

**Aktivierung von c-Jun-N-terminalen Kinasen
(SAPK/JNK) als Teil der späten Cisplatin
abhängigen DNA-Schadensantwort**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Lars Helbig

geb. am 07.07.1979 in Speyer

Mainz, 2013

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2013

Es ist nicht der Berg, den wir bezwingen – wir bezwingen uns selbst
(Sir Edmund Hillary)

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	4
1.1 Mitogen-aktivierte-Protein Kinasen (MAPK).....	4
1.1.1 Stresskinasen - SAPK/JNK.....	5
1.2 Rho-GTPasen und clostridiale Rho glucosylierende Toxine.....	7
1.2.2 Clostridiale glukolierende Toxine.....	8
1.2.3 Latrunculin B.....	8
1.3 DNA-Reparatur.....	9
1.3.1 Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER).....	9
1.3.1.1 Xeroderma Pigmentosum (XP).....	11
1.3.1.2 Cockayne Syndrom (CS).....	12
1.3.2 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	12
1.3.3 DNA-Schadenserkenung.....	15
1.4 DNA-Crosslinking Agenzien.....	16
1.4.1 Cisplatin.....	16
1.4.2 Transplatin.....	17
1.4.3 UV-Licht.....	18
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Chemikalien.....	20
2.1.2 Zytostatika.....	21
2.1.3 Käuflich erwerbliche KITS.....	21
2.1.4 Standardpuffer und Lösungen.....	21
2.1.5 Antikörper.....	23
2.1.5.1 Antikörper für Western-Immunoblotting und Fluoreszenzmikroskopie.....	23
2.1.5.2 Zweit-Antikörper für die Fluoreszenzmikroskopie.....	24
2.1.6 siRNA.....	24
2.1.7 Plasmid.....	24
2.1.8 Medien und Reagenzien für die Zellkultur.....	24
2.1.9 Zelllinien.....	25
2.1.10 Geräte und sonstige Hilfsmittel.....	25
2.1.11 Verbrauchsmaterial.....	26
2.1.12 Software.....	26

2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Zellkultur	27
2.2.2 Behandlung von Zellen	27
2.2.3 Langzeitlagerung von Zellen.....	27
2.2.4 Zytotoxizitätstest	28
2.2.5 FACS Analysen.....	28
2.2.5.1 Messung der reaktiven Sauerstoffspezies	28
2.2.5.2 Zellzyklusmessung – Analyser der SubG1 Fraktion.....	29
2.2.6 siRNA Techniken	29
2.2.7 Herstellung von platinierter DNA	30
2.2.8 Herstellung von Gesamtproteinextrakten.....	30
2.2.9 Herstellung von Extrakten für die Membranisolierung.....	30
2.2.10 Neutraler Comet-Assay zum Nachweis von DNA-Doppelstrang-brüchen in eukaryotischen Zellen	31
2.2.11 Genomische DNA-Isolation aus Zellen	31
2.2.12 Bestimmung des Reinheitsgrades und der Konzentration von.....	32
2.2.13 South Western Analyse (Slot Blot)	32
2.2.14 Immunfluoreszenzfärbungen – γ H2AX-Foci.....	33
2.2.15 GST-PAK Pulldown-Assay.....	34
2.2.16 Induktiv gekoppelte Massenspektrometrie (ICP-MS).....	34
3. Ergebnisse	35
3.1 DNA-schadensabhängige Aktivierung von Stresskinasen.....	35
3.2 Replikation assoziierte Mechanismen tragen zur Aktivierung der SAPK/JNK in CSB-defekten Zellen bei	44
3.3 Sind Doppelstrangbrüche als initialer Auslöser für die SAPK/JNK duale Phosphorylierung ausreichend?.....	49
3.4 DNA-Reparatur Defekte und deren Auswirkungen auf späte SPAK/JNK Aktivierung nach Cisplatin Behandlung.....	52
3.5 Untersuchungen verschiedener Marker nach Cisplatin-Behandlung in DNA-PKcs defizienten Mausfibroblasten zu frühen und späten Zeiten	54
3.5 Weitere mögliche Faktoren, die im späten durch Cisplatin induzierten Signaling eine Rolle spielen.	57
3.6 Untersuchungen von Tyrosin-Kinasen und Rho-GTPasen und deren Einfluss auf die späte SAPK/JNK Phosphorylierung.....	59

3.7 Späte SAPK/JNK Aktivierung führt zum Überleben der Zellen nach Cisplatin- Behandlung.....	64
4. Diskussion	66
5. Zusammenfassung.....	74
6. Summary	76
7. Literaturverzeichnis.....	77
8. Anhänge.....	91
8.1 Abkürzungsverzeichnis	91
8.2 Veröffentlichungen.....	94
Danksagung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Eidesstattliche Erklärung	98

1. Einleitung

1.1 Mitogen-aktivierte-Protein Kinasen (MAPK)

Die Mitogen-aktivierte-Protein Kinase Superfamilie (MAPK) setzt sich aus drei Gruppen zusammen:

- extrazellulär regulierte Kinasen (ERK), wie ERK-1; ERK-2; ERK-3/4 und ERK-5
- c-Jun-N-terminalen Kinasen (SAPK/JNK), wie SAPK/JNK 1,2 und 3
- p38 MAP-Kinasen mit den Unterformen α , β , γ und δ

Die Gesamtheit aller MAPK gehört einem intrazellulären Signaltransduktionsnetzwerk an. Sie sind dafür verantwortlich, dass externe Stimuli durch eine Vielzahl an biologischen Prozessen beantwortet werden (Roux, Blenis, 2004).

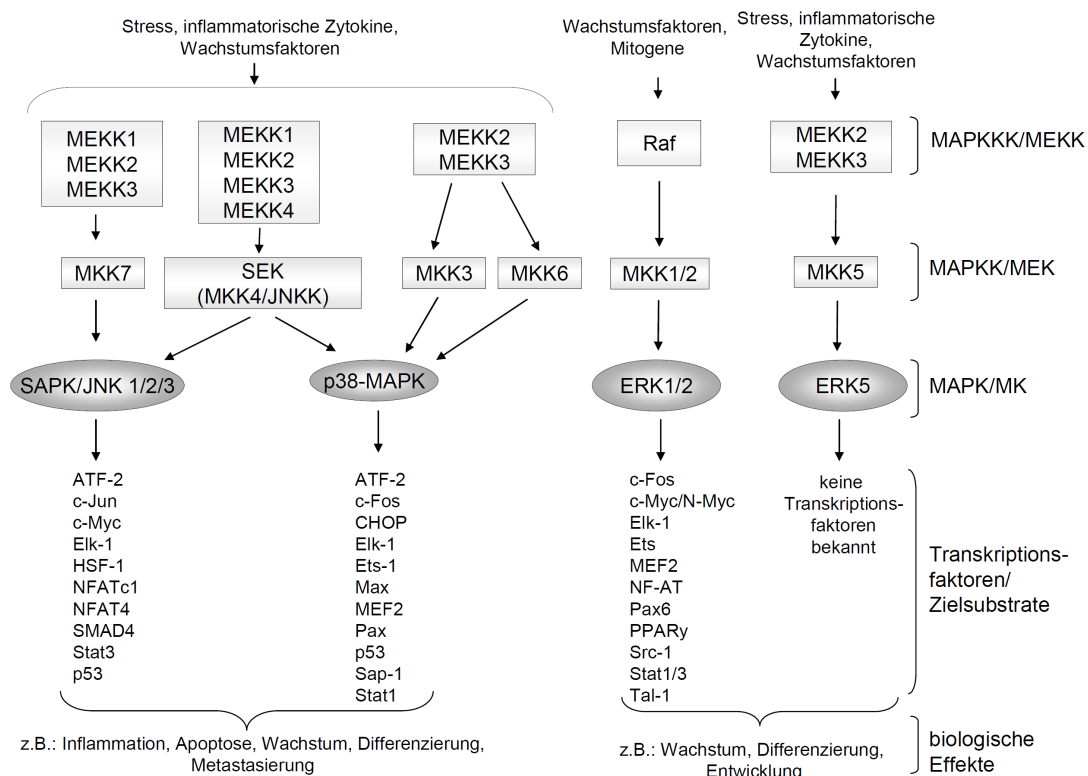


Abbildung 1: Schema des MAP-Kinase Signalweges mit den Substraten und der biologischen Bedeutung (nach Brozovic, Osmak, 2007)

Zellulärer Stress, wie beispielsweise osmotischer Stress, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder auch inflammatorische Zytokine, als auch genotoxische Noxen wie UV-Strahlung und Alkylantien führen zu einer Aktivierung der SAPK/JNK

(Kolbus et al., 2000; Herrlich et al., 1997; Zanke et al., 1996; Seger und Krebs, 1995; Minden et al., 1994). Mitogene (Mitose anregende Proteine) und Wachstumsfaktoren führen zu einer Aktivierung der ERK, der „extra cellular regulated kinases“.

Bei der SAPK/JNK Aktivierung ist das zentrale Starterereignis die Rezeptoraktivierung an der äußeren Zellmembran. Dies hat zur Folge, dass Adaptermoleküle des Rezeptors rekrutiert und kleine GTP-Proteine als „Transmitter“ aktiviert werden.

Als Folge treten eine Reihe von Phosphorylierungskaskaden auf, die als Protein-Kinase-Kaskaden bezeichnet werden. Die Kinase-Kaskade beginnt dabei mit den MAPKK Kinasen, kurz MAPKKK oder MEKKs, die die MAPK Kinasen, kurz MAPKK oder MEKs aktivieren. Die MEKs phosphorylieren danach die MAPKs (Hagemann, Blank, 2001). Die MAP Kinasen selbst aktivieren durch Phosphorylierung dann ihre spezifischen Zielsubstrate. Dies sind beispielsweise Proteine des Zytoskeletts, Transkriptionsfaktoren und andere Proteine, die an verschiedenen Prozessen beteiligt sind. MAPK nehmen aber auch direkten Einfluss auf die Expression vieler Gene, die für Prozesse wie Apoptose, Inflammation, Wachstum und Differenzierung kodieren (siehe Abb. 1).

1.1.1 Stresskinasen - SAPK/JNK

Die Stress-aktivierte Protein-Kinasen/c-Jun-N-terminalen Kinasen (SAPK/JNK) sind sogenannte Serin/Threonin Kinasen. Aktiviert werden sie durch zellulären Stress unterschiedlichsten Ursprungs, was zur Phosphorylierung der aminoterminalen Domäne des Transkriptionsfaktors c-Jun führt. Die Bedeutung der SAPK/JNK im biologischen Sinne ist mannigfaltig und reicht von der Regulation von Immunantworten, der Einflussnahme auf Zytokingenexpression, Regulation der mRNA Integrität, Zytoskelettstabilität bis hin zur Apoptose, dem programmierten Zelltod.

Bisher sind drei Gene bekannt, die für die verschiedenen Isoformen der JNK kodieren. Diese sind: *jnk1*, *jnk2* und *jnk3*. Diese drei Gene unterscheiden sich bezüglich ihrer Expression. *Jnk1* und *jnk2* werden ubiquitär exprimiert, was soviel bedeutet, dass die Genprodukte überall vorkommen. *Jnk3* wird allerdings vorwiegend nur im Gehirn und in den Testis (Hoden) exprimiert (Yang et al. 1997). Des Weiteren gibt es zehn Spleissvarianten dieser JNK-Isoformen, welche

sich wiederum in ihrer Substratspezifität unterscheiden (Gupta et al., 1996; Widmann et al., 1999).

Die Funktionsweise aller Isoformen jedoch ist gleich. Nach ihrer Aktivierung durch unterschiedlichste Stimuli translozieren die SAPK/JNK in den Zellkern, um dort mit ihren spezifischen Substraten zusammenzutreffen und diese an spezifischen Positionen zu phosphorylieren und damit zu aktivieren. Diese sind: c-Jun, JunB, JunD, sowie die Transkriptionsfaktoren ATF-2, NFAT4, p53, STAT3, NFATc1 und Elk-1 (Roux & Blenis, 2004).

Wie bereits oben erwähnt wurde, findet die Aktivierung der SAPK/JNK durch Phosphorylierung statt. Wichtig ist hierzu, dass bei allen zehn SAPK/JNK-Isoformen das Aminosäuresequenzmotiv Thr-Pro-Tyr (T-P-Y) konserviert ist. Somit kann die Phosphorylierung am Threonin 183 und am Tyrosin 185 stattfinden. Verantwortlich für die Phosphorylierung sind zwei verschiedene MAPKKs, zum einen der MKK4/SEK1 (Sanchez et al. 1994) und zum anderen der MKK7 (Tournier et al., 1997; Wu et al., 1997). Die Katalyse beider Phosphorylierungen erfolgt dabei synergistisch, wobei die SEK1 Tyrosinreste und die MKK7 Threoninreste bevorzugt (Fleming et al., 2000; Lisnock et al., 2000). Die Phosphorylierung beider Reste ist jedoch nicht irreversibel. Eine im Kern befindliche MAP-Kinase Phosphatase (MKP-1) ist in der Lage die SAPK/JNK wieder zu dephosphorylieren. Aktiviert wird die MKP-1 ebenfalls nach DNA-Schädigung wie beispielsweise durch UV-C oder Methanmethylsulfonat (MMS). Die MKP-1 ist somit auch Aktivitätsregulator der anderen Kinasen (Liu et al. 1995).

Neben den bereits genannten Kinasen sind weitere Proteine bei der Aktivierung der SAPK/JNK beteiligt, insbesondere die kleinen GTP-bindenden Proteine der Ras- und Rho-Familie. Die Familie der Rho-Proteine ist dabei Ras homolog, entstammt also dem gleichen Ursprung. Coso und Kollegen konnte bereits eine Beteiligung der Rho-GTPasen Cdc42 und Rac an der Aktivierung der SAPK/JNK nachweisen (Coso et al., 1995; Minden et al. 1995). GTPasen wie Cdc42 und Rac binden dabei in ihrer GTP-gebundenen und somit aktivierten Form an die p21 aktive Serin/Threonin Kinase (PAK). Dadurch wird die Autophosphorylierung der PAK ausgelöst, die ein wichtiges Bindeglied zwischen den GTPasen und den MAP-Kinase-Kinasen SEK1 und MKK7 darstellt (Bagrodia et al 1995 a & b; Manser et al., 1995).

Behandlungen von Zellen mit alkylierenden Agenzien wie MMS (Methyl-Methan-Sulfonat) und MNNG (Methylnitrosoguanidin) führten zu einem Anstieg der SAPK/JNK Phosphorylierungen (Wilhelm et al., 1997). Diese Erkenntnisse stellen die Grundlage der Überlegung eines DNA-schadensabhängigen Weges zur Aktivierung von Stress-Kinasen dar. Andere DNA-schädigende Agenzien wie Doxorubicin, Mitomycin C sowie Cisplatin (cDDP) sind ebenfalls in der Lage, die Aktivität der SAPK/JNK zu induzieren (Sanchez-Perez et al., 2000; Persons et al., 1999; Kharbanda et al., 1995b). Auch der Einfluss von ionisierender Strahlung und UV-C-Licht als Aktivatoren der SAPK/JNK wurde bereits gezeigt (Shangary et al., 2003; Chen et al., 1996; Liu et al., 1995). Bezüglich UV-Licht als auch IR induzierter Aktivierung konnte eine Beteiligung der Rho-GTPasen bereits nachgewiesen werden (Gnad et al., 2000).

Mit Hilfe von Reparatur defekten, genauer Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) defekten Zellen, konnte eine Einflussnahme von DNA-Schäden auf die Aktivierung der SAPK/JNK gezeigt werden. Reparatur defekte Zellen zeigen aufgrund ihrer erhöhten Sensitivität eine höhere Phosphorylierung der SAPK/JNK als Wildtypzellen (Bulmer & Zacal 2005). Die MMS-induzierte Aktivierung der SAPK/JNK verläuft in Abhängigkeit der Schadenserkennungsproteine CSB und DNA-PKcs (Fritz & Kaina 2006). Die genauen Mechanismen einer Genotoxin induzierten Aktivierung sind bisher allerdings noch nicht genau bekannt, sind allerdings für das Verständnis einer Stress-Reaktion nach DNA-Schaden unerlässlich.

1.2 Rho-GTPasen und clostridiale Rho glucosylierende Toxine

1.2.1 Rho-GTPasen

Eine Vielzahl biologischer Prozesse findet unter Beteiligung von Rho-Proteinen statt. Diese gehören einer Überfamilie, der sogenannten Ras-Superfamilie der kleinen GTP-bindenden Proteine, an. Hauptaufgaben der Rho-Proteine ist aber die Organisation des Zytoskeletts, die Kontrolle des Zellzyklus, sowie die Beteiligung an Differenzierung und Apoptose (Fritz & Kaina 2000, Fritz et al. 1994). Rho A beispielsweise reguliert die Integrin-Komplexe, die Formation von Aktin-Stressfasern, sowie die Kontraktion der glatten Muskulatur (Hirata 1992; Morii, 1992). Eine Hemmung von Rho führt in 3T3 Zellen zu einem Block der Zellen in

der G1-Phase des Zellzyklus (Yamamoto, 1993). Rho B organisiert ebenfalls die Formation von Aktin-Stressfasern, wird aber im Vergleich zu Rho A nicht konstitutiv exprimiert. Rac, ein weiteres Rho-Protein reguliert die Aktinpolymerisation für die Bildung sogenannter Lamellipodien. Cdc42 fördert die Bildung von Filopodien (Kozma et al., 1995; Ridley et al. 1992). Alle hier genannten GTPasen regulieren die Verankerung der extrazellulären Matrix mit der Zellmatrix (Nobes & Hall, 1995). Die Aktivierung von Rho-GTPasen kann aber auch zu einer Stimulation von MAP-Kinasen führen (Coso et al., 1995; Minden et al. 1995).

1.2.2 Clostridiale glukolierende Toxine

Das Bakterium *Clostridium difficile* bildet Toxin B als einen sogenannten Virulenzfaktor aus. Die Bakterien verursachen eine Antibiotika-assoziierte Diarrhöe und pseudomembranöse Colitis. Eine Therapie mittels Breitspektrum-Antibiotika führt zu einer Überwachsung der Darmflora durch *Clostridium difficile*. Es beginnt eine Sekretion der Bakterien von pathogenen Faktoren wie Toxin A und B. Diese einkettigen Proteine gehören zu einer Gruppe der sogenannten „Clostridialen glucosylierenden Toxine“, da sie eine inhärente Glucosyltransferase Aktivität haben (Aktories & Just 2005). Die Glukosylierung erfolgt dabei durch Übertragung eines Glukoserestes von dem Ko-Substrat UDP-Glucose auf das Proteinsubstrat. Substrate stellen dabei RhoA, B, C, Rac1-3, RhoG und Cdc42 dar. Das Toxin modifiziert dabei die Rho-Proteine an einem hoch konservierten Aminosäurerest. Diese ist für Rho A, B Threonin37, für Rac und Cdc42 Threonin 35 (Just et al., 1995 a, b). Der Aminosäurerest befindet sich in der sogenannten Effektorregion der GTPasen, was dazu führt, dass die Glukosylierung die GTPase-Effektor Interaktion blockiert. Als Folge tritt phänotypisch eine Abrundung der Zellen auf, da die Rho-GTPasen wichtige Regulatoren des Aktin-Zytoskelett sind.

1.2.3 Latrunculin B

Latrunculin A und B sind zellpermeable Makrolide. Diese marinen Toxine stammen aus dem roten Seeschwamm *Negombata magnifica* besser bekannt als *Latrunculia magnifica*. Latrunculin führt zur Zerstörung der Polymerisation der Mikrofilamente durch die Bindung an monomeres G-Actin, beeinflusst dabei

allerdings nicht die Mikrotubuli Struktur. Die genaue Bindungsstruktur von Latrunculin ist bisher aber nicht ganz geklärt (Yarmola et al., 2000).

1.3 DNA-Reparatur

1.3.1 Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER)

Der Hauptmechanismus zur Abwehr gegen DNA-schädigende Läsionen in Zellen, wie sie durch UV-C-Strahlung oder Cisplatin ausgelöst werden, ist die Nukleotid-Exzisionsreparatur, kurz NER (Friedberg et al. 1995). 20 – 30 Proteine sind an diesem Reparaturweg beteiligt. Unterschieden werden dabei 2 Wege:

- 1) DNA-Schäden, die im transkriptionell aktiven Teil der DNA liegen, werden mittels transkriptionsgekoppelter Nukleotidexzisionsreparatur (TC-NER – transcription coupled nucleotide excision repair) entfernt.
- 2) DNA-Läsionen aus transkriptionell inaktiven Bereichen werden durch globale Genom Nukleotidexzisionsreparatur (GG-NER – global genome nucleotide excision repair) entfernt.

Für beide Wege gibt es sechs Kernfaktoren, nämlich XPA, RPA, XPC-hHR23B, TFIIH Komplex und zwei Endonukleasen XPG und ERCC1-XPF Heterodimer (Aboussekhra & Wood, 1995; Guzder et al., 1995). Die DNA-Schadenserkennung erfolgt bei der GGR durch den XPC-HR23B- und RPA-XPA-Komplex. Es ist allerdings noch unklar, welcher dieser Komplexe als erster aktiviert wird (Evans et al., 1997; Naegeli, 1995; Sugasawa et al., 1998; Wood, 1999). Es gibt Daten, wonach XPC-hHR23B die Verzerrung erkennen, das wird danach von RPA-XPA verifiziert. Weiterhin ist das „damaged DNA binding protein“ (DDB), ein Heterodimer aus zwei Polypeptiden (DDB1 und DDB2), bei der UV-Schadenserkennung von großer Bedeutung. Diese Polypeptide gehören zu der XPE-Komplementationsgruppe (Tang & Chu, 2002). Nach Erkennung der Läsion erfolgt die Rekrutierung des Transkriptionsfaktors TFIIH zu dem DNA-Schaden. TFIIH besteht aus zehn Untereinheiten (XPB, XPD, GTF2H1, GTF2H2, GTF2H3, GTF2H4, CDK-7, CCNH und MNAT1) und besitzt eine DNA-Helikase Aktivität, die durch die Untereinheiten XPB und XPD ausgeführt wird. Die DNA wird um die Läsion herum entwunden (Schaeffer et al., 1994; Schaeffer et al., 1993) und die Läsion durch einen dualen Einschnitt an definierten Positionen der DNA entfernt (Evans et al., 1997). Der 3'-Einschnitt wird durch XPG und der 5'-Einschnitt durch

den XPFERCC1 Komplex durchgeführt (Sijbers et al., 1996). Anschließend wird ein Oligo mit einer definierten Länge entfernt. Die entstandene Lücke wird durch die Polymerase- δ , sowie ϵ gefüllt und durch DNA Ligase-I versiegelt (Aboussekhra et al., 1995; Araujo et al., 2000; Mu et al., 1995). Da DNA-Schäden oftmals zu einem Block der Transkription führen, stellt die TCR ein wichtiges System für die Entfernung von DNA-Schäden dar. Sie erkennt und entfernt DNASchäden, wie z.B. UV-C Schäden auf dem transkribierten Strang, wofür die GGR zu langsam ist. Defekte in der TCR sind Ursache für das Cockayne Syndrom (CS), wobei diese Erbkrankheit auf Störungen in den CS-Genen, CSA und CSB zurückzuführen ist. Die genaue Rolle der CS-Proteine ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Es wird spekuliert, dass der durch die TCR hervorgerufene Block der RNA-Polymerase-II das CSA und CSB Protein aktiviert und zur DNA-Läsion rekrutiert. In einem noch unklaren Mechanismus entfernen CSA und CSB die gestoppte RNA-Polymerase-II, so dass Reparaturproteine den DNA-Schaden besser erreichen und prozessieren können. Wie genau CSA und CSB mit der RNA Polymerase-II interagiert, ist noch nicht bekannt. Es wird angenommen, dass CSB seine DNA-Translokase Aktivität nutzt, um den RNA-Polymerase-II Komplex von der Läsion zu entfernen (Svejstrup, 2003). Die Exonukleasen XPF-ERCC1 und XPG schneiden daraufhin den läsionstragenden DNA-Strang aus. Die Resynthese erfolgt wie bei der GGR durch die Polymerase- δ , sowie- ϵ und die DNA-Ligase-I ligiert die DNA Enden. Eine Übersicht der an der NER beteiligten Mechanismen und Faktoren ist in Abbildung 2 dargestellt.

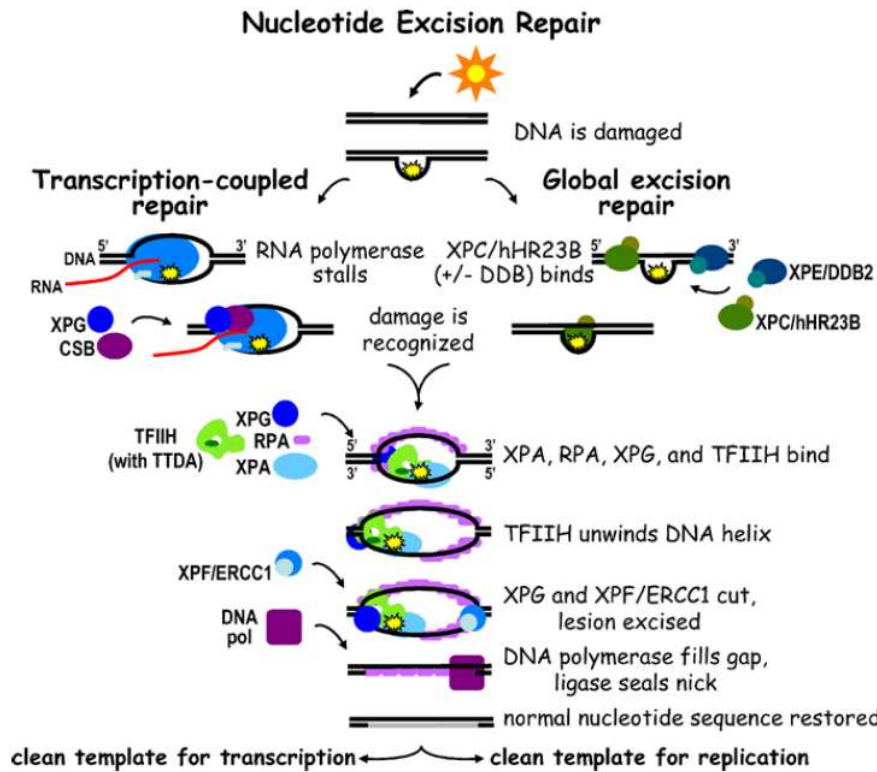


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Nukleotid Excisionsreparatur.
(Quelle: Fuss et al., 2006)

1.3.1.1 Xeroderma Pigmentosum (XP)

Defekte in der Nukleotid-Exzisionsreparatur führen beim Menschen zu rezessiven Erbkrankheiten wie Xeroderma Pigmentosum (XP) (Cleaver & Hultner 1995). Xeroderma umfasst mehrere Komplementationsgruppen, XP-A bis XP-G. Der Krankheitsverlauf unterscheidet sich innerhalb der Komplementationsgruppen deutlich. Hauptmerkmal der XP ist die sehr stark ausgeprägte Lichtempfindlichkeit (Photosensitivität) und dadurch auch ein 2000-fach erhöhtes Risiko an Hauttumoren zu erkranken. 20 % der Erkrankten können ebenfalls neurologischen Störungen unterliegen, die im schlimmsten Fall zur neurologischen Degeneration führen (Kraemer et al. 1994). Neurologische Defekte konnten allerdings bei partiellen Defekten in XP-F und XP-C nicht nachgewiesen werden. Die Mutation im XP-F Gen führt zur Abschwächung der Photosensitivität der Patienten. Der Verlust an XP-D und XP-B ist mit dem Leben nicht vereinbar. Dies liegt daran, dass XP-D und XP-B dem TFIIH-Komplex angehören, welcher für die basale Transkription notwendig ist. XP-C wird allerdings nur in der GG nicht aber in der TCR benötigt. Menschen mit einem Defekt in XP-C zeigen daher keine Unterschiede in Bezug auf Lichtempfindlichkeit im Vergleich mit Gesunden. Bei diesen Patienten wird die

transkriptionsblockierende Läsion durch die TCR entfernt. Die schwersten Krankheitsverläufe haben Patienten mit defekten in XP-A, XP-B und XP-G. Hier sind neurologische Probleme als auch früh manifestierte UV-Schäden das Hauptproblem. Durch die frühen UV-Schäden entwickeln sich daher unterschiedliche Tumore an allen lichtzugänglichen Bereichen (Kraemer et al., 1994).

1.3.1.2 Cockayne Syndrom (CS)

Als Cockayne Syndrom bezeichnet man eine seltene autosomal-rezessive Erbkrankheit. Patienten mit dieser Erkrankung leiden unter starker UV-Sensitivität, haben aber, im Gegensatz zu Xeroderma pigmentosum (XP) Patienten kein erhöhtes Risiko an Hautkrebs zu erkranken (Rapin et al., 2000; Colella et al., 1999). Defekte, die in der TCR zu einer anhaltenden Blockade der Reparatur führen, sind eine Erklärung dieser Tatsache. Diese Blockade reicht möglicherweise auch aus, um Signale des programmierten Zelltods (Apoptose) auszulösen. Durch diesen Vorgang werden potentielle Onkogene entfernt (Ljungman & Zhang, 1996). Weitere typische Symptome dieser Krankheit sind neurologische und psychomotorische Beeinträchtigungen, geistige Retardation, als auch Verlust des Seh- und Hörvermögens (Dollfus et al. 2003). Patienten mit Xeroderma Pigmentosum leiden nicht unter den von CS beschriebenen Symptomen, so dass nicht alle Defekte ausschließlich mit der NER-Reparatur zu erklären sind.

1.3.2 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

DNA-Doppelstrangbrüche können chromosomale Aberrationen hervorrufen oder den Zelltod verursachen (Dikomey et al. 1998, Lips and Kaina 2001, Pfeiffer et al. 2000). In einer eukaryonten Zelle kann bereits ein einziger, nicht reparierter Doppelstrangbruch in einem entscheidenden Gen den Tod der Zelle durch Apoptose induzieren (Rich et al., 2000). Wenn die Schädigung nicht vor Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus behoben wird, kann dies zur fehlerhaften Bildung der Tochterchromatide führen und somit schwerwiegende Auswirkungen haben. Dies kann genetische Instabilität sein und endgültig bis zum Zelltod führen.

Für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen sind zwei Mechanismen bekannt, zum einen die Homologe Rekombination (HR) und zum anderen das Non Homologous End Joining (NHEJ). Das Non Homologe End Joining stellt bei eukaryonten Zellen

den entscheidenden Reparaturmechanismus in sich mitotisch teilenden Zellen dar, um mögliche Chromosomentranslokationen, -deletionen und Geneamplifikationen zu verhindern, wohingegen in Hefen die Homologe Rekombination dominiert (Christmann et al., 2003M; Cromie et al., 2001; Haber 2000).

Das NHEJ findet hauptsächlich in der G0/G1 Phase des Zellzyklus statt (Johnson und Jasin, 2000; Takata et al., 1998). Durch diesen Vorgang können DNA-Enden wieder miteinander verbunden werden, ohne dabei eine homologe Sequenz zu benötigen (Critchlow und Jackson, 1998). Das NHEJ spielt sowohl bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen als auch bei der V(D)J-Rekombination zur Generierung verschiedener Antikörper eine entscheidende Rolle (Smider und Chu, 1997). Der erste Schritt besteht in der Bindung eines heterodimeren Komplexes an die geschädigte DNA. Dieser Komplex besteht aus den Proteinen Ku70 (Reeves und Stoeber, 1989) und Ku80 (Jeggo et al., 1992) und verhindert einen Abbau der DNA durch Exonukleasen. An diesen DNA-Protein-Komplex erfolgt nun die Anlagerung der katalytischen Einheit der DNA-PK, die DNA-PKcs (Siple et al., 1995; Hartley et al., 1995). Die DNA-PKcs gehört zur Familie der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K). Viele dieser Kinasen haben entscheidende Funktionen in der Erkennung und Beseitigung von DNA-Schäden, wie beispielsweise auch die Kinasen Ataxia telangiectasia mutated (ATM) und die ATM and Rad3-related (ATR) Kinase (Durocher und Jackson, 2001). Letztlich wird dieser neue Komplex, bestehend aus Ku70, Ku80 und DNA-PKcs als DNA-PK bezeichnet (Gottlieb und Jackson, 1993; Smith und Jackson, 1999). Dabei handelt es sich um eine Serin/Threonin-Kinase, die durch die Bindung an die DNA Enden aktiviert wird. Hierfür ist die Lokalisation von DNA-PKcs direkt an die DNA essentiell. Um dies zu ermöglichen, disloziert Ku an die DNA und übt dort eine stabilisierende Funktion aus (Yoo und Dynan, 1999). Die Aktivierung der DNA-PKcs führt zu einer Annäherung der beiden DNA-Enden und zum anderen zur Phosphorylierung mehrerer Proteine, die für weitere Schritte von Bedeutung sind. Eines dieser Proteine ist Artemis, welches in die Vorbereitung der DNA-Enden für die folgende Verknüpfung involviert zu sein scheint, indem es als Endonuclease überschüssige DNA-Einzelstränge oder Hairpins entfernt. (Ma et al., 2002). Ebenso wird der Rad50-Mre11-Nbs1-Komplex aktiviert, der multimerisiert und durch seine Aktivitäten als Exonuklease, Endonuklease und Helicase die DNA-Enden prozessiert und die End-zu-End-Verbindung zusammen mit Ku stabilisiert (De Jager et al., 2001; McElhinny et al., 2000; Walker et al. 2001). Dies ist

Voraussetzung für die abschließende Verknüpfung der DNA-Enden durch den XRCC4-Ligase IV Komplex, welcher ebenfalls durch Phosphorylation aktiviert wird (Leber et al., 1998). XRCC4 spielt dabei in Säugetierzellen eine große Rolle. Die homologe Rekombination dominiert hauptsächlich in Hefen als auch in höheren eukaryonten Zellen. Die Homologe Rekombination nimmt bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen während der Meiose eine entscheidende Rolle ein. Für die Homologe Rekombination wird eine der geschädigten DNA homologe Sequenz benötigt, die als Schablone für die Reparatur dient (Christmann et al. 2003). Der erste Schritt dabei ist die nukleolytische Spaltung der DNA durch den Rad50-Mre11-Nbs1- (MRN) Komplex (Sonoda et al., 2001). Es entsteht ein 3'-Einzelstrang DNA-Fragment, an welches Rad52 bindet (Stasiak et al., 2001). Rad52 interagiert mit Rad51 (Kagawa et al., 2001; Shen et al., 1996). Die Interaktion von Rad52 und Rad51 führt zu einem DNA-Strangaustausch mit dem ungeschädigten, homologen DNA-Molekül. Bei dieser Interaktion spielt auch das RPA-Protein (Replication Protein A) eine wichtige Rolle (Golub et al., 1998). Es folgt anschließend die DNA-Synthese, Ligation. Nach der Formation der Holliday Junctions ist die Reparatur abgeschlossen (Holliday, 1964). Eine Übersicht der an der homologen Rekombination beteiligten Mechanismen und Faktoren ist in Abbildung 3 dargestellt.

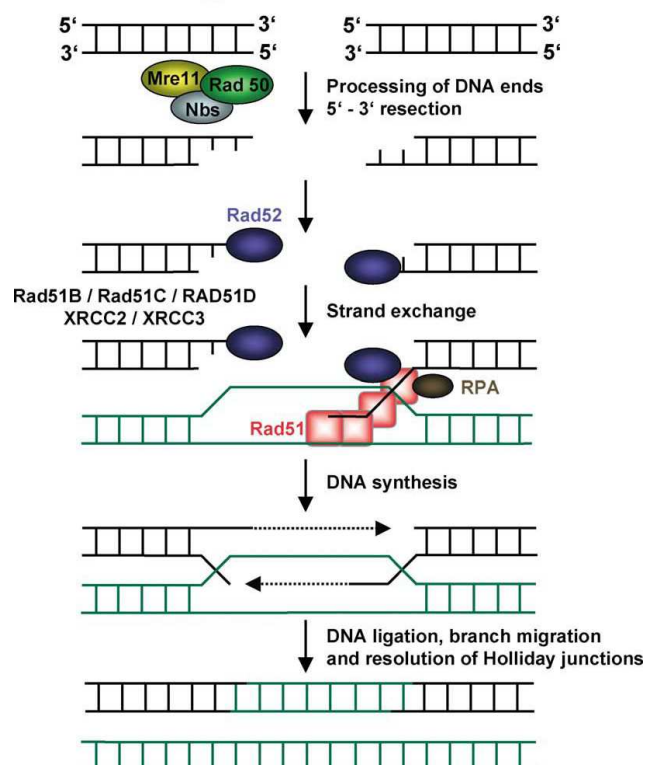


Abbildung 3: Schematische Darstellung der homologen Rekombination. (Quelle: Christmann et al., 2003)

1.3.3 DNA-Schadenserkennung

DNA-Schäden führen zu einer Vielzahl von Reparaturmechanismen, die spezifische Schäden der DNA erkennen und prozessieren. Die Reparatur allein reicht aber nicht aus, um die zahlreichen Prozesse zu koordinieren. Abbildung 4 zeigt ein komplexes Signalnetzwerk, das die einzelnen Prozesse miteinander verknüpft.

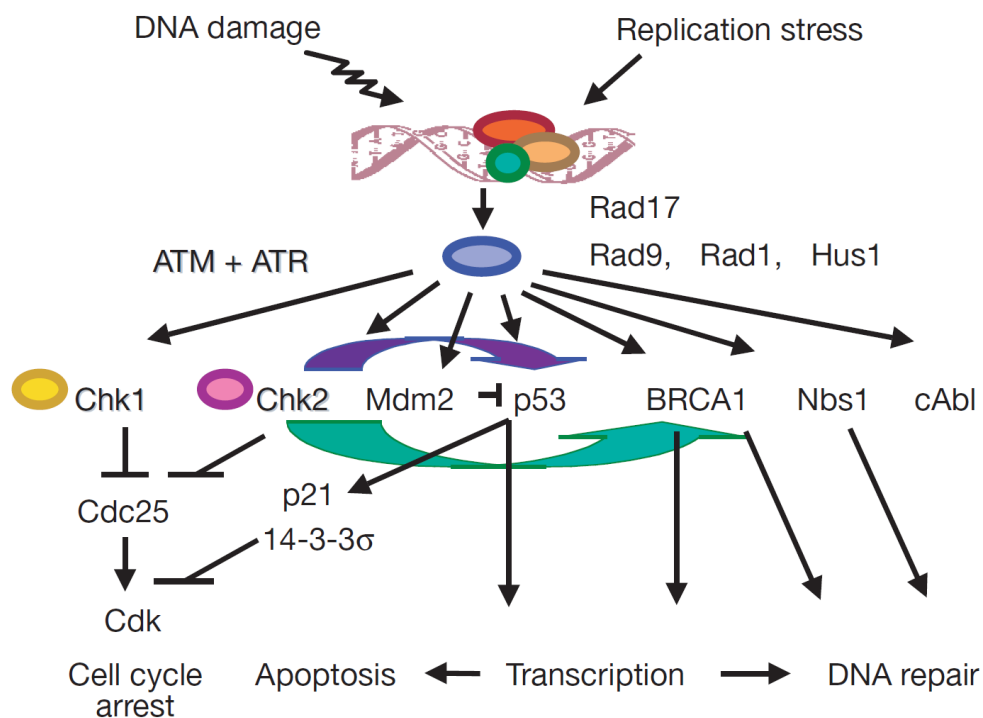


Abbildung 4: Schematische Übersicht des DNA-Schadenssignalling. (Quelle: Zhou et al., 2000)

Bei Cisplatin assoziierten Signaltransduktionswegen spielen v.a. ATM („Ataxia Telangiectasia Mutated“), ATR („ATM- and Rad3-related“), c-ABL („cellular Abelson“), p53 und Proteine der MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) Kaskade eine zentrale Rolle (Wang et al. 2005). Auch dem MRN-Komplex kommt bei der Erkennung von Doppelstrangbrüchen eine bedeutende Rolle zu. Der Komplex fungiert als Sensor für ATM, welches dann an geschädigte DNA binden kann. Nach der Bindung von ATM an DSB dissoziiert das inaktive ATM-Dimer in ein Monomer. Dieses Monomer kann nun an verschiedenen Aminosäureresten autophosphoryliert und dadurch aktiviert werden. (Bakkenist, 2003). Die Blockierung der DNA-Replikation kann auch zu Strangbrüchen, genauer

Einzelstrangbrüchen (ssDNA) führen. RPA erkennt diese ssDNA und rekrutiert ATR (Zhou et al., 2003). ATR phosphoryliert abschließend Rad17 und Rad911 (Yang et al., 2006). Durch die Aktivierung der ATM und ATR-Kinase kommt es zu einer Reihe weiterer Phosphorylierungen von Zielsubstraten. Diese können beispielsweise die Regulation der DNA-Reparatur, des Zellzyklus oder Apoptose beeinflussen (Shiloh 2006). Die Phosphorylierung der Checkpoint-Kinasen (Chk1/2) durch ATM/ATR vermittelte Wege ist dabei ein wichtiger Zellzykluskontrollmechanismus (Xiao et al., 2003). Aktivierte Cdks hemmen dabei die Phosphataseaktivität von cdc25. Diese Hemmung bewirkt einen Zellzyklusarrest in G1/S durch Einflussnahme auf die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs).

1.4 DNA-Crosslinking Agenzien

1.4.1 Cisplatin

Cisplatin (cDDP, *Cis*-diammindichlorplatin-II) ist ein in der Therapie von Tumoren weit verbreitet eingesetztes Zytostatikum. Es wird als Chemotherapeutikum sehr erfolgreich bei der Behandlung von verschiedenen Krebserkrankungen eingesetzt. Die Entdeckung der zytostatischen Wirkung von Platinkomplexen erfolgte in den 1960er Jahren, die Zulassung zur Behandlung maligner Tumore erfolgte 1978 (Rosenberg et al., 1965). Die ursprüngliche Verwendung von Cisplatin erfolgte bei Patienten mit Hodenkrebs, da hier eine frühzeitige Behandlung mit Cisplatin eine Heilungsrate von mehr als 90 % erzielte. Mittlerweile wird Cisplatin auch bei der Behandlung von Ovarial-, Harnblasen-, Bronchial- und Zervixkarzinomen eingesetzt (Loehrer et al. 1984).

Cisplatin stellt einen planaren Komplex dar, der am zentralen Platinatom zwei cis-ständige Chlor Liganden und zwei Ammin Liganden gebunden hat. Der Komplex wird nach Eindringen in eine Zelle durch Hydrolyse aktiviert (Bancroft et al. 1990). Die beiden *Cis*-Chlor Liganden werden dabei durch Wassermoleküle ausgetauscht. Die nun wassergelöste Form ist hochreaktiv und kann an DNA, RNA und Proteine binden (Bancroft et al. 1990).

Die Bindung des Cisplatin an die DNA ist der Hauptmechanismus von Cisplatin als Tumortheraeutikum. Die Produkte, die durch die Bindung von Cisplatin an die DNA entstehen, sind wie folgt:

- Monoaddukte, die bereits nach wenigen Minuten gebildet werden (t~10 min.)
- Bifunktionelle Addukte die nach ca. 2-3 h entstehen
- Protein-Cisplatin-DNA Crosslinks (Barnham et al., 1995; Bancroft et al., 1990)

Bifunktionelle Addukte bestehen aus 1,2-Intrastrand-Crosslinks (*cis*-GG) die ca. 47-50 % der Cisplatin Läsionen ausmachen. 23-28 % bilden die 1,3-Intrastrand-Crosslinks (*cis*-AG) und 8-10 % die 1,3-Intrastrand-Crosslinks (*cis*-GNG). Die restlichen 1-2 % bilden die sogenannten Interstrand-Crosslinks und Monoaddukte. In allen Addukten bindet das Cisplatin an das N7-Atom der Purinbasen (Guanin und Adenin) (Fichtinger-Schepman et al., 1985). Cisplatin-Crosslinks bewirken eine Strukturänderung der DNA. Daraus resultierend findet ein Block der DNA-Replikations- und Transkriptionsmechanismen statt. Der durch Cisplatin-induzierte Replikationsblock konnte bereits in verschiedenen Zellsystemen gezeigt werden. Dort inhibierten sogenannte GG-Addukte die DNA-Replikation am stärksten (Harder et al., 1976). Ebenso können als sekundäre Läsion Strangbrüche aufgrund des Replikationsblocks entstehen.

Die Hemmung der Transkription durch Cisplatin erfolgt durch die Blockade der Initiation und Elongation der RNA-Polymerase II (Cullinane et al., 1999). Resultierend führt dies zu einem G2-Block der Zellen. Ursache ist, dass für die Mitose notwendigen Gene nicht mehr transkribiert werden können. Reparatur defiziente Zellen zeigen eine anhaltende Blockade in G2, während bei reparaturprofizienten Zellen, die Cisplatin-induzierte Addukte entfernen können, der Arrest wieder aufgehoben werden kann (Sorenson, 1988).

Cisplatin führt allerdings auch zu einer Vielzahl anderer Aktivierungen. Darunter die Induktion von Stress-Signalwegen, wie den MAP-Kinasen, genauer der SAPK/JNK Signalweg (Persons et al., 1999). In Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass Cisplatin die Expression des Fas-Liganden erhöht, und das über das Fas-System die vom Cisplatin ausgelöste Apoptose vermittelt wird (Brozovic et al., 2007).

Die Reparatur von Cisplatin Addukten erfolgt hauptsächlich über den bereits beschriebenen NER-Reparaturweg (Nehme et al. 1999).

1.4.2 Transplatin

Das *Trans*-diamindichlorplatin-II (Transplatin, tDDP) ist ein Stereoisomer des oben beschriebenen Cisplatin. Aufgrund der geringeren Zytotoxizität von Transplatin bei

der Behandlung von Tumorerkrankungen wird dieses als Therapeutikum nicht eingesetzt. Der Mechanismus der Bindung von Transplatin an die DNA ist unterschiedlich zu Cisplatin und verläuft dabei in 2 Schritten.

- 1) Der Austausch der Chlorid-Ionen durch Wassermoleküle
- 2) Bildung von Monoaddukten und Umwandlung der Monoaddukte in Interstrand-Crosslinks.

Vergleichend zu Cisplatin findet hier keine Intrastrand-Crosslink Bildung aufgrund sterischer Behinderung statt. Transplatin vermag nur an einzelsträngiger DNA Intrastrand-Crosslinks zu generieren (Lepre et al. 1987).

1.4.3 UV-Licht

Viele der heute publizierten Untersuchungen von DNA-Photoläsionen erfolgen mittels UV-C (254 nm) oder UV-B (280-320 nm) Strahlung. Normalerweise erreichen Strahlen der Wellenlänge kleiner 290 nm erst gar nicht die Erdoberfläche. Sie werden bereits in der Stratosphäre absorbiert. Die Umwelt, somit auch Mensch und Tier sind daher eher den längeren UV-Wellen der UV-A (320-400 nm) und UV-B Strahlung ausgesetzt. Bei der natürlichen Verteilung machen die UV-B Strahlen mit 95%, gegenüber den UV-A Strahlen mit 5%, den Großteil der solaren Strahlung aus. Die Photoläsionen der UV-C Strahlung, wie Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD) und Pyrimidin(6-4)Pyrimidon Photoprodukte ((6-4)P-P), sind dabei mit denen des UV-B vergleichbar. Diese Läsionen sind für die prämutagene Wirkung der UV-Strahlung hauptverantwortlich (Mitchell et al., 1993). Die durch UV-Strahlung induzierten Schäden werden mittels Nukleotid-Exzisionsreparatur entfernt (Friedberg et al., 1995).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit stand die Frage nach einer verzögerten, durch Cisplatin-induzierte DNA Schäden hervorgerufene Aktivierung der SAPK/JNK im Mittelpunkt des Interesses. Es sollte untersucht werden, ob SAPK/JNK einen wichtigen Teil der späten, durch Cisplatin hervorgerufenen DNA-Schadensantwort spielen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in kommerziell höchst erhältlichem Reinheitsgrad verwendet.

Chemikalie	Hersteller / Vertrieb
3-Aminophthalazin (Luminol)	Sigma-Aldrich, München
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	GibcoLife Technologies, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin	Roth, Karlsruhe
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
Clostridium difficile Toxin B (ToxB)	Hannover, MHH
Coomassie Blue G-250	Sigma-Aldrich, München
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fluka, Neu-Ulm
H2DCFDA (2',7'-dichloro- hydrofluorescein diacetat)	Invitrogen, Karlsruhe
Lambda DNA/EcoRI/HindIII Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Latrunculin B	Sigma-Aldrich, München
LMP-Agarose	Appligene, Heidelberg
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Nonidet P40	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich, München
Prestained Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Propidiumjoidid	Serva, Heidelberg
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)	Roth, Karlsruhe
Tunicamycin	AppliChem, Gatersleben
Tween-20	Sigma-Aldrich, München
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München

Hier nicht erwähnte Chemikalien stammten von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Bio-Rad (München), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt) sowie Sigma-Aldrich (München).

2.1.2 Zytostatika

Zytostatika	Hersteller
Cisplatin (cis-diamindichloroplatin)	Apotheke, Universitätsmedizin Mainz
MMS (Methylmethansulfonat)	Sigma-Aldrich, München
Transplatin (trans-diamindichloroplatin)	Sigma-Aldrich, München

2.1.3 Käuflich erwerbliche KITS

Kit	Hersteller
DNeasy® Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden
ECL TM -/ECL-Plus TM -Western blotting detection reagent	Amersham, Freiburg
Effektene TM Transfection Reagent Kit	Qiagen, Hilden
Nucleospin RNA II	Machery-Nagel, Düren
WST-1 Cell Proliferation Reagent	Roche, Mannheim

2.1.4 Standardpuffer und Lösungen

- PBS:**

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
pH	7,4
- Ponceau S:**

Ponceau S	0,1 % (w/v)
Essigsäure	3 % (v/v)
- 10-fach SDS-Laufpuffer (Laemmli):**

Tris/HCl	250 mM
Glyzin	1,9 M
SDS	35 mM
pH	7,1
- 10-fach Blotting Puffer (Towbin):**

Tris/HCl	250 mM
Glyzin	1,9 M
pH	8,3

- 10-fach TBS:

Tris/HCl	500 mM
NaCl	1,5 M
pH	7,6

- 1-fach TBST:

TBS	1x
Tween-20	0,06 % (v/v)

- ECl-Lösung:

0,1 M Tris-HCl	200 ml
Luminol	50mg

- Hydroxycoumarinsäure-Lösung:

Para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO	6,8 mM
--------------------------------------	--------

- Upper-Tris Puffer:

Tris/HCl	0,5 M
pH	6,8

- Lower-Tris Puffer:

Tris/HCl	1,5 M
pH	8,8

- Coomassie Färbe-Lösung:

Coomassie Brilliant Blue R250	0,04 %
-------------------------------	--------

- Coomassie Entfärbe-Lösung:

Essigsäure	7,5 % (v/v)
Methanol	5 % (v/v)
Wasser	87,5 % (v/v)

- Neutraler Comet-Lysepuffer:

NaCl	2,5 M
EDTA	100 mM
Tris	10 mM
Na-Laurylsarcosinat	1 %
pH	7,5

Wichtig: Nach pH Einstellung nur auf 890 ml auffüllen. Lagerung bei RT. Vor Gebrauch zu 75 ml Lysepuffer 0,75 ml Triton X-100 und 7,5 ml DMSO zugeben und 1 h bei 4°C vorkühlen.

- Neutraler Comet-Elektrophoresepuffer:

Tris	90 mM
Borsäure	90 mM
EDTA	2 mM
pH	7,5

- Membranlysepuffer:

Tris	10 mM
NaCl	10 mM
MgCl ₂	3 mM
pH	7,4
Kurz vor Gebrauch zugeben:	
PMSF	50 mM
Proteaseinhibitor	1:50

- 10 x SSC:

NaCl	1,5 M
Natriumcitrat	150 mM
pH	7,0

- Blockierungspuffer 1:

Milchpulver	5 % in 1x TBST
-------------	----------------

- Blockierungspuffer 2:

Bovines Serum Albumin	5 % in 1x TBST
-----------------------	----------------

- Blockierungspuffer 3 Foci:

Bovines Serum Albumin	5 % in PBS
Triton-X-100	0,3 %

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Antikörper für Western-Immunoblotting und Fluoreszenzmikroskopie

Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Hersteller/Vertrieb
Anti-1,2-GG-Intrastrand-Crosslink	Ratte	1:200	Thomale et al., Essen
Anti-Aktin	Maus	1:200	Sigma-Aldrich, München
Anti-CHOP	Maus	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-CSB	Kaninchen	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-ERK2	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-IgG-Kaninchen-Antikörper (HRP konjugiert)	Esel	1:5000	Amersham, Braunschweig
Anti-IgG-Maus-Antikörper (HRP konjugiert)	Schaf	1:5000	Amersham, Braunschweig
Anti-IgG-Ratte-Antikörper (HRP konjugiert)	Kaninchen	1:3000	Santa Cruz, Heidelberg

Anti-MKP-1	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-PARP	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-p-ATR	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-p-Chk1 (Ser345)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-p-Chk2 (Thr68)	Kaninchen	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-p-H2AX (Ser139)	Maus	1:1000	Milipore, Schwalbach
Anti-p-P38 (Thr180/Tyr182)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-RPA-32	Maus	1:200	
Anti-p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-p-SEK-1/MKK4 (Thr261)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Beverly, MA

2.1.5.2 Zweit-Antikörper für die Fluoreszenzmikroskopie

Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Hersteller/Vertrieb
Alexa-Fluor 488 anti-Maus IgG	Ziege	1:500	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa-Fluor 488 anti-Kaninchen IgG	Ziege	1:500	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.6 siRNA

siRNA	Zielsequenz	Hersteller
CSB oligo 2	5'- ATG GAT GGT ACC ACT ACA ACA ATA -3'	Qiagen, Hilden
CSB oligo 4	5'- CGG ACT TAT AGC CCT AAG AAA -3'	Qiagen, Hilden

2.1.7 Plasmid

pEGFP-C1 Plasmid, der Firma Clontech

2.1.8 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

FCS	Biochrom, Berlin
PBS (Instamed 9,55 g/ml)	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
DMEM high Glucose	Gibco by Invitrogen, Karlsruhe

2.1.9 Zelllinien

Name	Beschreibung	Spezies	Herkunft
43-3B	ERCC1 defekte Hamster Zellen	Hamster	Dunkernet al., 2003
ATM ^{-/-}	Fibroblasten mit fehlendem ATM-Protein	Maus	P. Leder, Boston
ATR-Seckel	ATR-defekte Fibroblasten	Human	M. O'Driscoll
Balb/c	Mausfibroblasten, p53 wildtypisch	Maus	ATCC
CHO	Wildtypische Hamster Ovarienzellen	Hamster	Dunkern et al., 2003
CSB	SV-40 immortalisierte humane Fibroblasten von CS-B Patienten (CS1AN.S3.G2)	Human	T. Stevnsner et al., 2002
CSB ^{-/-}	CSB knockout Mausfibroblasten	Maus	G. van der Horst, Rotterdam
FANCD2	FANCD2 defekte humane Zellen	Human	D. Schindler, Würzburg
GM637	SV-40 immortalisierte humane Fibroblasten	Human	ATCC
HIFB-D	Primäre humane Fibroblasten	Human	Provitro, Berlin
NHDF	Natural human fibroblasts	Human	Cambrex, Verviers
p53 ^{-/-}	p53 defiziente Mauszellen	Maus	Lackinger D., 2000
SCID	DNA-PKcs defekte Zellen, p53 Wildtyp	Maus	Dikomey et al., 1998
XPAmT	XP12RO Zelllinie defizient in XPA Protein (Xeroderma pigmentosum protein A)	Human	Köberle et al., 2006
XPAwT	XP129-Zellen durch stabile Transfektion mit xpa-cDNA wieder hergestellt.	Human	Köberle et al., 2006
XPC	Primäre humane Fibroblasten, defizient in XPC-Protein (Xeroderma pigmentosum protein C)	Human	L.H. Mullenders, Leiden

2.1.10 Geräte und sonstige Hilfsmittel

Gerätename und Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Autoklav	Systec, Wetzlar
B250 Sonifier Ultraschallstab	Branson, Dietzenbach
Brutschrank B5060 EK/CO ₂	Heraeus, München
Elisa-Reader MagellanTM	Tecan, Salzburg
FACSCalibur Durchflusszytometer	Beckton&Dickinson Biosciences GmbH, Heidelberg
Feinwaage TE313S-DS	Sartorius, Göttingen
Magnetrührer mit Heizung MR-Standard	Heidolph, Schwabach

Mikroskop BX50, Fluoreszenzmikroskop (Komet)	Olympus, Hamburg
Mikroskop Axiovert35 Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss AG, Göttingen
Mini-Protean 3 System (SDS-Page)	Bio-Rad, München
Pipetten 2 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson, Limburg-Offheim
Reinstwasseranlage Purelab Plus	ELGA LabWater GmbH, Siersheim
Schüttler Rotamax120	Heidolph, Schwabach
Taumelrollenmischer	Roth, Karlsruhe
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot Cell Blottingkammer	Bio-Rad, München
Überkopfschüttler REAX2	Heidolph, Schwabach
Zählkammer, Neubauer	Roth, Karlsruhe
Zellkulturmaterial	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zentrifuge, Labofuge400R (Zellkultur)	Heraeus, München
Zentrifuge, Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg

2.1.11 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
96-well Microtiter-Platten	Greiner, Frickenhausen
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
PP-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflasche klein	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflasche groß	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturschale (Ø 9 cm, Ø 5 cm, Ø 2,5 cm)	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg

2.1.12 Software

Cell Quest Pro FACS Analyse Software
 Cell A, Fluoreszenzmikroskopiesoftware
 Kinetic Imaging Komet 4.0.2
 WinMDI 6.9

Beckton & Dickinson, Heidelberg
 Olympus, Hamburg
 Kinetic Imaging Ltd., Liverpool
 Free Internet Software

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Zelllinien wurden bei 37 °C in CO₂-Inkubatoren unter wasserdampfgesättigten Bedingungen bei 7 % CO₂ in ihrem entsprechenden Medium kultiviert. Die Zellen wurden je nach Wachstums- bzw. Teilungsrate alle 3-4 Tage passagiert. Zum Umsetzen wurden sie dabei mit PBS gewaschen und anschließend je nach Flaschen- oder Schalengröße mit 1 oder 2 ml Trypsin/EDTA für 5 min. inkubiert. Die Überführung in sterile Gefäße erfolgte dann dabei in einem Verhältnis von Zellen zu Medium von 1:5 oder 1:10.

Die primären Zellen wurden bei gleichen Bedingungen wie die Zelllinien gehalten. Die Umsetzung erfolgte jedoch erst bei nahezu konfluenten Bedingungen. Somit wurde eine maximale Anzahl Zellen beim Aussäen gewährleistet, als auch die Passagen Zahl gering gehalten.

2.2.2 Behandlung von Zellen

Die Versuchsansätze bzw. die Behandlung der Zellen mit Cisplatin, Transplatin oder MMS erfolgte in Form einer Dauerbehandlung. Wenn dies nicht der Fall war, ist dies sonderlich bezeichnet. Die Behandlung erfolgte durch Zugabe der entsprechenden Substanz zum Zellkulturmedium.

Die UV-C, wie auch die IR (ionisierende) Bestrahlung erfolgte nach Entnahme des Mediums und spülen mit 37 °C warmen PBS. Dies geschah ebenfalls in den entsprechenden Kulturschalen. Nach der Bestrahlung wurde den Zellen wieder warmes Medium zugesetzt.

2.2.3 Langzeitlagerung von Zellen

Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert. Zum Einfrieren wurde die Suspensionskultur mit ungefähr 10⁷ Zellen für 10 min. bei 1500 U/min. und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und das Zellpellet in 8 ml Medium aus DMEM bzw. RPMI mit 20 % FKS, das auf Eis gekühlt war, resuspendiert. Davon wurden 8 Kryo-Ampullen auf Eis jeweils mit 0,9 ml befüllt. Zuletzt wurden dazu 0,9 ml einer eisgekühlten Lösung aus DMEM bzw. RPMI mit 20 % FKS und 20 % DMSO gegeben. Die so befüllten Ampullen wurden gut verschlossen und zuerst für 1 h auf

Eis gegeben, dann in einer Isolierbox auf -20 °C abgekühlt. Danach wurden sie in flüssigem Stickstoff eingelagert.

2.2.4 Zytotoxizitätstest

Die Analyse der metabolischen Aktivität der Zellen erfolgte mittels WST-1 Assay der Firma Promega. Dabei wurde die Vitalität der Zellen mittels eines hinzugefügten Substrats bestimmt. Das Substrat, ein Tetrazoliumsalz (WST-1), wurde dabei von zellulären Enzymen, je nach metabolischer Aktivität der Zellen zu Formazan umgesetzt. Dabei verändert sich die Farbe von gelb zu dunkelrot, was anhand eines Photometers bestimmt werden konnte. Zur Durchführung wurde zu bestimmten Zeiten nach Behandlung der Zellen das WST Reagenz zugegeben und nach 15-120 minütiger Inkubationszeit bei 37 °C die Bildung von Formazan durch Messung der Absorption bei 420 nm bestimmt. Zur Berechnung der Vitalität wurden die unbehandelten Kontrollen gleich 100 % gesetzt und die behandelten Proben in Relation gesetzt.

2.2.5 FACS Analysen

2.2.5.1 Messung der reaktiven Sauerstoffspezies

Die Zellen wurden in 6-well Platten ausgesät und entsprechend behandelt. Die Zugabe des Fluorophors 2',7'-dichlorofluorescein (DCFDA) erfolgte in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst für 1 h in Medium ohne Phenolrot. Die Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beruhte auf der Grundlage einer chemischen Reaktion durch Oxidation. Dabei wird die reduzierte und acetylierte Form des DCFDA unter Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies oxidiert und deacetyliert. Die oxidierte und deacetylierte Form ist nun im FACS oder Fluorimeter bei einer Wellenlänge von 492-495 nm detektierbar.

Behandelte und unbehandelte Zellen als auch Positiv- und Negativkontrollen wurden mittels Trypsin/EDTA abgelöst und mit den bereits nicht mehr adhären Zellen des Zellkulturüberstandes vereinigt und abzentrifugiert (1000 U/min; 10 min., 4 °C). Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen wurden, um damit letzte Mediumreste zu entfernen, die zum Störfaktor in der Analyse werden könnten, erfolgte die Fixierung der Zellen in 75 %-igem eiskaltem (-20 °C) Ethanol. Wichtig war dabei die Zellen zuvor in 100 µl PBS zu resuspendieren um ein Verklumpen der Zellen zu verhindern.

Dazu erfolgte die Zugabe des Ethanol erfolgte unter ständigem schütteln der Suspension auf dem Vortexer. Die Zellen wurden anschließend mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert und die erhaltenen Daten unter Verwendung der Software WinMDI 6.9 analysiert.

2.2.5.2 Zellzyklusmessung – Analyser der SubG1 Fraktion

Die Grundlage dieser Messmethode beruht auf der Tatsache, dass der DNA-Gehalt apoptotischer Zellen geringer ist als der DNA-Gehalt von Zellen die sich in der G1-Phase befinden (Fraker et al., 1995; Nicoletti et al., 1991). Dieser Sachverhalt wurde in der Analyse genutzt. Zellen die sich in der Teilung befinden ändern in den verschiedenen Zellzyklusphasen ihren DNA-Gehalt, welcher dann bestimmt werden kann. Behandelte und unbehandelte Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA abgelöst und mit den bereits nicht mehr adhären Zellen des Zellkulturüberstandes vereinigt und abzentrifugiert (1000 U/min; 10 min., 4 °C). Nach dem Waschen der Zellen, um letzte Mediumreste zu entfernen, die sich störend auswirken könnten, erfolgte die Fixierung der Zellen in 75 %-igem Ethanol bei 20 °C für 30 min. Nach einer erneuten Zentrifugation (1500 U/min.; 5 min., 4 °C) wurde das Zellpellet getrocknet und in einem Gemisch aus RNase A (0,1mg/ml in PBS) und 0,5 ml Propidiumjodid (PI; 20 µg/ml in PBS) aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 15 min. bei Raumtemperatur wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert und die erhaltenen Daten mittels der Software WinMDI 6.9 analysiert.

2.2.6 siRNA Techniken

Die Transfektion der Zellen mit siRNA Oligonukleotiden zur „Downregulation“ ausgewählter Proteine erfolgte immer nach Herstellerangaben (Qiagen, Effectene Transfection Reagent Handbuch). Die lyophilisierte siRNA wurde mittels siRNA-Lagerungspuffer gelöst (20 µM) und 1 min bei 90 °C aufgeköcht. Nach einer Inkubation von 60 min. bei 37 °C konnte nun die Lagerung der siRNA bei -20 °C erfolgen. Für die Durchführung der Transfektion wurden Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen ausgesät. Die Transfektion erfolgte unter RNase-freien Bedingungen mittels Effectene[®]. Die Inkubation der Zellen erfolgte danach unter Standardbedingungen.

2.2.7 Herstellung von platinierter DNA

Für die Herstellung platinierter Plasmid-DNA wurde eine modifizierte Methode von Hansson und Wood verwendet (Hansson et al. 1989). Das verwendete Plasmid war das pEGFP-C1-Plasmid der Firma Clontech. Die Cisplatin Inkubation (100 µM) erfolgte bei 37 °C über Nacht. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0.5 M NaCl-Lösung gestoppt. Es folgte eine Präzipitation der DNA durch Zugabe von 200 µl eiskaltem Ethanol (minus 70 °C) und 2,5M CH₃COONH₄-Lösung. Abschließend wurde die DNA in 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in Tris-EDTA Puffer gelöst. Die Transfektion erfolgte wie oben bereits beschreiben mittels Effectene[®].

2.2.8 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Die Herstellung von Gesamtzellextrakten erfolgte immer nach dem gleichen Schema. Dabei wurde der Zellrasen vom Medium befreit und zweimal mit PBS gespült. Die Lyse der Zellen erfolgte danach durch Zugabe von 100-300 µl (je nach Zelldichte) auf 95 °C erhitzten 2x-Roti-Load-Ladepuffer direkt in den Zellkulturschalen. Der Zellrasen wurde unter zur Hilfenahme eines Zellschabers von den Schalen abgelöst und direkt in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Zur Reduzierung der Viskosität erfolgte anschließend eine Ultraschallbehandlung (Duty cycle: 40 %, Output control 5) für 10 bis max. 20 Sekunden. Die fertigen Proteinextrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.9 Herstellung von Extrakten für die Membranisolierung

Für die Herstellung von Membranextrakten konnte die normale Proteinextraktion mittels Roti-Load nicht verwendet werden. Da für die Membranisolierung mehr Ausgangsmaterial benötigt wird, erfolgte die Aussaat der Zellen in 10 cm Schalen. Nach einer Wachstumszeit von mindestens 48 h erfolgte die Behandlung und danach sofort im Anschluss die Isolation der Membranen. Alle nachfolgenden Schritte sollen dabei auf Eis stattfinden. Die Lyse der Zellen erfolgte dabei in einem speziellen Membranlysepuffer (siehe 2.1.4). Nach der Bestimmung des Proteingehaltes mittels Bradford-Reagenz wurden gleiche Proteinmengen für die weitere Isolierung

eingesetzt. Diese erfolgte mittels Zentrifugation bei 10.000 x g für 10 min. bei 4 °C. Das erhaltene Pellet, welches hauptsächlich nun aus Membranbestandteilen besteht, wurde nun noch zur Reinigung 3-mal mit dem Lysepuffer gewaschen. Die gereinigten Membranproteine werden anschließend mit 2x-Roti-Load Ladepuffer versetzt. Diese können im Anschluss im SDS-Page aufgetrennt werden.

2.2.10 Neutraler Comet-Assay zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen in eukaryotischen Zellen

Zur Vorbereitung dieser Methode zählt neben dem Herstellen der benötigten Puffer ebenfalls die Präparation von beschichteten Objektträgern. Dazu wurde 1,5 %ige Agarose ins PBS aufgekocht und die Objektträger (frosted end) darin eingetaucht. Die Objektträger wurden auf der Unterseite abgewischt und zum Trocknen über Nacht aufrecht hingestellt. Die Zellen wurden entsprechend behandelt und wie oben bereits beschrieben mittels Trypsin/EDTA von den Schalen abgelöst. Die Zellen sollten nun auf eine Dichte von 2×10^6 /ml eingestellt und auf Eis gehalten werden. 10 µl dieser Zellsuspension wurden anschließend in 120 µl LMP-Agarose gegeben und auf einem der vorbereiteten Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas versehen im Kühlschrank 4-5 Minuten abgekühlt. Danach wurde das Deckglas seitlich abgezogen und die Objektträger im Lysepuffer für 1 h im Kühlschrank inkubiert. Nach der Lyse begann sofort die Elektrophorese. Diese erfolgte mit vorgekühltem Elektrophoresepuffer bei 4 °C und 25 Volt. Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger in doppelt destilliertem Wasser gewaschen (Tauchbad) und anschließend für 5 min in 100 %igem EtOH fixiert. Nach dem Trocknen können die Präparate bis zur weiteren Verwendung gelagert werden. Zur Auswertung der Präparate wird 25-30 µl Propidiumjodidlösung auf die Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas versehen. Die Auswertung erfolgt mit der bereits genannten Software (siehe 2.8).

2.2.11 Genomische DNA-Isolation aus Zellen

Die Isolation von genomischer DNA aus Zellen erfolgte mit dem DNeasy[®] Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend Herstellerangaben. Dabei wurden 4×10^6 Zellen als Ausgangsmenge für die Isolation eingesetzt und bei 300xg für 5 min zentrifugiert. Das dabei erhaltene Zellpellet wurde laut Vorschrift in 200 µl PBS und

20 µl Proteinase K resuspendiert. Danach erfolgte eine Zugabe von 4 µl RNase A (100 mg/ml) und eine Inkubation von 2 min bei RT. Nach der Lyse wurde das Zellgemisch mit der DNA nach Zugabe von 100%-igem Ethanol auf die QIAamp-Säulen gegeben und nach Bindung der DNA mit 180 µl Elutionspuffer eluiert.

2.2.12 Bestimmung des Reinheitsgrades und der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration wurde mittels Absorption bei 260 nm, 280 nm, und 320 nm bestimmt. Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) bei 260 nm (OD_{260}) von 1,0 ca. 50 µg doppelsträngiger DNA/ml. Für RNA entspräche eine OD_{260} von 1 ca. 40 µg/ml, bei Nukleinsäuren 20 µg/ml.

Das Verhältnis von OD_{260}/OD_{280} gibt Auskunft über die Reinheit der DNA-Lösung. Bei reiner DNA beträgt das Verhältnis 1,8 bis 2,0. Proteinverunreinigungen hingegen werden bei einer Wellenlänge von 320 nm detektiert.

2.2.13 South Western Analyse (Slot Blot)

Von entsprechend behandelten oder unbehandelten Zellen wurde die genomische DNA wie unter 2.2.11 beschrieben isoliert. 2 µg dieser DNA wurden mit TE-Puffer zu einem Endvolumen von 100 µl verdünnt. Die Denaturierung erfolgte bei 95 °C für 10 Minuten mit anschließendem Abkühlen in Eiswasser. Es folgte eine Zugabe von 100 µl eiskaltem 2 M Ammoniumacetat.

Zur Vorbereitung der Slot-Blot Apparatur wurde eine Hybond-N+-Membran mit 1 M Ammoniumacetat getränkt und in die Apparatur eingebracht. Die Proben wurden nun vollständig (200 µl) in die Slots pipettiert und mit Hilfe einer Vakuumpumpe und dem entsprechendem Unterdruck durch die Apparatur gezogen, wobei die DNA aufgrund der Porengröße der Membran an dieser hängen bleibt. Nach dem einmaligen Waschen der Membran mit 1 M Ammoniumacetat und anschließend H₂O erfolgte eine 5-minütige Inkubation in 5x SSC-Lösung. Danach wurde die Membran in einem Ofen zur Fixierung der DNA an die Membran für 2 h bei 80 °C „gebacken“. Nach der Fixierung erfolgte, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern ein Blockierungsschritt (Blockierungspuffer 1; 4 °C ü.N.). Nach 1 h Inkubation mit dem primären Antikörper bei RT und einer weiteren 2-stündigen Inkubation mit dem

korrespondierenden Zweitantikörper erfolgte die Detektion der AK-Bindung mittels ECL-Reaktion auf Autoradiogrammen.

2.2.14 Immunfluoreszenzfärbungen – γ H2AX-Foci

Zur Immunfluoreszenzfärbung musste eine vorbereitende Oberflächenbehandlung der Deckgläschen durchgeführt werden. Hierzu wurden diese für 15 min. in Diethylether inkubiert und anschließend mit 100 % und 70 %-Ethanol gewaschen. Danach erfolgte eine Ätzung der Oberfläche in 1 M HCl. Nach diesem Schritt wurden die Deckgläschen bis zur weiteren Verwendung in 70 %igem Ethanol gelagert.

Zur Verwendung der Deckgläschen wurden diese in der benötigten Anzahl in 6-well Platten oder 6 cm Schalen überführt und „zum trocknen“ aufrecht hingestellt. Nach dem trocknen konnten diese flach in die jeweilige Schale gelegt werden und Zellen darauf ausgesät werden. Diese wurden nach dem Adhären nach mindestens 24 h entsprechend behandelt und nach bestimmten Zeiten die Fixierung durchgeführt. Hierzu wurde das Medium entfernt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte eine Inkubation der Zellen in 4 % Formaldehyd in PBS für 15 min. Nach dreimaligem Waschen mittels PBS wurden die Zellen durch Inkubation mit eiskaltem Methanol (75 %) bei -20 °C fixiert. Die Zellen wurden anschließend 1 h in Blockierungspuffer 3 (siehe 2.3) geblockt und mit dem primären Antikörper (γ -H2AX 1:1000) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS und PBS/0,4 M NaCl gewaschen, um die Hintergrundsignale zu reduzieren. Vor der Zugabe des sekundären Antikörpers (Alexa Fluor 488, goat-anti-mouse 1:500) erfolgte ein dreimaliges waschen mit PBS/0,3 % Triton. Die Zweitantikörperinkubation dauerte 2 h. Nach weiteren drei Waschstritten mittels PBS, welche im Dunkeln erfolgte, wurden die Deckgläschen mittels Mounting Medium (10 μ l) auf einen Objektträger aufgebracht. Eine gesonderte Inkubation mittels DAPI erfolgte nicht, da das Mounting Medium (Vectashield, Axxora) bereits DAPI enthält. Die luftdichte Versiegelung der Objektträger erfolgte mittels Nagellack. Die anschließende Darstellung der Kerne und Foci erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop bei einer 1000-fachen Vergrößerung.

2.2.15 GST-PAK Pulldown-Assay

Der GST-PAK Pulldown Assay ist ein Rac-1 Aktivitätsassay, basierend auf dem Rap1 Aktivitätsprinzip von Franke et al. 1997. Dazu wurde ein Glutathion-S-Transferase (GST)-PAK-CD Fusionsprotein verwendet, die die Rac und Cdc-42 Binderegionen von humanen Pak1B beinhaltet. Das genaue Prozedere wurde, wie in Sander et al. beschrieben, durchgeführt (Sander, E.E., 1998).

2.2.16 Induktiv gekoppelte Massenspektrometrie (ICP-MS)

Die DNA wurde aus 2×10^6 entsprechend behandelten Zellen isoliert. Das vorhandene organischen Material musste für die Messung der Platinierung vollständig mittels HNO_3 hydrolisiert und oxidiert werden. Dafür wurden 40 μl der DNA mit 3 ml Reinstwasser (Millipore) und mit 160 μl rauchender Salpetersäure versetzt. Die Messung des Plattingehaltes erfolgte dann an einem HR-ICP-MS, Element 2 (Thermo Finigen, Bremen). Die Eichung erfolgte mittels Platinstandards 1 g/l (Fluka-Riedel-de Häen, Seelze). Die Berechnung der Platinaddukte erfolgte anschließend mittels folgender Formel:

$$\text{rB-Wert} = \frac{\frac{\text{Platinmassenkonz. (g/l)}}{\text{M (Pt) g/mol}}}{\frac{\text{DNA-Massenkonz. (g/l)}}{\text{Ø M (Bp) g/mol}}}$$

Zur Erklärung: Die Platinkonzentration berechnet sich aus dem Quotienten der Massenkonzentration und der Molmasse von Platin (195,08 g/mol). Die Konzentration der Basenpaare ergibt sich aus dem Quotienten der DNA-Massenkonzentration und der durchschnittlichen Molmasse eines Basenpaares (650 g/mol). Das Verhältnis der Konzentration entspricht dem molaren Verhältnis und wird als der rB-Wert bezeichnet. Die Platinierungsmessung erfolgte dabei durch unseren kroatischen Kooperationspartner am Rudjer Boskovic Institut Frau Dr. Maja Osmak.

3. Ergebnisse

3.1 DNA-schadensabhängige Aktivierung von Stresskinasen

Humane Fibroblasten als Modell zur Analyse Cisplatin induzierter späten SAPK/JNK Phosphorylierung

Die in dieser Arbeit bearbeitete Thematik beschäftigt sich mit den durch Cisplatin hervorgerufenen späten DNA-Schadensmechanismen. Die Arbeit schließt dabei nahtlos an Vorarbeiten meiner Kollegin Julia Rose geb. Damrot an. Aus diesem Grund wurde zum Einstieg ein Ergebnis aus ihrer Vorarbeit übernommen und gezeigt, dieses ist jedoch zur Unterscheidung von den eigenen Befunden genau gekennzeichnet.

Die Ergebnisse von Julia Rose zeigen, dass in Mausfibroblasten (MEFs) eine Korrelation zwischen platinieren DNA-Addukten und der Phosphorylierung von Stresskinasen insbesondere SAPK/JNK-Kinasen besteht (Abb.1)

Zur Untersuchung wurden wildtypische Mausfibroblasten mit steigenden Konzentrationen von Cisplatin behandelt und anschließend Western-Blot Analysen mit spezifischem p-JNK Antikörpern durchgeführt. Das Maß der Induktion wurde durch Quantifizierung der Signalstärke ermittelt, wobei das stärkste p-JNK Signal gleich 1 gesetzt wurde. Parallel dazu wurden die Platin-Addukte der DNA mittels ICP-MS (inductively-coupled-plasma mass-spectrometry) bestimmt. Die Induktion der SAPK/JNK wurde dann gegen die DNA-Adduktmenge aufgetragen. Das dadurch ermittelte Bestimmtheitsmaß (0.97) machte deutlich, dass die DNA-Adduktmenge mit der Stärke der SAPK/JNK Phosphorylierung korrelierte und somit in linearem Zusammenhang steht. Die Abbildung 1 zeigt das Ergebnis, das damals von Julia Rose ermittelt wurde.

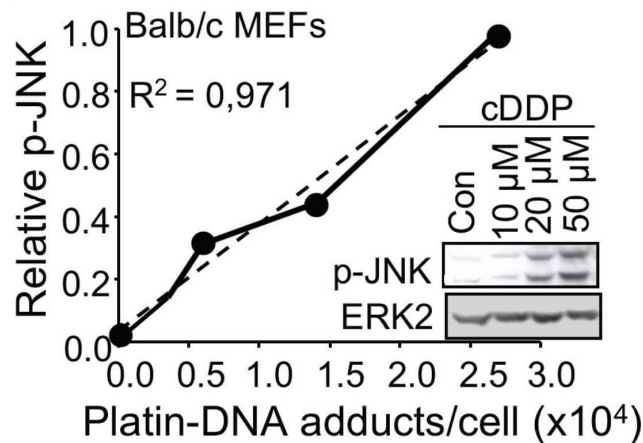


Abbildung 1: Korrelation zwischen der SAPK/JNK Induktion und der Bildung von Cisplatin DNA-Addukten nach 24 h.

Behandlung mit zunehmenden Konzentrationen an Cisplatin für 24 h in wildtypischen Mausfibroblasten (Balb/c). Anschließend wurden Western-Blot Analysen mit phosphospezifischen SAPK/JNK Antikörper (p-JNK) durchgeführt. Vergleichend dazu wurde mittels ICP-MS die Menge an DNA-Platin-Addukten bestimmt. Zur Berechnung wurde die p-JNK Induktion quantifiziert, in dem der stärkste Peak gleich 1 gesetzt wurde. Die restlichen Proben wurden in Relation dazu berechnet. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) wurde mit einem Tabellenkalkulationsprogramm ermittelt. (Quelle: Dissertation Julia Rose).

Untersuchungen von 1,2-GG Intrastrand Crosslinks mittels South Western Methode sollten dieses Ergebnis verifizieren. 1,2-GG Intrastrand Crosslinks werden durch Cisplatin hervorgerufen, in dem das Cisplatinmolekül bedingt durch seine besondere Struktur zwischen dem 1. und 2. Guanin der DNA eine Brücke (Crosslink) schlägt.

Die Untersuchung erfolgte in wildtypischen humanen Fibroblasten (GM637) nach einer kontinuierlichen Behandlung mit Cisplatin für 4 h bzw. 24 h. Die DNA wurde danach isoliert und anschließend mittels Southwestern Analyse analysiert. Parallel dazu erfolgte eine Western-Blot Analyse zur Ermittlung des SAPK/JNK Phosphorylierungsstatus. Im Gegensatz zum Southwestern-Blot wurde hier allerdings als früher Analysezeitpunkt ein 6 h Wert untersucht. Abbildung 2 zeigt die Gegenüberstellung beider Ergebnisse.

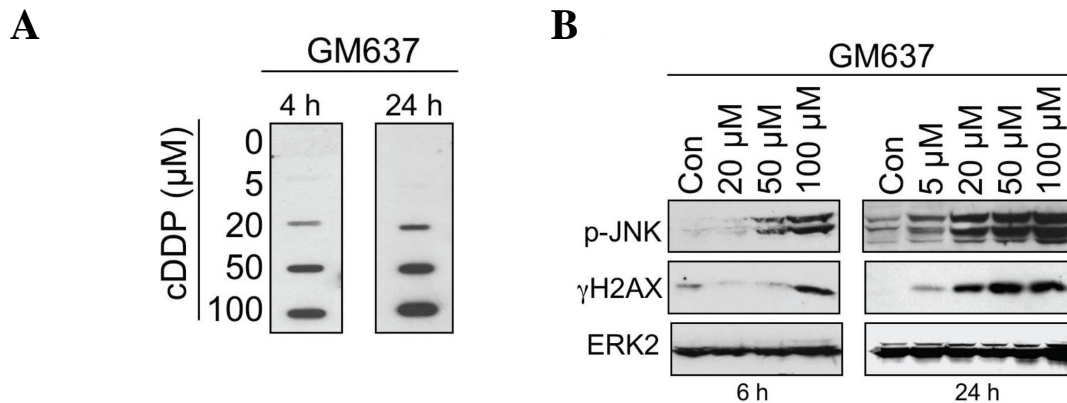


Abbildung 2: Verifizierung der Korrelation der Menge an Cisplatin DNA-Addukte mit der dualen Phosphorylierung der SAPK/JNK.

Kontinuierliche Behandlung von humanen GM637 Fibroblasten mit ansteigenden Cisplatinkonzentrationen. Sowohl bei frühen (4 h) als auch bei späten Zeiten (24 h) ist in der Southwestern-Analyse (A) bereits bei 20 µM eine deutliche Bildung von 1,2 GG Intrastrand Crosslinks zu beobachten. Zu frühen Zeiten (6 h) in der Western-Blot Analyse ist erst bei Konzentrationen von 50 µM eine duale Phosphorylierung zu sehen. Zusätzlich dazu, wurde die Ser139-Phosphorylierung von Histon H₂AX als genereller Surrogatmarker der DNA damage response (DDR) untersucht. Als Ladekontrolle diente ERK2. Con sind unbehandelte Kontrollen.

In Abbildung 2 ist ein Gleichgewicht der Cisplatin-DNA Addukte ab einer 20 µM Cisplatin Behandlung für 4 h und 24 h erkennbar, welches mit der Konzentration zunimmt. (Abb.2A). Das Maß an DNA-Addukten ist nach 24 h aber deutlich höher als nach 4 h. Im Vergleich der beiden Analysen (Abb. 2 A und B) ist zu erkennen, dass zu frühen Zeiten bei einer Konzentration von 20 µM keine Korrelation zwischen der Menge an Cisplatin-DNA Addukten und phosphorylierter SAPK/JNK besteht. Zu frühen Zeiten ist in Abb. 2A deutlich die Bildung von Cisplatin-DNA Addukten zu erkennen, jedoch findet in Abb. 2B keine Phosphorylierung der SAPK/JNK statt. Die Cisplatin-DNA Addukte scheinen keine Stress-Antwort im Sinne einer Aktivierung von Stresskinasen zu generieren. Zu späten Zeiten (24 h) nach Cisplatin Behandlung zeigte sich bei erhöhten DNA Addukten auch eine Zunahme der SAPK/JNK Phosphorylierung als auch eine erhöhte H2AX Phosphorylierung. Es scheint daher, dass DNA-Addukte zu späten Zeiten eine SAPK/JNK Aktivierung bewirken.

Die Frage, die sich nun stellte, war, welcher Weg bzw. Vermittler diese späte Aktivierung bedingt. Die Idee war nun, ROS (reaktive Sauerstoffspezies) als möglicher Kandidat zu untersuchen, der die Vermittlerrolle zwischen DNA-Schaden und JNK-Aktivierung übernehmen könnte. Dazu wurden sowohl Balb/c Mausfibroblasten, als auch humane GM637 Fibroblasten mit einer kontinuierlichen Cisplatinbehandlung für 16 h behandelt. Anschließend erfolgte die Präparation der

Zellen wie in Teil 2.2.5.1 beschrieben um die ROS-Messung mittels FACS-Analyse durchführen zu können. Abbildung 3 zeigt die Gegenüberstellung der Ergebnisse.

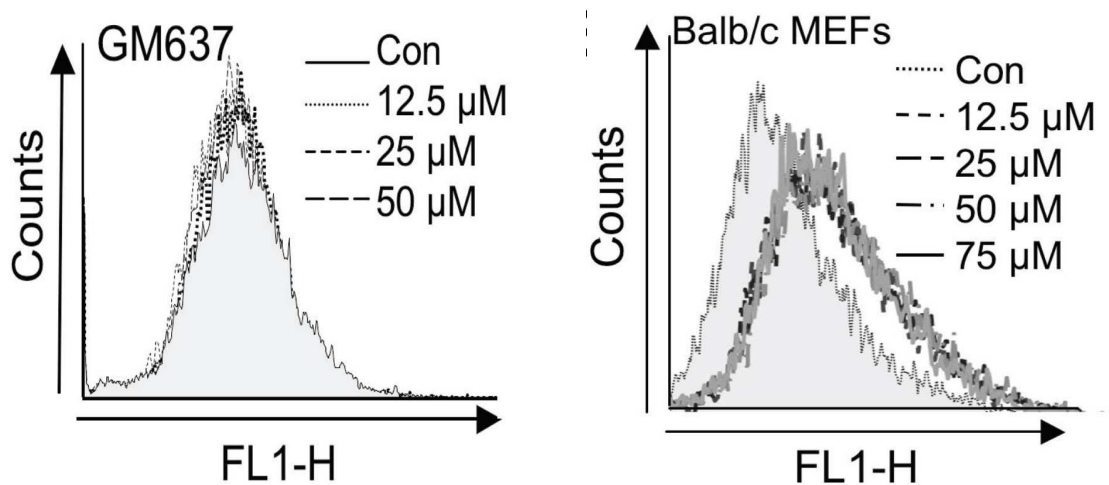


Abbildung 3: FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) von GM637 und Balb/c Fibroblasten, nach einer kontinuierlichen Cisplatin Behandlung für 16h. Keine ROS-Bildung in humanen GM637-Zellen. In Mausfibroblasten (Balb/c) wird durch Cisplatin eine ROS-Produktion initiiert, die allerdings dosisunabhängig zu sein scheint. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments.

Die Behandlung von humanen- (GM637) und Mausfibroblasten (Balb/c) mit Cisplatin führte in GM637 zu keiner ROS-Produktion (Abbildung 3, links). Die Zellen scheinen unsensibel auf Cisplatin induzierte ROS-Bildung zu sein. Balb/c-Zellen zeigten zwar eine Bildung von ROS, diese war allerdings dosisunabhängig.

Inwieweit DNA-Schäden ursächlich für die späte, durch Cisplatin induzierte SAPK/JNK Phosphorylierung ist, bleibt unklar. Die Idee war nun, DNA (Plasmid-DNA) mit Cisplatin zu platinieren und diese in wildtypische GM637 Fibroblasten zu transfizieren. Da unbehandelte wildtypische Zellen normalerweise keine SAPK/JNK Phosphorylierung zeigen, sollte mit dieser Versuchsanordnung der Zusammenhang zwischen platinierter DNA und SAPK/JNK Aktivierungszustand gezeigt werden. Die Methode erfolgte in abgewandelter Form nach Hansson und Wood (Hansen et al. 1989). 24 h nach der Transfektion erfolgte die Analyse des SAPK/JNK Phosphorylierungszustandes. Als Kontrolle diente unbehandeltes Plasmid.

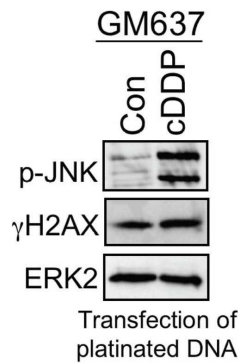


Abbildung 4: Humane Fibroblasten (GM637) 24 h nach Transfektion mit platinierter Plasmid-DNA. Platinierte Plasmid-DNA wurde in wildtypische GM637 Zellen transfiziert. Als Kontrolle diente nicht platinierte Plasmid-DNA (Con). γ H2AX zeigt wie erwartet unter diesen Bedingungen keine Veränderung. Als Ladekontrolle diente ERK2.

Abbildung 4 zeigt, dass platinierte-Plasmid DNA ist der Lage ist, die Aktivierung der SAPK/JNK zu stimulieren. Unplatinierte DNA führt, wie erwartet, zu keiner Veränderung. Ebenso ist γ H2AX nicht verändert. Nunmehr sollte geklärt werden, ob und wie Cisplatin induzierte DNA-Addukte für die späte SAPK/JNK Antwort verantwortlich sind. Auf Grundlage von Erfahrungen der Arbeitsgruppe wurden Zellen in die Untersuchungen mit einbezogen, die Defekte in der NER, der Nukleotid-Exzisionsreparatur, aufweisen. Transkriptionsblock, als auch die transkriptionsgekoppelte Nukleotidexzisionsreparatur (TC-NER) sind wesentliche Determinanten der Cisplatin Sensitivität. Daher wurden für die weiteren Versuche Zellen mit einem Defekt in der TC-NER, sogenannte CSB-Zellen verwendet. Die ersten Untersuchungen waren Zeitstudien, in denen gezeigt werden konnte, dass CSB-Zellen im Vergleich zu GM637 Zellen zu späten Zeiten (16 h und 24 h) deutlich ausgeprägter im Grad der Phosphorylierung von SAPK/JNK sind (Abb. 5A). Die Untersuchung zu späten Zeiten (24 h) erfolgte dann konzentrationsabhängig (Abb 5B). Es konnte weiterhin ein Anstieg der SEK1/MKK4 (p-SEK1) einer „Upstream-Kinase“ der SAPK/JNK zu späten Zeiten gezeigt werden (Abb.5 B).

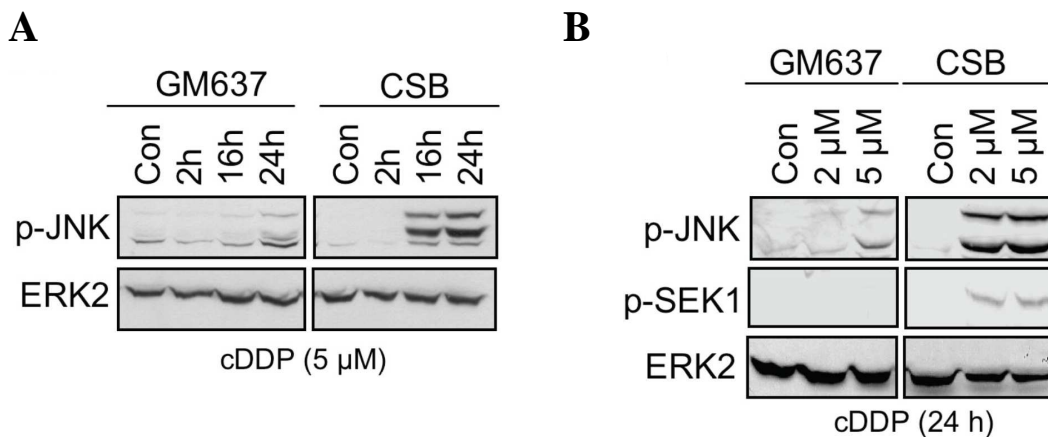


Abbildung 5: TC-NER defekte CSB-Zellen zeigen eine verstärkte SAPK/JNK Phosphorylierung zu späten Zeiten (16 h und 24 h) nach Cisplatin Behandlung.

(A) Wildtypische GM637 Zellen und SV40 immortalisierte humane CSB-Zellen, mit einem Defekt in der TC-NER wurden für 2-24 h mit Cisplatin behandelt und danach auf ihren Phosphorylierungsgrad hin untersucht. (B) Analyse der SAPK/JNK Phosphorylierung (p-JNK) zu späten Zeiten nach Behandlung mit niedrigen Cisplatin-Konzentrationen. Die „Upstream“-Kinase SEK1/MKK4 (p-SEK1) wurde ebenfalls untersucht. Con sind unbehandelte Kontrollzellen. ERK2 diente als interne Ladungskontrolle.

Wie oben bereits beschrieben, zeigen CSB-Zellen erwartungsgemäß die späte Aktivierung der SAPK/JNK nach Cisplatin Behandlung. Somit ist das „Zellpaar“ GM637 und CSB für weitere Untersuchungen geeignet. Um die Beteiligung von CSB-Protein über eine andere Methodik zu verifizieren, wurde das CSB-Protein in Primären Humanen Fibroblasten mittels si-RNA herunterreguliert. Des Weiteren wurden Mausfibroblasten (MEFs) mit einem Defekt im CSB-Protein auf die späte SAPK/JNK Aktivierung hin untersucht.

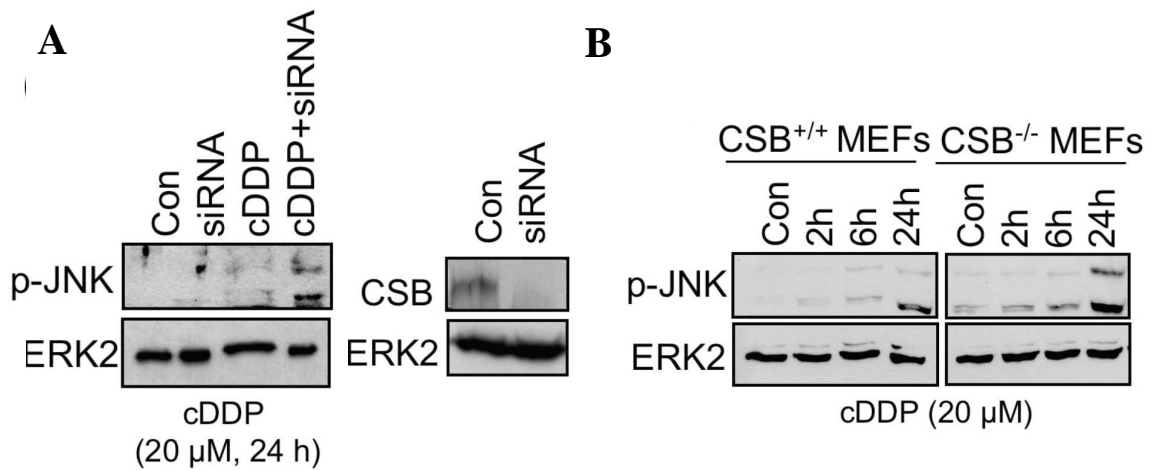


Abbildung 6: Primäre humane Fibroblasten zeigen nach si-RNA knockdown von CSB eine verstärkte SAPK/JNK Phosphorylierung zu späten Zeiten (24 h). CSB defiziente Mausfibroblasten (MEFs) zeigen phänotypisch ebenfalls eine verstärkte Aktivierung der SAPK/JNK nach Cisplatin Behandlung. (A) Primäre humane Fibroblasten wurden mittels siRNA für CSB-Protein behandelt. Der Knock-down wurde mittels Western-Blot Analyse und CSB-Antikörper überprüft. Die CSB-Knock-Down Zellen wurden mit einer kontinuierlichen Cisplatinbehandlung für 24 h inkubiert und der Phosphorylierungszustand der SAPK/JNK mittels Western-Blot Analyse überprüft. (B) Mausfibroblasten (MEFs), profizient bzw. defizient (CSB^{+/+} bzw. CSB^{-/-}) in CSB-Protein wurden auf Ihren Phosphorylierungszustand nach Cisplatin Behandlung (24 h) überprüft. Con sind unbehandelte Kontrollzellen. ERK2 diente als interne Ladungskontrolle.

In Abbildung 6A ist zu erkennen, dass wildtypische primäre Fibroblasten nach Knock-down des CSB-Proteins eine Aktivierung der SAPK/JNK nach Cisplatinbehandlung zeigen. Nicht mit siRNA behandelte Zellen zeigen diesen Effekt nicht (Abb. 6A, links). Die Überprüfung des knockdown erfolgte mittels eines spezifischen CSB-Antikörpers. Nach siRNA Behandlung war das CSB-Protein nicht mehr zu detektieren. Das schließt somit auf einen funktionieren Knock-Out.

Auch CSB defiziente Mausfibroblasten zeigten zu späten Zeiten (24 h) nach Cisplatin Behandlung eine im Vergleich zu wildtypischen MEFs deutlichere Phosphorylierung der SAPK/JNK (Abb. 6B).

In weiteren Experimenten sollte die Annahme bestätigt werden, dass der DNA-Schaden der initiale „Trigger“ für die SAPK/JNK Phosphorylierung ist. Zu diesem Zweck wurde die S139 Phosphorylierung des Histon H2AX näher untersucht. H2AX dient als Indikator für die Bildung von Doppelstrangbrüchen. Werden Doppelstrangbrüche erkannt, wird H2AX im Zuge der DNA damage response (DDR) phosphoryliert. Dies kann man mittels zweier unterschiedlicher Verfahren messen. Zum einen durch immunhistochemischen Nachweis von γ H2AX-Foci und zum

anderen durch Western-Blot Analyse mit einem Antikörper für phosphoryliertes H2AX (γ H2AX).

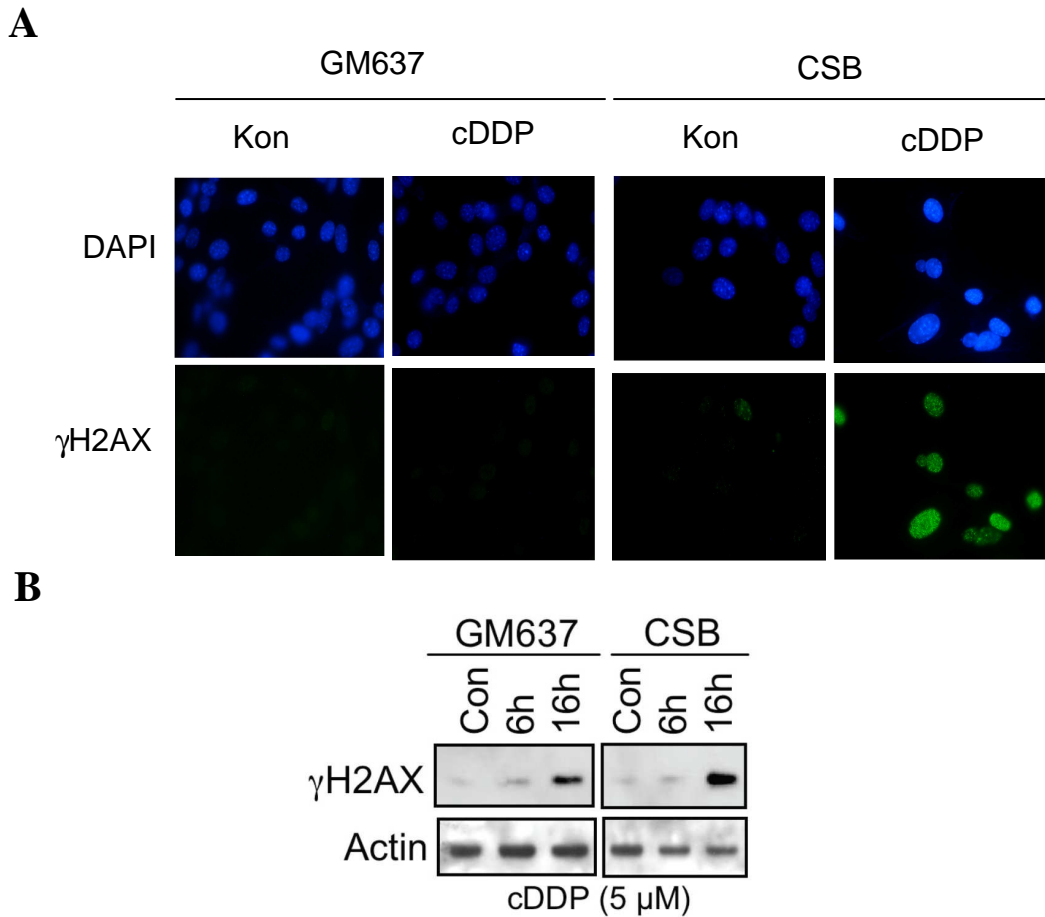


Abbildung 7: Untersuchung der Doppelstrangbruchformation durch Nachweis von γ H2AX-Protein mittels Immunhistochemie (A) und Western-Blot Analyse (B), zu späten Zeiten (16 h) nach kontinuierlicher Cisplatin Behandlung. (A) GM637 und CSB Zellen wurden mit 5 μ M Cisplatin behandelt und nach einer Inkubationszeit von 16 h γ H2AX Foci immunhistochemisch nachgewiesen. Die DAPI-Färbung erfolgte zum Nachweis der Zellkerne. Vergrößerung 100-fach. (B) Western-Blot Analyse paralleler Extrakte zu 16 h. Con sind unbehandelte Kontrollen. Actin dient als interne Ladekontrolle.

In Abbildung 7 ist deutlich zu erkennen, dass sowohl immunhistochemisch als auch auf Western-Blot Ebene CSB-Zellen eine verstärkte H2AX Phosphorylierung (γ H2AX) zeigen. In GM637 Zellen ist immunhistochemisch γ H2AX nicht nachweisbar, allerdings zeigt die Cisplatinbehandlung auf Western-Blot Ebene ein eindeutiges Signal, das jedoch deutlich schwächer ist als in CSB-defizienten Zellen.

Somit scheinen Doppelstrangbrüche einer der möglichen Trigger für eine SAPK/JNK Phosphorylierung darzustellen. Um diese Hypothese weiter abzusichern wurden,

neben dem Nachweis von DSB mittels Immunhistochemie und Western-Blot (γ H2AX), Doppelstrangbrüche zusätzlich mittels Neutralem Komet Assay erfasst.

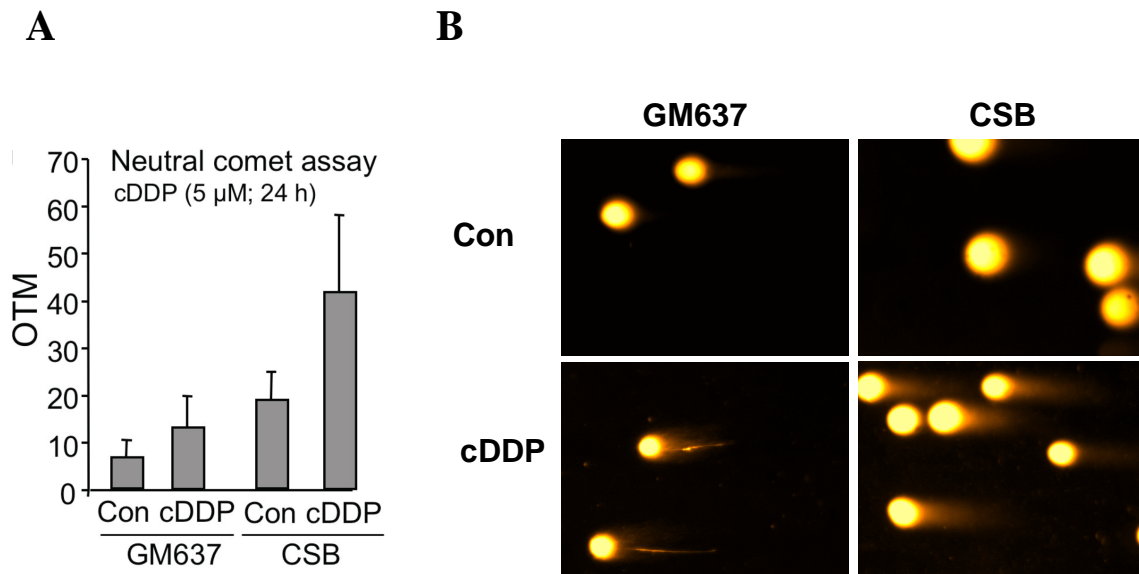


Abbildung 8: Komet-Assay Analyse von GM637 und CSB-Zellen nach 24 h Cisplatin Dauerbehandlung. (A) Quantitative graphische Darstellung des olive tail moments (OTM) der ausgewerteten Kometen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD aus n=50 Versuchen. Con sind unbehandelte Kontrollzellen. (B) zeigt exemplarisch jeweils ein Beispiel der detektierten Kometen. Vergrößerung 100-fach.

Die Ergebnisse der Kometenanalyse zeigen, dass bei beiden Zelllinien Cisplatin in der Lage ist DSB zu induzieren. In CSB-Zellen jedoch ist der Effekt deutlich verstärkt, wie aus Abbildung 8A in der graphischen Darstellung hervorgeht. Abbildung 8B zeigt nur exemplarisch ausgewertete Kometen, die zur Bestimmung herangezogen wurden. Deutlich zu erkennen ist in Cisplatin behandelten CSB-Zellen die Länge der gebildeten Kometenschweife.

Diese Daten lassen darauf schließen, dass sekundäre DNA-Läsionen, wie beispielsweise Doppelstrangbrüche (DSBs), für das Signalling zu SAPK/JNK eher relevant sind als primäre, durch Cisplatin hervorgerufene DNA-Addukte.

3.2 Replikation assoziierte Mechanismen tragen zur Aktivierung der SAPK/JNK in CSB-defekten Zellen bei

Nachdem festgestellt werden konnte, dass Doppelstrangbrüche als sekundäre Läsionen die wahrscheinlichste Erklärung für die späte SAPK/JNK Aktivierung ist, sollte nunmehr untersucht werden, wie der Weg von den DSBs zu der SAPK/JNK Aktivierung von statten geht. Um dies zu klären, wurden Replikations-assoziierte Mechanismen untersucht, die möglicherweise in die späte Aktivierung der SAPK/JNK nach Cisplatin Behandlung eingreifen. Zu diesem Zweck wurden primär die Checkpoint-Kontrollmechnismen untersucht.

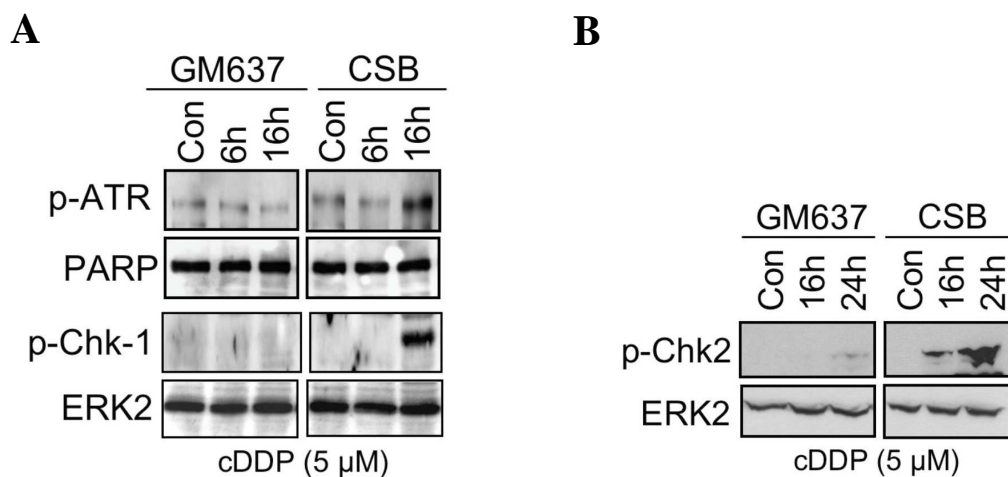


Abbildung 8: Cisplatin induzierte Checkpointaktivierung in CSB-defekten Zellen. (A) Western-Blot Analyse nach 6 h und 16 h kontinuierlicher Cisplatin Behandlung (5 µM) in Wildtyp (GM637) und CSB-Zellen. Der Phosphorylierungsstatus von ATR (p-ATR) und Chk-1 (p-Chk-1) wurde untersucht. (B) Analyse des Chk-2 Phosphorylierungsstatus 16 h & 24 h nach Cisplatinbehandlung in GM637 und CSB-Zellen. Con sind unbehandelte Kontrollzellen. ERK2 diente als interne Ladungskontrolle.

Bei der Untersuchung von Checkpoint-Kontrollmechanismen konnte gezeigt werden, dass in CSB-defizienten Zellen nach Cisplatin Behandlung eine deutlich Aktivierung der Checkpointkinasen auftritt (Abb. 8A und 8B; p-CHK-1 und p-CHK-2). ATR, eine Serin/Threonin spezifische Proteinkinase, die nach replikationsblockierenden DNA Läsionen aktiviert wird, zeigt ebenfalls eine Erhöhung zu späten Zeiten nach Cisplatin Behandlung an. Somit konnte gezeigt werden, dass Checkpointkontrolle zum einen, als auch DNA-Schadenserkennung durch ATR eine wichtige Rolle spielen.

Die Frage, die nun darauffolgend geklärt werden sollte ist, ob replikative Mechanismen an der Signalweiterleitung beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurden in weiteren Untersuchungen mögliche Unterschiede in der Expression des heterotrimeren Protein RPA (Replication protein A) zwischen Wildtyp und CSB-Zellen analysiert. Wie bereits erwähnt ist RPA ein heterotrimeres Protein bestehend aus den Untereinheiten RPA70, RPA32 und RPA 14. Es bindet direkt an einzelsträngige DNA (ssDNA) und wurde als essentieller Faktor für die *in vitro* Replikation identifiziert (Wobbe et al. 1987). An dieser Stelle soll auch erwähnt werden, dass RPA durch ATR gesteuert wird (Vassin et al. 2009).

In den nachfolgenden Versuchen konnte sowohl auf Western-Blot Ebene, als auch immunhistochemischem Wege gezeigt werden, dass RPA nachweislich eine Aktivierung erfährt. Nachfolgende Abbildung zeigt die beiden Experimente.

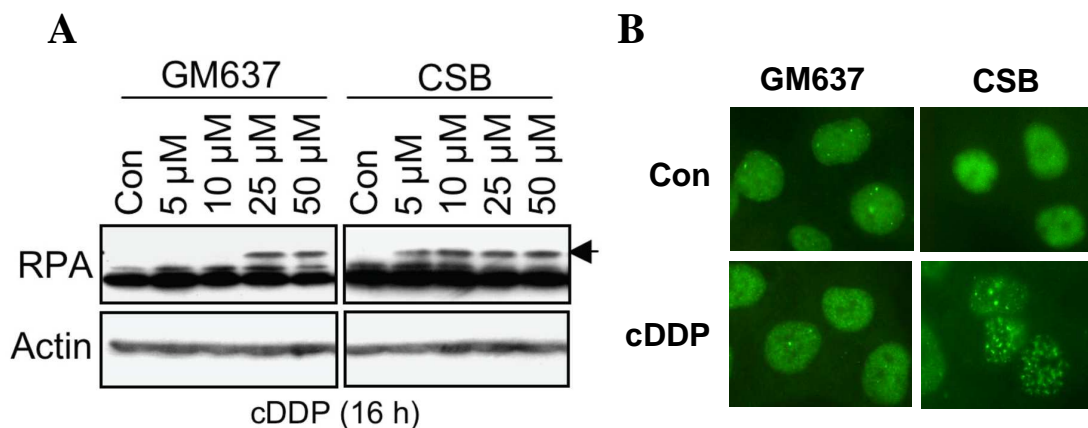


Abbildung 9: Aktivierung des Replikationsprotein A (RPA) zu späten Zeiten (16 h) nach dosisabhängiger Behandlung mit Cisplatin (cDDP). (A) Western-Blot Analyse zum Nachweis der Phosphorylierung des RPA Proteins. Phosphoryliertes RPA Protein (Pfeil) bei CSB defizienten Zellen bereits bei 5 µM Cisplatin Dosis erkennbar. Bei profizienten Zellen (GM637) ist dies bei gleicher Behandlungszeit erst ab einer Dosis von 25 µM zu erkennen. Con sind unbehandelte Kontrollzellen. Actin diente als interne Ladungskontrolle. (B) Immunhistochemischer Nachweis von RPA-Foci in CSB-Zellen. Die Behandlungszeit ist wie in Versuchsteil A 16h bei einer Dosis von 5 µM. Vergrößerung 100-fach.

Wie in Abbildung 9 zu erkennen ist erfolgt eine Aktivierung des RPA-Proteins bei sowohl CSB-profizienten, als auch defizienten Zellen. In den meisten Untersuchungen wurde eine Cisplatin Konzentration von 5 µM gewählt. Bei dieser Konzentration zeigen CSB-Zellen im Gegensatz zu wildtypischen GM637 Zellen eine deutliche RPA-Aktivierung (Pfeil). GM637 Zellen benötigen deutlich höhere Konzentrationen, um ein vergleichbares Signal zu generieren.

Eine weitere Bestätigung, dass replikative Mechanismen eine Rolle bei der Cisplatin induzierten späten SAPK/JNK Aktivierung spielen, zeigt ein Vergleich logarithmisch wachsender Fibroblasten von Mensch und Nager mit nicht wachsenden Zellen. Grundannahme dabei ist, dass konfluente Zellen in der Petrischale ihr Wachstum einstellen und somit nicht mehr replikativ aktiv sind, logarithmisch wachsende Zellen dahingegen sich weiterhin replizieren. Das Ergebnis der durchgeführten Western-Blot Analyse ist nachfolgend dargestellt.

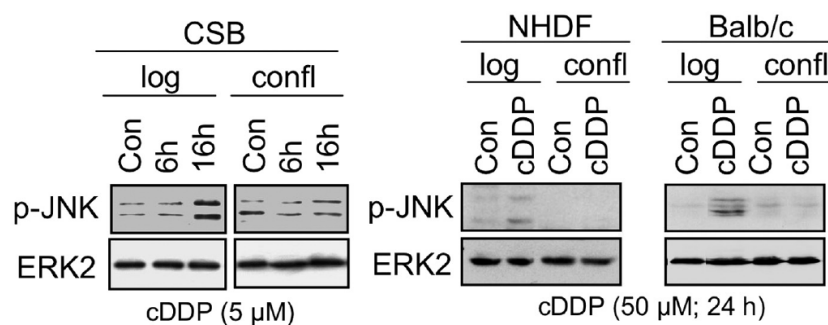


Abbildung 10: Gegenüberstellung wachsender und nicht-wachsender (konfluenter) humaner und Mausfibroblasten. Fibroblasten von Mensch (CSB, NHDF) und Nager Balb/c) wurden entweder zur vollen Konfluenz (confl), oder noch logarithmisch (log) wachsen gelassen. Eine Behandlung erfolgte bei CSB Zellen für 24 h mit 5 μM Cisplatin (links). In NHDF (normal human dermal fibroblasts) als auch Balb/c Zellen erfolgte die Behandlung über 24 h mit einer Konzentration von 50 μM (rechts). ERK2 diente als Ladekontrolle, Con sind unbehandelte Kontrollzellen.

Aus der Gegenüberstellung der logarithmisch vs. konfluent gewachsenen Zellen ist ersichtlich, dass Replikation wie bereits mittels RPA-Protein bewiesen, einen Einfluss auf die SAPK/JNK Aktivierung hat. CSB-Zellen zeigten erwartungsgemäß in konfluent wachsenden Zellen das bereits beschriebene Ergebnis einer späten durch Cisplatin hervorgerufenen Aktivierung der SAPK/JNK. Sind diese Zellen allerdings konfluent gewachsen und somit in einen nicht replikativen Status übergegangen, verschwindet auch das Signal der SAPK/JNK Aktivierung. Dies ist ebenfalls in normalen humanen Hautfibroblasten (NHDF) als auch in Mausfibroblasten zu erkennen.

In einem weiteren Schritt wurde der Ubiquitinierungszustand des FANCD2 Proteins (Fanconi anemia group D2 protein), welches nach DNA-Schaden in einem monoubiquitiniertem Zustand vorliegt, untersucht. Die Ubiquitinierung der FANCD2

ist nötig für die Translokation des Proteins in den Zellkern, als auch für die Interaktion mit der Nuklease FAN1 (Liu et al. 2010). FANCD2 ist ein Schlüsselprotein in der homologen DNA-Reparatur. Die Untersuchung erfolgte mittels Western-Blot Analyse. Interessant ist, dass wildtypische GM637 und CSB defiziente Zellen beide in gleichem Maße auf die Cisplatinbehandlung reagierten. Dies lässt darauf schließen, dass die erhöhte SAPK/JNK Aktivierung in CSB-Zellen nicht durch eine zuvor stattfindende Aktivierung des FANC-Signalweges begünstigt wird. Dieser Signalweg spielt normalerweise eine Schlüsselrolle in der Intra-S-Phase Checkpoint Aktivierung nach Behandlung mit Interstrand cross-linking Agentien wie Cisplatin.

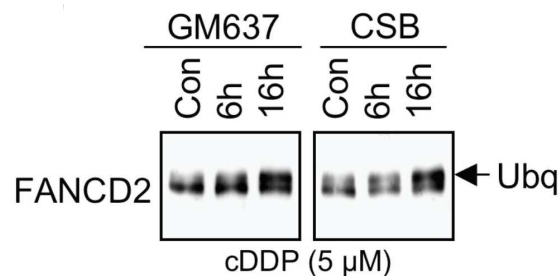


Abbildung 11: Ubiquitinierungszustand des FANCD2 Proteins nach Cisplatinbehandlung (5 μM) in wildtypischen humanen GM637 und CSB-Zellen. 6 h und 16 h kontinuierliche Cisplatinbehandlung. Der Pfeil zeigt die ubiquitinierte Form an.

Die Untersuchung der FANCD2 Ubiquitinierung zeigte keine Unterschiede zwischen wildtypischen und CSB-defizienten Zellen, weder zu frühen noch zu späten Zeiten. Die Ergebnisse führen zu der Frage, in wie weit transkriptionelle Mechanismen eine Rolle für die späte SAPK/JNK Aktivierung spielen. Zur Untersuchung dieses Sachverhaltes diente uns die pharmakologische Inhibition der Transkription durch RNA-Polymerase II Inhibitoren, wie α -Amanitin oder 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB). Die Inhibitoren sind bekannt dafür, dass sie p53 zu aktivieren.

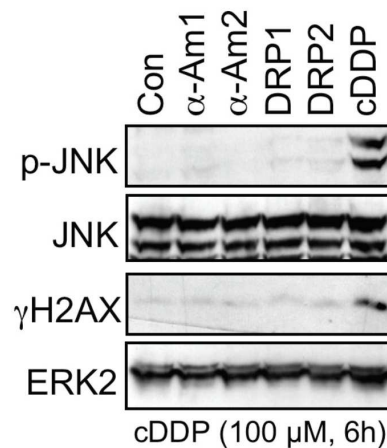


Abbildung 12: Pharmakologische Inhibition der Transkription durch RNA-Polymerase II Inhibitoren (α -Amanitin, 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol – DRB) mit anschließender Untersuchung der JNK-Phosphorylierung. Jeweils zwei Konzentrationen der Inhibitoren wurden eingesetzt. Für α -amanitin 0,5 μ g/ml (α -Am1) und 2,0 μ g/ml (α -Am2), sowie für 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol 40 μ M (DRB1) und 80 μ M (DRB2). Die Behandlungsdauer betrug 6 h. Cisplatin (100 μ M) diente als Positivkontrolle. Con sind unbehandelte Kontrollen. ERK2 diente als interne Ladungskontrolle.

Das Ergebnis zeigte nach Hemmung der RNA-Polymerase II keine Aktivierung der SAPK/JNK. Dies lässt darauf schließen, dass pharmakologische Inhibition der Transkription allein nicht in der Lage ist den Signalweg zur SAPK/JNK auszulösen und deren Phosphorylierung zu initiieren.

In wieweit DSB alleine für eine Aktivierung der Stresskinasen SAPK/JNK ausreichend sind und welche genaue Funktion sie dabei haben, wird im folgenden Kapitel näher untersucht werden.

3.3 Sind Doppelstrangbrüche als initialer Auslöser für die SAPK/JNK duale Phosphorylierung ausreichend?

Um die Bedeutung der Doppelstrangbrüche für das durch Cisplatin (cDDP) hervorgerufene SAPK/JNK Signalling herauszufinden, wurde der Effekt von ionisierender Strahlung (IR), welche als Erzeuger von Doppelstrangbrüchen bekannt ist, auf die duale SAPK/JNK Phosphorylierung hin untersucht (Abb.13 A). In weiteren Versuchen wurde zum einen ionisierende Strahlung (IR) mit einer Ko-Behandlung von RNA-Polymerase II Inhibitoren (Abb. 13 B), zum anderen Cisplatin mit Ko-Behandlung von RNA-Polymerase II Inhibitoren (Abb. 13C) untersucht.

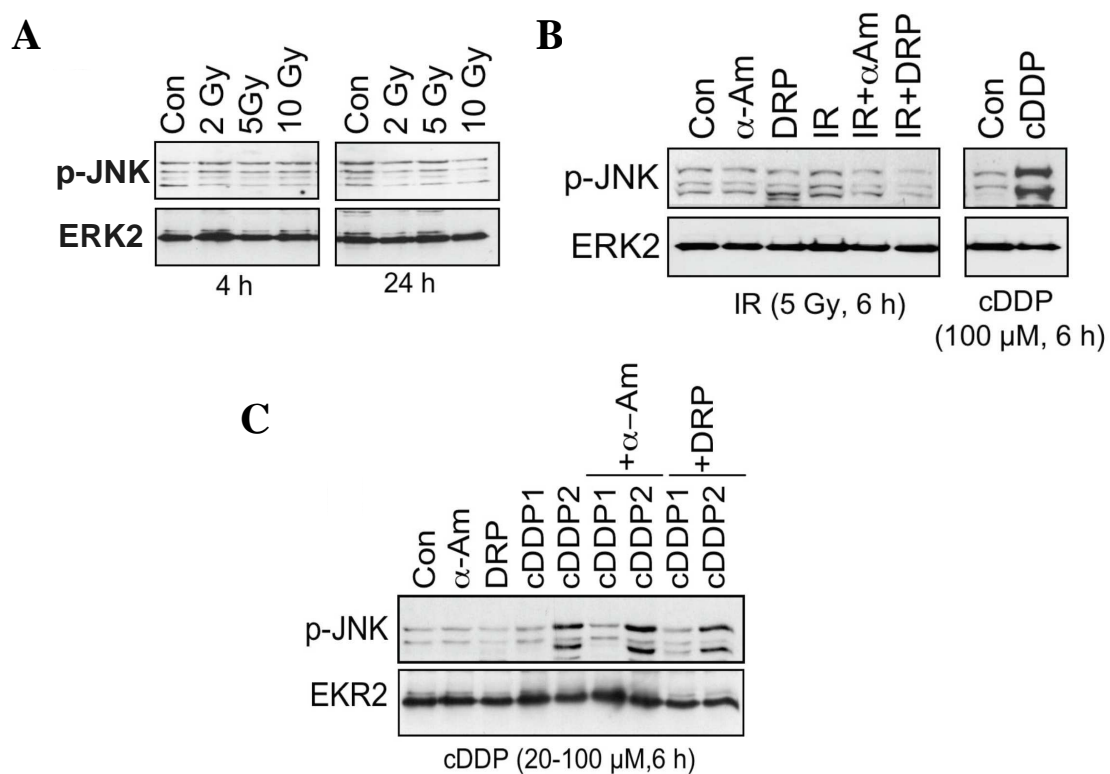


Abbildung 13: Ionisierende Strahlung als Erzeuger von Doppelstrangbrüchen und dessen Relevanz für die duale Phosphorylierung von SAPK/JNK. (A) GM637 Zellen wurden mit Dosen bis zu 10 Gray ionisierender Strahlung behandelt und anschließend der Phosphorylierungszustand der SAPK/JNK untersucht. (B) Kombination von IR mit RNA-Polymerase II Inhibitoren. GM637 Zellen wurden für 2 h mit Inhibitoren vorbehandelt, danach mit 5 Gray bestrahlt. Nach weiteren 6 h wurde der Phosphorylierungsstatus bestimmt. (C) GM637 Zellen wurden mit RNA-Polymerase Inhibitoren für 2 h vorbehandelt und anschließend mit Cisplatin behandelt (cDDP1 = 20 μ M; cDDP2 = 100 μ M). Nach 6 h wurde der Phosphorylierungsstatus der SAPK/JNK bestimmt. Con sind jeweils unbehandelte Kontrollen. ERK2 diente als interne Ladungskontrolle.

Es konnte gezeigt werden, dass Dosen bis zu 10 Gray in GM637 Wildtypzellen, keine, mittels SEK1/MKK4 katalysierte frühe (4 h) oder späte (24 h) duale Phosphorylierung der SAPK/JNK hervorzurufen vermögen (Abb13A). Das gleiche gilt in Kombination mit Polymerase II Inhibitoren (Abb.13 B). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Kombination von Cisplatin mit den RNA-Polymerase II Inhibitoren auch nicht zu einer Potentierung des Cisplatin Effektes führt (Abb13C)

Zusammenfassend lässt sich nach diesen Ergebnissen sagen, dass Doppelstrangbrüche weder allein, noch in Kombination mit Transkriptionsblock in der Lage sind, SAPK/JNK zu aktivieren.

Der Verdacht lag nunmehr nahe, dass agenzspezifische Mechanismen Einfluss nehmen können. Weitere Versuche sollten dies klären. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die Aktivierung der SAPK/JNK in CSB defekten Zellen einer strikten Agenzspezifität unterliegt. Weder UV-C Licht noch Zytostatika wie Fotemustin, ein weiterer Cross-Linker, sind in der Lage, die gleichen Reaktionen in CSB-Zellen hervorzurufen wie Cisplatin. Nur Transplatin, ein trans-Stereoisomer von Cisplatin, zeigt ebenfalls eine erhöhte Phosphorylierung von SAPK/JNK in CSB-defekten Zellen zu späten Zeiten (Abb.14).

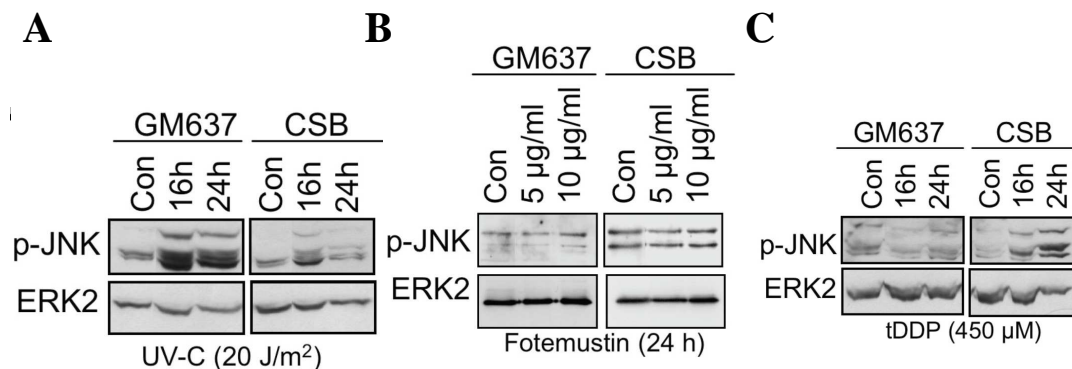


Abbildung 14: Untersuchung von UV-C Licht, Fotemustin, und Transplatin auf die späte Phosphorylierung von SAPK/JNK in Wildtyp und CSB-defizienten Zellen. (A) GM637 und CSB Zellen wurden mit Dosen von 20 J/m² behandelt und nach 16 h bzw. 24 h auf die Phosphorylierung der SAPK/JNK hin untersucht. (B) Fotemustin wurde in GM637 und CSB Zellen auf die Aktivierung der SAPK/JNK hin untersucht. Die Konzentrationen betragen 5 µg/ml und 10 µg/ml Fotemustin bei einem Zeitwert von 24 h. (C) Wildtyp (GM637) und CSB defiziente Zellen wurden für 16 h und 24 h mit einer Konzentration von 450 µM Transplatin behandelt und auf die Aktivierung der SAPK/JNK untersucht. Con sind unbehandelte Kontrollzellen. ERK2 diente als interne Ladungskontrolle.

Aus Abbildung 14 ist ersichtlich, dass weder UV-C Licht, noch Fotemustin in der Lage waren, eine verstärkte späte SAPK/JNK Phosphorylierung zu bewirken (Abb.14 A, B). Einzig Transplatin ein Stereoisomer von Cisplatin, führt ebenfalls zu einer späten Phosphorylierung der SAPK/JNK (Abb. 14 C)

In diesem Zusammenhang sollte aber erwähnt werden, dass Cisplatin und Transplatin in der Wirkung unterschiedliche Potenz zeigen. So ist Cisplatin um den Faktor 10 – 15 effektiver in der Aktivierung der SAPK/JNK als Transplatin in Bezug auf einen gleichen Level von Platin-DNA Addukten (Abb. 15).

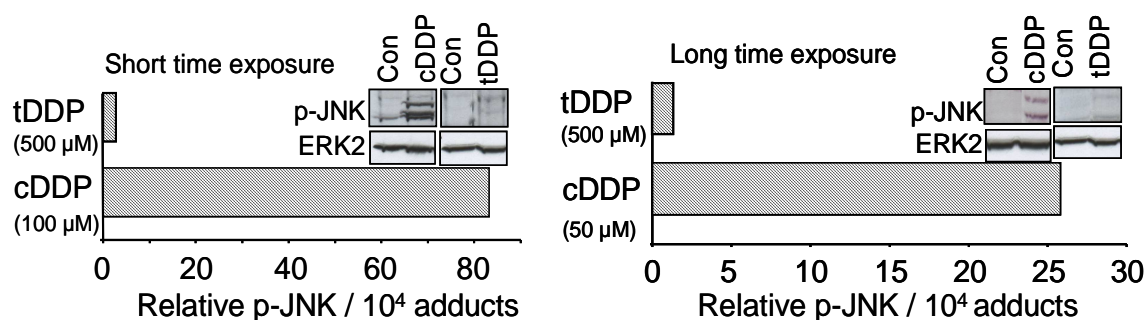


Abbildung 15: Gesamtplatinierung nach kontinuierlicher Behandlung mit Cisplatin (100 µM; 50 µM) und Transplatin (500 µM) zu 4 h und 24 h in Balb/c Mausfibroblasten mittels ICP-MS. Der Phosphorylierungsstatus wurde mittels Western-Blot Analyse bestimmt. Die unbehandelten Kontrollen wurden gleich 1 gesetzt. Gezeigt ist der relative Zuwachs der SAPK/JNK Phosphorylierung (p-JNK) in Platin behandelten Zellen pro 10⁴ Platin-DNA Addukten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Con). ERK2 diente als interne Ladekontrolle.

Die Ergebnisse aus den Abbildungen 14 und 15 lassen darauf schließen, dass Cisplatin induzierte Intrastrand-Crosslinks eher als Interstrand-Crosslinks den Effekt der SAPK/JNK Aktivierung hervorrufen. Es lässt sich jedoch bisher sagen, dass das späte SAPK/JNK-Signalling in TC-NER defekten CSB-Zellen spezifisch für Platinagenzien zu sein scheint und dass Doppelstrangbrüche selbst nicht ausreichend sind, diese Zellantwort selbst hervorzurufen. Im Signalprozess selbst spielen DSB anscheinend jedoch eine essentielle Rolle.

3.4 DNA-Reparatur Defekte und deren Auswirkungen auf späte SPAK/JNK Aktivierung nach Cisplatin Behandlung

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die späte Aktivierung der SAPK/JNK durch Cisplatin bisher CSB-Zellspezifisch ist. Die Frage, die sich stellte war, ob ein Defekt in der DNA-Reparatur, nicht nur durch CSB bedingt, sondern auch durch andere Faktoren, die gleiche späte SAPK/JNK Aktivierung auslösen kann. Es wurden daher in folgenden Analysen weitere Reparatur defekte Zellmutanten auf die späte durch Cisplatin hervorgerufene SAPK/JNK Aktivierung untersucht.

Es zeigte sich, dass XPA-mutierte Zellen, ähnlich wie CSB-Zellen zu späten Zeiten ein höheres Maß der Phosphorylierung der SAPK/JNK zeigen (Abb. 16A). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass eine nicht effiziente DNA-Reparatur von durch Cisplatin hervorgerufenen DNA-Schäden, zu einem Stress-Signalling der SAPK/JNK führen kann. In Abbildung 16B ist zu sehen, dass humane Zellen mit einem Defekt im XPC-Protein, welches eine wichtige Rolle bei der globalen NER spielt, eine verminderte Aktivierung der SAPK/JNK zeigt, sich also gegensätzlich zu den CSB- und XPA-Zellen verhält. Auch ERCC1-defekte Hamster 43-3B-Zellen zeigen eine reduzierte SAPK/JNK Phosphorylierung nach 24 h Cisplatin Dauerbehandlung (Abb. 16C).

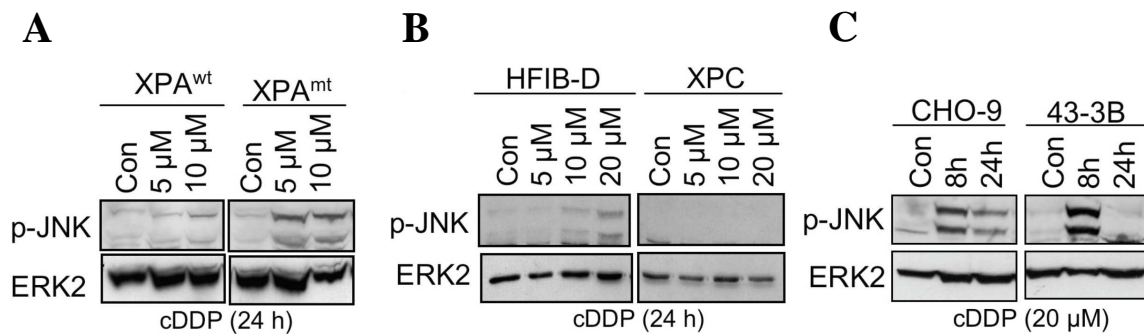


Abbildung 16: DNA-Reparatur Defekte und deren unterschiedlichen Effekte auf Cisplatin induzierte SAPK/JNK Aktivierung. (A) SV40 immortalisierte humane Zellen mit einem Defekt in TC-NER durch Fehlen des XPA-Proteins (XPA^{mt}) und XPPRO12—Zellen (XPA^{WT}), welche durch stabile Transfektion mit xpa-cDNA wiederhergestellt wurden, wurden mit 5 µM oder 10 µM Cisplatin behandelt. Nach einer kontinuierlichen 24 h Inkubation wurde der Phosphorylierungszustand der SAPK/JNK ermittelt. (B) Primäre humane wildtyp Fibroblasten (HFIB-D) und XPC-defekte humane Fibroblasten wurden für 24 h mit Dosen von Cisplatin (5-20 µM) behandelt. Nach der Inkubation wurde der Phosphorylierungszustand der SAPK/JNK mittels Western-Blot Analyse ermittelt. (C) ERCC1-kompetente (CHO-9) und defekte (43-3B) Hamster Zellen wurden mit 20 µM Cisplatin für 24h behandelt. Nachfolgend wurde der Phosphorylierungszustand der SAPK/JNK ermittelt. Con beschreibt jeweils unbehandelte Kontrollzellen. ERK2 diente als interne Ladungskontrolle.

Die Ergebnisse aus Abbildung 16 zeigen, dass Defekte in der Nukleotid Exzisionsreparatur die späte Aktivierung der SAPK/JNK sowohl fördern (CSB und XPA), als auch hemmen können (XPC und ERCC1).

Die Untersuchungen weiterer Zelllinien wie die Pankreas-Zellen Capan-1, welche durch das Fehlen eines funktionierenden BRCA2-Protein einen Defekt in der Doppelstrangbruchreparatur aufweisen, zeigen ebenso keine Aktivierung der SAPK/JNK nach einer späten Cisplatin Behandlung (Abb. 17 A). Humane ATR-defekte ATR-Seckel Zellen zeigten nur leichte Störungen in der durch Cisplatin hervorgerufenen späten SAPK/JNK Antwort (Abb. 17 B). Mausfibroblasten (MEFs), genauer gesagt DNA-PKcs (SCID) Zellen zeigten den gleichen Phänotyp in Bezug auf SAPK/JNK Aktivierung wie CSB-Zellen (Abb. 17 C). SCID Zellen sind durch eine Mutation in der DNA-PKcs im non-homologen end-joining kompromittiert.

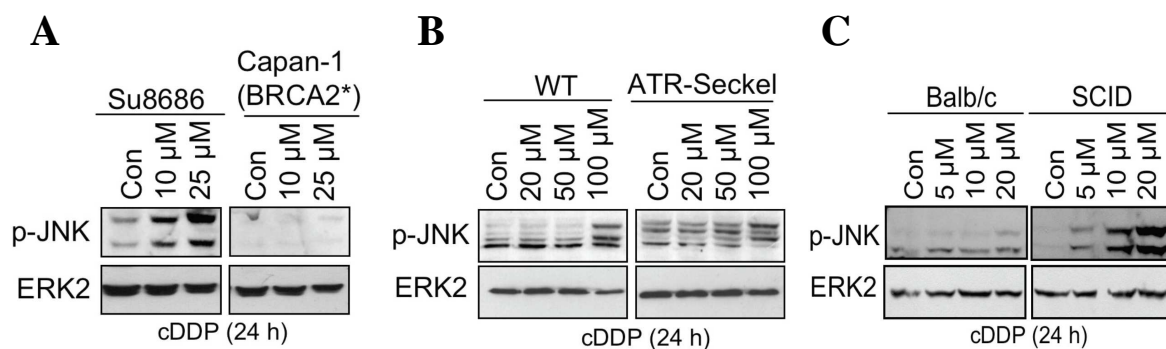


Abbildung 17: Einfluss weiterer DNA-Reparatur Defekte auf die späte SAPK/JNK Aktivierung nach Cisplatin Behandlung. (A) Pankreas Karzinom Zellen profizient für BRCA2 Protein (Su8686) oder defizient (Capan-1) wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen an Cisplatin (10 und 25 μM) behandelt, anschließend wurde der Phosphorylierungsstatus der SAPK/JNK bestimmt. (B) Humane Fibroblasten (WT) und ATR-deficiente Fibroblasten (ATR-Seckel) wurden mit verschiedenen Konzentrationen Cisplatin behandelt. Die Dauer betrug als kontinuierliche Behandlung 24 h. Untersucht wurde der Phosphorylierungsstatus der SAPK/JNK mittels Western-Blot Analyse. (C) DNA-PKcs defiziente Mausfibroblasten (SCID) und wildtypische Balb/c Fibroblasten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Cisplatin für 24 h dauerbehandelt und der Phosphorylierungsstatus der SAPK/JNK bestimmt. Con sind jeweils unbehandelte Kontrollzellen, ERK2 dient der internen Ladekontrolle.

Resümierend aus den Ergebnissen der Abbildungen 16 und 17 lässt sich sagen, dass nicht nur CSB defiziente Zellen, sondern auch weitere Zellen wie XPA und SCID Zellen eine späte durch Cisplatin hervorgerufene Aktivierung der SAPK/JNK aufweisen. Als weiteres Zellmodell sollten daher Balb/c und SCID Zellen weiter untersucht werden.

3.5 Untersuchungen verschiedener Marker nach Cisplatin-Behandlung in DNA-PKcs defizienten Mausfibroblasten zu frühen und späten Zeiten

Wie bereits in Abbildung 17C zu erkennen ist, zeigen DNA-PKcs defiziente Mausfibroblasten (SCID) zu späten Zeiten den gleichen Phänotyp wie CSB-Zellen. Die Frage, die sich nun stellte war, ob diese SCID-Zellen nun auch zu frühen Zeiten, wie die CSB-Zellen, den gleichen Phänotyp zeigen. Des Weiteren sollte auch überprüft werden, ob auch weitere bereits in den CSB-Zellen identifizierte Marker wie γ H2AX Phosphorylierung, CHK-1 Phosphorylierung als auch die Bildung von Platin-DNA Addukten sich in SCID-Zellen ähnlich wie in CSB-Zellen verhalten. Die folgenden Abbildungen zeigen die Resultate dieser Analysen.

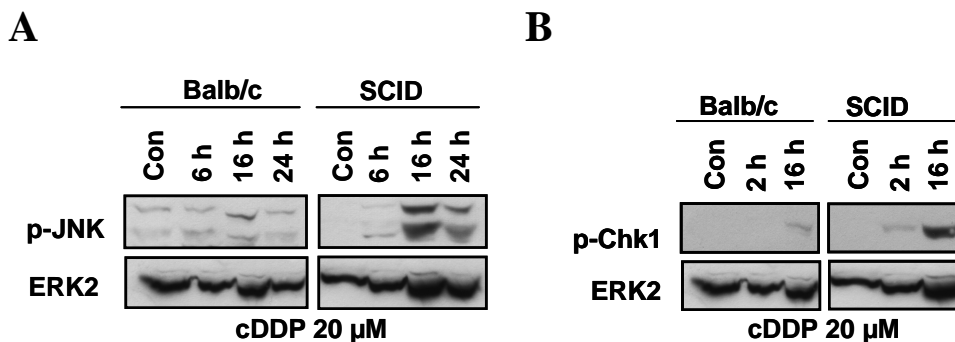
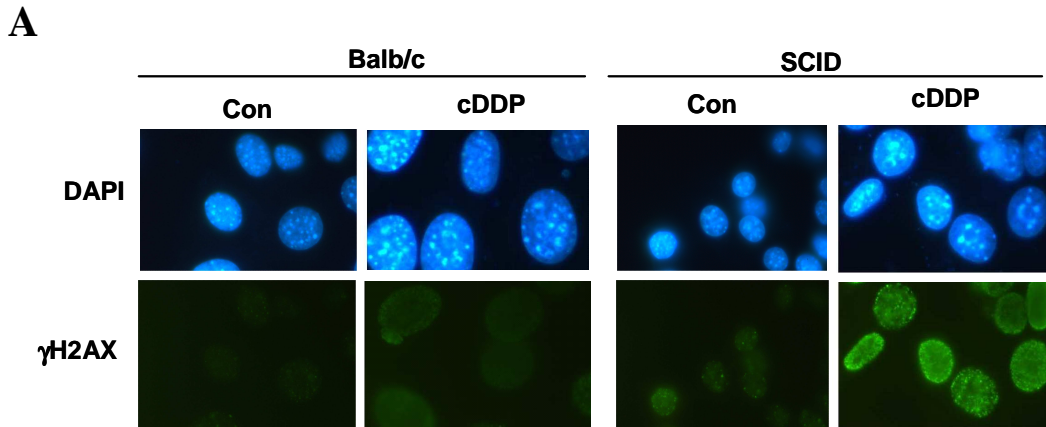


Abbildung 18: Phosphorylierungsstatus der SAPK/JNK und CHK1 in DNA-PKcs defizienten SCID-Zellen. (A) Balb/c und SCID Mausfibroblasten wurden mit 20 μ M Cisplatin für verschiedene Zeiten behandelt (6 h, 16 h, 24 h) und anschließend der Phosphorylierungsstatus der SAPK/JNK bestimmt. (B) Untersuchung der Checkpoint-Kinase Chk1 auf Phosphorylierung nach zeitkinetischer Cisplatinbehandlung (20 μ M). Con sind jeweils unbehandelte Kontrolle. ERK2 dient der internen Ladekontrolle.

SCID-Zellen zeigen im Gegensatz zu CSB-Zellen zu frühen Zeiten keine veränderte Phosphorylierung im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp-Zellen (Balb/c) (Abb. 18 A). Zu späten Zeiten allerdings zeigen SCID-Zellen eine deutlich stärkere Aktivierung der SAPK/JNK. (Abb.18 B). Zu späten Zeiten (16 h) zeigen SCID-Zellen eine deutliche Phosphorylierung der Chk1. Gleich behandelte wildtypische Zellen zeigen diesen Effekt nicht. Die Untersuchung der γ H2AX Phosphorylierung erfolgte auch bei den Mausfibroblasten mittels der schon beschriebenen Methodik der Immunhistochemie in Form von γ H2AX Foci als auch der normalen Western-Blot Analyse.



B

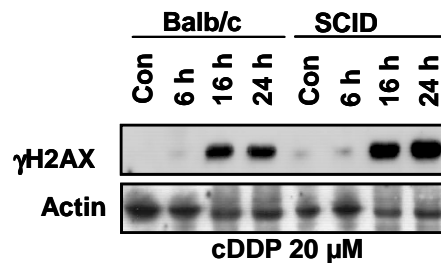


Abbildung 19: H2AX Phosphorylierung in DNA-PKcs defizienten (SCID) und profizienten (Balb/c) Mausfibroblasten. (A) Balb/c und SCID Zellen wurden mit 20 μ M Cisplatin behandelt und nach einer Inkubationszeit von 16 h γ H2AX Foci immunhistochemisch nachgewiesen. Die DAPI-Färbung erfolgte zum Nachweis der Zellkerne. Vergrößerung 100-fach. (B) Western-Blot Analyse paralleler Extrakte zu 16 h und 24 h. Con sind unbehandelte Kontrollen. Actin dient als interne Ladekontrolle.

Zu späten Zeiten zeigen DNA-PKcs defiziente SCID-Zellen nach Cisplatin Behandlung in Bezug auf Chk1 und γ H2AX die gleichen zellulären Antworten wie CSB-defekte humane Fibroblasten. Es stellte sich nun allerdings die Frage, ob SCID Zellen, die zwar den gleichen Phänotyp zeigen wie CSB-Zellen, auch im gleichen Masse eine Veränderung der Platin-DNA Addukte erfahren. Zu diesem Zweck wurde auch hier eine Messung der DNA-Platinierung mittels ICP-MS durchgeführt. Die Daten wurden parallel, wie bei den CSB Zellen mittels South-Western Analyse verifiziert.

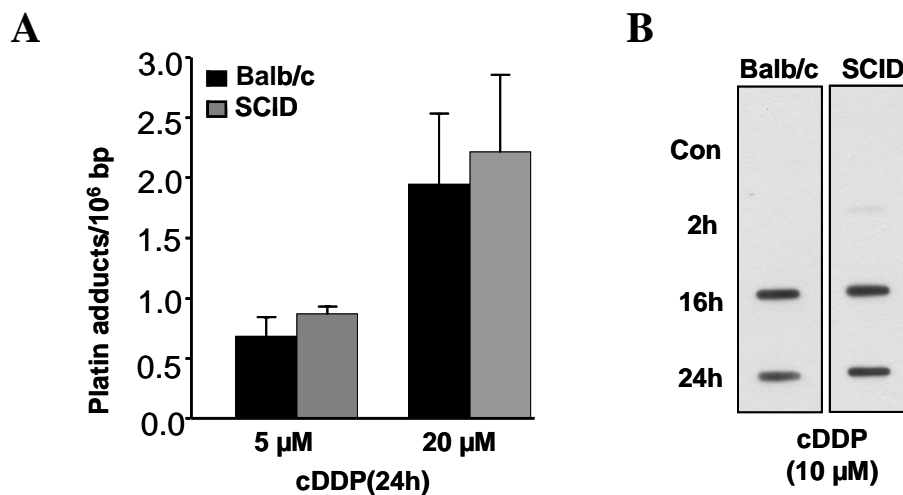


Abbildung 20: Messung der DNA-Platin Addukte und der Cisplatin-DNA Intrastrand Crosslinks mittels ICP-MS und South-Western Analyse. (A) DNA-Platinierung in wildtypischen Balb/c und DNA-PKcs defizienten (SCID) Mausfibroblasten wurde zum Zeitpunkt 24 h nach Cisplatinbehandlung (5 und 20 μM) mittels ICP-MS gemessen. Dargestellt sind die mittleren \pm sd aus Triplikaten. (B) Parallel wurden die Cisplatin-DNA Intrastrand-Crosslinks mit einer kontinuierlichen Cisplatinbehandlung (10 μM) zu 2, 16 und 24 h mittels South-Western Analyse gemessen. Con beschreibt unbehandelte Kontrollzellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der „steady-state“ Level der DNA-Platin Addukte durch das Fehlen der DNA-PKcs nicht beeinflusst wurde. In Bezug auf die Cisplatin Intrastrand Crosslinks sind zwischen DNA-PKcs und Balb/c Zellen keine Unterschiede erkennbar.

Weitere Untersuchungen humaner- bzw. Mausfibroblasten, die unterschiedliche Defekte in der DNA-Reparatur besitzen, zeigten nach Cisplatinbehandlung keine Unterschiede zwischen den defizienten Mutanten und profizienten Wildtypzellen. Auch Mausfibroblasten defizient für p53 ($p53^{-/-}$) bzw. profizient ($p53^{+/+}$) zeigten identische Ergebnisse.

Insgesamt zeigen die Resultate, dass einzelne Reparaturfaktoren eine entscheidende Rolle in der durch DNA-Schaden vermittelten Signalkette zur Aktivierung der SAPK/JNK spielen.

Tabelle 1: Auswirkungen der zellulären Reparaturkapazität auf Cisplatin induzierte späte Aktivierung der SAPK/JNK. Western-Blot Analysen der dualen Phosphorylierung der SAPK/JNK nach 24 h Cisplatin Dauerbehandlung. Verschiedene Zellen mit unterschiedlichen Reparaturdefekten wurden hierzu verwendet. Der Ursprung der Zellen ist entweder humanen oder murinen Ursprungs. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Autoradiogramme densitometrisch analysiert. Relevante Unterschiede im Level der phosphorylierten SAPK/JNK zwischen Reparatur defizienten Zellen und profizienten Zellen wurden ≥ 2 -fach bzw. $\leq 0,5$ -fach definiert. Somit bedeutet + erhöht, o unverändert und – reduziert.

Zelllinien mit Defekt in Reparaturprotein	Ursprung	Cisplatin induzierter SAPK/JNK Level
CSB	Human	+
XPA	Human	+
XPC	Human	-
ERCC1	Nager	-
BRCA2	Human	-
ATR	Human	-
FANCD2	Human	o
DNA-PKcs	Nager	o
ATM	Nager	+
p53	Nager	o

3.5 Weitere mögliche Faktoren, die im späten durch Cisplatin induzierten Signaling eine Rolle spielen.

Neben den bereits in diesem Teil der Arbeit untersuchten möglichen molekularen Mechanismen, welche der SAPK/JNK Aktivierung zugrunde liegen könnten, wie Doppelstrangbrüche, replikative oder transkriptionelle Blockierungen als auch reaktive Sauerstoffspezies, die alle entweder positiv oder negativ ausgefallen sind, gibt es natürlicherweise noch weitere Möglichkeiten der Einflussnahme. Zwei weitere Möglichkeiten sollen in diesem Abschnitt nochmals genauer dargestellt werden.

Mandic et al zeigte, dass Cisplatin in humanen Melanomzellen im Stande ist ER-Stress auszulösen (Mandic et al. 2002). Die Frage, die sich nun stellte, war, ob auch ER-Stress, ausgelöst durch Cisplatin, zu einer SAPK/JNK Phosphorylierung und somit zu einer Aktivierung führt. Um diese Frage zu beantworten, wurden wildtypische GM637, als auch CSB-defiziente Fibroblasten mit 5 μ M Cisplatin behandelt und

anschließend mittels Western-Blot Analyse auf ER-Stress (endoplasmatisches Reticulum) hin untersucht. Als Marker wurde das Protein CHOP (C/EBP homologous protein) gewählt. CHOP wurde in vielen Veröffentlichungen als Marker für ER-Stress publiziert (Oyadomari, 2004; Goodall et al., 2010). Als Positivkontrolle wurde Tunicamycin verwendet, welches als Nucleosid-Antibiotikum die GlcNAc-1-P-Transferase hemmt und damit den ersten Schritt in der Verknüpfung Fettsäure:Saccharid unterdrückt. Schlussendlich führt dies zu ER-Stress (Elbein, A.D., 1984).

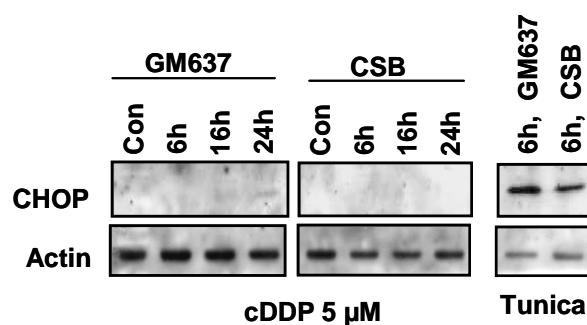


Abbildung 21: Cisplatin induzierte ER-Stress Aktivierung in GM637 und CSB Zellen. GM637 und CSB Zellen wurden mit 5 μM Cisplatin behandelt. Mittels Western-Blot Analyse wurde die Induktion von ER-Stress untersucht. Als Markerprotein wurde CHOP verwendet (links). Als Positivkontrollen dienten gleichzeitig behandelte Zellen mit dem ER-Stress Induktor Tunicamycin (Tunica). Con sind unbehandelte Kontrollzellen. Actin diente als interne Ladekontrolle.

In Abbildung 21 ist ersichtlich, dass in unseren Versuchsbedingungen weder in Wildtyp noch in CSB-defizienten Zellen, sowohl zu frühen (6 h), als auch zu späten Zeiten (16 h, 24 h) ER-Stress durch Cisplatin ausgelöst wird. Zur Überprüfung der allgemeinen ER-Stress Induktion diente uns Tunicamycin, welches nach 6 h Dauerbehandlung sowohl in Wildtyp, als auch in CSB-Zellen ER-Stress auszulösen vermag.

In anderen Arbeiten der Arbeitsgruppe (Fritz, Kaina, 2006) konnte gezeigt werden, dass MMS (Methyl-Methan-Sulfonat), ein methylierendes Agenz, MKP-1 induziert. Nach UV-Licht Behandlung konnte nachgewiesen werden, dass eine verminderte Expression von MKP-1 in CSB und c-Fos Zellen zu einer erhöhten Signalwirkung in Bezug auf SAPK/JNK führt.

Es sollte daher untersucht werden, in welcher Art und Weise Cisplatin die Expression von MKP-1 beeinflusst.

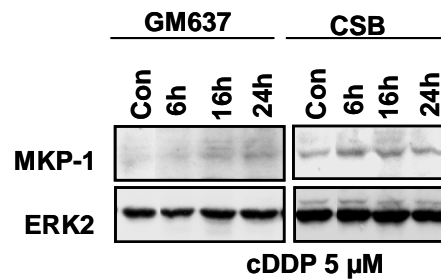


Abbildung 22: Protein Expression der MKP-1 nach Cisplatin Behandlung in GM637 und CSB Zellen. Behandlung von wildtypischen GM637 und CSB-defizienten Zellen mit 5 μ M Cisplatin. Untersuchung der Expression von MKP-1 mittels Western-Blot Analyse. Die Behandlung wurde als Dauerbehandlung durchgeführt. Con sind unbehandelte Kontrollen. ERK2 diente als interne Ladekontrolle.

Das Ergebnis der MKP-1 Induktion zeigt, dass weder in CSB, noch in GM637 Zellen eine veränderte Expression von MKP-1 vorliegt. Die Expression von MKP-1 ist zwar in CSB-Zellen höher, jedoch ist kein Unterschied zwischen unbehandelten Kontrollen (con) und mit Cisplatin behandelten (6 h, 16 h, 24 h) CSB Zellen zu sehen. In GM637 Zellen zeigt sich das gleiche Ergebnis wie in CSB Zellen, jedoch mit reduzierter MKP-1 Expression.

3.6 Untersuchungen von Tyrosin-Kinasen und Rho-GTPasen und deren Einfluss auf die späte SAPK/JNK Phosphorylierung

Von Cisplatin ist bereits bekannt, dass es zu einer Aktivierung des EGF-Rezeptor Signalweges führt (Benhar et al. 2002) und somit einen Einfluss auf die DNA-Reparatur, genauer das non-homologe end-joining nimmt (Rodemann et al. 2007). Außerdem ist die Nicht-Rezeptor Tyrosin Kinase c-Abl notwendig für die SAPK/JNK Aktivierung nach Genotoxin Behandlung (Kharbana et al. 2000). Auf Grundlage dieser Befunde wurden die Auswirkungen einer pharmakologischen Hemmung der Rezeptor-, als auch der Nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinase auf die SAPK/JNK Aktivierung untersucht. Die bisherige kontinuierliche Dauerbehandlung wurde dahingehend geändert, dass nach 8 h kontinuierlicher Cisplatinbehandlung die Zugabe der Inhibitoren erfolgte. Die Inhibitoren blieben dabei zusammen mit Cisplatin für weitere 8 h auf den Zellen. Die gesamte Cisplatinbehandlung betrug somit 16 h Dauerbehandlung mit 8 h Ko-Behandlung der Inhibitoren. Nachfolgend wurde der Phosphorylierungsstatus der SAPK/JNK bestimmt.

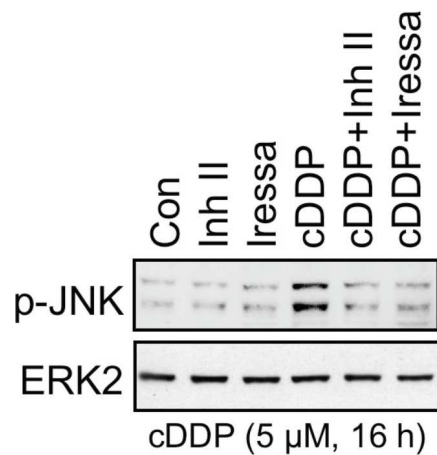


Abbildung 23: Cisplatin induzierte Aktivierung der SAPK/JNK erfordert Tyrosin-Kinasen. Humane CSB-Zellen wurden mit 5 μ M Cisplatin behandelt. Nach 8 h wurden Tyrosin-Kinase Inhibitoren zugefügt welche die Tyrosinkinase Bcr-Abl (Inh II) (10 μ M) oder EGFR (Iressa) (10 μ M) hemmen. Nach weiteren 8 h Inkubationszeit von Inhibitor und Cisplatin wurden die Zellen für weitere Analysen der SAPK/JNK Phosphorylierung geerntet. Con sind unbehandelte Kontrollen. ERK2 diente der internen Ladekontrolle.

Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, führt die Hemmung von Rezeptor- als auch nicht Rezeptor-Tyrosinkinase zu einer abgemilderten SAPK/JNK Phosphorylierung. Die Inhibitoren selbst bewirken keinerlei p-JNK Aktivierung. Somit lässt sich vermuten, dass sowohl Rezeptor als auch Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase für die späte SAPK/JNK Aktivierung notwendig sind.

Neben den oben gezeigten Bcr-Abl bzw. EGFR Inhibitoren wurden auch andere Protein-Kinasen und deren Einfluss auf die späte Cisplatin-abhängige SAPK/JNK Aktivierung untersucht. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 2: Einfluss verschiedener Proteinkinase Inhibitoren auf die späte Aktivierung der SAPK/JNK. Die duale Phosphorylierung der SAPK/JNK wurde mittels Western-Blot Analyse nach 24 h Cisplatin Behandlung in CSB- und GM637-Zellen ermittelt. Die Cisplatinkonzentration betrug 5 und 20 μM für CSB- und GM637-Zellen. Die Inhibitoren wurden 4 bzw. 8 h nach Behandlungsbeginn mit Cisplatin zugesetzt und bis zur Ernte der Extrakte mit Cisplatin zusammen auf den Zellen belassen. Folgende Inhibitoren wurden verwendet: Bcr-Abl Inhibitor TypII (10 μM), c-Src inhibitor PP2 (10 μM), EGFR-Inhibitor Iressa (10 μM), Akt-Kinase Inhibitor (5 μM), MEK1-Kinase Inhibitor PD98059 (10 μM), PI3K-related Kinase (PI3K-RK) Wortmannin (1 μM) und ATM-Kinase Inhibitor Ku55993 (5 μM). Als Effektiv wurde der Inhibitor mit + markiert, wenn die Cisplatin stimulierte SAPK/JNK Phosphorylierung um $\geq 50\%$ reduziert wurde vergleichend mit nicht Inhibitor behandelten Zellen. O bedeutet kein Unterschied, NB nicht bestimmt.

Protein-Kinase Inhibitor	Späte Cisplatin induzierte SAPK/JNK Level	
	CSB	GM637
Bcr-Abl	+	+
c-Src	o	o
EGFR	+	+
Akt	o	o
MEK1	o	o
PI3K-RK	+	+
ATM	+	NB

Aus Tabelle 2 ist zu erkennen, dass Hemmung der Phosphatidylinositol-3-kinase durch Wortmannin, sowie die Hemmung von ATM, durch Ku55933 zu einer verminderten Aktivierung der SAPK/JNK führt. Im Gegensatz dazu hatten Inhibition von MEK1, Akt und c-Src keine Veränderung in Bezug auf die SAPK/JNK Phosphorylierung nach Cisplatinbehandlung zur Folge.

Abschließend wurde die Beteiligung der Rho GTPasen an der späten Cisplatin induzierten SAPK/JNK Aktivierung untersucht. Membran gebundene Rho GTPasen sind entscheidend für die SEK1/MKK4 vermittelte frühe Aktivierung der SAPK/JNK (Minden et al. 1995; Coso et al. 1995; Gnad et al. 2000).

Spezifische Inhibition der Rho-Funktionen durch das bakterielle *Clostridium difficile* Toxin B (ToxB) heben sowohl die durch UV-Licht, als auch MMS-induzierte SAPK/JNK Aktivierung auf (Fritz et al. 2006; Gnad et al. 2000).

In Abbildung 24 ist gezeigt, dass ToxB auch dazu in der Lage ist, die Cisplatin induzierte späte Phosphorylierung der SAPK/JNK zu blockieren.

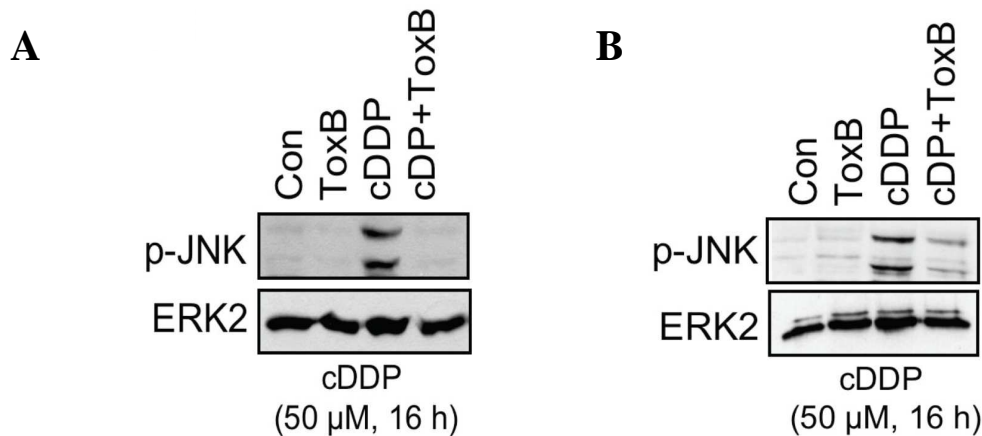


Abbildung 24: Durch ToxB blockierte späte Cisplatin induzierte SAPK/JNK Phosphorylierung. (A) GM637-Zellen wurden mit dem Rho-inaktivierenden Toxin ToxB (2,5 ng/ml) für 2 h vorinkubiert. Danach wurde Cisplatin hinzugefügt (50 μM) und für weitere 16 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und der Phosphorylierungsstatus der SAPK/JNK bestimmt. (B) gleicher Versuchsaufbau wie bei A, allerdings mit Primären humanen Fibroblasten und einer ToxB Konzentration von 1 ng/ml. Con sind jeweils unbehandelte Kontrollzellen. ERK2 diente der internen Ladekontrolle.

In Abbildung 24 ist zu erkennen, dass sowohl in immortalisierten GM637 Fibroblasten, als auch in primären humanen Zellen, ToxB eine Hemmung der späten durch Cisplatin hervorgerufenen SAPK/JNK Aktivierung unterdrückt.

Da bekannt ist, dass ToxB ebenfalls Einfluss auf die Integrität des Aktin Zytoskelett nimmt, erfolgte im Anschluss eine Untersuchung, ob Veränderungen im Zytoskelett ebenfalls die Aktivierung der SAPK/JNK beeinflusst. Der Versuchsaufbau glich dabei dem aus Abbildung 24, mit dem Unterschied, dass mittels Lantruculin B, einem Agens welches die Integrität von Aktinfilamenten aufhebt, der Einfluss auf die Phosphorylierung der SAPK/JNK untersucht wurde. Abbildung 25 zeigt das erhaltene Ergebnis.

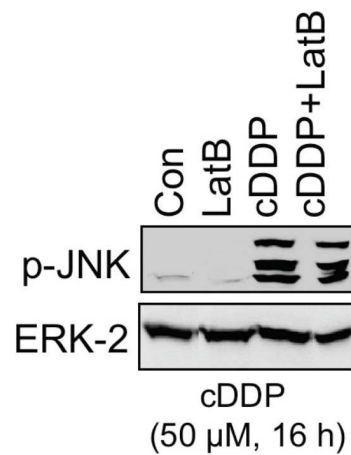


Abbildung 25: Einfluss der Zytoskelett-Integrität auf die Cisplatin-induzierte späte SAPK/JNK Aktivierung. GM637 Fibroblasten wurden mit Latrunculin B (1 μ M), einem F-Aktin Filament zerstörendem Agens, für 2 h vorbehandelt und anschließend mit 50 μ M Cisplatin für 16 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und der Phosphorylierungsstatus der SAPK/JNK bestimmt. Con sind unbehandelte Zellen. ERK2 dient als interne Ladekontrolle.

Das Ergebnis in Abbildung 25 zeigt, dass eine Zerstörung von Zytoskelettbestandteilen, wie Aktinfilamenten durch Latrunculin B keinen Einfluß auf die Aktivierung der SAKP/JNK hat. Somit lässt sich festhalten, dass der Effekt von ToxB (Abb. 22A, B), eine Hemmung der SAPK/JNK Phosphorylierung auszulösen, unabhängig von einer Zerstörung der Aktinfilamente ist.

Innerhalb der Familie der Rho-GTPasen ist Rac1 von großer Bedeutung für die durch UV-Licht induzierbare Aktivierung der SAPK/JNK (Gnad et al. 2000; von Bardeleben et al. 2003). Mittels Membranfraktionierung sollte daher die Menge an membrangebundenem Rac1 nach Cisplatin Exposition untersucht werden (Abb. 26A). Die Analyse des GTP Bindungsstatus von Rac1 erfolgte durch den GST-PAK Pulldown-Assay (Abb. 26B).

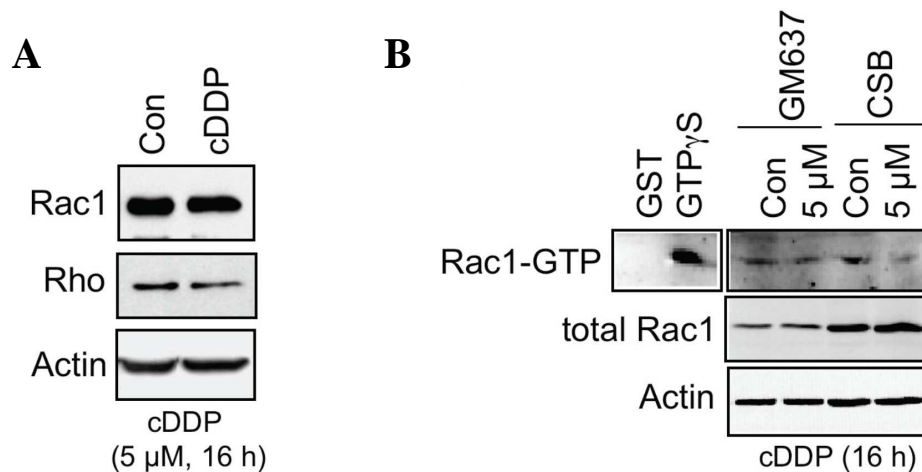


Abbildung 26: Cisplatin induzierte *de novo* Aktivierung von Rac1. (A) 16 h nach kontinuierlicher Cisplatin Behandlung (5 μ M) in CSB-Zellen, wurde die Expression von Rho GTPase Rac1 und die RhoA-like-GTPase (Rho) in Membranfraktionen bestimmt. (B) Nach 16 h Cisplatin-Behandlung wurde in CSB-profizienten und CSB-defizienten Zellen der GTP-Bidungsstatus von Rac1 mittels GST-Pak Pulldown Assay bestimmt. Als interne Kontrolle wurde die Expression von β -Aktin (Actin) und Total-Rac1 in Gesamtzellextrakten bestimmt. GTP γ S, GST-PAK Pulldown von Zellextrakten, welche mit GTP γ S vorinkubiert wurden (Positivkontrolle). Con sind jeweils unbehandelte Kontrollzellen.

In Abbildung 26 ist gezeigt, dass eine Exposition mit Cisplatin weder zu einem Anstieg an membrangebundenem Rac1 führt (Abb. 26A), noch den GTP Bindungsstatus von Rac1 verändert (Abb. 26B). Eine *de novo* Stimulation von Rac1 durch Cisplatin kann somit ausgeschlossen werden.

3.7 Späte SAPK/JNK Aktivierung führt zum Überleben der Zellen nach Cisplatin-Behandlung

Wie in verschiedenen Publikationen bereits beschrieben, weisen SAPK/JNK über eine Aktivierung nach Cisplatin-Behandlung protektive Funktionen aus (Potapova et al. 1997; Brozovic et al. 2004; Hayakawa et al. 2004). Um herauszufinden, welche Relevanz die SAPK/JNK regulierten Mechanismen zu späten Zeiten nach Cisplatin-Behandlung haben, wurden unserem Versuchsansatz nach 16 h der JNK-Inhibitor SP600125 hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von bis zu 40 h wurde das Zellüberleben (Viabilität) mittels WST-Assay untersucht.

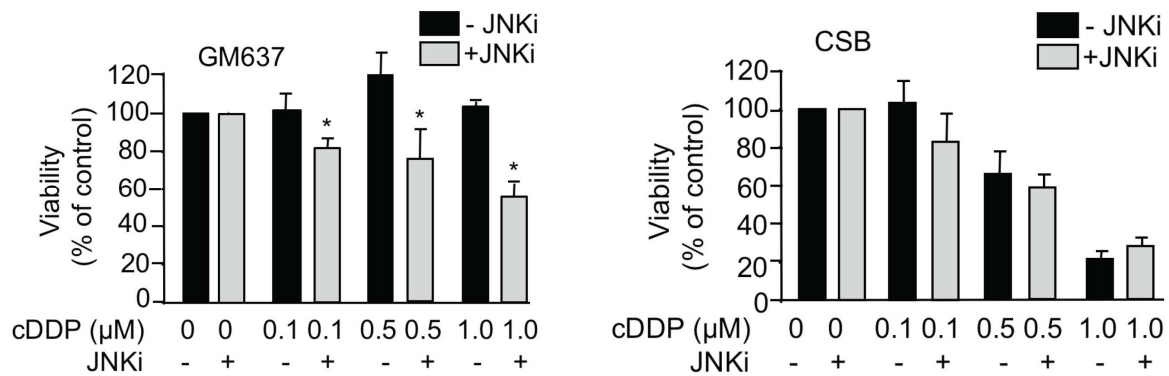


Abbildung 28: Aktivierung der SAPK/JNK durch Cisplatin führt zum Überleben der GM637-Zellen. Logarithmisch wachsende Wildtyp (GM637) und CSB-defiziente Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0,1-1 μM) für 16 h behandelt. Nachdem das alte Medium, durch neues Cisplatin-freies, mit JNK-Inhibitor SP600125 (10 μM) ersetzt wurde folgte eine weitere Inkubation für 8 h. Nach dieser Inkubation wurde das Medium ein weiteres Mal durch frisches ersetzt. 40 h danach erfolgte die Messung der Zellvitalität mittels WST-1 (tetrazolium salt 1) Assay. Die Zellvitalität von nicht mit Cisplatin behandelten Zellen wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD aus n=3 Versuchen

Aus dem Ergebnis aus Abbildung 28 ist zu erkennen, dass unter diesen experimentellen Bedingungen die Sensitivität von GM637 wildtypischen Zellen nach Cisplatinbehandlung erhöht wird. Dies ist mit den bereits publizierten Daten konform, die ebenfalls eine protektive Funktion der SAPK/JNK beschrieben haben. CSB-defiziente Fibroblasten dahingegen zeigen keinen Effekt nach JNK-Inhibition.

4. Diskussion

Stress-aktivierte Protein-Kinasen/c-Jun-N-terminale Kinasen SAPK/JNK sind von immenser Bedeutung für das zelluläre Überleben von Zellen nach genotoxischen Stress. Grund dieser Tatsache ist, dass SAPK/JNK eine Vielzahl von Zielproteinen regulieren, die für die Reparatur und das Überleben von Zellen wichtig sind. Dabei kann eine Aktivierung der SAPK/JNK zwei gegensätzliche Konsequenzen haben. Zum einen kann die SAPK/JNK zu pro-apoptotischen (Brozovic et al., 2004; Sanchez-Perez et al., 2000), als auch zu anti-apoptotischen Signalen führen. Diese Tatsache lässt die Vermutung zu, dass das zelluläre System, als auch die Dauer und Signalstärke der SAPK/JNK Aktivierung darüber entscheiden, ob die Zelle stirbt oder überlebt.

Bei der Aktivierung der SAPK/JNK durch Genotoxine können zwei Wege unterschieden werden: 1.) einen rezeptorvermittelten Weg für frühe Stressereignisse und 2.) einen DNA-schadensabhängigen Weg. Die frühe rezeptorvermittelte Aktivierung erfolgt über kleine GTPasen und MEK-Kinasen (Canman et al. 1996; Rosette et al. 1996). Die DNA-schadensabhängige Aktivierung der SAPK/JNK ist dahingegen weniger charakterisiert, stellt aber vermutlich eine späte Reaktion auf genotoxischen Stress dar (Fritz et al. 2006, Brozovic et al. 2004). Es wird angenommen, dass der Hauptteil der SAPK/JNK Aktivierung rezeptorvermittelt abläuft. Verschiedene Publikationen zeigen, dass DNA-Reparatur defiziente Zellen sich in Bezug auf die Genotoxin-vermittelte Aktivierung der SAPK/JNK von Wildtypzellen unterscheiden (Nehme et al., 1997; Hamdi et al., 2005; Dhar et al. 1996). Auf Grundlage dieser Daten wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch DNA-Schäden das Genotoxin vermittelte Signalling der SAPK/JNK beeinflussen.

In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, dass DNA-Schäden, hervorgerufen durch Cisplatin-Behandlung, ebenfalls zu einer Aktivierung der SAPK/JNK führen können. Weiterhin sollte der molekulare Mechanismus hierfür näher beschrieben und aufgezeigt werden. In früheren Untersuchungen konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine dosisabhängige Stimulation der SAPK/JNK in direkter Korrelation zur gesamten DNA-Platinierung steht. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden weiterführende Untersuchungen durchgeführt. Früheren Untersuchungen folgend wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls wildtypische humane GM637-Fibroblasten benutzt, und die Korrelation zwischen der SAPK/JNK Aktivierung und der Bildung von 1,2-GG

intrastrand-crosslinks untersucht. Die erhobenen Befunde bestätigten die Resultate der oben genannten Vorarbeiten.

Zunächst sollte überprüft werden, ob reaktive Sauerstoffspezies möglicherweise die späte Cisplatin abhängige SAPK/JNK Aktivierung auszulösen vermögen. Durch FACS-Analysen unter Verwendung eines ROS-spezifischen Substrates (DCF) konnte dies allerdings ausgeschlossen werden. Da ROS vermittelte Effekte nun ausgeschlossen waren, sollte weiterhin überprüft werden, inwieweit „geschädigte“ DNA für die Aktivierung der SAPK/JNK verantwortlich ist. Zum Beweis wurde platinierter DNA in unbehandelte Wildtypzellen transfiziert und anschließend der Phosphorylierungszustand der SAPK/JNK untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Aktivierung der Stresskinase durch Phosphorylierung. Somit konnte geschlossen werden, dass Cisplatin-DNA-Addukte fähig sind, die Phosphorylierung der SAPK/JNK zu verursachen. Dieses Ergebnis geht konform mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die zeigten, dass ein einziger DNA-interstrand-crosslink ausreicht, um in zellfreien Extrakten den Checkpoint Signalweg zu beeinflussen (Ben-Yehoyada et al., 2009). Mittels weiterer Untersuchungen sollte gezeigt werden, dass Cisplatin induzierte DNA-Addukte zur Aktivierung des SAPK/JNK Signalweges führen. Daher wurden Zellen mit einem Defekt in der TC-NER, einem der Hauptreparaturwege bestimmend für Stressantworten, DNA-Reparatur und Zelltod, untersucht (Fousteri et al., 2008; Ljungman et al., 2007; Ljungman, 2005). CSB-Zellen zeigen einen Defekt in der TC-NER und weisen auch eine verstärkte Phosphorylierung der SAPK/JNK, besonders zu späten Zeiten (16 h und 24 h) nach Cisplatin-Behandlung im Vergleich zu den GM637 Wildtypzellen auf. Auch bei bereits geringen Dosen von 2 und 5 μM zeigen CSB-defiziente Zellen eine deutliche Phosphorylierung der SAPK/JNK im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp.

Man könnte nun darauf schließen, dass andere Eigenschaften der CSB-Zellen zu einem solchen Ergebnis führen können. Um zu verifizieren, dass der Phänotyp, also die Aktivierung der SAPK/JNK zu späten Zeiten im Defekt des CSB-Proteins liegt, wurden primäre humane Fibroblasten mit siRNA für CSB transfiziert und anschließend der Phosphorylierungsstatus der SAPK/JNK überprüft. Die transient transfizierten primären Fibroblasten zeigen nach knockdown von CSB-Protein eine deutliche Phosphorylierung und damit Aktivierung der SAPK/JNK. Wildtypische Kontrollen (con) zeigen diesen Effekt nicht. Ebenfalls CSB-defiziente Mausfibroblasten zeigen die gleiche phänotypische Ausprägung. Vergleichend mit CSB-Zellen zeigen auch humane XPA-Zellen zu späten Zeiten eine erhöhte SAPK/JNK Phosphorylierung nach Cisplatin

Exposition. Im Gegensatz dazu zeigen Zellen mit einem Defekt in der globalen NER (z.B.: XPC-Zellen) eine reduzierte SAPK/JNK Phosphorylierung auf Cisplatin Behandlung.

Die Ergebnisse zeigten, dass ein Verlust in der TC-NER eine späte durch Cisplatin hervorgerufene Phosphorylierung der SAPK/JNK bewirkt, die mit der Bildung von Cisplatin DNA-Addukten einhergeht. Erstaunlich jedoch ist die Tatsache, dass außer XPA, ERCC1 und BRCA2 defekten Zellen auch weitere Zellen die späte Phosphorylierung der SAPK/JNK nach Cisplatin Behandlung zeigen (Tab. 1). Somit kann gesagt werden, dass einzelne Reparaturfaktoren in unterschiedlichem Ausmaß für die Aktivierung der SAPK/JNK notwendig sind. XPC beispielsweise wird beschrieben als essentieller Bestandteil der SAPK/JNK Aktivierung nach Behandlung von Zellen mit UV-Licht (Hamdi et al., 2005). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unterschiedliche DNA Reparatur-Proteine wichtige, Reparatur unabhängige Funktionen, in der DNA-Schadensantwort spielen.

Im Folgenden sollte der Mechanismus geklärt werden, der dazu führt, dass die späte, durch Cisplatin induzierte SAPK/JNK Aktivierung überhaupt stattfindet. Eine Frage, die sich stellte, war, ob DNA-Doppelstrangbrüche ein möglicher Auslöser sein könnten. In verschiedenen Publikationen wurden sowohl Doppelstrangbrüche als auch ein Replikationsblock als potente Vermittler von Stressantworten bereits beschrieben (Durocher et al., 2001; Harper et al., 2007). Die SAPK/JNK betreffend konnte bereits gezeigt werden, dass eine Hemmung der replikativen DNA-Polymerase ausreicht, um die duale Phosphorylierung zu stimulieren (Damrot et al., 2009). Im Zusammenschluss mit früheren Ergebnisse könnte man über Replikations abhängige Ereignisse spekulieren, die zusammen mit der Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB), welche durch das Fehlen der TC-NER bedingt sind, das ultimative Signal für die späte Phosphorylierung und somit die Aktivierung der SAPK/JNK nach langanhaltender Cisplatinbehandlung darstellen. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse der ATM/ATR katalysierten Phosphorylierung von H2AX untermauert. Dort war sowohl auf Proteinebene als auch nach immunhistochemischer Methodik in Form von γ H2AX Foci eine deutliche Phosphorylierung des H2AX-Proteins in TC-NER defekten Zellen zu erkennen. Dieses Ergebnis wird durch Resultate unter Verwendung des gezeigten neutralen Komet Assay unterstützt, der als Marker für Doppelstrangbrüche weithin eingesetzt wird.

Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, sind außer Doppelstrangbrüche auch replikative Mechanismen verändert. So ist auch der Phosphorylierungsstatus von ATR (p-ATR) in CSB-defizienten Zellen erhöht. ATM/ATR regulierte Checkpoint-Kinasen sind als Folge einer Langzeitbehandlung (24 h) mit Cisplatin ebenfalls deutlich erhöht im Vergleich zu wildtypischen GM637-Zellen. Ein weiterer Marker für replikative Mechanismen ist das sogenannte replikative Protein A, kurz RPA. RPA wird durch ATR-katalysierte Prozesse phosphoryliert. Das RPA-Protein wurde mittels Immunhistochemie und Western-Blot Analyse auf Phosphorylierungsprozesse hin untersucht. Diese Ergebnisse in ihrer Summe deuten darauf hin, dass Cisplatin in TC-NER defekten Zellen zu späten Zeiten replikativen Stress auslöst. Bestätigt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass wachsende, somit replikative Zellen, im Gegensatz zu konfluent und nicht proliferierenden Zellen, ebenfalls eine durch Cisplatin hervorgerufene Aktivierung der SAPK/JNK zeigen. Dieses Ergebnis zeigt sich aber nicht nur in CSB-Zellen, sondern ebenfalls in Primären humanen Fibroblasten, als auch in Nagerzellen wie den hier verwendeten Balb/c Zellen.

Wie lassen sich nun die hier gefundenen Resultate interpretieren? Eine Hypothese für die oben genannten Ergebnisse ist, dass Cisplatin-DNA-Addukte in transkriptionell aktiven Regionen des Genoms zu replikativem Stress führen. Dieser replikative Stress bedingt als Folge die Aktivierung der SAPK/JNK. Die Stressantwort ist dabei verstärkt, wenn die transkriptionsgekoppelte NER defekt ist, alle übrigen Signalfaktoren (inklusive XPC) jedoch vorhanden und funktionsfähig sind. Weiterhin kann davon ausgegangen werden, dass ATR eine große Rolle beim Signalweg zur Aktivierung der SAPK/JNK spielt. ATR selbst ist entscheidend für die Regulation von Stress-Antworten bei blockierter Replikation, als auch an der Ausbildung von γ H2AX-Foci nach Cisplatinbehandlung beteiligt (Pabla et al., 2008). Beachtenswert ist zudem, dass, wie in Abb. 4 dargestellt, die SAPK/JNK ebenfalls durch nicht replizierende platinierter DNA, welche in Wildtypzellen transfiziert wurde, aktiviert wurde. Dieser Befund deutet darauf hin, dass auch Cisplatin Addukte per se, unabhängig vom Replikationsblock, zur Aktivierung von SAPK/JNK beitragen können.

Pharmakologische Inhibition der Transkription zeigte keine hinreichende Aktivierung. Dies kann aus dem Ergebnis geschlossen werden, dass die pharmakologische Hemmung der RNA-Polymerase II keine Aktivierung der SAPK/JNK zur Folge hat. Zum zweiten zeigt sich keine Verstärkung der SAPK/JNK Phosphorylierung bei Inhibition der RNA-Polymerase II und Cisplatin Co-Behandlung.

Die Bedeutung von Doppelstrangbrüchen für die Aktivierung der SAPK/JNK ist unklar. Auf der einen Seite sind Doppelstrangbrüche allein nicht ausreichend, die SEK1/MKK4 katalysierte duale Phosphorylierung der SAPK/JNK zu stimulieren. Dies ist aus den Ergebnissen zu schließen, dass IR, weder allein, noch in Kombination mit RNA-Polymerase II Inhibitoren in der Lage ist, die SAPK/JNK zu phosphorylieren. Auf der anderen Seite zeigen Zellen mit einem Defekt im Non-homologen-End-joining (DNA-PKcs) ebenfalls eine erhöhte SAPK/JNK, sowie CHK1 Phosphorylierung nach Cisplatin Behandlung. In DNA-PKcs-Zellen konnte zudem eine erhöhte H2AX Phosphorylierung gezeigt werden. In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wurde bereits gezeigt, dass SAPK/JNK mit H2AX nach Behandlung mit IR ko-precipitiert (Cook et al., 2009), nach UV-A Strahlung H2AX phosphoryliert (Lu et al. 2006), sowie mit DNA-PKcs interagiert nach MMS (Methan-Methyl-Sulfonat) Behandlung (Fritz, Kaina, 2006). Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse lässt auf eine Verbindung zwischen Doppelstrangbrüchen und dem Phosphorylierungszustand der SAPK/JNK schließen. Diese Ergebnisse lassen insgesamt vermuten, dass DSB zwar essentiell sind für das Auslösen der SAPK/JNK Aktivierung nach Cisplatin Behandlung, jedoch selbst nicht stark genug sind, dies selbsttätig zu tun.

Die überraschende Agenzspezifität der zellulären Stressantwort wird dadurch belegt, dass die Aktivierung der SAPK/JNK nach Behandlung mit alkylierenden Agenzien wie MMS, gegensätzlich zu Cisplatin, eine reduzierte SAPK/JNK Aktivierung in Reparatur defekten CSB- und SCID-Zellen nach sich zieht (Fritz, Kaina 2006). Somit ist erwiesen, dass das Fehlen verschiedener Reparaturfaktoren sowohl die Aktivierung der SAPK/JNK als auch deren Hemmung erwirken kann. Eine SAPK/JNK Aktivierung scheint somit zum einen von der genotoxischen Noxe, zum anderen vom Vorhandensein verschiedener Reparaturfaktoren zur Zeit des DNA-Schadens abzuhängen.

Wie in Abb. 5B gezeigt, ist die späte Aktivierung der SAPK/JNK in CSB-Zellen abhängig von der SEK1/MKK4 Aktivität. Gegensätzlich dazu zeigte Hamdi et al., dass SEK1/MMK4 für die UV-Strahlung abhängige Antwort dieser Zellen nicht notwendig ist (Hamdi et al. 2005). Die reduzierte Expression von MKP-1 (MAPK phosphatase 1) führt zu einer erhöhten durch UV-Licht induzierten SAPK/JNK Antwort sowohl in CSB als auch in c-Fos defizienten Mausfibroblasten (Hamdi et al., 2005; Christmann et al., 2007). Die Untersuchung der MKP-1 in unserem System ergab keine Cisplatin abhängige MKP-1 Induktion oder Hemmung. In früheren Untersuchungen konnte

jedoch gezeigt werden, dass das alkylierende Agens MMS (Methyl-Methan-Sulfonat) es schafft, die MPK-1 Expression zu erhöhen (Fritz, Kaina 2006).

Es wurde bereits erwähnt, dass es einen Rezeptorvermittelten Signalweg der SAPK/JNK Aktivierung gibt. Daher wurde ebenfalls die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass membrangebundene kleine GTPasen der Rho-Familie, genauer Rac1, ebenfalls Einfluss auf das von uns untersuchte Signalling haben. Rac1, wie andere Studien zeigen, wird als ein sehr wichtiger Regulator der SAPK/JNK beschrieben (Minden et al., 1995; Coso et al., 1995). Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass Rac-1 essentiell für die Aktivierung nach MMS Behandlung (Fritz, Kaina, 2006), als auch UV-Licht ist (Gnad et al., 2000; von Bardeleben et al., 2003). Die Ergebnisse der hier durchgeführten Analysen zeigen, dass Rho-GTPasen auch an der späten Aktivierung der SAPK/JNK beteiligt sind. Da jedoch Cisplatin die Translokation von Rac-1 zur Membran nicht stimuliert, was für eine *de novo* Aktivierung von Rac-1 gesprochen hätte, gehen wir von einer untergeordneten Rolle von membran-assoziiertem Rac-1 aus. Rac-1, so zeigen die Arbeiten von Sandrock et al konnte ebenfalls im Zellkern nachweisen werden. (Sandrock et al., 2010). Gleiches gilt natürlich auch für Rezeptor (EGFR) und nicht-rezeptor Tyrosinkinase (c-Abl), die wir in Tabelle 2 gezeigt haben. Somit spielen diese Faktoren wohl alle eine untergeordnete Rolle.

Welcher Faktor die Brücke zwischen dem DNA-Schaden und dem SAPK/JNK Signalweg schlägt ist unklar. Nach den hier getätigten Untersuchungen wäre eine Möglichkeit das c-Abl Protein. Studien zeigen bereits, dass c-abl durch Genotoxine, wie beispielsweise Cisplatin aktiviert wird (Kharbanda et al., 1995; Liu et al., 1996). Die Regulation von c-Abl erfolgt über ATM-abhängige Signalwege wie Baskaran oder auch Shafman zeigen konnten (Baskaran et al., 1997; Shafman et al., 1997). Kharbanda konnte zeigen, dass c-Abl in der Lage ist die MEK Kinase 1 (MEKK1) zu aktivieren (Kharbanda et al., 2000). Da die MEKK1 die Upstream-Kinase der auch hier untersuchten SEK1/MKK4 ist könnte c-Abl somit eine Vermittlerfunktion zwischen DNA-Schaden und SAPK/JNK Signalweg einnehmen. Die Rolle des Vermittlers c-Abl konnte analog dazu auch schon nach ionisierender Strahlung für die ATM und DNA-PKcs defizienten Zellen gezeigt werden (Shangary et al., 2000).

Im Folgenden ist ein Modell dargestellt, das den Zusammenhang zwischen dem Cisplatin bedingten DNA-Schäden, der Reparatur und SAPK/JNK illustriert.

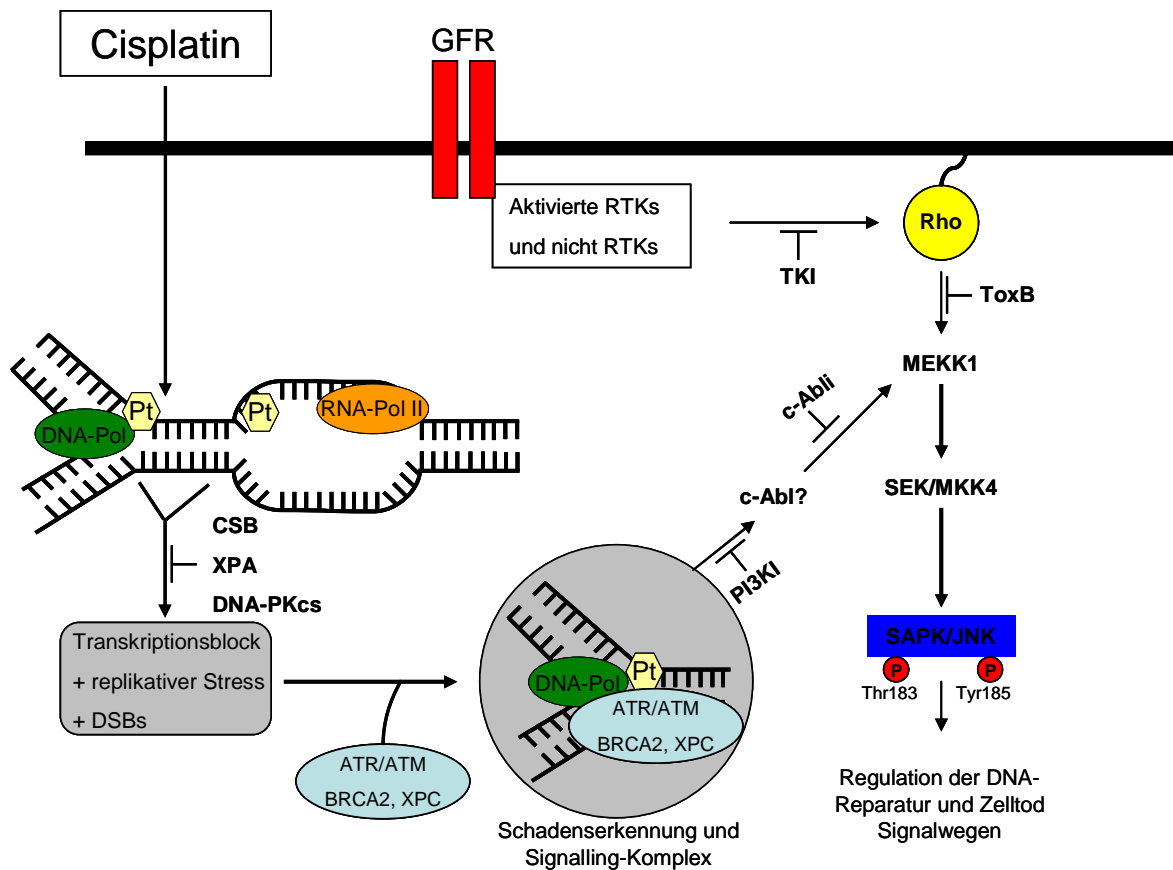


Abbildung 28: Modell der späten DNA-Schaden vermittelten Aktivierung der SAPK/JNK nach Cisplatin Behandlung.

In diesem Modell ist gezeigt, dass neben DNA-schadensunabhängigen Mechanismen, welches eine frühe SAPK/JNK Aktivierung über Rezeptortyrosin-kinasen (RTKs) und nicht Rezeptortyrosinkinasen bewirken auch DNA-schadensabhängige Mechanismen existieren.

In diesem Schaubild wird die Hypothese dieser Arbeit, dass DNA-Schaden die späte, durch Cisplatin hervorgerufene Aktivierung der SAPK/JNK in TC-NER und DNA-PKcs defizienten Zellen vermittelt, gezeigt. Grundlage dieser späten SAPK/JNK Aktivierung ist, dass Cisplatin DNA-Addukte in transkribierten Genen innerhalb des Reparaturprozesses nicht korrekt repariert wurden. Resultierend daraus findet eine anhaltende Blockade der Transkription statt, die in TC-NER defekten Zellen zum replikativen Stress führt.

Der sich entwickelnde replikative Stress, zusammen mit DNA-Platin Addukten, Doppelstrangbrüchen, sowie Entwindung der DNA-Helix, führen zur Rekrutierung weiterer multifunktionaler Reparatur- als auch Signalfaktor-Proteine. Diese Proteine bilden vermutlich einen Komplex, welcher wiederum den Signalweg zur SAPK/JNK in

Abhängigkeit der SEK1/MKK4 vermittelt. Wie oben bereits beschrieben, liegt die Vermutung nahe, dass die Protein-Tyrosin-Kinase c-abl die Verbindung zwischen dem DNA-Schaden und der SEK1 vermittelten Aktivierung der SAPK/JNK herstellt. Weiterführende Untersuchungen, die nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit waren, sollten diesen Sachverhalt klären. Nach Aktivierung der SAPK/JNK werden DNA-Reparatur oder auch Zelltod-Signalwege reguliert (Roos, Kaina, 2006).

5. Zusammenfassung

Stress-aktivierte-Protein-Kinasen (c-Jun-N-terminal kinases) SAPK/JNK werden sehr schnell nach Exposition von Zellen mit verschiedensten Noxen, wie beispielsweise Genotoxinen, aktiviert. Sie sind allerdings noch nicht als Teil der DNA-Schadensantwort etabliert.

In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, dass SAPK/JNK einen wichtigen Teil innerhalb der DNA-Schadensantwort spielen. Aus diesem Grund wurde zu frühen (z.B.: 4 h) als auch zu späten Zeiten (z.B.: 24 h) die Bildung von DNA-Addukten nach Cisplatin Exposition untersucht und überprüft, ob diese mit dem Aktivierungsstatus der SAPK/JNK nach Cisplatinbehandlung korreliert.

Menschliche Fibroblasten, die einen Defekt in der Transkription gekoppelten Nukleotid-Exzisionsreparatur (TC-NER) aufwiesen, wie beispielsweise CSB-Zellen (Cockane Syndrom B) oder XPA-Zellen (Xeroderma Pigmentosum A), sind charakterisiert durch einen erhöhten Phosphorylierungsstatus der SAPK/JNK, 16 h nach Cisplatingabe, im Vergleich zu normalen Wildtyp-Fibroblasten. Die nach Cisplatin Exposition beobachtete Aktivierung der SAPK/JNK ist quantitativ jedoch nicht vergleichbar mit dem Level an gebildeten Cisplatin-DNA-Addukten, wie in den Southwestern- und Massenspektrometrischen Untersuchungen gezeigt werden konnte. Es konnten jedoch Parallelen zwischen der Aktivierung der SAPK/JNK, sowie den gezeigten γ -H2AX-Foci als auch der Aktivierung von Check-Point Kinasen gefunden werden. Dies lässt darauf schließen, dass DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) an der späten Aktivierung des SAPK/JNK Signalweges beteiligt sind.

Dementsprechend lässt sich ebenfalls in Zellen, die einen Defekt in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen aufweisen, wie beispielsweise DNA-PKcs Zellen, eine erhöhte, durch Cisplatin hervorgerufene späte Phosphorylierung der SAPK/JNK als auch eine vermehrte γ -H2AX-Foci Bildung und Check-Point Kinasen Aktivierung nachweisen.

Vergleichend dazu zeigten Zellen mit einem Defekt in ATM (Ataxia telegiectasia mutated protein) oder XPC keine erhöhte Phosphorylierung zu späten Zeiten nach Cisplatin Behandlung.

Weiterhin bleibt festzuhalten, dass die späte, durch Cisplatin hervorgerufene Schadensantwort unabhängig von p53, ER-Stress oder MKP-1 ist. Die SAPK/JNK Aktivierung nach Cisplatin Exposition erfordert funktionsfähige Rho-GTPasen und kann durch pharmakologische Hemmung der Tyrosin-Kinasen und durch N-Acetylcystein gehemmt werden.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass die durch Cisplatin induzierte späte SAPK/JNK Aktivierung durch die Formation von DSB initiiert wird und XPC, Rho-Proteine sowie Tyrosin Kinasen an der Signalweiterleitung beteiligt sind.

6. Summary

Stress activated protein kinases (c-Jun-N-terminal kinases) SAPK/JNK are rapidly activated by various genotoxins but are not yet established as part of the DNA damage response. Here we show that the level of cisplatin-induced DNA adducts correlated with the activation status of SAPK/JNK both at early (i.e. 4 h) and late (i.e. 24 h) time points after exposure. Human cells deficient in transcription-coupled nucleotide excision repair (TC-NER) due to lack of CSB (Cockayne Syndrom B) or XPA (Xeroderma Pigmentosum A) protein are characterized by an enhanced phosphorylation status of SAPK/JNK 16-24 h after cisplatin treatment as compared to corresponding wild-type cells. Ameliorated late SAPK/JNK activation in CSB defective cells is not paralleled by the level of Cisplatin DNA adducts as determined by mass spectrometry and southwestern analysis. Yet, it is paralleled by enhanced γ H2AX foci formation and checkpoint activation, indicating DNA double strand breaks (DSB) being involved in triggering late signalling to SAPK/JNK. Correspondingly, cells deficient in the repair of DSB due to a defect in DNA-PKcs showed elevated cisplatin-induced late phosphorylation of SAPK/JNK as well as ameliorated γ H2AX foci formation and checkpoint activation. Cells defective in ATM (Ataxia telangiectasia) or XPC (Xeroderma Pigmentosum C) protein do not reveal increased SAPK/JNK activation at late time point after cisplatin treatment. Cisplatin-induced late damage response in CSB cells is independent of both p53, MKP-1 and ER-stress. It requires functional Rho GTPases and can be attenuated by pharmacological inhibition of tyrosine kinase activity and by N-acetylcystein. Summarizing, we identified SAPK/JNK as a novel player in the late DNA damage response to cisplatin. Cisplatin-induced late SAPK/JNK activation seems to be triggered by the formation of DSB and furthermore, involves XPC and Rho proteins as well as tyrosine kinases.

7. Literaturverzeichnis

A

ABOUSSEKHRA, A., BIGGERSTAFF, M., SHIVJI, M. K., VILPO, J. A., MONCOLLIN, V., PODUST, V. N., PROTIC, M., HUBSCHER, U., EGLY, J. M. & WOOD, R. D. (1995). Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* **80**, 859-68

ABOUSSEKHRA, A. & WOOD, R. D. (1995). Detection of nucleotide excision repair incisions in human fibroblasts by immunostaining for PCNA. *Exp Cell Res* **221**, 326-32

AKTORIES, K. & JUST, I. (2005). Clostridial Rho-inhibiting protein toxins. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **291**, 113-45

ARAUJO, S. J., TIRODE, F., COIN, F., POSPIECH, H., SYVAOJA, J. E., STUCKI, M., HUBSCHER, U., EGLY, J. M. & WOOD, R. D. (2000). Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: Definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK. *Genes Dev.* **14**, 349-59

B

BAGRODIA, S., DERIJARD, B., DAVIS, R. J. & CERIONE, R. A. (1995a). Cdc42 and PAK-mediated signalling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* **270**, 27995-8

BAGRODIA, S., TAYLOR, S. J., CREAMY, C. L., CHERNOFF, J. & CERIONE, R. A. (1995b). Identification of a mouse p21Cdc42/Rac activated kinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 22731-7

BAKKENIST, C. J. & KASTAN, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499-506

BANCROFT, D. P., LEPRE, C. A. & LIPPARD, S. J. (1990). 195PtN MR Kinetic and Mechanistic Studies of cis- and trans-Diamminedichloroplatinum(II) Binding to DNA. *J. Am. Chem. SOC* **112**, 6860-687 1

BARDELEBEN, R., KAINA, B. & FRITZ, G. (2003). Ultraviolet light-induced apoptotic death is impaired by the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**, 401-7

BASKARAN, R., WOOD, L. D., WHITAKER, L. L., CANMAN, C. E., MORGAN, S. E., XU, Y., BARLOW, C., BALTIMORE, D., WYNshaw-BORIS, A., KASTAN, M. B. & WANG, J. Y. (1997). Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature* **387**, 516-9

BENHAR, M., ENGELBERG, D., and LEVITZKI, A. (2002). ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep.* **3**, 420-425

BEN-YEHOYADA, M., WANG, L. C., KOZEKOV, I. D., RIZZO, C. J., GOTTESMAN, M. E., and GAUTIER, J. (2009). Checkpoint signaling from a single DNA interstrand crosslink *Mol. Cell* **35**, 704–715

BROZOVIC, A. & OSMAK, M. (2007). Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. *Cancer Lett.* **251**, 1-16

BROZOVIC, A., FRITZ, G., CHRISTMANN, M., ZISOWSKY, J., JAEHDE, U., OSMAK, M., and KAINA, B. (2004). Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance. *Int. J. Cancer* **112**, 974–985

BULMER, J. T., ZACAL, N. J. & RAINBOW, A. J. (2005). Human cells deficient in transcription-coupled repair show prolonged activation of the Jun N-terminal kinase and increased sensitivity following cisplatin treatment. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **56**, 189-98

C

CANMAN, C. E., and KASTAN, M. B. (1996). Signal transduction - 3 paths to stress relief. *Nature* **384**, 213–214

CHEN, Y. R., MEYER, C. F. & TAN, T. H. (1996). Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **271**, 631-4

CHRISTMANN, M., TOMICIC, M. T., AASLAND, D., and KAINA, B. (2007). A role for UV-light-induced c-Fos: Stimulation of nucleotide excision repair and protection against sustained JNK activation and apoptosis. *Carcinogenesis* **28**, 183–190

CHRISTMANN, M., TOMICIC-CHRISTMANN, M., ROOS, W. P., and KAINA, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair? An update. *Toxicology* **193**, 3-34

CLEAVER, J. E. & HULTNER, M. L. (1995). Transcription-related human disorders. *Am. J. Hum. Genet.* **56**, 1257-61

COOK, P. J., JU, B. G., TELESE, F., WANG, X., GLASS, C. K., and ROSENFELD, M. G. (2009). Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions *Nature* **458**, 591–596

COLELLA, S., NARDO, T., MALLERY, D., BORRONE, C., RICCI, R., RUFFA, G., LEHMANN, A. R. & STEFANINI, M. (1999). Alterations in the CSB gene in three Italian patients with the severe form of Cockayne syndrome (CS) but without clinical photosensitivity. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 935-41

COSO, O. A., CHIARIELLO, M., YU, J. C., TERAMOTO, H., CRESPO, P., XU, N., MIKI, T. & GUTKIND, J. S. (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**, 1137-46

CRITCHLOW, S. E., JACKSON, S. P. (1998). DNA end-joining: From yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 394-398

CROMIE, G.A., CONELLY, J.C., LEACH, D.R.F. (2001). Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Mol. Cell.* **8**, 1163-74

CULLINANE, C., MAZUR, S. J., ESSIGMANN, J. M., PHILLIPS, D. R. & BOHR, V. A. (1999). Inhibition of RNA Polymerase II Transcription in Human Cell Extracts by Cisplatin DNA Damage. *Biochemistry* **38**, 6204-6212

D

DAMROT, J., HELBIG, L., ROOS, W. P., BARRANTES, S. Q., KAINA, B., and FRITZ, G. (2009). DNA replication arrest in response to genotoxic stress provokes early activation of stress-activated protein kinases (SAPK/JNK). *J. Mol. Biol.* **385**, 1409-1421

DE JAGER, M. VAN NOORT, J., VAN GENT, D.C., DEKKER, C., KANAAR, R., WYMAN, C. (2001). Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol. Cell.* **8**(5), 1129-35.

DHAR, V., ADLER, V., LEHMANN, A., and RONAI, Z. (1996). Impaired jun-NH2-terminal kinase activation by ultraviolet irradiation in fibroblasts of patients with Cockayne syndrome complementation group B. *Cell Growth Differ.* **7**, 841-846

DIKOMEY, E., DAHM-DAPHI, J., BRAMMER, I., MARTENSEN, R. & KAINA, B. (1998). Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* **73**, 269-78

DUNKERN, T. R., FRITZ, G. & KAINA, B. (2001). Ultraviolet light-induced DNA damage triggers apoptosis in nucleotide excision repair-deficient cells via Bcl-2 decline and caspase-3/-8 activation. *Oncogene* **20**, 6026-38

DOLLFUS, H., PORTO, F., CAUSSADE, P., SPEEG-SCHATZ, C., SAHEL, J., GROSSHANS, E., FLAMENT, J. & SARASIN, A. (2003). Ocular manifestations in the inherited DNA repair disorders. *Surv. Ophthalmol.* **48**, 107-22

DUROCHER, D., and JACKSON, S. P. (2001). DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 225-231

E

ELBEIN, A.D., (1984). Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharides. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **16**(1), 21-49

EVANS, E., MOGGS, J. G., HWANG, J. R., EGLY, J. M. & WOOD, R. D. (1997). Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *Embo J.* **16**, 6559-73

F

FICHTINGER-SCHEPMAN, A. M., VAN DER VEER, J. L., DEN HARTOG, J. H., LOHMAN, P. H. & REEDIJK, J. (1985). Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* **24**, 707-13

FLEMING, Y., ARMSTRONG, C. G., MORRICE, N., PATERSON, A., GOEDERT, M. & COHEN, P. (2000). Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7. *Biochem J.* **352 Pt 1**, 145-54

FOUSTERI, M., and MULLENDERS, L. H. (2008). Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res.* **18**, 73–84

FRAKER, P.J., KING, L.E., LILL-ELGHANIAN, D., TELFORD, W.G (1995). Quantification of apoptotic events in pure and heterogeneous populations of cells using the flow cytometer. *Methods Cell Biol.* **46**, 57–76

FRANKE, B., AKKERMAN J.W., BOS, J.L. (1997). Rapid Ca²⁺-mediated activation of Rap1 in human platelets. *EMBO J.* **16**, 252–259

FRIEDBERG, E. C., BARDWELL, A. J., BARDWELL, L., FEAVER, W. J., KORNBERG, R. D., SVEJSTRUP, J. Q., TOMKINSON, A. E. & WANG, Z. (1995). Nucleotide excision repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: its relationship to specialized mitotic recombination and RNA polymerase II basal transcription. *Philos. Trans R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **347**, 63-8

FRITZ, G. & KAINA, B. (2006). Late activation of stress kinases (SAPK/JNK) by genotoxins requires the DNA repair proteins DNA-PKcs and CSB. *Mol. Biol. Cell* **17**, 851-61

FRITZ, G. & KAINA, B. (2000). Ras-related GTPase RhoB forces alkylation-induced apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 784-9

FRITZ, G., JUST, I., WOLLENBERG, P. & AKTORIES, K. (1994). Differentiation-induced increase in *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme-catalyzed ADP-ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *Eur. J. Biochem.* **223**, 909-16

FUSS, J.O., COOPER, P.K. (2006). DNA repair: dynamic defenders against cancer and aging *PLoS Biol.* **Epub**, 2006

G

GNAD, R., AKTORIES, K., KAINA, B. & FRITZ, G. (2000). Inhibition of protein isoprenylation impairs rhoregulated early cellular response to genotoxic stress. *Mol Pharmacol* **58**, 1389-97

GOLUB, E. I., GUPTA, R. C., HAAF, T., WOLD, M. S. & RADDING, C. M. (1998). Interaction of human rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic Acids Res* **26**, 5388-93

GOODALL, J.C., WU J. (2010). Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression. *PNAS* Vol.107 no. **41**, 17698-17703

GOTTLIEB, T.M, JACKSON, S.P. (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**(1), 131-42.

GUPTA, S., BARRETT, T., WHITMARSH, A. J., CAVANAGH, J., SLUSS, H. K., DERIJARD, B. & DAVIS, R. J. (1996). Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo J.* **15**, 2760-70

GUZDER, S. N., HABRAKEN, Y., SUNG, P., PRAKASH, L. & PRAKASH, S. (1995). Reconstitution of yeast nucleotide excision repair with purified Rad proteins, replication protein A, and transcription factor TFIIH. *J. Biol. Chem.* **270**, 12973-6

H

HABER, J.E. (2000). Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet.* **16**, 259-64

HAGEMANN, C. & BLANK, J. L. (2001). The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal* **13**, 863-75

HAMDI, M., KOOL, J., CORNELISSEN-STEIJGER, P., CARLOTTI, F., POPEIJUS, H. E., VAN DER BURGT, C., JANSSEN, J. M., YASUI, A., HOEBEN, R. C., TERLETH, C., MULLENDERS, L. H. & VAN DAM, H. (2005). DNA damage in transcribed genes induces apoptosis via the JNK pathway and the JNK-phosphatase MKP-1. *Oncogene* **24**, 7135-44

HANSSON, J. & WOOD, R. D. (1989) Repair synthesis by human cell extracts in DNA damaged by cis and trans- diamminedichloroplatinum (II). *Nucleic Acids Res.***17** (**20**), 8073 – 8091

HARDER, H. C., SMITH, R. G. & LEROY, A. F. (1976). Template primer inactivation by cis- and transdichlorodiammine platinum for human DNA polymerase alpha, beta, and Rauscher murine leukemia virus reverse transcriptase, as a mechanism of cytotoxicity. *Cancer Res.* **36**, 3821-9

HARPER, J.W., ELLEDGE, S.J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* **28**, 739–745

HARTLEY, K. O., GELL, D., SMITH, G. C., ZHANG, H., DIVECHA, N., CONNELLY, M. A., ADMON, A., LEESMILLER, S. P., ANDERSON, C. W. & JACKSON, S. P. (1995). DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. *Cell* **82**, 849-56

HAYAKAWA, J., DEPATIE, C., OHMICH, M., and MERCOLA, D. (2003). The activation of c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) by DNA-damaging agents serves to promote drug resistance via activating transcription factor 2 (ATF2)-dependent enhanced DNA repair. *J. Biol. Chem.* **278**, 20582–20592

HERRLICH P., BLATTNER C., KNEBEL A., BENDER K., RAHMSDORF H.J. (1997). Nuclear and non-nuclear targets of genotoxic agents in the induction of gene expression. Shared principles in yeast, rodents, man and plants. *Biol. Chem.* **378**, 217–1229

HIRATA, K., KIKUCHI, A., SASAKI, T., KURODA, S., KAIBUCHI, K., MATSUURA, Y., SEKI, H., SAIDA, K. and TAKAI, Y. (1992). Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J. Biol. Chem.* **267**, 8719-8722

HOLLIDAY. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetical Research* **5**, 282-304

J

JEGGO, P. A., HAFEZPARAST, M., THOMPSON, A. F., BROUGHTON, B. C., KAUR, G. P., ZDZIENICKA, M. Z. & ATHWAL, R. S. (1992). Localization of a DNA repair gene (XRCC5) involved in double-strandbreak rejoining to human chromosome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6423-7

JOHNSON, R. D. & JASIN, M. (2000). Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Embo J.* **19**, 3398-407

JUST, I., SELZER, J., WILM, M., VON EICHEL-STREIBER, C., MANN, M. & AKTORIES, K. (1995a). Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B. *Nature* **375**, 500-3.

JUST, I., WILM, M., SELZER, J., REX, G., VON EICHEL-STREIBER, C., MANN, M. & AKTORIES, K. (1995b). The enterotoxin from Clostridium difficile (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 13932-6

K

KAGAWA, W., KURUMIZAKA, H., IKAWA, S., YOKOYAMA, S. & SHIBATA, T. (2001). Homologous pairing promoted by the human Rad52 protein. *J Biol Chem* **276**, 35201-8

KHARBANDA, S., PANDEY, P., YAMAUCHI, T., KUMAR, S., KANEKI, M., KUMAR, V., BHARTI, A., YUAN, Z. M., GHANEM, L., RANA, A., WEICHSELBAUM, R., JOHNSON, G., and KUFEL, D. (2000). Activation of MEK kinase 1 by the c-Abl protein tyrosine kinase in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4979–4989

KHARBANDA, S., PANDEY, P., REN, R., MAYER, B., ZON, L. & KUFE, D. (1995a). c-Abl activation regulates induction of the SEK1/stress-activated protein kinase pathway in the cellular response to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *J Biol Chem* **270**, 30278-81.

KHARBANDA, S., REN, R., PANDEY, P., SHAFMAN, T. D., FELLER, S. M., WEICHSELBAUM, R. R. & KUFE, D.W. (1995b). Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature* **376**, 785-8.

KOEBERLE, B., ROGINSKAYA, V. & WOOD, R. D. (2006). XPA protein as a limiting factor for nucleotide excision repair and UV sensitivity in human cells. *DNA Repair (Amst)* **5**, 641-8

KOLBUS, A., HERR, I., SCHREIBER, M., DEBATIN, K-M., WAGNER, E.F. and ANGEL, P. (2000). c-Jun dependent induction of CD95L is critically involved in the induction of apoptosis by alkylating agents. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 575-582

KOZMA, R., AHMED, S., BEST, A. & LIM, L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* **15**, 1942-52

KRAEMER, K. H., LEVY, D. D., PARRIS, C. N., GOZUKARA, E. M., MORIWAKI, S., ADELBERG, S. & SEIDMAN, M. M. (1994). Xeroderma pigmentosum and related disorders: examining the linkage between defective DNA repair and cancer. *J. Invest. Dermatol.* **103**, 96S-101S

L

LACKINGER, D., KAINA, B. (2000). Primary mouse fibroblasts deficient for c-Fos, p53 or for both proteins are hypersensitive to UV light and alkylating agent-induced chromosomal breakage and apoptosis. *Mutation Research* **457**, 113-123

LEBER, R., WISE, T. W., MIZUTA, R. & MEEK, K. (1998). The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 1794-801

LEPRE, C. A., STROTHKAMP, K. G. & LIPPARD, S. J. (1987). Synthesis and ¹H NMR spectroscopic characterization of trans-[Pt(NH₃)₂[d(ApGpGpCpCpT)-N7-A(1),N7-G(3)]]. *Biochemistry* **26**, 5651-7

LIPS, J., KAINA, B. (2001). DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. *Carcinogenesis* **22** (4), 579-585

LISNOCK, J., GRIFFIN, P., CALAYCAY, J., FRANTZ, B., PARSONS, J., O'KEEFE, S. J. & LOGRASSO, P. (2000). Activation of JNK3 alpha 1 requires both MKK4 and MKK7: kinetic characterization of in vitro phosphorylated JNK3 alpha 1. *Biochemistry* **39**, 3141-8

LIU, T., GHOSAL, G., YUAN, J., CHEN, J., HUANG, J. (2010). FAN1 acts with FANCI-FANCD2 to promote DNA interstrand cross-link repair. *Science* **329**, 693-6

LIU, Y., GOROSPE, M., YANG, C. & HOLBROOK, N. J. (1995). Role of mitogen-activated protein kinase phosphatase during the cellular response to genotoxic stress. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase activity and AP-1-dependent gene activation. *J Biol Chem* **270**, 8377-80

LJUNGMAN, M. (2007). The transcription stress response. *Cell Cycle* **6**, 2252–2257

LJUNGMAN, M. (2005). Activation of DNA damage signalling. *Mutat. Res.* **577**, 203–216

LJUNGMAN, M. & ZHANG, F. (1996). Blockage of RNA polymerase as a possible trigger for UV light induced apoptosis. *Oncogene* **13**, 823-31

LOEHRER, P. J. & EINHORN, L. H. (1984). Drugs five years later. Cisplatin. *Ann. Intern. Med.* **100**, 704-13

LU, C., ZHU, F., CHO, Y. Y., TANG, F., ZYKOVA, T., MA, W. Y., BODE, A. M., and

DONG, Z. (2006). Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3. *Mol. Cell* **23**, 121–132

M

MA, S., EGYHAZI, S., RINGBORG, U., HANSSON, J. (2002): Immunohistochemical analysis of DNA mismatch repair protein and O6-methylguanine-DNA methyltransferase in melanoma metastases in relation to clinical response to DTIC-based chemotherapy. *Oncol. Rep.* **9**, 1015–1019

MANDIC, A., HANSSON, J., LINDER, S., and SHOSHAN, M. C. (2003). Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 9100–9106

MANSER, E., CHONG, C., ZHAO, Z. S., LEUNG, T., MICHAEL, G., HALL, C. & LIM, L. (1995). Molecular cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family. *J. Biol. Chem.* **270**, 25070-8

MC ELHINNY NICK, S.A., SNOWDEN, C.M., MC CARVILLE, J., RAMSDEN, D.A. (2000). Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol Cell Biol.* **20**, 2996–3003

MINDEN, A., LIN, A., CLARET, F. X., ABO, A. & KARIN, M. (1995). Selective activation of the JNK signalling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**, 1147-57

MINDEN, A., LIN, A., MCMAHON, M., LANGE-CARTER, C., DERIJARD, B., DAVIS, R. J., JOHNSON, G. L. & KARIN, M. (1994). Differential activation of ERK and JNK mitogen activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* **266**, 1719-23

MITCHELL, D. L., PFEIFER, G. P., TAYLOR, J. S., ZDZIENICKA, M. Z. & NIKIAIDO, O. (1993). Biological role of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers. *Frontier of Photobiology*, 337-344

MORII, N., TERU-UCHI, T., TOMINAGA, T., KUMAGAI, N., KOZAKI, S., USHIKUBI, F. and NARUMIYA, S. (1992). A *rho* gene product in human blood platelets. II. Effects of the ADP-ribosylation by botulinum C3 ADP-ribosyltransferase on platelet aggregation. *J. Biol. Chem.* **267**, 20921-20926

MU, D., PARK, C. H., MATSUNAGA, T., HSU, D. S., REARDON, J. T. & SANCAR, A. (1995). Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system. *J. Biol. Chem.* **270**, 2415-8

N

NAEGELI, H. (1995). Mechanisms of DNA damage recognition in mammalian nucleotide excision repair. *Faseb J.* **9**, 1043-50

NEHME, A., BASKARAN, R., NEBEL, S., FINK, D., HOWELL, S. B., WANG, J. Y., and CHRISTEN, R. D. (1999). Induction of JNK and c-Abl signalling by cisplatin and oxaliplatin in mismatch repair-proficient and -deficient cells. *Br. J. Cancer* **79**, 1104-1110

NEHME, A., BASKARAN, R., AEBI, S., FINK, D., NEBEL, S., CENNI, B., WANG, J. Y., HOWELL, S. B. & CHRISTEN, R. D. (1997). Differential induction of c-Jun NH2-terminal kinase and c-Abl kinase in DNA mismatch repair-proficient and -deficient cells exposed to cisplatin. *Cancer Res* **57**, 3253-7

NICOLETTI, I., MIGLIORATI, G., PAGGLIACCI, M.C., GRIGNANI, F., RICCARDI, C (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **139**, 271-279

NOBES, C. D. & HALL, A. (1995).

Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 456-9

O

OYADOMARI, S., MORI, M. (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* **11**, 381-389

P

PABLA, N., HUANG, S., MI, Q. S., DANIEL, R. & DONG, Z. (2008). ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* **283**, 6572-83.

PERSONS, D. L., YAZLOVITSKAYA, E. M., CUI, W. & PELLING, J. C. (1999). Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clin. Cancer Res.* **5**, 1007-14.

PFEIFFER, P., GOEDECKE, W. & OBE, G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* **15**, 289-302

POTAPOVA, O., HAGHIGHI, A., BOST, F., LIU, C., BIRRER, M. J., GJERSET, R., and MERCOLA, D. (1997). The Jun kinase/stress-activated protein kinase pathway functions to regulate DNA repair and inhibition of the pathway sensitizes tumor cells to cisplatin. *J. Biol. Chem.* **272**, 14041–14044

R

RAPIN, I., LINDENBAUM, Y., DICKSON, D. W., KRAEMER, K. H. & ROBBINS, J. H. (2000). Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum. *Neurology* **55**, 1442-9

REEVES, W. H. & STHOEGER, Z. M. (1989). Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) lupus autoantigen. *J. Biol. Chem.* **264**, 5047-52

RICH, T., ALLEN, R. L. & WYLLIE, A. H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* **407**, 777-83

RIDLEY, A. J. & HALL, A. (1992). Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. *Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol.* **57**, 661-71

RIDLEY, A. J., PATERSON, H. F., JOHNSTON, C. L., DIEKMANN, D. & HALL, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-10

RODEMANN, H. P., DITTMANN, K., and TOULANY, M. (2007). Radiation-induced EGFR-signaling and control of DNA-damage repair. *Int. J. Radiat. Biol.* **83**, 781–791

ROOS, W. P., KAINA, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. In *TRENDS in Molecular Medicine* Vol. **12**, 440-450

ROSENBERG, B., VANCAMP, L. & KRIGAS, T. (1965). Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* **205**, 698-9

ROSETTE, C., and KARIN, M. (1996). Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* **274**, 1194–1197

ROUX, P. P. & BLENIS, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 320-44

S

- SANCHEZ-PEREZ, I., MARTINEZ-GOMARIZ, M., WILLIAMS, D., KEYSE, S. M. & PERONA, R. (2000). CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene* **19**, 5142-52
- SANCHEZ-PEREZ, I., MURGUIA, J. R., and PERONA, R. (1998). Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene* **16**, 533–540
- SANCHEZ, I., HUGHES, R. T., MAYER, B. J., YEE, K., WOODGETT, J. R., AVRUCH, J., KYRIAKIS, J. M. & ZON, L. I. (1994). Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* **372**, 794-8
- SANDER, E. E., VAN DELFT, S., TEN KLOOSTER, J.P., REID, T., VAN DER KAMMEN, R.A., MICHIELS, F. COLLARD, J.G. (1998). Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Cell Biol.* **143**, 1385-98
- SANDROCK, K, BIELEK, H., SCHRADI, K., SCHMIDT, G., and KLUGBAUER, N. (2010). The Nuclear Import of the Small GTPase Rac1 is Mediated by the Direct Interaction with Karyopherin $\alpha 2$. *Traffic* **11**, 198–209
- SCHAEFFER, L., MONCOLLIN, V., ROY, R., STAUB, A., MEZZINA, M., SARASIN, A., WEEDA, G., HOEIJMAKERS, J. H. & EGLY, J. M. (1994). The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *Embo J.* **13**, 2388-92
- SCHAEFFER, L., ROY, R., HUMBERT, S., MONCOLLIN, V., VERMEULEN, W., HOEIJMAKERS, J. H., CHAMBON, P. & EGLY, J. M. (1993). DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science* **260**, 58-63
- SEGER, R. & KREBS, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *Faseb J.* **9**, 726-35
- SHAFMAN, T., KHANNA, K. K., KEDAR, P., SPRING, K., KOZLOV, S., YEN, T., HOBSON, K., GATEI, M., ZHANG, N., WATTERS, D., EGERTON, M., SHILOH, Y., KHARBANDA, S., KUFE, D., and LAVIN, M. F. (1997) Interaction between ATM protein and c-Abl in response to DNA damage. *Nature* **387**, 520–523
- SHANGARY, S., LERNER, E. C., ZHAN, Q., COREY, S. J., SMITHGALL, T. E. & BASKARAN, R. (2003). Lyn regulates the cell death response to ultraviolet radiation through c-Jun N terminal kinase dependent Fas ligand activation. *Exp Cell Res* **289**, 67-76
- SHANGARY, S., BROWN, K.D., ADAMSON, A.W., EDMONSON, S., Ng, B., PANDITA, T.K., YALOWICH, J., TACCIOLI, G.E., and BASKARAN, R. (2000) Regulation of DNA-dependent protein kinase activity by ionizing radiation-activated abl kinase is an ATM-dependent process. *J. Biol. Chem.* **275**, 30163–30168
- SHEN, Z., CLOUD, K. G., CHEN, D. J. & PARK, M. S. (1996). Specific interactions between the human RAD51 and RAD52 proteins. *J Biol Chem* **271**, 148-52

- SHILOH, Y. (2006). The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 402-10
- SIJBERS, A. M., VAN DER SPEK, P. J., ODIJK, H., VAN DEN BERG, J., VAN DUIN, M., WESTERVELD, A., JASPERS, N. G., BOOTSMA, D. & HOEIJMAKERS, J. H. (1996). Mutational analysis of the human nucleotide excision repair gene ERCC1. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3370-80
- SIPLEY, J. D., MENNINGER, J. C., HARTLEY, K. O., WARD, D. C., JACKSON, S. P. & ANDERSON, C. W. (1995). Gene for the catalytic subunit of the human DNA-activated protein kinase maps to the site of the XRCC7 gene on chromosome 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7515-9
- SMIDER, V., CHU, G. (1997). The end-joining reaction in V(D)J recombination. *Semin. Immunol.* **9**, 189-197
- SMITH, G. C., JACKSON, S.P. (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes & Dev.* **13**, 916-934
- SONODA, E., TAKATA, M., YAMASHITA, Y. M., MORRISON, C. & TAKEDA, S. (2001). Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8388-94
- SORENSEN, C. M. & EASTMAN, A. (1988). Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* **48**, 6703-7
- STASIAK, A. Z., LARQUET, E., STASIAK, A., MULLER, S., ENGEL, A., VAN DYCK, E., WEST, S. C. & EGELMAN, E. H. (2000). The human Rad52 protein exists as a heptameric ring. *Curr. Biol.* **10**, 337-40
- STEVNSNER, T., NYAGA, S., DE SOUZA-PINTO, N.C., VAN DER HORST, G.T., GORGELS, T.G., HOGUE, B.A., THORSLUND, T., BOHR, V.A. (2002). Mitochondrial repair of 8-oxoguanine is deficient in Cockayne syndrome group B. *Oncogene* **21**(57), 8675-82
- SUGASAWA, K., NG, J. M., MASUTANI, C., IWAI, S., VAN DER SPEK, P. J., EKER, A. P., HANAOKA, F., BOOTSMA, D. & HOEIJMAKERS, J. H. (1998). Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol. Cell* **2**, 223-32
- SVEJSTRUP, J. Q. (2003). Rescue of arrested RNA polymerase II complexes. *J. Cell Sci.* **116**, 447-51

T

TAKATA, M., SASAKI, M. S., SONODA, E., MORRISON, C., HASHIMOTO, M., UTSUMI, H., YAMAGUCHI-IWAI, Y., SHINOHARA, A. & TAKEDA, S. (1998). Homologous recombination and non-homologous endjoining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo J.* **17**, 5497-508

TANG, J. & CHU, G. (2002). Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein. *DNA Repair (Amst)* **1**, 601-16

TOURNIER, C., WHITMARSH, A. J., CAVANAGH, J., BARRETT, T. & DAVIS, R. J. (1997). Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7337-42

V

VASSIN, V.M., ANANTHA, R.W., SOKOLOVA, E., KANNER, S., and BOROWIEC, J.A., (2009). Human RPA phosphorylation by ATR stimulates DNA synthesis and prevents ssDNA accumulation during DNA-replication stress. *J. Cell Science* **122**, 4070-4080

W

WALKER, J.R., CORPINA, R.A., GOLDBERG, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **412**, 607–614

WANG, D. and LIPPARD, S.J. (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 307–320

WANG, H., ZENG, Z. C., BUI, T. A., DIBIASE, S. J., QIN, W., XIA, F., POWELL, S. N., and ILIAKIS, G. (2001). Nonhomologous end-joining of ionizing radiation-induced DNA double-stranded breaks in human tumor cells deficient in BRCA1 or BRCA2. *Cancer Res.* **61**, 270–277

WIDMANN, C., GIBSON, S., JARPE, M. B. & JOHNSON, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* **79**, 143-80

WILHELM, D., BENDER, K., KNEBEL, A. & ANGEL, P. (1997). The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including Jun N-terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents. *Mol. Cell Biol.* **17**, 4792-800

WOBBE, C.R., WEISSBACH, L. (2000). Replication of simian virus 40 origin-containing DNA in vitro with purified proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1834-1838

WOOD, R. D. (1999). DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochemie* **81**, 39-44

WU, Z., WU, J., JACINTO, E. & KARIN, M. (1997). Molecular cloning and characterization of human JNKK2, a novel Jun NH2-terminal kinase-specific kinase. *Mol. Cell Biol.* **17**, 7407-16

X

XIAO, Z., CHEN, Z., GUNASEKERA, A. H., SOWIN, T. J., ROSENBERG, S. H., FESIK, S. & ZHANG, H. (2003). Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J. Biol. Chem.* **278**, 21767-73

Y

YAMAMOTO, M., MARUI, N., SAKAI, T., MORII, N., KOZAKI, S., IKAI, K., IMAMURA, S. and NARUMIYA, S. (1993). ADP-ribosylation of the *rhoA* gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. *Oncogene* **8**, 1449-1455

YANG, X. H. & ZOU, L. (2006). Recruitment of ATR-ATRIP, Rad17, and 9-1-1 complexes to DNA damage. *Methods Enzymol.* **409**, 118-31

YANG, D. D., KUAN, C. Y., WHITMARSH, A. J., RINCON, M., ZHENG, T. S., DAVIS, R. J., RAKIC, P. & FLAVELL, R. A. (1997). Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the *Jnk3* gene. *Nature* **389**, 865-70

YARMOLA, E.G., SOMASUNDARAM, T., BORING, T.A., SPECTOR, I. & BUBB, M.R. (2000). "Actin-latrunculin A structure and function." *J. Biol. Chem.* **275** (36), 28120-28127

YOO, S. and DYNAN, W. (1999). Geometry of a complex formed by double stranded break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4679-4686

Z

ZANKE, B. W., BOUDREAU, K., RUBIE, E., WINNETT, E., TIBBLES, L. A., ZON, L., KYRIAKIS, J., LIU, F. F. & WOODGETT, J. R. (1996). The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr. Biol.* **6**, 606-13

ZOU, L. & ELLEDGE, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**, 1542-8

8. Anhänge

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
cDDP	Cisplatin (<i>Cis</i> -diammindichlorplatin-II)
cDNA	„copy“ - Desoxyribonukleinsäure
cm	zentimeter (1/10 Meter)
con	Kontrolle (Control)
CSB	Cockayne Syndrom; Erbkrankheit. Typ A, B (Defekt in Gen A oder B)
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKcs	katalytische Einheit der DNA-Protein-kinase
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	extracellular signal regulated kinase
FACS	fluorescence activated cell sorter
FKS	fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosin-5'-Phosphat
Gy	Gray
H	Stunde(n)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
IR	ionizing radiation (ionisierende Strahlung)

J	Joule
k	Kilo
kB	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
M	molar
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	mitogen-activated ERK activating kinase
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MKP-1	mitogen-activated protein kinase phosphatase-1
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMS	Methylmethansulfonat
MNNG	Methylnitronitrosoguanidine
mRNA	messenger RNA
nm	nanometer
OD	optische Dichte
p	phospho
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
pH	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pt	Platin
Rac	Ras-related C3-botulinum toxin substrate
Rho	Ras homolog
RNase	Ribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
SAPK/JNK	stress-activated protein kinase, c-Jun-N-terminale Kinase
SDS	Natrium-(Sodium-)dodecylsulfat
sek	Sekunde(n)

siRNA	silecing RNA
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
U/min	Umdrehungen pro Minute
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolette Strahlung (UV-A, nm; UV-B, nm; UV-C, nm)
V	Volt
(v/v)	volume per volume
Vol.	Volumen
WST	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzendisulfonat
WT / wt	Wildtyp
(w/v)	weight per volume
[Wert] x g	Beschreibung der relativen Zentrifugalbeschleunigung (RCF)

8.2 Veröffentlichungen

Publikationen:

Helbig L., Damrot J., Hülsenbeck J., Köberle B., Brozovic A., Osmak M., Fiket Z., Kaina B., Fritz F. Stress-activated protein kinases/c-Jun-N-terminal kinases (SAPK/JNK) are part of a delayed Cisplatin-triggered DNA damage response. *J. Biol. Chem.* 2011 Apr 15; 286(15): 12991-13001.

Brozovic A., Damrot J., Tsaryk R., **Helbig L.**, Nikolova T., Hartig C., Osmak M., Roos W.P., Kaina B., Fritz G. Cisplatin sensitivity is released to late DNA damage processing and checkpoint control rather than to the early DNA damage response. *Mutat. Res.* 2009 Nov 2; 670 (1-2):32-41.

Damrot J., **Helbig L.**, Roos W.P., Barrantes S.Q., Kaina B., Fritz G. DNA replication arrest in response to genotoxic stress provokes early activation of stress-activated protein kinases (SAPK/JNK). *J. Mol. Biol.* 2009 Feb 6; 385(5) 1409-21.

Vorträge:

Helbig L., Fritz G.

Activation of c-Jun-N-terminal kinases (JNK) is part of the late DNA damage response to cisplatin. 51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

Posterpräsentationen:

Fritz G., **Helbig L.**, Kaina B. DNA-Reperatur und Genotoxin-induzierbare Stress-Antworten.

13. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V., Hamburg

Schweikert E.M., Goldeck M., Wilgenbus P., **Helbig L.**, Förstermann U., Horke S. The bacterium *Pseudomonas aeruginosa* subverts our defense by inactivating paraoxonase-2: the search for post-translational modifications. 51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

Helbig L., Damrot J., Hülsenbeck J., Hartig C., Brozovic A., Osmak M., Thomale J., Kaina B., Fritz G. Stress activated protein kinase / c-Jun-N-terminal Kinase (SAPK/JNK) is part of the cellular DNA damage response. 10th International Conference on Environmental Mutagens, Firenze

Helbig L., Hülsenbeck J., Fritz G. Late Activation of stress kinases (SAPK/JNK) by methylating and cross-linking agents in DSB repair defective cells. 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

Fritz G., Damrot J., **Helbig L.**, Roos W.P., Barrantes S.Q., Kaina B. Genotoxin-induced DNA damage contributes to early activation of stress activated protein kinases (SAPK/JNK). *9. Biennial Meeting of the DGDR (Deutsche Gesellschaft für DNA Reperaturforschung), Berlin*

Damrot J., **Helbig L.**, Brachetti T., Kaina B., Fritz G. UV-induced DNA replication block contributes to the activation of stress Kinases (SAPK/JNK). *10. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V., Mainz*

Huljic S., Koehl R., **Helbig L.**, Bruene B., O'Brien E., Dietrich D.R. Effect of the nephrotoxic compounds Aristolochic Acid (AA), Methylazoxymethanol acetate (MAMAc) and Ochratoxin A (OTA) on the cell cycle *in vitro*. *45th Annual SOT Meeting, San Diego*





Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, gemäß §11, Abs. 3d der Promotionsordnung vom 22.12.2003, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Römerberg, den __. __. 2013

(Unterschrift)