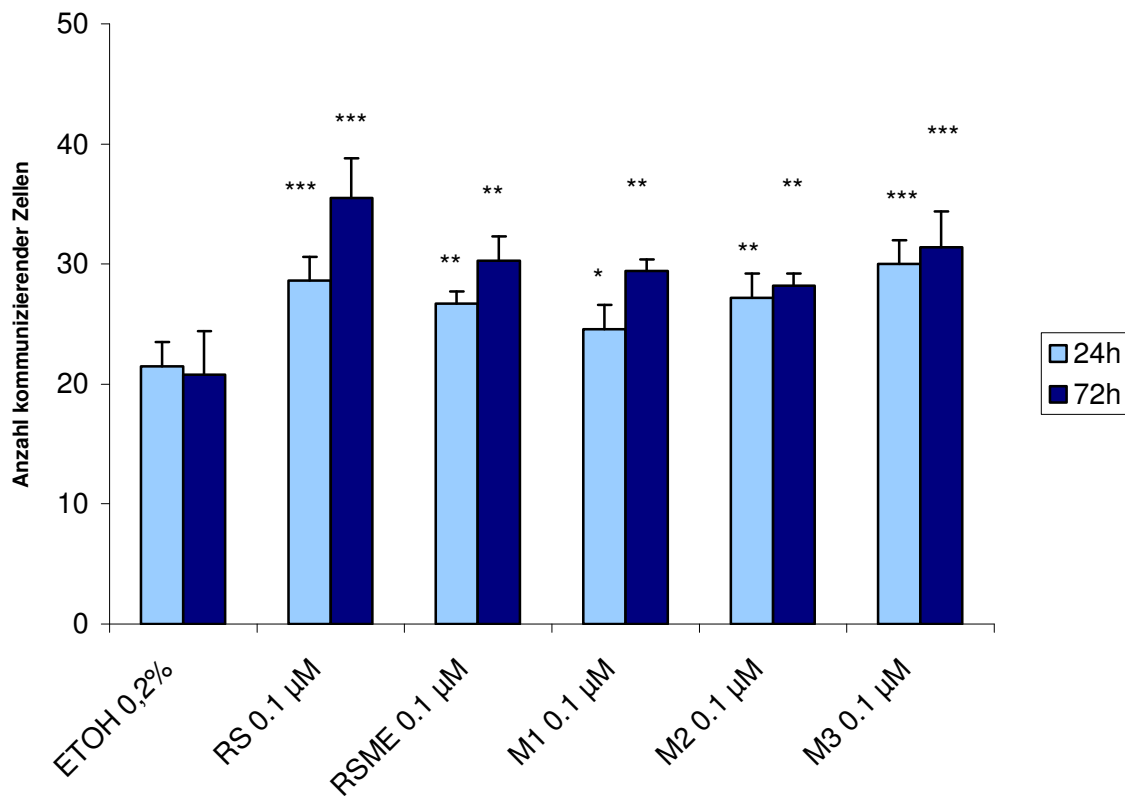


Abb. 3.1.1.4

Interzelluläre Kommunikation der WB-F344 nach 24 und 72 stündiger Behandlung mit 0,1 µM *RS*: Retinsäure, *RSME*: Retinsäuremethylester, *M1*: 4-Oxo-3-acetoxy-Retinsäuremethylester, *M2*: 3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester, *M3*: 4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester
 Hier bei wurden die Mittelwerte von 5 unabhängigen Testreihen bestimmt. [*p<0,05, **p<0,01; ***p<0,001]

| | 24 Std. | 72 Std. |
|-----------------------|-------------|--------------|
| Kontrolle (0,2% ETOH) | 100 ± 11 | 100 ± 8 |
| RS 0,1 µM | 135 ± 7 *** | 169 ± 15 *** |
| RSME 0,1 µM | 125 ± 5 ** | 143 ± 9 ** |
| M1 0,1 µM | 115 ± 4 * | 140 ± 3 ** |
| M2 0,1 µM | 126 ± 10 ** | 134 ± 5 ** |
| M3 0,1 µM | 139 ± 9 *** | 149 ± 14 *** |

Tab 3.1.1.4 zu Abb. 3.1.1.4: ZZK (%) Bezogen auf Kontrolle (0,2% ETOH).

D) Konzentrationsbereich 1 μ M

Aus der bisherigen Untersuchung der Effekte von Retinsäurederivaten auf die ZZK in WB-F344 Zellen zeichnet sich ein konzentrationsabhängiger Induktionseffekt ab. Von der Retinsäure ist bekannt, dass sie bei den physiologischen Konzentrationen in vielen verschiedenen Zellkulturen eine Stimulation der ZZK hervorrufen kann (Hossain et al., 1993; Budunova et al., 1994). In **Abb. 3.1.1.5** sind die Ergebnisse der Behandlung der WB-F344 Zellen mit 1,0 μ M RS, RSME, M1, M2 und M3 dargestellt. Hierbei wurde der Einfluss der 1 μ M Retinsäure, die gleichzeitig auch als Positivkontrolle eingesetzt ist, auf die ZZK in WB-F344 Zellen untersucht. Ein signifikanter Anstieg der ZZK in den Zellen konnte schon nach 24 Std. beobachtet werden. Dabei steigt die Kommunikationsrate in den Zellen nach 24 stündiger Retinsäureinkubation auf das 1,5-fache und nach 72 Std. auf das 1,7-fache der Kontrolle.

Die Inkubation mit Retinsäuremethylester (RSME) führte nach 24 Std. zu einem geringen aber noch signifikanten ($p < 0,01$) Anstieg der ZZK gegenüber der Kontrolle (1,24-fache der Kontrolle). Nach der dreitägigen Inkubation erhöhte sich die Induktion der ZZK auf das ca. 1,4-fache der Kontrolle.

Bei eintägiger Inkubation mit den Derivaten M1 und M2 konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle gemessen werden. Erst nach drei Tagen Inkubation der Zellen mit M1 und M2 konnte eine schwache aber signifikante ($p < 0,05$) Erhöhung der ZZK um das 1,3 (M1) – und 1,2-fache (M2) der Kontrolle ermittelt werden.

Die Inkubation mit 1,0 μ M M3 führte nach 24 Std. zu einem signifikanten Anstieg der ZZK auf das 1,6-fache der Kontrolle. Die nachfolgende dreitägige Inkubation dagegen führte zu einer Abnahme des Stimulationseffekts auf das 1,3-fache der Kontrollgruppe. Trotz der verminderten Induktion der ZZK wurde ein signifikanter ($p < 0,01$) Unterschied zur Kontrolle festgestellt.

D) Konzentrationsbereich 1 μ M

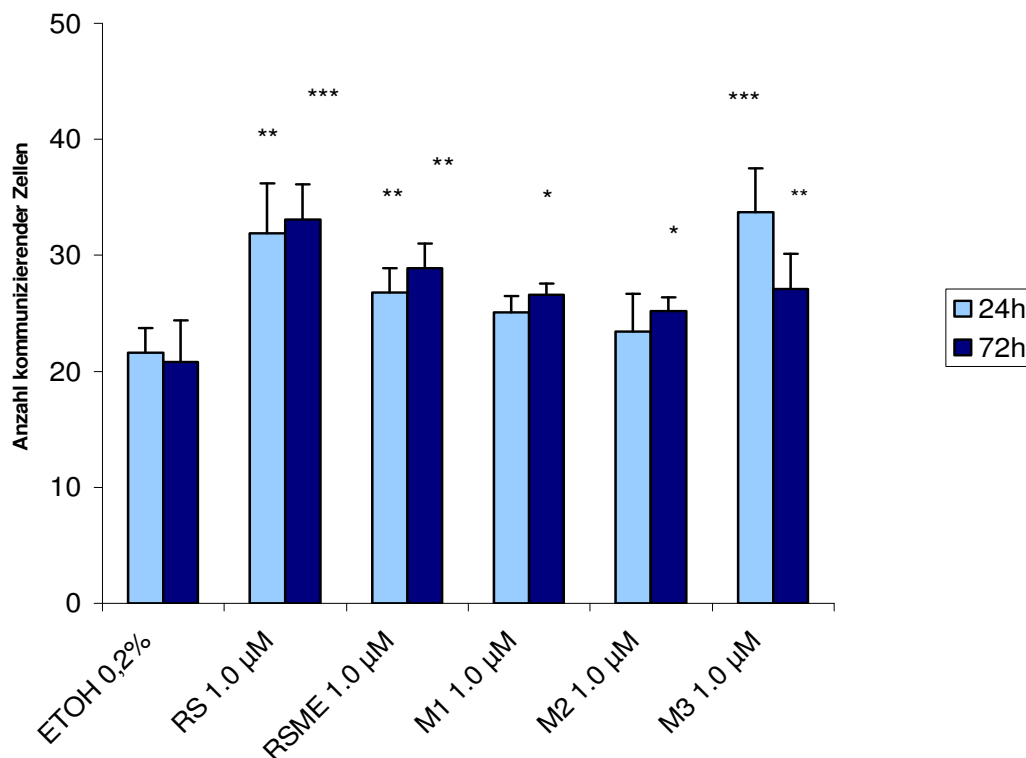


Abb. 3.1.1.5

Interzelluläre Kommunikation der WB-F344 nach 24 und 72 stündiger Behandlung mit 1,0 μ M *RS*: Retinsäure, *RSME*: Retinsäuremethylester, *M1*: 4-Oxo-3-acetoxy-Retinsäuremethylester, *M2*: 3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester, *M3*: 4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester

Hier bei wurden die Mittelwerte von 5 unabhängigen Testreihen bestimmt. [* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$]

| | 24 Std. | 72 Std. |
|-----------------------|------------------|------------------|
| Kontrolle (0,2% ETOH) | 100 \pm 13 | 100 \pm 11 |
| RS 1,0 μ M | 148 \pm 20 *** | 170 \pm 15 *** |
| RSME 1,0 μ M | 124 \pm 10 ** | 139 \pm 10 ** |
| M1 1,0 μ M | 116 \pm 6 | 128 \pm 4 * |
| M2 1,0 μ M | 109 \pm 10 | 121 \pm 6 * |
| M3 1,0 μ M | 156 \pm 17 *** | 130 \pm 15 ** |

Tab 3.1.1.5 Abb. 3.1.1.5: ZZK (%) Bezogen auf Kontrolle (0,2% ETOH).

E) Konzentrationsbereich 10 μ M

In Versuchen an Nagetieren wurde für die Retinsäure bereits bei Konzentrationen von 1,0 μ M und 10 μ M Missbildungsentwicklung festgestellt. Dabei konnte die Bildung von Gaumenspalten und Missbildungen in der Knorpelanlage beobachtet werden [Klug, Kirschbaum 1995]. Daher wurde im nächsten Schritt überprüft, ob die Behandlung der WB-F344 Zellen mit 10 μ M Retinsäure, Retinsäuremethylester und seinen Derivaten M1, M2 und M3 einen Einfluss auf die ZZK hat. Um sicherzustellen, dass die gemessenen Effekte auf die ZZK nicht auf eine allgemeine Zellschädigung bzw. ein Absterben der Zellen zurückzuführen sind, wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test (s. 2.4.5) bestimmt. Es zeigte sich, dass die hier getesteten Konzentrationen der Retinoide nicht zelltoxisch sind (Daten nicht gezeigt).

In **Abb. 3.1.1.6** sind die Ergebnisse der Behandlung der WB-F344 Zellen mit 10 μ M Retinsäure, RSME, M1, M2 und M3 dargestellt. Die Inkubation der Zellen mit Retinsäure führte bei beiden Zeitpunkten zu 30-40%iger Hemmung der ZZK.

Durch die Behandlung der Zellen mit 10 μ M RSME kam es nach 24 Std. zu einer ca. 40%igen Hemmung der ZZK, die sich nach der 72 stündigen Inkubation auf 60% Hemmung erhöht hat. Die Behandlung der WB-F344 Zellen mit M1, M2 und M3 führte bei beiden Zeitpunkten zu einer 80-100%igen Hemmung der ZZK. Im Vergleich dazu konnte durch die Behandlung der Zellen mit der Positivkontrolle (0,1 μ M Retinsäure) eine signifikante Erhöhung der ZZK gemessen werden.

E) Konzentrationsbereich 10 μM

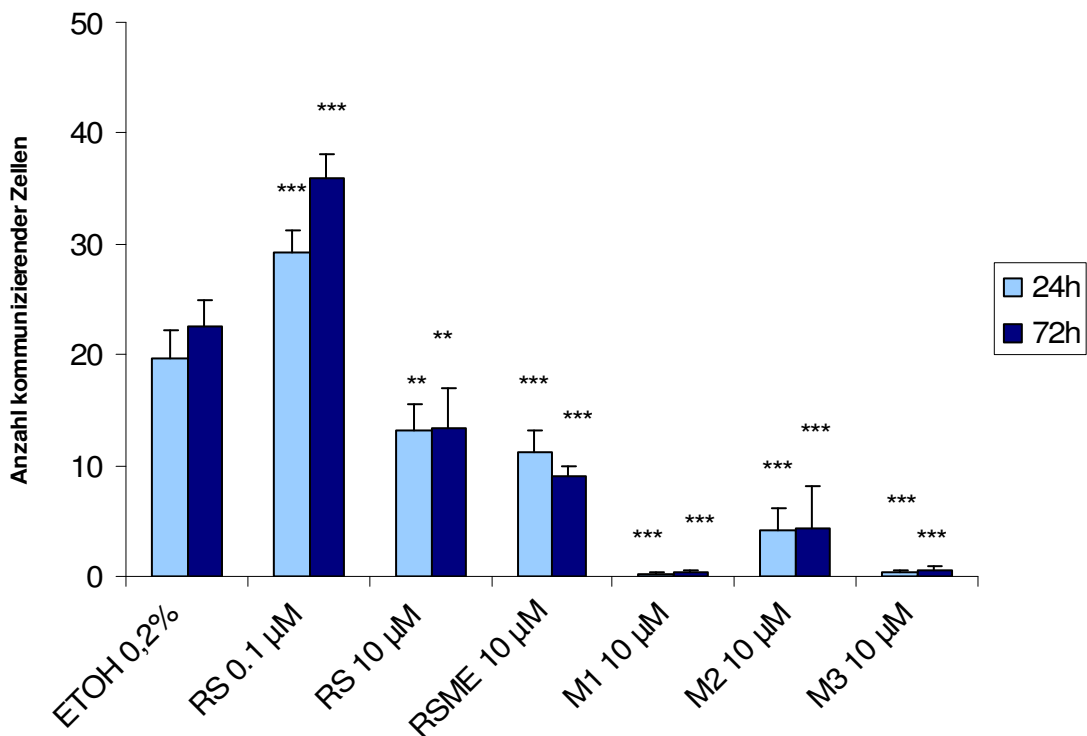


Abb. 3.1.1.6

Interzelluläre Kommunikation der WB-F344 nach 24 und 72 stündiger Behandlung mit 10 μM RS: *Retinsäure*, RSME: *Retinsäuremethylester*, M1: *4-Oxo-3-acetoxy-Retinsäuremethylester*, M2: *3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester*, M3: *4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester*

Hier bei wurden die Mittelwerte von 5 unabhängigen Testreihen bestimmt. [*p<0,05, **p<0,01; ***p<0,001]

| | 24 Std. | 72 Std. |
|-----------------------|-----------------|-----------------|
| Kontrolle (0,2% ETOH) | 100 \pm 13 | 100 \pm 11 |
| RS 0,1 μM | 149 \pm 5 *** | 159 \pm 5 *** |
| RS 10 μM | 67 \pm 12 *** | 59 \pm 16 *** |
| RSME 10 μM | 57 \pm 10 *** | 40 \pm 4 *** |
| M1 10 μM | 1 \pm 1 *** | 1 \pm 1 *** |
| M2 10 μM | 22 \pm 10 *** | 19 \pm 17 *** |
| M3 10 μM | 2 \pm 1 *** | 3 \pm 1 *** |

Tab 3.1.1.6 Abb. 3.1.1.6: ZZK (%) Bezogen auf Kontrolle (0,2% ETOH).

F) Konzentrationsbereich 20 μ M

In der **Tab. 3.1.1.7** sind die Ergebnisse der ZZK- Untersuchung nach der Behandlung der Zellen mit 20 μ M Retinsäure, RSME, M1, M2 und M3 dargestellt.

Die 24 stündige Inkubation der Zellen mit 20 μ M Retinsäure führte zur 96 % Hemmung der ZZK. Die Behandlung der WB-F344 Zellen mit 20 μ M RSME zeigte bei den gleichen Inkubationsbedingungen nur eine 31%ige Hemmung der ZZK, die sich signifikant von der Kontrolle unterschied ($p < 0,001$). Dagegen kam es nach der 24 stündigen Inkubation der Zellen mit 20 μ M M1, M2 und M3 zur 98-100% Hemmung der ZZK. Die Inkubation der Zellen mit 0,1 μ M Retinsäure, die als Positivkontrolle mitgeführt wurde, erhöhte die ZZK um das 1,4-fache der Kontrolle.

Nach der 72 stündigen Inkubation der Zellen mit 20 μ M Retinsäure konnte ein Anstieg der ZZK von 4% auf 51% der Kontrolle beobachtet werden. Dagegen führte die dreitägige Inkubation mit 20 μ M Retinsäuremethylester zur stärkeren Hemmung als am ersten Tag der Inkubation. Nach dreitägiger Behandlung der Zellen mit den Derivaten M1, M2 und M3 konnte immer noch eine vergleichbare Hemmung der ZZK zu der eintägigen Inkubation gemessen werden. Wie bereits beschrieben, wurde die Viabilität der Zellen nach der Behandlung mit den Retinoiden mittels MTT-Test überprüft und keine Zelltoxizität nachgewiesen. Daher sind die inhibitorischen Effekte, die durch die Behandlung der Zellen mit den Retinoiden zu beobachten sind, nicht auf Zellschädigungen zurückzuführen.

F) Konzentrationsbereich 20 μM

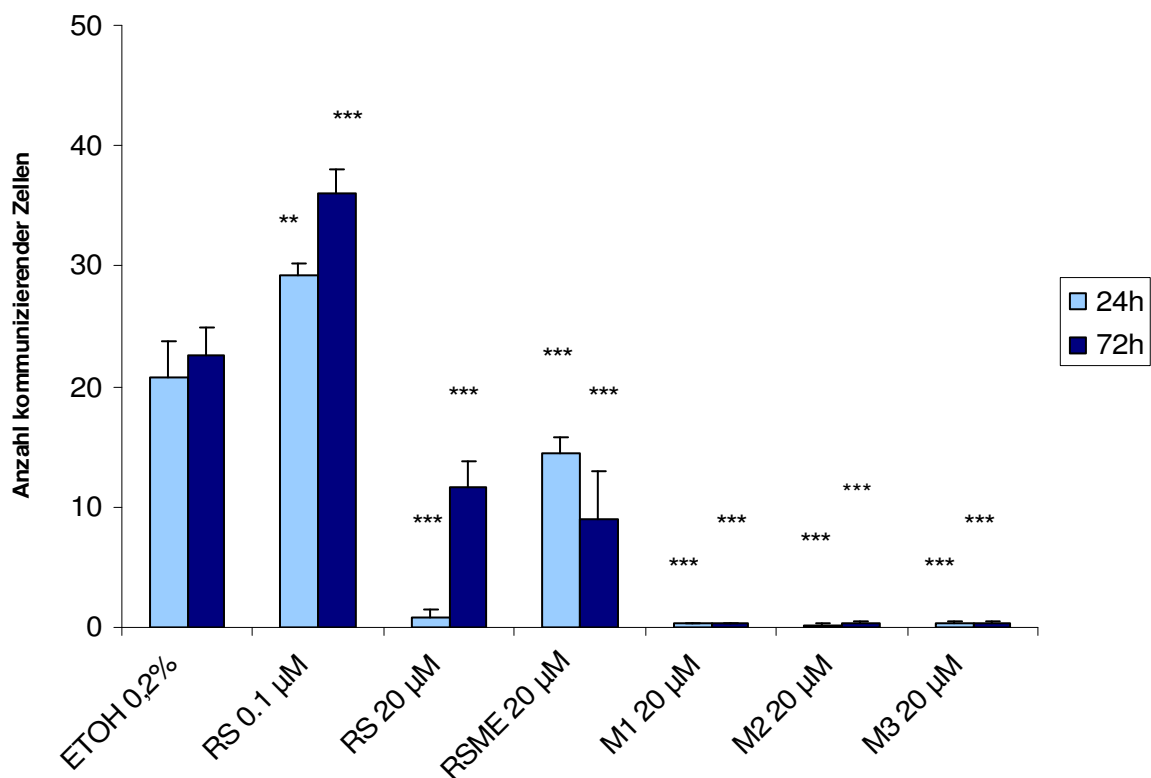


Abb. 3.1.1 7

Interzelluläre Kommunikation der WB-F344 nach 24 und 72 stündiger Behandlung mit 20 μM RS: Retinsäure, RSME: Retinsäuremethylester; M1: 4-Oxo-3-acetoxy-Retinsäuremethylester; M2: 3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester; M3: 4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester
 Hier bei wurden die Mittelwerte von 5 unabhängigen Testreihen bestimmt. [* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$]

| | 24 Std. | 72 Std. |
|------------------------|----------------|-----------------|
| Kontrolle (0,2% ETOH) | 100 \pm 14 | 100 \pm 11 |
| RS 0,1 μM | 140 \pm 5 ** | 160 \pm 9 *** |
| RS 20 μM | 4 \pm 3 *** | 51 \pm 10 *** |
| RSME 20 μM | 69 \pm 6 *** | 40 \pm 17 *** |
| M1 20 μM | 1 \pm 1 *** | 1 \pm 1 *** |
| M2 20 μM | 1 \pm 1 *** | 2 \pm 0,3 *** |
| M3 20 μM | 2 \pm 1 *** | 1 \pm 1 *** |

Tab. 3.1.1.7: Abb. 3.1.1.7: ZZK (%) Bezogen auf Kontrolle(0,2% ETOH).

3.1.2 Einfluss der Retinoide auf das Connexin43-Protein

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions zu beeinflussen. Für Retinsäure wurde z.B. gezeigt, dass die Stimulation der ZSK mit einer Erhöhung der Menge des Connexin Proteins korreliert [Bex et al., 1995]. Eine andere Möglichkeit zur Regulierung der interzellulären Kommunikation ist die Phosphorylierung der Gap Junction-Proteine. In Rattenleberepithelzellen (WB-F344) ist Connexin43 das am stärksten exprimierte Gap Junction-Protein [Zhang et al., 1994; Trosko et al., 1998]. In der folgenden Abbildung wird ein typisches Bild des Connexin43-Proteins nach der Western Blot -Analyse dargestellt. Die drei Banden zeigen die 3 Phosphorylierungsgrade des Connexin43-Proteins. Dabei stellt P0 die unphosphorylierte, P1 und P2 phosphorylierte Formen des Proteins dar. Der Phosphorylierungsgrad der Connexine ist für die Funktionalität der Gap Junctions wichtig (**Abb. 3.1.2.1**).

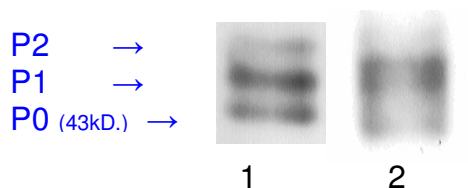


Abb. 3.1.2.1

Western Blot-Analyse des Connexin43-Proteins. Reihe 1: WB-F344 Zellen mit 0,1% DMSO behandelten; Reihe 2: 100 nM TPA.

Die Phosphorylierung des Connexin43-Proteins an Serin- bzw. Threonin- oder Tyrosinresten wird mit Hemmung der ZSK in Verbindung gebracht. Inkubation mit Phorbol ester TPA führt zur Phosphorylierung des Connexin43 am Serinrest. Dominant ist nur die P1 (**Abb. 3.1.2.1**).

Im vorherigen Kapitel wurden durch die Behandlung der Zellen mit den verschiedenen Retinoiden inhibierende und stimulierende Effekte auf die ZSK beschrieben. Um die unterschiedlichen Effekte zu untersuchen, wurde die Western-Blot-Analyse auf Connexin43-Protein durchgeführt.

Für diese Analyse wurden die gleichen Inkubationsbedingungen gewählt, wie bei den Messungen zur Bestimmung der ZSK im Farbstoff-Transfer-Assay (**s. 3.1.1**). Die Herstellung der Zellextrakte und der Nachweis des Connexin43-Proteins erfolgten wie in **2.8.1** beschrieben.

In **Abb. 3.1.2.2 A-D** sind die Ergebnisse nach 24 und 72 stündiger Inkubation der WB-F344 Zellen mit den Retinoiden wiedergegeben.

In Analysen der Extrakte 3 unabhängiger Testreihen mit der Zelllinie WB-F344 zeigte sich nach 24 stündiger Inkubation mit 20 μM RS eine starke Hypophosphorylierung des Connexin43-Proteins. Die beiden anderen Proteinbanden P1 und P2, die die phosphorylierten Formen des Connexin-Proteins darstellen, konnten nicht detektiert werden (**Abb. 3.1.2.2 A**)

Dagegen führte die Behandlung der Zellen mit 20 μM Retinsäuremethylester nur zur Abschwächung der Proteinbanden. Im Vergleich dazu induzierte die 24 stündige Behandlung mit 20 μM M1, M2 und M3 in den WB-F344 Zellen eine deutliche Hyperphosphorylierung des Connexin43-Proteins (**Abb. 3.1.2.2 A**). Die 72 stündige Inkubation mit Retinsäure (**Abb. 3.1.2.2 B**) führte zu einer Connexin-Protein-Verteilung die wieder mit der Kontrolle vergleichbar war. Die unphosphorylierte und die phosphorylierten Formen des Connexin-Proteins waren wieder detektierbar. Im Fall des RSME führte die dreitägige Inkubation zur weiteren Abnahme der Connexin-Menge. Die Behandlung der Zellen mit 20 μM M1, M2 verursachte nach einer dreitägigen Inkubation eine starke Abnahme der Connexin-Menge. Nach der dreitägigen Behandlung mit 20 μM M3 konnte am Phosphorylierungsgrad des Connexin-Proteins keine Veränderung beobachtet werden.

Die Ergebnisse der 1-tägigen Inkubation von WB-F344-Zellen mit 10 μM RS, RSME, M1; M2 und M3 sind in der **Abb. 3.1.2.2 C** dargestellt. Durch die RS Behandlung der Zellen kam es zu einer Abnahme der Connexin-Menge. Bei der Inkubation der Zellen mit 10 μM RSME konnte kein signifikanter Effekt auf das Connexin-Protein festgestellt werden. Die Behandlung der Zellen mit 10 μM M1 und M3 führte zur Phosphorylierung des Connexin-Proteins. Dagegen löste die M2 Inkubation nur eine Abnahme der Connexin-Menge aus, die vergleichbar war dem Effekt der Inkubation mit 10 μM RS.

In **Abb. 3.1.2.2 D** werden die Ergebnisse der Western Blot-Analyse nach der dreitägigen Behandlung der Zellen mit 10 μM Retinsäure, RSME, M1, M2 und M3 dargestellt. Die Behandlung der Zellen mit 10 μM Retinsäure führte zur Halbierung der Connexin-Proteinmenge; nach Inkubation mit RSME konnte kein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Die Untersuchung der Zellextrakte aus der mit M1, M2 und M3 behandelten Zellen zeigte eine deutliche Hyperphosphorylierung des Connexin-Proteins (**Abb. 3.1.2.2 D**).

Im vorigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die ZZK in WB-F344 Zellen durch die Behandlung mit den Retinsäurederivaten konzentrationsabhängig stimuliert werden kann (**Abb. 3.1.1.2-5**). Es wurden daher weitere Connexin-Protein-Analysen nach der ein- und dreitägigen Inkubation mit 1 bis 0,001 μM Retinoide durchgeführt.

Die folgende Abbildung (**Abb. 3.1.2.3 A-B**) wird als ein Beispiel für die Effekte auf die Connexin- Proteinmenge nach der Behandlung mit 0,01 μM RSME, M1, M2 und M3 aufgeführt. Hierbei wurde die 0,1 μM Retinsäure als Positivkontrolle mitgeführt, da zahlreiche Untersuchungen eine Erhöhung der ZZK mit einer Steigerung des Connexin- Proteinmenge in Verbindung bringen [Stock 1998].

In **Abb. 3.1.2.3 A** sind die Ergebnisse der eintägigen Inkubation mit 0,01 μM RSME, M1, M2 und M3 wiedergegeben. Durch die Behandlung der Zellen mit 0,1 μM Retinsäure als Positivkontrolle stieg die Connexin-Proteinkonzentration schon nach 24 Std. auf das 1,5 fache der Kontrolle an. Für 0,01 μM Retinsäure konnte keine signifikante Beeinflussung der Connexin-Menge nachgewiesen werden. Die Behandlung mit RSME führte zu einer leichten aber signifikanten Steigerung der Connexin-Proteinmenge. Nach der eintägigen Inkubation mit den Derivaten (M1, M2 und M3) konnte in den WB-F344 Zellen eine signifikante Akkumulation des Connexin43-Proteins festgestellt werden (**Abb. 3.1.2.3 A**). Nach der dreitägigen Inkubation der Zellen mit 0,01 μM RSME konnte ein leichter Anstieg der Connexin-Proteinmenge beobachtet werden. Die dreitägige Inkubation der Zellen mit 0,01 μM M1, M2 und M3 führte hier zur deutlichen Akkumulation des Connexin43-Proteins. (**Abb. 3.1.2.3 A**).

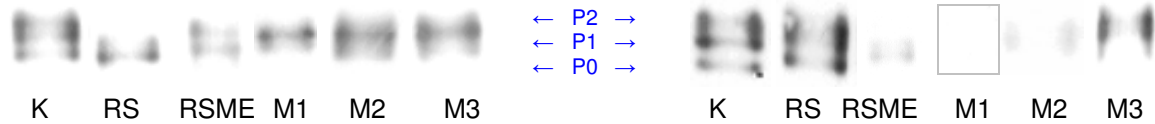
Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass die hier untersuchten Retinoide in der Lage sind, die ZZK in den WB-F344 Zellen durch Beeinflussung des Connexin43-Proteins zu stimulieren bzw. zu hemmen.

24 Std. Inkubation

72 Std. Inkubation

A (Konzentrationsbereich: 20 μ M)

B (Konzentrationsbereich: 20 μ M)



C (Konzentrationsbereich: 10 μ M)

D (Konzentrationsbereich: 10 μ M)



Abb. 3.1.2.2(A-D)

Nachweis des Gap junction-Proteins Connexin43 aus WB-F344 Zellenextrakt nach 24 und 72 stündiger Inkubation mit:

- 1: Kontrolle (0,2% Ethanol);
- 2: RS: Retinsäure, 3: RSME: Retinsäuremethylester,
- 4: M1: 4-Oxo-3-acetoxy-Retinsäuremethylester,
- 5: M2: 3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester
- 6: M3: 4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester

24 Std. Inkubation

72 Std. Inkubation

A

B

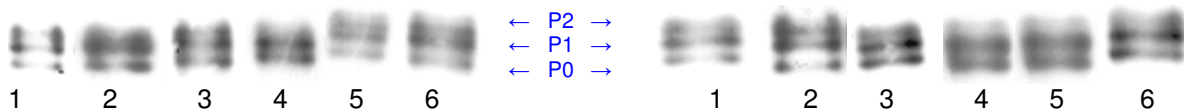


Abb. 3.1.2.3 A/B

Nachweis des Gap junction-Proteins Connexin43 aus WB-F344 Zellenextrakt nach 24 stündiger (Teil **A**) und 72 stündiger (Teil **B**) Inkubation mit:

- 1: Kontrolle (0,2% Ethanol);
- 2: Retinsäure 0,1 μ M (als Positivkontrolle), 3: Retinsäuremethylester 0,01 μ M,
- 4: M1: 4-Oxo-3-acetoxy-Retinsäuremethylester 0,01 μ M,
- 5: M2: 3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester 0,01 μ M,
- 6: M3: 4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester 0,01 μ M.

3.1.3 Der Einfluss der Retinoide auf die subzelluläre Lokalisierung von Connexin43

Die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions unterliegt vielfältigen Regulationsmechanismen. Unter anderem kann durch externe Stimuli der Transport von Connexinen in der Zelle und deren Einbau in die Plasmamembran beeinflusst werden. Die Anwesenheit funktionsfähiger Kanalproteine in der Zellmembran ist eine Voraussetzung zum Aufbau interzellulärer Kanalverbindungen (Gap Junctions).

Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung von Connexin43 eine Delokalisierung des Proteins von der Membran ins Zytoplasma und dadurch eine Abnahme der ZZK zur Folge hat [Musil et al, 1993].

Nachdem festgestellt wurde, dass die Derivate der Retinsäure M1, M2 und M3 in der Lage sind, die ZZK durch Phosphorylierung zu inhibieren, sollte deren Einfluss auf die Lokalisation der Proteine überprüft werden

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung wurde der Einfluss der Retinoide auf die Lokalisation der Connexin-Proteine in WB-F344 Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Retinsäure und ihren Derivaten behandelt. Nach 24 und 72 stündiger Inkubation der Zellen mit den Substanzen wurde weiter wie in 2.8.2 beschrieben verfahren. Bei der Färbung des Connexin43-Proteins werden die Zellen zuerst mit einem spezifischen primären Antikörper (Rabbit anti-Connexin43) inkubiert und anschließend mit einem sekundären Antikörper (Alexa 546 goat anti rabbit IgG (H+L)), der einen fluoreszierenden Farbstoff enthält, sichtbar gemacht. Gleichzeitig wurde eine Anfärbung des Kerns mit DAPI (DNA-Färbung) durchgeführt (zur Methode s. 2.8.1 und 2.8.2). Im Fluoreszenzmikroskop werden die Anfärbungen sichtbar. In den folgenden Abbildungen werden die Ergebnisse der Connexin- und Kernfärbungen nach der Retinoidbehandlung dargestellt. Die Bilder aus den jeweiligen Versuchsreihen wurden zum besseren Vergleich mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen. In den Bildern sind die Connexin43-Proteine grün und die Kerne (DNA) rot dargestellt.

In den Abb. **3.1.3.1- 3.1.3.6** werden die Ergebnisse der 24 und 72 stündigen Behandlungen mit 20 µM bis 1 µM Retinsäure, RSME, M1, M2 und M3 dargestellt.

In **Abb.3.1.3.1(A)** wurde eine Kontrollgruppe mit einer typischen Verteilung des Connexin43 dargestellt. Die Proteinplaques sind hauptsächlich in der Zellmembran

lokalisiert. Durch die Behandlung mit 20 μM Retinsäure kam es zu einer starken Abnahme der Connexin-Proteine in der Membran. Es konnte aber kein Anstieg des Connexinplaques im Zytoplasma detektiert werden.

Die RSME Behandlung zeigte keinen ausgeprägten Effekt auf die Lokalisierung des Connexin-Proteins. Dagegen konnte schon nach einer 24 stündigen Inkubation mit M1, M2 und besonders M3 sowohl eine deutliche Abnahme der Connexin43-Proteine in der Membran als auch gleichzeitig eine Zunahme des Connexin43-Proteins im Zytoplasma und am Kern beobachtet werden (**Abb.3.1.3.1 D-F**).

Die 72 stündige Inkubation mit RSME, M1, M2 und M3 führte bei allen Substanzen in erster Linie zu einer starken Abnahme der Connexin43-Proteine (**Abb.3.1.3.2**). Bei den mit M1, M2 behandelten Zellen konnten kaum noch Connexin-Proteine detektiert werden. Dabei verursachte die dreitägige Inkubation mit 20 μM M3 auch noch eine Delokalisation der Proteine ins Zytoplasma. Im Gegensatz zu den Derivaten, bewirkte die dreitägige Inkubation mit 20 μM RS einen Wiedereinbau des Connexins in die Membranen.

Nach der 24 stündigen Inkubation (**Abb.3.1.3.3**) der Zellen mit 10 μM Retinsäure, RSME, M1, M2 und M3 kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einer leichten Abnahme des zellmembrangebundenen Connexins; nur die RS Behandlung führte zu einem deutlichen Verlust an Connexin43-Plaques. Die dreitägige Inkubation (**Abb.3.1.3.4**) mit den Derivaten M1, M2 und M3 in der gleichen Konzentration bewirkte eine ausgeprägte Delokalisation des Connexins aus der Zellmembran ins Zytoplasma. Dieser Effekt war bei mit M1 behandelten Zellen besonders deutlich. Nach der dreitägigen Behandlung der Zellen mit den 10 μM M3 (**Abb. 3.1.3.4 F**) wurde eine starke Akkumulation des Connexins43 am Kern beobachtet. Dieser Effekt ist vergleichbar mit dem der eintägigen Inkubation mit 20 μM .

Die Behandlung der Zellen mit 10 μM RS und RSME führte nur zu einer Abnahme der Connexinplaques in der Zellmembran.

Die ein- und dreitägige Inkubation der WB-F344 Zellen mit 1- 0,001 μM Retinsäure, RSME, M1, M2, und M3 bewirkte keinen deutlichen Anstieg der Connexin-Menge in der Zellmembran. Beispiele sind in der **Abb. 3.1.3.5-6** dargestellt.

Konzentrationsbereich 20 μM (Inkubationszeit: 24 Std.)

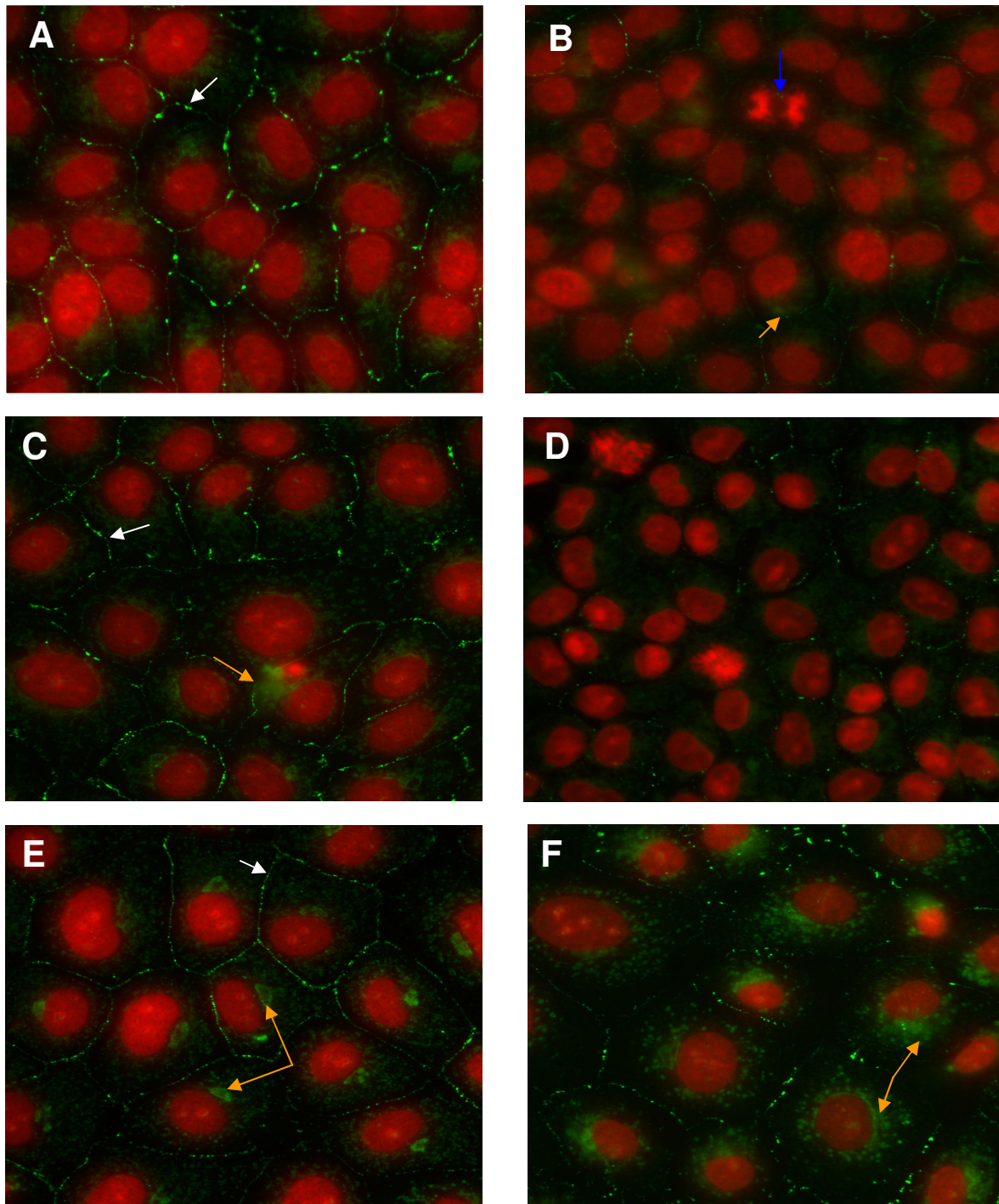


Abb.3.1.3.1

Nachweis der subzellulären Verteilung des Connexin43-Proteins mittels Immunfluoreszenz-Analyse in WB-F344 Zellen nach 24 Std. bei einer Konzentration von jeweils 20 μM . Als Lösungsmittelkontrolle wurde 0,2% Ethanol eingesetzt.

Weißer Pfeil (\rightarrow): Connexin43 in der Membran; gelbe Pfeile (\rightarrow) Connexin43 in Cytosol; blauer Pfeil (\rightarrow): mitotischer Kern

A: Kontrolle (0,2% Ethanol);

B: RS: Retinsäure, **C:** RSME: Retinsäuremethylester,

D: M1: 4-Oxo-3-acetoxy-Retinsäuremethylester,

E: M2: 3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester,

F: M3: 4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester.

Konzentrationsbereich 20 μ M (Inkubationszeit: 72 Std.)

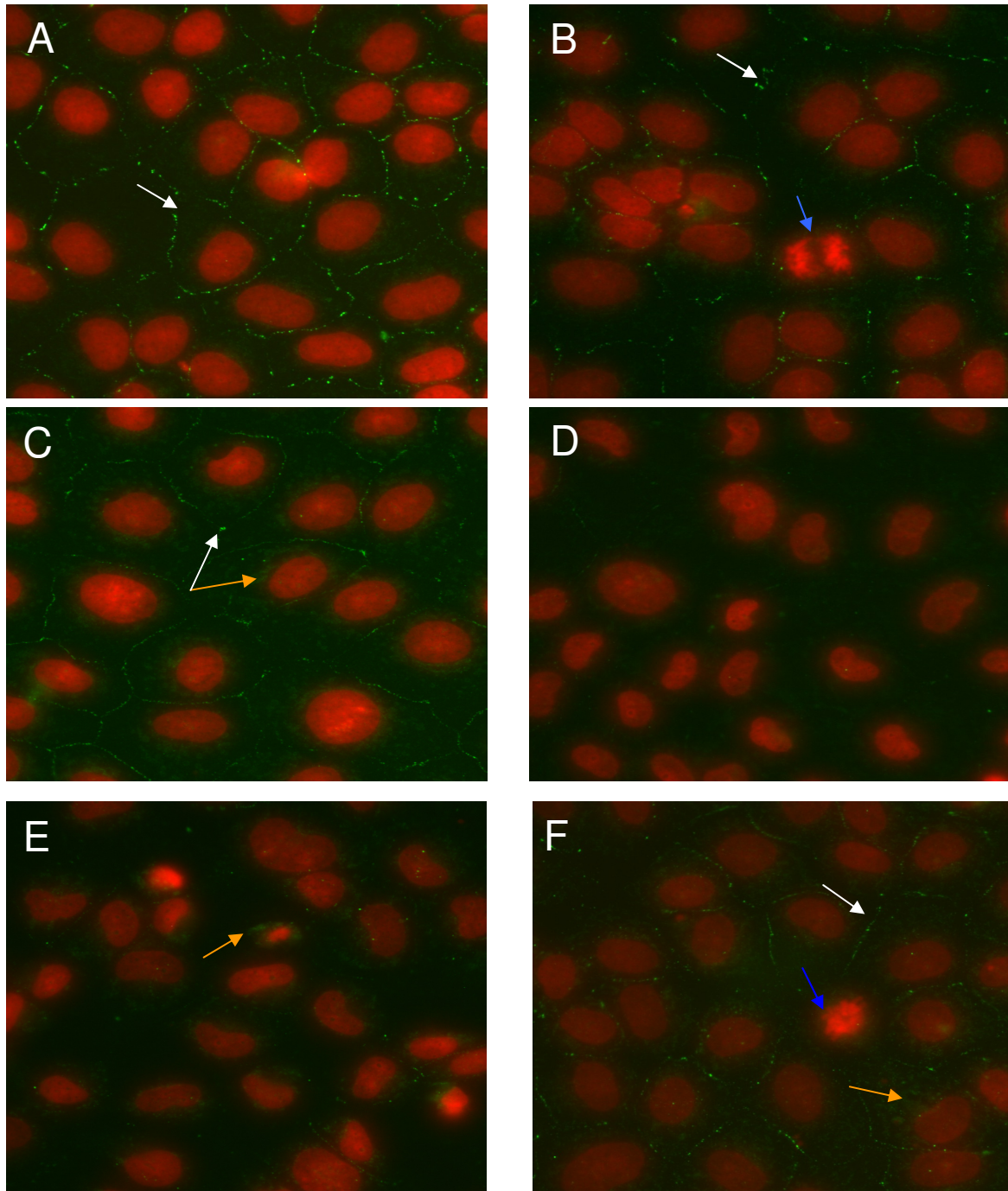


Abb.3.1.3.2

Nachweis der subzellulären Verteilung des Connexin43-Proteins mittels Immunfluoreszenz-Analyse in WB-F344 Zellen nach 72 Std. bei einer Konzentration von jeweils 20 μ M. Als Lösungsmittelkontrolle wurde 0,2% Ethanol eingesetzt.

Weißer Pfeil (\rightarrow): Connexin43 in der Membran; gelbe Pfeile (\rightarrow) Connexin43 in Cytosol; blauer Pfeil (\rightarrow): mitotischer Kern

A: Kontrolle (0,2% Ethanol);

B: RS: Retinsäure, **C:** RSME: Retinsäuremethylester,

D: M1: 4-Oxo-3-acetoxy-Retinsäuremethylester,

E: M2: 3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester,

F: M3: 4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester.

Konzentrationsbereich 10 μ M (Inkubationszeit: 24 Std.)

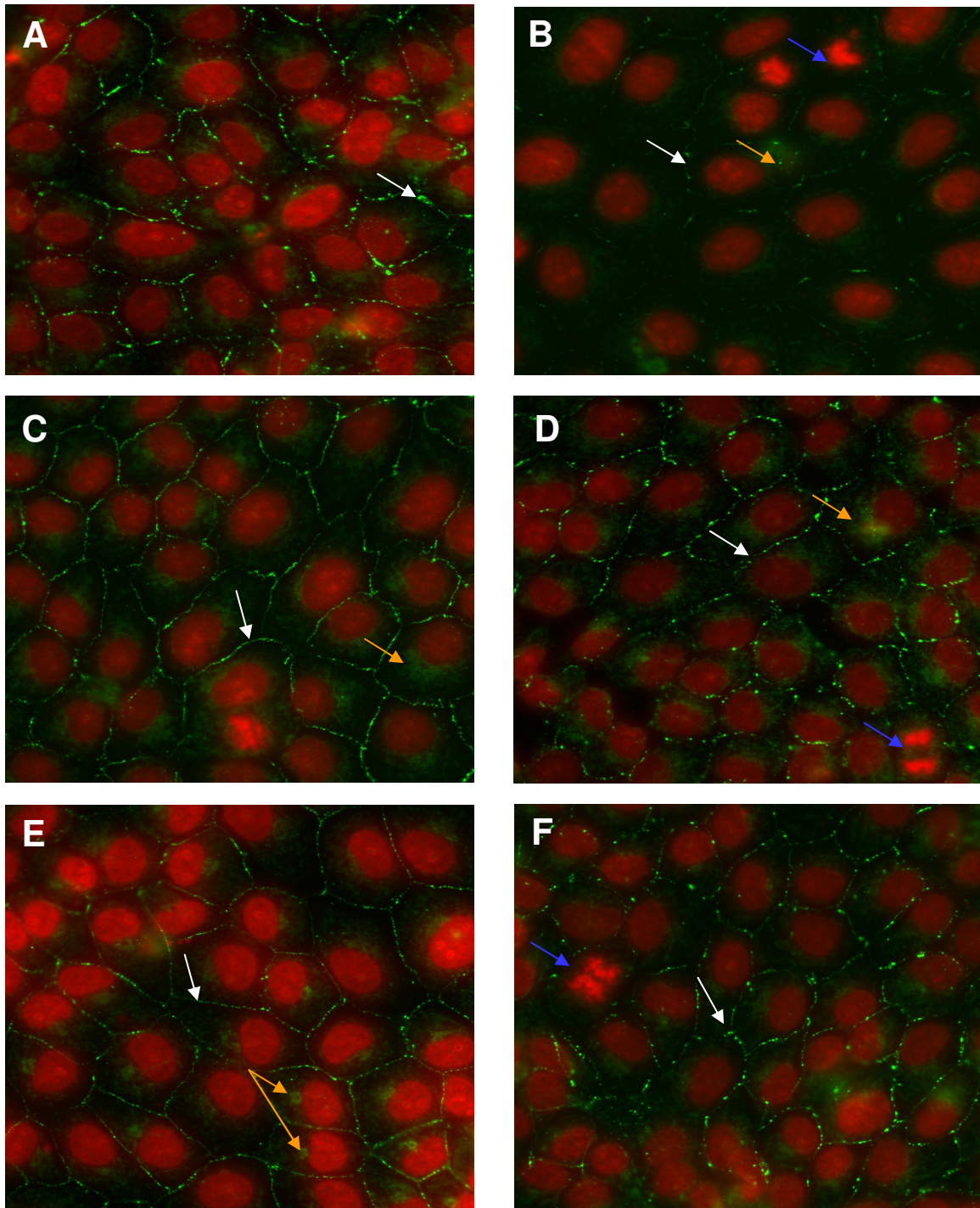


Abb.3.1.3.3

Nachweis der subzellulären Verteilung des Connexin43-Proteins mittels Immunfluoreszenz-Analyse in WB-F344 Zellen nach 72 Std. bei einer Konzentration von jeweils 20 μ M. Als Lösungsmittelkontrolle wurde 0,2% Ethanol eingesetzt.

Weißer Pfeil (\rightarrow): Connexin43 in der Membran; gelbe Pfeile (\rightarrow) Connexin43 in Cytosol; blauer Pfeil (\rightarrow): mitotischer Kern

A: Kontrolle (0,2% Ethanol);

B: RS: Retinsäure, **C:** RSME: Retinsäuremethylester,

D: M1: 4-Oxo-3-acetoxy-Retinsäuremethylester,

E: M2: 3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester,

F: M3: 4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester.

Konzentrationsbereich 10 μM (Inkubationszeit: 72 Std.)

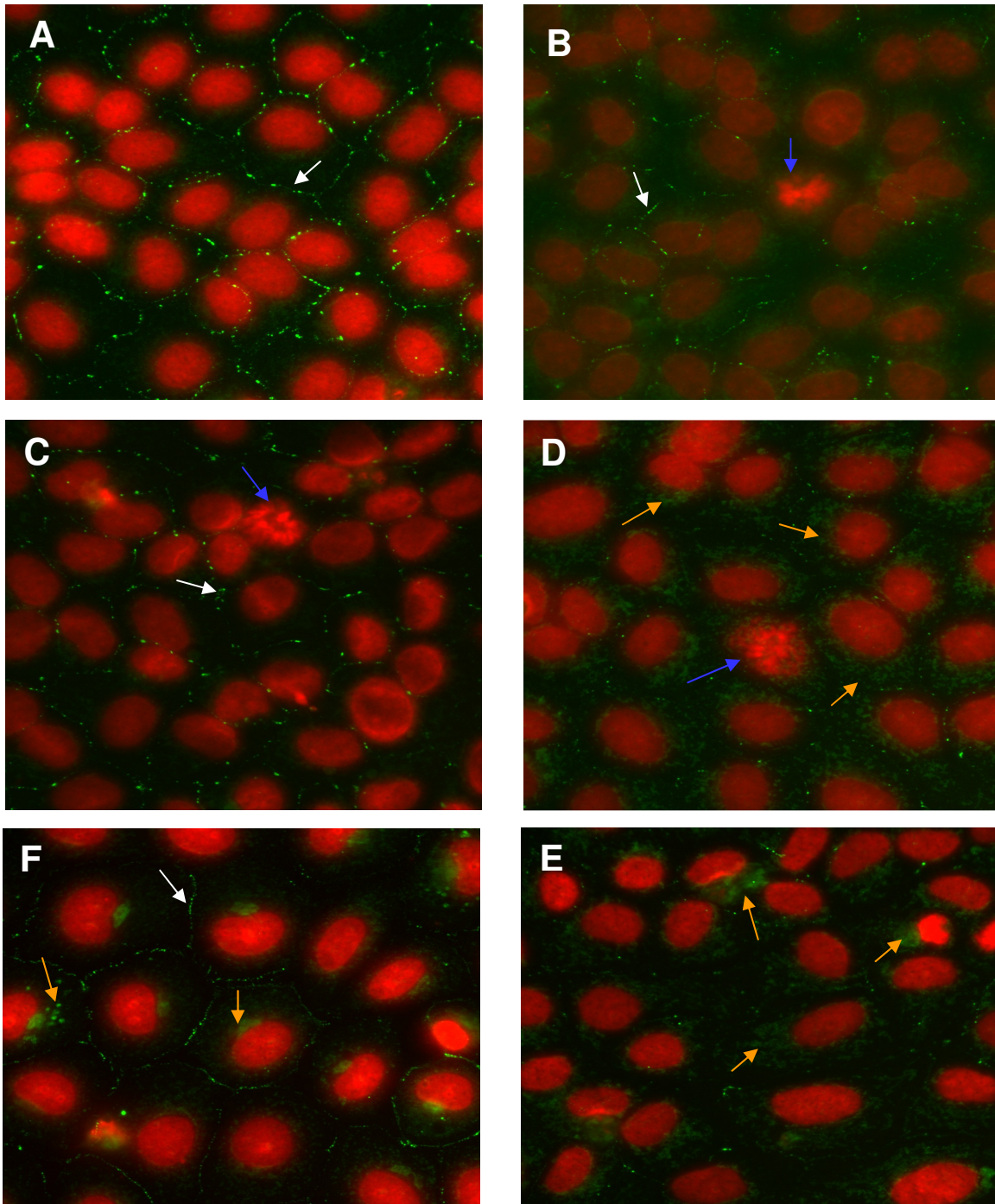


Abb.3.1.3.4

Nachweis der subzellulären Verteilung des Connexin43-Proteins mittels Immunfluoreszenz-Analyse in WB-F344 Zellen nach 72 Std. bei einer Konzentration von jeweils 10 μM . Als Lösungsmittelkontrolle wurde 0,2% Ethanol eingesetzt.

Weißer Pfeil (\rightarrow): Connexin43 in der Membran; gelbe Pfeile (\rightarrow) Connexin43 in Cytosol; blauer Pfeil (\rightarrow): mitotischer Kern

A: Kontrolle (0,2% Ethanol);

B: RS: Retinsäure, **C:** RSME: Retinsäuremethylester,

D: M1: 4-Oxo-3-acetoxy-Retinsäuremethylester,

E: M2: 3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester,

F: M3: 4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester.

Konzentrationsbereich 1,0 μ M (Inkubationszeit: 24 Std.)

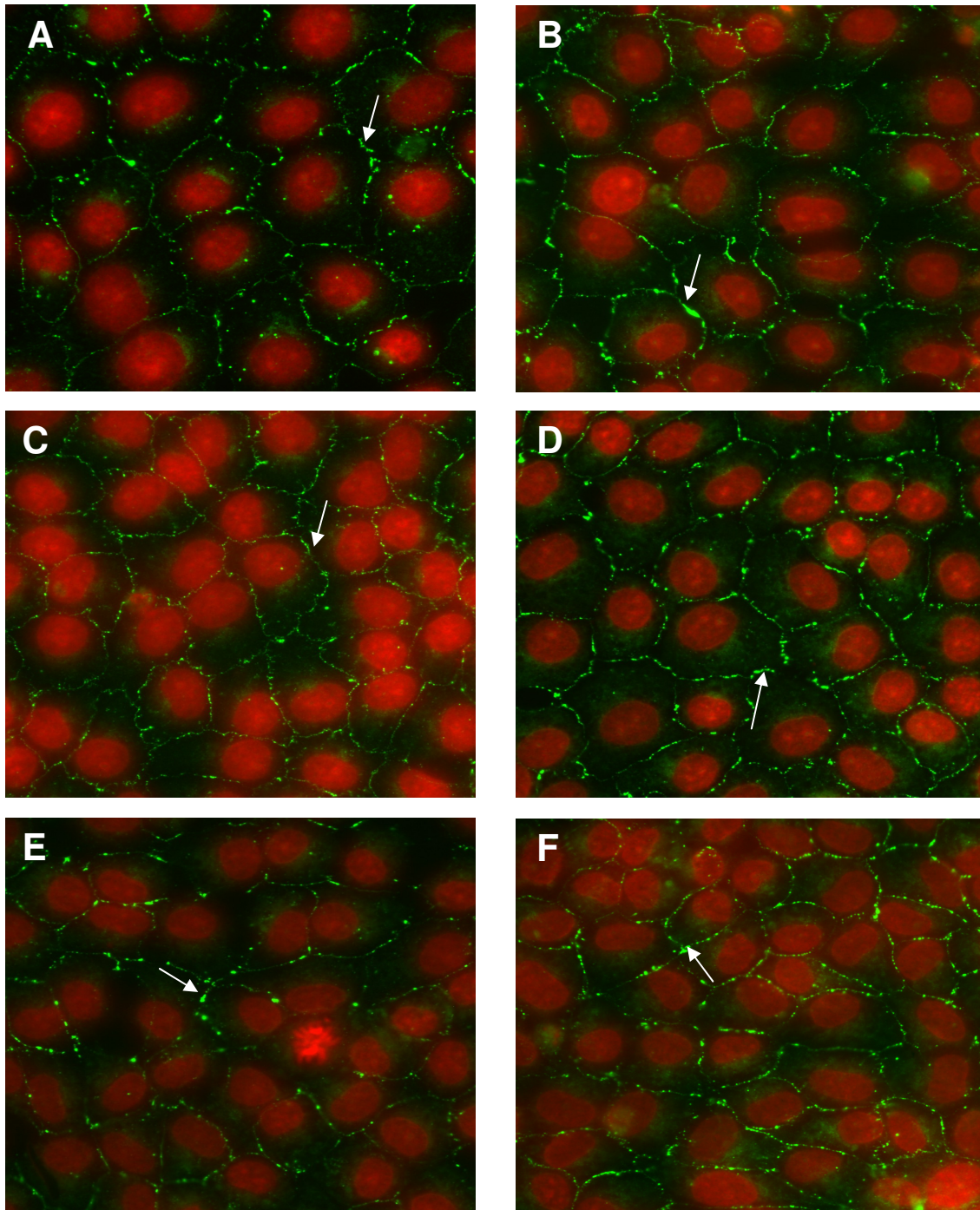


Abb.3.1.3.5

Nachweis der subzellulären Verteilung des Connexin43-Proteins mittels Immunfluoreszenz-Analyse in WB-F344 Zellen nach 72 Std. bei einer Konzentration von jeweils 1,0 μ M. Als Lösungsmittelkontrolle wurde 0,2% Ethanol eingesetzt.

Weißer Pfeil (\rightarrow): Connexin43 in der Membran in Cytosol;

A: Kontrolle (0,2% Ethanol);

B: RS: Retinsäure, **C:** RSME: Retinsäuremethylester,

D: M1: 4-Oxo-3-acetoxy-Retinsäuremethylester,

E: M2: 3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester,

F: M3: 4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester.

Konzentrationsbereich 1,0 μM (Inkubationszeit: 72 Std.)

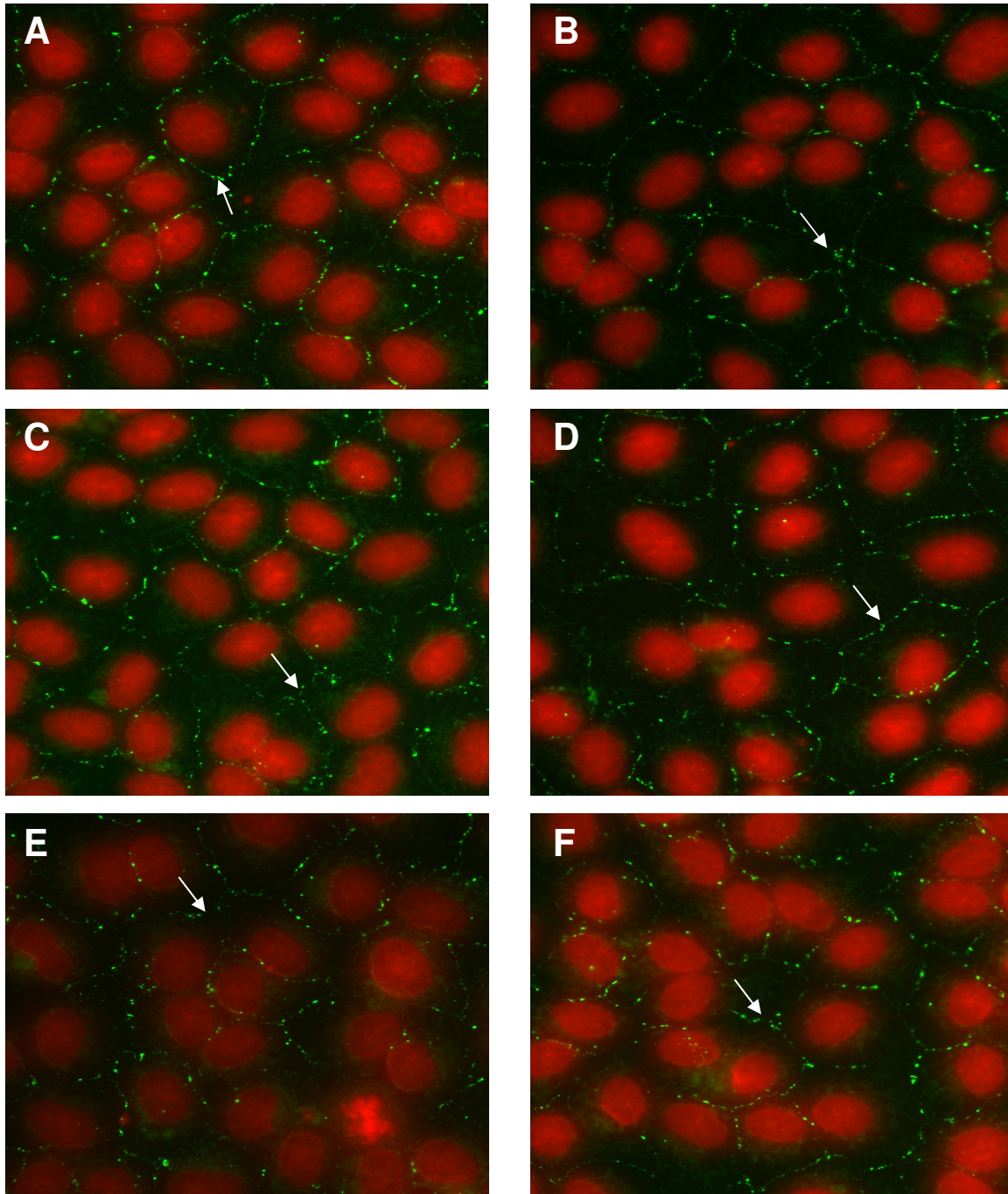


Abb.3.1.3.6

Nachweis der subzellulären Verteilung des Connexin43-Proteins mittels Immunfluoreszenz-Analyse in WB-F344 Zellen nach 72 Std. bei einer Konzentration von jeweils 1,0 μM . Als Lösungsmittelkontrolle wurde 0,2% Ethanol eingesetzt.

Weißer Pfeil (\rightarrow): Connexin43 in der Membran in Cytosol;

A: Kontrolle (0,2% Ethanol);

B: RS: Retinsäure, **C:** RSME: Retinsäuremethylester,

D: M1: 4-Oxo-3-acetoxy-Retinsäuremethylester,

E: M2: 3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester,

F: M3: 4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester.

3.1.4 Einfluss der Retinoide auf die Aktivierung des Retinsäurerezeptor RAR β

In der Literatur wird eine retinoidrezeptorabhängige Chondrogenese (Gliedmassenentwicklung bei Embryonalphase) beschrieben. Eine besondere Funktion in der Differenzierung und Embryonalentwicklung wird den Retinsäurerezeptoren der Unterklasse β (RAR β) zugeschrieben [Yu-Jui et al., 1992]. Es wird angenommen, dass diese Rezeptoren auch eine Rolle bei der retinsäuregesteuerten Regulation der ZSK spielen. Die Untersuchungen zu einer möglichen Bindung bzw. Aktivierung des RAR β durch RSME und seiner Derivate wurden in einer Reporterzelllinie von Teratokarzinomzellen der Maus (F9 RAR β LacZ) durchgeführt. Diese Zellen sind stabil mit einem Genkonstrukt transfiziert, das aus RAR β -Promotor und dem LacZ (β -Galaktosidase) Reporter gen besteht. Im RAR β -Promotor ist ein retinsäurespezifisches responsives Element (RARE) lokalisiert. Retinoide binden an Retinsäurerezeptoren (RAR, RXR), die als Heterodimere an das RARE binden. Dadurch wird die Transkription des LacZ (β -Galaktosidase) Gens stimuliert. Das Produkt dieser Transkription ist das Enzym β -Galaktosidase, dessen Aktivität durch Umsetzung von ONPG (ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid) zu Nitrophenol bestimmt werden kann (zur Methode siehe 2.7). Die Retinsäure ist ein natürlicher Ligand von RAR β . Es wurde gezeigt, dass die Behandlung dieser F9 RAR β LacZ Zellen mit all-trans-Retinsäure, 9-cis-Retinsäure oder 4-oxo-Retinsäure zu einem Anstieg der β -Galaktosidase-Aktivität führt. [Nikawa, et al 1995].

Die Ergebnisse nach der 24 stündigen Inkubation der F9 RAR β -LacZ Zellen mit Retinoiden sind in der **Abb. 3.1.4.1A/B** dargestellt. Die Behandlung der Zellen mit Retinsäure führte wie erwartet zur Transaktivierung des RAR β -Promotors bei Konzentrationen zwischen 10 und 0,01 μ M. Nach der Inkubation der Zellen mit 10-0,01 μ M RSME wurde ein ähnlicher Effekt wie bei der Retinsäureinkubation beobachtet. Während Retinsäure eine 4-7fache Induktion der β -Galaktosidase-Aktivität bewirkt, zeigt der RSME in Konzentrationsbereich 10-0,01 μ M nur eine 2-5-fache Erhöhung der β -Galaktosidase-Aktivität. Beide Substanzen bewirkten bei 0,001 μ M Konzentration keine signifikante Erhöhung der β -Galaktosidase-Aktivität. Die Behandlung der Zellen mit 20 und 10 μ M M2 führte dagegen zu einer Abnahme der β -Galaktosidase-Aktivität (die Substanz erwies sich in den Konzentrationen von

20µM und 10 µM als zelltoxisch für diese Zelllinie). Nach der Behandlung der Zellen mit 1 bis 0,01 µM M2 konnte eine signifikante 3–2-fache Induktion der β-Galaktosidase-Aktivität gemessen werden. Die 24 stündige Inkubation mit 20 µM M1 und M3 führte im Vergleich zur Kontrolle zu keinem signifikanten Anstieg der β-Galaktosidase-Aktivität. Die Behandlung der F9 RARβ-LacZ Zellen mit 10 µM RSME führte zu einer 4 fachen Induktion der β-Galaktosidase-Aktivität; gleichzeitig zeigt die Behandlung der Zellen mit 10 µM M1 und M3 nur eine 2-2,6-fache Erhöhung der β-Galaktosidase-Aktivität. Nach der Behandlung der Zellen mit 0,01 µM M1 und 0,01 µM M3 konnte ein signifikanter Anstieg der β-Galaktosidase- Konzentration auf das 1,8 Fache der Kontrolle gemessen werden. Im Gegensatz zu Retinsäure, RSME und M2 führte die 24 stündige Inkubation der Zellen mit 0,001µM M1 und 0,001 µM M3 zur 1,8 bzw. 1,9-fachen Induktion der β-Galaktosidase-Aktivität. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass RSME und seine Derivate in der Lage sind, den RARβ-Promotor zu transaktivieren.

| | RS | RSME | M1 | M2 | M3 |
|------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| Kontrolle (0,2% ETOH) | 100 ± 39 | 100 ± 39 | 100 ± 39 | 100 ± 39 | 100 ± 39 |
| 20 µM | 159 ± 71 | 251 ± 116 | 86± 47 | 34 ± 44 | 214 ± 170 |
| 10 µM | 694 ± 176 *** | 399 ± 112 *** | 260 ± 21 *** | 38 ± 46 | 207 ± 45 *** |
| 1,0 µM | 563 ± 169 *** | 394 ± 160 *** | 476 ± 166 *** | 328 ± 95 *** | 287 ± 54 *** |
| 0,1 µM | 319 ± 42 *** | 238 ± 33 *** | 244 ± 51 *** | 269 ± 163 *** | 164 ± 29 ** |
| 0,01 µM | 359 ± 110 *** | 250 ± 77 *** | 181 ± 55 ** | 185 ± 55 * | 187 ± 57 ** |
| 0,001 µM | 127 ± 29 | 105 ± 24 | 180 ± 41 *** | 126 ± 36 | 193 ± 52 *** |

Tab. 3.1.4.1A

Aktivität der β-Galaktosidase in der F9-RARβ-LacZ Zellen nach eintägiger Inkubation mit den Retinoiden, 0,2 %Ethanol wurde als Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Die Daten sind in Prozent der Lösungsmittelkontrolle (100% Kontrolle) angegeben. Dabei entspricht die Kontrolle mit 100 ± 39 % einer Enzymaktivität von 2,1 ± 0,81 mU/mg.

Kontrolle (0,2% Ethanol);

RS: Retinsäure, RSME: Retinsäuremethylester,

M1: 4-Oxo-3-acetoxy-Retinsäuremethylester,

M2: 3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester,

M3: 4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester.

Hierbei wurden die Mittelwerte von 5 unabhängigen Testreihen bestimmt. [*p<0,05, **p<0,01; ***p<0,001].

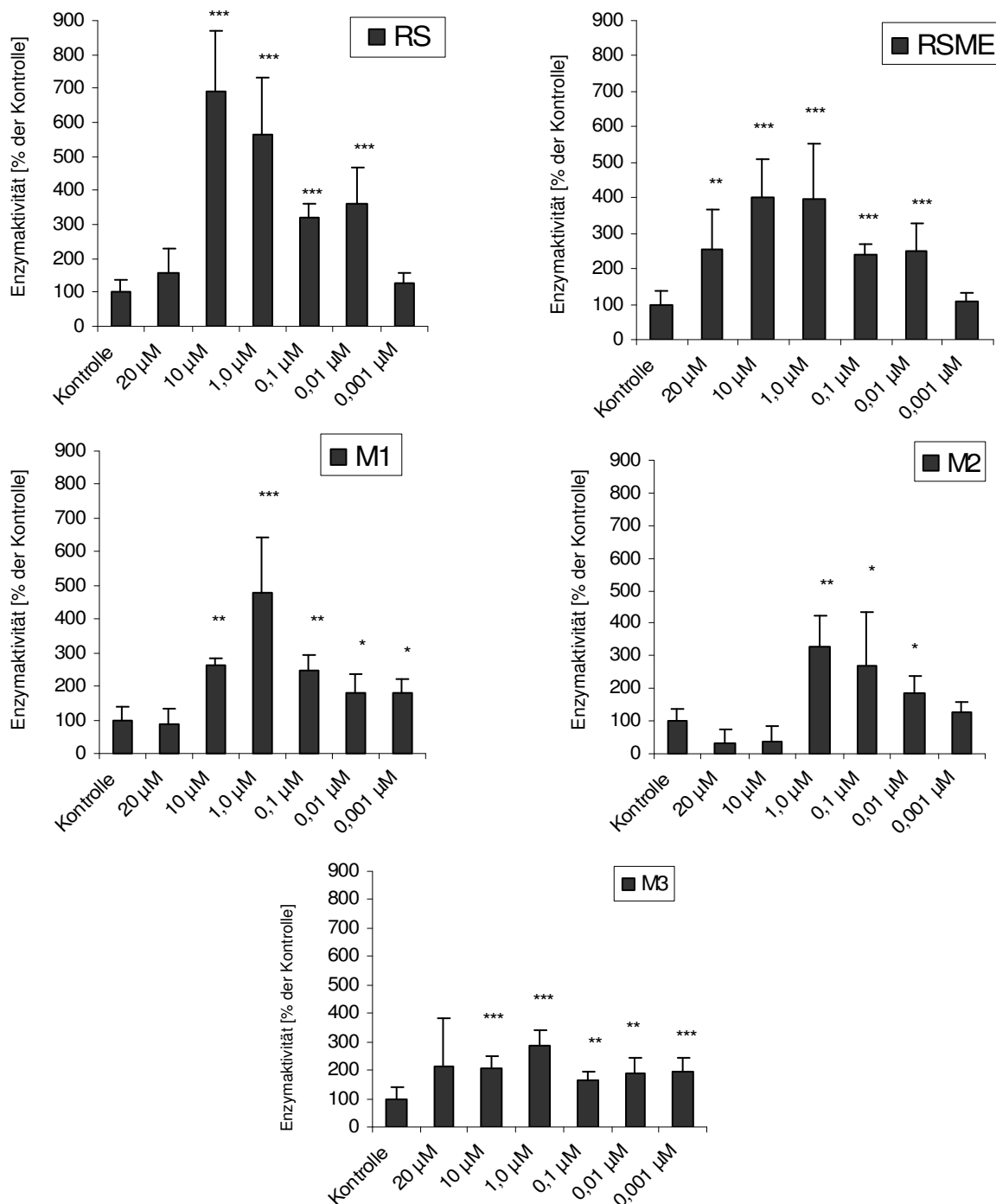


Abb. 3.1.4.1B(Diagrammdarstellung)

Aktivität der β -Galaktosidase in der F9-RAR β -LacZ Zellen nach 1-tägiger Inkubation mit den Retinoiden, 0,2 %Ethanol wurde als Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Die Daten sind in Prozent der Lösungsmittelkontrolle (100% der Kontrolle) angegeben. Dabei entspricht die Kontrolle mit 100 ± 39 % einer Enzymaktivität von $2,1 \pm 0,81$ mU/mg.

Kontrolle (0,2% Ethanol),

RS: Retinsäure, RSME: Retinsäuremethylester,

M1: 4-Oxo-3-acetoxy-Retinsäuremethylester,

M2: 3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester,

M3: 4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester.

Hierbei wurden die Mittelwerte von 5 unabhängigen Testreihen bestimmt. [*p<0,05, **p<0,01; ***p<0,001].

3.1.5 Einfluss der Retinoide auf die Kommunikation anderer Zelllinien

In der Literatur wird beschrieben, dass in bestimmten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches [Xu et al., 1994] und Bronchialkarzinomen die Expression von RAR β 2 deutlich reduziert ist oder vollständig fehlt. Retinoide vermindern signifikant das Risiko von Kopf- und Nacken Plattenepithelkarzinomen (Squamous Carcinom) bei Patienten, die eine höhere Tendenz zur Entwicklung eines Zweitumors zeigen [Lotan et al., 1997]

Die untersuchten SCL-1 Zellen sind wenig differenzierte menschliche Plattenepithelkarzinomzellen [Boukamp et al. 1982]. Es ist bekannt, dass einige Tumorzellen nicht in der Lage sind, miteinander und/ oder mit der umgebenden normalen Zellen mittels Gap Junctions zu kommunizieren [Trosko et al., 1998].

Zuerst wurde mittels Farbstofftransfer (Mikroinjektion eines fluoreszierenden Farbstoffs) untersucht, ob diese Zellen eine Kommunikation über Gap Junctions aufweisen. Die hier getesteten Plattenepithelkarzinomzellen der Haut (SCL-1 Zellen) zeigten wie bei vielen Tumorzellen bekannt [Metha et al., 1989; Budunova et al., 1994; Trosko et al., 1998], keine Kommunikation über Gap Junctions (**Abb. 3.1.5.1 A**). Weiterhin sollte das Verhalten der Zellen in Bezug auf die Kommunikationsfähigkeit über Gap Junctions in einer Cokultur mit „normalen“ Hautfibroblasten untersucht werden.

Im nächsten Schritt wurde zuerst die Basis Kommunikation der menschlichen Hautfibroblasten -HDFF Zellen- in Monokultur gemessen. Die HDFF Zellen weisen eine Basiskommunikation von 16 ± 3 Zellen auf. Die HDFF und SCL-1 Zellen wurden in einem 2:1 Verhältnis kokultiviert. In der zu Monolayer gewachsenen Cokultur wurde die Kommunikationsfähigkeit beider Zellarten gemessen. Die Kommunikationsrate der HDFF Zellen nimmt in der Cokultur um 50-60% ab. Bei den SCL-1 Zellen konnte auch in Cokultur keine Kommunikation gemessen werden (**Abb. 3.1.5.1 A** und **Abb. 3.1.5.2 (A-D)**). **Abb. 3.1.5.2** zeigt ein Beispiel für die mikroskopischen Aufnahmen der HDFF, SCL Zellen in Mono- und Cokultur nach der Mikroinjektion des fluoreszierenden Farbstoffs Lucifer Yellow. Dabei wurde in eine willkürlich ausgewählte Zelle der Farbstoff Lucifer Yellow mikroinjiziert und nach ca. 1 min die Anzahl der fluoreszierenden Nachbarzellen der Zielzelle ermittelt.

Die Immunohistochemische Untersuchung zeigte, dass die beiden Zellarten Connexin43 exprimieren. Bei den SCL-1 Zellen wurden die Connexin43-Plaques nur im Zytoplasma nachgewiesen [Stuhlmann/Ale-Agha unveröffentlichte Daten].

Hier sollte untersucht werden, ob die Retinoidbehandlung einen Einfluss auf die Kommunikationsrate der SCL-1 und HDFF Zellen in Mono- und Cokultur hat.

Die Inkubation fand unter den gleichen Bedingungen statt, die für die vorherigen Versuche galten.

Da Retinsäure als Stimulans der ZZK bekannt ist, wurden im folgenden Versuch die Cokultur HDFF und SCL 1 Zellen (2:1) für 24 Std. mit 1 und 10 μM Retinsäure, 1 und 10 μM M2 inkubiert. Die Ergebnisse sind in der **Abb. 3.1.5.1(A-D)** dargestellt. Als Kontrollen wurden von HDFF und SCL-1 Monolayer getrennt kultiviert und auch mit Retinsäure und M2 behandelt. Die 24 stündige Inkubation der HDFF Zellen in Monokultur mit 1 μM Retinsäure führte zu einer signifikanten Erhöhung der ZZK auf das 1,5 fache der Kontrolle. Die M2 Behandlung zeigte keinen Einfluss auf die ZZK der HDFF Zellen **Abb. 3.1.5.1(B, C)**. Nach der 24 stündigen Inkubation konnte weder in SCL- Monolayerkultur, noch in Cokultur eine Veränderung der ZZK beobachtet werden **Abb. 3.1.5.1(C)**. Dagegen führte die Retinsäureinkubation bei den HDFF Zellen der Cokultur zu einer Stimulation der ZZK im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Cokultur. Dadurch konnten SCL-1 Zellen zwar nicht stimuliert, aber der inhibitorische Effekt der Tumorzellen auf die „Normalzellen“ aufgehoben werden **Abb. 3.1.5.1(D)** und **Abb. 3.1.5.2 (E-G)**.

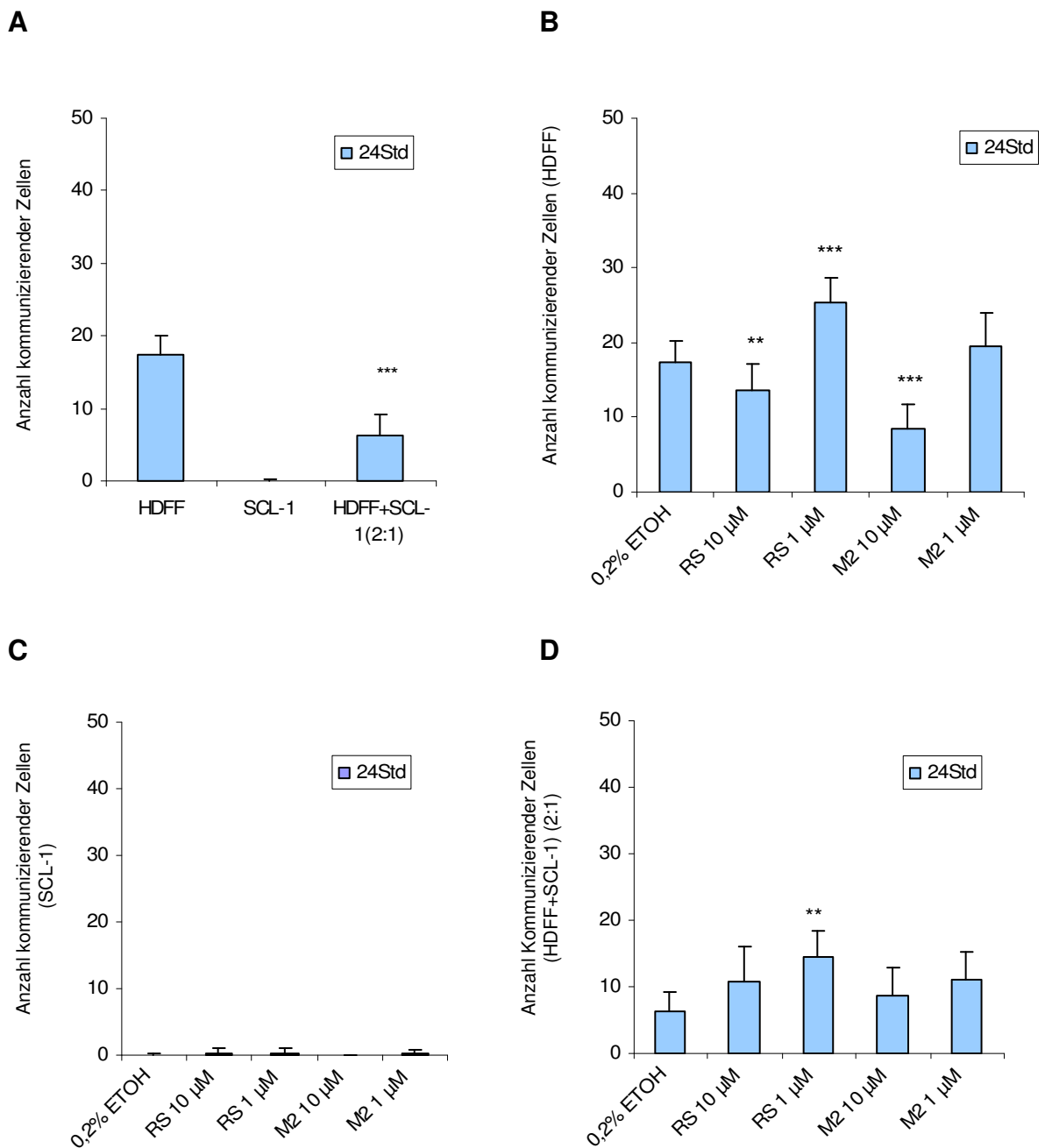


Abb. 3.1.5.1 (A-D)

A: Basiskommunikation von HDFF, SCL-1 und HDFF+SCL-1 (2:1)

B: Interzelluläre Kommunikation von HDFF Zellen nach 24 stündiger Behandlung mit 1 μM Lösungen der *RS*: *Retinsäure*, *M2*: *3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester*.

C: Interzelluläre Kommunikation von SCL-1 Zellen nach 24 stündiger Behandlung mit 1 μM Lösungen der *RS*: *Retinsäure*, *M2*: *3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester*.

D: Interzelluläre Kommunikation von HDFF Zellen in Cokultur von HDFF+SCL-1 Zellen im Verhältnis von (2:1) nach 24 stündiger Behandlung mit 1 μM Lösungen der *RS*: *Retinsäure*, *M2*: *3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester*.

Hier bei wurden die Mittelwerte von 3 unabhängigen Testreihen bestimmt. [*p<0,05, **p<0,01; ***p<0,001]

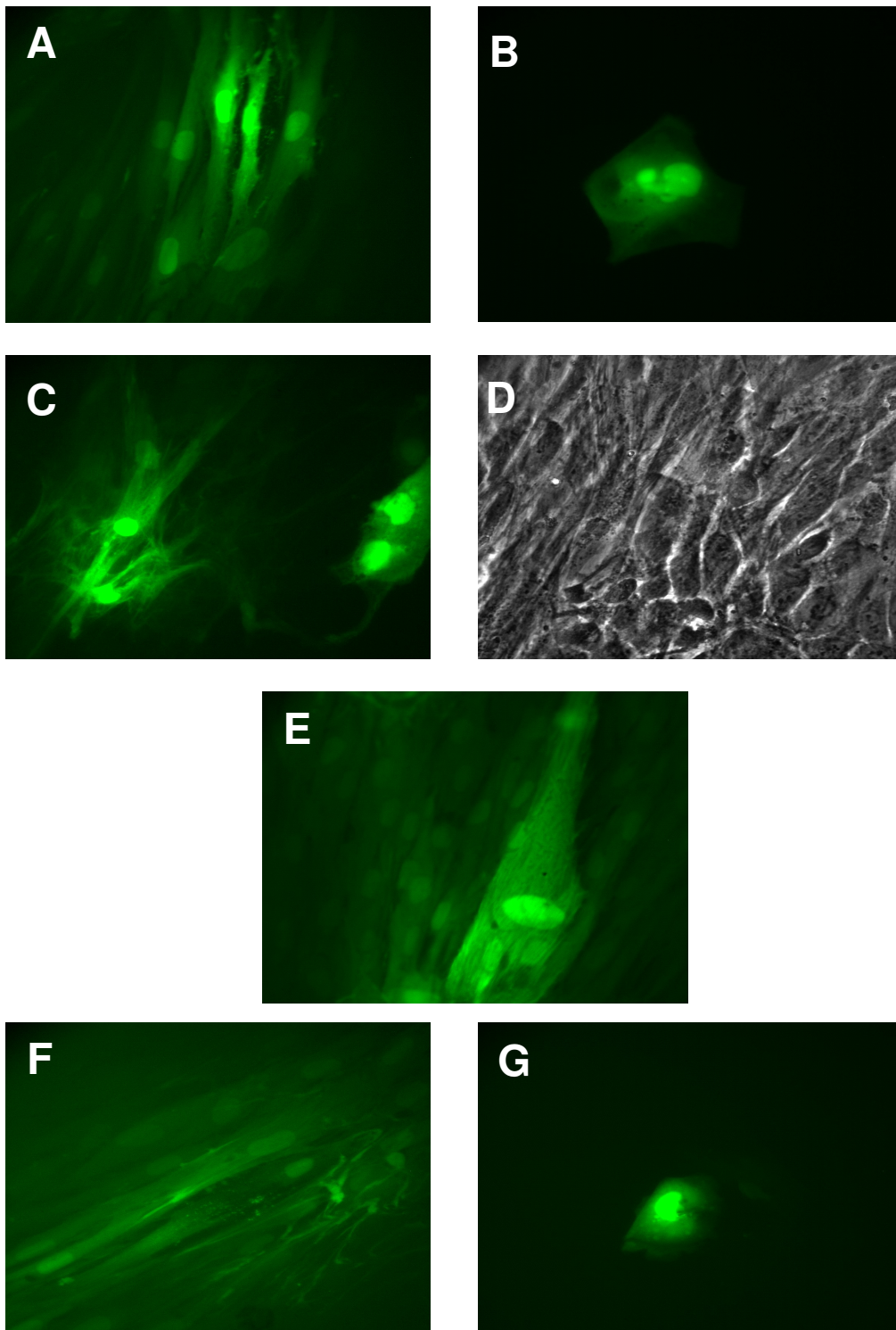


Abb. 3.1.5.2 (A-G)

Interzelluläre Kommunikation von HDFF, SCL-1 und HDFF+SCL-1(2:1) Zellen nach 24 stündiger Behandlung.

A: 0,2% Ethanol in HDFF Zellen; B: 0,2% Ethanol in SCL-1 Zellen;

C: 0,2% Ethanol in HDFF+SCL-1 (2:1) Zellen,

D: 0,2% Ethanol in HDFF+SCL-1 (2:1) Zellen (Phasenkontrast),

E: 1 μ M *RS*: Retinsäure in HDFF,

F: 1 μ M *RS*: Retinsäure in HDFF aus HDFF+SCL-1 (2:1) Cokultur,

G: 1 μ M *RS*: Retinsäure in SCL-1 Zellen.

3.2 Flavonoide

Die Strukturen der hier untersuchten Flavonoide (-)-Epicatechin und Genistein sind in Kapitel 2.4 dargestellt.

3.2.1 Einfluss von (-)-Epicatechin und Genistein auf die Zell-Zell-Kommunikation

Einige antioxidativ wirksame Mikronährstoffe wie Carotinoide und Flavonoide sind in der Lage, die interzelluläre Kommunikation zu beeinflussen [Chaumontet et al.1997, Stahl et al. 1998].

In dem vorliegenden Kapitel wird der Einfluss von (-)-Epicatechin auf die Induktion von ZZK in WB-F344 Zellen beschrieben. Die Zellen wurden wie in **2.5.4.1** beschrieben für 24, 72 und 120 Std. mit 40 μM (-)-Epicatechin inkubiert. Die Stammlösungen für (-)-Epicatechin und Genistein wurden in DMSO eingesetzt, daher wurde als Kontrolle DMSO mit einer Endkonzentration von 0,2% mitgeführt. Es ist bekannt, dass Genistein (Tyrosinkinasehemmer) in der Lage ist, nach einem 24 und 72 stündigen Inkubation die ZZK in Hautfibroblasten zu stimulieren [Nikolai, 1997]. Daher wurde Genistein als Positivkontrolle eingesetzt. Die Messung der ZZK erfolgte wie in **2.6** und **3.1**. beschrieben. Genistein zeigt bei einer Konzentration von 40 μM nach Literaturdaten einen inhibitorischen Effekt auf tyrosinspezifische Proteinkinasen [Akiyama et al., 1987]. Die Zellen wurden daher für 24 bis 120 Std. mit 40 μM Epicatechin inkubiert. In der **Abb. 3.2.1.1** sind die Effekte der mehrtägigen Inkubation der Zellen mit 40 μM (-)-Epicatechin und Genistein dargestellt. Bereits nach einer 24 stündigen Inkubation mit 40 μM (-)-Epicatechin konnte eine Erhöhung der ZZK auf das 1,5-fache und mit 40 μM Genistein auf 2,1fache der Kontrolle gemessen werden. Eine längere Inkubation (72 Std.) mit (-)-Epicatechin führte in den WB-F344 Zellen zu einem weiteren Anstieg der ZZK auf das 2,1-fache der Kontrolle. Im Vergleich dazu zeigte die 72 stündige Inkubation mit Genistein eine 2,9fache Erhöhung der ZZK. Eine längere Inkubation der Zellen mit (-)-Epicatechin induzierte keine weitere signifikante Veränderung der ZZK im Vergleich zu der 72 stündigen Inkubation.

Dagegen konnte nach der 120 stündigen Inkubation mit Genistein eine Abnahme des stimulierenden Effektes beobachtet werden.

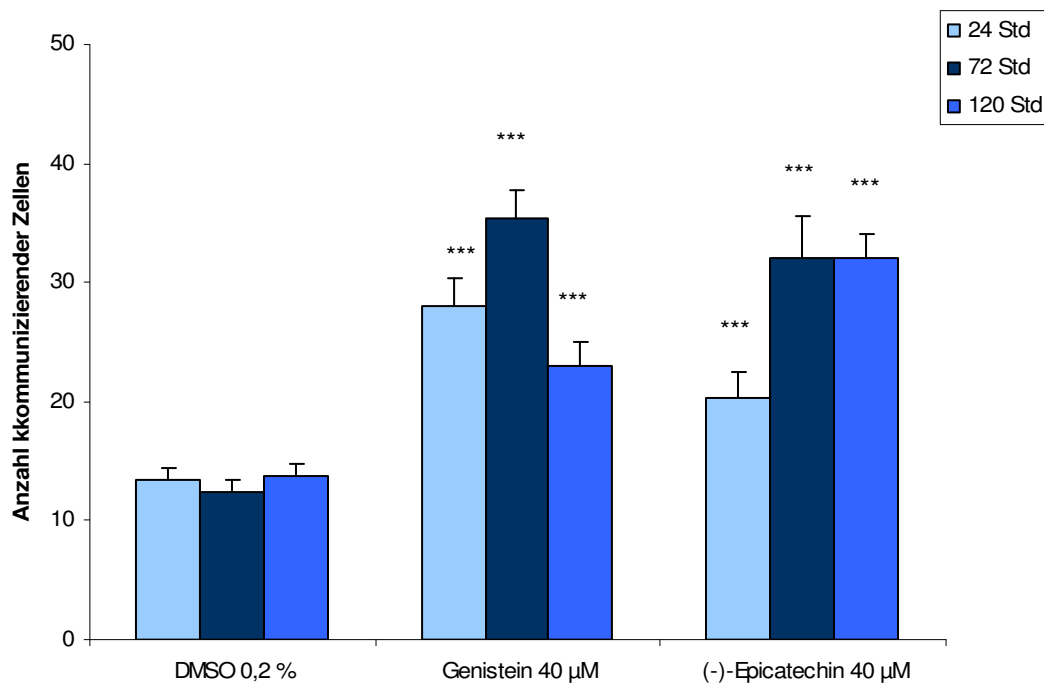


Abb. 3.2.1.1

Interzelluläre Kommunikation in der Zelllinie WB-F344 nach 24, 72 und 120 stündiger Behandlung mit 40 µM von Genistein und (-)-Epicatechin. Als Lösungsmittelkontrolle wurde 0,2% DMSO eingesetzt.

Da die 72 stündige Inkubation der Zellen mit den beiden Flavonoiden einen Anstieg der interzellulären Kommunikation um das 2-3-fache der Kontrolle induziert, wurde für die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit nur der Zeitpunkt von 72 Std. gewählt. (**Abb.3.2.1.2**). Dabei zeigte sich, dass die Behandlung mit der niedrigsten hier eingesetzten Konzentration 4 µM in den WB-F344 Zellen einen Anstieg der ZZK auf das 1,6-fache der Kontrolle bewirkt. Genistein wurde wieder als Positivkontrolle mitgeführt und hat einen fast 3-fachen Anstieg der ZZK hervorgerufen.

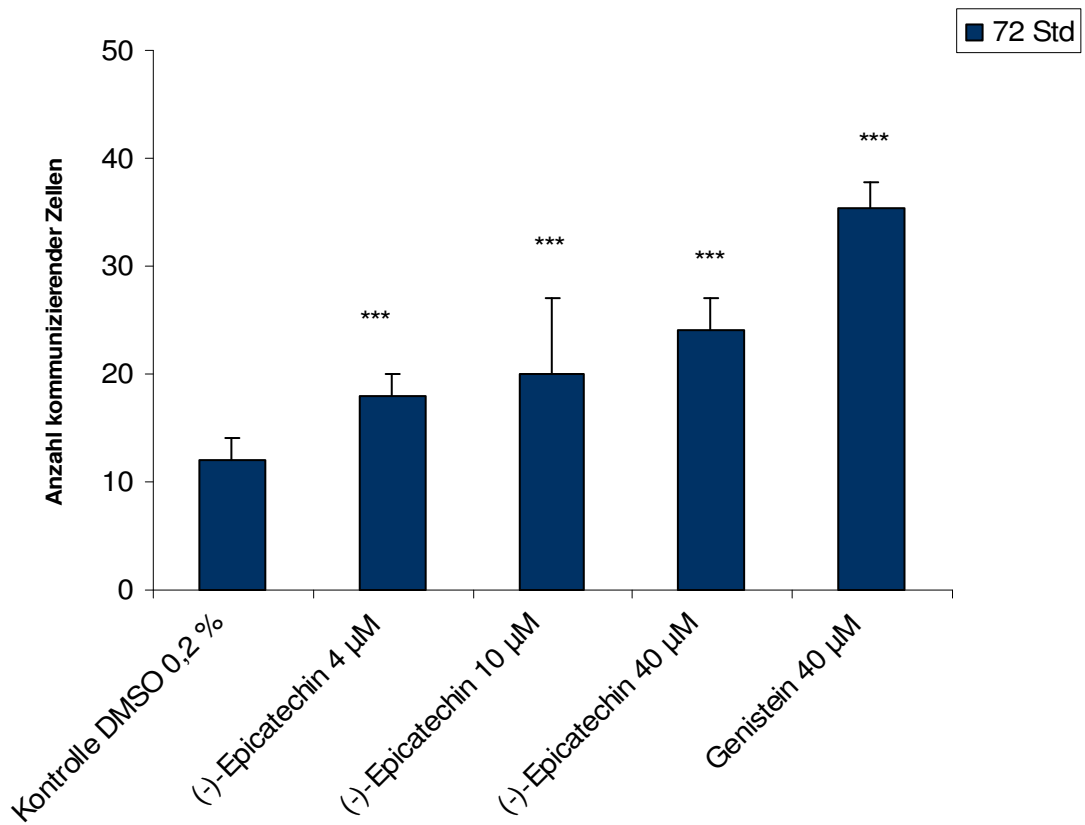


Abb. 3.2.1.2

Darstellung des konzentrationsabhängigen Einflusses von (-)-Epicatechin auf die interzelluläre Kommunikation der WB-F344 Zellen nach 72 stündiger Behandlung. 0,2% DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle und 40 µM Genistein als Positivkontrolle mitgeführt.

3.2.2 Einfluss von (-)-Epicatechin auf das Connexin43-Protein

Für die Western-Blot-Analyse des Connexin43 Proteins wurden die WB-F344 Zellen mit 40 µM (-)-Epicatechin mit 40 µM Genistein und 0,2% DMSO für 72 Std. inkubiert. Es wurden die gleichen Inkubationsbedingungen gewählt, wie zuvor bei **3.2.1** beschrieben. Die Herstellung der Zellextrakte und der Nachweis des Connexin43-Proteins erfolgte wie in **2.8.1** beschrieben.

Nach der gelelektrophoretischen Trennung des Connexin43 lassen sich bei Connexin43 3 Proteinbanden detektieren P0; P1; P2. Dabei stellt die P0 Proteinbande die unphosphorylierte, und die P1/P2 die phosphorylierten Formen dar (**Abb.3.2.2.1**). Nach der dreitägigen Inkubation mit (-)-Epicatechin und Genistein konnte in den WB-F344 Zellen eine leichte aber signifikante Erhöhung des Connexin43-Proteins gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.

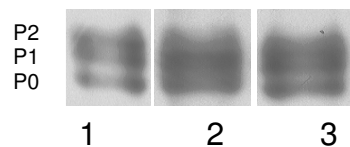


Abb.:3.2.2.1

Nachweis des Gap Junction-Proteins Cx 43 nach der 72 stündigen Inkubation mit 1: Kontrolle 0,2% DMSO; 2: 40 µM (-) Epicatechin; 3: 40 µM Genistein

3.2.3 Interaktion zwischen Phorbolster (TPA) und (-)-Epicatechin

TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) zählt zu den Tumorpromotoren. Der Phorbolster und einige andere Substanzen wie DDT und Lindan wurden in der Literatur als Inhibitoren der ZZK (Hu J. et al. 1995, Krutovskikh et al. 1995) beschrieben. TPA ist in der Lage, durch die Aktivierung von PKC Connexin43 am Serinrest zu phosphorylieren und damit die ZZK zu hemmen.

Hier wurden die TPA-Effekte auf die ZZK in WB-F344 Zellen, die Connexin43 als Haupt- Gap Junction- Protein exprimieren, untersucht.

Die Messung der ZZK erfolgte nach einer 90-minütigen Inkubation mit unterschiedlichen TPA- Konzentrationen.

Die Zellen wurden mit TPA in Konzentrationen von 0,1 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM und 100 nM inkubiert. Die Ergebnisse werden in der folgenden **Abb. 3.2.3.1** wiedergegeben. Die Behandlung der Zellen mit 0,1 nM TPA wies keinen Unterschied zur Kontrolle auf. Die Inkubation mit 1 μ M TPA verursachte im Vergleich zur Kontrolle nur eine 45%ige Inhibition der ZZK. Dagegen führte die Behandlung mit 5, 10 und 100 nM TPA über 90 min. zu einer vollständigen Inhibition der interzellulären Kommunikation.

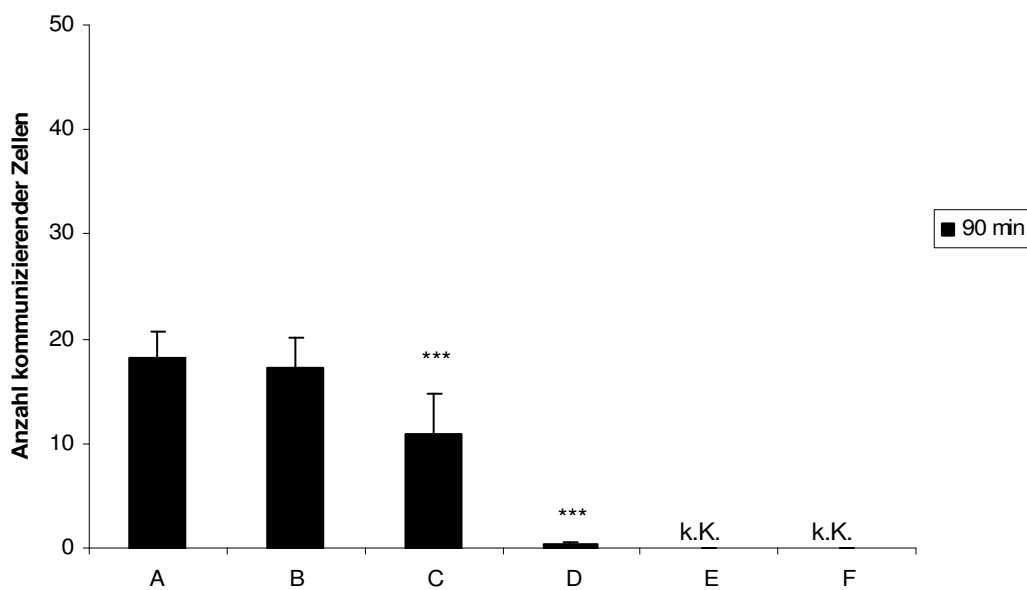


Abb. 3.2.3.1

Interzelluläre Kommunikation der WB-F344 Zellen nach 90 min Behandlung mit **A:** 0,2% DMSO, **B:** 0,1 nM TPA, **C:** 1 nM TPA, **D:** 5 nM TPA, **E:** 10 nM TPA, **F:** 100 nM TPA. k.K.: keine Kommunikation

Im nächsten Schritt wurden die Zellen für 90 min mit TPA + 40 μ M (-)-Epicatechin oder TPA + 40 μ M Genistein inkubiert. Dabei wurde bei gleichbleibender Konzentration von (-)-Epicatechin und Genistein die TPA- Konzentration variiert.

In der **Abb.3.2.3.2** sind die Ergebnisse für TPA 0,1 und 1 nM in Kombination mit 40 μ M (-)-Epicatechin und Genistein dargestellt. Die Inkubation der Zellen mit 0,1 nM TPA hat keinen Einfluss auf die ZZK in den WB-F344 Zellen.

Die 90 minütige Inkubation mit 1 nM TPA führte zu einer 45 %igen Hemmung der ZZK gegenüber der Kontrolle. Die Behandlung der Zellen mit der Kombination von 1 nM TPA + 40 μ M (-)-Epicatechin bzw. 1 nM TPA + 40 μ M Genistein führte zu einer Wiederherstellung der interzellulären Kommunikation in der Größenordnung der Kontrolle.

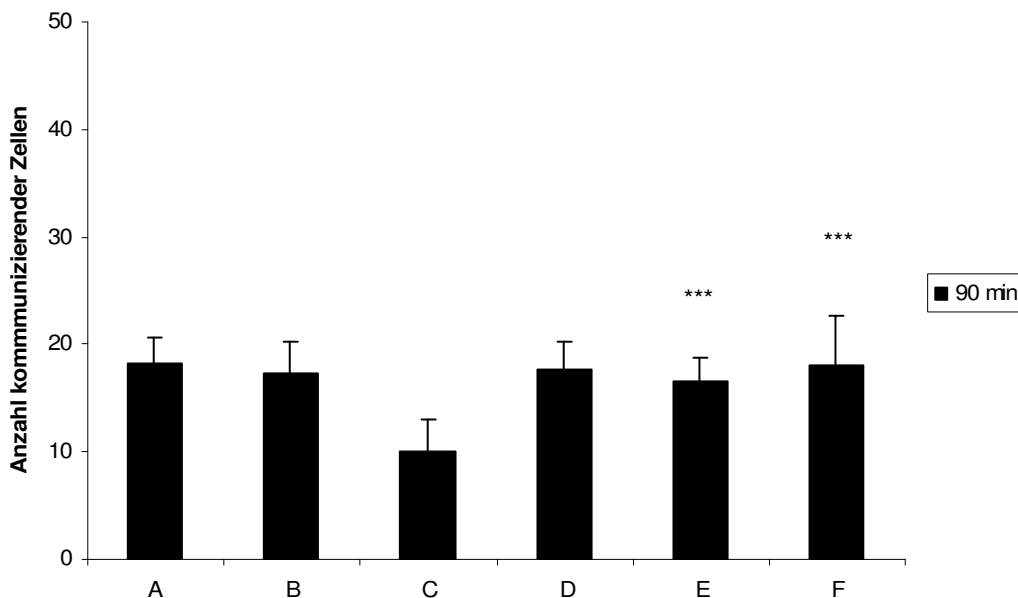


Abb. 3.2.3.2

Interzelluläre Kommunikation der WB-F344 Zellen nach 90 min Behandlung mit **A:** Kontrolle 0,2% DMSO, **B:** 0,1 nM TPA, **C:** 1 nM TPA, **D:** 0,1 nM TPA + 40 μ M (-)-Epicatechin, **E:** 1 nM TPA + 40 μ M (-)-Epicatechin, **F:** 1 nM TPA + 40 μ M Genistein.

Die 90-minütigen Behandlungen der Zellen mit 5 und 10 nM TPA führten in den WB-F344 Zellen zu einer kompletten Inhibition der ZZK.

Die vollständige Hemmung der interzellulären Kommunikation nach einer 90-minütigen Behandlung der WB-F344 Zellen mit 5 und 10 nM TPA konnte durch Coinkubation sowohl mit 40 μ M (-)-Epicatechin als auch mit 40 μ M Genistein aufgehoben werden (**Abb. 3.2.1.4**). Dabei wurden bei der Coinkubation mit (-)-Epicatechin ZZK-Werte um 50-60% der Kontrolle erreicht.

Es zeigte sich, dass die Behandlung mit 40 μ M Genistein bei beiden TPA-Konzentrationen effektiver war als die mit 40 μ M (-)-Epicatechin.

Die 90-minütige Inkubation mit 40 μ M (-)-Epicatechin und Genistein induzierte keine Stimulation der ZZK. Die inhibitorischen TPA-Effekte sind nach 24 Std. reversibel (Daten nicht gezeigt).

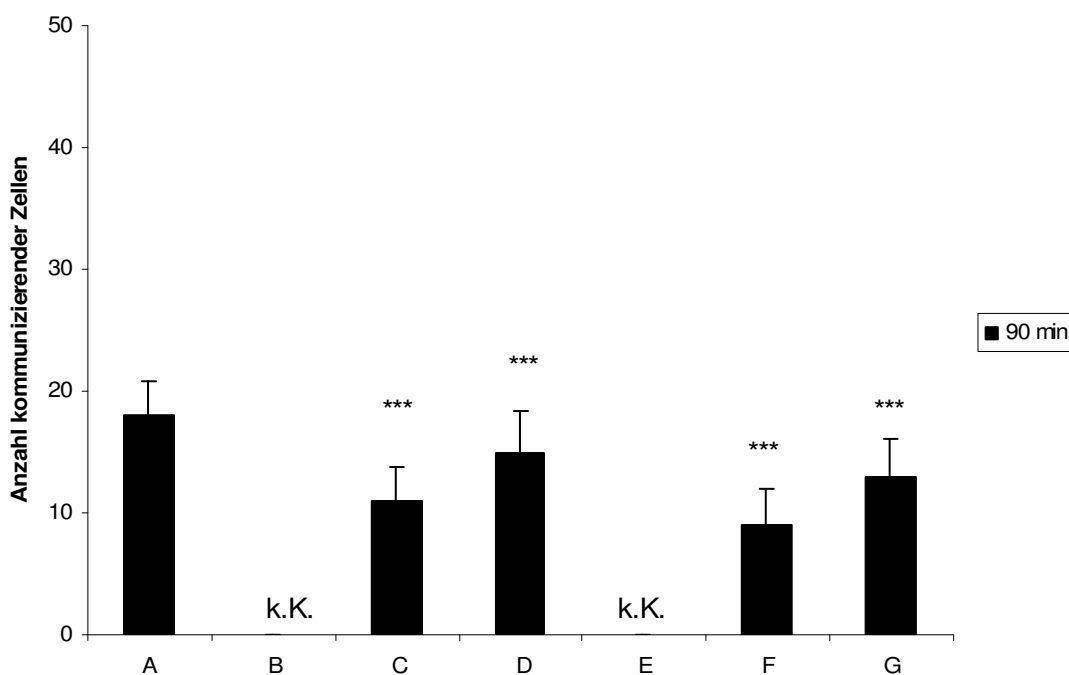


Abb. 3.2.3.3

Interzelluläre Kommunikation der WB-F344 Zellen nach 90 min Behandlung mit

A: Kontrolle 0,2% DMSO, **B:** 5 nM TPA, **C:** 5 nM TPA + 40 μ M (-)-Epicatechin,

D: 5 nM TPA + 40 μ M Genistein,

E: 10 nM TPA,

F: 5 nM TPA + 40 μ M (-)-Epicatechin,

G: 10 nM TPA + 40 μ M Genistein,

k.K.: keine Kommunikation.

3.2.4 Einfluss von TPA / (-)-Epicatechin auf das Connexin43-Protein

In **Abb:3.2.4.1** wird der Einfluss von unterschiedlichen TPA- Konzentrationen auf Connexin43- Protein nach 90 min Inkubation dargestellt.

Deutliche Phosphorylierungseffekte wurden nur bei 10 und 100 nM TPA beobachtet

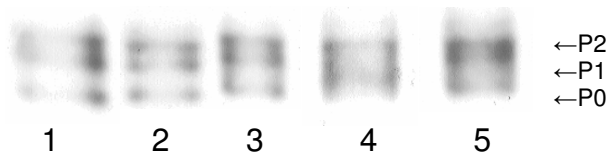


Abb:3.2.4.1

Nachweis des Gap Junction Proteins Connexin43 nach 90 min. Behandlung mit **1:** 0,2 % DMSO, **2:** 1 nM TPA, **3:** 5 nM TPA, **4:** 10 nM TPA, **5:** TPA 100 nM.

Vor der Herstellung der Zellextrakte für die Western Blot- Analyse wurden die Zellen wie in 3.2.3 beschrieben 90 min mit TPA, TPA + 40 μ M (-)-Epicatechin und TPA + 40 μ M Genistein inkubiert.

Nach der Coinkubation von TPA mit (-)-Epicatechin oder TPA + Genistein konnten nur bei 5, 10 nM TPA + 40 μ M (-)-Epicatechin und 5, 10 nM TPA + 40 μ M Genistein deutliche Effekte ermittelt werden.



Abb:3.2.4.2

Nachweis des Gap Junction Proteins Connexin43 nach 90 min Behandlung mit

1: 0,2% DMSO,

2: 1 nM TPA,

3: 1 nM TPA + 40 μ M (-)-Epicatechin,

4: 1 nM TPA + 40 μ M Genistein,

5: 5 nM TPA,

6: 5 nM TPA + 40 μ M (-)-Epicatechin,

7: 5 nM TPA + 40 μ M Genistein,

8: 10 nM TPA,

9: 10 nM TPA + 40 μ M (-)-Epicatechin,

10: 10 nM TPA + 40 μ M Genistein.

3.2.5 Einfluss von TPA / (-)-Epicatechin auf die Lokalisation des Connexin43-Proteins

Es wird angenommen, dass TPA als PKC-Aktivator das Connexin43-Protein phosphoryliert. Durch die Hyperphosphorylierung des Connexin43-Proteins kommt es zu einer Störung bzw. einer Unterbrechung des Connexin- Traffickings. Dadurch ist eine Anhäufung des Connexin43 im Cytosol zu beobachten. Da in den vorherigen Messungen festgestellt wurde, dass Genistein und (-)-Epicatechin den inhibitorischen Effekten des Tumorpromotors entgegenwirken, sollte hier untersucht werden, ob die Coinkubation der Substanzen auch der Delokalisation des Connexins entgegenwirken kann. Dafür wurde die Verteilung und Lokalisation des Connexin43-Proteins in den WB-F344 Zellen mittels immunohistochemischer Färbung untersucht. Die Inkubationsbedingungen entsprachen denen in den Kapiteln 3.2.4 und 2.8.

Es wurden 1, 5, und 10 nM TPA und die Effekte der Coinkubation mit 40 µM (-)-Epicatechin bzw. 40 µM Genistein untersucht.

In der folgenden **Abb. 3.2.5.1** sind nur die Effekte mit 10 nM TPA Behandlung dargestellt. Für die Kontrolle wurden die Zellen mit 0,2% DMSO behandelt. Nach 90 min Inkubation konnte eine Proteinlokalisierung in der Zellmembran gezeigt werden (A). Die Behandlung mit 10 nM TPA führte zu einer ausgeprägten Delokalisation des Connexin-Proteins aus der Zellmembran ins Zytoplasma. Wenn 40 µM (-)-Epicatechin oder Genistein mit inkubiert wurden, konnte der von TPA induzierte Effekt vermindert und Connexin43-Protein wieder in der Zellmembran detektiert werden. Dabei war Genistein effektiver als (-)-Epicatechin. Somit können (-)-Epicatechin und Genistein der TPA induzierten Hemmung der ZZK in WB-F344 Zellen entgegenwirken, indem sie in den intrazellulären Transport des Connexin43 eingreifen [Ale-Agha et al., 2002].

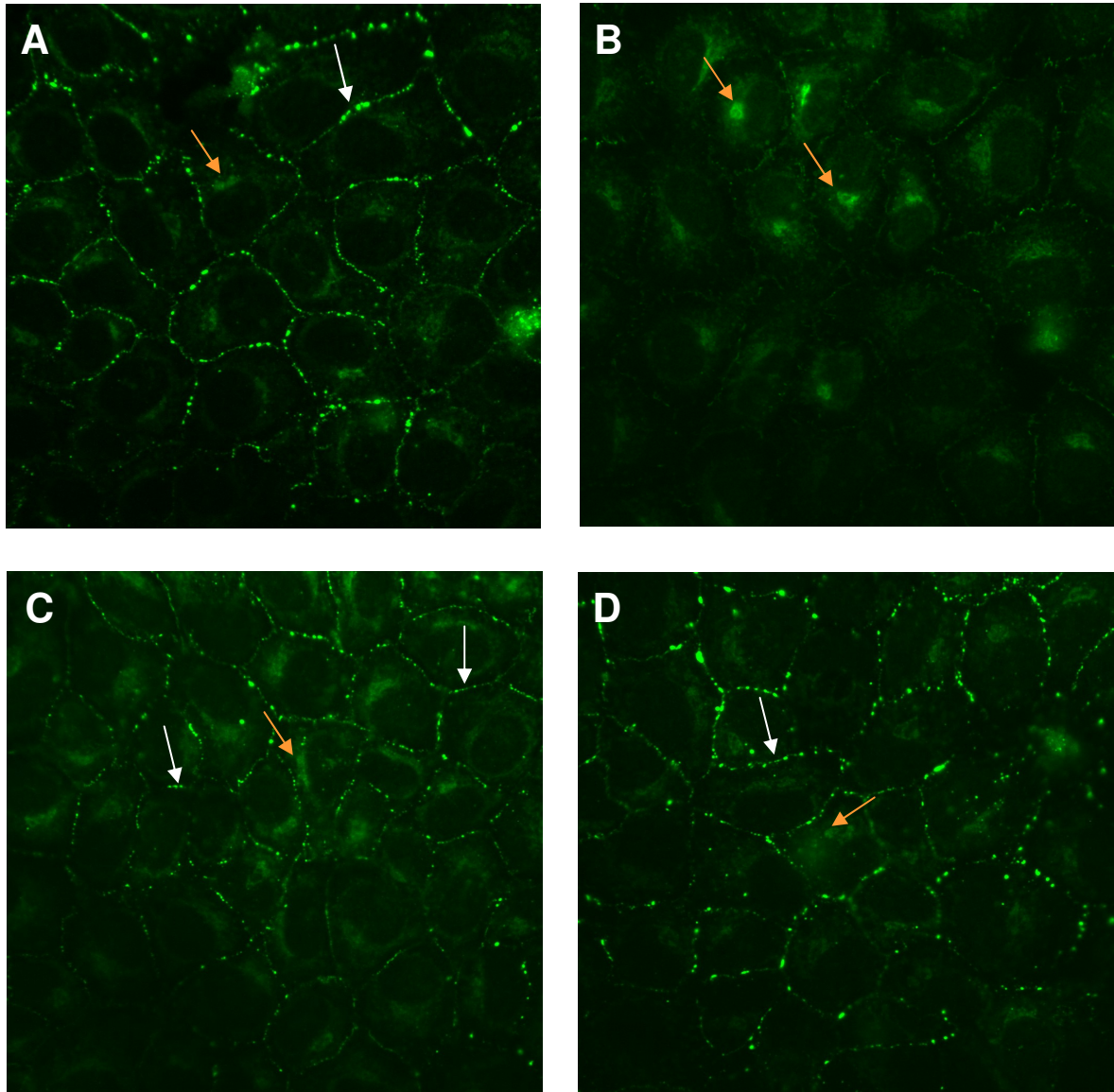


Abb.3.2.5.1

Nachweis der subzellulären Verteilung des Connexin43-Proteins mittels Immunfluoreszenz-Analyse in WB-F344 Zellen nach 90 min Behandlung mit:

A: Kontrolle: 0,2% DMSO

B: TPA 10 nM,

C: 10 nM TPA + 40 μ M (-)-Epicatechin,

D: 10 nM TPA + 40 μ M Genistein,

Weißer Pfeil (\rightarrow): Connexin43 in der Membran; gelbe Pfeile (\rightarrow) Connexin43 in Cytosol.

3.3 Menadion (Vitamin K3)

Die K-Vitamine sind Derivate von 2-Methyl-1,4-naphthochinon, die am C3-Atom unterschiedlich substituiert sind (**Struktur s. 2.2.2**). Darüber hinaus gibt es eine Reihe von Derivaten, die synthetisch hergestellt werden und therapeutisch Anwendung finden. Menadion ist cardiotoxisch und wirkt toxisch in Erythrozyten. Daher ist Menadion als Medikament und Supplement in Deutschland nicht zugelassen. Menadion wird als Modell-Chinon für *in vivo*- und Zellkultur-Untersuchungen eingesetzt, und zeigt eine ausgeprägte Toxizität gegen Tumorzellen.

Es ist bekannt, dass Menadion in der Lage ist, ERK1/2 (extrazellulär regulierte Kinase 1 und 2) zu aktivieren. ERK1/2 gehören zu der Gruppe der MAPK (mitogen aktivierte Kinasen) und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Zelldifferenzierungs- und Proliferationsvorgängen. Es wird angenommen, dass ERK1/2 auch an der Phosphorylierung von Connexin43 beteiligt sind.

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass die Behandlung von WB-F344 Zellen mit 100 μ M Menadion schon nach 30 min bei 70% der Zellen Zelltod verursacht. Die Behandlung mit 50 μ M Menadion führte erst nach 2 Std. zum Zelltod (Daten nicht gezeigt). Daher wurde für beide Konzentrationen eine Inkubationszeit von 15 min. gewählt. TPA wurde hier als Positivkontrolle und DMSO als Lösungsmittelkontrolle eingesetzt.

In **Abb. 3.3.1** werden die Ergebnisse der 15 minütigen Inkubation der WB-F344 Zellen mit 50 und 100 nM Menadion dargestellt.

Es konnte hier gezeigt werden, dass Menadion mit beiden Konzentrationen nach 15 min Inkubation die ZZK hemmt. Dabei führte die 15 minütige Inkubation mit 100 μ M Menadion zur 70 % Hemmung der interzellulären Kommunikation. Dagegen wurde durch die 15 minütige Behandlung mit 50 μ M Menadion nur eine 50 % ige Hemmung der ZZK induziert. Eine 15 minütige TPA Inkubation kann in den WB-F344 Zellen zur 96-100%igen Hemmung der ZZK führen. Diese Hemmung konnte mit einer Delokalisation des Connexin43-Proteins in Verbindung gebracht werden. Als nächstes sollte untersucht werden, ob die inhibitorischen Effekte von Menadion mit einer Internalisation des Connexins43 verbunden ist. Durch die immunohistochemische Färbung des Connexin43-Proteins mittels spezifischer Antikörper konnte die subzelluläre Connexin-Verteilung in WB-F344 Zellen

untersucht werden (**Abb.3.3.2**). Die 15 minütige Inkubation der Zellen mit 100 nM TPA führte wie erwartet zu einer Delokalisation des Connexin-Proteins (**Abb.3.3.2 B**). Dagegen konnte in Zellen, die 15 Min. mit 50 μ M Menadion behandelt wurden, keine Internalisation, keine Delokalisation und auch kein Abbau des Connexin43 (**Abb.3.3.2 C**) beobachtet werden. Die 15 minütige Behandlung mit 100 nM Menadion führte ebenfalls nicht zum Abbau des Connexin43-Proteins. (**Abb.3.3.2 D**)

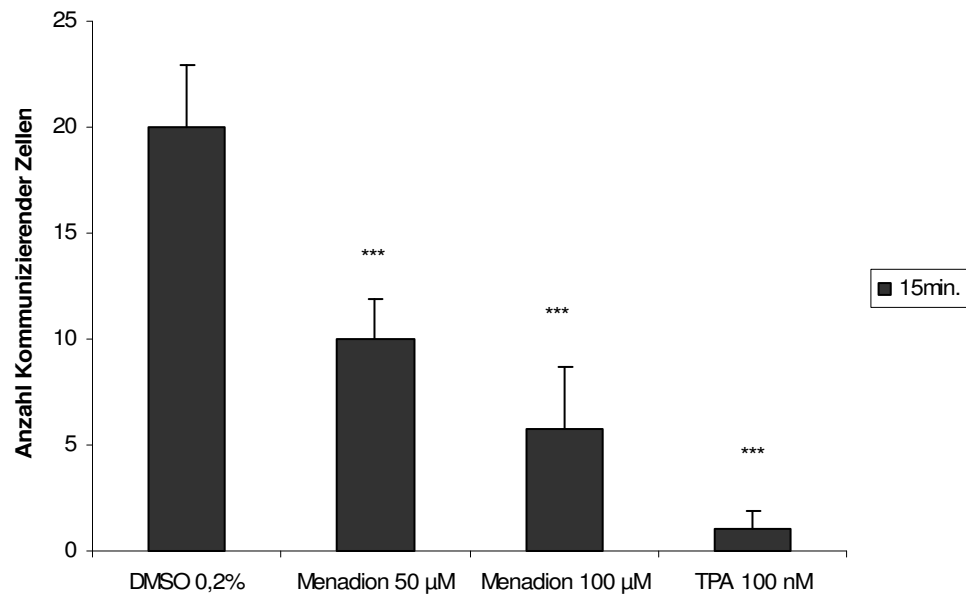


Abb.3.3.1

Interzelluläre Kommunikation der WB-F344 nach 15 min Behandlung mit 0,2% DMSO als Kontrolle, 50; 100 μ M Menadion. 100 nM TPA wurde als Positivkontrolle mitgeführt.

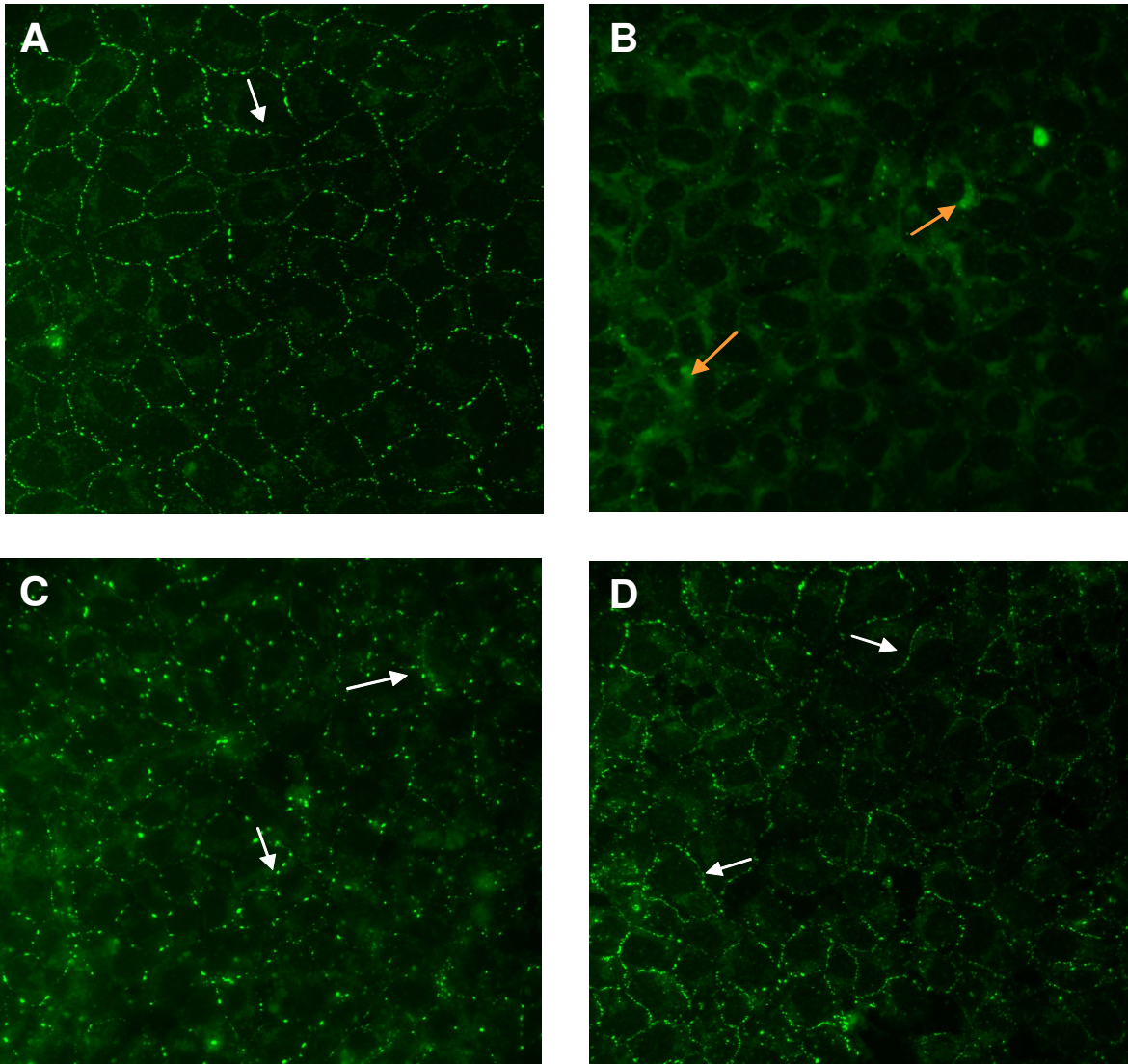


Abb.3.3.2

Nachweis der subzellulären Verteilung des Connexin43-Proteins mittels Immunfluoreszenz-Analyse in WB-F344 Zellen nach 15 min Inkubation mit:

A: Kontrolle: 0,2% DMSO,

B: TPA 10 nM,

C: 50 μ M Menadion,

D: 100 nM Menadion,

Weißer Pfeil (\rightarrow): Connexin43 in der Membran; gelbe Pfeile (\rightarrow) Connexin43 in Cytosol.

4. Diskussion

4.1 Retinoide

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von Retinsäure, Retinsäuremethylester (*RSME*) und seiner Derivate 4-Oxo-3-acetoxy-Retinsäuremethylester (*M1*), 3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester (*M2*) und 4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester (*M3*) auf die ZZK untersucht. Die Strukturen sind in Kapitel 2.2.1 dargestellt.

4.1.1 Bestimmung des Einflusses der Retinoide auf die interzelluläre Kommunikation im Farbstoff-Transfer-Assay

Der Farbstoff-Transfer-Assay mittels eines fluoreszierenden Farbstoffes (Lucifer Yellow) gehört zu den wichtigsten Methoden zur Bestimmung des Kopplungsgrades der Zellen und der Veränderung der ZZK nach einer Behandlung der Zellen mit stimulierenden und hemmenden Substanzen.

Der Einfluss von Retinsäure auf die ZZK wurde bereits mehrfach mit dieser Methode untersucht und in der Literatur beschrieben. Retinsäure wies in verschiedenen Zelllinien einen konzentrations- und zeitabhängigen Effekt auf die ZZK auf, wobei sowohl eine Stimulation als auch eine Hemmung der ZZK gezeigt wurde [Bex et al., 1995; Hossain et al. 1993; Rogers et al., 1991].

Im hier verwendeten Zellsystem (Rattenleberepithelzellen WB-F344) wurde ebenfalls ein konzentrations- und zeitabhängiger Effekt auf die ZZK beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Inkubation mit Retinsäure in Konzentrationsbereichen von 20 μM -0,001 μM sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Wirkungen auf die ZZK auftreten. Die ein- und dreitägige Inkubation der Zellen mit 0,1 μM und 1 μM Retinsäure führte zu einem 140%-170% fachen Anstieg der ZZK [Abb. 3.1.1.2-3]. Daher wurde Retinsäure in unserem Testsystem in diesem Konzentrationsbereich zusätzlich als Positivkontrolle mitgeführt. In der Literatur wurden bei Konzentrationen der Retinsäure von 0,01 μM und 0,001 μM noch stimulatorische Wirkungen auf die

ZZK angegeben [Hossain et al. 1993]. Wir konnten unter den hier gewählten Bedingungen jedoch keinen Effekt auf die ZZK feststellen. Die inhibitorischen Effekte wurden erst nach der ein- und dreitägigen Inkubation der WB-F344 Zellen mit 10 μM Retinsäure beobachtet, wobei eine statistisch signifikante Hemmung von ca. 30 -40% gemessen wurde. Die eintägige Inkubation mit 20 μM Retinsäure führte zur 96%igen Hemmung der ZZK. Dieser Effekt war jedoch nach dreitägiger Inkubation teilweise reversibel, dabei wurde die 96%ige Hemmung der ZZK auf 50% reduziert **[Abb. 3.1.1.6-7]**. Darüber hinaus wurden weitere Effekte der Retinsäure auf die WB-F344 Zellen untersucht.

Hier konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Retinsäuremethylester die Regulation der ZZK beeinflussen kann. Es scheint, dass die Einführung einer Estergruppe einen Einfluss auf die biologische Aktivität der Substanz hat. Im Farbstoff-Transfer-Assay (Dye Transfer Assay) zeigte RSME unter den hier gewählten Bedingungen eine konzentrations- und zeitabhängige Stimulation bzw. Hemmung der ZZK in den WB-F344 Zellen. Die ein- und dreitägige Inkubation der Zellen mit 0,01 μM und 0,001 μM RSME führte im Gegensatz zur Behandlung mit Retinsäure zur signifikanten 130%-140% fachen Stimulation der ZZK **[Abb. 3.1.1.2-3]**. Diese Effekte könnten mit der Veresterung der Retinsäure in Verbindung stehen. Da die Veresterung die Verfügbarkeit der Substanz für die Zelle erhöht und der Ester intrazellulär durch Esterasen zu Retinsäure abgebaut wird, könnte der stimulatorische Effekt des RSME in den Konzentrationsbereichen 0,01 μM und 0,001 μM damit in Verbindung stehen. Im Bereich der 1 μM und 0,1 μM Konzentration zeigte die entsprechende Behandlung der Zellen mit RSME eine noch signifikante aber im Vergleich zu Retinsäure niedrigere Induktion der ZZK. Die ein- und dreitägige Behandlung der Zellen mit 10 μM und 20 μM RSME verursachte im Gegensatz zu der Behandlung mit Retinsäure nur eine 30-60%ige Hemmung der ZZK **[Abb. 3.1.1.4-7]**. Die inhibitorischen Effekte des RSME auf die ZZK sind nicht so stark ausgeprägt wie die durch Retinsäure hervorgerufene Hemmung. Es ist nicht klar, ob dieser Effekt mit der Veresterung in Zusammenhang steht. Es müssten zusätzliche Untersuchungen im Bezug auf die Verfügbarkeit, Aufnahme und die Esteraseaktivität in den WB-F344 Zellen bei hohen Konzentrationen durchgeführt werden.

M1, M2 und M3 sind Derivate von RSME, die unterschiedliche Substituenten am Ring tragen. M1 und M3 weisen beide eine Oxo-Gruppe am C4-Atom auf, unterscheiden sich jedoch durch Substitution am C3-Atom, wobei M1 eine acetoxy-Gruppe und M3 eine tert-butylacetoxy-Gruppe aufweist. M2 trägt eine Oxo-Gruppe am C3-Atom. Im Gegensatz zu den anderen Verbindungen ist an der C5-C6-Position des Ringes substituiert. Die Strukturen dieser Substanzen sind im Kapitel Material und Methoden **2.2.1** dargestellt. Die Regulation der ZZK in den WB-F344 Zellen durch M1, M2 und M3 erfolgte konzentrations- und zeitabhängig. Dabei führte die 72 stündige Behandlung der Zellen mit 0,01 μM und 0,001 μM M1 und M3 zu einer 150%-170% fachen Erhöhung der ZZK [**Abb. 3.1.1.2-3**]. Die Stimulation der ZZK durch M1 und M3 in diesem Konzentrationsbereich ist mit dem Effekt der 0,1 μM Retinsäure vergleichbar. Die effektivste Konzentration für eine Stimulation der ZZK durch M2 lag bei 0,01 μM . Erst nach einer dreitägigen Inkubation mit 0,01 μM M2 konnte für diese Substanz eine mit M1 und M3 vergleichbare Aktivität beobachtet werden.

Alle drei Abkömmlinge des RSME zeigen somit im Konzentrationsbereich von 0,01 μM und 0,001 μM eine höhere biologische Aktivität als die Stammverbindungen in den gleichen Konzentrationen. Andere ähnlich substituierte Retinsäuren wie 4-Oxo-Retinsäure zeigten in Hautfibroblasten eine stimulatorische Wirkung auf die ZZK [Teichert et al., 1999]. Daher kann angenommen werden, dass die Substituenten am Ring und im Fall von M2 die Lage der Doppelbindung im Ringsystem eine Wirkung auf die biologische Effektivität haben. Dabei zeigte sich, dass M1 und M3, die ähnlich am Ring substituiert sind, vergleichbare biologische Aktivität aufweisen. M2 dagegen wirkt in den WB-F344 Zellen geringer stimulierend auf die ZZK als M1 und M3. Die Unterschiede in der Effektivität für die Stimulation der ZZK könnten somit auf die unterschiedliche Substitution am Ring zurückzuführen sein. Die unterschiedliche Position der Doppelbindung scheint aber ebenfalls eine Rolle zu spielen. Im Vergleich zur Ausgangsverbindung RSME mit einer unterschiedlichen Position der Doppelbindung zeigt M2 im vorliegenden System eine höhere biologische Wirkung. Im hohen Konzentrationsbereich (10 μM und 20 μM) wurde für Retinsäure, RSME und die Derivate M1, M2 und M3 eine inhibitorische Wirkung auf die ZZK festgestellt. Die Effizienz und Zeitabhängigkeit waren jedoch unterschiedlich, was vermutlich auf unterschiedliche Wirkungsmechanismen oder Stabilität der Substanzen im Zellmodell zurückzuführen ist. Nach ein- und dreitägiger Inkubation der Zellen mit sowohl 10 μM als auch mit 20 μM M1, M2 und M3 konnte eine ca. 80-99%ige Hemmung der ZZK

gemessen werden. Die eintägige Behandlung mit Retinsäure (20 μM) führte zur 96%igen Hemmung der ZZK; im Gegensatz zu RSME und den Derivaten M1, M2 und M3 war dieser Effekt jedoch nach drei Tagen Inkubation reversibel. Die Behandlung der Zellen mit 10 μM und 20 μM RSME hemmte die ZZK um ca. 60% [Abb. 3.1.1.6-7]. Somit scheint es, dass den inhibitorischen Effekten durch M1, M2 und M3 auf die ZZK ein anderer Mechanismus zu Grunde liegt, als der durch Retinsäure und RSME verursachten Hemmung.

4.1.2 Wirkung der Retinoide auf das Connexin43-Protein

Retinsäure und ihre Derivate haben Einfluss auf die Regulation der Genexpression und beeinflussen so die Bildung der verschiedensten Proteine.

Um die molekularen Mechanismen der oben beschriebenen Stimulation und Hemmung zu untersuchen, wurde der Einfluss dieser Substanzen auf die Expression des Hauptconnexinproteins (Connexin43) der WB-F344 Zellen mittels Western-Blot-Analyse ermittelt. Eine vermehrte Expression könnte mit stimulatorischen Wirkungen in Verbindung gebracht werden.

Die hier beobachtete Stimulation der ZZK durch die Retinoide geht mit einer Erhöhung der Connexin-Proteinmenge einher, wie in Western-Blot-Analysen nachgewiesen wurde.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte so zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Behandlung von WB-F344 Zellen mit RSME und seinen Derivaten ähnlich der Retinsäure zu einem Anstieg der Connexin43-Proteinmenge führt. Dabei zeigte sich, dass dieser Effekt konzentrationsabhängig und im Gegensatz zur Retinsäure noch bei sehr geringen Konzentrationen (0,01 μM) zu beobachten ist. Durch Steigerung der Lipophilie wird die Wirksamkeit bei Retinoiden entsprechend der modifizierten Struktur erhöht [Soprano et al., 1995]. Dies kann auf eine erhöhte zelluläre Verfügbarkeit oder Affinität zum Zielmolekül (z.B. Rezeptoren) zurückzuführen sein. In der Krebstherapie werden synthetische Retinoide wie Acitretin eingesetzt, die einen aromatischen Ring tragen und an der 3-Position mit einer Methoxygruppe substituiert sind. Alle neueren synthetisch hergestellten Retinoide verfügen als Strukturelement über ein hydrophobes Ringsystem [Lu et al., 1997; Sun et al., 1997]. Die Verbindungen weisen in der Regel eine bessere Wirkung als die

Stammverbindungen auf und zeichnen sich durch spezifische Effekte auf die Rezeptoren aus.

In der vorliegenden Arbeit konnten auch inhibitorische Effekte der Retinoide mit Veränderungen der zellulären Connexin-Proteinmenge in Verbindung gebracht werden. Dabei zeigte sich für Retinsäure, dass die moderaten inhibitorischen Effekte bei der Konzentration 10 μM mit einer Abnahme der Connexin-Proteinmenge einhergehen. Die ausgeprägte Hemmung der ZZK bei Behandlung mit 20 μM Retinsäure dagegen ging mit einer *Hypophosphorylierung* des Connexin43-Proteins einher [**Abb. 3.1.2.1A/B**]. Durch die *Hypophosphorylierung* des Connexin43-Proteins kommt es zum Anstieg der unphosphorylierten Form (P0); die phosphorylierten Formen P1 und P2 sind nicht mehr nachweisbar. Eine Veränderung des Phosphorylierungsgrades von Connexin43 beeinflusst die ZZK. Die *Hypophosphorylierung* von Connexin43 wurde unter anderem als Wirkungsmechanismus der inhibitorischen Effekte von Tumorpromotoren wie Dieldrin und Heptachlorepoxid beschrieben [Matesic et al 1994]. Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass auch eine *Hypophosphorylierung* durch Retinsäure im verwendeten Zellsystem zur Inhibierung der ZZK führt und für die Ausbildung funktionsfähiger Gap Junctions alle 3 Connexin43-Phosphorylierungszustände P0 bis P2 in ausgewogenem Muster benötigt werden [Trosko et al., 1998; Matesic et al., 1994]. GJIC und Retinsäure spielen in der Embryogenese eine wichtige Rolle [Trosko et al., 1998]. Eine Veränderung in der Expression und Funktionalität der Gap Junctions kann zu Störungen in der Embryonalentwicklung führen. Somit könnte die *Hypophosphorylierung* durch Retinsäure in hoher Konzentration mit der Teratogenität der Retinsäure in Verbindung stehen und als ein Mechanismus der Induktion von Missbildungen in Frage kommen.

Nach dreitägiger Inkubation mit Retinsäure (20 μM) war die *Hypophosphorylierung* kaum mehr festzustellen. Somit könnte die zeitabhängige Änderung im Phosphorylierungsmuster ein Grund für die wiederhergestellte Kommunikation nach dreitägiger Inkubation sein.

Im Gegensatz zur Retinsäure führte die ein- und dreitägige Behandlung mit 10 μM und 20 μM Retinsäuremethylester nicht zur Veränderung des Phosphorylierungsgrades sondern zur zeitabhängigen Abnahme der Connexin-Proteinmenge, womit die hemmende Wirkung der Substanz erklärt werden kann.

Die 24 stündige Inkubation der WB-F344 Zellen mit 10 μM M1 und M3 führte hier entsprechend der Western Blot- Analyse zur *Hyperphosphorylierung* des

Connexin43-Proteins. Im Gegensatz zur *Hypophosphorylierung* zeichnet sich die *Hyperphosphorylierung* des Connexin43-Proteins dadurch aus, dass keine unphosphorylierte Form (P0), sondern verstärkt die phosphorylierte Formen P1 und/oder P2 detektierbar sind. Die 24 stündige Behandlung mit M2 verursachte dagegen nur eine starke Abnahme der Connexin43-Proteinmenge. Die 72 stündige Inkubation mit M1, M2 und M3 verursachte eine *Hyperphosphorylierung* [Abb. 3.1.2.2]. Nach eintägiger Behandlung der Zellen mit 20 µM M1, M2 und M3 konnte eine *Hyperphosphorylierung* des Connexin43-Proteins beobachtet werden. Die dreitägige Inkubation der Zellen unter den gleichen Bedingungen führte zusätzlich zu einer starken Abnahme des Connexin43-Proteins, die bei der Behandlung mit M1 und M2 sehr ausgeprägt war.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Effekte der hier untersuchten Retinoide auf die ZZK auf unterschiedliche Wirkungsmechanismen zurückzuführen sind. Im Vordergrund stehen zum einen Änderungen im Phosphorylierungsmuster des Connexin43 mit der Tendenz zu Hyper- und Hypophosphorylierung und zum anderen Effekte auf die Connexinexpression. Die unterschiedliche Substitution am Ring der Retinsäure-Derivate scheint für die beobachteten Effekte verantwortlich zu sein und korreliert mit den unter 4.1.1 diskutierten Wirkungen der Retinoide auf die Funktionsfähigkeit der Gap Junctions, die mittels des interzellulären Farbstofftransfers gemessen wurden.

4.1.3 Einfluss der Retinoide auf die subzelluläre Connexin43-Verteilung

Die posttranslationale Phosphorylierung von Connexin43 hat einen Einfluss auf den Transport der Connexin-Proteine zur Plasmamembran, auf ihre Aggregation zu funktionsfähigen Kanälen und auf die Ausbildung von Gap Junctions [Aronica et al., 2001; Saez et al., 1998; Hossain et al., 1994]. Daher beeinflusst eine Veränderung des Phosphorylierungsgrades von Connexin43 auch die subzelluläre Verteilung von Connexin-Proteinen. Über den Einbau bzw. Abbau von Connexin-Proteinen in die Plasmamembran kann die ZZK gesteuert werden.

Anders als in der Literatur beschrieben, führte die Behandlung der Zellen mit 1 µM - 0,001 µM Retinsäure und RSME und den Derivaten bei den untersuchten Zeitpunkten nicht zu einem eindeutigen Anstieg der membranständigen Connexin43-

Proteinmenge [Bex et al., 1995]. Der Grund dafür könnte die hier gewählten spezifischen Untersuchungsbedingungen oder das Zellkulturmodell sein.

Im hohen Konzentrationsbereich (10 μM und 20 μM) konnte jedoch nach der Behandlung der WB-F344 Zellen mit Retinoiden ebenfalls eine konzentrations- und zeitabhängige Veränderung der subzellulären Verteilung des Connexin43-Proteins festgestellt werden.

Die ein- und dreitägige Behandlung der Zellen mit 10 μM Retinsäure und 10 μM RSME führte zu einer Abnahme der membranständigen Connexinproteine, wobei eine Akkumulation des Connexins im Cytoplasma nicht festgestellt werden konnte. Nach eintägiger Inkubation der Zellen mit 20 μM Retinsäure kam es ebenfalls zur Abnahme der membranständigen Connexin-Proteine. Dieser Effekt korreliert mit der verminderten ZZK und der Veränderung des Phosphorylierungsgrades.

Die Behandlung der Zellen mit 20 μM RSME führte zu einer zeitabhängigen Abnahme der membranständigen Connexin43-Proteine.

Wurden die Zellen mit 10 μM M1, M2 und M3 für 24 Std. behandelt, kam es zu einer Abnahme der Connexin43-Menge in der Plasmamembran, wobei die Zellen, die mit M1 und M3 behandelt wurden, eine stärkere Akkumulation des Connexins im Zytoplasma aufweisen, als die mit M2 behandelten Zellen. Dies erklärt im Vergleich zu Retinsäure und RSME den stärkeren Verlust der Kommunikationsfähigkeit bei den WB-F344 Zellen nach der Behandlung mit den Derivaten M1, M2 und M3.

Eine deutliche Akkumulation im Cytoplasma, verbunden mit vollständigem Ausbau des Connexin-Proteins aus der Membran, konnte nach der 72 stündigen Behandlung der Zellen mit 10 μM M1, M2 und M3 beobachtet werden. Dabei war der Internalisationseffekt durch M2 etwas schwächer als bei M1 und M3.

Die eintägige Behandlung der Zellen mit 20 μM M1, M2 und M3 führte bei den verwendeten Substanzen zu einer ausgeprägten Delokalisation des Connexin43-Proteins aus der Membran und zur Akkumulation des Connexin43 im Cytoplasma. Dieser Delokalisationseffekt war bei einer längeren Inkubation (dreitägig) verstärkt **[Abb. 3.1.3.1-6]**. Alle Effekte korrelieren mit dem vollständigen Verlust der ZZK. In der Literatur wurden solche Effekte der Behandlung der Zellen mit Tumorpromotoren beschrieben. Dabei wird angenommen, dass die Kommunikationshemmung mit einer Hyperphosphorylierung und damit verbundenen Ausbau membranständiger Connexin-Proteine und einer Internalisation des Connexin-Proteins einhergeht [Ren et al. 1998; Trosko et al. 1998; Ale-Agha et al. 2002].

Wie schon erwähnt, erlaubt ein basales Niveau an posttranslationaler Phosphorylierung den Zusammenbau funktioneller Kanäle und die Aktivierung der Gap Junctions [Musil et al., 1990]; eine Hyperphosphorylierung des Connexin-Proteins an den Aminosäuren Serin und Threonin führt dagegen zu einer Hemmung der Kommunikation. Die serin-, threonin- und tyrosinspezifischen Kinasen gehören zu den Kinasen mit Einfluss auf die ZZK. Proteinkinase C (PKC reguliert durch DAG) und mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) gehören zu den serin- und threoninspezifischen Kinasen. In der Sequenz des Connexin43-Proteins gibt es mehrere Positionen, die von PKC und MAPK angegriffen werden können [Yamasaki et al., 1997]. Tumorpromotoren wie TPA sind in der Lage über die Aktivierung von PKC eine Phosphorylierung an Serinresten des Connexin43 in verschiedenen Zelllinien hervorzurufen, die gleichzeitig mit einer Delokalisation des membranständigen Connexin43-Proteins ins Cytoplasma verbunden ist [Kang et al., 2000; Trosko et al. 1998; Ale-Agha et al. 2002]. Für eine weitere Aufklärung des Mechanismus müsste noch die Beteiligung von Proteinkinasen an der in dieser Arbeit beobachteten *Hyperphosphorylierung* nachgewiesen werden.

Fazit:

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die Derivate M1, M2 und M3 die ZZK durch einen anderen Mechanismus als Retinsäure und RSME beeinflussen. Dabei konnte festgestellt werden, dass diese Substanzen in der Lage sind, durch *Hyperphosphorylierung* des Connexin43-Proteins einen Ausbau des Proteins aus der Membran und eine damit verbundene Akkumulation des Proteins im Cytoplasma hervorzurufen und über diesen Mechanismus die ZZK zu hemmen. Der Vergleich von RSME mit den Derivaten M1, M2 und M3 zeigt, dass die Einführung von Substituenten am Ring des RSME mit einer *Hyperphosphorylierung* des Connexin43 einhergeht. Eindeutige Struktur-Wirkungsbeziehungen können auf Grund der wenigen untersuchten Verbindungen nicht gemacht werden.

Wir konnten zeigen, dass eine *Hypophosphorylierung* nur mit einem Ausbau des Connexin-Proteins in Verbindung steht. Dies entspricht den in der Literatur beschriebenen Effekten für die *Hypophosphorylierung* durch den Tumorpromotor Dieldrin, wobei die Behandlung mit Dieldrin ebenfalls keine Internalisation von Connexin43 ins Cytoplasma verursachte [Matesic et al., 1994].

In Rahmen dieser Arbeit konnte zudem festgestellt werden, dass die untersuchten Retinoide konzentrations- und zeitabhängig die ZZK stimulieren können. Dabei besitzen die RSME und die Derivate in Konzentrationen zwischen 0,01 μM und 0,001 μM eine höhere Effektivität als die Retinsäure. Dieser Effekt beruht auf strukturellen Unterschieden zwischen Retinsäure und den anderen untersuchten Retinoiden.

Als Mechanismus für die stimulatorischen Effekte der Retinoide auf die ZZK konnte für alle Substanzen eine Erhöhung der Menge des Connexin43-Proteins identifiziert werden. Für Retinsäure wurde dieser schon beschrieben [Clairmont et al., 1996; Bex et al. 1994]. Untersuchungen zur biologischen Aktivität der Retinsäure zeigten, dass sie über die Stabilisierung der mRNA am 3' -untranslatierten Bereich (3' -UTR) und nicht über den Anstieg der Transkriptionsrate die Connexin-Menge erhöht. Die 3' UTR ist eine AU reiche Sequenz und enthält sechs AUUUA Motive, wodurch die Stabilität der m-RNA verringert wird [Ross et al., 1995]. Die Stabilisierung der m-RNA geht mit einer Verlängerung der Lebensdauer (Halbwertszeit) von Connexin43-m-RNA einher. Damit verbunden ist eine Connexin-Proteinakkumulation und dementsprechenden Stimulation der ZZK [Bex et al., 1995, Clairmont et al., 1996; Clairmont et al., 1997]. Außer Retinsäure sind auch einige Derivate wie 4-Oxo-Retinsäure in der Lage, über eine Stabilisierung der Connexin43-mRNA die ZZK zu stimulieren [Teichert et al. 1999]. Andere Substanzen wie acyclo-Retinsäure zeigen dagegen keinen Einfluss auf die ZZK, oder wirken erst bei unphysiologischen hohen Konzentrationen [Stahl et al., 2000].

4.1.4 Einfluss der Retinoide auf den Retinsäurerezeptor

Untersucht wurde die transaktivierende Wirkung von Retinsäure-Derivaten im Reporter-gen-Assay bestehend aus dem RAR β -2 Promotor und dem LacZ Reporter-gen.

In diesem System zeigen RSME und seine Derivate eine niedrigere Transaktivierung des RAR- β 2- Promotors im Vergleich zum natürlichen Liganden Retinsäure. Erst bei einer Konzentration von 0,01 und 0,001 μ M kommt es durch die Derivate zu einer gesteigerten Transaktivierung. Interessant ist, dass die effektivste Konzentration für eine Transaktivierung des Promotors für alle 4 Ester bei 1 μ M liegt und diese Konzentration einen 3-4-fachen Anstieg der Promotoraktivität hervorruft. Retinsäure als natürlicher Ligand von RAR bewirkt bei der gleichen Konzentration eine ca. 6 fache Transaktivierung des RAR β 2-Promotors. Diese Abnahme der Aktivität im Vergleich zur Retinsäure könnte im Falle vom RSME mit der Veresterung am Carboxylende und im Falle der Derivate mit der Substitution der 4 und 3-Stellung am Ring in Verbindung stehen.

M1 und M3 weisen am C4-Atom des Ringes die gleiche Substitution wie 4-Oxo-Retinsäure auf. Die 4-Oxo-Retinsäure zeigte eine ähnlich starke Transaktivierung des RAR- β 2- Promotors wie Retinsäure [Teicher et al., 1999]. M1 und M3 sind wie schon erwähnt weniger effektiv als Retinsäure, obwohl sie durch die lipophile Substitution am C3-Atom besser in die Rezeptortasche passen und dadurch eine höhere Aktivität aufweisen sollten. Durch die Steigerung der Lipophilie wird die Wirksamkeit der Retinoide erhöht [Soprano et al., 1995]. Andererseits konnte für acyclo-Retinsäure auch nur eine geringe Transaktivierung des RAR- β 2- Promotors nachgewiesen werden [Stahl et al., 2002]. Eine niedrige Transaktivierungs-Aktivität von M1 und M3 könnte unter anderem durch sterisch ungünstige Substitution am Ring begründet sein; M3 mit dem tert-Butylrest weist die niedrigste Aktivität auf. Ein anderer Grund könnte die niedrige Affinität zu RAR β sein. Es ist jedoch möglich, dass diese Derivate zu den anderen RAR-Subtypen (α , γ) oder zum RXR eine höhere Aktivität aufweisen.

In Zellkultur und *in vivo* Versuchen bei Nagetieren wurden für die Retinsäure bereits bei Konzentrationen von 1,0 μ M und 10 μ M die Entwicklung von Missbildung festgestellt. Dabei wurde die Ausbildung von Gaumenspalten und Missbildungen in der Knorpelanlage beobachtet. Es ist zudem gezeigt worden, dass RAR β 2 während

der Embryogenese die am häufigsten exprimierte RAR β -Isoform ist [Morris and Sokolova 1996]. Die Applikation einer teratogenen Dosis von Retinsäure bzw. Retinoiden führt in vielen Untersuchungen zu einem Anstieg des RAR β 2 mRNA-Spiegels und zu einer Erhöhung der Menge an RAR β 2 Proteins. Die Heterodimerisierung von RAR mit RXR und des RXR mit anderen Kernrezeptoren spielt eine große Rolle bei der Regulation der Genexpression durch Retinoide. Daher führt jegliche Veränderung im Bereich dieser Rezeptoren zu einem Ungleichgewicht in der relativen Konzentration der heterodimeren Rezeptoren in Embryonen. Jeder dieser Rezeptoren ist für die Expression von spezifischen Gengruppen zuständig (z.B. Hox- Genen). Eine Veränderung dieses Expressionsmusters zu einem sensiblen Zeitpunkt in der Embryogenese führt zu einer transkriptionalen Aktivierung oder Repression von Genen, die wiederum für die embryonale Entwicklung wichtig sind. Somit kann es zu verschiedenen Missbildungen kommen [Soprano et al., 1995]. RAR β wird in Limbmeseenchymen von Mäusen und Hühnern nach Exposition mit einer teratogenen Dosis von Retinsäure überexprimiert, wodurch eine Missbildung der Gliedmaßen induziert wird [Jiang et al. 1994; Underhill et al., 1998].

RSME und seine Derivate bewirken bei höheren Konzentrationen - bei denen Retinsäure bereits teratogen wirkt - eine geringere Rezeptoraktivierung als Retinsäure selbst. In wie weit die niedrige Transaktivierung des RAR β 2-Promotors durch die hier untersuchten Retinoide, mit einer geringeren Teratogenität der Substanzen zusammenhängt, muss noch untersucht werden. Da angenommen wird, dass die durch Retinsäure vermittelte Teratogenität letztendlich von den RAR/RXR-Signalwegen abhängt, ist ein solcher Zusammenhang von Bedeutung beim Versuch, Retinoide mit spezifischen Aktivitäten zu synthetisieren, die sich durch geringe Teratogenität auszeichnen [Tziams et al., 2001].

4.1.5 Einfluss der Retinoide auf die interzelluläre Kommunikation anderer Zellarten

In der Literatur wird beschrieben, dass in bestimmten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches [Xu et al., 1994], oralen Leukoplakien [Lotan et al. 1997], Prostatakarzinomen [Lotan et al., 2000] und Bronchialkarzinomen die Expression von RAR β 2 deutlich vermindert ist oder sogar vollständig fehlt. Eine Mutation des RAR β 2 Rezeptors erhöht z.B. das Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken [Berard et al. 1996].

Nach Gabe von Retinsäure oder anderen Retinoiden wird RAR β 2 in bestimmten Bronchialkarzinomzelllinien verstärkt exprimiert [Lotan et al., 1997a]. Dadurch wird ein Mechanismus aktiviert, über den ein Teil der wachstumshemmenden Wirkung der Retinsäure vermittelt wird [Weber et al., 1999]. Es wird angenommen, dass die Hemmung des Wachstums durch Retinsäure auf einen Stillstand während der G1-Phase des Zellzyklus zurückzuführen ist [Wu et al., 1997a]. Die hier untersuchte Zelllinie (Plattenepithelkarzinomzellen der Haut - SCL-1-Zellen) zeigte wie bei vielen Tumorzellen beschrieben, keine Kommunikation über Gap Junctions [Metha et al., 1989; Budunova et al., 1994; Trosko et al., 1998]. Es wird angenommen, dass die meisten Tumorzellen nicht in der Lage sind, miteinander und/oder mit den umgebenden Zellen gesunder Gewebe zu kommunizieren [Budunova et al., 1994; Trosko et al., 1998].

Es ist bekannt, dass fötale Hautfibroblasten in der Lage sind, über Gap junctions zu kommunizieren [Teicher et al., 1999; Stahl et al., 2000]. Es konnte hier gezeigt werden, dass die normalen primären Hautfibroblasten HDFF-Zellen ebenfalls über Gap Junctions kommunizieren. Die SCL-1 Zellen und HDFF wurden als ein Modell für Wechselwirkungen von neoplastischen Zellen und gesundem Gewebe in Cokultur im Verhältnis 1:2 gezüchtet und die Kommunikationsfähigkeit der beiden Zelltypen innerhalb der Cokultur gemessen. Dabei stellte sich heraus, dass die Kommunikation der HDFF in der Cokultur im Vergleich zur HDFF-Monokultur um 50-60% abgenommen hat. Bei den SCL-1 Zellen konnte wie in der Cokultur Kommunikation gemessen werden.

Es wird angenommen, dass bei Tumorzellen eine Wiederaufnahme der Fähigkeit über Gap Junctions zu kommunizieren, z.B. durch Transfektion mit Genen, die für Connexine kodieren, zu einem kompletten Verlust der Tumorgenität führen kann [Mesnil et al., 1993; Budunova et al., 1994; Trosko et al. 1998]. Die Erhöhung der ZZK in Tumorzellen mit ZZK-stimulierenden Substanzen könnte einen zusätzlichen Vorteil bei der Verminderung des Tumorwachstums haben [Trosko et al. 1998, Denning et al., 1997]. Die Zellen in Cokultur wurden für 24 Std. mit 1 und 10 μ M Retinsäure inkubiert. Als Kontrollen wurden jeweils HDFF und SCL-1 Monolayer kultiviert und ebenfalls mit Retinsäure behandelt. Nach der 24 stündigen Inkubation konnte weder in den SCL- Monolayerzellen, noch in Cokultur eine Veränderung der ZZK beobachtet werden. Dagegen führte die Inkubation mit Retinsäure bei den HDFF Zellen der Cokultur zu einer Stimulation der ZZK im Vergleich zur Kontrolle. Dadurch konnten SCL-1 Zellen zwar nicht stimuliert werden, zu kommunizieren, aber

der inhibitorische Effekt der Tumorzellen auf die Normalzellen wurde aufgehoben. Dies ist von Bedeutung, da eine Abnahme der ZZK in Normalgewebe mit einer neoplastischen Veränderung der Zellen und Tumorentwicklung in Verbindung gebracht wird [Trosko et al., 1998].

Tumorzellen können durchaus Connexin-Proteine enthalten, die aber oftmals nicht als funktionsfähige Einheiten vorliegen [Loewenstein et al., 1979]. Dafür spricht der Befund der Immunfärbung des Connexin43-Proteins in SCL-1 Zellen; in diesen Zellen konnten Connexin43-Proteine nur im Cytoplasma nachgewiesen werden. Die Cokultivierung führte auch zu einer Abnahme der Connexinplaques in den Membranen der HDFF-Zellen [Stuhlmann/Ale-Agha in Vorbereitung]. Die weiteren Behandlungen mit höher konzentrierter Retinsäure zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die ZZK des Zelltyps.

Es ist möglich, dass die SCL-1 Zellen wenig oder gar nicht retinsäure-sensitiv sind. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die basale RAR-Expression niedrig oder gar nicht vorhanden ist. Wie schon erwähnt ist in einigen Plattenepithelkarzinomen die RAR β -Expression vermindert [Lotan et al., 1997; Lotan et al., 2000].

4.2 Flavonoide und Tumorpromotor TPA

Die GJIC spielt eine große Rolle bei der Regulierung des Tumorwachstums [Trosko et al. 2000; Omori et al., 2001]. Tumorpromotoren wie Phorbolster TPA oder Insektizide wie DDT, Lindan sind dafür bekannt, dass sie die ZZK in verschiedenen Zellkultursystemen hemmen. Die Regulierung der GJIC ist komplex. Die Bildung und Funktion der Gap Junctions wird durch Stabilisierung der Connexin-mRNA oder posttranslational wie z.B. durch Phosphorylierung des Gap Junction-Proteins (Connexin) reguliert [Lampe et al., 2000].

Die Fähigkeit der Phorbolster wie TPA die ZZK durch Connexinphosphorylierung zu hemmen, wird mit der aktivierenden Wirkung auf die Proteinkinase C in Verbindung gebracht. Connexin43-Protein weist eine spezifische Phosphorylierungsstelle auf, die bevorzugt von der PKC phosphoryliert wird. Andererseits kann TPA auch den MAPK (ERK1/2) Weg durch die Aktivierung von Raf stimulieren. Dies wiederum könnte ein Hinweis für eine Interaktion zwischen den beiden Signalwegen sein [Schonwasser et al., 1998; Rivedal et al., 2001].

Die in der Literatur beschriebenen inhibitorischen Effekte der TPA auf die ZVK zeigten sich auch in unserem Zellsystem [Ale-Agha, et al., 2002; Ren et al., 1998]. Wir konnten bei der TPA-Behandlung von WB-F344 Zellen ähnlich wie Rivedal et al. eine konzentrationsabhängige Hemmung der ZVK feststellen [Rivedal et al., 2001]. Dabei zeigte 0,1 nM TPA keine inhibitorischen Effekte nach 90 min Inkubation. Erst ab 1 nM konnte zu diesem Zeitpunkt eine 40%ige Hemmung der ZVK gemessen werden. Höhere Konzentrationen von TPA 5, 10 und 100 μ M führten nach 90 min Inkubation zur vollständigen Hemmung der ZVK. Diese Hemmung war auch mit einer Veränderung im Phosphorylierungsmuster des Connexin43-Proteins verbunden, wobei unter Behandlung mit 1 und 5 nM TPA keine so deutliche Hyperphosphorylierung des Connexin43-Proteins in den WB-F344 Zellen nachweisbar war, wie nach der Behandlung mit 10 nM und 100 nM TPA. Die Untersuchungen der TPA Effekte zeigen, dass nur bei niedriger TPA-Konzentration die ERK1/2 aktiviert sind und diese Aktivierung für den Verlust an ZVK und Connexin-Phosphorylierung verantwortlich ist, aber bei höheren TPA-Konzentrationen PKC möglicherweise direkt die Gap Junctions beeinflusst [Ruch et al., 2001].

Die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions ist auch sensitiv gegenüber oxidativem und nitrosativem Stress. Die Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid und Peroxynitrit kann die ZVK hemmen [Briviba et al., 1999].

Einige antioxidativ wirksame Mikronährstoffe wie Flavonoide und Carotinoide sind in der Lage, die ZVK zu stimulieren. Zu der Flavonoidgruppe der Flavan-3-ole gehört unter anderem (-)-Epicatechin, das in verschiedenen Obstsorten, Tee oder Kakao vorkommt [Watzl et al. 2001]. Es konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, dass (-)-Epicatechin die ZVK auf das 2,1 Fache der Kontrolle stimulieren kann [Ale-Agha et al., 2002]. Genistein zeigte in diesem Zellsystem eine ausgeprägtere stimulatorische Wirkung auf die ZVK als (-)-Epicatechin. Nach der Behandlung mit beiden Substanzen konnte nach 72 Std. Inkubation eine signifikante Akkumulation des Connexin 43-Proteins nachgewiesen werden.

Nach einer 90 minütigen Inkubation mit TPA kann die ZVK durch Hyperphosphorylierung des Connexin-Proteins gehemmt werden. Die Inhibition der ZVK mit 1 nM, 5 nM und 10 nM TPA konnte durch eine Coinkubation mit jeweils 40 μ M Epicatechin oder mit 40 μ M Genistein verhindert werden [Ale-Agha et al., 2002; Kang et al., 2000]. Andere Flavonoide wie Apigenin und Tangerin sind ebenfalls in der Lage, der durch Tumorpromotoren induzierten Hemmung der ZVK

entgegenzuwirken [Chaumontet et al., 1997]. Wie schon erwähnt, führte die Behandlung mit 10 nM TPA zur deutlichen Hyperphosphorylierung des Connexin-Proteins. Durch die Coinkubation mit (-)-Epicatechin oder Genistein wurde die Hyperphosphorylierung durch 10 nM TPA verhindert. Dieser Effekt war mit einer Wiederherstellung der funktionellen Kommunikation verbunden. Da die 90 minütige Inkubation von 40 µM (-)-Epicatechin und Genistein keinen Anstieg der ZZK verursacht, kann die Wirkung nicht der Erhöhung der ZZK zugeschrieben werden.

Durch die TPA induzierte Hyperphosphorylierung von Connexin 43 kommt es bei den WB-F344 Zellen zu einer Delokalisation von Connexinplaques aus der Membran und nachfolgender Internalisation ins Cytoplasma [Ale-Agha et al., 2002; Kang et al. 2000; Rivedal et al., 1994]. Bei Coinkubation von TPA mit 40 µM (-)-Epicatechin oder 40 µM Genistein kommt es zu einem Wiedereinbau des Connexin-Proteins in die Membran. Es werden noch einige Connexinplaques im Zytoplasma registriert, wobei die mit Genistein-Coinkubation erzielte Relokalisation des Connexin43-Proteins in die Membran stärker ausgeprägt ist, als mit (-)-Epicatechin. Es gibt 2 Wege, durch die diese Effekte erklärt werden können:

a) Einfluss auf die kinaseabhängigen Signalwege und b) antioxidative Wirkung.

Zu a): Genistein ist ein Tyrosinkinasehemmer und ist in der Lage die PKC-Enzymaktivität teilweise zu hemmen [Akiyama et al., 1987].

Nicht nur für (-)-Epicatechin, sondern auch für andere Verbindungen der Flavan-3-ol Gruppe aus dem Grünteeextrakt gibt es zahlreiche Studien, die verschiedene biologische Wirkungen dieser Mikronährstoffe aufzeigen. So sind die Verbindungen in der Lage, PKC- und ERK 1/2- Aktivität zu hemmen [Chung et al., 2002; Sartippour et al., 2002]. (-)-Epicatechin weist im Vergleich zu den Epicatechingalaten eine niedrigere Wirkung auf PKC und ERK1/2 auf. Die niedrige Aktivität von (-)-Epicatechin könnte auch ein Grund für die schwächere Inhibition des TPA-Effektes sein, die aber dennoch ausreicht um 50 bis 60% der ZZK in Verbindung mit einem Wiedereinbau der Connexinplaques in den Membranen zu bewirken.

Zu b): Beide Flavonoide sind gute Antioxidantien, und in der Lage sind reaktive Sauerstoffradikale und NO abzufangen. TPA kann in bestimmten Zellen die ROS- [Datta et al. 2000] und NO-Bildung induzieren, die durch Flavonoide des grünen Tees inhibiert werden kann [Srivastava et al., 2000]. Unter der Einwirkung von ROS wird eine Hemmung der ZZK hervorgerufen [Wie et al. 1998]. Somit können die inhibitorischen Effekte von (-)-Epicatechin und Genistein ebenfalls auf ihren antioxidativen Eigenschaften beruhen. Es ist durchaus denkbar, dass beide

Mechanismen bei der protektiven Wirkung von Flavonoiden gegenüber TPA-vermittelter Hemmung der ZSK eine Rolle spielen.

4.3 Menadion

Vitamin K₃ (Menadion), das als Modellchinon *in vitro* und *in vivo* eingesetzt wird, wurde auf seine Effekte im Hinblick auf die ZSK untersucht. *In vitro* konnte für Menadion nachgewiesen werden, dass es das Wachstum vieler Krebszellen hemmen kann [Munday et al., 1998]. Darüber hinaus führt die Menadionbehandlung *in vitro* und *in vivo* zu zelltoxischen Effekten. Die Behandlung mit Menadion ruft starke Nebenwirkungen hervor, weshalb Menadion in Deutschland als Medikament oder Ersatz für Vitamin K₁- und K₂- nicht zugelassen ist. Menadion weist eine Toxizität gegen Erythrozyten auf und führt bei Ratten, Hunden, Kaninchen, Katzen und Menschen zur hämolytischen Anämie [Munday et al., 1998]. Daneben wurden auch kardiotoxische Effekte unter der Gabe von Menadion beobachtet [Tzeng et al. 1992].

Menadion hat im Gegensatz zu seinen natürlich vorkommenden Analoga (Vitamin K₁ und K₂) ein anderes Lösungsverhalten (geringere Hydrophilie) und wird daher anders als die fettlöslichen Vit K₁ und K₂ metabolisiert. Menadion und andere Chinone sind sogenannte Redoxcycler. Menadion kann *in vivo* und *in vitro* den durch Redoxcycling induzierten oxidativen Stress und durch Arylierung das Zellwachstum inhibieren [Kar et al. 2002].

Zu der Gruppe der MAPK gehören unter anderem ERK1/2, die eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Zelldifferenzierungs- und Proliferationsvorgängen spielen. Die Eigenschaft von Menadion, das Wachstum von Krebszellen zu hemmen und Zelltod zu induzieren, korreliert mit der Menadion-vermittelten Aktivierung von ERK1 und ERK2 [Klotz et al., 2002].

Die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions spielt beim Zellwachstum und Differenzierung eine große Rolle [Trosko et al., 1998]. Es wird angenommen, dass ERK1/2 an der Phosphorylierung des Connexin43-Proteins mitbeteiligt sind [Klotz et al., 2002]. Wir konnten zum ersten Mal zeigen, dass Menadioninkubation schon nach 15 min. konzentrationsabhängig die ZSK in WB-F344 Zellen zu 50 -70% hemmen kann. Die rasche Abnahme der ZSK lässt die Annahme zu, dass der Effekt auf

posttranslationalen Ebene stattfindet. TPA, ein Tumorpromotor, ist in der Lage durch Hyperphosphorylierung von Connexin 43 die ZJK zu hemmen. Es wird angenommen, dass TPA entweder über PKC-Aktivierung die Connexine direkt phosphoryliert oder durch Aktivierung von ERK1 und ERK2 zur Phosphorylierung führt. Von Klotz und Mitarbeitern wurde gezeigt, dass ERK1 und ERK2 in WB-F344 Zellen durch Menadion aktiviert werden, während TPA nur eine schwache ERK-Aktivierung hervorruft [Klotz et al., 2002]. Der starke Phosphorylierungseffekt von TPA könnte durch eine Interaktion der beiden Signalwege erklärt werden. TPA Behandlung führt bei WB-F344 Zellen zu einer Delokalisation von Connexinplaques [Ale-Agha et al. 2002, Trosko et al. 1998]. Mit 50 µM Menadion behandelte Zellen zeigen keine Internalisation, keine Delokalisation und auch keine Degradierung des Connexin43-Proteins. Es scheint also, dass die menadionabhängige Hemmung der ZJK nicht mit einer Störung in der Connexinlokalisation in Verbindung steht.

Die vorliegenden Untersuchungen zu den Effekten des Menadions auf die ZJK und des Gap Junction-Proteins (Connexin43) lassen vermuten, dass für die toxischen Eigenschaften des Menadions ebenfalls die Veränderungen in der interzellulären Kommunikation verantwortlich sind.

5. Zusammenfassung

Die interzelluläre Kommunikation über Zell-Zell-Kanäle (Gap Junction) erlaubt den Austausch von niedermolekularen Verbindungen in gekoppelten Zellverbänden und dient unter anderem der Signaltransduktion. Sie spielt eine Rolle bei der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung. Störungen in der Gap Junctional Intercellular Communication (GJIC) stehen im Zusammenhang mit teratogenen und karzinogenen Wirkmechanismen. Die Zellkanäle sind aus Membranproteinen, den sogenannten Connexinen aufgebaut. Die Regulation der GJIC erfolgt auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene; zahlreiche biologisch aktive Verbindungen, wie Retinoide, Carotinoide, Flavonoide oder Tumorpromotoren beeinflussen die Zell-Zellkommunikation (ZZK).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung strukturell verschiedener Retinoide, Flavonoide und des Menadions auf die Zell-Zellkommunikation über Gap Junctions in WB-F344 Zellen (Rattenleberepithelzellen) untersucht. Neben Untersuchungen zum Einfluss der Verbindungen auf die Funktionalität von Gap Junctions, konnten auch Mechanismen der Regulation aufgeklärt werden.

Im funktionellen Farbstoff-Transfer-Assay zeigt sich, dass die Retinsäuremethylester und seine Derivate M1 (4-Oxo-3-acetoxy-Retinsäuremethylester), M2 (3-Oxo-4-dehydro-5,6-dihydro-Retinsäuremethylester) und M3 (4-Oxo-3-pivaloyloxy-Retinsäuremethylester) im niedrigen Konzentrationsbereich (0,001 μM - 1 μM) die interzelluläre Kommunikation stimulieren. Inhibitorische Effekte werden dagegen bei hohen Konzentrationen (10 μM - 20 μM) gemessen. Die stimulatorischen Effekte gehen mit einer Erhöhung der Menge an Connexin43-Protein einher, die vermutlich auf retinoidvermittelte stabilisierende Effekte der Connexin43-mRNA zurückzuführen ist. Die inhibitorische Wirkung der Derivate M1, M2 und M3 auf die Zell-Zellkommunikation bei hohen Retinoidkonzentrationen korreliert mit einer *Hyperphosphorylierung* des Connexin43. Diese Verschiebungen im Phosphorylierungsmuster des Connexin43 führen zur Störungen des Ein- bzw. Abbaus funktioneller Proteine in bzw. aus der Membran.

Die Flavonoide (-)-Epicatechin und Genistein induzieren ebenfalls die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions in WB-F344 Zellen, die mit einer Erhöhung der Menge an Connexin43-Protein einhergeht. Beide Substanzen sind zudem in der Lage, den inhibitorischen Effekten des Tumorpromotors TPA auf die ZZK

entgegenzuwirken. Unter Behandlung von TPA ist der Einbau von Connexin43 in die Zellmembran gestört. Dieser Effekt korreliert mit einer Hyperphosphorylierung des Connexin43 und ist vermutlich auf TPA-induzierte Aktivierung von Proteinkinasen zurückzuführen. Die protektive Wirkung von (-)-Epicatechin und Genistein gegen die inhibitorische Effekte des Tumorpromotors steht vermutlich nicht im Zusammenhang mit deren direktem Einfluss auf die GJIC. Aufgrund unterschiedlicher Zeitfenster in der Wirkung wird angenommen, dass eine Hemmung der Proteinkinasen oder antioxidative Effekte eine Rolle spielen.

Das Vitamin K Analogon Menadion ist ein effektiver Inhibitor der GJIC. Die rasche Abnahme der interzellulären Kommunikation lässt darauf schließen, dass dieser Effekt auf posttranslationale Regulationsmechanismen zurückzuführen ist.

Pharmakologische, toxikologische, teratogene und präventive Wirkungen der hier vorgestellten Verbindungen dürften zumindest teilweise mit Interaktion mit Prozessen der Regulation interzellulärer Kommunikationswege im Zusammenhang stehen. Somit kann die Aufklärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen zur Entwicklung neuer, selektiver Wirkstoffe beitragen.

6. Literatur

- Ale-Agha N., Stahl W., Sies H. (2002). (-)-Epicatechin effects in rat liver epithelial cells: stimulation of gap junctional communication and counteraction of its loss due to the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Biochem. Pharmacol.*, 63 :2145-9.
- Ara C., Massimi M., Devirgiliis Conti L. (2002). Retinoic acid modulates gap junctional intercellular communication in hepatocytes and hepatoma cells. *Cell Mol. Life Sci.* 59:1758-65.
- Aronica E., Gorter J.A., Jansen G.H., Leenstra S., Yankaya B., Troost D. (2001). Expression of connexin 43 and connexin 32 gap-junction proteins in epilepsy-associated brain tumors and in the perilesional epileptic cortex. *Acta. Neuropathol.* 101: 41549-59.
- Bennett M.V., Barrio L.C., Bargiello T.A., Spray D.C., Hertzberg E., Saez J.C. (1991). Gap junctions: new tools, new answers, new questions *Neuron.*, 6: 305-20.
- Berard J., Laboune F., Mukuna M., Masse S., Kothary R., Bradley W.E. (1996) Lung tumors in mice expressing an antisense RARbeta2 transgene. *FASEB J.*, 10:1091-7.
- Bergoffen J., Scherer S.S., Wang S., Scott M.O., Bone L.J., Paul D.L, Chen K., Lensch M.W., Chance P.F., Fischbeck K.H. (1993). Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science*, 262: 2039-42.
- Bex V., Mercier T., Chaumontet C., Gaillard-Sanchez I., Flechon B., Mazet F., Traub O., Martel P. (1995). Retinoic acid enhances connexin43 expression at the post-transcriptional level in rat liver epithelial cells. *Cell Biochem. Funct.*, 13: 69-77.
- Bischoff E.D., Heyman R.A., Lamph W.W. (1999). Effect of the Retinoid X Receptor-Selective Ligand LGD1069 on Mammary Carcinoma After Tamoxifen Failure *J Natl Cancer Inst.*, 91: 2118.
- Bolton J.L., Trush M.A., Penning T.M., Dryhurst G., Monks T.J. (2000) Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol.*, 13: 135-60.
- Boukamp P., Tilgen W., Dzarlieva R.T., Breitkreutz D., Haag D., Riehl R.K., Bohnert A., Fusenig N.E. (1982). Phenotypic and genotypic characteristics of a cell line from a squamous cell carcinoma of human skin. *J. Natl. Cancer Inst.*; 68: 415-27.
- Brinkmann E., Mehlitz I., Oei H.B., Tiebach R., Baltus W.Z. L. (1994). Determination of vitamin A in liver and liver-containing products using narrow-bore normal, phase HPLC. *Z Lebensm. Unters. Forsch.*, 199: 206-9.
- Budunova I.V., Mittelman L.A., Miloszewska J. (1994). Role of protein kinase C in the regulation of gap junctional communication. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 14: 259-70.

- Budunova I.V., Williams G.M. (1994). Cell culture assays for chemicals with tumor-promoting or tumor-inhibiting activity based on the modulation of intercellular communication. *Cell Biol. Toxicol.*, 10: 71-116.
- Carr B.I., Wang Z., Kar S. (2002). K vitamins, PTP antagonism, and cell growth arrest. *J. Cell Physiol.*, 193: 263-74.
- Chambon P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.*, 10: 940-54.
- Chaumontet C., Bex V., Gaillard-Sanchez I., Seillan-Heberden C., Suschetet M., Martel P. (1994). Apigenin and tangeretin enhance gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells. *Carcinogenesis*, 15: 2325-30.
- Chaumontet C., Droumaguet C., Bex V., Heberden C., Gaillard-Sanchez I., Martel P. (1997). Flavonoids (apigenin, tangeretin) counteract tumor promoter-induced inhibition of intercellular communication of rat liver epithelial cells. *Cancer Lett.*, 114: 207-10.
- Chen Z.Q., Lefebvre D., Bai X.H., Reaume A., Rossant J., Lye S.J. (1995). Identification of two regulatory elements within the promoter region of the mouse connexin 43 gene. *J. Biol. Chem.*, 270: 3863-8.
- Clairmont A., Sies H. (1997). Evidence for a posttranscriptional effect of retinoic acid on connexin43 gene expression via the 3'-untranslated region. *FEBS Lett.*, 419: 268-70.
- Clairmont A., Tessmann D., Sies H. (1996). Analysis of connexin43 gene expression induced by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. *FEBS Lett.*, 397: 22-4.
- Collins M.D., Mao G.E. (1999). Teratology of retinoids. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 39: 399-430
- Dahl E., Winterhager E., Traub O., Willecke K. (1996). Expression of gap junction genes, connexin40 and connexin43, during fetal mouse development. *Mol. Hum. Reprod.*, 2: 621-32.
- Dahl E., Winterhager E., Traub O., Willecke K. (1995). Expression of gap junction genes, connexin40 and connexin43, during fetal mouse development. *Anat. Embryol.*, 191: 267-78.
- Datta R., Yoshinaga K., Kaneki M., Pandey P., Kufe D. (2000). Phorbol ester-induced generation of reactive oxygen species is protein kinase c β -dependent and required for SAPK activation. *J. Biol. Chem.*, 275: 41000-3.
- De Luca L.M. (1999). Ligand-activated retinoic acid receptor inhibits AP-1 transactivation by disrupting c-Jun/c-Fos dimerization. *Mol. Endocrinol.*, 13: 276-85.
- De Luca L.M. (1991). Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J.*, 5: 2924-33.

- Dealy C.N., Beyer E.C., Koshier R.A.y CN, Beyer E.C., Koshier R.A. (1994). Expression patterns of mRNAs for the gap junction proteins connexin43 and connexin42 suggest their involvement in chick limb morphogenesis and specification of the arterial vasculature. *Dev. Dyn.*, 199: 156-67.
- Delorme B., Dahl E., Jarry-Guichard T., Marics I., Briand J.P., Willecke K., Gros D., Theveniau-Ruissy M. (1995). Developmental regulation of connexin 40 gene expression in mouse heart correlates with the differentiation of the conduction system. *Dev. Dyn.*, 204: 358-71.
- Denning C., Pitts J.D. (1997). Bystander effects of different enzyme-prodrug systems for cancer gene therapy depend on different pathways for intercellular transfer of toxic metabolites, a factor that will govern clinical choice of appropriate regimes. *Hum. Gene Ther.*, 8: 1825-35.
- Di W.L., Rugg E.L., Leigh I.M., Kelsell D.P. (2001). Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin 31. *J. Invest. Dermatol.*, 117: 958-64.
- Diez J.A., Ahmad S., Evans W.H. (1999). Assembly of heteromeric connexons in guinea-pig liver en route to the Golgi apparatus, plasma membrane and gap junctions. *Eur. J. Biochem.*, 262: 142-8.
- Dixon R.A., Ferreira D. (2002). Genistein. *Phytochem.*, 60: 205-11.
- Dragnev K.H., Rigas J.R., Dmitrovsky E. (2000). The retinoids and cancer prevention mechanisms. *Oncologist*; 5: 361-8.
- Evans W.H., Martin P.E. (2002). Gap junctions: structure and function (Review). *Mol. Membr. Biol.*, 19: 121-36.
- Fisher G.J., Voorhees J.J. (1996). Molecular mechanisms of retinoid actions in skin. *FASEB J.*, 10: 1002-13.
- Fotsis T., Pepper M., Adlercreutz H., Hase T., Montesano R., Schweigerer L. (1995). Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. *J. Nutr.*, 125: 790S-797S.
- Gamet-Payrastre L., Manenti S., Gratacap M.P., Tulliez J., Chap H., Payrastre B. (1999). Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen Pharmacol.*, 32: 279-86.
- Geimonen E., Boylston E., Royek A., Andersen J. (1998). Elevated connexin-43 expression in term human myometrium correlates with elevated c-Jun expression and is independent of myometrial estrogen receptors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83: 1177-85.
- Geimonen E., Jiang W., Ali M., Fishman G.I., Garfield R.E., Andersen J. (1996). Activation of protein kinase C in human uterine smooth muscle induces connexin-43 gene transcription through an AP-1 site in the promoter sequence. *J. Biol. Chem.*, 271: 23667-74.

- George C.H., Kendall J.M., Evans W.H. (1999). Intracellular trafficking pathways in the assembly of connexins into gap junctions. *J. Biol. Chem.*, 274: 8678-85.
- Goodenough D.A., Goliger J.A., Paul D.L. (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu. Rev. Biochem.*, 65: 475-502.
- Gottlicher M., Heck S., Herrlich P. (1998). Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J. Mol. Med.*, 76: 480-9.
- Gudas L.J. (1994). Retinoids and vertebrate development. *J. Biol. Chem.*, 269: 15399-402.
- Guo H., Acevedo P., Parsa F.D., Bertram J.S. (1992). Gap-junctional protein connexin 43 is expressed in dermis and epidermis of human skin: differential modulation by retinoids. *J. Invest. Dermatol.*, 99: 460-7.
- Haftek M., Kowalewski C., Mesnil M., Blaszczyk M., Schmitt D. (1999). Internalization of gap junctions in benign familial pemphigus (Hailey-Hailey disease) and keratosis follicularis (Darier's disease). *Br. J. Dermatol.*, 141: 224-30.
- Haubrich S., Schwarz H.J., Bukauskas F., Lichtenberg-Frate H., Traub O., Weingart R., Willecke K. (1996). Incompatibility of connexin 40 and 43 Hemichannels in gap junctions between mammalian cells is determined by intracellular domains. *Mol. Biol. Cell*, 7: 1995-2006.
- Hennemann H., Suchyna T., Lichtenberg-Frate H., Jungbluth S., Dahl E., Schwarz J., Nicholson B.J., Willecke K. (1992). Molecular cloning and functional expression of mouse connexin40, a second gap junction gene preferentially expressed in lung. *J. Cell Biol.*, 117: 1299-310.
- Hossain M.Z., Zhang L.X.; Bertram J.S. (1993). Retinoids and Caretenoids upregulate gap-junctional communication: cprrelation with enhanced growth control and cancer prevention. *Cell Res.*, 3: 301-309.
- Hossain M.Z., Murphy L.J., Hertzberg E.L., Nagy J.I. (1994). Phosphorylated forms of connexin43 predominate in rat brain: demonstration by rapid inactivation of brain metabolism. *J. Neurochem.*, 62: 2394-403.
- Hossain M.Z., Wilkens L.R., Mehta P.P., Loewenstein W., Bertram J.S. (1989). Enhancement of gap junctional communication by retinoids correlates with their ability to inhibit neoplastic transformation. *Carcinogenesis*, 10: 1743-8.
- Hu J., Engman L., Cotgreave I.A. (1995). Redox-active chalcogen-containing glutathione peroxidase mimetics and antioxidants inhibit tumour promoter-induced downregulation of gap junctional intercellular communication between WB-F344 liver epithelial cells. *Carcinogenesis*, 16: 1815-24.
- Hu J., Speisky H., Cotgreave I.A. (1995). The inhibitory effects of boldine, glaucine, and probucol on TPA-induced down regulation of gap junction function. Relationships to intracellular peroxides, protein kinase C translocation, and connexin 43 phosphorylation. *Biochem. Pharmacol.*, 50:1635-43

- Jiang H., Gyda M., Harnish D.C., Chandraratna R.A., Soprano K.J., Kochhar D.M., Soprano D.R. (1994). Teratogenesis by retinoic acid analogs positively correlates with elevation of retinoic acid receptor-beta 2 mRNA levels in treated embryos. *Teratology*, 50: 38-43.
- Jiang J.X., Goodenough D.A. (1996). Heteromeric connexons in lens gap junction channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93(3): 1287-91.
- Jou Y.S., Layhe B., Matesic D.F., Chang C.C., de Feijter A.W., Lockwood L., Welsch C.W., Klaunig J.E., Trosko J.E. (1995). Inhibition of gap junctional intercellular communication and malignant transformation of rat liver epithelial cells by neu oncogene. *Carcinogenesis*, 16: 311-7.
- Kaiser A., Herbst H., Fisher G., Koenigsmann M., Berdel W.E., Riecken E.O., Rosewicz S. (1997). Retinoic acid receptor beta regulates growth and differentiation in human pancreatic carcinoma cells. *Gastroenterology*, 113: 920-9.
- Kang K.S., Kang B.C., Lee B.J., Che J.H., Li G.X., Trosko J.E., Lee Y.S. (2000). Preventive effect of epicatechin and ginsenoside Rb(2) on the inhibition of gap junctional intercellular communication by TPA and H(2)O(2). *Cancer Lett.*, 152: 97-106.
- Kar S., Adachi T., Carr B.I. (2002). EGFR-independent activation of ERK1/2 mediates growth inhibition by a PTPase antagonizing K-vitamin analog. *J. Cell Physiol.*, 190: 356-64.
- Kar S., Adachi T., Carr B.I. (2002). EGFR-independent activation of ERK1/2 mediates growth inhibition by a PTPase antagonizing K-vitamin analog. *J. Cell Physiol.*, 190: 356-64.
- Kar S., Carr B.I. (2000). Growth inhibition and protein tyrosine phosphorylation in MCF 7 breast cancer cells by a novel K vitamin. *J. Cell Physiol.*, 185: 386-93.
- Kelsell D.P., Di W.L., Houseman M.J. (2001). Connexin mutations in skin disease and hearing loss. *Am. J. Hum. Genet.*, 68: 559-68.
- Keppler-Noreuil K.M. (2001). OEIS complex (omphalocele-exstrophy-imperforate anus-spinal defects): a review of 14 cases. *Am. J. Med. Genet.*, 99: 271-9.
- Kiehn O., Tresch M.C. (2002). Gap junctions and motor behaviour. *Trends Neurosci.*, 25: 108-15.
- Klotz L.O., Patak P., Ale-Agha N., Buchczyk D.P., Abdelmohsen K., Gerber P.A., von Montfort C., Sies H. (2002). 2-Methyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K(3), decreases gap-junctional intercellular communication via activation of the epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase cascade. *Cancer Res.*, 62: 4922-8.
- Krutovskikh V., Yamasaki H. (1997). The role of gap junctional intercellular communication (GJIC) disorders in experimental and human carcinogenesis. *Histol. Histopathol.*, 12: 761-8.

- Laird D.W. (1996). The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation. *Bioenerg. Biomembr.*, 28: 311-8.
- Lampe P.D., Lau A.F. (2000). Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 384: 205-15.
- Lampe P.D., TenBroek E.M., Burt J.M., Kurata W.E., Johnson R.G., Lau A.F. (2000) Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *J. Cell Biol.*, 149: 1503-12.
- Lippman S.M., Lotan R. (2000). Advances in the development of retinoids as chemopreventive agents. *J. Nutr.*, 130: 479S-482S.
- Loewenstein W.R. (1979). Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim. Biophys. Acta.*, 560:1-65.
- Lotan R. (1996). Retinoids and their receptors in modulation of differentiation, development, and prevention of head and neck cancers. *Anticancer Res.*, 16: 2415-9.
- Lotan R., Xiao-Chun Xu, Lippman S.M., Ro J.Y., Lee J.S., Lee J.J., Hong W.K. (1995). Suppression of Retinoic Acid Receptor- β in Premalignant Oral Lesions and Its Up-Regulation by Isotretinoin. *N. Engl. J. Med.*, 332: 1405-1411.
- Lotan R. (1996). Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J.*, 10: 1031-9.
- Lotan R. (1997). Retinoids and chemoprevention of aerodigestive tract cancers. *Cancer Metastasis. Rev.*, 16: 349-56.
- Lu H.C., Eichele G., Thaller C. (1997). Ligand-bound RXR can mediate retinoid signal transduction during embryogenesis. *Development*, 124: 195-203.
- Lu H.C., Revelli J.P., Goering L., Thaller C., Eichele G. (1997). Retinoid signaling is required for the establishment of a ZPA and for the expression of Hoxb-8, a mediator of ZPA formation. *Development*, 124: 1643-51.
- Lu X.P., Fanjul A., Picard N., Pfahl M., Rungta D., Nared-Hood K., Carter B., Piedrafita J., Tang S., Fabbriozio E., Pfahl M. (1997) Novel retinoid-related molecules as apoptosis inducers and effective inhibitors of human lung cancer cells in vivo. *Nat. Med.*, 3: 686-90.
- MacDonald P.N., Bok D., Ong D.E. (1990). Localization of cellular retinol-binding protein and retinol-binding protein in cells comprising the blood-brain barrier of rat and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 87: 4265-9.
- Makarenkova H., Patel K. (1999). Gap junction signalling mediated through connexin-43 is required for chick limb development. *Dev. Biol.*, 207: 380-92.
- Mast T.J., Cukierski M.A., Nau H., Hendrickx A.G. (1986). Predicting the human teratogenic potential of the anticonvulsant, valproic acid, from a non-human primate model. *Toxicology*, 39:111-9.

- Matesic D.F., Rupp H.L., Bonney W.J., Ruch R.J., Trosko J.E. (1994). Changes in gap-junction permeability, phosphorylation, and number mediated by phorbol ester and non-phorbol-ester tumor promoters in rat liver epithelial cells. *Mol. Carcinog.*, 10: 226-36.
- Mehta P.P., Bertram J.S., Loewenstein W.R. (1989). The actions of retinoids on cellular growth correlate with their actions on gap junctional communication. *Cell Biol.*, 108: 1053-65.
- Mehta P.P., Bertram J.S., Loewenstein W.R. (1986). Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells. *Cell*, 44: 187-96.
- Morriss-Kay G.M., Sokolova N. (1996). Embryonic development and pattern formation. *FASEB J.*, 10: 961-8.
- Musil L.S., Cunningham B.A., Edelman G.M., Goodenough D.A. (1990). Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J. Cell Biol.*, 111: 2077-88.
- Musil L.S., Goodenough D.A. (1993). Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell*, 74:1065-77.
- Nagy J.I., Patel D., Ochalski P.A., Stelmack G.L. (1999). Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience*, 88: 447-68.
- Napoli J.L. (1986). Retinol metabolism in LLC-PK1 Cells. Characterization of retinoic acid synthesis by an established mammalian cell line. *J. Biol. Chem.*, 261: 13592-7.
- Napoli J.L. (1999). Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1440: 139-62.
- Napoli J.L. (1999). Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 63: 139-88.
- Nau H. (2001). Teratogenicity of isotretinoin revisited: species variation and the role of all-trans-retinoic acid. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 45: S183-7.
- Nelis E., Haites N., Van Broeckhoven C. (1999). Mutations in the peripheral myelin genes and associated genes in inherited peripheral neuropathies. *Hum. Mutat.*, 13: 11-28.
- Nelis E., Timmerman V., De Jonghe P., Van Broeckhoven C., Rautenstrauss B. (1999). Molecular genetics and biology of inherited peripheral neuropathies: a fast-moving field. *Neurogenetics*, 2: 137-48.

- Newton D.L., Henderson W.R., Sporn M.B. (1980). Structure-activity relationships of retinoids in hamster tracheal organ culture. *Cancer Res.*, 40: 3413-25.
- Nicolai S., Sies H., Stahl W. (1997). Stimulation of gap junctional intercellular communication by thalidomide and thalidomide analogs in human skin fibroblasts. *Biochem. Pharmacol.*, 53: 1553-7.
- Oh S.Y., Grupen C.G., Murray A.W. (1999). Phorbol ester induces phosphorylation and down regulation of connexin 43 in WB-F344 cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1094: 243-5.
- Omori Y., Zaidan Dagli M.L., Yamakage K., Yamasaki H. (2001). Involvement of gap junctions in tumor suppression: analysis of genetically-manipulated mice. *Mutat. Res.*, 477: 191-6.
- Pal J.D., Liu X., Mackay D., Shiels A., Berthoud V.M., Beyer E.C., Ebihara L. (2000). Connexin46 mutations linked to congenital cataract show loss of gap junction channel function. *Am J. Physiol. Cell Physiol.*, 279: C596-602.
- Paulson A.F., Lampe P.D., Meyer R.A., TenBroek E., Atkinson M.M., Walseth T.F., Johnson R.G. (2000). Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. *J. Cell Sci.*, 113 : 3037-49
- Pfahl M. (1993). Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocr. Rev.*, 14: 651-8.
- Pfahl M. (1993). Signal transduction by retinoid receptors. *Skin Pharmacol.*, 1: 8-16.
- Randolph R.K., Simon M. (1997). Metabolism of all-trans-retinoic acid by cultured human epidermal keratinocytes. *J. Lipid Res.*, 38: 1374-83.
- Ren P., Mehta P.P., Ruch R.J. (1998). Inhibition of gap junctional intercellular communication by tumor promoters in connexin43 and connexin32-expressing liver cells: cell specificity and role of protein kinase C. *Carcinogenesis*, 19: 169-75.
- Rivedal E., Opsahl H. (2001). Role of PKC and MAP kinase in EGF- and TPA-induced connexin43 phosphorylation and inhibition of gap junction intercellular communication in rat liver epithelial cells. *Carcinogenesis*, 22: 1543-50.
- Rivedal E., Yamasaki H., Sanner T. (1994). Inhibition of gap junctional intercellular communication in Syrian hamster embryo cells by TPA, retinoic acid and DDT. *Carcinogenesis*, 15: 689-94.
- Rizzo R., Lammer E.J., Parano E., Pavone L., Argyle J.C. (1991). Limb reduction defects in humans associated with prenatal isotretinoin exposure. *Teratology*, 44: 599-604.
- Rogers M., Berestecky J.M., Hossain M.Z., Guo H.M., Kadle R., Nicholson B.J., Bertram J.S. (1990). Retinoid-enhanced gap junctional communication is achieved by increased levels of connexin 43 mRNA and protein. *Mol. Carcinog.*, 3: 335-43.

- Rogers M.B., Glozak M.A., Heller L.C. (1997). Induction of altered gene expression in early embryos. *Mutat. Res.*, 396: 79-95.
- Ross J.A., Kasum C.M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.*, 22: 19-34.
- Ross J. (1995). m-RNA stability in mammalian cells. *Microbiol. Rev.*, 59: 423-50.
- Ruch R.J., Trosko J.E., Madhukar B.V. (2001). Inhibition of connexin43 gap junctional intercellular communication by TPA requires ERK activation. *J. Cell Biochem.*, 83: 163-9.
- Ruch R.J., Trosko J.E. (1999). The role of oval cells and gap junctional intercellular communication in hepatocarcinogenesis. *Anticancer Res.*, 19: 4831-8.
- Saez J.C., Martinez A.D., Branes M.C., Gonzalez H.E. (1998). Regulation of gap junctions by protein phosphorylation. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31: 593-600.
- Saez J.C., Nairn A.C., Czernik A.J., Fishman G.I., Spray D.C., Hertzberg E.L. (1997). Phosphorylation of connexin43 and the regulation of neonatal rat cardiac myocyte gap junctions. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 29: 2131-45.
- Sartippour M.R., Shao Z.M., Heber D., Beatty P., Zhang L., Liu C., Ellis L., Liu W., Go V.L., Brooks M.N. (2002). Green tea inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) induction in human breast cancer cells. *J. Nutr.*, 132: 2307-11.
- Schonwasser D.C., Marais R.M., Marshall C.J., Parker P.J. (1998). Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol. Cell Biol.*, 18: 790-8.
- Sharov V.S., Briviba K., Sies H. (1999). Peroxynitrite diminishes gap junctional communication: protection by selenite supplementation. *IUBMB Life*, 48: 379-84.
- Simon A.M., Goodenough D.A., Paul D.L. (1998). Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. *Curr. Biol.*, 8: 295-8.
- Simon A.M., Goodenough D.A. (1998). Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell. Biol.*, 8: 477-83.
- Soprano D.R., Soprano K.J. (1995). Retinoids as teratogens. *Annu. Rev. Nutr.*, 15:111-32.
- Srivastava R.C., Husain M.M., Hasan S.K., Athar M. (2000). Green tea polyphenols and tannic acid act as potent inhibitors of phorbol ester-induced nitric oxide generation in rat hepatocytes independent of their antioxidant properties. *Cancer Lett.*, 153: 1-5.
- Stahl W., Nicolai S., Hanusch M., Sies H. (1994). Vitamin D influences gap junctional communication in C3H/10T 1/2 murine fibroblast cells. *FEBS Lett.*, 352: 1-3.

- Stahl W., Sies H. (1998). The role of carotenoids and retinoids in gap junctional communication. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 68: 354-9.
- Stahl W., von Laar J., Martin H.D., Emmerich T., Sies H. (2000). Stimulation of gap junctional communication: comparison of acyclo-retinoic acid and lycopene. *Arch. Biochem. Biophys.*, 373: 271-4.
- Stock A., Sies H., Stahl W. (1998). Enhancement of gap junctional communication and connexin43 expression by thyroid hormones. *Biochem. Pharmacol.*, 55: 475-9.
- Stock A., Sies H. (2000). Thyroid hormone receptors bind to an element in the connexin43 promoter. *Biol. Chem.*, 381: 973-9.
- Sun S.Y., Lotan R. (2002). Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 41: 41-55.
- Sun S.Y., Yue P., Dawson M.I., Shroot B., Michel S., Lamph W.W., Heyman R.A., Teng M., Chandraratna R.A., Shudo K., Hong W.K., Lotan R. (1997). Differential effects of synthetic nuclear retinoid receptor-selective retinoids on the growth of human non-small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res.*, 57: 4931-9.
- Teicher V.B., Kucharski N., Martin H.D., van der Saag P., Sies H., Stahl W. (1999). Biological activities of Apo-canthaxanthinoic acids related to gap junctional communication. *Arch. Biochem. Biophys.*, 365: 150-5
- Trosko J.E., Chang C.C. (2000). Modulation of cell-cell communication in the cause and chemoprevention/chemotherapy of cancer. *Biofactors*, 12: 259-63.
- Trosko J.E., Chang C.C. (2001). Role of stem cells and gap junctional intercellular communication in human carcinogenesis. *Radiat. Res.*, 155: 175-180.
- Trosko J.E., Ruch R.J. (1998). Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front. Biosci.*, 3: D208-36.
- Tsao M.S., Smith J.D., Nelson K.G., Grisham J.W. (1984). A diploid epithelial cell line from normal adult rat liver with phenotypic properties of 'oval' cells. *Exp. Cell Res.*, 154: 38-52.
- Tzeng W.F., Chiou T.J., Huang J.Y., Chen Y.H. (1992), Menadione-induced cardiotoxicity is associated with alteration in intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China*, 16: 84-90.
- Tzimas G., Nau H. (2001). The role of metabolism and toxicokinetics in retinoid teratogenesis. *Curr. Pharm. Des.*, 7: 803-31.
- Ubeda A., Trillo M.A., House D.E., Blackman C.F. (1995). Melatonin enhances junctional transfer in normal C3H/10T1/2 cells. *Cancer Lett.*, 91: 241-5.
- Underhill T.M., Weston A.D. (1998). Retinoids and their receptors in skeletal development. *Microsc. Res. Tech.*, 43: 137-55.

- Upham B.L., Kang K.S., Cho H.Y., Trosko J.E. (1997). Hydrogen peroxide inhibits gap junctional intercellular communication in glutathione sufficient but not glutathione deficient cells. *Carcinogenesis*, 18: 37-42.
- Vaney D.I. (1999). Neuronal coupling in the central nervous system: lessons from the retina. *Novartis Found Symp.*, 219:113-33.
- Varghese L., Janckila A., Yam L.T. (1999). Acute promyelocytic leukemia. New methods in diagnosis and treatment. *J. Ky. Med. Assoc.*, 97: 61-5.
- Warn-Cramer B.J., Cottrell G.T., Burt J.M., Lau A.F. (1998). Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 273: 9188-96.
- Weber E., Ravi R.K., Knudsen E.S., Williams J.R., Dillehay L.E., Nelkin B.D., Kalemkerian G.P., Feramisco J.R., Mabry M. (1999). Retinoic acid-mediated growth inhibition of small cell lung cancer cells is associated with reduced myc and increased p27Kip1 expression. *Int. J. Cancer*, 80: 935-43.
- Willecke K., Eiberger J., Degen J., Eckardt D., Romualdi A., Guldenagel M., Deutsch U., Sohl G. (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.*, 383: 725-37.
- Willecke K., Heynkes R., Dahl E., Stutenkemper R., Hennemann H., Jungbluth S., Suchyna T., Nicholson B.J. (1991). Mouse connexin37: cloning and functional expression of a gap junction gene highly expressed in lung. *J. Cell Biol.*, 114: 1049-57.
- Wilcox J.N., Blumenthal B.F. (1995). Thrombotic mechanisms in atherosclerosis: potential impact of soy proteins. *J. Nutr.*, 125: 631S-638S.
- Wu Q., Dawson M.I., Zheng Y., Hobbs P.D., Agadir A., Jong L., Li Y., Liu R., Lin B., Zhang X.K. (1997). Inhibition of trans-retinoic acid-resistant human breast cancer cell growth by retinoid X receptor-selective retinoids. *Mol. Cell Biol.*, 17: 6598-608.
- Wu S., Donigan A., Platsoucas C.D., Jung W., Soprano D.R., Soprano K.J. (1997). All-trans-retinoic acid blocks cell cycle progression of human ovarian adenocarcinoma cells at late G1. *Exp. Cell Res.*, 232: 277-86.
- Xu X.C, Wong W.Y, Goldberg L., Baer S.C., Wolf J.E., Ramsdell W.M., Alberts D.S., Lippman S.M., Lotan R. (2001). Progressive decreases in nuclear retinoid receptors during skin squamous carcinogenesis. *Cancer Res.*, 61: 4306-10.
- Lippman S.M., Lotan R. (2001). Progressive decreases in nuclear retinoid receptors during skin squamous carcinogenesis. *Cancer Res.*, 61: 4306-10.
- Yang C.S., Maliakal P., Meng X. (2002). Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 42: 25-54.

- Zhou X.F., Shen X.Q., Shemshedini L. (1999). Ligand-activated retinoic acid receptor inhibits AP-1 transactivation by disrupting c-Jun/c-Fos dimerization. *Mol. Endocrinol.*, 13: 276-85.
- Zou C.P., Kurie J.M., Lotan D., Zou C.C., Hong W.K., Lotan R. (1998). Higher potency of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide than all-trans-retinoic acid in induction of apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.*, 4: 1345-55.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wilhelm Stahl für die Vergabe dieses sehr interessanten Themas, seine Anregungen, sein Vertrauen in mich, seine Geduld und natürlich für die Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Martin möchte ich herzlichst für die Übernahme des Koreferates und sein Interesse an meiner Arbeit danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Helmut Sies möchte ich mich herzlichst für die Überlassung eines Arbeitsplatzes, seine ständige Diskussion- und Hilfsbereitschaft und sein Vertrauen in mich bedanken.

Herrn Privat Doz. Lars Oliver Klotz danke ich sehr für die Erlaubnis zur Arbeitsplatz- und Arbeitsmaterialienmitbenutzung, für die Ratschläge und die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern bzw. ehemaligen Mitgliedern des Instituts, besonders bei Dr. Anke Stock für die Einführung in die faszinierende Welt der Mikroinjektion (ZZK), Dr. Heiko Possel für die Einführung in die ebenso spannende Immunostaining, und bei Ira Melchheier, Jule Bayer, Kotb Aly, Holger Steinbrenner, Cristy Ramos, Claudia Wyrich bedanken. Die gute Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft in der Gruppe und eine scheinbar nie versiegende Schokoladenquelle haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Bei Andrea Borchardt möchte ich mich für die Einführung in die Zellkultur und ihre Unterstützung in schwierigen Zeiten bedanken. Mein besonderer Dank gilt auch Marlies Scholtes, die durch ihre herzliche, freundliche und hilfsbereite Art mir bei vielen Gelegenheiten geholfen hat.

Dr. Darius Buchzyck, Claudia von Montfort, Dominik Stuhlmann, Alejandro Betancor und Dr. Antonio Pérez-Gálvez möchte ich herzlich für ihre Freundschaft, Hilfsbereitschaft in jeglicher Labor- und Lebenssituation, und natürlich auch für ihre Mühe bei den Korrekturen dieser Arbeit danken.

Bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Gruppe Prof. Stahl: Privat Doz. Dr. Cristina Polidori, Dr. Olivier Aust, , Alejandro Betancor, Dr. Antonio Pérez-Gálvez, Juan-Carlos Carrillo (die spanische Delegation), Felicitas Daubrawa, Karin Neukam, Peter Graf und Heide Krahl möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft, die Zusammengehörigkeit und die familiäre Atmosphäre bedanken, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ganz herzlich möchte ich mich noch mal bei Privat Doz. Dr. Cristina Polidori und Alejandro Betancor bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Ganz besonders und aus tiefstem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder, allen anderen Familienmitgliedern, Freunden und natürlich bei meinem Freund Bernhard Boldt bedanken, die durch ihre unendliche Liebe, Zuneigung und Verständnis mich über all die Jahre unterstützt, motiviert und das Gelingen dieser Arbeit erst ermöglicht haben. Insbesondere bedanke ich noch mal bei Bernhard Boldt, der meinen Ehrgeiz gesteigert und mich während der Entstehung der Arbeit außerordentlich unterstützt und für seine Verhältnisse sagenhaft geduldig ertragen hat.