
Die Wirkung von Benzo[a]pyren-diol-epoxid auf Zellen des vaskulären Systems

Dissertation zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Mainz, 2019

Joana Melanie Scheiba

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Dezember 2019

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2015 bis November 2018 am Institut für Toxikologie der Universitätsmedizin Mainz angefertigt und wird am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität (D77) eingereicht.

Wer nichts weiß, muss alles glauben.

Marie von Ebner-Eschenbach
österreichische Schriftstellerin (1830-1916)

Inhalt

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	5
2.1	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	7
2.1.1	B[a]P und seine Metabolisierung zu BPDE	7
2.1.2	Kanzerogene Wirkung von BPDE	10
2.2	Reparatur von DNA-Schäden	11
2.2.1	Basen-Exzisionsreparatur.....	12
2.2.2	Basenfehlpaarungsreparatur	13
2.2.3	Doppelstrangbruchreparatur.....	13
2.3	Nukleotid-Exzisionsreparatur	15
2.3.1	Defekte der NER.....	19
2.4	Werner	20
2.4.1	Werner-Syndrom	20
2.4.2	WRN in der DNA-Reparatur	21
2.5	DNA-Schadensantwort.....	23
2.5.1	Signaltransduktion zwischen DNA-Schaden und Zellschicksal	24
2.5.2	Durch DNA-Schaden induzierter Zelltod: Apoptose und Nekrose	24
2.5.3	Seneszenz.....	25
2.6	Das Blutgefäßsystem.....	27
2.6.1	Atherosklerose	28
2.7	Primärzilien	31
2.7.1	Primärzilien auf den Zellen des vaskulären Systems	32
2.8	Ziel der Arbeit	33
3	Material und Methoden	35
3.1	Materialien.....	35

3.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	35
3.1.2	Geräte	35
3.1.3	Software	37
3.2	Methoden	39
3.2.1	Zellkultur	39
3.2.1.1	Zelllinien	39
3.2.1.2	Kultivierung von Zellen	40
3.2.2	Behandlung mit BPDE	41
3.2.2.1	Inhibitoren	41
3.2.3	Transiente Transfektion	42
3.2.4	Zellwachstum und Zellzyklusbestimmungen	43
3.2.4.1	iCelligence	43
3.2.4.2	MTT	43
3.2.4.3	Zellzyklusanalyse: Propidiumiodid Färbung	44
3.2.5	Zytotoxizitätsbestimmungen	44
3.2.5.1	Koloniebildungstest	44
3.2.5.2	Apoptose/Nekrose: Annexin V/PI Doppelfärbung	45
3.2.5.3	Comet Assay	45
3.2.6	Seneszenz: X-Gal	46
3.2.7	Proteinanalysen	47
3.2.7.1	Proteinextraktion	47
3.2.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	47
3.2.7.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	47
3.2.7.4	Immun-Blot – Western-Blot	48
3.2.8	Immunfluoreszenz	51
3.2.8.1	Primärzilien	52

3.2.9	Genexpression – Real-time PCR.....	53
3.2.10	BPDE-DNA-Addukt Bestimmung.....	54
3.2.11	Migrationstest.....	55
3.2.12	Statistik.....	55
4	Ergebnisse.....	57
4.1	Einfluss des WRN-Proteins auf die Sensitivität von Endothelzellen und Fibroblasten nach DNA-Schadenssetzung.....	58
4.1.1	Untersuchung der Sensitivität gegenüber BPDE	59
4.1.2	WRN- <i>Knockdown</i> verstärkt die BPDE-induzierte Apoptose	61
4.1.3	ESB akkumulieren nach BPDE-Behandlung in den WRN- <i>Knockdown</i> Zellen.....	62
4.1.4	WRN-Inhibitor bestätigt die Daten des WRN- <i>Knockdown</i>	63
4.1.5	Untersuchung des Einflusses des WRN- <i>Knockdown</i> auf BPDE-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche	65
4.2	Vergleich der Primärzellen des vaskulären Systems hinsichtlich ihrer Sensitivität zu BPDE.....	69
4.2.1	Untersuchung der Sensitivität gegenüber BPDE	69
4.2.2	BPDE induziert Seneszenz in Primärzellen.....	74
4.2.3	Akkumulierende Einzelstrangbrüche nach BPDE Behandlung	75
4.2.4	BPDE induziert gleiche Mengen von DSB in HUVEC, HUASMC und hPC-PL ..	77
4.2.5	BPDE-Addukte persistieren in HUVEC-Zellen	79
4.2.6	Untersuchung der Expression von DNA Reparaturproteinen in humanen vaskulären Primärzellen	80
4.2.7	DNA-Schadensantwort in HUVEC, HUASMC und hPC-PL nach Behandlung mit BPDE	85
4.2.8	Einfluss der BPDE-Behandlung auf Primärzilien	87
4.2.8.1	Einfluss des ATRi auf die Anzahl zilierter Zellen nach Behandlung mit BPDE	91

5	Diskussion	95
5.1	Der Einfluss von WRN auf zytotoxische Endpunkte	97
5.1.1	Der Einfluss von WRN auf BPDE-induzierte zytotoxische Endpunkte in Endothelzellen und Fibroblasten.....	99
5.2	Rauchen als Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Krankheiten.....	103
5.2.1	Ein Vergleich vaskulärer Primärzellen	104
5.2.1.1	Endothelzellen reagieren am sensitivsten auf BPDE	104
5.2.1.2	Endothelzellen weisen eine beeinträchtigte NER-Kapazität auf	109
5.2.1.3	BPDE aktiviert die DNA-Schadensantwort.....	110
5.2.1.4	DNA-Schäden und Atherosklerose	111
5.2.2	Primärzilien und Atherosklerose	112
5.2.2.1	BPDE vermindert die Anzahl an Zellen mit Primärzilium in den getesteten vaskulären Primärzelltypen	112
5.2.2.2	Primärzilien und DNA-Schadensantwort	114
5.2.2.3	ATRi verhindert den Abbau von Primärzilien nach BPDE Behandlung	114
5.3	Zusammenfassung	115
6	Literaturverzeichnis	117
7	Anhang.....	135
7.1	Tabellenverzeichnis.....	135
7.2	Abbildungsverzeichnis	137
7.3	Abkürzungsverzeichnis	141
8	Danksagung	145
9	Lebenslauf.....	148

1 Zusammenfassung

Täglich sind wir Schadstoffen in unserer Umwelt ausgesetzt, wie z.B. dem polyzyklischen Kohlenwasserstoff Benzo[a]pyren (B[a]P), der durch unvollständige Verbrennung entsteht und als Karzinogen im Tabakrauch, Dieselruß, Gegrilltem u. v. m. enthalten ist. Dieser ist an sich ungiftig, wird aber im Körper in einen reaktiven Metaboliten, dem Benzo[a]pyren-7R,8S-Dihydrodiol-9S,10R-Epoxid (BPDE), umgewandelt, welcher hochgradig genotoxisch ist. Dieser Metabolit entsteht in allen Zellen, in denen B[a]P durch die CYP450 Enzyme (insbesondere das CYP1A1) umgesetzt werden kann, was auf zahlreiche Zelltypen in unserem Organsystem, u.a. auf Zellen des vaskulären Systems, zutrifft. Schäden an vaskulären Zellen begünstigen nachweislich die Entwicklung von Atherosklerose und kardiovaskulären Folgeerkrankungen wie Herzinfarkt, Schlaganfall oder die koronare Herzkrankheit.

Wie sich die Zellen des vaskulären Systems in ihrer Reaktion auf BPDE und der Expression der Nukleotid-Exzisionsreparaturproteine unterscheiden und welchen Einfluss das WRN-Protein auf diese zellulären Reaktionen hat, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Es konnte mittels Zelltodmessung sowie dem *Comet Assay* und der Erfassung von γ H2AX-Foci gezeigt werden, dass das WRN-Protein direkten Einfluss auf die Sensitivität von EA.hy926- (Endothel) und VH10tert-Zellen (Fibroblast) gegenüber BPDE hat, was vermutlich auf die Funktion von WRN in der DSB-Reparatur zurückzuführen ist. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Frage untersucht, ob Endothelzellen gegenüber BPDE geschützt sind, z.B. durch eine effizientere Reparatur der BPDE-induzierten DNA-Schäden. Es wurden daher primäre menschliche Endothelzellen (HUVEC) vergleichend zu primären Perizyten (hPC-PL) und glatten Muskelzellen (HUASMC) in Bezug auf ihre Sensitivität zu BPDE und DNA-Reparaturkapazität untersucht. Anhand von Zelltodmessungen, *Comet Assay* und γ H2AX-Foci Messung konnte gezeigt werden, dass HUVEC-Zellen die sensitivsten der untersuchten Zelltypen waren und nach BPDE-Behandlung in die Apoptose gehen. Mittels Western-Blot Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass HUVEC-Zellen niedrigere Mengen der NER-Proteine ERCC1, XPF und Ligase I exprimieren. Die Addukt-Quantifizierung durch das ^{32}P -Postlabeling zeigte, dass in HUVEC-Zellen BPDE-Addukte

nicht repariert werden, während sie in Perizyten und glatten Muskelzellen (HUASMC) aus der DNA entfernt werden. Perizyten (hPC-PL) und glatte Muskelzellen (HUASMC) haben somit im Vergleich zum Endothel (HUVEC) einen besseren Schutz vor BPDE-induzierten Schäden. Primärzilien sind Zellfortsätze, welche von ruhenden Zellen gebildet werden und vielfältige Funktionen, wie z.B. Signaltransduktion besitzen. Es konnte durch immunzytochemische Versuche gezeigt werden, dass BPDE die Zilienbildung in ruhenden Zellen negativ beeinflusst und dass dieser Prozess über einen durch ATR beeinflussten Signalweg gesteuert wird.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen bieten Erkenntnisse darüber, wie der Kontakt mit dem Umweltschadstoff Benzo(a)pyren bzw. dessen Metaboliten BPDE zur Induktion von DNA-Schäden und deren zellulären Folgen führt und sollte Ausgangspunkt von weiteren Forschungsvorhaben werden, die sich mit der Atheroskleroseentwicklung ausgehend von Schädigung kardiovaskulärer Zellen nach Exposition mit BPDE befassen.

Abstract

Every day we are exposed to pollutants in our environment, such as the polycyclic hydrocarbon benzo[a]pyrene (B[a]P) produced by incomplete combustion. It is a carcinogen included in tobacco smoke, diesel soot, grilled food and much more. B[a]P itself is not toxic but it is converted in the body into a reactive metabolite, the benzo[a]pyrene-7R,8S-dihydrodiol-9S,10R-epoxide (BPDE), which is highly genotoxic. This metabolite is produced in all cells in which B[a]P can be converted by the CYP450 enzymes (especially CYP1A1), including numerous cell types in our organ system, u.a. in vascular cells. Damage to vascular cells has been shown to promote the development of atherosclerosis and cardiovascular sequelae such as heart attack, stroke or coronary heart disease.

How the cells of the vascular system differ in their response to BPDE and their expression of the nucleotide excision repair proteins, and what influence the WRN protein has on these cellular responses, was investigated in the present work. It was demonstrated by cell death measurements, by the comet assay and by the detection of γ H2AX foci that the WRN protein has a direct influence on the sensitivity of EA.hy926 (endothelial) and VH10tert cells (fibroblast) after exposure to BPDE, which is probably due to the function of WRN in the DSB repair. Furthermore, the question was evaluated of whether endothelial cells are protected against BPDE, e.g. by more efficient repair of BPDE-induced DNA damage. Therefore, primary human endothelial cells (HUVEC) were compared to primary pericytes (hPC-PL) and smooth muscle cells (HUASMC) in terms of their sensitivity to BPDE and their DNA repair capacity. Cell death measurements, Comet Assay and γ H2AX-Foci measurements showed that the HUVEC cells were the most sensitive of the investigated cell types and that they undergo apoptosis after BPDE treatment. Western blot analysis revealed that HUVEC cells express lower levels of the NER proteins ERCC1, XPF and ligase I. Adduct quantification by ^{32}P post-labeling showed that in HUVEC cells BPDE adducts are not repaired while in pericytes and smooth muscle cells (HUASMC) they are removed from the DNA. Pericytes (hPC-PL) and smooth muscle cells (HUASMC) thus have better protection against BPDE-induced damage than the endothelial cells (HUVEC).

Primary cilia are cell membrane extensions that are formed by quiescent cells and have multiple functions e.g. chemical sensation or signal transduction. It has been demonstrated by immunocytochemistry that BPDE negatively affects cilia formation in quiescent cells and that this process is controlled by an ATR-mediated signaling pathway.

The results of this study provide insights into how the contact with the environmental pollutant B[a]P or its metabolite BPDE leads to the induction of DNA damage and its cellular consequences and should be the starting point for further research projects, including the promotion of atherosclerosis resulting from damage of cardiovascular cells after exposure to BDPE.

2 Einleitung

Die innerste Schicht unseres Blutgefäßsystems wird von einer Monozellschicht aus über 10 Milliarden Endothelzellen gebildet. Diese regulieren vielfältige Funktionen, u.a. die Blutgerinnung, den Blutdruck oder die Wundheilung und erfüllen damit zentrale Aufgaben in unserem Körper. Mit den vielen verschiedenen Stoffen, die von unserem Körper aufgenommen und durch unser Blut transportiert werden, kommen die Endothelzellen als erste Zellschicht in Kontakt, gefolgt von den glatten Muskelzellen, welche das Endothel in den großen Arterien umkleiden oder den Perizyten, welche das Endothel der kleinen Venolen umhüllen. Einer dieser Stoffe ist Benzo[a]pyren, ein polyzyklischer Kohlenwasserstoff, der in unserer Umwelt ubiquitär verbreitet ist und z.B. im Zigarettenrauch und in Industrieabgasen vorkommt (Hecht 2003). Benzo[a]pyren wird von unseren Zellen aufgenommen und zu einem Epoxid metabolisiert, welches DNA-Schäden hervorrufen und damit z.B. unser Endothel schädigen kann (Curfs et al. 2005; Shah und Bennett 2017; Shah und Bennett 2016; Pulliero et al. 2015). Eine Schädigung der Endothelzellen kann zur Entwicklung atherosklerotischer Plaques beitragen. Rauchen stellt neben Lebensalter, Geschlecht und erhöhten LDL-Cholesterinwerten einen der bekannten Risikofaktoren für die Entstehung von Atherosklerose dar (Knaapen et al. 2007; Berenson et al. 1998). Atherosklerose ist eine Alterserkrankung und ein chronisch entzündlicher Prozess (siehe Kapitel 2.6.1). Nachfolgende kardiovaskuläre Komplikationen wie Herzinfarkt, Schlaganfall oder die koronare Herzkrankheit sind Haupttodesursachen in der westlichen Welt.

Neben den oben genannten verbreiteten Risikofaktoren für die Entwicklung von Atherosklerose gibt es verschiedene Krankheiten, die die Entstehung von Atherosklerose begünstigen. Patienten, die an einer Progerie wie dem Werner-Syndrom leiden, tragen einen Defekt im Gen des Werner-Proteins (WRN) (Oshima 2000). WRN ist eine DNA-Helikase, welche vielfältige Funktionen innerhalb der Replikation, Telomer Erhaltung und DNA-Reparatur erfüllt (siehe Kapitel 2.4.2). Patienten mit WRN-Syndrom zeigen neben Symptomen wie Katarakt, Diabetes mellitus Typ II und Osteoporose schon in frühen

Jahren eine ausgeprägte Atherosklerose mit den dazugehörigen Folgeerkrankungen, die neben Tumorerkrankungen häufigste Todesursache sind (Hisama et al. 2015).

Am Beispiel des genotoxischen Metaboliten von Benzo[a]pyren, Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE), soll in dieser Arbeit untersucht und diskutiert werden, wie sich die Zellen des vaskulären Systems in ihrer Reaktion auf BPDE unterscheiden und welchen Einfluss das WRN-Protein auf diese Reaktion hat.

2.1 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) entstehen bei unvollständiger Verbrennung von organischem Material (z.B. Holz, Tabak) und sind deshalb weit verbreitet in der Umwelt zu finden. Außerdem sind sie natürlicher Bestandteil von Kohle und Erdöl, entstehen aber hauptsächlich durch anthropogene Einflüsse (Industrie- und Autoabgase). Durch die voranschreitende Industrialisierung sind die PAK-Konzentrationen in der Umwelt in den letzten Jahren stetig angestiegen. Der Mensch kann die PAK durch Inhalation oder durch seine Nahrung aufnehmen.

PAK bestehen aus mindestens zwei verbundenen aromatischen Ringsystemen, die plan vorliegen. Sie sind vorwiegend ungeladene Feststoffe und sehr gering wasserlöslich, dafür jedoch lipophil. Ihre Wasserlöslichkeit nimmt mit der Anzahl der aromatischen Ringsysteme weiter ab. Durch ihren lipophilen Charakter weisen sie eine hohe Bioverfügbarkeit im menschlichen Körper auf. Naphthalin ist das einfachste PAK. Es besteht aus zwei aromatischen Ringsystemen und findet in der Industrie z.B. für die Herstellung von Lösungsmitteln und Azofarbstoffen Verwendung. Der bekannteste und meist untersuchte PAK mit stark kanzerogenem Potential ist Benzo[a]pyren (B[a]P).

2.1.1 B[a]P und seine Metabolisierung zu BPDE

Bereits im 19. Jahrhundert konnte ein Zusammenhang zwischen Hautkrebs und der Arbeit in der Steinkohleteerindustrie und in Paraffinraffinerien hergestellt werden. Jedoch wurde B[a]P erst viel später als Bestandteil von Steinkohleteer und Auslöser der kanzerogenen Wirkung nachgewiesen (Cook et al. 1943; Mottram 1944). Dass B[a]P selbst nicht das Kanzerogen ist, sondern erst sein Metabolit Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE) das ultimative Kanzerogen darstellt, wurde erst später herausgefunden. Eine ausschlaggebende Untersuchung hierzu war, dass B[a]P erst nach der Aktivierung durch Leberenzyme (S9-Fraktion; Mischung aus Leberenzymen von der männlichen Ratte) mutagen wirkt (Ames et al. 1973).

B[a]P besteht aus fünf aromatischen Ringsystemen und liegt plan vor (Abbildung 1). Da B[a]P, wie die meisten PAK, sehr lipophil ist, akkumuliert es im Fettgewebe und kann

nicht einfach aus dem Körper ausgeschieden, sondern muss zunächst metabolisiert werden. Ziel der Metabolisierung ist immer, den vorher lipophilen Stoff in einen hydrophilen Stoff umzuwandeln, damit er über Niere und Leber ausgeschieden werden kann (Gelboin 1980).

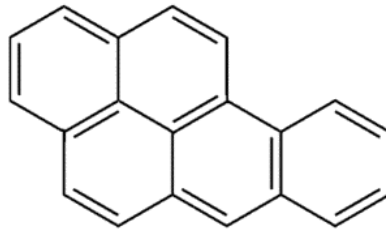


Abbildung 1: Benzo[a]pyren. Benzo[a]pyren besteht aus fünf aromatischen Ringsystemen, die plan vorliegen. <http://www.umweltbundesamt.at/umweltsituation/luft/luftschadstoffe/benzoapyren/>.

B[a]P wird zunächst durch eine Phase I Reaktion funktionalisiert (Abbildung 2). Dieser Schritt wird durch Monooxygenasen, auch bekannt als Cytochrom P-450-Enzyme (CYP), enzymatisch katalysiert. B[a]P wird hauptsächlich von den Subtypen CYP1A1 und CYP1B1 metabolisiert (Kim et al. 1998). Nach Übertragung eines Sauerstoffmoleküls an die Kohlenstoffatome 7 und 8 entsteht ein Epoxid, welches, wenn es nicht durch die mikrosomale Epoxidhydrolase zu Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol umgesetzt und detoxifiziert wird, sehr reaktiv ist und kovalent an Moleküle (z.B. DNA) binden kann. Das Zwischenprodukt Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol kann in ein Katechol (hydrophil) umgewandelt oder mit Glucuronsäure konjugiert (hydrophil) und dann ausgeschieden werden. In dem für diese Arbeit relevanten Fall wird das entstandene Diol mittels der CYP-Enzyme weiter zu dem ultimativen Karzinogen Benzo[a]pyren-7,8-dihydro-9,10-epoxid (BPDE) oxidiert. Dieses ist hoch reaktiv und kann kovalent an DNA-Basen (z.B. N²-Guanin-BPDE oder N⁶-Adenin-BPDE) binden.

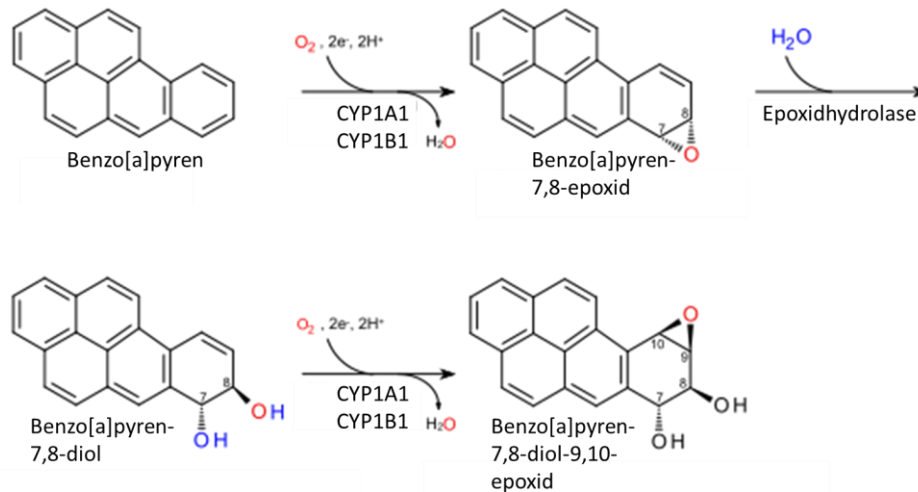


Abbildung 2: Metabolisierung von B[a]P zu BPDE. Zur vereinfachten Darstellung ist nur einer der möglichen Metabolisierungswege gezeigt: die Verstoffwechslung von B[a]P zum kanzerogenen Epoxid-Produkt BPDE. Die Metabolisierung läuft über drei Reaktionsschritte ab. Zunächst oxidiert CYP1A1 oder CYP1B1 die Kohlenstoffatome 7 und 8, was zur Bildung eines Epoxids führt. Dieses Epoxid wird sofort durch die Epoxidhydrilase detoxifiziert. Eine erneute Reaktion durch CYP1A1 oder CYP1B1, diesmal an den Kohlenstoffatomen 9 und 10, generiert das ultimative Karzinogen BPDE. Abbildung modifiziert (Moserová et al. 2009).

Es gibt einige bekannte Polymorphismen in der menschlichen Bevölkerung, die dazu führen, dass verschiedene CYP-Enzyme aktiver oder weniger aktiv als in der Durchschnittsbevölkerung sind. Am Beispiel von Rauchern konnte gezeigt werden, dass man aufgrund dieser Polymorphismen eine Hochrisikogruppe, die B[a]P sehr schnell metabolisieren und in der mehr BPDE-DNA-Addukte nachweisbar waren, und eine Niedrigrisikogruppe, die eine langsame Metabolisierung mit einer guten Detoxifizierung und weniger BPDE-DNA-Addukten zeigten, unterscheiden kann (Lodovici et al. 2004; Shiizaki et al. 2017). Generell liegt die tägliche Aufnahme von B[a]P bei ungefähr 2,2 μg pro Person, was in einer Untersuchung der U.S. Bevölkerung festgestellt wurde (Hattemer-Frey und Travis 1991). Der Umsatz von B[a]P zu BPDE liegt ungefähr bei 10 % des Ausgangsprodukts (Kim 1998), das entspricht einer Menge von 220 ng BPDE, die täglich in unserem Körper gebildet werden können und unseren Zellen schaden. Bei starken Rauchern und Menschen, die einer großen Menge an Abgasen o. ä. ausgesetzt sind, wie z.B. Industriearbeitern, kann diese Menge doppelt bis dreifach so hoch sein, da in jeder Zigarette zusätzlich 9-22 ng B[a]P zu finden sind (Hecht 2003; Vu et al. 2015). Bei einer Schachtel mit 20 Zigaretten am Tag entspricht das einer zusätzlichen Aufnahme zur

täglichen Exposition von B[a]P von bis zu 20 % (180-440 ng B[a]P je nach Tabakmarke; berechnet anhand von Kim 1998).

2.1.2 Kanzerogene Wirkung von BPDE

Es ist gezeigt worden, dass B[a]P seine kanzerogene Wirkung größtenteils über den Metaboliten BPDE vermittelt (Piberger et al. 2018; Chen et al. 1996; Slaga et al. 1979). BPDE ist hoch reaktiv und kann über die Epoxid-Gruppe an das Guanin der DNA binden. Dabei entsteht ein sehr sperriges DNA-Addukt (siehe Abbildung 3). Dieser Schaden ist für die mutagene Wirkung von BPDE verantwortlich (Moriya et al. 1996), da das DNA-Addukt, wenn es nicht vor der Replikation entfernt wurde, die Replikationsgabel blockiert, und es entweder zu einem DNA-Strangbruch kommen oder die Translasionssynthese fehlerhafte Basen einfügen kann. Wenn zu viele BPDE-DNA-Addukte vorliegen und die DNA-Reparatur der Nukleotid-Exzisionsreparatur (siehe 2.3) nicht effizient genug arbeitet bzw. gesättigt ist und die Schäden nicht reparieren kann, können Mutationen z.B. über die Translasionssynthese (TLS) entstehen (Dreij et al. 2005). Diese tritt auf, wenn durch das sperrige Addukt die DNA-Replikation blockiert wird. In so einem Fall setzen spezielle DNA-Polymerasen an, die gezielt über DNA-Läsionen hinweg DNA replizieren können (Nair et al. 2015). Bei einem BPDE-DNA-Addukt können z.B. die DNA-Polymerasen Pol η und Pol IV (in Bakterien) über den DNA-Schaden hinweglesen, jedoch entsteht dabei häufig eine Fehlpaarung, z.B. eine G --> T Transversion (Zhang et al. 2000a; Nair et al. 2015; Hess et al. 1997). Die DNA-Polymerase Pol κ kann als einzige TLS Polymerase fehlerfrei über BPDE-DNA hinweglesen (Zhang et al. 2000b; Bi et al. 2005).

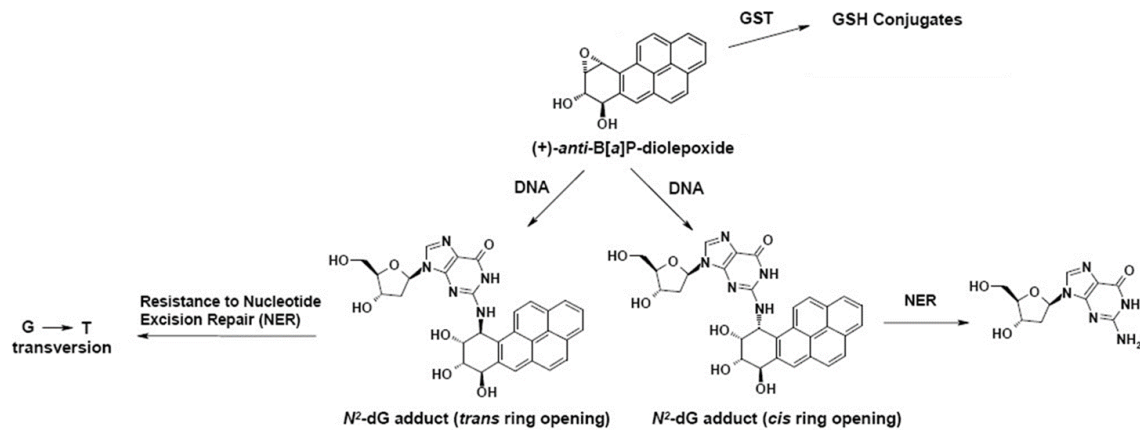


Abbildung 3: BPDE-Stoffwechsel – Detoxifizierung oder DNA-Schädigung. BPDE kann direkt nach seiner Entstehung durch die Addition an Glutathion (GSH) über die Glutathion-S-Transferase (GST) detoxifiziert werden. Wird BPDE nicht detoxifiziert, kann es an DNA binden. Die Bindung an die DNA kann von der Nucleotid-Exzisionsreparatur (NER) repariert werden (Pfeil nach rechts). Wenn die Läsion nicht repariert wird, kann es während der DNA-Replikation zu einer Transversion von G zu T kommen, wenn die Translasiationspolymerasen fehlerhafte Basen einsetzen. Abbildung modifiziert (Trushin et al. 2012).

2.2 Reparatur von DNA-Schäden

Nicht nur Benzo[a]pyren, sondern auch eine ganze Reihe anderer in der Umwelt vorhandenen Substanzen und auch Substanzen endogenen Ursprungs können unsere DNA schädigen. Um mit den verschiedensten DNA-Schäden umgehen zu können, haben die Zellen DNA-Reparaturmechanismen entwickelt, die DNA-Schäden entfernen und so die genomische Stabilität aufrechterhalten (Abbildung 4). Man unterscheidet zwischen der Nucleotid-Exzisionsreparatur (NER, siehe Kapitel 2.3), der Basen-Exzisionsreparatur (BER), der Basenfehlpaarungsreparatur (MMR, engl. *mismatch repair*) und der Doppelstrangbruch-Reparatur (DSBR), welche sich in die Homologe Rekombinationen Reparatur (HRR) und die Nicht-homologe-Endverknüpfung (NHEJ, engl. *non-homologous-end-joining*) unterteilen lässt (Christmann et al. 2003). Außerdem gibt es noch das (Suizid-) Enzym O⁶-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT), welches spezifisch die Schäden O⁶-Methylguanin (oder O⁶-Ethylguanin) und O⁴-Methylthymin aus der DNA über einen Schadenreversionsmechanismus entfernt.

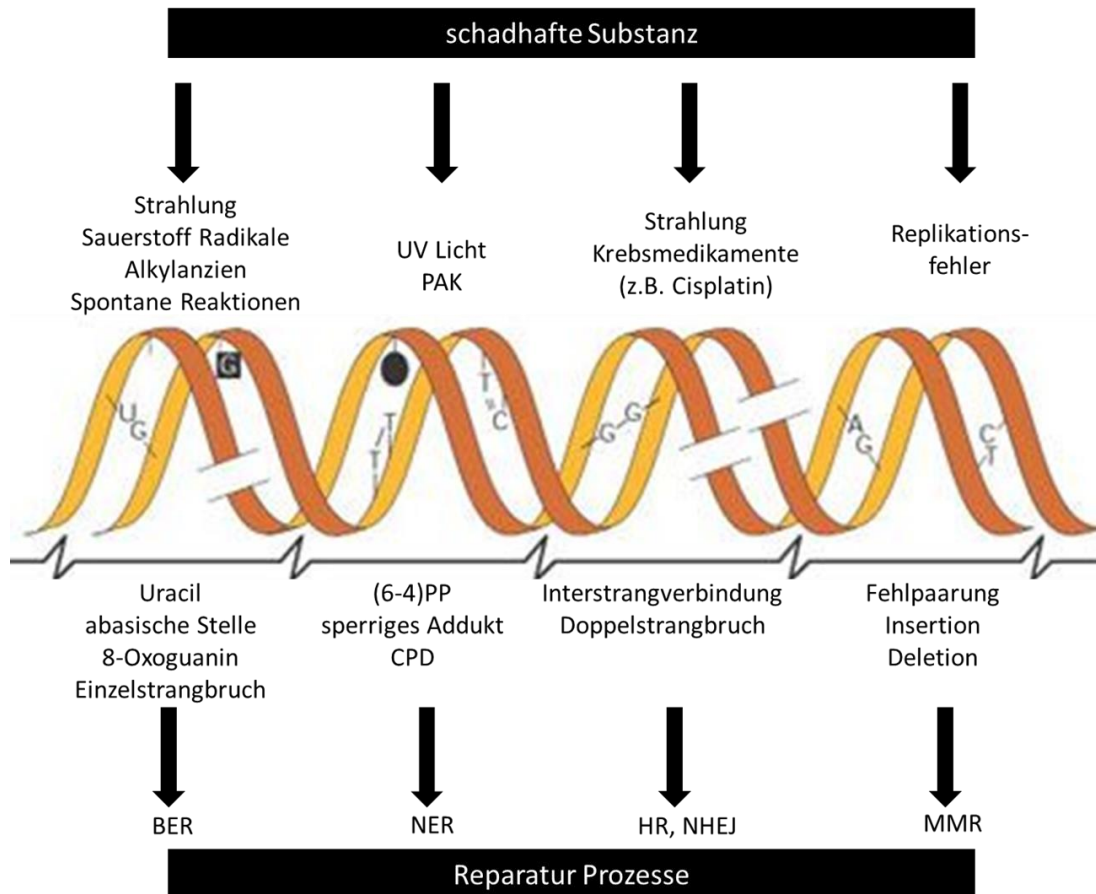


Abbildung 4: Übersicht über die DNA-Schäden und ihre dazugehörigen DNA-Reparatur-Mechanismen. Verschiedene endogene und exogene Faktoren können der DNA schaden, indem z.B. sperrige Addukte oder Fehlpaarungen entstehen. Die DNA-Reparatur-Mechanismen können die verschiedenen Schäden reparieren. Genaue Beschreibung siehe Text. (6-4)PP= (6-4) Pyrimidin-Pyrimidon Fotoprodukt, CPD= Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer. Abbildung modifiziert (Hoeijmakers 2001).

2.2.1 Basen-Exzisionsreparatur

Die Basen-Exzisionsreparatur (BER) entfernt beschädigte Basen, wie z.B. oxidierte Basen oder alkylierte Basen, aus dem DNA-Strang. Die Erkennung der Schäden erfolgt hierbei über DNA-Glykosylasen (z.B. OGG1), welche die beschädigte Base ausschneiden und eine abasische Stelle zurücklassen. An der abasischen Stelle wird anschließend die Phosphodiesterbindung enzymatisch gespalten und der entstandene Einzelstrangbruch entweder über den sogenannten *short patch*- oder den *long patch*-Weg aufgefüllt und geschlossen (Krokan und Bjørås 2013; Parsons und Dianov 2013; Wallace 2014).

2.2.2 Basenfehlpaarungsreparatur

Die Basenfehlpaarungsreparatur (MMR) korrigiert Fehlpaarungen, wie sie z.B. bei der DNA-Replikation entstehen, und kleine Insertions- oder Deletionsschleifen. Die Erkennung der Fehlpaarung erfolgt über einen Enzymkomplex (MSH2/MSH6 oder MSH2/MSH3), der anschließend Proteine rekrutiert, welche für das Ausschneiden, die Neusynthese und die Ligation der Schnittstellen zuständig sind (Fishel 2015; Li et al. 2016; Reyes et al. 2015).

2.2.3 Doppelstrangbruchreparatur

Doppelstrangbrüche (DSB), die die toxischsten DNA-Schäden darstellen, da sie Zelltod, chromosomale Aberrationen oder Genommutationen verursachen können, sind zumeist auf einen Kollaps von Replikationsgabeln während der DNA-Replikation zurückzuführen oder werden direkt durch ionisierende Strahlung induziert. Die Hauptreparaturwege, welche DSB reparieren können, sind die fehlerfreie Homologe Rekombinationsreparatur (HRR) oder die fehlerhafte Nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ) (Sung 2018). Als Schadens-Sensor für beide Reparaturmechanismen dient der MRN-Komplex (MRE11, RAD51 und NBS1), der über den Reparaturweg HRR oder NHEJ bestimmt. Dieser Mechanismus ist jedoch noch ungeklärt (Ceccaldi et al. 2016).

Die HRR benötigt als Vorlage das Schwesterchromatid und agiert deshalb nur in S- und G2-Phasen des Zellzyklus. Der Schadenssensor MRN-Komplex bindet an den DSB und durch den intakten DNA-Strang des Schwesterchromatids, welcher als Matritze genutzt wird, kann die Synthese und Ligation des DSB fehlerfrei erfolgen (Ranjha et al. 2018). Hierzu wird das Bruchende der DNA zunächst prozessiert, damit ein Überhang entsteht, der dann durch *Replication Protein A* (RPA) erkannt und geschützt wird. Durch BRAC2 wird ein Austausch von RPA und RAD51 vermittelt, was zur Ausbildung sogenannter RAD51-Filamente führt. Dies ist nötig, um das homologe Gegenstück auf dem Schwesterchromatid zu finden, mit dessen Hilfe dann die Synthese der fehlenden DNA erfolgt, und nach Auflösung dieses Komplexes können die Enden des DSB ligiert werden.

Die NHEJ setzt Doppelstrangbrüche in allen Zellzyklusphasen zusammen. Es gibt zwei Unterwege, die kanonische c-NHEJ (eng. *canonical*) und die alternative alt-NHEJ. Generell ist der Reparaturprozess der NHEJ jedoch sehr fehleranfällig, da sie ohne Vorlage DNA-Enden verknüpft. Der Komplex aus Ku70 und Ku80 bindet an die DNA, schützt sie vor dem Verdau und formt mit der DNA-Proteinkinase (DNA-PK_{CS}) einen Enzymkomplex. Die DNA-Enden müssen vor der Ligation zunächst noch prozessiert werden, damit die Enden zusammengefügt werden können und die DNA-Ligase IV die Endstücke verknüpft (Chang et al. 2017).

2.3 Nukleotid-Exzisionsreparatur

Die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) ist der Reparaturmechanismus, der für die Reparatur der BPDE-DNA-Addukte zuständig ist (Schärer 2013). Dieser Reparaturweg kann sperrige Addukte wie Fotoläsionen durch UV-Licht (6-4PP, 6-4 Pyrimidin-Pyrimidon Fotoprodukt) oder chemische Addukte wie BPDE-DNA ausschneiden (Friedberg 2001; Mullenders und Berneburg 2001). Der NER-Prozess teilt sich in zwei Erkennungsmechanismen, die Globale-Genom-Reparatur (GGR, engl. *global genomic repair*) und die Transkriptionsgekoppelte-Reparatur (TCR, engl. *transcription coupled repair*) (Nadkarni et al. 2016; Hanawalt 2002). Hierbei erkennt die TCR selektiv DNA-Schäden, die die RNA-Polymerase des transkribierten DNA-Stranges von exprimierten Genen blockieren (siehe Abbildung 5). Die GGR ist nicht selektiv und kann DNA-Schäden im gesamten Genom entfernen, jedoch wird sie beeinflusst vom Verpackungszustand des Chromatins (Yu et al. 2016; van Eijk et al. 2018) (siehe Abbildung 6).

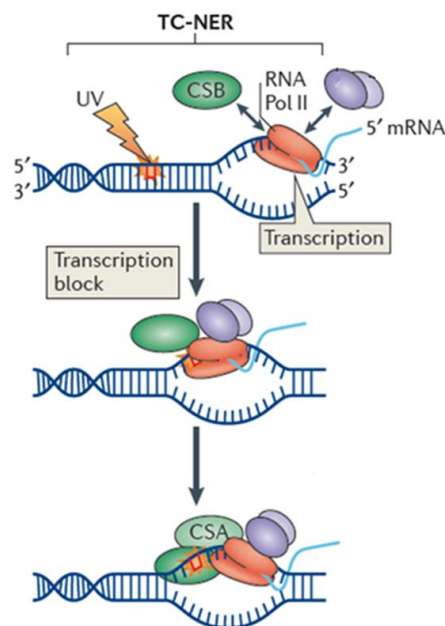


Abbildung 5: Die Transkriptionsgekoppelte-Reparatur (TCR) als einer der zwei Erkennungsprozesse der Nukleotid-Exzisionsreparatur. Ein sperriges Addukt (als Beispiel hier ein 6-4 Pyrimidin-Pyrimidon Fotoprodukt) blockiert die normale Transkription. Der Arrest führt zur Rekrutierung eines Proteinkomplexes aus CSA und CSB. Abbildung modifiziert (Marteijn et al. 2014).

Die Transkriptionsgekoppelte-Reparatur (TCR) wird durch die Blockade der RNA-Polymerase II an der Läsion initiiert. Dadurch werden die Proteine *Cockayne syndrome A* und B (CSA und CSB) rekrutiert, welche benötigt werden, damit weitere Faktoren (UVSSA, USP7, XAB2 und HMGN1) für die Reparatur-Vorbereitung binden können. Die folgenden Schritte der Reparatur sind synchron zu den Schritten der GGR (siehe weiter unten).

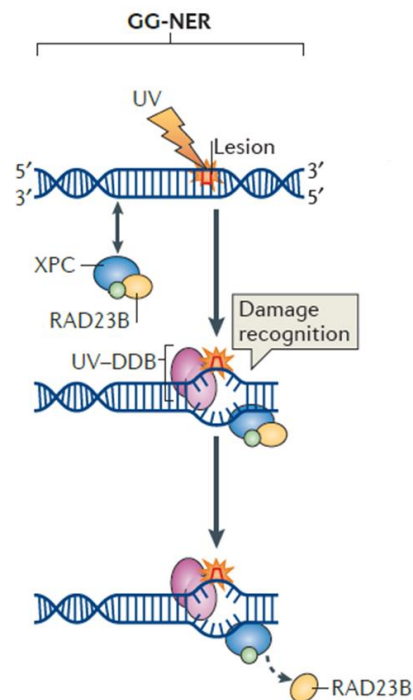


Abbildung 6: Die Globale-Genom-Reparatur (GGR) also einer der beiden Erkennungsmechanismen der Nukleotid-Exzisionsreparatur. DNA Läsionen, am Beispiel eine UV-induziertes Fotoprodukt wie das ein 6-4 Pyrimidin-Pyrimidon Fotoprodukt, werden von einem Proteinkomplex (XPC, DDB2) erkannt. Abbildung modifiziert (Marteiijn et al. 2014).

Die Detektion der Läsion erfolgt bei der GGR mittels des Proteins Xeroderma pigmentosum C (XPC), welches durch RAD23B stabilisiert wird, oder mittels des Proteinkomplexes aus *Damage Specific DNA Binding Protein 1* und *2* (DDB1 und DDB2), welcher die Bindung von XPC ermöglicht. Die weiteren Schritte der Reparatur sind die gleichen wie nach der Erkennung durch die TCR.

In Abbildung 7 sind die gemeinsamen Reparaturschritte der TCR und GGR dargestellt. Die Bindung von XPC bzw. CSA und CSB ermöglicht die Assoziierung von TFIIH, einem

Komplex aus 10 Proteinen, der die zwei DNA Helikasen XPB und XPD enthält, die die DNA Doppelhelix um die Läsion öffnen können. Der *CDK-activating kinase*-Unterkomplex (CAK-Unterkomplex) von TFIIH ist nur für seine Transkription-Initiation-Aktivität wichtig und dissoziiert nach der Bindung an XPC. Der Komplex *Replication Protein A* (RPA)-XPA stabilisiert den Reparatur-Komplex. Die beiden Endonukleasen XPG und *Excision Repair Cross-Complementation Group 1* (ERCC1)-XPF können dann 3' und 5' zur Läsion schneiden. In welcher Reihenfolge diese Einschnitte erfolgen, wird aktuell diskutiert. Es gibt jedoch eindeutige Hinweise darauf, dass der erste Einschnitt durch ERCC1-XPF erfolgt (Fagbemi et al. 2011). Die nun fehlenden DNA-Basen werden über Resynthese mittels DNA Polymerase Pol δ oder Pol η aufgefüllt. Die Ligation der Enden erfolgt über die DNA Ligase Lig I oder Lig III.

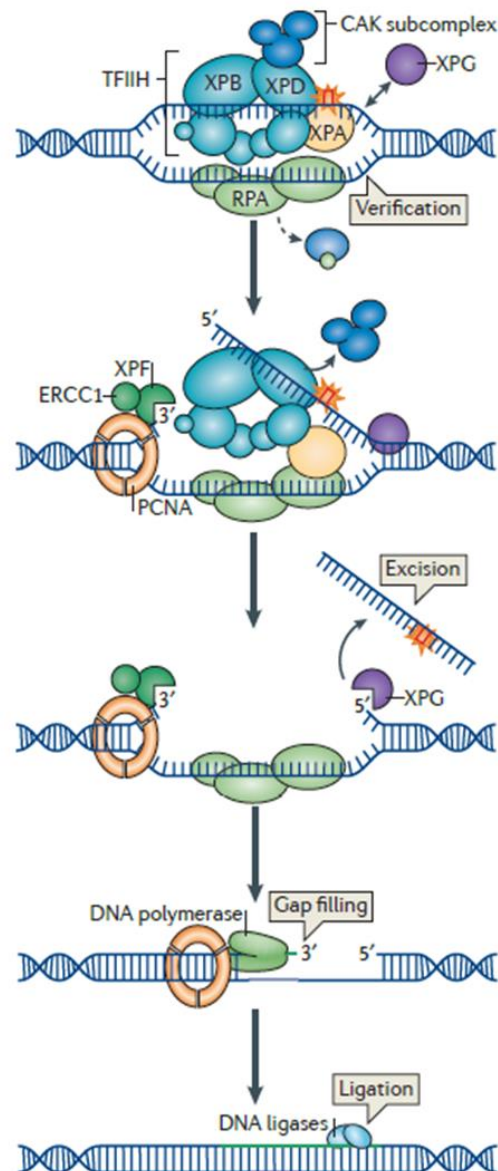


Abbildung 7: Die gemeinsamen Schritte der Transkriptionsgekoppelten- und der Globalen-Genom-Nukleotid-Exzisionsreparatur. Zusammengefasst: Der TFIID-Komplex bindet an die Läsion und XPG und ERCC1-XPF schneiden die Läsion heraus. Die Resynthese erfolgt über DNA Polymerasen Pol δ oder Pol η und die Ligation über Lig I oder Lig III. Abbildung modifiziert (Marteijn et al. 2014).

Auch innerhalb des NER Reparaturmechanismus sind diverse Polymorphismen in der menschlichen Bevölkerung bekannt, wie z.B. in den Proteinen XPA, XPC, XPD, ERCC1, XPF und XRCC1 (Ji et al. 2010; Romanowicz et al. 2017; Xiao et al. 2016), die die Reparatur der BPDE-DNA-Addukte beeinflussen und damit auch die mutagenen Effekte bestärken können. Außerdem sind einige der NER Proteine induzierbar wie z.B. DDB2, XPC, XPF,

XPG und Pol η , was zu einem Schutz vor Folgeschäden durch BPDE beitragen kann (Christmann et al. 2016).

2.3.1 Defekte der NER

Es gibt mehrere bekannte NER-Defekte, die gleichzeitig ein hohes Risiko für die Entwicklung von Krebserkrankungen der Haut aufweisen. Der bekannteste dieser Defekte ist *Xeroderma pigmentosum* (XP), auch Mondscheinkrankheit genannt (Black 2016; Moriwaki et al. 2017; Natale und Raquer 2017). Dieser autosomal rezessiv vererbte Defekt betrifft immer eines der XP-Proteine der NER: XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF oder XPG. Die verschiedenen Subtypen der Erkrankung haben unterschiedlich starke Symptome zur Folge; bei XPA, XPB, XPD und XPG Defekten treten neben den Hautentzündungen und Hautkrebsformen auch neurologische Störungen auf. Das Cockayne-Syndrom ist ebenfalls eine autosomal rezessiv vererbte Krankheit, die die Proteine CSA oder CSB der TCR betrifft (Karikkineth et al. 2017; Natale und Raquer 2017). Symptome des Syndroms sind Kleinwüchsigkeit und vorzeitiges Altern, sowie ebenfalls eine Überempfindlichkeit gegenüber UV-Strahlung. Diese Beispiele von NER-Defekten zeigen auf, wie notwendig und wichtig eine intakte NER für die Prävention von Zellveränderungen, Entzündungen und Krebs ist.

2.4 Werner

Das Werner-Protein (WRN) gehört der Familie der RecQ-Helikasen an: eine der hoch konservierten Gruppen von DNA Helikasen, von denen ebenfalls eine homologe Form in Bakterien und Hefen zu finden ist (RecQ und SGS1). Beim Menschen sind fünf Homologe bekannt: RecQ1, WRN, BLM, RecQ4 und RecQ5 β (siehe Abbildung 8). Die Helikase-Domäne, die alle fünf RecQ-Helikasen gemeinsam haben, kann DNA durch Nukleotid-Hydrolyse entwinden. Weitere Domänen, wie die RQC- (RecQ C-terminal) oder die HRDC-Domäne (Helikase und RNaseD C-terminal) sind nicht in allen Helikasen der Gruppe vorhanden und vor allem für Proteininteraktionen und DNA-Bindung wichtig. Die WRN und BLM Helikase haben außerdem noch eine sehr saure Domäne (engl. *acidic*), die für die Interaktion mit Proteinen wie RPA, welches einzelsträngige DNA bindet, wichtig ist (Doherty et al. 2005).

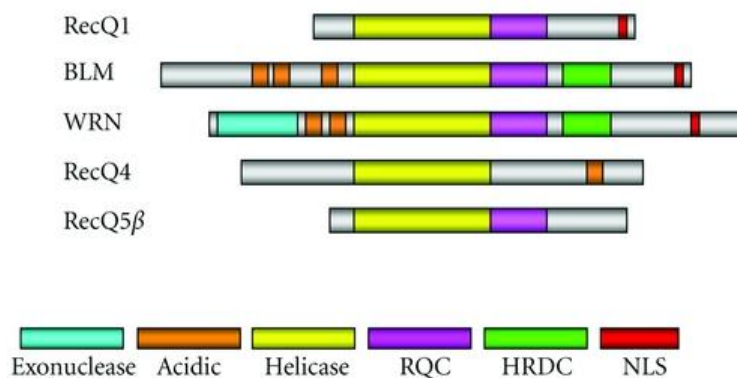


Abbildung 8: Übersicht über die RecQ Helikase Familie und ihre funktionellen Gruppen. RQC = RecQ C-terminal, HRDC = Helikase und RNase D C-terminal, NLS = Zellkernlokalisations-Signal (engl. *nuclear localization signal*). Abbildung modifiziert (Sharma 2011).

WRN beinhaltet als einzige der Helikasen eine Exonuklease-Domäne N-terminal.

2.4.1 Werner-Syndrom

Das Werner-Syndrom ist eine autosomal-rezessive genetische Krankheit, welche vor allem durch Symptome wie vorzeitiges Altern und ein hohes Risiko für Krebserkrankungen charakterisiert ist (Hisama et al. 2015). Außerdem findet man oft

Begleiterkrankungen wie Katarakt, Osteoporose, Diabetes mellitus Typ 2, Atherosklerose und Folgeerkrankungen der Atherosklerose wie die koronare Herzkrankheit. Das vorzeitige Versterben der Werner-Patienten ist meist Folge der Krebserkrankungen oder der Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Die Patienten weisen einen Defekt des WRN-Proteins auf, was auf Zellebene zu Chromosomalen Translokationen, Inversionen und Deletionen in der DNA und einer hohen Spontanmutationsrate führt (Shamanna et al. 2017).

2.4.2 WRN in der DNA-Reparatur

Das WRN-Protein hat vielfältige Funktionen in verschiedenen zellulären Prozessen, wie z.B. in der Replikation, Doppelstrangbruch-Reparatur und Telomer-Erhaltung (Cheng et al. 2007).

Während der Replikation ist das WRN-Protein an der Vorwärtsbewegung der Replikationsgabel, dem Neustart der gestoppten DNA Replikation und dem Schutz der Replikationsgabel mit Hilfe von diversen Interaktionspartnern (z.B. Replikations-Überwachungspunkt-Proteinen wie dem HUS1-9.1.1. Komplex) beteiligt (Ammazzalorso et al. 2010; Cheng et al. 2007; Machwe et al. 2007; Palermo et al. 2016).

WRN soll eine mögliche Rolle in der Doppelstrangbruchreparatur durch HRR und NHEJ innehaben. Es wurde gezeigt, dass WRN mit den wichtigen Faktoren des klassischen NHEJ Reparaturweges KU70/80 und DNA-PK_{CS} interagiert, seine genaue Rolle während der klassischen NHEJ ist noch unklar. Eine weitere Studie zeigt jedoch, dass WRN die Entscheidung zwischen den beiden NHEJ Reparaturwegen, klassisch bzw. alternativ, mit beeinflusst. Seine Anwesenheit am Doppelstrangbruch blockiert MRE11 und fördert so die Reparatur durch den klassischen NHEJ Reparaturweg. Bei der Doppelstrangbruchreparatur durch die HRR interagiert WRN mit einigen Schlüsselproteinen dieses Weges: MRN Komplex, RAD52, RPA, BRCA1 und RAD51.

Neben der Doppelstrangbruchreparatur soll WRN auch eine Rolle in der Reparatur durch die BER spielen, indem es mit einigen wichtigen Faktoren der BER interagiert bzw. die jeweiligen Funktionen der Proteine stimuliert. WRN interagiert mit der Glykosylase NEIL1 und stimuliert und unterstützt sie beim Entfernen von oxidativen DNA-Schäden

(Ahn et al. 2004; Das et al. 2007; Popuri et al. 2010; Harrigan et al. 2006). Außerdem zeigen Studien, dass WRN die Endo-/Exonuklease FEN-1 (engl. *Flap endonuclease 1*) stimuliert, die während der BER und der Replikation aktiv ist (Brosh et al. 2001). PARP-1 wurde ebenfalls als Interaktionspartner von WRN identifiziert, was bei einem WRN Defekt zur fehlenden Poly(ADP-Ribosyl)ation in mit H₂O₂ behandelten Zellen führt (von Kobbe et al. 2003).

Die direkte Interaktion von WRN mit TRF2 (*Telomeric repeat-binding factor 2*), einem Protein, das für den Schutz der Telomere wichtig ist, hilft der Telomer-Aufrechterhaltung, indem es die Helikase Funktion von WRN stimuliert und den Strangtausch zwischen einzelsträngiger DNA und dem Überhang erleichtert (Edwards et al. 2014; Crabbe et al. 2004; Opresko et al. 2002).

2.5 DNA-Schadensantwort

Der Erhalt der genomischen Stabilität ist eine der wichtigsten Aufgaben der DNA-Schadensantwort (DDR, engl. *DNA damage response*) nach einem DNA-Schaden, wie z.B. durch BPDE induziert (Abbildung 9).

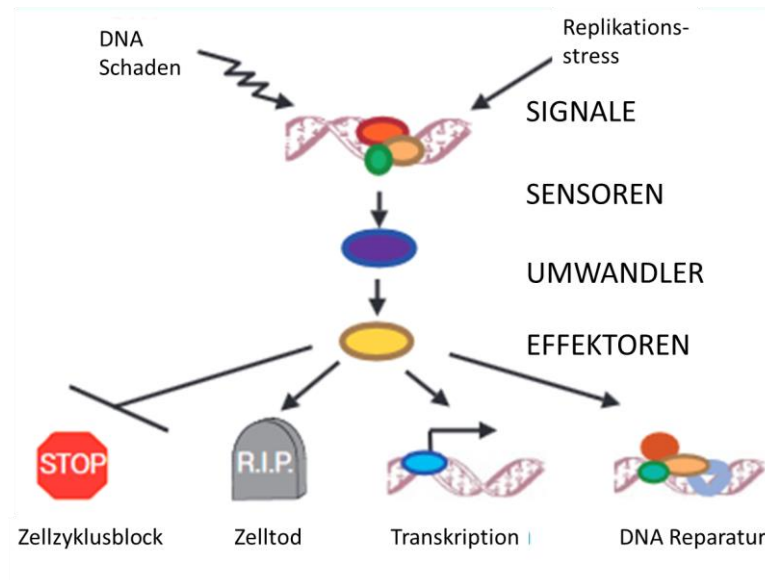


Abbildung 9: Vereinfachte Darstellung der DNA-Schadensantwort. Ein DNA Schaden führt über mehrere Zwischenschritte und über ein hier vereinfacht linear dargestelltes Netzwerk an interagierenden Signalwegen zu einem Zellzyklusblock, Zelltod, DNA-Schaden-induzierte Transkription oder zu DNA-Reparatur. Abbildung modifiziert (Zhou und Elledge 2000).

Die bereits angeführten DNA-Reparatur-Mechanismen (Kapitel 2.2) gehören zu den vielfältigen Antworten der Zelle auf einen Schaden, die über eine komplexe Signalkaskade reguliert werden (siehe Abbildung 9). Über diese Signalkaskade können Reparaturproteine rekrutiert, der Zellzyklus arretiert und Zelltod oder Gentranskription aktiviert werden (Roos und Kaina 2013; Goldstein und Kastan 2015). Wie die Signaltransduktion aussehen kann wird in den folgenden Kapiteln 2.5.1 und 2.5.2 näher beschrieben.

2.5.1 Signaltransduktion zwischen DNA-Schaden und Zellschicksal

Die Signaltransduktion zwischen dem DNA-Schaden und dem Zellschicksal (DNA Reparatur, Zellzyklus-Arrest, Zelltod, Seneszenz) erfolgt hauptsächlich über die Kinasen ATM (eng. *Ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (engl. *Ataxia telangiectasia and RAD3-related*) (Awasthi et al. 2015).

ATM wird hauptsächlich nach Doppelstrangbrüchen aktiviert. Doppelstrangbrüche und eine Aktivierung von ATM erfolgen z.B. bei Rekombinationsprozessen während der Meiose in der Zelle, oder auch durch äußere Einflüsse wie ionisierende Strahlung. Der Doppelstrangbruch wird zunächst durch den MRN-Komplex erkannt, welcher anschließend ATM aktiviert. ATR ist hauptsächlich für die Signaltransduktion nach Einzelstrangbrüchen, z.B. nach einem Replikationsblock, beteiligt. Die einzelsträngige DNA wird zunächst von RPA erkannt und stabilisiert, was wiederum durch das *ATR-interacting protein* (ATRIP) erkannt wird. ATRIP bindet an RPA und rekrutiert ATR an den Einzelstrangbruch. Sowohl ATM als auch ATR sind Serin/Threonin Proteinkinasen der Familie von PIKK-Kinasen. Beide Kinasen phosphorylieren nach ihrer Aktivierung weitere Proteine, die hauptsächlich an der Zellzykluskontrolle, Replikation und DNA-Reparatur beteiligt sind. Werden beispielsweise die Kinasen Chk1 und Chk2 phosphoryliert, führt das zu einem Zellzyklusarrest. Eine Phosphorylierung des Histons H2AX ist wiederum wichtig für die Einleitung der Doppelstrangbruch-Reparatur.

2.5.2 Durch DNA-Schaden induzierter Zelltod: Apoptose und Nekrose

Als Apoptose wird der Prozess des programmierten Zelltods bezeichnet. Es ist ein aktiver, regulierter Ablauf, der Energie benötigt und wichtig ist für die Beseitigung von geschädigten Zellen aus dem Organismus. Die Signalvermittlung kann über einen intrinsischen oder einen extrinsischen Signalweg erfolgen, wobei am Ende der beiden Signalwege die Aktivierung von Caspasen steht, welche die DNA Fragmentierung initiieren. Der intrinsische Signalweg läuft über das Mitochondrium, welches zu Beginn durch einen Stimulus seine Permeabilität verändert und Cytochrom C freisetzt. Der Stimulus geht von den pro-apoptischen Proteinen BAX und BAK aus, welche durch die anti-apoptischen Proteine BCL-2 und BCL-XL reguliert werden. Cytochrom C interagiert

schließlich mit Pro-Caspase-9 und *Apoptotic Protease-activating Factor 1* (APAF-1) und bildet das Apoptosom, welches zur Aktivierung von Effektor-Caspasen führt. Der extrinsische Signalweg verläuft über die Aktivierung von membranständigen Rezeptoren, wie z.B. dem FasR, durch Liganden, wie z.B. FasL, was intrazellulär zu einer Trimerisierung und Rekrutierung des Proteins *Fas-associated protein with death domain* (FADD) führt. Der entstandene *Death-inducing Signaling Complex* (DISC) rekrutiert die Pro-Caspasen 8 und 10, die trans-autolytisch in ihre aktive Form gespalten werden, welche wiederum die Pro-Caspasen 3 und 7 aktivieren können. Ein wichtiges Merkmal von apoptotischen Zellen ist die Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen wie die *Caspase activated DNase* (CAD), sowie die Verlagerung von Phosphatidylserinen an die Zelloberfläche, welche als Nachweis für Apoptose *in vitro* verwendet werden können. Frühere Studien konnten bereits zeigen, dass BPDE Apoptose in Zellen *in vitro* induziert: Mechanistisch induziert BPDE Apoptose über den intrinsischen Signalweg durch Erhöhung der Expression von pro-apoptotischen Proteinen wie p53 und BAK und Verminderung der Expression des anti-apoptotischen BCL-2 bei Dosen von 0,25-2 µM BPDE (Wang et al. 2018). Eine weitere Studie zeigte die Apoptose-Induktion über die Aktivierung von p53 und BAX bei einer Dosis von 0,5-2 µM BPDE (Donauer et al. 2012).

Die Nekrose ist ein weiterer Zelltodmechanismus, jedoch im Gegensatz zur Apoptose nicht bzw. weniger reguliert, nicht energieverbrauchend und Caspasen-unabhängig. Hierbei kommt es durch einen Funktionsverlust der Zellorganellen zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und zum Auflösen der Zellwand, was zu einem Anschwellen und Platzen der Zellen führt. Die Nekrose führt durch die Verteilung des Zellinhaltes außerdem zu einer lokalen Entzündungsreaktion im Organismus. Nekrose ist *in vitro* einfach nachweisbar mittels Propidiumiodid-Färbung, da die aufgeplatzte Zellmembran den Farbstoff ungehindert ins Zellinnere diffundieren lässt, wo er in die DNA interkaliert.

2.5.3 Seneszenz

Seneszenz ist der Zustand eines permanenten Zellzyklusarrests/Zellteilungsstopps, der in Zellen aufgrund von replikationsabhängiger Telomerverkürzung oder durch DNA-

Schäden ausgelöst werden kann. Seneszente Zellen unterscheiden sich in ihrer Morphologie, Biochemie und Chromatinstruktur von anderen Zellen. Vor allem die veränderte Biochemie macht man sich für die Charakterisierung seneszenten Zellen zu Nutze. So ist in diesen Zellen eine erhöhte β -Galaktosidase Aktivität bei saurem pH-Wert festzustellen. Dies wird bei der Bestimmung des Anteils an seneszenten Zellen mittels eines Substrats eingesetzt, das nach der Umsetzung durch die aktive β -Galaktosidase die Zellen blau färbt. Verwendet man hierzu das Substrat X-Gal, welches anschließend lichtmikroskopisch detektiert werden kann. Weiterhin sind seneszente Zellen durch eine Hochregulierung der CDK-Inhibitoren p21^{Cip1/Waf1} oder p16^{INK4a} charakterisiert und es können sogenannte Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci beobachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass 5 mg/kg B[a]P *in vivo* in Ratten und 0,05 μ M BPDE *in vitro* Seneszenz induzieren können (Ling et al. 2018) und dass ein WRN-*Knockdown* ebenfalls Seneszenz in den Zellen induziert (Lu et al. 2014).

2.6 Das Blutgefäßsystem

Unser Blutgefäßsystem ist anatomisch aus drei Schichten aufgebaut: der *Tunica intima* (auch *Tunica interna* genannt), der *Tunica media* und der *Tunica adventitia* (auch *Tunica externa* genannt) (siehe Abbildung 10). Die *Tunica intima* stellt die innerste Schicht unseres Blutgefäßsystems dar und wird gebildet von einer Monozellschicht aus über 10 Milliarden Endothelzellen, die durch eine Basalmembran von den äußeren Schichten abgegrenzt werden.

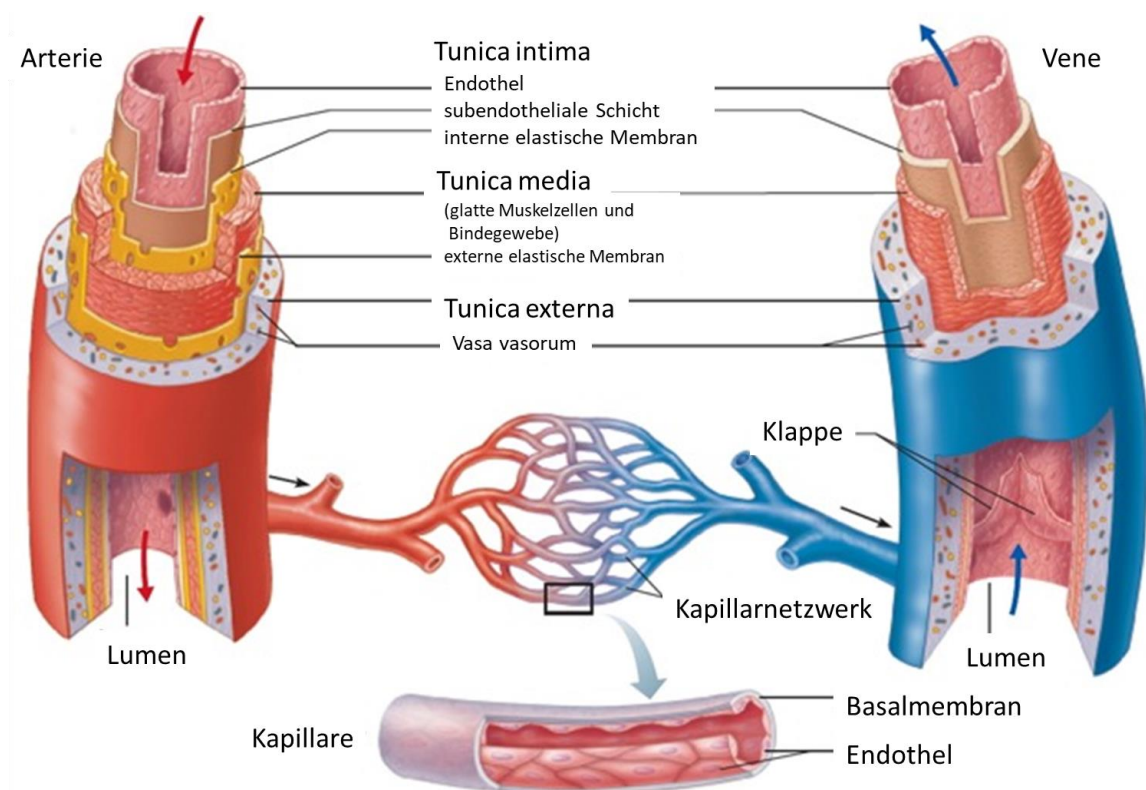


Abbildung 10: Aufbau eines Blutgefäßes unterteilt in Arterie, Vene und Kapillare. Die großen Gefäße bestehen aus den drei Schichten *Tunica intima*, *Tunica media* und *Tunica externa*. Die *Tunica intima* besteht aus dem Endothel und einer Membran, die sie zur *Tunica media* hin abgrenzt. Die *Tunica media* besteht aus einer Muskelschicht, die von dem Bindegewebe der *Tunica externa* umsäumt wird. Die Kapillaren bestehen nur aus Endothel und Basalmembran. Abbildung modifiziert (Homan und Cichowski 2018).

Die *Tunica media* besteht je nach Gefäßgröße aus einer wenig bis gut ausgeprägten Muskelschicht aus glatten Muskelzellen. Diese Schicht wird ebenfalls durch eine

Membran von der *Tunica adventitia* abgetrennt. Die *Tunica adventitia* besteht aus lockerem Bindegewebe zur Einbettung des Gefäßes in die Umgebung, die bei größeren Gefäßen ebenfalls kleine Blutgefäße (*Vasa vasorum*) zur Versorgung der Gefäßwand enthalten kann (Mulvany und Aalkjaer 1990). In den kleinen postkapillaren Venolen findet man als Stützzellen um das Endothel eingebettet in die Basalmembran Perizyten, auch bekannt als Rouget Zellen (Birbrair et al. 2015; Bergers und Song 2005).

Die Endothelzellen regulieren vielfältige Funktionen u.a. die Blutgerinnung, den Blutdruck oder die Wundheilung und haben damit zentrale Aufgaben in unserem Körper. Die glatten Muskelzellen und Perizyten regulieren durch Vasokonstriktion oder Vasodilatation den Gefäßdurchmesser und damit den Blutfluss (Rucker et al. 2000). Sie haben außerdem wichtige Funktionen in Wundheilung und Angiogenese (Majesky et al. 2011; Greenberg et al. 2008). Glatte Muskelzellen und Perizyten stehen über Zell-Zell-Verbindung in Kontakt mit den Endothelzellen (Armulik et al. 2005; Lilly 2014; Darland und D'Amore 2001; Dora 2001).

Werden Stoffe wie B[a]P nach der Aufnahme durch das Blut transportiert, treffen sie auf die Endothelzellen als erste Zellschicht, gefolgt von den glatten Muskelzellen oder den Perizyten. Die Endothelzellen, die glatten Muskelzellen und die Perizyten exprimieren nachweislich die für die Metabolisierung von B[a]P benötigten CYP-Enzyme (Annas et al. 2000; Dubey et al. 2004; Thirman et al. 1994; Palenski et al. 2013).

2.6.1 Atherosklerose

Atherosklerose ist eine progressive Erkrankung der Arterien, die Ursache von Herzerkrankungen und Schlaganfällen ist. Die genaue Ursache für die Entstehung von Atherosklerose ist nicht vollständig geklärt, jedoch ist der Ausgangspunkt ein geschädigtes oder nicht funktionierendes Endothel (Gimbrone und García-Cardeña 2016). Infolgedessen dringt LDL-Cholesterin durch passive Diffusion durch die Verbindungen (engl. *junctions*) der Endothelzellen ein und wird in der *Tunica intima* unter der Endothelzellschicht abgelagert. Die Folge sind Entzündungsreaktionen: die sogenannten Plaques entstehen (Abbildung 11) (Moriya 2019; Pant et al. 2014).

Zunächst binden Monozyten an die Oberfläche der Endothelzellen und migrieren in die *Tunica intima*, wo sie zu Makrophagen ausdifferenzieren, und beginnen die Lipoproteine zu phagozytieren. Sie werden zu Schaumzellen, die mit der Zeit absterben und den nekrotischen Kern der atherosklerotischen Läsion bilden. Innerhalb dieses Prozesses kann es auch zu einer Migration von glatten Muskelzellen kommen, die eine Art Schutzkappe über dem nekrotischen Kern formen (Lusis 2000).

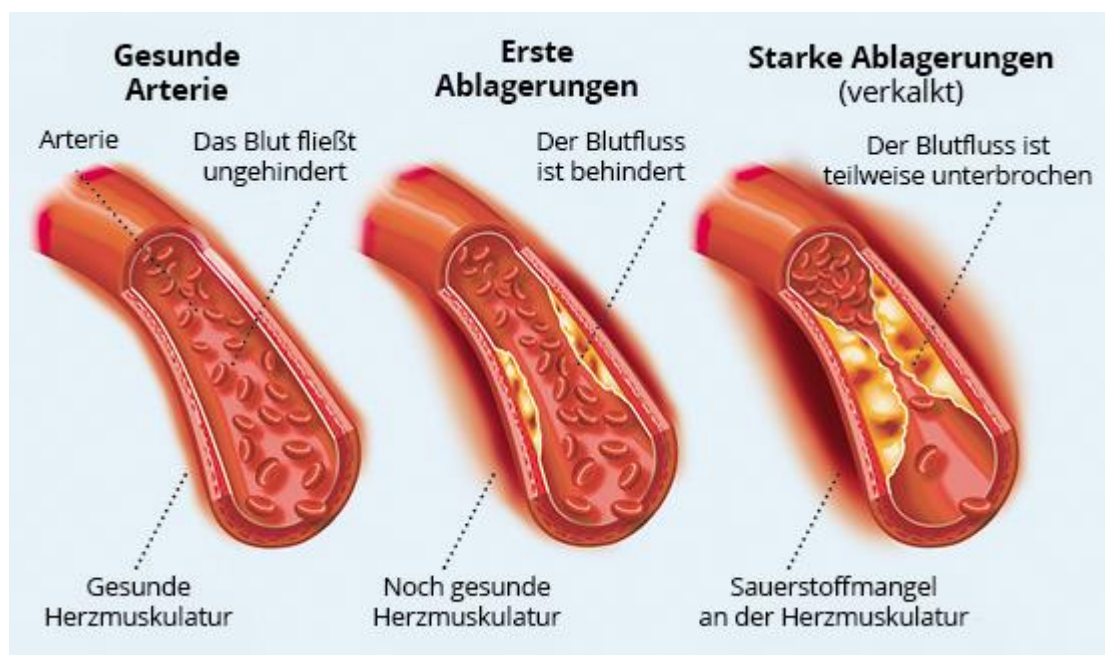


Abbildung 11: Die Stadien der Atherosklerose. In gesunden Arterien lagern sich nach und nach LDL-Cholesterin in der Wand ab, was zu einer Beeinflussung des Blutflusses führt. Bei starken Ablagerungen kann der Blutfluss komplett unterbrochen werden und es kann zu Folgeerscheinungen wie einem Herzinfarkt kommen. Abbildung aus <https://www.cardiosecur.com/de/ihr-herz/fachartikel-rund-um-das-herz/herzinfarkt-myokardinfarkt/>.

Dies ist ein schleichender Prozess und oft auch bei bereits jungen Menschen in den Anfangsstadien vorhanden, jedoch asymptomatisch. Bei ausgeprägten Atherosklerotischen Plaques kommt es nach und nach zu einer Verengung des Gefäßlumens und zu daraus resultierenden Verschlüssen. Die Plaques können außerdem reißen, was zur Entstehung eines Thrombus beiträgt und ebenfalls das Gefäß verschließen kann. Dies führt dazu, dass umliegendes Gewebe nicht mehr mit Sauerstoff versorgt werden kann und sich Narbengewebe bildet. Ist das Herz betroffen kann sich je

nach Menge des betroffenen Herzmuskels eine Herzrhythmusstörung entwickeln oder es kommt sogar zu einem tödlich verlaufenden Herzinfarkt. Es können auch Arterien im Hirn oder in anderen Bereichen des Körpers betroffen sein, was z.B. zu einem Schlaganfall oder anderen Durchblutungsstörungen führen kann.

Allgemein anerkannte Risikofaktoren für Atherosklerose neben Lebensalter, Geschlecht und erhöhten LDL-Cholesterinwerten sind Hypertonie, Diabetes mellitus, Rauchen und das Metabolische Syndrom (Berenson et al. 1998). Dabei stellt vor allem das Rauchen einen Risikofaktor dar, der einfach zu vermeiden ist. Durch das Rauchen soll vor allem die Bioverfügbarkeit von NO sinken, dadurch kann der Blutdruck nicht mehr richtig reguliert werden, und die Endothelzellen können durch zu viel Druck geschädigt werden. Außerdem steigt die Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen und erleichtert eine Bindung von Immunzellen und fördert damit die Entstehung von entzündlichen Bereichen in den Arterien (Messner und Bernhard 2014; DiGiacomo et al. 2018; Siasos et al. 2014).

2.7 Primärzilien

Viele Zellen besitzen ein einzelnes Primärziliom. Das Primärziliom besteht aus 9 + 0 Mikrotubuli-Doubletten und einem Basalkörper, der ein aus dem Zentrum der Zelle abgewandertes Zentriol ist, das Primärziliom in der Zellmembran verankert und sein Auswachsen induziert (siehe Abbildung 12). Deshalb verbleiben die (-)-Enden der Mikrotubuli basal und das (+)-Ende ist zur Zilienspitze ausgerichtet (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012; Ishikawa und Marshall 2011).

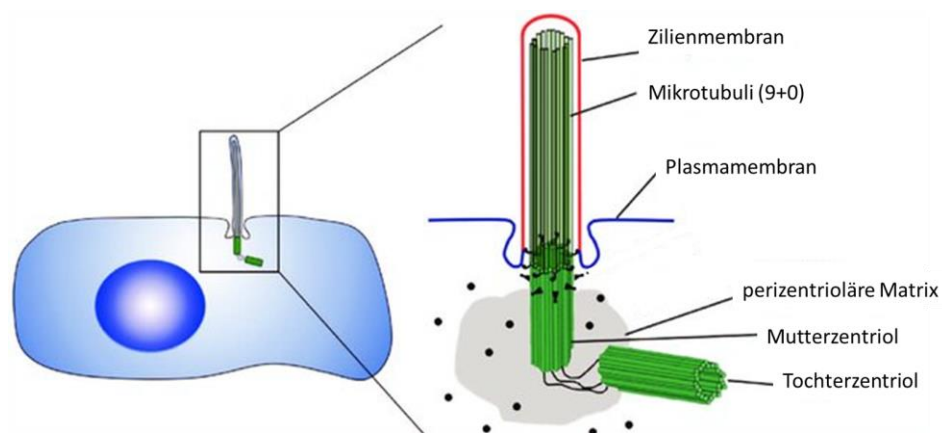


Abbildung 12: Aufbau und Position eines Primärzilioms. Das Primärziliom besteht aus einem Basalkörper, der aus dem Mutter- und Tochterzentriol aufgebaut ist, und daraus entwickelte Mikrotubuli. Es ist in der Zellmembran verankert. Abbildung modifiziert (Mahjoub 2013).

Dieses Primärziliom ist nicht beweglich und hat vor allem eine Funktion als „Antenne“, um mechanische, osmotische oder chemische Reize aus dem Extrazellulärraum in die Zelle zu übertragen. Dazu sitzen auf der Oberfläche des Zilioms besondere Rezeptoren und Ionenkanäle, welche intrazelluläre Signalkaskaden auslösen können, die z.B. Proliferation oder Differenzierung der Zelle beeinflussen können. Während des Zellzyklus verschwindet das Primärziliom, da der Basalkörper und sein angehängtes Tochterzentriol Bestandteil des Zentrosoms werden (Hua und Ferland 2018). Es gibt einige Krankheiten wie z.B. das Bardet-Biedl-Syndrom, die mit einer genetisch bedingten Fehlfunktion der Primärzilien assoziiert werden (Fliegau et al. 2007).

2.7.1 Primärzilien auf den Zellen des vaskulären Systems

Einige Studien konnten zeigen, dass das Primärzilium auf Endothelzellen in Richtung des Blutgefäßlumens gerichtet ist und vor allem als Überwachungssensor des Blutflusses dient. Diese Funktion beruht auf der mechanischen Bewegung des Ziliums im Blutstrom, bei der durch Berührung der Zilienmembran mit der Zellmembran Rezeptoren auf der Zilienoberfläche aktiviert werden (Nauli et al. 2008). Über eine Signalkaskade innerhalb der Endothelzellen kommt es schließlich über Abgabe von NO zu einer Vasodilatation der glatten Muskelzellen und damit zu einer Verringerung des Blutdrucks (Ando und Yamamoto 2013; Mohieldin et al. 2016; Nauli et al. 2011).

Die Primärzilien der glatten Muskelzellen sind ebenfalls hin zu den Endothelzellen ausgerichtet. Auch sie sollen die Funktion der Überwachung des Blutflusses innehaben, können jedoch auch als Signalüberträger der extrazellulären Matrix dienen (Lu et al. 2008). Die Funktion der Blutdruckregulierung sollen die glatten Muskelzellen vor allem dann übernehmen können, wenn das darüberliegende Endothel beschädigt ist und die glatten Muskelzellen direkt dem Blutfluss ausgesetzt werden (Shi und Tarbell 2011).

Primärzilien auf Perizyten sind bisher nicht in der Literatur beschrieben worden.

2.8 Ziel der Arbeit

Es ist bekannt, dass Zigarettenrauch und die darin enthaltenen Genotoxine schädlich für den menschlichen Körper sind und die Ursache (als Initiator wie auch Promotor) für unterschiedliche, mit dem Rauchen assoziierte Krebserkrankungen (wie z.B. Lungenkrebs) darstellen. Auch ist die direkte Assoziation von Rauchen und Atherosklerose erwiesen (siehe Kapitel 2.6.1). Noch unerforscht ist, wie weit die Zellen unseres Blutgefäßsystems von den Auswirkungen dieser Genotoxine geschützt sind bzw. wie hoch ihre Widerstandsfähigkeit in Bezug auf den Metaboliten BPDE von dem im Zigarettenrauch enthaltenen Karzinogen, B[a]P, ist. Die diversen gesunden Zellen des Körpers haben unterschiedlich stark exprimierte DNA-Reparaturenzyme, die teilweise auch induzierbar sind, wie z.B. XPC (siehe Kapitel 2.3). Daher soll in dieser Arbeit untersucht und diskutiert werden, wie sich die Zellen des vaskulären Systems in ihrer Reaktion auf BPDE und der Expression der Nukleotid-Exzisionsreparaturproteine unterscheiden und welchen Einfluss das WRN-Protein auf diese zellulären Reaktionen hat. Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

Im ersten Teil der Arbeit:

- Hat das WRN-Protein einen direkten Einfluss auf die Sensitivität von Endothelzellen/Fibroblasten gegenüber BPDE?
- Ist dieser Einfluss auf schon bekannte von WRN beeinflusste Reparaturwege zurückzuführen?

Im zweiten Teil der Arbeit

- Unterscheiden sich die vaskulären Primärzellen des Endothels (HUVEC), der glatten Muskelzellen (HUASMC) und der Perizyten (hPC-PL) in ihrer Reaktion gegenüber BPDE?
- Kann die unterschiedliche Resistenz der Primärzellen auf Reparatur-Defizite zurückgeführt werden?
- Was für Konsequenzen hat die Sensitivität der primären Endothelzellen auf ihre Funktion?

- Wie beeinflusst BPDE die Anzahl von Primärzellen mit primärem Zilium? Ist die Anzahl zilisierter Zellen mit der DNA Schadensantwort assoziiert und kann diese durch Inhibition der DDR z.B. mit einem Hemmstoff von ATR aufgehoben werden?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die zur Anfertigung dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von der Firma Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) oder von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Die Plastikware wurden von den Firmen Greiner BioOne GmbH (Frickenhausen, Deutschland) und Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) erstanden. Zellkulturmedien und -zusätze wurden von der Firma Life Technologies/Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham (MA), USA) verwendet.

3.1.2 Geräte

Beschreibung	Name	Hersteller
Blotting Kammer	TransBlot Cell	Biorad, Hercules, CA, USA
CO ₂ Inkubator	HeraCell	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
CO ₂ -N ₂ -Inkubator	HeraCell 240i	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Durchflusszytometer	FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Einfrierbox Cryo 1°C Freezing Container	Mr. Frosty	Nalgene (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Elektrophorese Kammer	Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Biorad, Hercules, CA, USA
Fluoreszenz-Mikroskop	Axiovert 35	Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland

Beschreibung	Name	Hersteller
Gefrierschrank (-20°C)	Premium NoFrost	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Heizblock	Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
iCelligence	iCelligence	ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA
Infrarot Imaging System	Odyssey 9120	LI-COR, Bad Homburg, Deutschland
Konfokales Mikroskop	LSM 710	Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland
Kühlschrank (+4°C)		Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Kühlzentrifuge	Refrigerated 5402	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Laborschüttler		Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Roll-Inkubator	SRT6/SRT9	Stuart, Stone (Staffordshire), UK
Spektrometer	NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Stromversorgung	PowerPac HC	Biorad, Hercules, CA, USA
Tiefkühlschrank (-80°C)		Sanyo, München, Deutschland
Ultraschallgerät	Branson Sonifier 250	Branson Ultrasonics Corporation, Danbury (CT), USA
Vortex Mixer	VORTEX 1	VWR, Darmstadt, Deutschland

Beschreibung	Name	Hersteller
Vortex Mixer	Vortex-Genie	Bender & Hobein GmbH, Ismaning, Deutschland
Wasserbad	3044	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Zentrifuge	Hereaus Megafuge 1.0	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Zentrifuge	Microcentrifuge Sprout	Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA

3.1.3 Software

Software	Entwickler
Cell^A-Imaging Software für Life Science Microscopy	Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Deutschland
Citavi Version 6.0.0.2	Swiss Academic Software GmbH
Comet IV Software	Perceptive Instruments Ltd. Bury St. Edmunds, UK
GraphPad Prism Version 6	GraphPad Software, La Jolla (CA), USA
ICE Software	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
iCelligence RTCA Data Analysis 1.0.0.1304	ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA
Image Studio Lite 5.2	LI-COR, Lincoln (NE), USA
ImageJ	U.S. National Institutes of Health, Bethesda (MD), USA

Software	Entwickler
ModFit LT 3.3	Verity Software House Inc, Topsham (ME), USA
MS Office Version 365	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
Odyssey Version 3.0	LI-COR, Lincoln (NE), USA
ZEISS ZEN Imaging Software 2.1	Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Plastikmaterial, soweit nicht steril vom Hersteller bezogen, wurde 30 min bei einem Überdruck von 1 bar und einer Temperatur von 121°C autoklaviert. Unsterile Lösungen wurden steril filtriert (0,45 µm Filter), oder mit dem Flüssigkeits-Programm (20 min, 1-2 bar/120°C) im Autoklaven sterilisiert.

3.2.1.1 Zelllinien

Primärzellen	Medium	Herkunft
HUVEC	Endothelial Cell Growth Medium 2 (Ready-to-use) C-22011	C-12203, PromoCell
HUASMC	Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 (Ready-to-use) C-22062	C-12500, PromoCell
hPC-PL	Pericyte Growth Medium (Ready-to-use) C-28040	C-12980, PromoCell
Zelllinien	Medium	Herkunft
EA.hy926	DMEM + 10 % FCS + 1 % HAT	CRL-2922, ATCC Manassas, VA, USA
VH10tert	DMEM + 10 % FCS + 1 % L-Glutamin	
LN229	DMEM + 10 % FCS	CRL- ATCC Manassas, VA, USA

Bei HUVEC (Endothelzellen aus der Nabelschnurvene, engl. *human umbilical vein endothelial cells*), HUASMC (glatte Muskelzellen aus der Nabelschnurarterie, engl. *human umbilical arterie smooth muscle cells*) und hPC-PL (Perizyten aus der Plazenta, engl. *human pericytes placenta*) handelt es sich um humane Primärzellen, die bei

PromoCell käuflich erworben wurden. EA.hy926 ist eine Fusionszelllinie aus der Lungenkarzinomzelllinie A549 und primären HUVEC. VH10tert sind humane primäre Fibroblasten, isoliert aus der männlichen Vorhaut, die durch die stabile Transfektion mit h-TERT (humane Telomerase Reverse Transkriptase, engl. *human telomerase reverse transcriptase*) immortalisiert wurden.

3.2.1.2 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der Primärzellen erfolgte im Inkubator bei 37°C, 7 % O₂ und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit den entsprechenden Medien. Die Zellen wurden routinemäßig subkonfluent passagiert und maximal bis zur 15. Passage kultiviert.

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in Zellkulturschalen in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) angereichert mit 10 % fötalem Kälberserum (engl. *fetal calf serum*, FCS) im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Auch die Zelllinien wurden routinemäßig subkonfluent passagiert.

Zum Passagieren oder Aussäen der Zellen wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellschicht mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, engl. *Phosphate buffered saline*) gewaschen, bevor sie durch Zugabe von 0,5 mg/ml Trypsin-0,2 mg/ml EDTA₄Na-Lösung abgelöst wurde. Durch frisches Medium wurde dieser Ablösungsprozess gestoppt und die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 1000 rpm, RT). Nach Aufnahme der Zellen in ihrem spezifischen frischen Medium wurden sie mit Hilfe der Neubauer Zählkammer gezählt und anschließend zur Weiterkultivierung oder für Experimente ausgesät. Bei den Primärzellen war darauf zu achten, dass sie immer in der gleichen Zelldichte ausgesät wurden, um ein stetiges Wachstum im exponentiellen Bereich zu gewährleisten: HUVEC mit 5.000-10.000 Zellen/cm², HUASMC mit 7.500-10.000 Zellen/cm² und hPC-PL mit 3.000-4.000 Zellen/cm² nach Herstellerangaben. Die Zellzahl wurde bei den Zelllinien so gewählt, dass auch über einen längeren Inkubationszeitraum ein exponentielles Wachstum, sofern nicht von der Behandlung gestört, ermöglicht wurde.

Zum Erhalt der Zellen wurden außerdem Zellpellets in Einfriermedium (Medium + 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Diese Röhrchen wurden in einer Einfrierbox (Kühlungsrate: 1°C/ min) auf -80°C abgekühlt und anschließend zur Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff (Gasphase) überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen zügig mit Hilfe von etwas Handwärme aufgetaut und, sobald sie pipettierbar waren, in 10 ml vorgewärmtes Medium überführt. Nach einer Zentrifugation von 2 min (1.000 rpm, RT) wurde der Überstand abgenommen und dieser Waschvorgang wiederholt, um das zytotoxische DMSO, das als Kälteschutzmittel für die Konservierung genutzt wurde, zu entfernen.

3.2.2 Behandlung mit BPDE

Benzo[a]pyren-7*R*,8*S*-dihydrodiol-9*S*,10*R*-epoxid [(+)-anti-BPDE, kurz: BPDE] wurde in Tetrahydrofuran mit 5 % Triethylamin gelöst und bei -80°C gelagert. Die Stockkonzentration betrug 1 mM, von der vor Gebrauch, falls nötig, eine frische Verdünnung mit PBS hergestellt wurde. Um den Zellen Zeit zu geben vollständig anzuheften und das Medium zu konditionieren, wurden sie zwei Tage vor der Behandlung (t=-48 h) ausgesät. Die Behandlung mit BPDE erfolgte durch direkte Zugabe ins Zellkulturmedium mit einer Endkonzentration von 0,25-1,5 µM. Je nach Versuchsansatz erfolgte anschließend eine Inkubation von 1-96 h.

3.2.2.1 Inhibitoren

Mit Hilfe von verschiedenen DNA Schadensantwort-Inhibitoren (DNA Schadensantwort= DDR, engl. *DNA damage response*), die den Zellzyklus kontrollieren, wurde deren Einfluss auf den Abbau der Primärzilien nach BPDE Behandlung untersucht. Dazu wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.8.1 beschrieben ausgesät und 1 h vor der Zugabe von BPDE mit den Inhibitoren (siehe Tabelle 1) inkubiert.

Tabelle 1: Liste der Inhibitoren

Präparat	Hersteller	Ziel	Konzentration	Endkonz.
Chk2-Inhibitor II	Sigma-Aldrich, Karlsruhe, Deutschland	Chk2	10 mM in DMSO	10 μ M
KU-55933	Selleckchem, Houston (TX), USA	ATM	10 mM in DMSO	10 μ M
Mirin	Tocris, WI-Nordenstadt, Deutschland	MRE11	25 mM in DMSO	25 μ M
MK-8776	Selleckchem, Houston (TX), USA	Chk1	5 mM in DMSO	0,3 μ M
Pifithrin- α	Sigma-Aldrich, Karlsruhe, Deutschland	p53	1 mM in DMSO-PBS	30-50 μ M
VE-822	Selleckchem, Houston (TX), USA	ATR	10 mM in DMSO	10 μ M
NSC 617145	Sigma-Aldrich, Karlsruhe, Deutschland	WRN	1 mM in H ₂ O, 10 % DMSO	1 μ M

3.2.3 Transiente Transfektion

Mit Hilfe der transienten Transfektion konnte das Werner-Protein (WRN) temporär durch einen siRNA (kleine eingreifende RNA, engl. *small interfering RNA*) *Knockdown* ausgeschaltet werden. Dazu wurden die Zellen ebenfalls 48 h vor Transfektion ausgesät und bei einer 60-70 % Konfluenz mit Lipofectamin RNAiMAX (ThermoFisher) nach Herstellerangaben transfiziert. Als Transfektionskontrolle wurde eine nicht-kodierende siRNA verwendet. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für die angeschlossenen Experimente ausgesät und 48 h nach der Transfektion mit BPDE behandelt. Die *Knockdown* Kontrolle erfolgte mittels Western Blot Nachweis.

Eine weitere Möglichkeit nur die Funktion WRN-Proteins zu inhibieren, ohne das Protein zu entfernen, stellt die Behandlung mit einem Inhibitor dar. Hierzu wurde der Inhibitor NSC 617145 (Sigma-Aldrich) (weiterhin im Text als WRNi bezeichnet) verwendet.

3.2.4 Zellwachstum und Zellzyklusbestimmungen

3.2.4.1 iCelligence

Das iCelligence System (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA) kann zur Analyse der Proliferation von Zellen genutzt werden. Hierzu erfolgt die Kultivierung der Zellen in E-Plates, welche mit Mikroelektroden ausgestattet sind. Durch die Mikroelektroden wird ein sogenannter Zell Index gemessen, welcher aus dem Widerstand der Lochplatte mit den Zellen gegen den Hintergrundwiderstand mit dem Medium allein besteht. Die Aussaat und Analyse der Zellen wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und anschließend mit der dazugehörigen Software (RTCA Data Analysis) ausgewertet.

3.2.4.2 MTT

Beim MTT-Assay handelt es sich um einen Test zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen. Das MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird dabei von den lebenden Zellen verstoffwechselt und als Endprodukt zu Formazan ((*E,Z*)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan), einem blau-violetten Farbstoff, reduziert. Die Farbstoffkonzentration von Formazan kann dann über die Absorption gemessen werden, dabei gilt, je höher die Absorption, desto mehr MTT wurde von den Zellen reduziert. Für den MTT-Assay wurde eine 96-Loch Platte verwendet und pro Well 3.000 Zellen in 200 µl Medium ausgesät. Die Zellen wurden behandelt und bei Standardbedingungen für 72 h weiter kultiviert. Nach Ablauf der 72 h wurde das Medium von den Zellen abgenommen und neues mit MTT versetztes Medium (1:10) auf die Zellen gegeben, welche dann während einer Inkubationszeit von 2-4 h das MTT zu Formazan reduzieren konnten. Nach der Inkubation wurde das MTT-Medium abgenommen und die MTT-Entfärbelösung (Isopropanol, 0,04 mM HCl) auf die Zellen gegeben, welche den gebildeten Farbstoff aus den Zellen löst. Die Menge des reduzierten MTTs konnte dann mit Hilfe des Plate Readers bei 570 nm gemessen werden.

3.2.4.3 Zellzyklusanalyse: Propidiumiodid Färbung

Die Bestimmung der Zellzyklusverteilung basiert auf dem unterschiedlichen DNA-Gehalt der verschiedenen Zellzyklusphasen. Apoptotische Zellen schnüren membranumhüllte Chromatinfragmente ab und besitzen deshalb im Vergleich mit G1-Phase-Zellen (2n) einen reduzierten DNA-Gehalt. M- und S-Phase-Zellen besitzen einen bis zu doppelten DNA-Gehalt, G2-Phase Zellen einen doppelten DNA-Gehalt (4n). Mit Hilfe des Nukleinsäureinterkalators Propidiumiodid (PI) und der Durchflusszytometrie kann der DNA-Gehalt der einzelnen Zelle und damit die Zellzyklus-Phase bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen zunächst abgelöst und pelletiert. Anschließend wurden sie in 150 µl PBS resuspendiert und mit 4 ml Ethanol fixiert und permeabilisiert für mindestens 20 min bei -20°C. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 1.500 rpm, RT) wurde das Zellpellet in 250 µl PBS/Ribonuklease A (RNase A) (30 µg/ml) resuspendiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach dem RNA-Verdau wurde die DNA mit 150 µl PI (50 µg/ml) gefärbt und durchflusszytometrisch am FACS Calibur (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) quantifiziert. Hierzu wurden mindestens 10.000 Zellen/Probe analysiert.

3.2.5 Zytotoxizitätsbestimmungen

3.2.5.1 Koloniebildungstest

Um die klonogene Überlebensrate nach Behandlung mit BPDE und mit und ohne *Knockdown* von WRN zu untersuchen, wurden exponentiell wachsende Zellen vereinzelt, in einer definierten Zellzahl in 6 cm-Kulturschalen ausgesät und 8 h danach behandelt. Nach einer Inkubation von 12-14 Tagen wurde das Medium entfernt, die angehefteten Zellen mit PBS gespült und die Kolonien mit Methanol-Essigsäure-Wasser (1:1:8, V:V:V) für 30 min fixiert. Anschließend wurden die Kolonien mit 1,25 %Giemsa/0,125 % Kristallviolett gefärbt (20 min) und mit Leitungswasser gespült. Kolonien, die sich mindestens aus 20 Zellen zusammensetzten, wurden gezählt. Die Überlebensraten, unter Berücksichtigung der jeweiligen Plattierungseffizienz, wurden relativ zur unbehandelten Kontrolle berechnet.

3.2.5.2 Apoptose/Nekrose: Annexin V/PI Doppelfärbung

Die lebende, apoptotische und nekrotische/spät-apoptotische Fraktion einer Zellpopulation kann mithilfe der Annexin V/PI-Doppelfärbung bestimmt werden (Vermees et al. 1995). Es werden lebende Zellen untersucht. Die Identifikation erfolgt bei apoptotischen Zellen über das Phosphoglycerid Phosphatidylserin (PS), das auf die Außenseite der Plasmamembran transloziert und so zugänglich für Annexin V wird. Da die Plasmamembran der Zellen intakt ist, kann das Propidiumiodid (PI) nicht in die Zellen eindringen und in die DNA interkalieren. Apoptotische Zellen sind folglich Annexin V-positiv und PI-negativ. Die Plasmamembran nekrotischer Zellen verliert ihre Integrität und wird permeabel. Annexin V sowie PI können daher in die Zellen eindringen und von der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran an PS binden sowie die DNA markieren. Folglich sind nekrotische Zellen sowohl Annexin V als auch PI positiv. Nekrotische Zellen können nicht von spät-apoptotischen Zellen unterschieden werden. Da sich apoptotische Zellen von der Kulturschale lösen, wurde sowohl der Überstand gesammelt als auch adhärenente Zellen mithilfe von Trypsin-EDTA geerntet. Nach Sedimentierung wurden die Zellen in 50 µl Annexin-Bindepuffer mit 2,5 µl Annexin V-FITC-Lösung resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation im Dunkeln und auf Eis wurde den Proben 200 µl Annexin-Bindepuffer und 10 µl PI (50 µg/ml) hinzugefügt und in FACS Röhren überführt. Die Proben wurden mittels Durchflusszytometrie am FACS Calibur analysiert.

3.2.5.3 Comet Assay

Die Einzelzellgelelektrophorese, auch bekannt unter dem Namen *Comet Assay*, erlaubt die Detektion von DNA Schäden in einzelnen Zellen. DNA Einzelstrangbrüche (ESB), welche als Reparaturintermediat in der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) vorkommen, werden mit Hilfe des alkalischen *Comet Assay* bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass die Mobilität von Nukleinsäuren im elektrischen Feld mit abnehmender Größe des Fragments zunimmt, sodass in Agarose eingebettete Zellkerne mit fragmentierter DNA nach Beendigung der Gelelektrophorese einen Kometenschweif (engl. *comet tail*) zu haben scheinen. Die Zellen wurden dazu nach BPDE Behandlung

trypsiniert, in 0,5 % Niedrigschmelzpunkt-Agarose eingebettet und auf Agarose-Objektträger transferiert. Die Objektträger wurden anschließend für 55 min bei 4°C in Lyse-Puffer inkubiert (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10 % DMSO, 1 % Triton X, pH 10). Nach der Überführung in den Lauf-Puffer (0,3 M NaOH, 6 mM EDTA, pH > 13) wurde die DNA für 20 min bei 4°C entwunden und die Elektrophorese durchgeführt (22 min, 0,74 V/cm, 300 mA, 4°C). Nach dreimaligem Waschen in Neutralisations-Puffer (0,4 M Tris, pH 7.5) wurden die Proben in 100 % Ethanol für 10 min bei RT fixiert, luftgetrocknet und mit 50 µg/ml Propidiumiodid gefärbt. Die Kometenschweife wurden mittels Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus BX50, mit ColorView Kamera (Olympus, Münster, Germany)) quantifiziert. Mindestens 50 Zellen wurden pro Probe und Experiment gezählt (Comet IV Software (Perceptive Instruments Ltd., Bury St Edmunds, UK)). Der DNA Schaden wurde gemessen als *Tail*-Intensität in Prozent, was der Summe aller Pixel innerhalb eines DNA-Schweifes (engl. *comet tail*) entspricht:

$Tail\text{-Intensität (\%)} = (\text{Intensität des DNA-Schweifes} / \text{Intensität der DNA der Zelle}) \times 100$

3.2.6 Seneszenz: X-Gal

Die Untersuchung der Seneszenz erfolgte indirekt über die Bestimmung der Seneszenz-assoziierten-β-Galaktosidase (SA-βGal)-Aktivität, durch die Umsetzung eines β-Gal-Substrates bei pH 6. Die Zellen wurden in 6-Loch Platten ausgesät, behandelt, über 96 h inkubiert und nach Herstellerangaben mittels des Senescence β-Galaktosidase Cell Staining Kits (Cell Signaling Technology, B. V.; Leiden, Niederlande) fixiert und gefärbt. Als β-Gal-Substrat wurde das chromogene 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) eingesetzt. Die β-Gal hydrolysiert X-Gal zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol, welches anschließend zum tiefblauen 5,5`-Dibrom-4,4`-dichlor-indigo oxidiert. Die Proben wurden anschließend mikroskopiert und fotografiert.

3.2.7 Proteinanalysen

3.2.7.1 Proteinextraktion

Zur Proteinextraktion wurde das verbrauchte Medium der Zellen abgenommen und mit PSB gewaschen. Die Zellen wurden anschließend direkt in der Kulturschale in SDS-Probenpuffer (62,5 mM TRIS HCl (pH 6,8), 10 % Glycerin, 5 % β -Mercaptoethanol, 2 % SDS und 0,01 % Bromphenolblau) lysiert. Nach der Ultraschallbehandlung (3 x 10 Pulse bei *duty cycle* 40 % und *output control* 4) wurden die Lysate bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der relative Proteingehalt der Lysate wurde durch Densitometrie der Ladekontrollen (β -Aktin oder HSP90) nach erfolgter SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Westernblotting und Immundetektion bestimmt. Nach der densitometrischen Bestimmung der Ladekontrollen wurde das Volumen des Lysats so angepasst, dass die Proben eine vergleichbare Menge des Ladeproteins zeigten.

3.2.7.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) ist eine Methode zur Trennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld. Nach der Denaturierung der blauen Lysate bei 95°C für 5 min wurden 20-40 μ l Extrakt auf das Gel geladen, zusammen mit einem Proteinmarker zur späteren Bestimmung der Proteingröße (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA). Das Gel bestand aus einem Sammelgel (126 mM TRIS-HCl (pH 6,8), 4 % Acrylamid/Bisacrylamid, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,1 % TEMED), an dessen Grenze zum Trenngel (375 mM TRIS-HCl (pH 8,8), 5-15 % Acrylamid/Bisacrylamid, 0,1 % SDS, 0,05 % APS, 0,05 % TEMED) sich zunächst die Proteine sammelten, bevor sie ins Trenngel übergingen und dort elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Die Spannung wurde hierzu

bei 80-135 V angelegt und in 1x Laufpuffer (50 μ M TRIS, 384 mM Glycin, 0,1 % SDS) bis zur gewünschten Auftrennung durchgeführt.

3.2.7.4 Immun-Blot – Western-Blot

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulose Membran (Protan, Amersham, GE Healthcare, Dassel, Deutschland) übertragen, mittels Blotting-Puffer (50 mM TRIS, 384 mM Glycin, 20 % Methanol) bei konstanter Stromstärke. Der Transfer erfolgte bei 100 mA für 16 h bei 4°C. Zur Verifizierung der Transfers wurde die Membran in einer PonceauS-Lösung (0,1 % PonceauS, 5 % Essigsäure) für 1 min inkubiert, die überschüssige Lösung entfernt und die Membran in TBS-T (20 mM TRIS-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,1 % Tween-20) gewaschen. Nach Entfernung der Färbelösung wurden unspezifische Antikörperbindestellen an der Membran blockiert mit 5 % BSA oder 5 % fettfreiem Milchpulver in TBS-T für 1 h. Die Inkubation mit den Primärantikörper (siehe Tabelle 2) erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach dem Waschen der Membran in TBS-T (3 x 5 min, RT) wurden ungebundene Antikörperreste entfernt und die Membran anschließend für 1-2 h in Dunkelheit bei RT im entsprechenden Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2) inkubiert. Ungebundene Reste wurden erneut durch Waschen entfernt (3 x 5 min in TBS-T, RT, lichtgeschützt). Das Fluoreszenzsignal des an einen Infrarot-Farbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpers wurde mittels des LI-COR® Odyssee-Systems analysiert und mittels Densitometrie quantifiziert (ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda (MD), USA).

Tabelle 2: Antikörper für den Immun-Blot

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Primäre Antikörper			
CYP1A1 (B-4)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
DDB2 (2246C4a)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
DNA Ligase I (C-5)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
DNA Ligase III (E-7)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Primäre Antikörper			
DNA pol δ 2 (D-7)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
DNA pol δ cat (A-9)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
DNA pol ϵ A (D-10)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
DNA pol ϵ B (C-9)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
ERCC1	Maus	1:500	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
E-Selektin (CTB202-)	Maus	1:200	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
ET-2 (3B4-1C5)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
ETAR (16)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
Flk-1/VEGFR (D-8)	Maus	1:1000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
HSP90 α/β (F-8)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
ICAM-1 (15.2)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
MCP-1 (5J)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
p53 (DO-I)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
PDGFR- α (C-9)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
PECAM-1 (D-11)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
phospho-Chk1 ^{Ser345}	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
phospho-Chk2 ^{Thr68}	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
phospho-p53 ^{Ser15} (D4S1H)	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
phosphor-p53 ^{Ser46}	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
POL H (B-7)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
VCAM-1 (E-10)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Primäre Antikörper			
WRN (20A11.1)	Maus	1:200	Merck/Millipore, Billerica (MA), USA
XPA	Maus	1:1000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
XPC (D-10)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
XPF (F-11)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
XPG (8H7)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
XRCC1	Kaninchen	1:400	Abcam, Cambridge, UK
β-Aktin (C-20)	Maus	1:1.000	Santa Cruz, Dallas (TX), USA
Sekundäre Antikörper Infrarot-Farbstoff gekoppelt			
IRDye anti-Kaninchen IgG 680CW	Esel	1:10.000	LI-COR®, Lincoln (NE), USA
IRDye anti-Kaninchen IgG 800CW	Esel	1:10.000	LI-COR®, Lincoln (NE), USA
IRDye anti-Maus IgG 680CW	Esel	1:10.000	LI-COR®, Lincoln (NE), USA
IRDye anti-Maus IgG 800CW	Esel	1:10.000	LI-COR®, Lincoln (NE), USA
Sekundäre Antikörper Peroxidase-gekoppelt			
IgG Kaninchen	Esel	1:4.000	Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, USA
IgG Maus	Esel	1:2.000	Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, USA

3.2.8 Immunfluoreszenz

Zur Detektion von γ H2AX-Foci in proliferierenden Zellen wurden die Zellen auf sterile Deckgläschen (\varnothing 10 mm) in 24-Loch Platten ausgesät. 20 min vor Behandlung mit BPDE wurden die Zellen nach Herstelleranleitung mit EdU inkubiert (siehe Tabelle 3), damit Zellen, welche zu dem Zeitpunkt DNA neu synthetisieren, durch das Einfügen des Thymidin-Analogen EdU markiert wurden. Anschließend wurde frisches Medium und 0,5 μ M BPDE zugegeben. Nach entsprechender Inkubationszeit wurde das Medium erneut entfernt und die Zellen 10 min bei -20°C mit Methanol-Aceton (7:3) fixiert und permeabilisiert. Nach Re-Hydrierung in PBS (3 x 5 min) wurde die Click-iT Reaktion nach Herstellerangaben durchgeführt und danach unspezifische Antikörperbindestellen mit 10 % Ziegen-Serum in PBS blockiert (1 h, RT). Der γ -H2AX Antikörper wurde 1:1.000 in PBS/ 0;3 % Triton-X-100 verdünnt und auf die Deckgläschen gegeben (über Nacht, 4°C). Ungebundene Antikörperreste wurden durch Waschen in PBS entfernt (3 x 5 min), die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte lichtgeschützt mit dem an Alexa Fluor[®]488 gekoppelten Antikörpern (siehe Tabelle 3) für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen (3 x 5 min PBS) wurden die Zellkerne für 15 min mit TO-PRO[®]-3 (1 μ M in PBS) gefärbt und in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingedeckt und mit Nagellack versiegelt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte am konfokalen LSM 710. Die Foci wurden mittels ImageJ quantifiziert.

Tabelle 3: Antikörper für Immunfluoreszenzanalysen

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Primäre Antikörper			
γ H2AX	Maus	1:1.000	Merck/Millipore, Billerica, MA, USA
53BP1	Kaninchen	1:1.000	Bethyl Laboratories, Inc.
Click-iTTM EdU Alexa 488 Imaging Kit		nach Hersteller- angaben	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Sekundäre Antikörper			
F(ab'2) anti-Maus IgG, Alexa Fluor 488 gekoppelt	Ziege	1:400	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
F(ab'2) anti-Kaninchen IgG, Alexa Fluor 555 gekoppelt	Ziege	1:400	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA

3.2.8.1 Primärzilien

Zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von Primärzilien wurden die Zellen zunächst konfluent auf Deckgläschen ausgesät und für mindestens 48 h inkubiert, bis sie vollständig kontaktinhibiert waren. Anschließend wurden die Zellen zusätzlich noch für mindestens 48 h im serumfreien Medium mangelernährt. Die Fixierung der Zellen erfolgte in 4 % PFA (Paraformaldehyd) für 10 min bei RT mit anschließendem Waschen in PBS (3 x 5 min). Mit der Inkubation in 50 mM NH₄Cl (10 min, RT) wurde eine mögliche Fluoreszenz des PFA entfernt und die Zellen anschließend mit PBS-T (PBS/ 0,3 % Triton-X-100) permeabilisiert. Unspezifische Antikörperbindestellen wurden mit 10 % Ziegen-Serum in PBS-T blockiert (1 h, RT). Die Antikörper (siehe Tabelle 4) wurde 1:800 in PBS verdünnt und auf die Deckgläschen gegeben (über Nacht, 4°C). Ungebundene Antikörperreste wurden durch Waschen in PBS entfernt (3 x 5 min), die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte lichtgeschützt mit den gekoppelten Antikörpern (siehe Tabelle 4) für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen (3 x 5 min PBS) wurden die Zellkerne für 15 min mit TO-PRO®-3 (1 µM in PBS) gefärbt und in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingedeckt und mit Nagellack versiegelt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte am konfokalen LSM 710. Die Zilien wurden mittels ImageJ quantifiziert.

Tabelle 4: Antikörper für Immunfluoreszenzanalysen der Primärzilien

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Primäre Antikörper			
ac. Tubulin	Maus	1:800	Sigma
Arl13b	Kaninchen	1:800	Proteintech
Sekundäre Antikörper			
F(ab'2) anti-Maus IgG, Alexa Fluor 488 gekoppelt	Ziege	1:400	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
F(ab'2) anti-Kaninchen IgG, Alexa Fluor 555 gekoppelt	Ziege	1:400	ThermoFisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA

3.2.9 Genexpression – Real-time PCR

Die *real time* Polymerasekettenreaktion (*real-time* PCR, übersetzt: Echtzeit PCR)) ermöglicht die Messung genspezifischer mRNA. Hierzu wurde mit Hilfe des Kits NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben RNA Extrakte aus Zellpellets gewonnen. Die RNA wurde in RNase-freiem Wasser gelöst und mittels Spektrometer (NanoDrop 2000; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) ihre Reinheit und Konzentration gemessen. 1 µg RNA wurde dann verwendet, um mit dem Verso cDNA Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) durch reverse Transkription cDNA herzustellen. Die gewonnene cDNA wurde anschließend für die PCR Reaktion genutzt (Endverdünnung 1:6). Die Primer wurden in einer Endkonzentration von 250 nM zugegeben. Für die Amplifikation und Messung wurde ein Mastermix (SensiMix SYBR® & Fluorescein Kit, Bioline, London, UK) verwendet, mit einer DNA Polymerase, dNTPs, MgCl₂ (Endkonzentration 4 mM) und dem SYBR® grün Fluorophor.

Die PCR Konditionen waren 50°C für 2 min, Polymerase Aktivierung bei 95°C für 10 min, Amplifizierungszyklen von 10 sec bei 95°C Denaturierung, 20 sec bei 56°C für Annealing und Elongation für 20 sec bei 72°C. SYBR® grün Fluoreszenz wurde nach jedem Zyklus gemessen. Nach 45 Zyklen wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt bei Temperaturen von 65-95°C. Die relativen cDNA Level wurden mit Hilfe der Bio-Rad CFX manager Software analysiert.

Tabelle 5 Liste der Primer

Gen	Orientierung	Sequenz
<i>DDB2</i>	vorwärts	TGTAGCCTGGATGTGTTCT
	rückwärts	GCATTCTGAGATTCCAAAGC
<i>XPC</i>	vorwärts	ACACCTACTACCTCTCAA
	rückwärts	TAAATAGCAAATCTCCTTTCC
<i>CDKN1A (p21)</i>	vorwärts	TACATCTTCTGCCTTAGT
	rückwärts	TCTTAGGAACCTCTCATT
<i>GAPDH</i>	vorwärts	CATGAGAAGTATGACAACAG
	rückwärts	ATGAGTCCTTCCACGATA
<i>ACTB</i>	vorwärts	TGGCATCCACGAAACTACC
	rückwärts	GTGTTGGCGTACAGGTCTT

3.2.10 BPDE-DNA-Addukt Bestimmung

Die BPDE-DNA Bestimmung wurde freundlicherweise von Dr. Alberto Izzotti (Universität Genua) durchgeführt. Hierzu wurden Zellen behandelt und ihre DNA mittels des peq Gold DNA Kit (VWR, Radnor, PA, USA) isoliert. Die DNA Konzentrationen wurden mit dem Spektrometer (NanoDrop 2000) gemessen und zwei Mal 6 µg pro Probe in ein

Reaktionsgefäß aliquotiert und verblindet zu Dr. Izzotti geschickt. Dort wurde die Analyse der BPDE-DNA-Addukte mittels radioaktiver Markierung gemessen.

3.2.11 Migrationstest

Der Migrationstest oder auch Wundheilungstest (engl. *scratch wound healing assay*) beruht darauf, dass Zellen in einen künstlich gezogenen Riss der Zellmonoschicht migrieren können. Dazu wurden die Zellen konfluent ausgesät und nach 24 h mit Hilfe einer Pipettenspitze ein Riss in die Zellschicht gekratzt. Anschließend wurden die abgekratzten Zellen gewaschen und die Zellen für 8-24 h unter Standardbedingungen mit oder ohne Zugabe von BPDE inkubiert. Der Riss wurde nach 0 h, 6 h und 8 h oder nach 0 h, 16 h und 24 h je nach Zelltyp fotografiert (Axiovert 35, Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland) und der Abstand zwischen den Rissrändern mit Hilfe von ImageJ quantifiziert.

3.2.12 Statistik

Die Datenpunkte wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) gebildet, wenn nicht anders beschrieben. Für den Vergleich zweier Gruppen wurde der t-Test genutzt und die berechneten p-Werte dargestellt für: p-Wert<0,05*, p-Wert<0,005**, p-Wert<0.001***. Für die Durchführung der statistischen Tests wurde die Software GraphPad Prism Version 6 genutzt.

4 Ergebnisse

Das Endothel bildet die innerste Schicht der Blutgefäße. Umrundet von Muskelzellen formt es arterielle Gefäße, oder umrandet von Perizyten formt es venöse Kapillaren. Besonders das Endothel ist in die Entstehung vieler Krankheiten involviert, wie z.B. in den chronisch entzündlichen Prozess der Atherosklerose.

Das genotoxische Benzo[a]pyren-7*R*,8*S*-Dihydrodiol-9*S*,10*R*-Epoxid (BPDE) ist die aktivierte Form von Benzo[a]pyren, einem polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff, der bei unvollständigen Verbrennungen organischen Materials entsteht und somit weit verbreitet ist. BPDE ist sehr reaktiv und kann die exozyklische Aminoposition *N*2 von Guanin der DNA (BPDE-*N*²-dG) binden, was eine Läsion verursacht, die durch die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) repariert wird.

Das autosomal rezessive Werner Syndrom, bei dem ein Defekt des WRN-Gens vorliegt, verursacht vorzeitiges Altern und führt meist wegen einer höheren Tumorinzidenz oder atherosklerotischen Veränderungen (Myokardinfarkt, Apoplexie) zum vorzeitigen Tod. Das WRN-Protein ist an einigen DNA-Reparatur-Prozessen, wie der Doppelstrangbruchreparatur und der Basen-Exzisionsreparatur beteiligt, was dazu führt, dass ein Defekt des WRN-Proteins die Mutationsrate steigen lässt.

In dem folgenden Kapitel 4.1 wurden zunächst die Einflüsse des WRN-Proteins auf Zelltod und andere Mechanismen nach Behandlung mit BPDE in der Endothelzelllinie EA.hy926 und humanen Fibroblasten VH10tert im Vergleich untersucht. Im zweiten Teil (Kapitel 4.2) lag der Schwerpunkt in einer vergleichenden Untersuchung von humanen Primärzellen des Endothels (HUVEC), humaner primärer Muskelzellen (HUASMC) und humaner primärer Perizyten (hPC-PL) auf die Exposition von BPDE.

4.1 Einfluss des WRN-Proteins auf die Sensitivität von Endothelzellen und Fibroblasten nach DNA-Schadensetzung

Zur Untersuchung der Sensitivität von WRN-Wildtyp Zellen und WRN-*Knockdown* Zellen gegenüber verschiedenen Agenzien wurde zunächst ein Modell entwickelt, um den Einfluss des WRN-Proteins untersuchen zu können. Hierzu wurde die humane endothel-ähnliche Zelllinie EA.hy926 und humane Fibroblasten VH10tert verwendet und mit siRNA gegen WRN transient transfiziert. Der *Knockdown* wurde mittels Westernblotanalyse nachgewiesen (Abbildung 13).

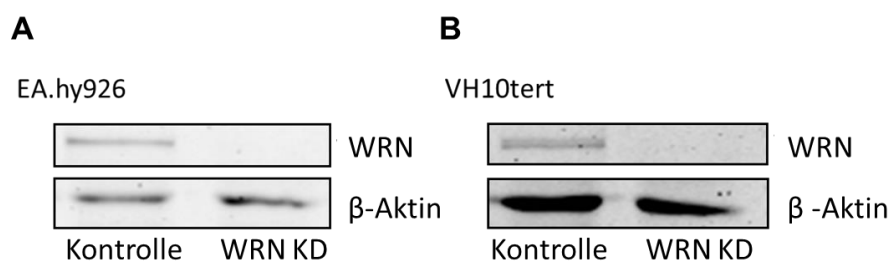


Abbildung 13: Nachweis des erfolgreichen WRN-*Knockdown* in EA.hy926 (A) und VH10tert (B) Zellen. Die Herunterregulation von WRN auf Proteinebene wurde mittels Western Blot überprüft. Die Westernblotanalyse des WRN-Proteins in Gesamtzellextrakten nach Transfektion mit zufälliger siRNA (Kontrolle) oder WRN spezifischer siRNA (WRN KD). β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Um zu überprüfen, ob die Agentien TMZ, MMS, CCNU und BPDE die Zell-Viabilität (gemessen an ihrer enzymatischen Aktivität) der beiden Zelllinien EA.hy926 und VH10tert beeinflussen und ob das WRN-Protein auf diesen Effekt signifikanten Einfluss hat, wurde zunächst ein MTT-Test durchgeführt. Wie in Abbildung 14 zu sehen, konnten bei Behandlung mit 100 μ M TMZ, 40 μ M CCNU und 1 mM MMS nach 72 h Inkubation keine signifikanten Unterschiede der Viabilität zwischen der Kontrolle und dem WRN-*Knockdown* in beiden Zelllinien festgestellt werden. Nur die Behandlung mit 0.75 μ M BPDE erzielte in beiden Zelllinien einen signifikanten Unterschied in der Viabilität; in beiden Zelllinien war der WRN-*Knockdown* weniger sensitiv gegenüber der Behandlung, weshalb in den folgenden Untersuchungen der Schwerpunkt auf der Behandlung der zwei Zelllinien mit BPDE gelegt wurde.

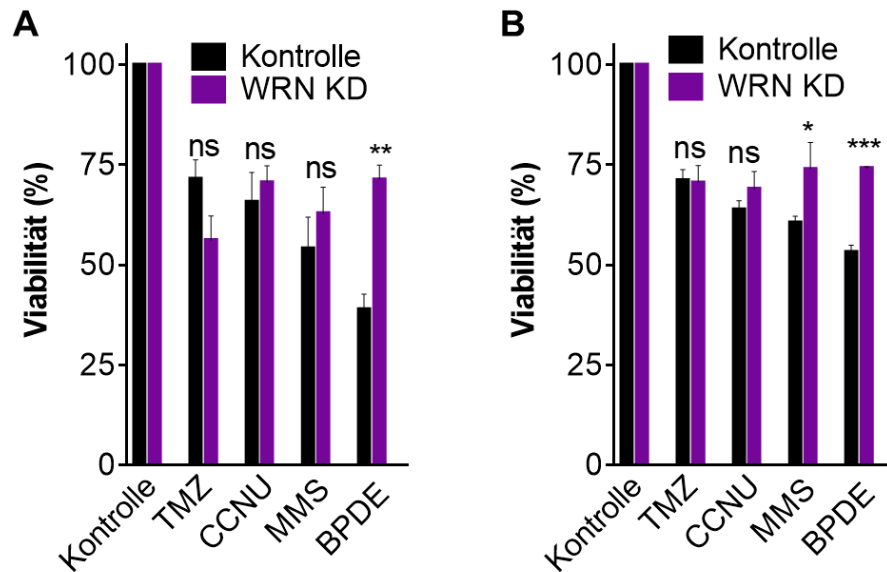


Abbildung 14: Einfluss von TMZ, CCNU, MMS und BPDE auf die Viabilität der Endothelzelllinie EA.hy926 und der Fibroblasten VH10tert ± WRN-Protein. Prozentual dargestellt sind mittels MTT-Test ermittelte Viabilitäten nach Behandlung mit 100 μ M TMZ, 40 μ M CCNU, 1 mM MMS und 0.75 μ M BPDE an EA.hy926 (A) und VH10tert (B). Die Viabilität wurde auf die unbehandelte Kontrolle (100 %) normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels zweifaktorieller ANOVA und dem Post-hoc-Test nach Šidák berechnet: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

4.1.1 Untersuchung der Sensitivität gegenüber BPDE

Nachdem die Beeinflussung der Viabilität durch das WRN-Protein nach BPDE-Behandlung festgestellt wurde, wurde eine Dosisabhängigkeit geprüft. Hierzu wurde erneut ein MTT-Test durchgeführt, bei dem die Zelllinien mit oder ohne WRN-*Knockdown* über 72 h mit BPDE inkubiert wurden. Die Messung wurde auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Abbildung 15 zeigt, dass die Endothelzellen EA.hy926 im Trend nach WRN-*Knockdown* eine bessere Viabilität zeigten als die Kontrollzellen, jedoch war dies nur für die Dosis von 0,75 μ M BPDE signifikant (Abbildung 15A). Die humanen Fibroblasten VH10tert zeigten diese Tendenz ebenfalls, und es war hier für den ganzen Dosisbereich von BPDE eine Signifikanz festzustellen (Abbildung 15B).

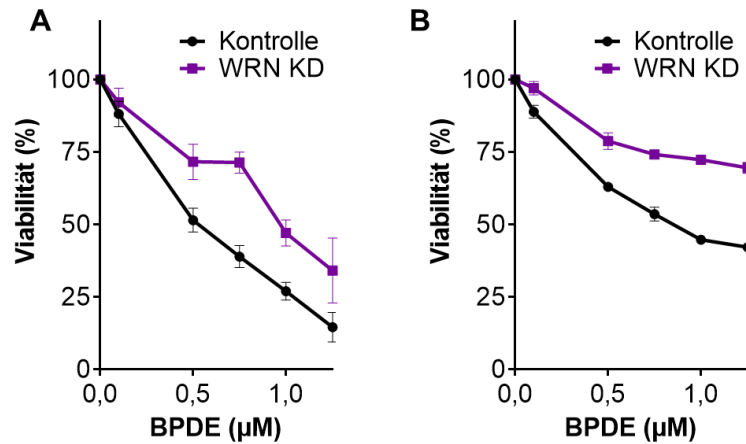


Abbildung 15: Einfluss von BPDE auf die Viabilität der Endothelzelllinie EA.hy926 und der Fibroblasten VH10tert ± WRN-Protein. Prozentual dargestellt ist mittels MTT-Tests ermittelte Viabilität nach Behandlung mit BPDE an EA.hy926 (A) und VH10tert (B) in steigenden Dosen. Die Viabilität wurde 72 h nach BPDE-Behandlung gemessen und auf die unbehandelte Kontrolle (100 %) normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

Um anschließend den Einfluss des WRN-Proteins auf die Sensitivität der Zelllinien gegenüber BPDE zu testen, wurde mittels Koloniebildungstests das Überleben der Endothelzelllinie EA.hy926 und der Fibroblasten VH10tert jeweils konzentrationsabhängig untersucht (Abbildung 16).

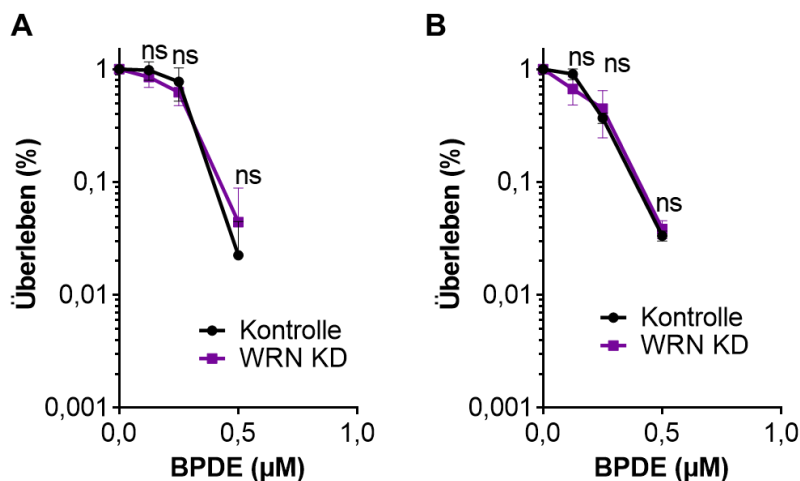


Abbildung 16: Koloniebildungstest nach BPDE Behandlung mit der Endothelzelllinie EA.hy926 und den Fibroblasten VH10tert ± WRN-Protein. Dargestellt ist die mittlere Überlebensrate nach der Behandlung mit BPDE (EA.hy926 (A) und VH10tert (B)). Die Überlebensrate wurde auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels zweifaktorieller ANOVA und dem Post-hoc-Test nach Šidák berechnet.

Hierzu wurden die mittleren Überlebensraten nach Behandlung mit BPDE auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert und semi-logarithmisch gegen die Konzentration aufgetragen. Weder die EA.hy926-Zellen noch die VH10tert-Zellen zeigten eine Abhängigkeit von WRN, jedoch eine BPDE-konzentrationsabhängige Abnahme der Überlebensrate generell. Zusammenfassend reagierten beide Zelllinien ähnlich sensitiv auf die Behandlung mit BPDE.

4.1.2 WRN-Knockdown verstärkt die BPDE-induzierte Apoptose

Endothelzellen und Fibroblasten reagieren auf eine BPDE-Behandlung durch die Induktion von Apoptose. Für diesen Versuch wurde eine BPDE Konzentration von 1,5 μM gewählt, da in dem Viabilität-Test die Tendenz zu sehen war, dass der Unterschied zwischen WRN-Knockdown und Kontrolle bei den VH10tert-Zellen mit höherer Dosis anstieg.

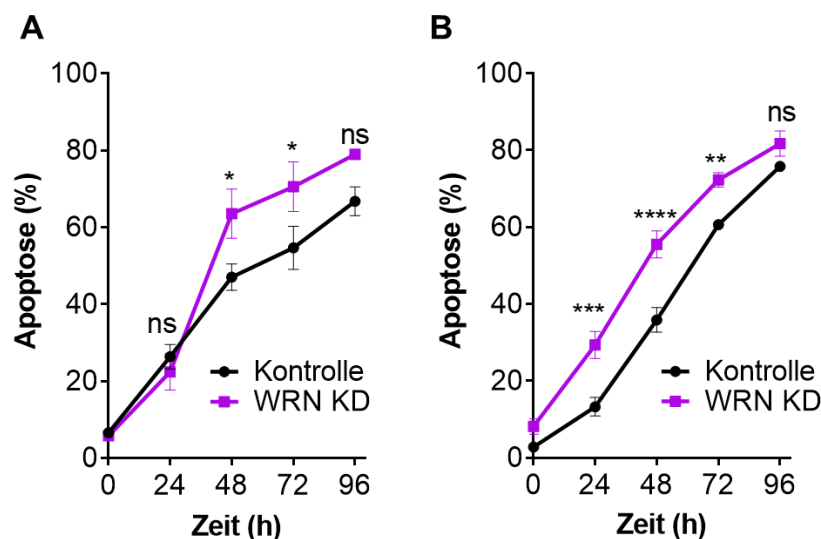


Abbildung 17: Einfluss des WRN-Proteins auf den BPDE-induzierten Zelltod in EA.hy926- und VH10tert-Zellen. Mittels PI-Färbung wurden apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nach der Behandlung mit BPDE (1,5 μM) bestimmt. Dargestellt ist der Zelltod quantifiziert anhand der SubG1-Population für EA.hy926- (A) und VH10tert-Zellen (B). Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten, die Signifikanz wurde mittels zweifaktorieller ANOVA und dem Post-hoc-Test nach Šidák berechnet: ns = nicht signifikant; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Die Induktion des Zelltods ist zeitabhängig in Abbildung 17 dargestellt. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit BPDE behandelt und 24-96 h später für die Zelltodmessung geerntet. Beide Zelltypen reagierten mit einem Anstieg des Zelltods über die Inkubationszeit, wobei der Unterschied zwischen WRN-*Knockdown* und Kontrolle in beiden Zelllinien signifikant war. In den EA.hy926-Zellen (Abbildung 17A) betrug der Unterschied zwischen WRN-*Knockdown* und Kontrolle nach 48, 72 und 96 h jeweils bis zu 17 % (48 h 17 %; 72 h 16 %; 96 h 12 %) mehr Zelltod in den WRN-*Knockdown* Zellen. In den VH10tert-Zellen (Abbildung 17B) betrug der Unterschied zwischen WRN-*Knockdown* und Kontrolle nach 24, 48 und 72 h jeweils bis zu 20 % (24 h 16 %; 48 h 20 %; 72 h 12 %) mehr Zelltod in den WRN-*Knockdown* Zellen.

4.1.3 ESB akkumulieren nach BPDE-Behandlung in den WRN-*Knockdown* Zellen

Während der Reparatur von BPDE-DNA-Läsionen entsteht, wie zu Beginn beschrieben (2.3), ein Einschnitt in der DNA neben der Läsion, welcher nach der Durchführung einer alkalischen Einzelzellgelelektrophorese fluoreszenzmikroskopisch als Einzelstrangbruch (ESB) detektiert werden kann. Der WRN-*Knockdown* beeinflusst die Akkumulation von ESB wie in Abbildung 18 gezeigt wird. Vor allem im höheren Dosisbereich konnten signifikant mehr ESB in EA.hy926 (Abbildung 18B: nach 0,75; 1,2 und 1,5 μM BPDE) und VH10tert-Zellen (Abbildung 18D: nach 1,5 μM BPDE) nachgewiesen werden. Repräsentative Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen einer unbehandelten, behandelten (1,5 μM BPDE) Kontroll- und WRN-*Knockdown*-Zelle sind in Abbildung 18A (EA.hy926) und Abbildung 18C (VH10tert) dargestellt.

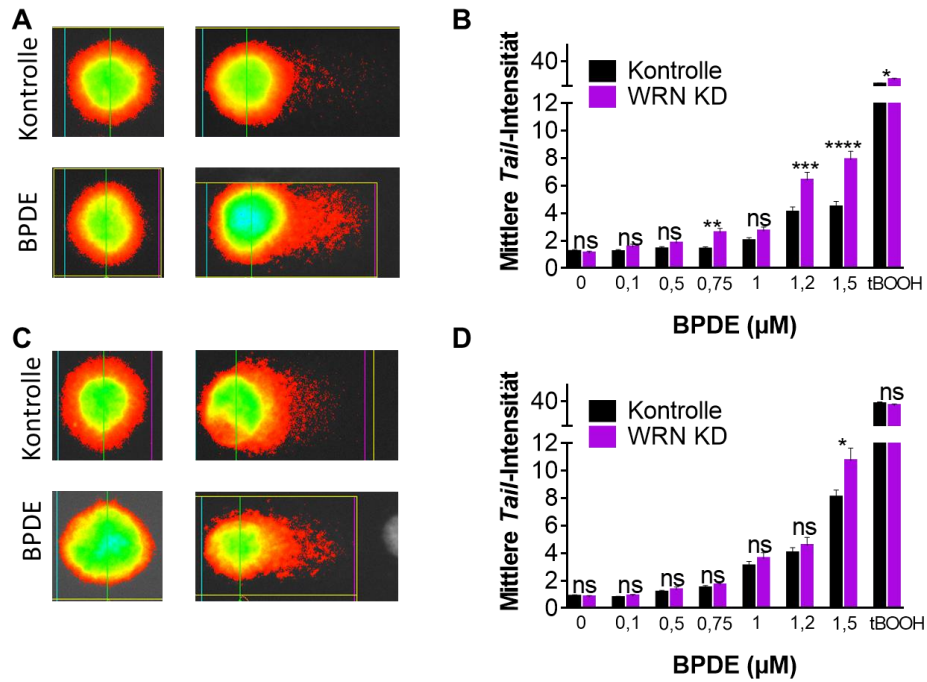


Abbildung 18: BPDE-induzierte Einzelstrangbrüche in Endothelzellen und Fibroblasten ± WRN-Protein. Mittels alkalischer Einzelzellgelelektrophorese wurden BPDE-induzierte Einzelstrangbrüche (ESB) in den EA.hy926-Zellen (A+B) und VH10tert-Zellen (C+D) fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Mikroskopische Aufnahmen einer unbehandelten Zelle (Kontrolle) und einer mit 1,5 µM BPDE behandelten Zelle sind exemplarisch in (A+C) gezeigt. Die Zellen wurden mit verschiedenen Dosen BPDE behandelt. 2,5 h nach Zugabe von BPDE zum Medium wurden die Zellen "geerntet" und dem *Comet-Assay* unterzogen. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte ± SEM der *Tail-Intensitäten* aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem t-Test berechnet: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$, ns=nicht signifikant.

4.1.4 WRN-Inhibitor bestätigt die Daten des WRN-Knockdown

Die Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese wurden mit Hilfe eines WRN-Inhibitors in EA.hy926-Zellen überprüft. Hierzu wurde der Inhibitor zunächst in unterschiedlichen Dosierungen auf seine Toxizität analysiert. Wie in Abbildung 19 zu sehen, konnte keine Zunahme der Apoptose- oder Nekrosefrequenz in EA.hy926-Zellen nach Behandlung mit aufsteigenden WRN-Inhibitor-Dosen festgestellt werden. Daraus folgt, dass der Inhibitor in dem untersuchten Dosisbereich nicht toxisch ist.

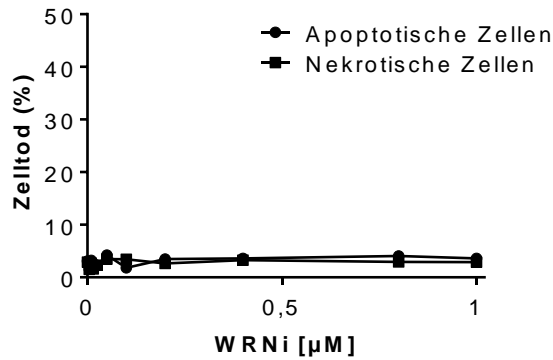


Abbildung 19: WRN Inhibitor verursacht keine Toxizität in EA.hy926-Zellen. Mittels Annexin V/ PI-Färbung wurden Apoptose- und Nekrosefrequenz von EA.hy926-Zellen durchflusszytometrisch 72 h nach der Behandlung mit aufsteigenden Dosen WRN-Inhibitor bestimmt.

Die anschließend durchgeführte Einzelzellgelelektrophorese zeigte für die Zellen, in denen das WRN-Protein mittels des WRN-Inhibitors gehemmt wurde, einen ähnlichen Effekt auf die auftretenden ESB nach BPDE-Behandlung wie in den Zellen, in denen WRN durch die siRNA ausgeschaltet wurde (Abbildung 20).

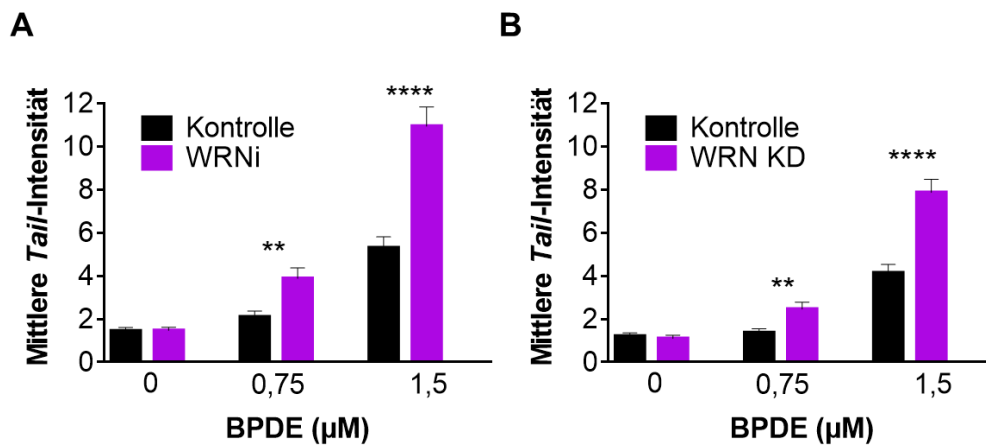


Abbildung 20: BPDE-induzierte Einzelstrangbrüche in Endothelzellen ± WRN Inhibitor. Mittels alkalischer Einzelzellgelelektrophorese wurden BPDE-induzierte Einzelstrangbrüche (ESB) in den EA.hy926-Zellen fluorezenzmikroskopisch detektiert. Die Zellen wurden mit verschiedenen Dosen BPDE (2,5 h) behandelt. Die Zellen wurden entweder mit WRNi vorbehandelt (1 µM, 1 h; A) oder es erfolgte ein *Knockdown* mit siRNA (B). Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte ± SEM der *Tail*-Intensitäten aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaartem t-Test berechnet: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$, ns=nicht signifikant.

Bei beiden Dosen BPDE konnten mit der Zugabe des WRN-Inhibitors signifikant mehr ESB als in den Kontrollzellen nachgewiesen werden.

4.1.5 Untersuchung des Einflusses des WRN-Knockdowns auf BPDE-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche

Bisher wurde noch nicht gezeigt, dass BPDE DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) induziert. Es ist bekannt, dass DNA-Schäden, welche die Replikation blockieren, zu einem Replikationsgabel-Kollaps und damit zu der Entstehung von DSB beitragen (Vare et al. 2012). Studien konnten außerdem belegen, dass das WRN-Protein an der Reparatur von DSB durch die HRR und NHEJ beteiligt ist (siehe Einleitung 2.4.2). In dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass der WRN-Knockdown die Reparatur von den durch BPDE-induzierten DSB beeinflusst. Eine seit Jahren etablierte Methode zum Nachweis von DSB ist die immunzytochemische Detektion von γ H2AX-Foci.

Um die Entstehung von BPDE-induzierten DSB und den Einfluss des WRN-Proteins auf deren Reparatur zu analysieren, wurde die Induktion von γ H2AX-Foci immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Hierzu wurden EA.hy926-Zellen und VH10tert-Zellen mit oder ohne WRN-Knockdown nach der Behandlung mit BPDE (1 μ M) nach 16 bzw. 24 h fixiert und spezifisch gefärbt. Es konnten BPDE-induzierte DSB in den Zellen nachgewiesen werden.

Repräsentative Aufnahmen der Zellkerne (blau) und der γ H2AX-Foci (grün) 16 bzw. 24 h nach Behandlung mit 1 μ M BPDE in EA.hy926-Zellen sind in Abbildung 21A dargestellt. Die entsprechende Quantifizierung (Abbildung 21B) zeigte, dass die Induktion von γ H2AX-Foci in den Kontrollzellen nach 16 h mit 23 γ H2AX-Foci/Zelle höher war, als in den WRN-Knockdown-Zellen mit 14 γ H2AX-Foci/Zelle. Nach 24 h reduziert sich die Anzahl der Foci/Zelle in den Kontrollzellen signifikant auf 12 γ H2AX-Foci/Zelle, während in den WRN-Knockdown-Zellen keine signifikante Reduktion nachgewiesen werden konnte und die Foci-Zahl nach 24 h weiterhin bei 14 γ H2AX-Foci/Zelle lag. Demnach konnte ein Einfluss des WRN-Proteins auf die DSB-Reparatur gezeigt werden.

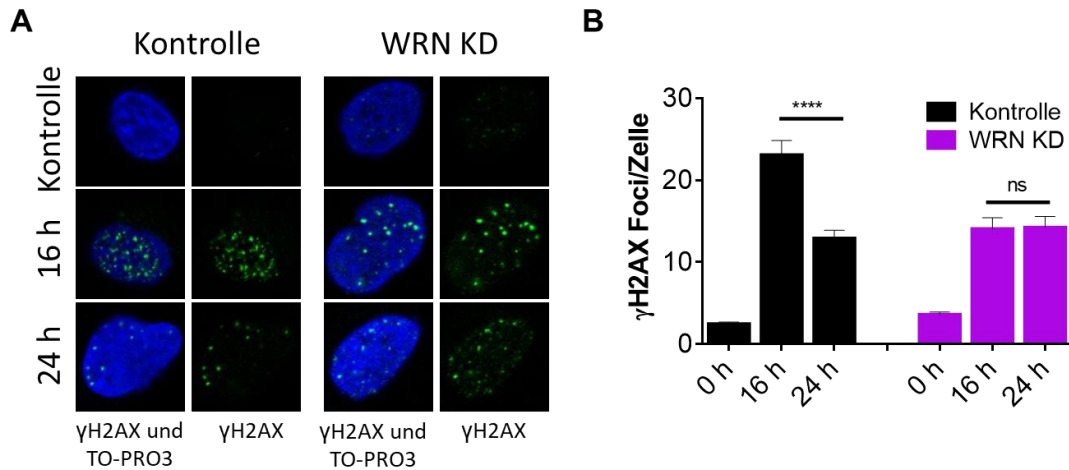


Abbildung 21: Einfluss des WRN-Proteins auf die Reparatur der BPDE-induzierten DSB in EA.hy926-Zellen. Repräsentative Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der EA.hy926-Zellen 16 h und 24 h nach Zugabe von BPDE zum Medium (0.75 μ M): grün= γ H2AX-Foci, blau=Kernfärbung mit To-Pro3 (A). Die entsprechende Quantifizierung ist in (B) gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten, deren Signifikanz mittels ungepaartem *t*-Test berechnet wurde: **** $p \leq 0,0001$, ns=nicht signifikant.

In VH10tert-Zellen (Abbildung 22B) wurden sowohl in den Kontrollzellen als auch in den WRN-Knockdown-Zellen 11 γ H2AX-Foci/Zelle nach 16 h gemessen. 24 h nach Behandlung war in den Kontrollzellen ein Abfall der Foci-Zahl auf 8 γ H2AX-Foci/Zelle zu erkennen, der jedoch nicht signifikant war. In den WRN-Knockout-Zellen wurde ein leichter Abfall auf 10 γ H2AX-Foci/Zelle nachgewiesen. Repräsentative Bilder von VH10tert-Zellen sind in Abbildung 22A zu sehen. Auch wenn der Effekt des WRN-Knockdown nicht signifikant ausgeprägt war, wie in den EA.hy926-Zellen, konnte auch in den VH10tert-Zellen ein Einfluss des WRN-Proteins auf die Reparatur der durch BPDE-induzierten DSB festgestellt werden.

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass BPDE-induzierte DNA-Addukte zu blockierten Replikationsgabeln führen und damit zu DSB, die in Abwesenheit des WRN-Proteins weniger effizient repariert werden.

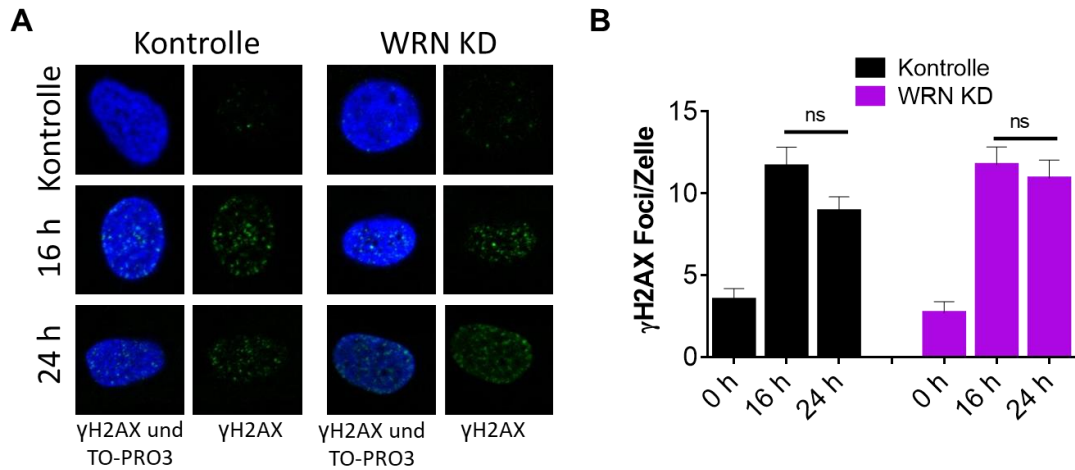


Abbildung 22: Einfluss des WRN-Proteins auf die Reparatur der BPDE-induzierten DSB in VH10tert-Zellen. Repräsentative Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der VH10tert-Zellen 16 h und 24 h nach der Behandlung mit BPDE (0.75 µM): grün=γH2AX-Foci, blau=Kernfärbung mit To-Pro3 (A). Die entsprechende Quantifizierung ist in (B) gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten, deren Signifikanz mittels ungepaartem *t*-Test berechnet wurde: ns=nicht signifikant.

Die Induktion der BPDE-Doppelstrangbrüche ist abhängig von der Zellzyklus-Phase, da die DSB, wie bereits erwähnt, durch einen Replikationsgabel-Kollaps und somit in der S-Phase des Zellzyklus entstehen. In Abbildung 23 ist die Zellzyklusverteilung der EA.hy926 und VH10-tert Zellen 24 h nach der Behandlung mit 1,5 µM BPDE aufgetragen.

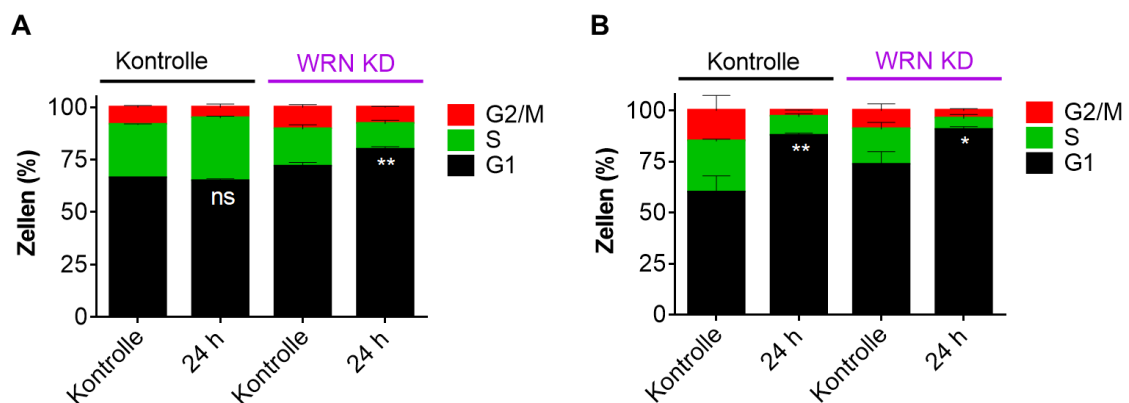


Abbildung 23: Zellzyklusverteilung der EA.hy926-Zellen und VH10tert-Zellen nach BPDE-Behandlung. Mittels PI-Färbung wurde der DNA-Gehalt durchflusszytometrisch nach der Behandlung mit BPDE (1,5 µM) bestimmt. Dargestellt sind die Histogramme der Kontrollen und des WRN KD der EA.hy926-Zellen (A) und der VH10tert-Zellen (B) und die entsprechende Quantifizierung der G1-, S- und G2/M-Phasen. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten, die Signifikanz wurde mittels ungepaartem *t*-Test berechnet: ns=nicht signifikant, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. Linke drei Balken = Kontrolle, rechte drei Balken = WRN KD.

Die EA.hy926-Zellen in Abbildung 23A zeigten nach *WRN-Knockdown* einen signifikanten Anstieg von Zellen in der G1-Phase und eine Reduktion des Anteils der Zellen in der S-Phase. In den Kontrollzellen war dieser G1-Block nicht nachzuweisen. Dieses Resultat spiegelt sich in den Ergebnissen der γ H2AX-Foci wider, da in den Kontrollzellen die Induktion der DSB höher war, als in den *WRN-Knockdown*-Zellen. Die VH10tert-Zellen zeigten ebenfalls übereinstimmend mit den Ergebnissen der DSB-Induktion nach BPDE-Behandlung sowohl in den Kontrollzellen als auch in den *WRN-Knockout*-Zellen einen signifikanten G1-Phase Arrest und eine Reduktion der Zellen in der S-Phase.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Menge der Zellen in der S-Phase mit der Induktion von DSB korreliert und unterstützen die Annahme, dass BPDE-induzierte DNA-Addukte während der S-Phase zu blockierten Replikationsgabeln führen und damit zu DSB. Das WRN-Protein hat Einfluss auf den Durchlauf der Zellen durch den Zellzyklus und deshalb arretiert ein *WRN-Knockdown* die Zellen in der G1-Phase, was die Anzahl der DSB und damit der γ H2AX-Foci verringert.

4.2 Vergleich der Primärzellen des vaskulären Systems hinsichtlich ihrer Sensitivität zu BPDE

4.2.1 Untersuchung der Sensitivität gegenüber BPDE

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Sensitivität dreier Primärzelltypen des vaskulären Systems gegenüber BPDE untersucht. Verwendet wurden venöse Endothelzellen (HUVEC), glatte Muskelzellen der Arterie (HUASMC) und Perizyten aus der Plazenta (hPC-PL). Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, wurde zunächst ein MTT-Test durchgeführt, um die generelle Sensitivität und das Ansprechen der drei Zelltypen auf BPDE zu untersuchen.

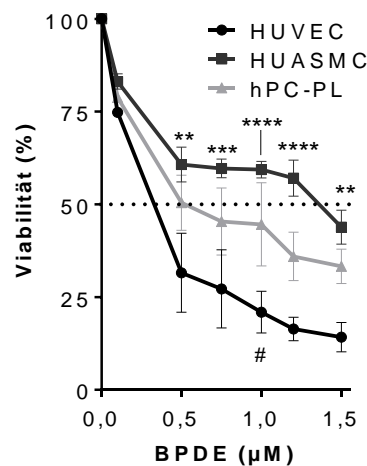


Abbildung 24: Einfluss von BPDE auf die Viabilität der Primärzelltypen HUVEC, HUASMC und hPC-PL. Prozentual dargestellt sind mittels MTT-Tests ermittelte Viabilitäten nach Behandlung mit BPDE an HUVEC, HUASMC und hPC-PL in steigenden Dosen. Die "Viabilität" wurde 72 h nach Zugabe von BPDE zum Medium bestimmt und auf die unbehandelte Kontrolle (100 %) normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. LD₅₀: HUVEC < 0,5 µM BPDE; HUASMC < 1,5 µM BPDE; hPC-PL = 0,5 µM BPDE.

Hierzu wurden die Zelltypen mit aufsteigenden Dosen BPDE über einen Zeitraum von 72 h inkubiert und anschließend der Umsatz von MTT zu Formazan photometrisch bestimmt. Alle drei Zelltypen zeigten eine konzentrationsabhängige Reduzierung der Viabilität. Den größten Abfall der Viabilität nach Behandlung mit BPDE zeigten die primären Endothelzellen (HUVEC), die mit einem LD₅₀ von unter 0,5 µM BPDE am sensitivsten reagierten. Die primären Perizyten (hPC-PL) und glatte Muskelzellen

(HUASMC) zeigten einen deutlich und signifikant weniger starken Abfall der Viabilität mit einem LD₅₀ von 0,5 µM BPDE (hPC-PL) und >1,2 µM BPDE (HUASMC). Zusammenfassend zeigten HUVEC-Zellen die höchste Sensitivität, gefolgt von hPC-PL- und HUASMC-Zellen.

Um zu überprüfen, ob der beobachtete Viabilitätsabfall mit einem erhöhten Zelltod einhergeht, wurde anschließend eine SubG1-Messung durchgeführt, um die Apoptose-Induktion der drei Primärzelltypen nach Behandlung mit BPDE zu bestimmen. Hierzu wurden die Zellen mit 1,5 µM BPDE behandelt und 24-96 h später geerntet, fixiert, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung 25 zeigt die Auswertung der Apoptoseraten der drei Zelltypen.

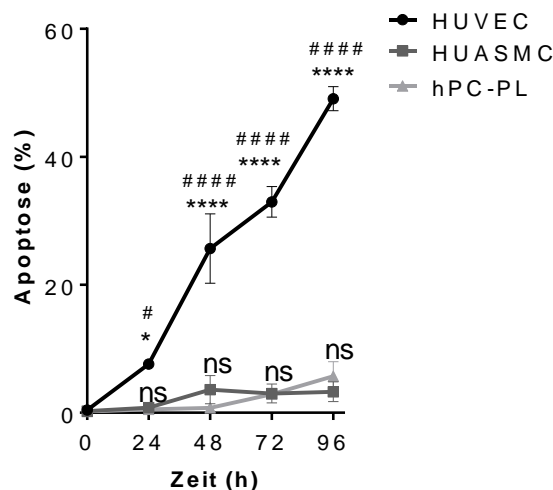


Abbildung 25: BPDE-induzierter Zelltod in HUVEC, HUASMC und hPC-PL. Mittels PI-Färbung wurden apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nach der Behandlung mit BPDE (1,5 µM) bestimmt. Dargestellt ist der Zelltod quantifiziert anhand der SubG1-Population für HUVEC, HUASMC und hPC-PL. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten, die Signifikanz wurde mittels zweifaktorieller ANOVA und dem Post-hoc-Test nach Šidák berechnet: HUVEC vs. HUASMC = *; HUVEC vs. hPC-PL = #; ns = nicht signifikant; */# $p \leq 0,05$; ****/##### $p \leq 0,0001$.

HUVEC zeigten bereits nach 24 h eine signifikant höhere Apoptoserate von 7,6 % als HUASMC und hPC-PL. Mit zunehmender Inkubationsdauer nahm die Signifikanz noch weiter zu bis nach 96 h 50 % der HUVEC betroffen waren, gegenüber 3,3 % HUASMC und 5,7 % hPC-PL, die sich nicht signifikant voneinander unterschieden.

Um die Induktion des Zelltods nach Behandlung mit BPDE noch genauer zu charakterisieren, wurde mit Hilfe der Annexin-V/PI Doppelfärbung sowohl Apoptose als auch Nekrose gesondert analysiert (Abbildung 26 und Abbildung 27).

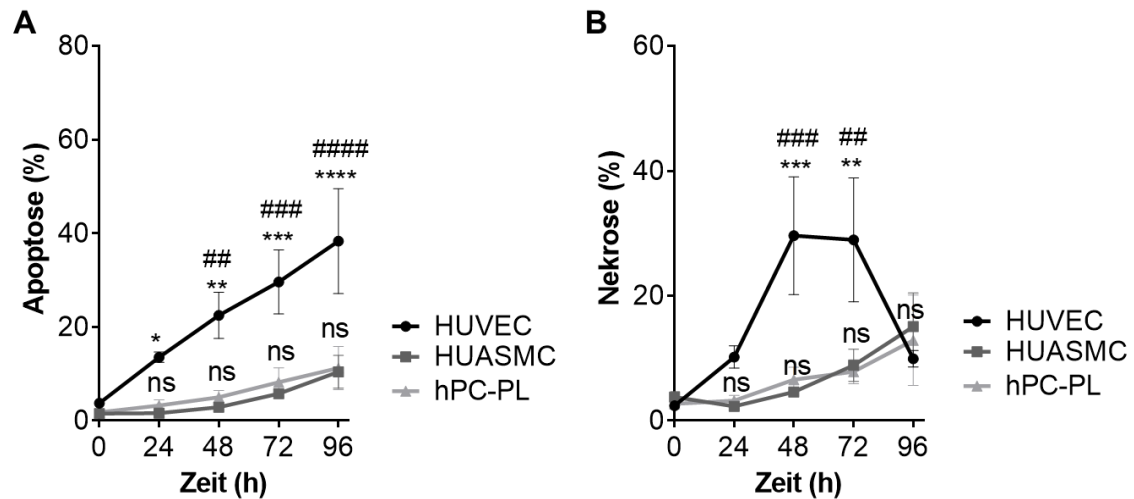


Abbildung 26: BPDE-induzierter Zelltod in HUVEC, HUASMC und hPC-PL. Mittels Annexin V/ PI-Färbung wurden Apoptose- (A) und Nekrosefrequenz (B) durchflusszytometrisch zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Behandlung mit BPDE (0,75 μ M) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten, die Signifikanz wurde mittels zweifaktorieller ANOVA und dem Post-hoc-Test nach Šidák berechnet: HUVEC vs. HUASMC = *; HUVEC vs. hPC-PL = #; ns = nicht signifikant; */# $p \leq 0,05$; **/## $p \leq 0,01$; ***/### $p \leq 0,001$; ****/#### $p \leq 0,0001$.

Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, zeigten die HUVEC-Zellen ebenfalls bei einer Behandlung mit 0,75 μ M BPDE eine signifikant höhere Apoptoserate für alle gemessenen Zeitpunkte, sowie eine höhere Nekroseinduktion nach 48 und 72 h Inkubation mit BPDE. Bis zu 38 % der HUVEC-Zellen zeigten nach 96 h eine positive Annexin-V Färbung für Apoptose, jedoch nur 10 % bzw. 11 % der HUASMC- bzw. hPC-PL-Zellen. In Abbildung 27 ist dies nochmal mit der Behandlung von 1,5 mM BPDE dargestellt. Hier zeigten die HUVEC-Zellen eine signifikant höhere Apoptosefrequenz von bis zu 68 %, als die HUASMC- und hPC-PL-Zellen mit jeweils maximal 21 % Apoptose nach 96 h Inkubation mit BPDE.

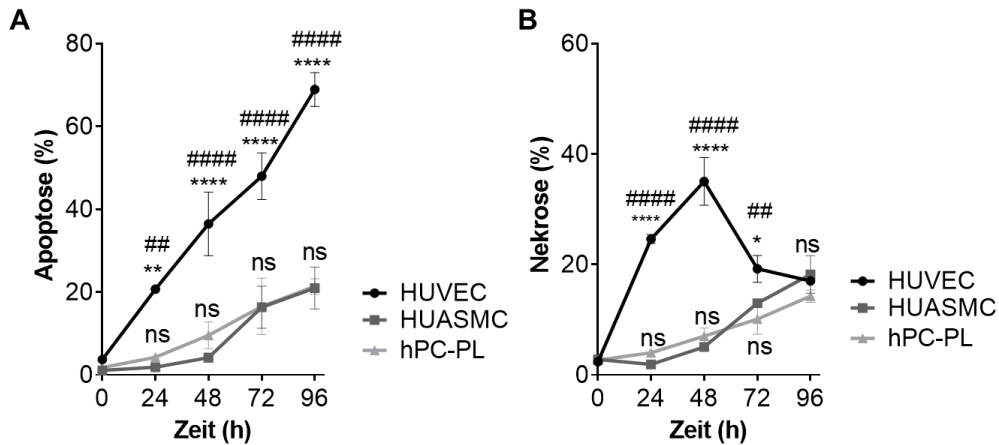


Abbildung 27: BPDE-induzierter Zelltod in HUVEC, HUASMC und hPC-PL. Mittels Annexin V/ PI-Färbung wurden Apoptose- (A) und Nekrosefrequenz (B) durchflusszytometrisch zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Behandlung mit BPDE (1,5 μ M) bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten, die Signifikanz wurde mittels zweifaktorieller ANOVA und dem Post-hoc-Test nach Šidák berechnet: HUVEC vs. HUASMC = *; HUVEC vs. hPC-PL = #; ns = nicht signifikant; */# $p \leq 0,05$; **/## $p \leq 0,01$; ***/### $p \leq 0,001$; ****/#### $p \leq 0,0001$.

Auch die Nekrosefrequenz nach 1,5 μ M BPDE war von den HUVEC-Zellen nach 24, 48 und 72 h signifikant höher als in den HUASMC- und hPC-PL-Zellen. Zusammenfassend zeigten die SubG1-Messung und die Annexin-V/PI Doppelfärbung eine höhere Sensitivität der HUVEC-Zellen gegenüber BPDE, verglichen mit den beiden anderen Primärzelltypen.

Ein weiterer Versuch sollte Aufschluss über die Vitalität der behandelten Zellen und ihrer Fähigkeit zur weiteren Proliferation geben. Hierzu wurde ein Proliferations-Test mit dem iCelligence System (ACEA Biosciences Inc.) durchgeführt (Abbildung 28).

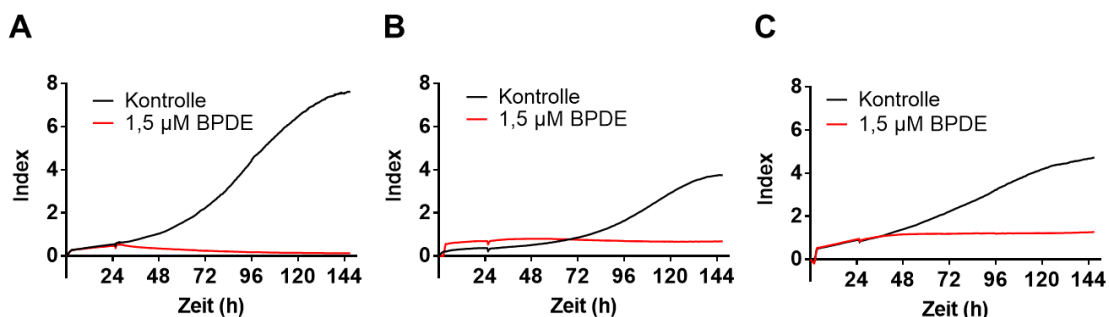


Abbildung 28: Einfluss von BPDE auf die Proliferationskurve von HUVEC, HUASMC und hPC-PL. Mit Hilfe des RTCA iCelligence Systems wurden Proliferationskurven der HUVEC- (A), HUASMC- (B) und hPC-PL-Zellen (C) bestimmt. Dazu wurden Kontrollen und die Zellen mit 1,5 μ M BPDE behandelt über einen Zeitraum von 144 h im iCelligence kultiviert.

Die Zellen wurden in speziellen 16-Loch-Platten des Systems mit Gold-Mikroelektroden-Biosensoren eingesät und nach 24 h mit 1,5 μM BPDE behandelt. Das System ermöglicht ein zeitechtes Messen des durch die Zellen generierten Widerstands. Wie in Abbildung 28A-C abgebildet, proliferierte die Kontrolle (schwarz) der drei Primärzelltypen wie erwartet über den gesamten Zeitraum der Inkubation, erkennbar an dem Kurvenverlauf mit steigendem Index. Während die behandelten Zellen (rot) einen gleichbleibenden Widerstand (dargestellt als Index) und damit keine Proliferation zeigten. Anhand dieser Echtzeit-Messungen konnte das dazugehörige Programm genutzt werden, um die Verdopplungszeiten der drei Zelltypen zu überprüfen. Die Abbildung 29 zeigt die durch iCelligence ermittelten Verdopplungszeiten der Kontrollen und der behandelten Zellen.

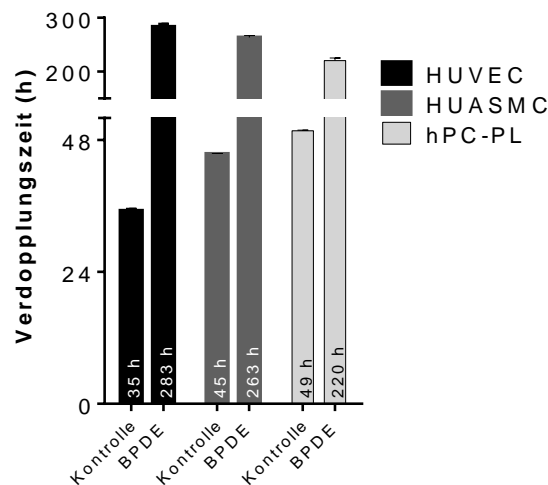


Abbildung 29: Einfluss von BPDE auf die Verdopplungszeit von HUVEC, HUASMC und hPC-PL. Mit Hilfe des RTCA iCelligence Systems wurde die Verdopplungszeit der HUVEC, HUASMC und hPC-PL berechnet. Dazu wurden Kontrollen und die Zellen mit 1,5 μM BPDE behandelt über einen Zeitraum von 144 h im iCelligence kultiviert. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte \pm SD der Verdopplungszeit aus einem Experiment mit Duplets.

Die durch den Hersteller PromoCell ermittelten Verdopplungszeiten der Zellen betragen für HUVEC-Zellen 12,3 h, für HUASMC-Zellen 46,8 h und für hPC-PL-Zellen 41 h (nicht extra für diese Charge getestet). Die für HUASMC- und hPC-PL-Zellen ermittelten Verdopplungszeiten konnten somit durch diesen Versuch bestätigt werden. Die Verdopplungszeit der HUVEC-Zellen war jedoch mehr als doppelt so hoch wie angegeben. Nach Behandlung mit BPDE stieg die Verdopplungszeit der Zellen auf eine

theoretische Zahl von über 220 h, was mehr als 9 Tagen entspricht, und die Inkubationszeit von 144 h weit übersteigt. Die Zellen zeigten also innerhalb des Inkubationszeitrahmens keinerlei Proliferation mehr nach Behandlung mit BPDE in einer Konzentration von 1,5 μM .

4.2.2 BPDE induziert Seneszenz in Primärzellen

Wie bereits in Maus-Spermatozyten gezeigt werden konnte (Ling et al. 2018), induziert BPDE vorzeitige Seneszenz. Um zu testen, ob dies auch in den humanen Primärzellen des vaskulären Systems der Fall ist, wurden die Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen BPDE (0,25-1 μM) behandelt und nach 96 h Inkubation mit einem X-Gal Substrate angefärbt. Die Seneszenz-assoziiertes- β -Galaktosidase färbte durch Umsetzung des Substrates seneszente Zellen blau, die per Mikroskop detektiert wurden, wie man in der Abbildung 30A erkennen kann.

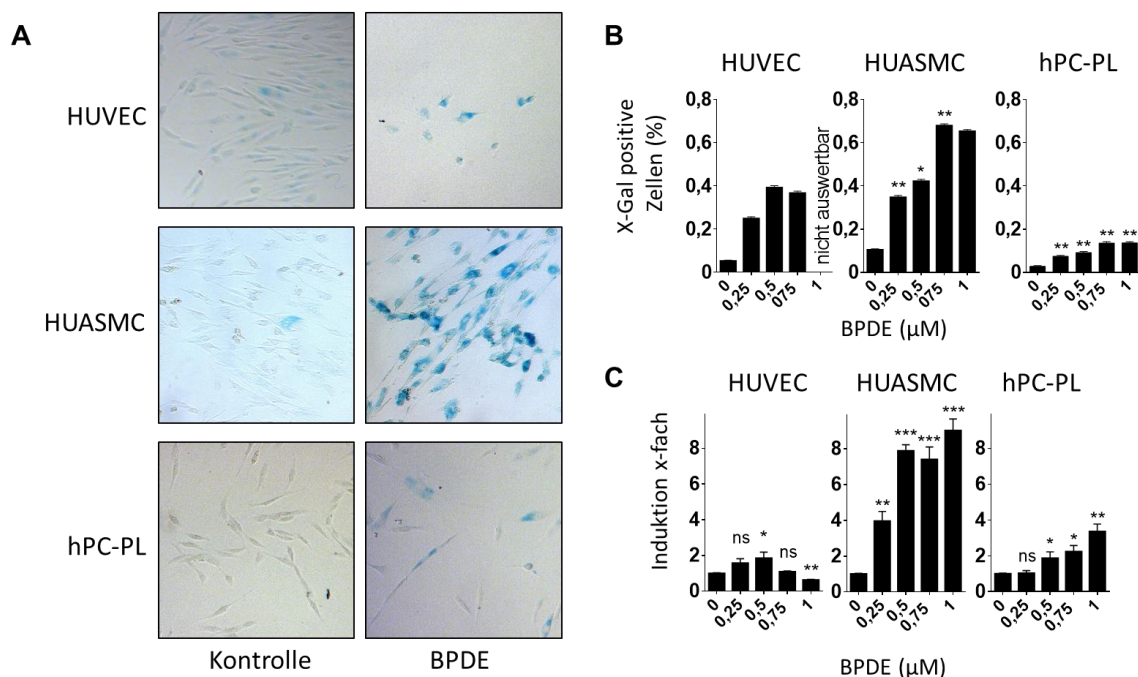


Abbildung 30: BPDE-induzierte Seneszenz in HUVEC, HUASMC und hPC-PL. Mittels β -Galaktosidase Färbung wurde die Seneszenz-Induktion durch BPDE (0,25; 0,5; 0,75 und 1 μM BPDE; 96 h) bestimmt. Repräsentative Mikroskop-Aufnahmen der Kontrolle und nach der Behandlung mit BPDE (0,75 μM) (A). Die entsprechende Quantifizierung ist in (B) gezeigt. Quantifizierung der mRNA Expression des Seneszenz-Markers p21 (*CDKN1A*) (C). Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten, die Signifikanz wurde mittels zweifaktorieller ANOVA und dem Post-hoc-Test nach Šidák berechnet: HUVEC vs. HUASMC = *; HUVEC vs. hPC-PL = #; ns = nicht signifikant; */# $p \leq 0,05$; **/# $p \leq 0,01$; ***/### $p \leq 0,001$; ****/#### $p \leq 0,0001$. n.a.=nicht auswertbar.

Die Behandlung erfolgte als Dauerbehandlung ohne Abnahme des Mediums, jedoch hat BPDE eine Halbwertszeit von 10 min in Zellkulturmedium, weshalb die Behandlung als Pulsbehandlung angesehen werden kann. Die Auswertung der Mikroskop-Aufnahmen (Abbildung 30B) zeigte eine moderate Induktion von X-Gal positiven HUVEC-Zellen (40 %), eine starke Induktion von X-Gal positiven HUASMC-Zellen (67 %) und eine schwache Induktion von X-Gal positiven hPC-PL-Zellen (14 %). Die Untersuchung zeigte, dass die BPDE Behandlung nach 96 h die Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase induziert und der Anteil der seneszenten Zellen positiv, wenn auch unterschiedlich stark in den drei Zelltypen, mit der BPDE-Konzentration korrelierte. Ferner wurde auch die Seneszenz durch Induktion des p21-Gens (*CDKN1A*) überprüft, einem charakteristischen Seneszenz-Marker. Die Abbildung 30C zeigt, dass HUVEC- und hPC-PL-Zellen eine ~2-fache Induktion des p21-Gens (*CDKN1A*) zeigten, während die HUASMC-Zellen in allen Dosisbereichen eine bis zu 8-fache Induktion des p21-Gens (*CDKN1A*) vorwiesen.

4.2.3 Akkumulierende Einzelstrangbrüche nach BPDE Behandlung

Die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER), welche die BPDE-DNA-Läsionen repariert, durchläuft ein Reparaturintermediat, welches durch eine Inzision und Exzision der Addukt-DNA entsteht (siehe Einleitung 2.3). Dieses kann durch alkalische Einzelzellgelelektrophorese als Einzelstrangbruch (ESB) detektiert werden. Einzelstrangbrüche nach BPDE-Behandlung wurden schon in früheren Studien in menschlichen Blutzellen nachgewiesen (Leroy et al. 1995; Leroy et al. 1996; Speit et al. 2004). Ob dies auch in den Primärzellen des vaskulären Systems der Fall ist und sich in den drei Zelltypen unterscheidet, wurde mittels alkalischer Einzelzellgelelektrophorese überprüft. Die in Abbildung 31 dargestellten Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die BPDE-Behandlung in den verwendeten Primärzellen HUVEC, HUASMC und hPC-PL Einzelstrangbrüche erzeugt, die mittels *Comet Assay* gemessen werden können.

Repräsentative Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen unbehandelter Zellen und mit 0,75 bzw. 1,5 μ M BPDE (2,5 h) behandelte Zellen sind in Abbildung 31A gezeigt. Die Quantifizierung in Abbildung 31B-D zeigt, dass die HUVEC-Zellen bereits nach niedrigeren Dosen ($\geq 0,5 \mu$ M BPDE) vermehrt ESB aufwiesen. Die HUASMC- und hPC-PL-

Zellen zeigten eine Induktion erst ab einer Dosis von 1 μM BPDE und höher, jedoch mit einer maximalen *Tail*-Intensität (relative Migration der DNA aus dem lysierten Zellkern) von 13 (HUASMC) und 11 (hPC-PL) gegenüber einer maximalen *Tail*-Intensität von 24 in HUVEC-Zellen.

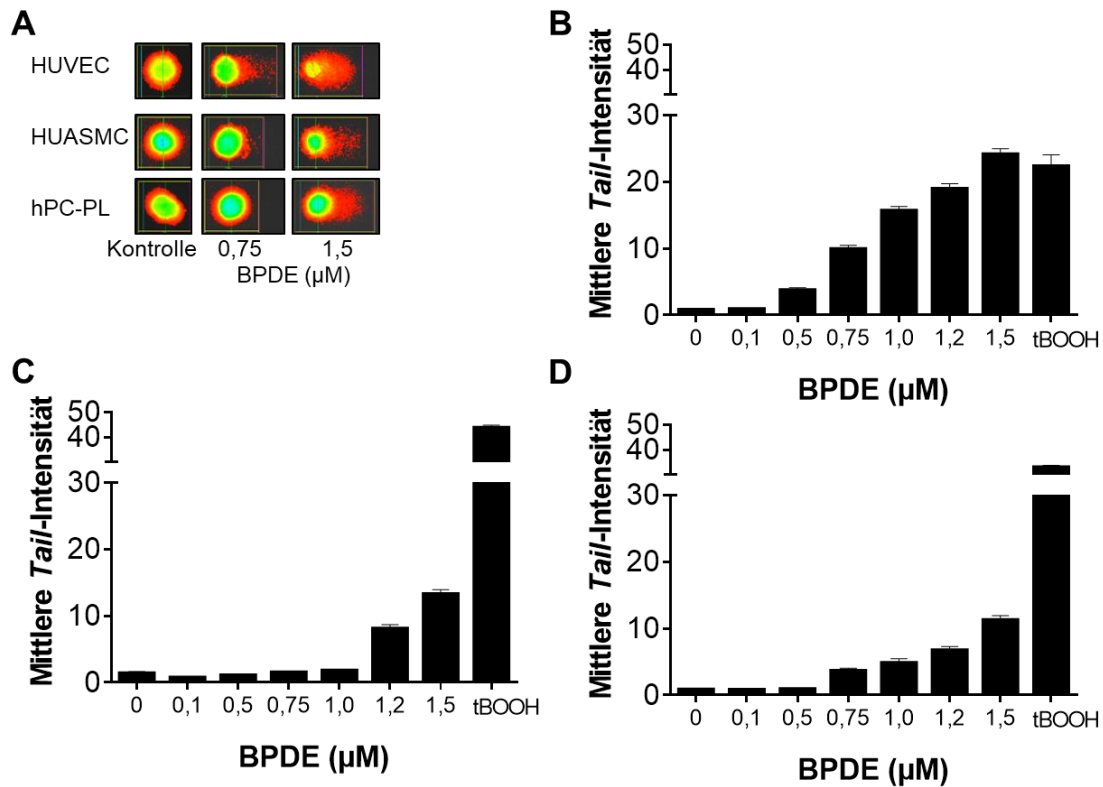


Abbildung 31: BPDE-induzierte dosisabhängige Einzelstrangbrüche in HUVEC, HUASMC und hPC-PL. Mittels alkalischer Einzelzellgelelektrophorese wurden BPDE-induzierte Einzelstrangbrüche in HUVEC-Zellen (B), HUASMC-Zellen (C) und in hPC-PL-Zellen (D) fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Mikroskopische Aufnahmen einer unbehandelten Zelle (Kontrolle) und einer mit 0,75 μM und 1,5 μM BPDE behandelten Zelle sind exemplarisch in (A) gezeigt. Die Zellen wurden mit verschiedenen Dosen BPDE (2,5 h) behandelt. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte \pm SEM der *Tail*-Intensitäten aus drei unabhängigen Experimenten.

Um einen zeitlich früher oder später liegenden Peak der *Tail*-Intensität in HUASMC- und hPC-PL-Zellen auszuschließen, wurde anschließend eine Zeitkinetik mit dem Zeitraum 1 h bis 7 h nach Behandlung mit 0,5 μM BPDE angefertigt. Die Konzentration von 0,5 μM BPDE wurde gewählt, weil bei dieser Dosis bereits eine Erhöhung der *Tail*-Intensität in HUVEC-Zellen zu beobachten war, aber noch nicht in den beiden anderen Primärzelltypen HUASMC und hPC-PL. Wie in Abbildung 32 zu sehen ist, war in den HUVEC-Zellen (Abbildung 32A) ein zeitabhängiger Anstieg der *Tail*-Intensität

nachweisbar, welcher nach 5 h in eine Plateauphase überging. HUASMC- und hPC-PL-Zellen zeigten im selben Zeitraum keine Induktion von ESB bzw. keinen herausragenden Peak der *Tail*-Intensität (Abbildung 32B+C).

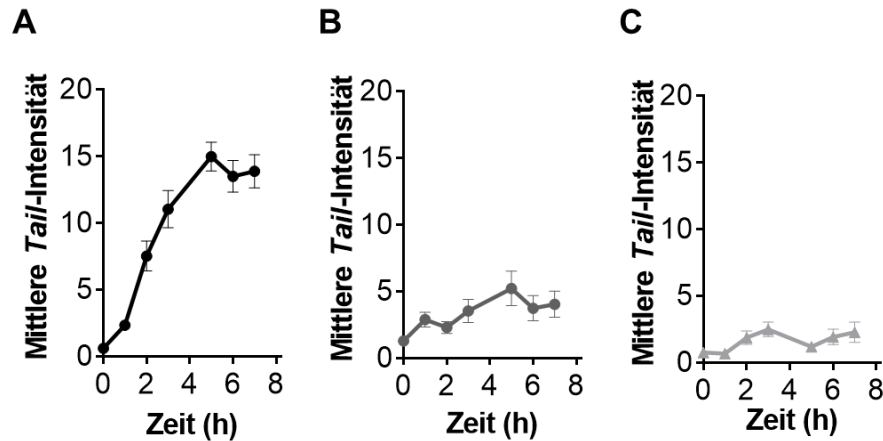


Abbildung 32: BPDE-induzierte zeitabhängige Einzelstrangbrüche in HUVEC, HUASMC und hPC-PL. Mittels alkalischer Einzelzellgelelektrophorese wurden BPDE-induzierte Einzelstrangbrüche (ESB) in HUVEC-Zellen (A), HUASMC-Zellen (B) und in hPC-PL-Zellen (C) fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Die Zellen wurden mit BPDE (0,5 μ M) über die angegebene Zeit behandelt. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte \pm SEM der *Tail*-Intensitäten aus drei unabhängigen Experimenten.

4.2.4 BPDE induziert gleiche Mengen von DSB in HUVEC, HUASMC und hPC-PL

Um die Entstehung von BPDE-induzierten Doppelstrangbrüchen (DSB) in den drei vaskulären Primärzelltypen S-Phase abhängig zu analysieren, wurde die Induktion von γ H2AX-Foci immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Hierzu wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und mit BPDE behandelt. Vor dem Abstoppen und Fixieren der Zellen wurden sie mit EdU inkubiert, um die Zellen in der S-Phase spezifisch anzufärben und zu testen, ob die induzierten DSB als Folge der blockierten Replikationsgabeln während der S-Phase auftreten. Anschließend erfolgte (entsprechend der Anweisung des kommerziellen EdU Färbe-Kits) die Färbung der EdU positiven Zellen, sowie das Anfärben von γ H2AX-Foci.

BPDE induziert in allen drei vaskulären Zelltypen eine ähnliche Menge von γ H2AX-Foci in S-Phase positiven/EdU positiven Zellen (Abbildung 33A-C). Die γ H2AX-Foci in EdU negativen Zellen (nicht S-Phase (EdU-positive) Zellen) halten sich in allen drei Zelltypen auf dem gleichen niedrigen Kontroll-Niveau. Die nach 16 h und 24 h leicht ansteigenden

Werte in den EdU negativen Zellen sind auf die frühe Inkubationszeit mit EdU nach Behandlung zu erklären, da nach dieser Zeit nicht angefärbte Zellen ebenfalls in die S-Phase eintreten.

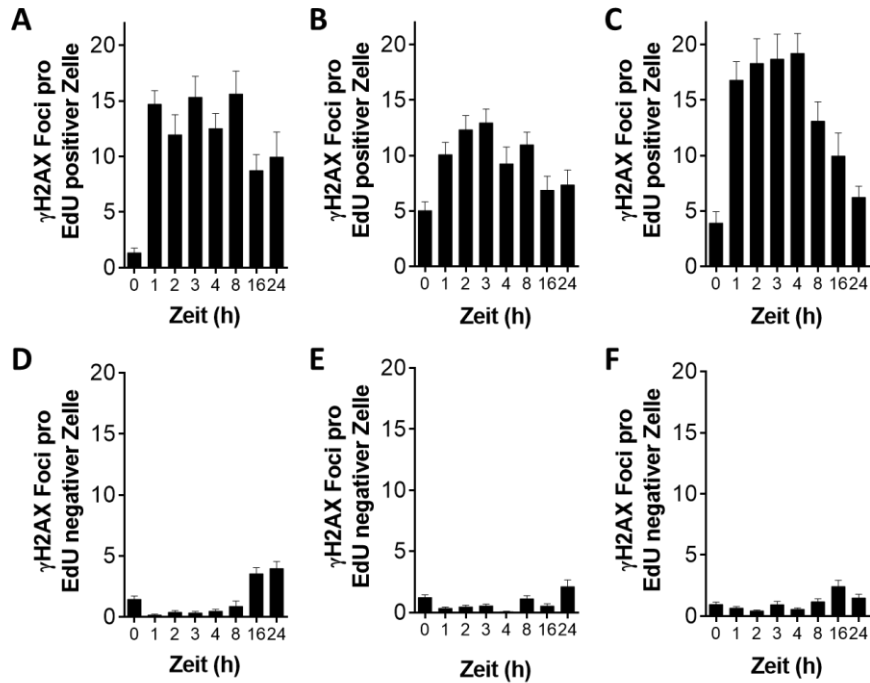


Abbildung 33: BPDE-induzierte und S-Phase abhängige γ H2AX-Foci in HUVEC-, HUASMC- und hPC-PL-Zellen. Quantifizierung der γ H2AX-Foci nach der Behandlung mit 0,75 μ M BPDE, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 8 h, 16 h und 24 h danach, von HUVEC-Zellen (A+D), HUASMC-Zellen (B+E) und hPC-PL-Zellen (C+F). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

Repräsentative Bilder für die Färbung sind in Abbildung 34 zu sehen. Die γ H2AX-Foci traten kondensiert an Stellen auf, wo EdU eingebaut wurde, wie in der überlappenden letzten Darstellung zu erkennen ist.

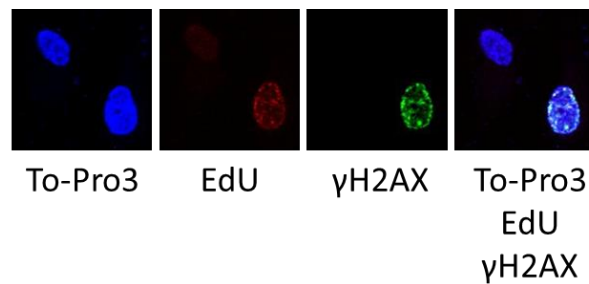


Abbildung 34: Repräsentative Bilder der BPDE-induzierten und S-Phase abhängigen γ H2AX-Foci in HUVEC-Zellen 1h nach Behandlung. Repräsentative Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen 1 h nach der Behandlung mit BPDE ($0.75 \mu\text{M}$) in HUVEC-Zellen: blau=Kernfärbung mit To-Pro3, rot=EdU S-Phase Färbung, grün= γ H2AX-Foci.

4.2.5 BPDE-Addukte persistieren in HUVEC-Zellen

Nachdem gezeigt wurde, dass HUVEC-Zellen nach Behandlung mit BPDE verglichen mit HUASMC- und hPC-PL-Zellen signifikant mehr Zelltod und eine Akkumulierung von Einzelstrangbrüchen zeigten, muss überprüft werden, ob die BPDE-Addukte in der DNA überhaupt abgebaut und repariert werden. Hierzu wurde eine Dosis von $0,5 \mu\text{M}$ BPDE benutzt. Diese Dosis wurde bereits von Christmann et al. verwendet. Sie zeigte über die Zeit (1-48 h nach Behandlung) einen Abbau der BPDE-DNA-Addukte in humanen Fibroblasten (Christmann et al. 2016). Die Zellen wurden ausgesät, mit $0,5 \mu\text{M}$ BPDE behandelt und nach einer Inkubation von 1-24 h ihre DNA isoliert. Die DNA wurde in einem Umfang von $6 \mu\text{g}$ pro Probe zur weiteren Analyse zu Dr. Alberto Izzotti nach Italien geschickt. Dort wurden die Proben mit Hilfe der ^{32}P -Postlabeling Methode analysiert und die Anzahl der BPDE-Addukte pro 10^8 Nukleotide bestimmt (Abbildung 35). Die BPDE-Adduktmenge in den drei Primärzelltypen variierte stark. Es ist zu erkennen, dass in HUVEC-Zellen (Abbildung 35A) die Adduktmenge über die Zeit nicht rückläufig war wie bei HUASMC- und hPC-PL-Zellen. Die initiale Adduktmenge von 82 Addukte/ 10^8 Nukleotide lag in HUVEC-Zellen nach 24 h immer noch bei über 70 Addukte/ 10^8 Nukleotide. In den HUASMC-Zellen sank die initiale Adduktmenge von 33 Addukte/ 10^8 Nukleotide auf 3 Addukte/ 10^8 Nukleotide nach 24 h. Bei hPC-PL-Zellen sank die initiale Adduktmenge von 51 Addukte/ 10^8 Nukleotide auf 17 Addukte/ 10^8 Nukleotiden nach 24 h. Das entsprach einer prozentualen Abnahme von 11% in HUVEC-Zellen, 91% in HUASMC-Zellen und 67% in hPC-PL-Zellen.

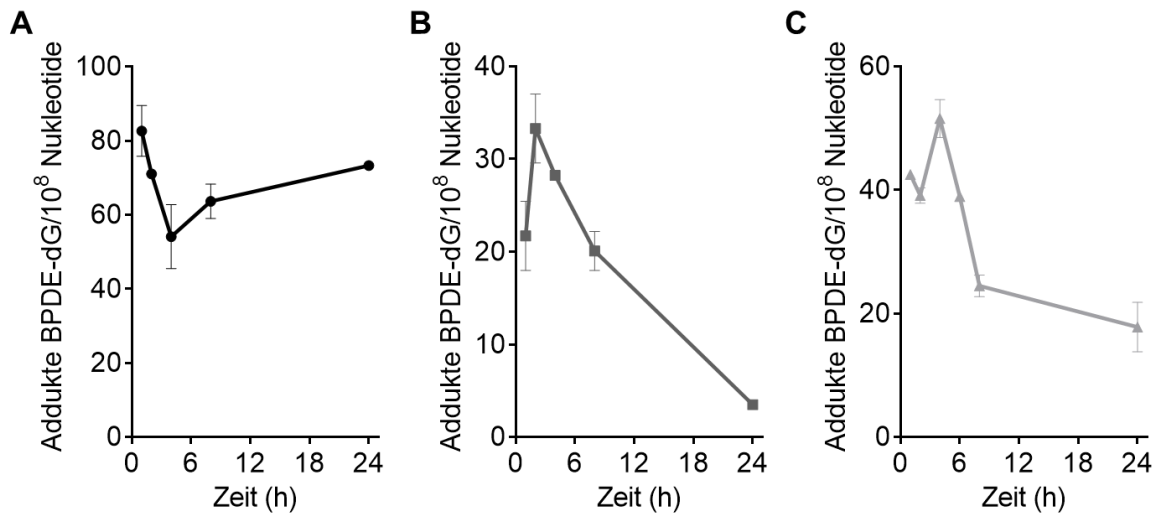


Abbildung 35: Zeitabhängige BPDE-Addukt-Mengen in HUVEC, HUASMC und hPC-PL. BPDE Addukte pro 10^8 Nukleotide in HUVEC, HUASMC und hPC-PL nach Behandlung mit $0,5 \mu\text{M}$ BPDE wurden mit der ^{32}P -Postlabeling Methode durch Dr. Alberto Izzotti analysiert. Gezeigt werden Mittelwerte \pm SD von zwei unabhängigen Messungen.

Insgesamt war zwar eine deutlich höhere Adduktmenge in HUVEC-Zellen vorhanden als in den beiden anderen Zelltypen, jedoch war die Reparatur des DNA-Schadens nach BPDE-Behandlung gemessen an der Adduktmenge in den HUASMC- und hPC-PL-Zellen deutlich effizienter.

4.2.6 Untersuchung der Expression von DNA Reparaturproteinen in humanen vaskulären Primärzellen

Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass in manchen humanen Zelltypen innerhalb eines Organsystems verschiedene Proteine eines DNA-Reparaturmechanismus nicht exprimiert werden, wie z.B. XRCC1, PARP-1 und Ligase III α , die zwar in Makrophagen, aber nicht in Monozyten exprimiert werden (Bauer et al. 2011).

BPDE-induziert vermehrt Zelltod in HUVEC-Zellen (siehe 4.2.1). Dieser Effekt könnte durch fehlende Reparatur der BPDE-Addukte verstärkt werden. Daher wurde als folgender Schritt in einer Western Blot-Analyse die Proteinexpression der wichtigsten NER-Proteine in den drei Primärzelltypen näher untersucht (Abbildung 36).

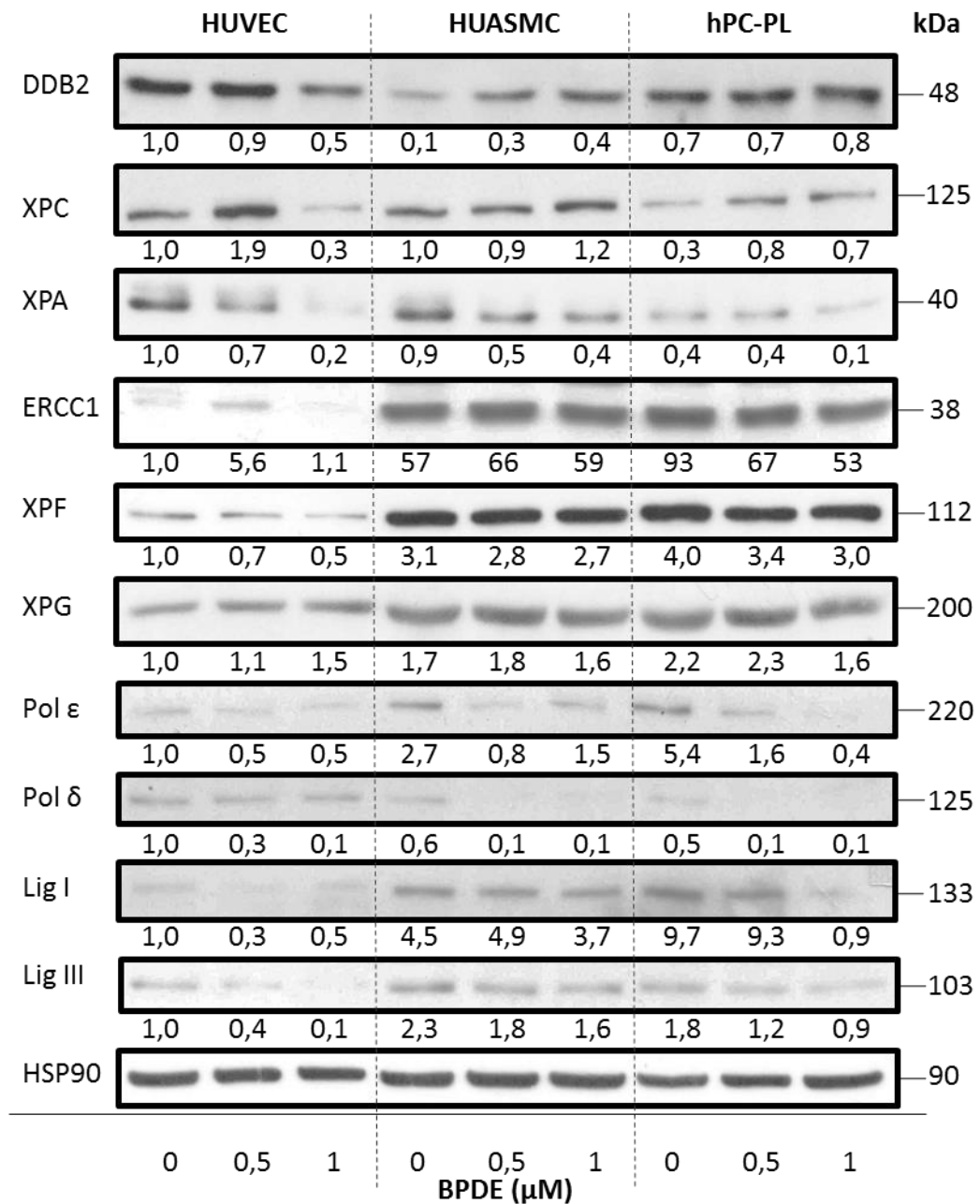


Abbildung 36: NER Protein Expression basal und 24 h nach Behandlung mit BPDE. Mittels Western Blot-Analyse wurden die NER-Proteine in Gesamtzellextrakten basal und 24 h nach 1 μ M BPDE untersucht. HSP90 diente als Ladekontrolle, hier wird ein repräsentatives Beispiel gezeigt. HUVEC, HUASMC und hPC-PL Extrakte wurden auf einen Blot aufgetragen und die quantitative Analyse wurde mit ImageJ durchgeführt. HUVEC Kontrolle wurde auf 1,0 gesetzt.

Es wurden mehrfach Western Blots angefertigt, in der Abbildung 36 sind repräsentative Western-Blot-Analysen dargestellt, die zeigen, dass die NER-Proteine ERCC1, XPF, XPG,

Pol ϵ , Lig I und Lig III in HUVEC-Zellen basal (Spur 1) nur sehr schwach exprimiert wurden. Am stärksten unterschied sich die basale Expression von ERCC1 in den drei Zelltypen: während die Expression in HUVEC-Zellen auf 1 normiert wurde, exprimierten HUASMC-Zellen 57-fach (Spur 4) und hPC-PL-Zellen 93-fach (Spur 7) so viel ERCC1 wie HUVEC-Zellen. Die basale Expression der anderen vorher genannten Proteine war in HUASMC- und hPC-PL-Zellen 1,7 bis 9,7-fach so hoch wie in HUVEC-Zellen, im Detail: XPF 3,1 und 4, XPG 1,7 und 2,2, Pol ϵ 2,7 und 5,4, Lig I 4,5 und 9,7 und Lig III 2,3 und 1,8. Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass im Gegensatz zu den oben genannten Proteinen DDB2, XPC, XPA und Pol δ in HUVEC-Zellen basal stärker exprimiert wurden.

Zusammenfassend zeigten HUVEC-Zellen im Vergleich mit HUASMC- und hPC-PL-Zellen eine höhere Expression der NER-Proteine für Schadenserkennung, jedoch eine verminderte Expression wichtiger NER-Proteine, was auf eine verminderte NER-Reparaturkapazität hinweist, in der Schaden zwar erkannt aber nicht prozessiert werden kann.

BPDE kann DNA-Reparaturfaktoren induzieren, d.h. zur transkriptionellen Aktivierung von DNA-Reparaturgenen führen (Christmann et al. 2016). Um dies zu prüfen wurden die in Abbildung 36 dargestellten Protein-Spuren nach BPDE-Behandlung mit den Basiswerten verglichen und der prozentuale Anstieg bzw. Abfall berechnet. In Tabelle 6 ist die prozentuale Veränderung der Proteinexpression nach Behandlung mit 0,5 μ M BPDE dargestellt und in Tabelle 7 ist die prozentuale Veränderung der Proteinexpression nach Behandlung mit 1 μ M BPDE zusammengefasst worden. Grün markiert sind die Felder, wo eine Zunahme der Proteinexpression nach Behandlung festzustellen war, in Rot sind die Felder markiert, wo eine Abnahme der Proteinexpression nach Behandlung festzustellen war. Schwankungen um $\pm 10\%$ wurden farblich nicht markiert und stellen den Varianzbereich der Western Blot-Auswertung dar. Die Expression von XPC nahm in HUVEC- und hPC-PL-Zellen nach Behandlung mit 0,5 μ M BPDE stark zu, in HUVEC- und HUASMC-Zellen dagegen die Expression von ERCC1. Nach Behandlung mit BPDE nahm die Expression von XPA, XPF, Pol ϵ , Pol δ und Lig III in allen drei Zelltypen ab oder blieb innerhalb des 10% Varianzbereichs.

Tabelle 6: Prozentuale Veränderung der NER-Protein Expression. Die Expression nach 0,5 μ M BPDE in Bezug auf die Basalexpression. Analyse der Abbildung 36.

	HUVEC	HUASMC	hPC-PL
DDB2	-10%	+200%	0%
XPC	+90%	-10%	+167%
XPA	-30%	-44%	0%
ERCC1	+460%	+16%	-28%
XPF	-30%	-10%	-15%
XPG	+10%	+6%	+5%
Pol ϵ	-50%	-70%	-70%
Pol δ	-70%	-83%	-80%
Lig I	-70%	+9%	-4%
Lig III	-60%	-22%	-33%

Nach Behandlung mit 1 μ M BPDE wurde eine Zunahme der Expression von DDB2 und XPC in HUASMC- und hPC-PL-Zellen festgestellt. In HUVEC-Zellen nahm mit Ausnahme von XPG, das nach Behandlung mit 1 μ M BPDE um 50 % stärker exprimiert wurde, die Expression von XPA, XPF, Pol ϵ , Pol δ , Lig I und Lig III ab.

Tabelle 7: Prozentuale Veränderung der NER-Protein Expression. Die Expression nach 1 μ M BPDE in Bezug auf die Basalexpression. Analyse der Abbildung 36.

	HUVEC	HUASMC	hPC-PL
DDB2	-50%	+300%	+14%
XPC	-70%	+20%	+133%
XPA	-80%	-56%	-75%
ERCC1	+10%	+4%	43%
XPF	-50%	-13%	-25%
XPG	+50%	-6%	-27%
Pol ϵ	-50%	-44%	-93%
Pol δ	-90%	-83%	-80%
Lig I	-50%	-18%	-91%
Lig III	-90%	-30%	-50%

Die Expression von DDB2 und XPC mRNA wurde außerdem noch via semiquantitative Real-Time PCR bestimmt. Wie in Abbildung 37 zu sehen ist, induzierte die Behandlung mit 0,5 μ M BPDE die Expression von DDB2 und XPC in HUVEC- und HUASMC-Zellen über das 2-fache und in hPC-PL-Zellen nur auf das 1,3-fache. Die Behandlung mit 1 μ M BPDE induzierte DDB2 und XPC jedoch über das 2-fache in HUASMC- und hPC-PL-Zellen, während die HUVEC-Zellen eine Reduktion der mRNA zeigten.

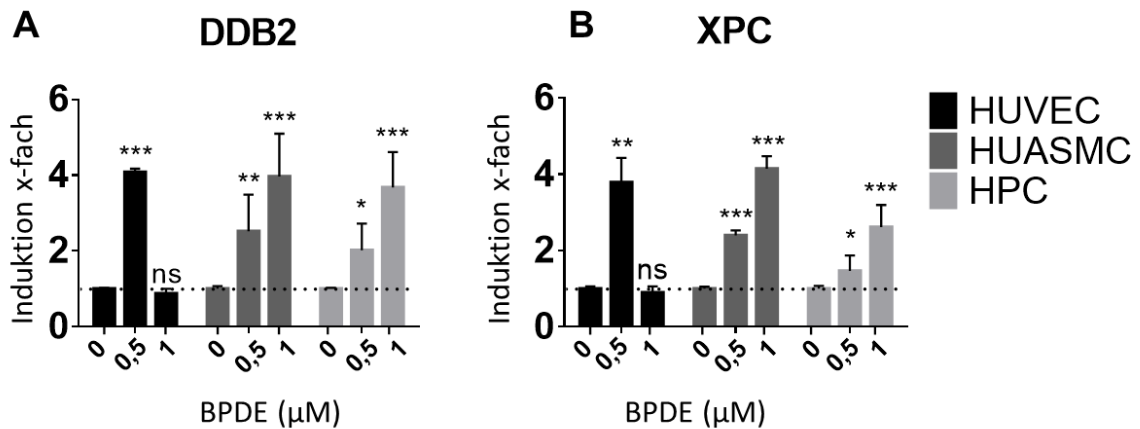


Abbildung 37: mRNA Expression von DDB2 (A) und XPC (B) nach Behandlung mit BPDE. (A) Semi quantitative Real-Time PCR der mRNA Expression von DDB2 nach Behandlung mit 0,5 und 1 µM BPDE für 24 h. (B) Semi quantitative Real-Time PCR mRNA Expression von XPC nach Behandlung mit 0,5 und 1 µM BPDE für 24 h. (A+B) Gezeigt ist der Mittelwert ± SD von zwei unabhängigen Experimenten jeweils in Duplikaten durchgeführt. Die relative mRNA Expression der unbehandelten Kontrolle wurde auf 1 gesetzt.

Zusammenfassend sah man nach Behandlung mit 0,5 µM BPDE in HUVEC-Zellen die hochregulierte Expression von DDB2 und XPC auf mRNA-Ebene und von XPC außerdem auf Proteinebene, in HUASMC-Zellen eine Induktion auf mRNA-Ebene, jedoch nur von DDB2 auf Proteinebene und in hPC-PL-Zellen eine nur schwache Induktion von DDB2 und XPC auf mRNA-Ebene, jedoch eine starke Induktion von XPC auf Proteinebene. Nach Behandlung von 1 µM BPDE ging die mRNA von DDB2 und XPC in HUVEC-Zellen eher zurück, was ebenfalls auf Proteinebene sichtbar war, in HUASMC- und hPC-PL-Zellen konnte man sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene eine starke Induktion von DDB2 und XPC feststellen.

4.2.7 DNA-Schadensantwort in HUVEC, HUASMC und hPC-PL nach Behandlung mit BPDE

Die Behandlung mit BPDE induziert in HUVEC-Zellen im Vergleich zu HUASMC- und hPC-PL-Zellen vermehrt Apoptose (siehe 4.2.1), was darauf zurückzuführen ist, dass aufgrund des NER-Defekts eine höhere Menge an BPDE-Addukten in der DNA vorhanden ist. Zur Klärung der Frage, ob dies Auswirkungen auf die DNA-Schadensantwort hat, wurden Western Blot-Analysen nach Behandlung mit 1 µM BPDE über eine Zeit von 4-48 h

durchgeföhrt. Wie in Abbildung 38 dargestellt ist, wurde die Kinase Chk1 phosphoryliert und damit aktiviert. In HUVEC-, HUASMC- und hPC-PL-Zellen war jeweils die stärkste Phosphorylierung von Chk1 4 und 6 h nach Behandlung nachweisbar.

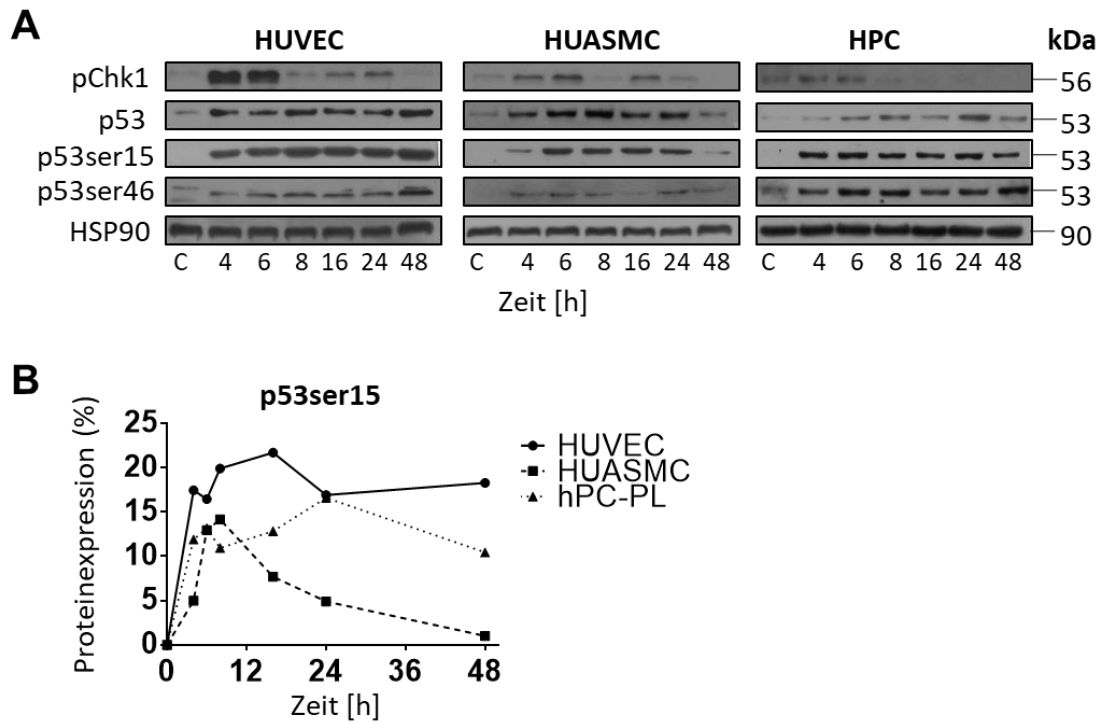


Abbildung 38: NER Protein Expression basal und 24 h nach Behandlung mit BPDE. Die Aktivierung (=Phosphorylierung von Chk1) von Chk1, sowie die Aktivierung (=Phosphorylierung von p53 an Serin 15/ Serin 46) von p53 durch 1 μ M BPDE wurde zeitabhängig untersucht. (A) Westernblotanalyse in Gesamtzellextrakten nach Behandlung mit 1 μ M BPDE. HSP90 diente als Ladekontrolle. C=Kontrolle. (B) Zeitabhängige Quantifizierung des p53 Serin15 Levels nach Behandlung mit 1 μ M BPDE. HUASMC 48 h wurde zur Normalisierung herangezogen.

Ebenfalls wurde nach Behandlung mit BPDE p53 stabilisiert (sichtbar an der Gesamt-p53-Proteinmenge) und phosphoryliert an Serin15 und Serin46. In Abbildung 38B ist die Quantifizierung der p53 Serin15 Expression über die Zeit zu sehen. Während die Menge in HUVEC über die Zeit hinweg stabil blieb, nahm die Menge von p53 Serin15 in HUASMC- und hPC-PL-Zellen mit der Zeit wieder ab.

4.2.8 Einfluss der BPDE-Behandlung auf Primärzilien

Primärzilien haben wie einleitend erwähnt eine wichtige physiologische Funktion bei der Blutdruckregulierung durch das Endothel (siehe 2.7.1). Daher wurde zunächst untersucht, ob die drei Primärzelltypen Zilien unter Versuchsbedingungen ausbilden können (Zilium in Abbildung 39 rechts zu sehen).

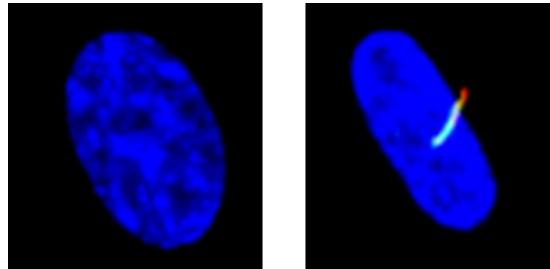


Abbildung 39: Beispielbild einer Zelle (links) und einer Zelle mit Zilium (rechts). Mittels Fluoreszenzfärbung dargestellte Zelle links ohne Zilium, rechts mit Zilium. Der Zellkern ist blau gefärbt, das Zilium ist grün/rot gefärbt.

Hierzu wurden die Zellen auf Deckgläschen konfluent ausgesät und für 48 h in verschiedenen Medien inkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Da die Zellen in der G_0 -Phase (vollständiger Zellteilungsstopp) des Zellzyklus Zilien ausbilden, wurden verschiedene Mangelmedien getestet, um die Bedingungen für die verschiedenen Zelltypen festzustellen, unter denen sie ihre Teilung einstellen. Abbildung 40 fasst die Auswertung der ersten Untersuchung zusammen.

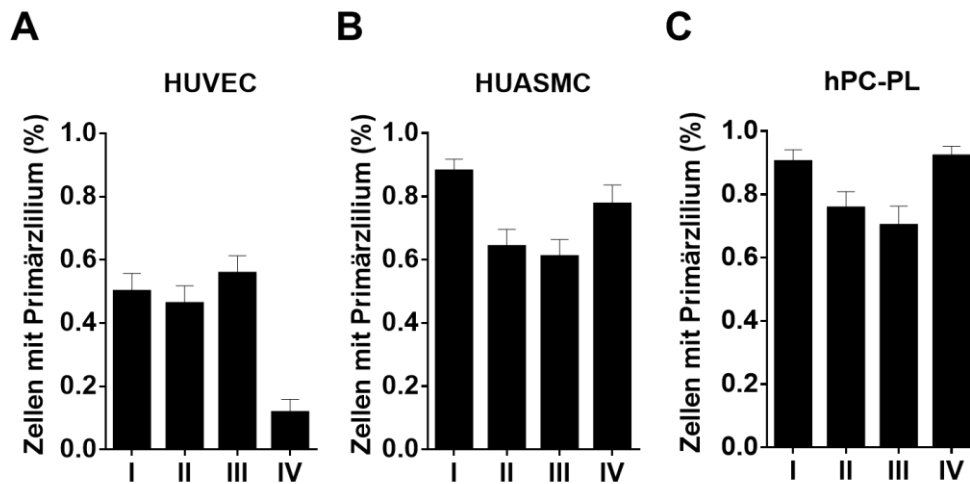


Abbildung 40: Analyse der besten Mangelmedium-Kondition für den höchsten Anteil zilierter Zellen in HUVEC, HUASMC und hPC-PL. Die Zellen wurden konfluent auf Deckgläschen ausgesät, über 48 h in verschiedenen spezifischen Mangelmedien kultiviert. Nach Fixierung der Zellen wurden zwei zilienspezifische Proteine immunzytochemisch angefärbt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. I Medium ohne Supplement, II Medium mit Supplement, III Medium mit Supplement + 20 % FCS, IV Opti-MEM. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment wurden mindestens 50 Zellen ausgezählt.

Die Versuchsbedingungen (I Medium ohne Supplement, II Medium mit Supplement, III Medium mit Supplement + 20 % FCS, IV Opti-MEM) ergaben, dass HUVEC-Zellen im Trend die größte Menge an zilierten Zellen nach Inkubation im Medium mit erhöhter Serumkonzentration zeigten (III). Die HUASMC-Zellen zeigten den signifikant höchsten Anteil an zilierten Zellen nach 48 h Inkubation in Medium ohne Supplement (I). hPC-PL-Zellen hingegen wiesen die größte Menge zilierter Zellen nach Inkubation in Opti-MEM auf (IV). Die je Zelltyp besten Mangelmedienkonditionen, unter denen je Zelltyp spezifisch die meisten zilierten Zellen gemessen wurden, wurden für alle weiteren Zilien-Experimente verwendet. Repräsentative Aufnahmen von Ausschnitten der Zellpopulation (Zellkerne in blau) und der Zilien (grün und rot) sind in Abbildung 41 zu sehen. Es wurden nur völlig intakte Zilien in der Auswertung gezählt. Hierzu wurden die LSM-Aufnahmen visuell und von Hand ausgewertet.

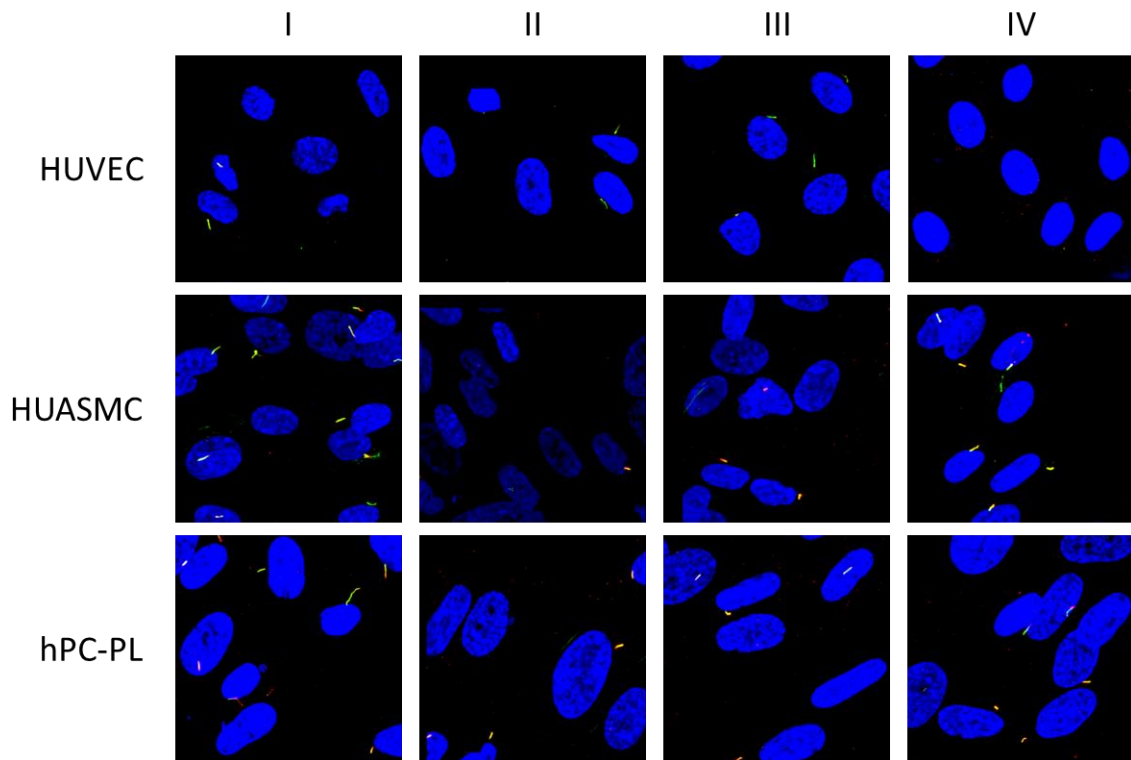


Abbildung 41: Repräsentative Bilder der Zellen mit Primärzilium zu der in Abbildung 40 dargestellten Analyse der Mangelmediumkonditionen. Die Zellen wurden konfluent auf Deckgläschen ausgesät, über 48 h in verschiedenen spezifischen Mangelmedien kultiviert. Nach Fixierung der Zellen wurden zwei zilienspezifische Proteine immunzytochemisch angefärbt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. I Medium ohne Supplement, II Medium mit Supplement, III Medium mit Supplement + 20 % FCS, IV Opti-MEM.

Die anschließende Untersuchung sollte klären, ob der Anteil zilierter Zellen durch die Behandlung mit BPDE beeinflusst wird. Hierzu wurden die Zellen ebenfalls auf Deckgläschen ausgesät, 48 h in Mangelmedium inkubiert und dann für 24 h mit 0,5 μM BPDE behandelt. Die Auswertung erfolgte erneut über die spezifische Anfärbung von Zilienmarkern und der Analyse am Fluoreszenzmikroskop. In der Abbildung 42 sind die Ergebnisse dargestellt. Sie zeigen, dass in den drei untersuchten Zelltypen die Behandlung mit BPDE signifikant den Anteil an zilierten Zellen senkte (repräsentative Bilder in Abbildung 45A).

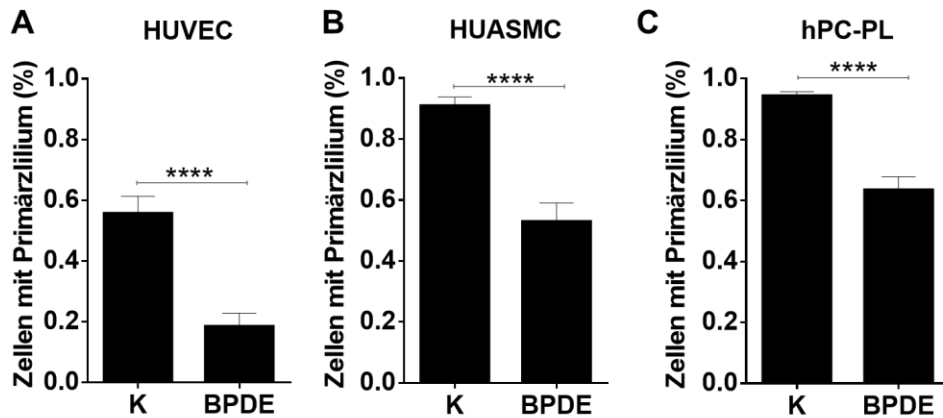


Abbildung 42: Anteil an Zellen mit Primärzilium nach der Behandlung mit 0,5 µM BPDE. Die Zellen wurden konfluent auf Deckgläschen ausgesät, über 48 h in ihrem spezifischen Mangelmedium kultiviert und für 48 h mit 0,5 µM BPDE behandelt. Nach Fixierung der Zellen wurden zwei zilienspezifische Proteine immunzytochemisch angefärbt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment wurden mindestens 50 Zellen ausgezählt.

Es sollte weiterhin geklärt werden, ob andere Agenzien oder, angelehnt an den ersten Teil der Untersuchungen (Kapitel 4.1), das WRN-Protein denselben Einfluss auf den Anteil ziliierter Zellen der drei Primärzelltypen haben. Hierzu wurden die Zellen wie zuvor ausgesät, für 48 h in Mangelmedium inkubiert und mit 100 µM TMZ, 1 mM MMS oder 1 µM WRNi behandelt, angelehnt an die Dosen, die in 4.1.1 für EA.hy926- und VH10tert-Zellen verwendet wurden (Abbildung 43). Die Analyse ergab zunächst, dass die Dosis von 1 mM MMS zu toxisch für die drei Primärzelltypen war, da nach der Fixierung und dem Anfärben keine Zellen mehr zur Auswertung vorhanden waren. Ebenfalls erwies sich die Dosis des WRNi, die zuvor für die Untersuchung in Kapitel 4.1.4 mit den Zelllinien EA.hy926 und VH10tert verwendet wurde und bei dieser nicht toxisch war, als sehr toxisch für die hPC-PL-Zellen. Es konnten für diesen Ansatz mit 1 µM WRNi insgesamt nur 23 Zellen ausgezählt werden. Bei diesen wies nur eine Zelle noch ein intaktes Zilium auf. Die Auswertung der Wirkung von 100 µM TMZ auf die Zellen zeigte in keinem Primärzelltyp eine signifikante Verringerung der Anzahl ziliierter Zellen.

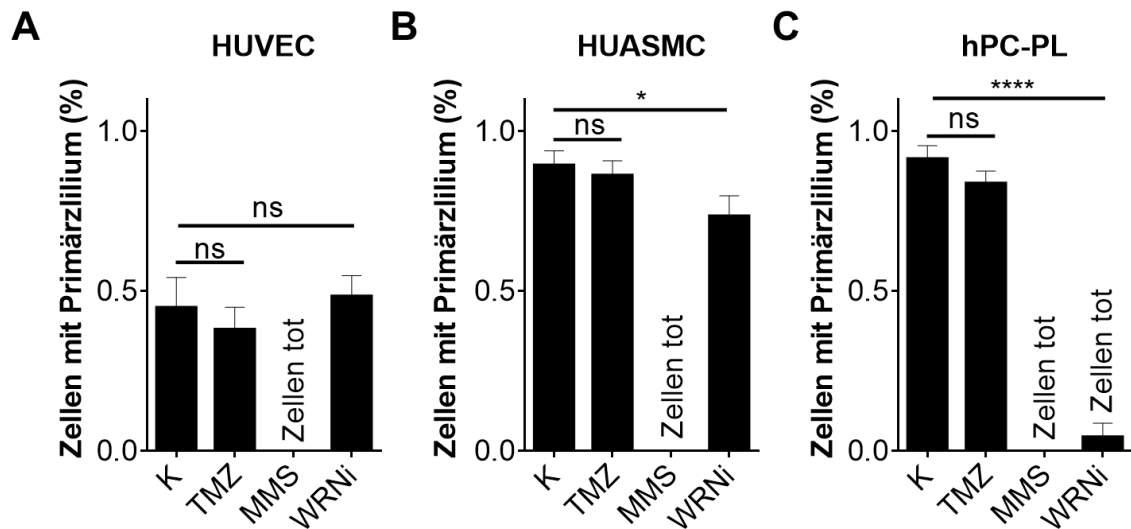


Abbildung 43: Anteil an Zellen mit Primärziliium nach der Behandlung mit TMZ, MMS oder WRNi. Die Zellen wurden konfluent auf Deckgläschen ausgesät, über 48 h in ihrem spezifischen Mangelmedium kultiviert und für 48 h mit 100 μ M TMZ, 1 mM MMS oder 1 μ M WRNi behandelt. Nach Fixierung der Zellen wurden zwei zilienspezifische Proteine immunzytochemisch angefärbt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Kontrolle, TMZ und WRNi: Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment wurden mindestens 50 Zellen ausgezählt. MMS: ein Experiment.

4.2.8.1 Einfluss des ATRi auf die Anzahl zilierter Zellen nach Behandlung mit BPDE

Da in einem 2016 erschienenen Review funktionelle Überschneidungen zwischen DNA-Schadensantwort und der Ziliengese thematisiert wurden (Johnson und Collis 2016), nahmen wir uns vor, experimentell zu klären, ob die Reduktion der Anzahl zilierter Zellen nach Behandlung mit BPDE auf einen Signalweg der DNA-Schadensantwort zurückzuführen ist. Hierzu wurden die Zellen unter denselben Bedingungen ausgesät und inkubiert, jedoch vor der Behandlung mit BPDE für 1 h mit verschiedenen Inhibitoren vorbehandelt. Bei den verwendeten Inhibitoren handelte es sich um Chk2-Inhibitor II (Chk2i), KU-55933 (ATMi), Mirin (MRE11i), MK-8776 (Chk1i) und VE-822 (ATRi). Es wurde mit den folgenden Konzentrationen der Inhibitoren gearbeitet: 10 μ M für Chk2i, 10 μ M für ATMi, 25 μ M für MRE11i, 0,3 μ M für Chk1i und 10 μ M für ATRi.

Außer ATRi hatte keiner der verwendeten Inhibitoren einen Effekt auf die Reduktion der zilierten Zellen nach BPDE Behandlung, weshalb die Versuche nicht wiederholt wurden. Die verwendete Konzentration des ATMi war zu toxisch für die Primärzellen, sodass nach der Fixierung keine Zellen mehr für eine Auswertung vorhanden waren. Ebenso hatte

der Chk2i bereits in der Kontrolle ohne zusätzliche BPDE Behandlung Einfluss auf die Anzahl zilisierter Zellen, da er ebenfalls zu einem Rückgang derselben führte. Wie in Abbildung 44 und auf den repräsentativen Aufnahmen in Abbildung 45 dargestellt ist, erfolgte nach Behandlung der Zellen mit ATRi eine Aufhebung der Reduzierung der zilisierten Zellen, wie sie nach BPDE Behandlung zu verzeichnen war.

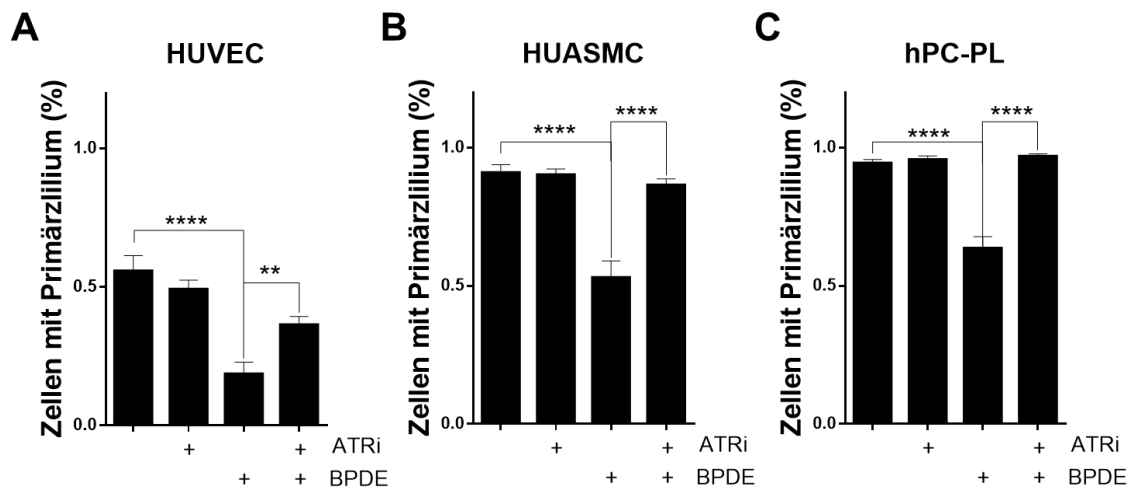


Abbildung 44: Anteil an Zellen mit Primärzilie nach der Behandlung mit 0,5 μ M BPDE \pm ATRi. Die Zellen wurden konfluent auf Deckgläschen ausgesät, über 48 h in ihrem spezifischen Mangelmedium kultiviert und für 48 h mit 0,5 μ M BPDE \pm ATRi behandelt. Nach Fixierung der Zellen wurden zwei zilienspezifische Proteine immunzytochemisch angefärbt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment wurden mindestens 50 Zellen ausgezählt.

In HUVEC-, HUASMC- und hPC-PL-Zellen führt der Einsatz des ATRi vor der Behandlung mit BPDE dazu, dass die Anzahl zilisierter Zellen nicht so stark abnimmt wie nach alleiniger Behandlung mit BPDE. Der Unterschied zwischen der Anzahl zilisierter Zellen nach BPDE Behandlung und nach ATRi und anschließender BPDE Behandlung ist in HUVEC-, HUASMC- und hPC-PL-Zellen hoch signifikant. Die Abbildung 45 zeigt zur Unterstützung dieser Beobachtung einen Ausschnitt des Zellrasens, um sowohl zilisierte Zellen als auch nicht zilisierte Zellen mit abzubilden.

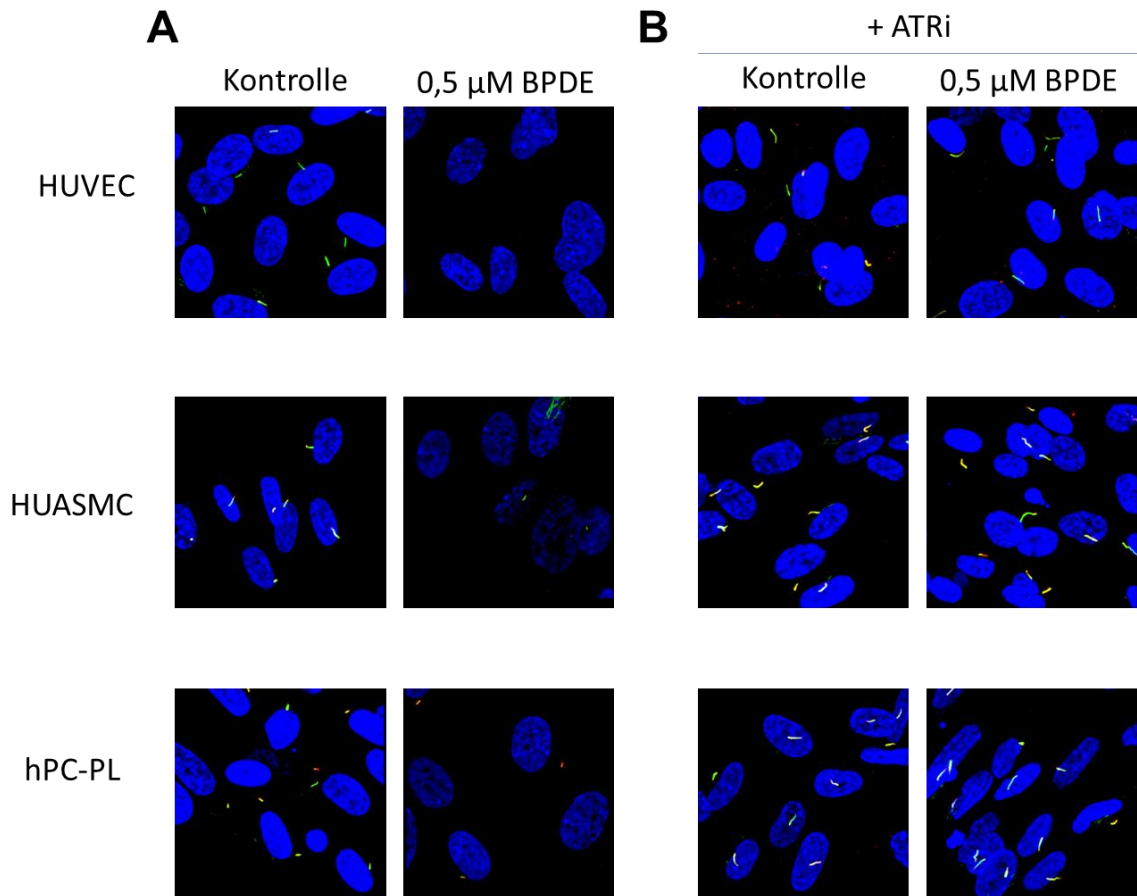


Abbildung 45: Repräsentative Bilder von Zellen mit jeweils einem Primärzilium nach Behandlung mit BPDE ± ATRi. Die Zellen wurden konfluent auf Deckgläschen ausgesät, über 48 h in verschiedenen spezifischen Mangelmedien kultiviert. Die Behandlung erfolgte mit oder ohne der Vorinkubation mit ATRi und anschließend mit 0,5 μM BPDE für 24 h. Nach Fixierung der Zellen wurden zwei zilienspezifische Proteine immunzytochemisch angefärbt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment wurden mindestens 50 Zellen ausgezählt.

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass BPDE in subtoxischer Dosis einen starken Einfluss auf die Anzahl zilierter Zellen in HUVEC-, HUASMC- und hPC-PL-Zellen hat. Der ATRi war der einzige auswertbare, getestete Inhibitor der DNA-Schadensantwort, der Einfluss auf den Effekt von BPDE auf die Menge zilierter Zellen hatte.

5 Diskussion

Das Endothel bildet die innerste Schicht der Blutgefäße aus, wobei es von glatten Muskelzellen oder Perizyten umsäumt und gestützt wird. Neben den wichtigen Funktionen wie Blutdruckregulierung, Blutgerinnung oder Wundheilung stellt das Endothel außerdem eine Barriere dar, die das umgebende Gewebe vor allerlei Substanzen, die durch das Blut transportiert werden, schützt. Vor allem im Gehirn stellt das Endothel als Blut-Hirn-Schranke eine umfassende Schutzbarriere dar, welche das Hirngewebe vor vielen Substanzen abschirmt (Karnovsky 1968; Reese und Karnovsky 1967; Dempsey und Wislocki 1955). Es gibt Untersuchungen, die dem Endothel ähnliche Barrierefunktionen in der Cornea (Kaye et al. 1973) und dem Thymus (Raviola und Karnovsky 1972) zusprechen.

Ein gesundes und funktionsfähiges Endothel kann neben den Barrierefunktionen die oben genannten lebensnotwendigen Aufgaben verrichten und ist deshalb von zentraler Wichtigkeit für den Körper. Viele Krankheiten gehen jedoch mit einer Einschränkung oder gar Fehlfunktion des Endothels einher, wie z.B. die in der Einleitung beschriebene Atherosklerose (Kapitel 2.6.1), Diabetes mellitus oder Bluthochdruck. Neben den genannten Krankheiten gibt es viele Substanzen, die, vom Körper aufgenommen, durch das Blut verteilt werden und das Endothel schädigen können. Zu diesen Substanzen zählen Genotoxine (z.B. Aflatoxin) oder auch Medikamente wie z.B. Krebstherapeutika (z.B. Temozolomid) oder Stoffe, die in der Nahrung enthalten sind (z.B. B[a]P) oder die wir z.B. durch Rauchen von Tabak (z.B. B[a]P) aufnehmen. Die Reaktion der Endothelzellen auf DNA-schädigende Substanzen, wie den Metaboliten von B[a]P, BPDE, welcher Gegenstand der vorliegenden Untersuchung war, ist hinsichtlich Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität und der Zellfunktionen von besonderer Bedeutung.

DNA-Schäden, die nicht erkannt und repariert werden, führen zu Mutationen, zum Funktionsverlust der Zelle und zu einer möglichen Tumorinitiation. Durch die zuerst beschriebenen Funktionen des Endothels kommt die Frage auf, ob dieser Zelltyp eine besonders effiziente DNA-Reparatur besitzt, die gegenüber den induzierten DNA-

Schäden einen besseren Schutz bewirkt, als es in anderen Zelltypen des umliegenden Gewebes der Fall ist. Patienten des WRN-Syndroms haben durch den Defekt des WRN-Proteins besondere Einschränkungen in einigen zellulären Mechanismen wie DNA-Replikation und DNA-Reparatur. Sie zeigen zudem bereits früh starke atherosklerotische Veränderungen, was auf eine Verbindung beider Phänomene hinweisen mag. Inwieweit das WRN-Protein an der Schutzfunktion der Endothelzellen beteiligt ist, war folglich Teil der wissenschaftlichen Fragestellung und Gegenstand der vorliegenden Untersuchung.

Als Grundlage dieser Untersuchung diente die Modells substanz Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE), die ein reaktiver Metabolit des polyzyklischen Kohlenwasserstoffes B[a]P ist und nachweislich kanzerogen auf den Menschen wirkt. Das reaktive BPDE besitzt eine sehr kurze Halbwertszeit im wässrigen Medium, da es aufgrund seiner Epoxid-Eigenschaften ebenfalls mit Wasser reagieren kann und anschließend nicht mehr reaktiv ist. Die für die Versuche angenommene Halbwertszeit beträgt ca. 10 min bei 37°C und die damit durchgeführte Behandlung entspricht einer Pulsbehandlung, da nur in den ersten Minuten nach Zugabe des BPDE eine Reaktion mit der DNA, bzw. einer kovalenten Bindung an die DNA, stattfinden kann (siehe auch Kapitel 2.1).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden zwei Zelllinien zum Vergleich herangezogen: die endothelähnliche Zelllinie EA.hy926, ein Hybrid aus HUVEC und der Lungenkarzinomlinie A549, und die menschliche diploide Fibroblastenzelllinie VH10tert, die durch Telomerasetransfektion immortalisiert wurde. In diesen beiden Zelltypen wurde der Einfluss des WRN-Proteins auf die Sensitivität gegenüber BPDE untersucht und im folgenden Kapitel 5.1 diskutiert. Dabei wurden HUVEC mit ihren im Gewebe direkt benachbarten Zelltypen, den glatten Muskelzellen (HUASMC) und den Perizyten (hPC-PL), vergleichend untersucht und die Ergebnisse in Kapitel 5.2 diskutiert.

5.1 Der Einfluss von WRN auf zytotoxische Endpunkte

Das WRN-Protein ist eine der fünf humanen RecQ-Helikasen. Es hat, wie bereits in der Einleitung beschrieben, viele zentrale Rollen in der DNA-Replikation, der Telomer-Erhaltung und der DNA-Reparatur (siehe Kapitel 2.4.2). Die intensivste Forschung an WRN gibt es im Bereich der DNA-Replikation, wo WRN an der Progression, dem Neustart und am Schutz von Replikationsgabeln beteiligt ist (Mukherjee et al. 2018). Die Prozessierung und der Neustart von gestoppten Replikationsgabeln benötigt unter anderem das Zusammenspiel von WRN mit RPA und Rad51, die an den geblockten Replikationsgabeln co-lokalisieren (Constantinou et al. 2000; Sakamoto et al. 2001; Ryu und Koo 2017). Die Interaktion von WRN mit dem 9.1.1.-Komplex (RAD9-RAD1-HUS1) verhindert die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) an blockierten Replikationsgabeln (Pichierri et al. 2012). Der *Knockdown* von einer der fünf RecQ-Helikasen, zu denen WRN gehört, führt zur Induktion von zellulärer Seneszenz, die sich durch β -Galaktosidase-Färbung auszeichnet, sowie einer reduzierten Zellproliferation (Lu et al. 2014). Aber auch nach der Induktion von DNA-Schäden soll ein durch MDM2 regulierter Abbau von WRN zur Induktion der zellulärer Seneszenz beitragen (Liu et al. 2018). Eine Untersuchung von Garige und Sharma (2014) konnte zeigen, dass ein WRN-*Knockdown* die Zellen gegenüber einer Behandlung mit B[a]P sensitiviert und WRN demnach eine wichtige Schutzfunktion bei der DNA-Reparatur und/oder der DNA-Schadensantwort nach BPDE-Gabe besitzt. Auch auf DNA-Vernetzer wie Mitomycin C reagieren WRN-defiziente Zellen sensitiv (Poot et al. 2001). Choudhary et al. (2006) untersuchten wiederum den umgekehrten Einfluss von BPDE-Addukten auf die Funktion der WRN-Helikase und zeigten, dass die Helikase-Aktivität durch BPDE-Addukte inhibiert werden kann.

Zellen von WRN-Patienten zeigen gegenüber Zellen von gesunden Menschen eine verminderte Replikations-Initiation (Takeuchi et al. 1982) und eine leicht verlängerte S-Phase (Poot et al. 1992). Untersuchungen von Ammazalorso et al. (2010) zeigen einen Anstieg von DSB nach einem Replikationsblock, wenn die Phosphorylierung von WRN durch ATM oder ATR nicht erfolgen kann. Ihren Ergebnissen zufolge sei die Phosphorylierung durch ATM bzw. ATR am C-terminalen Ende von WRN wichtig für die

Akkumulation von WRN am Replikationsblock, sowie für die Co-Lokalisation mit RPA und für die Rekrutierung von RAD51. Bleibt diese Phosphorylierung aus, kollabieren die Replikationsgabeln und mehr Zellen gehen in die Apoptose.

In einer frühen Studie von Leroy et al. (1995) wurden Einzelstrangbrüche (ESB) nach Behandlung mit BPDE in Lymphozyten nachgewiesen, die über die Zeit der Nachinkubation zunahm. Es wurde dabei angenommen, dass sie durch die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) entstehen und deshalb über die Zeit nach BPDE-Zugabe zum Medium akkumulieren.

XPG, eine der beiden für die Inzision verantwortlichen Endonukleasen der NER, moduliert nachweislich die Helikase-Aktivität von WRN, indem es diese stimuliert (Trego et al. 2011). Trego et al. zeigten außerdem Hinweise dafür, dass sowohl WRN als auch XPG, als solitäre Proteine und auch gemeinschaftlich, die Anlagerung von Einzelstrangbrüchen fördern können und wie im Modell in Abbildung 46 gezeigt ist, den Replikationsgabelkollaps an blockierten Replikationsgabeln verhindern, indem sie gemeinschaftlich die DNA-Struktur entwinden und die DNA Stränge verbinden. Es ist zusammengefasst sehr wahrscheinlich, dass der WRN-Knockdown Konsequenzen für die Zellen nach BPDE Behandlung hat und diese sensitiviert.

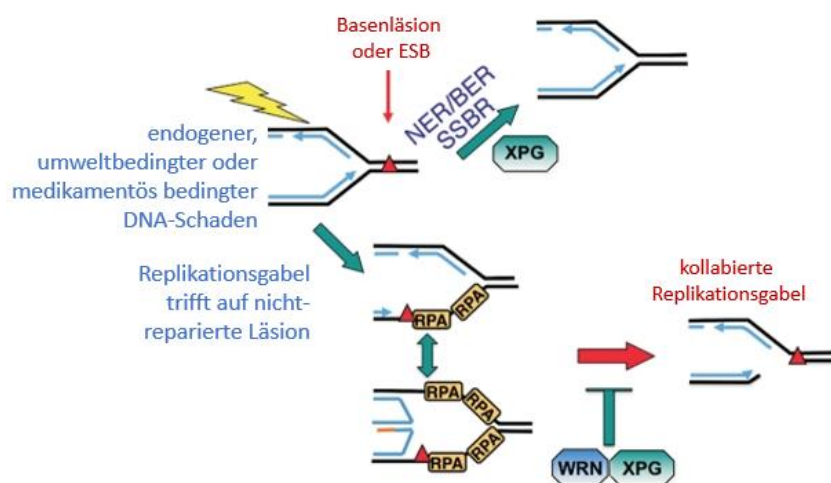


Abbildung 46: Modell des Zusammenspiels von WRN und XPG bei der Reparatur von DNA-Läsionen, die die Replikationsgabel blockieren. Die Reparatur von Basenläsionen ist notwendig, damit die DNA-Replikation fehlerfrei stattfinden kann, wenn eine Läsion nicht repariert wurde und eine Replikationsgabel auf den Schaden trifft, kann es zu einem Replikationsgabelkollaps kommen. Die Proteine WRN und XPG sind gleichermaßen an dem Aufschluss und der Reparatur der DNA-Strukturen um die blockierte Replikationsgabel beteiligt. Abbildung modifiziert (Trego et al. 2011).

5.1.1 Der Einfluss von WRN auf BPDE-induzierte zytotoxische Endpunkte in Endothelzellen und Fibroblasten

Zur Überprüfung, ob WRN Einfluss auf die BPDE-induzierte Toxizität in Endothelzellen und Fibroblasten hat, wurden die endothelähnliche Zelllinie EA.hy926, sowie die Fibroblastenlinie VH10tert verwendet. Ein durch siRNA-erzeugter transienter *Knockdown* von WRN, der über den maximalen Behandlungszeitraum von 96 h aufrechterhalten blieb, wurde dabei mit einer Kontrolle verglichen, die mit nicht-kodierender siRNA transfiziert wurde. Die Kontrolle des *Knockdowns* auf Proteinebene wurde mittels Western Blot nachgewiesen und zeigte keine WRN-Rückstände in den *Knockdown*-Zellen (Abbildung 13). Das Auftreten seneszenten Zellen nach WRN-*Knockdown* ist ein Effekt, der auch in den durchgeführten MTT-Tests Auswirkungen auf die Ergebnisse hat (Abbildung 14-15). Die zunächst im MTT-Test nachgewiesene im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöhte Viabilität der WRN-*Knockdown*-Zellen nach BPDE-Behandlung (Abbildung 15) kann darauf zurückgeführt werden, dass die interne Kontrolle bereits weniger stark proliferierte als die Kontrollzellen ohne *Knockdown*. Der Einfluss der BPDE-Behandlung hatte, vermutlich wegen der fehlenden Proliferation, deshalb nicht mehr so starke Auswirkungen auf das Ergebnis. Nur mittels des MTT-Tests ist es also nicht möglich, den Einfluss des WRN-Proteins auf die Zell-Viabilität zu bestimmen. Die aus diesem Grund durchgeführten Zelltod-Messungen (Abbildung 17) zeigten, dass WRN-*Knockdown*-Zellen sensitiv auf eine Behandlung mit BPDE reagieren und bestätigen die Untersuchungen von Garige und Sharma (2014) mit dem Ausgangsstoff B[a]P, wenn auch der Effekt im Koloniebildungstest nicht zur Ausprägung kam (Abbildung 16).

Der zuvor erläuterte Einfluss von WRN auf die verminderte Entstehung von DSB an blockierten Replikationsgabeln (Pichierri et al. 2012) kann hier nicht bestätigt werden. Vielmehr zeigten die Ergebnisse nach BPDE-Behandlung von EA.hy926-Zellen weniger DSB, gemessen anhand von γ H2AX-Foci, im WRN-*Knockdown* (Abbildung 21). Das könnte an dem zuvor beschriebenen Effekt der verminderten Replikations-Initiation in WRN-defizienten Zellen und anzahlmäßig weniger blockierten Replikationsgabeln, aber auch an vermehrt seneszenten Zellen liegen. Die EA.hy926-Zellen (Abbildung 23A) zeigten nach WRN-*Knockdown* einen signifikanten Anstieg der G1-Phase und eine Reduktion des

Anteils der Zellen in der S-Phase. In den Kontrollzellen war dieser G1-Block nicht nachzuweisen. Dieses Resultat spiegelt sich in den Ergebnissen der DSB-Messung über γ H2AX-Foci wider, da in den Kontrollzellen die Induktion der DSB höher war als in den WRN-*Knockdown*-Zellen. In den VH10tert-Zellen (Abbildung 22) geht dieser Effekt ganz verloren, weil bereits die Kontroll-Zellen einen starken G1-Arrest nach der Behandlung mit 1,5 μ M BPDE zeigten (Abbildung 23B). Dass das WRN-Protein durch die Interaktion mit mehreren Enzymen Anteil an der Auflösung von Replikationsblocks und der DSB-Reparatur hat (siehe Einleitung 2.4.2), lässt sich ebenfalls an den stagnierenden DSB-Mengen in den WRN-*Knockdown*-Zellen erkennen, in denen keine signifikante Reparatur zu beobachten war (Abbildung 21-22). In der Zellzyklusphasenbestimmung lässt sich ein leichter Trend der WRN-*Knockdown* Kontrolle zum G1-Arrest feststellen (Abbildung 23), der ebenfalls bereits durch Lu et al. 2014 nachgewiesen wurde.

In dieser Arbeit wurde eine signifikante Akkumulation von ESB nach Behandlung mit BPDE in WRN-*Knockdown*-Zellen und ebenfalls nach dem Einsatz des WRN-Inhibitors NSC 617145 (WRNi) nachgewiesen (Abbildung 18 und Abbildung 20). Dies lässt ebenfalls Rückschlüsse auf einen Einfluss des WRN-Proteins auf den Ablauf der NER bzw. auf die Anlagerung und Ligation der innerhalb der NER entstandenen Einzelstrangbrüche schließen, wie Trego et al. (2011) zeigte, ist das Zusammenspiel von WRN und XPG wichtig für die Beseitigung eines DNA-Schadens an einer blockierten DNA-Replikationsgabel (siehe Abbildung 46). Dies muss aber noch Teil einer intensiveren Untersuchung werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der WRN-*Knockdown* sensitivierende Effekte auf die Reaktion von Endothelzellen und Fibroblasten nach BPDE-Behandlung hat. Dabei werden vielfältige Mechanismen und Signalwege durch das Fehlen von WRN beeinflusst; die diskutierten Ergebnisse der Behandlung von BPDE auf die beiden Zelllinien EA.hy926 und VH10tert kann nicht durch einen einzigen Wirkmechanismus von WRN erklärt werden. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass ein Einfluss von WRN auf die DSB-Reparatur zu den gezeigten Resultaten führt.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass in der getesteten Endothelzelllinie kein besonderer Schutzmechanismus gegenüber der Behandlung mit BPDE vorhanden ist, da

die verschiedenen Endpunkte größtenteils deckungsgleich mit der Fibroblastenlinie VH10tert waren. Jedoch könnten die Ergebnisse in primären Zellsystemen anders aussehen, als in immortalisierten Zellen wie den VH10tert und den EA.hy926, in denen veränderte Bedingungen (z.B. die Überexpression von Proteinen zur stetigen Proliferation) vorhanden sind. Da Primärzellen oft schwierig zu transfizieren sind und sich wegen ihrer wenigen Populationsverdopplungen *in vitro* kein stabiler *Knockout* herstellen lässt, könnte man die Versuche mit einem WRN-Inhibitor durchführen. Erst kürzlich erfolgte ein neues Screening nach *small molecule* Inhibitoren von WRN, wobei zwei neue vielversprechende Kandidaten (NCGC00029283 und NCGC00063279) identifiziert wurden (Sommers et al. 2019).

Ob in WRN Patienten die Entstehung von Folgeerkrankungen wie Atherosklerose oder Bluthochdruck mit der verminderten Toleranz von WRN-defizienten Endothelzellen und Fibroblasten gegenüber dem ubiquitär vorhandenen B[a]P und seinem Metaboliten BPDE einhergeht, müssten *in vivo* Folgestudien z.B. in WRN *Knockout* Mäusen bestätigen.

5.2 Rauchen als Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Krankheiten

Laut der Deutschen Hauptstelle für Suchtfragen e.V. (DHS, www.dhs.de), die in jedem Jahr aktuelle Daten über das Rauchverhalten der deutschen Bevölkerung offenlegt, ging der Verbrauch seit dem Jahr 2000 zwar von 129.625 Millionen Zigaretten auf 75.838 Millionen Zigaretten im Jahr 2017 zurück (-41 %), dafür stieg jedoch der Verbrauch anderer Tabakwaren (Zigarren/Zigarillos, Feinschnitt und Pfeifentabak) innerhalb dieser Zeitspanne an (um 10 %, 66 % und 256 %). Die aktuellste DEBRA-Studie (Deutsche Befragung zum Rauchverhalten) zeigt, dass immer noch rund 29 % der Deutschen rauchen (Kastaun et al. 2017). Zigarettenrauch enthält neben B[a]P noch weitere 60 gut charakterisierte Karzinogene (z.B. Nitrosamine, aromatische Amine) (Hecht 2003) und ist damit nicht nur für ein Drittel aller Krebsfälle mitverantwortlich, sondern wird auch mit der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie ischämischen Herzkrankheiten (z.B. koronare Herzkrankheit) oder zerebrovaskulären Krankheiten (z.B. Hirnblutungen) assoziiert. Schon das Rauchen von weniger als 5 Zigaretten am Tag steigert das Risiko für einen Herzinfarkt um das 1,5-fache, für einen Schlaganfall um das 2-fache (Burns 2003). In Deutschland gehen 13,5 % der jährlichen Todesfälle auf das Rauchen zurück, davon stellen Krebserkrankungen 40,5 %, Herz-Kreislauserkrankungen 31,8 % und Atemwegserkrankungen 27,6 % der Todesursachen dar (Deutsches Krebsforschungszentrum und Pabst Science Publishers 2015).

Wie bereits in der Einleitung beschrieben (Kapitel 2.6.1), ist Atherosklerose die Grunderkrankung, die zu den tödlichen Herz-Kreislauserkrankungen führt. Die Entstehung von Atherosklerose wird vor allem in Gefäßbereichen mit endothelialer Dysfunktion und vaskulärer Inflammation induziert. Es ist demnach äußerst wichtig den Zusammenhang zwischen den im Zigarettenrauch enthaltenen Substanzen, u.a. B[a]P, und der Entwicklung von Atherosklerose (Herz-Kreislauf-Erkrankungen) durch endotheliale Schäden zu eruieren und die direkte Wirkung der Substanzen auf die Zellen des kardiovaskulären Systems näher zu untersuchen.

5.2.1 Ein Vergleich vaskulärer Primärzellen

Als Grundlage dieser Untersuchung diene wieder die Modellsubstanz Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE), die ein aktiver Metabolit des polyzyklischen Kohlenwasserstoffes B[a]P ist und nachweislich kanzerogene Wirkung hat. Um in diesem Teil der Arbeit das Endothel auf seinen möglichen außerordentlichen Schutz (d.h. eine besonders effiziente DNA-Reparatur) zu untersuchen, wurden endotheliale HUVEC mit ihren im Gewebe direkt benachbarten Zelltypen, den glatten Muskelzellen (HUASMC) und den Perizyten (hPC-PL), verglichen. Die Arbeiten sollten die Frage beantworten, ob Endothelzellen gegenüber DNA-Schäden durch BPDE besser geschützt sind, als andere Zelltypen des umliegenden Gewebes.

Die drei Zelltypen HUVEC, HUASMC und hPC-PL sind Primärzellen, die nach ihrer Isolation aus dem Menschen maximal über 15 Passagen kultiviert wurden, um ihren Primärzellstatus möglichst lang zu erhalten. Sie wurden von der Firma PromoCell bezogen, wo sie direkt aus dem menschlichen Gewebe isoliert und aufgereinigt und kryokonserviert wurden. Sie stammen aus direkt benachbartem Gewebe: die HUVEC und HUASMC aus der Nabelschnur und die hPC-PL aus Blutgefäßen der Plazenta. In der Literatur gibt es Nachweise dafür, dass alle drei Zelltypen die Cytochrom P-450-Enzyme (CYP) exprimieren, um damit die Ursprungssubstanz B[a]P in das Karzinogen BPDE umzuwandeln. HUVEC und HUASMC zeigen eine Expression von CYP1A1 und hPC-PL von CYP1B1 *in vitro*. Diese Cytochrom-P450-Oxidasen sind für die Metabolisierung von B[a]P verantwortlich (siehe Kapitel 2.1.1) (Annas et al. 2000; Dubey et al. 2004; Thirman et al. 1994; Palenski et al. 2013). In Mäusen und Ratten wurde *in vivo* nach Behandlung mit B[a]P eine Induktion von CYP1A1 und CYP1B1 in den Endothelzellen der Aorta nachgewiesen (Yang et al. 2016; Thirman et al. 1994). Thirman et al. (1994) zeigten außerdem eine Metabolisierung von B[a]P zu BPDE nach Induktion der CYP-Enzyme in der Ratten-Aorta.

5.2.1.1 Endothelzellen reagieren am sensitivsten auf BPDE

Um zunächst den Dosisbereich der Untersuchungen festlegen zu können, wurden MTT-Tests mit den drei Primärzelltypen HUVEC, HUASMC und hPC-PL durchgeführt. Schon bei

diesen Ergebnissen (siehe Tabelle 8 und Abbildung 24) wurde deutlich, dass die Endothelzellen (HUVEC) sehr sensitiv auf den Metaboliten BPDE reagierten, da sie einen LD₅₀ von unter 0,5 µM BPDE aufwiesen, während die anderen Zelltypen über 0,5 µM bis hin zu 1,2 µM BPDE tolerierten. Nach der Behandlung mit der moderaten Dosis von 0,75 µM BPDE zeigten noch 27 % der HUVEC-Zellen Enzym-Aktivität gegenüber 59 % und 45 % der HUASMC- und hPC-PL-Zellen (Tabelle 8). Nach der Behandlung mit der hohen Dosis von 1,5 µM BPDE zeigten noch 14 % der HUVEC-Zellen Enzym-Aktivität gegenüber 43 % und 33 % der HUASMC- und hPC-PL-Zellen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Zusammenfassung der verschiedenen Test-Endpunkte nach Behandlung mit BPDE in den drei Primärzelltypen HUVEC, HUASMC und hPC-PL.

Testtyp	HUVEC	HUASMC	hPC-PL
Dosis – Behandlungsdauer			
Zellviabilität			
0,75 µM BPDE	27 %	59 %	45 %
1,5 µM BPDE	14 %	43 %	33 %
SubG1 Population			
1,5 µM BPDE – 96 h	49 %	3 %	5 %
Apoptose			
0,75 µM BPDE – 96 h	38 %	10 %	11 %
1,5 µM BPDE – 96 h	68 %	20 %	21 %
Nekrose			
0,75 µM BPDE – 96 h	9 %	15 %	12 %
1,5 µM BPDE – 96 h	17 %	18 %	14 %

Diese Sensitivität konnte anschließend in den durchgeführten Apoptose- und Nekrose-Messungen erneut dokumentiert werden, da die HUVEC-Zellen nach BPDE-Behandlung eine sehr hohe Zelltodmenge von bis zu 68 % aufwiesen, während die anderen Zelltypen unter 21 % Apoptose blieben (Tabelle 8 und Abbildung 25-27). Die Unterschiede zwischen den getesteten Endothelzellen und den glatten Muskelzellen und Perizyten waren im MTT-Test und den Zelltodmessungen extrem, wenn auch der Proliferationstest mittels des iCelligence (Abbildung 28+29) belegt, dass alle Zelltypen nach Behandlung mit BPDE gleichermaßen in einen Proliferationsstopp traten und die vom iCelligence berechneten Populationsverdopplungszeiten anstiegen. Um die Frage der BPDE-vermittelten anti-proliferativen Wirkung abschließend zu klären, könnten Untersuchungen in zellzyklussynchronisierten Zellsystemen, BrdU- bzw. EdU-Inkorporationen oder auch die Analyse von Zellzyklusproteinen beitragen.

Insgesamt würde ein Proliferationsstopp der vaskulären Zellen nach BPDE-Behandlung Einfluss auf Wundheilung und Angiogenese haben, und könnte somit die Entstehung von Endothelschäden und damit die Entwicklung von Atherosklerose beschleunigen.

Mit Hilfe der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Färbung konnte nachgewiesen werden, dass HUVEC- und HUASMC-Zellen eine konzentrationsabhängige Induktion von Seneszenz aufwiesen (Abbildung 30A+B). Die Perizyten (hPC-PL) zeigten jedoch selbst nach hohen Behandlungsdosen mit BPDE nur einen geringen Anteil β -Galaktosidase positiver Zellen. Auf mRNA-Ebene konnte in hPC-PL-Zellen eine ähnlich hohe Induktion des p21-Gens dokumentiert werden, wie es in den HUVEC-Zellen der Fall war (Abbildung 30C). Die Hochregulierung des CDK-Inhibitors p21 kann ebenfalls als Beleg zellulärer Seneszenz herangezogen werden. Alle drei vaskulären Zelltypen reagieren also mit der Induktion von Seneszenz und einem damit verbundenen Proliferationsstopp, jedoch nur die Endothelzellen (HUVEC) zeigen zusätzlich eine sehr starke Zelltodinduktion. Man kann aus diesen Resultaten schließen, dass die Seneszenz als Proliferationsstopp von den Zellen eingesetzt werden könnte, um sie vor Mutationen und damit vor Tumorentstehung zu schützen. Das Endothel jedoch nimmt durch die zusätzliche Induktion des Zelltods mehr Schaden und im Organismus könnte es vermutlich

anschließend seine Funktion z.B. in der Wundheilung durch die fehlende Proliferation nicht mehr erfüllen. Dies könnte den Prozess der Atherosklerose unterstützen.

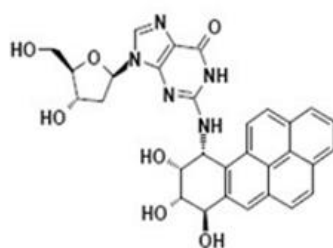
Zieht man die Ergebnisse der alkalischen Einzelzellgelelektrophorese zur Analyse heran (siehe Übersicht in Tabelle 9), wird deutlich, dass dort der größte Unterschied erneut zwischen Endothelzellen (HUVEC) und den beiden anderen Zelltypen HUASMC (glatte Muskelzellen) und hPC-PL (Perizyten) zu finden ist.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Endpunkte im Comet Assay und der Adukk-Messung nach Behandlung der Primärzellen mit BPDE.

Testtyp	HUVEC	HUASMC	hPC-PL
Dosis – Behandlungsdauer			
Comet Assay			
<i>Tail</i> Intensität			
0,75 μ M BPDE – 2,5 h	9,9	1,5	3,6
1,5 μ M BPDE – 2,5 h	24,1	13,2	11,2
BPDE Addukte			
Addukte/10^8 Nukleotiden			
0,5 μ M BPDE – 2 h	71	33	39
0,5 μ M BPDE – 24 h	73	3	17

Die dort gemessenen Einzelstrangbrüchen (ESB) entstehen bei der Reparatur der BPDE-Addukte (siehe auch Kapitel 2.3) und stellen Intermediate da, die nach dem ersten Schnitt von einer der Endonukleasen XPG oder ERCC1-XPF entstehen, und bis zur Ligation der DNA-Enden zu finden sind. Die Endothelzellen zeigten sowohl eine stärkere konzentrationsabhängige Induktion von ESB (Tabelle 9 und Abbildung 31) als auch eine

Akkumulation über die Zeit (Abbildung 32). Die niedrigen ESB-Mengen von HUASMC- und hPC-PL-Zellen, sowohl in der Konzentrationsabhängigkeit als auch in der Zeitabhängigkeit, könnten entweder bedeuten, dass sie die Addukte nicht reparieren, oder dass der Prozess schnell und ohne Akkumulation von ESB bzw. Intermediaten erfolgt. Gegen die erste Erklärung spricht, dass die gemessenen BPDE-Addukt Mengen (Tabelle 9 und Abbildung 35) der HUASMC- und hPC-PL-Zellen im Zeitverlauf deutlich reduziert wurden. Es ist also zu vermuten, dass der Abbau der Addukte (DNA-Addukt siehe Abbildung 47) und die fehlende Akkumulation von ESB bzw. Reparaturintermediaten auf eine sehr effiziente Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) schließen lassen. Die Endothelzellen (HUVEC) zeigen jedoch keine dieser Eigenschaften und der fehlende Abbau der BPDE-Addukte lässt vielmehr auf eine sehr ineffiziente Reparatur schließen.



N²-dG Addukt

Abbildung 47: BPDE-DNA-Addukt. Durch die Reaktion des BPDE-Epoxids mit dem Guanin der DNA entsteht ein N²-Guanin Addukt, welches durch die Nukleotidexzisionsreparatur entfernt werden kann.

Die ineffiziente Reparatur von BPDE-Addukten in den HUVEC-Zellen könnte für die starke Induktion des Zelltodes verantwortlich sein und ihre Hypersensitivität im Vergleich zu den HUASMC- und hPC-PL-Zellen erklären.

Wie in Abbildung 33 zu sehen ist, führt eine Behandlung mit BPDE zu DSB, deren Entstehung abhängig vom Durchlaufen der Zellen durch die S-Phase ist, jedoch konnte kein Unterschied zwischen den drei Primärzelltypen hinsichtlich der DSB-Menge festgestellt werden. Aufgrund der hohen Zelltodrate der Endothelzellen (HUVEC; siehe Tabelle 8) hätte man von einer starken Induktion von DSB ausgehen können, da es sich

bei DSB um sehr toxische Läsionen handelt. DSB können also nicht der alleinige Grund für die starke Zelltodinduktion in HUVEC sein. Die Anzahl der γ H2AX-Foci zeigte in den Primärzellen keinen signifikanten Unterschied nach Behandlung mit BPDE. Hierzu muss hervorgehoben werden, dass in die Analyse nur intakte, nicht apoptotische Zellkerne eingeschlossen wurden. Auch ist der Zeitpunkt nach Behandlung mit BPDE so kurz gewählt (2,5-24 Stunden), dass fast keine Apoptosen in den sensitiven HUVEC-Zellen zu detektieren waren. Daraus folgt, dass neben der DSB-Reparatur ein weiterer Signalweg von der Behandlung mit BPDE betroffen sein muss wie im folgenden Kapitel (5.2.1.2) diskutiert wird.

5.2.1.2 Endothelzellen weisen eine beeinträchtigte NER-Kapazität auf

Die Beobachtungen aus dem vorangestellten Kapitel machten eine nähere Untersuchung der NER-Proteinexpression der drei Primärzelltypen erforderlich, um die Ursache der verminderten Reparatur von BPDE-Addukten in HUVEC-Zellen zu erforschen. Die dazu angefertigten Western-Blots mit Schlüsselenzymen der NER zeigten in den HUVEC-Zellen eine verminderte Expression von ERCC1, XPF, XPG, Pol ϵ , Lig I und Lig III, während die Expression von DDB2, XPC und XPA vergleichsweise stärker war im Vergleich zu HUASMC- und hPC-PL-Zellen (Abbildung 36). Dies lässt vermuten, dass in den HUVEC-Zellen die Erkennung des BPDE-Adduktes effizient, möglicherweise sogar effizienter als in den Vergleichszelltypen, funktioniert. Allerdings erfolgt in den Endothelzellen (HUVEC) nach der Inzision das Herausschneiden von DNA-Basennukleotiden an der Adduktstelle und das Vervollständigen und Auffüllen des DNA-Stranges sehr ineffizient durch die schwache Expression der NER-Proteine für diese Schritte. Diese Interpretation stimmt mit der beobachteten ESB-Akkumulation und den persistierenden BPDE-Addukten überein. Eine weitere Erklärung für die ineffiziente Reparatur von BPDE-Addukten in den HUVEC-Zellen könnte sein, dass die stark verminderte Expression der Endonuklease ERCC1-XPF den limitierenden Schritt der NER darstellt, wenn man davon ausgeht, dass XPG 3' den ersten Schnitt an der Adduktstelle setzt, wofür es experimentelle Hinweise gibt (Fagbemi et al. 2011). Da die beiden Primärzelltypen HUASMC und hPC-PL eine verminderte Expression der Erkennungsenzyme zeigten, könnte man auch davon

ausgehen, dass der Reparaturprozess deshalb nach der Addukt-Erkennung sehr effizient abläuft und es demnach nicht zur Akkumulation von ESB und zur Persistenz von BPDE-Addukten in der DNA kommt. Ein möglicher Test, um die aktive oder nicht-aktive NER in den Zelltypen nachzuweisen, wäre der USD-Test (engl. *unscheduled DNA synthesis*, außerplanmäßige DNA-Synthese), bei dem Tritium-Thymidin zum Einsatz kommt und neu synthetisierte DNA sichtbar gemacht werden kann (Latimer und Kelly 2014; Wienholz et al. 2017). Der USD-Test kann *in vivo* verwendet werden. Die Methode ist etabliert in Leberzellen (Test No. 486: Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *in vivo* 1997), kann jedoch an allen Zelltypen angewandt werden, die nach der BPDE-Behandlung der Tiere schnell isoliert werden können.

5.2.1.3 BPDE aktiviert die DNA-Schadensantwort

Primär wird die zelluläre DNA-Schadensantwort durch zwei verschiedene Kinase-Kaskaden, dem ATM- und dem ATR-Signalweg, koordiniert (siehe Einleitung 2.5). Neben der initialen DNA-Schädigung durch BPDE könnten auch durch ineffiziente NER Modulationen der DDR, wie z.B. eine verstärkte Stabilisierung und/oder Phosphorylierung von p53, hervorgerufen werden, die für den gesteigerten Zelltod der Endothelzellen ursächlich sein könnten. BPDE induziert ein sperriges Addukt (Abbildung 47), durch das die Replikation blockiert wird und zunächst die Rekrutierung von ATR erfolgt, wie bereits in der Literatur beschrieben wurde (Choi et al. 2009) und ATR phosphoryliert die Checkpoint-Kinase CHK1, was die Stabilisierung von p53 verursacht (Abbildung 38). Die Stabilisierung von p53 soll die Regulierung der DNA-Schadensantwort nach BPDE maßgeblich beeinflussen, da nach seiner Phosphorylierung die Apoptoserate der behandelten Zellen steigt (Xiao und Singh 2007). In allen drei Primärzelltypen ist eine Stabilisierung von p53 im Western-Blot deutlich zu erkennen. Die Phosphorylierung von p53 erfolgt jedoch nicht ganz simultan in den drei Zelltypen. In den HUVEC-Zellen bleibt die phosphorylierte Form von p53^{ser15} sehr lange (48 h) auf einem hohen Niveau, während in den beiden anderen Zelltypen HUASMC und hPC-PL die Menge von phosphoryliertem p53^{ser15} mit der Zeit (nach 8-24 h) wieder abfällt (Abbildung 38B). Offensichtlich hat die BPDE-Behandlung, die in den Endothelzellen

(HUVEC) den Zelltod induziert, ihren Ursprung in den nicht entfernten Addukten, die eine dauerhafte Aktivierung der DDR bewirken. Es ist jedoch zu vermuten, dass weitere Prozesse an der Vermittlung der Toxizität beteiligt sind, die untersucht werden müssen. Eine nähere Untersuchung des *Signalings* und die daraus folgende Apoptose-Induktion und Caspasen-Aktivierung wäre hierbei hilfreich.

5.2.1.4 DNA-Schäden und Atherosklerose

Um auf die Ausgangsfrage zurück zu kommen, ob vaskuläre Zellen einen höheren Schutz im Sinne einer effizienteren DNA-Reparatur besitzen und damit Schäden durch BPDE besser tolerieren und somit die Entwicklung von Atherosklerose erschweren, sind sicherlich noch Tierversuche notwendig. In dieser Arbeit lässt sich die Schutzfunktion durch eine effizientere Reparatur in Bezug auf die untersuchte NER in den endothelialen HUVEC-Zellen jedoch nicht bestätigen. Vielmehr hat sich herausgestellt, dass HUVEC-Zellen den sensitivsten der untersuchten Zelltypen darstellen. Die Entstehung von Atherosklerose und dessen Zusammenhang mit DNA-Schädigung ist Gegenstand mehrerer Untersuchungen gewesen (Shah und Mahmoudi 2015; Uryga et al. 2016). Durik et al. (2012) zeigte in einer Mausstudie, dass der Defekt eines NER-Proteins, nämlich ERCC1, bereits in sehr jungen Mäusen hohen Blutdruck durch fehlende Vasodilatation verursacht, was eine Vorstufe der Entwicklung einer Herz-Kreislauferkrankung ist. Auch eine induzierte Seneszenz in glatten Muskelzellen wurde mit der Entstehung von Atherosklerose in Verbindung gebracht (Wang et al. 2015; Uryga und Bennett 2016). Ebenso ist eine fehlerhafte BER in vaskulären glatten Muskelzellen mit der Entstehung von Atherosklerose assoziiert (Barranco 2018; Gray et al. 2015).

5.2.2 Primärzilien und Atherosklerose

Das bereits in der Einleitung beschriebene Primärzilium ist nicht beweglich und hat vor allem die Funktion, als „Antenne“ zu wirken, um mechanische, osmotische oder chemische Reize aus dem Extrazellulärraum in die Zelle zu übertragen (siehe Kapitel 2.7). Das Primärzilium auf Endothelzellen weist in Richtung des Blutgefäßlumens und dient vor allem als Überwachungssensor des Blutflusses (Zilium in Abbildung 48 zu sehen).

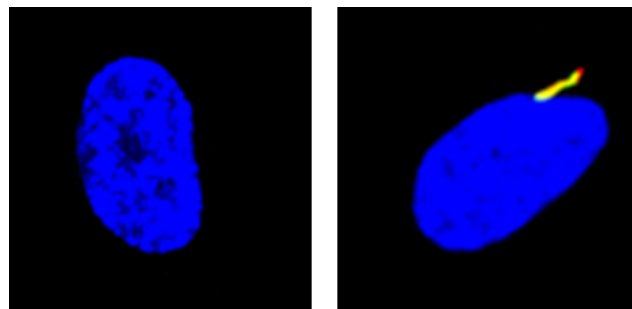


Abbildung 48: Beispielbild einer Zelle (links) und einer Zelle mit Zilium (rechts). Aufnahme mittels Fluoreszenzfärbung, der Zellkern ist blau, das Zilium in grün/rot angefärbt.

Auf glatten Muskelzellen sind ebenfalls Primärzilien vorhanden, wobei diese zu den Endothelzellen ausgerichtet sind. Auch sie sollen die Funktion der Überwachung des Blutflusses innehaben, können jedoch auch als Signalüberträger der extrazellulären Matrix dienen (Lu et al. 2008). Mehrere Studien zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen fehlenden Primärzilien und Atherosklerose (Dinsmore und Reiter 2016; Pala et al. 2018; van der Heiden et al. 2008). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Behandlung der verschiedenen vaskulären Primärzelltypen (HUVEC-, HUASMC- und hPC-PL-Zellen) mit BPDE Auswirkungen auf deren Anzahl zilisierten Zellen hat.

5.2.2.1 BPDE vermindert die Anzahl an Zellen mit Primärzilium in den getesteten vaskulären Primärzelltypen

Da Primärzilien ausschließlich auf ruhenden Zellen gefunden werden, die sich in der G0-Phase des Zellzyklus befinden, wurden die Primärzellen konfluent ausgesät und über

48 h in Mangelmedien inkubiert, die zuvor in Vorexperimenten (siehe Kapitel 4.2.8) verwendet wurden. Dieses Vorgehen diente dazu, die optimalen Bedingungen, unter denen die höchste Anzahl zilierter Zellen zu finden ist, für jeden einzelnen Zelltyp zu bestimmen. Wie in Abbildung 40 und 41 zu sehen ist, konnten in allen vaskulären Zellen Primärzilien detektiert werden. Es konnten zudem die Mediumkonditionen so verändert werden, dass eine möglichst hohe Dichte an zilierten Zellen zu finden war. Die Behandlung mit BPDE reduzierte die Anzahl zilierter Zellen signifikant von (Abbildung 42). Dies erfolgte ohne messbare zytotoxische Wirkungen. 18 % der Endothelzellen zeigten nach Behandlung mit 0,5 µM BPDE noch ein Zilium (im Vergleich zu 56 % vor der Behandlung), das ist eine Reduktion von 38 %. In Muskelzellen und Perizyten ging der Anteil von zilierten Zellen auf 53 % und 64 % zurück (in Vergleich zu 90 % und 94 % vor der Behandlung), das entspricht einer Reduktion um 37 % bzw. 30 %.

Obwohl nicht bekannt ist, ob B[a]P auch den Anteil zilierter Zellen im Endothel im Körper beeinflusst, so darf im Folgenden über die möglichen Auswirkungen spekuliert werden: Übertragen auf das Gefäßsystem würden die Daten darauf hinweisen, dass eine fehlende Regulierung des Blutdrucks und des Blutflusses nach BPDE-Einwirkung erfolgt und ein hoher Blutdruck begünstigt wird. Dies könnte eine endotheliale Dysfunktion begünstigen, sowie die Grundlage für die Entwicklung von Atherosklerose darstellen. Die anderen getesteten genotoxischen Agenzien TMZ und MMS sowie der WRNi hatten keine signifikanten Auswirkungen auf die Anzahl der zilierten Zellen in den drei untersuchten vaskulären Zelltypen, zumindest in der verwendeten Dosis und unter den gewählten experimentellen Bedingungen. Es sollte Bestandteil einer weiterführenden Untersuchung sein, ob der beobachtete Effekt an dem durch BPDE-induzierten DNA-Schaden liegt, ob es an der Natur des BPDE-DNA-Schadens als sperriges Addukt liegt, welcher zu einer Reduzierung der Anzahl von Zellen mit Primärzilium führt, oder ob noch andere DNA-Schäden diesen Phänotyp hervorrufen können. Hierfür wären andere PAKs, die ebenfalls sperrige Addukte in der DNA bilden, mögliche Kandidaten.

5.2.2.2 Primärzilien und DNA-Schadensantwort

Johnson und Collis (2016) haben in ihrem Review über Zilien versucht, mögliche Überschneidungen zellulärer Signalwege nach DNA-Schädigung und der Zilienbildung zu finden. Eine der wichtigsten Überschneidungen sahen sie in der direkten Verbindung der Zilienbildung und der DNA-Schadensantwort mit dem Zellzyklus. Die DNA-Schadensantwort, die, wie in der Einleitung erläutert wurde (siehe Kapitel 2.5), maßgeblich durch die beiden Kinasen ATM und ATR gesteuert wird, aktiviert und inhibiert viele Proteine (z.B. CHK1, CHK2), die u.a. den Zellzyklus überwachen. Interessant ist, dass die Zilienbildung ausschließlich in der G₀-Phase des Zellzyklus stattfinden kann (Izawa et al. 2015; Nishimura et al. 2019). Kemp und Sancar (2016) zeigten, dass auch in ruhenden (G₀-) Zellen ATR nach DNA-Schadenssetzung aktiviert wird und eine Inhibierung von ATR die Zellen vor den letalen Effekten des DNA-Schadens schützt.

Das Protein CEP164 ist eines der von Johnson und Collis (2016) identifizierten Proteine, das an DNA-Schadensantwort und Zilienbildung beteiligt sein könnte. CEP164 ist am Zentrosom lokalisiert und unterstützt unter normalen Bedingungen die Zilienbildung. Nach DNA-Schädigung wird es von ATR phosphoryliert (Sivasubramaniam et al. 2008). Es ist außerdem an der Zellantwort auf UV-induzierte Schäden beteiligt, indem es als Chromatinbindungsmediator für die ATR gesteuerte Aktivierung der Zellzyklus-Überwachungspunkte fungiert, und könnte auch im Zusammenhang mit der NER stehen, in der CEP164 mit XPA interagieren soll (Pan und Lee 2009). Um am Signalweg über CEP164 anzusetzen und damit an einem möglichst primär an der DNA Schadensantwort beteiligten Protein, wurde ATR mit Hilfe eines ATR Inhibitors in der Phosphorylierungsaktivität gehemmt.

5.2.2.3 ATRi verhindert den Abbau von Primärzilien nach BPDE Behandlung

Durch Behandlung der Zellen mit ATRi (VE-822; Selleckchem) vor der Behandlung mit BPDE (0,5 µM) konnte der Effekt einer Reduzierung der zilisierten Zellen auf die Primärzilien fast gänzlich umgekehrt werden. In allen drei primären vaskulären Zelltypen (HUVEC, HUASMC und hPC-PL) wurde der Effekt des Rückganges der zilisierten Zellen

nach Behandlung mit BPDE signifikant aufgehoben (Abbildung 44 und Abbildung 45). Bisher liegen keine weiteren Daten oder publizierten Untersuchungen zu dieser Fragestellung vor. Weitere Untersuchungen vor allem auch an dem angesprochenen Protein CEP164 und seine mögliche Involvierung in den Prozess der DDR und der Zilienbildung wären angeraten. Zusammenfassend weisen die Daten darauf hin, dass BPDE, bzw. die durch BPDE induzierte DDR, Auswirkungen auf die Zilienbildung der Primärzellen hat und dass ATR an der Signalweiterleitung zum Zilienabbau nach der BPDE-Behandlung beteiligt ist.

5.3 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der *WRN-Knockdown* sensitivierende Effekte auf die Reaktion von Endothelzellen EA.hy926 und Fibroblasten VH10tert nach BPDE-Behandlung hat. Jedoch wurden vielfältige Mechanismen und Signalwege durch das Fehlen von WRN beeinflusst, und das Ergebnis ist nicht auf einen einzigen Wirkmechanismus von WRN eingrenzbar. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass der Anteil von WRN an der DSB-Reparatur mit zu der sensitiven Reaktion auf BPDE beiträgt. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit eine mögliche Schutzfunktion von Endothelzellen durch eine effizientere Reparatur (NER) in HUVEC-Zellen untersucht, jedoch nicht bestätigt. Es hat sich herausgestellt, dass die HUVEC-Zellen die sensitivsten der untersuchten Zelltypen waren, und glatte Muskelzellen (HUASMC) und Perizyten (hPC-PL) im Vergleich zu HUVEC-Zellen einen besseren Schutz vor BPDE-induzierten Schäden durch eine effizientere NER aufwiesen. Ferner konnte gezeigt werden, dass BPDE die Zilienbildung negativ beeinflusst und dieser Prozess über einen durch ATR beeinflussten Signalweg gesteuert wird.

6 Literaturverzeichnis

Ahn, B; Harrigan, J A; Indig, F E; Wilson, D M; Bohr, V A (2004): Regulation of WRN helicase activity in human base excision repair. *J Biol Chem.* 279(51):53465–53474.

Ames, B N; Durston, W E; Yamasaki, E; Lee, F D (1973): Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 70(8):2281–2285.

Ammazzalorso, F; Pirzio, L M; Bignami, M; Franchitto, A; Pichierri, P (2010): ATR and ATM differently regulate WRN to prevent DSBs at stalled replication forks and promote replication fork recovery. *EMBO J.* 29(18):3156–3169.

Ando, J; Yamamoto, K (2013): Flow detection and calcium signalling in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 99(2):260–268.

Annas, A; Brittebo, E; Hellman, B (2000): Evaluation of benzo(a)pyrene-induced DNA damage in human endothelial cells using alkaline single cell gel electrophoresis. *Mutat Res.* 471(1-2):145–155.

Armulik, A; Abramsson, A; Betsholtz, C (2005): Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res.* 97(6):512–523.

Awasthi, P; Foiani, M; Kumar, A (2015): ATM and ATR signaling at a glance. *J Cell Sci.* 128(23):4255–4262.

Barranco, C (2018): Atherosclerosis linked to faulty DNA repair in VSMCs. *Nat Rev Cardiol.* 15(7):380–388.

Bauer, M; Goldstein, M; Christmann, M; Becker, H; Heylmann, D; Kaina, B (2011): Human monocytes are severely impaired in base and DNA double-strand break repair that renders them vulnerable to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(52):21105–21110.

Berenson, G S; Srinivasan, S R; Bao, W; Newman, W P; Tracy, R E; Wattigney, W A (1998): Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med.* 338(23):1650–1656.

Bergers, G; Song, S (2005): The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol.* 7(4):452–464.

Bi, X; Slater, D M; Ohmori, H; Vaziri, C (2005): DNA polymerase kappa is specifically required for recovery from the benzoapyrene-dihydrodiol epoxide (BPDE)-induced S-phase checkpoint. *J Biol Chem.* 280(23):22343–22355.

Birbrair, A; Zhang, T; Wang, Z-M; Messi, M L; Mintz, A; Delbono, O (2015): Pericytes at the intersection between tissue regeneration and pathology. *Clin Sci (Lond).* 128(2):81–93.

Black, J O (2016): Xeroderma Pigmentosum. *Head Neck Pathol.* 10(2):139–144.

Brosh, R M; Kobbe, C von; Sommers, J A; Karmakar, P; Opresko, P L; Piotrowski, J; Dianova, I; Dianov, G L; Bohr, V A (2001): Werner syndrome protein interacts with human flap endonuclease 1 and stimulates its cleavage activity. *EMBO J.* 20(20):5791–5801.

Burns, D M (2003): Epidemiology of smoking-induced cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 46(1):11–29.

Ceccaldi, R; Rondinelli, B; D'Andrea, A D (2016): Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol.* 26(1):52–64.

Chang, H H; Pannunzio, N R; Adachi, N; Lieber, M R (2017): Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 18(8):495–506.

Chen, L; Devanesan, P D; Higginbotham, S; Ariese, F; Jankowiak, R; Small, G J; Rogan, E G; Cavalieri, E L (1996): Expanded analysis of benzoapyrene-DNA adducts formed in vitro and in mouse skin: their significance in tumor initiation. *Chem Res Toxicol.* 9(5):897–903.

Cheng, W-H; Muftuoglu, M; Bohr, V A (2007): Werner syndrome protein: functions in the response to DNA damage and replication stress in S-phase. *Exp Gerontol.* 42(9):871–878.

Choi, J-H; Lindsey-Boltz, L A; Sancar, A (2009): Cooperative activation of the ATR checkpoint kinase by TopBP1 and damaged DNA. *Nucleic Acids Res.* 37(5):1501–1509.

- Choudhary, S; Doherty, K M; Handy, C J; Sayer, J M; Yagi, H; Jerina, D M; Brosh, R M (2006): Inhibition of Werner syndrome helicase activity by benzo(a)pyrene diol epoxide adducts can be overcome by replication protein A. *J Biol Chem.* 281(9):6000–6009.
- Christmann, M; Boisseau, C; Kitzinger, R; Berac, C; Allmann, S; Sommer, T; Aasland, D; Kaina, B; Tomicic, M T (2016): Adaptive upregulation of DNA repair genes following benzo(a)pyrene diol epoxide protects against cell death at the expense of mutations. *Nucleic Acids Res.* 44(22):10727–10743.
- Christmann, M; Tomicic, M T; Roos, W P; Kaina, B (2003): Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology.* 193(1-2):3–34.
- Constantinou, A; Tarsounas, M; Karow, J K; Brosh, R M; Bohr, V A; Hickson, I D; West, S C (2000): Werner's syndrome protein (WRN) migrates Holliday junctions and co-localizes with RPA upon replication arrest. *EMBO Rep.* 1(1):80–84.
- Cook, J W; Hewett, C L; Hieger, I (1933): The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. Parts I, II and III. *J Chem Soc.* (0):395-405.
- Crabbe, L; Verdun, R E; Haggblom, C I; Karlseder, J (2004): Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science.* 306(5703):1951–1953.
- Curfs, D M; Knaapen, A M; Pachen, D M; Gijbels, M J; Lutgens, E; Smook, M L; Kockx, M M; Daemen, M J; van Schooten, F J (2005): Polycyclic aromatic hydrocarbons induce an inflammatory atherosclerotic plaque phenotype irrespective of their DNA binding properties. *FASEB J.* 19(10):1290–1292.
- Darland, D C; D'Amore, P A (2001): Cell-cell interactions in vascular development. *Curr Top Dev Biol.* 52:107–149.
- Das, A; Boldogh, I; Lee, J W; Harrigan, J A; Hegde, M L; Piotrowski, J; Souza Pinto, N de; Ramos, W; Greenberg, M M; Hazra, T K; Mitra, S; Bohr, V A (2007): The human Werner syndrome protein stimulates repair of oxidative DNA base damage by the DNA glycosylase NEIL1. *J Biol Chem.* 282(36):26591–26602.
- Dempsey, E W; Wislocki, G B (1955): An electron microscopic study of the blood-brain barrier in the rat, employing silver nitrate as a vital stain. *J Biophys Biochem Cytol.* 1(3):245–256.

Deutsches Krebsforschungszentrum; Pabst Science Publishers (2015): Tabakatlas Deutschland 2015. Lengerich, Westf: Pabst Science Publishers.

DiGiacomo, S I; Jazayeri, M-A; Barua, R S; Ambrose, J A (2018): Environmental Tobacco Smoke and Cardiovascular Disease. *Int J Environ Res Public Health*. 16(1).

Dinsmore, C; Reiter, J F (2016): Endothelial primary cilia inhibit atherosclerosis. *EMBO Rep*. 17(2):156–166.

Doherty, K M; Sommers, J A; Gray, M D; Lee, J W; Kobbe, C von; Thoma, N H; Kureekattil, R P; Kenny, M K; Brosh, R M (2005): Physical and functional mapping of the replication protein a interaction domain of the werner and bloom syndrome helicases. *J Biol Chem*. 280(33):29494–29505.

Donauer, J; Schreck, I; Liebel, U; Weiss, C (2012): Role and interaction of p53, BAX and the stress-activated protein kinases p38 and JNK in benzo(a)pyrene-diolepoxide induced apoptosis in human colon carcinoma cells. *Arch Toxicol*. 86(2):329–337.

Dora, K A (2001): Cell-cell communication in the vessel wall. *Vasc Med*. 6(1):43–50.

Dreij, K; Seidel, A; Jernström, B (2005): Differential removal of DNA adducts derived from anti-diol epoxides of dibenzo(a,h)pyrene and benzo(a)pyrene in human cells. *Chem Res Toxicol*. 18(4):655–664.

Dubey, R K; Jackson, E K; Gillespie, D G; Zacharia, L C; Imthurn, B (2004): Catecholamines block the antimitogenic effect of estradiol on human coronary artery smooth muscle cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 89(8):3922–3931.

Durik, M; Kavousi, M; van der Pluijm, I; Isaacs, A; Cheng, C; Verdonk, K; Loot, A E; Oeseburg, H; Bhaggoe, U M; Leijten, F; van Veghel, R; Vries, R de; Rudez, G; Brandt, R; Ridwan, Y R; van Deel, E D; Boer, M de; Tempel, D; Fleming, I; Mitchell, G F; Verwoert, G C; Tarasov, K V; Uitterlinden, A G; Hofman, A; Duckers, H J; van Duijn, C M; Oostra, B A; Witteman, J C; Duncker, D J; Danser, A H; Hoeijmakers, J H; Roks, A J (2012): Nucleotide excision DNA repair is associated with age-related vascular dysfunction. *Circulation*. 126(4):468–478.

Edwards, D N; Orren, D K; Machwe, A (2014): Strand exchange of telomeric DNA catalyzed by the Werner syndrome protein (WRN) is specifically stimulated by TRF2. *Nucleic Acids Res.* 42(12):7748–7761.

Fagbemi, A F; Orelli, B; Schärer, O D (2011): Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst).* 10(7):722–729.

Fishel, R (2015): Mismatch repair. *J Biol Chem.* 290(44):26395–26403.

Fliegau, M; Benzing, T; Omran, H (2007): When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(11):880–893.

Friedberg, E C (2001): How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer.* 1(1):22–33.

Garige, M; Sharma, S (2014): Cellular deficiency of Werner syndrome protein or RECQ1 promotes genotoxic potential of hydroquinone and benzoapyrene exposure. *Int J Toxicol.* 33(5):373–381.

Gelboin, H V (1980): Benzoalaphapyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev.* 60(4):1107–1166.

Gimbrone, M A; García-Cardena, G (2016): Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 118(4):620–636.

Goldstein, M; Kastan, M B (2015): The DNA damage response: implications for tumor responses to radiation and chemotherapy. *Annu Rev Med.* 66:129–143.

Gray, K; Kumar, S; Figg, N; Harrison, J; Baker, L; Mercer, J; Littlewood, T; Bennett, M (2015): Effects of DNA damage in smooth muscle cells in atherosclerosis. *Circ Res.* 116(5):816–826.

Greenberg, J I; Shields, D J; Barillas, S G; Acevedo, L M; Murphy, E; Huang, J; Schepke, L; Stockmann, C; Johnson, R S; Angle, N; Cheresch, D A (2008): A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature.* 456(7223):809–813.

Hanawalt, P C (2002): Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene.* 21(58):8949–8956.

Harrigan, J A; Wilson, D M; Prasad, R; Opresko, P L; Beck, G; May, A; Wilson, S H; Bohr, V A (2006): The Werner syndrome protein operates in base excision repair and cooperates with DNA polymerase beta. *Nucleic Acids Res.* 34(2):745–754.

Hattemer-Frey, H A; Travis, C C (1991): Benzo-a-pyrene: environmental partitioning and human exposure. *Toxicol Ind Health.* 7(3):141–157.

Hecht, S S (2003): Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer.* 3(10):733–744.

Hess, M T; Gunz, D; Luneva, N; Geacintov, N E; Naegeli, H (1997): Base pair conformation-dependent excision of benzo[a]pyrene diol epoxide-guanine adducts by human nucleotide excision repair enzymes. *Mol Cell Biol.* 17(12):7069–7076.

Hisama, F M; Kubisch, C; Martin, G M; Oshima, J (2015): Clinical utility gene card for: Werner Syndrome - Update 2014. *Eur J Hum Genet.* 23(6).

Hoeijmakers, J H (2001): Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 411(6835):366–374.

Homan, Travis D.; Cichowski, Erica (2018): StatPearls. Physiology, Pulse Pressure. Treasure Island (FL).

Hua, K; Ferland, R J (2018): Primary cilia proteins: ciliary and extraciliary sites and functions. *Cell Mol Life Sci.* 75(9):1521–1540.

Ishikawa, H; Marshall, W F (2011): Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12(4):222–234.

Izawa, I; Goto, H; Kasahara, K; Inagaki, M (2015): Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. *Cilia.* 4:12.

Ji, G; Gu, A; Zhou, Y; Shi, X; Xia, Y; Long, Y; Song, L; Wang, S; Wang, X (2010): Interactions between exposure to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA repair gene polymorphisms on bulky DNA adducts in human sperm. *PLoS One.* 5(10).

Johnson, C A; Collis, S J (2016): Ciliogenesis and the DNA damage response: a stressful relationship. *Cilia.* 5:19.

- Karikkineth, A C; Scheibye-Knudsen, M; Fivenson, E; Croteau, D L; Bohr, V A (2017): Cockayne syndrome: Clinical features, model systems and pathways. *Ageing Res Rev.* 33:3–17.
- Karnovsky, M J (1968): The Ultrastructural Basis of Transcapillary Exchanges. *J Gen Physiol.* 52(1):64–95.
- Kastaun, S; Brown, J; Brose, L S; Ratschen, E; Raupach, T; Nowak, D; Cholmakow-Bodechtel, C; Shahab, L; West, R; Kotz, D (2017): Study protocol of the German Study on Tobacco Use (DEBRA): a national household survey of smoking behaviour and cessation. *BMC Public Health.* 17(1):378.
- Kaye, G I; Sibley, R C; Hoefle, F B (1973): Recent studies on the nature and function of the corneal endothelial barrier. *Exp Eye Res.* 15(5):585–613.
- Kemp, M G; Sancar, A (2016): ATR Kinase Inhibition Protects Non-cycling Cells from the Lethal Effects of DNA Damage and Transcription Stress. *J Biol Chem.* 291(17):9330–9342.
- Kim, J (1998): Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis.* 19(10):1847–1853.
- Kim, J H; Stansbury, K H; Walker, N J; Trush, M A; Strickland, P T; Sutter, T R (1998): Metabolism of benzoapyrene and benzoapyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis.* 19(10):1847–1853.
- Knaapen, A M; Curfs, D M; Pachen, D M; Gottschalk, R W; Winther, M P de; Daemen, M J; van Schooten, F J (2007): The environmental carcinogen benzoapyrene induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 in vascular tissue: a possible role in atherogenesis. *Mutat Res.* 621(1-2):31–41.
- Kobbe, C von; Harrigan, J A; May, A; Opresko, P L; Dawut, L; Cheng, W-H; Bohr, V A (2003): Central role for the Werner syndrome protein/poly(ADP-ribose) polymerase 1 complex in the poly(ADP-ribosyl)ation pathway after DNA damage. *Mol Cell Biol.* 23(23):8601–8613.
- Krokan, H E; Bjørås, M (2013): Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(4): a012583.

Latimer, J J; Kelly, C M (2014): Unscheduled DNA synthesis: the clinical and functional assay for global genomic DNA nucleotide excision repair. *Methods Mol Biol.* 1105:511–532.

Leroy, T; Lison, D; Lauwerys, R (1995): Preliminary in vitro investigation into the use of alkaline elution assay for the biomonitoring of humans exposed to genotoxic agents. *Hum Exp Toxicol.* 14(1):61–68.

Leroy, T; van Hummelen, P; Anard, D; Castelain, P; Kirsch-Volders, M; Lauwerys, R; Lison, D (1996): Evaluation of three methods for the detection of DNA single-strand breaks in human lymphocytes: alkaline elution, nick translation, and single-cell gel electrophoresis. *J Toxicol Environ Health A.* 47(5):409–422.

Li, Z; Pearlman, A H; Hsieh, P (2016): DNA mismatch repair and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst).* 38:94–101.

Lilly, B (2014): We have contact: endothelial cell-smooth muscle cell interactions. *Physiology (Bethesda).* 29(4):234–241.

Ling, X; Yang, W; Zou, P; Zhang, G; Wang, Z; Zhang, X; Chen, H; Peng, K; Han, F; Liu, J; Cao, J; Ao, L (2018): TERT regulates telomere-related senescence and apoptosis through DNA damage response in male germ cells exposed to BPDE in vitro and to B[a]P in vivo. *Environ Pollut.* 235:836–849.

Liu, B; Yi, J; Yang, X; Liu, L; Lou, X; Zhang, Z; Qi, H; Wang, Z; Zou, J; Zhu, W-G; Gu, W; Luo, J (2018): MDM2-mediated degradation of WRN promotes cellular senescence in a p53-independent manner. *Oncogene.* 38(14):2501-2515.

Lodovici, M; Luceri, C; Guglielmi, F; Bacci, C; Akpan, V; Fonnesu, M L; Boddi, V; Dolaro, P (2004): Benzo(a)pyrene diolepoxide (BPDE)-DNA adduct levels in leukocytes of smokers in relation to polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, and mEH. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13(8):1342–1348.

Lu, C J; Du, H; Wu, J; Jansen, D A; Jordan, K L; Xu, N; Sieck, G C; Qian, Q (2008): Non-random distribution and sensory functions of primary cilia in vascular smooth muscle cells. *Kidney Blood Press Res.* 31(3):171–184.

- Lu, H; Fang, E F; Sykora, P; Kulikowicz, T; Zhang, Y; Becker, K G; Croteau, D L; Bohr, V A (2014): Senescence induced by RECQL4 dysfunction contributes to Rothmund-Thomson syndrome features in mice. *Cell Death Dis.* 5:e1226.
- Lüllmann-Rauch, Renate; Paulsen, Friedrich (2012): Taschenlehrbuch Histologie. 4., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: G. Thieme.
- Lusis, A J (2000): Atherosclerosis. *Nature.* 407(6801):233–241.
- M. Mohieldin, A; Saad Md Zubayer, H; J. Al Omran, A; C. Saternos, H; A. Zarban, A; M. Nauli, S; A. AbouAlaiwi, W (2016): Vascular Endothelial Primary Cilia: Mechanosensation and Hypertension. *Curr Hypertens Rev.* 12(1):57–67.
- Machwe, A; Xiao, L; Lloyd, R G; Bolt, E; Orren, D K (2007): Replication fork regression in vitro by the Werner syndrome protein (WRN): holliday junction formation, the effect of leading arm structure and a potential role for WRN exonuclease activity. *Nucleic Acids Res.* 35(17):5729–5747.
- Mahjoub, M R (2013): The importance of a single primary cilium. *Organogenesis.* 9(2):61–69.
- Majesky, M W; Dong, X R; Regan, J N; Hoglund, V J (2011): Vascular smooth muscle progenitor cells: building and repairing blood vessels. *Circ Res.* 108(3):365–377.
- Marteijn, J A; Lans, H; Vermeulen, W; Hoeijmakers, J H (2014): Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15(7):465–481.
- Messner, B; Bernhard, D (2014): Smoking and cardiovascular disease: mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34(3):509–515.
- Moriwaki, S; Kanda, F; Hayashi, M; Yamashita, D; Sakai, Y; Nishigori, C (2017): Xeroderma pigmentosum clinical practice guidelines. *J Dermatol.* 44(10):1087–1096.
- Moriya, J (2019): Critical roles of inflammation in atherosclerosis. *J Cardiol.* 73(1):22–27.
- Moriya, M; Spiegel, S; Fernandes, A; Amin, S; Liu, T; Geacintov, N; Grollman, A P (1996): Fidelity of translesional synthesis past benzo[a]pyrene diol epoxide-2'-deoxyguanosine

DNA adducts: marked effects of host cell, sequence context, and chirality. *Biochemistry*. 35(51):16646–16651.

Moserová, M; Kotrbová, V; Aimová, D; Sulc, M; Frei, E; Stiborová, M (2009): Analysis of benzo[a]pyrene metabolites formed by rat hepatic microsomes using high pressure liquid chromatography: optimization of the method. *Interdiscip Toxicol* 2 (4), S. 239–244.

Mottram, J C (1944): A developing factor in experimental blastogenesis. *J Pathol*. 56(2):181–187.

Mukherjee, S; Sinha, D; Bhattacharya, S; Srinivasan, K; Abdisalaam, S; Asaithamby, A (2018): Werner Syndrome Protein and DNA Replication. *Int J Mol Sci*. 19(11).

Mullenders, L H; Berneburg, M (2001): Photoimmunology and nucleotide excision repair: impact of transcription coupled and global genome excision repair. *J Photochem Photobiol B*. 65(2-3):97–100.

Mulvany, M J; Aalkjaer, C (1990): Structure and function of small arteries. *Physiol Rev*. 70(4):921–961.

Nadkarni, A; Burns, J A; Gandolfi, A; Chowdhury, M A; Cartularo, L; Berens, C; Geacintov, N E; Scicchitano, D A (2016): Nucleotide Excision Repair and Transcription-coupled DNA Repair Abrogate the Impact of DNA Damage on Transcription. *J Biol Chem*. 291(2):848–861.

Nair, D T; Kottur, J; Sharma, R (2015): A rescue act: Translesion DNA synthesis past N(2) - deoxyguanosine adducts. *IUBMB Life*. 67(7):564–574.

Natale, V; Raquer, H (2017): Xeroderma pigmentosum-Cockayne syndrome complex. *Orphanet J Rare Dis*. 12(1):65.

Nauli, S M; Jin, X; Hierck, B P (2011): The mechanosensory role of primary cilia in vascular hypertension. *Int J Vasc Med*. 2011:376281.

Nauli, S M; Kawanabe, Y; Kaminski, J J; Pearce, W J; Ingber, D E; Zhou, J (2008): Endothelial cilia are fluid shear sensors that regulate calcium signaling and nitric oxide production through polycystin-1. *Circulation*. 117(9):1161–1171.

- Nishimura, Y; Kasahara, K; Shiromizu, T; Watanabe, M; Inagaki, M (2019): Primary Cilia as Signaling Hubs in Health and Disease. *Adv Sci (Weinh)*. 6(1):1801138.
- Opresko, P L; Kobbe, C von; Laine, J-P; Harrigan, J; Hickson, I D; Bohr, V A (2002): Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *J Biol Chem*. 277(43):41110–41119.
- Oshima, J (2000): The Werner syndrome protein: an update. *Bioessays*. 22(10):894–901.
- Pala, R; Jamal, M; Alshammari, Q; Nauli, S M (2018): The Roles of Primary Cilia in Cardiovascular Diseases. *Cells*. 7(12).
- Palenski, T L; Sorenson, C M; Jefcoate, C R; Sheibani, N (2013): Lack of Cyp1b1 promotes the proliferative and migratory phenotype of perivascular supporting cells. *Lab Invest*. 93(6):646–662.
- Palermo, V; Rinalducci, S; Sanchez, M; Grillini, F; Sommers, J A; Brosh, R M; Zolla, L; Franchitto, A; Pichierri, P (2016): CDK1 phosphorylates WRN at collapsed replication forks. *Nat Commun*. 7:12880.
- Pan, Y-R; Lee, E Y-H (2009): UV-dependent interaction between Cep164 and XPA mediates localization of Cep164 at sites of DNA damage and UV sensitivity. *Cell Cycle*. 8(4):655–664.
- Pant, S; Deshmukh, A; Gurumurthy, G S; Pothineni, N V; Watts, T E; Romeo, F; Mehta, J L (2014): Inflammation and atherosclerosis--revisited. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 19(2):170–178.
- Parsons, J L; Dianov, G L (2013): Co-ordination of base excision repair and genome stability. *DNA Repair (Amst)*. 12(5):326–333.
- Piberger, A L; Krüger, C T; Strauch, B M; Schneider, B; Hartwig, A (2018): BPDE-induced genotoxicity: relationship between DNA adducts, mutagenicity in the in vitro PIG-A assay, and the transcriptional response to DNA damage in TK6 cells. *Arch Toxicol*. 92(1):541–551.
- Pichierri, P; Nicolai, S; Cignolo, L; Bignami, M; Franchitto, A (2012): The RAD9-RAD1-HUS1 (9.1.1) complex interacts with WRN and is crucial to regulate its response to replication fork stalling. *Oncogene*. 31(23):2809–2823.

- Poot, M; Hoehn, H; Runger, T M; Martin, G M (1992): Impaired S-phase transit of Werner syndrome cells expressed in lymphoblastoid cell lines. *Exp Cell Res.* 202(2):267–273.
- Poot, M; Yom, J; Whang, S; Kato, J T; Gollahon, K A; Rabinovitch, P S (2001): Werner syndrome cells are sensitive to DNA cross-linking drugs. *FASEB J.* 15(7):1224–1226.
- Popuri, V; Croteau, D L; Bohr, V A (2010): Substrate specific stimulation of NEIL1 by WRN but not the other human RecQ helicases. *DNA Repair (Amst).* 9(6):636–642.
- Pulliero, A; Godschalk, R; Andreassi, M G; Curfs, D; van Schooten, F J; Izzotti, A (2015): Environmental carcinogens and mutational pathways in atherosclerosis. *Int J Hyg Environ Health.* 218(3):293–312.
- Ranjha, L; Howard, S M; Cejka, P (2018): Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. *Chromosoma.* 127(2):187–214.
- Raviola, E; Karnovsky, M J (1972): Evidence for a blood-thymus barrier using electron-opaque tracers. *J Exp Med.* 136(3):466–498.
- Reese, T S; Karnovsky, M J (1967): Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol.* 34(1):207–217.
- Reyes, G X; Schmidt, T T; Kolodner, R D; Hombauer, H (2015): New insights into the mechanism of DNA mismatch repair. *Chromosoma.* 124(4):443–462.
- Romanowicz, H; Pyziak, Ł; Jabłoński, F; Bryś, M; Forma, E; Smolarz, B (2017): Analysis of DNA Repair Genes Polymorphisms in Breast Cancer. *Pathol Oncol Res.* 23(1):117–123.
- Roos, W P; Kaina, B (2013): DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett.* 332(2):237–248.
- Rucker, H K; Wynder, H J; Thomas, W E (2000): Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res Bull.* 51(5):363–369.
- Ryu, J-S; Koo, H-S (2017): The *Caenorhabditis elegans* WRN helicase promotes double-strand DNA break repair by mediating end resection and checkpoint activation. *FEBS Lett.* 591(14):2155–2166.

Sakamoto, S; Nishikawa, K; Heo, S J; Goto, M; Furuichi, Y; Shimamoto, A (2001): Werner helicase relocates into nuclear foci in response to DNA damaging agents and co-localizes with RPA and Rad51. *Genes Cells*. 6(5):421–430.

Schärer, O D (2013): Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 5(10):a012609.

Shah, A; Bennett, M (2016): Controlling Inflammation Through DNA Damage and Repair. *Circ Res*. 119(6):698–700.

Shah, A V; Bennett, M R (2017): DNA damage-dependent mechanisms of ageing and disease in the macro- and microvasculature. *Eur J Pharmacol*. 816:116–128.

Shah, N R; Mahmoudi, M (2015): The role of DNA damage and repair in atherosclerosis: A review. *J Mol Cell Cardiol*. 86:147–157.

Shamanna, R A; Croteau, D L; Lee, J-H; Bohr, V A (2017): Recent Advances in Understanding Werner Syndrome. *F1000Research*. 6:1779.

Sharma, S (2011): Non-B DNA Secondary Structures and Their Resolution by RecQ Helicases. *J Nucleic Acids*. 2011:724215.

Shi, Z-D; Tarbell, J M (2011): Fluid flow mechanotransduction in vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *Ann Biomed Eng*. 39(6):1608–1619.

Shiizaki, K; Kawanishi, M; Yagi, T (2017): Modulation of benzo[a]pyrene-DNA adduct formation by CYP1 inducer and inhibitor. *Genes Environ*. 39:14.

Siasos, G; Tsigkou, V; Kokkou, E; Oikonomou, E; Vavuranakis, M; Vlachopoulos, C; Verveniotis, A; Limperi, M; Genimata, V; Papavassiliou, A G; Stefanadis, C; Tousoulis, D (2014): Smoking and atherosclerosis: mechanisms of disease and new therapeutic approaches. *Curr Med Chem*. 21(34):3936–3948.

Sivasubramaniam, S; Sun, X; Pan, Y-R; Wang, S; Lee, E Y-H (2008): Cep164 is a mediator protein required for the maintenance of genomic stability through modulation of MDC1, RPA, and CHK1. *Genes Dev*. 22(5):587–600.

Slaga, T J; Bracken, W J; Gleason, G; Levin, W; Yagi, H; Jerina, D M; Conney, A H (1979): Marked differences in the skin tumor-initiating activities of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo(a)pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides. *Cancer Res.* 39(1):67–71.

Sommers, J A; Kulikowicz, T; Croteau, D L; Dexheimer, T; Dorjsuren, D; Jadhav, A; Maloney, D J; Simeonov, A; Bohr, V A; Brosh, R M (2019): A high-throughput screen to identify novel small molecule inhibitors of the Werner Syndrome Helicase-Nuclease (WRN). *PLoS One.* 14(1):e0210525.

Speit, G; Schütz, P; Hoffmann, H (2004): Enhancement of genotoxic effects in the comet assay with human blood samples by aphidicolin. *Toxicol Lett.* 153(3):303–310.

Sung, P (2018): Introduction to the Thematic Minireview Series: DNA double-strand break repair and pathway choice. *J Biol Chem.* 293(27):10500–10501.

Takeuchi, F; Hanaoka, F; Goto, M; Akaoka, I; Hori, T; Yamada, M; Miyamoto, T (1982): Altered frequency of initiation sites of DNA replication in Werner's syndrome cells. *Hum Genet.* 60(4):365–368.

Test No. 486: Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells in vivo (1997): OECD.

Thirman, M J; Albrecht, J H; Krueger, M A; Erickson, R R; Cherwitz, D L; Park, S S; Gelboin, H V; Holtzman, J L (1994): Induction of cytochrome CYP1A1 and formation of toxic metabolites of benzo(a)pyrene by rat aorta: a possible role in atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(12):5397–5401.

Trego, K S; Chernikova, S B; Davalos, A R; Perry, J J; Finger, L D; Ng, C; Tsai, M-S; Yannone, S M; Tainer, J A; Campisi, J; Cooper, P K (2011): The DNA repair endonuclease XPG interacts directly and functionally with the WRN helicase defective in Werner syndrome. *Cell Cycle.* 10(12):1998–2007.

Trushin, N; Alam, S; El-Bayoumy, K; Krzeminski, J; Amin, S G; Gullett, J; Meyers, C; Prokopczyk, B (2012): Comparative metabolism of benzo(a)pyrene by human keratinocytes infected with high-risk human papillomavirus types 16 and 18 as episomal or integrated genomes. *J Carcinog.* 11:1.

Uryga, A; Gray, K; Bennett, M (2016): DNA Damage and Repair in Vascular Disease. *Annu Rev Physiol.* 78:45–66.

Uryga, A K; Bennett, M R (2016): Ageing induced vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. *J Physiol.* 594(8):2115–2124.

van der Heiden, K; Hierck, B P; Krams, R; Crom, R de; Cheng, C; Baiker, M; Pourquie, M J; Alkemade, F E; DeRuiter, M C; Gittenberger-de Groot, A C; Poelmann, R E (2008): Endothelial primary cilia in areas of disturbed flow are at the base of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 196(2):542–550.

van Eijk, P; Nandi, S P; Yu, S; Bennett, M; Leadbitter, M; Teng, Y; Reed, S H (2018): Nucleosome remodeling at origins of global genome-nucleotide excision repair occurs at the boundaries of higher-order chromatin structure. *Genome Res.* 29(1):74-84.

Vare, D; Groth, P; Carlsson, R; Johansson, F; Erixon, K; Jenssen, D (2012): DNA interstrand crosslinks induce a potent replication block followed by formation and repair of double strand breaks in intact mammalian cells. *DNA Repair (Amst).* 11(12):976–985.

Vermes, I; Haanen, C; Steffens-Nakken, H; Reutelingsperger, C (1995): A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 184(1):39–51.

Vu, A T; Taylor, K M; Holman, M R; Ding, Y S; Hearn, B; Watson, C H (2015): Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Mainstream Smoke of Popular U.S. Cigarettes. *Chem Res Toxicol.* 28(8):1616–1626.

Wallace, S S (2014): Base excision repair: a critical player in many games. *DNA Repair (Amst).* 19:14–26.

Wang, J; Uryga, A K; Reinhold, J; Figg, N; Baker, L; Finigan, A; Gray, K; Kumar, S; Clarke, M; Bennett, M (2015): Vascular Smooth Muscle Cell Senescence Promotes Atherosclerosis and Features of Plaque Vulnerability. *Circulation.* 132(20):1909–1919.

Wang, W; Wang, R; Zhang, Q; Mor, G; Zhang, H (2018): Benzo(a)pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide induces human trophoblast Swan 71 cell dysfunctions due to cell apoptosis through disorder of mitochondrial fission/fusion. *Environ Pollut.* 233:820–832.

Wienholz, F; Vermeulen, W; Marteijn, J A (2017): Amplification of unscheduled DNA synthesis signal enables fluorescence-based single cell quantification of transcription-coupled nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res.* 45(9):e68.

Xiao, H; Singh, S V (2007): p53 regulates cellular responses to environmental carcinogen benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide in human lung cancer cells. *Cell Cycle.* 6(14):1753–1761.

Xiao, M; Xiao, S; van der Straaten, T; Xue, P; Zhang, G; Zheng, X; Zhang, Q; Cai, Y; Jin, C; Yang, J; Wu, S; Zhu, G; Lu, X (2016): Genetic polymorphisms in 19q13.3 genes associated with alteration of repair capacity to BPDE-DNA adducts in primary cultured lymphocytes. *Mutat Res.* 812:39–47.

Yang, F; Yang, H; Ramesh, A; Goodwin, J S; Okoro, E U; Guo, Z (2016): Overexpression of Catalase Enhances Benzo(a)pyrene Detoxification in Endothelial Microsomes. *PLoS One.* 11(9):e0162561.

Yu, S; Evans, K; van Eijk, P; Bennett, M; Webster, R M; Leadbitter, M; Teng, Y; Waters, R; Jackson, S P; Reed, S H (2016): Global genome nucleotide excision repair is organized into domains that promote efficient DNA repair in chromatin. *Genome Res.* 26(10):1376–1387.

Zhang, Y; Yuan, F; Wu, X; Rechkoblit, O; Taylor, J-S; Geacintov, N E; Wang, Z (2000a): Error-prone lesion bypass by human DNA polymerase η . *Nucleic Acids Res.* 28(23):4717–4724.

Zhang, Y; Yuan, F; Wu, X; Wang, M; Rechkoblit, O; Taylor, J-S; Geacintov, N E; Wang, Z (2000b): Error-free and error-prone lesion bypass by human DNA polymerase κ in vitro. *Nucleic Acids Res.* 28(21):4138–4146.

Zhou, B B; Elledge, S J (2000): The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* 408(6811):433–439.

7 Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der Inhibitoren	42
Tabelle 2: Antikörper für den Immun-Blot	48
Tabelle 3: Antikörper für Immunfluoreszenzanalysen	51
Tabelle 4: Antikörper für Immunfluoreszenzanalysen der Primärzilien.....	53
Tabelle 5 Liste der Primer	54
Tabelle 6: Prozentuale Veränderung der NER-Protein Expression.....	83
Tabelle 7: Prozentuale Veränderung der NER-Protein Expression.....	84
Tabelle 8: Zusammenfassung der verschiedenen Test-Endpunkte nach Behandlung mit BPDE in den drei Primärzelltypen HUVEC, HUASMC und hPC-PL.....	105
Tabelle 9: Zusammenfassung der Endpunkte im Comet Assay und der Adukk-Messung nach Behandlung der Primärzellen mit BPDE.....	107

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Benzo[a]pyren.	8
Abbildung 2: Metabolisierung von B[a]P zu BPDE.....	9
Abbildung 3: BPDE-Stoffwechsel – Detoxifizierung oder DNA-Schädigung.	11
Abbildung 4: Übersicht über die DNA-Schäden und ihre dazugehörigen DNA-Reparatur-Mechanismen.....	12
Abbildung 5: Die Transkriptionsgekoppelte-Reparatur (TCR) als einer der zwei Erkennungsprozesse der Nukleotid-Exzisionsreparatur.....	15
Abbildung 6: Die Globale-Genom-Reparatur (GGR) also einer der beiden Erkennungsmechanismen der Nukleotid-Exzisionsreparatur.	16
Abbildung 7: Die gemeinsamen Schritte der Transkriptionsgekoppelten- und der Globalen-Genom- Nukleotid-Exzisionsreparatur.....	18
Abbildung 8: Übersicht über die RecQ Helikase Familie und ihre funktionellen Gruppen.. ..	20
Abbildung 9: Vereinfachte Darstellung der DNA-Schadensantwort.	23
Abbildung 10: Aufbau eines Blutgefäßes unterteilt in Arterie, Vene und Kapillare.....	27
Abbildung 11: Die Stadien der Atherosklerose.....	29
Abbildung 12: Aufbau und Position eines Primärziliums.....	31
Abbildung 13: Nachweis des erfolgreichen WRN- <i>Knockdown</i> in EA.hy926 (A) und VH10tert (B) Zellen.	58
Abbildung 14: Einfluss von TMZ, CCNU, MMS und BPDE auf die Viabilität der Endothelzelllinie EA.hy926 und der Fibroblasten VH10tert ± WRN-Protein.....	59
Abbildung 15: Einfluss von BPDE auf die Viabilität der Endothelzelllinie EA.hy926 und der Fibroblasten VH10tert ± WRN-Protein.	60
Abbildung 16: Koloniebildungstest nach BPDE Behandlung mit der Endothelzelllinie EA.hy926 und den Fibroblasten VH10tert ± WRN-Protein.....	60
Abbildung 17: Einfluss des WRN-Proteins auf den BPDE-induzierten Zelltod in EA.hy926- und VH10tert-Zellen.. ..	61
Abbildung 18: BPDE-induzierte Einzelstrangbrüche in Endothelzellen und Fibroblasten ± WRN-Protein.	63
Abbildung 19: WRN Inhibitor verursacht keine Toxizität in EA.hy926-Zellen.	64

Abbildung 20: BPDE-induzierte Einzelstrangbrüche in Endothelzellen \pm WRN Inhibitor..	64
Abbildung 21: Einfluss des WRN-Proteins auf die Reparatur der BPDE-induzierten DSB in EA.hy926-Zellen.	66
Abbildung 22: Einfluss des WRN-Proteins auf die Reparatur der BPDE-induzierten DSB in VH10tert-Zellen.....	67
Abbildung 23: Zellzyklusverteilung der EA.hy926-Zellen und VH10tert-Zellen nach BPDE-Behandlung.	67
Abbildung 24: Einfluss von BPDE auf die Viabilität der Primärzelltypen HUVEC, HUASMC und hPC-PL.	69
Abbildung 25: BPDE-induzierter Zelltod in HUVEC, HUASMC und hPC-PL.....	70
Abbildung 26: BPDE-induzierter Zelltod in HUVEC, HUASMC und hPC-PL.....	71
Abbildung 27: BPDE-induzierter Zelltod in HUVEC, HUASMC und hPC-PL.....	72
Abbildung 28: Einfluss von BPDE auf die Proliferationskurve von HUVEC, HUASMC und hPC-PL.	72
Abbildung 29: Einfluss von BPDE auf die Verdopplungszeit von HUVEC, HUASMC und hPC-PL.	73
Abbildung 30: BPDE-induzierte Seneszenz in HUVEC, HUASMC und hPC-PL.....	74
Abbildung 31: BPDE-induzierte dosisabhängige Einzelstrangbrüche in HUVEC, HUASMC und hPC-PL.	76
Abbildung 32: BPDE-induzierte zeitabhängige Einzelstrangbrüche in HUVEC, HUASMC und hPC-PL.	77
Abbildung 33: BPDE-induzierte und S-Phase abhängige γ H2AX-Foci in HUVEC-, HUASMC- und hPC-PL-Zellen.	78
Abbildung 34: Repräsentative Bilder der BPDE-induzierten und S-Phase abhängigen γ H2AX-Foci in HUVEC -Zellen 1h nach Behandlung.	79
Abbildung 35: Zeitabhängige BPDE-Addukt-Mengen in HUVEC, HUASMC und hPC-PL....	80
Abbildung 36: NER Protein Expression basal und 24 h nach Behandlung mit BPDE.....	81
Abbildung 37: mRNA Expression von DDB2 (A) und XPC (B) nach Behandlung mit BPDE.	85
Abbildung 38: NER Protein Expression basal und 24 h nach Behandlung mit BPDE. zeitabhängig untersucht.	86

Abbildung 39: Beispielbild einer Zelle (links) und einer Zelle mit Zilium (rechts).	87
Abbildung 40: Analyse der besten Mangelmedium-Kondition für den höchsten Anteil zilisierter Zellen in HUVEC, HUASMC und hPC-PL.....	88
Abbildung 41: Repräsentative Bilder der Zellen mit Primärzilium zu der in Abbildung 40 dargestellten Analyse der Mangelmediumkonditionen.	89
Abbildung 42: Anteil an Zellen mit Primärzilium nach der Behandlung mit 0,5 μ M BPDE.	90
Abbildung 43: Anteil an Zellen mit Primärzilie nach der Behandlung mit TMZ, MMS oder WRNi.	91
Abbildung 44: Anteil an Zellen mit Primärzilie nach der Behandlung mit 0,5 μ M BPDE \pm ATRi.	92
Abbildung 45: Repräsentative Bilder von Zellen mit jeweils einem Primärzilium nach Behandlung mit BPDE \pm ATRi.	93
Abbildung 46: Modell des Zusammenspiels von WRN und XPG bei der Reparatur von DNA-Läsionen, die die Replikationsgabel blockieren.	98
Abbildung 47: BPDE-DNA-Addukt.	108
Abbildung 48: Beispielbild einer Zelle (links) und einer Zelle mit Zilium (rechts).	112

7.3 Abkürzungsverzeichnis

(6-4)PP	6-4 Pyrimidin-Pyrimidon Fotoprodukt
APAF-1	<i>Apoptotic protease-activating factor 1</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and RAD3-related</i>
ATRIP	<i>ATR-interacting protein</i>
B[a]P	Benzo[a]pyren
BER	Basen-Exzisionsreparatur
BLM	Bloom Helikase
BPDE	Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid
CAD	<i>Caspase activated DNase</i>
CAK-Unterkomplex	<i>CDK-activating kinase-Unterkomplex</i>
CCNU	Lomustin, Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea
CSA	<i>cockayne syndrome A</i>
CSB	<i>cockayne syndrome B</i>
CYP	Cytochrom P-450-Enzym
DDB1	<i>Damage specific DNA binding protein 1</i>
DDB2	<i>Damage specific DNA binding protein 2</i>
DDR	DNA-Schadensantwort, engl. <i>DNA damage response</i>
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure von engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DSB	Doppelstrangbruch
DSBR	Doppelstrangbruchreparatur
ERCC1	<i>Excision repair cross-complementation group 1</i>
ESB	Einzelstrangbruch
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>

FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FEN-1	<i>Flap endonuclease 1</i>
GGR	Globale-Genom-Reparatur
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
hPC-PL	<i>Human pericytes from placenta</i>
HRDC	Helikase und RNase D C-terminal
HRR	Homologe Rekombinationen Reparatur
h-TERT	<i>Human telomerase reverse transcriptase</i>
HUASMC	<i>Human umbilical arterie smooth muscle cells</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
LSM	<i>Laser scanning Microscope</i>
MGMT	O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase
MMR	Basenfehlpaarungsreparatur von engl. <i>mismatch repair</i>
MMS	Methylmethansulfonat
MRN-Komplex	MRE11, RAD51, NBS1
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NHEJ	Nicht-homologe-Endverknüpfung, engl. <i>non-homologous-end-joining</i>
NLS	Zellkernlokalisations-Signal, engl. <i>nuclear localization signal</i>
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumiodid
RNase	Ribonuklease
RPA	<i>replication protein A</i>
RQC	RecQ C-terminal
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
TCR	Transkriptionsgekoppelte-Reparatur, engl. <i>transcription coupled repair</i>

TMZ	Temozolomid
TRF2	<i>Telomeric repeat-binding factor 2</i>
WRN	Werner
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i>

8 Danksagung

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Joana Melanie Scheiba

Anschrift

Geburtstag

Staatsangehörigkeit

Studium & wissenschaftliche Tätigkeit

WS 2010/11 – SS 2013 B.Sc. Biowissenschaften

Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt

WS 2013/14 – WS 2015 M.Sc. Molekulare Medizin

Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt

WS 2015/16 – SS 2019 Promotionsstudium/Wissenschaftliche Mitarbeiterin

Johannes Gutenberg Universität

Mainz/Universitätsmedizin Mainz

Publikationen:

Kress, JM, Di Dio, L, Heck, L, Pulliero, A, Izzotti, A, Laarmann, K, Fritz, G, Kaina, B (2019): Human primary endothelial cells are impaired in nucleotide excision repair and sensitive to benzo[a]pyrene compared with smooth muscle cells and pericytes. Sci Rep. accepted.

Laarmann, K, **Kress, JM**, Kaina, B, Fritz, G (2018): Werner syndrome (WRN) DNA helicase and base excision repair (BER) factors maintain endothelial homeostasis. DNA Repair (Amst). 73:17-27.

Mikhed, Y, Fahrer, J, Oelze, M, Kröller-Schön, S, Steven, S, Welschof, P, Zinßius, E, Stamm, P, Kashani, F, Roohani, S, **Kress, JM**, Ullmann E, Tran, L, Schulz, E, Epe, B, Kaina, B, Münzel, T, Daiber, A (2016): Nitroglycerin induces DNA damage and vascular cell death in the setting of nitrate tolerance. Basic Res Cardiol. 111(4):52.