

**Rolle der FOS-Proteine und des
MAPK-Signallings in der Regulation
der zellulären Antwort auf
genotoxischen Stress**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Ruth Hildegard Meise (geb. Birkner)

geb. in Heidelberg

Mainz, 2014

Tag der mündlichen Prüfung: 02.10.2014

„Mama – bist du jetzt endlich fertig mit doktorarbeiten?“

„Ja Nora! Jetzt bin ich endlich fertig!“

1	ZUSAMMENFASSUNG	- 1 -
2	HINTERGRUND	- 3 -
2.1	Das Glioblastom	- 3 -
2.2	AP-1	- 5 -
2.2.1	Die Familie der FOS-Proteine.....	- 7 -
2.2.2	FRA-1.....	- 8 -
2.3	MAPK	- 11 -
2.3.1	ERK1/2.....	- 12 -
2.3.2	JNK	- 13 -
2.3.3	p38K.....	- 13 -
2.4	Alkylierende Agenzien	- 16 -
2.4.1	ACNU.....	- 16 -
2.4.2	Temozolomid.....	- 18 -
2.5	DNA-Schadensantwort	- 19 -
2.5.1	Schadenserkenung	- 20 -
2.5.2	Zellzykluskontrolle	- 22 -
2.5.3	DNA Reparatur.....	- 23 -
2.5.4	Zelltod	- 31 -
2.5.5	Apoptose	- 31 -
2.6	Ziel der vorliegenden Arbeit	- 34 -
3	MATERIAL UND METHODEN	- 36 -
3.1	Material	- 36 -
3.1.1	Chemikalien	- 36 -
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	- 37 -
3.1.3	Kits, Assays und gebrauchsfertige Mixe	- 38 -
3.1.4	Inhibitoren, Aktivatoren und biologische Substanzen.....	- 38 -
3.1.5	Zytostatika.....	- 39 -
3.1.6	Geräte und Hilfsmittel.....	- 40 -

3.1.7	Software	- 42 -
3.1.8	Zelllinien und Medien.....	- 42 -
3.1.9	Antikörper.....	- 43 -
3.1.10	Primer.....	- 44 -
3.1.11	siRNA.....	- 45 -
3.1.12	Plasmide	- 45 -
3.1.13	Enzyme und entsprechende Reaktionspuffer	- 46 -
3.1.14	Puffer und Stammlösungen	- 46 -
3.2	Methoden	- 47 -
3.2.1	Zelllinien und Zellkultur.....	- 47 -
3.2.2	Behandlung der Zellen	- 48 -
3.2.3	Erstellung von Wachstumskurven.....	- 48 -
3.2.4	RNA-Isolation	- 48 -
3.2.5	cDNA-Synthese.....	- 49 -
3.2.6	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	- 49 -
3.2.7	Quantitative Echtzeit PCR (<i>Real time quantitative PCR</i>)	- 50 -
3.2.8	Herstellung von Zellextrakten	- 51 -
3.2.9	Proteinbestimmung.....	- 53 -
3.2.10	Western Blot.....	- 53 -
3.2.11	Messung des Zelltods am Durchflusszytometer.....	- 55 -
3.2.12	Transformation von Bakterien.....	- 56 -
3.2.13	Transfektion von Zellen	- 56 -
3.2.14	<i>Comet Assay</i>	- 58 -
3.2.15	Gelretardationsexperimente (EMSA)	- 59 -
4	ERGEBNISSE	- 61 -
4.1	Charakteristika der Zelllinie LN-229	- 61 -
4.1.1	Replikationsdauer LN-229	- 61 -
4.1.2	Chemosensitivität von LN-229 gegenüber ACNU und TMZ.....	- 62 -

4.2	Die Rolle von FRA-1 in der Chemosensitivität von LN-229 gegenüber ACNU.....	- 63 -
4.2.1	Regulation von FRA-1 nach ACNU Behandlung.....	- 63 -
4.2.2	Rolle der MAPKs in der Regulation der FRA-1 Expression.....	- 64 -
4.2.3	Einfluss einer Herunterregulation der FRA-1-Expression auf die Sensitivität von LN-229 gegenüber ACNU.....	- 66 -
4.2.4	Einfluss einer Herunterregulation der FRA-1-Expression auf die AP-1-Bildung	- 71 -
4.2.5	Einfluss einer Herunterregulation der FRA-1-Expression auf die DNA-Reparatur nach Behandlung mit ACNU	- 73 -
4.2.6	Einfluss einer Herunterregulation der FRA-1-Expression auf die Apoptose nach Behandlung mit ACNU.....	- 77 -
4.2.7	Einfluss einer Herunterregulation der FRA-1-Expression auf die Kontrolle des Zellzyklus nach Behandlung mit ACNU.....	- 81 -
4.3	Regulation der Apoptose in LN-229 nach Behandlung mit ACNU und TMZ.....	- 85 -
4.3.1	Apoptotische Antwort nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ in LN-229.....	- 85 -
4.3.2	Einfluss von p53 auf die Apoptose nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ .-	- 87 -
4.3.3	Rolle der MAPKs in der Regulation der Apoptose nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ	- 91 -
4.3.4	Rolle der AP-1-Aktivität in der Regulation der Apoptose nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ.....	- 94 -
5	DISKUSSION	- 96 -
5.1	Einfluss von FRA-1 auf die Sensitivität von LN-229 gegenüber ACNU .-	- 96 -
5.1.1	FRA-1 wird nach Behandlung induziert.	- 96 -
5.1.2	Die FRA-1-Expression wird durch ERK2 und p38K reguliert	- 96 -
5.1.3	Die Herunterregulation der FRA-1-Expression führt zu einer Sensitivierung gegenüber ACNU.....	- 97 -
5.1.4	Die Herunterregulation der FRA-1-Expression führt zu einer verminderten AP-1-Bindung, die durch eine reduzierte FRA-1 Menge im AP-1-Komplex bedingt ist.....	- 97 -

5.1.5	FRA-1 nimmt keinen Einfluss auf die DNA-Reparatur nach Behandlung mit ACNU	- 98 -
5.1.6	Die Sensitivierung gegenüber ACNU durch eine Herunterregulation der FRA-1-Expression ist nicht durch die Regulation apoptotischer Faktoren bedingt	- 99 -
5.1.7	Die Herunterregulation der FRA-1-Expression führt zu einem verminderten G2/M-Arrest bedingt durch eine Dephosphorylierung von CHK1	- 100 -
5.1.8	Ausblick.....	- 101 -
5.2	Rolle von p53, den MAPKs und AP-1 in der Regulation der DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ in LN-229....	- 103 -
5.2.1	ACNU und TMZ induzieren in LN-229 Apoptose über den extrinsischen und intrinsischen Signalweg	- 103 -
5.2.2	Die durch ACNU induzierte Apoptose wird durch eine Inhibierung der p53-Aktivität verstärkt, die durch TMZ induzierte Apoptose wird hingegen reduziert	- 103 -
5.2.3	Die durch ACNU und TMZ ausgelöste Apoptose wird durch JNK und ERK1/2 vermittelt	- 104 -
5.2.4	Ausblick.....	- 106 -
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	- 109 -
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	- 112 -
8	TABELLENVERZEICHNIS	- 118 -
9	LITERATURVERZEICHNIS	- 119 -
10	ANHANG	- 147 -
10.1	Ergänzende Daten zur Regulation von BIM.....	- 147 -
10.2	Veröffentlichungen.....	- 149 -
10.3	Kongressbeiträge.....	- 149 -

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die mittlere Überlebenszeit nach Erkennung eines Glioblastoms ohne Behandlung liegt bei 3 Monaten und kann durch die Behandlung mit TMZ auf etwa 15 Monate gesteigert werden. Neben TMZ sind die chlorethylierenden Nitrosoharnstoffe die meistversprechendsten und am häufigsten eingesetzten Chemotherapeutika in der Gliomtherapie. Hier liegt die mittlere Überlebenszeit bei 17,3 Monaten. Um die Therapie des Glioblastoms noch effektiver zu gestalten und Resistenzen zu begegnen, werden unterschiedlichste Ansätze untersucht. Eine zentrale Rolle spielen hierbei AP-1 und die MAPKs, deren Funktion in bisherigen Arbeiten noch unzureichend beleuchtet wurde.

Besonders mit der Rolle des AP-1 bildenden Proteins FRA-1 in der Therapie des Glioblastoms haben sich bisher nur wenige Arbeiten beschäftigt, weshalb im ersten Teil der vorliegenden Arbeit dessen Funktion in der Regulation der Chemosensitivität gegenüber ACNU genauer untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die FRA-1-Expression durch Behandlung mit ACNU induziert wird. Die Induktion erfolgte über die beiden MAPKs ERK1/2 und p38K. JNK hatte keinen Einfluss auf die Induktion. Durch die Herunterregulation der FRA-1-Expression mit Hilfe von siRNA und eines shRNA exprimierenden Plasmids kam es zu einer signifikanten Sensitivierung gegenüber ACNU. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation der FRA-1-Expression in einer verminderten AP-1-Bildung, bedingt durch eine reduzierte Menge an FRA-1 im AP-1-Komplex resultiert. Die Sensitivierung gegenüber ACNU ist weder durch eine Veränderung in der DNA-Reparatur, noch in der Modulation der FAS-Ligand- bzw. FAS-Rezeptor-Expression bedingt. Auch die hier untersuchten BCL-2-Familienmitglieder wiesen keine Unterschiede in der Expression durch Modulation der FRA-1-Expression auf. Allerdings kam es durch die verminderte FRA-1-Expression zu einer Reduktion der Zellzahl in der G2/M-Phase nach Behandlung mit ACNU. Diese ging einher mit einer reduzierten Menge an phosphoryliertem und unphosphoryliertem CHK1, weshalb davon auszugehen ist, dass FRA-1 nach ACNU-Behandlung in Gliomzellen vor der Apoptose schützt, indem es modulierend auf die Zellzykluskontrolle einwirkt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Regulation der apoptotischen Antwort nach Behandlung mit ACNU und TMZ genauer beleuchtet, wobei ein spezielles Augenmerk auf AP-1 und die MAPKs gelegt wurde. Hier konnte gezeigt werden, dass die Apoptose nach Behandlung mit ACNU und TMZ sowohl durch Spaltung von Caspase 8, als auch Caspase 9 eingeleitet wird. Dabei wurde in beiden Fällen p53 vermehrt im Zellkern akkumuliert. Eine Inhibierung der transkriptionellen Aktivität von p53 führte nach ACNU-Behandlung zu einer Sensitivierung der Zellen, nach TMZ-Behandlung kam es zu einem leichten Anstieg in der Vitälität. Der FAS-Rezeptor wurde nach ACNU- und nach TMZ-Behandlung aktiviert und

auch die DNA-Reparaturproteine DDB2 und XPC wurden in beiden Fällen vermehrt exprimiert. Für die MAPKs JNK und ERK2 konnte gezeigt werden, dass diese proapoptotisch wirken. Die AP-1-Bildung nach ACNU-Behandlung erfolgte bereits nach 24 h und war von langer Dauer, wohingegen nach TMZ-Behandlung nur eine kurze AP-1-Bildung zu relativ späten Zeitpunkten detektiert werden konnte. Ebenso konnte für das AP-1-Zielgen FAS-Ligand nach ACNU-Behandlung eine relativ schnelle, lang anhaltende Aktivierung detektiert werden, wohingegen nach TMZ-Behandlung zu einem späten Zeitpunkt ein kurzer Anstieg im Signal zu verzeichnen war. In späteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass das BCL-2-Familienmitglied BIM eine zentrale Rolle in der Regulation des intrinsischen Signalweges nach Behandlung mit ACNU und TMZ spielt. Die hier entstandenen Ergebnisse tragen entscheidend zum Verständnis der durch diese beiden Agenzien gesteuerten, apoptotischen Signalwege bei und bieten eine fundierte Grundlage für weitere Untersuchungen.

2 HINTERGRUND

2.1 Das Glioblastom

Das Auftreten aller primären Tumore des Gehirns und des zentralen Nervensystems in Europa betrug im Jahr 2012 6,6 pro 100 000 Einwohner (Ferlay, Steliarova-Foucher et al. 2013). Gliome stellen die häufigste Form von primären Gehirntumoren dar. Sie werden nach ihrem zellulären Ursprung und ihrem Ausmaß der Infiltration klassifiziert und beinhalten Astrozytome (76 %), Oligodendrogliome und Ependymome. Glioblastome (*glioblastoma multiforme* = GBM) machen 54 % aller astrozytären Tumore aus und sind die häufigste und bösartigste Form von primären Tumoren. Sie treten 1,6 mal häufiger bei Männern, als bei Frauen auf (Dolecek, Propp et al. 2012). Astrozytome sind sehr heterogen und können umliegendes und weiter weg liegendes Gehirngewebe infiltrieren. Tumore des zentralen Nervensystems werden anhand ihrer Malignität mit Hilfe einer Klassifikation der *World Health Organization* (WHO) in vier prognostische Grade unterteilt. GBMs werden als Grad IV Gliome klassifiziert, was bedeutet, dass sie histologisch charakterisiert sind durch eine erhöhte Zelldichte, atypische Zellkerne, erhöhte Mitoserate, Auftreten von Nekrose und glomeruloïder mikrovaskulärer Proliferation (Louis, Ohgaki et al. 2007). GBMs werden wiederum in primäre und sekundäre GBMs unterschieden (s. Abb. 2-1). Letztere entstehen aus weniger bösartigen Astrozytomen, was aber relativ selten ist und meist bei Patienten im Alter unter 45 Jahren auftritt. Primäre GBMs entstehen *de novo* ohne detektierbare vorangegangene maligne Läsion und treten meist bei älteren Patienten, im Alter von etwa 62 Jahren auf. Zirka 95 % aller GBMs sind aus letztgenanntem Ursprung (Ohgaki, Dessen et al. 2004; Furnari, Fenton et al. 2007). Primäre und sekundäre GBMs sind morphologisch und klinisch nicht zu unterscheiden, allerdings sind auf molekularer Ebene klare Unterschiede vorhanden. So sind primäre GBMs charakterisiert durch die Amplifikation des *epidermal growth factor receptor* (*EGFR*) codierenden Gens, die Mutation von *PTEN* und dem kompletten Verlust von Chromosom 10. Zu den Kennzeichen sekundärer GBMs zählen die Mutation von *TP53* und Isocitrat Dehydrogenase 1/2 (*IDH1/2*) und der *loss of heterozygosity* (LOH) von Chromosom 19q (Nobusawa, Watanabe et al. 2009; Ohgaki and Kleihues 2013).

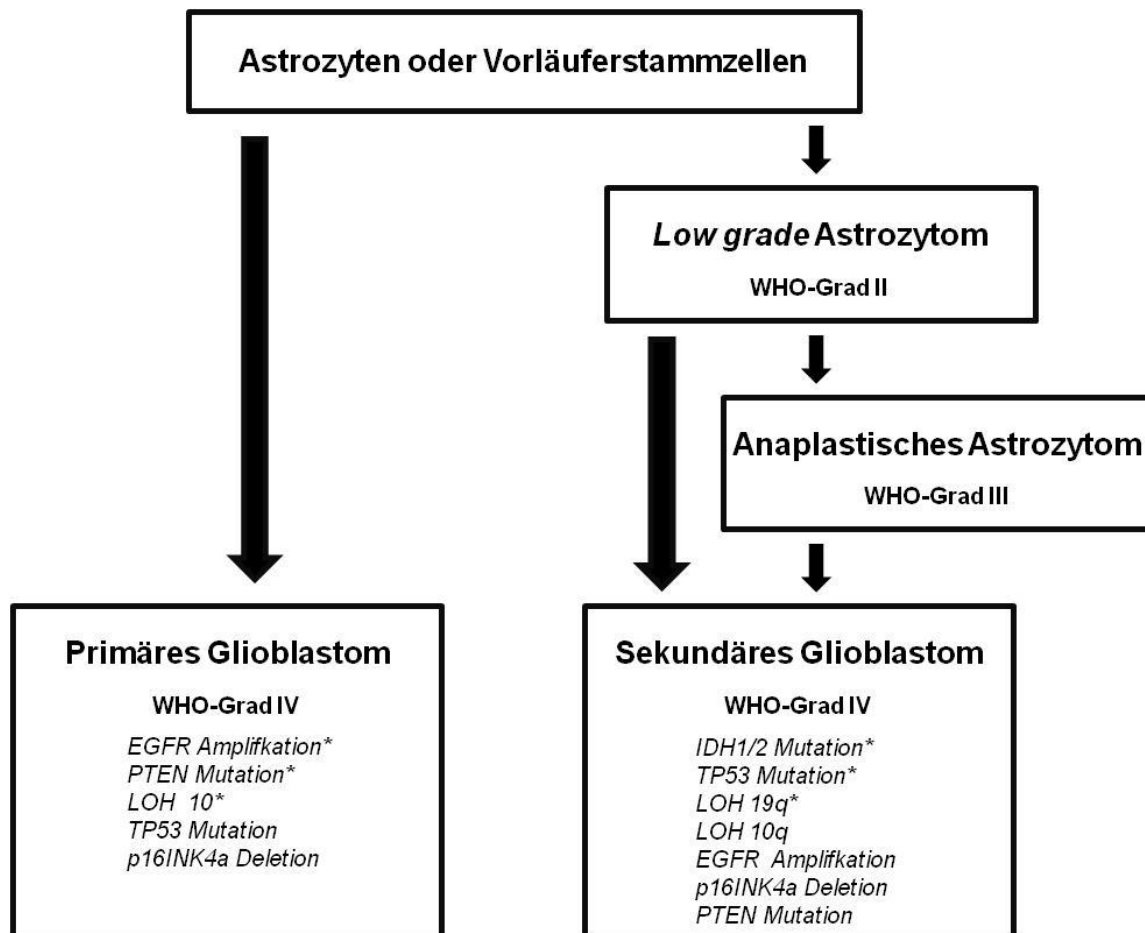


Abb. 2-1: Genetische Wege der Entstehung eines primären bzw. sekundären Glioblastoms (modifiziert nach (Ohgaki and Kleihues 2007)).

Die Entstehung eines primären bzw. sekundären Glioblastoms mit der entsprechenden Klassifizierung nach WHO und molekularen Eigenschaften des Glioblastoms. Genetische Eigenschaften, die sich in der Häufigkeit ihres Auftretens zwischen primären und sekundären Glioblastom auffällig unterscheiden sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Basierend auf der histopathologischen und zunehmend auch auf der genetischen Klassifikation des Tumors erfolgt die therapeutische Entscheidung. Die Standardtherapie von GBMs besteht aus einer maximalen operativen Entfernung des malignen Gewebes, gefolgt von einer konkomitanten Radiochemotherapie und einer adjuvanten Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ). Die Radiotherapie umfasst eine Gesamtdosis von 60 Gy die in 30 Dosen à 2 Gy für 5 Tage pro Woche über 6 Wochen hinweg verabreicht wird. Die gleichzeitige Gabe von TMZ erfolgt oral mit einer Dosis von 75 mg/m² 7 Tage pro Woche über die gesamte Zeit der Bestrahlung hinweg, für maximal 49 Tage. Nach einer vierwöchigen Pause wird den Patienten in bis zu 6 Zyklen alle vier Wochen eine Dosis von 150-200 mg/m² an 5 Tagen verabreicht (Stupp, Mason et al. 2005; Stupp, Hegi et al. 2009). Hierdurch kann zwar die mittlere Überlebenszeit von etwa 3 Monaten, ohne Behandlung, auf etwa 15 Monate

gesteigert werden (Walker, Alexander et al. 1978; Stupp, Hegi et al. 2009). Durch die hohe Infiltration des umliegenden Gewebes ist es jedoch fast unmöglich das gesamte Tumorgewebe zu entfernen, bzw. durch die anschließende Therapie eine Remission des Gewebes zu erreichen. In 90 % der Fälle tritt aus diesem Grund ein Rezidiv auf (Weller, Cloughesy et al. 2013). Neben TMZ sind immer noch die chlorethylierenden Nitrosoharnstoffe die meistversprechendsten und die am häufigsten eingesetzten Chemotherapeutika in der Glioblastomtherapie (Strik, Marosi et al. 2012). Eine der hierzu veröffentlichten wichtigsten Studien, die NOA-01-Studie, wurde durch Neuroonkologischen Arbeitsgruppe der Deutschen Krebsgesellschaft durchgeführt (Weller, Muller et al. 2003). Dabei wurde, wie auch bei der TMZ-Therapie, das Tumorgewebe eingehends maximal operativ entfernt und im Anschluss eine Radiochemotherapie durchgeführt. Bei der Behandlung mit ACNU, kombiniert mit dem Topoisomerase II-Inhibitor Teniposid (VM26) wurde eine mittlere Überlebensrate von 17,3 Monaten erreicht, was in der Therapie des Glioblastoms eine beachtliche Zeit ist. Die Bestrahlung erfolgte nach demselben Schema, wie auch bei der TMZ-Behandlung. ACNU wurde mit einer Dosis von 90 mg/m² an 3 Tagen pro Woche über 6 Wochen hinweg über vier bis fünf Zyklen ohne Resttumorgewebe und bis zur Tumorprogression bei Patient mit Resttumorgewebe verabreicht. Aufgrund der hämatologischen Toxizität von ACNU, ist die Behandlung mit TMZ jedoch besser verträglich und deshalb die Therapie der Wahl.

Um die Therapie des GBMs noch effektiver zu gestalten und Resistenzen zu begegnen, werden unterschiedlichste Ansätze untersucht, mit dem Ziel, eine auf den Patienten abgestimmte Behandlung zu ermöglichen. Einen vielversprechenden prognostischen Faktor stellt hierbei das DNA-Reparatur Protein O⁶-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT) dar. Dieses wirkt in erster Instanz dem zytotoxischen Effekt O⁶-alkylierender Agenzien entgegen (s. 2.5.3.1). Durch eine Methylierung des MGMT-Promotors kommt es meist zu einer reduzierten bis fehlenden MGMT-Expression und infolgedessen zu einer verbesserten therapeutischen Antwort auf O⁶-alkylierende Agenzien (Esteller, Garcia-Foncillas et al. 2000; Hegi, Diserens et al. 2005; Donson, Addo-Yobo et al. 2007). Weitere interessante Ansatzpunkte stellen beispielsweise die Inhibierung des EGFR, der DNA-Schadensantwort-Kinasen ATM, ATR, CHK1 und CHK2, oder die an der Basenexzisionsreparatur beteiligte Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) dar (Dungey, Caldecott et al. 2009; Leonetti, Biroccio et al. 2012; Barazzuol, Jena et al. 2013; Eich, Roos et al. 2013; Kalman, Szep et al. 2013).

2.2 AP-1

Der Transkriptionsfaktor AP-1 (*activator protein 1*) ist ein Dimer, das gebildet wird aus Mitgliedern der JUN, FOS, ATF (*activating transcription factor*) und MAF (*musculoaponeurotic*

fibrosarcoma) Proteinfamilie. Der AP-1-Komplex kann sich somit aus einer Vielzahl von Kombinationen aus Hetero- und Homodimeren zusammensetzen, was wiederum die Gene, welche durch AP-1 reguliert werden, bestimmt. AP-1-Proteine dimerisieren über ein Leuzin-Zipper-Motiv und besitzen eine basische DNA-Binde-Domäne zur Interaktion mit dem DNA-Rückgrat, weshalb sie in die Gruppe der *basic leucine-zipper* (bZIP)-Proteine eingeordnet werden. Neben den genannten Dimerisierungspartnern, können die AP-1-Proteine auch mit anderen Proteinen interagieren, wie z.B. der p65-Untereinheit von NF- κ B, CBP/p300, SMAD-3 und -4 oder dem Retinoblastom-Protein (Weber, Raben et al. 1997)

Die AP-1 Aktivität wird durch eine Vielzahl von Stimuli induziert. Hierzu zählen zum Beispiel Wachstumsfaktoren, wie EGF, Zytokine, wie TNF α oder IL-1, Neurotransmitter, Polypeptidhormone, Zell-Matrix-Interaktionen, bakterielle und virale Infektionen und physikalischer und chemischer Stress, wie UV-Licht, Mikrogravitation oder Chemotherapeutika (Quantin and Breathnach 1988; Brenner, O'Hara et al. 1989; Goldgaber, Harris et al. 1989; Sheng, Thompson et al. 1991; Hibi, Lin et al. 1993; Kasibhatla, Brunner et al. 1998; Granet, Vico et al. 2002; Eferl and Wagner 2003; Reifenberger and Louis 2003; Nair, Barve et al. 2010; Slomiany and Slomiany 2012; Tacon, Newton et al. 2012). Nach Stimulation erkennt und bindet AP-1 in Abhängigkeit der Zusammensetzung bevorzugt an *TPA response elements* (TRE) (5'-TGA(G/C)TCA-3') oder *cAMP response elements* (CRE) (5'-TGACGTCA-3') (Bohmann, Bos et al. 1987; Angel, Hattori et al. 1988). Zu den AP-1-Zielgenen zählen u.a. *ERCC1*, *CYCLIN D1*, *p53*, *FASL*, *FASR*, *BIM*, *BCL2*, *BCL-X_L*, *BCL3*, *VEGFD*, *MMP1*, *MMP3* und *CD44* (Saez, Rutberg et al. 1995; Orlandini, Marconcini et al. 1996; Lamb, Hennigan et al. 1997; Brown, Nigh et al. 1998; Kasibhatla, Brunner et al. 1998; Li, Zhang et al. 1999; Li, Chong et al. 1999; Schreiber, Kolbus et al. 1999; Bakiri, Lallemand et al. 2000; Lasham, Lindridge et al. 2000; Rebollo, Dumoutier et al. 2000; Passegue, Jochum et al. 2001; Whitfield, Neame et al. 2001). Aus der Fülle an AP-1-Zielgenen resultieren Auswirkungen auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie Zellproliferation, Apoptose, Überleben, Metastasierung, Angiogenese und EMT (*epithelial mesenchymal transition*) (s. Abb. 2-2), was AP-1 zu einem wichtigen und interessanten Regulator der Tumorentstehung und – proliferation macht. Bisher wurden in humanen Tumoren keine aktivierende Mutationen, Deletionen oder Amplifikationen von JUN- oder FOS-Proteinen entdeckt. Allerdings werden viele AP-1-Komponenten, wie z.B. die FOS-Proteine in hohem Maße exprimiert, und die Signalwege, die zu einer erhöhten AP-1-Bindeaktivität führen, sind in humanen Tumorzellen häufig konstitutiv aktiviert (Eferl and Wagner 2003).

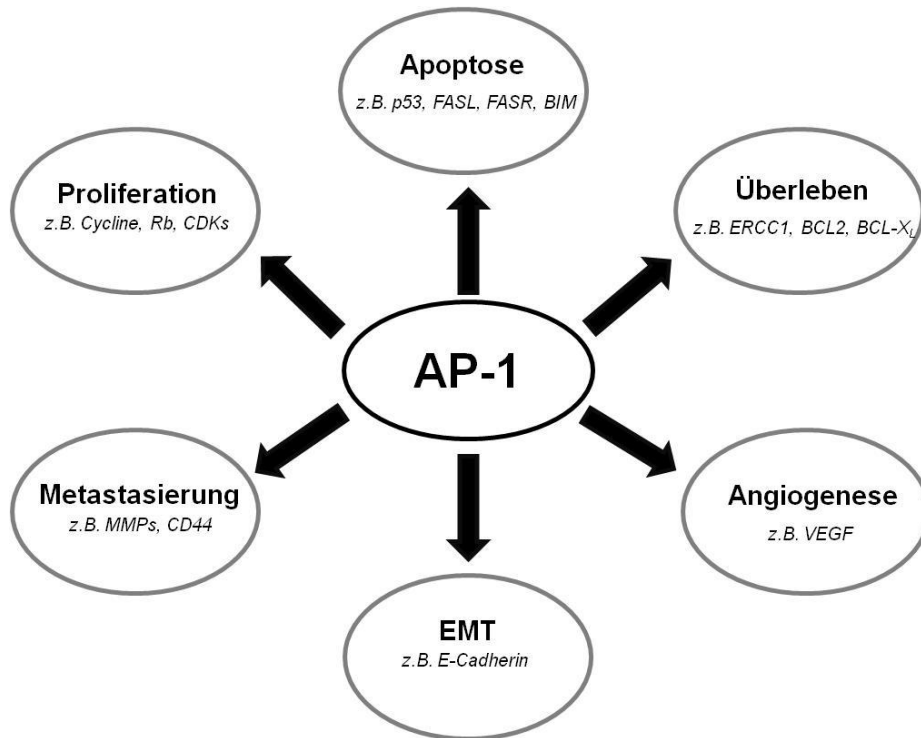


Abb. 2-2: Rolle von AP-1 in der Krebsentstehung. Modifiziert nach (Durchdewald, Angel et al. 2009)

2.2.1 Die Familie der FOS-Proteine

Die Familie der FOS-Proteine besteht aus c-FOS, FOSB, FRA-1 und FRA-2, sowie den FOSB-Splicevarianten FOSB2 und delta FOSB2. Normalerweise akkumulieren die FOS-Proteine fast ausschließlich im Zellkern. Um dort transkriptionell aktiv zu werden, müssen diese zusammen mit Mitgliedern der JUN-, MAF- oder ATF-Familie über ihre Leuzin-Zipper-Domäne zum Transkriptionsfaktor AP-1 dimerisieren (s. 2.2). Im Gegensatz zu den JUN-Proteinen können FOS-Proteine keine Homodimere bilden. *In vitro*-Studien haben gezeigt, dass JUN-FOS-Heterodimere stabiler sind und stärkere DNA-Bindeaktivität besitzen als JUN-JUN-Homodimere. Während c-FOS und FOSB eine C-terminale Transaktivierungsdomäne besitzen, ist diese bei FRA-1, FRA-2 und FOSB2 nicht vorhanden (Bergers, Graninger et al. 1995; Milde-Langosch 2005; Malnou, Brockly et al. 2010).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von FRA-1 in der Sensitivität gegenüber ACNU genauer untersucht, weshalb im Folgenden die Regulation und Funktion dieses Proteins genauer erläutert wird.

2.2.2 FRA-1

FRA-1 steht für *Fos related antigen 1* und wurde ursprünglich als ein *immediate early gene* isoliert, das ein Antigen codiert, welches mit Antikörpern gegen c-FOS kreuzreagiert. FRA-1 wird durch *FOSL1* codiert (Cohen and Curran 1988).

2.2.2.1 Regulation der Expression und Aktivität

Während die Expression von c-FOS nach Serumstimulation sehr schnell und transient, erfolgt die von FRA-1 etwas verzögert und ist stabiler (Kruijer, Cooper et al. 1984). Eine Erklärung hierfür liefert die Tatsache, dass die *FRA-1*-Expression durch c-FOS reguliert werden kann (Cohen and Curran 1988; Tulchinsky 2000).

Transkriptionell

FOSL1 wird transkriptionell vor allem über den Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Weg reguliert (s. 2.3). Dabei ist die Region zwischen -318 und -237 verantwortlich für die durch Mitogene induzierte Expression von *FOSL1*. Diese Region enthält neben einer TCF (*t-cell transcription factor*)-Bindestelle, die TRE-, SRE (*serum response element*)- und ATF-Bindestellen. Letztgenannte bilden einen zweiteiligen *Enhancer* zusammengesetzt aus der oberhalb liegenden TRE-Bindestelle und den unterhalb liegenden SRE- und ATF-Bindestellen, welcher notwendig und ausreichend ist, um *FOSL1* nach Mitogenbehandlung zu regulieren (Adisheshaiah, Papaiahgari et al. 2003; Adisheshaiah, Peddakama et al. 2005). Bergers et al. zeigten außerdem, dass die *FOSL1* Transkription durch c-FOS reguliert werden kann und sobald *FOSL1* einmal transkribiert wurde, FRA-1 seine eigene Transkription positiv reguliert, indem es an die AP-1 Bindestelle im ersten Intron bindet (Bergers, Graninger et al. 1995). Des Weiteren ist *FOSL1* ein direktes Zielgen von MYC. Der intronische *Enhancer* wird dabei durch ein mit Wachstumsfaktoren stimuliertes MYC-MAX Heterodimer gebunden, welches PIM1 Kinase zum Chromatin rekrutiert. PIM1 phosphoryliert Histon H3 an Ser10 und führt dadurch zu einer Induktion von *FOSL1*. Die *Enhancer*-Box befindet sich 62 bp oberhalb des TRE (Zippo, De Robertis et al. 2007). In Prostatakrebszellen wurde gezeigt, dass die *FOSL1*-Transkription in Abwesenheit von PTEN über Aktivierung des PI3K/Akt/Sp1-Signalweges erfolgt. Dabei bindet Sp1 zusammen mit dem RB-Protein an das *Retinoblastoma control element* (RCE) in der Region zwischen -161 und -105 de Promotors (Tsuchiya, Fujii et al. 1993; Tiwari, Sakaue et al. 2003). Der WNT/ β -CATENIN-Signalweg könnte eine Rolle in der Induktion von FRA-1 im Kolorektalkrebs spielen. Mann et al. identifizierten *FOSL1* und *c-JUN* als Zielgene von β -CATENIN in Kolorektalkrebszelllinien (Mann, Gelos et al. 1999). Außerdem zeigten Wang et al., dass die FRA-1-Expression in kolorektalen Adenokarzinomzelllinien eng mit der β -CATENIN-Expression korreliert (Wang, Wang et al. 2002). Es bleibt zu klären, ob der *FOSL1* Promotor direkt vom β -Catenin-Tcf/Lef-

Komplex reguliert wird oder nicht. Möglicherweise kontrolliert der WNT/ β -Catenin Signalweg die *FRA-1*-Expression über Komplexbildung, wie z.B. einer c-JUN-abhängigen Induktion der TRE Elemente im *FOSL1* Promotor.

Posttranslational

Die posttranslationalen Modifikationen von FRA-1 machen einen Großteil der Regulation aus. FRA-1 wird in nicht transformierten Zellen als Antwort auf Serum-Mitogene oder Insulin phosphoryliert. In transformierten thyroidalen Zelllinien geschieht dies als Antwort auf das Onkogen RAS. Die Phosphorylierung kann durch eine Inhibierung der MEK1/2-ERK1/2 Signalweges verhindert werden (Vial and Marshall 2003). Außerdem ist die FRA-1-Phosphorylierung zellzyklusabhängig und wird in der G2/M-Phase weiter erhöht (Casalino, Bakiri et al. 2007).

FRA-1 besitzt in einer Region, welche größtenteils homolog zu c-FOS ist, ein C-terminal gelegenes, destabilisierendes Element, das über Phosphorylierung der beiden Serinreste Ser252 und Ser265 durch ERK1/2 die proteasomale Degradation von FRA-1 als Antwort auf Aktivatoren des MEK-Weges verhindert (Basbous, Chalbos et al. 2007). Dabei zeigten Vial et al., dass bereits eine moderate Aktivierung des ERK1/2-Signalweges ausreichend ist, um die Transkription des *FOSL1* Genes zu induzieren (Vial and Marshall 2003). Um jedoch die proteasomale Degradation von FRA-1 zu verhindern, ist eine stark erhöhte ERK1/2-Aktivität notwendig. Casalino et al. zeigten, dass eine konstitutive Aktivierung von ERK1/2 sowohl bei der Synthese als auch der Stabilität von FRA-1 eine Rolle spielt, aber nicht für seine DNA-Bindeaktivität von Bedeutung ist (Casalino, De Cesare et al. 2003). Auch für andere MAPKs wurde gezeigt, dass sie an der Regulation von FRA-1 beteiligt sind. So beeinflusst die MAPK ERK5 die Stabilität und Aktivität von FRA-1 durch Phosphorylierung (Terasawa, Okazaki et al. 2003).

2.2.2.2 Zielgene

Obwohl FRA-1 keine Transaktivierungsdomäne besitzt, hat es onkogenes Potential. Eine Überexpression von FRA-1 resultiert *in vitro* in der Fähigkeit unabhängig eines Gewebeverbands zu wachsen und führt im Mausmodell zur Tumorentwicklung (Bergers, Graninger et al. 1995). Matsuo et al. zeigten, dass die regulatorische Funktion von FRA-1 auf dem N-terminalen Ende liegt (Matsuo, Owens et al. 2000).

Im Folgenden sind Gene deren Transkription durch FRA-1 reguliert wird zusammengestellt. Hierbei ist besonders auffällig, dass speziell Gene der Vaskularisierung, wie *VEGF* und der Angiogenese, wie *MMP9* durch FRA-1 reguliert werden. Dies erklärt weshalb ein FRA-1 *knock down* im Mausmodell in einer fehlenden Vaskularisierung der Plazenta resultiert und somit embryonal letal ist (s. 2.2.2.3).

Überraschend ist außerdem, dass trotz der Vielzahl an Studien zur biologischen Funktion von FRA-1 und der Existenz der AP-1-Zielsequenzen TRE und CRE in vielen Genen, bisher verhältnismäßig wenige Zielgene beschrieben sind, die eindeutig durch FRA-1 reguliert werden.

Zielgen	Funktion	Quelle(n)
MMP1	Abbau extrazellulärer Matrixproteine	(Belguise, Kersual et al. 2005)
MMP9	Abbau extrazellulärer Matrixproteine	(Belguise, Kersual et al. 2005)
VEGF-D	Vaskulo- und Angiogenese	(Debinski, Slagle-Webb et al. 2001)
CCNA2 (<i>Cyclin A2</i>)	Zellzykluskontrolle	(Casalino, Bakiri et al. 2007)
CCND1 (<i>Cyclin D1</i>)	Zellzykluskontrolle	(Burch, Yuan et al. 2004)
JunB	s. 2.2	(Debinski and Gibo 2011)
p14/p19^{ARF}	Zellzykluskontrolle	(Ameyar-Zazoua, Wisniewska et al. 2005)
CD44	Kontrolle der Aktivierung, Rezirkulation und „homing“ von Lymphozyten, Hämatopoese und Tumormetastasierung	(Ramos-Nino, Scapoli et al. 2003), (Ramos-Nino, MacLean et al. 2007)
c-met	Proto-Onkogen, Verantwortlich für die Embryonalentwicklung und Wundheilung	(Ramos-Nino, Scapoli et al. 2003)
uPAR	Gewebeneuorganisation	(Leupold, Asangani et al. 2007)
β1-Integrin	Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion	(Vial, Sahai et al. 2003)
IL-2	Stimulation Immunsystem	(Ehret, Li-Weber et al. 2001)
EGR-1	Zelldifferenzierung und Mitogenese	(Gius, Cao et al. 1990)
FOSL1	s. 2.2.2.1	(Bergers, Graninger et al. 1995)

Tab. 2-1: Gene die einer direkten Regulation durch FRA-1 unterliegen

2.2.2.3 Auswirkungen einer Deregulation der FRA-1-Expression

FRA-1 spielt eine Rolle in der Tumorprogression in dem es Prozesse wie das Überleben, Proliferation, Invasivität (Vial and Marshall 2003; Belguise, Kersual et al. 2005) reguliert und die Zelle vor einer mitotischen Katastrophe schützt (Casalino, Bakiri et al. 2007). So wurde in einer Vielzahl von Tumorgewebe eine FRA-1-Überexpression detektiert. Hierzu zählen

Glioblastome, kolorektale Adenokarzinome, Mesotheliome der Lunge, Brustkrebs, Schilddrüsenkrebs, und Speiseröhrenkrebs (Chiappetta, Tallini et al. 2000; Kim, Oh et al. 2001; Zajchowski, Bartholdi et al. 2001; Wang, Wang et al. 2002; Ramos-Nino, Scapoli et al. 2003; Debinski and Gibo 2005)

Eine Überexpression von FRA-1 im Mausmodell führt bedingt durch eine Deregulation der Osteoblasten zu Osteosklerose, einer Knochenkrankheit, die durch eine erhöhte Knochenmasse gekennzeichnet ist. Des Weiteren kann es zur Ausbildung von Lungentumoren führen (Jochum, David et al. 2000; Young and Colburn 2006). Der *knock out* des für FRA-1 kodierenden Gens *FOSL1* ist aufgrund einer ungenügenden Vaskularisierung der Plazenta embryonal, zwischen Tag E10 und E10,5, letal (Schreiber, Wang et al. 2000; Eferl and Wagner 2003). Dies kann umgangen werden, indem der *FOSL1 knock out* lediglich im Embryo, nicht jedoch in der Plazenta induziert wird (Eferl, Hoebertz et al. 2004). Durch diese Weiterentwicklung wurde es möglich die Folgen einer fehlenden FRA-1-Expression auf die postnatale Entwicklung, speziell des Knochens, zu untersuchen. Hier konnte gezeigt werden, dass ein *FOSL1 knock out* zu Osteopenie, einer Knochenkrankheit, die durch reduzierte Knochenmasse charakterisiert ist, führt (Eferl, Hoebertz et al. 2004).

2.3 MAPK

Die durch Mitogen aktivierte Protein Kinasen (MAPK) gesteuerte Signalwege gehören zu den am meist verbreiteten eukaryotischen Regulationsmechanismen. Die Aktivierung der MAPKs kann durch eine Vielzahl von Stimuli hervorgerufen werden, u.a. durch Hormone (z.B. Insulin), Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF, EGF und FGF), inflammatorische Zytokine der Tumor-Nekrosefaktor-Familie (TNF) und Umweltstress, wie Strahlung, osmotischen Schock oder ischämische Verletzungen (Lewis, Shapiro et al. 1998; Leppa and Bohmann 1999; Kim and Choi 2010). Die Stimuli werden über verschiedene Rezeptor-Familien vermittelt, wie Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), Zytokinrezeptoren und Ser/Thr-Kinase-Rezeptoren. Durch MAPKs werden eine Vielzahl zellulärer Mechanismen reguliert, wie z.B. die Genexpression, Zellzyklusmaschinerie, Zellmetabolismus, Motilität, Überleben, Apoptose und Differenzierung (Krishna and Narang 2008).

Derzeit sind sechs verschiedene Gruppen von MAPKs in Säugetierzellen bekannt und charakterisiert worden: extrazellulär regulierte Kinasen (ERK1/2), JUN NH₂ terminal Kinasen (JNK1/2/3), p38 Kinasen (p38K α , β , γ , δ), ERK 7/8, ERK 3/4 und ERK 5 (Krishna and Narang 2008). Während über letztere drei noch nicht viele Informationen vorliegen, sind ERK1/2, JNK und p38K extrem gut untersucht worden (Roux and Blenis 2004; Krishna and Narang 2008).

Generelle Eigenschaften der MAPKs

Obwohl jede MAPK ihre eigene Funktion hat, besitzen sie auch einige gemeinsame Eigenschaften, weshalb sie als eine Familie gruppiert sind. Diese werden im Folgenden kurz beschrieben:

Typisch für diesen Signalweg ist das zentrale dreigestufte Kernmodul. Dieses besteht aus drei aufeinanderfolgenden Kinasen: einer MAPK Kinase Kinase (MAPKKK), den MAPK Kinasen (MAPKK) und der MAPK. Die MAPKKK, auch MAP3Ks oder MEKKs genannt, sind Ser/Thr-Kinasen, die durch Phosphorylierung oder ihre Interaktion mit kleinen GTP Proteinen der Ras/Rho-Familie als Antwort auf extrazelluläre Stimuli aktiviert werden. Die Aktivierung der MAP3K führt wiederum zur Phosphorylierung und Aktivierung der MAPKK, einer dualspezifischen Kinase, welche MAPK sowohl am Threonin-, als auch am Tyrosinrest phosphorylieren können. Die aktivierten MAPKs phosphorylieren ihre Zielsubstrate an Serin- und Threoninresten, vorausgesetzt, den Aminosäureresten folgt Prolin (Roux and Blenis 2004).

Der physiologische Effekt des MAPK-Signalweges beruht sowohl auf der Art und Weise, als auch auf der Dauer der Phosphorylierung der MAPKs, weshalb die Regulation der MAPK-Aktivität durch Phosphatasen von besonderer Bedeutung ist. Diese Regulation erfolgt durch Protein-Ser/Thr-Phosphatasen (PPs), Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPases), oder durch die MAPK-Phosphatasen (MKPs) (Krishna and Narang 2008).

Die Stimulation von JNK und p38K erfolgt durch Agenzien, welche zellulären Stress verursachen, wie Hitzeschock, UV-Licht, inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktorentzug und DNA-schädigende Agenzien (Leppa and Bohmann 1999; Kim and Choi 2010). Die ERK1/2-Aktivität hingegen wird durch die Zellproliferation stimulierende Agenzien, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Serum und Phorbolster angeregt (Roux and Blenis 2004).

Im Folgenden sollen die Funktionen der verschiedenen MAPKs noch einmal kurz dargestellt werden.

2.3.1 ERK1/2

Die zwei Isoformen ERK1 (p44) und ERK2 (p42) besitzen zu 83 % Sequenzhomologien und werden in unterschiedlichem Ausmaß ubiquitär exprimiert. Nach Aktivierung, wird ein Großteil von ERK in den Zellkern transloziert (Chen, Sarnecki et al. 1992), wo es die Expression vieler seiner Zielgene reguliert. Aber auch cytosolische und Membranproteine werden durch ERK reguliert. Es sind über 150 Substrate von ERK bekannt (Krishna and Narang 2008).

So nimmt ERK Einfluss auf die Aktivität von Regulatoren des *Zellzyklus*, wie Cyclin C und c-MYC, der *Apoptose*, wie p53 (Brown and Benchimol 2006), TNF- α , Caspase 8 (Cagnol, Van Obberghen-Schilling et al. 2006) und AKT (Sinha, Bannerjee et al. 2004), des *Überlebens*, wie die CDK-Inhibitoren p21 und p27 (Sewing, Wiseman et al. 1997; Mirza, Gysin et al. 2004), BAD (Pucci, Indelicato et al. 2009), NRF2 (Filomeni, Piccirillo et al. 2012) und der *Entwicklung* und *Differenzierung*, wie z.B. der Entwicklung von Thymozyten im Mausmodell und der Differenzierung von Adipozyten (Prusty, Park et al. 2002). Des Weiteren wurde mehrfach gezeigt, dass sowohl c-FOS, als auch FRA-1 einer Regulation durch ERK1/2 unterliegen (s. 2.2.1).

2.3.2 JNK

JNK wird durch drei unterschiedliche Gene codiert (*JNK1*, *JNK2*, *JNK3*), aus denen 10 Splicevarianten gebildet werden können (Derijard, Hibi et al. 1994; Kallunki, Su et al. 1994; Gupta, Barrett et al. 1996). Während JNK1 und JNK2 ubiquitär exprimiert werden, wird JNK3 bevorzugt im Gehirn, Herz und Hoden exprimiert (Martin, Mohit et al. 1996; Yang, Kuan et al. 1997). Wie ERK1/2 kann auch JNK nach Aktivierung im Zytoplasma in den Kern translozieren und so in beiden Kompartimente seine Zielsubstrate regulieren. Zu diesen zählen Regulatoren der *Tumorgenese*, wie c-JUN (Derijard, Hibi et al. 1994), der *Apoptose*, wie p53 (Buschmann, Potapova et al. 2001), c-MYC (Alarcon-Vargas and Ronai 2004), BCL-2 (Deng, Xiao et al. 2001), BCL-X_L (Kharbanda, Saxena et al. 2000), BAX (Kim, Ryu et al. 2006), 14-3-3 (Tsuruta, Sunayama et al. 2004) und *Differenzierung*, wie IFN- γ (Derijard, Hibi et al. 1994). Neben c-JUN werden weitere AP-1 bildende Proteine, wie JUND (Yazgan and Pfarr 2002), JUNB (Li, Tournier et al. 1999) und ATF2 (Gupta, Campbell et al. 1995) durch JNK phosphoryliert. Des Weiteren führt die Phosphorylierung von ELK-1 durch JNK zu einer transkriptionellen Aktivierung von c-FOS (Cavigelli, Dolfi et al. 1995; Yang, Whitmarsh et al. 1998). Unter den Zielsubstraten der JNK sind außerdem die NFAT-Familie (Chow, Dong et al. 2000; Ortega-Perez, Cano et al. 2005), STAT1 und 3 (Zhang, Liu et al. 2001; Zhao, Li et al. 2005) und AKT (Shao, Bhattacharya et al. 2006) zu nennen.

2.3.3 p38K

Es existieren vier Isoformen der p38 MAPK, α , β , γ , δ , von denen die p38K α die bestuntersuchtete ist. p38K ist sowohl im inaktiven, als auch im aktiven Zustand im Zellkern und im Zytoplasma zu finden (Raingeaud, Gupta et al. 1995; Ben-Levy, Hooper et al. 1998). Alle p38K-Isoformen werden in nahezu allen Geweben exprimiert, wobei p38K γ vor allem im

Skelettmuskel zu finden ist und p38K δ bevorzugt im Hoden, Pankreas, Niere und Dünndarm exprimiert wird (Cuenda and Rousseau 2007).

Unter den p38K-Zielproteinen befinden sich Proteine, die an der *Zellzykluskontrolle* beteiligt sind, wie z.B. HBP1, p21, p53, CDC25B, und RB (Wang, Nath et al. 1999; She, Chen et al. 2000; Bulavin, Higashimoto et al. 2001; Kim, Mercer et al. 2002; Xiu, Kim et al. 2003; Hawkes and Alkan 2012). Desweiteren gibt es Daten die zeigen, dass p38K Einfluss auf die *Apoptose* nimmt. So wurde in verschiedenen Zelllinien nach Behandlung mit unterschiedlichen Apoptose induzierenden Agenzien ein Anstieg der phosphorylierten p38K beobachtet, der mit einer Zunahme im Spaltprodukt der Casaspase 3 einherging, was durch Inhibierung der p38K-Aktivität reduziert wurde (Liu, Chen et al. 2004; Jiang, Jia et al. 2006; Shimizu, Nakazato et al. 2006; Liu, Huang et al. 2007). Auch p53 unterliegt einer Regulation durch p38K (She, Bode et al. 2001). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass p38K nach UV-Bestrahlung eine zentrale Rolle in der Phosphorylierung, nukleären Translokation und der Aktivierung der Transkription von c-FOS spielt (Tanos, Marinissen et al. 2005). Weitere durch p38K regulierte, an der Apoptose beteiligte Substrate beinhalten BCL-10 (Bodero, Ye et al. 2003) und BAX (Kim, Ryu et al. 2006). Es existieren jedoch auch Daten die belegen, dass p38K nach UV-Bestrahlung protektiv gegenüber der Apoptose wirkt indem sie cytoplasmatisches p53 stabilisiert (Chouinard, Valerie et al. 2002), die NF- κ B-Aktivität und die damit durch NF- κ B regulierten FAS-Rezeptor-Expression herunterreguliert (Ivanov and Ronai 2000) und das anti-apoptotische BCL-2-Familienmitglied BCL-X_L reguliert (Bachelor and Bowden 2004). Insgesamt lässt sich festhalten, dass die exakte Rolle von p38K in der Regulation der Apoptose von vielen Faktoren, wie z.B. der Art des Stimulus, Zelltyps und der Dauer der Aktivierung abhängt. p38K spielt des Weiteren eine große Rolle in der Regulation der *Immunantwort* und *Inflammation*, indem es z.B. die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IFN- γ (Zhang and Kaplan 2000), IL-1 β (Lee, Kwon et al. 2012; Wang, Huber et al. 2012), TNF- α (Lee, Kwon et al. 2012; Stratz, Bhatia et al. 2012) und IL-6 beeinflusst, die Produktion von Enzymen, wie COX-2 (Chen, Tang et al. 2001; Bachelor, Silvers et al. 2002) und iNOS steuert und die Expression von Adhäsionsproteinen, wie z.B. VCAM-1 reguliert (Pietersma, Tilly et al. 1997).

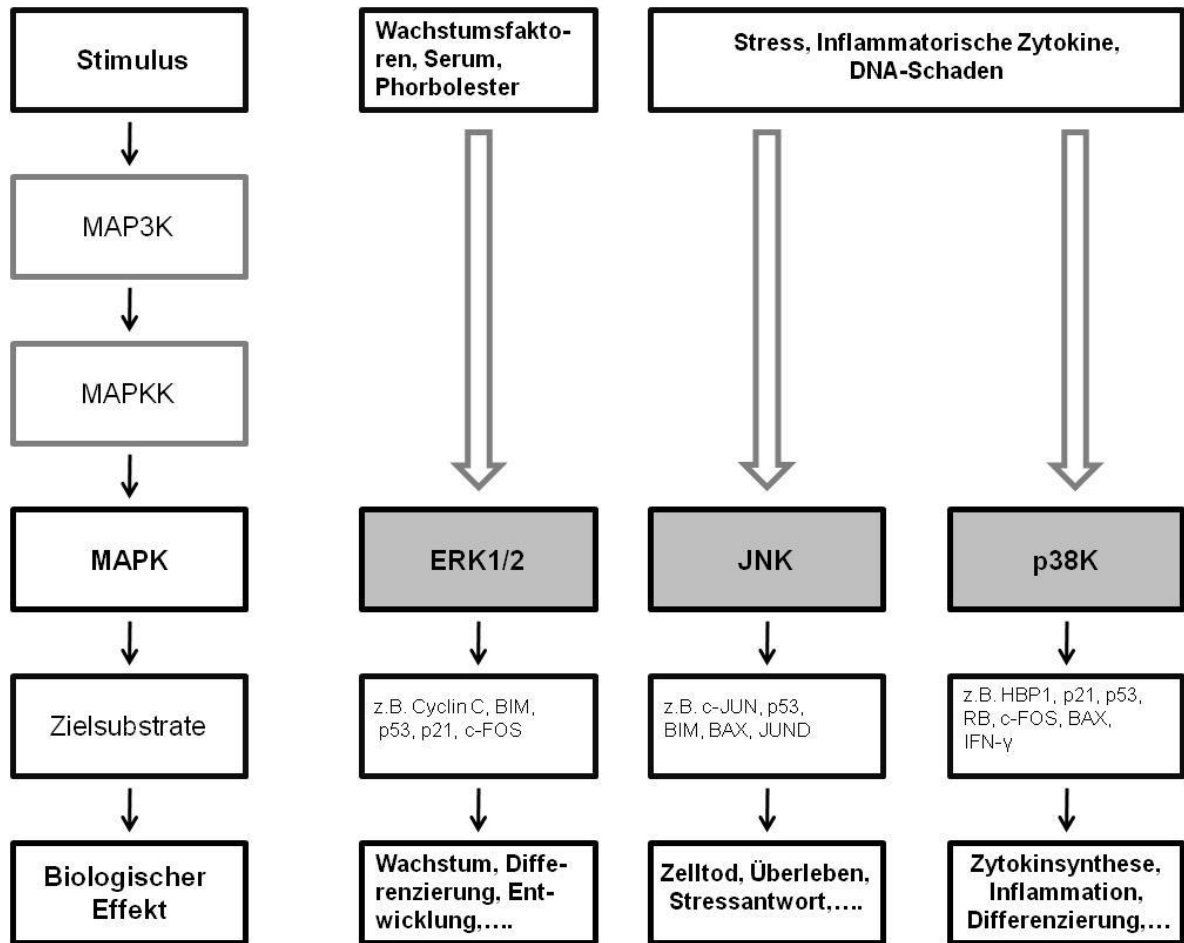


Abb. 2-3: Schematische Darstellung des MAPK-Signalweges. Modifiziert nach (Krishna and Narang 2008)

Zusammenfassend kann man also festhalten, dass die MAPKs eine Vielzahl, oft sogar gegensätzlicher zellulärer Prozesse regulieren. Wie sich die Aktivität der entsprechenden MAPKs final auswirkt, wird durch verschiedene Mechanismen beeinflusst, zu denen zählen: Dauer und Stärke der Aktivierung des Signals, Interaktion mit Gerüstproteinen, subzelluläre Lokalisation, Vorhandensein verschiedener Isoformen auf jeder Ebene der Kaskade, intensives Zusammenspiel zwischen verschiedenen MAPK-Kaskaden und anderen Signalwegen und posttranslationale Modifikationen, welche über die Phosphorylierungen hinausgehen.

2.4 Alkylierende Agenzien

2.4.1 ACNU

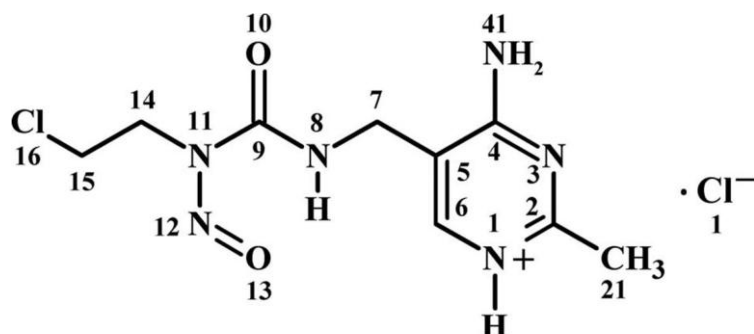


Abb. 2-4: Struktur von Nimustin (ACNU) (Beko, Urmann et al. 2012)

Die Chemotherapie des Gehirntumors gestaltet sich aufgrund der Bluthirnschranke, die einen Großteil aller Fremdstoffe ausschließt, als besonders schwierig. Auf der Suche nach einem geeigneten Medikament, welches ausreichende Aktivität, bei gleichzeitig geringer Toxizität für den Gesamtorganismus aufweist und zudem hydrophob ist, wurde basierend auf der Struktur von N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) verschiedene Derivate mit einer höheren Tumoraktivität synthetisiert (Greene and Greenberg 1960; Ludlum 1997; Beko, Urmann et al. 2012). Aus diesen Derivaten, wurden für klinische Studien u.a. N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosurea (BCNU, Carmustin), N-(2-chloroethyl)-N'-cyclohexyl-N-nitrosurea (CCNU, Lomustin), N-(2-chloroethyl)-N'-(trans-4-methylcyclohexyl)-N-nitrosurea (MeCCNU, Semustin) und N'-[(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl]-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosurea (ACNU, Nimustin) eingesetzt (Montgomery 1976). BCNU und CCNU besitzen eine relativ schlechte Wasserlöslichkeit, was ihre Einsatzmöglichkeiten limitiert (Kanamaru, Asamura et al. 1980). ACNU hingegen ist nicht nur wasserlöslich, sondern kann auch die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Ludlum 1997). Neben der Therapie von Tumoren des Gehirns, finden die Nitrosoharnstoffe auch Einsatz bei der Behandlung von Brustkrebs und Melanomen (Bodell 2003).

In wässriger Lösung zerfallen die chlorethylierenden Agenzien zu Alkyldiazohydroxiden und Isocyanaten (Montgomery, James et al. 1967; Brundrett 1980), die in der Zelle nach dem Mechanismus der unimolekularen nukleophilen Substitution (S_N1 -Mechanismus) mit nukleophilen Zentren der DNA reagieren. Während die Isocyanate lediglich Proteine binden, können die Alkyldiazohydroxide sowohl DNA- als auch Proteinaddukte bilden (Cheng, Fujimura et al. 1972). Primäres DNA-Addukt ist das N7-Guanin (ca. 95 % aller Basenaddukte),

wohingegen die toxische Läsion O⁶-(2-chloroethyl)guanin lediglich 2-3 % aller Addukte ausmacht (Inga, Chen et al. 1999). Wie Brent et al. gezeigt haben, bleiben diese Vorläuferaddukte, wenn nicht repariert, mindestens für 8 h stabil und führen, wie im Folgenden beschrieben, durch intramolekulare Umlagerungen zu Interstrang *Crosslinks* (ICLs) (Brent, Lestrud et al. 1987).

Nach Alkylierung an der O⁶-Position des Guanins (Tong, Kirk et al. 1981; Parker, Kirk et al. 1987), kann das entstandene O⁶-(2-chloroethyl)guanin durch MGMT repariert werden (s. 2.5.3.1). Geschieht dies nicht, kommt es zu intramolekularen Umlagerungen des O⁶-(2-chloroethyl)guanins zu N1-O⁶-Ethanoguanin. Dieses kann wiederum durch MGMT erkannt werden, allerdings bleibt MGMT in diesem Fall kovalent an die DNA gebunden (Gonzaga and Brent 1989). Die physiologische Relevanz dieses Schrittes ist bisher unbekannt. Kommt es nicht zur Reparatur reagiert N1-O⁶-Ethanoguanin schließlich mit dem auf dem komplementären DNA-Strang liegenden Cytosin zu N1-guanin-N3-cytosin (Kohn 1977; Tong, Kirk et al. 1982). Hierdurch sind beide DNA-Stränge kovalent miteinander verbunden. Der ICL kann durch die relativ komplexe ICL-Reparatur, die sich aus Teilen der Nukleotidexzisionsreparatur, Doppelstrangbruchreparatur und Transläsionssynthese zusammensetzt entfernt werden (s. 2.5.3.2). Geschieht dies nicht, kommt es bedingt durch einen Kollaps der Replikationsgabel zu Doppelstrangbrüchen, die letztlich zur Apoptose führen. Es wird angenommen, dass 20-40 unreparierte ICLs in der Säugetierzelle zum Zelltod führen (Lawley and Phillips 1996; Dronkert and Kanaar 2001)

2.4.2 Temozolomid

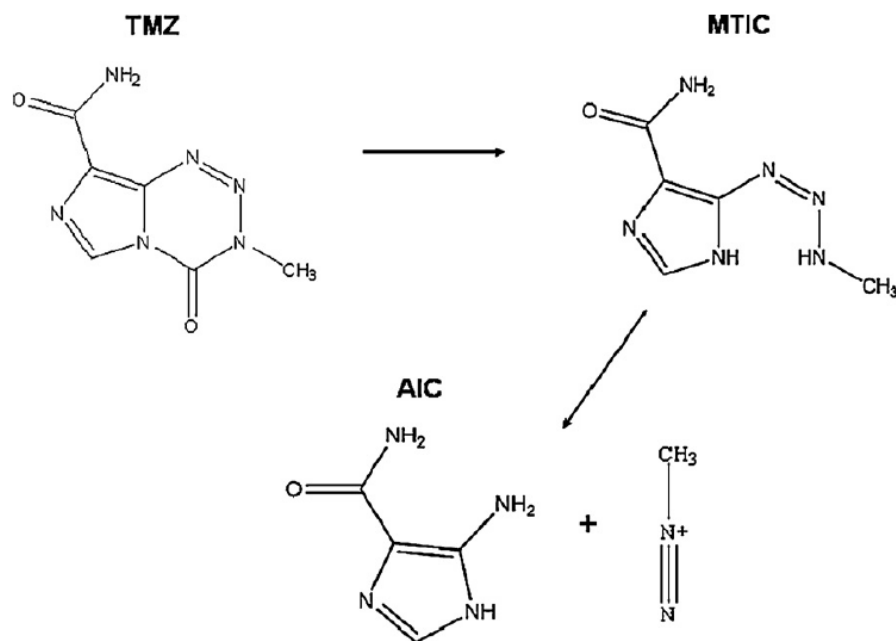


Abb. 2-5: Struktur von Temozolomid, MTIC und AIC (Andrasi, Bustos et al. 2010)

Temozolomid wurde an der Aston Universität Birmingham in den frühen 80er Jahren als eines einer Serie neuartiger Imidazotetrazinone synthetisiert (Stevens, Hickman et al. 1984). Bei physiologischem pH-Wert wird TMZ spontan zu MTIC (5-3-(methyltriazen-1-yl)imidazol-4-carboxamid) umgewandelt, welches dann zum Methyl diazonium Kation degradiert, das seine Methylgruppe auf die DNA übertragen kann. Neben der DNA können auch RNA und Proteine methyliert werden, was aber soweit bekannt, für die cytotoxische Aktivität von TMZ keine Rolle spielt. Das Endprodukt AIC (4-amino-5-Imidazol-Carboximid) wird dann über die Nieren ausgeschieden (Bull and Tisdale 1987; Denny, Wheelhouse et al. 1994). Weitere methylierende Agenzien, welche derzeit in der Chemotherapie Verwendung finden, sind Procarbazin (PCZ), Dacarbazin (DTIC) und Streptozotozin (STZ). Diese methylieren die DNA an 13 verschiedenen Positionen. Sie zählen zu den S_N1 alkylierenden Agenzien, die an Stickstoffatome im DNA-Ring und extrazyklische Sauerstoffgruppen binden können. Die Hauptprodukte sind hierbei N7-Methylguanin (N7MeG) (67 %), N3-Methyladenin (N3MeA) (12 %) und N3-Methylguanin (N3MeG). In geringerer Frequenz tritt die Methylierung O⁶-Methylguanin (O⁶MeG) (7 %) auf (Beranek 1990; Denny, Wheelhouse et al. 1994). TMZ kann die Blut-Hirn-Schranke passieren, weshalb es ein attraktives Cytostatikum in der Gliomtherapie darstellt (Ostermann, Csajka et al. 2004). Des Weiteren findet TMZ Anwendung in der Therapie von malignen Melanomen.

Obwohl O⁶MeG das bei TMZ-Behandlung am geringsten entstehende DNA-Addukt ausmacht, ist es die haupttoxische Läsion (Dolan, Moschel et al. 1990; Kaina, Fritz et al. 1991). O⁶MeG blockiert nicht die DNA-Synthese, führt jedoch unrepariert zu einer Bildung einer GC zu AT-Punktmutation und ist somit relevant für die Krebsentstehung und -progression. O⁶MeG wird durch MGMT erkannt und wie in 2.5.3.1 beschrieben entfernt. Geschieht dies nicht, wenn MGMT nicht exprimiert wird, oder aber beispielsweise durch Zugabe von O⁶-Benzylguanin (O⁶BG) blockiert wird, kommt es während der Replikation in der S-Phase zu einer Fehlpaarung von O⁶MeG mit Thymin. Diese Fehlpaarung wird durch die sogenannte Fehlpaarungsreparatur oder auch *mismatch repair* (MMR) erkannt und Thymin wird entfernt. Dabei entstehende Reparaturintermediate sind durch lange einzelsträngige DNA-Stücke von 1000-3000 bp charakterisiert. Da jedoch O⁶MeG bestehen bleibt, wird Thymin während der DNA-Synthese wieder eingebaut. Dies führt zu einem aussichtslosen Zyklus, in dem für längere Zeit einzelsträngige DNA vorhanden ist, die durch die DNA-Replikation in einen Doppelstrangbruch umgewandelt wird. Wird dieser im folgenden Zyklus nicht durch die Doppelstrangbruchreparatur behoben, induziert er Apoptose (Hampson, Humbert et al. 1997; Mojas, Lopes et al. 2007; Roos, Batista et al. 2007; Quiros, Roos et al. 2010).

Während O⁶MeG replikationsabhängig zur Apoptose führt, wird durch die N-Alkylierungen bei hohen Alkylierungsdosen replikationsunabhängig, Apoptose eingeleitet (Roos, Baumgartner et al. 2004). N7MeG, N3MeA und N3MeG werden durch die Basenexzisionsreparatur (BER) entfernt. Die hierbei entstehenden Intermediärprodukte, wie Einzelstrangbrüche oder auch apurine Stellen, sind cytotoxisch, mutagen und können sich bei einem hohen Alkylierungslevel überschneiden und infolgedessen zu Doppelstrangbrüchen führen (Coquerelle, Dosch et al. 1995). Außerdem können diese Intermediärprodukte beim Zusammentreffen mit der Replikationsgabel in einen Doppelstrangbruch umgewandelt werden, der unrepariert zur Apoptose führt (Trivedi, Almeida et al. 2005; Briegert and Kaina 2007; Nikolova, Ensminger et al. 2010).

2.5 DNA-Schadensantwort

DNA-Schäden lösen in Abhängigkeit der Art und Stärke des Schadens entsprechende biologische Antworten, wie DNA Reparatur, Zellzyklusarrest, Zelltod und Seneszenz aus. Wird ein DNA-Schaden detektiert, kommt es zum Zellzyklusarrest und zur DNA-Reparatur, solange die normale DNA Reparaturkapazität erhalten ist. Wird diese jedoch verhindert oder verändert, wird der DNA Schaden nicht repariert und führt zum Zelltod.

2.5.1 Schadenserkenkung

Der DNA-Schaden wird vor allem durch die drei Phosphatidylinositol 3 Kinase *like* Protein Kinasen (PIKK) *ataxia-telangiectasia mutated* (ATM), *ATM and Rad3 related* (ATR) und *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit* (DNA-PKcs) erkannt. Je nach Art des Schadens wird eine der drei Kinasen aktiviert. Sie regulieren sich jedoch auch gegenseitig. Keine der PIKKs kann selbst DNA binden, sie benötigen also alle drei Gerüstproteine.

ATM wird vor allem durch Doppelstrangbrüche, wie sie z.B. durch ionisierende Strahlung erzeugt werden, oder auch bei der Behandlung mit methylierenden Agenzien entstehen können, aktiviert. Aktuelle Studien haben gezeigt, dass auch reaktive Sauerstoffspezies ATM aktivieren (Guo, Deshpande et al. 2010; Guo, Kozlov et al. 2010). Dabei wird der Doppelstrangbruch vom MRN-Komplex, bestehend aus NBN (NBS1 oder Nibrin), MRE11 und RAD50, erkannt (Lee and Paull 2005). Die Lokalisation des MRN-Komplexes an den Doppelstrangbruch wird möglicherweise durch PARP-1 erleichtert (Haince, Kozlov et al. 2007; Haince, McDonald et al. 2008). Der MRN Komplex wiederum rekrutiert das im inaktiven Zustand als Homodimer vorliegende ATM, das sich durch Autophosphorylierung und in Folge dessen Monomerisierung aktiviert (Bakkenist and Kastan 2003). Daraufhin wird Histon 2A.X (H2A.X) phosphoryliert und der MRN Komplex, BRCA1 (*breast cancer type 1 susceptible protein*) und SMC1 (*structural maintenance of chromosome 1*) unabhängig voneinander zum Doppelstrangbruch rekrutiert. NBN und BRCA1 rekrutieren daraufhin aktiviertes ATM, welches mit NBN, BRCA1 und SMC1 interagiert und diese phosphoryliert (Kitagawa, Bakkenist et al. 2004). Infolgedessen kommt es in der S und G2-Phase zur Aktivierung der homologen Rekombination (HR). Wird ATM in der G1 Phase aktiviert, kommt es zur Einleitung der nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ) (Woods and Turchi 2013). ATM aktiviert CHK2 durch Phosphorylierung, welches dann multimerisiert und autophosphoryliert (Matsuoka, Huang et al. 1998; Ahn, Schwarz et al. 2000; Xu, Tsvetkov et al. 2002). CHK2 stabilisiert p53 durch Phosphorylierung an Serin 20 (Hirao, Kong et al. 2000). p53 kann aber auch direkt durch ATM phosphoryliert werden (Canman, Lim et al. 1998).

ATR wird durch Replikationsstress, wie geblockte Replikationsgabeln aktiviert. Diese treten z.B. durch Intrastrang *Crosslinks* oder auch durch die DNA-Replikation blockierende Läsionen, wie N3MeA oder AP-Stellen auf (Nam and Cortez 2011). RPA (*replication protein A*) bindet an einzelsträngige DNA und verhindert somit, dass sich diese zurück windet oder Sekundärstrukturen bildet (Fanning, Klimovich et al. 2006). ATRIP (*ATR-interacting protein*) rekrutiert ATR und bildet zusammen mit diesem den ATR-ATRIP-Komplex (Cortez, Guntuku et al. 2001). Dieser bindet durch direkte Interaktion von ATRIP mit RPA und Oligomerisierung von ATRIP, an die einzelsträngige DNA (Zou and Elledge 2003; Ball and Cortez 2005;

Byun, Pacek et al. 2005). Außerdem wird RAD17 durch RPA rekrutiert und aktiviert, welches wiederum zusammen mit RFC (*replication factor C*) den 9-1-1 Komplex, bestehend aus RAD9, HUS1 und RAD1 an die einzelsträngige DNA bindet. RAD9 interagiert mit TopBP1 und rekrutiert TopBP1 zur blockierten Replikationsgabel, wodurch schließlich ATR aktiviert wird (Kumagai, Lee et al. 2006; Delacroix, Wagner et al. 2007). ATR phosphoryliert CHK1 an Ser317 und Ser345, was zur Aktivierung der Kinaseaktivität von CHK1 führt (Liu, Guntuku et al. 2000). Aktiviertes ATR phosphoryliert außerdem eine Reihe von Proteinen, welche an der DNA-Reparatur beteiligt sind, wie BRCA1 (Zhang, Willers et al. 2004), BRCA2, RAD51, FANCE (Wang, Kennedy et al. 2007), FANCD1 (Sakasai, Sakai et al. 2012) und p53 (Chehab, Malikzay et al. 2000). p53 kann auch durch ATR direkt phosphoryliert werden (Tibbetts, Brumbaugh et al. 1999).

ATM und ATR können auch miteinander interagieren. So kann bei einer Blockade der Replikationsgabel ATM durch ATR phosphoryliert werden (Stiff, Walker et al. 2006). Jazayeri et al. haben gezeigt, dass ATR nach Doppelstrangbrüchen in Abhängigkeit von ATM in der S und G2/M-Phase aktiviert wird (Jazayeri, Falck et al. 2006). Hierbei gilt es jedoch zu beachten, dass DNA-Läsionen keine statischen Strukturen sind, sondern schnell prozessiert und metabolisiert werden. Die vermeintlichen Interaktionen zwischen ATM und ATR könnten also auch aus der Umwandlung von Doppelstrangbrüchen zu Einzelstrangbrüchen und umgekehrt resultieren.

DNA-PKcs spielt eine große Rolle bei der Detektion von Doppelstrangbrüchen. Dabei partizipiert sie, im Gegensatz zu ATM und ATR direkt an der DNA-Reparatur. Im inaktiven Zustand liegt DNA-PKcs als Monomer vor. Tritt ein Doppelstrangbruch in der Zelle auf, bindet der Ku70/80-Komplex an beide Enden des DNA-Bruchs und rekrutiert monomeres DNA-PKcs an beide Stellen. Ku70/80 und DNA-PKcs bilden zusammen das aktive Heterotrimer DNA-PK (Gell and Jackson 1999; Singleton, Torres-Arzayus et al. 1999). Die DNA-PKcs-Moleküle dimerisieren und bilden somit eine Art Synapse über die DNA-Enden (Spagnolo, Rivera-Calzada et al. 2006). DNA-PK autophosphoryliert im Rahmen dieser Interaktionen, wodurch vermutlich die DNA-Enden zugänglich für die Reparatur gemacht werden und DNA-PK von Ku dissoziiert. Aktivierte DNA-PK phosphoryliert daraufhin nachfolgende Zielproteine und leitet somit die Doppelstrangbruchreparatur ein (Neal, Dang et al. 2011). Es gibt Daten die zeigen, dass DNA-PKcs, wie auch ATM, CHK2 durch Phosphorylierung an Thr68 aktivieren können (Li and Stern 2005). Auch für p53 wurde gezeigt, dass es durch DNA-PKcs reguliert werden kann, allerdings führt die Stabilisierung von p53 durch DNA-PKcs nicht zum Zellzyklusarrest, sondern zur Apoptose (Wang, Guo et al. 2000; Hill, Leidal et al. 2008).

2.5.2 Zellzykluskontrolle

Nach der Aktivierung regulieren CHK1 und CHK2 die CDC25 Familie von dual-spezifischen Phosphatasen, indem sie diese inaktivieren. Hierdurch können wichtige inhibitorische Phosphorylierungssignale der CDK/Cyclin-Komplexe nicht entfernt werden und führen dadurch zum Zellzyklusarrest.

CDC25A wird durch CHK1 phosphoryliert und dadurch degradiert. In Folge dessen kommt es zur Inhibierung der CDK2-Cyclin E Kinaseaktivität, wodurch CDC45 *binding factor* nicht ans Chromatin geladen werden kann. Hierdurch können keine DNA Polymerasen rekrutiert werden und es kommt zum Zellzyklusarrest in der S-Phase (Sorensen, Syljuasen et al. 2003; Jin, Ang et al. 2008). CDC25B und C binden nach Phosphorylierung durch CHK1 an 14-3-3 Protein und werden innerhalb dieses Komplexes aus dem Zellkern heraus transportiert. Dadurch sind sie nicht mehr fähig CDK1-CyclinB zu dephosphorylieren und führen schließlich zum G2/M-Arrest (Sanchez, Wong et al. 1997). Auch für CHK2 konnte gezeigt werden, dass diese durch Regulation von CDC25A und C den Zellzyklus kontrollieren kann (Chaturvedi, Eng et al. 1999; Falck, Mailand et al. 2001).

Des Weiteren kommt es durch die Stabilisierung von p53 über Aktivierung von p21 und infolge dessen Hemmung der Phosphorylierung von Rb durch Cyclin E/CDK2 zu einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus (Chen, Ko et al. 1996; Chehab, Malikzay et al. 2000). Wird durch p53 GADD45 aktiviert, bindet dieses an CDK1 und verhindert dessen Komplexierung mit Cyclin B wodurch es zu einem G2-Phasearrest kommt (Zhan, Antinore et al. 1999). Außerdem wird 14-3-3 δ durch p53 reguliert, was wiederum über eine Regulation des Cyclin B/CDK1 Komplexes in einem G2-Phasearrest resultiert (Hermeking, Lengauer et al. 1997).

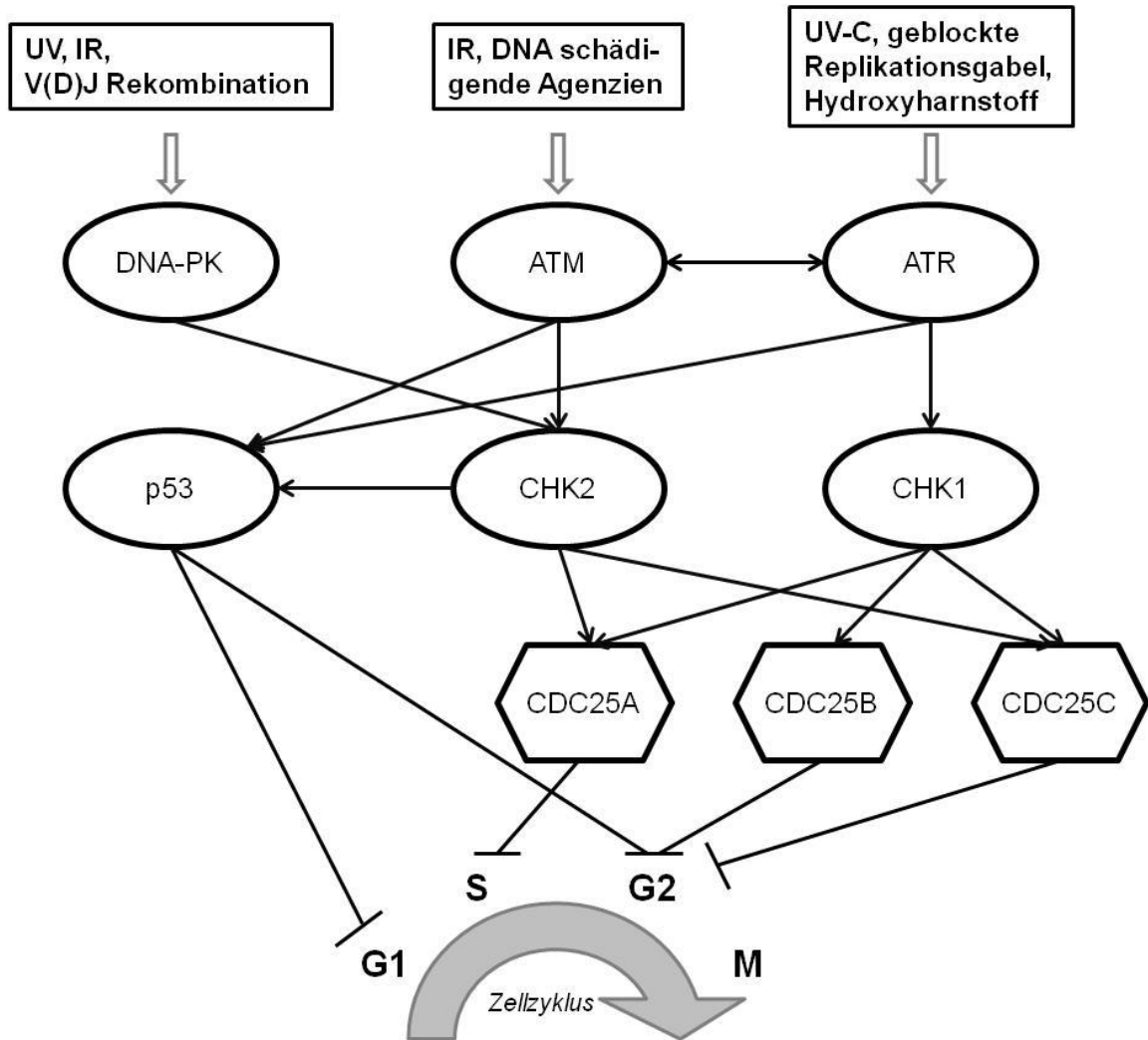


Abb. 2-6: Vereinfachtes Schema der Zellzykluskontrolle nach DNA-Schaden. Modifiziert nach (Yang, Yu et al. 2003)

2.5.3 DNA Reparatur

Die Fülle an DNA Schäden, die durch Strahlung und reaktive Chemikalien entstehen, werden durch eine Vielzahl verschiedener DNA-Reparaturmechanismen entfernt. Zu diesen zählen die Nukleotidexzisionsreparatur (NER), die Transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR), die Basenexzisionsreparatur (BER), Basenfehlpaarungs- oder auch *mismatch* Reparatur (MMR), die Doppelstrangbruchreparatur (DSB), die sich aus der homologen Rekombination (HR) und der nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ) zusammensetzt, Einzelstrangbruchreparatur (SSB) und Transläsionssynthese (TLS).

Im Folgenden werden nun die Reparaturmechanismen, welche für die in dieser Arbeit verwendeten Agenzien ACNU und TMZ relevant sind und im Rahmen der durchgeführten Experimente genauer untersucht wurden, erläutert.

2.5.3.1 O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)

MGMT ist ein sogenanntes Suizidenzym, das O⁶MeG und O⁴MeT-Addukte von der DNA entfernt. Diese entstehen durch Behandlung mit methylierenden und chlorethylierenden Agenzien, aber auch durch die Aufnahme von Zigarettenrauch, Autoabgasen oder unter Hitzeeinwirkung verarbeiteter Lebensmittel (Fiddler 1975; Jagerstad and Skog 2005; Christmann and Kaina 2011). Bei der Reparatur wird die Alkylgruppe auf einen Cysteinrest im aktiven Zentrum von MGMT übertragen. Daraufhin wird das Enzym inaktiv, ubiquitiniert und durch proteasomale Degradation abgebaut (Xu-Welliver and Pegg 2002). Ist MGMT nicht vorhanden kommt es zum Zelltod, chromosomalen Aberrationen, Mutationen und Krebs. Durch seine Aktivität spielt MGMT eine wichtige Rolle in der Tumorthherapie, sowohl im gesunden, als auch im Tumorgewebe. Die Aktivität von MGMT wird neben der Regulation der Expression, durch Methylierung von CpG *islands* im Promoter gesteuert. In humanen Glioblastomen konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass die MGMT Promotor-methylierung mit der therapeutischen Antwort auf O⁶-alkylierende Agenzien korreliert (Esteller, Garcia-Foncillas et al. 2000; Hegi, Diserens et al. 2004; Donson, Addo-Yobo et al. 2007). Zur Inhibierung der MGMT-Aktivität wird derzeit das O⁶-MeG Derivat O⁶-BG (O⁶-Benzylguanin) eingesetzt, wodurch *in vitro* innerhalb von 15 Min eine komplette Inaktivierung der MGMT Aktivität erreicht werden kann (Dolan, Moschel et al. 1990).

2.5.3.2 Interstrang *Crosslink*-Reparatur

Natürlicherweise ist der Körper nur selten ICL erzeugenden Ereignissen ausgesetzt. Ein Beispiel hierfür sind die Nebenprodukte Acrolein und Crotonaldehyd R, der Lipidperoxidation. Diese entstehen beispielsweise bei einer Ernährung mit hohem Fettanteil oder aber bei Alkoholismus. Sie können aber auch durch Autoabgase und Zigarettenrauch aufgenommen werden können (Nath, Ocando et al. 1998; Folmer, Soares et al. 2003; Kozekov, Nechev et al. 2003; Brooks and Theruvathu 2005; Stone, Cho et al. 2008). Zudem können abasische Stellen, die z.B. durch spontane Hydrolyse entstehen, natürlich auftretende Psoralene, wie sie z.B. in Sellerie oder auch in Petersilie vorkommen und auch Östrogene die Entstehung von ICLs verursachen (Ljunggren 1990; Manderfeld, Schafer et al. 1997; Dutta, Chowdhury et al. 2007; Bennetts, De Iuliis et al. 2008). Die Anhäufung unreparierter ICLs führt in replizierenden Zellen zu einem vorübergehenden Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus, bis die DNA Schäden entfernt wurden (s.2.5.1). Geschieht dies nicht entstehen beim Zusammen-treffen mit der Replikationsgabel toxische DNA-Doppelstrangbrüche (De Silva, McHugh et al. 2000; Niedernhofer, Odijk et al. 2004). Man geht davon aus, dass bereits 20-40 unreparierte ICLs in der Säugetierzelle zum Zelltod führen (Lawley and Phillips 1996; Dronkert and Kanaar 2001). Dies macht man sich in der Chemotherapie zu Nutze, indem gezielt ICL

erzeugende Agenzien, wie Cyclophosphamid, Melphalan, Mitomycin C (MMC), Psoralene, Nitrosoharnstoffe (s. 2.4.1) und platinierende Agenzien, wie Cisplatin eingesetzt werden.

Die Reparatur von ICLs ist sehr komplex und immer noch nicht vollkommen geklärt. Grob skizziert erfolgt diese jedoch in zwei Zyklen die in folgende Schritte aufgeteilt werden können:

- (1) Schadenserkennung
- (2) Inzision und Entkopplung des ICLs (*Unhooking*)
- (3) Schadensentfernung (Exzision) und Schließen der entstandenen Lücke
- (4) Reparatur des offenen Doppelstrangbruchs

Die Erkennung und Reparatur des ICLs kann je nach Ursprung des ICLs replikationsunabhängig oder in Abhängigkeit der Replikation geschehen. So können Läsionen, welche die DNA-Struktur stark verformen, wie sie z.B. durch platinierende Agenzien erzeugt werden, sowohl unabhängig, als auch abhängig von der Replikation bzw. Transkription erkannt und entfernt werden (Huang, Zhu et al. 1995; Hofr and Brabec 2001). Handelt es sich jedoch um einen ICL, der die Struktur der DNA nur geringfügig beeinflusst, wie er z.B. durch Nitrosoharnstoffe erzeugt wird, ist die Erkennung des ICLs an die Transkription bzw. Replikation gebunden (Raschle, Knipscheer et al. 2008; Smeaton, Hlavin et al. 2008). Zudem kann es geschehen, dass eine zweite Replikationsgabel auf den ICL trifft, was wiederum Einfluss auf den Reparaturmechanismus nimmt (Raschle, Knipscheer et al. 2008). Die ICL Reparatur scheint primär durch einen Block der Replikationsmaschinerie am ICL, also in der S-Phase initiiert zu werden (Akkari, Bateman et al. 2000; De Silva, McHugh et al. 2000). Jedoch ist auch die replikationsunabhängige ICL-Reparatur ein wichtiger Mechanismus, da dieser Weg von Bedeutung für die Toleranz von ICLs in sich nicht teilenden bzw. ausdifferenzierten Zellen ist.

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der ICL Reparatur in Abhängigkeit der Zellzyklusphase beschrieben.

Erkennung des ICLs

Replikationsunabhängig wird der ICL vermutlich durch die Verformung des DNA-Stranges um den ICL herum erkannt. Welche Faktoren nun an der Erkennung beteiligt sind ist nicht ganz klar, allerdings wurde gezeigt, dass der XPC-HR23A/B-centrin2 Komplex sowohl für die Erkennung durch Psoralen als auch durch (MMC) erzeugter ICLs benötigt wird (Chen, Xu et al. 2003; Zheng, Wang et al. 2003; Muniandy, Thapa et al. 2009). Hingegen scheint der XPC-HR23A/B-centrin2 Komplex durch Cisplatin erzeugte ICLs nicht zu erkennen. Hier konnte gezeigt werden, dass Komponenten der TC-NER, namentlich CSA, CSB, XPA, XPD, XPF und XPG an der Erkennung beteiligt sind (Furuta, Ueda et al. 2002). Zhao et al. zeigten

außerdem, dass der an der MMR beteiligte Komplex MutS β an der Erkennung durch Psoralen erzeugter ICLs mittels Interaktion mit XPA und XPC partizipiert (Zhao, Jain et al. 2009).

Wird ein ICL durch einen Block der Replikationsmaschinerie detektiert, wird der Fanconi Anemia Kern Komplex, bestehend aus FANCA, B, C, E, F, G, L, M und den Fanconia Anemia assoziierten Proteinen FAAP100, 24 und 20 aktiviert (Ciccia, Ling et al. 2007; Ling, Ishiai et al. 2007; Ali, Pradhan et al. 2012). Für die korrekte Lokalisation werden FANCM und FAAP24 benötigt, welche nach Dimerisierung den FA Kern Komplex und RPA rekrutieren (Ciccia, Ling et al. 2007; Kim, Kee et al. 2008; Huang, Kim et al. 2010). FANCL besitzt E3-Ubiquitinligase-Aktivität und führt, in Anwesenheit von RPA und ATR, zusammen mit der Ubiquitin E2-Ligase UBE2T, zu einer Monoubiquitinierung von FANCD2 und FANCI (ID-Komplex) und somit zu einer Translokation der beiden Faktoren zum Chromatin (Andreassen, D'Andrea et al. 2004). Hier bildet der ID-Komplex Reparaturfoci, die sich aus Proteinen des FA Signalweges, der HR, und der TLS zusammensetzen (Garcia-Higuera, Taniguchi et al. 2001; Matsushita, Kitao et al. 2005; Smogorzewska, Matsuoka et al. 2007).

Entkopplung des ICLs

Dieser Schritt kann in dem in 3.2.14.2 beschriebenem modifizierten alkalischen Comet Assay detektiert werden.

Die replikationsunabhängige Entkopplung durch Stickstofflost, Cisplatin oder Psoralen erzeugter ICLs erfolgt primär durch XPF-ERCC1. Für die anderen an der NER beteiligten XP-Proteine (s. 2.5.3.3) konnte kein Einfluss gezeigt werden (De Silva, McHugh et al. 2000; De Silva, McHugh et al. 2002; Rothfuss and Grompe 2004).

Die replikationsabhängige Entkopplung des ICLs kann man sich folgendermaßen vorstellen: Die Replikationspolymerasen blockieren auf dem Elternstrang etwa 20 (Cisplatin, DNA verformend) bis 24 (Stickstofflost, DNA nicht verformend) Nukleotide vor dem ICL (Raschle, Knipscheer et al. 2008). An dieser Stelle findet der Wechsel zur TLS statt, indem FANCD2 mit DNA Polymerase ν (Pol ν , POLN) interagiert (Moldovan, Madhavan et al. 2010). Pol ν verlängert den freiwerdenden DNA Strang bis zu einem Basenpaar vor dem ICL. Daraufhin wird der ICL durch einen dualen Einschnitt, links und rechts vom ICL entkoppelt. An diesem Schritt scheinen mehrere Nukleasen involviert zu sein, deren genaue Rolle jedoch noch nicht spezifiziert wurde. So wurde für die heterodimeren Nukleasen XPF-ERCC1, MUS81-EME1, SLX1-SLX4 und die *Fanconia anemia-associated nuclease 1* (FAN1) gezeigt, dass sie notwendig sind um die Sensitivität gegenüber Stickstofflost, MMC oder platinierenden Agenzien zu verhindern (Hanada, Budzowska et al. 2006; Fekairi, Scaglione et al. 2009). Es wird angenommen, dass die unterschiedlichen Nukleasen für verschiedene ICLs, wie z.B.

die DNA Struktur deformierende und nicht deformierende ICLs, zuständig sind (Smeaton, Hlavin et al. 2008). So hat jede Nuklease ihre eigene Spezifität, beispielsweise spalten XPF-ERCC1 und MUS81-EME1 bevorzugt 3'-Überhangstrukturen an ssDNA-dsDNA-Verknüpfungen, wohingegen SLX1-SLX4 und FAN1 bevorzugt 5'-Überhangstrukturen spalten (de Laat, Appeldoorn et al. 1998; Bastin-Shanower, Fricke et al. 2003; Fricke and Brill 2003; MacKay, Declais et al. 2010). Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Aktivierung der verschiedenen Nukleasen beeinflusst, ist die Zellzyklusphase in welcher der ICL detektiert bzw. repariert wird (Sengerova, Wang et al. 2011).

Schadensentfernung und Schließen der Lücke

Nach Entkopplung des ICLs in G0/G1 wird aufgrund der Tatsache, dass kein Schwesterchromatid vorhanden ist, die entstandene Lücke durch TLS Polymerasen geschlossen und das Monoaddukt durch NER entfernt (Wang, Peterson et al. 2001; Sarkar, Davies et al. 2006)

Wird der ICL bei Zusammentreffen mit der Replikationsgabel entkoppelt, wird der freigewordene DNA Strang an der Läsion verlängert. Hierfür wird die blockierte Replikationsgabel durch homologe Rekombination stabilisiert. Die Überbrückung der Läsion erfolgt durch fehleranfällige Transläsionspolymerasen, dessen Aktivierung durch monoubiquitiniertes PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) erfolgt (Lehmann, Niimi et al. 2007). Gegenüber des entkoppelten ICLs wird durch die Deoxycytosinmonophosphat (dCMP) Transferase REV1 ein Cytosin in den freiwerdenden DNA-Strang eingefügt. Die Verlängerung des freiwerdenden DNA Stranges erfolgt dann durch eine weitere TLS Polymerase, vermutlich Pol ζ (Mirchandani, McCaffrey et al. 2008; Raschle, Knipscheer et al. 2008). Ist die Integrität des Elternstrangs wiederhergestellt, kann die Doppelstrangbruchreparatur und Reinitiation der Replikation gestartet werden.

Das entkoppelte Monoaddukt muss nun vom zweiten Strang entfernt werden, was in einem zweiten Reparaturzyklus geschieht. Dieser Schritt erfolgt durch NER oder spontane Hydrolyse (Niedernhofer, Lalai et al. 2005). Des Weiteren gibt es Untersuchungen, die darauf hinweisen, dass die an der BER beteiligten Glykosylasen NEIL1 und Alkyladenin-glykosylase/Methylpuringlykosylase (MPG) an der Entfernung der Monoaddukte durch Psoralen und MMC erzeugter ICLs beteiligt ist (Allan, Engelward et al. 1998; Couve-Privat, Mace et al. 2007)

Reparatur des offenen DSBs durch HR

Während in bisherigen Modellen angenommen wurde, dass die homologe Rekombination sowohl zur Reparatur des entkoppelten ICLs, als auch der Replikationsgabel dient, ist man mittlerweile der Ansicht, dass die Auffüllung der entstandenen Lücke lediglich durch TLS

bewerkstelligt wird und die HR dazu dient in einem zweiten Reparaturzyklus die Replikationsgabel nach Reparatur der ICL-Addukte an beiden Strängen wieder aufzubauen (Niedernhofer, Lalai et al. 2005; Thompson and Hinz 2009). Hierfür kolokalisiert FANCD2 mit an der HR beteiligten Faktoren, wie BRCA1, BRCA2/FANCD1, FANCO/RAD 51C, FANCN/PALB2 und FANCI/BACH1/BRIP1 und der Histondeacetylase TIP60 (Taniguchi, Garcia-Higuera et al. 2002; Xia, Sheng et al. 2006; Kumaraswamy and Shiekhattar 2007; Hejna, Holtorf et al. 2008; Jensen, Carreira et al. 2010). RAD 51 bildet Nukleoproteinfilamente an gebrochenen DNA-Enden, sucht nach der homologen Sequenz im Schwesterchromatid und katalysiert den Strangaustausch, welcher für die HR benötigt wird (Baumann, Benson et al. 1996).

Der FA Signalweg wird schließlich durch die Deubiquitinierung von FANCD2 mit Hilfe der Ubiquitin Hydrolase USP1, zusammen mit UAF1 beendet (Nijman, Huang et al. 2005; Cohn, Kowal et al. 2007).

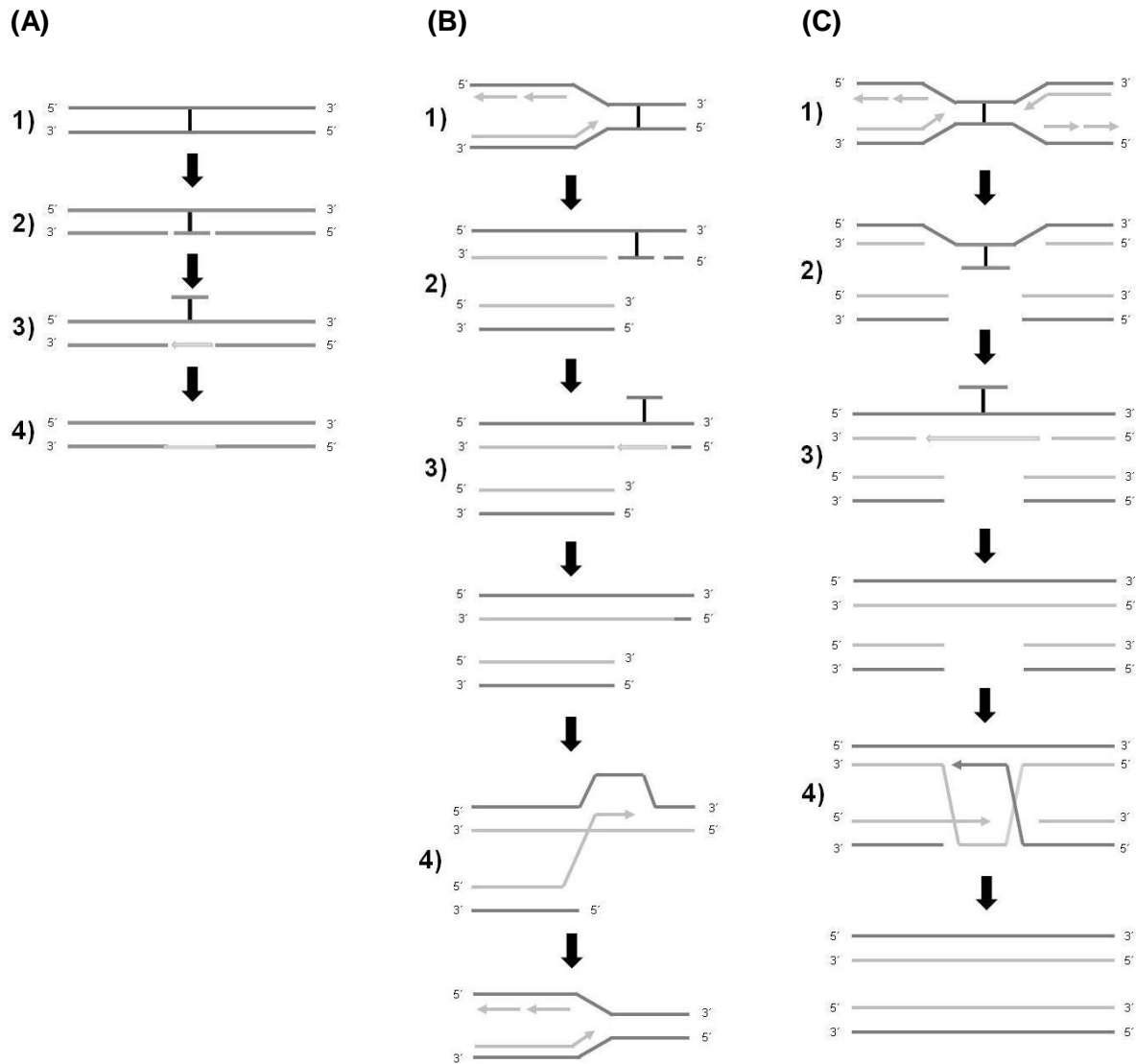


Abb. 2-7: Vereinfachte, schematische Darstellung der ICL-Reparatur in Abhängigkeit der Zellzyklusphase. Die ICL Reparatur bestehend aus der Schadenserkenkung (1), Inzision und Entkopplung des ICLs (2), Schadensentfernung (3) und Reparatur des offenen Doppelstrangbruchs (4) - replikationsunabhängig (A), beim Zusammentreffen mit einer Replikationsgabel (B) und mit zwei Replikationsgabeln (C) - ist hier vereinfacht dargestellt.

2.5.3.3 Nukleotidexzisionsreparatur

Durch die NER werden sperrige, die Helix deformierende DNA-Schäden, wie z.B. Cyclobutan Pyrimidin Dimere (CPDs) oder auch (6-4) Photoprodukte (6-4PPs), welche durch UV-Licht entstehen, entfernt. Aber auch zahlreiche sperrige chemische Addukte, wie sie beim Kontakt mit Aflatoxinen, Benzo[a]pyren und anderen genotoxischen Agenzien entstehen, werden durch die NER beseitigt. Es werden zwei Wege unterschieden: die *Global Genome Repair* (GGR), wobei über das gesamte Genom hinweg die Schäden, transkriptionsunabhängig entfernt werden, und die transkriptionsgekoppelte Reparatur

(TCR), wobei lediglich am transkribierten Strang aktiver Gene Läsionen repariert werden. Durch GGR werden v.a. die Helix entwindende Schäden wie 6-4PPs entfernt wohingegen durch die TCR sperrige Läsionen, wie CPDs, Intrastrang *Crosslinks* und DNA-Addukte, die durch Benzo[a]pyren entstehen, beseitigt werden (Christmann, Tomicic et al. 2003). Die beiden Wege unterscheiden sich lediglich in der Schadenserkenkung, die Entfernung läuft in beiden Fällen gleich ab.

Bei der GGR wird die DNA durch den XPC-HR23A/B-centrin2 Komplex und dem *damaged DNA-binding protein* (DDB) Komplex, bestehend aus DDB1 und DDB2/XPE überwacht (Payne and Chu 1994; Araki, Masutani et al. 2001; Wakasugi, Kawashima et al. 2002). Wird beschädigte DNA detektiert, dissoziiert HR23 von XPC (Bergink, Toussaint et al. 2012). Die DNA wird dann um die Läsion herum durch den Transkriptionsfaktor II H (TFIIH) entwunden. TFIIH ist ein Komplex der sich aus 10 Untereinheiten, u.a. den beiden Helikasen XPB und XPD zusammensetzt (Schultz, Fribourg et al. 2000). Dieser Prozess ist ATP-abhängig, welches durch die ATPase Aktivität von XPB zur Verfügung gestellt wird (Oksenyuch, Bernardes de Jesus et al. 2009). Es entsteht eine Blase, die durch XPA und RPA stabilisiert wird (Coin, Proietti De Santis et al. 2006). RPA aktiviert die beiden Endonukleasen XPG und ERCC1-XPF, welche das DNA-Fragment am 3'- bzw. 5'-Ende einschneiden (O'Donovan, Davies et al. 1994; Sijbers, de Laat et al. 1996). In Abhängigkeit des DNA-Schadens hat das ausgeschnittene Stück eine Länge zwischen 25 und 30 Nukleotiden (Svoboda, Taylor et al. 1993; Moggs, Yarema et al. 1996). Die entstandene einzelsträngige Lücke wird im Anschluss durch die replikative DNA Polymerasen δ und ϵ oder die Transläsionspolymerase κ gefüllt (Popanda and Thielmann 1992; Ogi, Limsirichaikul et al. 2010). Dieser Prozess erfolgt mit Hilfe von PCNA (Nichols and Sancar 1992; Shivji, Kenny et al. 1992), in Anwesenheit von RFC und RFA (Shivji, Podust et al. 1995; Overmeer, Gourdin et al. 2010). Das freigewordene DNA Fragment wird dann schließlich vorwiegend durch DNA Ligase III-XRCC1, aber auch durch DNA Ligase I geschlossen (Moser, Kool et al. 2007).

Obwohl die TCR bereits in den 80er Jahren entdeckt wurde, ist ihr molekularer Mechanismus immer noch relativ unklar (Bohr, Smith et al. 1985; Mellon, Spivak et al. 1987). Bisher bekannt ist, dass bei der TCR die blockierte RNA Polymerase II (RNAPII) am beschädigten DNA-Strang mit Cockayne Syndrom B (CSB), einer DNA-abhängigen ATPase und CSA kolokalisiert (Selby, Drapkin et al. 1997). CSB rekrutiert die an der NER beteiligten Proteine und die Histonacetyltransferase p300. CSA bindet HMG1 (*high mobility group nucleosome binding domain 1*), welches für die Verformung des Chromatins verantwortlich ist, XAB2 (*XPA binding protein 2*), welches als Gerüstprotein für XPA dient und dem Transkriptionsfaktor TFIIIS (Fousteri, Vermeulen et al. 2006). Sobald das Chromatin für die TCR zugänglich ist, wird die Läsion durch die NER wie oben beschrieben entfernt.

2.5.4 Zelltod

Zelltod ist ein fundamentaler zellulärer Prozess der eine wichtige Rolle bei der Formung unserer Körper während der Entwicklung, aber auch der Eliminierung ungewollter Zellen, z.B. im Immunsystem spielt. Ein Ungleichgewicht in der Bildung und Entfernung von Zellen kann dramatische Folgen, wie Krebs, Autoimmunität, Schlaganfall, Herzinfarkt und Diabetes mit sich bringen. In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl von Wegen des Zelltods definiert und abgegrenzt. Mit dem Ziel eine einheitliche Definition des Zelltodes und dessen morphologischer Kriterien zu definieren, hat sich das NCCD (*Nomenclature Committee on Cell Death*) gegründet. Nach dessen Definition ist eine Zelle tot, wenn eine der drei folgenden morphologischen Kriterien zutrifft: (1) Die Zelle verliert die Integrität der Plasmamembran, was *in vitro* durch die Inkorporation von Vitalfarbstoffen wie Propidiumjodid (PI) (s. 3.2.11) nachgewiesen werden kann. (2) Die Zelle wird komplett in einzelne Körperchen fragmentiert, welche als apoptotische Körperchen bekannt sind. (3) Die tote Zelle bzw. seine Fragmente werden *in vivo* von benachbarten Zellen eingeschlossen. Die drei Haupttypen des Zelltods stellen Apoptose, Nekrose und der autophagieassoziierte Zelltod, dar. Weitere bekannte, aber weniger gut untersuchte Wege sind Anoikis, Exzitotoxizität, mitotische Katastrophe, Wallersche Degeneration, Paraptose, Pyroptose, Pyronekrose und Entose (Kroemer, Galluzzi et al. 2009).

Da in der vorliegenden Arbeit lediglich die Apoptose untersucht wurde, wird diese im Folgenden genauer erläutert.

2.5.5 Apoptose

Während der Apoptose kommt es zu einer Abrundung der Zelle, pseudopodenartiger Ausstülpung der Plasmamembran, Reduzierung des Zellvolumens, Chromatinkondensation (Pyknose), Fragmentierung des Zellkerns (Karyorrhexis), Abschnürung apoptotischer Körperchen, welche *in vivo* phagozytiert werden. All diese morphologischen Charakteristika sind bedingt durch die proteolytische Aktivität von Caspasen (*cysteine-dependent aspartate-specific acid proteases*). Hierbei handelt es sich um in gesunden Zellen als Zymogen vorliegende Enzyme, welche nach Aktivierung eine Vielzahl von Proteinen spalten. Mehr als 400 Zielproteine der Caspasen sind derzeit bekannt. Neben der Aktivierung der Caspasen, zählen als weitere biochemische Merkmale der Apoptose der Konsum von ATP, die Freisetzung von Cytochrom C ins Zytoplasma, die Translokation des Membran-Phosphoglycerids Phosphatidylserin von der Membraninnenseite an die Membranaußenseite und die nukleosomale Fragmentierung der DNA (Taylor, Cullen et al. 2008; Kroemer, Galluzzi et al. 2009; Ulukaya, Acilan et al. 2011).

Apoptose kann über zwei Wege initiiert werden. Beim extrinsischen Weg wird die Apoptose durch Bindung von Liganden an membranständige Todesrezeptoren der Tumornekrosefamilie (TNF-R) ausgelöst. Der intrinsische oder auch mitochondriale Weg wird durch Stimuli in der Zelle, wie DNA Schaden, Glucocorticoide, Störungen im Redoxgleichgewicht, oder Entzug von Wachstumsfaktoren, ausgelöst und verursacht eine Permeabilisierung der mitochondrialen Membran, die von einer Ausschüttung pro-apoptotischer Faktoren in das Cytosol gefolgt ist.

Beide Wege führen zu einer Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7.

2.5.5.1 Extrinsischer Signalweg

Die TNF-R-Familie umfasst mehr als 20 Mitglieder, von denen die am besten charakterisierten FASR/CD95, TNF-R1, DR3, DR4/TRAILR1 und DR5/TRAILR2 darstellen. Diese Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulär gelegenen Todesdomäne (*death domain*). Desweiteren gibt es drei *decoy* Rezeptoren, DcR 1-3, welche eine funktionelle extrazelluläre Domäne besitzen, die Todesdomäne jedoch fehlt oder trunkiert ist (Degli-Esposti, Smolak et al. 1997; Marsters, Sheridan et al. 1997; Pitti, Marsters et al. 1998). Zu den zugehörigen Liganden der TNF Superfamilie gehören die Todesrezeptorliganden FASL/CD95L, TNF- α , TRAIL/Apo-2L, TWEAK/Apo-3L und Lymphotoxin- α . Mit der Ausnahme von Lymphotoxin- α sind alle Liganden Typ II Transmembranproteine, welche durch Metalloproteinasen bzw. Cysteineproteasen gespalten werden können und dann als lösliche Zytokine vorliegen (McGeehan, Becherer et al. 1994; Kayagaki, Kawasaki et al. 1995; Chicheportiche, Bourdon et al. 1997; Griffith, Chin et al. 1998; Mariani and Krammer 1998).

Bindet ein Ligand an seinen zugehörigen Rezeptor kommt es zur Aktivierung desselbigen durch Trimerisierung. Daraufhin kommt es zu einer Clusterung der Todesdomänen, an die dann intrazelluläre Adapterproteine, wie FADD/MORT1, TRADD und RAIDD rekrutiert werden (Chinnaiyan, O'Rourke et al. 1995). Die Adapterproteine wiederum rekrutieren über ihre *death effector domain* (DED) Procaspase 8. Der hierdurch entstehende Komplex wird als *death-inducing signaling complex* (DISC) bezeichnet. Es kommt zur Oligomerisierung von Procaspase 8, die sich durch Autoproteolyse aktiviert (Kischkel, Hellbardt et al. 1995). Die aktivierte Caspase 8 spaltet und aktiviert damit die Effektorcaspasen 3, 6 und 7.

2.5.5.2 Intrinsischer Signalweg

Der mitochondriale Weg wird durch das Zusammenspiel pro- und antiapoptotischer Mitglieder der BCL-2 Familie reguliert. Zu den prominentesten proapoptotischen BCL-2-Proteinen gehören BAX, BAK, BID, BCL-X_s, BAD, BIM, BMF, BOK, NOXA und PUMA. Unter den anti-apoptotischen Mitgliedern der BCL-2-Familie sind v.a. BCL-2, BCL-X_l und MCL-1 zu

nennen (Hotchkiss, Strasser et al. 2009). Wirken Stressfaktoren, wie reaktive Sauerstoffspezies, DNA Schaden oder der Entzug von Wachstumsfaktoren auf die Zelle ein, kommt es entweder zur Aktivierung des *BCL-2 associated X protein* (BAX) oder des *BCL-2 antagonist or killer* (BAK). BAX wandert daraufhin zu den Mitochondrien und sowohl BAX, als auch BAK homooligomerisieren. Hierdurch kommt zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP) und in Folge dessen zu einer Ausschüttung proapoptotischer Faktoren aus dem Intermembranraum in das Cytosol (Cosulich, Worrall et al. 1997; Polster, Kinnally et al. 2001). Ein solcher proapoptotischer Faktor ist Cytochrom C, welches in Anwesenheit von dATP Apaf-1 rekrutiert und zu dessen Oligomerisierung führt. Dieses rekrutiert, dimerisiert und aktiviert Caspase 9 über seine CARD (*Caspase recognition domain*). Der entstehende heptamere Komplex wird als Apoptosom bezeichnet. Caspase 9 wiederum spaltet und aktiviert hierdurch die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 (Li, Nijhawan et al. 1997; Yuan and Akey 2013). Ein weiterer wichtiger Regulator der Apoptose in der onkogengerichteten Tumorthherapie ist das BCL-2-Familiemitglied BIM. Dieses wirkt proapoptotisch indem es antiapoptotische BCL-2-Proteine bindet und dadurch die Aktivität von BAX und BAK begünstigt. Dabei wird dessen Aktivität u.a. durch Chemotherapeutika, vermittelt über AP-1 und die beiden MAPKs JNK und ERK1/2 gesteuert (Akiyama, Dass et al. 2009).

Aktivierte Caspase 8 kann *Bcl-2 homology 3 (BH3) interacting domain death agonist* (BID) spalten und dadurch aktivieren. tBID (*truncated BID*) führt zu MOMP und somit zur Aktivierung des intrinsischen Signalweges (Li, Zhu et al. 1998; Luo, Budihardjo et al. 1998; Kuwana, Mackey et al. 2002). Hierdurch kann also eine Interaktion zwischen dem intrinsischen und dem extrinsischen Weg stattfinden, wodurch das apoptotische Signal amplifiziert wird.

p53 spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Apoptose. So werden PUMA (*p53-upregulated modulator of apoptosis*), NOXA und BAX nach DNA Schaden und anderen den Zelltod verursachenden Signalen durch p53 transkriptionell aktiviert (Oda, Ohki et al. 2000; Han, Flemington et al. 2001; Nakano and Vousden 2001; Michalak, Villunger et al. 2008). Auch FASR unterliegt der Kontrolle von p53 nach DNA Schaden (Muller, Wilder et al. 1998).

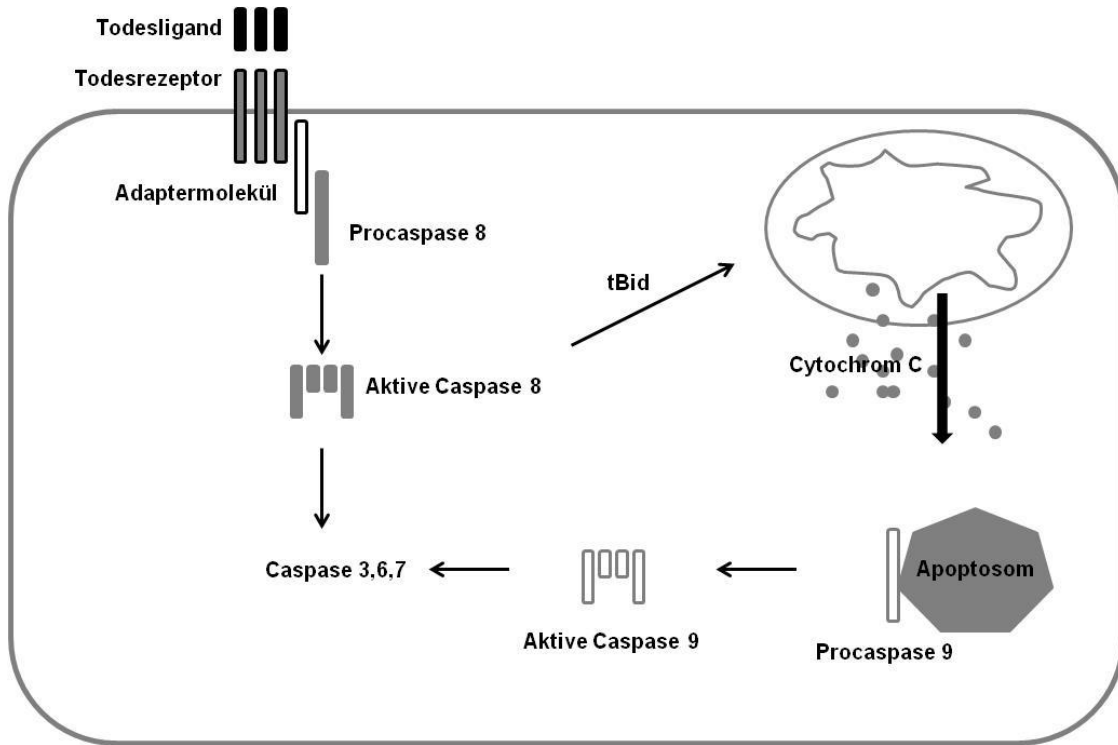


Abb. 2-8: Vereinfachtes Schema der Apoptose

In unserem Institut wurde gezeigt, dass ACNU und TMZ in humanen Glioblastomzellen zur Apoptose führen, welche in Anwesenheit von p53 über den FAS-Rezeptor, also den extrinsischen Signalweg ausgelöst wird (Batista, Roos et al. 2007; Roos, Batista et al. 2007).

2.6 Ziel der vorliegenden Arbeit

In unserer Arbeitsgruppe wurde die Rolle von c-FOS in der Antwort auf DNA-schädigende Ereignisse, wie Behandlung mit Karzinogenen, Zytostatika und Bestrahlung mit UV-C bereits ausführlich untersucht. Hierbei konnte u.a. gezeigt werden, dass c-FOS die NER maßgeblich beeinflusst, indem es die Neusynthese der Endonuklease XPF steuert (Dosch and Kaina 1996; Kaina, Haas et al. 1997; Christmann, Tomicic et al. 2006; Christmann, Tomicic et al. 2007). FRA-1, ein weiteres Mitglied der FOS-Familie, ist in vielen Tumoren überexprimiert. Welche Auswirkungen dies auf die Sensitivität gegenüber Cytostatika hat, wurde bisher jedoch nur in wenigen Arbeiten untersucht und lieferte oft gegenläufige Ergebnisse. So kamen Macleod et al. zu dem Ergebnis, dass die Herunterregulation der *FRA-1*-Expression in einer humanen Ovarialkarzinomzelllinie zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit Cisplatin führt (Macleod, Mullen et al. 2005). Hamdi et al. hingegen zeigten, dass FRA-1 in der Glioblastomzelllinie T98G nach Behandlung mit Cisplatin proapoptotisch

wirkt, indem es zu einer reduzierten Phosphorylierung von CHK1 und CDK2 und in Folge dessen zu einem verminderten S-Phase-Arrest führt (Hamdi, Popeijus et al. 2008). Da bekannt ist, dass FRA-1 gerade in der Modulation der malignen Eigenschaft von Gliomzellen eine große Bedeutung zukommt (Debinski and Gibo 2005), wurde in der vorliegenden Arbeit dieses Zellsystem als Modell gewählt. Nach der Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft kommen in der Chemotherapie von Gliomen die Cytostatika Procarbazine, CCNU, Vincristin ACNU, Teniposid und Temozolomid zum Einsatz, weshalb entschieden wurde, mit dem Nitrosoharnstoff ACNU zu behandeln. Ziel der Arbeit ist es, herauszufinden, ob FRA-1 in Glioblastomzellen die Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum ACNU beeinflusst. Hierzu soll in verschiedenen Zelllinien FRA-1 transient und stabil herunterreguliert werden und die Auswirkungen auf den Zelltod analysiert werden. Zeigt sich ein Einfluss von FRA-1, soll die molekulare Ursache hierfür geklärt werden. Hierzu soll der Einfluss von FRA-1 auf die DNA-Reparatur, Apoptose und Zellzykluskontrolle geklärt werden.

Ein weiteres bei der Therapie von Glioblastomen verwendetes Zytostatikum ist TMZ. Für dieses Agens konnte in unserem Institut bereits gezeigt werden, dass die Effektivität vom p53-Status abhängt. In weiteren geplanten Arbeiten soll nun untersucht werden, ob nicht nur p53 sondern auch AP-1 und die MAPKs einen Einfluss auf die Zytotoxizität dieser Substanz haben. Hierzu soll in Glioblastomzellen vergleichend der Einfluss von p53, AP-1 und der MAPKs auf die durch ACNU bzw. TMZ vermittelte Apoptose untersucht werden. Sollten sich Hinweise auf eine Rolle von AP-1 und der MAPKs bei der Resistenz gegenüber ACNU und TMZ ergeben soll auch hier die molekulare Ursache aufgeklärt werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BA) 40 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Coomasie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Entwicklerlösung	Kodak GBX, Rochester, USA
Ethanol (EtOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromidlösung (1 %, 10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fixierlösung	Kodak GBX, Rochester, USA
Glycerin ~87 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-(4-[2-Hydroxyethyl]-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kupfersulfat (CuSO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol (MeOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na-K-Tatrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Na-Lauroylsarcosinat-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdiphosphat (Na ₄ P ₂ O ₇)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Roche, Mannheim, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween 20 (Polysorbat 20)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
6/24/48/96-Loch-Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Chemilumineszenz-Filme	GE Healthcare, München, Deutschland
Deckgläser 24x50 mm	Diagonal, Münster, Deutschland
Durchflusszytometer-Analysenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einmalpipetten (5/10/25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Kryoröhrchen (2 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Nitrozellulose-Membran Protran®	Whatman, Dassel, Deutschland
Objektträger	Diagonal, Münster, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Company, Chicago, Illinois, USA
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml) Multi®-Ultra	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Platten, 96-Loch	Bio-Rad, München Deutschland
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (weiß, gelb, blau)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

Material und Methoden

Pipettenspitzen, Tip One, gestopft, repellierend	Star Lab, Ahrensburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (15/50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spritzenfilter, Rotilabo 0,45 µM	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Transferpapier (1 mm)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturschalen und -flaschen, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

3.1.3 Kits, Assays und gebrauchsfertige Mixe

Kit/Assay/Mix	Hersteller
Venor®GeM Mykoplasmandetektionskit	Biochrom, Berlin, Deutschland
ECL-Detektions-Kit	GE Healthcare, München, Deutschland
Effectene®Transfection Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
Lipofectamine® RNAiMAX	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Roti Load 4 x (SDS Ladepuffer)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SYBR®GrennERTM qPCR SuperMix for iCycler	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Taq DNA Pol Master RED	Biomol, Hamburg, Deutschland
Verso cDNA Kit	ABgene, Hamburg, Deutschland
Nucleospin® RNA II	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

Die Anwendung der aufgelisteten Systeme fand, falls nicht gesondert vermerkt, nach Angaben des Herstellers statt.

3.1.4 Inhibitoren, Aktivatoren und biologische Substanzen

Substanz	Hersteller
100 bp DNA-Leiter	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Actinomycin D	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Agar (Pulver)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Ampicillin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe, Deutschland
AnnexinV-FITC (Fluoresceinisothiocyanat)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
G418 (Gentamycin)	Biochrom, Berlin, Deutschland
LB-Medium, Pulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Low melting point</i> (LMP)-Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Frema Reform Granovita, Heimertingen, Deutschland
O ⁶ -Benzylguanin (O ⁶ BG)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PeqGOLD Protein-Marker I/III	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Pifithrin α (p53-Inhibitor)	Sigma-Aldrich, Karlsruhe, Deutschland
Rinderserumalbumin, Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SB203580 (p38K-Inhibitor)	Sigma-Aldrich, Karlsruhe, Deutschland
SP600125 (JNK1/2/3-Inhibitor)	Sigma-Aldrich, Karlsruhe, Deutschland
U0126 (MEK1/2-Inhibitor)	Promega, Madison, USA

3.1.5 Zytostatika

Zytostatikum	Hersteller	Verarbeitung
Nimustin [ACNU]	Sigma, München, Deutschland	Es wurden 10 mM Stocks in sterilem dH ₂ O hergestellt, in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20°C gelagert
Temozolomid [TMZ]	Schering-Plough, Kenilworth, NJ, USA	Es wurden 35 mM Stocks in einem Gemisch aus DMSO und sterilem dH ₂ O (1:2) hergestellt, in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert

Generell sind Nitrosoharnstoffe relativ instabil. Für ACNU gibt es vergleichsweise wenige Untersuchungen, deren Ergebnisse eine weite Streuung aufweisen. So kommen Hisazumi et al. (Hisazumi, Nakajima et al. 1983) zu dem Ergebnis, dass ACNU, in Lösung bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Temperatur von 37°C eine Halbwertszeit von 25 Minuten hat, wohingegen Schein et al. (Schein, Heal et al. 1978) zeigen, dass die Halbwertszeit unter den gleichen Bedingungen 75 Minuten beträgt. In jedem Fall ist es aber wichtig das Zytostatikum möglichst schnell zum Einsatz zu bringen, um die volle Aktivität zu nutzen, was in den hier durchgeführten Versuchen getan wurde.

TMZ ist in saurer wässriger Lösung (pH 1) bei Raumtemperatur über mehrere Tage stabil, wohingegen mit steigendem pH-Wert die Stabilität stark abnimmt. So liegt die Halbwertszeit bei einem pH-Wert von 6,8 bei 10 Stunden bei eine pH-Wert von 7,9 bei 28 Minuten und bei pH 9,1 bei 9 Minuten. Werden die Lösungen bei -20°C aufbewahrt reduziert sich der Abbau massiv und TMZ bleibt für mindestens 90 Tage stabil (Andrasi, Bustos et al. 2010).

3.1.6 Geräte und Hilfsmittel

Geräte	Typ	Hersteller
Analysenwaage	A200S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Brutschrank für Bakterien	Typ B	Heraeus, Hanau, Deutschland
Brutschrank für Säugerzellen (CO ₂ -Inkubator)	Hera Cell 150	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchflusszytometer	FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Einfrierbox	Cryo 1°C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Elektrophoreseapparatur, Agarose Gel	Wide Mini-Sub Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Elektrophoreseapparatur, Comet Assay	41-2025	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Elektrophoreseapparatur, EMSA	PROTEAN® II XL Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Elektrophoreseapparatur, SDS-PAGE	Mini Protean 3 Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Entwicklungskassette		Apligene, Heidelberg, Deutschland
Flüssigkeitsszintillationszähler	TriCarb 2100TR	Canberra Packard Central Europe, Schwadorf, Österreich
Gefrierschrank (-20°C)	Premium NoFrost	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	Forma 905	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Heizblock	Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer	MR 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mikroplatten Photometer	Multiscan EX	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Mikroskop	TMS-F	Nikon, Düsseldorf, Deutschland

Material und Methoden

Mikroskop	Axiovert 35	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop	BX 50	Olympus, Hamburg, Deutschland
N ₂ -Zelltank	Locator 6+	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
pH-Meter	pH525	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Pipetman (P10, P20, P200, P1000)	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	IBS, Fernwald, Deutschland
Präzisionswaage	TE4101	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Proteintransferkammer	Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Schüttelinkubator	Certomat R	Braun, Melsungen, Deutschland
Spannungsgerät	200/2.0 Power Supply	Bio-Rad, München, Deutschland
Spannungsgeräte	Power Pac 200/300	Bio-Rad, München, Deutschland
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Sterilbank	Hera Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermocycler PCR	My Cycler Thermal Cycler	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermocycler RealTime	MyiQ Single Color RealTime PCR Detection System	Bio-Rad, München, Deutschland
Transilluminator	InGenius	Syngene, Cambridge, UK
Überkopfschüttler	Eigenbau	Werkstatt, Universitätsmedizin Mainz
Ultraschallstab	Sonifier Cell Disruptor B 15	Branson, Dietzenbach, Deutschland
Vakuumpumpe	N022 AN.18	KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland
Vortexer	Vortex Genie	Bender&Hobein, Gera, Deutschland
Wasserbad		Grant Instruments Ltd, Cambridge, UK
Wippschüttler	Tercomat, TC2	Braun, Melsungen, Deutschland

Material und Methoden

Zählkammer	Neubauer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge	Galaxy Mini, Tischzentrifuge	Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge	Sorvall, RC-5	Du Pont, Neu-Isenburg, Deutschland

3.1.7 Software

Software	Quelle
Ascent software v2.6	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Cell A	Olympus, Hamburg, Deutschland
CellQuest Pro	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
EndNote X5	Thompson Reuters, NY City, USA
GeneSnap v6.0.5	Syngene, Cambridge, UK
GeneTools	Syngene, Cambridge, UK
Komet 4.0.2	Kinetic Imaging, Liverpool, UK
MS Office v2007	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
Multi Analyst v1.0.1	Bio-Rad, München, Deutschland
Photoshop v7.0	Adobe Systems, München, Deutschland
WinMDI	J. Trotter (facs.scripps.edu/software.html)

3.1.8 Zelllinien und Medien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle	Verwendetes Medium
LN-229	Humane primäre Glioblastomzelllinie	ATCC®CRL-2611™	DMEM High Glucose, 5 % FBS
LN-229-pSuper-Leervektor	LN-229-vec	selbst hergestellt	DMEM High Glucose, 10 % FBS
LN-229-pSuper-shRNA-Fra-1	LN-229-shFra-1	selbst hergestellt	DMEM High Glucose, 10 % FBS

U87MG	Humane Glioblastom-(Astrozytom-) zelllinie	ATCC®HTB-14™	DMEM High Glucose, 10 % FBS
U138MG	Humane primäre Glioblastomzelllinie	ATCC®HTB-16™	DMEM High Glucose, 10 % FBS

3.1.9 Antikörper

Primärantikörper

Zielprotein	Spezifikation	Herkunft	Größe (kDa)	Verdünnung	Hersteller
c-Fos	sc-52	Kaninchen pAk	62	1:1000	Santa Cruz Biotechnology. Heidelberg, Deutschland
Fra-1	sc-183	Kaninchen pAk	38	1:2000	Santa Cruz Biotechnology. Heidelberg, Deutschland
pErk2		Kaninchen pAk	42/44	1:1000	Cell Signaling Technology. Beverly, MA, USA
Erk2	sc-154	Kaninchen pAk	42	1:1000	Santa Cruz Biotechnology. Heidelberg, Deutschland
β-Actin	sc-47778	Maus mAk	43	1:1000	Santa Cruz Biotechnology. Heidelberg, Deutschland
pJNK		Kaninchen pAk	46/54	1:1000	Cell Signaling Technology. Beverly, MA, USA
JNK		Kaninchen pAk	46/54	1:1000	Cell Signaling Technology. Beverly, MA, USA
pp38K (Thr180/Tyr182)		Kaninchen pAk	38	1:1000	Cell Signaling Technology. Beverly, MA, USA
p38K		Kaninchen pAk	38	1:1000	Santa Cruz Biotechnology. Heidelberg, Deutschland
XPF		Maus mAk	112	1:1000	Neomarkers
ERCC-1 (rwo18)		Kaninchen pAk	37	1:1500	(Sijbers, de Laat et al. 1996)
p-H2AX (Ser139)		Maus mAk	22	1:1000	Millipore, Billerica, MA, USA
Caspase 8	9746	Maus mAk	57/43+41/21	1:2000	Cell Signaling Technology. Beverly, MA, USA
Caspase 3	9664	Kaninchen pAk	17	1:1000	Cell Signaling Technology. Beverly, MA, USA

Material und Methoden

Caspase 9	9508	Maus mAk	47/35	1:1000	Cell Signaling Technology. Beverly, MA, USA
CD178 (FasL)	556387	Maus mAk	40/26	1:500	BD Transduction Laboratories, Erembodegem, Belgien
Fas	sc-8009	Maus mAk	48	1:500	Santa Cruz Biotechnology. Heidelberg, Deutschland
TBP (TATA binding protein)	ab818	Maus mAk	38	1:1000	abcam, Cambridge, UK
Chk1	2345	Kaninchen pAK	56	1:1000	Cell Signaling Technology. Beverly, MA, USA Cell
pChk1		Kaninchen pAk	56	1:1000	Cell Signaling Technology. Beverly, MA, USA
p-c-Jun (Ser73)	9261	Kaninchen pAK	48	1:1000	Cell Signaling Technology. Beverly, MA, USA
c-Jun	9165	Kaninchen pAK	43	1:2000	Cell Signaling Technology. Beverly, MA, USA
p53	DLN-08276	Maus mAk	53	1:2000	Dianova, Hamburg, Deutschland

Sekundärantikörper

Zielorganismus	Herkunft	Einzusetzende Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus IgG, HRP- konjugiert	Ziege	1:2000	Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, Pennsylvania, USA
Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	Ziege	1:2000	Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, Pennsylvania, USA

3.1.10 Primer

Primer	Sequenz	Zyklenzahl	Annealing- Temperatur
<i>h-GAPDH</i>	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT-3' (up) 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3' (low)	21	58°C
<i>h-BAX</i>	5'-GGA CGG GTC CGG GGA GCA GCC C-3' (up) 5'-GCC TTG AGC ACC AGT TTG CTG GC-3' (low)	24	59°C
<i>h-BCL2</i>	5'-CGC ACC GGG CAT CTT CTC CT-3' (up) 5'-GCA TCC CAG CCT CCG TTA TCC T-3' (low)	25	53°C
<i>h-NOXA</i>	5'-GCC TGG GAA GAA GGC GCG CAA G-3' (up) 5'-CAG GTT CCT GAG CAG AAG AG-3' (low)	25	58°C
<i>h-PUMA</i>	5'-TGT AGA GGA GAC AGG AAT CCA CGG-3' (up) 5'-AGG CAC CTA ATT GGG CTC CAT CTC-3' (low)	28	57°C

Material und Methoden

<i>h-FRA-1</i>	5'-CAT CGC AAG AGT AGC CTT CCT CTG AC-3' (up) 5'-GGA GAT AGG GTT GGG TGG AT-3' (low)	23	58°C
<i>h-FASL</i>	5'-ATA TGT CAA CGT ATC TGA GCT CTC TCT-3' (up) 5'-GAG TTC TAT GTT CTT CCG TCA TAT TCC-3' (low)	35	60°C
<i>h-FASR</i>	5'-AAG GGA TTG GAA TTG AGG AAG ACT G-3' (up) 5'-GTG GAA TTG GCA AAA GAA GAA GAC A-3' (low)	25	57°C
<i>h-DDB2</i>	5'-GGG GCT CCA GCA GTC CTT TTT-3' (up) 5'-GGG CCA CAT GCG TCA CTT TCT TTT-3' (low)	27	59°C
<i>h-ERCC1</i>	5'-AGG GCC GCC AGC AAG GAA GAA AT-3' (up) 5'-TGC AGT CGG CCA GGA TAC ACA T-3' (low)	26	58°C
<i>h-XPC</i>	5'-CTT TGA TTT CCA TGG CGG CTA CTC-3' (up) 5'-GCT GCT GCT TTC TTT TCC CTT TTG-3' (low)	27	59°C
<i>h-XPF</i>	5'-TCC CGT GCT TCT GAT TGA GTT TGA-3' (up) 5'-AGG GCT GCT AAT TCT GCG ATG TTC-3' (low)	30	60°C
<i>h-XPG</i>	5'-AAG AAG CAG CAG CCA GCG AAA TAG-3' (up) 5'-AAA CAC AGA TCT GGC GGT CAC GAG-3' (low)	27	58°C

3.1.11 siRNA

Zielgen	Sequenz	Hersteller
<i>FRA-1</i>	5'-CAC CAT GAG TGG CAG TCA G-3'	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
AllStars negative control siRNA (<i>nonsense</i> siRNA)	Nicht angegeben	Qiagen, Hilden, Deutschland

3.1.12 Plasmide

Vektor	Hersteller/Bezugsquelle
pSuper.basic	OligoEngine, Seattle
pSV2-neo	(Southern and Berg 1982)

3.1.13 Enzyme und entsprechende Reaktionspuffer

Substanz	Hersteller/Bezugsquelle
10 x Restriktionspuffer (rot)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
10 x T4 Polynukleotid-Kinase Reaktionspuffer	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
BGLII (10 000 U/ml)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
EcoRI (10 000 U/ml)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
HINDIII (18 000 U/ml)	GE Healthcare, München, Deutschland
T4 DNA-Ligase (2x10 ⁶ U/ml), 10 x Reaktionspuffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
T4 Polynukleotid-Kinase (10 000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Phosphokreatin-Kinase	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Uracil-DNA-Glykosylase (1000 U/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim Deutschland

3.1.14 Puffer und Stammlösungen

Lösung	Zusammensetzung
Lysispuffer I	10 mM NaCl, 3 mM MgCl ₂ , 10 mM Tris-HCl, pH 7,4
Lysispuffer II (MAP-Kinase-Puffer)	20 mM Tris-HCl (pH7,4), 40 mM Na ₄ P ₂ O ₇ , 5 mM MgCl ₂ , 50 mM NaF, 10 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 1 % SDS
Gesamtzelleextraktpuffer	1 mM EDTA, 1 mM Mercaptoethanol, 5 % Glycerin, 20 mM Tris-HCl, pH 8,5
Bindepuffer Stock (10x)	10 mM HEPES (pH 7,4), 1,4 M NaCl, 25mM CaCl ₂ , 1 % BSA
Lowry I	2 % Na ₂ CO ₃ , 0,1 M NaOH
Lowry IV	2% Na ₂ CO ₃ , 0,1 M NaOH, 0,02 % Na-K-Tatrat, 0,01 % CuSO ₄
Bradford-Reagenz	8,5 % Phosphorsäure, 4,75 % Ethanol, 1 % Commasie blue G250
Anlagerungspuffer pSuper	100 mM NaCl, 50 mM Hepes, pH 7,4, sterilfiltriert
Ponceau S	0,1 % Ponceau S, 5 % CH ₂ COOH
Lysepuffer (Alkalischer Comet Assay)	2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1 % Na-Laurylsarcosinat, 0,1 % Triton X-100, 1 % DMSO, pH 10

Elektrophoresepuffer (Alkalischer Comet Assay)	300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13
Elektrophoresepuffer (Western Blot)	50 mM Tris, 384 mM Glycin, 0,1 % SDS
Neutralisationspuffer (Alkalischer Comet Assay)	0,4 M Tris, pH 7,5
Hypotoner Kernlysispuffer (EMSA)	0,2 mM EDTA, 20 mM Hepes-KOH, pH 7,4
TBS	20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6
Reaktionsmix für EMSA	10 % Glycerin, 10 mM Hepes-KOH (pH.7,9), 50mM KCl, 4 mM MgCl ₂ , 4 mM Tris/HCl, 0,5 mM EDTA, 0,005 % BSA, 0,005 % poly (dIdC)
Transferpuffer/Blottingpuffer (Western Blot)	50 mM Tris, 384 mM Glycin, 20 % Methanol
Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8
Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 1,25 mM EDTA

3.2 Methoden

3.2.1 Zelllinien und Zellkultur

Die Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und 7 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Die Zelllinie LN-229 wurde in DMEM High Glucose 5 % FBS, LN-229 pSuper wurde in DMEM High Glucose 10 % FBS kultiviert.

Je nach Teilungsrate wurden die Zellen etwa alle zwei bis drei Tage passagiert. Hierfür wurde das sich auf den Zellen befindende Medium entfernt und Überreste mit zuvor auf 37°C erwärmten PBS abgewaschen. Die Zellen wurden dann mit Trypsin/EDTA abgelöst, 1:5 – 1:20 mit Medium verdünnt und dann zurück in die Zellkulturflasche gegeben.

Zum Einfrieren wurden exponentiell wachsende Zellen wie bereits beschrieben, mit Trypsin/EDTA abgelöst, in 10 ml Medium aufgenommen und bei 150 rpm für 5 Min herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in Einfriermedium (Medium mit 10 % DMSO versetzt) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden über Nacht bei -80°C in der Einfrierbox weggefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese im Wasserbad erwärmt, dann in 37°C warmes Medium aufgenommen, bei 1500 rpm für 5 Min zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in eine kleine Zellkulturflasche überführt.

Alle hier verwendeten Zelllinien wurden regelmäßig durch *hot start Polymerase Chain Reaction* mit Hilfe des Venor®GeM Mykoplasmen Detektion Kits auf Mykoplasmen (*M. orale*, *M. hyorhinis*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. salivarium*, *M. hominis*, *M. pneumoniae*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. synoviae* und verschiedene Ureaplasma-Spezies) untersucht. Nur unkontaminierte Zelllinien wurden für die Versuche verwendet.

3.2.2 Behandlung der Zellen

Die Behandlung der Zellen erfolgte, wenn nicht anders beschrieben durch eine Dauerbehandlung.

3.2.3 Erstellung von Wachstumskurven

Zur Bestimmung der Replikationsdauer der Zellen unter den beschriebenen Bedingungen wurde Eingehends die Zellzahl bestimmt und je 100 000 Zellen in Doppelwerten in 6 cm Schalen ausgesät. nach 24, 48, 72, und 96 h wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, in einem definierten Volumen resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Diese wurde dann in einer logarithmischen Skala aufgetragen und die Generationszeit in Stunden mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$G = \frac{\log 2 * \Delta t}{\log N - \log N_0}$$

G= Generationszeit in Stunden

Δt = Dauer der Kultur in Stunden

N = Zellzahl zum Endpunkt

N_0 = Zellzahl zu Beginn

3.2.4 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® RNA II Kits der Firma Macherey-Nagel. Nach dem Aufbrechen der Membran und Waschen mit Ethanol, wurde die RNA auf einer Silikamembran gebunden und die restliche DNA durch einen DNase-Verdau abgebaut. Die RNA wurde dann mit Wasser eluiert und die RNA-Konzentration photometrisch am NanoDrop bestimmt

3.2.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem Thermo Scientific Verso cDNA Kit wobei 1 µg der isolierten Gesamt-RNA als Ausgangssubstanz diente. Diese wurde zur Entfernung von Sekundärstrukturen zunächst für 5 Min auf 70°C erhitzt und anschließend zusammen mit 5 x cDNA-Synthese-Puffer, dNTP-Mix, RNA *random* hexamer Primer, RT *Enhancer* und dem Verso Enzym Mix für 60 Min auf 42°C erhitzt. Abschließend wurde die reverse Transkriptase durch Erhitzen auf 95°C für 2 Min inaktiviert.

3.2.6 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR dient zur Vervielfältigung von Nucleinsäuren und somit zur späteren Quantifizierung mittels Absorption. Hierbei werden durch eine Denaturierung bei 95°C die beiden Stränge der Ausgangs-DNA getrennt. Initial erfolgt dies für 2 Min um sicher zu stellen, dass die gesamte DNA und auch die Primer einzelsträngig vorliegen. Im nächsten Schritt wird die Temperatur auf einen Wert gesenkt, der eine spezifische Anlagerung (*Annealing*) der Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige DNA erlaubt. Dieser liegt zwischen 55°C und 65°C. Anschließend wird die Temperatur auf 72°C, dem Temperaturoptimum der thermostabilen Taq-Polymerase erhöht, wobei es zur Verlängerung (*Elongation*) des DNA Doppelstranges kommt und somit zu einer Verdopplung der Ausgangs-DNA. Die neu synthetisierten Stränge dienen im nächsten Zyklus wieder als Matrize, an welche die Primer hybridisieren können. Dadurch kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA Fragmente.

Für die PCR wurden 3 µl cDNA, mit je 2 µl des auf 20 mM verdünnten *Primers* und 15 µl taq DNA Polymerase 2v Mastermix red (1,5 mM MgCl₂) mit RNase freiem Wasser auf 30 µl aufgefüllt und dann mit unten angegebenem Programm amplifiziert.

Standardprogramm:

Schritt	Temperatur	Dauer
Initialisierung	95°C	2 Min
Denaturierung	95°C	30 Sek
Annealing	Primerspezifisch	45 Sek
Elongation	72°C	1 Min

Die Proben wurden anschließend in einem 1%igen Agarosegel in TBE-Puffer, welches mit Ethidiumbromid (1:10000) versetzt war, zur Größenauftrennung einem elektrischen Feld von 100 V ausgesetzt. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid lagert sich in die DNA und kann in einem UV-Transilluminator detektiert werden. Zusätzlich wurde mit den Proben ein Größenmarker von 100 bp aufgetragen und die Expression anhand des Referenzgens *GAPDH* quantifiziert.

3.2.7 Quantitative Echtzeit PCR (*Real time quantitative PCR*)

Das Prinzip der qRT-PCRst beruht auf dem der herkömmlichen RT-PCR (vgl. 3.2.6). Durch den Einsatz eines in dsDNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes, wie z.B. Hoechst 33258, YO-PRO-1 oder SYBR®Green I ist es möglich bereits während des Laufs, die DNA-Menge zu quantifizieren. Die Fluoreszenz steigt somit während der PCR proportional zur DNA-Menge an.

Hierfür wurden zunächst je ein Master-Mix aus der cDNA und einer aus den verwendeten *Primern* wie folgt vorbereitet:

Primer-Mix pro well:

10 µl 2x SYBR®GreenER™qPCR SuperMix

1,67 µl Primerpaar [3 µM]

2,33 µl ddH₂O

cDNA-Mix pro well:

1 µl cDNA (unverdünnt)

5 µl ddH₂O

Es wurden 14 µl des Primer-Mastermixes vorgelegt und 6 µl es cDNA-Mastermixes hinzupipettiert. Als zusätzliche Kontrolle wurde anstelle des cDNA-Mastermixes eine *No Template Control* (NTC) mitgeführt, d.h. es wurden zum Primer-Mastermix 6 µl ddH₂O hinzugefügt. Die Proben wurden jeweils in Dreifachansätzen pipettiert. Als interner Standard dienen die Haushaltsgene *β-ACTIN* und *GAPDH*.

Für die Durchführung der qRT-PCR, wurde folgendes Programm eingesetzt:

Schritt	Temperatur	Dauer
Vorinkubation	50°C	2 Min
	95°C	8 Min 30 Sek
Denaturierung	95°C	15 Sek
Annealing	55°C	30 Sek
Elongation	72°C	40 Sek

Denaturierung, Annealing und Elongation wurden 45 x hintereinander durchgeführt.

Die Normalisierung und Kalibrierung erfolgte automatisch durch die Software iQ5 2.0 Standard Edition. Lag der C_t -Wert (*cycle threshold*) bei einer Zyklenzahl von >35, wurde die Probe aus der Analyse ausgeschlossen.

Zur Verifizierung der spezifischen Amplifikation erstellte das Gerät eine Schmelzkurve, aus der die Schmelztemperatur T_m der Amplifikate ablesbar ist und mit der theoretischen T_m des gewünschten Amplifikats verglichen werden kann.

Hierzu wurde folgendes Temperaturprofil appliziert:

95°C; 1 Min: Initiale Denaturierung

55°C; 1 Min: Abkühlen auf Starttemperatur

+0,5 °C in 10 s bis Erreichen von 95°C: Detektion der Fluoreszenzintensität

Wurden hierbei *Primer*-Dimere oder unspezifische Amplifikate detektiert, so wurde der PCR-Lauf aus der Expressions-Analyse ausgeschlossen

3.2.8 Herstellung von Zellextrakten

Je nach Fragestellung, wurden die sich im Überstand befindenden Zellen zusammen mit abgelösten Zellen vereinigt, oder nur die abgelösten Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 1500 rpm für 5 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann verworfen und das Zellpellet entweder bei -20°C eingefroren oder direkt nach unten beschriebenen Verfahren aufgeschlossen.

3.2.8.1 Herstellung von Kernextrakten für Western Blot

Das Zellpellet wurde in 1 ml Lysispuffer I resuspendiert und für 5 Min auf Eis gelagert. Durch Zugabe von 50 µl 10%igem NP40 wurde in einer anschließenden Inkubationszeit von 5 Min auf Eis, die Cytoplasmamembran aufgebrochen. Es wurde dann für 5 Min bei 3200 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet erneut in 1 ml Lysispuffer I

resuspendiert um Reste des NP40 und des Cytoplasmas zu entfernen. Durch Zentrifugation für 5 Min bei 320 rpm und 4°C wurde der Zellkern sedimentiert und nach Verwerfen des Überstandes, je nach Größe in 150 µl bis 200 µl Lysispuffer II (MAP-Kinase-Puffer) resuspendiert. Dem Lysispuffer II wurde zuvor frisch zur Inhibierung der Oxidation von Sulfhydrylgruppen, und zur Inhibierung von Proteasen und Phosphatasen DTT, PMSF und Na₃VO₄, in einer Konzentration von 1 mM hinzugegeben. Die Kernmembran wurde mittels Ultraschall (2x10 Schläge; Duty Cycle: 40 %, Output Control: 4) aufgebrochen und die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 15 Min bei 14000 rpm und 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt nach Lowry (s. 3.2.9.1) bestimmt.

3.2.8.2 Herstellung von Kernextrakten für EMSA

Die Zellpellets wurden, wie bereits in 3.2.8.1 beschrieben, aufgeschlossen und anschließend mit Lysispuffer I gewaschen. Der sedimentierte Zellkern wurde dann in 2 Vol hypotonem Kernlysispuffer, welcher zuvor mit 600 mM KCl versetzt wurde resuspendiert und für 30 Min auf Eis lysiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 15 Min abgetrennt und der Überstand, welcher die gelösten Kernproteine enthält, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Vol Kernlysispuffer (ohne KCl) verdünnt, mit 20 % Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren. Der Proteingehalt wurde mittels der Methode nach Bradford (s. 3.2.9.2) bestimmt.

3.2.8.3 Herstellung von Gesamtzellextrakten zur Detektion unphosphorylierter Proteine

Das Zellpellet wurde in 200 µl Gesamtzellextraktbuffer resuspendiert und die Membranen mittels Ultraschall (3x10 Schläge; Duty Cycle: 40 %, Output Control: 4) aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 15 Min bei 14000 rpm und 4°C abgetrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentration der Proteine wurde mittels der Methode nach Bradford (s. 3.2.9.2) bestimmt.

3.2.8.4 Herstellung von Gesamtzellextrakten zur Detektion phosphorylierter Proteine

Adhärenente, 70-80 % konfluente Zellen wurden mit PBS gewaschen und dann mit 200 µl auf 95°C erhitztem, einfach konzentrierten Roti-Load-Ladepuffer© pro 6 cm Schale benetzt. Das Zelllysat wurde abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Um die DNA und Membran zu zerstören und somit die Viskosität des Lysats zu reduzieren, wurde zusätzlich mit Ultraschall (3x10-15 Schläge; Duty Cycle: 40 %, Output Control: 4) lysiert. Die Proteine wurden durch Erhitzen für 5 Min auf 95°C denaturiert und das Lysat bis zur weiteren

Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Der Proteinangleich erfolgte densitometrisch, mittels Quantifizierung des Western Blot-Signals einer entsprechenden Ladekontrolle.

3.2.9 Proteinbestimmung

3.2.9.1 Proteinbestimmung mittels Lowry

Bei der Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951) entsteht durch Zugabe von Kupfer(II)-Ionen zu den Kernextrakten in alkalischer Lösung eine Biuretreaktion, wobei Kupfer(II)-Ionen mit der Peptidbindung zu einem blau-violetten Komplex reagieren. Zusätzlich wird Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert, welches mit dem Folinreagenz zu Molybdänblau reagiert, dessen Absorption bei 600 nm photometrisch bestimmt werden kann.

Hierfür wurde mit BSA in 1,5 ml Reaktionsgefäßen eine Eichkurve erstellt und von den Kernextrakten jeweils 10 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde mit Lowry I auf 150 µl aufgefüllt, 250 µl Lowry IV hinzugegeben und anschließend 50 µl 50 % Folinreagenz zugesetzt und für 30 Min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Dann wurden je 100 µl in Doppelwerten auf eine Mikrotiterplatte überführt und die Absorption bei 600 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde anhand der Eichkurve errechnet.

3.2.9.2 Proteinbestimmung mittels Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) beruht auf dem Prinzip, dass der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G250 in saurer Lösung zusammen mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen einen Komplex bildet, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 470 nm auf 595 nm verschiebt, was mittels Photometer gemessen werden kann.

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine Eichkurve mit BSA auf einer Mikrotiterplatte erstellt. Von den Zellextrakten wurden jeweils 2 µl in Doppelwerten auf die Mikrotiterplatten gegeben. Dann wurde mit Bradfordreagenz auf 200 µl aufgefüllt und für 15 Min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Die Absorption wurde bei 600 nm photometrisch bestimmt und die Proteinkonzentration anhand der Eichkurve rechnerisch ermittelt.

3.2.10 Western Blot

Bei dieser Methode werden die Proteine zunächst im elektrischen Feld in einem SDS-Polyacrylamid-Gel der Größe nach aufgetrennt und anschließend im elektrischen Feld von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Proteinexpression kann nun durch Inkubation mit einem für das Protein spezifischen Primärantikörper und einem gegen die

Spezies aus dem der Primärantikörper gewonnen wurde gerichteten HRP-konjugierten Sekundärantikörper detektiert werden. Das hier verwendete Verfahren beruht auf der Methode nach Laemmli (Laemmli 1970).

3.2.10.1 SDS-Polyacrylamidgel

Die entsprechenden Volumina der Proteinextrakte wurden, wenn sie nicht bereits direkt nach dem Ernten mit dem Roti-Load-Ladepuffer© lysiert wurden, mit letzterem im Verhältnis 2:1 versetzt und für 5 Min auf 95°C erhitzt um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen.

Anschließend wurden die Proben auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Dieses besteht aus einem Sammelgel, welches einen pH-Wert von 6,8 besitzt wodurch alle Proteine negativ geladen werden und einem Trenngel, welches einen pH-Wert von 8,6 besitzt. Hier werden die Proteine nur nach der Größe, nicht jedoch nach der Ladung aufgetrennt. Neben den Proben wurde immer mindestens ein Größenmarker aufgetragen, der zur späteren Verifizierung der detektierten Proteine dienen soll.

3.2.10.2 Western Blot-Transfer

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde nun im Blotting-Puffer auf eine Nitrocellulosemembran gelegt und zusammen mit Whatman-Papier eng gepackt einem horizontalem elektrischen Feld (300 mA, 1 h) ausgesetzt. Hierbei wandern die Proteine aus dem Gel, auf die Nitrocellulosemembran. Die Übertragung der Proteine wurde im Anschluss durch eine Färbung mit Ponceau S überprüft.

3.2.10.3 Detektion der Proteine

Um eine spätere unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurde für 1 h bei Raumtemperatur in 5% Milch bzw. BSA TBS 0,2% tween geblockt. Anschließend wurde über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in 5% Milch bzw. BSA TBS 0,2% tween inkubiert. Nach dreifachem Waschen für 10 Min mit TBS 0,2% tween wurde mit dem entsprechenden Zweitantikörper (1:2000) in 5% Milch TBS 0,2% tween für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. An den Zweitantikörper gekoppelt, ist eine Meerrettichperoxidase, welche zur späteren Detektion der Proteine dient. Die Membran wurde dann erneut dreimal für 10 Min mit TBS 0,2 % tween gewaschen. Dann wurde die Membran vollständig mit ECL (*enhanced chemilumineszenz*)-Reagenz benetzt und für 2 Min inkubiert. Das im ECL-Reagenz enthaltene Luminol wird von der an den Zweitantikörper gekoppelten Peroxidase umgesetzt, wodurch es zu einer Lumineszenz (Emission von Licht) kommt. Die Proteine können dann im Dunkeln durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert werden.

3.2.11 Messung des Zelltods am Durchflusszytometer

3.2.11.1 SubG1-Messung

Bei der SubG1-Messung wird der DNA-Gehalt der Zelle durch Einlagerung von Propidiumiodid mit Hilfe des Durchflusszytometers bei einer Wellenlänge von 350 nm bestimmt. Da der DNA-Gehalt der Zelle sich im Laufe des Zellzyklus verändert (G1<S<G2/M), kann auf die Zellzyklusphase rückgeschlossen werden. Während der Apoptose kommt es zur Fragmentierung und späterem Abbau der DNA, wodurch der DNA-Gehalt dieser Zellen unter dem der G1-Phase liegt und als SubG1 im Durchflusszytometer detektiert werden kann (Nicoletti, Migliorati et al. 1991; Fraker, King et al. 1995)

Hierfür wurde der Überstand von behandelten Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und die adherenten Zellen mit Trypsin abgelöst, mit dem Überstand vereinigt und bei 1500 rpm für 5 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zur Vereinzelung der Zellen in 100 µl PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch tropfenweise Zugabe von 2 ml eiskaltem 70 % Ethanol permeabilisiert. Hierbei wurde durchgehend gevortext, um eine Verklumpung der Zellen zu verhindern. Die Proben werden dann für mindesten 1 h und maximal eine Woche bei -20°C gelagert. Zur Vorbereitung für die Messung am Durchflusszytometer, wurde der Ethanol nach Zentrifugation der Proben bei 1500 rpm für 5 Min entfernt. Das Zellpellet wurde dann in 336 µl PBS (0,3 mg/ml RNase) für 1 h verdaut. Anschließend wurden 164 µl Propidiumiodid zu einer Endkonzentration von 16,4 µg/ml hinzugefügt und die Proben bis zur Messung auf Eis im Dunkeln gelagert.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit WinMDI.

3.2.11.2 Annexin V/PI Färbung

Während der Apoptose werden Phosphatidylserinreste von der Innen- auf die Außenseite der Zellmembran transloziert (Martin, Reutelingsperger et al. 1995). Annexin bindet in Abhängigkeit der Ca^{2+} -Konzentration diese Phosphatidylserinreste und ermöglicht somit eine Unterscheidung vitaler und apoptotischer Zellen. Für die FACS-Messung wurde Fluorescein-isothiocyanat (FITC-)gekoppeltes Annexin V verwendet, welches bei einer Wellenlänge von 495 nm maximal angeregt wird und daraufhin Photonen emittiert. Nekrotische Zellen werden, durch eine Zerstörung der Zellmembran, durchlässig für Annexin V, welches an intrazelluläre Phosphatidylserinreste binden kann, wodurch diese ebenfalls durchflusszytometrisch detektiert werden. Um nun nekrotische Zellen von apoptotischen unterscheiden zu können, wird zusätzlich mit Propidiumiodid (PI) (350 nm) gefärbt, welches nicht membrangängig ist, also lediglich von nekrotischen/spät-apoptotischen, nicht jedoch von apoptotischen Zellen aufgenommen wird.

Nach Behandlung der Zellen wurden die adhärennten Zellen abtrypsinisiert, mit den sich im Überstand befindenden Zellen vereinigt und bei 1000 rpm für 4 Min pelletiert, der Überstand verworfen und mit PBS gewaschen. Anschließend wurde erneut bei 1000 rpm zentrifugiert, das PBS verworfen und das Zellpellet in 50 µl 1x Bindepuffer vorsichtig resuspendiert. Nach Zugabe von 2,5 µl Annexin V-FITC, wurde für 20 Min im Dunkeln und auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 430 µl 1x Bindepuffer und 10 µl Propidiumjodid [50 µg/ml] zur Zellsuspension gegeben und die Populationen direkt am FACS bestimmt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe von WinMDI

3.2.12 Transformation von Bakterien

Kompetente *E.coli* wurden mit Plasmid versetzt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Hierbei lagert sich das Plasmid an das Bakterium an. Anschließend wurde der Ansatz für 1 Min auf 42°C erhitzt und direkt wieder auf Eis gegeben, wodurch das Plasmid in das Bakterium aufgenommen wird. Die transformierten Bakterien wurden dann in 1 ml flüssiges LB-Medium aufgenommen und vermehrt, indem sie für 1 h bei 37°C auf dem Bakterieneschüttler inkubiert wurden. 100 µl der Bakterienkultur wurden dann zur Selektion auf mit Ampicillin versetzte Agarplatten ausgestrichen.

3.2.13 Transfektion von Zellen

3.2.13.1 Stabil

Für die stabile Transfektion von Zellen wurde das Effectene Transfektions Kit von Qiagen verwendet. Hierfür wurden einen Tag vor Transfektion 2×10^5 Zellen auf 6 cm Platten ausgesäht. Am Tag der Transfektion wurde mit 1,8 µg Vektor und 0,2 µg Neomycinresistenzvektor (pSV2-neo) nach Protokoll transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Platten 1:5 in 10 cm Schalen gesplittet und nach 8 h mit 0,5 mg/ml Neomycin versetzt. Die Klone wurden in 24 well Platten überführt und die Expression des entsprechenden Proteins mittels Western Blot Analyse überprüft.

Herstellung des pSuper-shFRA-1 Plasmids

Zunächst wurde der pSuper-Vektor linearisiert. Hierfür wurden 20 µg Vektor zusammen mit 72 U des Restriktionsenzym HindIII in Restriktionspuffer (rot) für 2 Std. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 40 U des Restriktionsenzym BglII hinzugefügt und erneut für 2 Std. bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der beiden Restriktionsenzyme wurde der Ansatz abschließend für 20 Min auf 80°C erhitzt und dann bei -20°C gelagert.

Die zwei für die *hairpin* Expression notwendigen Oligonukleotide gegen *FRA-1* wurden von Oligoengine bezogen und in sterilem, nukleasefreiem Wasser auf eine Endkonzentration von 3 mg/ml eingestellt. Anschließend wurden die beiden DNA-Stränge aneinander angelagert, in dem je 1 µl jedes Oligonukleotids zusammen mit 48 µl Anlagerungspuffer vermengt wurden und dadurch auf eine Konzentration von 0,12 µg/µl eingestellt wurden. Die Mischung wurde für 4 Min bei 90°C und anschließend für 10 Min bei 70°C inkubiert und dann langsam auf 10°C abgekühlt.

Die doppelsträngigen Oligonukleotide wurden dann in den linearisierten Vektor geklont indem 2 µl/0,24 µg der Oligonukleotide zusammen mit 1 µl T4-DNA-Ligase-Puffer, 1 µl/0,5 µg Vektor, 5 µl nukleasefreiem Wasser und 1 µl T4-DNA-Ligase über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

Zur Steigerung der späteren Transformation, wurde nach der Klonierung für 30 Min bei 37°C mit BglIII inkubiert, wodurch Plasmide in die das Oligonukleotid nicht integriert wurde, linearisiert werden.

Anschließend wurden kompetente *E. coli*-Bakterien Stamm RR1 mit 11 µl des Vektor-konstrukts wie oben beschrieben, transformiert. Die transformierten Bakterien wurden dann auf Agarplatten, welche mit Ampicillin versetzt wurden (100 µg/ml), über Nacht selektiert. Positive Klone wurden dann wiederum über Nacht in ampicillinhaltigem LB-Medium kultiviert. Aus einem Teil dieser Klone wurde nun mit dem NucleoSpin Kit von Macherey-Nagel das Plasmid isoliert. Der Rest der Klone wurde im Verhältnis 1:1 mit Glycerin (98 %) versetzt in N₂ schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Um zu überprüfen ob das Insert in die klonierten Plasmide eingebaut wurde, wurde ein Kontrollverdau durchgeführt. Hierbei wurden 1 µg (2 µl) Plasmid zusammen mit 1 µl EcoRI, 1 µl HindIII und 1 µl Puffer R versetzt und 5 µl nukleasefreiem Wasser für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Größe der Restriktionsfragmente wurde dann durch Auftrennung im elektrischen Feld in einem ethidiumbromidhaltigem 2 %igem Agarosegel bestimmt.

Zur abschließenden Überprüfung der Vektoren wurde die Region um das klonierte DNA-Fragment von der Firma Genterprise Genomics (Mainz, Deutschland) sequenziert.

Insert

Zielgen	Sequenz (F: <i>forward</i> ; <i>sense</i> ; R: <i>reverse</i> ; <i>antisense</i>)	Plasmidname
FRA-1 NM_005438	F: 5'-CACCATGAGTGGCAGTCAG-3' R: 5'-CTGACTGCCACTCATGGTG-3'	shFRA-1

Aus den positiven Klonen wurde einer ausgewählt und von dem bei -80°C eingefrorenem Stock 50 µl im 5 ml flüssigem LB-Medium, welches mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt wurde, für 8 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. 600 µl der Vorkultur wurden dann zusammen mit 300 ml flüssigem LB-Medium, welches ebenfalls mit Ampicillin versetzt wurde, über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert.

Das Plasmid wurde dann aus den pelletierten, transformierten Bakterien mit Hilfe des High-copy plasmid purification kits (Maxi) von Macherey und Nagel isoliert.

3.2.13.2 Transient

Um die siRNA gegen FRA-1 einsetzen zu können, mussten die gegenläufigen Stränge zunächst aneinander angelagert werden. Hierfür wurden 30 µl siRNA *up* [100 mM], 30 µl siRNA *low*, 30 µl Anlagerungspuffer und 60 µl ddH₂O (RNase frei) für 1 Minute bei 90°C inkubiert und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die siRNA wurde in 30 µl Aliquots [20 µM] bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Die transiente Transfektion mit siRNA erfolgte mit dem Transfektionsreagenz LipofectamineTMRNAiMAX der Firma Invitrogen nach dem Protokoll für die *fast forward transfection*. Hierfür wurden am Tag vor der Transfektion je nach Versuchsansatz entsprechende Zellzahlen ausgesät. 24 h später wurde dann nach Protokoll mit 20 nM siRNA transfiziert. Dabei wurde für 6-Loch-Platten (3 ml Medium) 5 µl Lipofectamine und für 6 cm Platten (5 ml Medium) 7,5 µl Lipofectamine eingesetzt.

3.2.14 Comet Assay

Der *Comet Assay* wurde 1984 von Östling und Johanson entwickelt um DNA Doppelstrangbrüche unter neutralen Bedingungen zu detektieren (Ostling and Johanson 1984). Singh et al. entwickelte diese Methode weiter und ermöglichte unter alkalischen Bedingungen (pH>13) die Detektion von Einzelstrangbrüchen und alkalilabilen, wie z.B. apurinen und apyrimidinen Stellen (Singh, McCoy et al. 1988).

3.2.14.1 Alkalischer Comet Assay

Die behandelten Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen, abtrypsinisiert, bei 1500 rpm für 4 Min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem PBS auf eine Dichte von etwa 1x10⁶ Zellen/ml eingestellt. 15 µl der Zellsuspension wurden in 120 µl 0,5 % LMP (*low melting point*) Agarose, die zuvor auf 37°C erwärmt wurde, aufgenommen und auf mit 1,5 %iger Agarose beschichtete Objektträger gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Die beschichteten Objektträger wurden dann zur Polymerisation der Agarose für 5 Min bei 4°C gelagert. Anschließend wurde das Deckglas abgezogen und

die Objektträger für 50 Min im vorgekühlten Lysispuffer bei 4°C inkubiert. Der Lysispuffer enthält Triton X-100, welches die Zellmembran zerstört und eine hohe Konzentration an Salz (NaCl), welches Histone und andere lösliche Proteine entfernt. Die Präparate werden aus dem Lysispuffer genommen, kurz abtropfen gelassen und in eine Elektrophoresekammer überführt. Hier werden sie 2-3 mm mit vorgekühltem Elektrophoresepuffer überschichtet und für 20 Min bei 4°C inkubiert. Hierbei wird die DNA entwunden, wodurch sie als Einzelstrang vorliegt und alkalilabile Stellen freigelegt werden. Im Anschluss wird die Elektrophorese unter alkalischen Bedingungen durchgeführt. Hierfür wird ein elektrisches Feld mit 25 V und 300 mA für 15 Min angelegt. Die beschädigte DNA wandert nun aus dem Zellkern Richtung Anode, was in einem Bild resultiert, welches wie ein Komet aussieht, was dieser Methode den Namen verlieh. Nach der Elektrophorese werden die Objektträger aus der Kammer genommen, abtropfen gelassen und dreimal für 5 Min vorsichtig mit Neutralisationspuffer überschichtet. Der Neutralisationspuffer wird dann entfernt, indem die Objektträger kurz in dH₂O getaucht werden und anschließend werden die Präparate für 5 Min in 100 %igem Ethanol fixiert, für 2 h trocknen gelassen und bis zur Auswertung im Dunkeln aufbewahrt. Für die Auswertung wird die DNA durch Zugabe von 50 µl Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

3.2.14.2 Modifizierter alkalischer Comet Assay

Beim modifizierten *Comet Assay* wird das Protokoll des alkalischen *Comet Assays* um einen Schritt ergänzt. Nachdem die Zellen geerntet wurden und auf eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen eingestellt wurden, werden diese mit 8 Gy bestrahlt. Hierdurch wird die gesamte DNA fragmentiert und wandert bei der Elektrophorese aus dem Kern. Wurden die Zellen jedoch zuvor mit einem Agens behandelt, welches ICLs in der DNA verursacht, kann diese im elektrischen Feld nicht wandern. Dies ermöglicht die Detektion der Entstehung und Reparatur von ICLs im Zeitverlauf.

3.2.15 Gelretardationsexperimente (EMSA)

Der *electrophoresis mobility shift assay* (EMSA) wird genutzt um Protein-Nukleinsäureinteraktionen zu detektieren. Das Prinzip beruht auf der Beobachtung, dass Protein-Nukleinsäurekomplexe im elektrischen Feld langsamer wandern, als freie Nukleinsäuren. Zur Bestimmung der Bindungsaktivität eines Proteins werden hierfür Kernextrakte isoliert und diese mit einem definierten, radioaktiv markiertem Oligonukleotid inkubiert.

3.2.15.1 Radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden für EMSA

Zur Herstellung der Fehlpaarungsoligonukleotide wurden 250 pmol G-oligo mit 250 pmol C-oligo oder 250 pmol T-oligo gemischt und auf 40 µl mit A.bidest aufgefüllt. Die markierten Oligonukleotide wurden bei 80°C denaturiert und dann langsam auf 20°C abgekühlt. In

dieser Zeit erfolgte die Hybridisierung der Oligonukleotide. Die Ansätze wurden dann mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt. Zur radioaktiven Markierung der DNA-Sonde, wurden 1,4 µl (3,5 pmol) des Oligonukleotids mit 1 µl 10x Poly-Nucleotid-Kinase-Puffer und 3 µl ³²P-dATP, und 1 µl Polynukleotidkinase (PNK) gemischt und der Reaktionsansatz mit ddH₂O auf 10 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 60 Min bei 37° C erfolgte die Zugabe von 90 µl ddH₂O. Anschließend wurde die DNA durch die Zugabe von 250 µl abs. Ethanol über Nacht bei -20° C gefällt. Die DNA wurde für 30 Min bei 14000 Upm und 4°C abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen, in 100 µl A.bidest gelöst und erneut mit 2,5 Vol abs. Ethanol gefällt. Nach einer Inkubation bei -20° C über Nacht wurde die DNA für 30 min bei 14000 Upm und 4°C abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl ddH₂O gelöst.

Zielpromotor	Sequenz
MMP1	5'-AGTGGTGACTCATCACT-3'

3.2.15.2 EMSA Reaktion

Für die Bestimmung der Bindungsaktivität der Proteine an die radioaktiv markierte DNA-Sonde wurden 3 – 6 µg der Kernextrakte aus den behandelten Zellen (3.2.8.2), mit 15 µl Reaktionsmix gemischt und 25 fmol des radioaktiv markierten Oligonukleotids (3.2.15.1) zugegeben, und der Ansatz mit A.bidest auf 20 µl aufgefüllt und für 30 Min bei RT inkubiert. Für Supershift Experimente wurden die Proteinextrakte vor der Zugabe des radioaktiv markierten Oligonukleotids für 30 Min bei 4°C mit spezifischen Antikörpern gegen c-Jun und FRA-1 inkubiert.

3.2.15.3 EMSA Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Oligonukleotide wurde ein natives 4 % Polyacrylamidgel gegossen. Dieses wurde zunächst durch einen einstündigen Vorlauf bei 100 mV äquilibriert, als Laufpuffer diente hierbei 0,25 % TBE-Puffer. Die Proben wurden dann, zusammen mit einem Laufmarker (Bromphenolblau / Xylen-Cyanol FF) auf das Gel aufgetragen; der Gellauf erfolgte bei 100 mV, bis die Lauffront eines separat aufgetragenen Bromphenolblaumarkers ca. 1-2 cm vor dem Auslaufen war. Danach wurde das Gel abgebaut, bei +80°C und Unterdruck getrocknet und in einer Röntgenkassette mit Verstärkungsfilter mit einem Röntgenfilm belegt und über Nacht bei -80°C exponiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakteristika der Zelllinie LN-229

Die Zelllinie LN-229 wurde 1979 etabliert und stammt aus einer 60 Jahre alten Patientin mit einem rechts frontal gelegenen parieto-occipitalen Glioblastom. LN-229 sind p53-profizient, besitzen jedoch eine Punktmutation an Kodon 98, was einen Aminosäureaustausch zu Folge hat (CCT (Pro) --> CTT (Leu)). *PTEN* ist wildtypisch. Die Stimulation der Zelllinie mit FAS Ligand führt innerhalb von 16 Stunden zum Zelltod durch Apoptose. BCL-2 beschützt LN-229 vor dem durch FASL induzierten Zelltod, aber hat nur einen geringen Einfluss auf die durch Puromycin induzierte Apoptose (Ishii, Maier et al. 1999). LN-229 besitzt keine MGMT-Aktivität, was regelmäßig mit Hilfe eines MGMT-Assays überprüft wurde.

4.1.1 Replikationsdauer LN-229

Um weitere wichtige Charakteristika der Zelllinie LN-229 in Kultur zu beschreiben, wurden die Zellen in DMEM High Glucose Medium, welches mit 5 % FCS versetzt war, ausgesät und wie in 3.2.3 beschrieben, die Replikationszeit der Zelllinie bestimmt.

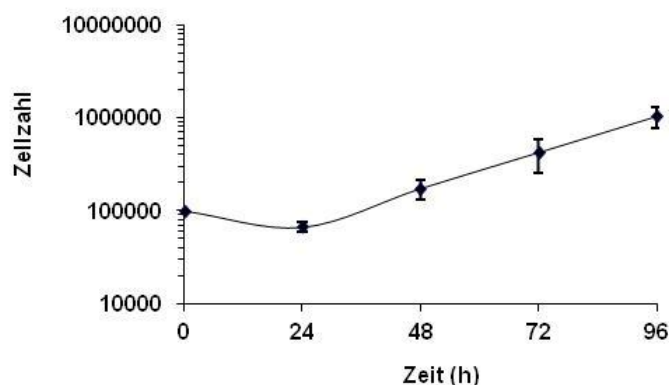


Abb. 4-1: Bestimmung der Replikationsdauer von LN-229 in DMEM High Glucose Medium, welches mit 5 % FCS versetzt wurde.

Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Aufgrund der Linearität des Wachstums wurde zur Ermittlung der Generationszeit, nach 3.2.3, der Zeitraum zwischen 24 h und 96 h gewählt. Die Verdopplungszeit von LN-229 unter den genannten Bedingungen beträgt demnach 18,17 h.

4.1.2 Chemosensitivität von LN-229 gegenüber ACNU und TMZ

Um die Bedingungen für weitere Behandlungen zu testen wurden LN-229 mit ACNU [50 µM] bzw. TMZ [100 µM] behandelt und die Toxizität in Abhängigkeit der Zeit mit Hilfe einer SubG1-Messung, wie in 3.2.11.1 beschrieben bestimmt.

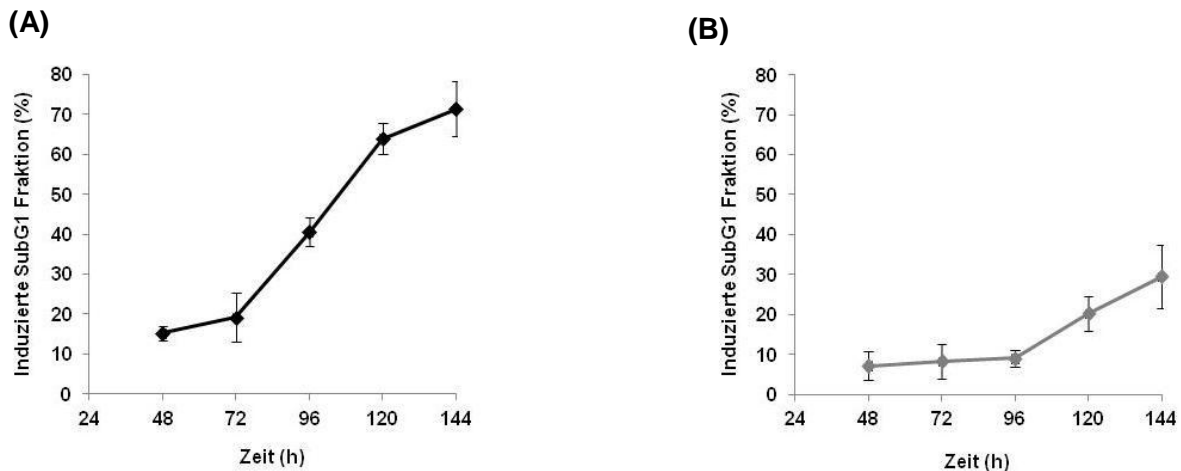


Abb. 4-2: Chemosensitivität von LN-229 gegenüber ACNU (A) und TMZ (B) im Zeitverlauf.

LN-229 wurden mit 50 µM ACNU (A) bzw. 100 µM TMZ (B) behandelt und nach 48, 72, 96, 120 und 144 h die SubG1-Fraktion in behandelten und unbehandelten Zellen bestimmt. Die induzierte SubG1-Fraktion wurde hier als Differenz der SubG1-Rate in den behandelten Zellen gegenüber den unbehandelten Zellen dargestellt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigen, dass unter den gewählten Bedingungen nach ACNU-Behandlung ein deutlicher Anstieg der SubG1-Fraktion nach 96 h zu beobachten ist, wohingegen nach TMZ-Behandlung die induzierte SubG1-Fraktion erst nach 120 h deutlich ansteigt (Abb. 4-2). Basierend auf diesen Resultaten wurde für folgende Sensitivitätsmessungen im Fall von ACNU die Behandlungsdauer von 96 h, für TMZ von 120 h gewählt.

4.2 Die Rolle von FRA-1 in der Chemosensitivität von LN-229 gegenüber ACNU

4.2.1 Regulation von FRA-1 nach ACNU Behandlung

Um den Einfluss einer Behandlung von LN-229 mit ACNU auf die Regulation von *FRA-1* zu testen wurde mittels PCR dessen Transkription bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass das *FRA-1*-Signal 8 h nach Behandlung mit 25 μ M ACNU deutlich ansteigt und die Induktion bis 24 h nach Behandlung anhält (Abb. 4-3 (A)).



Abb. 4-3: Einfluss der Behandlung mit ACNU auf die Regulation der FRA-1 Expression.

(A) LN-229 wurden mit 25 μ M ACNU behandelt, nach 4, 8, 16 und 24 h geerntet, und die Transkription von *FRA-1* mittels PCR bestimmt. (B) LN-229 wurden für 1 h mit dem Transkriptionshemmer Actinomycin D vorbehandelt. 6 h nach Behandlung mit 100 μ M ACNU wurden die Zellen geerntet und die *FRA-1* Expression mittels RT-PCR bestimmt. *GAPDH* diente als interner Standard für die eingesetzte cDNA-Menge.

Als nächstes wurde überprüft ob die transkriptionelle Regulation der *FRA-1*-Expression durch eine Neusynthese oder durch eine posttranskriptionelle Stabilisierung der mRNA verursacht wird. Hierfür wurde für 1 h mit dem Transkriptionshemmer Actinomycin D vorbehandelt und 6 h nach Behandlung mit 100 μ M ACNU die *FRA-1*-Expression mittels PCR bestimmt (Abb. 4-3 (B)). Hier ist zum Einen ein deutlicher Anstieg im Signal nach Behandlung mit ACNU zu sehen, zum Anderen führt eine Vorbehandlung mit Actinomycin D zu einem völligen Verschwinden des *FRA-1*-Signals, weshalb von einer Neusynthese und keiner posttranskriptionellen Stabilisierung der *FRA-1*-mRNA auszugehen ist.

Um zu überprüfen, ob die gesteigerte Transkription auch in einer erhöhten Translation der *FRA-1*-mRNA resultiert, wurden LN-229 mit verschiedenen Konzentrationen an ACNU behandelt und nach 6 h die *FRA-1* Expression bestimmt (Abb. 4-4 (A)).

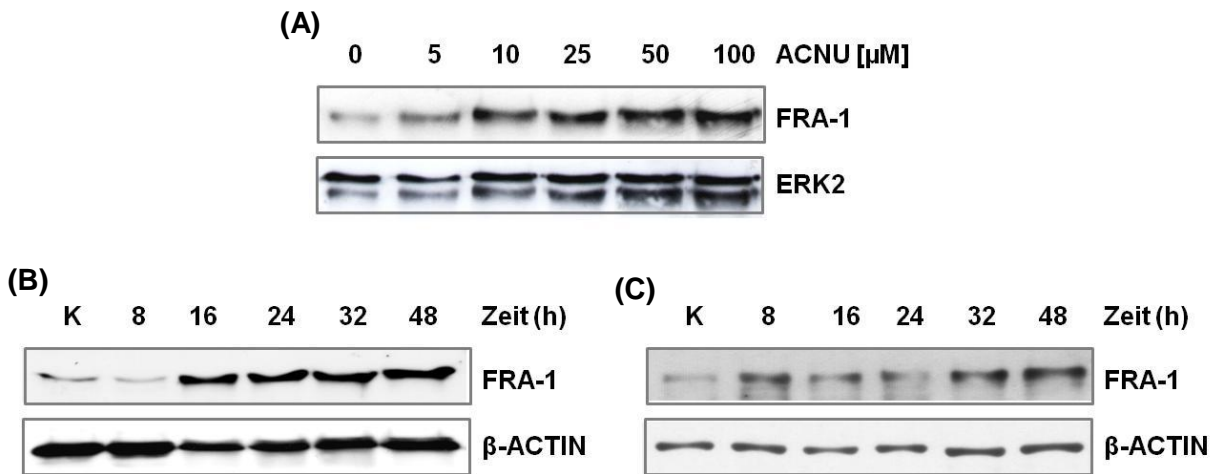


Abb. 4-4: FRA-1 Expression in LN-229 nach Behandlung mit ACNU.

(A) Die FRA-1-Expression in Abhängigkeit der ACNU-Dosis wurde 6 h nach Behandlung in Gesamtzellextrakten mittels Western Blot Analyse bestimmt. ERK2 diente als Ladekontrolle. Die FRA-1 Expression im Zeitverlauf nach Behandlung mit 50 µM ACNU nach 8, 16, 24, 32 und 48 h wurde in Gesamtzellextrakten (B) und Kernextrakten (C) mittels Western Blot Analyse bestimmt. β-ACTIN diente als Ladekontrolle.

Wie das Ergebnis der Western Blot Analyse zeigt, steigt das FRA-1-Signal in Abhängigkeit der ACNU-Konzentration.

Zusätzlich wurde die zeitabhängige Expression von FRA-1 in Gesamtzellextrakten (Abb. 4-4 (B)) und Kernextrakten (C) durch Western Blot Analysen bestimmt. Die Gesamtproteinmenge an FRA-1 nimmt nach 16 h deutlich zu und bleibt bis 48 h nach Behandlung erhöht. Außerdem kann bereits nach 8 h eine durch die Behandlung verursachte, vermehrte Translokation von FRA-1 in den Zellkern detektiert werden, die ebenfalls bis 48 h nach Behandlung anhält.

Zusammenfassend kann man sagen, dass ACNU in LN-229 eine gesteigert FRA-1-Synthese, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene verursacht und dass diese durch eine Neusynthese und nicht durch Stabilisierung der mRNA bedingt ist.

4.2.2 Rolle der MAPKs in der Regulation der FRA-1 Expression

Es ist bekannt, dass die MAPKs eine große Rolle sowohl in der Regulation der Transkription, als auch in der posttranslationalen Stabilisierung von FRA-1 spielen (s. 2.2.2.1). Aus diesem Grund wurde die Expression der drei wichtigsten MAPKs p38K, JNK und ERK2 auf Proteinebene bestimmt. Da diese durch Phosphorylierung aktiviert werden, wurde sowohl die phosphorylierte, als auch die unphosphorylierte Form mittels Western Blot Analyse detektiert.

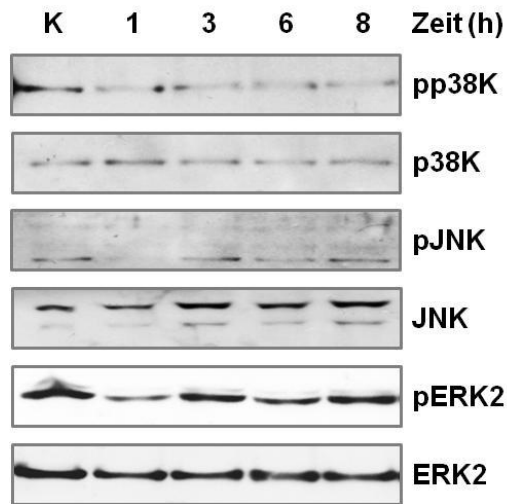


Abb. 4-5: Expression der MAPKs nach ACNU-Behandlung zu frühen Zeitpunkten.

Die Expression von p38K, JNK und ERK2 und die, der jeweils phosphorylierten Form wurde nach Behandlung mit 50 µM ACNU für 1, 3, 6 und 8 h mittels Western Blot Analyse bestimmt. ERK2 diente als Ladekontrolle.

Alle drei MAPKs zeigen für die phosphorylierte und unphosphorylierte Form ein Signal. Zu den gemessenen, frühen Zeitpunkten nach ACNU-Behandlung sind jedoch keine Unterschiede in der Phosphorylierung vorhanden (Abb. 4-5).

Trotz der gleichbleibenden Signalstärke der phosphorylierten MAPKs, ist es möglich, dass eine Grundaktivität der MAPKs vorhanden ist, die nach Behandlung mit ACNU Einfluss auf die FRA-1-Expression nimmt. Aus diesem Grund wurde die Aktivität der drei oben beschriebenen MAPKs durch eine einstündige Vorbehandlung mit den spezifischen Inhibitoren U0126 (MEK 1/2), SP600125 (JNK 1/2/3) oder SB203580 (p38K) gehemmt. 8 h bzw. 24 h nach Behandlung mit 50 µM ACNU wurde dann die FRA-1-Expression in Gesamtzell-extrakten bestimmt.

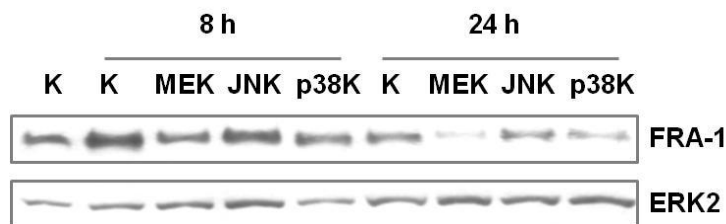


Abb. 4-6: FRA-1 Expression in LN-229 nach Inhibierung der MAPKs.

LN-229 wurden mit den spezifischen Inhibitoren für MEK (U0126), JNK (SP600125) und p38K (SB203580) für 1 h vorbehandelt. Die FRA-1-Expression wurde dann nach Behandlung mit 50 µM ACNU für 8 h bzw. 24 h in Gesamtzell-extrakten mittels Western Blot Analyse bestimmt. ERK2 diente als Ladekontrolle.

Bereits nach 8 h führt eine Inhibierung der p38K-Aktivität und der MEK1/2-Aktivität, und somit auch des durch MEK1/2 aktivierten ERK2, zu einer Reduktion des FRA-1-Signals. Nach 24 h ist lediglich ein sehr schwaches FRA-1 Signal zu detektieren. Eine Inhibierung der JNK-Aktivität hingegen hat keinen Einfluss auf die FRA-1-Expression.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass trotz einer fehlenden Aktivierung der MAPKs ERK2, p38K und JNK zu frühen Zeitpunkten, ERK2 und p38K die FRA-1-Expression nach ACNU-Behandlung beeinflussen, wohingegen JNK keinen Einfluss hat.

4.2.3 Einfluss einer Herunterregulation der FRA-1-Expression auf die Sensitivität von LN-229 gegenüber ACNU

Um herauszufinden, ob die erhöhte FRA-1-Expression nach ACNU-Behandlung die Sensitivität von LN-229 gegenüber ACNU beeinflusst, wurde diese durch Transfektion mit siRNA transient herunterreguliert. Wie in Abb. 4-7 (A) zu sehen ist, konnte 48 h und 72 h nach Transfektion eine starke Herunterregulation der FRA-1-Expression im Vergleich zu den mit *nonsense* siRNA transfizierten LN-229 mittels Western Blot Analyse detektiert werden. Im Anschluss wurde nun der Einfluss der Herunterregulation auf die Sensitivität getestet. Hierfür wurden LN-229 mit siRNA gegen FRA-1 bzw. *nonsense* siRNA transfiziert, 24 h später mit 25 µM ACNU behandelt und nach 96 h für die SubG1-Messung geerntet.

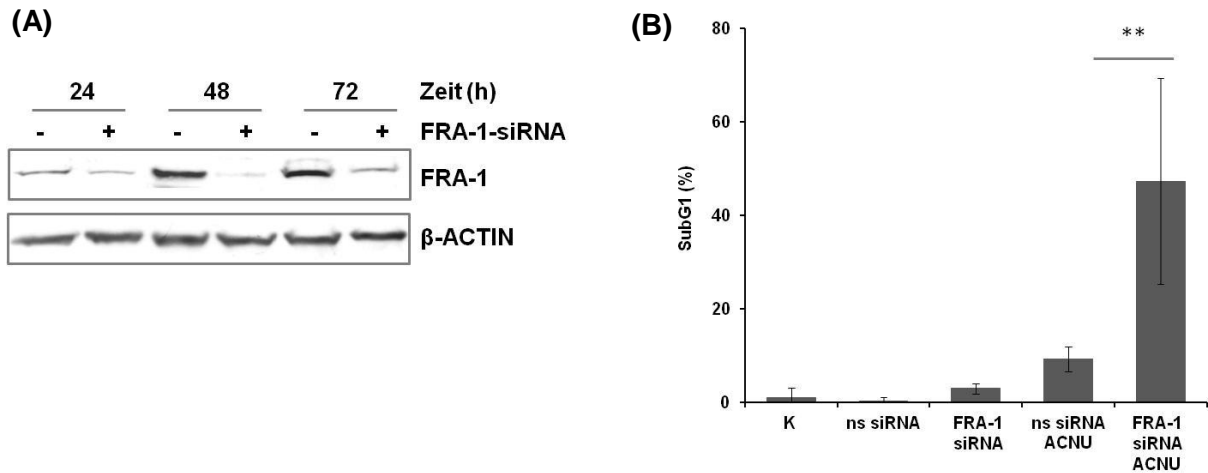


Abb. 4-7: Einfluss einer transienten Herunterregulation der FRA-1 Expression durch siRNA auf die Sensitivität gegenüber ACNU.

(A) LN-229 wurden mit siRNA gegen FRA-1 transfiziert und 6 h vor der Ernte mit 50 μ M ACNU behandelt. Die FRA-1-Expression wurde 24, 48 und 72 h nach Transfektion in Gesamtzellextrakten mittels Western Blot bestimmt. β -ACTIN diente als Ladekontrolle. (B) FRA-1 wurde mittels Transfektion mit siRNA herunterreguliert. Die Kontrollen wurden mit *nonsense* siRNA transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit 25 μ M ACNU für 96 h behandelt. Die Sensitivität wurde mittels SubG1-Messung am Durchflusszytometer bestimmt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten (** $p < 0,01$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

Wie in Abb. 4-7 (B) zu sehen ist, führt eine Herunterregulation der FRA-1 Expression zu einer Steigerung der SubG1-Fraktion nach ACNU-Behandlung von 15 % in *nonsense* siRNA transfizierten LN-229 auf 50 % in mit siRNA gegen FRA-1 transfizierten Zellen. Um diese Ergebnisse nach zu bestärken, wurde FRA-1 in LN-229 durch Transfektion mit einem shRNA exprimierenden Plasmid stabil herunterreguliert (Abb. 4-8 (A)). Als dazugehörige Kontrolle diente ein mit Leervektor transfizierter Klon (LN-229-vec).

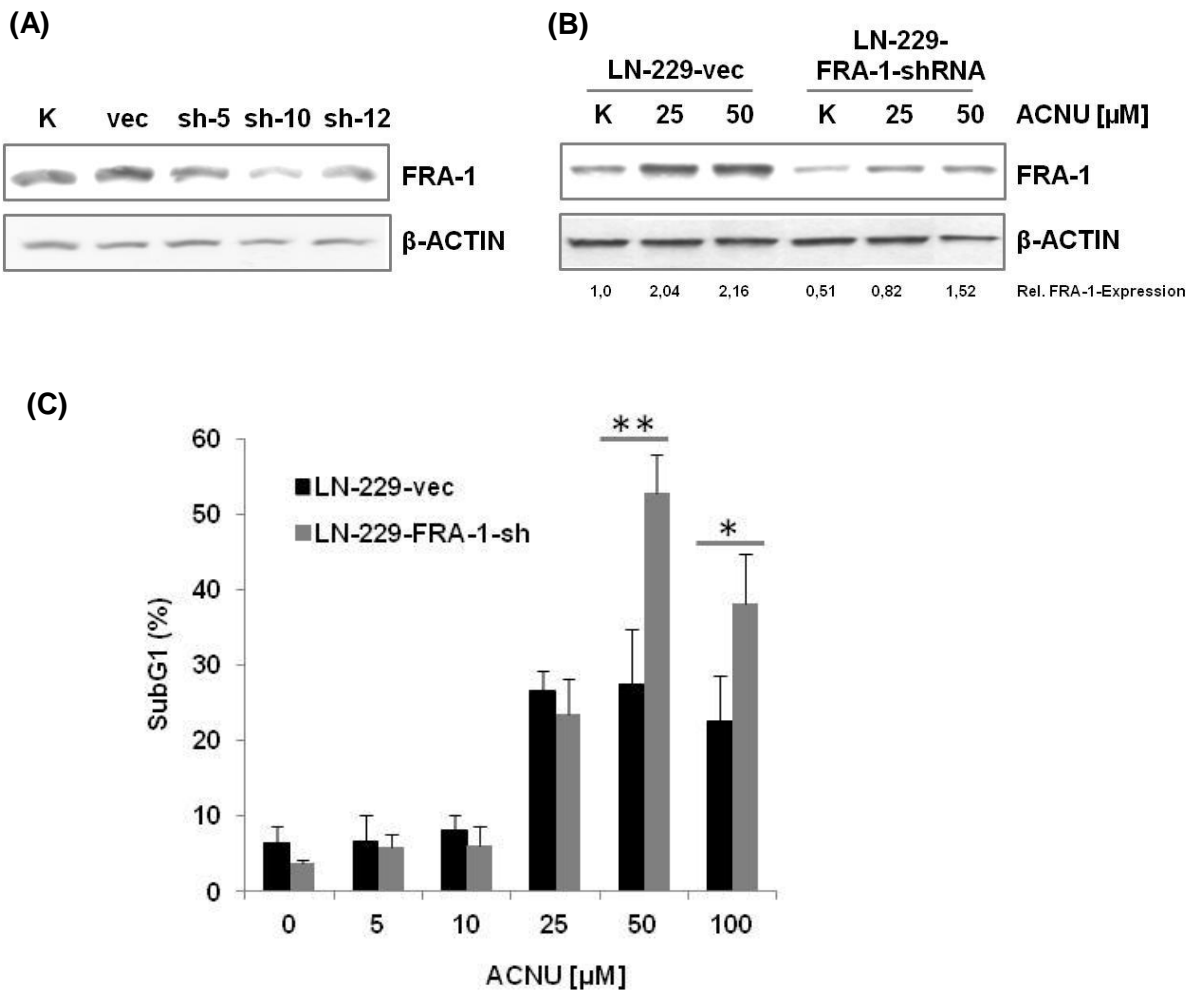


Abb. 4-8: Einfluss einer stabilen Herunterregulation der FRA-1-Expression auf die Sensitivität von LN-229 gegenüber ACNU.

(A) LN-229 wurden mit pSuper shRNA gegen FRA-1 bzw. pSuper Leervektor transfiziert und die Effektivität der Herunterregulation von FRA-1 in verschiedenen Klonen mittels Western Blot Analyse bestimmt. β-ACTIN diente als Ladekontrolle. (B) LN-229-vec und LN-229-sh-10 (=FRA-1-shRNA) wurden mit 25 bzw. 50 μM ACNU für 24 h behandelt und die FRA-1-Expression in Gesamtzellextrakten mittels Western Blot Analyse bestimmt. Die relative FRA-1-Expression wurde durch Quantifizierung des FRA-1-Signals und anschließender Verrechnung mit der eingesetzten Proteinmenge, durch Quantifizierung des entsprechenden β-ACTIN-Signals und Angleich an die unbehandelte LN-229-vec ermittelt. (C) LN-229-vec und LN-229-FRA-1-sh wurden für 96 h mit 5, 10, 25, 50 und 100 μM ACNU behandelt und im Anschluss die SubG1-Fraktion am Durchflusszytometer bestimmt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten (*p<0,05; **p<0,01). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

Im Klon sh-10 wurde der stärkste Effekt erzielt, weshalb dieser für die nachfolgenden Versuche verwendet wurde (LN-229-FRA-1-shRNA). Um nun die Effektivität der Herunterregulation im Vergleich zur Kontrolle zu quantifizieren, wurden die beiden Zelllinien für 24 h mit

25 μM bzw. 50 μM ACNU behandelt. Danach wurde die FRA-1 Expression in Gesamtzell-extrakten mittels Western Blot Analyse detektiert, quantifiziert und mit der Intensität des β -ACTIN-Signals verrechnet (Abb. 4-8(B)). Die basale Expression von FRA-1 ist in LN-229-FRA-1-shRNA im Vergleich zur Kontrollzelllinie LN-229-vec um 50 % reduziert und bleibt auch nach Behandlung mit ACNU stark erniedrigt. Im Anschluss wurde die Sensitivität der ausgewählten Klone gegenüber ACNU bestimmt (Abb. 4-8 (C)). Hierfür wurden LN-229-FRA-1-shRNA und LN-229-vec mit unterschiedlichen ACNU-Dosen für 96 h behan-delt und im Anschluss die SubG1-Fraktion am Durchflusszytometer bestimmt. Während bei niedrigen Dosen bis 25 μM ACNU kein Unterschied in der SubG1-Rate zwischen den beiden Klonen zu verzeichnen ist, liegt bei der Dosis von 50 μM ACNU die SubG1-Fraktion von LN-229-FRA-1-shRNA mit 53 % signifikant höher, als bei LN-229-vec mit 23 %. Auch bei 100 μM ACNU ist durch die Herunterregulation der FRA-1-Expression ein signifikanter Anstieg von 15 % im Vergleich zu den Kontrollzellen zu beobachten.

p53 spielt eine zentrale Rolle in der Modulation der zellulären Antwort auf DNA-schädigende Ereignisse indem es Prozesse, wie Zellzyklus, DNA-Reparatur und Apoptose reguliert. Um auszuschließen, dass die nachfolgenden Versuche durch eine veränderte Regulation von p53 nach ACNU-Behandlung beeinflusst werden, wurde in beiden Zelllinien die nukleäre Akkumulation von p53 mittels Western Blot Analyse detektiert (Abb. 4-9). Sowohl in LN-229-vec, als auch in LN-229-FRA-1-shRNA ist ein deutlicher Anstieg des p53-Signals nach Behandlung mit ACNU zu verzeichnen, was darauf hinweist, dass keine Veränderungen im p53-Status vorhanden sind.

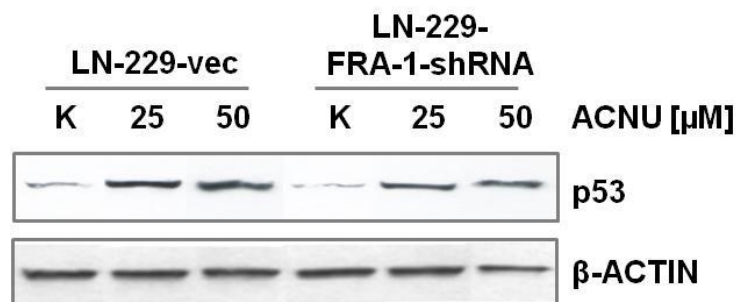


Abb. 4-9: p53 Expression in stabil transfizierten LN-229 nach Behandlung mit ACNU.

Die p53-Expression in LN-229-vec und LN-229-FRA-1-shRNA wurde 24 h nach Behandlung mit 25 bzw. 50 μM ACNU in Gesamtzell-extrakten mittels Western Blot Analyse bestimmt. β -ACTIN diente als Ladekontrolle.

Um nun die Übertragbarkeit der Ergebnisse in LN-229 auf andere Zellsysteme zu überprüfen, wurden die zwei Gliomzelllinien U87 und U138 hinzugezogen und mit siRNA

gegen FRA-1 transfiziert. Die Effektivität der Herunterregulation wurde mittels Western Blot Analyse überprüft (Abb. 4-10 (A)). Im Anschluss wurde der Einfluss einer Herunterregulation der FRA-1-Expression auf die Sensitivität von U87 und U138 gegenüber ACNU ermittelt. Hierfür wurden die Zellen mit siRNA welche gegen FRA-1 gerichtet ist, bzw. *nonsense* siRNA transfiziert, 24 h später mit 50 µM ACNU behandelt und nach 96 h für die Bestimmung der SubG1-Fraktion geerntet.

Auch hier konnte ein signifikanter Anstieg der induzierten SubG1-Fraktion von 12 % in *nonsense* siRNA transfizierten auf 23 % in mit siRNA gegen FRA-1 transfizierten U87 und von 18 % in *nonsense* siRNA transfizierten auf 32 % in mit siRNA gegen FRA-1 transfizierten U138 gezeigt werden.

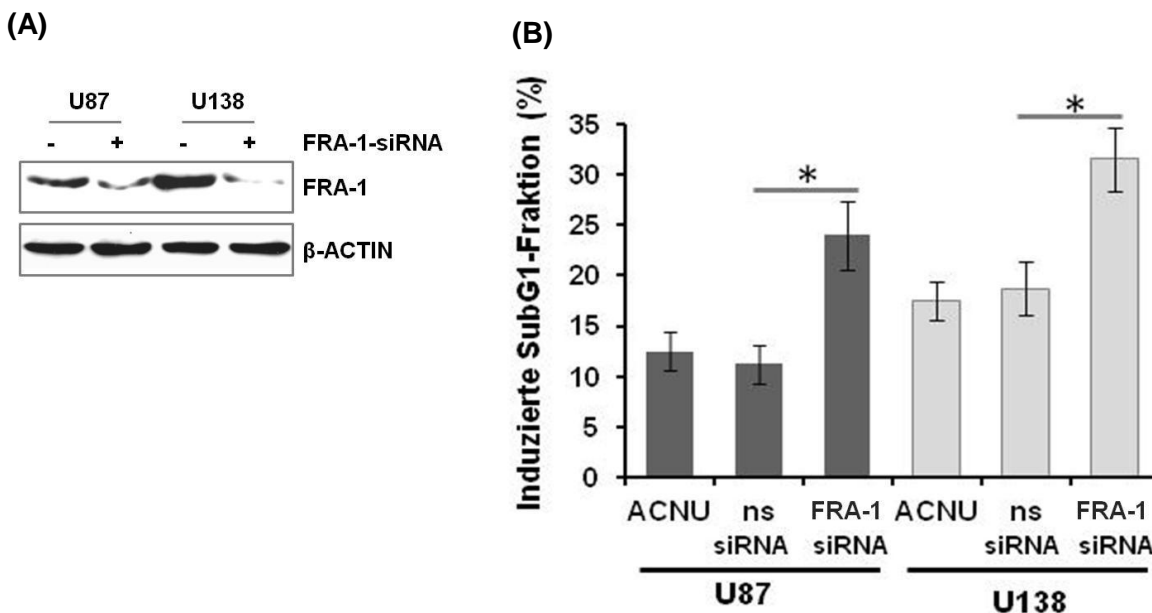


Abb. 4-10: Sensitivität von U87 und U138 gegenüber ACNU nach Herunterregulation der FRA-1-Expression.

(A) U87 und U138 wurden mit siRNA gegen FRA-1 transfiziert und 24 h später wurde die Effektivität der Transfektion in Gesamtzell-extrakten mittels Western Blot Analyse überprüft. β-ACTIN diente als Ladekontrolle. (B) U87 und U138 wurden nicht transfiziert, mit *nonsense* siRNA bzw. mit siRNA gegen FRA-1 transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und mit 50 µM ACNU für 96 h behandelt. Die induzierte SubG1-Fraktion wurde im Vergleich zu unbehandelten Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten (*p<0,05). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die vermehrte FRA-1-Expression in Gliomzellen nach ACNU-Behandlung zu einer Resistenz gegenüber ANCU führt.

4.2.4 Einfluss einer Herunterregulation der FRA-1-Expression auf die AP-1-Bildung

FRA-1 besitzt keine Transaktivierungsdomäne und ist aus diesem Grund nur als Dimer zusammen mit einem seiner Bindepartner aktiv. Infolgedessen, kann die Auswirkung einer Herunterregulation von FRA-1 auf dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor lediglich über die Bildung und Aktivität von AP-1 detektiert werden. Die Bindeaktivität von AP-1 kann mit Hilfe eines EMSAs bestimmt werden (s. 3.2.15). Hierfür wurden LN-229-vec bzw. LN-229-FRA-1-shRNA mit 50 μ M ACNU behandelt und nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die AP-1-Bindeaktivität wurde in Kernextrakten bestimmt, als Zielsequenz diente die AP-1-Bindestelle des *MMP1*-Promotors (Abb. 4-11).



Abb. 4-11: Einfluss einer Herunterregulation der FRA-1-Expression in LN-229 auf die AP-1 Bildung nach Behandlung mit ACNU.

LN-229 wurden für 8, 16, 24 und 32 h mit 50 μ M ACNU behandelt. Die AP-1-Bindung wurde mittels EMSA in den Kernextrakten bestimmt. Als Zielsequenz diente die AP-1 Bindestelle des *MMP1*-Promotors

Hier ist zu sehen, dass die AP-1-Bindeaktivität 16 h und 24 h nach Behandlung mit ACNU in den mit Leervektor transfizierten LN-229 gegenüber der Kontrolle stark zunimmt, wohingegen durch eine Herunterregulation von FRA-1 diese Zunahme extrem vermindert wird und fast nicht mehr zu detektieren ist.

Um zu verifizieren, dass die Abnahme in der AP-1-Bindeaktivität nach ACNU-Behandlung in LN-229 mit verminderter FRA-1-Expression, durch eine reduzierte FRA-1-Menge im AP-1 Komplex bedingt ist, wurde ein EMSA *Supershift* durchgeführt. Hierbei wurden spezifische Antikörper gegen FRA-1 und seinen Bindepartner c-JUN verwendet (Abb. 4-12).

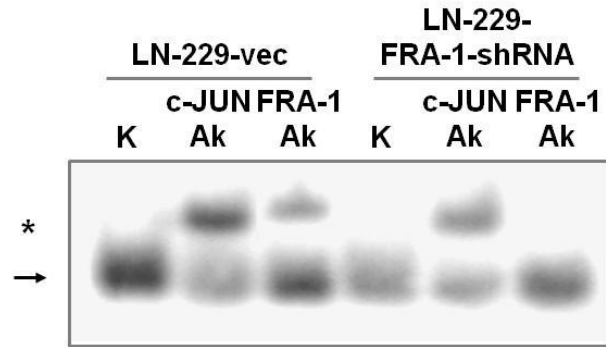


Abb. 4-12: Einfluss einer Herunterregulation der FRA-1-Expression auf die Zusammensetzung des AP-1-Komplexes.

LN-229 wurden für 24 h mit 50 μ M ACNU behandelt. Im Anschluss wurde in den Kernextrakten die Zusammensetzung des AP-1-Komplexes mit Hilfe eines EMSA *Supershifts* bestimmt. Hierbei kamen Antikörper gegen c-JUN und FRA-1 zum Einsatz, deren spezifische Bande mit einem Stern (*) gekennzeichnet ist. Die AP-1-Bande ist mit einem Pfeil (→) hervorgehoben.

Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass im AP-1-Komplex in LN-229-vec nach Behandlung mit ACNU, sowohl c-JUN, als auch FRA-1 an der Komplexbildung beteiligt sind. In LN-229-FRA-1-shRNA hingegen, ist nur noch c-JUN detektierbar, FRA-1 hingegen liefert kein Signal mehr.

Zusätzlich wurde mittels Western Blot Analyse die Regulation von c-JUN in Abhängigkeit von der Zeit nach Behandlung mit 50 μ M ACNU in Kernextrakten untersucht.

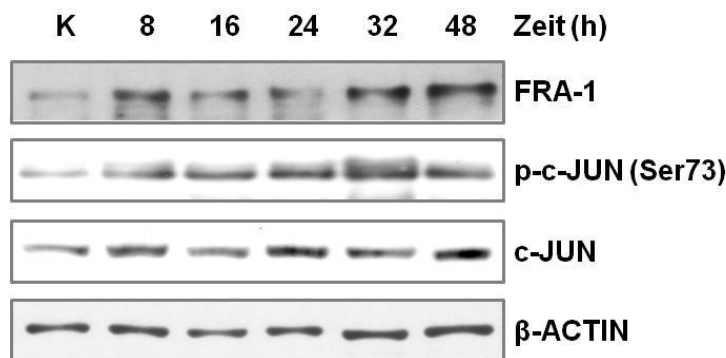


Abb. 4-13: Regulation von FRA-1 und c-JUN in Abhängigkeit der Zeit nach ACNU-Behandlung.

Die Expression von FRA-1, p-c-JUN und c-JUN nach wurde nach Behandlung mit 50 μ M ACNU für 8, 16, 24, 32 und 48 h in Kernextrakten mittels Western Blot Analyse detektiert. β -ACTIN diente als Ladekontrolle.

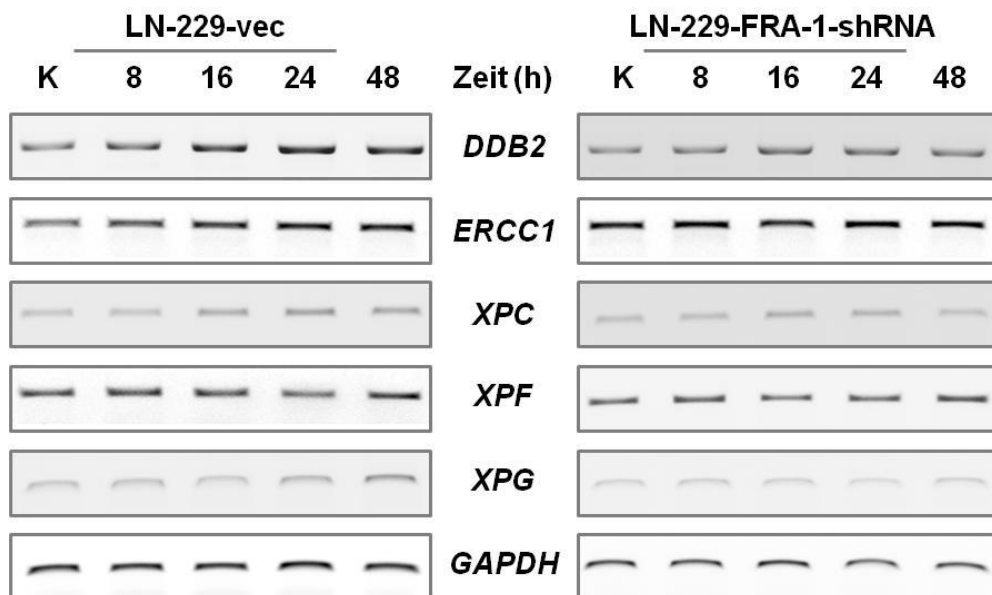
Da die Aktivität von c-JUN vor allem über Phosphorylierung reguliert wird (Binetruy, Smeal et al. 1991; Smeal, Binetruy et al. 1992), wurde neben der unphosphorylierten Form auch

p-c-JUN (Ser73) detektiert. Hier kann nach 8 h ein schwacher Anstieg im c-JUN-Signal im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. Die Menge an p-c-JUN (Ser73) hingegen steigt parallel zum FRA-1-Signal nach 8 h an und bleibt bis 48 h nach Behandlung im Vergleich zur Kontrolle erhöht.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es durch die Behandlung mit ACNU zu einer gesteigerten Bildung von AP-1 kommt, an der sowohl FRA-1 als auch c-JUN beteiligt sind und die durch eine Herunterregulation von FRA-1 stark reduziert wird.

4.2.5 Einfluss einer Herunterregulation der FRA-1-Expression auf die DNA-Reparatur nach Behandlung mit ACNU

Ein wichtiger Reparaturweg der durch ACNU hervorgerufenen DNA-Schäden, stellt die Nukleotidexzisionsreparatur dar (s. 2.5.3.3). Für eine Vielzahl von Proteinen der NER ist bekannt, dass diese transkriptionell reguliert werden. Speziell für XPF wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass es einer Regulation durch AP-1 unterliegt (Christmann, Tomicic et al. 2006). Aus diesem Grund wurde im Folgenden der Einfluss einer Herunterregulation von FRA-1 auf die mRNA-Expression verschiedener, an der NER beteiligter Gene, mittels PCR untersucht.



Gen	LN-229-vec					LN-229-FRA-1-shRNA				
	K	8	16	24	48	K	8	16	24	48
<i>DDB2</i>	1,0	1,26	1,62	1,60	1,58	1,0	1,13	1,38	1,45	1,31
<i>ERCC1</i>	1,0	1,19	1,47	1,39	1,39	1,0	1,22	0,87	1,27	1,13
<i>XPC</i>	1,0	1,04	1,44	1,40	1,31	1,0	1,04	1,29	1,33	0,94
<i>XPF</i>	1,0	1,06	1,11	1,12	1,17	1,0	1,14	0,88	1,14	1,22
<i>XPG</i>	1,0	1,12	0,97	1,08	1,40	1,0	1,21	1,07	0,97	1,21

Abb. 4-14: Einfluss einer Herunterregulation der FRA-1-Expression auf die transkriptionelle Regulation verschiedener Reparaturgene der NER.

LN-229-vec und LN-229-FRA-1-shRNA wurden mit 50 µM ACNU für 8, 16, 24 und 48 h behandelt und die Expression von *DDB2*, *ERCC1*, *XPC*, *XPF* und *XPG* mittels RT-PCR bestimmt. *GAPDH* diente als interner Standard für die eingesetzte cDNA-Menge. Die relative Expression der Gene wurde durch Quantifizierung des entsprechenden Signals und anschließender Verrechnung mit der eingesetzten cDNA-Menge, mittels Quantifizierung des *GAPDH*-Signals ermittelt.

Wie in Abb. 4-14 zu sehen ist, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien in der Expression der verschiedenen Reparaturgene detektiert werden. Lediglich für *ERCC1* konnte ein etwas stärkerer Anstieg in LN-229-vec als in LN-229-FRA-1-shRNA detektiert werden.

Aus diesem Grund wurde zusätzlich die *ERCC1*-Expression in den beiden Zelllinien nach ACNU-Behandlung, auf Proteinebene untersucht. Außerdem wurde *XPF* detektiert, von welchem bekannt ist, dass es nach Bestrahlung mit UV-Licht durch c-FOS reguliert wird (Christmann, Tomicic et al. 2006) und als Bindungspartner von *ERCC1* für dessen Stabilität verantwortlich ist.

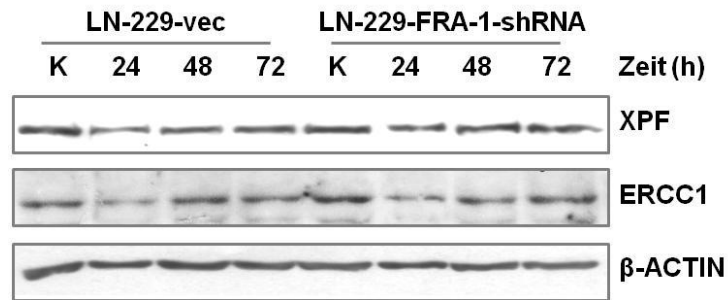


Abb. 4-15: Einfluss von FRA-1 auf die Regulation von XPF und ERCC1 nach Behandlung mit ACNU.

LN-229-vec und LN-229-FRA-1-shRNA wurden mit 50 μ M ACNU behandelt. Die Expression von XPF und ERCC1 nach 24, 48, 72 h wurde in Gesamtzellextrakten mittels Western Blot Analyse bestimmt. β -ACTIN diente als Ladekontrolle.

Weder für XPF noch für ERCC1 wurden Unterschiede in der Expression in den beiden Zelllinien detektiert.

Zusätzlich wurde im *Comet Assay* untersucht, ob FRA-1 einen Einfluss auf die DNA-Reparatur nimmt. Hierfür wurde sowohl der alkalische *Comet Assay* durchgeführt, bei welchem primär Einzelstrangbrüche detektiert werden, als auch der modifizierte alkalische *Comet Assay*, welcher zu Detektion von ICLs dient.

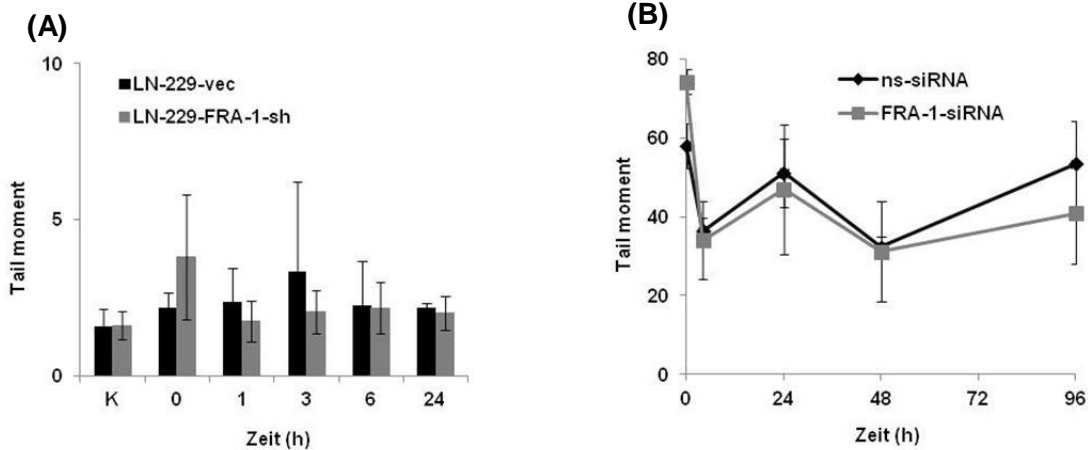


Abb. 4-16: Einfluss von FRA-1 auf die Bildung und Reparatur von Einzelstrangbrüchen (A) und ICLs (B) nach ACNU-Behandlung.

(A) LN-229-vec und LN-229-FRA-1-shRNA wurden für 1 h mit 50 μ M ACNU behandelt, dann wurde das Medium gewechselt und nach 0, 1, 3, 6 und 24 h die Entstehung von Einzelstrangbrüchen mittels alkalischem *Comet* Assay detektiert. (B) LN-229 wurden mit *nonsense* siRNA bzw. siRNA gegen FRA-1 transfiziert und 24 h später für 1 h mit 25 μ M ACNU behandelt. Nach 24, 48, 72 und 96 h wurden die entstandenen ICLs mit Hilfe des modifizierten alkalischen *Comet* Assays detektiert. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Wie aus Abb. 4-16 ersichtlich ist, wurde weder die Bildung bzw. Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen (A), noch die von ICLs (B) durch die Herunterregulation der FRA-1-Expression wesentlich beeinflusst.

Schließlich wurde der Einfluss von FRA-1 auf die Bildung bzw. Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen untersucht. Diese können sich im Rahmen der ICL-Reparatur bilden, oder aber durch eine fehlende Reparatur der ICLs, wie in 2.5.3.2 beschrieben entstehen. Zur Detektion wurde phosphoryliertes Histon 2A.X gemessen, welches als anerkannter Marker für die Erkennung von Doppelstrangbrüchen durch die Zelle dient.

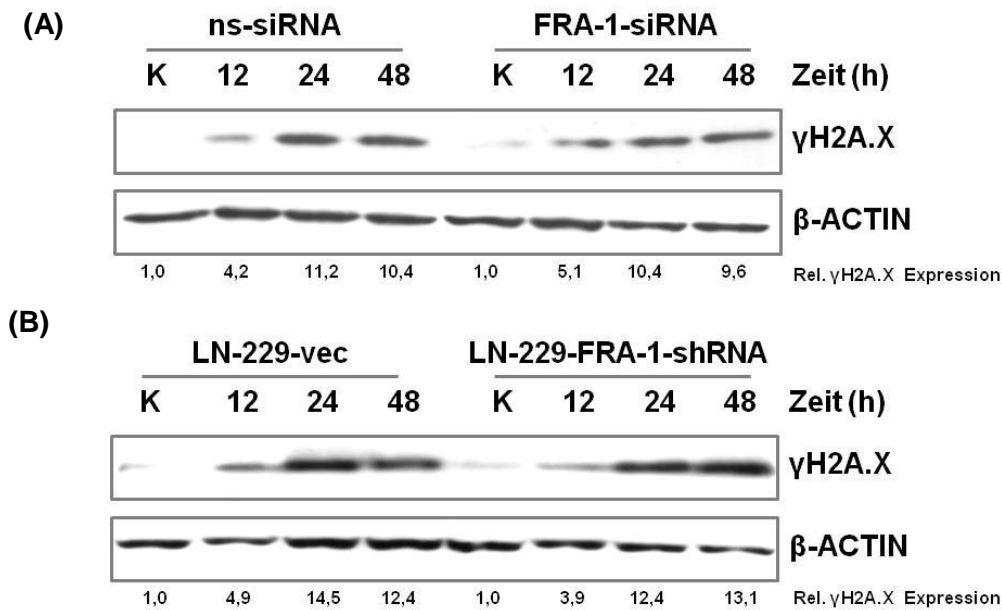


Abb. 4-17: Entstehung von γ H2A.X durch Behandlung mit ACNU nach Herunterregulation der FRA-1-Expression.

Die FRA-1-Expression wurde durch Transfektion mit siRNA gegen FRA-1 bzw. *nonsense* siRNA 24 h vor Behandlung mit 50 μ M ACNU herunterreguliert (A). Außerdem wurden LN-229-vec und LN-229-FRA-1-shRNA mit 50 μ M ACNU behandelt (B). Nach 12, 24, und 48 h wurde die γ H2A.X-Menge mittels Western Blot Analyse in Gesamtzellextrakten bestimmt. Die relative γ H2A.X-Expression wurde durch Quantifizierung des γ H2A.X-Signals und anschließender Verrechnung mit der eingesetzten Proteinmenge, durch Quantifizierung des entsprechenden β -ACTIN-Signals und Angleich an die jeweilige unbehandelte Kontrolle ermittelt.

Auch hier konnte kein Unterschied in der Signalintensität, also der Bildung und Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch eine Herunterregulation der FRA-1-Expression festgestellt werden. 12 h nach Behandlung ist ein schwacher Anstieg des γ H2A.X-Signals zu verzeichnen, der nach 24 h noch intensiver wird und bis 48 h nach Behandlung anhält.

Zusammenfassend kann man sagen, dass FRA-1 weder eine Rolle in der Bildung von DNA-Schäden noch in der DNA-Reparatur nach ACNU-Behandlung in LN-229 spielt.

4.2.6 Einfluss einer Herunterregulation der FRA-1-Expression auf die Apoptose nach Behandlung mit ACNU

Ein wichtiges Zielgen von AP-1 ist der *FASL* (Kasibhatla, Brunner et al. 1998). Um festzustellen, ob die Sensitivierung gegenüber ACNU bei Herunterregulation der FRA-1-Expression, durch einen Anstieg in der apoptotischen oder in der nekrotischen Fraktion bedingt ist, wurden diese mittels Annexin/PI-Färbung und Messung am Durchflusszytometer bestimmt (Abb. 4-18).

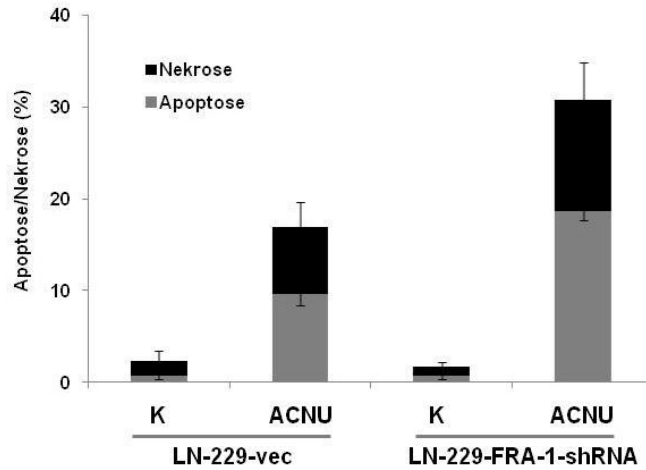


Abb. 4-18: Einfluss der Herunterregulation von FRA-1 auf die Apoptose nach Behandlung mit ACNU.

LN-229-vec und LN-229-FRA-1-shRNA wurden für 96 h mit 50 μ M ACNU behandelt. Im Anschluss wurde die apoptotische und nekrotische Fraktion durch Färbung mit Annexin V/PI am Durchflusszytometer bestimmt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Hier ist zu sehen, dass es durch eine Herunterregulation der FRA-1-Expression primär zu einem Anstieg in der apoptotischen Fraktion von 9,6 % in den mit Leervektor transfizierten Zellen auf 18,7 % in den Zellen mit verminderter FRA-1-Expression kommt. Die nekrotische Fraktion nimmt hingegen nur marginal zu. Um zu überprüfen, ob sich diese Ergebnisse durch einen Unterschied in der Regulation des FAS-Liganden erklären lassen, wurde dessen Expression auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Zusätzlich wurde der FAS-Rezeptor detektiert, von dem bekannt ist, dass er ebenfalls eine AP-1-Bindestelle im Promotor besitzt (s. Abb. 4-19).

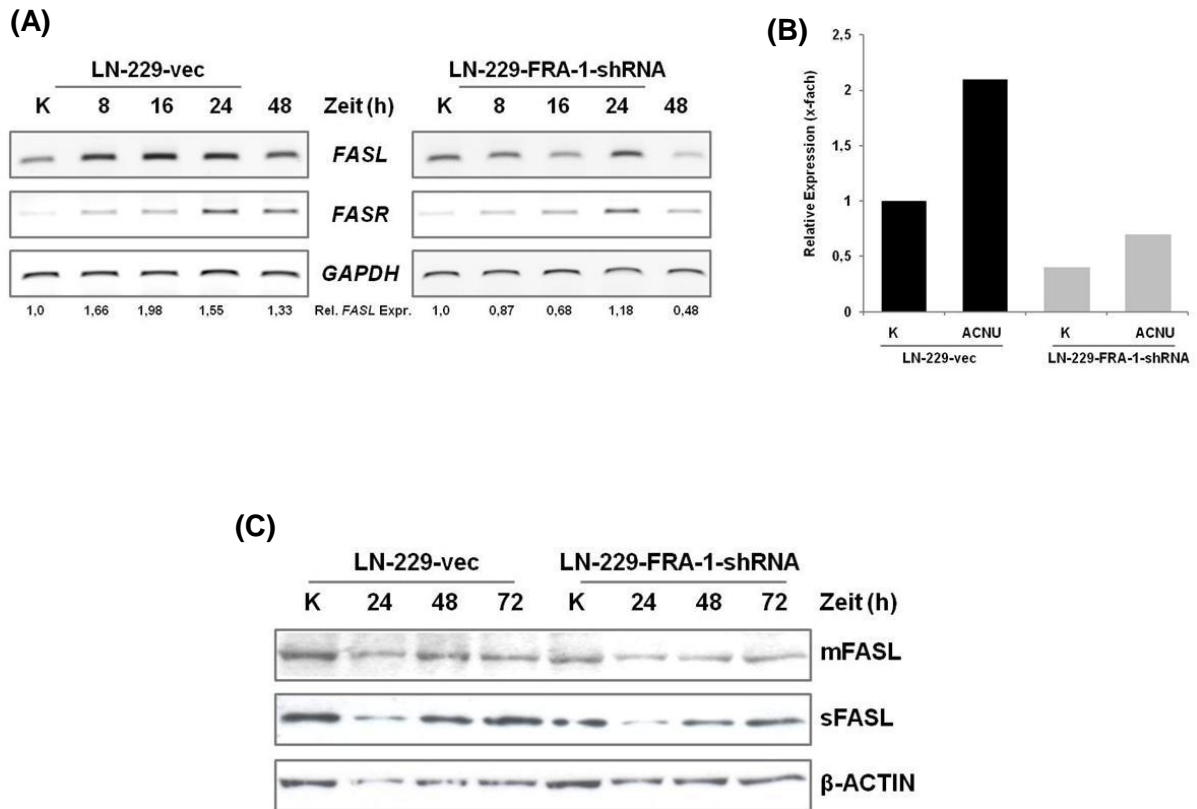


Abb. 4-19: Regulation des FASL und FASR nach Behandlung mit ACNU in LN-229-vec und LN-229-FRA-1-shRNA.

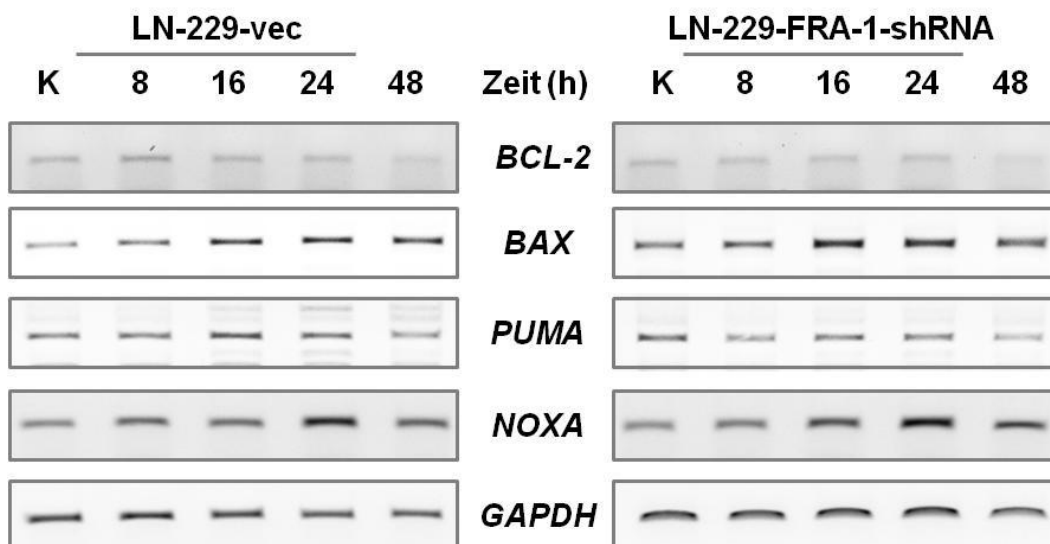
(A) LN-229-vec und LN-229-FRA-1-shRNA wurden mit 50 µM ACNU behandelt. Die *FASL*- und *FASR*-Expression wurde mittels RT-PCR nach 8, 16, 24 und 48 h bestimmt. *GAPDH* diene als interner Standard für die eingesetzte cDNA-Menge. Die relative *FASL*-Expression wurde durch Quantifizierung des *FASL*-Signals und anschließender Verrechnung mit der eingesetzten cDNA-Menge, mittels Quantifizierung des entsprechenden *GAPDH*-Signals und Angleich an die jeweilige unbehandelte Kontrolle ermittelt. (B) LN-229-vec und LN-229-FRA-1-shRNA wurden für 24 h mit 50 µM ACNU behandelt. Im Anschluss wurde die Expression des *FASL* mittels *real time* PCR bestimmt. Die relative Expression wurde durch Angleich an die beiden Kontrollen für die eingesetzte cDNA-Menge *GAPDH* und *β-ACTIN* berechnet. (C) Die Expression des membrangebundenen und löslichen FASL nach Behandlung mit ACNU in Abhängigkeit der FRA-1-Expression wurde mittels Western Blot Analyse untersucht. Hierfür wurden LN-229-vec und LN-229-FRA-1-shRNA mit 50 µM ACNU behandelt und die Expression des mFASL und sFASL nach 24, 48 und 72 h in den Gesamtzellextrakten aus adhärenenten und im Überstand befindenden Zellen detektiert. *β-ACTIN* diene als Ladekontrolle.

Wie aus Abb. 4-19 (A) hervorgeht, wird der *FASL* in LN-229-vec durch die Behandlung mit ACNU bereits nach 8 h deutlich induziert und das Signal bleibt im Vergleich zur Kontrolle bis 24 h nach Behandlung erhöht. Durch die Herunterregulation von FRA-1 wird dieser Anstieg im Signal verhindert. Die Signalstärke des *FASR* hingegen unterscheidet sich in den beiden Zelllinien nur gering.

Um die Ergebnisse zu verifizieren wurde eine *real time* PCR mit spezifischen Primern für den FAS-Liganden 24 h nach Behandlung mit 50 µM ACNU durchgeführt (Abb. 4-19 (B)). Hier ist

zu sehen, dass in LN-229-FRA-1-shRNA die relative *FASL*-Expression in der unbehandelten Kontrolle nur halb so hoch ist, wie in LN-229-vec. Durch die Behandlung mit 50 μ M ACNU für 24 h steigt die relative *FASL*-Expression in LN-229-vec um das zweifache von 1 auf 2,1. In LN-229-FRA-1-shRNA wird die *FASL*-Expression ebenfalls verdoppelt, von 0,4 auf 0,7, allerdings beträgt die relative *FASL*-Expression im Vergleich zu LN-229-vec lediglich ein Drittel.

Zusätzlich wurde die *FASL*-Expression auf Proteinebene untersucht. *FASL* wird nach der Translation auf der Zellmembran präsentiert (m*FASL*= membrangebundener *FAS*-Ligand) und kann dort von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) abgespalten und als löslicher *FAS*-Ligand (s*FASL*) sekretiert werden. Beide Formen des *FAS*-Liganden können mit dem hier verwendeten Antikörper mittels Western Blot Analyse detektiert werden (Abb. 4-19 (C)). LN-229-vec besitzen auch auf Proteinebene eine etwas höhere Proteinexpression als LN-229-FRA-1-shRNA. Allerdings ist der Unterschied nur marginal, weshalb davon auszugehen ist, dass die Regulation des *FASL* durch *FRA-1* nur eine untergeordnete Rolle in der Sensitivität von LN-229 gegenüber ACNU spielt. Zudem erklären die Ergebnisse nicht die Sensitivierung durch eine Herunterregulation von *FRA-1*. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob die Unterschiede in der apoptotischen Antwort, nach Modulation der *FRA-1*-Expression, durch eine veränderte Regulation des mitochondrialen Signalweges bedingt ist. Hierfür wurde die Expression der anti-apoptotischen Gene der *BCL-2*-Familie *BAX*, *PUMA* und *NOXA* und des pro-apoptotischen Gens *BCL-2* mittels PCR untersucht (Abb. 4-20).



Gen	LN-229-vec					LN-229-FRA-1-shRNA				
	K	8	16	24	48	K	8	16	24	48
<i>BCL-2</i>	1,0	1,25	1,03	1,02	0,87	1,0	1,02	1	1	1,08
<i>BAX</i>	1,0	1,16	1,55	1,70	1,89	1,0	1,10	1,53	1,43	1,65
<i>PUMA</i>	1,0	1,06	1,31	1,18	1,07	1,0	0,84	0,88	0,83	0,85
<i>NOXA</i>	1,0	1,30	1,39	2,55	1,84	1,0	1,24	1,64	2,25	1,95
<i>GAPDH</i>	1,0	1,02	0,98	0,88	0,82	1,0	0,93	0,98	1,03	0,78

Abb. 4-20: Einfluss einer Herunterregulation von FRA-1 auf die transkriptionelle Regulation wichtiger Mitglieder der BCL-2-Familie.

LN-229-vec und LN-229-FRA-1-shRNA wurden mit 50 μ M ACNU für 8, 16, 24 und 48 h behandelt und die Expression von *BCL-2*, *BAX*, *PUMA* und *NOXA* mittels RT-PCR bestimmt. *GAPDH* diente als interner Standard für die eingesetzte cDNA-Menge. Die relative Expression der Gene wurde durch Quantifizierung des entsprechenden Signals und anschließender Verrechnung mit der eingesetzten cDNA-Menge, mittels Quantifizierung des *GAPDH*-Signals ermittelt.

Auch hier sind wieder nur geringfügige Unterschiede in der Expression zu verzeichnen. Es ist also nicht davon auszugehen, dass der Anstieg in der apoptotischen Fraktion nach Behandlung mit ACNU, in Zellen mit verminderter FRA-1-Expression, durch eine veränderte Regulation der BCL-2-Familienmitglieder *BCL-2*, *BAX*, *PUMA* und *NOXA* bedingt ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es durch eine Herunterregulation der FRA-1-Aktivität zu einer reduzierten *FASL*-Expression kommt, die in geringem Maße auch auf Proteinebene detektiert werden kann. Diese Beobachtung erklärt aber nicht die Sensitivierung gegenüber ACNU. Zusätzlich wurde die Expression wichtiger Regulatoren des mitochondrialen Signalweges überprüft. Hier konnten jedoch keine Unterschiede in der Regulation auf mRNA-Ebene durch Herunterregulation der FRA-1-Expression festgestellt werden.

4.2.7 Einfluss einer Herunterregulation der FRA-1-Expression auf die Kontrolle des Zellzyklus nach Behandlung mit ACNU

Hamdi et al. (Hamdi, Popeijus et al. 2008) haben gezeigt, dass FRA-1 die Sensitivität gegenüber Cisplatin über eine Regulation des Zellzyklus beeinflusst. Dabei resultiert die Herunterregulation der FRA-1-Expression in einem verminderten S-Phase-Arrestes, wobei

gezeigt wurde dass dies über eine Veränderung im CHK1-CDK2-Signalweg vermittelt wurde. Um nun festzustellen, ob auch in dem hier untersuchten Zellsystem, bei Veränderung der FRA-1-Expression ein Unterschied in der Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit ACNU vorhanden ist, wurde diese in LN-229-vec und LN-229-FRA-1-shRNA 96 h nach Behandlung mit 25 und 50 μM ACNU mittels Durchflusszytometer analysiert (Abb. 4-21).

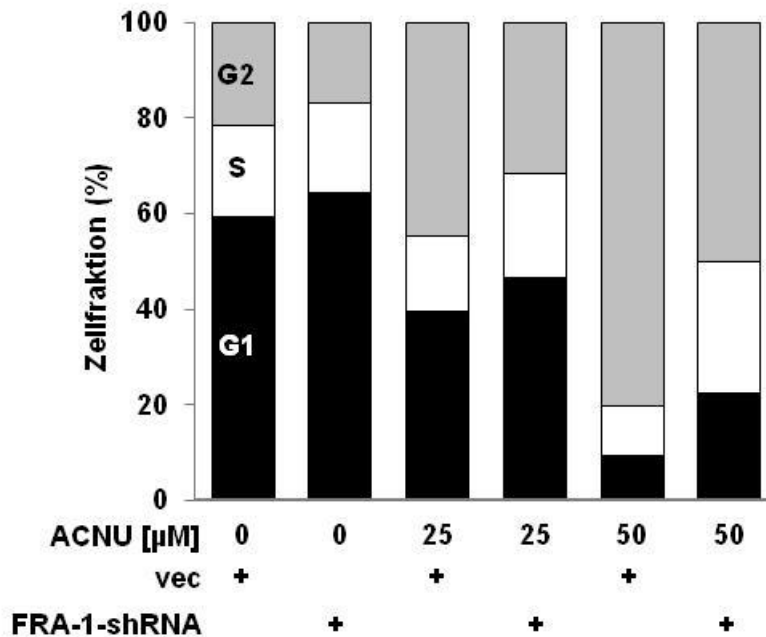


Abb. 4-21: Zellzyklusverteilung in LN-229-vec und LN-229-FRA-1-shRNA nach Behandlung mit ACNU.

Die beiden Zelllinien wurden für 96 h mit 25 bzw. 50 μM ACNU behandelt. Im Anschluss wurde die Zellzyklusverteilung durch Färbung mit PI am Durchflusszytometer bestimmt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Hier ist zu sehen, dass es nach Behandlung mit ACNU zu einem vermehrten Arrest in der G2/M-Phase kommt, von 22 % in den unbehandelten LN-229-vec auf 45 % nach Behandlung mit 25 μM ACNU und 80 % nach Behandlung mit 50 μM ACNU. Dieser Arrest wird durch die Herunterregulation von FRA-1 auf 32 % nach Behandlung mit 25 μM ACNU und auf 50 % nach Behandlung mit 50 μM ACNU reduziert. Die Reduktion des prozentualen Anteils der Zellen in der G2/M-Phase durch die Herunterregulation der FRA-1-Expression, geht einher mit einem Anstieg der Zellzahl in der G1- und S-Phase.

Diese Ergebnisse konnten in U87 und U138 bestätigt werden (Abb. 4-22). Hier kommt es durch die Herunterregulation der FRA-1-Expression und einer anschließenden Behandlung mit 50 μM ACNU zu einer Reduktion der Zellzahl in der G2/M-Phase von 65 % auf 48 % in U87 und von 53 % auf 32 % in U138. Der Anteil an Zellen in der G1- bzw. S-Phase nach

Behandlung mit ACNU steigt dementsprechend in den Zellen mit reduzierter FRA-1-Expression.

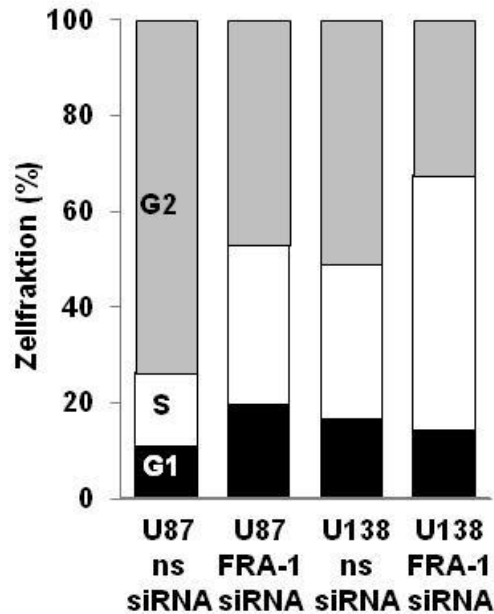


Abb. 4-22: Zellzyklusverteilung in U87 und U138 nach Herunterregulation der FRA-1-Expression und anschließender Behandlung mit ACNU.

Die beiden Zelllinien wurden mit siRNA gegen FRA-1 bzw. *nonsense* siRNA transfiziert und nach 24 h für 96 h mit 50 μ M ACNU behandelt. Im Anschluss wurde die Zellzyklusverteilung durch Färbung mit PI am Durchflusszytometer bestimmt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Nach Behandlung mit DNA-schadensinduzierenden Agenzien, wird der G2/M-Arrest durch den ATR-CHK1-CDC25c-Weg vermittelt (s. 2.5.2). Um die Aktivierung dieser DNA-Schadensantwort-Kaskade zu untersuchen, wurde die Expression der Serin-Threonin-Kinase CHK1 mit spezifischen Antikörpern detektiert (Abb. 4-23).

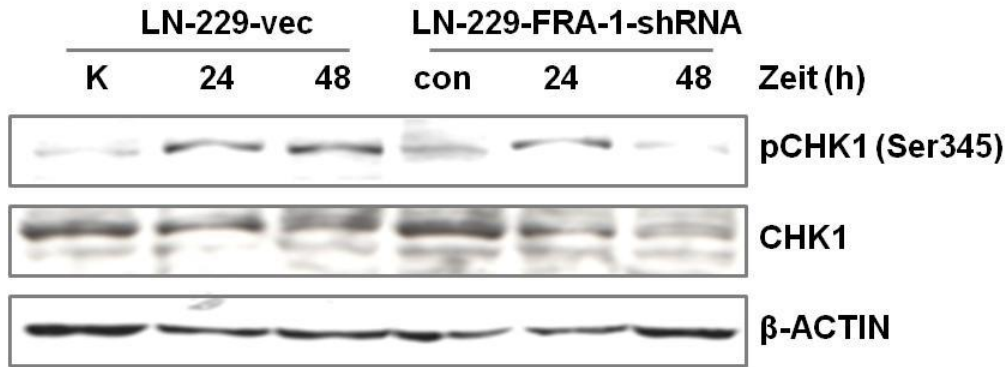


Abb. 4-23: Expression von pCHK1 und CHK1 nach Behandlung mit ACNU in Abhängigkeit der FRA-1-Expression.

LN-229-vec und LN-229-FRA-1-shRNA wurden mit 50 µM ACNU behandelt und die Expression von pCHK1 und CHK1 nach 24, 48 und 72 h in Gesamtzellextrakten mittels Western Blot Analyse bestimmt. β-ACTIN diente als Ladekontrolle.

Durch die Behandlung mit 50 µM ACNU kommt es nach 24 h in beiden Zelllinien zu einer Phosphorylierung und somit Aktivierung von CHK1. Diese ist in LN-229-vec auch noch 48 h nach Behandlung zu sehen, wohingegen in LN-229-FRA-1-shRNA nur noch ein schwaches Signal detektiert werden kann. Nicht nur das pCHK1- sondern auch das CHK1-Signal wird durch die Herunterregulation von FRA-1 reduziert. Zur Verifizierung der Daten wurde die FRA-1-Expression in U87 und U138 durch Transfektion mit spezifischer siRNA herunterreguliert und die CHK1- und pCHK1-Expression 48 h nach Behandlung mit 50 µM ACNU mittels Western Blot Analyse detektiert.

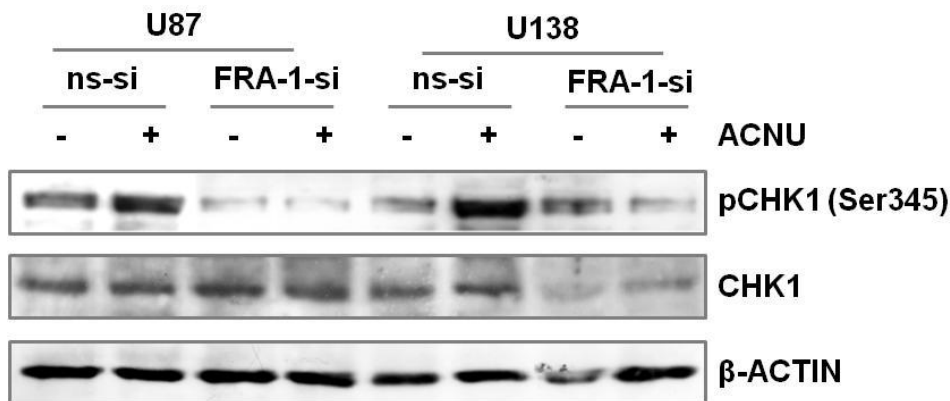


Abb. 4-24: Expression von pCHK1 und CHK1 nach Behandlung mit ACNU in U87 und U138 in Abhängigkeit der FRA-1-Expression.

U87 und U138 wurden mit siRNA gegen FRA-1 bzw. *nonsense* siRNA transfiziert und 24 h später mit 50 µM ACNU behandelt. Die Expression von pCHK1 und CHK1 nach 48 h wurde in Gesamtzellextrakten mittels Western Blot Analyse bestimmt. β-ACTIN diente als Ladekontrolle.

Wie in Abb. 4-24 zu sehen ist kommt es auch hier durch die Herunterregulation der FRA-1-Expression zu einer Reduktion des pCHK1-Signals nach Behandlung mit ACNU.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass es durch die Herunterregulation der FRA-1-Expression zu einem verminderten Arrest in der G2/M-Phase und einem entsprechenden Anstieg der Zellzahl in der G1- bzw. S-Phase nach Behandlung mit ACNU kommt. Dieser geht zu späten Zeitpunkten nach Behandlung, mit einer reduzierten Menge an CHK1 und pCHK1 einher.

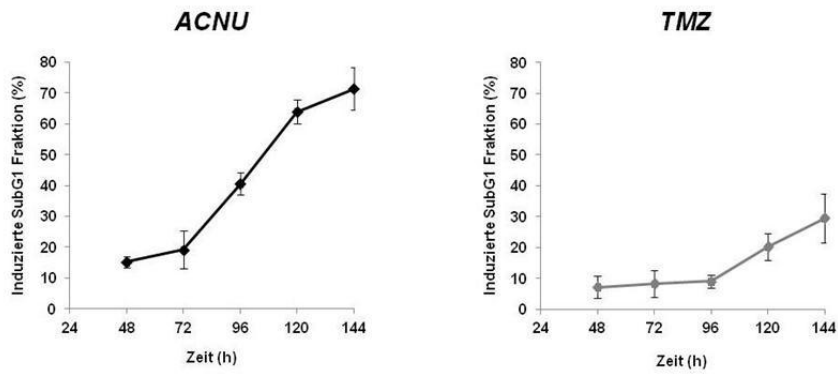
4.3 Regulation der Apoptose in LN-229 nach Behandlung mit ACNU und TMZ

4.3.1 Apoptotische Antwort nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ in LN-229

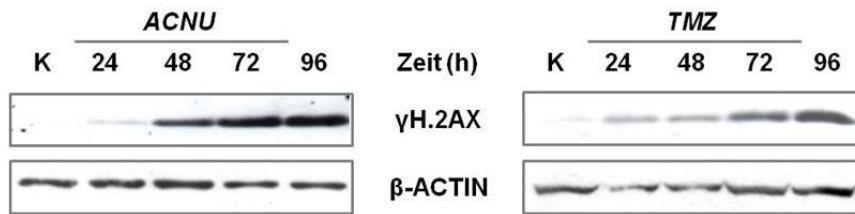
Die Apoptose nach ACNU-Behandlung kann bereits im ersten Zellzyklus ausgelöst werden, wohingegen die apoptotische Antwort nach Behandlung mit TMZ erst ab dem zweiten Zellzyklus nach Behandlung eingeleitet wird (Quiros, Roos et al. 2010). Um in dem vorhandenen Zellmodell abzuklären, wann es zu einem Anstieg in der apoptotischen Fraktion kommt, wurden LN-229 mit 50 μ M ACNU bzw. 100 μ M TMZ behandelt und nach 48, 72, 96, 120 und 144 h die SubG1-Fraktion am Durchflusszytometer bestimmt (Abb. 4-25 (A)). Hier ist zu sehen, dass 96 h nach Behandlung mit ACNU bereits eine induzierte SubG1-Fraktion von 40 % zu verzeichnen ist, wohingegen nach Behandlung mit TMZ erst nach 120 h ein Anstieg in der induzierten SubG1-Fraktion gemessen werden kann. Um nun festzustellen, ob der Anstieg der SubG1-Fraktion durch eine gesteigerte Zahl an Doppelstrangbrüchen bedingt ist, wurde der anerkannte Marker für Doppelstrangbrüche γ H2A.X mittels Western Blot Analyse nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ detektiert (Abb. 4-25 (B)). Die erhaltenen Ergebnisse sind mit der SubG1-Messung stimmig. Das γ H2A.X-Signal bei Behandlung mit ACNU ist bereits nach 48 h stark erhöht und steigt in der Intensität mit der Zeit. Nach TMZ-Behandlung ist erst nach 72 h ein deutlicher Anstieg im γ H2A.X-Signal zu beobachten, der auch mit der Zeit weiter zunimmt.

Desweiteren sollte geklärt werden, ob der Anstieg in der SubG1-Fraktion durch eine Aktivierung des intrinsischen, oder des extrinsischen Apoptosesignalweges eingeleitet wird. Hierfür wurden die beiden Initiatorcaspasen 8 und 9 und deren Spaltprodukte und das Spaltprodukt der Effektorcaspase 3 mittels Western Blot Analyse detektiert (Abb. 4-25 (C)). Hier ist zu sehen, dass es 72 h nach Behandlung mit ACNU bzw. 96 h nach Behandlung mit TMZ zu einem Anstieg im Spaltprodukt der Caspase 8 und Caspase 9 kommt. Die Aktivierung beider Caspasen resultiert in einem Anstieg des Spaltprodukts der Caspase 3.

(A)



(B)



(C)

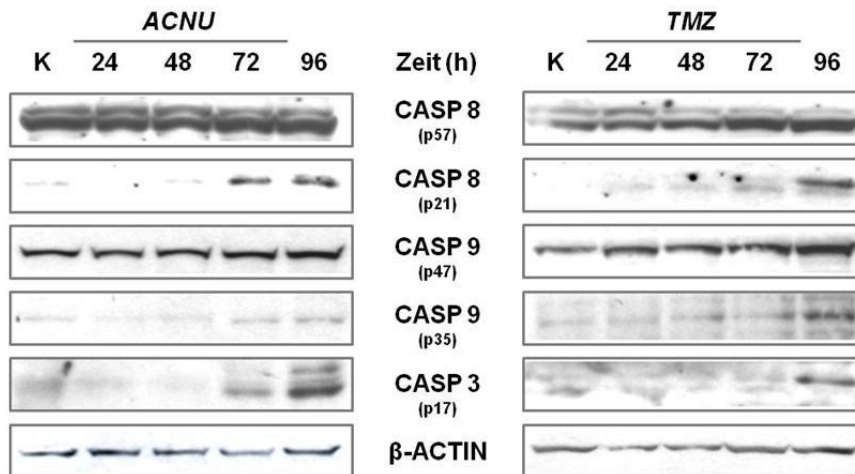


Abb. 4-25: Apoptotische Antwort nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ.

(A) LN-229 wurden mit 50 μ M ACNU bzw. 100 μ M TMZ behandelt und nach 48, 72, 96, 120 und 144 h die SubG1-Fraktion in behandelten und unbehandelten Zellen bestimmt. Die induzierte SubG1-Fraktion wurde hier als Differenz der SubG1-Rate in den behandelten Zellen gegenüber den unbehandelten Zellen dargestellt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. (B) LN-229 wurden mit 50 μ M ACNU bzw. 100 μ M TMZ behandelt und die γ H2A.X-Bildung nach 24, 48, 72 und 96 h mittels Western Blot Analyse in Gesamtzell-extrakten bestimmt. β -Actin diente als Ladekontrolle. (C) LN-229 wurden für 24, 48, 72 und 96 h mit 50 μ M ACNU bzw. 100 μ M TMZ behandelt. Die Expression von Caspase 8 und 9 und die Spaltprodukte von Caspase 8, 9 und 3 wurden mittels Western Blot Analyse in Gesamtzell-extrakten bestimmt. β -Actin diente als Ladekontrolle.

Zusammenfassend kann man also festhalten, dass sowohl die Behandlung mit ACNU als auch mit TMZ in LN-229 einen Anstieg der Rate an Doppelstrangbrüchen bedingt, welche über den extrinsischen und den intrinsischen apoptotischen Signalweg zum Zelltod führen.

4.3.2 Einfluss von p53 auf die Apoptose nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ

Wie bereits eingehends erläutert wurde, konnte in unserem Institut für p53 gezeigt werden, dass es eine wichtige Rolle in der Regulation der DNA-Schadensantwort spielt indem es nach Behandlung mit chlorethylierenden Agenzien die Expression der DNA-Reparaturproteine DDB2 und XPC reguliert und nach Behandlung mit TMZ Einfluss auf die Expression des FAS-Rezeptors nimmt (Batista, Roos et al. 2007). Aus diesem Grund wurde in dem vorhandenen Zellsystem die nukleäre Akkumulation von p53 nach Behandlung mit ACNU und TMZ detektiert (Abb. 4-26 (A)). Um auszuschließen, dass ein möglicher Anstieg im p53-Signal durch Stress, aufgrund der langen Kultivierung der Zellen verursacht wird, wurde zu jedem Zeitpunkt eine entsprechende unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Hier ist zu sehen, dass sowohl die ACNU-, als auch die TMZ-Behandlung zu jedem gemessenen Zeitpunkt zwischen 32 und 96 h, in einem Anstieg des p53-Signals im Vergleich zur Kontrolle resultiert.

Zusätzlich wurde die Funktion von p53 in dem vorhandenen Zellsystem untersucht, indem die transkriptionelle Aktivität von p53 durch den spezifischen Inhibitor Pifithrin α gehemmt wurde (Abb. 4-26 (B)). Durch diese Inhibierung kommt es nach Behandlung mit ACNU zu einem Anstieg der SubG1-Fraktion von 40 % auf 70 %. Wird die p53 Aktivität bei Behandlung mit TMZ inhibiert, kommt es hingegen zu einem geringen Abfall der SubG1-Fraktion von 40 % auf 30 %.

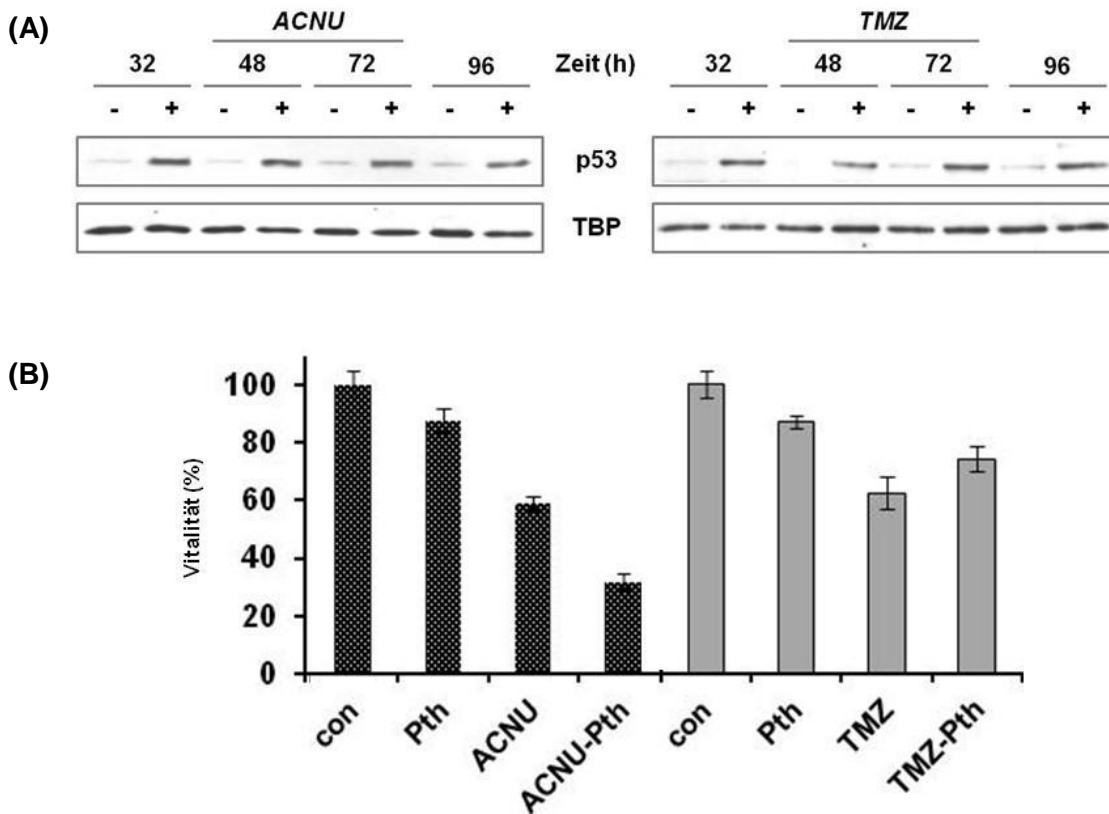


Abb. 4-26: Einfluss von p53 auf die DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ.

(A) LN-229 wurde für 32, 48, 72 und 96 h mit 50 μ M ACNU bzw. 100 μ M TMZ behandelt und die p53-Akkumulation in Kernextrakten mittels Western Blot Analyse bestimmt. TBP diente als Ladekontrolle. (B) LN-229 wurden für 1 h mit 25 μ M Pifithrin α vorbehandelt und dann für 96 h mit 50 μ M ACNU bzw. für 120 h mit 100 μ M TMZ inkubiert. Die SubG1-Fraktion wurde am Durchflusszytometer bestimmt und die relative Überlebensrate durch Verrechnung mit der Überlebensrate in der unbehandelten Kontrolle ermittelt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Die p53-vermittelte Apoptose wird durch Regulation der FASR-Expression ausgelöst. Um nun zu überprüfen, ob die nukleäre Akkumulation von p53 in unserem Modell einen Anstieg der FASR-Expression bedingt und somit den Anstieg in der hier gemessenen SubG1-Rate beeinflusst, wurde die FASR-Expression auf mRNA und Proteinebene nach Behandlung mit ACNU und TMZ detektiert. Zusätzlich wurde die transkriptionelle Aktivität von p53, durch Detektion des durch p53 regulierten Gens *p21* überprüft.

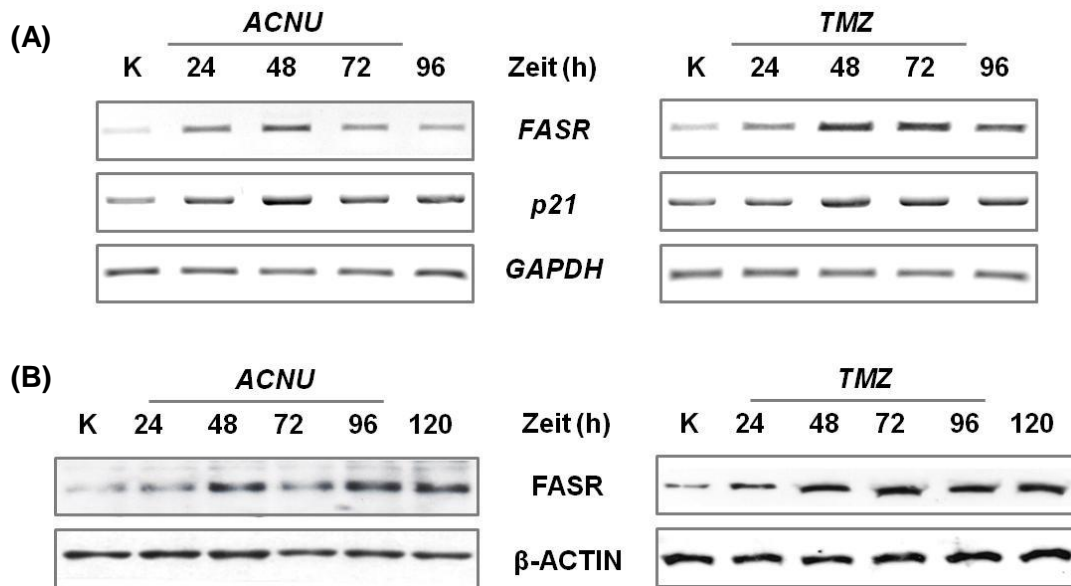


Abb. 4-27: FASR-Expression in LN-229 nach ACNU- bzw. TMZ-Behandlung.

(A) Die Expression von *FASR* und *p21* 24, 48, 72 und 96 h nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ wurde mittels RT-PCR ermittelt. *GAPDH* diente als interner Standard für die eingesetzte cDNA-Menge. (B) Die *FASR*-Expression 24, 48, 72, 96 und 120 h nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ wurde in Gesamtzellextrakten mittels Western Blot Analyse detektiert. β -ACTIN diente als Ladekontrolle.

Wie aus Abb. 4-27 (A) hervorgeht, wird *p21* 24 h nach Behandlung mit ACNU hochreguliert, hat bei 48 h sein Maximum erreicht und ab 72 h fällt das Expressionslevel leicht ab. Bei Behandlung mit TMZ ist erst nach 48 h ein Anstieg der *p21*-Expression zu verzeichnen, welche nach 72 h leicht abfällt. Das *FASR*-Signal steigt bereits 24 h nach Behandlung mit ACNU leicht an, verstärkt sich noch einmal nach 48 h und fällt dann nach 72 h wieder ab. Auf Proteinebene ist der starke Anstieg nach 48 h ebenfalls zu beobachten und bleibt bis 120 h nach Behandlung erhöht. Nach TMZ-Behandlung kommt es auf mRNA-Ebene ebenfalls nach 48 h zu einem Anstieg im *FASR*-Signal, welches jedoch erst nach 96 h schwach abfällt. Auf Proteinebene ist auch hier ein starker Anstieg nach 48 h zu verzeichnen, der bis 120 h nach Behandlung gleichbleibt (Abb. 4-27 (B)).

Weitere wichtige Zielgene von p53 nach Behandlung mit chlorethylierenden Agenzien stellen die Reparaturproteine DDB2 und XPC dar. Aus diesem Grund wurde auch hier deren Expression nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ auf mRNA- und Proteinebene untersucht.

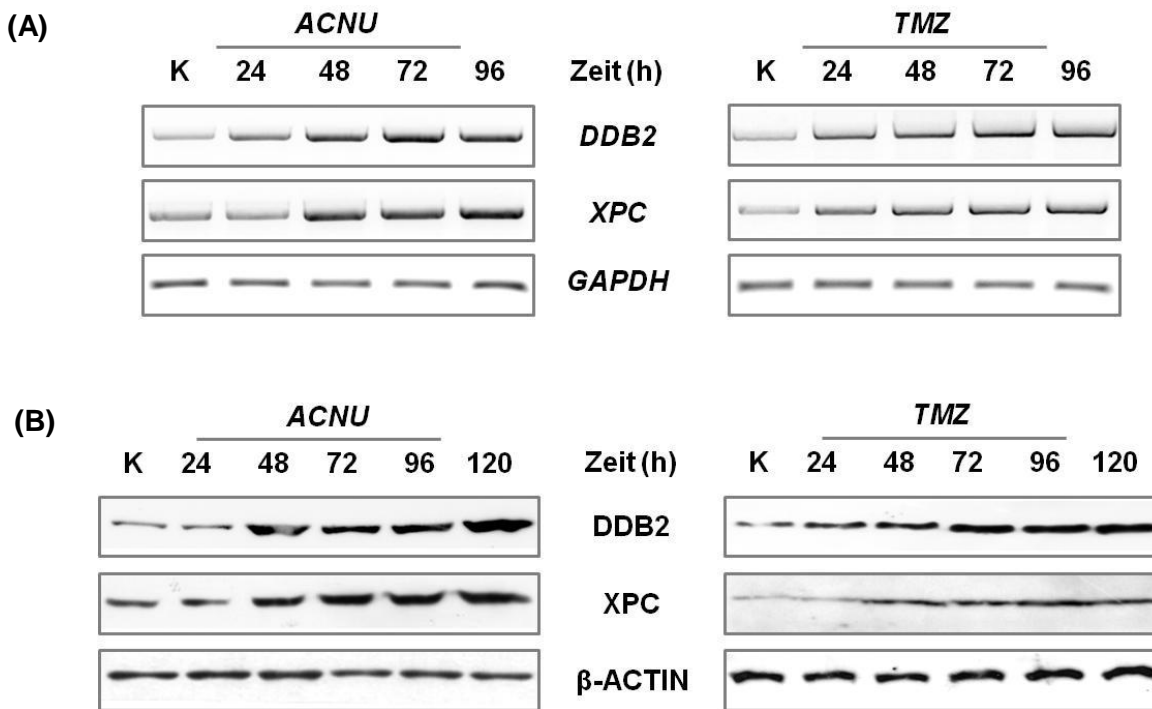


Abb. 4-28: Einfluss der Behandlung mit ACNU bzw. TMZ auf die Regulation von DDB2 und XPC.

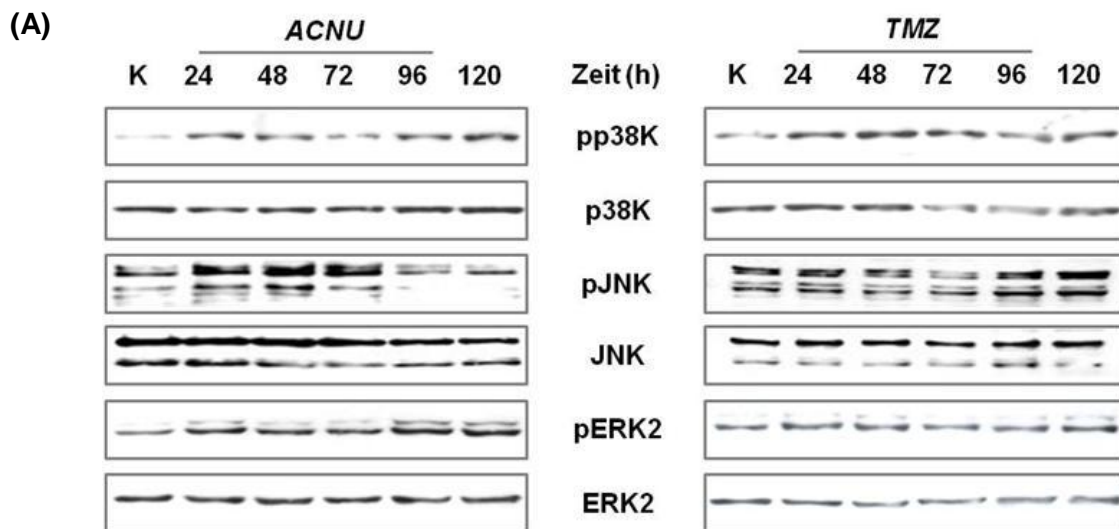
(A) LN-229 wurden für 24, 48, 72 und 96 h mit 50 μ M ACNU bzw. 100 μ M TMZ behandelt und die Expression von *DDB2* und *XPC* mittels RT-PCR ermittelt. *GAPDH* diente als Kontrolle für die eingesetzte cDNA-Menge. (B) LN-229 wurden für 24, 48, 72, 96 und 120 h mit 50 μ M ACNU, bzw. 100 μ M TMZ behandelt und die Expression von *DDB2* und *XPC* in Gesamtzellextrakten mittels Western Blot Analyse detektiert. β -ACTIN diente als Ladekontrolle für die eingesetzte Proteinmenge.

Aus Abb. 4-28 (A) geht hervor, dass es sowohl nach Behandlung mit ACNU, als auch nach Behandlung mit TMZ bereits nach 24 h zu einer vermehrten *DDB2*-Expression kommt. Bei Behandlung mit ACNU ist nach 48 h, bei Behandlung mit TMZ nach 24 h ein Anstieg in der *XPC*-Expression zu verzeichnen. Der Anstieg im Signal setzt sich sowohl für *DDB2* als auch für *XPC* auf Proteinebene fort (Abb. 4-28 (B))

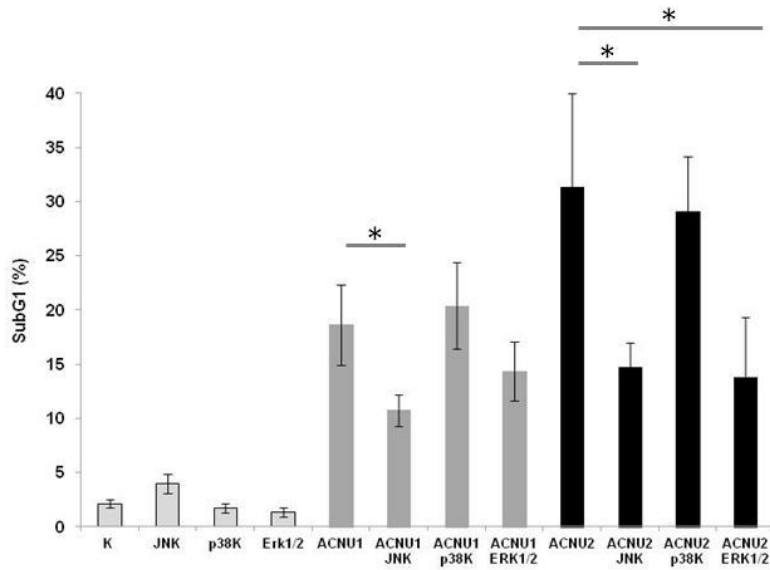
Zusammenfassend kann man also festhalten, dass es sowohl nach Behandlung mit ACNU, als auch mit TMZ zu einer nukleären Akkumulation von p53 kommt, welches transkriptionell aktiv ist, was durch die Detektion der p53 Zielgene *p21*, *FASR*, *DDB2* und *XPC* gezeigt wurde. Während die vermehrte Translokation von p53 nach TMZ-Behandlung nur einen geringen Einfluss auf die Apoptose auszuüben scheint, hat diese nach ACNU-Behandlung einen protektiven Effekt.

4.3.3 Rolle der MAPKs in der Regulation der Apoptose nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ

Die MAPKs sind wichtige Regulatoren der zellulären Antwort nach DNA Schaden, indem sie u.a. Einfluss auf den Zellzyklus, die DNA-Reparatur und die Apoptose nehmen (s. 2.3). Die Regulation zu frühen Zeitpunkte nach Behandlung mit ACNU wurde in der vorliegenden Arbeit bereits genauer beleuchtet (s. 4.2.2). Um den Einfluss auf die Apoptose zu untersuchen sind jedoch spätere Zeitpunkte von Interesse, da beispielsweise für JNK gezeigt wurde, dass diese nach Cisplatinbehandlung zu frühen Zeitpunkten Einfluss auf die DNA-Reparatur ausübt und bei langfristiger Aktivierung Apoptose auslöst (Christmann, Tomicic et al. 2007). Aus diesem Grund wurde sowohl die unphosphorylierte, als auch die phosphorylierte Form der drei MAPKs p38K, JNK und ERK2 24, 48, 72, 96 und 120 h nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ mittels Western Blot Analyse detektiert (Abb. 4-29 (A)). Hier ist zu sehen, dass es nach Behandlung mit ACNU zu einem Anstieg im Signal der phosphorylierten Form aller drei MAPKs kommt, der bei pp38K und pERK2 über die gesamte Dauer der Messung anhält und bei pJNK nach 96 h wieder abfällt. Nach Behandlung mit TMZ kommt es ebenfalls zu einem Anstieg im Signal der pp38K, das bis zum Ende der Messung anhält. Das pERK2 Signal bleibt über die gesamte Dauer unverändert, das pJNK-Signal fällt 72 h nach Behandlung sogar leicht ab und steigt, dann nach 96 h wieder an.



(B)



(C)

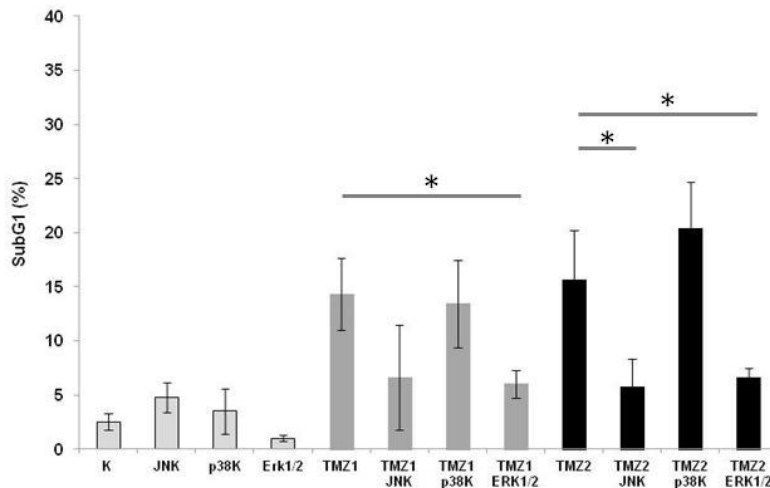


Abb. 4-29: Rolle der MAPKs bei der Regulation der DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ in LN-229

(A) LN-229 wurden mit 50 μ M ACNU bzw. 100 μ M TMZ behandelt und die Expression der drei MAPKs p38K, JNK und ERK2 und deren phosphorylierte Form mittels Western Blot Analyse in Gesamtzellextrakten nach 24, 48, 72, 96 und 120 h bestimmt. LN-229 wurden mit 20 μ M (ACNU1) bzw. 40 μ M (ACNU2) (B) bzw. 50 μ M (TMZ1) und 100 μ M (TMZ2) (C) vorbehandelt und nach 24 h wurden die spezifischen Inhibitoren für die drei MAPKs p38K (SB203580), JNK (SP600125) und MEK (U0126) zugegeben. 96 h nach Behandlung mit ACNU bzw. 120 h nach Behandlung mit TMZ wurde die SubG1-Fraktion am Durchflusszytometer bestimmt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten (* $p < 0,05$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

Um nun die Rolle der MAPKs in der Regulation der Apoptose nach Behandlung mit ACNU und TMZ genauer zu beleuchten wurde deren Aktivität durch Zugabe der entsprechenden spezifischen Inhibitoren gehemmt (Abb. 4-29 (B) und (C)). Da wie bereits erwähnt, die frühe

Aktivität der MAPKs die DNA-Reparatur beeinflusst, und die späte Aktivität Einfluss auf den Zelltod nimmt, wurden die Inhibitoren 24 h nach Behandlung zugegeben. Hier ist zu sehen, dass es sowohl bei Behandlung mit ACNU, als auch mit TMZ durch die Inhibierung von JNK und ERK1/2 zu einer Reduktion der SubG1-Fraktion kommt, wohingegen die Inhibierung der p38K-Aktivität keinen Einfluss auf die SubG1-Fraktion nimmt.

Die Umwandlung der durch ACNU bzw. TMZ erzeugten DNA-Addukte in toxische Läsionen bzw. deren Entfernung ist an den Zellzyklus gebunden. D.h. werden die Zellen im Zellzyklus geblockt, gehen diese nicht in die Apoptose über, bzw. wird im umgekehrten Fall ein Block aufgehoben, kommt es zum Anstieg in der apoptotischen Fraktion. Von den MAPKs ist bekannt, dass diese an der Regulation des Zellzyklus partizipieren, indem sie beispielsweise auf die Expression von Cyclin D oder auch die von c-MYC regulierend einwirken (Lavoie, L'Allemain et al. 1996; Pelengaris, Khan et al. 2002). Um zu überprüfen, ob LN-229 nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ und anschließender Inhibierung der drei MAPKs, Unterschiede in der Zellzyklusverteilung aufweisen, wurde diese 96 h nach ACNU- bzw. 120 h nach TMZ-Behandlung am Durchflusszytometer bestimmt (Abb. 4-30).

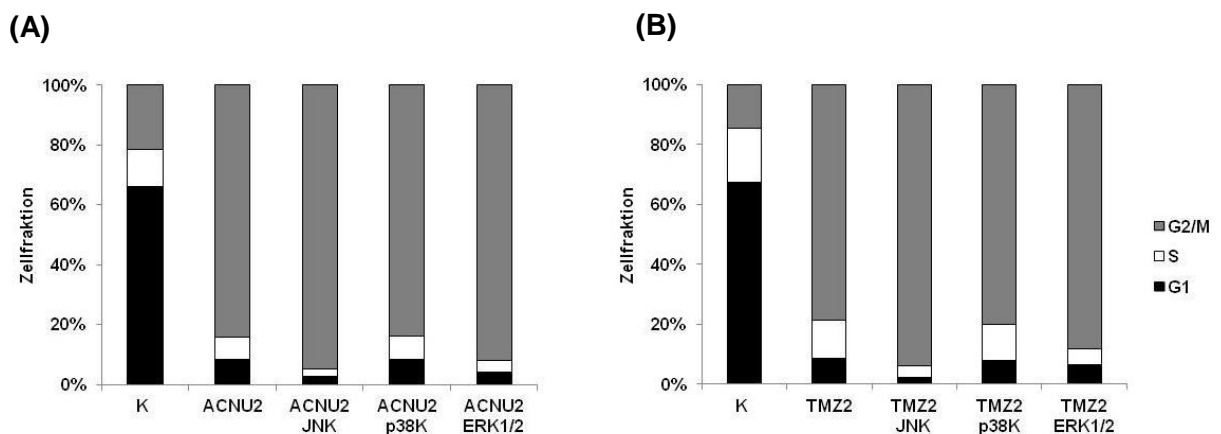


Abb. 4-30: Einfluss der Inhibierung der MAPK-Aktivität auf die Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ.

LN-229 wurden mit 40 µM (ACNU2) (A) bzw. 100 µM (TMZ2) (B) vorbehandelt und nach 24 h wurden die spezifischen Inhibitoren für die drei MAPKs p38K (SB203580), JNK (SP600125) und MEK (U0126) zugegeben. 96 h nach Behandlung mit ACNU bzw. 120 h nach Behandlung mit TMZ wurde die Zellzyklusverteilung am Durchflusszytometer bestimmt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Durch die Behandlung mit ACNU bzw. TMZ kommt es zu einem G2/M-Arrest. Während die Inhibierung der p38K-Aktivität keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung nimmt, ist sowohl nach Inhibierung der JNK-, als auch der ERK1/2-Aktivität ein Anstieg in der prozentualen Zahl der Zellen in der G2/M-Fraktion zu sehen. Die relative Zahl der Zellen in der G1- und S-Phase nimmt ab.

Zusammenfassend kann man also festhalten, dass die Behandlung mit ACNU bzw. TMZ zu späten Zeitpunkten in einem Anstieg der phosphorylierten Form aller MAPKs resultiert. Lediglich ERK2 wird durch die Behandlung mit TMZ nicht vermehrt phosphoryliert. Die Inhibierung der JNK- und ERK2-Aktivität durch spezifische Inhibitoren führt sowohl nach ACNU- als auch nach TMZ-Behandlung zu einer Reduktion der apoptotischen Fraktion, die mit einer Akkumulation in der G2/M-Phase des Zellzyklus verbunden ist.

4.3.4 Rolle der AP-1-Aktivität in der Regulation der Apoptose nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ

Die MAPKs üben ihren Einfluss auf die zellulären Signalwege u.a. über die Regulation der AP-1-Aktivität aus, weshalb diese nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ mittels EMSA bestimmt wurde (Abb. 4-31). Hier ist zu sehen, dass es bereits 24 h nach Behandlung mit ACNU zu einer Zunahme in der AP-1-Bindeaktivität kommt, diese bis 48 h nach Behandlung weiter ansteigt und dann wieder langsam abfällt. 120 h nach Behandlung mit ACNU ist die AP-1-Aktivität wieder vergleichbar mit der in der Kontrolle. Nach Behandlung mit TMZ hingegen ist erst nach 48 h ein sehr schwacher Anstieg im Signal zu erkennen. 96 h nach Behandlung ist ein sehr starkes Signal vorhanden, das jedoch bereits nach 120 h wieder massiv abnimmt.

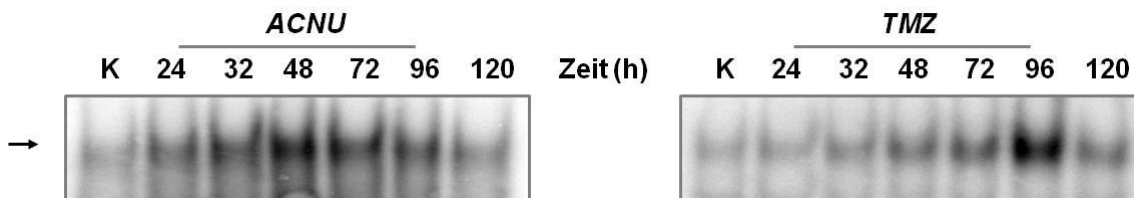


Abb. 4-31: AP-1-Bindeaktivität nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ in LN-229.

Die AP-1-Bindeaktivität 24, 32, 48, 72, 96 und 120 h nach Behandlung mit 50 μ M ACNU bzw. 100 μ M TMZ wurde mittels EMSA in Kernextrakten bestimmt. Als Zielsequenz diente die AP-1-Bindestelle des *MMP1*-Promotors.

Ein wichtiges Zielgen von AP-1 stellt der *FASL* dar. Um zu überprüfen ob die AP-1-Aktivität mit der *FASL*-Expression korreliert, wurde dessen Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene detektiert (Abb. 4-32).

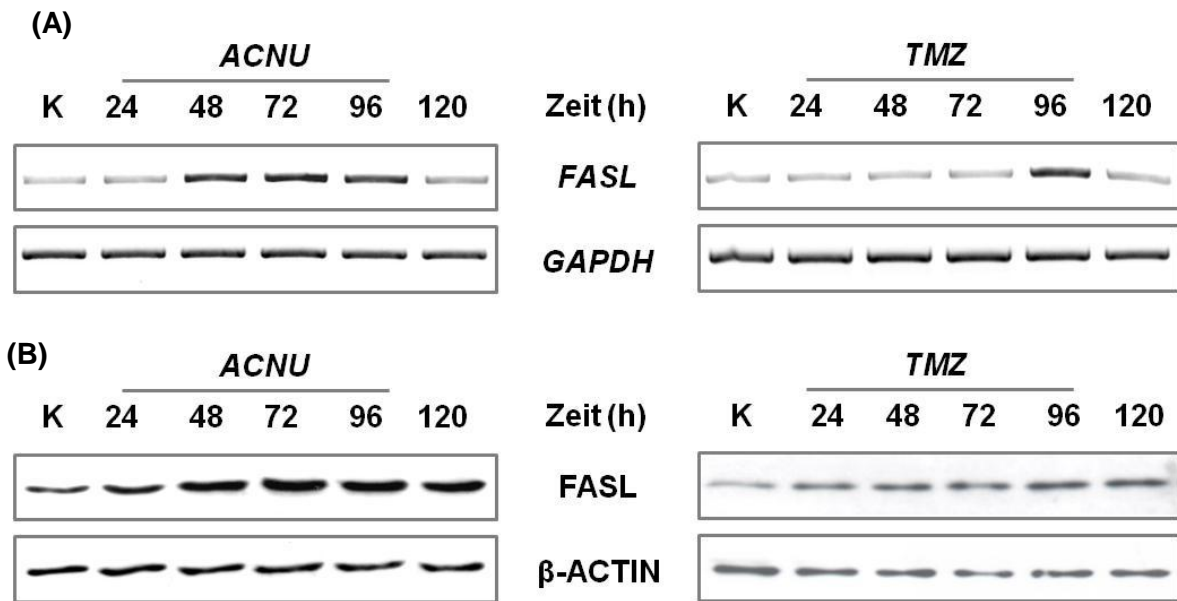


Abb. 4-32: Expression des FASL nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ in LN-229

LN-229 wurden für 24, 48, 72, 96 und 120 h mit 50 μ M ACNU bzw. 100 μ M TMZ behandelt und die *FASL*-Expression auf mRNA-Ebene (A) mittels RT-PCR, auf Proteinebene (B) mittels Western Blot Analyse gemessen. *GAPDH* diente als Kontrolle für die eingesetzte cDNA-Menge, β -ACTIN als Ladekontrolle.

Hier ist zu sehen, dass es 48 h nach Behandlung mit ACNU, parallel zur Zunahme mit der AP-1-Aktivität, zu einem Anstieg im *FASL*-mRNA-Signal kommt, das bis 96 h nach Behandlung anhält und nach 120 h stark abfällt. Auf Proteinebene ist 24 h nach Behandlung ein schwacher Anstieg im Signal zu verzeichnen, der nach 48 h weiter zunimmt und dann bis 120 h nach Behandlung gleich bleibt. Nach TMZ-Behandlung ist lediglich 96 h nach Behandlung ein deutlicher Anstieg des *FASL*-mRNA-Signals zu detektieren. 120 h nach Behandlung ist das *FASL*-mRNA-Signal wieder auf dem Kontrolllevel. Auf Proteinebene ist nur ein schwacher Anstieg in der Signalstärke zu beobachten.

Zusammenfassend kann man also festhalten, dass es durch die Behandlung mit ACNU in LN-229 zu einem starken, langanhaltenden Anstieg der AP-1-Aktivität kommt, der sich in einer vermehrten Expression des FAS-Liganden sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene fortsetzt. Die Behandlung mit TMZ hingegen führt lediglich nach 96 h zu einem Anstieg der AP-1-Aktivität und der *FASL*-mRNA-Expression. Auf Proteinebene ist nach TMZ-Behandlung ein schwacher Anstieg in der FASL-Expression zu detektieren.

5 DISKUSSION

5.1 Einfluss von FRA-1 auf die Sensitivität von LN-229 gegenüber ACNU

5.1.1 FRA-1 wird nach Behandlung induziert.

Die FRA-1-Expression wird durch eine Vielzahl von Stimuli angeregt, erfolgt meist mit leichter Verzögerung, ist aber dann stabil (Cohen and Curran 1988; Tulchinsky 2000). Auch in LN-229 ist nach ACNU-Behandlung ein verzögerter Anstieg in der FRA-1-Menge, sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene zu detektieren. Dieser Anstieg beruht auf einer Neusynthese und nicht auf einer Stabilisierung der mRNA, da nach Inhibierung der Transkription das FRA-1-Signal auf mRNA-Ebene vollkommen verschwindet. Während die Proteinmenge erst nach 16 h ansteigt, ist bereits nach 8 h ein Anstieg von FRA-1 im Zellkern zu detektieren, was durch eine vermehrte Translokation erklärt werden kann.

5.1.2 Die FRA-1-Expression wird durch ERK2 und p38K reguliert

Die MAPKs spielen eine zentrale Rolle in der Regulation der Expression, Aktivität und Stabilität von FRA-1 (s.2.2.2.1). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die drei MAPKs p38K, JNK und ERK auf Proteinebene detektierbar sind, das Signal nach Behandlung mit ACNU jedoch gleichbleibend ist, die MAPKs also bis zu 8 h nach Behandlung nicht durch vermehrte Phosphorylierung aktiviert werden. Für p38K und JNK ist dieses Ergebnis nicht zu erwarten gewesen, da bekannt ist, dass diese beiden u.a. durch DNA-schädigende Agenzien aktiviert werden (Leppa and Bohmann 1999; Kim and Choi 2010). Möglicherweise ist jedoch die Grundaktivität bereits so hoch, dass durch den Stress, kein weiterer Anstieg im Signal zu detektieren ist oder die auslösenden DNA-Läsionen erst noch gebildet werden müssen. Nach Hemmung der Aktivität der Kinasen durch spezifische Inhibitoren und anschließender ACNU-Behandlung, wurde sowohl nach Inhibierung von MEK, als auch nach Inhibierung von p38K kein FRA-1-Signal mehr detektiert. Diese Ergebnisse stimmen mit bereits vorhanden Daten über die Regulation von FRA-1 überein (Young, Nair et al. 2002; Casalino, De Cesare et al. 2003; Vial and Marshall 2003; Looby, Abdel-Latif et al. 2009).

5.1.3 Die Herunterregulation der FRA-1-Expression führt zu einer Sensitivierung gegenüber ACNU

Bisherige Untersuchungen bezüglich der Rolle von FRA-1 in der Sensitivität gegenüber Cytostatika lieferten gegensätzliche Ergebnisse. Während Macleod et al. (Macleod, Mullen et al. 2005) zeigten, dass eine Herunterregulation der *FRA-1*-Expression in einer ovarialen Krebszelllinie zu einer Sensitivierung gegenüber Cisplatin führt, kamen Hamdi et al. (Hamdi, Popeijus et al. 2008) zu dem Ergebnis, dass die Herunterregulation der FRA-1-Expression in p53-defizienten Glioblastomzellen zu einer vermehrten Resistenz gegenüber Cisplatin führt. Um die Rolle von FRA-1 in der Sensitivität gegenüber ACNU in LN-229 zu prüfen wurde FRA-1 sowohl transient durch Transfektion mit siRNA, als auch stabil durch Transfektion mit einem shRNA exprimierenden Vektor herunterreguliert und die Sensitivität gegenüber ACNU bestimmt. Nach transients Transfektion konnte bei einer Dosis von 25 µM und einer Inkubationszeit von 96 h ein signifikanter Anstieg in der SubG1-Fraktion gegenüber der mit *nonsense* siRNA transfizierten Zellen verzeichnet werden. Hingegen wurde bei den stabil transfizierten Zellen erst bei einer Dosis von 50 µM ACNU ein signifikanter Anstieg in der SubG1-Fraktion im Vergleich zu den mit Leervektor transfizierten Zellen gemessen. Möglicherweise ist dieser Unterschied durch die verminderte Effizienz in der Herunterregulation von FRA-1 zu erklären. So ist die Restaktivität von 50% in den stabil transfizierten, unbehandelten Zellen, im Vergleich zu den mit Leervektor transfizierten Zellen möglicherweise noch ausreichend, um bei geringen Dosen die gleiche DNA-Schadensantwort auszulösen, wie bei den mit Leervektor transfizierten LN-229. Die Ergebnisse wurden, um diese zu bestärken, in den beiden Gliomzelllinien U87 und U138 bestätigt.

5.1.4 Die Herunterregulation der FRA-1-Expression führt zu einer verminderten AP-1-Bindung, die durch eine reduzierte FRA-1 Menge im AP-1-Komplex bedingt ist

FRA-1 benötigt, um transkriptionell aktiv zu werden einen Dimerisierungspartner aus der JUN-, ATF- oder MAF-Familie, mit dem es den Transkriptionsfaktor AP-1 bildet (s. 2.2.2). Die AP-1-Bildung nach ACNU-Behandlung wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines EMSAs genauer untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit ACNU in LN-229-vec zu einer vermehrten AP-1-Bildung und -Bindung an die AP-1-Konsensussequenz führt. Diese Bindung wird durch eine Herunterregulation der FRA-1-Synthese reduziert. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass dieser Effekt durch eine verminderte FRA-1-Menge im AP-1-Komplex bedingt ist.

5.1.5 FRA-1 nimmt keinen Einfluss auf die DNA-Reparatur nach Behandlung mit ACNU

Für c-FOS wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass es die DNA-Schadensantwort gegenüber UV-Licht maßgeblich beeinflusst, indem es die Resynthese von XPF reguliert (Christmann, Tomicic et al. 2006; Tomicic, Reischmann et al. 2011). Aus diesem Grund wurde auch hier untersucht, ob FRA-1 Einfluss auf die DNA-Reparatur nach Behandlung mit ACNU ausübt. Ein zentraler Reparaturweg in der Toleranz *Crosslinks* erzeugender Agenzien ist die NER (s. 2.5.3.2 und 2.5.3.3). Die Expression eines Großteils der Regulatoren der NER wird transkriptionell gesteuert, weshalb die mRNA-Expression verschiedener, an der NER beteiligter Gene ermittelt wurde. Es konnte lediglich für *ERCC1* ein geringer Unterschied in der Expression zwischen LN-229-vec und LN-229-FRA-1-shRNA festgestellt werden, der sich auf Proteinebene jedoch nicht reproduzieren ließ. Zusätzlich wurden der alkalische *Comet* Assay und der modifizierte alkalische *Comet* Assay durchgeführt, die dazu dienen, die Bildung und Reparatur von Einzelstrangbrüchen bzw. ICLs zu detektieren. Bei der Behandlung mit ACNU können Einzelstrangbrüche bei der Entfernung der DNA-Monoaddukte auftreten, welche im Rahmen der DNA-Reparatur wieder ligiert werden (s. 2.4.1). Die Einzelstrangbrüche sind vornehmlich in den ersten 24 h nach Behandlung zu erwarten, da ACNU eine geringe Halbwertszeit von maximal 75 Minuten besitzt (Schein, Heal et al. 1978) und die DNA-Addukte für etwa 8 h stabil bleiben (Brent, Lestrud et al. 1987). Hier bestand jedoch kein Unterschied zwischen den Zellen mit normaler FRA-1-Expression und mit herunterreguliertem FRA-1. Werden die DNA-Monoaddukte nicht entfernt, können sich diese in toxische ICLs umwandeln (s. 2.4.1), die entweder durch die ICL-Reparatur entfernt werden, oder zur Apoptose führen. Da nach 96 h bereits eine SubG1-Fraktion von 50 % vorhanden ist und keine weiteren DNA-Monoaddukte mehr gebildet werden können, war davon auszugehen, dass bis dahin die DNA-Schäden entfernt wurden, oder die Zellen in die Apoptose übergegangen sind. Auch hier wurde weder in der Bildung, noch in der Entfernung der ICLs ein Unterschied zwischen den Zellen mit normaler und denen, mit herunterregulierter FRA-1-Expression detektiert. Ein wichtiger Marker für die Erkennung von Doppelstrangbrüchen ist γ H2A.X. Dieses wurde sowohl in LN-229 mit transienter, als auch mit stabil reduzierter FRA-1-Expression mittels Western Blot Analyse detektiert und quantifiziert. Aber auch hier konnte kein Unterschied in der Signalstärke nach Behandlung mit ACNU festgestellt werden.

Die DNA-Reparatur nach Behandlung mit ACNU in Abhängigkeit der FRA-1-Expression wurde ausführlich mit unterschiedlichen Methoden untersucht und dabei die verschiedenen Schritte beleuchtet. In keinem der durchgeführten Untersuchungen konnte ein Unterschied zwischen den Zellen mit normaler und verminderter FRA-1-Expression festgestellt werden,

weshalb davon auszugehen ist, dass FRA-1 bei der Regulation der DNA Reparatur in LN-229 nach Behandlung mit ACNU keine Rolle spielt.

5.1.6 Die Sensitivierung gegenüber ACNU durch eine Herunterregulation der FRA-1-Expression ist nicht durch die Regulation apoptotischer Faktoren bedingt

Es ist bekannt, dass AP-1 ein wichtiger Regulator der Apoptose ist, indem es vor allem die Transkription des FAS-Liganden aber auch die des FAS-Rezeptors beeinflusst (Kasibhatla, Brunner et al. 1998; Li, Chong et al. 1999; Lasham, Lindridge et al. 2000). Aus diesem Grund wurde die Apoptoserate in LN-229-vec und LN-229-FRA-1-shRNA nach Behandlung mit ACNU mittels Annexin V/PI-Färbung bestimmt. Hier konnte gezeigt werden, dass der Anstieg in der SubG1-Fraktion nach Herunterregulation der FRA-1-Expression primär auf eine erhöhte Apoptoserate zurückzuführen ist, wohingegen die Nekroserate nur geringfügig ansteigt. Um zu sehen, ob dieser Unterschied auf der Regulation von *FASL* bzw. *FASR* beruht, wurde deren Expression mittels semiquantitativer PCR untersucht. Das *FASR*-mRNA-Signal war in beiden Klonen nach 24 h erhöht, reduzierte sich nach 48 h und die Signalintensität zeigte in beiden Zelllinien nur einen geringfügigen Unterschied. Interessanterweise wurde jedoch in LN-229-vec der *FASL* bereits nach 8 h vermehrt transkribiert und blieb bis 48 h nach Behandlung bestehen, wohingegen in LN-229-FRA-1-shRNA kein Anstieg im Signal zu verzeichnen war. Das Ergebnis wurde noch einmal mittels *real time* PCR verifiziert. Dieses Resultat ist sehr überraschend, da mit der erhöhten Expression des FAS-Liganden auch ein Anstieg in der apoptotischen Fraktion zu erwarten wäre und dieses Ergebnis somit im Widerspruch zur Messung der Apoptoserate steht. Aus diesem Grund wurde noch zusätzlich die FASL-Expression auf Proteinebene bestimmt. Hier wurde erneut in LN-229-vec etwas mehr Signal detektiert, als in LN-229-FRA-1-shRNA. Der Unterschied war aber auf Proteinebene weitaus geringer, als auf mRNA-Ebene, weshalb davon auszugehen ist, dass die Regulation des FAS-Liganden nicht die Ursache für die Unterschiede in der Apoptoserate darstellt. Einen weiteren wichtigen Regulator der Apoptose stellen die pro- und antiapoptotischen Mitglieder der BCL-2-Familie dar, die größtenteils transkriptionell reguliert werden. Hier wurde die mRNA-Expression der wichtigsten Regulatoren *BCL-2*, *BAX*, *PUMA* und *NOXA* der beiden Klone detektiert und quantifiziert. Aber auch hier konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Nach eingehender Untersuchung der verschiedenen Regulatoren der Apoptose, kann man also mit großer Sicherheit behaupten, dass FRA-1 in dem hier getesteten Zellsystem nach Behandlung mit ACNU keine direkte Rolle in der Regulation des Apoptosesignalwegs spielt.

5.1.7 Die Herunterregulation der FRA-1-Expression führt zu einem verminderten G2/M-Arrest bedingt durch eine Dephosphorylierung von CHK1

Hamdi et al. (Hamdi, Popeijus et al. 2008) zeigen in ihrer Studie, dass FRA-1 in der Glioblastomzelllinie T98G nach Cisplatinbehandlung die apoptotische Antwort beeinflusst, indem es regulierend auf den Zellzyklus wirkt. Dabei wurde eine veränderte Phosphorylierung von CHK1 beobachtet. In der hier vorliegenden Arbeit, konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation der FRA-1-Expression zu einem Anstieg der Zellzahl in der G1- und S-Phase, bzw. einem verminderten Arrest in der G2/M-Phase nach Behandlung mit ACNU führt. Wird 24 h nach Behandlung mit ACNU noch in beiden Klonen ein Anstieg an phosphoryliertem CHK1 detektiert, ist nach 48 h nur noch in LN-229-vec phosphoryliertes CHK1 vorhanden, während in LN-229-FRA-1-shRNA lediglich ein schwaches Signal detektiert werden kann. Auch die Menge an unphosphoryliertem CHK1 ist reduziert. Die Aktivierung von CHK1 durch Phosphorylierung führt über den CDK1-CyclinB-Komplex zu einem G2/M-Arrest (Sanchez, Wong et al. 1997). Kommt es nun zu einer verminderten Expression und Phosphorylierung von CHK1, können die Zellen mit unrepariertem DNA-Schaden aus dem Zellzyklusarrest entlassen werden, was im darauffolgenden Zellzyklen, bei Zusammentreffen mit der Replikationsgabel in der M-Phase, zum Zelltod führt (2.5.3.2). Diese Ergebnisse wurden in den zwei Glioblastomzelllinien U87 und U138 verifiziert.

Man kann aus diesem Grund mit großer Sicherheit schlussfolgern, dass FRA-1 in Glioblastomzellen nach Behandlung mit ACNU den Arrest in der G2/M-Phase fördert, indem es die CHK1-Expression und –Phosphorylierung beeinflusst. Die Zellen durchlaufen keine weiteren Mitosephasen und gehen hierdurch nicht in die Apoptose über. Das Resultat ist eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Nitrosoharnstoffderivat ACNU.

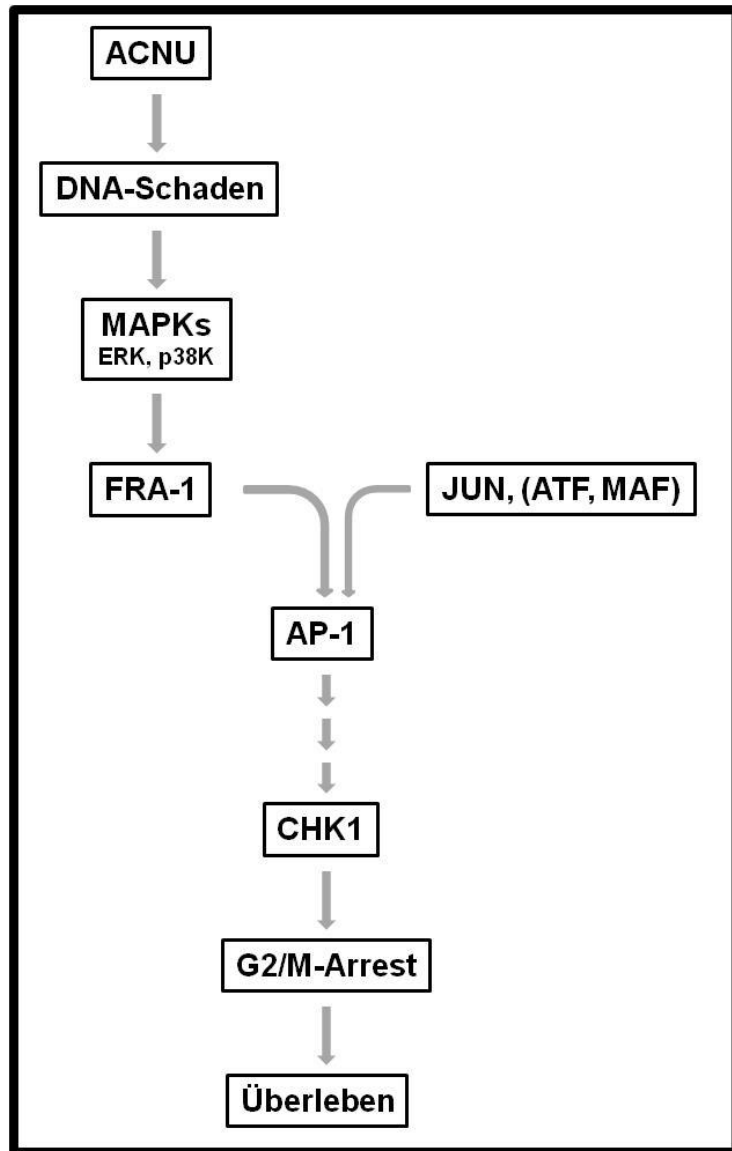


Abb. 5-1: Modell zur Rolle von FRA-1- in der DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit ACNU.

Das Modell wurde basierend auf den in dieser Arbeit entstanden Daten entwickelt. Die genaue Erläuterung ist dem vorhergehenden Abschnitt zu entnehmen.

5.1.8 Ausblick

Wie bereits eingehend erläutert, stellt die Glioblastomtherapie immer noch eine große medizinische Herausforderung dar. Trotz zahlreicher Forschungsarbeiten und Therapieansätzen, liegt die mittlere Überlebenszeit bei etwa 15 Monaten. Bisher wurden nur wenige erfolgsversprechende prognostische Faktoren gefunden. Neben MGMT, dem derzeit wichtigsten Prädiktor, sind in der Therapie mit chlorethylierenden Agenzien FANCD1/BRCA2 und p53 bekannte Resistenzmarker (Batista, Roos et al. 2007; Kondo, Takahashi et al. 2011; Quiros, Roos et al. 2011). Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass FRA-1 einen neuen vielversprechenden Faktor in Bezug auf die Resistenz gegenüber

chlorethylierenden Agenzien in der Gliomtherapie darstellen könnte. FRA-1 ist als Transkriptionsfaktor in der Regulation einer Vielzahl, sehr wichtiger Gene beteiligt, weshalb eine Inhibierung dessen Aktivität wohl unmöglich ist. Unsere Daten zeigen jedoch, dass die vermehrte Aktivität von FRA-1 mit der Expression und Aktivität von CHK1 eng verbunden ist und hierdurch die Resistenz gegenüber chlorethylierenden Agenzien vermittelt wird. Die CHK1-Aktivität kann jedoch durch Inhibitoren wie UCN-01, XL-844, AZD7762, PF-477736, SCH900776 oder auch LY2606368 blockiert und somit das Ansprechen gegenüber der Chemotherapie gesteigert werden. Diese werden bereits in klinischen Studien der Phase I eingesetzt (Bunch and Eastman 1996; Hirose, Berger et al. 2001; Kortmansky, Shah et al. 2005; Ashwell, Janetka et al. 2008; Karp, Thomas et al. 2012; King, Diaz et al. 2013). Theoretisch könnte also bei Detektion einer erhöhten FRA-1-Expression in Glioblastomzellen, der FRA-1 vermittelten Resistenz gegenüber chlorethylierenden Agenzien durch eine Inhibierung von CHK1 entgegen gewirkt werden.

Um diese Annahme zu bestärken, wäre es interessant und notwendig, die im Folgenden aufgeführten Fragestellungen noch genauer zu untersuchen:

- Wie ist der genaue Zusammenhang zwischen FRA-1- und CHK1-Expression? Wird die CHK1-Expression durch AP-1-Reguliert? Hierfür wäre es interessant eine CHK1-Promotoranalyse durchzuführen.
- Welche Regulatoren des Zellzyklus, werden durch die Herunterregulation der FRA-1-Expression und der dadurch vermittelten Inhibierung der CHK1-Aktivität in ihrer Aktivität modifiziert?
- Führt eine Inhibierung der CHK1-Aktivität zur gleichen biologischen Antwort, wie die Herunterregulation der FRA-1-Expression? D.h. wird die Zellzyklusverteilung, apoptotische Antwort und DNA-Reparatur im vorhandenen Modell im gleichen Maße beeinflusst?
- Lassen sich die erhaltenen Ergebnisse mit anderen Cytostatika, speziell TMZ, das einen hohen Stellenwert in der Chemotherapie des Glioblastoms besitzt, reproduzieren?

5.2 Rolle von p53, den MAPKs und AP-1 in der Regulation der DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ in LN-229

5.2.1 ACNU und TMZ induzieren in LN-229 Apoptose über den extrinsischen und intrinsischen Signalweg

Es wurde bereits in anderen Gliomzelllinien gezeigt, dass TMZ vermittelt über p53, den extrinsischen Apoptosesignalweg triggert (Roos, Batista et al. 2007). Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl nach ACNU-, als auch nach TMZ-Behandlung, neben dem extrinsischen auch der intrinsische Signalweg aktiviert wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass es bei Behandlung mit ACNU bereits nach 96 h zu einem starken Anstieg in der SubG1-Rate kommt, wohingegen nach Behandlung mit TMZ erst nach 120 h ein Anstieg zu verzeichnen ist. Diese Ergebnisse sind schlüssig und stimmen mit bisherigen Untersuchungen überein. Während ACNU bereits im ersten Zellzyklus nach Behandlung Apoptose induzieren kann, erfolgt die Auslösung der Apoptose nach Behandlung mit TMZ bei den eingesetzten Dosen erst ab dem zweiten Zellzyklus (Quiros, Roos et al. 2010). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Aktivierung der Caspasen und dem darauffolgenden Anstieg der SubG1-Fraktion ein Anstieg in der phosphorylierten Form des Histons 2.AX vorhergeht, was darauf schließen lässt, dass die Apoptose durch die Entstehung von Doppelstrangbrüchen ausgelöst wird. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen, die bereits in anderen Arbeiten erzielt wurden (Roos, Batista et al. 2007).

5.2.2 Die durch ACNU induzierte Apoptose wird durch eine Inhibierung der p53-Aktivität verstärkt, die durch TMZ induzierte Apoptose wird hingegen reduziert

p53 spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der apoptotischen Antwort indem es zum Einen die Expression des FAS-Rezeptors reguliert, zum Anderen aber auch Einfluss auf die Expression der DNA-Reparaturproteine XPC und DDB2 nimmt (Muller, Wilder et al. 1998; Batista, Roos et al. 2007). Je nach Agenz kommt es also durch die vermehrte Stabilisierung und nukleäre Akkumulation von p53 entweder zu einer gesteigerten Resistenz durch eine Begünstigung der DNA-Reparatur, oder aber auch zu einem Anstieg der Apoptose durch vermehrte Expression des FAS-Rezeptors. Um die Rolle von p53 in dem hier vorhandenen Modell zu untersuchen wurde dessen transkriptionelle Aktivität durch Zugabe von Pifithrin α gehemmt und die SubG1-Rate nach Behandlung mit ACNU und TMZ bestimmt. Zusätzlich wurde die Regulation der DNA-Reparatur und der Apoptose durch Detektion der DDB2-, XPC- und FASR-Expression bestimmt.

Die Inhibierung der p53-Aktivität bei Behandlung mit ACNU führte zu einem massiven Anstieg der SubG1-Fraktion im Vergleich zu den mit ACNU behandelten LN-229 mit unveränderter p53-Aktivität. Während DDB2 und XPC eine starke und langfristige Aktivierung aufwiesen, wurde der FAS-Rezeptor nur transient aktiviert und auch auf Proteinebene war keine stetige Aktivierung vorhanden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bisherigen Daten, in denen gezeigt wurde, dass die vermehrte Stabilisierung und nukleäre Akkumulation von p53 nach Behandlung mit chlorethylierenden Agenzien zu einem Anstieg in der Expression der NER-Reparaturproteine DDB2 und XPC führt und somit zu einem Anstieg in der DNA-Reparatur, was zu einer Reduktion der apoptotischen Fraktion im Vergleich zu Zellen mit reduzierter p53-Aktivität führt (Batista, Roos et al. 2007; Barckhausen, Roos et al. 2013). Auch der FAS-Rezeptor wurde nach Behandlung mit ACNU vermehrt exprimiert, was allerdings bei Betrachtung der SubG1-Messung im Vergleich zur DNA-Reparatur nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

Wird bei Behandlung mit TMZ die p53-Aktivität inhibiert kommt es lediglich zu einem geringen Anstieg in der Sensitivität gegenüber den Zellen mit unveränderter p53-Aktivität. XPC und DDB2 werden nach TMZ-Behandlung vermehrt exprimiert, allerdings spielt die NER bei der Reparatur durch TMZ verursachter DNA-Schäden keine Rolle. Der FAS-Rezeptor wurde nach Behandlung mit TMZ ebenfalls vermehrt exprimiert. Unter Einbezug der SubG1-Messung nach Inhibierung der p53-Aktivität kann man jedoch schlussfolgern, dass die durch p53 vermittelte Hochregulation der FASR-Expression lediglich eine untergeordnete Rolle in der apoptotischen Antwort spielt.

5.2.3 Die durch ACNU und TMZ ausgelöste Apoptose wird durch JNK und ERK1/2 vermittelt

Die MAPKs JNK, ERK1/2 und p38K spielen eine zentrale Rolle in der Regulation von Zelltod und -überleben (s. 2.3), weshalb in der vorliegenden Arbeit, die Auswirkungen einer Inhibierung auf den Zelltod genauer beleuchtet wurde. Sowohl nach Behandlung mit ACNU, als auch nach Behandlung mit TMZ, führte eine Inhibierung von JNK und ERK1/2 zu einer erhöhten Resistenz gegenüber der beiden Cytostatika, wohingegen die Inhibierung der p38K-Aktivität keinen Einfluss auf die apoptotische Antwort ausübte. Wichtige Zielproteine von ERK1/2 stellen, die AP-1-bildenden Proteine c-JUN und c-FOS dar. Diese wiederum regulieren die Expression des FAS-Liganden (Kasibhatla, Brunner et al. 1998) und nehmen somit Einfluss auf die Apoptose. Dies könnte erklären, weshalb eine Inhibierung von ERK1/2 zu einer Abnahme der apoptotischen Fraktion führt. Desweiteren nimmt ERK1/2 Einfluss auf die Zellzykluskontrolle, indem es an der Kontrolle der G2-DNA-Schadensantwortkaskade beteiligt ist und die Entlassung aus einem G2/M-Zellzyklusarrest steuert (Abbott and Holt

1999; Tang, Wu et al. 2002; Yan, Spieker et al. 2005). Wie die Zellzyklusanalyse zeigt, wird durch die Inhibierung der ERK1/2-Aktivität die Zahl der Zellen in der G2/M-Phase erhöht. Dies lässt die Annahme zu, dass es durch die fehlende Aktivität von ERK1/2 zu einem gesteigerten Arrest in der G2/M-Phase kommt, wodurch die durch ACNU und TMZ erzeugten DNA-Addukte nicht in letale Läsionen umgewandelt werden und hierdurch die apoptotische Fraktion im Vergleich zu den LN-229 mit unveränderter ERK1/2-Aktivität reduziert wird. Um diese Hypothese weiter zu stützen, wäre es jedoch notwendig, die Regulatoren des Zellzyklus noch genauer zu untersuchen.

Die lang andauernde Aktivierung der JNK führt zu einem Anstieg der Apoptose wohingegen eine transiente Aktivierung der JNK an der Regulation der Zellproliferation bzw. des Überlebens beteiligt ist. Wie bereits für ERK1/2 beschrieben wurde, ist auch JNK an der AP-1-Bildung beteiligt und kann hierüber die Expression von AP-1 Zielgenen wie TNF- α , BAK und FASL regulieren (Fan and Chambers 2001). Desweiteren ist JNK an der Phosphorylierung und Stabilisierung von p53 beteiligt (Fuchs, Adler et al. 1998). Während die p53-Aktivität in der Regulation der DNA-Schadensantwort nach TMZ-Behandlung in LN-229 eine untergeordnete Rolle spielt, konnte für ACNU gezeigt werden, dass die Inhibierung der p53-Aktivität nach ACNU-Behandlung einen proapoptotischen Effekt hat. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu denen, die nach Inhibierung der JNK-Aktivität erzielt wurden. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass JNK seinen proapoptotischen Effekt durch die Regulation der FAS-Ligand-Expression und nicht der p53-Aktivität ausübt. Die Zellzyklusanalyse zeigte, dass durch die Inhibierung der JNK-Aktivität ein Anstieg in der G2/M-Fraktion nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ zu beobachten ist. Für JNK ist aber, im Gegensatz zu ERK1/2, keine Funktion in der Regulation des Zellzyklus genauer beschrieben. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass der hier beobachtete Anstieg durch eine veränderte Regulation der Apoptose und nicht des Zellzyklus bedingt ist.

Die erzielten Daten lassen eine zentrale Rolle der AP-1-Aktivität in der Regulation der DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ annehmen, weshalb dessen langfristige Bildung bis zu 120 h nach Behandlung mit Hilfe eines EMSAs bestimmt wurde. Während es nach ACNU-Behandlung zu einem stetigen Anstieg des Signals bis zu 96 h nach Behandlung kommt, ist nach TMZ-Behandlung lediglich nach 96 h ein starkes Signal zu messen. Die AP-1-Bildung wird also durch die ACNU-Behandlung stark induziert, wohingegen nach TMZ-Behandlung die AP-1-Aktivität eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

Um die weiteren Auswirkungen der AP-1-Aktivität auf die Regulation der Apoptose zu überprüfen wurde zusätzlich die FAS-Ligand-Expression auf mRNA- und Proteinebene detektiert. Diese korreliert mit der AP-1-Aktivität, d.h. das *FASL*-Signal steigt 48 h nach

ACNU-Behandlung stark an, bleibt bis 96 h erhöht und nimmt dann wieder ab. Nach TMZ-Behandlung ist nur nach 96 h ein Anstieg in der Signalintensität zu verzeichnen. Auch auf Proteinebene ist das FASL-Signal nach ACNU Behandlung sehr viel stärker, als nach TMZ-Behandlung.

Zusammenfassend kann man also festhalten, dass es durch die Behandlung mit ACNU zu einem starken Anstieg in der JNK und ERK1/2-Aktivität kommt, die in einer vermehrten AP-1-Bildung resultiert, welche durch eine gesteigerte FASL-Synthese den extrinsischen Signalweg aktiviert und somit zur Apoptose führt. Nach Behandlung mit TMZ werden ebenfalls die MAPKs JNK und ERK1/2 aktiviert, was sich aber lediglich in einem geringen Anstieg der AP-1-Aktivität fortsetzt. Auch die Expression des FAS-Liganden wird durch die Behandlung mit TMZ in einem geringeren Ausmaß beeinflusst, als nach Behandlung mit ACNU.

5.2.4 Ausblick

Der Weg der durch ACNU induzierten Apoptose konnte mit den hier durchgeführten Experimenten schon relativ gut beleuchtet werden. So kommt es über die Aktivierung der MAPKs JNK und ERK1/2 zu einer Aktivierung von AP-1, welches eine gesteigert Expression des FAS-Liganden nach sich zieht. Durch den DNA-Schaden kommt es zu einer vermehrten Translokation von p53 in den Zellkern und in Folge dessen zu einem Anstieg in der XPC-, DDB2- und FAS-Rezeptor-Expression. Die erhöhte XPC- und DDB2-Expression wirkt protektiv gegenüber der durch ACNU entstehenden DNA-Schäden. Trotzdem kommt es zu späten Zeitpunkten zu einer, über den extrinsischen Signalweg vermittelten Apoptose, die durch Inhibierung der p53-Aktivität noch weiter gesteigert werden kann. Nach TMZ-Behandlung hingegen sind die Ergebnisse nicht so eindeutig. Es wurde gezeigt, dass auch hier JNK und ERK1/2 an der durch TMZ vermittelten Apoptose beteiligt sind, allerdings ist der Anstieg im AP-1-Signal nur von kurzer Dauer und auch der FAS-Ligand wird sehr viel schwächer induziert, als nach Behandlung mit ACNU. p53 transloziert nach TMZ-Behandlung vermehrt in den Zellkern und es kommt auch hier zu einer gesteigerten Expression von XPC, DDB2 und FAS-Rezeptor. XPC und DDB2 spielen jedoch bei der DNA-Reparatur nach TMZ-Behandlung keine Rolle. Zudem zeigt die Inhibierung der p53-Aktivität durch Pifithrin α , dass dessen Aktivität nur einen geringen Einfluss auf die Regulation der Apoptose in LN-229 ausübt.

Sowohl nach ACNU- als auch nach TMZ-Behandlung wurde gezeigt, dass nicht nur der extrinsische, sondern auch der intrinsische apoptotische Signalweg ausgelöst wird. Aus diesem Grund wurde in unserer Arbeitsgruppe die Rolle eines weiteren sehr wichtigen

Regulators der durch Chemotherapeutika vermittelten Apoptose, dem BH3-only Protein BIM untersucht. Seine Transkription wird u.a. durch AP-1 gesteuert und die Aktivität durch JNK positiv, bzw. ERK negativ reguliert (Lei and Davis 2003; Hubner, Barrett et al. 2008; Chen, Saha et al. 2013). BIM wiederum wirkt pro-apoptotisch, indem es den mitochondrialen Apoptoseweg begünstigt (s. 2.5.5.2). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass BIM nach ACNU- und TMZ-Behandlung aktiviert wird (s. 10.1). Eine Herunterregulation der BIM-Aktivität führt zudem zu einer signifikanten Abnahme der SubG1-Fraktion nach ACNU- und TMZ-Behandlung. Diese Ergebnisse komplettieren die bisher erhaltenen Daten zur Regulation der apoptotischen Signalwege nach ACNU- und TMZ-Behandlung und liefern eine schlüssige Erklärung für die beobachtete Aktivierung des intrinsischen Signalweges.

Die aus dieser Arbeit hervorgehenden Daten wurden zum besseren Verständnis im Folgenden noch einmal in einem Modell zusammengefasst.

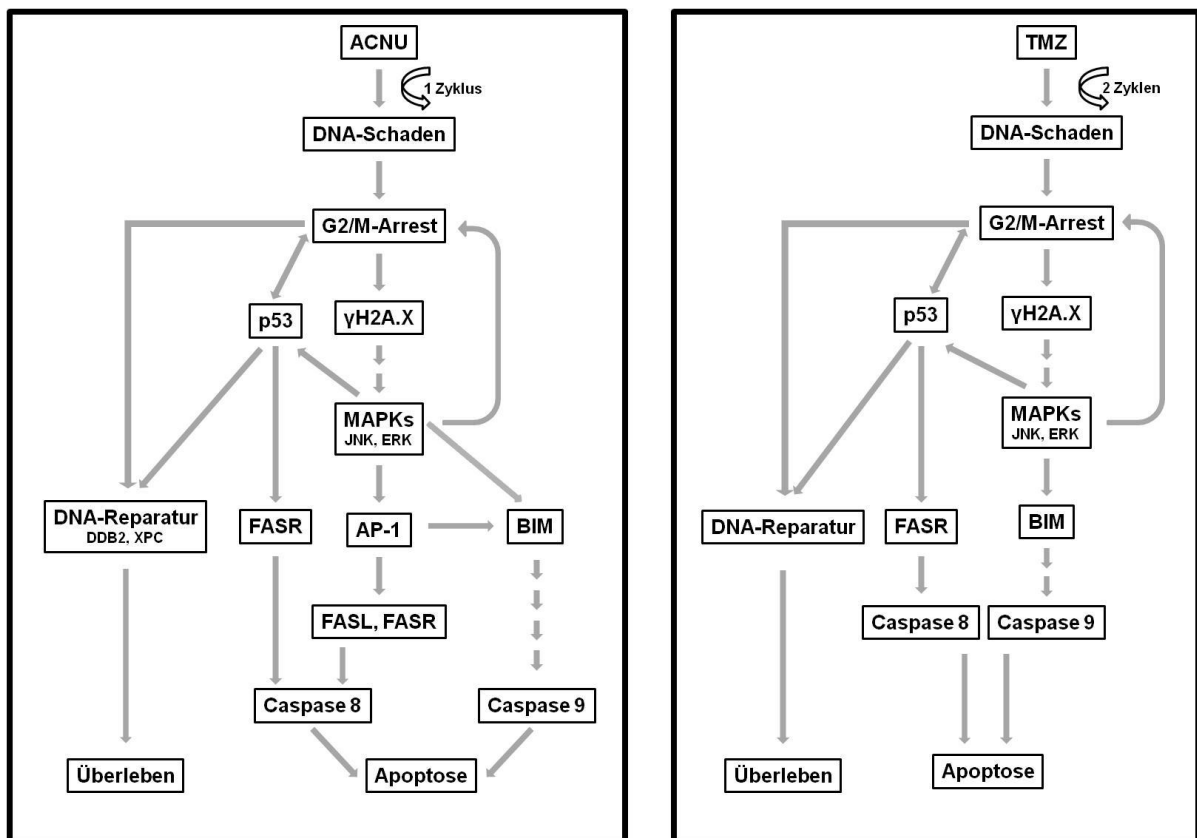


Abb. 5-2: Modell zur Regulation der DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ in LN-229

Das hier abgebildete Modell wurde basierend auf den Ergebnissen, die in der vorliegenden Arbeit vorgestellt wurden, erstellt. Die genaue Erläuterung ist dem vorhergehenden Abschnitt zu entnehmen.

Basierend auf den hier vorgestellten Daten wäre es nun noch interessant und notwendig folgende Punkte genauer zu beleuchten:

- Sind weitere Mitglieder der TNF-Familie, wie beispielsweise TRAIL, an der Regulation des extrinsischen Apoptosesignalweges beteiligt?
- Welche Rolle spielen die AP-1-bildenden Proteine c-FOS und c-JUN bei der Regulation der Apoptose? Hierfür wäre es sehr interessant, deren Expression nach Inhibierung der MAPKs zu quantifizieren und die FAS-Ligand-Expression nach Herunterregulation der AP-1-bildenden Proteine zu untersuchen.
- Welche Rolle spielt NF- κ B bei der Regulation der apoptotischen Antwort nach TMZ-Behandlung? Neben der Funktion als Transkriptionsfaktor des FAS-Liganden, begünstigt NF- κ B die DISC-Bildung indem es die Rekrutierung von FADD und Caspase 8 an den aktivierten FAS-Rezeptor steigert (Karl, Pritschow et al. 2009; Jennewein, Karl et al. 2012). Da die AP-1-Aktivität nach TMZ-Behandlung relativ schwach ist, wäre dies ein interessanter Ansatzpunkt, dessen genauere Untersuchung möglicherweise weitere Erklärungen liefern würde.
- Inwiefern wird die DNA-Schadensantwortkaskade, insbesondere die Kinasen ATM, ATR, CHK1 und CHK2 durch die Aktivität von AP-1 und den MAPKs beeinflusst?
- Führt eine Inhibierung der BIM-Aktivität zur Reduktion der Menge an gespaltener Caspase 9?
- Wie hängt die AP-1-Aktivität, bzw. die der MAPKs mit der BIM-Aktivität zusammen?

6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2-1: Genetische Wege der Entstehung eines primären bzw. sekundären Glioblastoms (modifiziert nach (Ohgaki and Kleihues 2007)).	- 4 -
Abb. 2-2: Rolle von AP-1 in der Krebsentstehung. Modifiziert nach (Durchdewald, Angel et al. 2009)	- 7 -
Abb. 2-3: Schematische Darstellung des MAPK-Signalweges. Modifiziert nach (Krishna and Narang 2008)	- 15 -
Abb. 2-4: Struktur von Nimustin (ACNU) (Beko, Urmann et al. 2012)	- 16 -
Abb. 2-5: Struktur von Temozolomid, MTIC und AIC (Andrasi, Bustos et al. 2010)	- 18 -
Abb. 2-6: Vereinfachtes Schema der Zellzykluskontrolle nach DNA-Schaden. Modifiziert nach (Yang, Yu et al. 2003)	- 23 -
Abb. 2-7: Vereinfachte, schematische Darstellung der ICL-Reparatur in Abhängigkeit der Zellzyklusphase.	- 29 -
Abb. 2-8: Vereinfachtes Schema der Apoptose.	- 34 -
Abb. 4-1: Bestimmung der Replikationsdauer von LN-229 in DMEM High Glucose Medium, welches mit 5 % FCS versetzt wurde.	- 61 -
Abb. 4-2: Chemosensitivität von LN-229 gegenüber ACNU (A) und TMZ (B) im Zeitverlauf.	- 62 -
Abb. 4-3: Einfluss der Behandlung mit ACNU auf die Regulation der FRA-1 Expression.	- 63 -
Abb. 4-4: FRA-1 Expression in LN-229 nach Behandlung mit ACNU.	- 64 -
Abb. 4-5: Expression der MAPKs nach ACNU-Behandlung zu frühen Zeitpunkten.	- 65 -
Abb. 4-6: FRA-1 Expression in LN-229 nach Inhibierung der MAPKs.	- 65 -
Abb. 4-7: Einfluss einer transienten Herunterregulation der FRA-1 Expression durch siRNA auf die Sensitivität gegenüber ACNU.	- 67 -
Abb. 4-8: Einfluss einer stabilen Herunterregulation der FRA-1-Expression auf die Sensitivität von LN-229 gegenüber ACNU.	- 68 -
Abb. 4-9: p53 Expression in stabil transfizierten LN-229 nach Behandlung mit ACNU.	- 69 -
Abb. 4-10: Sensitivität von U87 und U138 gegenüber ACNU nach Herunterregulation der FRA-1-Expression.	- 70 -

Abb. 4-11: Einfluss einer Herunterregulation der FRA-1-Expression in LN-229 auf die AP-1 Bildung nach Behandlung mit ACNU.	- 71 -
Abb. 4-12: Einfluss einer Herunterregulation der FRA-1-Expression auf die Zusammensetzung des AP-1-Komplexes.	- 72 -
Abb. 4-13: Regulation von FRA-1 und c-JUN in Abhängigkeit der Zeit nach ACNU-Behandlung.	- 72 -
Abb. 4-14: Einfluss einer Herunterregulation der FRA-1-Expression auf die transkriptionelle Regulation verschiedener Reparaturgene der NER.	- 74 -
Abb. 4-15: Einfluss von FRA-1 auf die Regulation von XPF und ERCC1 nach Behandlung mit ACNU.	- 75 -
Abb. 4-16: Einfluss von FRA-1 auf die Bildung und Reparatur von Einzelstrangbrüchen (A) und ICLs (B) nach ACNU-Behandlung.	- 76 -
Abb. 4-17: Entstehung von γ H2A.X durch Behandlung mit ACNU nach Herunterregulation der FRA-1-Expression.	- 77 -
Abb. 4-18: Einfluss der Herunterregulation von FRA-1 auf die Apoptose nach Behandlung mit ACNU.	- 78 -
Abb. 4-19: Regulation des FASL und FASR nach Behandlung mit ACNU in LN-229-vec und LN-229-FRA-1-shRNA.	- 79 -
Abb. 4-20: Einfluss einer Herunterregulation von FRA-1 auf die transkriptionelle Regulation wichtiger Mitglieder der BCL-2-Familie.	- 81 -
Abb. 4-21: Zellzyklusverteilung in LN-229-vec und LN-229-FRA-1-shRNA nach Behandlung mit ACNU.	- 82 -
Abb. 4-22: : Zellzyklusverteilung in U87 und U138 nach Herunterregulation der FRA-1-Expression und anschließender Behandlung mit ACNU.	- 83 -
Abb. 4-23: Expression von pCHK1 und CHK1 nach Behandlung mit ACNU in Abhängigkeit der FRA-1-Expression.	- 84 -
Abb. 4-24: Expression von pCHK1 und CHK1 nach Behandlung mit ACNU in U87 und U138 in Abhängigkeit der FRA-1-Expression.	- 84 -
Abb. 4-25: Apoptotische Antwort nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ.	- 86 -
Abb. 4-26: Einfluss von p53 auf die DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ.	- 88 -

Abb. 4-27: FASR-Expression in LN-229 nach ACNU- bzw. TMZ-Behandlung.....	- 89 -
Abb. 4-28: Einfluss der Behandlung mit ACNU bzw. TMZ auf die Regulation von DDB2 und XPC.....	- 90 -
Abb. 4-29: Rolle der MAPKs bei der Regulation der DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ in LN-229.....	- 92 -
Abb. 4-30: Einfluss der Inhibierung der MAPK-Aktivität auf die Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ.	- 93 -
Abb. 4-31: AP-1-Bindeaktivität nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ in LN-229.	- 94 -
Abb. 4-32: Expression des FASL nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ in LN-229	- 95 -
Abb. 5-1: Modell zur Rolle von FRA-1- in der DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit ACNU.	- 101 -
Abb. 5-2: Modell zur Regulation der DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit ACNU bzw. TMZ in LN-229	- 107 -
Abb. 10-1: BIM-Expression nach Behandlung mit ACNU und TMZ in LN-229.....	- 147 -
Abb. 10-2: Sensitivität von LN-229 gegenüber ACNU und TMZ nach Herunterregulation der BIM-Expression.	- 148 -

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
μ	mikro
6-4PP	(6-4)Photoprodukt
Abb.	Abbildung
ACNU	N'-[(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl]-N-(2-chloroethyl)-N-nitrosurea (=Nimustin)
AIC	4-amino-5-Imidazol-Carboximid
AP	apurin
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATF	<i>activating transcription factor</i>
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ATM and Rad3 related</i>
ATRIP	<i>ATR interacting protein</i>
BAK	<i>BCL-2 antagonist/killer</i>
BAX	<i>BCL-2 associated X protein</i>
BCNU	N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosurea (=Carmustin)
BER	Basenexsisionsreparatur
BID	<i>BCL-2 homology 3 interacting domain death agonist</i>
bp	Basenpaare
BRCA1	<i>breast cancer type 1 susceptible protein</i>
bZIP	<i>basic leucine-zipper</i>
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid

CARD	<i>Caspase recognition domain</i>
Caspase	<i>Cystein-dependent aspartate-specific acid protease</i>
CCNU	N-(2-chloroethyl)-N'-cyclohexyl-N-nitrosurea (=Lomustin)
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CPD	Cyclobutan Pyrimidin Dimer
CRE	<i>cAMP response element</i>
CS	Cockayne-Syndrom
CuSO₄	Kupfersulfat
dCMP	Deoxycytosinmonophosphat
DcR	<i>Decoy receptor</i>
DDB	<i>DNA binding protein</i>
DED	<i>death effector domain</i>
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
DSB	Doppelstrangbruch/ <i>Double strand break</i>
dsDNA	Dopplesträngige DNA/ <i>double stranded DNA</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemilumineszenz</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz Dihydrat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EMT	epithelial mesenchymal transition
ERK	extrazellulär regulierte Kinase

Abkürzungsverzeichnis

EtOH	Ethanol
FA	Fanconi Anemia
FAAP	Fanconi Anemia assoziiertes Protein
FAN1	<i>Fanconi anemia associated nuclease 1</i>
FANC	Fanconi Protein
FASL	FAS-Ligand
FASR	FAS-Rezeptor
FCS	Fetales Kälberserum/ <i>fetal calf serum</i>
FRA-1	<i>fos related antigen 1</i>
g	Gramm
GBM	<i>glioblastoma multiforme</i>
GGR	<i>Global genome repair</i>
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
h	Stunden
H2A.X	Histon 2A.X
HCl	Salzsäure
HMGN1	<i>high mobility group nucleosome binding domain 1</i>
HR	Homologe Rekombination
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICL	Interstrang <i>Crosslink</i>
IDH1/2	Isocitrat Dehydrogenase
JNK	JUN NH ₂ terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LB	Luria-Broth

LMP	<i>low melting point</i>
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
m	milli
M	molar
m²	Quadratmeter
MAF	<i>musculoarponerotic fibrosarcoma</i>
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MeCCNU	N-(2-chloroethyl)-N'-(trans-4-methylcyclohexyl)-N-nitrosurea (=Semustin)
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA Methyltransferase
Min	Minuten
MMC	Mitomycin C
MMP	Matrixmetalloproteinase
MMR	<i>Mismatch</i> Reparatur
MNNG	N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine
MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
MPG	Methylpuringlykosylase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTIC	5-3-(methyltriazen-1-yl)imidazol-4-carboxamid
N₂	Stickstoff
N3MeA	N3-Methyladenin
N3MeG	N3-Methylguanin
N7MeG	N7-Methylguanin
Na₂CO₃	Natriumcarbonat
Na₃VO₄	Natriumorthovanadat

Abkürzungsverzeichnis

Na₄P₂O₇	Natriumdiphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCCD	<i>Nomenclature Committee on Cell Death</i>
NER	Nukleotidexsisionsreparatur
NHEJ	Nicht-Homologe Endverknüpfung/ <i>Non-homologous endjoining</i>
NTP	Nukleotidtriphosphat
O⁶-BG	O ⁶ -Benzylguanin
O⁶MeG	O ⁶ -Methylguanin
p-	Phospho-
p38K	p38 MAPK
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion/ <i>Polymerase chain reaction</i>
PI	Propidiumiodid
PIKK	<i>Phosphatidylinositol 3 Kinase like Protein Kinase</i>
pmol	pico-Mol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
PUMA	<i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>
RB	<i>retinoblastoma</i>
RCE	<i>retinoblastoma control element</i>
RF	<i>replication factor</i>
RFC	<i>replication factor C</i>

RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RPA	<i>replication protein A</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute/ <i>revolutions per minute</i>
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat/ <i>sodium dodecyl sulfate</i>
Ser	Serin
sh	<i>short hairpin</i>
SMC1	<i>structural maintenance of chromosome 1</i>
SRE	<i>serum response element</i>
SSB	Einzelstrangbruch/ <i>Single strand break</i>
ssDNA	Einzelsträngige DNA/ <i>single stranded DNA</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TC	<i>transcription coupled</i>
TCF	<i>t-cell transcription factor</i>
TCR	Transkriptionsgekoppelte Reparatur
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFIIH/S	Transkriptionsfaktor II H/S
Thr	Threonin
TLS	Transläsionssynthese
TMZ	Temozolomid
TNF	Tumornekrosefaktor
TRE	<i>TPA response element</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolett
WHO	<i>World Health Organization</i>
XP	Xeroderma pigmentosum
z.B.	zum Beispiel

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2-1: Gene die einer direkten Regulation durch FRA-1 unterliegen- 10 -

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbott, D. W. and J. T. Holt (1999). "Mitogen-activated protein kinase kinase 2 activation is essential for progression through the G2/M checkpoint arrest in cells exposed to ionizing radiation." J Biol Chem **274**(5): 2732-2742.
- Adiseshaiah, P., S. R. Papaiahgari, et al. (2003). "Multiple cis-elements mediate the transcriptional activation of human fra-1 by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in bronchial epithelial cells." J Biol Chem **278**(48): 47423-47433.
- Adiseshaiah, P., S. Peddakama, et al. (2005). "Mitogen regulated induction of FRA-1 proto-oncogene is controlled by the transcription factors binding to both serum and TPA response elements." Oncogene **24**(26): 4193-4205.
- Ahn, J. Y., J. K. Schwarz, et al. (2000). "Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation." Cancer Res **60**(21): 5934-5936.
- Akiyama, T., C. R. Dass, et al. (2009). "Bim-targeted cancer therapy: a link between drug action and underlying molecular changes." Mol Cancer Ther **8**(12): 3173-3180.
- Akkari, Y. M., R. L. Bateman, et al. (2000). "DNA replication is required To elicit cellular responses to psoralen-induced DNA interstrand cross-links." Mol Cell Biol **20**(21): 8283-8289.
- Alarcon-Vargas, D. and Z. Ronai (2004). "c-Jun-NH2 kinase (JNK) contributes to the regulation of c-Myc protein stability." J Biol Chem **279**(6): 5008-5016.
- Ali, A. M., A. Pradhan, et al. (2012). "FAAP20: a novel ubiquitin-binding FA nuclear core-complex protein required for functional integrity of the FA-BRCA DNA repair pathway." Blood **119**(14): 3285-3294.
- Allan, J. M., B. P. Engelward, et al. (1998). "Mammalian 3-methyladenine DNA glycosylase protects against the toxicity and clastogenicity of certain chemotherapeutic DNA cross-linking agents." Cancer Res **58**(17): 3965-3973.
- Ameyar-Zazoua, M., M. B. Wisniewska, et al. (2005). "AP-1 dimers regulate transcription of the p14/p19ARF tumor suppressor gene." Oncogene **24**(14): 2298-2306.
- Andrasi, M., R. Bustos, et al. (2010). "Analysis and stability study of temozolomide using capillary electrophoresis." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **878**(21): 1801-1808.
- Andreassen, P. R., A. D. D'Andrea, et al. (2004). "ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response." Genes Dev **18**(16): 1958-1963.

- Angel, P., K. Hattori, et al. (1988). "The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1." Cell **55**(5): 875-885.
- Araki, M., C. Masutani, et al. (2001). "Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair." J Biol Chem **276**(22): 18665-18672.
- Ashwell, S., J. W. Janetka, et al. (2008). "Keeping checkpoint kinases in line: new selective inhibitors in clinical trials." Expert Opin Investig Drugs **17**(9): 1331-1340.
- Bachelor, M. A. and G. T. Bowden (2004). "Ultraviolet A-induced modulation of Bcl-XL by p38 MAPK in human keratinocytes: post-transcriptional regulation through the 3'-untranslated region." J Biol Chem **279**(41): 42658-42668.
- Bachelor, M. A., A. L. Silvers, et al. (2002). "The role of p38 in UVA-induced cyclooxygenase-2 expression in the human keratinocyte cell line, HaCaT." Oncogene **21**(46): 7092-7099.
- Bakiri, L., D. Lallemand, et al. (2000). "Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression." EMBO J **19**(9): 2056-2068.
- Bakkenist, C. J. and M. B. Kastan (2003). "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation." Nature **421**(6922): 499-506.
- Ball, H. L. and D. Cortez (2005). "ATRIP oligomerization is required for ATR-dependent checkpoint signaling." J Biol Chem **280**(36): 31390-31396.
- Barazzuol, L., R. Jena, et al. (2013). "Evaluation of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor ABT-888 combined with radiotherapy and temozolomide in glioblastoma." Radiat Oncol **8**: 65.
- Barckhausen, C., W. P. Roos, et al. (2013). "Malignant melanoma cells acquire resistance to DNA interstrand cross-linking chemotherapeutics by p53-triggered upregulation of DDB2/XPC-mediated DNA repair." Oncogene.
- Basbous, J., D. Chalbos, et al. (2007). "Ubiquitin-independent proteasomal degradation of Fra-1 is antagonized by Erk1/2 pathway-mediated phosphorylation of a unique C-terminal destabilizer." Mol Cell Biol **27**(11): 3936-3950.
- Bastin-Shanower, S. A., W. M. Fricke, et al. (2003). "The mechanism of Mus81-Mms4 cleavage site selection distinguishes it from the homologous endonuclease Rad1-Rad10." Mol Cell Biol **23**(10): 3487-3496.
- Batista, L. F., W. P. Roos, et al. (2007). "Differential sensitivity of malignant glioma cells to methylating and chloroethylating anticancer drugs: p53 determines the switch by regulating xpc, ddb2, and DNA double-strand breaks." Cancer Res **67**(24): 11886-11895.

- Baumann, P., F. E. Benson, et al. (1996). "Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro." Cell **87**(4): 757-766.
- Beko, S. L., D. Urmann, et al. (2012). "Nimustine hydrochloride: the first crystal structure determination of a 2-chloroethyl-N-nitrosourea hydrochloride derivative by X-ray powder diffraction and solid-state NMR." Acta Crystallogr C **68**(Pt 3): o144-148.
- Belguise, K., N. Kersual, et al. (2005). "FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells." Oncogene **24**(8): 1434-1444.
- Ben-Levy, R., S. Hooper, et al. (1998). "Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2." Curr Biol **8**(19): 1049-1057.
- Bennetts, L. E., G. N. De Iuliis, et al. (2008). "Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa: evidence for cross-linking and redox cycling activities." Mutat Res **641**(1-2): 1-11.
- Beranek, D. T. (1990). "Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents." Mutat Res **231**(1): 11-30.
- Bergers, G., P. Graninger, et al. (1995). "Transcriptional activation of the fra-1 gene by AP-1 is mediated by regulatory sequences in the first intron." Mol Cell Biol **15**(7): 3748-3758.
- Bergink, S., W. Toussaint, et al. (2012). "Recognition of DNA damage by XPC coincides with disruption of the XPC-RAD23 complex." J Cell Biol **196**(6): 681-688.
- Binetruy, B., T. Smeal, et al. (1991). "Ha-Ras augments c-Jun activity and stimulates phosphorylation of its activation domain." Nature **351**(6322): 122-127.
- Bodell, W. J. (2003). "Repair of DNA alkylation products formed in 9L cell lines treated with 1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea." Mutat Res **522**(1-2): 85-92.
- Bodero, A. J., R. Ye, et al. (2003). "UV-light induces p38 MAPK-dependent phosphorylation of Bcl10." Biochem Biophys Res Commun **301**(4): 923-926.
- Bohmann, D., T. J. Bos, et al. (1987). "Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1." Science **238**(4832): 1386-1392.
- Bohr, V. A., C. A. Smith, et al. (1985). "DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall." Cell **40**(2): 359-369.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

- Brenner, D. A., M. O'Hara, et al. (1989). "Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha." Nature **337**(6208): 661-663.
- Brent, T. P., S. O. Lestrud, et al. (1987). "Formation of DNA interstrand cross-links by the novel chloroethylating agent 2-chloroethyl(methylsulfonyl)methanesulfonate: suppression by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase purified from human leukemic lymphoblasts." Cancer Res **47**(13): 3384-3387.
- Briegert, M. and B. Kaina (2007). "Human monocytes, but not dendritic cells derived from them, are defective in base excision repair and hypersensitive to methylating agents." Cancer Res **67**(1): 26-31.
- Brooks, P. J. and J. A. Theruvathu (2005). "DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis." Alcohol **35**(3): 187-193.
- Brown, J. R., E. Nigh, et al. (1998). "Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1." Mol Cell Biol **18**(9): 5609-5619.
- Brown, L. and S. Benchimol (2006). "The involvement of MAPK signaling pathways in determining the cellular response to p53 activation: cell cycle arrest or apoptosis." J Biol Chem **281**(7): 3832-3840.
- Brundrett, R. B. (1980). "Chemistry of nitrosoureas. Intermediacy of 4,5-dihydro-1,2,3-oxadiazole in 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea decomposition." J Med Chem **23**(11): 1245-1247.
- Bulavin, D. V., Y. Higashimoto, et al. (2001). "Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase." Nature **411**(6833): 102-107.
- Bull, V. L. and M. J. Tisdale (1987). "Antitumour imidazotetrazines--XVI. Macromolecular alkylation by 3-substituted imidazotetrazinones." Biochem Pharmacol **36**(19): 3215-3220.
- Bunch, R. T. and A. Eastman (1996). "Enhancement of cisplatin-induced cytotoxicity by 7-hydroxystaurosporine (UCN-01), a new G2-checkpoint inhibitor." Clin Cancer Res **2**(5): 791-797.
- Burch, P. M., Z. Yuan, et al. (2004). "An extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-dependent program of chromatin trafficking of c-Fos and Fra-1 is required for cyclin D1 expression during cell cycle reentry." Mol Cell Biol **24**(11): 4696-4709.
- Buschmann, T., O. Potapova, et al. (2001). "Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress." Mol Cell Biol **21**(8): 2743-2754.
- Byun, T. S., M. Pacek, et al. (2005). "Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint." Genes Dev **19**(9): 1040-1052.

- Cagnol, S., E. Van Obberghen-Schilling, et al. (2006). "Prolonged activation of ERK1,2 induces FADD-independent caspase 8 activation and cell death." Apoptosis **11**(3): 337-346.
- Canman, C. E., D. S. Lim, et al. (1998). "Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53." Science **281**(5383): 1677-1679.
- Casalino, L., L. Bakiri, et al. (2007). "Fra-1 promotes growth and survival in RAS-transformed thyroid cells by controlling cyclin A transcription." EMBO J **26**(7): 1878-1890.
- Casalino, L., D. De Cesare, et al. (2003). "Accumulation of Fra-1 in ras-transformed cells depends on both transcriptional autoregulation and MEK-dependent posttranslational stabilization." Mol Cell Biol **23**(12): 4401-4415.
- Cavigelli, M., F. Dolfi, et al. (1995). "Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation." EMBO J **14**(23): 5957-5964.
- Chaturvedi, P., W. K. Eng, et al. (1999). "Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway." Oncogene **18**(28): 4047-4054.
- Chehab, N. H., A. Malikzay, et al. (2000). "Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53." Genes Dev **14**(3): 278-288.
- Chen, D. W., V. Saha, et al. (2013). "Erg and AP-1 as determinants of glucocorticoid response in acute lymphoblastic leukemia." Oncogene **32**(25): 3039-3048.
- Chen, R. H., C. Sarnecki, et al. (1992). "Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases." Mol Cell Biol **12**(3): 915-927.
- Chen, W., Q. Tang, et al. (2001). "Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes." Oncogene **20**(29): 3921-3926.
- Chen, X., L. J. Ko, et al. (1996). "p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells." Genes Dev **10**(19): 2438-2451.
- Chen, Z., X. S. Xu, et al. (2003). "Defining the function of XPC protein in psoralen and cisplatin-mediated DNA repair and mutagenesis." Carcinogenesis **24**(6): 1111-1121.
- Cheng, C. J., S. Fujimura, et al. (1972). "Interaction of 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (NSC 79037) with nucleic acids and proteins in vivo and in vitro." Cancer Res **32**(1): 22-27.
- Chiappetta, G., G. Tallini, et al. (2000). "FRA-1 expression in hyperplastic and neoplastic thyroid diseases." Clin Cancer Res **6**(11): 4300-4306.

- Chicheportiche, Y., P. R. Bourdon, et al. (1997). "TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis." J Biol Chem **272**(51): 32401-32410.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, et al. (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." Cell **81**(4): 505-512.
- Chouinard, N., K. Valerie, et al. (2002). "UVB-mediated activation of p38 mitogen-activated protein kinase enhances resistance of normal human keratinocytes to apoptosis by stabilizing cytoplasmic p53." Biochem J **365**(Pt 1): 133-145.
- Chow, C. W., C. Dong, et al. (2000). "c-Jun NH(2)-terminal kinase inhibits targeting of the protein phosphatase calcineurin to NFATc1." Mol Cell Biol **20**(14): 5227-5234.
- Christmann, M. and B. Kaina (2011). "O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT): impact on cancer risk in response to tobacco smoke." Mutat Res.
- Christmann, M., M. T. Tomicic, et al. (2007). "A role for UV-light-induced c-Fos: Stimulation of nucleotide excision repair and protection against sustained JNK activation and apoptosis." Carcinogenesis **28**(1): 183-190.
- Christmann, M., M. T. Tomicic, et al. (2006). "c-Fos is required for excision repair of UV-light induced DNA lesions by triggering the re-synthesis of XPF." Nucleic Acids Res **34**(22): 6530-6539.
- Christmann, M., M. T. Tomicic, et al. (2003). "Mechanisms of human DNA repair: an update." Toxicology **193**(1-2): 3-34.
- Ciccia, A., C. Ling, et al. (2007). "Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM." Mol Cell **25**(3): 331-343.
- Cohen, D. R. and T. Curran (1988). "fra-1: a serum-inducible, cellular immediate-early gene that encodes a fos-related antigen." Mol Cell Biol **8**(5): 2063-2069.
- Cohn, M. A., P. Kowal, et al. (2007). "A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway." Mol Cell **28**(5): 786-797.
- Coin, F., L. Proietti De Santis, et al. (2006). "p8/TTD-A as a repair-specific TFIIH subunit." Mol Cell **21**(2): 215-226.
- Coquerelle, T., J. Dosch, et al. (1995). "Overexpression of N-methylpurine-DNA glycosylase in Chinese hamster ovary cells renders them more sensitive to the production of chromosomal aberrations by methylating agents--a case of imbalanced DNA repair." Mutat Res **336**(1): 9-17.
- Cortez, D., S. Guntuku, et al. (2001). "ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling." Science **294**(5547): 1713-1716.

- Cosulich, S. C., V. Worrall, et al. (1997). "Regulation of apoptosis by BH3 domains in a cell-free system." Curr Biol **7**(12): 913-920.
- Couve-Privat, S., G. Mace, et al. (2007). "Psoralen-induced DNA adducts are substrates for the base excision repair pathway in human cells." Nucleic Acids Res **35**(17): 5672-5682.
- Cuenda, A. and S. Rousseau (2007). "p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases." Biochim Biophys Acta **1773**(8): 1358-1375.
- de Laat, W. L., E. Appeldoorn, et al. (1998). "DNA structural elements required for ERCC1-XPF endonuclease activity." J Biol Chem **273**(14): 7835-7842.
- De Silva, I. U., P. J. McHugh, et al. (2000). "Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells." Mol Cell Biol **20**(21): 7980-7990.
- De Silva, I. U., P. J. McHugh, et al. (2002). "Defects in interstrand cross-link uncoupling do not account for the extreme sensitivity of ERCC1 and XPF cells to cisplatin." Nucleic Acids Res **30**(17): 3848-3856.
- Debinski, W. and D. M. Gibo (2005). "Fos-related antigen 1 modulates malignant features of glioma cells." Mol Cancer Res **3**(4): 237-249.
- Debinski, W. and D. M. Gibo (2011). "Fos-related antigen 1 (Fra-1) pairing with and transactivation of JunB in GBM cells." Cancer Biol Ther **11**(2): 254-262.
- Debinski, W., B. Slagle-Webb, et al. (2001). "VEGF-D is an X-linked/AP-1 regulated putative onco-angiogen in human glioblastoma multiforme." Mol Med **7**(9): 598-608.
- Degli-Esposti, M. A., P. J. Smolak, et al. (1997). "Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family." J Exp Med **186**(7): 1165-1170.
- Delacroix, S., J. M. Wagner, et al. (2007). "The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1." Genes Dev **21**(12): 1472-1477.
- Deng, X., L. Xiao, et al. (2001). "Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase." J Biol Chem **276**(26): 23681-23688.
- Denny, B. J., R. T. Wheelhouse, et al. (1994). "NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA." Biochemistry **33**(31): 9045-9051.
- Derijard, B., M. Hibi, et al. (1994). "JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain." Cell **76**(6): 1025-1037.
- Dolan, M. E., R. C. Moschel, et al. (1990). "Depletion of mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity by O6-benzylguanine provides a means to evaluate the role

of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(14): 5368-5372.

Dolecek, T. A., J. M. Propp, et al. (2012). "CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009." Neuro Oncol **14 Suppl 5**: v1-49.

Donson, A. M., S. O. Addo-Yobo, et al. (2007). "MGMT promoter methylation correlates with survival benefit and sensitivity to temozolomide in pediatric glioblastoma." Pediatr Blood Cancer **48**(4): 403-407.

Dosch, J. and B. Kaina (1996). "Induction of c-fos, c-jun, junB and junD mRNA and AP-1 by alkylating mutagens in cells deficient and proficient for the DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and its relationship to cell death, mutation induction and chromosomal instability." Oncogene **13**(9): 1927-1935.

Dronkert, M. L. and R. Kanaar (2001). "Repair of DNA interstrand cross-links." Mutat Res **486**(4): 217-247.

Dungey, F. A., K. W. Caldecott, et al. (2009). "Enhanced radiosensitization of human glioma cells by combining inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase with inhibition of heat shock protein 90." Mol Cancer Ther **8**(8): 2243-2254.

Durchdewald, M., P. Angel, et al. (2009). "The transcription factor Fos: a Janus-type regulator in health and disease." Histol Histopathol **24**(11): 1451-1461.

Dutta, S., G. Chowdhury, et al. (2007). "Interstrand cross-links generated by abasic sites in duplex DNA." J Am Chem Soc **129**(7): 1852-1853.

Eferl, R., A. Hoebertz, et al. (2004). "The Fos-related antigen Fra-1 is an activator of bone matrix formation." EMBO J **23**(14): 2789-2799.

Eferl, R. and E. F. Wagner (2003). "AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis." Nat Rev Cancer **3**(11): 859-868.

Ehret, A., M. Li-Weber, et al. (2001). "The effect of HIV-1 regulatory proteins on cellular genes: derepression of the IL-2 promoter by Tat." Eur J Immunol **31**(6): 1790-1799.

Eich, M., W. P. Roos, et al. (2013). "Contribution of ATM and ATR to the resistance of glioblastoma and malignant melanoma cells to the methylating anticancer drug temozolomide." Mol Cancer Ther.

Esteller, M., J. Garcia-Foncillas, et al. (2000). "Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents." N Engl J Med **343**(19): 1350-1354.

Falck, J., N. Mailand, et al. (2001). "The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis." Nature **410**(6830): 842-847.

- Fan, M. and T. C. Chambers (2001). "Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy." Drug Resist Updat **4**(4): 253-267.
- Fanning, E., V. Klimovich, et al. (2006). "A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways." Nucleic Acids Res **34**(15): 4126-4137.
- Fekairi, S., S. Scaglione, et al. (2009). "Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases." Cell **138**(1): 78-89.
- Ferlay, J., E. Steliarova-Foucher, et al. (2013). "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012." Eur J Cancer **49**(6): 1374-1403.
- Fiddler (1975). "The occurrence and determination of N-nitroso compounds." Toxicol Appl Pharmacol **31**(3): 352-360.
- Filomeni, G., S. Piccirillo, et al. (2012). "p38(MAPK) and ERK1/2 dictate cell death/survival response to different pro-oxidant stimuli via p53 and Nrf2 in neuroblastoma cells SH-SY5Y." Biochem Pharmacol **83**(10): 1349-1357.
- Folmer, V., J. C. Soares, et al. (2003). "A high fat diet inhibits delta-aminolevulinate dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*)." J Nutr **133**(7): 2165-2170.
- Fousteri, M., W. Vermeulen, et al. (2006). "Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo." Mol Cell **23**(4): 471-482.
- Fraker, P. J., L. E. King, et al. (1995). "Quantification of apoptotic events in pure and heterogeneous populations of cells using the flow cytometer." Methods Cell Biol **46**: 57-76.
- Fricke, W. M. and S. J. Brill (2003). "Slx1-Slx4 is a second structure-specific endonuclease functionally redundant with Sgs1-Top3." Genes Dev **17**(14): 1768-1778.
- Fuchs, S. Y., V. Adler, et al. (1998). "MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(18): 10541-10546.
- Furnari, F. B., T. Fenton, et al. (2007). "Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment." Genes Dev **21**(21): 2683-2710.
- Furuta, T., T. Ueda, et al. (2002). "Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells." Cancer Res **62**(17): 4899-4902.
- Garcia-Higuera, I., T. Taniguchi, et al. (2001). "Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway." Mol Cell **7**(2): 249-262.
- Gell, D. and S. P. Jackson (1999). "Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex." Nucleic Acids Res **27**(17): 3494-3502.

- Gius, D., X. M. Cao, et al. (1990). "Transcriptional activation and repression by Fos are independent functions: the C terminus represses immediate-early gene expression via CArG elements." Mol Cell Biol **10**(8): 4243-4255.
- Goldgaber, D., H. W. Harris, et al. (1989). "Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(19): 7606-7610.
- Gonzaga, P. E. and T. P. Brent (1989). "Affinity purification and characterization of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase complexed with BCNU-treated, synthetic oligonucleotide." Nucleic Acids Res **17**(16): 6581-6590.
- Granet, C., A. G. Vico, et al. (2002). "MAP and src kinases control the induction of AP-1 members in response to changes in mechanical environment in osteoblastic cells." Cell Signal **14**(8): 679-688.
- Greene, M. O. and J. Greenberg (1960). "The activity of nitrosoguanidines against ascites tumors in mice." Cancer Res **20**: 1166-1171.
- Griffith, T. S., W. A. Chin, et al. (1998). "Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells." J Immunol **161**(6): 2833-2840.
- Guo, Z., R. Deshpande, et al. (2010). "ATM activation in the presence of oxidative stress." Cell Cycle **9**(24): 4805-4811.
- Guo, Z., S. Kozlov, et al. (2010). "ATM activation by oxidative stress." Science **330**(6003): 517-521.
- Gupta, S., T. Barrett, et al. (1996). "Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors." EMBO J **15**(11): 2760-2770.
- Gupta, S., D. Campbell, et al. (1995). "Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway." Science **267**(5196): 389-393.
- Haince, J. F., S. Kozlov, et al. (2007). "Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents." J Biol Chem **282**(22): 16441-16453.
- Haince, J. F., D. McDonald, et al. (2008). "PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites." J Biol Chem **283**(2): 1197-1208.
- Hamdi, M., H. E. Popeijus, et al. (2008). "ATF3 and Fra1 have opposite functions in JNK- and ERK-dependent DNA damage responses." DNA Repair (Amst) **7**(3): 487-496.
- Hampson, R., O. Humbert, et al. (1997). "Mismatch repair defects and O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression in acquired resistance to methylating agents in human cells." J Biol Chem **272**(45): 28596-28606.

- Han, J., C. Flemington, et al. (2001). "Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11318-11323.
- Hanada, K., M. Budzowska, et al. (2006). "The structure-specific endonuclease Mus81-Eme1 promotes conversion of interstrand DNA crosslinks into double-strands breaks." EMBO J **25**(20): 4921-4932.
- Hawkes, W. C. and Z. Alkan (2012). "Delayed Cell Cycle Progression in Selenoprotein W Depleted Cells Is Regulated By a Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 4 (MKK4)-p38/c-Jun NH2-Terminal Kinase (JNK)-p53 Pathway." J Biol Chem.
- Hegi, M. E., A. C. Diserens, et al. (2004). "Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide." Clin Cancer Res **10**(6): 1871-1874.
- Hegi, M. E., A. C. Diserens, et al. (2005). "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 997-1003.
- Hejna, J., M. Holtorf, et al. (2008). "Tip60 is required for DNA interstrand cross-link repair in the Fanconi anemia pathway." J Biol Chem **283**(15): 9844-9851.
- Hermeking, H., C. Lengauer, et al. (1997). "14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression." Mol Cell **1**(1): 3-11.
- Hibi, M., A. Lin, et al. (1993). "Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain." Genes Dev **7**(11): 2135-2148.
- Hill, R., A. M. Leidal, et al. (2008). "Chromium-mediated apoptosis: involvement of DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) and differential induction of p53 target genes." DNA Repair (Amst) **7**(9): 1484-1499.
- Hirao, A., Y. Y. Kong, et al. (2000). "DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2." Science **287**(5459): 1824-1827.
- Hirose, Y., M. S. Berger, et al. (2001). "Abrogation of the Chk1-mediated G(2) checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells." Cancer Res **61**(15): 5843-5849.
- Hisazumi, H., K. Nakajima, et al. (1983). "Chemosensitivity of established human bladder carcinoma cell lines in vitro." Gann **74**(1): 176-182.
- Hofr, C. and V. Brabec (2001). "Thermal and thermodynamic properties of duplex DNA containing site-specific interstrand cross-link of antitumor cisplatin or its clinically ineffective trans isomer." J Biol Chem **276**(13): 9655-9661.
- Hotchkiss, R. S., A. Strasser, et al. (2009). "Cell death." N Engl J Med **361**(16): 1570-1583.

- Huang, H., L. Zhu, et al. (1995). "Solution structure of a cisplatin-induced DNA interstrand cross-link." Science **270**(5243): 1842-1845.
- Huang, M., J. M. Kim, et al. (2010). "The FANCM/FAAP24 complex is required for the DNA interstrand crosslink-induced checkpoint response." Mol Cell **39**(2): 259-268.
- Hubner, A., T. Barrett, et al. (2008). "Multisite phosphorylation regulates Bim stability and apoptotic activity." Mol Cell **30**(4): 415-425.
- Inga, A., F. X. Chen, et al. (1999). "N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea tethered to lexitropsin induces minor groove lesions at the p53 cDNA that are more cytotoxic than mutagenic." Cancer Res **59**(3): 689-695.
- Ishii, N., D. Maier, et al. (1999). "Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines." Brain Pathol **9**(3): 469-479.
- Ivanov, V. N. and Z. Ronai (2000). "p38 protects human melanoma cells from UV-induced apoptosis through down-regulation of NF-kappaB activity and Fas expression." Oncogene **19**(26): 3003-3012.
- Jagerstad, M. and K. Skog (2005). "Genotoxicity of heat-processed foods." Mutat Res **574**(1-2): 156-172.
- Jazayeri, A., J. Falck, et al. (2006). "ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks." Nat Cell Biol **8**(1): 37-45.
- Jennewein, C., S. Karl, et al. (2012). "Identification of a novel pro-apoptotic role of NF-kappaB in the regulation of TRAIL- and CD95-mediated apoptosis of glioblastoma cells." Oncogene **31**(11): 1468-1474.
- Jensen, R. B., A. Carreira, et al. (2010). "Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination." Nature **467**(7316): 678-683.
- Jiang, D. J., S. J. Jia, et al. (2006). "Asymmetric dimethylarginine induces apoptosis via p38 MAPK/caspase-3-dependent signaling pathway in endothelial cells." J Mol Cell Cardiol **40**(4): 529-539.
- Jin, J., X. L. Ang, et al. (2008). "Differential roles for checkpoint kinases in DNA damage-dependent degradation of the Cdc25A protein phosphatase." J Biol Chem **283**(28): 19322-19328.
- Jochum, W., J. P. David, et al. (2000). "Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1." Nat Med **6**(9): 980-984.
- Kaina, B., G. Fritz, et al. (1991). "Transfection and expression of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents." Carcinogenesis **12**(10): 1857-1867.

- Kaina, B., S. Haas, et al. (1997). "A general role for c-Fos in cellular protection against DNA-damaging carcinogens and cytostatic drugs." Cancer Res **57**(13): 2721-2731.
- Kallunki, T., B. Su, et al. (1994). "JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation." Genes Dev **8**(24): 2996-3007.
- Kalman, B., E. Szep, et al. (2013). "Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in glioblastoma." Neuromolecular Med **15**(2): 420-434.
- Kanamaru, R., M. Asamura, et al. (1980). "Studies on the mechanism of action of ACNU, 1-(4-amino-2-methylpyrimidine-5-yl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride: effects on cultured HeLa S3 cells." Tohoku J Exp Med **132**(4): 431-441.
- Karl, S., Y. Pritschow, et al. (2009). "Identification of a novel pro-apoptotic function of NF-kappaB in the DNA damage response." J Cell Mol Med **13**(10): 4239-4256.
- Karp, J. E., B. M. Thomas, et al. (2012). "Phase I and pharmacologic trial of cytosine arabinoside with the selective checkpoint 1 inhibitor Sch 900776 in refractory acute leukemias." Clin Cancer Res **18**(24): 6723-6731.
- Kasibhatla, S., T. Brunner, et al. (1998). "DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1." Mol Cell **1**(4): 543-551.
- Kayagaki, N., A. Kawasaki, et al. (1995). "Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand." J Exp Med **182**(6): 1777-1783.
- Kharbanda, S., S. Saxena, et al. (2000). "Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage." J Biol Chem **275**(1): 322-327.
- Kim, B. J., S. W. Ryu, et al. (2006). "JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells." J Biol Chem **281**(30): 21256-21265.
- Kim, E. K. and E. J. Choi (2010). "Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases." Biochim Biophys Acta **1802**(4): 396-405.
- Kim, G. Y., S. E. Mercer, et al. (2002). "The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21(Cip1) by phosphorylation." J Biol Chem **277**(33): 29792-29802.
- Kim, J. M., Y. Kee, et al. (2008). "Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24." Blood **111**(10): 5215-5222.
- Kim, Y. H., J. H. Oh, et al. (2001). "Fra-1 expression in malignant and benign thyroid tumor." Korean J Intern Med **16**(2): 93-97.
- King, C., H. Diaz, et al. (2013). "Characterization and preclinical development of LY2603618: a selective and potent Chk1 inhibitor." Invest New Drugs.

- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, et al. (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." EMBO J **14**(22): 5579-5588.
- Kitagawa, R., C. J. Bakkenist, et al. (2004). "Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway." Genes Dev **18**(12): 1423-1438.
- Kohn, K. W. (1977). "Interstrand cross-linking of DNA by 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and other 1-(2-haloethyl)-1-nitrosoureas." Cancer Res **37**(5): 1450-1454.
- Kondo, N., A. Takahashi, et al. (2011). "FANCD1/BRCA2 plays predominant role in the repair of DNA damage induced by ACNU or TMZ." PLoS One **6**(5): e19659.
- Kortmansky, J., M. A. Shah, et al. (2005). "Phase I trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor and protein kinase C inhibitor 7-hydroxystaurosporine in combination with Fluorouracil in patients with advanced solid tumors." J Clin Oncol **23**(9): 1875-1884.
- Kozekov, I. D., L. V. Nechev, et al. (2003). "DNA interchain cross-links formed by acrolein and crotonaldehyde." J Am Chem Soc **125**(1): 50-61.
- Krishna, M. and H. Narang (2008). "The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple." Cell Mol Life Sci **65**(22): 3525-3544.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." Cell Death Differ **16**(1): 3-11.
- Kruijer, W., J. A. Cooper, et al. (1984). "Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein." Nature **312**(5996): 711-716.
- Kumagai, A., J. Lee, et al. (2006). "TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex." Cell **124**(5): 943-955.
- Kumaraswamy, E. and R. Shiekhattar (2007). "Activation of BRCA1/BRCA2-associated helicase BACH1 is required for timely progression through S phase." Mol Cell Biol **27**(19): 6733-6741.
- Kuwana, T., M. R. Mackey, et al. (2002). "Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane." Cell **111**(3): 331-342.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lamb, R. F., R. F. Hennigan, et al. (1997). "AP-1-mediated invasion requires increased expression of the hyaluronan receptor CD44." Mol Cell Biol **17**(2): 963-976.
- Lasham, A., E. Lindridge, et al. (2000). "Regulation of the human fas promoter by YB-1, Puralpha and AP-1 transcription factors." Gene **252**(1-2): 1-13.

- Lavoie, J. N., G. L'Allemain, et al. (1996). "Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway." J Biol Chem **271**(34): 20608-20616.
- Lawley, P. D. and D. H. Phillips (1996). "DNA adducts from chemotherapeutic agents." Mutat Res **355**(1-2): 13-40.
- Lee, H. S., S. H. Kwon, et al. (2012). "Zaprinast activates MAPKs, NFkappaB, and Akt and induces the expressions of inflammatory genes in microglia." Int Immunopharmacol **13**(3): 232-241.
- Lee, J. H. and T. T. Paull (2005). "ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex." Science **308**(5721): 551-554.
- Lehmann, A. R., A. Niimi, et al. (2007). "Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch." DNA Repair (Amst) **6**(7): 891-899.
- Lei, K. and R. J. Davis (2003). "JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2432-2437.
- Leonetti, C., A. Biroccio, et al. (2012). "Targeted therapy for brain tumours: role of PARP inhibitors." Curr Cancer Drug Targets **12**(3): 218-236.
- Leppa, S. and D. Bohmann (1999). "Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis." Oncogene **18**(45): 6158-6162.
- Leupold, J. H., I. Asangani, et al. (2007). "Src induces urokinase receptor gene expression and invasion/intravasation via activator protein-1/p-c-Jun in colorectal cancer." Mol Cancer Res **5**(5): 485-496.
- Lewis, T. S., P. S. Shapiro, et al. (1998). "Signal transduction through MAP kinase cascades." Adv Cancer Res **74**: 49-139.
- Li, B., C. Tournier, et al. (1999). "Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation." EMBO J **18**(2): 420-432.
- Li, H., H. Zhu, et al. (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." Cell **94**(4): 491-501.
- Li, J. and D. F. Stern (2005). "Regulation of CHK2 by DNA-dependent protein kinase." J Biol Chem **280**(12): 12041-12050.
- Li, P., D. Nijhawan, et al. (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**(4): 479-489.
- Li, Q., L. Zhang, et al. (1999). "Phorbol ester exposure activates an AP-1-mediated increase in ERCC-1 messenger RNA expression in human ovarian tumor cells." Cell Mol Life Sci **55**(3): 456-466.

- Li, X. R., A. S. Chong, et al. (1999). "Transcriptional regulation of Fas gene expression by GA-binding protein and AP-1 in T cell antigen receptor.CD3 complex-stimulated T cells." J Biol Chem **274**(49): 35203-35210.
- Ling, C., M. Ishiai, et al. (2007). "FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway." EMBO J **26**(8): 2104-2114.
- Liu, Q., T. Chen, et al. (2004). "Triptolide (PG-490) induces apoptosis of dendritic cells through sequential p38 MAP kinase phosphorylation and caspase 3 activation." Biochem Biophys Res Commun **319**(3): 980-986.
- Liu, Q., S. Guntuku, et al. (2000). "Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint." Genes Dev **14**(12): 1448-1459.
- Liu, S. I., C. C. Huang, et al. (2007). "Thimerosal-induced apoptosis in human SCM1 gastric cancer cells: activation of p38 MAP kinase and caspase-3 pathways without involvement of [Ca²⁺]_i elevation." Toxicol Sci **100**(1): 109-117.
- Ljunggren, B. (1990). "Severe phototoxic burn following celery ingestion." Arch Dermatol **126**(10): 1334-1336.
- Looby, E., M. M. Abdel-Latif, et al. (2009). "Deoxycholate induces COX-2 expression via Erk1/2-, p38-MAPK and AP-1-dependent mechanisms in esophageal cancer cells." BMC Cancer **9**: 190.
- Louis, D. N., H. Ohgaki, et al. (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol **114**(2): 97-109.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
- Ludlum, D. B. (1997). "The chloroethylnitrosoureas: sensitivity and resistance to cancer chemotherapy at the molecular level." Cancer Invest **15**(6): 588-598.
- Luo, X., I. Budihardjo, et al. (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." Cell **94**(4): 481-490.
- MacKay, C., A. C. Declais, et al. (2010). "Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2." Cell **142**(1): 65-76.
- Macleod, K., P. Mullen, et al. (2005). "Altered ErbB receptor signaling and gene expression in cisplatin-resistant ovarian cancer." Cancer Res **65**(15): 6789-6800.
- Malnou, C. E., F. Brockly, et al. (2010). "Heterodimerization with different Jun proteins controls c-Fos intranuclear dynamics and distribution." J Biol Chem **285**(9): 6552-6562.

- Manderfeld, M. M., H. W. Schafer, et al. (1997). "Isolation and identification of antimicrobial furocoumarins from parsley." J Food Prot **60**(1): 72-77.
- Mann, B., M. Gelos, et al. (1999). "Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1603-1608.
- Mariani, S. M. and P. H. Krammer (1998). "Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage." Eur J Immunol **28**(3): 973-982.
- Marsters, S. A., J. P. Sheridan, et al. (1997). "A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain." Curr Biol **7**(12): 1003-1006.
- Martin, J. H., A. A. Mohit, et al. (1996). "Developmental expression in the mouse nervous system of the p493F12 SAP kinase." Brain Res Mol Brain Res **35**(1-2): 47-57.
- Martin, S. J., C. P. Reutelingsperger, et al. (1995). "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl." J Exp Med **182**(5): 1545-1556.
- Matsuo, K., J. M. Owens, et al. (2000). "Fosl1 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation." Nat Genet **24**(2): 184-187.
- Matsuoka, S., M. Huang, et al. (1998). "Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase." Science **282**(5395): 1893-1897.
- Matsushita, N., H. Kitao, et al. (2005). "A FancD2-monoubiquitin fusion reveals hidden functions of Fanconi anemia core complex in DNA repair." Mol Cell **19**(6): 841-847.
- McGeehan, G. M., J. D. Becherer, et al. (1994). "Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor." Nature **370**(6490): 558-561.
- Mellon, I., G. Spivak, et al. (1987). "Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene." Cell **51**(2): 241-249.
- Michalak, E. M., A. Villunger, et al. (2008). "In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute." Cell Death Differ **15**(6): 1019-1029.
- Milde-Langosch, K. (2005). "The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis." Eur J Cancer **41**(16): 2449-2461.
- Mirchandani, K. D., R. M. McCaffrey, et al. (2008). "The Fanconi anemia core complex is required for efficient point mutagenesis and Rev1 foci assembly." DNA Repair (Amst) **7**(6): 902-911.

- Mirza, A. M., S. Gysin, et al. (2004). "Cooperative regulation of the cell division cycle by the protein kinases RAF and AKT." Mol Cell Biol **24**(24): 10868-10881.
- Moggs, J. G., K. J. Yarema, et al. (1996). "Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-cisplatin adduct." J Biol Chem **271**(12): 7177-7186.
- Mojas, N., M. Lopes, et al. (2007). "Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA." Genes Dev **21**(24): 3342-3355.
- Moldovan, G. L., M. V. Madhavan, et al. (2010). "DNA polymerase POLN participates in cross-link repair and homologous recombination." Mol Cell Biol **30**(4): 1088-1096.
- Montgomery, J. A. (1976). "Chemistry and structure-activity studies of the nitrosoureas." Cancer Treat Rep **60**(6): 651-664.
- Montgomery, J. A., R. James, et al. (1967). "The modes of decomposition of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and related compounds." J Med Chem **10**(4): 668-674.
- Moser, J., H. Kool, et al. (2007). "Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner." Mol Cell **27**(2): 311-323.
- Muller, M., S. Wilder, et al. (1998). "p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs." J Exp Med **188**(11): 2033-2045.
- Muniandy, P. A., D. Thapa, et al. (2009). "Repair of laser-localized DNA interstrand cross-links in G1 phase mammalian cells." J Biol Chem **284**(41): 27908-27917.
- Nair, S., A. Barve, et al. (2010). "Regulation of Nrf2- and AP-1-mediated gene expression by epigallocatechin-3-gallate and sulforaphane in prostate of Nrf2-knockout or C57BL/6J mice and PC-3 AP-1 human prostate cancer cells." Acta Pharmacol Sin **31**(9): 1223-1240.
- Nakano, K. and K. H. Vousden (2001). "PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53." Mol Cell **7**(3): 683-694.
- Nam, E. A. and D. Cortez (2011). "ATR signalling: more than meeting at the fork." Biochem J **436**(3): 527-536.
- Nath, R. G., J. E. Ocando, et al. (1998). "1,N2-propanodeoxyguanosine adducts: potential new biomarkers of smoking-induced DNA damage in human oral tissue." Cancer Res **58**(4): 581-584.
- Neal, J. A., V. Dang, et al. (2011). "Inhibition of homologous recombination by DNA-dependent protein kinase requires kinase activity, is titratable, and is modulated by autophosphorylation." Mol Cell Biol **31**(8): 1719-1733.

- Nichols, A. F. and A. Sancar (1992). "Purification of PCNA as a nucleotide excision repair protein." Nucleic Acids Res **20**(13): 2441-2446.
- Nicoletti, I., G. Migliorati, et al. (1991). "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." J Immunol Methods **139**(2): 271-279.
- Niedernhofer, L. J., A. S. Lalai, et al. (2005). "Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair." Cell **123**(7): 1191-1198.
- Niedernhofer, L. J., H. Odijk, et al. (2004). "The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks." Mol Cell Biol **24**(13): 5776-5787.
- Nijman, S. M., T. T. Huang, et al. (2005). "The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway." Mol Cell **17**(3): 331-339.
- Nikolova, T., M. Ensminger, et al. (2010). "Homologous recombination protects mammalian cells from replication-associated DNA double-strand breaks arising in response to methyl methanesulfonate." DNA Repair (Amst) **9**(10): 1050-1063.
- Nobusawa, S., T. Watanabe, et al. (2009). "IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas." Clin Cancer Res **15**(19): 6002-6007.
- O'Donovan, A., A. A. Davies, et al. (1994). "XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair." Nature **371**(6496): 432-435.
- Oda, E., R. Ohki, et al. (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." Science **288**(5468): 1053-1058.
- Ogi, T., S. Limsirichaikul, et al. (2010). "Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells." Mol Cell **37**(5): 714-727.
- Ohgaki, H., P. Dessen, et al. (2004). "Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study." Cancer Res **64**(19): 6892-6899.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2007). "Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma." Am J Pathol **170**(5): 1445-1453.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2013). "The definition of primary and secondary glioblastoma." Clin Cancer Res **19**(4): 764-772.
- Oksenysh, V., B. Bernardes de Jesus, et al. (2009). "Molecular insights into the recruitment of TFIIH to sites of DNA damage." EMBO J **28**(19): 2971-2980.
- Orlandini, M., L. Marconcini, et al. (1996). "Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11675-11680.

- Ortega-Perez, I., E. Cano, et al. (2005). "c-Jun N-terminal kinase (JNK) positively regulates NFATc2 transactivation through phosphorylation within the N-terminal regulatory domain." J Biol Chem **280**(21): 20867-20878.
- Ostermann, S., C. Csajka, et al. (2004). "Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients." Clin Cancer Res **10**(11): 3728-3736.
- Ostling, O. and K. J. Johanson (1984). "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells." Biochem Biophys Res Commun **123**(1): 291-298.
- Overmeer, R. M., A. M. Gourdin, et al. (2010). "Replication factor C recruits DNA polymerase delta to sites of nucleotide excision repair but is not required for PCNA recruitment." Mol Cell Biol **30**(20): 4828-4839.
- Parker, S., M. C. Kirk, et al. (1987). "Synthesis and characterization of O6-(2-chloroethyl)guanine: a putative intermediate in the cytotoxic reaction of chloroethylnitrosoureas with DNA." Biochem Biophys Res Commun **148**(3): 1124-1128.
- Passegue, E., W. Jochum, et al. (2001). "Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking junB expression in the myeloid lineage." Cell **104**(1): 21-32.
- Payne, A. and G. Chu (1994). "Xeroderma pigmentosum group E binding factor recognizes a broad spectrum of DNA damage." Mutat Res **310**(1): 89-102.
- Pelengaris, S., M. Khan, et al. (2002). "c-MYC: more than just a matter of life and death." Nat Rev Cancer **2**(10): 764-776.
- Pietersma, A., B. C. Tilly, et al. (1997). "p38 mitogen activated protein kinase regulates endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level." Biochem Biophys Res Commun **230**(1): 44-48.
- Pitti, R. M., S. A. Marsters, et al. (1998). "Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer." Nature **396**(6712): 699-703.
- Polster, B. M., K. W. Kinnally, et al. (2001). "BH3 death domain peptide induces cell type-selective mitochondrial outer membrane permeability." J Biol Chem **276**(41): 37887-37894.
- Popanda, O. and H. W. Thielmann (1992). "The function of DNA polymerases in DNA repair synthesis of ultraviolet-irradiated human fibroblasts." Biochim Biophys Acta **1129**(2): 155-160.
- Prusty, D., B. H. Park, et al. (2002). "Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes." J Biol Chem **277**(48): 46226-46232.

- Pucci, B., M. Indelicato, et al. (2009). "ERK-1 MAP kinase prevents TNF-induced apoptosis through bad phosphorylation and inhibition of Bax translocation in HeLa Cells." J Cell Biochem **108**(5): 1166-1174.
- Quantin, B. and R. Breathnach (1988). "Epidermal growth factor stimulates transcription of the c-jun proto-oncogene in rat fibroblasts." Nature **334**(6182): 538-539.
- Quiros, S., W. P. Roos, et al. (2010). "Processing of O6-methylguanine into DNA double-strand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles." Cell Cycle **9**(1): 168-178.
- Quiros, S., W. P. Roos, et al. (2011). "Rad51 and BRCA2--New molecular targets for sensitizing glioma cells to alkylating anticancer drugs." PLoS One **6**(11): e27183.
- Raingaud, J., S. Gupta, et al. (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." J Biol Chem **270**(13): 7420-7426.
- Ramos-Nino, M. E., C. D. MacLean, et al. (2007). "Association between cancer prevalence and use of thiazolidinediones: results from the Vermont Diabetes Information System." BMC Med **5**: 17.
- Ramos-Nino, M. E., L. Scapoli, et al. (2003). "Microarray analysis and RNA silencing link fra-1 to cd44 and c-met expression in mesothelioma." Cancer Res **63**(13): 3539-3545.
- Raschle, M., P. Knipscheer, et al. (2008). "Mechanism of replication-coupled DNA interstrand crosslink repair." Cell **134**(6): 969-980.
- Rebollo, A., L. Dumoutier, et al. (2000). "Bcl-3 expression promotes cell survival following interleukin-4 deprivation and is controlled by AP1 and AP1-like transcription factors." Mol Cell Biol **20**(10): 3407-3416.
- Reifenberger, G. and D. N. Louis (2003). "Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology." J Neuropathol Exp Neurol **62**(2): 111-126.
- Roos, W., M. Baumgartner, et al. (2004). "Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1." Oncogene **23**(2): 359-367.
- Roos, W. P., L. F. Batista, et al. (2007). "Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine." Oncogene **26**(2): 186-197.
- Rothfuss, A. and M. Grompe (2004). "Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway." Mol Cell Biol **24**(1): 123-134.
- Roux, P. P. and J. Blenis (2004). "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." Microbiol Mol Biol Rev **68**(2): 320-344.

- Saez, E., S. E. Rutberg, et al. (1995). "c-fos is required for malignant progression of skin tumors." Cell **82**(5): 721-732.
- Sakasai, R., A. Sakai, et al. (2012). "CtIP- and ATR-dependent FANCDJ phosphorylation in response to DNA strand breaks mediated by DNA replication." Genes Cells **17**(12): 962-970.
- Sanchez, Y., C. Wong, et al. (1997). "Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25." Science **277**(5331): 1497-1501.
- Sarkar, S., A. A. Davies, et al. (2006). "DNA interstrand crosslink repair during G1 involves nucleotide excision repair and DNA polymerase zeta." EMBO J **25**(6): 1285-1294.
- Schein, P. S., J. Heal, et al. (1978). "Pharmacology of nitrosourea antitumor agents." Antibiot Chemother **23**: 64-75.
- Schreiber, M., A. Kolbus, et al. (1999). "Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent." Genes Dev **13**(5): 607-619.
- Schreiber, M., Z. Q. Wang, et al. (2000). "Placental vascularisation requires the AP-1 component fra1." Development **127**(22): 4937-4948.
- Schultz, P., S. Fribourg, et al. (2000). "Molecular structure of human TFIIH." Cell **102**(5): 599-607.
- Selby, C. P., R. Drapkin, et al. (1997). "RNA polymerase II stalled at a thymine dimer: footprint and effect on excision repair." Nucleic Acids Res **25**(4): 787-793.
- Sengerova, B., A. T. Wang, et al. (2011). "Orchestrating the nucleases involved in DNA interstrand cross-link (ICL) repair." Cell Cycle **10**(23): 3999-4008.
- Sewing, A., B. Wiseman, et al. (1997). "High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1." Mol Cell Biol **17**(9): 5588-5597.
- Shao, Z., K. Bhattacharya, et al. (2006). "c-Jun N-terminal kinases mediate reactivation of Akt and cardiomyocyte survival after hypoxic injury in vitro and in vivo." Circ Res **98**(1): 111-118.
- She, Q. B., A. M. Bode, et al. (2001). "Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase." Cancer Res **61**(4): 1604-1610.
- She, Q. B., N. Chen, et al. (2000). "ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation." J Biol Chem **275**(27): 20444-20449.
- Sheng, M., M. A. Thompson, et al. (1991). "CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases." Science **252**(5011): 1427-1430.

- Shimizu, T., T. Nakazato, et al. (2006). "Resveratrol induces apoptosis of human malignant B cells by activation of caspase-3 and p38 MAP kinase pathways." Biochem Pharmacol **71**(6): 742-750.
- Shivji, K. K., M. K. Kenny, et al. (1992). "Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair." Cell **69**(2): 367-374.
- Shivji, M. K., V. N. Podust, et al. (1995). "Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA." Biochemistry **34**(15): 5011-5017.
- Sijbers, A. M., W. L. de Laat, et al. (1996). "Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease." Cell **86**(5): 811-822.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, et al. (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells." Exp Cell Res **175**(1): 184-191.
- Singleton, B. K., M. I. Torres-Arzayus, et al. (1999). "The C terminus of Ku80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit." Mol Cell Biol **19**(5): 3267-3277.
- Sinha, D., S. Bannerjee, et al. (2004). "Inhibition of ligand-independent ERK1/2 activity in kidney proximal tubular cells deprived of soluble survival factors up-regulates Akt and prevents apoptosis." J Biol Chem **279**(12): 10962-10972.
- Slomiany, B. L. and A. Slomiany (2012). "Involvement of p38 MAPK-dependent activator protein (AP-1) activation in modulation of gastric mucosal inflammatory responses to Helicobacter pylori by ghrelin." Inflammopharmacology.
- Smeal, T., B. Binetruy, et al. (1992). "Oncoprotein-mediated signalling cascade stimulates c-Jun activity by phosphorylation of serines 63 and 73." Mol Cell Biol **12**(8): 3507-3513.
- Smeaton, M. B., E. M. Hlavin, et al. (2008). "Distortion-dependent unhooking of interstrand cross-links in mammalian cell extracts." Biochemistry **47**(37): 9920-9930.
- Smogorzewska, A., S. Matsuoka, et al. (2007). "Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair." Cell **129**(2): 289-301.
- Sorensen, C. S., R. G. Syljuasen, et al. (2003). "Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A." Cancer Cell **3**(3): 247-258.
- Southern, P. J. and P. Berg (1982). "Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter." J Mol Appl Genet **1**(4): 327-341.
- Spagnolo, L., A. Rivera-Calzada, et al. (2006). "Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair." Mol Cell **22**(4): 511-519.

- Stauber, R. H., S. K. Knauer, et al. (2012). "A combination of a ribonucleotide reductase inhibitor and histone deacetylase inhibitors downregulates EGFR and triggers BIM-dependent apoptosis in head and neck cancer." Oncotarget **3**(1): 31-43.
- Stevens, M. F., J. A. Hickman, et al. (1984). "Antitumor imidazotetrazines. 1. Synthesis and chemistry of 8-carbamoyl-3-(2-chloroethyl)imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3 H)-one , a novel broad-spectrum antitumor agent." J Med Chem **27**(2): 196-201.
- Stiff, T., S. A. Walker, et al. (2006). "ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling." EMBO J **25**(24): 5775-5782.
- Stone, M. P., Y. J. Cho, et al. (2008). "Interstrand DNA cross-links induced by alpha,beta-unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation and environmental sources." Acc Chem Res **41**(7): 793-804.
- Stratz, C., H. S. Bhatia, et al. (2012). "The anti-inflammatory effects of the 5-HT(3) receptor antagonist tropisetron are mediated by the inhibition of p38 MAPK activation in primary human monocytes." Int Immunopharmacol **13**(4): 398-402.
- Strik, H. M., C. Marosi, et al. (2012). "Temozolomide dosing regimens for glioma patients." Curr Neurol Neurosci Rep **12**(3): 286-293.
- Stupp, R., M. E. Hegi, et al. (2009). "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial." Lancet Oncol **10**(5): 459-466.
- Stupp, R., W. P. Mason, et al. (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 987-996.
- Svoboda, D. L., J. S. Taylor, et al. (1993). "DNA repair by eukaryotic nucleotide excision nuclease. Removal of thymine dimer and psoralen monoadduct by HeLa cell-free extract and of thymine dimer by *Xenopus laevis* oocytes." J Biol Chem **268**(3): 1931-1936.
- Tacon, C. E., R. Newton, et al. (2012). "Rhinovirus-induced MMP-9 expression is dependent on Fra-1, which is modulated by formoterol and dexamethasone." J Immunol **188**(9): 4621-4630.
- Tang, D., D. Wu, et al. (2002). "ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53." J Biol Chem **277**(15): 12710-12717.
- Taniguchi, T., I. Garcia-Higuera, et al. (2002). "S-phase-specific interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with BRCA1 and RAD51." Blood **100**(7): 2414-2420.
- Tanos, T., M. J. Marinissen, et al. (2005). "Phosphorylation of c-Fos by members of the p38 MAPK family. Role in the AP-1 response to UV light." J Biol Chem **280**(19): 18842-18852.

- Taylor, R. C., S. P. Cullen, et al. (2008). "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(3): 231-241.
- Terasawa, K., K. Okazaki, et al. (2003). "Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway." Genes Cells **8**(3): 263-273.
- Thompson, L. H. and J. M. Hinz (2009). "Cellular and molecular consequences of defective Fanconi anemia proteins in replication-coupled DNA repair: mechanistic insights." Mutat Res **668**(1-2): 54-72.
- Tibbetts, R. S., K. M. Brumbaugh, et al. (1999). "A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53." Genes Dev **13**(2): 152-157.
- Tiwari, G., H. Sakaue, et al. (2003). "Gene expression profiling in prostate cancer cells with Akt activation reveals Fra-1 as an Akt-inducible gene." Mol Cancer Res **1**(6): 475-484.
- Tomicic, M. T., P. Reischmann, et al. (2011). "Delayed c-Fos activation in human cells triggers XPF induction and an adaptive response to UVC-induced DNA damage and cytotoxicity." Cell Mol Life Sci **68**(10): 1785-1798.
- Tong, W. P., M. C. Kirk, et al. (1981). "Molecular pharmacology of the haloethyl nitrosoureas: formation of 6-hydroxyethylguanine in DNA treated with BCNU (N,N1-bis[2-chloroethyl]-N-nitrosourea)." Biochem Biophys Res Commun **100**(1): 351-357.
- Tong, W. P., M. C. Kirk, et al. (1982). "Formation of the cross-link 1-[N3-deoxycytidyl],2-[N1-deoxyguanosinyl]ethane in DNA treated with N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea." Cancer Res **42**(8): 3102-3105.
- Trivedi, R. N., K. H. Almeida, et al. (2005). "The role of base excision repair in the sensitivity and resistance to temozolomide-mediated cell death." Cancer Res **65**(14): 6394-6400.
- Tsuchiya, H., M. Fujii, et al. (1993). "Human T-cell leukemia virus type 1 Tax activates transcription of the human fra-1 gene through multiple cis elements responsive to transmembrane signals." J Virol **67**(12): 7001-7007.
- Tsuruta, F., J. Sunayama, et al. (2004). "JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins." EMBO J **23**(8): 1889-1899.
- Tulchinsky, E. (2000). "Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation." Histol Histopathol **15**(3): 921-928.
- Ulukaya, E., C. Acilan, et al. (2011). "Apoptosis: why and how does it occur in biology?" Cell Biochem Funct **29**(6): 468-480.
- Vial, E. and C. J. Marshall (2003). "Elevated ERK-MAP kinase activity protects the FOS family member FRA-1 against proteasomal degradation in colon carcinoma cells." J Cell Sci **116**(Pt 24): 4957-4963.

- Vial, E., E. Sahai, et al. (2003). "ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility." Cancer Cell **4**(1): 67-79.
- Wakasugi, M., A. Kawashima, et al. (2002). "DDB accumulates at DNA damage sites immediately after UV irradiation and directly stimulates nucleotide excision repair." J Biol Chem **277**(3): 1637-1640.
- Walker, M. D., E. Alexander, Jr., et al. (1978). "Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial." J Neurosurg **49**(3): 333-343.
- Wang, H. L., J. Wang, et al. (2002). "Elevated protein expression of cyclin D1 and Fra-1 but decreased expression of c-Myc in human colorectal adenocarcinomas overexpressing beta-catenin." Int J Cancer **101**(4): 301-310.
- Wang, Q., N. Huber, et al. (2012). "NF-kappaBeta inhibition is ineffective in blocking cytokine-induced IL-8 production but P38 and STAT1 inhibitors are effective." Inflamm Res.
- Wang, S., M. Guo, et al. (2000). "The catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase selectively regulates p53-dependent apoptosis but not cell-cycle arrest." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1584-1588.
- Wang, S., N. Nath, et al. (1999). "Regulation of Rb and E2F by signal transduction cascades: divergent effects of JNK1 and p38 kinases." EMBO J **18**(6): 1559-1570.
- Wang, X., R. D. Kennedy, et al. (2007). "Chk1-mediated phosphorylation of FANCE is required for the Fanconi anemia/BRCA pathway." Mol Cell Biol **27**(8): 3098-3108.
- Wang, X., C. A. Peterson, et al. (2001). "Involvement of nucleotide excision repair in a recombination-independent and error-prone pathway of DNA interstrand cross-link repair." Mol Cell Biol **21**(3): 713-720.
- Weber, J. D., D. M. Raben, et al. (1997). "Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase." Biochem J **326 (Pt 1)**: 61-68.
- Weller, M., T. Cloughesy, et al. (2013). "Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet?" Neuro Oncol **15**(1): 4-27.
- Weller, M., B. Muller, et al. (2003). "Neuro-Oncology Working Group 01 trial of nimustine plus teniposide versus nimustine plus cytarabine chemotherapy in addition to involved-field radiotherapy in the first-line treatment of malignant glioma." J Clin Oncol **21**(17): 3276-3284.
- Whitfield, J., S. J. Neame, et al. (2001). "Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release." Neuron **29**(3): 629-643.

- Woods, D. and J. J. Turchi (2013). "Chemotherapy induced DNA damage response: Convergence of drugs and pathways." Cancer Biol Ther **14**(5).
- Xia, B., Q. Sheng, et al. (2006). "Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2." Mol Cell **22**(6): 719-729.
- Xiu, M., J. Kim, et al. (2003). "The transcriptional repressor HBP1 is a target of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in cell cycle regulation." Mol Cell Biol **23**(23): 8890-8901.
- Xu-Welliver, M. and A. E. Pegg (2002). "Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase." Carcinogenesis **23**(5): 823-830.
- Xu, X., L. M. Tsvetkov, et al. (2002). "Chk2 activation and phosphorylation-dependent oligomerization." Mol Cell Biol **22**(12): 4419-4432.
- Yan, Y., R. S. Spieker, et al. (2005). "BRCA1-mediated G2/M cell cycle arrest requires ERK1/2 kinase activation." Oncogene **24**(20): 3285-3296.
- Yang, D. D., C. Y. Kuan, et al. (1997). "Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene." Nature **389**(6653): 865-870.
- Yang, J., Y. Yu, et al. (2003). "ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses." Carcinogenesis **24**(10): 1571-1580.
- Yang, S. H., A. J. Whitmarsh, et al. (1998). "Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1." EMBO J **17**(6): 1740-1749.
- Yazgan, O. and C. M. Pfarr (2002). "Regulation of two JunD isoforms by Jun N-terminal kinases." J Biol Chem **277**(33): 29710-29718.
- Young, M. R. and N. H. Colburn (2006). "Fra-1 a target for cancer prevention or intervention." Gene **379**: 1-11.
- Young, M. R., R. Nair, et al. (2002). "Transactivation of Fra-1 and consequent activation of AP-1 occur extracellular signal-regulated kinase dependently." Mol Cell Biol **22**(2): 587-598.
- Yuan, S. and C. W. Akey (2013). "Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation." Structure **21**(4): 501-515.
- Zajchowski, D. A., M. F. Bartholdi, et al. (2001). "Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells." Cancer Res **61**(13): 5168-5178.
- Zhan, Q., M. J. Antinore, et al. (1999). "Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45." Oncogene **18**(18): 2892-2900.

- Zhang, J., H. Willers, et al. (2004). "Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair." Mol Cell Biol **24**(2): 708-718.
- Zhang, S. and M. H. Kaplan (2000). "The p38 mitogen-activated protein kinase is required for IL-12-induced IFN-gamma expression." J Immunol **165**(3): 1374-1380.
- Zhang, Y., G. Liu, et al. (2001). "MSK1 and JNKs mediate phosphorylation of STAT3 in UVA-irradiated mouse epidermal JB6 cells." J Biol Chem **276**(45): 42534-42542.
- Zhao, J., A. Jain, et al. (2009). "Mismatch repair and nucleotide excision repair proteins cooperate in the recognition of DNA interstrand crosslinks." Nucleic Acids Res **37**(13): 4420-4429.
- Zhao, K. W., D. Li, et al. (2005). "Interferon-alpha-induced expression of phospholipid scramblase 1 through STAT1 requires the sequential activation of protein kinase Cdelta and JNK." J Biol Chem **280**(52): 42707-42714.
- Zheng, H., X. Wang, et al. (2003). "Nucleotide excision repair- and polymerase eta-mediated error-prone removal of mitomycin C interstrand cross-links." Mol Cell Biol **23**(2): 754-761.
- Zippo, A., A. De Robertis, et al. (2007). "PIM1-dependent phosphorylation of histone H3 at serine 10 is required for MYC-dependent transcriptional activation and oncogenic transformation." Nat Cell Biol **9**(8): 932-944.
- Zou, L. and S. J. Elledge (2003). "Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes." Science **300**(5625): 1542-1548.

10 ANHANG

10.1 Ergänzende Daten zur Regulation von BIM

Die nachstehenden Daten wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Markus Christmann zur Verfügung gestellt. Der gegen BIM gerichtete shRNA-exprimierende Vektor stammt von Prof. Dr. Oliver Krämer (Stauber, Knauer et al. 2012).

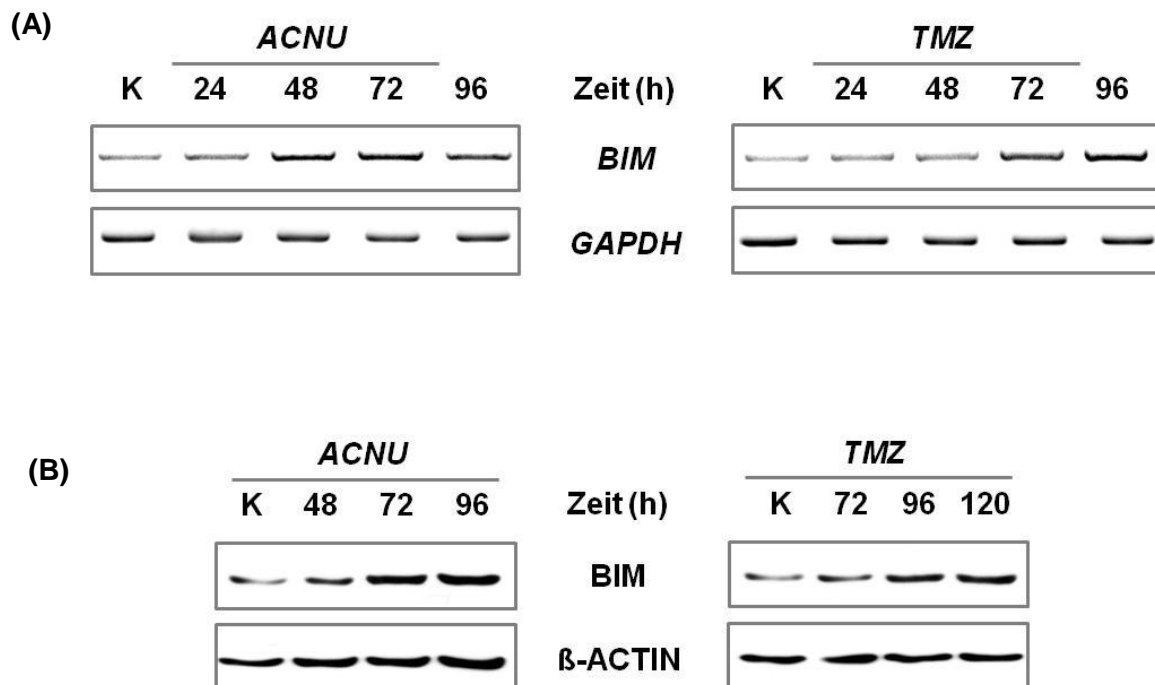


Abb. 10-1: BIM-Expression nach Behandlung mit ACNU und TMZ in LN-229

(A) LN-229 wurden für 24, 48, 72 und 96 h mit 50 μ M ACNU bzw. 100 μ M TMZ behandelt und die *BIM*-Expression mittels RT-PCR detektiert. *GAPDH* diente als Kontrolle für die eingesetzte cDNA-Menge. (B) LN-229 wurden für 48, 72 und 96 h mit 50 μ M ACNU bzw. für 72, 96 und 120 h mit 100 μ M TMZ behandelt und die *BIM*-Expression mittels Western Blot Analyse gemessen. β -ACTIN diente als Ladekontrolle.

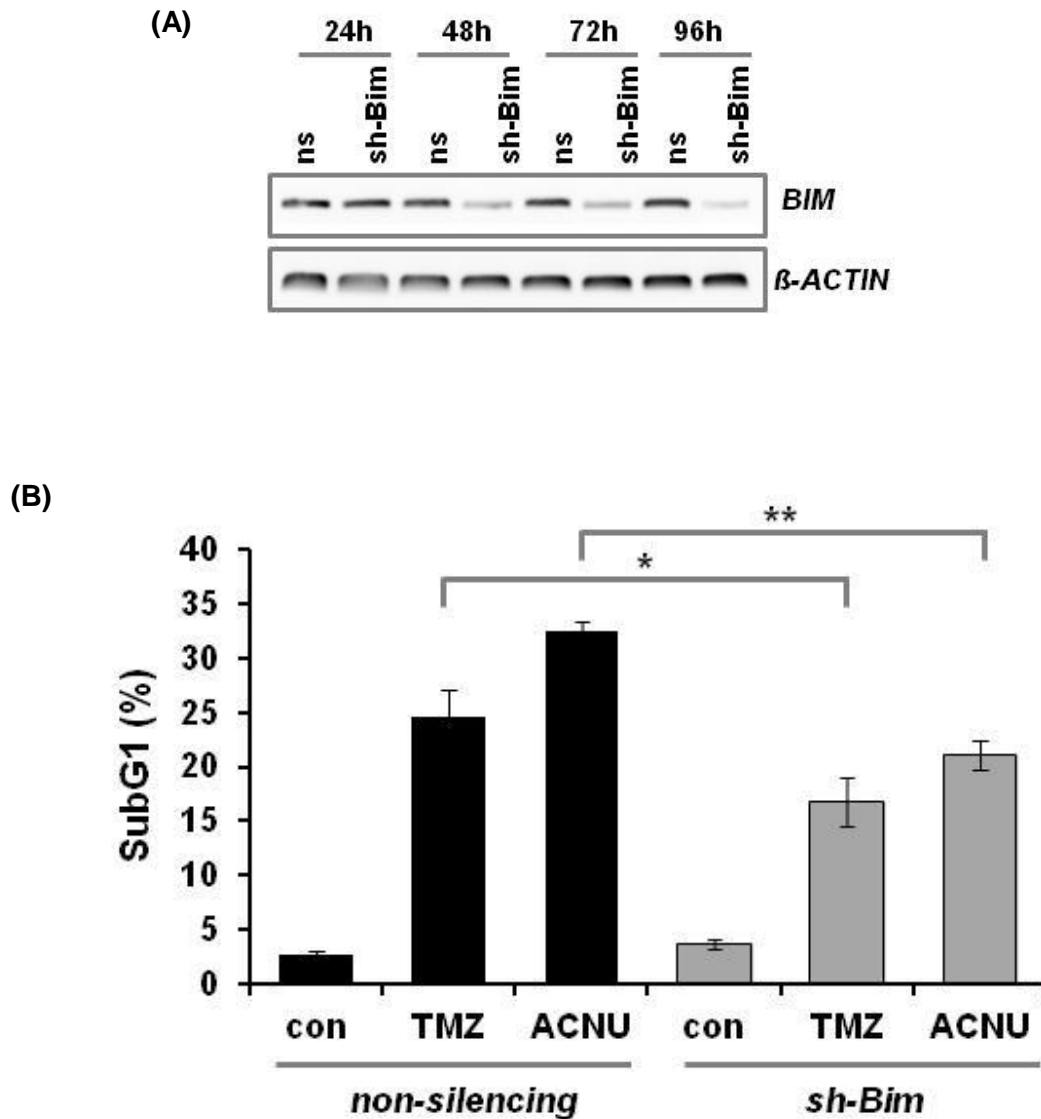


Abb. 10-2: Sensitivität von LN-229 gegenüber ACNU und TMZ nach Herunterregulation der BIM-Expression.

(A) LN-229 wurden mit einem gegen BIM gerichtete shRNA-exprimierenden Vektor transfiziert. 24, 48, 72 und 96 h später wurde die Effektivität der Transfektion mittels RT-PCR überprüft. β -ACTIN diente als Kontrolle für die eingesetzte cDNA-Menge. (B) LN-229 wurden mit einem *non-silencing* shRNA bzw. shRNA gegen BIM exprimierenden Plasmid transfiziert. Nach 32 h wurde mit 50 μ M ACNU bzw. 100 μ M TMZ für 96 h behandelt. Die SubG1-Fraktion wurde am Durchflusszytometer bestimmt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

10.2 Veröffentlichungen

Meise R., Tomicic M.T., Kaina B., Christmann M. (2012): "The chloroethylating anticancer drug ACNU induces FRA1 that is involved in drug resistance of glioma cells." *Biochim Biophys Acta.* 1823(7):1199-207 (Die Daten dieser Publikation sind in der vorliegenden Arbeit präsentiert)

Tomicic M.T., Reischmann P., Rasenberger B., **Meise R.**, Kaina B., Christmann M. (2011): "Delayed c-Fos activation in human cells triggers XPF induction and an adaptive response to UVC-induced DNA damage and cytotoxicity". *Cell Mol Life Science* 68(10): 1785-98

10.3 Kongressbeiträge

- 03/2011** 52. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz. Posterbeitrag: **Meise R**, Kaina B and Christmann M: "Fra-1 enhances cellular survival in the human glioblastoma cell line LN229 after ACNU treatment by regulation of FasL expression"
- 09/2009** 2. deutsch-französisches DNA-Reparatur Meeting der Deutschen Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung, Konstanz. Posterbeitrag: **Meise R**, Rasenberger B, Christmann M and Kaina B: "Topotecan- and ACNU-mediated induction of Fra-1 is independent of the MAPK-cascade and increases resistance in the human glioblastoma cell line LN229."
- 03/2009** 50. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz. Posterbeitrag: **Birkner R**; Kaina B and Christmann M: "Induction of Fra-1 by topotecan and ACNU in the human glioblastoma cell line LN229 is independent of MAPK cascade and enhances cellular survival."