

**Regulation der Stress-aktivierten
Proteinkinasen durch den genotoxischen
Benzo[a]pyren-Metaboliten BPDE**

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität

Nina Grico
Geboren am 2.7.1978 in Groß-Gerau

Mainz, 2007

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Prüfung am: 17.12.2007

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Toxikologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz und am Institut für Toxikologie und Genetik am Forschungszentrum Karlsruhe angefertigt.

Danksagung

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	1
1.1.1	Vorkommen polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe	1
1.1.2	Fremdstoffmetabolismus polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe	3
1.1.3	Metabolismus von B[a]P	5
1.1.4	Bindung von BPDE an zelluläre Makromoleküle (DNA und Proteine)	7
1.1.5	Zelluläre biologische Konsequenzen der PAK-Exposition	8
1.1.6	Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) durch PAK	10
1.2	DNA-Reparatur	11
1.2.1	PAK und DNA-Reparatur	11
1.2.2	Nukleotidexzisionsreparatur (NER)	12
1.2.3	PAK und Transläsionssynthese (TLS)	16
1.3	PAK und intrazelluläre Signaltransduktionswege	17
1.3.1	MAPK-Signalwege	17
1.3.2	PAK und MAPK	20
1.4	Zielsetzung der Arbeit	22
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	Bezugsquellen	23
2.1.1	Chemikalien und Lösungen	23
2.1.2	Induktoren und Inhibitoren	24
2.1.3	Membranen, Filme und Plastikwaren	24
2.2	Glaswaren	24
2.3	Verwendete Antikörper und Verdünnungen	25
2.3.1	Phosphospezifische und nicht-phosphospezifische Antikörper	25
2.3.2	Sekundäre Antikörper	26
2.3.3	Kulturmedien und Kulturbedingungen	26
2.3.3.1	Standardkulturmedien für eukaryotische Zellen	26
2.4	Lösungen und Puffer	26
2.5	Zellen	29
2.6	Zellkulturmethoden	30
2.6.1	Zellkultur	30
2.6.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	30
2.6.3	Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer	30
2.6.4	Zellbehandlung und Präparation des Gesamtzelllysats	31

2.7	Methoden zur Arbeit mit Proteinen	32
2.7.1	SDS PAGE	32
2.7.2	Western Blot.....	33
2.7.3	Detektion der Protein-Antikörperkomplexe mit Hilfe von Chemilumineszenz	34
2.7.4	Entfernung der Antikörper von der Nitrozellulosemembran	34
2.7.5	Quantifizierung der Western Blot-Ergebnisse.....	34
2.7.6	Bestimmung des Proteingehaltes mit Hilfe der Coomassie Blau-Färbung.....	35
2.8	Detektion von DNA-Schäden mit Hilfe des Comet Assays	35
2.9	5'-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) Assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).....	38
2.10	Bestimmung der Zytotoxizität mit Hilfe des CellTiter-Blue® Zellvitalitäts Assays	39
3	ERGEBNISSE	40
3.1	BPDE-induzierte Aktivierung der SAPK p38 und JNK.....	40
3.1.1	Rolle von Replikation und Transkription bei der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung	40
3.1.2	BPDE, jedoch nicht die Muttersubstanz B[a]P, aktiviert die SAPK	43
3.1.3	Die Aktivierung der SAPK p38 und JNK durch BPDE erfolgt unabhängig voneinander	45
3.1.4	Durch welche Signaltransduktionsmechanismen aktiviert BPDE die SAPK?	46
3.1.4.1	Rolle von PI3K und Akt bei der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung	46
3.1.5	Identifizierung zwischengeschalteter Faktoren in der BPDE-induzierten SAPK- Aktivierung.....	50
3.1.6	Beteiligung von Tyrosinkinase an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung.....	51
3.1.6.1	Rolle von Rezeptortyrosinkinase (RTK) an BPDE-induzierten Signalkaskaden.....	51
3.1.6.2	Rolle von Nicht-Rezeptortyrosinkinase an BPDE-induzierten Signalkaskaden.....	53
3.1.6.2.1	Beteiligung von c-Abl an den BPDE-induzierten Signalkaskaden	54
3.1.7	Rolle von BPDE-induzierten DNA-Schäden in der Signaltransduktion	56
3.1.7.1	Ist die Erkennung des BPDE-induzierten DNA-Schadens wichtig für die Signalinduktion?.....	58
3.1.7.2	XPC vermittelt die SAPK-Aktivierung durch sperrige Addukte, jedoch nicht durch andere zelluläre Stressoren	63
3.2	Zytotoxische Wirkung von BPDE.....	65
3.2.1	Konsequenzen der XPC-abhängigen SAPK-Aktivierung durch BPDE für das Zellwachstum.....	66
3.3	Rolle von DNA-Strangbrüchen in der Gentoxin-induzierten SAPK-Aktivierung	70
3.3.1	DNA-Einzelstrangbrüche sind nicht notwendig für die BPDE-induzierte SAPK- Aktivierung.....	73
3.4	Ist die BPDE-induzierte Phosphorylierung von JNK und p38 abhängig von XPA?	75

3.5	Untersuchung Benzo[c]phenanthren-3,4-Diol-1,2-Epoxid-induzierter DNA-Schäden mit Hilfe des alkalischen Comet Assays	76
3.6	Induziert B[c]PhenDE, dessen DNA-Addukte nicht durch XPC erkannt werden, die SAPK p38 und JNK?.....	77
4	DISKUSSION	79
4.1	BPDE-induzierte intrazelluläre Signalkaskaden	79
4.1.1	Welche intrazellulären Signalkaskaden führen zur BPDE-abhängigen SAPK-Aktivierung?	80
4.1.2	Durch welchen Mechanismus induziert BPDE die Aktivierung der SAPK JNK und p38?	82
4.1.3	Was ist der primäre Ansatzpunkt für BPDE?	85
4.1.4	BPDE-induzierte DNA-Schäden: Bedeutung von NER-Faktoren für die JNK- und p38-Aktivierung.....	87
4.1.5	Konsequenzen der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung für das zelluläre Wachstum und Überleben.....	90
4.1.6	Bedeutung von DNA-Einzel- und DNA-Doppelstrangbrüchen für die SAPK-Aktivierung	92
4.1.7	Rolle von XPC in der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung	94
4.1.8	Abhängigkeit der SAPK-Aktivierung von der DNA-Schadenserkennung.....	97
4.2	Modell zur BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung	98
5	Zusammenfassung und Abstract	101
6	Abkürzungen	103
7	Literaturverzeichnis	107

1 EINLEITUNG

1.1 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

1.1.1 Vorkommen polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, im Folgenden PAK genannt, sind aus mindestens zwei miteinander kondensierten (annellierten) Benzolringen aufgebaut. An dem Namen dieser Moleküle ist erkennbar, dass sie hauptsächlich aus Kohlenstoff- und Wasserstoff-Atomen aufgebaut sind. Sie können aber auch Derivate mit Sauerstoff oder Stickstoff in Form von Aldehyd-, Keto-, Carboxyl- und Nitrogruppen bilden. Wegen ihres delokalisierten π -Elektronensystems besitzen die PAK aromatischen Charakter. PAK sind bei Raumtemperatur feste, kristalline Verbindungen und nur schwer wasserlöslich. Je mehr aromatische Ringe ein Molekül besitzt, desto schwerer wasserlöslich ist es. Der einfachste Vertreter dieser Stoffgruppe ist das aus zwei aromatischen Ringen aufgebaute planare Molekül Naphthalin (siehe Abb. 1). Der bekannteste Vertreter der PAK ist Benzo[a]pyren (B[a]P), ein aus fünf Benzolringen (pentanuklear) aufgebautes, kanzerogenes Molekül (Abb. 1).

PAK sind ein natürlicher Bestandteil von Kohle und Erdöl, sie stellen aber auch weltweit ubiquitäre Schadstoffe der Umwelt sowie mancher Arbeitsplätze dar, z.B. in Kokereien, Fabriken zur Aluminiumproduktion und Müllverbrennungsanlagen (Angerer *et al.*, 1997). Industriell hergestellte PAK, wie z.B. Naphthalin, dienen in der chemischen Industrie als Zwischenprodukte für Azofarbstoffe, Insektizide, Pharmaka, Kosmetikzusätze, Steinkohleteer und Weichmacher (EPA, 1986; ATSDR, 1995; Preuss *et al.*, 2003). PAK entstehen bei der Pyrolyse, d.h. der unvollständigen Verbrennung von organischem Material unter Luftausschluss. Diese Verbrennungsprozesse können natürlichen Ursprungs sein, z.B. Waldbrände. Des Weiteren werden PAK durch Verbrennung von Kohle, Holz und durch Müllverbrennung in die Umwelt eingebracht. Außerdem werden sie während des Rauchens von Tabak und durch Zubereitung von Nahrungsmitteln, wie Grillen, Braten oder Räuchern von Fleisch, gebildet (Knize *et al.*, 1999). PAK gelangen hauptsächlich bei der Verbrennung fossiler Energieträger, z.B. als Auto- und Industrieabgase, in die Luft. Böden werden hauptsächlich durch Ausbringen von Klärschlamm, Müllkompostierung und die Verwendung von Torf als Dünger kontaminiert. PAK wurden auch in Pflanzen, die als Nahrungsmittel verwendet werden, z.B. Gemüse und Getreide, nachgewiesen (Finlayson-Pitts und Pitts, 1997; Boström *et al.*, 2002). Tabelle 1 gibt die PAK-Belastungen verschiedener Quellen an. Bei der Bestimmung der Umweltbelastung durch PAK wird meist B[a]P als Referenz verwendet. Wichtige Expositionsquellen für Menschen stellen der Arbeitsplatz, das Rauchen, Einatmen verschmutzter Luft und die Nahrung dar.

Vom Menschen durch Nahrung (95%), Trinkwasser (1%) und Atemluft (1%) aufgenommen, können PAK krebsauslösend wirken (z.B. Lungen-, Kehlkopf-, Haut-, Magen-, Darm- und Harnblasenkrebs, siehe van Schooten *et al.*, 1990; Tang *et al.*, 1998; Merimsky und Inbar, 1998; Smith *et al.*, 2000;

Gärtner und Thériault, 2002). PAK können auch die kanzerogene Wirkung anderer Chemikalien fördern, d.h. als Tumorpromotoren wirken.

Damit PAK ihre kanzerogene Wirkung ausüben können, bedarf es ihrer metabolischen Aktivierung zu reaktiven Molekülen. Dieser Metabolismus von körperfremden Substanzen wird unter dem Begriff Fremdstoffmetabolismus zusammengefasst. Im nächsten Kapitel soll dieser Fremdstoffmetabolismus genauer besprochen werden.

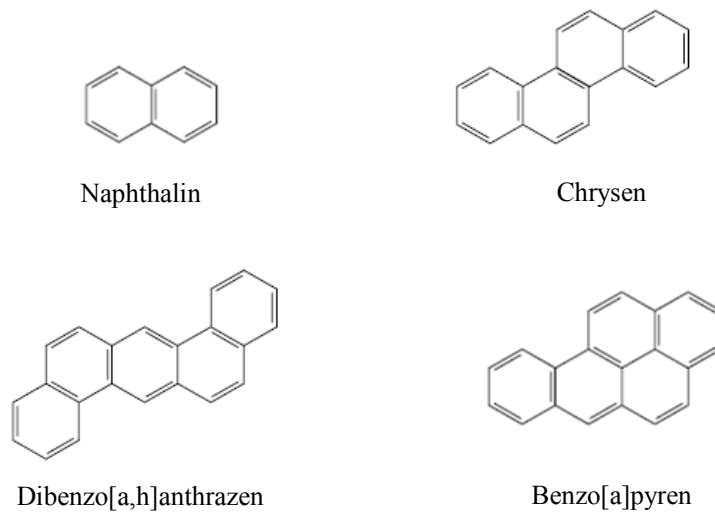


Abb. 1: Beispiele für polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe.

Naphthalin ist der einfachste PAK und nur aus zwei Benzolringen aufgebaut. Weitere PAK sind Chrysen, Dibenzo[a,h]anthracen und Benzo[a]pyren.

Vorkommen	Konzentration
Luft	1,3-500 ng/m ³
Boden	0,8 ng/kg-100 mg/kg
Leitungswasser	2,5-9 ng/l
Pflanzen	bis zu 150 µg/kg
Nahrung	0,1-20 µg/kg

Tabelle 1: Konzentration von B[a]P in der Luft, im Boden, im Wasser, in Pflanzen und in der Nahrung (aus Angerer *et al.*, 1997).

1.1.2 Fremdstoffmetabolismus polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe

Der Mensch ist ständig verschiedenen Stoffen, z.B. PAK, ausgesetzt die der Organismus nicht als Energielieferant oder zur Synthese von Makromolekülen, wie DNA oder Proteinen, oder allgemein zur Verwertung als zelluläre Bausubstanz nutzen kann. Da diese Stoffe von den Zellen nicht verwertet werden und sie auch potentiell (gen)toxisch sein können, müssen sie aus dem Organismus ausgeschieden werden, um eine Akkumulation im Körper zu verhindern. Die Metabolisierung von Fremdstoffen hat bedeutende Auswirkungen auf die Toxizität der Verbindungen, weil deren toxische Eigenschaften durch die metabolische Umsetzung meistens inaktiviert werden.

Wie und in welchem Umfang ein bestimmter Fremdstoff in der Zelle umgesetzt wird, ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Ein Beispiel ist die Speziesabhängigkeit, denn ein Fremdstoff kann in menschlichen Zellen anders metabolisiert werden als in Maus- oder Rattenzellen (Lewis *et al.*, 1998). Innerhalb einer Spezies kann die Metabolisierung einer Substanz abhängig sein von Geschlecht, Alter oder genetischen Unterschieden der untersuchten Individuen (Kamatagi *et al.*, 2005). Weitere Faktoren, welche den Fremdstoffmetabolismus beeinflussen können, sind z.B. Ernährungsgewohnheiten sowie eventuell vorliegende Entzündungen oder chronische Leberschädigungen.

Dem Körper stehen verschiedene Wege zur Ausscheidung von Fremdstoffen (Xenobiotika) zur Verfügung. Handelt es sich bei den aufgenommenen Fremdstoffen um leicht flüchtige Substanzen, so können sie auch über die Ventilation der Lunge mit der Atemluft ausgestoßen werden. Wasserlösliche Stoffe werden z.B. über die Nieren ausgeschieden. Eine weitere Möglichkeit ist die biliäre Ausscheidung mit der Galle. Die Galle, die in der Leber produziert und in der Gallenblase gespeichert wird, transportiert wasserunlösliche Abfallprodukte wie Hämoglobin, Steroide und Pharmaka, die von der Leber aus dem Blut entfernt wurden. Die Leber spielt eine zentrale Rolle in der Verarbeitung und Verteilung von Stoffwechselprodukten, sie ist aber auch der Hauptort für die Metabolisierung von Fremdstoffen in höheren Organismen, da alle Substanzen, die über den Darm aufgenommen werden, über die Blut- oder Lymphgefäße zur Leber transportiert werden. Andere Organe wie z.B. Darm, Niere und Lunge tragen auch zum Fremdstoffmetabolismus bei und besitzen entsprechende Enzyme (Oesch und Arand, 1999; Roos *et al.*, 2002). Den limitierenden Faktor bei der Ausscheidung aus dem Körper stellt die Wasserlöslichkeit der Fremdstoffe dar. Stark polare Substanzen werden auf Grund ihrer hohen Wasserlöslichkeit effizienter ausgeschieden als unpolare Verbindungen. Unpolare Substanzen müssen daher zu polaren Verbindungen umgesetzt werden, um aus dem Kreislauf besser entfernt werden zu können. Diese Funktion übernimmt der Fremdstoffmetabolismus.

Der Metabolismus körperfremder Substanzen (Fremdstoffmetabolismus) lässt sich in drei verschiedene Phasen gliedern (Abb. 2): Phase I, auch Funktionalisierung genannt, Phase II bzw. Konjugation und Phase III, die den gerichteten Transport des gebildeten Metaboliten über ein spezielles Carriersystem aus der Zelle bewirkt.

An Phase I des Fremdstoffmetabolismus sind verschiedene Enzyme wie Oxidoreduktasen und Hydrolasen beteiligt. Zur Gruppe der Oxidoreduktasen gehören die Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen, im Folgenden CYP genannt, flavinabhängige Monooxygenasen (FMO), Monoaminoxidasen (MAO) und Cyclooxygenasen (COX). Diese Enzyme katalysieren den Entzug von Elektronen oder führen Sauerstoff in die Substrate ein. Durch die Aktivität von Dehydrogenasen und Reduktasen wie z.B. der Alkoholdehydrogenase (ADH) kommt es zur Einführung oder Entfernung von Wasserstoffatomen. Darüber hinaus zählen zu den Phase-I-Enzymen auch noch bestimmte Hydrolasen, die verschiedene Stoffklassen hydrolysieren können, wie z.B. Ester, Sulfate oder Epoxide.

Zusammenfassend dient die Phase I dazu, apolare, lipophile Verbindungen durch die enzymatische Freisetzung oder Einführung elektrophiler oder nukleophiler Gruppen zu funktionalisieren. Diese Gruppen dienen dann als Angriffspunkt für Enzyme der Phase II.

Die Phase II wird auch als Konjugation bezeichnet, weil sie die durch Phase-I-Enzyme gebildeten Ankergruppen mit geladenen, d.h. hydrophilen endogenen Molekülen wie Glucuronsäure oder Glutathion belädt. Am Ende dieser Stoffwechselkaskade ist das ursprünglich unpolare Molekül in ein renal oder biliär ausscheidbares Molekül überführt. Zugleich ist die ursprüngliche chemische und biologische Reaktivität der durch die Phase I gebildeten elektrophilen Vorläufer wie z.B. der Epoxide durch die Konjugation aufgehoben.

An Phase III des Fremdstoffmetabolismus, der Elimination der Stoffwechselprodukte bzw. Exkretion durch die Leber, die Niere, die Galle und den Darm, sind verschiedene membranständige Transporter beteiligt. Darunter sind die so genannten ABC-Transporter („ATP binding cassette transporter“) an der Exkretion von Metaboliten und auch Medikamenten beteiligt. Zu den ABC-Transporten gehören u.a. die MDR-Transporter („multiple drug resistance“-Transporter, auch als P-Glykoproteine bezeichnet). Substrate dieser Transporter sind lipophile und basische Substanzen mit planarem Ringsystem. ABC-Transporter transportieren Substrate unter ATP-Hydrolyse durch zelluläre Membranen. Aufgebaut sind diese Transporter aus Nukleotid(ATP)-bindenden ABC-Untereinheiten und membranständigen Domänen (Hyde *et al.*, 1990). Exprimiert werden MDR-Transporter z.B. in Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, in den Bronchien und in der Brustdrüse (van der Valk *et al.*, 1990). Ein anderes ABC-Protein, das an der Phase III des Fremdstoffmetabolismus beteiligt ist, ist der MRP-Transporter („multidrug resistance-associated protein“), der, wie die MDR-Transporter auch, u.a. für die Resistenz von Tumorzellen gegen Zytostatika verantwortlich ist. Die Proteine der Phase III dienen also als terminale Schutzfunktion gegen potentiell gefährliche Stoffe, die von der Zelle aufgenommen wurden, und entfernen diese Stoffe aus dem Organismus.

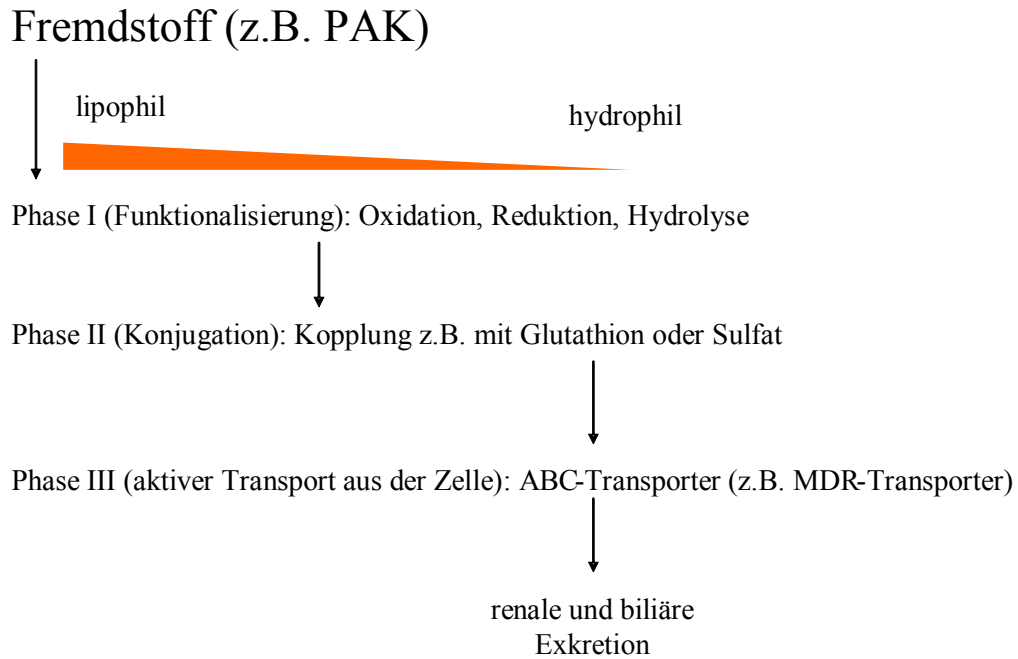


Abb. 2: Überblick über die drei Phasen des Fremdstoffmetabolismus.

PAK: polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe; MDR-Transporter: „multidrug resistance transporter“; ABC-Transporter: „ATP binding cassette transporter“.

Bei der Metabolisierung von Fremdstoffen kann es auf Grund der Aktivität von verschiedenen Enzymen der Phase I auch zur Bildung von potentiell (gen)toxischen Intermediaten kommen. Dabei werden lipophile Fremdstoffe durch die Aktivität von Phase-I-Enzymen (z.B. CYP, Hydrolasen, COX usw.) und abhängig von der chemischen Eigenschaft der eingeführten Seitengruppe entweder zu elektrophilen (z.B. Epoxide) oder nukleophilen (z.B. mit Amino- und Carboxylgruppen) Intermediaten umgesetzt. Elektrophile Verbindungen können mit endogenen nukleophilen, d.h. elektronenreichen Makromolekülen wie DNA oder Proteinen reagieren. Darin liegt das potentiell mutagene, aber auch zytotoxische Potential von PAK (Brookes und Osborne, 1982; Burchiel *et al.*, 1993). Die Bildung von reaktiven Metaboliten aus chemisch wenig reaktiven Muttersubstanzen soll im folgenden Abschnitt am Beispiel von B[a]P erläutert werden.

1.1.3 Metabolismus von B[a]P

Betrachtet man den Stoffwechsel von Benzo[a]pyren, einem typischen Vertreter der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, so kommt es im Laufe der enzymatischen Umsetzung auch zur Bildung von Molekülen, die sowohl zytotoxische als auch genotoxische Effekte hervorrufen können (Cosman *et al.*, 1992; Conney *et al.*, 1994). B[a]P selbst hingegen ist ein unpolares, chemisch nahezu inertes Molekül, d.h. es bildet keine kovalenten Bindungen zu anderen Molekülen, kann aber auf Grund seiner hydrophoben Eigenschaften schlecht ausgeschieden werden. In der Zelle bindet und

aktiviert B[a]P einen ligandenabhängigen Transkriptionsfaktor, den Arylhydrokarbon-Rezeptor (Ah-Rezeptor) (Hankinson, 1995). Der mit einem Liganden besetzte Ah-Rezeptor transloziert in den Zellkern und bildet dort mit ARNT (Ah-Rezeptor-nukleärer-Translokator) ein Heterodimer. Dieser Komplex kann mit speziellen Promotorelementen („xenobiotic-response-elements“, XRE) interagieren und dadurch die Transkription verschiedener Gene induzieren, z.B. Gene für Enzyme, die B[a]P metabolisieren können, wie die Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase CYP1A1 (Nebert *et al.*, 1993; Hankinson, 1995).

Verschiedene Schritte der Biotransformation von B[a]P (Phase-I) bilden durch die Einführung oder Freisetzung von elektrophilen Seitengruppen durch z.B. CYP1A1 reaktive Zwischenmetabolite. Diese elektrophilen Seitengruppen begünstigen auf der einen Seite die effizientere Ausscheidung, andererseits jedoch besitzen sie auch ein hohes genotoxisches Potential, weil sie kovalent an die Erbsubstanz DNA binden können.

Der erste Schritt der Biotransformation von B[a]P zu hydrophilen Metaboliten besteht in der CYP1A1-abhängigen Bildung reaktiver Epoxide, wie z.B. B[a]P-7,8-epoxid (siehe Abb. 3), das durch die mikrosomale Epoxidhydrolase (mEH) zum entsprechenden Diol (B[a]P-7,8-dihydrodiol) umgesetzt wird. Dieses Dihydrodiol kann entweder durch die Dihydrodioldehydrogenase (DDH) zu B[a]P-7,8-catechol oxidiert werden oder mit Glucuronsäure konjugiert werden. Beide Reaktionen führen durch die Bildung hydrophiler Metabolite zur Entgiftung, da diese Metabolite über die Nieren ausgeschieden werden können. Wird B[a]P-7,8-epoxid jedoch durch CYP oder COX weiter oxidiert, resultiert daraus die Bildung des kanzerogenen elektrophilen Metaboliten B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE). BPDE kann über die Öffnung des Epoxidrings kovalent an die Basen Adenin und Guanin der DNA, aber auch an Proteine binden (Frank *et al.*, 1998; Boysen und Hecht, 2003; Dreij *et al.*, 2005; Mensing *et al.*, 2005) und kann durch Epoxidhydrolasen nicht detoxifiziert werden. Lediglich die Konjugation mit Glutathion, durch die Glutathion-S-Transferase, inaktiviert das mutagene Potential dieser Verbindung. Abhängig von der B[a]P-Konzentration ist diese Reaktion aber nicht effizient genug, um die kanzerogene Wirkung von BPDE vollständig zu unterbinden. Die kanzerogene Aktivität von BPDE wurde in verschiedenen Tierstudien bewiesen (Walker *et al.*, 1992). Epidemiologische Studien deuten auf eine Beteiligung von BPDE am durch Zigarettenrauchen verursachten Lungenkrebs hin (IARC, 1983; Merimsky und Inbar, 1998; Smith *et al.*, 2000; IARC, 2004).

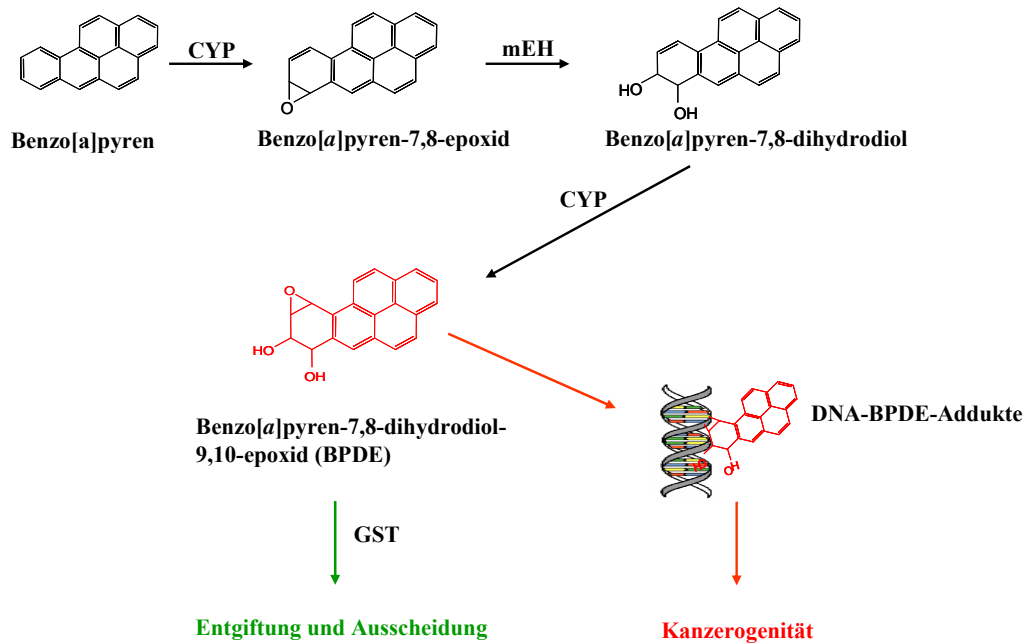


Abb. 3: Ausschnitt aus dem Stoffwechsel von Benzo[a]pyren (B[a]P) im Säugerorganismus.

In die Leber aufgenommen, wird B[a]P durch Enzyme des Fremdstoffmetabolismus zu verschiedenen Metaboliten umgesetzt. Hier gezeigt ist ein Ausschnitt, der die Bildung des ultimalen Kanzerogens BPDE zeigt. Einzelne Schritte sind in 1.1.3 beschrieben. CYP: Cytochrom-P450-Monooxygenasen; mEH: mikrosomale Epoxidhydrolase; GST: Gluthation-S-Transferase.

1.1.4 Bindung von BPDE an zelluläre Makromoleküle (DNA und Proteine)

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, ist BPDE ein stark elektrophiles Molekül und kann auf Grund dieser Eigenschaft an nukleophile Moleküle wie z.B. DNA und Proteine binden.

Cis- oder trans-Öffnung des Epoxid-Ringes von BPDE am Stickstoff der exozyklischen Aminogruppe von Adenin oder von Guanin resultiert in der kovalenten Bindung von BPDE an diese Basen (Jerina *et al.*, 1991). Im Gewebe von Tieren, die mit B[a]P behandelt wurden, konnten diese BPDE-DNA-Addukte nachgewiesen werden (Boysen und Hecht, 2003). Werden DNA-Addukte nicht durch Mechanismen der DNA-Reparatur entfernt, kann es zu Basen-Fehlpaarungen kommen, die zur Bildung von permanenten Mutationen führen können. Diese Mutationen sind besonders fatal, wenn sie Onkogene, Tumorsuppressorgene oder allgemein Gene betreffen, die an der Wachstumsregulation von Zellen beteiligt sind, denn in diesen Fällen können Mutationen zur Entstehung von Tumoren beitragen.

BPDE kann aber auch Addukte mit Proteinen bilden (Skipper und Tannenbaum, 1990). Diese Addukte können als Biomarker für die von einem Individuum aufgenommene Menge an B[a]P verwendet werden (Skipper *et al.*, 1994). In den meisten Studien wird die Bindung von BPDE an Hämoglobin oder Serumalbumin gemessen. Allgemein bilden PAK stabile Ester mit einer oder mehreren Carboxylgruppen in humanem Hämoglobin (Day *et al.*, 1990; Naylor *et al.*, 1990) und Diolepoxide

von PAK binden bevorzugt an His¹⁴⁶ oder Lys¹³⁷ von Albumin und Asp⁴⁷ in humanem Hämoglobin (Day *et al.*, 1991). Die durch B[a]P-Behandlung induzierten Adduktlevel variieren in verschiedenen Individuen abhängig vom genetischen Polymorphismus in Genen, die den B[a]P-Metabolismus betreffen, wie z.B. CYP1A1 (Georgiadis *et al.*, 2005). Die Quantität der BPDE-Addukte mit zellulären Makromolekülen wird auch durch Polymorphismen in dem Gen *GSTM1* beeinflusst, das für die Glutathion-S-Transferase kodiert und somit für die Entfernung von B[a]P-Metaboliten aus dem Körper zuständig ist (Pavanello *et al.*, 1999; Rojas *et al.*, 2000).

Das Ausmaß, in dem Kanzerogen-Protein-Addukte gebildet werden, kann als quantitatives Maß für die Exposition gegenüber dem Kanzerogen genutzt werden. Weil Protein-Addukte nach PAK-Exposition schneller nachweisbar sind als PAK-DNA-Addukte, spielen sie eine wichtige Rolle in der Expositionsabschätzung an betroffenen Arbeitsplätzen (z.B. in Kokereien). Unter den durch PAK verursachten Addukten waren PAK-Hämoglobin-Addukte die ersten, die für molekulare Dosimetrie in Betracht gezogen wurden (Weston *et al.*, 1988). Die Bestimmung von PAK-Hämoglobin-Addukten ist mittlerweile zur Routine bei dem Nachweis von PAK-Exposition geworden. Neben den PAK-Hämoglobin-Addukten bilden PAK auch noch Addukte mit Serumalbumin, welche auch als Biomarker für die PAK-Exposition verwendet werden. Da PAK-Protein-Addukte nicht repariert werden, repräsentiert das gemessene Adduktlevel die Total-Exposition während der Lebensdauer des Proteins (19 Tage für Albumin und 120 Tage für Hämoglobin). Das Ausmaß der PAK-Albumin-Addukte ist abhängig von der Dauer der PAK-Exposition (Lee *et al.*, 1991; Ehrenberg *et al.*, 1996).

Welche Wirkungen die PAK-Exposition auf die Zellen des Organismus besitzen wird in den folgenden Abschnitten erläutert.

1.1.5 Zelluläre biologische Konsequenzen der PAK-Exposition

B[a]P-Exposition kann unterschiedliche Zellantworten auslösen, wie erhöhte Zellproliferation (Culp *et al.*, 2000), aber auch Induktion von Apoptose und Nekrose (Solhaug *et al.*, 2004). Die meisten dieser Effekte sind abhängig von der Bindung von B[a]P an den Ah-Rezeptor (Arylhydrokarbonrezeptor). Diese Bindung induziert die Expression von verschiedenen Genen, darunter auch Gene, die für an dem B[a]P-Metabolismus beteiligte Enzyme kodieren (Nebert *et al.*, 2004). Die Aktivität dieser Enzyme, z.B. CYP1A1, ist an der Bildung des Gentoxins BPDE beteiligt.

Durch PAK verursachte DNA-Schäden, die nicht repariert werden, können zu Mutationen und damit auch zur Krebsentstehung führen. Um diese Entwicklung zu vermeiden, gibt es zelluläre Proteine, welche die durch DNA-Schäden verursachten Auswirkungen auf die Zelle modifizieren können. Ein solches zelluläres Protein ist p53, das nach DNA-Schäden im Zellkern akkumuliert und die Progression des Zellzyklus inhibieren kann, um die Reparatur des vorliegenden DNA-Schadens zu ermöglichen. Somit ist p53 an der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität beteiligt (Nelson und

Kastan, 1994). Ist der entstandene DNA-Schaden zu groß und kann nicht repariert werden, so kann p53 die Apoptose der betroffenen Zellen auslösen (Kastan *et al.*, 1991; Kastan *et al.*, 1992).

Die Behandlung mit PAK hat darüber hinaus auch Auswirkungen auf den Zellzyklus, welche von der Fähigkeit der PAK abhängig ist, DNA-Addukte zu bilden. Durch PAK verursachte DNA-Schäden können während allen Phasen des Zellzyklus auftreten und abhängig davon arretiert der Zellzyklus während der G₁-, G₂/M- oder der S-Phase (Synthese-Phase). Ein Arrest des Zellzyklus erlaubt die Reparatur geschädigter DNA, damit sich keine Mutationen manifestieren können. Je weniger Zeit der geschädigten Zelle vor der Replikation zur Reparatur zur Verfügung steht, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Mutation. Die mutagene und letale Wirkung genotoxischer Agenzien ist deshalb kurz vor und nach Beginn der S-Phase am größten. Zellen, die sich in der S-Phase befinden, zeigen die höchste Empfindlichkeit gegenüber genotoxischem Stress (Zhou und Bartek, 2004). Der S-Phase-Kontrollpunkt verursacht eine transiente, reversible Verzögerung der Zellzyklusprogression hauptsächlich durch die Hemmung neuer Replikationsinitiationspunkte, wodurch die Replikation deutlich verlangsamt wird (Lukas *et al.*, 2004).

PAK können auch immunotoxisch wirken, indem sie intrazelluläre Signalwege von Lymphozyten beeinflussen, die durch Mitogene oder Antigene aktiviert wurden (Davila *et al.*, 1995). Werden T- oder B-Zellen durch die Bindung von Antigenen oder Mitogenen an ihre Oberflächenrezeptoren aktiviert, so werden intrazelluläre, nicht-rezeptorassoziierte Phosphotyrosinkinasen (PTK) aktiviert (Cambier *et al.*, 1994; Weiss und Littman, 1994). Diese Tyrosinkinasen können die Phospholipase C (PLC) durch Phosphorylierung aktivieren. Aktivierung der PLC führt zur Bildung von IP₃ (Inositol-1,4,5-triphosphat) und der Freisetzung von intrazellulären Ca²⁺-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration wiederum führt zur Aktivierung von Ca²⁺-abhängigen Enzymen, darunter auch verschiedenen Kinasen, die dann ihre Zielproteine phosphorylieren können. Diese Signalkaskade ist z. B. für die Aktivierung von T-Zellen nach Antigenstimulierung wichtig.

Neben der stimulierenden Wirkung von Ca²⁺ kann eine erhöhte intrazelluläre Kalzium-Konzentration auch die Apoptose der betroffenen Zelle einleiten. Dies geschieht über die Aktivierung Ca²⁺-abhängiger nukleärer Endonukleasen, welche die DNA degradieren können. Außerdem beeinträchtigt die Aktivierung von kalziumabhängigen Phospholipasen das mitochondriale Membranpotential, so dass die ATP-Synthese zum Erliegen kommt (Orrenius *et al.*, 1992). Die genannten Ca²⁺-abhängigen Reaktionen spielen eine wichtige Rolle beim programmierten Zelltod (Apoptose) des Immunsystems und anderer Gewebe. Faktoren, welche die zelluläre Ca²⁺-Homöostase ändern, können deshalb intrazelluläre Signalprozesse von Lymphozyten beeinflussen (Davila *et al.*, 1995). Zum Beispiel wird die immunsuppressive Wirkung von PAK Ca²⁺-abhängig vermittelt. PAK-Exposition von murinen B- und T-Zellen erhöht den intrazellulären Ca²⁺-Spiegel (Krieger *et al.*, 1994), beeinträchtigt so u.a.

die Signalwege von aktivierten Antigen- oder Mitogen-Rezeptoren und führt zur Induktion der Apoptose in den betroffenen Zellen (Davis und Burchiel, 1992).

Die immunsuppressive Wirkung von PAK wurde auch für humane T-Zellen untersucht. So wurde gezeigt, dass B[a]P und Dimethylbenz[a]anthrazen (DMBA) die durch Mitogene induzierte T-Zellproliferation hemmen können (Pallardy *et al.*, 1992; Krieger *et al.*, 1995). Die immunsuppressive Wirkung von DMBA wurde für nahezu alle lymphoiden Gewebe (Milz, Lymphknoten und Peyersche Plaques) nachgewiesen (Burchiel *et al.*, 1990). DMBA bewirkt eine verminderte Sekretion von Antikörpern humaner B-Zellen (Wood *et al.*, 1993). Die immunotoxische Wirkung von B[a]P, wie sie bei Mäusen nachgewiesen wurde, wurde auch für humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes gezeigt (Davila *et al.*, 1996). Auch in murinen und humanen B-Zelllinien induzieren PAK, über die Aufrechterhaltung einer hohen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (s.o.), Apoptose (Burchiel *et al.*, 1993; Salas und Burchiel, 1998). Die immunsuppressive Wirkung von DMBA ist anscheinend nicht abhängig von der metabolischen Aktivierung dieser Substanz, da in DMBA-behandelten Zellen keine Stoffwechselintermediate detektiert werden konnten (Krieger *et al.*, 1994).

1.1.6 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) durch PAK

Die metabolische Umsetzung von B[a]P resultiert nicht zwangsläufig in der Bildung des starken Kanzerogens BPDE. B[a]P kann auch über bestimmte Stoffwechselwege, an denen CYP-Enzyme, Peroxidasen und Enzyme der Aldo-Keto-Reduktase-Familie (Dihydrodiol-Dehydrogenase) beteiligt sind, zu elektrophilen B[a]P-Chinonen umgesetzt werden (Abb. 4; Smithgall *et al.*, 1988). Die Chinon-Entstehung aus B[a]P führt über das Dihydrodiol-Stadium (Vorläufermoleküle von Diolepoxiden) zur Bildung von Katecholen, die eine Ein-Elektronen-Oxidation durchlaufen, die zur ROS-Produktion führt (Penning *et al.*, 1996). PAK-Katechole können autooxidiert werden, was in der Entstehung von PAK-*o*-Chinonen und reaktiven Sauerstoffspezies resultiert (Flowers *et al.*, 1996; Flowers *et al.*, 1997). Die entstandenen PAK-Chinone können sowohl kovalent an DNA binden, als auch, über die ROS-Bildung, zu oxidativen DNA-Schäden, wie der Bildung von 8-oxo-dG, führen (Park *et al.*, 2005). Die intrazelluläre ROS-Bildung führt oft zur Induktion von Apoptose und Schäden von zellulären Molekülen wie z.B. DNA (Fruehauf und Meyskens, 2007). ROS können auch an intrazellulären Signalkaskaden beteiligt sein (Finkel, 1998).

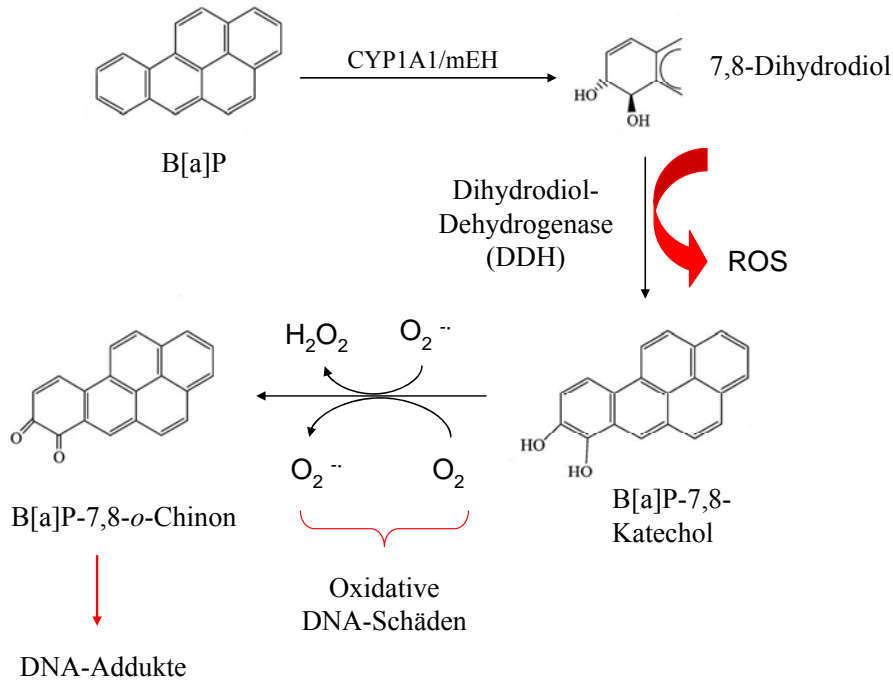


Abb. 4: Bildung von B[a]P-Chinon aus B[a]P. Über mehrere Zwischenschritte wird der PAK B[a]P zu B[a]P-o-Chinon oxidiert. Erklärung im Text. CYP1A1: Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase; mEH: mikrosomale Epoxidhydrolase; ROS: reactive oxygen species.

Kovalente DNA-Modifikationen, wie sie u.a. durch PAK induziert werden, sind potentiell mutagen und müssen deshalb aus dem Genom entfernt werden. Dieser Vorgang wird unter dem Begriff DNA-Reparatur zusammengefasst und wird im folgenden Abschnitt kurz erläutert.

1.2 DNA-Reparatur

1.2.1 PAK und DNA-Reparatur

Die 3×10^9 Basen des menschlichen Genoms sind ständig dem schädigenden Einfluss exogener oder endogener, potentiell DNA-schädigender Agenzien ausgesetzt. Exogene Agenzien sind alle extrazellulären Einflüsse, welche die Zelle von außen beeinflussen können, z.B. UV- und ionisierende Strahlung, PAK und verschiedene Cytostatika. Aber auch während des normalen Zellstoffwechsels können gentoxische Substanzen gebildet werden, so entstehen während der oxidativen Phosphorylierung (Zellatmung oder Atmungskette) oder der Fettsäureoxidation so genannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie z.B. Superoxidationen und Hydroxylradikale, die in der Lage sind, DNA zu oxidieren. ROS entstehen auch durch die Einwirkung ionisierender und UV-Strahlung (D'Errico *et al.*, 2007). Nach DNA-Schädigung werden wichtige zelluläre Prozesse wie Transkription, Replikation und dadurch auch der Zellzyklus gestoppt, damit die DNA-Reparatur die entstandenen Schäden

beseitigen kann. Ist das Ausmaß der Schäden zu hoch oder arbeitet die DNA-Reparatur fehlerhaft, kann es zur Manifestation von Mutationen, Entstehung von Tumoren (80 bis 90% der humanen Tumore sind, zumindest zum Teil, durch DNA-Schäden entstanden (Doll und Peto, 1981)) oder zur Einleitung der Apoptose kommen (Übersicht in Hoeijmakers, 2001).

Angesichts der großen Variabilität der DNA-Schäden, haben sich verschiedene Reparaturprozesse etabliert (siehe Tabelle 2). Da die DNA in der Evolution schon früh einer Vielzahl von schädigenden Einflüssen ausgesetzt war, sind die Reparaturprozesse von Prokaryoten zu Eukaryoten hoch konserviert.

DNA-Schäden und verursachende Agenzien	DNA-Reparaturmechanismus
Oxidierete und alkylierte Basen (verursacht z.B. durch MMS und MNNG)	Basenexzisionsreparatur (BER)
So genannte „bulky adducts“ (sperrige Addukte, verursacht z.B. durch UV-Strahlung, PAK und Chemotherapeutika wie z.B. Platinverbindungen)	Nukleotidexzisionsreparatur (NER)
Schäden z.B. durch spontane Desaminierung	Mismatch-Reparatur (Fehlpaarungs-Reparatur)
Doppelstrangbrüche (z.B. verursacht durch ionisierende Strahlung)	DNA-Doppelstrangbruchreparatur

Tabelle 2: DNA-Reparaturmechanismen eukaryotischer Zellen.

Im Menschen vorkommende DNA-Reparaturmechanismen und Beispiele für verursachende Agenzien. MMS: Methylmethansulfonat; MNNG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin; PAK: polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe.

DNA-Schäden, die durch BPDE verursacht werden, können, wie in Tabelle 2 gezeigt, durch die Nukleotidexzisionsreparatur entfernt werden, weshalb dieser Vorgang näher beschrieben werden soll.

1.2.2 Nukleotidexzisionsreparatur (NER)

Im Folgenden soll die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) näher beschrieben werden, weil sie für die Reparatur von sperrigen DNA-Addukten („bulky adducts“) zuständig ist, wie sie u.a. von PAK-Metaboliten induziert werden. Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) ist die vielfältigste Form der DNA-Reparatur, was die Art der reparierten Schäden betrifft. Zu diesen Schäden gehören alle

größeren sperrigen Addukte, die durch DNA-Glykosylasen nicht spezifisch erkannt und entfernt werden können, darunter die durch UV-Strahlung verursachten Cyclobutan-Pyrimidindimere (Thymidindimere), die bis zu 85% aller UV-Schäden ausmachen. Andere durch die NER reparierten Schäden sind chemische DNA-Addukte, verursacht unter anderem durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, das Pilzgift Aflatoxin und das Tumorthapeutikum Cisplatin (Lindahl und Wood, 1999; Wang *et al.*, 2004). Die Bildung dieser Addukte führt zu einer erheblichen Verzerrung der DNA-Struktur, deswegen werden diese Schäden auch „sperrige Basenmodifikationen“ (im Englischen „bulky adducts“) genannt.

Die NER kann aber auch andere Schäden, verursacht z.B. durch Basenalkylierung oder -oxidation (Brooks *et al.*, 2000; Drablos *et al.*, 2004), erkennen und entfernen. Zwar werden diese Schäden hauptsächlich durch die Basenexzisionsreparatur (BER) entfernt, bei Ausfall der BER ist die NER aber in der Lage, auch diese Art der Schäden zu reparieren (Satoh und Lindahl, 1994).

Defekte der NER-Gene führen u.a. zu den rezessiv vererbten Krankheiten Xeroderma Pigmentosum (XP), Trichothiodystrophie (TTD) und Cockayne Syndrom (CS). Alle diese Syndrome sind verbunden mit erhöhter Sensitivität gegenüber Sonnenlicht (Bootsma *et al.*, 1995). Patienten mit Xeroderma Pigmentosum leiden unter einer extremen Sensitivität gegen Sonnenlicht, einer Prädisposition gegenüber UV-bedingtem Hautkrebs (ca. 1000-fach erhöht) (Kraemer *et al.*, 1994; Lehmann, 2003) und in manchen Fällen an neurodegenerativen Schäden (Batty und Wood, 2000). Es wurden sieben XP-Komplementationsgruppen identifiziert (XPA bis XPG), die verschiedene Reparaturgene repräsentieren (Bootsma *et al.*, 1995). Die NER wurde bisher in verschiedenen Organismen nachgewiesen: Bakterien, Hefen, Drosophila und Säugetiere. Isolierte NER-Gene dieser Lebewesen zeigen deutliche Ähnlichkeiten in ihrer Sequenz (Hoeijmakers, 1993). In Pflanzen zeigen biochemische Untersuchungen das Vorhandensein eines NER-ähnlichen Mechanismus, da in Pflanzen ein Homolog zu dem an der NER beteiligten Protein ERCC1 identifiziert wurde (Xu *et al.*, 1998). Darüber hinaus besitzen Pflanzen das Enzym Photolyase, das durch UV-Strahlung induzierte Pyrimidindimere wieder in die Monomere überführen kann (Thoma, 1999). Dieser auch als Photoreaktion bezeichnete Prozess ist lichtabhängig und stellt einen direkteren und schnelleren Weg der DNA-Reparatur dar als das Entfernen mehrerer Basen bei der Nukleotidexzisionsreparatur.

Allgemein umfasst die NER fünf Schritte: Erkennung des spezifischen Schadens, doppelte Inzision des geschädigten Stranges in 5'- und 3'-Richtung um die Läsion, Entfernung des geschädigten Stranges, Synthese eines neuen Stranges und Ligation (Araújo und Wood, 1999). Dieser Prozess erfordert die koordinierte Aktivierung von ungefähr 30 verschiedenen Proteinen (Hoeijmakers, 2001; van Hoffen *et al.*, 2003).

Die NER wird in zwei unterschiedliche Wege aufgeteilt. Einerseits erkennt und repariert die globale Genom-Nukleotidexzisionsreparatur (GGR) Schäden, die über das gesamte Genom verteilt sind,

unabhängig von aktiver Transkription. Andererseits werden durch die transkriptionsgekoppelte Nukleotidexzisionsreparatur (TCR) nur Schäden repariert, die in transkriptionell aktiven Bereichen des Genoms auftreten (Hanawalt, 2000; van Hoffen *et al.*, 2003). Während die TCR die Reparatur des transkribierten Stranges unternimmt (nicht kodierend), wird der nicht-transkribierte Strang durch die GGR repariert. Die TCR repariert DNA-Schäden schneller als die GGR, damit wichtige Gene fehlerfrei transkribiert werden können. Allgemein entfernt die NER DNA-Schäden als ein Oligomer aus 24 bis 32 Nukleotiden (Huang *et al.*, 1992), abhängig von der Art des Schadens und der Sequenz der geschädigten DNA. Die NER ist ein hochdynamischer Prozess, aufgebaut aus verschiedenen aufeinander folgenden Schritten.

Bei der GGR detektiert ein heterodimerer Komplex, bestehend aus XPC und hHR23B (humanes Homolog des Hefeproteins Rad23), die geschädigte DNA (Sugasawa *et al.*, 1998). Um von XPC erkannt zu werden, muss die Läsion einerseits die DNA-Konformation stören und andererseits die DNA chemisch modifizieren, damit die Reparaturproteine an den einzelnen Strang binden können (Gunz *et al.*, 1996). Außerdem besitzt XPC eine hohe Affinität zu einzelsträngiger DNA (Masutani *et al.*, 1994; Maillard *et al.*, 2007). Das XPC-Protein erkennt die Doppelhelixstruktur der ungeschädigten DNA und das lokal auf den DNA-Schaden begrenzte Vorliegen von einzelsträngiger DNA gegenüber der Läsion. Das sperrige DNA-Addukt stört die Interaktionen zwischen den Basen gegenüberliegender Stränge, aber auch innerhalb eines Stranges, die normalerweise die Stabilität der DNA gewährleisten. Daraus resultiert die Bildung abnormaler DNA-Strukturen, die einzelsträngiger DNA ähneln (Buterin *et al.*, 2005). Nach Schadenserkenkung durch XPC/hHR23B wird der basale Transkriptionsfaktor TFIIH rekrutiert (Sugasawa *et al.*, 1998; Volker *et al.*, 2001). Die Proteine des TFIIH-Komplexes bilden die topologische Struktur, die den Eintritt der Proteine RPA (Replikationsprotein A) und XPA erlaubt (Tapias *et al.*, 2004). Der TFIIH-Komplex besteht aus sechs Polypeptiden, darunter auch die Helikasen XPB und XPD, die für die ATP benötigte Entwindung der DNA-Helix im geschädigten Bereich von 10 bis 20 Nukleotiden verantwortlich sind. Die DNA liegt dann für kurze Zeit als einzelsträngiges Intermediat vor, dieser Zustand wird durch XPA und RPA stabilisiert (de Laat *et al.*, 1999). XPC/hHR23B dissoziieren dann von dem Komplex ab, damit die Rekrutierung weiterer Reparaturkomplexe unterbunden wird und nicht mehr NER-Proteine als benötigt rekrutiert werden (Wakasugi und Sancar, 1998; Reardon und Sancar, 2003). XPA bindet an die Läsion und RPA an den ungeschädigten Strang (de Laat *et al.*, 1999). XPG, positioniert durch RPA und TFIIH, stabilisiert den komplett geöffneten Komplex und ist verantwortlich für die 3'-Inzision. ERCC1-XPF, ebenfalls positioniert durch RPA und TFIIH, erzeugt die 5'-Inzision. XPG und XPF sind Endonukleasen mit gegenläufiger Orientierung. Durch die Aktivität der Endonukleasen kann ein 24 bis 32 Nukleotide umfassendes Fragment entfernt werden. Anschließend wird die Lücke durch die DNA-Polymerasen δ und ϵ in einem PCNA („proliferating cell nuclear antigen“-)abhängigen Prozess wieder aufgefüllt und ligiert (Shivji *et al.*, 1995).

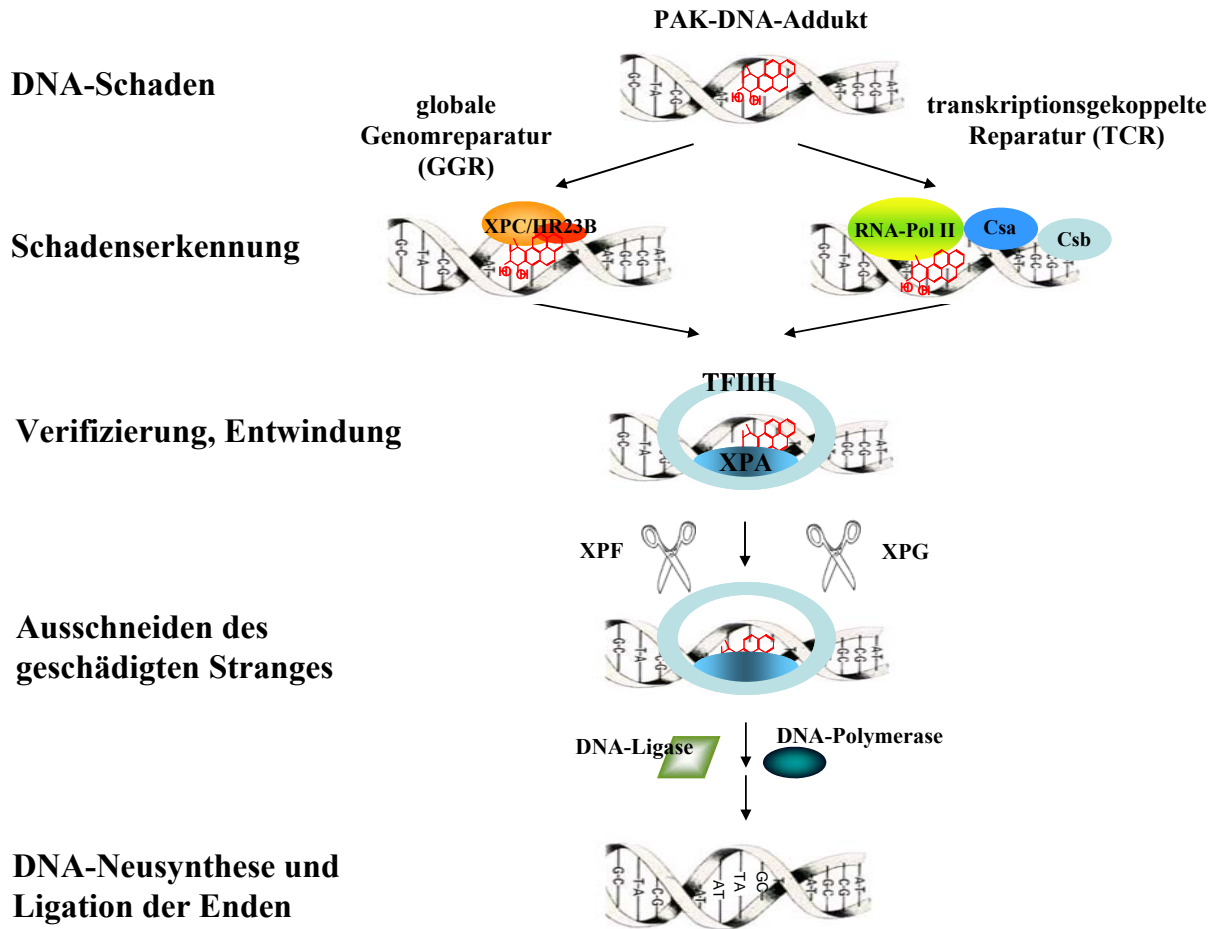


Abb. 5: Übersicht über die Nukleotidexzisionsreparatur.

Die NER ist in zwei Wege unterteilt, die globale Genom-NER (GGR) und die transkriptionsgekoppelte NER (TCR), Erläuterungen dazu im Text.

In der TCR wird das Entfernen geschädigter Nukleotide in aktiv transkribierten Bereichen der DNA durch die Transkriptionsmaschinerie initiiert (Mullenders und Berneburg, 2001). Die Reparatur transkribierter Gene erfolgt fünf- bis zehnmals schneller als die Reparatur von Schäden im nicht transkribierten Bereich des Genoms (Hanawalt, 1994). Für die TCR werden, mit Ausnahme von XPC/hHR23B, alle Proteine benötigt, die auch für die Reparatur nicht transkribierter DNA verantwortlich sind. Bei der TCR fungiert die Blockierung der RNA-Polymerase II an der Läsion des Templatestranges als Schadenserkennungssignal. Danach werden die Proteine CSA und CSB rekrutiert, die ebenfalls nicht an der GGR beteiligt sind und das Signal der blockierten RNA-Polymerase II mit der DNA-Reparatur koppeln. Auch bei der TCR kommt es zur Rekrutierung von TFIIH. Die TFIIH-Rekrutierung ist, zumindest teilweise, für die ATP-abhängige Abdissoziation der RNA-Polymerase II verantwortlich (Lainé und Egly, 2006). Darüber hinaus wurde nach UV-Bestrahlung die Ubiquitinierung und Degradierung der an einer Läsion blockierten RNA-Polymerase II beobachtet (Bregman *et al.*, 1996). Die Abdissoziation bzw. Degradierung der

Polymerase erlaubt möglicherweise anderen Reparaturfaktoren auch der GGR, wie z.B. XPC, den Zugang zur Läsion (Ratner *et al.*, 1998). Sarker *et al.* allerdings haben ein anderes Modell für das weitere Schicksal der RNA-Pol II aufgestellt, in dem die Polymerase auch während des Reparaturablaufs an der DNA gebunden bleibt (Sarker *et al.*, 2005). Durch Helikasen des TFIIH-Komplexes werden die DNA-Stränge getrennt und es kommt zur Formierung eines „offenen“ Komplexes im Bereich um die Läsion. Wie in Abb. 5 zu sehen, vereinigen sich die GGR und TCR ab dem Punkt der TFIIH-Rekrutierung.

In vivo-Untersuchungen haben gezeigt, dass die NER ein schrittweiser Prozess ist, bei dem die einzelnen Reparaturschritte aufeinander aufbauen. Die Reparatur eines einzelnen Schadens dauert dabei nur ca. eine Stunde. Nach der erfolgreichen Reparatur dissoziiert der gesamte Reparaturkomplex wieder auseinander (Hoeijmakers, 2001).

Wird ein DNA-Schaden nicht repariert, kann es durch den Einbau falscher Basen während der Replikation zur Entstehung von Mutationen kommen. Der Zelle steht aber auch ein Mechanismus zur Verfügung, der DNA-Läsionen im Template-DNA-Strang toleriert. Dabei wird die so genannte Transläsionssynthese (TLS) durchgeführt, die im folgenden Abschnitt behandelt werden soll.

1.2.3 PAK und Transläsionssynthese (TLS)

Diolepoxide, die reaktiven Stoffwechselmetabolite von B[a]P, sind stark elektrophil und können auf Grund dieser Eigenschaft an die Basen der DNA binden. So reagiert BPDE mit der Base Guanin an der N²-Aminogruppe oder der exozyklischen N⁶-Aminogruppe von Adenin durch *trans*- oder *cis*-Öffnung des Epoxidrings von BPDE. Konsequenz ist die kovalente Bindung von BPDE an DNA. Abhängig von der BPDE-Konzentration werden verschiedene DNA-Schäden induziert. Bei hohen PAK-Dosen werden bevorzugt Guanin-Addukte gebildet. Werden Zellen mit niedrigeren Dosen behandelt, die den Konzentrationen entsprechen, denen gegenüber der Mensch ubiquitär exponiert ist, bindet BPDE präferentiell an Adenin (Wei *et al.*, 1991). Diese Addukte behindern die DNA-Replikation, führen zu G→T-Transversion und können auf diese Weise an der Entstehung von Mutationen beteiligt sein.

Es sind mehrere DNA-Polymerasen bekannt, welche über DNA-Schäden hinweglesen können, die normalerweise einen Replikationsblock induzieren (Friedberg *et al.*, 2001). Zum Beispiel kann die DNA-Polymerase η DNA-Stränge als Template benutzen, die Thymidindimere enthalten (Masutani *et al.*, 1999). Diesen Vorgang nennt man Transläsionssynthese (TLS), weil dabei die geschädigte DNA als Template benutzt wird. Der potentiell toxische DNA-Schaden wird dabei toleriert. Die Polymerase η setzt die DNA-Synthese über die BPDE-geschädigte Base im Matrizenstrang hinweg fort (Zhang *et al.*, 2000a). Dies resultiert jedoch häufig im Einbau falscher Basen („error-prone repair“). Die TLS stellt somit einen Hauptweg zur schadensinduzierten Mutationsgenerierung dar. Die

DNA-Polymerase κ hingegen kann BPDE geschädigte Nukleotide im Matrizenstrang fehlerfrei („error-free“) kopieren (Zhang *et al.*, 2000b).

Bisher wurden das Vorkommen von PAK und die durch PAK bzw. BPDE induzierten zellulären Schäden und deren Konsequenzen beschrieben. Im folgenden Abschnitt sollen die durch PAK induzierten Signalkaskaden erläutert werden.

1.3 PAK und intrazelluläre Signaltransduktionswege

1.3.1 MAPK-Signalwege

Um auf extrazelluläre Stimuli angemessen reagieren zu können, müssen Zellen diese Signale zuerst erkennen. Zur Wahrnehmung der Signale dienen entweder Rezeptoren der Plasmamembran (z.B. Rezeptoren für Wachstumsfaktoren) oder, im Falle von Signalmolekülen, welche die Plasmamembran passieren können, zytoplasmatische Rezeptoren (z.B. Arylhydrokarbonrezeptor oder Steroidhormonrezeptoren). Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu einer Reizübermittlungskette, indem ein Molekül das nächste aktiviert. Diesen Vorgang nennt man auch Signaltransduktionskaskade. Am Ende dieser Signaltransduktionskaskade werden meist Transkriptionsfaktoren aktiviert, was zu veränderter Expression spezifischer Gene führt. Zu den Faktoren, die eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen können, gehören u.a. physiologische Stimuli wie Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine, aber auch nicht-physiologische Reize wie Strahlung (Gamma- oder UV-Strahlung), Tumorpromotoren wie Phorbolster und oxidativer Stress. Ebenfalls muss die Zelle Veränderungen des zellulären Umfelds wie Hyperosmolarität (osmotischer Schock) erkennen, um darauf reagieren zu können. Abhängig von dem extrazellulären Signal werden in der Zelle verschiedene Signalwege aktiviert. Durch Mitogene, Stress und Zytokine werden Signaltransduktionskaskaden aktiviert, an denen u.a. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) beteiligt sind. Zu den MAPK gehören drei Unterfamilien: Die ERK- (extracellular signal regulated kinase), JNK- (c-Jun-N-terminal kinase) und die p38-MAPK-Familie (Pearson *et al.*, 2001; Wada und Penninger, 2004; Weston und Davis, 2007). Die MAPK unterscheiden sich durch die verschiedenen Stimuli, durch die sie aktiviert werden. Wachstumsfaktoren und Phorbolster aktivieren bevorzugt die ERK-MAPK. JNK und p38 werden als Reaktion auf verschiedene Stressfaktoren wie DNA schädigende Agenzien, osmotischer Schock, UV-Strahlung, ionisierende Strahlung und inflammatorische Zytokine aktiviert, weshalb sie auch unter dem Namen Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK) zusammengefasst werden (Pearson *et al.*, 2001). Allen drei MAPK ist die Art ihrer stufenweisen Aktivierung gemeinsam. Die an der Aktivierungskaskade beteiligten Proteine werden jeweils von ihrem Vorgängerprotein, ebenfalls eine Proteinkinase, durch Phosphorylierung aktiviert. Die MAPK aktivieren ihre Substrate, z.B. die Transkriptionsfaktoren c-Jun, ATF2 oder

c-Fos, durch Phosphorylierung an einem Serin- oder Threonin-Rest, wobei diesen hochkonservierten Aminosäuren immer ein Prolin folgen muss (Prolin-gerichtete Kinasen). Die MAPK selbst werden durch Übertragung der endständigen Phosphatgruppe von ATP auf ein Threonin und Tyrosin in ihrer Aktivierungs-Domäne („activation loop“) aktiviert, wobei zwischen diesen Aminosäuren nur eine Aminosäure liegt (Thr-X-Tyr). Diese Aminosäure (AS) unterscheidet sich bei den verschiedenen MAPK und ist wichtig für die differenzierte Aktivierung der MAPK durch MAPK-Kinasen (MAPKK). Bei ERK1/2 liegt Glutaminsäure zwischen Threonin und Tyrosin, bei JNK1/2 ist es Prolin und bei p38 die AS Glycin. Direkte Interaktionen zwischen Substrat und Kinase tragen zur effizienten Phosphorylierung der Zielproteine bei. Allgemein gibt es sowohl eine Stelle, an der das Protein phosphoryliert wird, als auch eine Region, die für die Interaktion zwischen Enzym und Substrat wichtig ist („docking site“). Eine solche Interaktion wurde z.B. für JNK und c-Jun gezeigt. Bindung der δ -Domäne von c-Jun durch JNK erhöht die lokale Konzentration des JNK-Substrates, was somit zu einer effizienteren c-Jun-Phosphorylierung beiträgt (Adler *et al.*, 1992; Kallunki *et al.*, 1994). Die δ -Domäne (D-Domäne) von c-Jun beinhaltet die Sequenz Lys-X-X-Arg/Lys-X-Leu-X-Leu (X steht hierbei für eine beliebige Aminosäure) (Kallunki *et al.*, 1994). Das Leu-X-Leu-Motiv wurde auch in anderen Substraten (Transkriptionsfaktoren) gefunden, die von ERK oder JNK phosphoryliert werden. In Substraten der SAPK p38 hingegen ist die Leu-X-Leu-Sequenz innerhalb der D-Domäne durch drei hydrophobe Aminosäuren ersetzt. Dies deutet darauf hin, dass schon geringe Änderungen in der Sequenz der D-Domäne zur Substratspezifität beitragen. MAPK-Kinasen besitzen ebenso Interaktionsdomänen (bestehend aus basischen und sauren Aminosäuren) zur Bindung ihrer Substrate: die MAPK (Bardwell und Thorner, 1996).

Die MAPK-Kinasen sind dualspezifische Kinasen, da sie die MAPK an zwei AS phosphorylieren können (Treisman, 1996; Mittelstadt *et al.*, 2005; Raman *et al.*, 2007). Die MAPKK wiederum werden von in der Signaltransduktionskaskade stromaufwärts gelegenen Serin-Threonin-spezifischen MAPKK-Kinasen aktiviert/phosphoryliert. Eine Übersicht über diese Signaltransduktionskaskaden ist in Abb. 6 dargestellt. Die Änderung des Phosphorylierungsstatus bestimmter Proteine ist ein reversibler Prozess, an dem neben den zur Phosphorylierung benötigten Proteinkinasen auch noch Phosphatasen beteiligt sind, die Phosphatgruppen wieder entfernen können.

Die SAPK JNK und p38 sind evolutionär hoch konserviert und existieren in verschiedenen Isoformen. Erstmals beschrieben wurde JNK durch die Fähigkeit, das Onkoprotein c-Jun zu phosphorylieren, was als Konsequenz die transkriptionelle Aktivität von c-Jun erhöht (Hibi *et al.*, 1993). Zusammen mit c-Fos bildet c-Jun den Transkriptionsfaktor AP-1 („activator protein-1“).

Das Vorkommen dreier verschiedener Gene (*jnk1*, *jnk2* und *jnk3*) und alternatives Spleißen führt zu unterschiedlichen Expressionsmustern der JNK-Isoformen in verschiedenen Geweben und möglicher Substratelektivität. In neuronalen Geweben, Herz und Testis ist überwiegend JNK3 exprimiert, wohingegen die Gene JNK1 und JNK2 ubiquitär in allen Geweben koexprimiert werden. Die drei verschiedenen JNK-Gene werden alternativ gespleißt, was zur Bildung von zehn JNK-Isoformen führt

(Gupta *et al.*, 1996). Transkripte der drei JNK-Gene kodieren für zwei unterschiedlich große Proteine: Ein 46 kDa großes Protein, bezeichnet als JNK1, ohne carboxyterminale Verlängerung und ein 55 kDa großes Protein, bezeichnet als JNK2, mit zusätzlicher carboxyterminaler Sequenz.

Wie bereits erwähnt, wird JNK hauptsächlich durch verschiedene Stressfaktoren wie Hitze, UV-Strahlung, alkylierende Agenzien und inflammatorische Zytokine aktiviert. Als Folge der Aktivierung kann JNK verschiedene Substrate phosphorylieren, die an der Regulation von Apoptose, Wachstum und an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind (Kennedy und Davis, 2003).

Von der SAPK p38 wurden bisher vier verschiedene Gene (p38 α , p38 β , p38 γ und p38 δ) identifiziert. Die p38 α - und p38 β -Isoformen sind zu 60% mit den p38 γ - und p38 δ -Isoformen homolog, es gibt aber nur eine 40 bis 45%ige Identität mit anderen MAPK-Vertretern (Cohen, 1997).

Die Aktivierung der p38-Kinase durch verschiedene Stimuli (z.B.: UV-Strahlung, DNA-Schäden, Hitzeschock, proinflammatorische Zytokine und bakterielle Lipopolysaccharide) spielt eine entscheidende Rolle in wichtigen zellulären Prozessen wie Zelldifferenzierung, Immunantworten, zellulären Stressantworten und Zellüberleben (Bulavin und Fornace, 2004; Zarubin und Han, 2005).

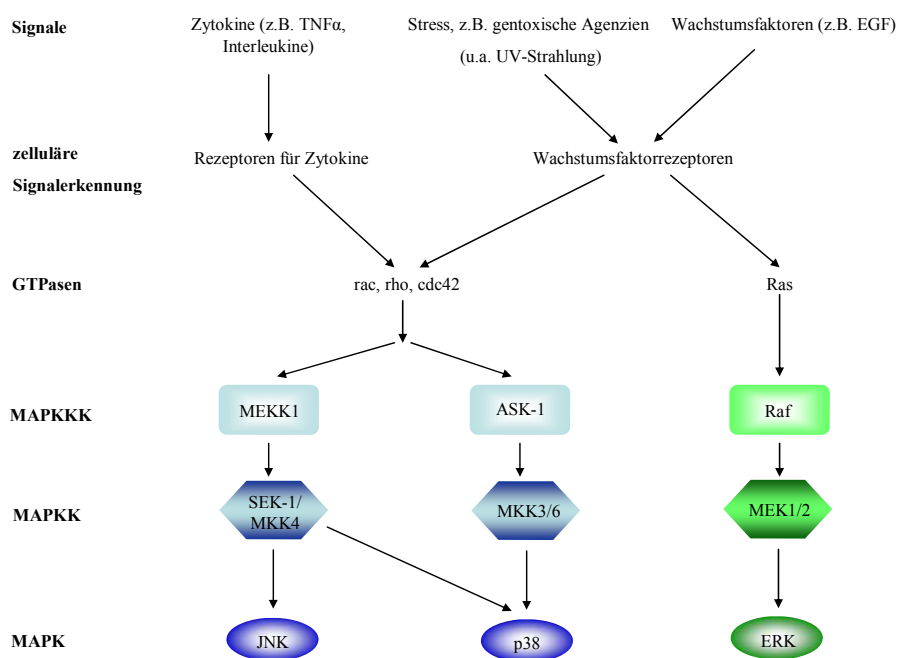


Abb. 6: Schematische Darstellung der MAPK-Signaltransduktionskaskade.

EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor („epidermal growth factor“); ERK: Extrazellulär-regulierte Kinase; JNK: c-Jun-N-terminale Kinase; MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; MAPKK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase; MAPKKK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase; MKK: MAPK/ERK-Kinase; Raf: Ras-aktivierter Faktor; Ras: *Rat* Sarkoma; RTK: Rezeptortyrosinkinase; TNF α : Tumor-Nekrosefaktor α .

In diesem Abschnitt wurde dargestellt, dass verschiedene Stressfaktoren, wie z.B. UV-Strahlung, DNA-schädigende Agenzien, wie z.B. PAK, und inflammatorische Zytokine eine Signalkaskade

induzieren können, an der auch MAPK beteiligt sind. Auf diese Signalkaskaden wird im Folgenden am Beispiel von PAK näher eingegangen.

1.3.2 PAK und MAPK

Bisher sind nur zwei Arbeiten publiziert, die sich mit der schnellen PAK-Diolepoxid-induzierten Aktivierung von MAPK befassen (Li *et al.*, 2004a; Li *et al.*, 2004b). Darin wird eine Beteiligung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und der Akt-Kinase an den PAK-Diolepoxid-induzierten Signalwegen nachgewiesen. Der PI3K/Akt-Signalweg wird u.a. durch Bindung von Wachstumsfaktoren an zelluläre Oberflächenrezeptoren, z.B. Rezeptortyrosinkinasen (RTK) oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR, für „G-protein-coupled receptor“), aktiviert und reguliert fundamental wichtige zelluläre Funktionen wie z.B. Zellwachstum und Zellüberleben (Datta *et al.*, 1999). Die PI3K katalysiert die Phosphorylierung membranständiger Phosphatidylinositol-Lipide, darunter Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), an der 3'-Position des endständigen Inositolrings (Abb. 7). Diese Phosphorylierung resultiert in der Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃), welches als so genannter „second messenger“ fungieren und in dieser Funktion weitere Signalmoleküle binden und regulieren kann (Katso *et al.*, 2001).

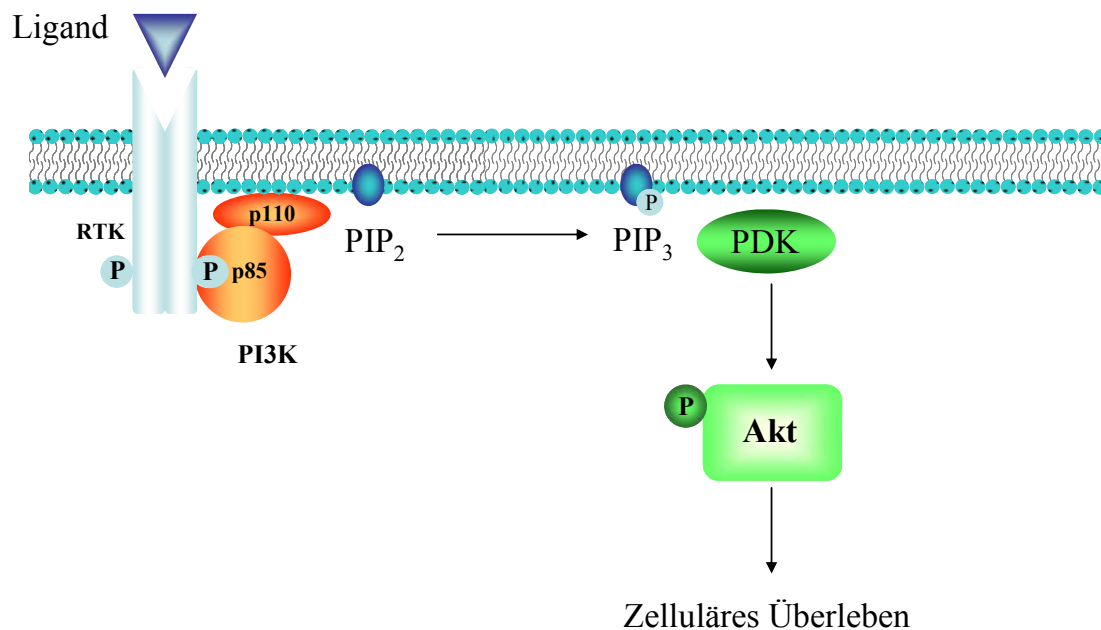


Abb. 7: Signalkaskade, die zur Aktivierung von Akt führt. Erläuterungen im Text. p85: Regulatorische Untereinheit der PI3K; p110: Katalytische Untereinheit der PI3K; PDK: PI-dependent kinase (PI-abhängige Kinase); PI3K: Phosphoinositol-3-Kinase; PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PIP₃: Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat; RTK: Rezeptortyrosinkinase.

Eine wichtige Kinase, die durch die PI3K reguliert wird, ist die Serin/Threonin-Kinase Akt, auch Proteinkinase B (PKB) genannt. Vermittelt wird die Aktivierung der Akt-Kinase hauptsächlich durch PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat). Die Bindung dieses „second messengers“ an PDK (PI-dependent kinase) induziert die Translokation dieser Kinase an die Plasmamembran, wo sie Akt phosphorylieren kann. Reguliert wird die PIP₃-Aktivierung durch PTEN („phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten“), eine Lipid-Phosphatase, welche PIP₃ dephosphoryliert (Maehama und Dixon, 1998). Zur Aktivierung muss Akt an zwei Domänen phosphoryliert werden, einmal innerhalb der Aktivierungs-Domäne an Tyrosin³⁰⁸ und in der C-terminalen Domäne an Serin⁴⁷³ (Alessi *et al.*, 1996). Neben der Aktivierung durch RTK und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kann die Akt-Kinase auch noch durch zellulären Stress aktiviert werden, darunter Hitzeschock, Hypoxie, UV- und γ -Strahlung und oxidativer Stress (Konishi *et al.*, 1996; Shaw *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2001; Crossthwaite *et al.*, 2002). Die Akt-Aktivierung durch Stressfaktoren, wie z.B. Hitzeschock, verläuft ebenfalls über Aktivierung membranständiger Wachstumsfaktorrezeptoren, z.B. EGF-Rezeptoren (Lin *et al.*, 1997).

In den bereits erwähnten Veröffentlichungen zu Diolepiden und MAPK wurden die durch 5-Methylchrysen-1,2-Diol-3,4-Epoxid (MCDE) und BPDE-induzierten intrazellulären Signalkaskaden in murinen epidermalen Zellen (Cl41) mit Hilfe chemischer Inhibitoren und Aktivierungs-defizienter Kinasen untersucht. MCDE entsteht durch metabolische enzymatische Umsetzung eines chemisch nicht-reaktiven Mutterkohlenwasserstoffs (5-Methylchrysen, Hecht *et al.*, 1978). MCDE bindet, wie BPDE, kovalent an DNA und ist an der Entstehung von Mutationen beteiligt (Melikian *et al.*, 1984; Amin *et al.*, 1985; Hecht *et al.*, 1987). MCDE induziert intrazelluläre Signalkaskaden, welche PI3-Kinase-abhängig sowohl zur Aktivierung von JNK und ERK als auch zur AP-1-Aktivierung führen (Li *et al.*, 2004b). Für BPDE wurde gezeigt, dass die AP-1-Aktivierung von PI3-Kinase- und JNK-Aktivierung abhängig ist (Li *et al.*, 2004a). Ein Weg, der Akt-abhängig zur Aktivierung der SAPK führen könnte, ist die Phosphorylierung von ASK1 („apoptosis signal-regulating kinase 1“) durch Akt. ASK-1 ist eine MAPKKK und kann deshalb die in der Signalkaskade oberhalb der JNK oder p38 liegenden MAPKK durch Phosphorylierung aktivieren (Abb. 6).

Bisher wurde gezeigt, welche intrazellulären Signalkaskaden durch BPDE-Behandlung induziert werden können. Im folgenden Abschnitt soll dargestellt werden, was über die zellulären Konsequenzen der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung bisher bekannt ist. In Maushepatomzellen (Hepa) induziert eine 24-stündige Inkubation mit BPDE sowohl die Spaltung des Caspasesubstrats PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) als auch die Freisetzung von Cytochrom c, einem in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Protein, das an der Elektronentransportkette beteiligt ist, aus den Mitochondrien. Beides sind typische Reaktionen während der Apoptose. Für denselben Zeitraum konnte die BPDE-abhängige Aktivierung der p38-Kinase detektiert werden. Außerdem wurde gezeigt, dass die BPDE-induzierte Apoptose abhängig von der p38-Kinase ist, denn in p38-

defizienten primären Mausfibroblasten findet keine Cytochrom c-Freisetzung und keine PARP-Spaltung statt (Chen *et al.*, 2003).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welcher Mechanismus der BPDE-induzierten Aktivierung der SAPK p38 und JNK zu Grunde liegt und welche Konsequenzen sich aus dieser Aktivierung für die Zelle ergeben. BPDE dient hierbei als Modellsubstanz zur Untersuchung, wie genotoxische Agenzien auf Zellen wirken und welche Signalkaskaden sie induzieren (z.B. SAPK-Signalwege). Bisher wurde ein Signalweg beschrieben, der abhängig von der vorherigen Aktivierung der PI3-Kinase zu einer Aktivierung der Akt-Kinase führt. Am Ende dieser Signalkaskade werden MAPK aktiviert (Li *et al.*, 2004a; Li *et al.*, 2004b). Diese Versuche wurden in epithelialen Mauszellen (Cl41) durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit sollten die BPDE-induzierten intrazellulären Signalwege in immortalisierten Mausfibroblasten untersucht werden. Dieser Zelltyp eignet sich sehr gut für die Untersuchung des Mechanismus, der intrazellulären Signalkaskaden zu Grunde liegt, da zum Vergleich eine Vielzahl von Knockout-Zelllinien zur Verfügung stehen, die defizient für verschiedene Proteine sind, welche an intrazellulären Signalkaskaden beteiligt sind.

Anhand dessen, was bisher über die BPDE-induzierten Signalkaskaden bekannt ist, ergeben sich folgende Fragestellungen: 1. Durch welchen Mechanismus aktiviert BPDE die SAPK und welche Signaltransduktionsmoleküle sind an dieser Aktivierungskaskade beteiligt? Diese Frage beinhaltet den primären Ansatzpunkt für BPDE zur Induktion von Signalkaskaden. Als Möglichkeiten kommen verschiedene zelluläre Strukturen in Frage, z.B. Rezeptortyrosinkinasen, wie z.B. den Rezeptoren für Wachstumsfaktoren oder die durch BPDE induzierten DNA-Schäden. Diese Frage sollte u.a. mit Hilfe von Inhibitoren zellulärer Faktoren und verschiedener Knockoutzellen (NIH3T3) untersucht werden. 2. Was sind die zellulären Konsequenzen der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung? Diese Frage sollte mit Hilfe verschiedener Knockout-Zelllinien, z.B. p38-defizienter Zellen und dazugehöriger Wildtypzellen, und mit Inhibitoren der SAPK untersucht werden. Ziel war die Untersuchung der Konsequenzen der BPDE-abhängigen SAPK-Aktivierung hinsichtlich der Endpunkte Zelltod, Zellüberleben und Auswirkungen auf die Proliferation.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bezugsquellen

2.1.1 Chemikalien und Lösungen

Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
BSA Fraktion V	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMEM	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe, Deutschland
ECL-Lösung	Amersham, Freiburg, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Entwickler und Fixierer	Kodak GmbH, Stuttgart, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Größenmarker für Proteingele	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Low melting point Agarose	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Saliter, Obergünzburg, Deutschland
„Newborn calf serum“ (NCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl, Tris-Base	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TritonX-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Whatman 3MM-Papier	Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland
Zellkulturmaterial	Greiner Labortechnik, Nürtingen, Deutschland

2.1.2 Induktoren und Inhibitoren

Actinomycin D	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
B[a]P	Albrecht Seidel, Großhansdorf, Deutschland
B[c]PhenDE	Albrecht Seidel, Großhansdorf, Deutschland
BPDE	Karl Platt, Mainz, Deutschland
Camptothecin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
CDDP	Sigma, München, Deutschland
Doxorubicin	Sigma, München, Deutschland
EGF	Sigma, München, Deutschland
MMS	Sigma, München, Deutschland
PP1	Biomol, Hamburg, Deutschland
Suramin	Sigma, München, Deutschland
SB203580	Calbiochem (VWR), Bruchsal, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wortmannin	Sigma, München, Deutschland

Von diesen Substanzen wurden entsprechende Stammlösungen angesetzt und bei -20°C gelagert.

2.1.3 Membranen, Filme und Plastikwaren

ECL-Filme	Amersham, Freiburg, Deutschland
Nitrozellulose-Membran	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Plastikwaren für die Zellkultur	Greiner Labortechnik, Nürtingen, Deutschland

2.2 Glaswaren

Alle verwendeten Glaswaren wurden von der Firma VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die Sterilisation erfolgte fünf Stunden in einem Wärmeschrank (Modell 800, Memmert GmbH & CoKG, Schwabach, Deutschland).

2.3 Verwendete Antikörper und Verdünnungen

2.3.1 Phosphospezifische und nicht-phosphospezifische Antikörper

Alle phosphospezifischen Antikörper (Cell Signalling, Frankfurt/Main, Deutschland) wurden in 3% BSA in 1xTBST verdünnt und die eingeschweißte Membran über Nacht bei 4°C, unter ständigem Schwenken, mit der Antikörperlösung inkubiert.

Antikörper	Verdünnung
phAkt	1:1000
phERK1/2	1:1000
phJNK1/2	1:1000
php38	1:1000
phShc	1:500
phMKK3/6	1:1000
phMKK7	1:1000
phSek-1	1:1000

Tabelle 3: Phosphospezifische Antikörper

Alle Antikörper gegen nicht-phosphorylierte Proteine (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) wurden in 5% fettarmem Milchpulver in 1xTBST verdünnt und die in Folie eingeschweißten Membranen mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit der Antikörperlösung inkubiert.

Antikörper	Verdünnung
Akt H-136	1:1000
ERK2 C-14	1:1000
JNK2 D-2	1:1000
p38 C-20	1:1000
Shc PG-797	1:500
MKK3/6 H-90	1:1000
MKK7 H-160	1:1000
SEK-1 H-98	1:1000

Tabelle 4: Antikörper gegen nicht-phosphorylierte Proteine

2.3.2 Sekundäre Antikörper

Mit Meerrettichperoxidase (HRP, „horseradish peroxidase“) gekoppelte sekundäre Antikörper

- HRP-gekoppelte Antikörper aus Ziege gegen Maus-IgG gerichtet (DakoCytomation GmbH, Hamburg)
- HRP-gekoppelte Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen-IgG gerichtet (DakoCytomation GmbH, Hamburg)
- HRP-gekoppelte Antikörper aus Kaninchen gegen Ziege-IgG gerichtet (DakoCytomation GmbH, Hamburg)

Alle verwendeten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper wurden 1:5000 verdünnt in 5% Milchpulver/TBST eingesetzt und 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.3.3 Kulturmedien und Kulturbedingungen

2.3.3.1 Standardkulturmedien für eukaryotische Zellen

Es wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco; Produktnummer #41966), supplementiert mit 10% FCS bzw. für JNK^{-/-} und korrespondierenden Wildtypzellen mit 10% NCS, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin verwendet.

Die XPC-defizienten Fibroblasten und korrespondierenden Wildtypmausfibroblasten benötigten eine 1:1-Mischung aus DMEM und Ham-F10 (Gibco; Produktnummer #31550), supplementiert mit 10% FCS und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin.

2.4 Lösungen und Puffer

Blockierungslösung (Western Blot)

5% Milchpulver in 1xTBST

Blotpuffer

200 mM Glycin

25 mM Tris-Base

20% Methanol

Coomassiefärbelösung

0,1% Coomassie Brilliant Blue R250
40% Methanol
7,5% Essigsäure

Coomassieentfärbelösung

45% Methanol
10% Essigsäure
45% H₂O

Elektrophoresepuffer für alkalischen Comet Assay

300 mM NaOH
1 mM EDTA
pH > 13

Elektrophoresepuffer für neutralen Comet Assay

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

Laufpuffer nach Laemmli

25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1% SDS

Lysepuffer für alkalischen Comet Assay

2,5 M NaCl
100 mM EDTA
10 mM Tris
1% Na-Laurylsarcosinat
pH Wert mit NaOH auf 10 einstellen.

Zu 80 ml dieses Puffers werden kurz vor Gebrauch 0,8 ml Triton X-100 und 8 ml DMSO gegeben

Lysepuffer für neutralen Comet Assay

2,5 M NaCl

100 mM EDTA

10 mM Tris

1% Na-Laurylsarcosinat

pH auf 7,5 einstellen, zu 80 ml des Puffers werden 0,8 ml Triton X-100 und 8 ml DMSO gegeben

Neutralisationspuffer für alkalischen Comet Assay

0,4 M Tris-Base pH 7,5

PBS (10x)

1,4 M NaCl

27 mM KCl

81 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

15 mM KH₂PO₄

4x Probenpuffer

12,5 ml 1M Tris pH 6,8

20 ml Glycerin

17,5 ml H₂Odest.

4 g SDS

25 mg Bromphenolblau → 10% β-Mercaptoethanol vor Gebrauch frisch dazugeben.

4% Sammelgel (10 ml)

7,5 ml H₂Odest.

1,7 ml 30%ige Acrylamidlösung

0,625 ml 2 M Tris pH 6,8

0,1 ml 10% SDS

0,01 ml APS

0,001 ml TEMED

1xStripping-Puffer

62,5 mM Tris pH 7,6

0,5% SDS

Vor Gebrauch 100 ml 1xPuffer mit 713 µl β-Mercaptoethanol versetzen.

10% Trenngel (10 ml)

- 7,5 ml H₂O
- 3,3 ml 30%ige Acrylamidlösung
- 1,88 ml 2 M Tris pH 8,8
- 0,1 ml 10% SDS
- 0,01 ml APS
- 0,001 ml TEMED

TBS-Puffer

- 20 mM Tris-Base
- 150 mM NaCl
- pH 7,6

TBST-Puffer

- TBS-Puffer mit 0,01% Tween 20

2.5 Zellen

Immortalisierte adhärenente Mausfibroblasten (NIH3T3):

- JNK^{-/-} (erhalten von E.F. Wagner, Wien, Österreich)
 - P38 α ^{-/-} (erhalten von A. Nebreda, Madrid, Spanien)
 - XPC^{-/-} (erhalten von G.T. van der Horst, Rotterdam, Niederlande)
 - XPA^{-/-} (erhalten von B. Epe, Mainz, Deutschland)
 - CSA^{-/-} (erhalten von B. Epe, Mainz, Deutschland)
 - CSB^{-/-} (erhalten von B. Epe, Mainz, Deutschland)
 - c-Abl^{-/-} (erhalten von A.J. Koleske, New Haven, USA)
- und jeweils korrespondierende Wildtypmausfibroblasten.

Primäre embryonale Mausfibroblasten („mouse embryonic fibroblast“, MEF):

- XPC^{-/-} und korrespondierende Wildtyp MEFs (erhalten von G.T. van der Horst, Rotterdam, Niederlande).

2.6 Zellkulturmethoden

2.6.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte in einem Zellinkubator kultiviert. Die adhärennten Zellen wurden in Kulturmedium inkubiert, bis sie eine Konfluenz von ca. 80-90% erreicht hatten. Wenn die Zellen die gewünschte Dichte erreicht hatten, wurde das Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen einmal mit 1xPBS gewaschen. Pro 145 cm² Kulturfläche wurden 2 ml einer 0,25%igen Trypsinlösung tropfenweise auf den Zellen verteilt und die Zellen für ca. 3-5 Minuten zurück in den Inkubator gestellt, bis sich die Zellen von der Schale und die Zellkontakte zwischen den Zellen gelöst hatten. Die abgelösten Zellen wurden entsprechend ihrer Dichte und ihrem Wachstumsverhalten in frischem Medium verdünnt und in der gewünschten Dichte auf eine neue Schale ausplattiert.

2.6.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, von der Zellkulturschale abtrypsinisiert und die Zellsuspension in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte das Abzentrifugieren der Zellen für fünf Minuten bei 1500 rpm. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in entsprechender Menge Einfriermedium (FCS bzw. NCS:DMSO im Verhältnis 10:1) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Zum langsamen Abkühlen wurden die Röhrchen für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend in einem Styroporgefäß über Nacht bei -80°C stehen gelassen. Am nächsten Tag konnten die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt werden. Dort können sie über Monate bis Jahre aufbewahrt werden.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen mit den Zellen rasch im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und auf eine Zellkulturschale verteilt. Sobald sich die Zellen abgesetzt hatten, wurde das Medium gewechselt und die Zellen wie im vorigen Abschnitt beschrieben kultiviert.

2.6.3 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer

Allgemeines:

Die Neubauer-Zählkammer ist eine etwa 30 mm x 80 mm große und etwa 5 mm dicke Glasplatte mit einer Mittelfläche, auf der quadratische Felder definierter Größe eingätzt sind. Sie wird zur Zählung aller Arten von Zellen (zum Beispiel Erythrozyten, Leukozyten) und Mikroorganismen verwendet.

In der Mitte der Glasplatte befindet sich die Fläche mit dem je nach Kammertyp unterschiedlichen Liniennetz (Zählfläche). Ein dünnes, plangeschliffenes Deckglas (vorher kurz zur Befeuchtung anhauchen) wird auf die seitlich daneben befindlichen Auflagen (zwei plangeschliffene Glasstege) gelegt, die um einen genau bekannten Betrag gegenüber der Zählfläche erhöht sind. Wenn das Deckglas auf den Trägerstegen korrekt aufsitzt, sind so genannte Newtonsche Ringe zu sehen. Das bedeutet, die Höhe des Zwischenraums zwischen den Trägerstegen und dem Deckglas liegt in der Größenordnung der Lichtwellenlängen, ist also zu vernachlässigen. In diesem Zustand verrutscht das Deckglas beim Kippen der Zählkammer nicht. Dadurch wird ein Raum mit definierter Höhe geschaffen. Die auszuzählende Teilchensuspension wird bei aufgelegtem Deckglas seitlich aufpipettiert und saugt sich durch Kapillarkräfte in diesen Zwischenraum. Die Teilchensuspension wird so in einer Schicht mit genau bekannter Dicke ausgebreitet. Nach Auszählung der vier Großquadrate (mäanderförmig) unter dem Lichtmikroskop mit Durchlicht und Bestimmung des Mittelwertes lässt sich die Anzahl der Zellen je Volumeneinheit errechnen.

Wichtig beim Zählen ist, dass man auf Grenzlinien liegende Zellen nicht doppelt zählt. Hierzu ist es üblich, bei der Auszählung eines Quadrates nur die Zellen auf zwei Grenzlinien (zum Beispiel oben und links) mitzuzählen und die auf den anderen beiden Linien (unten und rechts) liegenden nicht. Vor der Auszählung ist es ratsam, das gesamte Linienraster mit einer geringen Vergrößerung zu betrachten und zu prüfen, ob die Zellen gleichmäßig über die Quadrate verteilt und vereinzelt sind. Andernfalls sollte die Teilchensuspension nochmal gründlich resuspendiert und neu aufgebracht werden. Eine ungleichmäßige Verteilung erkennt man auch daran, dass sich bei der Auszählung mehrerer Quadrate stark schwankende Zellzahlen pro Quadrat ergeben.

Berechnung der Zellzahl

Von den vier ausgezählten Großquadraten wird folgendermaßen der Mittelwert (MW) und die Gesamtzellzahl bestimmt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{MW} \times 10^4$$

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{MW} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.6.4 Zellbehandlung und Präparation des Gesamtzelllysats

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden die Zellen auf 21 cm² Zellkulturschalen ausgesät, so dass ca. 60% der Fläche mit Zellen bedeckt war. Einen Tag später hatten die Zellen die Schale zu 100% bedeckt. Dann wurde der Mediumüberstand abgesaugt und durch 4 ml frisches Medium ohne FCS ersetzt. Die Zellen wurden über Nacht im Inkubator kultiviert. Zur Behandlung der Zellen wurde

1 ml des Mediumüberstandes in ein steriles Gefäß überführt, mit entsprechender Menge der zu behandelnden Substanz durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und tropfenweise wieder vorsichtig auf den Zellen verteilt. Nach Ablauf der Behandlungszeit wurde das Medium entsorgt und die Zellen in 400 µl 2xProbenpuffer lysiert. Das Lysat wurde fünf Minuten bei 95°C gekocht und anschließend zur Scherung der DNA mit einem Branson Sonifier 250 (Branson Sonifier Power, Danbury, USA) sonifiziert. Nach dem Sonifizieren wurden die Proben nochmals für fünf Minuten aufgekocht, anschließend abzentrifugiert und entweder direkt auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen oder bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.7 Methoden zur Arbeit mit Proteinen

2.7.1 SDS PAGE

Die eindimensionale Elektrophorese erfolgte nach dem denaturierenden und diskontinuierlichen System nach Laemmli (1970), wobei die Proteine nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden. Als reduzierendes Agens wird β -Mercaptoethanol verwendet. Die Proteine wurden in einem grobmaschigen Sammelgel und einem höher vernetzten Trenngel aufgetrennt.

Für die SDS PAGE wurde das „Mini-Protean®3“-System von Bio-Rad, München, verwendet. Vor Gebrauch wurden die Glasplatten mit Isopropanol gereinigt. Dann wurden jeweils eine Front- und eine Rückenplatte in den Plattenhalter gespannt und in den Gießstand eingespannt.

Die Polyacrylamidgele bestanden aus einem 10%igen Trenngel und einem 4%igen Sammelgel. 2,5 ml der Trenngellösung wurden luftblasenfrei zwischen die Platten gegossen und bis zum Auspolymerisieren mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde der Alkohol abgeschüttet und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Das überschüssige Wasser wurde vorsichtig mit einem Whatman-Papier entfernt, ohne das Gel zu berühren. Anschließend wurde die Sammelgellösung vorbereitet, auf das Trenngel geschichtet und ein entsprechender Kamm eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel aus der Gießstation genommen, der Kamm entfernt und die Taschen vorsichtig mit destilliertem Wasser gespült, um nicht-auspolymerisierte Sammelgelreste zu entfernen. Das Gel wurde dann in eine Laufkammer eingesetzt. Die Laufkammer wurde mit Laufpuffer aufgefüllt und die Proben aufgetragen. Die Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine erfolgte mit Hilfe des zusätzlich aufgetragenen Proteinmarkers (Page Ruler von Fermentas, St. Leon-Rot). Bis die Lauffront die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreichte, erfolgte die Elektrophorese bei 100 V, dann wurde die Spannung auf 120 V erhöht, bis die Bromphenolblaubande das Ende des Gels erreichte.

2.7.2 Western Blot

Nach der SDS PAGE wurden die Proteine mit dem Nassblotverfahren (Herrmann und Wiche, 1987) in der Transferapparatur des „Mini-Protean®3“-Systems elektrisch auf Nitrozellulosemembranen (Porengröße 0,45 µm; Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland) transferiert. Dazu wurde das Sammelgel vom Trenngel entfernt.

Zum Transfer wurde die in Blotpuffer befeuchtete Nitrozellulosemembran in der Blotapparatur von Biorad auf das Gel gepresst.

Blotaufbau („Sandwich“):

Anode

Schwamm

3 Lagen 3MM-Whatmanpapier (in Blotpuffer befeuchtet)

Nitrozellulosemembran

Trenngel

3 Lagen 3MM-Whatmanpapier (in Blotpuffer befeuchtet)

Schwamm

Kathode

Die Transferkammer wurde vollständig mit vorgekühltem Blotpuffer gefüllt, ein spezieller Kühlakku diente während der Elektrophorese zur Kühlung. Dann erfolgte die Übertragung der Proteine für eine Stunde bei 100 V.

Nach dem Proteintransfer wurden die unspezifischen Bindungen der Membranen mit 5% (w/v) fettarmem Milchpulver/TBST für mindestens eine halbe Stunde abgesättigt. Die Membran wurde anschließend zweimal 15 Minuten in TBST-Puffer auf einem Schüttelinkubator bei Raumtemperatur gewaschen. Nach dem Waschen erfolgte die Antikörperinkubation, wobei die Membranen mit der Antikörperlösung in Folie eingeschweißt wurden. Die phosphospezifischen Antikörper wurden wie in Tabelle 3 angegeben in 3% BSA/TBST verdünnt und über Nacht bei 4°C unter ständigem Schwenken inkubiert. Die Antikörper gegen nicht-phosphorylierte Proteine wurden in 5% (w/v) fettarmem Milchpulver/TBST entweder für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Antikörperinkubation wurde zweimal 15 Minuten mit TBST, zur Entfernung der unspezifischen Antikörperbindungen, gewaschen. Die Inkubation mit dem in 5% (w/v) fettarmem Milchpulver/TBST verdünnten sekundären Meerrettichperoxidase-konjugierten Antikörper erfolgte für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde wieder zweimal mit TBST gewaschen.

2.7.3 Detektion der Protein-Antikörperkomplexe mit Hilfe von Chemilumineszenz

Zur Detektion der Protein-Antikörperbindung wurde die ECL (enhanced chemiluminescence)-Western Blot-Detektionslösung von Amersham verwendet. Dazu wurden die Lösungen A und B im Verhältnis 1:1 gemischt und tropfenweise auf die feuchte Nitrozellulosemembran mit der Proteinseite nach oben gegeben, so dass die gesamte Membran gleichmäßig bedeckt war. Nach ein- bis zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde überschüssige Flüssigkeit vorsichtig an einem Zellstofftuch abgestreift und die Membran zwischen durchsichtige Folie gelegt, so dass sich zwischen Membran und Folie keine Luftblasen befanden. Bei der Reaktion der an den sekundären Antikörper gekoppelten Peroxidase mit ihrem Substrat wird Chemilumineszenz erzeugt, die einen exponierten ECL-Hyperfilm an entsprechenden Stellen schwärzt. Die Filme wurden mit Hilfe der Entwicklungs- und Fixierlösung von Kodak entwickelt.

2.7.4 Entfernung der Antikörper von der Nitrozellulosemembran

Zur Bestimmung der geladenen Gesamtproteinmenge wurden Antikörper verwendet, die nicht-phosphorylierte Proteine erkennen. Zuvor mussten aber die phosphospezifischen Antikörper von der Membran entfernt werden. Dies gelang durch 30-minütiges Schwenken der Membranen bei 50°C in 1xStripping-Puffer im Wasserbad. Anschließend wurde die Membran zweimal in TBST gewaschen und mit 5%igem Milchpulver/TBST geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper.

2.7.5 Quantifizierung der Western Blot-Ergebnisse

Quantifiziert wurden die Western Blot-Ergebnisse mit Hilfe des Computerprogramms Odyssey 2.0 (Lincoln, USA). Dazu wurden die ECL-Filme eingescannt und mit dem Odyssey-Programm wurde die Intensität der Signale im Vergleich zum vorhandenen Hintergrund bestimmt. Es wurden sowohl die Signale für die phosphorylierten als auch die nicht-phosphorylierten Proteine bestimmt. Zur Auswertung wurde der Quotient aus dem phosphorylierten gegen das nicht-phosphorylierte Protein bestimmt und graphisch aufgetragen. Dazu wurde jeweils der Mittelwert der durchgeführten Experimente (n=3-4) bestimmt und die Standardabweichung berechnet.

2.7.6 Bestimmung des Proteingehaltes mit Hilfe der Coomassie Blau-Färbung

Herstellung der Coomassiefärbelösung:

1g Coomassie Brilliant Blue R250 wurde zunächst über Nacht unter Rühren in 400 ml Methanol gelöst. Anschließend wurde 100 ml Essigsäure hinzugegeben und mit 500 ml destilliertem Wasser aufgefüllt. Danach wurde die Lösung durch einen 595 1/2 Faltenfilter Ø 185 mm der Firma Schleicher&Schuell (Dassel, Deutschland) filtriert.

Zur Bestimmung des Proteingehaltes von Zelllysaten wurden sie mit Hilfe eines SDS-Gels aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel mindestens eine Stunde (oder über Nacht bei Raumtemperatur) in Coomassiefärbelösung geschwenkt. Danach wurden die Gele in Entfärbelösung gelegt, wobei der Entfärber mehrmals gewechselt wurde. Zur Lagerung wurden die Gele in Kunststoffolie mit 7,5% Essigsäure eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt.

2.8 Detektion von DNA-Schäden mit Hilfe des Comet Assays

Der Comet Assay ist ein Routinetestverfahren zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen auf Einzelzellebene (single cell gelelectrophoresis) (Ostling und Johanson, 1984). Neben der alkalischen Variante (pH>13), mit der man wegen der alkalischen DNA-Denaturierung (Trennung der beiden DNA-Einzelstränge) sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche detektieren kann, gibt es noch eine neutrale Variante (pH 7,5) ohne DNA-Denaturierung, deshalb können mit diesem Assay nur Doppelstrangbrüche detektiert werden. Das Prinzip dieses Verfahrens ist die weitere Migration von geschädigter DNA im Vergleich mit ungeschädigter DNA. Die geschädigte DNA ist meist durch die Aktivität von Proteinen der DNA-Reparatur oder durch die Agenzien selbst an mehreren Stellen gespalten und kann deshalb in einem Agarosegel unter elektrophoretischen Bedingungen eine weitere Wegstrecke zurücklegen als ungeschädigte DNA, die während der Elektrophorese den Zellkern nicht verlässt. Angefärbt mit Ethidiumbromid und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, sehen Zellen mit geschädigter DNA aus wie Kometen, da die geschädigten DNA-Fragmente im elektrischen Feld in Richtung Anode wandern. Ungeschädigte DNA hingegen wandert nicht im elektrischen Feld. Man unterscheidet deshalb zwischen einer Kopfregion (entspricht der nicht-gewanderten DNA im Zellkern) und dem so genannten Schweif, der aus kleinen DNA-Fragmenten besteht. Der Comet Assay erlaubt nicht nur die Detektion des DNA-Schadens, sondern gibt auch Informationen über die Natur des Schadens (Einzel- oder Doppelstrangbruch).

Vorbereitung für den Comet Assay

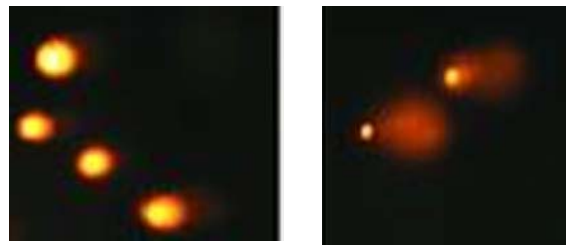
Objektträger werden mit einer 1,5%igen Agaroselösung (in PBS) beschichtet und mindestens über Nacht liegend getrocknet.

Durchführung

Die behandelten Zellen werden abtrypsinisiert und bei 1500 rpm für fünf Minuten in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in entsprechender Menge Medium aufgenommen, so dass sich ca. eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml ergibt. 10 μ l dieser Zellsuspension werden mit 120 μ l low melting point Agarose (LMP Agarose) gemischt, auf die agarosebeschichteten Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas bedeckt. Nachdem die Agarose-Zell-Mischung im Kühlschrank (bei 4°C) fest geworden ist, müssen die Zellen zur Auflösung der Zell- und Kernmembran eine Stunde bei 4°C lysiert werden, so dass ihre DNA frei vorliegt. Die Lyse wurde entweder in alkalischem (pH>13) oder neutralem (pH 7,5) Puffer in Plastikküvetten durchgeführt, indem die mit Zellen beschichteten Objektträger in entsprechenden Halterungen platziert wurden. Nach der Lyse werden die Zellen einer Elektrophorese unterzogen. Dazu werden die Objektträger mit der Agaroseseite nach oben in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 V und 300 mA (alkalischer Comet Assay) bzw. bei 25 Volt und ca. 30 mA (neutraler Comet Assay) in einer Kühlkammer bei 4°C. Die niedrige Temperatur sollte Enzyme der DNA-Reparatur inhibieren. Nach 15-minütiger Elektrophorese wurden die Objektträger aus der Kammer genommen, einmal in destilliertem Wasser gewaschen und fünf Minuten in Ethanol inkubiert (neutraler Comet Assay). Für den alkalischen Comet Assay wurden die Objektträger nach der Elektrophorese in Neutralisierungspuffer neutralisiert und dann, wie für den neutralen Comet Assay beschrieben, weiterbehandelt. Nach der Ethanolinkubation wurden die Objektträger schräg stehend über Nacht getrocknet.

Auswertung

Die über Nacht getrockneten Objektträger wurden mit 50 μ l einer Ethidiumbromidlösung (20 μ g/ml) kurz vor der Auswertung unter dem Abzug gefärbt. Unter einem Fluoreszenzmikroskop mit UV-Anregung betrachtet, ähnelt die DNA einer durch Gentoxine geschädigten Zelle einem Kometen, wobei die Bruchstücke den „Kometenschweif“ bilden (Abb. 8). Die Länge dieses „Schweifs“ bzw. der prozentuale Anteil der DNA im Schweif ist ein Maß für die Schädigung der DNA. Die Objektträger wurden dann nacheinander unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, 100 Zellen pro Objektträger mit einer Digitalkamera fotografiert und das Ausmaß der DNA-Schäden mit Hilfe des Computerprogramms VisComet 1.6.2 (Impuls Bildanalyse GmbH, Gilching, Deutschland) bestimmt.



unbehandelte humane
Lymphozyten

behandelte humane
Lymphozyten

Abb. 8: Beispielbilder für den Comet Assay.

In unbehandelten Zellen mit intakter DNA wandert die DNA nicht im elektrischen Feld (links). Geschädigte DNA hingegen wandert im elektrischen Feld. Mit Ethidiumbromid angefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, sieht man so genannte Kometen (rechts).

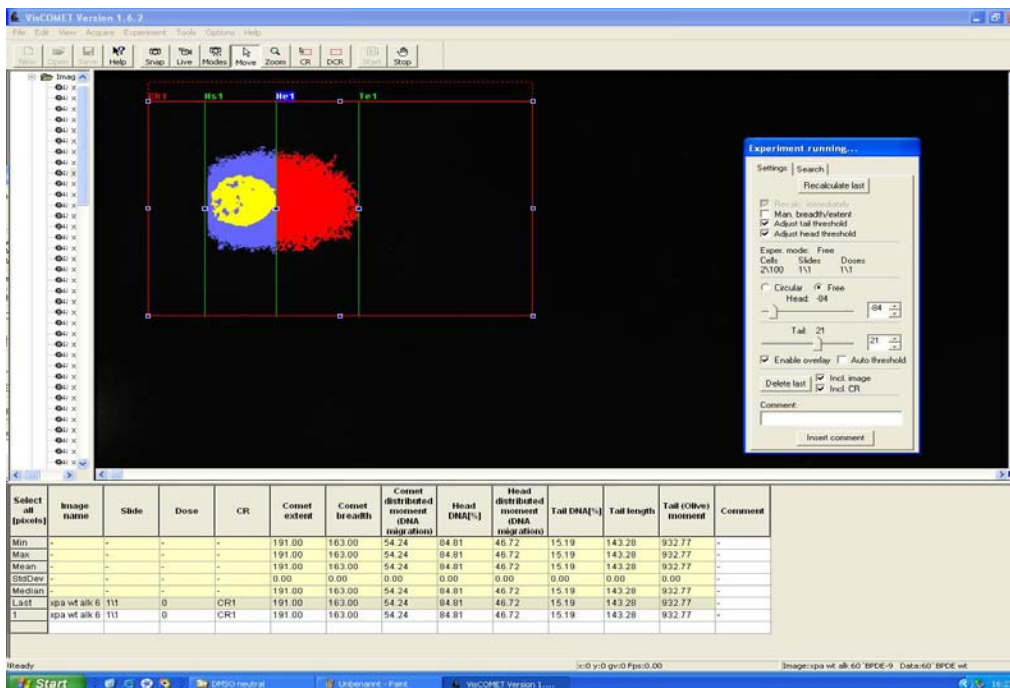


Abb. 9: Beispiel zur Auswertung des Comet Assays mit Hilfe des Computerprogramms „Viscomet 1.6.2“.

Abb. 9 zeigt die Auswertung des Comet Assays mit der Computersoftware Viscomet 1.6.2. Im oberen Teil der Abbildung ist exemplarisch eine Zelle gezeigt. Zur Messung der DNA-Schädigung werden drei unterschiedliche Bereiche der Zelle unterschieden: Gelb dargestellt ist die noch im Kern verbliebene, während der Elektrophorese nicht gewanderte, DNA; blau dargestellt sind die Bereiche der Zelle mit schwacher Fluoreszenz, welche aus diesem Grund nicht in die Berechnung der DNA-Schädigung eingehen; der Schweif des Kometen mit der im elektrischen Feld gewanderten DNA ist rot unterlegt.

Der untere Teil der Abbildung zeigt eine tabellarische Übersicht der detektierten Kometen mit den jeweiligen Messparametern (z.B. Anteil der DNA im Kopf bzw. Schweif). Angezeigt werden alle gemessenen Zellen mit Angabe u.a. der Minimal (Min)- bzw- Maximal (Max)-Werte. Im oberen rechten Teil sind die Messeinstellungen angezeigt.

2.9 5'-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) Assay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Proliferierende Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie während der S-Phase des Zellzyklus kontinuierlich neue DNA synthetisieren. Dabei lässt der direkte Zusammenhang zwischen DNA-Neusynthese und Zellverdopplung die Messung von neusynthetisierter DNA als Messparameter für die Zellproliferation zu und erlaubt dabei auch Rückschlüsse auf den Zellzyklus. Zur Synthese der neuen DNA benötigt die Zelle verschiedene Einzelbausteine wie zum Beispiel Nukleotide. Der BrdU Assay beruht auf dem Einbau des Pyrimidinanalogons 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), das in proliferierenden Zellen an Stelle von Thymidin in die neusynthetisierte DNA eingebaut wird. Die Messung des BrdU-Einbaus dient dem Nachweis und der Quantifizierung des Zellwachstums bzw. der Detektion von Substanzen, die den Zellzyklus beeinflussen.

Das eingebaute BrdU wird nach Fixieren der Zelle und Denaturieren der DNA von spezifischen monoklonalen Antikörpern erkannt, die kovalent mit einer Peroxidase (POD) gekoppelt sind. Diese Kopplung ermöglicht die quantitative Messung des eingebauten BrdU durch Umsetzung des POD-Substrates, Tetramethylbenzidin (TMB). Die Extinktion des entstandenen Produktes kann im ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“-)Reader bei 450 nm photometrisch bestimmt werden.

Versuchsablauf:

- 1000xBrdU-Lösung 1:100 in sterilem Medium verdünnen.
- Mediumüberstand von den Zellen absaugen.
- 100 µl BrdU-Lösung/well hinzufügen, 2 h Inkubation bei 37°C im Inkubator.
- Nach 2h Medium absaugen.
- 200 µl Fixierungs-Denaturierungslösung/well zugeben.
- 30 Min bei Raumtemperatur inkubieren.
- Vorbereitung der Antikörperlösung: 100x Anti-BrdU-POD-Lösung 1:100 in Antikörper-Verdünnungslösung verdünnen, Fix-Denat-Lösung absaugen und 100 µl/well zugeben.
- 90 Min bei Raumtemperatur inkubieren.
- 10x Waschpuffer 1:10 in sterilem Wasser verdünnen. Es wird drei Mal mit je 100 µl 1x Wasch-Lösung/well gewaschen.
- Überstand absaugen.
- Pro well werden 100 µl Substrat/well hinzugefügt. Nach 5, 10, 15, 20, 25 und 30 Minuten Inkubationszeit (im Dunkeln) wird die Absorption am ELISA-Reader bei 450 nm gemessen.

2.10 Bestimmung der Zytotoxizität mit Hilfe des CellTiter-Blue® Zellvitalitäts Assays

Zur Messung der zytotoxischen Wirkung von BPDE wurden die Mausfibroblasten proliferierend (in verschiedenen Zellzahlen/well) in 96-well Platten ausgesät. Einen Tag später wurden die Zellen mit 2 μM BPDE behandelt und jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden die Zellzahl bzw. Vitalität der Zellen mit Hilfe des CellTiter-Blue® Cell Viability Assays (Promega, Mannheim, Deutschland) von promega bestimmt. Dieser Assay beruht auf der metabolischen Umsetzung von Resazurin zu Resorufin in lebenden Zellen (Abb. 10). Nicht lebensfähige Zellen verlieren ihre metabolische Aktivität und können Resazurin nicht mehr umsetzen. Resazurin ist dunkelblau und besitzt nur geringe Fluoreszenz nach Anregung bei 540 nm. Resorufin hingegen ist pink und besitzt nach Anregung bei 540 nm hohe Fluoreszenzaktivität (Emission bei 590 nm). Diese Fluoreszenz kann mit Hilfe eines Fluoreszenzmessgerätes detektiert werden. Pro 100 μl Kulturmedium werden 20 μl des Substrates zu den Zellen gegeben und vier Stunden bei 37°C in einem CO₂-Inkubator inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz der Proben gemessen.

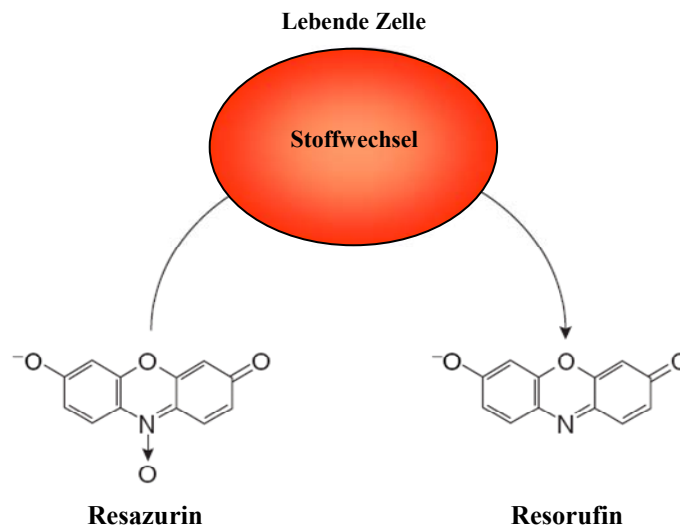


Abb. 10: Umsetzung von Resazurin zu Resorufin in metabolisch aktiven Zellen.

3 ERGEBNISSE

3.1 BPDE-induzierte Aktivierung der SAPK p38 und JNK

Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE) ist der reaktive Metabolit des polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffes (PAK) Benzo[a]pyren (BaP). Wie in der Einleitung beschrieben, wirkt BPDE genotoxisch, indem es kovalent an die DNA binden kann und auf diese Weise so genannte sperrige DNA-Addukte („bulky adducts“) bildet (Geacintov *et al.*, 2002). Allgemein aktivieren einige genotoxische Agenzien, wie zum Beispiel UV-Strahlung, intrazelluläre Signalkaskaden, welche zur Induktion der SAPK p38 und JNK führen (Chen *et al.*, 1996; Pillaire *et al.*, 2000). Dabei ist die Aktivierung dieser Kinasen wichtig für die Koordination der zellulären Antwort, die SAPK sind sozusagen zelluläre Sensoren für genotoxische Stimuli. Die zelluläre Antwort auf die Behandlung mit genotoxischen Agenzien beinhaltet die Entscheidung zwischen Überleben und Tod der behandelten Zelle (Harper und LoGrasso, 2001; Weston und Davis, 2007).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte untersucht werden, welche intrazellulären Signalkaskaden BPDE, als Modellsubstanz für genotoxische Agenzien, induziert. Welche zellulären Moleküle sind an dieser Signalkaskade beteiligt und welche Konsequenzen besitzt die BPDE-Behandlung für die Zelle?

Die zellulären Effekte von BPDE wurden in immortalisierten Mausfibroblasten (NIH3T3) untersucht. Von diesem Zelltyp wurden viele Knockout-Linien generiert, welche defizient für verschiedene Signalmoleküle sind. Die Untersuchung von Knockout- und korrespondierenden Wildtypzellen erlaubt sowohl die Untersuchung der Mechanismen der Signalinduktion als auch die Konsequenzen der Genotoxin-Exposition.

3.1.1 Rolle von Replikation und Transkription bei der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung

Als Antwort auf verschiedene Arten von DNA-schädigenden Agenzien können eukaryotische Zellen ein komplexes Netzwerk an Signaltransduktionskaskaden aktivieren. So können durch genotoxische Agenzien (zum Beispiel UV-Strahlung, Chemotherapeutika) verursachte DNA-Schäden die Zelle in der Replikation stören. Als Folge dieses Replikationsblockes werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die es der Zelle erlauben, adäquat auf den Schaden zu reagieren, zum Beispiel mit Apoptose-Induktion oder Reparatur der vorliegenden Läsion. Die Blockierung des Zellzyklus dient dazu, der Zelle Zeit zu geben, die entstandenen DNA-Schäden zu reparieren (Zhou und Elledge, 2000; Kastan und Bartek, 2004). Diese zelluläre Reaktion wird durch verschiedene DNA-schädigende Agenzien ausgelöst, zum Beispiel durch ionisierende Strahlung (γ -Strahlung), die zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen führt. DNA-Schäden induzieren eine Signalkaskade, an deren Beginn die Aktivierung von ATM („Ataxia Telangiectasia mutated kinase“) und ATR („ATM and Rad3 related“) steht und die für die

zelluläre Reaktion auf die DNA-Schäden entscheidende Bedeutung besitzt. ATM wird hauptsächlich durch Doppelstrangbrüche (DSB) und ATR neben DSB durch UV-induzierte DNA-Schäden und Replikationsarrest aktiviert (Shiloh, 2001). ATM und ATR sind Proteinkinasen und besitzen eine PI3K-ähnliche Aminosäure-Sequenz in ihrer carboxyterminalen Domäne (Rotman und Shiloh, 1999). Durch UV- oder ionisierende Strahlung werden ATM und/oder ATR aktiviert und in Folge dessen kommt es zur Aktivierung des G₂/M-Kontrollpunktes durch Phosphorylierung der Proteinkinasen Chk1 (durch ATR) und Chk2 (durch ATM). Chk1 und Chk2 inaktivieren die Phosphatase Cdc25C durch Phosphorylierung. Cdc25C reguliert den Übergang von der G₂-Phase in die Mitose-Phase durch Dephosphorylierung (Aktivierung) der Cyclin-abhängigen Kinase Cdc2. Die ausbleibende Dephosphorylierung von Cdc2 bei vorliegenden DNA-Schäden blockiert die Progression von G₂ in die Mitose-Phase und hemmt so die Progression des Zellzyklus (Übersicht in Shiloh, 2001).

Zur Untersuchung, ob die SAPK-Aktivierung abhängig von einem BPDE-induzierten Replikationsblock ist, wurden logarithmisch wachsende Zellen (50% konfluent, mit Serum) oder konfluente (100% konfluent), über Nacht serumgehungerte Mausfibroblasten für verschiedene Zeitpunkte mit BPDE behandelt. Zur Überprüfung der Proliferationsrate der konfluenten und proliferierenden Zellen wurde der BrdU Assay durchgeführt.

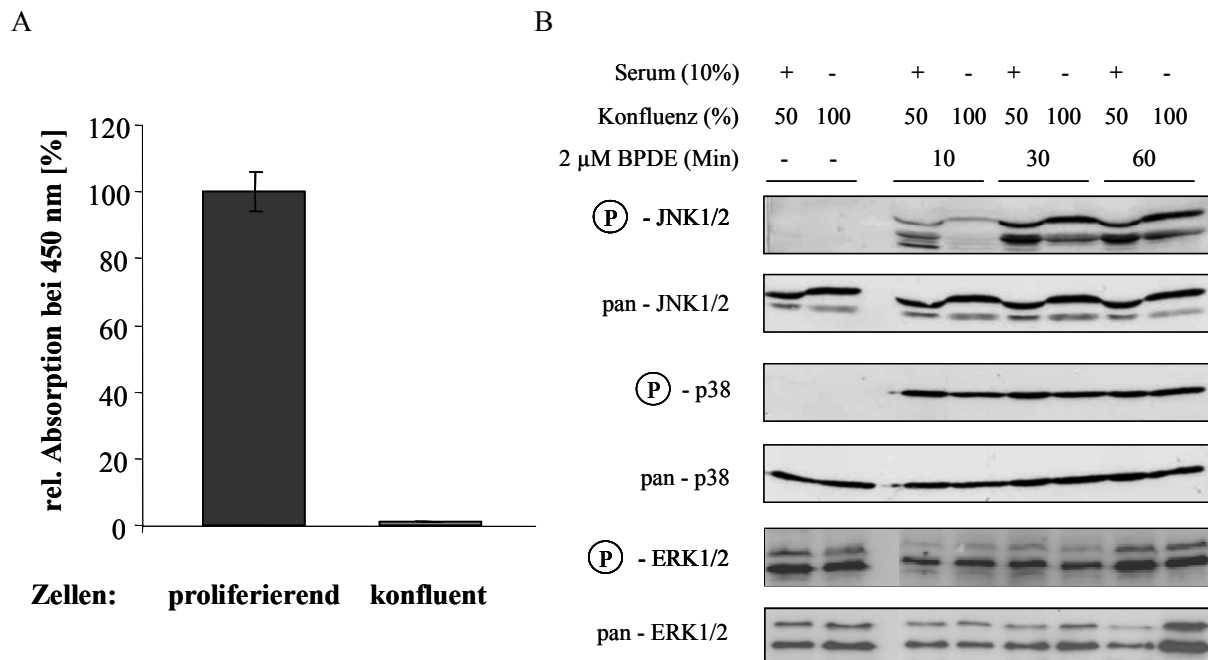


Abb. 11: BPDE-induzierte JNK- und p38-Phosphorylierung ist unabhängig von der Zellproliferation.

A Logarithmisch wachsenden und konfluenten, über Nacht serumgehungerten Mausfibroblasten (NIH3T3) wurde für drei Stunden BrdU zur Verfügung gestellt. Anschließend wurden die Zellen fixiert, d.h. permeabilisiert und die DNA denaturiert. Nach Zugabe eines Peroxidase-gekoppelten monoklonalen Antikörpers, der gegen BrdU gerichtet ist, wurde das Substrat Tetramethylbenzidin hinzugegeben und die Absorption des entstandenen Produktes konnte am ELISA-Reader bei 450 nm bestimmt werden; **B** Konfluente und serumgehungerte oder logarithmisch wachsende NIH3T3-Wildtypmausfibroblasten wurden für verschiedene Zeiten mit 2 µM BPDE (Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid) oder dem Lösungsmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) behandelt. Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung der JNK und p38 bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Proteine.

Eine Möglichkeit, die Proliferation von Zellen zu messen, ist die Untersuchung der DNA-Neusynthese. Der Einbau von speziell markierten DNA-Basen, in diesem Fall das Pyrimidinanalogon 5'-Bromo-2'-deoxyuridin, die mit spezifischen monoklonalen Antikörpern detektiert werden können, erlaubt Rückschlüsse auf die Zellproliferation.

Zum Vergleich des BrdU-Einbaus in neu-synthetisierte DNA wurde der gemessene Wert der proliferierenden Zellen auf 100% gesetzt und der BrdU-Einbau in konfluenten Zellen entsprechend bestimmt. In Abb. 11 links ist der relative BrdU-Einbau von proliferierenden und konfluenten Zellen gezeigt. Die konfluenten, serumdepletierten Mausfibroblasten bauen, im Gegensatz zu proliferierenden murinen Fibroblasten, kein BrdU ein. 100%ige Konfluenz und zusätzlicher Serumentzug induzieren demnach einen Proliferationsblock der Zellen.

Zur Untersuchung, ob die SAPK-Aktivierung abhängig von einem BPDE-induzierten Proliferationsblock ist, wurden sowohl proliferierende als auch konfluente, serumgehungerte Mausfibroblasten für verschiedene Zeiträume (10-60 Minuten) mit 2 μ M BPDE bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt und die Phosphorylierung der SAPK im Western Blot mit Hilfe phospho-spezifischer Antikörper detektiert (Abb. 11 rechts). Bereits nach 10 Minuten induziert BPDE eine schwache Phosphorylierung der JNK, die bis 30 Minuten weiter ansteigt und bis 60 Minuten persistiert. Die SAPK p38 wird durch BPDE-Behandlung wesentlich schneller phosphoryliert (nach 10 Minuten) als die JNK. Bereits nach 10 Minuten ist das Phosphorylierungsmaximum der p38-Kinase erreicht und persistiert über den gesamten untersuchten Zeitraum (bis 60 Minuten). Im Gegensatz zu den SAPK p38 und JNK konnte für die MAPK ERK, verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO, zu allen untersuchten Zeiten keine signifikante Phosphorylierung detektiert werden. Wie in Abb. 11 rechts zu sehen, ist die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung in proliferierenden und konfluenten, serumgehungerten Zellen vergleichbar. Lediglich nach 10-minütiger BPDE-Behandlung ist die JNK-Aktivierung in konfluenten Zellen geringfügig schwächer als in proliferierenden Zellen. Das heißt, die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung ist unabhängig von der Zellproliferation bzw. Replikation. Das Signal zur SAPK-Aktivierung benötigt somit keinen Proliferationsblock.

Eine weitere wichtige Frage ist, ob die BPDE-induzierte Aktivierung von p38 und JNK abhängig von Transkription ist, d.h. ob BPDE-Behandlung die Transkription von zwischengeschalteten Proteinen induziert, welche die SAPK aktivieren. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde die JNK- und p38-Phosphorylierung durch BPDE in Anwesenheit des Transkriptionshemmstoffes Actinomycin D untersucht (Abb. 12).

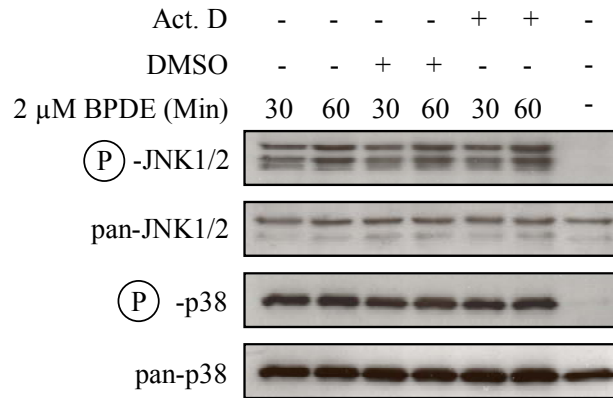


Abb. 12: Die BPDE-induzierte p38- und JNK-Aktivierung ist unabhängig von *de novo*-Transkription. Konfluent gewachsene NIH3T3-Wildtypmausfibroblasten wurden über Nacht serumgehungert und anschließend entweder direkt für 30 oder 60 Minuten mit 2 μ M BPDE bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Parallel erfolgte eine 15-minütige Vorbehandlung mit dem Transkriptionsinhibitor Actinomycin D (5 μ g/ml) und eine anschließende Behandlung der Zellen für 30 und 60 Minuten mit 2 μ M BPDE bzw. dem Lösungsmittel DMSO. Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung der JNK und p38 bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Proteine. Act. D: Actinomycin D.

Vorbehandlung mit Actinomycin D verhindert die p38- und JNK-Aktivierung durch BPDE nicht (Abb. 12). Die BPDE-induzierte Aktivierung von JNK und p38 ist demnach unabhängig von BPDE-induzierter transkriptioneller Induktion zwischengeschalteter Faktoren.

Bisher konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass BPDE-Behandlung von Mausfibroblasten zur Aktivierung der SAPK JNK und p38 führt. Diese BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung ist unabhängig von der Proliferation und der BPDE-induzierten Transkription zwischengeschalteter Faktoren.

3.1.2 BPDE, jedoch nicht die Muttersubstanz B[a]P, aktiviert die SAPK

Zur Untersuchung der BPDE-induzierten Signalkaskaden wurden NIH3T3-Mausfibroblasten für verschiedene Zeiten mit 2 μ M BPDE behandelt (siehe Abb. 13). Die Detektion der Aktivierung von JNK, p38 und ERK erfolgte mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper, welche die dual-phosphorylierten und somit aktivierten Kinasen im Western Blot detektieren. Wie in Abb. 13 gezeigt, induziert BPDE zu allen untersuchten Zeiten (10-120 Minuten) eine deutliche JNK-Phosphorylierung. Wie in Abb. 11 bereits geschildert, wird die SAPK p38 durch BPDE-Behandlung deutlich schneller aktiviert als die JNK und persistiert über den maximal untersuchten Behandlungszeitraum von 120 Minuten. Im Gegensatz zu den SAPK p38 und JNK konnte für die MAPK ERK, verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO, keine signifikante frühe Phosphorylierung (bis 60 Minuten) durch BPDE detektiert werden. Lediglich nach 120 Minuten konnte eine BPDE-induzierte Aktivierung von ERK, verglichen mit der DMSO-Kontrolle, nachgewiesen werden. Verglichen mit der ERK-Phosphorylierung durch den

epidermalen Wachstumsfaktor EGF hingegen ist die BPDE-induzierte ERK-Phosphorylierung nach 120 Minuten allerdings sehr schwach.

Wie in der Einleitung dargelegt (Kapitel 1.1.3), ist BPDE der reaktive Metabolit von B[a]P, einem Vertreter der PAK. B[a]P ist sozusagen der „Mutterkohlenwasserstoff“ von BPDE und chemisch nicht reaktiv. Zur Untersuchung, ob die SAPK-Aktivierung durch BPDE von dessen chemischer Reaktivität abhängig ist, wurde die SAPK-Phosphorylierung durch B[a]P untersucht. Im Gegensatz zu BPDE bewirkt die Behandlung mit B[a]P keine Phosphorylierung der SAPK p38 und JNK (Abb. 13).

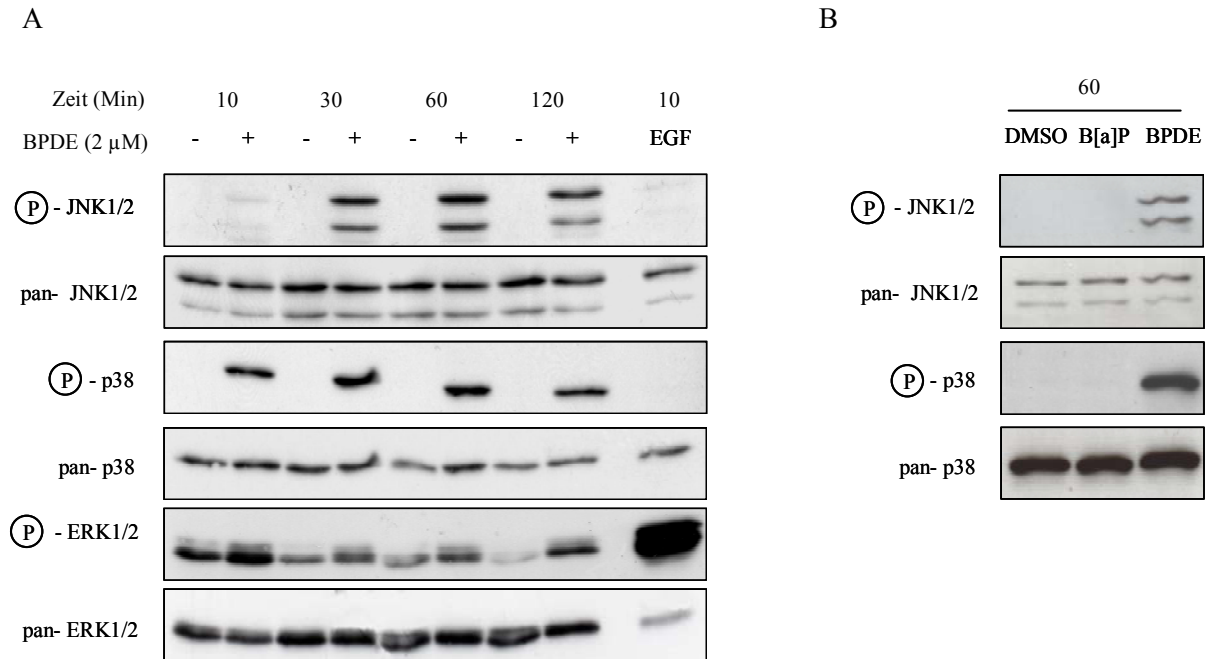


Abb. 13: BPDE, jedoch nicht die Muttersubstanz B[a]P, bewirkt eine schnelle Phosphorylierung der SAPK p38 und JNK.

Konfluente und serumgehungerte NIH3T3 wurden für die gezeigten Zeitwerte mit 2 μM BPDE [+], DMSO [-] bzw. 2 μM Benzo[a]pyren (B[a]P) behandelt und die Phosphorylierung der MAPK JNK, p38 und ERK mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper bestimmt. Als Ladekontrolle wurde die gesamte Kinasemenge mit Hilfe von nicht-phosphospezifischen Antikörpern bestimmt. **A** Zeitabhängige BPDE-induzierte Phosphorylierung von JNK, p38 und ERK; **B** Phosphorylierung von JNK und p38 nach Behandlung mit DMSO, Benzo[a]pyren (B[a]P) und BPDE (60 Minuten).

Die SAPK-Aktivierung durch BPDE ist demnach abhängig von der reaktiven Epoxid-Gruppe dieses PAK. Besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der BPDE-induzierten Phosphorylierung der JNK und der p38-Phosphorylierung, d.h ist die BPDE-induzierte p38-Phosphorylierung abhängig von JNK und umgekehrt?

3.1.3 Die Aktivierung der SAPK p38 und JNK durch BPDE erfolgt unabhängig voneinander

Wie in der Einleitung beschrieben, aktivieren verschiedene zelluläre Stressoren, zum Beispiel UVC, die Aktivierung der SAPK. Auch BPDE führt, wie oben gezeigt, zu einer Aktivierung dieser Kinasen. Zur Untersuchung, ob die Aktivierung der JNK durch BPDE abhängig von der BPDE-induzierten Aktivierung der p38-Kinase ist und umgekehrt, wurden sowohl p38-defiziente als auch JNK-defiziente Mausfibroblasten sowie korrespondierende Wildtypzellen mit BPDE behandelt und jeweils die p38- bzw. JNK-Phosphorylierung im Western Blot untersucht.

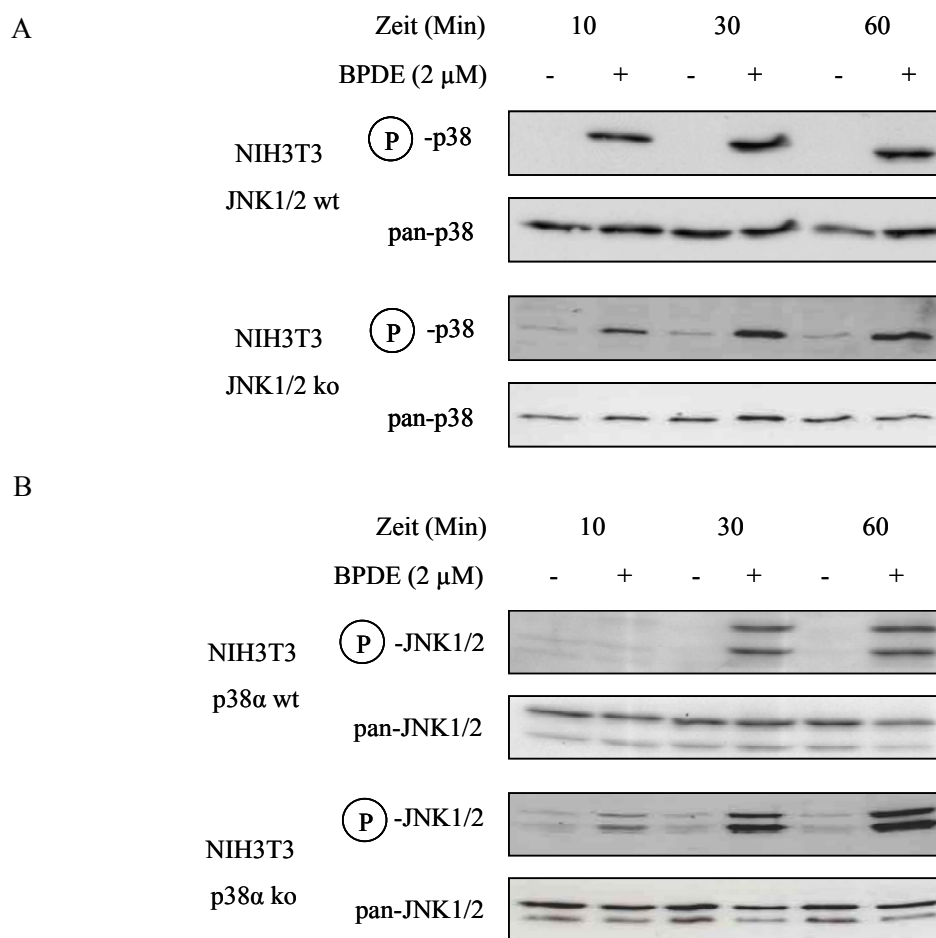


Abb. 14: BPDE induziert die Phosphorylierung von JNK und p38 unabhängig voneinander.

Konfluent gewachsene NIH3T3-Mausfibroblasten (**A** JNK1/2 wt (oben) und JNK1/2 ko (unten); **B** p38 α wt (oben) und p38 α ko (unten)) wurden über Nacht serumgehungert und anschließend für 10, 30 und 60 Minuten mit 2 μ M BPDE oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung von JNK bzw. p38 bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Proteine.

BPDE induziert sowohl in JNK-Knockout- als auch in den dazugehörigen Wildtypfibroblasten eine schnelle und andauernde Aktivierung der p38-Kinase. In p38 α -Knockout-Zellen und korrespondierenden Wildtypzellen (NIH3T3) induziert BPDE ebenso eine schnelle Aktivierung der JNK, die bis zum

maximal untersuchten Zeitraum persistiert. Die BPDE-induzierte Aktivierung der JNK ist demnach nicht abhängig von p38 und umgekehrt.

3.1.4 Durch welche Signaltransduktionsmechanismen aktiviert BPDE die SAPK?

3.1.4.1 Rolle von PI3K und Akt bei der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung

Wie in Abb. 13 gezeigt, aktiviert BPDE innerhalb von Minuten nach Exposition die SAPK JNK und p38. Durch welchen Mechanismus werden die genannten Kinasen (BPDE-abhängig) aktiviert? Bislang gibt es nur zwei publizierte Arbeiten, die sich mit Epoxid-induzierten Signaltransduktionskaskaden befassen. Als PAK-Epoxide wurden 5-Methylchrysen-1,2-diol-3,4-epoxid (MCDE) bzw. BPDE verwendet. Li *et al.* untersuchten die MCDE- bzw. BPDE-induzierten Signalwege in epidermalen Mauszellen (Cl41) und zeigten, dass in diesen Zellen MCDE bzw. BPDE PI3-Kinase-abhängig den Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren kann (Li *et al.*, 2004a; Li *et al.*, 2004b). Die PI3-Kinase ist ein Heterodimer, das aus einer regulatorischen Untereinheit (p85) und einer katalytischen Untereinheit (p110) aufgebaut ist (siehe Abb. 7). Die PI3-Kinase wird durch die Bindung der p85-Untereinheit an Tyrosin-phosphorylierte membranständige Rezeptoren aktiviert. Diese Interaktion führt zur Phosphorylierung von p85 und induziert eine Konformationsänderung des Enzyms, so dass die katalytische Untereinheit aktiviert wird. Über die PI3K-abhängige Aktivierung des „second messenger“ Phosphatidylinositol (PI)-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) kommt es zur Aktivierung der PDK („PI-dependent kinase“, PI-abhängige Kinase). Aktivierte PDK transloziert zur Plasmamembran, wo sie die Kinase Akt an Tyrosin³⁰⁸ und Serin⁴⁷³ phosphorylieren und somit aktivieren kann (Wymann und Pirola, 1998).

Li *et al.* konnten zeigen, dass durch Behandlung der Cl41-Zellen mit chemischen Inhibitoren der PI3-Kinase (Wortmannin und LY294002) die endogene PI3K-Aktivität blockiert wird. Auf diese Weise konnte sowohl die BPDE-induzierte JNK- als auch die AP-1-Aktivierung zeit- und dosisabhängig gehemmt werden. Die Expression einer inaktiven katalytischen p85-Untereinheit der PI3-Kinase konnte gleichermaßen die AP-1- und die JNK-Aktivierung hemmen. Die inaktive p85-Untereinheit blockiert dabei die Interaktion von endogener p85 mit der katalytischen p110-Untereinheit und hemmt somit die Aktivität der PI3K. Auch die Überexpression einer inaktiven Akt-Mutante, bei der sowohl das Tyrosin³⁰⁸ als auch das Serin⁴⁷³ durch Alanin ersetzt wurde und die deshalb nicht mehr durch PDK aktivierbar ist, beeinträchtigte die BPDE-induzierte JNK-Aktivierung in diesen Zellen. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde der Schluss gezogen, dass in epidermalen Mauszellen BPDE eine Signalkaskade induziert, die über PI3- und Akt-Kinase zur Aktivierung von JNK und AP-1 führt (Li *et al.*, 2004a). Ähnliche Ergebnisse lieferte die Untersuchung MCDE-induzierter Signalkaskaden in Cl41-Zellen. Versuche mit inaktiver p85-Untereinheit bzw. Aktivierungs-defizienter Akt-Kinase zeigten, dass MCDE eine Signalkaskade induziert, welche über PI3K zur JNK-, ERK- und AP1-Aktivierung führt (Li *et al.*, 2004b).

Zur Überprüfung, ob die PI3-Kinase bzw. Akt in die BPDE-induzierte Aktivierung von JNK und p38 in immortalisierten Mausfibroblasten (NIH3T3) involviert ist, wurden Wildtypmausfibroblasten für verschiedene Zeitpunkte (10-120 Minuten) mit 2 μ M BPDE behandelt und die Phosphorylierung der Kinasen Akt, JNK und p38 im Western Blot detektiert. Führt die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung über Akt, d.h. wäre Akt in der Signaltransduktionskaskade oberhalb der SAPK, erwartet man eine zeitliche Korrelation der Aktivierungs-Kinetiken. Die Akt-Kinase würde demnach zeitlich etwas früher aktiviert werden als p38 und JNK.

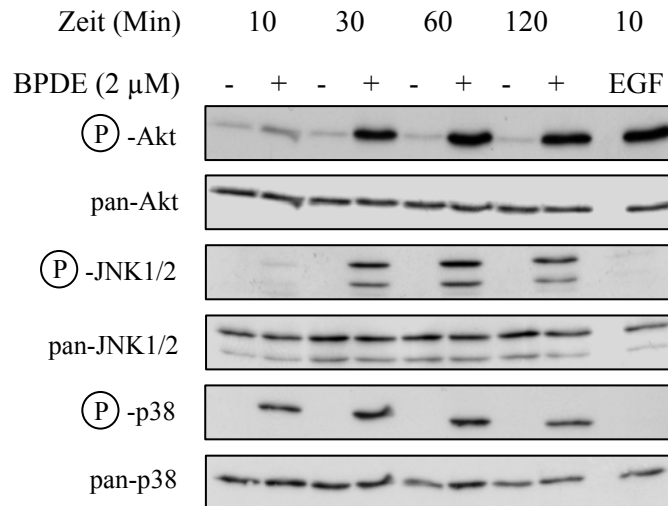


Abb. 15: BPDE induziert in konfluenten Mausfibroblasten ähnliche Aktivierungskinetiken für Akt, JNK und p38.

Konfluent gewachsene NIH3T3-Wildtypmausfibroblasten wurden über Nacht serumgehungert und anschließend für verschiedene Zeiten mit 2 μ M BPDE oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung der Akt, JNK und p38 bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Proteine.

Wie in Abb. 15 gezeigt, führt BPDE-Behandlung innerhalb von 10 Minuten zu einer schwachen Zunahme der Akt-Phosphorylierung. Nach 30 Minuten ist die Akt-Kinase maximal phosphoryliert und dieser Phosphorylierungsstatus persistiert bis zu dem längsten untersuchten Zeitraum von 120 Minuten.

Vergleicht man die Aktivierung der JNK durch BPDE mit der gezeigten Akt-Kinetik, so verlaufen beide Kinetiken ähnlich. Beide Kinasen werden nach 10-minütiger BPDE-Behandlung schwach aktiviert und diese Aktivierung persistiert über den untersuchten Zeitraum. Die Kinetik der p38-Aktivierung allerdings zeigt eine etwas abweichende Kinetik verglichen mit der Akt-Kinase. Bereits nach 10-minütiger BPDE-Behandlung ist die p38-Kinase stark aktiviert, das Aktivierungsmaximum ist nach 30 Minuten erreicht und persistiert bis zu 120 Minuten. Korreliert die Aktivierung der Akt-Kinase nur in der einen untersuchten Zelllinie mit der SAPK-Aktivierung oder lässt sich die Korrelation zwischen der Akt- und SAPK-Aktivierung auch in anderen Zelllinien beobachten? Um dieser Frage nachzugehen, wurden verschiedene Knockoutzellen (p38 α - bzw. JNK1/2-defizient) und die korrespondierenden

Wildtypzellen für verschiedene Zeitpunkte mit BPDE behandelt und die Phosphorylierung von Akt, JNK und p38 im Western Blot detektiert.

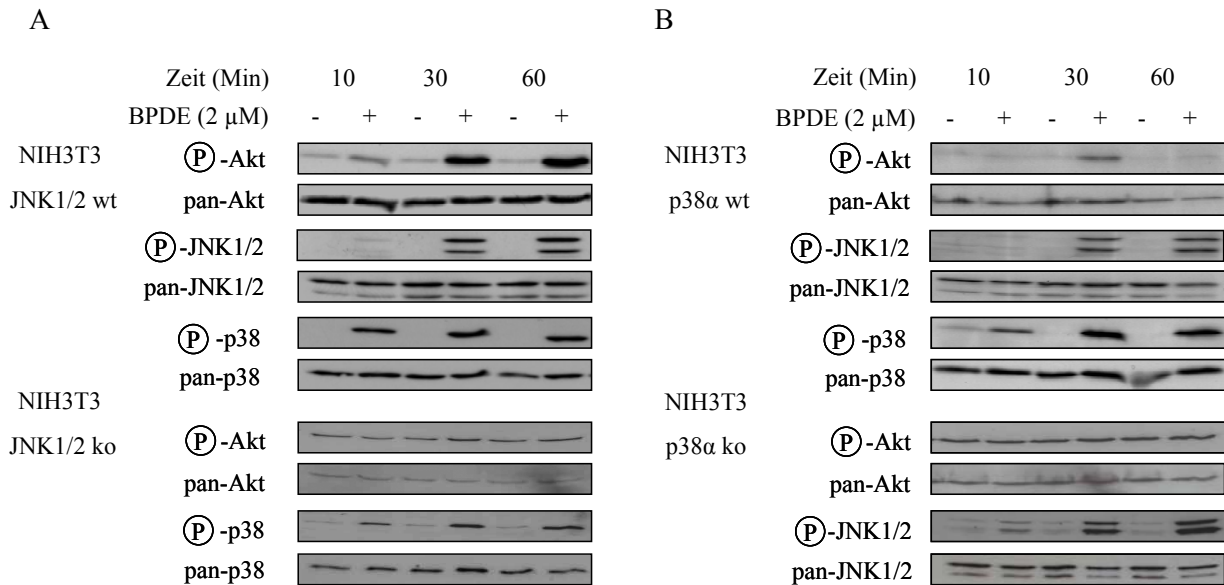


Abb. 16: Die BPDE-induzierte p38- und JNK-Aktivierung korreliert in verschiedenen Mausfibroblastenzelllinien nicht mit der Akt-Aktivierung.

Konfluent gewachsene NIH3T3-Mausfibroblasten (A: JNK1/2 wt (oben) und JNK1/2 ko (unten); B: p38α wt (oben) und p38α ko (unten)) wurden über Nacht serumgehungert und anschließend für verschiedene Zeiten mit 2 μM BPDE oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die Gesamtzell-extrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung der Akt, JNK und p38 bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Proteine.

Wie in Abb. 16 gezeigt, konnte die Akt-Kinase nur in einer Zelllinie (JNK1/2 wt, welche auch für die in Abb. 15 gezeigten Versuche verwendet wurde) signifikant und persistierend durch BPDE aktiviert werden. In p38α-wt-Zellen wurde die Akt-Kinase durch BPDE nur schwach und transient aktiviert und in p38α- bzw. JNK1/2-Knockout-Zellen konnte die Akt-Kinase nicht aktiviert werden. Im Gegensatz zur Akt-Kinase induzierte BPDE in allen untersuchten Mausfibroblasten-Zelllinien eine signifikante und persistierende Aktivierung der SAPK JNK und p38. Zusammenfassend korreliert die BPDE-abhängige Akt-Phosphorylierung in drei von vier Mausfibroblasten-Zelllinien nicht mit der JNK- und p38-Aktivierung. In den untersuchten Mausfibroblasten-Zelllinien ist die Aktivierung von Akt demnach nicht Voraussetzung für die SAPK-Aktivierung bzw. die Akt-Kinase ist in der BPDE-induzierten Signalkaskade nicht oberhalb von JNK und p38. Zur weiteren Untersuchung der Bedeutung von PI3-Kinase und Akt für die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung wurden Wildtypmausfibroblasten (JNK1/2 wt) mit Wortmannin, einem Inhibitor der PI3-Kinase, vorbehandelt. Anschließend erfolgte eine 60-minütige Behandlung der Zellen mit 2 μM BPDE. Die Phosphorylierung von Akt, JNK und p38 wurde im Western Blot detektiert. Ohne Wortmannin-Vorbehandlung induziert BPDE nach 60 Minuten eine deutliche Aktivierung sowohl der Akt-Kinase als auch der SAPK p38 und JNK. Die Vorbehandlung mit Wortmannin reduziert schon in der niedrigsten verwendeten Konzentration die Akt-Phosphorylierung deutlich. Mit steigender Inhibitor-konzentration lässt sich die Akt-Aktivierung vollständig verhindern.

Auf die BPDE-induzierte Aktivierung von p38 und JNK hingegen hat die Wortmanninvorbehandlung in keiner verwendeten Konzentration Auswirkungen (Abb. 17).

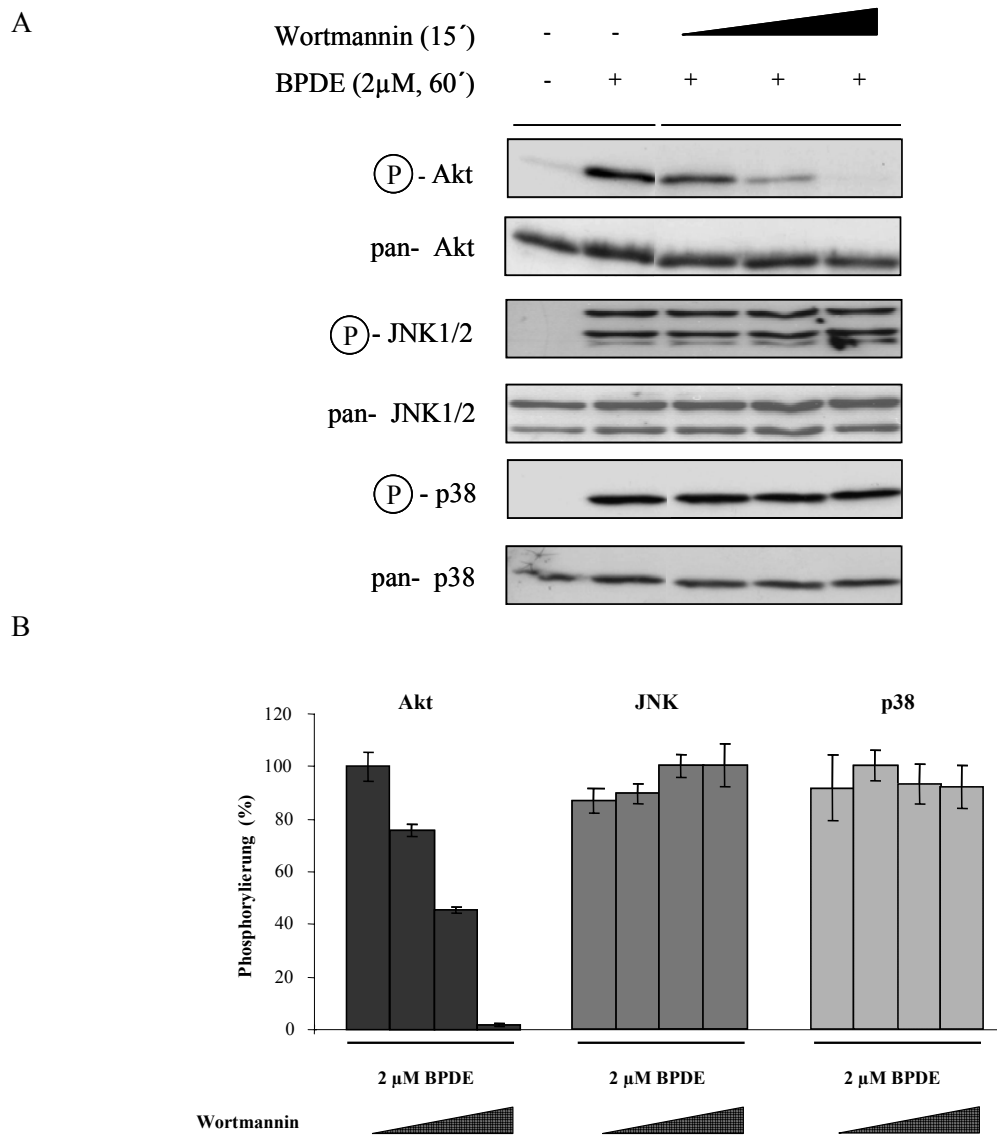


Abb. 17: Hemmung der Akt-Aktivierung durch Wortmannin-Vorbehandlung beeinträchtigt nicht die BPDE-induzierte JNK- und p38-Aktivierung.

Konfluent gewachsene NIH3T3-Wildtypmausfibroblasten wurden über Nacht serumgehungert und anschließend entweder direkt für 60 Minuten mit 2 μ M BPDE oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Zur Hemmung der Akt-Phosphorylierung wurden die Zellen für 15 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen (0,1 μ M, 0,3 μ M und 1 μ M) Wortmannin, einem Inhibitor der PI3-Kinase, vorbehandelt und anschließend für 60 Minuten mit 2 μ M BPDE behandelt. **A** Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung der Akt, JNK und p38 bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Proteine; **B** Quantifizierung der Western Blot-Analyse mit Hilfe des Computerprogramms Odyssey 2.0 (Lincoln, USA). Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung ermittelt aus drei unabhängigen Experimenten. Zur Ermittlung der relativen Phosphorylierung der Kinasen wurde die maximale Phosphorylierung der jeweiligen Kinase auf 100% gesetzt (60 Minuten BPDE/ohne Wortmannin-Vorbehandlung bei Akt; 0,3 μ M Wortmannin-Vorbehandlung/60 Minuten BPDE bei JNK und 0,1 μ M Wortmannin/60 Minuten BPDE bei p38) und die relative Phosphorylierung der Kinasen für die anderen Behandlungen bestimmt.

3.1.5 Identifizierung zwischengeschalteter Faktoren in der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung

Wie in der Einleitung beschrieben, sind an der Signalkaskade, die zur Aktivierung der MAPK/SAPK führt, verschiedene Proteinkinasen beteiligt. Jede MAPK wird dabei durch Übertragung einer Phosphatgruppe von ATP auf einen Threonin- und Tyrosin-Rest innerhalb ihrer Aktivierungsdomäne phosphoryliert (Kyriakis und Avruch, 2001). Verantwortlich für diese Phosphorylierung sind die so genannten MAPK-Kinasen (MAPKK), welche spezifisch für die verschiedenen MAPK sind. Wie in Abb. 6 dargestellt, kann die JNK durch die MAPKK SEK-1 (auch als MKK4 bezeichnet) und MKK7 phosphoryliert werden (Davis, 2000; Tournier *et al.*, 2001). Die MAPKK SEK-1 kann neben JNK auch die p38 phosphorylieren (Dérijard *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1995; Tournier *et al.*, 2001). Dagegen kann die MAPKK MKK7 selektiv nur die JNK phosphorylieren (Tournier *et al.*, 1997). Zwei weitere MAPKK sind MKK3 und MKK6, welche als MKK3/6 zusammengefasst werden und p38 phosphorylieren können (Enslin *et al.*, 1998). Die BPDE-induzierte Phosphorylierung der genannten MAPKK wurde im Western Blot mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper untersucht.

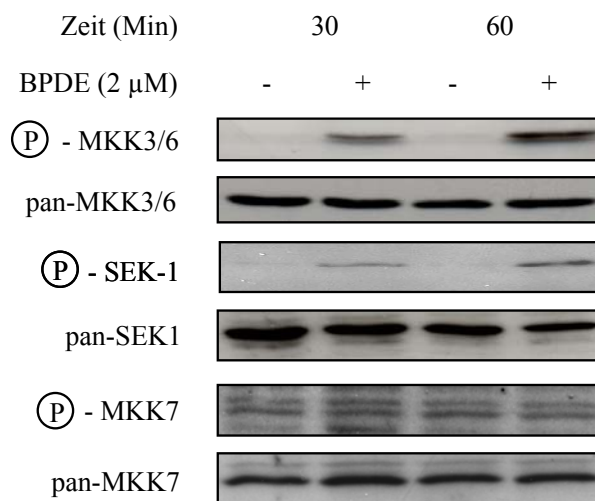


Abb. 18: BPDE aktiviert die MAPK-Kinasen MKK3/6 und SEK-1, aber nicht MKK7.

Konfluent gewachsene NIH3T3-Wildtypmausfibroblasten wurden über Nacht serumgehungert und anschließend für 10, 30 und 60 Minuten mit 2 μ M BPDE bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung von MKK3/6, MKK7 und SEK-1 bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Proteine.

Behandlung von Mausfibroblasten (NIH3T3) mit 2 μ M BPDE führt innerhalb von 30 Minuten zur Phosphorylierung der MAPKK MKK3/6 und SEK-1, die sich nach 60-minütiger Behandlung noch verstärkt. Die MKK7 hingegen wird zu beiden untersuchten Zeitpunkten nicht spezifisch aktiviert (Abb. 18). Die Aktivierungskinetiken der MAPKK MKK3/6 und SEK-1 korrelieren somit mit der SAPK-Aktivierung.

3.1.6 Beteiligung von Tyrosinkinasen an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung

3.1.6.1 Rolle von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) an BPDE-induzierten Signalkaskaden

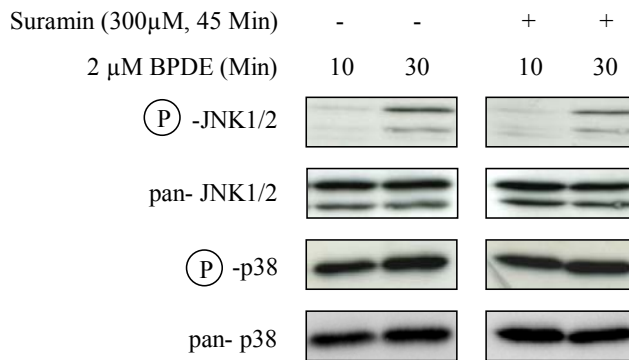
Eine wichtige Frage der BPDE-abhängigen p38- und JNK-Aktivierung ist, wo das primäre Signal generiert wird, das zur Aktivierung der SAPK führt.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, regulieren extrazelluläre Signale die Aktivierung der MAP-Kinase-Signalkaskade. Behandlung von Zellen mit Mitogenen, wie Wachstumsfaktoren (zum Beispiel EGF), aber auch die Exposition mit UVC ermöglicht, unter Einbeziehung von Wachstumsfaktorrezeptoren, die MAPK-Aktivierung. Die Behandlung mit UV-Strahlung induziert das „Clustering“ und die Internalisierung von zellulären Oberflächenrezeptoren, wie zum Beispiel der EGF-Rezeptoren (Protein-Tyrosinkinase) und induziert so die MAPK ERK (Sachsenmaier *et al.*, 1994; Knebel *et al.*, 1996; Rosette und Karin, 1996).

Protein-Tyrosinkinasen (PTK) lassen sich in zwei Kategorien einteilen: Rezeptorassoziierte PTK (auch Rezeptortyrosinkinasen, RTK, genannt), die eine extrazelluläre, ligandenbindende Domäne besitzen und zytoplasmatische Nicht-rezeptorassoziierte PTK (Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen) ohne extrazelluläre Domäne. PTK sind wichtig für die Übertragung von extrazellulären Signalen ins Zytoplasma und sind an der Kontrolle verschiedener zellulärer Prozesse wie Überleben und Apoptose beteiligt (Schlessinger, 2000).

Ist die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung abhängig von membranständigen Rezeptoren bzw. von der Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen? Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden Wachstumsfaktorrezeptoren mit Hilfe eines Inhibitors (Suramin) in ihrer Aktivierung gehemmt. Suramin inhibiert die Interaktionen zwischen Wachstumsfaktorrezeptoren und deren Liganden (Coffey *et al.*, 1987). Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit BPDE und die Phosphorylierung von p38 und JNK wurde im Western Blot untersucht. Die Vorbehandlung der Zellen mit Suramin hat keinen Einfluss auf die BPDE-induzierte Aktivierung der SAPK (Abb.19 A). Zur Untersuchung der Wirksamkeit des verwendeten Inhibitors wurden die Zellen entweder mit Suramin oder DMSO vorbehandelt. Nach anschließender EGF-Gabe wurde die Aktivierung der MAP-Kinase ERK getestet. In DMSO-vorbehandelten Zellen aktiviert EGF bereits nach 10 Minuten die MAPK ERK. Vorbehandlung mit Suramin hingegen bewirkt eine reduzierte EGF-induzierte ERK-Aktivierung (Abb. 19 B).

A



B

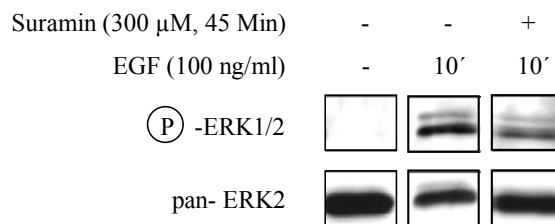


Abb. 19: Hemmung von Wachstumsfaktorrezeptoren durch Suramin hemmt nicht die BPDE-induzierte Aktivierung von p38 und JNK.

A Konfluent gewachsene NIH3T3-Wildtypmausfibroblasten wurden über Nacht serumgehungert und für 10 und 30 Minuten mit 2 µM BPDE bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Zum anderen wurden die Zellen mit dem Inhibitor wachstumsfaktorabhängiger Signalwege, Suramin (300 µM), für 45 Minuten vorbehandelt und anschließend erfolgte die Inkubation mit 2 µM BPDE für 10 und 30 Minuten. Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung der JNK und p38 bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Proteine; **B** Zum Test der Effektivität des Inhibitors wurde die Hemmung der EGF-induzierten ERK-Aktivierung durch Suramin untersucht. Dafür wurden die Zellen, wie oben beschrieben, entweder mit Suramin oder mit DMSO vorbehandelt und für 10 Minuten mit 100 ng/ml EGF („epidermal growth factor“) behandelt. Die Zellextrakte wurden, wie oben beschrieben, im Western Blot untersucht.

In Folge der Bindung von Wachstumsfaktoren an ihren entsprechenden Rezeptor in der Zellmembran kommt es unter anderem auch zur Aktivierung von rezeptorassoziierten Proteinen wie zum Beispiel Shc. Von dem Adapterprotein Shc wurden bisher drei Gene in Säugetieren identifiziert, deren Genprodukte ShcA, ShcB und ShcC sind (Luzi *et al.*, 2000). In Säugetieren ist nur ShcA ubiquitär exprimiert, ShcB und ShcC sind auf neuronale Zellen beschränkt. ShcA wird in drei Isoformen exprimiert, die 46, 52 und 66 kDa groß sind. Diese Isoformen entstehen durch alternatives Splicing und unterschiedliche Translationsinitiationspunkte (Pelicci *et al.*, 1992). Die Bindung von Shc-Proteinen an aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) resultiert in der Phosphorylierung von Shc an einem Tyrosinrest (Gotoh *et al.*, 1996). An phosphoryliertes Shc bindet das Adapterprotein Grb2 („growth factor receptor-bound protein 2“). Grb2 bindet anschließend an den Ras-Guaninnukleotid-Austauschfaktor Sos. Dieser Komplex aus Shc, Grb2 und Sos ist über die Interaktion von Shc mit dem phosphorylierten Rezeptor an der Zellmembran lokalisiert. Diese Interaktion wird vermittelt durch die SH2-Domäne („Src-homology 2“) von Shc (Pelicci *et al.*, 1992; Blaikie *et al.*, 1994). Die SH2-Domäne ist eine

Proteindomäne, die spezifische Proteininteraktionen vermittelt indem sie Proteine mit phosphoryliertem Tyrosin erkennt. Diese Interaktion führt zur Aktivierung des Ras-MAPK-Signalwegs (Rozakis-Adcock *et al.*, 1992; Bonfini *et al.*, 1996).

Für andere gentoxische Stimuli, zum Beispiel UV-Strahlung, konnte gezeigt werden, dass sie Rezeptoren für Wachstumsfaktoren aktivieren können (Sachsenmaier *et al.*, 1994; Warmuth *et al.*, 1994; Knebel *et al.*, 1996; Rosette und Karin, 1996). Zur Überprüfung, ob BPDE Wachstumsfaktorrezeptoren aktivieren kann, wurde im Western Blot die BPDE-induzierte Shc-Phosphorylierung überprüft. In Abb. 20 ist gezeigt, dass BPDE-Behandlung keine Shc-Phosphorylierung induziert. Als Positivkontrolle diente die Behandlung mit dem natürlichen Liganden des EGF-Rezeptors. Bereits eine zehninütige Behandlung mit EGF induziert eine signifikante Phosphorylierung von Shc.

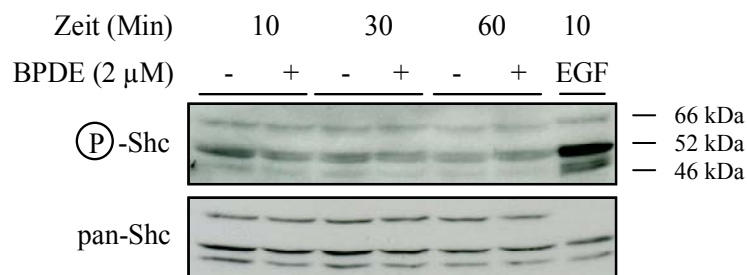


Abb. 20: BPDE induziert keine Shc-Phosphorylierung.

Konfluent gewachsene NIH3T3-Wildtypmausfibroblasten wurden über Nacht serumgehungert und anschließend entweder direkt für 10-60 Minuten mit 2 μ M BPDE oder mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen für 10 Minuten mit 100 ng/ml EGF behandelt. Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung von Shc bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen das nicht-phosphorylierte Protein.

Sowohl die Ergebnisse der Suramin-Vorbehandlung zur Hemmung der Wachstumsfaktoraktivierung als auch das Ausbleiben einer BPDE-induzierten Phosphorylierung von Shc, einem Adapterprotein von Wachstumsfaktoren, deuten darauf hin, dass membranständige Wachstumsfaktorrezeptoren wahrscheinlich nicht an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung beteiligt sind.

3.1.6.2 Rolle von Nicht-Rezeptortyrosinkinasen an BPDE-induzierten Signalkaskaden

Zu den oben erwähnten Nicht-rezeptorassoziierten Proteinkinasen gehören u.a. die Mitglieder der Src-Familie, auch Src-ähnliche Kinasen genannt. Die Familie der Src-ähnlichen Kinasen besteht aus neun Mitgliedern: Src, Fyn, Yes, Lyn, Lck, Hck, Fgr, Blk und Yrk (Thomas und Brugge, 1997). Diese Kinasen werden als Reaktion auf die Stimulierung einer Reihe membranständiger Rezeptoren aktiviert, darunter RTK, Integrin-Rezeptoren und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Thomas und Brugge, 1997). Außerdem sind die Src-ähnlichen Kinasen an der Reaktion auf zellulären Stress, wie zum Beispiel ROS,

beteiligt (Sato *et al.*, 2005). Die zelluläre Reaktion auf UV-Bestrahlung beinhaltet ebenfalls die Aktivierung der Src-Tyrosinkinase (Devary *et al.*, 1992). Als weiterer Angriffspunkt für BPDE kommen aus diesem Grund die Src-ähnlichen Kinasen in Frage. Um die Rolle dieser Src-ähnlichen Kinasen zu untersuchen, wurden NIH3T3-Wildtypzellen mit dem spezifischen Inhibitor PP1 (4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo-D-3,4-pyrimidin) für 15 Minuten vor- und anschließend mit BPDE behandelt. PP1 hemmt die Kinase-Aktivität als kompetitiver Inhibitor der ATP-Bindung (Hanke *et al.*, 1996).

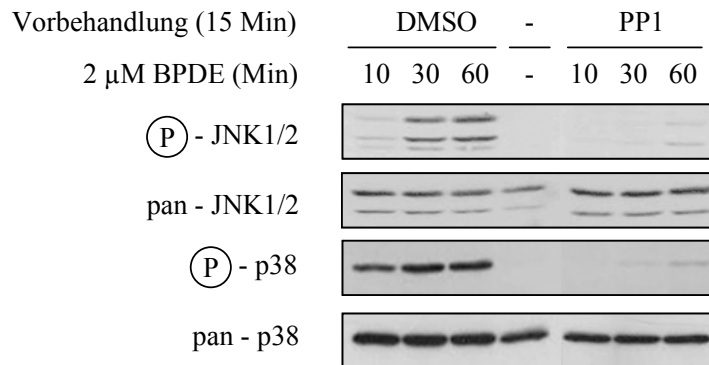


Abb. 21: Vorbehandlung mit PP1 hemmt die BPDE-induzierte Aktivierung von p38 und JNK.

Konfluent gewachsene NIH3T3-Wildtypmausfibroblasten wurden über Nacht serumgehungert und anschließend für 10 bis 60 Minuten mit 2 μ M BPDE bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Zum anderen wurden die Zellen vor der BPDE-Behandlung mit einem Inhibitor Src-ähnlicher Kinasen (PP1) in einer Konzentration von 10 μ g/ml für 15 Minuten vorbehandelt und anschließend erfolgte die Inkubation mit 2 μ M BPDE für 10, 30 und 60 Minuten. Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung der JNK und p38 bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Proteine.

PP1-Vorbereitung reduziert zu allen untersuchten Zeitpunkten (10, 30 und 60 Minuten) die Aktivierung von p38 und JNK signifikant (Abb. 21). Das gezeigte Ergebnis der Hemmung Src-ähnlicher Kinasen durch PP1 macht eine Beteiligung dieser Kinasen an der Aktivierung von JNK und p38 durch BPDE wahrscheinlich. Zur Identifizierung, welche der Src-ähnlichen Kinasen an der BPDE-induzierten Aktivierung der SAPK beteiligt sind, wurden sowohl c-Src- und c-Abl-Knockout- als auch jeweils korrespondierende Wildtypmausfibroblasten mit BPDE behandelt und die Aktivierung der SAPK untersucht.

3.1.6.2.1 Beteiligung von c-Abl an den BPDE-induzierten Signalkaskaden

Die Experimente mit dem Inhibitor von Src-ähnlichen Kinasen, PP1, deuten auf eine Beteiligung dieser Kinasen an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung hin. Die Nicht-rezeptorassoziierte Protein-Tyrosinkinase c-Abl ähnelt Src-ähnlichen Kinasen und besitzt die Src-homologen Domänen SH3 und SH2 und eine Src-ähnliche katalytische Domäne. C-Abl wird ubiquitär in zwei 145 kDa großen Isoformen exprimiert. Beide Isoformen von c-Abl sind sowohl im Zytoplasma als auch im Kern

vorhanden (Laneuville, 1995). Aktiviert wird c-Abl, durch Phosphorylierung an den Aminosäuren Tyrosin²⁴⁵, Tyrosin⁴¹² und Threonin⁷³⁵, hauptsächlich durch genotoxische Agenzien wie das Chemotherapeutikum Cisplatin (CDDP), alkylierende Agenzien wie zum Beispiel Methylmethansulfonat (MMS) und ionisierende Strahlung. Für diese Agenzien wurde darüber hinaus gezeigt, dass die Nicht-rezeptorassoziierte Protein-Tyrosinkinase c-Abl wichtig ist für die Aktivierung der SAPK JNK (Kharbanda *et al.*, 1995). Um die Beteiligung von c-Abl an der BPDE-induzierten Aktivierung von p38 und JNK zu untersuchen, wurden c-Abl profiziente und c-Abl-defiziente Mausfibroblasten für verschiedene Zeiten mit 2 μ M BPDE behandelt und die Aktivierung von p38 und JNK im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern detektiert.

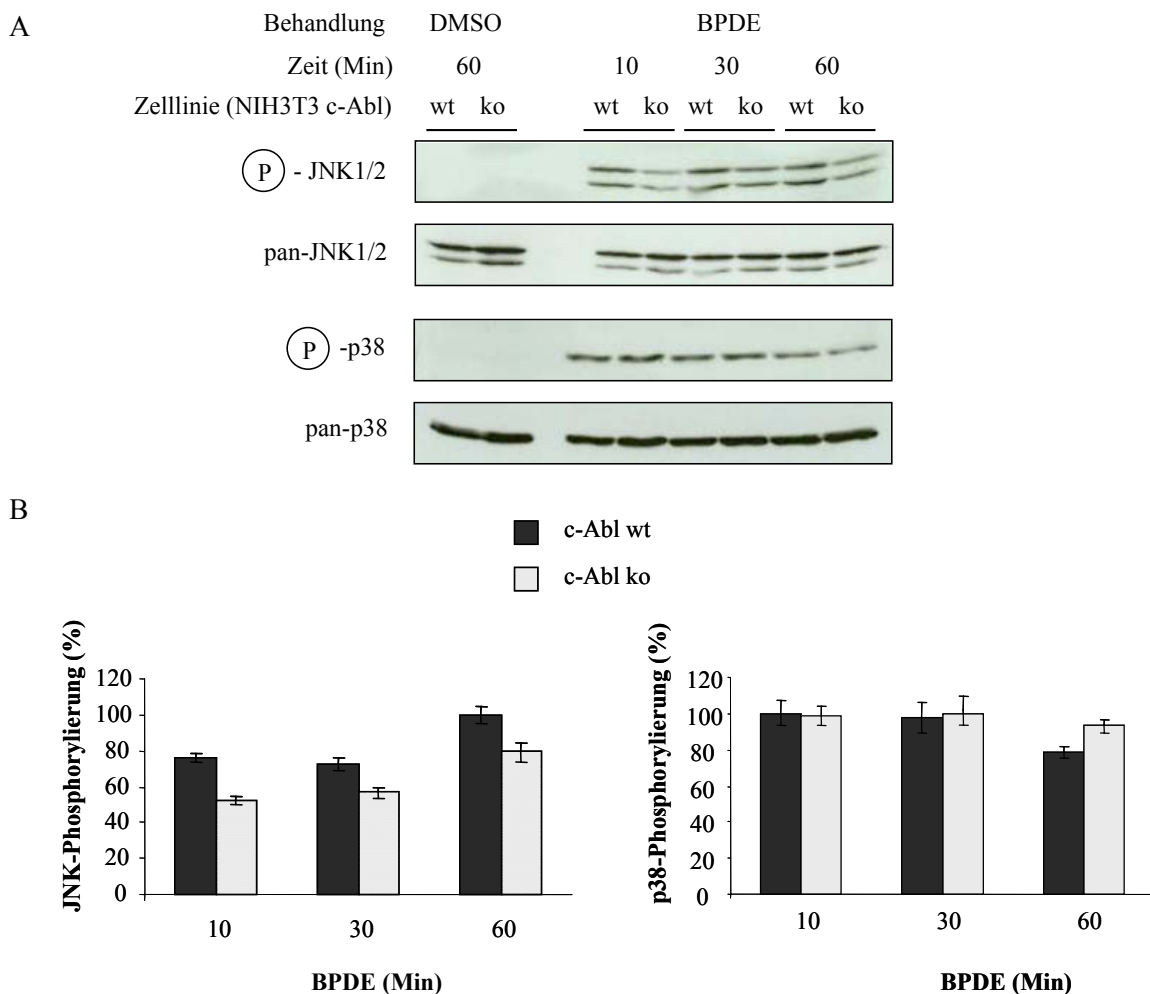


Abb. 22: c-Abl-defiziente Mausfibroblasten (NIH3T3) zeigen leicht reduzierte JNK-Aktivierung nach BPDE-Behandlung.

Konfluent gewachsene c-Abl-defiziente und c-Abl-profiziente Mausfibroblasten (NIH3T3) wurden über Nacht serumgehungert und anschließend für 10, 30 und 60 Minuten mit 2 μ M BPDE bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung der JNK und p38 bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Proteine. **A** Western Blot; **B** Quantifizierung der Western Blot-Analyse. JNK-Phosphorylierung (links), p38-Phosphorylierung (rechts). Die Quantifizierung der Phosphorylierung erfolgte mit dem Programm Odyssey 2.0 (Lincoln, USA). Zur Ermittlung der relativen Phosphorylierung der Kinasen wurde die maximale Phosphorylierung der jeweiligen Kinase auf 100% gesetzt (60 Minuten BPDE für die JNK (c-Abl wt); 10 Minuten BPDE für p38 (c-Abl wt)) und die relative Phosphorylierung der Kinasen für die anderen Behandlungen berechnet.

Wie in Abb. 22 gezeigt, induziert BPDE in c-Abl-Wildtypmausfibroblasten bereits nach 10-minütiger Behandlung die Phosphorylierung von JNK und p38. Verglichen mit der JNK-Aktivierung in Wildtypfibroblasten, ist die Phosphorylierung der JNK in c-Abl-defizienten Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten etwas schwächer. Die BPDE-induzierte p38-Aktivierung indessen zeigt keine Unterschiede in Wildtyp- und Knockoutzellen.

Zur Untersuchung einer direkten Beteiligung von c-Src an den BPDE-induzierten Signalkaskaden wurden c-Src-defiziente und c-Src-Wildtypmausfibroblasten (NIH3T3) untersucht. Verglichen mit den Wildtypzellen zeigen die c-Src-defizienten Zellen keinen Unterschied in der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung (Daten nicht gezeigt). Versuche mit c-Abl-defizienten Zellen und Wildtypzellen deuten darauf hin, dass c-Abl, zumindest teilweise, wichtig für die BPDE-induzierte JNK-Aktivierung ist. Da PP1-Vorbehandlung jedoch die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung fast vollständig hemmt, müssen noch weitere Src-ähnliche Kinasen an dieser Signalkaskade beteiligt sein.

3.1.7 Rolle von BPDE-induzierten DNA-Schäden in der Signaltransduktion

Welche Faktoren werden oberhalb von Src-ähnlichen Kinasen durch BPDE aktiviert? Entstehen BPDE-induzierte DNA-Schäden ähnlich früh wie die SAPK aktiviert werden? Um diese Fragen zu beantworten, wurden die durch BPDE induzierten DNA-Schäden mit Hilfe des alkalischen Comet Assays untersucht. Wie in der Einleitung beschrieben, bildet BPDE kovalente Addukte mit der DNA. Diese BPDE-DNA-Addukte nennt man auf Grund ihrer Größe und der Störung der Helixkonformation auch sperrige Addukte („bulky adducts“). DNA-Schäden dieser Art werden mit Hilfe der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) repariert. In Folge der DNA-Reparatur kommt es zur Entstehung von Strangbrüchen, weil die geschädigten Basen und die benachbarten Nukleotide durch Endonukleasen (XPG und ERCC1/XPF) entfernt werden (siehe Abb. 5).

Eine Methode zur Untersuchung von DNA-Schäden, genauer DNA-Strangbrüchen, ist der Comet Assay (siehe Kapitel 2.8). Der Comet Assay kann in verschiedenen Varianten durchgeführt werden, die sich durch den pH-Wert der verwendeten Puffer unterscheiden. Der alkalische Comet Assay wird bei einem pH-Wert >13 durchgeführt. Auf Grund der alkalischen Bedingungen kommt es zur Denaturierung der DNA, d.h. beide Stränge trennen sich durch Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen voneinander. Mit Hilfe des alkalischen Comet Assays können deshalb sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche detektiert werden (Singh *et al.*, 1988; Cotelle und Féraud, 1999). Bei der neutralen Variante hingegen bleiben die beiden DNA-Stränge über Wasserstoffbrücken verbunden, so dass nur Doppelstrangbrüche detektiert werden können.

Zur Untersuchung BPDE-induzierter DNA-Strangbrüche wurden konfluente, serumgehungerte Wildtypmausfibroblasten (NIH3T3) für unterschiedliche Zeiten (10, 30 und 60 Minuten) mit 2 μ M BPDE behandelt und anschließend der alkalische Comet Assay durchgeführt.

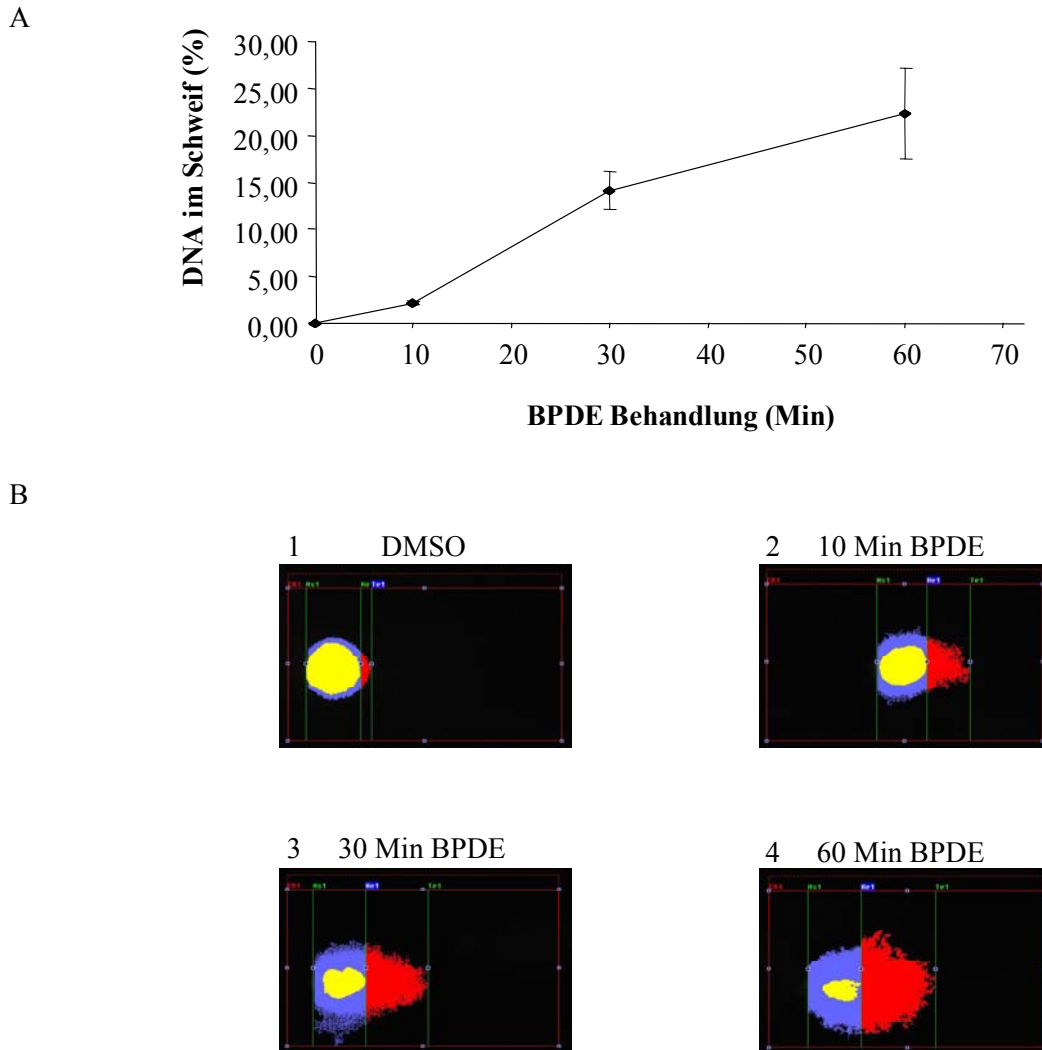


Abb. 23: BPDE induziert innerhalb von Minuten DNA-Strangbrüche.

Konfluent gewachsene NIH3T3-Wildtypmausfibroblasten wurden über Nacht serumgehungert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit $2 \mu\text{M}$ BPDE für 10, 30 und 60 Minuten bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die Zellen wurden, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, dem alkalischen Comet Assay unterzogen. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop mit der Auswertungssoftware Viscomet 1.6.2. **A** Quantitative Auswertung. Zur Auswertung wurde das Ausmaß der DNA-Schäden von 100 Zellen gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert des prozentualen Anteils der DNA im Schweif \pm Standardabweichung; **B** Repräsentative Aufnahmen von DMSO- bzw. BPDE-behandelten Mausfibroblasten mit dem Computerprogramm Viscomet 1.6.2. Gezeigt ist die starke Fluoreszenz der DNA im Kopf des Kometen (Zellkern, gelb), der nicht zur Kopf-Region zählende Bereich schwächerer Fluoreszenz (blau) und die im elektrischen Feld gewanderten DNA-Fragmente (rot). **1** 60 Minuten DMSO; **2** 10 Minuten $2 \mu\text{M}$ BPDE; **3** 30 Minuten $2 \mu\text{M}$ BPDE; **4** 60 Minuten $2 \mu\text{M}$ BPDE.

Wie in Abb. 23 gezeigt, induziert BPDE innerhalb von 10 Minuten DNA-Strangbrüche. Das Ausmaß der Strangbrüche, dargestellt als prozentuale Zunahme der DNA-Fragmente im Schweif, nimmt mit steigender Behandlungsdauer stetig zu. Nach maximaler Behandlungsdauer von 60 Minuten liegen bereits ca. 25% der zellulären DNA im Schweif vor.

Zur Untersuchung, ob BPDE nur Einzel- oder nur Doppelstrangbrüche induziert, wurde der neutrale Comet Assay durchgeführt. Lyse und Elektrophorese finden dabei unter neutralen Bedingungen (pH 7,5) statt, die DNA wird nicht denaturiert. Mit diesem Versuch werden deshalb nur Doppelstrangbrüche detektiert (Singh *et al.*, 1988).

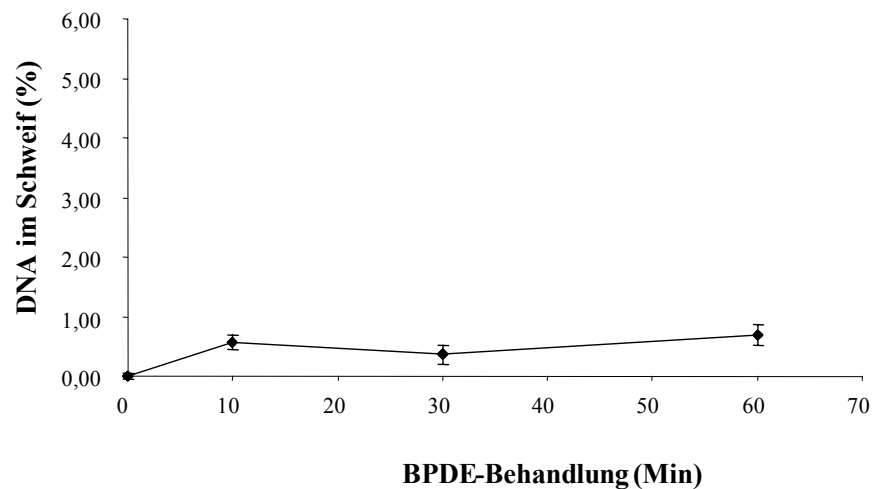


Abb. 24: BPDE induziert keine DNA-Doppelstrangbrüche in NIH3T3-Wildtypzellen.

Konfluent gewachsene NIH3T3-Wildtypmausfibroblasten wurden über Nacht serumgehungert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 10 bis 60 Minuten mit 2 μ M BPDE bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die Zellen wurden, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, dem neutralen Comet Assay unterzogen. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop mit der Auswertungssoftware Viscomet 1.6.2.

Wie in Abb. 24 zu sehen, kann mit dem neutralen Comet Assay keine Zunahme der DNA-Strangbrüche in BPDE-behandelten NIH3T3-Wildtypmausfibroblasten detektiert werden. BPDE induziert demnach nur DNA-Einzelstrangbrüche und keine Doppelstrangbrüche.

BPDE-induzierte DNA-Einzelstrangbrüche sind bereits nach 10-minütiger Behandlungszeit nachzuweisen und nehmen mit steigender Behandlungsdauer zu. In demselben Zeitraum werden auch die SAPK p38 und JNK durch BPDE aktiviert. Gibt es einen Zusammenhang zwischen den BPDE-induzierten Einzelstrangbrüchen und der SAPK-Aktivierung?

3.1.7.1 Ist die Erkennung des BPDE-induzierten DNA-Schadens wichtig für die Signalinduktion?

Die durch BPDE erzeugten sperrigen Addukte werden durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) entfernt, welche sich in zwei Wege unterteilen lässt: Die globale Genom- und die transkriptionsgekoppelte Reparatur (GGR und TCR). Die TCR repariert nur NER-spezifische DNA-Schäden in transkribierten Genen, wohingegen die GGR Schäden im nicht transkribierten Teil des Genoms repariert (siehe Kapitel 1.2.2). Um zu untersuchen, ob die Erkennung des DNA-Schadens durch NER-assoziierte Proteine wesentlich für die BPDE-induzierten Signalkaskaden ist, wurde die SAPK-Induktion in Mausfibroblasten untersucht, welche defizient für die an der DNA-Schadenserkenung beteiligten Proteine sind.

Der erste Schritt der DNA-Schadenserkennung bei der TCR erfolgt durch die an der Läsion blockierte RNA-Polymerase II. Dadurch werden Proteine, die DNA-Schäden erkennen wie zum Beispiel CSB zum Schaden rekrutiert und durch Rekrutierung weiterer NER-Proteine wie TFIIH und Nukleasen die Entfernung des BPDE-DNA-Adduktes veranlasst.

Die Beteiligung der Schadenserkennung von BPDE-induzierten DNA-Läsionen durch das TCR-Protein CSB wurde in CSB-defizienten Mausfibroblasten und korrespondierenden Wildtypzellen untersucht.

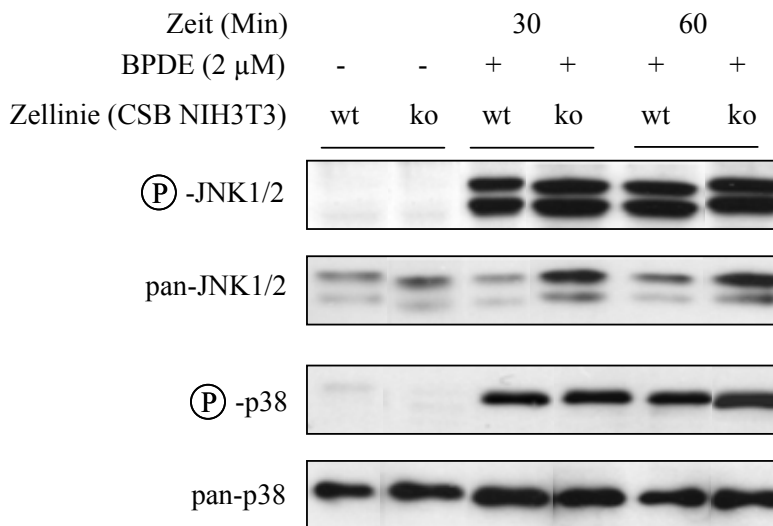


Abb. 25: Die BPDE-induzierte SAPK-Phosphorylierung ist in CSB-defizienten Mausfibroblasten (NIH3T3) nicht beeinträchtigt.

Konfluent gewachsene CSB-defiziente und profiziente immortalisierte Mausfibroblasten (NIH3T3) wurden über Nacht serumgehungert und anschließend für 30 und 60 Minuten mit 2 μ M BPDE bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung von p38 und JNK bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Proteine.

In Abb. 25 ist die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung in CSB-Knockout- und korrespondierenden Wildtypmausfibroblasten gezeigt. Weder die BPDE-induzierte JNK- noch die p38-Phosphorylierung ist in CSB-defizienten Zellen beeinträchtigt. Die DNA-Schadenserkennung durch die TCR scheint demnach nicht wichtig für die BPDE-induzierten Signalkaskaden zu sein.

Der erste Schritt der DNA-Schadenserkennung bei der GGR benötigt das XPC-Protein, welches weitere Reparaturproteine wie XPA, Helikasen und Nukleasen rekrutiert und so die Entfernung der DNA-Läsion einleitet.

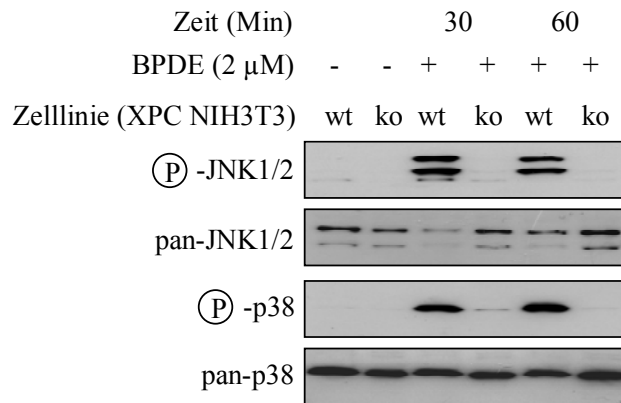


Abb. 26: Verminderte BPDE-induzierte p38- und JNK-Aktivierung in XPC-defizienten Mausfibroblasten. Konfluent gewachsene XPC-defiziente und -profiziente immortalisierte Mausfibroblasten (NIH3T3) wurden über Nacht serumgehungert und anschließend für 30 und 60 Minuten mit 2 μ M BPDE bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung von p38 und JNK bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Proteine.

BPDE induziert innerhalb von 30 Minuten die maximale Phosphorylierung der SAPK in XPC-profizienten Fibroblasten. Verglichen mit den Wildtypzellen zeigen die XPC-defizienten Mausfibroblasten eine signifikant reduzierte JNK- und p38-Aktivierung. Sowohl die 30- als auch die 60-minütige BPDE-induzierte SAPK-Phosphorylierung ist in XPC-Knockout-Zellen erheblich schwächer als in XPC-Wildtypzellen (Abb. 26).

Zur Überprüfung, ob das NER-Protein XPC nur für die schnelle Phosphorylierung der SAPK nach BPDE-Exposition wichtig ist oder XPC auch für die SAPK-Aktivierung nach längerer BPDE-Behandlung benötigt wird, wurden proliferierende XPC-Knockout-Mausfibroblasten und korrespondierende Wildtypmausfibroblasten für bis zu 24 Stunden mit 2 μ M BPDE behandelt (siehe Abb. 27).

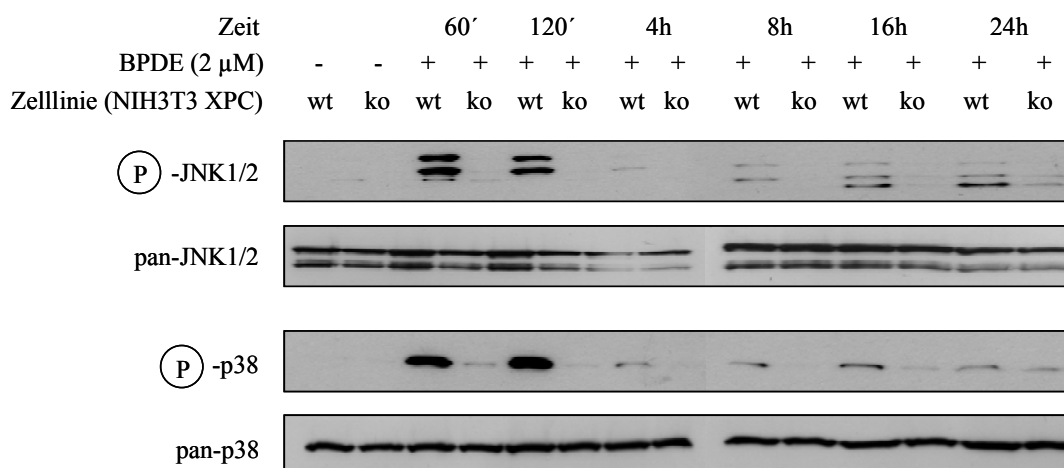


Abb. 27: Reduzierte BPDE-induzierte SAPK-Phosphorylierung in proliferierenden XPC-defizienten Mausfibroblasten.

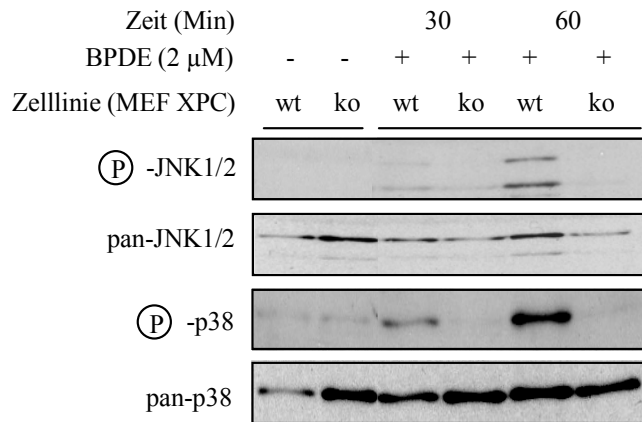
Logarithmisch wachsende XPC ko- und Wildtypmausfibroblasten (NIH3T3) wurden mit 2 μ M BPDE bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung von p38 und JNK bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Proteine.

Verglichen mit den Wildtypfibroblasten ist die BPDE-induzierte SAPK-Phosphorylierung in den XPC-Knockoutzellen zu allen untersuchten Zeitpunkten deutlich reduziert (Abb. 27)

Die bisher gezeigten Versuche wurden in spontan immortalisierten NIH3T3-Fibroblasten durchgeführt. Zur Generierung immortalisierter Zellen wurden primäre embryonale Mausfibroblasten („mouse embryonic fibroblast“, MEF) über einen längeren Zeitraum kultiviert. Hierbei unterliegen die Zellen einem natürlichen Alterungsprozess (auch als Seneszenz bezeichnet) und der Großteil der Zellen stirbt als Folge dieses Prozesses ab. Mit der Zeit entstehen allerdings auch spontan Mutationen im Genom der verbliebenen Zellen, welche u.a. Gene für die Regulierung von Wachstum und Zellzyklus betreffen können. Ist dies der Fall, so können sich die betroffenen Zellen zeitlich fast unbegrenzt teilen. Dies macht diese Zellen über einen längeren Zeitraum nutzbar, weshalb durch diese Methode viele Knockout-Zelllinien generiert wurden. Der Nachteil der immortalisierten Zelllinien ist, dass diese Zellen in verschiedenen Genen Mutationen, neben denen, die das Zellwachstum und die Proliferation betreffen, besitzen können. Die klonalen Unterschiede der XPC-profizienten Wildtypzellen und XPC-defizienten immortalisierten Mausfibroblasten könnten möglicherweise die reduzierte p38 und JNK in den XPC-defizienten Zellen bewirkt haben, so dass nicht das fehlende XPC-Protein die eigentliche Ursache für die reduzierte BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung in XPC-defizienten NIH3T3-Zellen ist. Aus diesem Grund wurden die BPDE-induzierten Signalwege in primären, nicht immortalisierten, Mausfibroblasten, die aus 13,5 Tage alten Wildtyp- bzw. XPC-defizienten Mausembryonen (Cheo *et al.*, 1997) generiert wurden, untersucht. Gewonnen wurden diese primären Zellen durch Entnahme von Embryonen am Tag 13,5 der Embryogenese aus dem Uterus. Die Vereinzelung der Zellen erfolgte mit Hilfe von Trypsin bei

37°C unter leichtem Schwenken. Anschließend werden die vereinzelt Zellen auf Zellkulturschalen ausgesät und in Nährmedium weiterinkubiert.

A



B

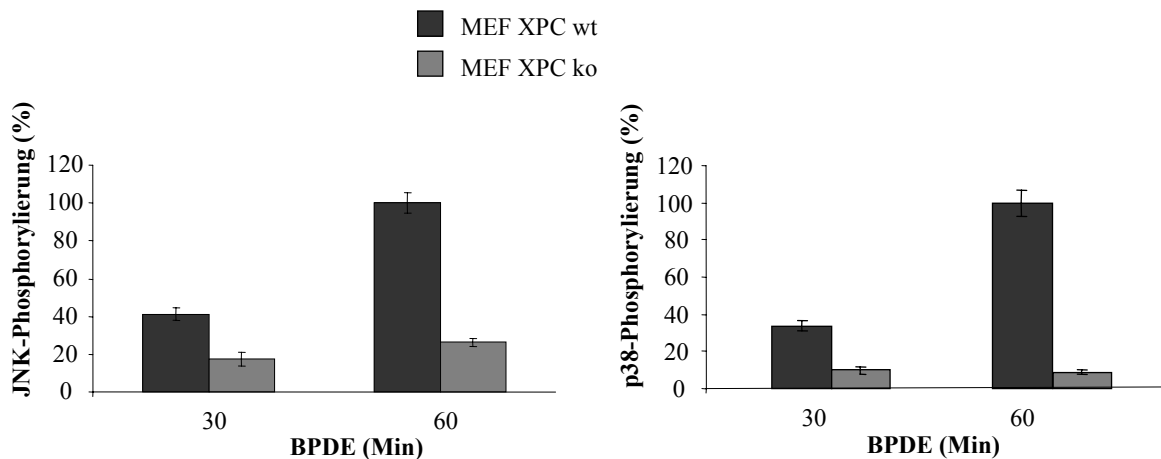


Abb. 28: Reduzierte p38- und JNK-Aktivierung durch BPDE in primären Mausfibroblasten.

Konfluent gewachsene XPC-defiziente und -profiziente primäre embryonale Mausfibroblasten (MEF) wurden über Nacht serumgehungert und anschließend für 30 und 60 Minuten mit 2 μ M BPDE (+) bzw. dem Lösungsmittel DMSO (-) behandelt. **A** Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung von p38 und JNK bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Proteine; **B** Die Quantifizierung der Western Blot-Analyse erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Odyssey 2.0 (Lincoln, USA). Zur Ermittlung der relativen Phosphorylierung der Kinasen wurde die maximale Phosphorylierung der jeweiligen Kinase auf 100% gesetzt (60 Minuten BPDE für die JNK (XPC wt); 60 Minuten BPDE für p38 (XPC wt)) und die relative Phosphorylierung der Kinasen für die anderen Behandlungen berechnet.

Wie bereits für die immortalisierten Mausfibroblasten gezeigt (Abb. 26), ist auch in primären embryonalen Mausfibroblasten die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung beeinträchtigt. Bereits eine 30-minütige BPDE-Behandlung bewirkt sowohl eine p38- als auch eine JNK-Phosphorylierung in den Wildtypzellen, welche sich nach 60-minütiger Behandlung noch erhöht. In XPC-defizienten primären Mausfibroblasten hingegen lässt sich für die beiden untersuchten Zeitpunkte (30 und 60 Minuten) keine Phosphorylierung nachweisen (Abb. 28). Diese Ergebnisse stimmen mit der in den spontan immortalisierten Mausfibroblasten gezeigten Kinetik der BPDE-induzierten XPC-abhängigen SAPK-

Phosphorylierungs-Kinetik überein. Die durch BPDE induzierte intrazelluläre Signalkaskade ist demnach von dem NER-Protein XPC abhängig. An dieser Signaltransduktionskaskade sind Src-ähnliche Kinasen sowie die MAPKK MKK3/6 und SEK-1 beteiligt.

3.1.7.2 XPC vermittelt die SAPK-Aktivierung durch sperrige Addukte, jedoch nicht durch andere zelluläre Stressoren

Die NER ist der vielseitigste DNA-Reparaturmechanismus hinsichtlich der Erkennung von unterschiedlichen DNA-Schäden. Zum Beispiel werden die durch UV-Strahlung, Cisplatin und PAK induzierten sperrigen DNA-Schäden durch NER-Proteine erkannt und entfernt (siehe Kapitel 1.2.2 und Hoeijmakers, 2001). Zur Untersuchung, ob weitere genotoxische Agenzien, deren Schäden durch die NER erkannt und repariert werden, in immortalisierten Mausfibroblasten die SAPK p38 und JNK aktivieren können und ob diese Aktivierung von der Schadenserkenkung durch XPC abhängig ist, wurden XPC-Knockoutfibroblasten und korrespondierende Wildtypzellen mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin behandelt und die Phosphorylierung von JNK und p38 im Western Blot detektiert.

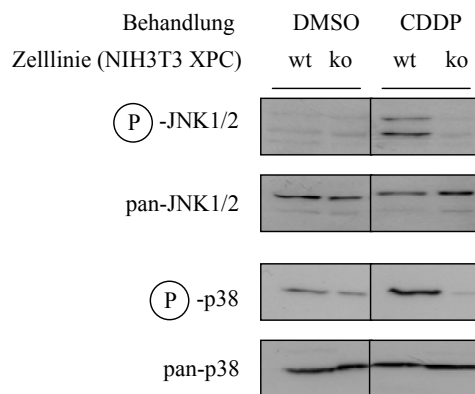


Abb. 29: XPC-vermittelte Aktivierung der SAPK durch NER-spezifische Läsionen.

Konfluent gewachsene XPC-defiziente und -profiziente immortalisierte Mausfibroblasten wurden über Nacht serumgehungert und anschließend für 60 Minuten mit 50 μ M Cisplatin bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt und anschließend lysiert. Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung von p38 und JNK bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Proteine.

Wie in Abb. 29 dargestellt, ist die Phosphorylierung von JNK und p38 durch Cisplatin in XPC-defizienten Zellen deutlich vermindert, verglichen mit der Phosphorylierung dieser Kinasen in den korrespondierenden Wildtypzellen. Die Induktion von Signalkaskaden durch Cisplatin in Mausfibroblasten ist demnach abhängig von dem NER-Protein XPC. Basierend auf den bisher gezeigten Ergebnissen ergibt sich folgende Fragestellung: Wird XPC generell für die durch Stressoren induzierte SAPK-Aktivierung benötigt oder handelt es sich um einen speziellen Mechanismus, der sich auf genotoxische Agenzien beschränkt, deren DNA-Läsionen durch NER-Proteine erkannt und repariert werden? Zur Untersuchung dieser Frage wurde die Induktion der JNK und p38 in XPC-Knockout-

Mausfibroblasten und korrespondierenden XPC-Wildtypzellen durch verschiedene zelluläre Stressoren wie das Zytostatikum Methylmethansulfonat (MMS), hyperosmolare Kochsalzlösung (NaCl), den Translationshemmstoff Anisomycin und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) untersucht. MMS ist eine alkylierende Substanz und die durch MMS verursachten DNA-Schäden (alkylierte Basen) werden durch die Basenexzisionsreparatur entfernt. H₂O₂ gehört zur Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, „reactive oxygen species“) und führt zur Oxidation von Basen. Guanin wird zum Beispiel durch H₂O₂ zu 8-Hydroxydeoxyguanosin (8-OHdG) oxidiert. Durch ROS induzierte DNA-Schäden werden ebenfalls durch die BER repariert (Barzilai und Yamamoto, 2004).

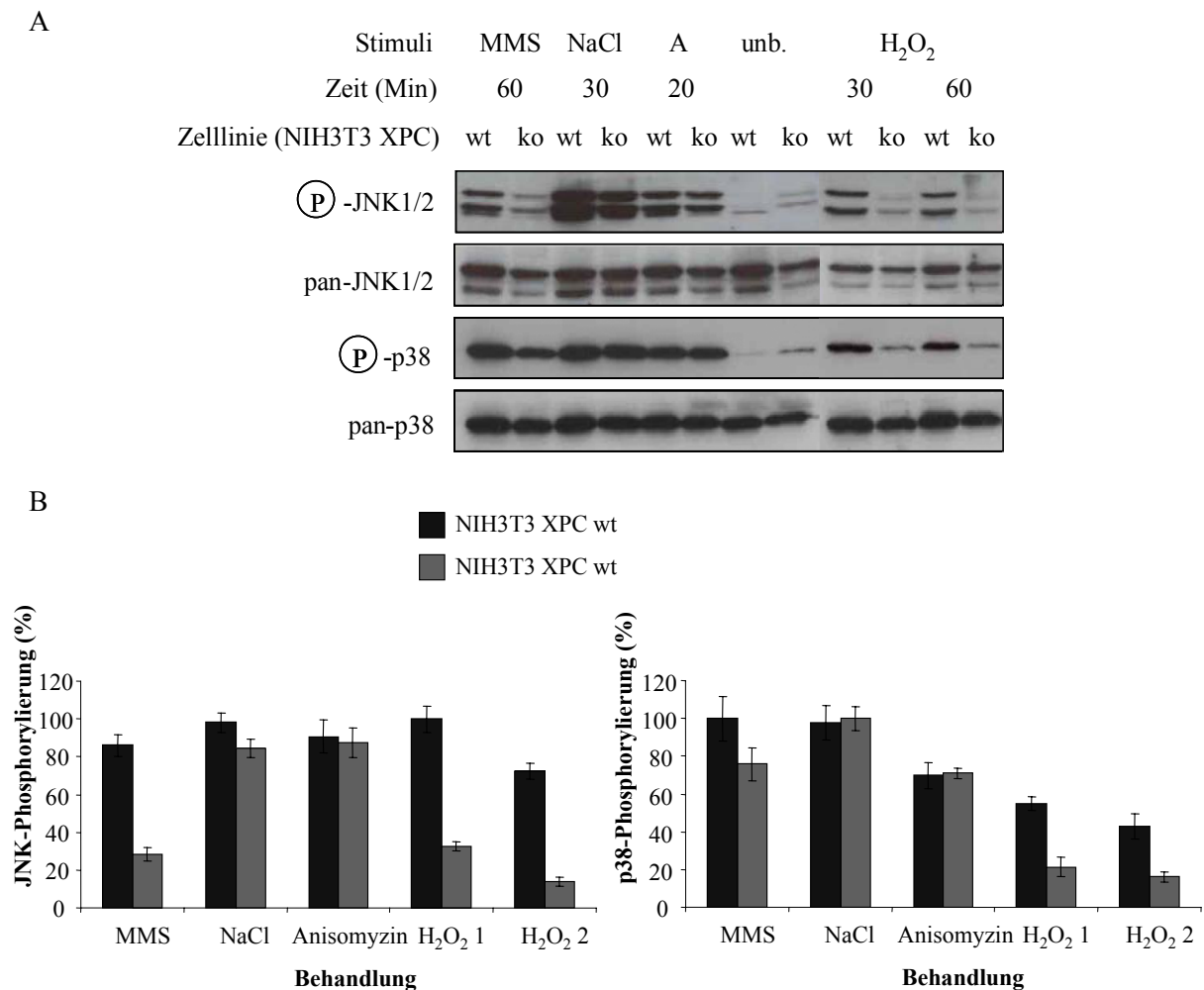


Abb. 30: Phosphorylierung von p38 und JNK durch verschiedene Stimuli in XPC-Knockout- und Wildtypmausfibroblasten (NIH3T3).

Konfluente und serumgehungerte XPC-defiziente und XPC-profiziente Mausfibroblasten wurden mit verschiedenen Substanzen behandelt: 1 mM MMS (60 Minuten); 200 mM NaCl (30 Minuten); 20 µg/ml Anisomycin (20 Minuten) und 50 µM H₂O₂ (30 (1) und 60 Minuten (2)). **A** Die Zellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung der SAPK bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Proteine; **B** Quantifizierung der Western Blot-Ergebnisse. Zur Ermittlung der relativen Phosphorylierung der Kinasen wurde die maximale Phosphorylierung der jeweiligen Kinase auf 100% gesetzt (30 Minuten 50 µM H₂O₂ für die JNK (XPC wt); 30 Minuten 200mMNaCl für p38 (XPC ko)) und die relative Phosphorylierung der Kinasen für die anderen Behandlungen berechnet.

Wie in Abb.30 zu sehen, werden die SAPK JNK und p38 durch MMS, NaCl, Anisomyzin und H₂O₂ in XPC-Wildtypmausfibroblasten deutlich aktiviert. Interessanterweise ist die SAPK-Aktivierung durch MMS und H₂O₂ in XPC-defizienten Zellen ebenfalls, wie für BPDE bereits gezeigt, deutlich reduziert. Durch diese Agenzien verursachte DNA-Schäden können ebenfalls durch die NER erkannt und repariert werden (Sato und Lindahl, 1994). XPC ist also, zumindest teilweise, an der Erkennung von durch MMS und H₂O₂ verursachten DNA-Läsionen und auch an der Induktion der Signaltransduktionskaskade beteiligt, welche zur SAPK-Aktivierung führt. Hingegen ist die deutliche SAPK-Phosphorylierung durch den bekannten Induktor und Translationshemmer Anisomyzin und durch hyperosmolare Kochsalzlösung (NaCl) in XPC-Knockout-Zellen nicht beeinträchtigt (siehe Abb. 30).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass XPC für die SAPK-Aktivierung durch bestimmte Agenzien benötigt wird. Hierbei handelt es sich um einen spezifischen Effekt für Agenzien, deren DNA-Schäden NER-abhängig repariert werden, denn die SAPK-Aktivierung durch NaCl und Anisomyzin ist in XPC-defizienten Zellen nicht beeinträchtigt. Dies zeigt, dass die SAPK-Aktivierung in XPC-Knockoutzellen nicht generell defekt ist.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass XPC wichtig für die SAPK-Aktivierung durch NER-spezifische Läsionen ist. Welche Bedeutung XPC und p38 für die zellulären Konsequenzen der BPDE-Exposition besitzen, soll im nächsten Abschnitt untersucht werden.

3.2 Zytotoxische Wirkung von BPDE

Bisher konnte gezeigt werden, dass BPDE sowohl p38 als auch JNK aktivieren kann. Nun stellt sich die Frage nach den biologischen Konsequenzen dieser Aktivierung bezüglich des zellulären Schicksals (Überleben oder Zelltod).

Werden BPDE-DNA-Addukte nicht durch die DNA-Reparatur aus dem Genom entfernt, stellen sie für proliferierende Zellen ein großes Problem dar, weil nicht-reparierte DNA-Schäden zu Mutationen führen können, welche zur Entstehung von Tumoren beitragen können. Außerdem induzieren DNA-Schäden so genannte Zellzyklus-Kontrollpunkte („checkpoints“), die für die Induktion eines Zellzyklusblocks verantwortlich sind. Diese Inhibierung der Zellzyklusprogression gibt der Zelle Zeit zur Reparatur der vorliegenden DNA-Schäden oder führt zur Induktion des Zelltodes, wenn die Anzahl der DNA-Schäden die Reparaturkapazität der Zelle übersteigt.

Aus den genannten Gründen wurde die Wirkung von BPDE auf das zelluläre Überleben untersucht.

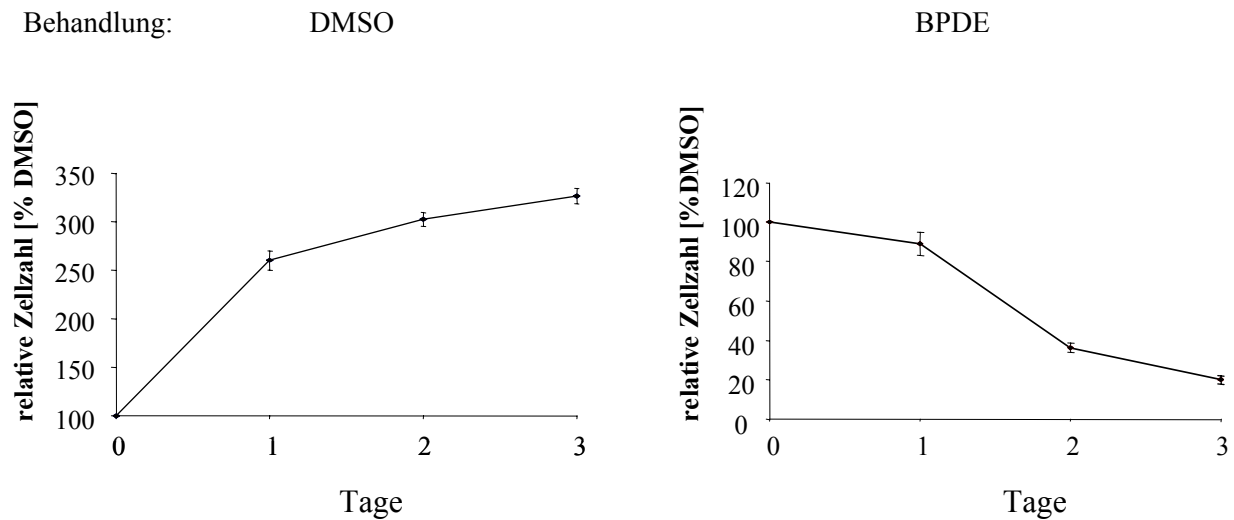


Abb. 31: Überleben von NIH3T3-Wildtypzellen nach BPDE-Behandlung.

Logarithmisch wachsende Zellen wurden als Triplikate ausgesät, einen Tag danach mit Lösungsmittel (links, DMSO) oder 2 μ M BPDE (rechts) behandelt und zu den angegebenen Zeiten die Zellzahl bestimmt. Angegeben ist die relative Zellzahl \pm Standardabweichung.

Werden proliferierende Mausfibroblasten (NIH3T3) für insgesamt drei Tage mit BPDE behandelt, so resultiert dies in einer signifikanten Abnahme der Zellzahl. Die relative Zellzahl reduziert sich nach 24-stündiger Behandlung auf ca. 85% der Startzellzahl. Nach dreitägiger Behandlung sind nur noch 20% lebende Zellen, verglichen mit der Startzellzahl, detektierbar. Als Kontrolle wurden Zellen für denselben Zeitraum mit Dimethylsulfoxid (DMSO), dem Lösungsmittel von BPDE, behandelt. DMSO-Behandlung beeinträchtigt die Proliferation der Mausfibroblasten nicht (Abb. 31).

Welche Rolle XPC und die SAPK p38 für die zellulären Konsequenzen der BPDE-Behandlung spielen, wird im nächsten Abschnitt behandelt.

3.2.1 Konsequenzen der XPC-abhängigen SAPK-Aktivierung durch BPDE für das Zellwachstum

Werden proliferierende Zellen mit genotoxischen Agenzien behandelt, so werden DNA-abhängige Prozesse wie das Zellwachstum, der Zellzyklus und die Transkription gestoppt, um der Zelle Zeit zu geben, die vorhandenen DNA-Schäden zu reparieren. Übersteigt allerdings das Ausmaß der DNA-Schäden die Reparaturkapazität der Zelle, so kommt es zur Einleitung des Zelltodes. Die DNA-Reparatur ist demnach wichtig für das Überleben von Zellen nach Behandlung mit genotoxischen Agenzien. Werden NER-defiziente Zellen mit UV-Strahlung behandelt, so werden die UV-induzierten DNA-Schäden, zum Beispiel Thymidindimere, schlechter erkannt bzw. repariert als in NER-profizienten Zellen. In reparaturdefizienten Zellen sind daher quantitativ mehr DNA-Schäden detektierbar und für XPC-defiziente Zellen wurde gezeigt, dass sie sensitiver gegenüber UVC sind als Wildtypzellen

(Sugasawa, 2006). Im folgenden Abschnitt soll untersucht werden, welche Konsequenzen XPC-Defizienz für das zelluläre Schicksal nach BPDE-Exposition besitzt.

Welchen Einfluss hat XPC auf das zelluläre Überleben nach BPDE-Gabe? Die Bestimmung der Zellzahl durch Zugabe eines Farbstoffes, der proportional zur Zellzahl umgesetzt wird, kann das relative Überleben der behandelten Zellen bestimmt werden (siehe Kapitel 2.10). BPDE-Exposition XPC-defizienter Zellen, sowie entsprechender Wildtypzellen über drei Tage zeigt eine deutlich erhöhte Sensitivität der XPC-defizienten Zellen (Abb. 32).

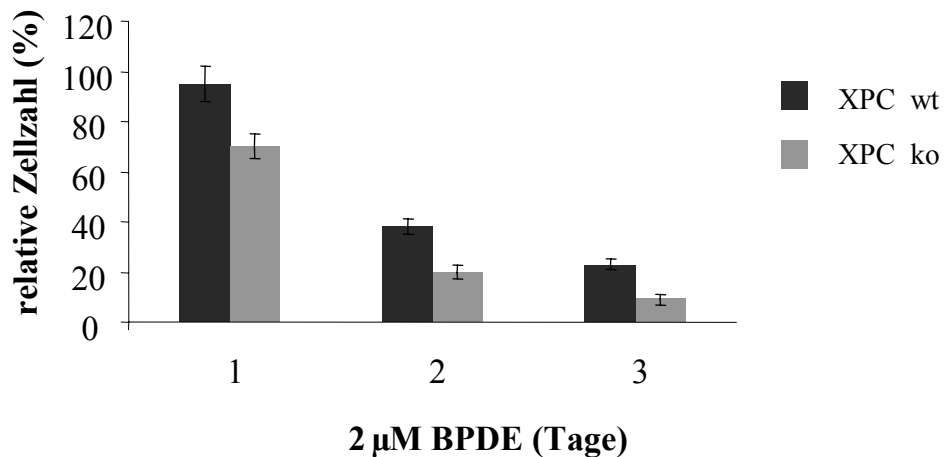


Abb. 32: XPC-Defizienz erhöht die Sensitivität gegenüber BPDE.

Logarithmisch wachsende XPC-defiziente und korrespondierende Wildtypzellen wurden als Triplikate ausgesät, einen Tag danach mit Lösungsmittel (DMSO) oder 2 µM BPDE behandelt und zu den angegebenen Zeiten die Zellzahl mit Hilfe des celltiter blue Assays (Promega) bestimmt. Angegeben ist die relative Zellzahl zur DMSO-Kontrolle.

Die XPC-defizienten Zellen zeigen, verglichen mit den korrespondierenden Wildtypzellen, eine erhöhte Sensitivität gegenüber BPDE. Dies ist wahrscheinlich auf das ausbleibende Erkennen der BPDE-DNA-Addukte zurückzuführen. Als Folge davon unterbleibt die Reparatur dieser Läsionen, die Zelle akkumuliert DNA-Schäden und die Zellen sind sensitiver als die XPC-Wildtypzellen. Die Rolle von p38 für die zelluläre Antwort auf BPDE soll im nächsten Abschnitt untersucht werden.

In Maushepatomzellen (Hepa1c1c7) bewirkt B[a]P, der Mutterkohlenwasserstoff von BPDE, konzentrationsabhängig eine Akkumulation und Phosphorylierung von p53 (Solhaug *et al.*, 2004). Die B[a]P-abhängige p53-Akkumulation wurde auch für humane Lungenadenokarzinomzellen (A549) und Mausfibroblasten (NIH3T3) gezeigt (Pei *et al.*, 1999). Diese p53-Akkumulation ist abhängig von der Bildung reaktiver B[a]P-Metabolite. Außerdem wird die p53-Akkumulation durch Wortmannin-Behandlung reduziert, was eine Beteiligung von PI3K-Signalwegen nahe legt (Sarkaria *et al.*, 1998). Behandlung von murinen Leberzellen mit B[a]P in einer Konzentration von 20 µM führt zur Apoptose der Zellen. Versuche mit einem Inhibitor von p53 (PFT-α) zeigen eine verringerte Apoptoserate und hemmen die Spaltung der Effektorcaspase 3, die normalerweise zur Einleitung der Apoptose führt

(Solhaug *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die B[a]P-induzierte Apoptose abhängig von p53 ist. Interessanterweise führt die Behandlung von Hepa1c1c7 mit geringeren B[a]P-Dosen (10 μ M) zur Aktivierung der Akt-Kinase, die an der Vermittlung des Zellüberlebens beteiligt ist. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass B[a]P-Behandlung (von 8 bis 30 Stunden) die MAPK ERK, JNK und p38 aktivieren kann (Solhaug *et al.*, 2004). Die Aktivierung der p38-Kinase durch B[a]P ist Voraussetzung für die B[a]P-induzierte Apoptose, denn Hemmung der p38 durch spezifische Inhibitoren reduziert die Apoptoserate.

Zur Untersuchung, welche Bedeutung die SAPK p38 nach BPDE-Behandlung für das zelluläre Überleben besitzt, wurden proliferierende p38 α -defiziente und Wildtypmausfibroblasten über einen Zeitraum von insgesamt drei Tagen mit 2 μ M BPDE behandelt und die relative Zellzahl bestimmt.

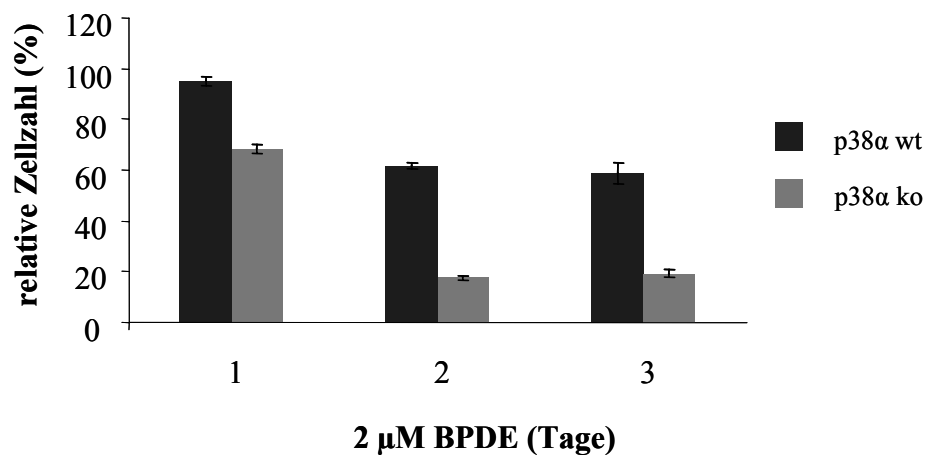


Abb. 33: p38 α -defiziente Mausfibroblasten sind, verglichen mit p38 α -Wildtypzellen, sensitiver gegenüber BPDE.

Logarithmisch wachsende p38 α -defiziente und -profiziente Mausfibroblasten (NIH3T3) wurden als Triplikate ausgesät, einen Tag danach mit Lösungsmittel (DMSO) oder 2 μ M BPDE behandelt und zu den angegebenen Zeiten die Zellzahl mit Hilfe des celltiter blue Assays (Promega) bestimmt. Angegeben ist die relative Zellzahl zur DMSO-Kontrolle.

Zu allen untersuchten Zeitpunkten nach BPDE-Behandlung sind weniger p38 α -defiziente Zellen als Wildtypzellen detektierbar. Die p38 α -defizienten Zellen zeigen, verglichen mit behandelten Wildtypzellen, eine erhöhte Sensitivität gegenüber BPDE (Abb. 33). JNK1/2-defiziente Fibroblasten weisen keine unterschiedliche Sensitivität im Vergleich zu korrespondierenden Wildtyp-Zellen auf, weshalb die JNK-Aktivierung wahrscheinlich nicht an der Regulation des Überlebens nach BPDE beteiligt ist und möglicherweise andere Funktionen besitzt (Daten nicht gezeigt).

Diese Versuche deuten darauf hin, dass sowohl p38 als auch XPC wichtig für das zelluläre Überleben nach BPDE-Behandlung sind. Die BPDE-induzierte Signaltransduktionskaskade, welche zur p38-Aktivierung führt, erhöht die Resistenz der BPDE-behandelten Zellen gegenüber diesem Gentoxin. Durch welchen zellulären Mechanismus ergibt sich die erhöhte Sensitivität der p38 α -defizienten Zellen, verglichen mit den Wildtypzellen? Eine Möglichkeit, die geringere Zellzahl der BPDE-behandelten p38 α -defizienten Zellen gegenüber den Wildtypzellen zu erklären, wäre eine erhöhte Apoptose- bzw.

Nekroserate. Die Bestimmung der Apoptose bzw. Nekrose von p38 α -Wildtyp- und Knockoutzellen nach BPDE-Behandlung ergab jedoch keinen Unterschied zwischen den beiden Zelllinien (mündliche Mitteilung von J.D.).

Eine andere Erklärung für die niedrigere Überlebensrate p38 α -defizienter Zellen ist eine mögliche Beeinträchtigung der Proliferation, verursacht durch die BPDE-Exposition. Diese Hypothese wurde durch Bestimmung der DNA-Neusynthese untersucht. Wie in Abb. 31 gezeigt, führt die Behandlung proliferierender Mausfibroblasten mit 2 μ M BPDE über mehrere Tage zur Reduktion der Zellzahl. Zur Untersuchung, ob die BPDE-Behandlung Auswirkungen auf den Zellzyklus hat, wurde die Zellproliferation mit Hilfe des BrdU Assays untersucht.

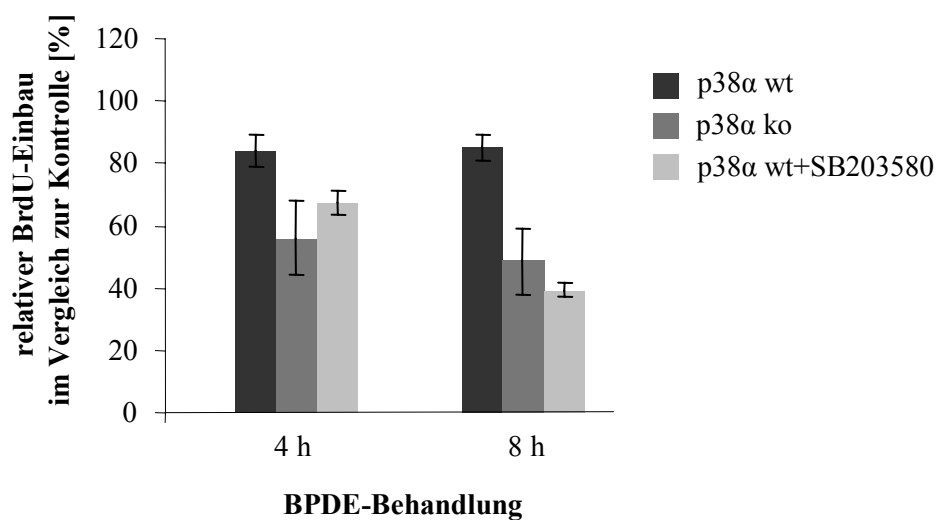


Abb. 34: p38-Defizienz bewirkt eine stärkere Hemmung der Proliferation, verursacht durch BPDE. Logarithmisch wachsende p38 α wt-, p38 α ko- und p38 α wt-Zellen, welche 15 Minuten vor der BPDE-Behandlung mit 25 μ M SB203580, einem Inhibitor der SAPK p38, behandelt wurden, wurden für vier und acht Stunden mit 2 μ M BPDE behandelt. Danach wurde für zwei Stunden BrdU zur Verfügung gestellt. Anschließend erfolgte die Fixierung und Denaturierung der Zellen. Nach BrdU-Detektion mit einem Peroxidase-gekoppelten monoklonalen Antikörper wurde das Peroxidase-Substrat Tetramethylbenzidin hinzugegeben und die Extinktion am ELISA-Reader bei 450 nm bestimmt.

Zur Untersuchung, ob BPDE in Abwesenheit von p38 die Proliferation stärker hemmt, was die niedrigere Zellzahl nach BPDE, verglichen mit Wildtypzellen, erklären könnte, wurde der BrdU Assay durchgeführt. Neben dem Vergleich von Wildtyp- und Knockoutzellen, wurden die p38 α -Wildtypzellen mit einem Inhibitor der p38-Kinase (SB203580) für 15 Minuten vor- und anschließend mit 2 μ M BPDE behandelt. Bereits eine vierstündige BPDE-Behandlung proliferierender Wildtypmausfibroblasten resultiert in einem deutlich reduzierten BrdU-Einbau gegenüber DMSO-behandelten Zellen. Die DNA-Neusynthese und die Zellproliferation reduzieren sich auf nur ca. 82% der kontrollbehandelten Zellen. Die BPDE-behandelten p38 α -defizienten Zellen zeigen eine stärkere Reduktion der Proliferationsrate, der BrdU-Einbau geht auf ca. 57% im Vergleich mit kontrollbehandelten Zellen zurück (Abb. 34). Die mit dem p38-Inhibitor (SB203580) vorbehandelten Wildtypzellen zeigen, ähnlich den p38 α -defizienten Zellen, einen vergleichbar reduzierten BrdU-Einbau nach BPDE-Behandlung,

verglichen mit der DMSO-Kontrolle (siehe Abb. 34). Ähnliche Ergebnisse liefert eine achtstündige BPDE-Behandlung. Der BrdU-Einbau der p38 α -Wildtypzellen reduziert sich nach BPDE-Gabe auf ca. 82% der DMSO-behandelten Zellen. Der BrdU-Einbau von p38 α -Knockoutzellen reduziert sich auf ungefähr 50% der DMSO-Kontrolle. Wildtypzellen, die mit einem Inhibitor von p38 vorbehandelt wurden zeigen mit nur ca.40% relativen BrdU-Einbaus die deutlichste Hemmung der Proliferation (Abb. 34).

Die reduzierte Zellzahl nach BPDE-Behandlung ist folglich nicht auf erhöhten Zelltod, sondern auf eine reduzierte Proliferationsrate zurückzuführen.

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass sowohl p38 α - als auch XPC-defiziente Zellen sensitiver gegenüber BPDE sind als entsprechend behandelte Wildtypzellen. Darüber hinaus konnte mit Hilfe des BrdU Assays und Verwendung eines Inhibitors der p38-Kinase gezeigt werden, dass in p38 α -defizienten Zellen, bzw. mit einem p38-Inhibitor vorbehandelten Wildtypzellen, BPDE-Exposition eine stärkere Hemmung der Proliferationsrate bewirkt als in BPDE-behandelten Wildtypzellen.

Im nächsten Abschnitt soll die Bedeutung von DNA-Schäden für die Gentoxin-induzierte SAPK-Aktivierung untersucht werden.

3.3 Rolle von DNA-Strangbrüchen in der Gentoxin-induzierten SAPK-Aktivierung

In Folge der BPDE-Behandlung von Mausfibroblasten kommt es zur Induktion von DNA-Strangbrüchen (Abb. 23). Das Auftreten dieser Einzelstrangbrüche korreliert zeitlich mit der SAPK-Aktivierung. Andere Gentoxine, die zur Induktion von Strangbrüchen führen, sind zum Beispiel Inhibitoren der zellulären Topoisomerase. Eukaryotische Topoisomerasen sind an allen Reaktionen beteiligt, die mit einer topologischen Änderung der DNA verbunden sind. Dazu gehören auch die Replikation und die Transkription der DNA. Zusammenfassend sind Topoisomerasen essentiell bei allen Reaktionen, bei denen sich die Zahl der Helixwindungen ändert und Verdrillungen der DNA-Stränge auftreten. Durch die Aktivität von Topoisomerasen entstehen transient entweder Einzelstrangbrüche (Topoisomerase I) oder Doppelstrangbrüche (Topoisomerase II). Wird die enzymatische Aktivität der Topoisomerasen durch Inhibitoren gehemmt, während gerade die DNA geschnitten wurde, kommt es zur Entstehung von persistierenden Strangbrüchen (Binaschi *et al.*, 1995; Sordet *et al.*, 2003; Wilstermann und Osheroff, 2003).

Zur Untersuchung, ob die SAPK-Induktion abhängig von DNA-Strangbrüchen ist, wurden verschiedene Induktoren für DNA-Strangbrüche untersucht. Zur Induktion von Einzelstrangbrüchen diente ein Inhibitor der Topoisomerase I (Camptothecin) und ein Inhibitor der Topoisomerase II (Doxorubicin) diente der Einführung von Doppelstrangbrüchen. Zur Überprüfung der Reaktivität dieser Agenzien in

dem verwendeten Zellsystem (NIH3T3), d.h. ob die Topoisomerasehemmung DNA-Strangbrüche induziert, wurden der alkalische und der neutrale Comet Assay durchgeführt.

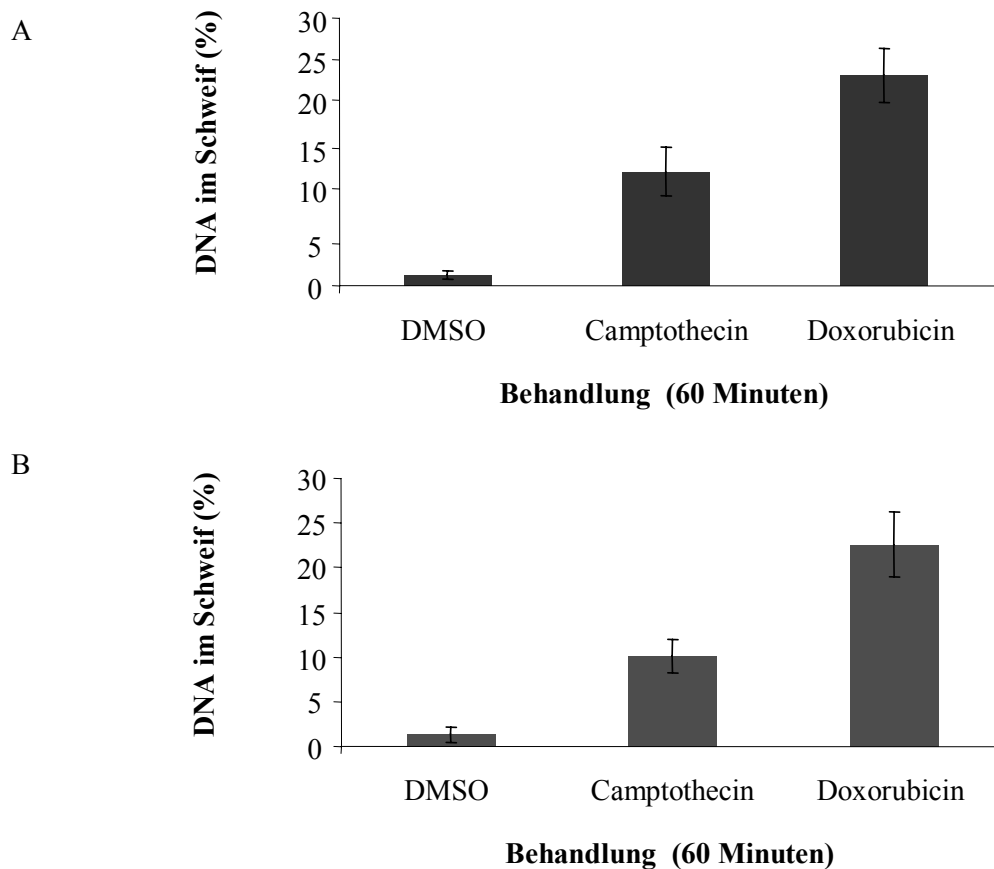


Abb. 35: In proliferierenden Mausfibroblasten induzieren Topoisomeraseinhibitoren DNA-Strangbrüche (NIH3T3).

Logarithmisch wachsende NIH3T3-Wildtypmausfibroblasten wurden mit 10 μ M Doxorubicin, 10 μ M Camptothecin oder DMSO für 60 Minuten behandelt. Die Zellen wurden, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, dem alkalischen (A) und neutralen (B) Comet Assay unterzogen. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop mit der Auswertungssoftware Viscomet 1.6.2. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der DNA im Schweif als Maß für die geschädigte DNA.

In Abb. 35 ist das Ergebnis des alkalischen Comet Assays dargestellt. Weil unter den alkalischen Bedingungen während der Lyse und Elektrophorese die DNA der behandelten Zellen denaturiert wird, d.h. die DNA-Stränge nicht mehr durch Wasserstoffbrücken verbunden sind, werden mit dem alkalischen Comet Assay sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche detektiert. Vergleicht man den Prozentsatz der DNA im Schweif, als Maß für das strangbruchinduzierende Potential der verwendeten Substanzen, so induziert die Lösungsmittelkontrolle DMSO keine signifikanten Strangbrüche, es sind nur ca. 2-3% der Gesamt-DNA während der Elektrophorese aus dem Kern in den Schweif gewandert. Nach einer einstündigen Behandlung der Zellen mit Camptothecin, einem der Topoisomerase I-Inhibitor und Einzelstrangbruch-Induktor, erhöht sich der prozentuale Anteil der DNA im Schweif auf ca. 17%. Behandlung mit Doxorubicin, einem Topoisomerase II-Inhibitor und Doppelstrangbruch-Induktor,

erhöht die DNA-Strangbruchrate auf fast 30%. Die Durchführung des neutralen Comet Assays mit DMSO-, Camptothecin- und Doxorubicin-behandelten Zellen zeigt ein ähnliches Ergebnis wie der alkalische Comet Assay. DMSO-Behandlung induziert keine signifikante Induktion von Strangbrüchen. Lediglich 2-3% der Kern-DNA sind in den Schweif migriert. Camptothecin-Behandlung führt dazu, dass ca. 10% der Kern-DNA in den Schweif wandern. Doxorubicin bewirkt das stärkste Ausmaß an DNA-Doppelstrangbrüchen, ca. 25% der nukleären DNA sind in den Schweif migriert (Abb. 35). Vergleicht man die Camptothecin-induzierte Strangbruchrate im alkalischen und neutralen Comet Assay miteinander, so wird im alkalischen Comet Assay ca. 7% mehr DNA im Schweif detektiert als mit dem neutralen Comet Assay, der nur DNA-Doppelstrangbrüche detektiert. Die Differenz von 7% DNA im Schweif, detektiert durch den alkalischen Comet Assay, ist demnach Resultat von DNA-Einzelstrangbrüchen. Somit induziert Camptothecin sowohl Doppel- als auch Einzelstrangbrüche. Die Quantität der DNA-Strangbrüche durch Doxorubicin ist im alkalischen und neutralen Comet Assay fast identisch. Die mit Hilfe des alkalischen Comet Assays detektierten Strangbrüche sind also DNA-Doppelstrangbrüche. Ob Camptothecin und Doxorubicin als Induktoren von DNA-Strangbrüchen die SAPK p38 und JNK aktivieren können, wird im folgenden Abschnitt untersucht. Die SAPK-Induktion durch diese Gentoxine wurde im Western Blot mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper gegen JNK und p38 untersucht.

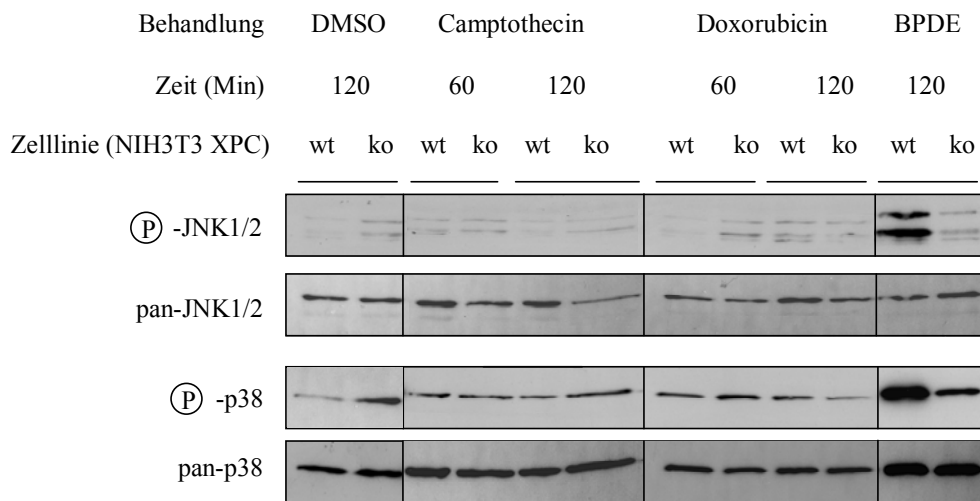


Abb. 36: SAPK-Induktion durch Strangbruchinduktoren in XPC-Wildtyp- und Knockoutfibroblasten. Konfluent gewachsene XPC-defiziente und -profiziente immortalisierte Mausfibroblasten (NIH3T3) wurden über Nacht serumgehungert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 60 und 120 Minuten mit 10 μ M Camptothecin bzw. 10 μ M Doxorubicin und für 120 Minuten mit 2 μ M BPDE bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung von p38 und JNK bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Proteine.

Wie in Abb. 36 gezeigt, induzieren weder Camptothecin noch Doxorubicin eine signifikante SAPK-Aktivierung obwohl sie DNA-Strangbrüche induzieren (Abb. 35). Die Induktion von DNA-Einzel- bzw. Doppelstrangbrüchen durch Topoisomerase-Inhibitoren ist anscheinend nicht ausreichend

für die Aktivierung der SAPK. Wie bereits gezeigt, induziert BPDE sowohl DNA-Einzelstrangbrüche als auch die Aktivierung der SAPK. Möglicherweise führen die BPDE-induzierten DNA-Einzelstrangbrüche über einen anderen Mechanismus zur SAPK-Induktion als die Camptothecin- bzw. Doxorubicin-induzierten Einzel- und Doppelstrangbrüche. Diese Möglichkeit wird im folgenden Abschnitt untersucht.

3.3.1 DNA-Einzelstrangbrüche sind nicht notwendig für die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung

Die Rolle von BPDE-induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen für die SAPK-Aktivierung wurde mit Hilfe XPC-defizienter Zellen untersucht. XPC spielt eine zentrale Rolle bei der Detektion und Reparatur von DNA-Läsionen bei der GER. XPC detektiert NER-spezifische Läsionen und in Folge dessen werden im folgenden Reparaturverlauf u.a. Nukleasen zur Läsion rekrutiert, welche sowohl die geschädigte Base als auch umliegende Nukleotide entfernt. Welche Konsequenzen hat das Fehlen des NER-Proteins XPC für die Entstehung von BPDE-induzierten Strangbrüchen? Wie gezeigt, induziert bereits eine 30-minütige Inkubation mit BPDE deutlich DNA-Strangbrüche in Wildtypmausfibroblasten (Abb. 23). Zum Test, welche Bedeutung das XPC-Protein für die BPDE-induzierten DNA-Schäden besitzt, wurde der alkalische Comet Assay mit XPC-Wildtyp- und XPC-Knockout-Mausfibroblasten durchgeführt.

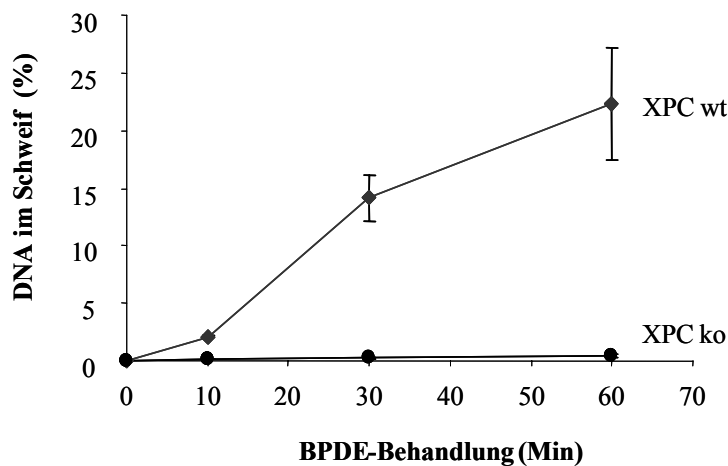


Abb. 37: BPDE-induzierte DNA-Schäden sind abhängig von XPC.

Konfluent gewachsene und über Nacht serumgehungerte XPC-defiziente bzw. Wildtypmausfibroblasten (NIH3T3) wurden mit 2 μ M BPDE bzw. dem Lösungsmittel DMSO für 10, 30 und 60 Minuten behandelt. Die Zellen wurden, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, dem alkalischen Comet Assay unterzogen. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop mit der Auswertungssoftware Viscomet 1.6.2. Zur Auswertung wurde das Ausmaß der DNA-Schäden von 100 Zellen/Behandlung gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert des prozentualen Anteils der DNA im Schweif \pm Standardabweichung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

In Abb. 37 ist das Ergebnis des alkalischen Comet Assays dargestellt. BPDE induziert in XPC-Wildtypmausfibroblasten bereits nach einer Behandlungszeit von 10 Minuten DNA-Strangbrüche.

Nach 60-minütiger Behandlung steigt der Prozentsatz der DNA im Schweif auf fast 25% der Gesamt-DNA. In XPC-defizienten Zellen hingegen induziert BPDE keine DNA-Strangbrüche. BPDE-Behandlung führt demnach abhängig von XPC zur Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen. Darüber hinaus ist in XPC-defizienten Zellen die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung stark reduziert (Abb. 26). Es wäre daher möglich, dass die SAPK-Aktivierung entweder abhängig von der Erkennung des BPDE-induzierten DNA-Schadens durch XPC oder von BPDE-induzierten DNA-Strangbrüchen selbst ist. Im nächsten Abschnitt soll zwischen beiden Möglichkeiten mit Hilfe XPA-defizienter Zellen unterschieden werden. XPA ist ebenfalls ein an der NER beteiligtes Protein und ist für die Rekrutierung des TFIIH-Komplexes und somit auch für die Rekrutierung der Helikasen und Nukleasen zuständig. An diesem Punkt vereinigen sich die beiden Wege der NER (Abb. 5).

Welche Bedeutung besitzt XPA für die Entstehung von BPDE-abhängigen DNA-Strangbrüchen? Um diese Frage zu untersuchen, wurden XPA-defiziente und korrespondierende Wildtypmausfibroblasten für verschiedene Zeitpunkte mit BPDE behandelt. Die Entstehung von DNA-Strangbrüchen wurde mit Hilfe des alkalischen Comet Assays untersucht.

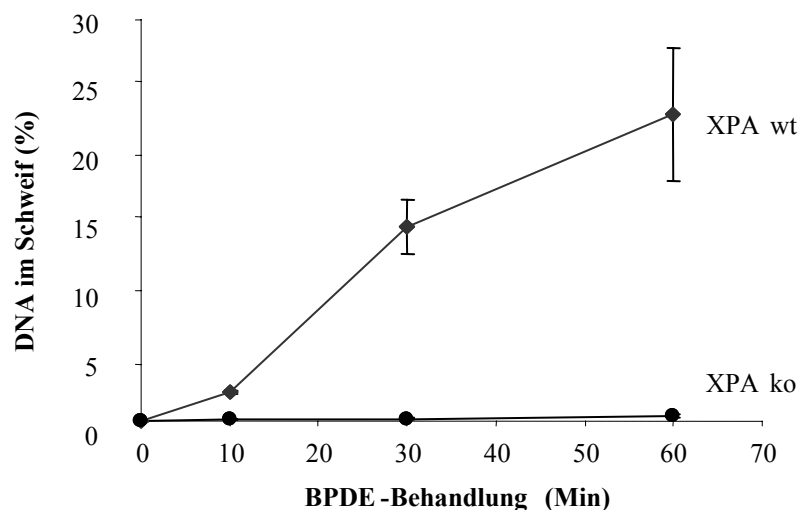


Abb. 38: BPDE-induzierte DNA-Schäden sind abhängig von XPA.

Konfluent gewachsene und über Nacht serumgehungerte XPA-defiziente bzw. Wildtypmausfibroblasten (NIH3T3) wurden für 10, 30 und 60 Minuten mit 2 μ M BPDE bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die Zellen wurden, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, dem alkalischen Comet Assay unterzogen. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop mit der Auswertungssoftware Viscomet 1.6.2. Zur Auswertung wurde das Ausmaß der DNA-Schäden von 100 Zellen/Behandlung gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert des prozentualen Anteils der DNA im Schweif \pm Standardabweichung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Wie in Abb. 38 zu sehen, induziert BPDE auch bei bis zu 60-minütiger Behandlung in XPA-defizienten Mausfibroblasten keine DNA-Strangbrüche, gemessen als prozentualer Anteil der DNA im Schweif. In XPA-Wildtypzellen hingegen beginnt die DNA-Strangbruchrate bereits nach 10 Minuten anzusteigen. Nach einer Behandlungszeit von 30 Minuten sind bereits ca. 15% der Kern-DNA in den Schweif gewandert, nach der maximalen Behandlungsdauer von 60 Minuten ca. 25%. Die Induktion von DNA-

Strangbrüchen durch BPDE ist demnach abhängig sowohl von XPA als auch von XPC. Ohne XPA werden keine Helikasen und Nukleasen rekrutiert und aus diesem Grund induziert BPDE in XPA-defizienten Zellen keine DNA-Strangbrüche. Ist das Ausbleiben der BPDE-induzierten DNA-Strangbrüche in XPA-defizienten Zellen, wie für XPC-defiziente Zellen gezeigt, verbunden mit ausbleibender SAPK-Aktivierung?

3.4 Ist die BPDE-induzierte Phosphorylierung von JNK und p38 abhängig von XPA?

Zur Untersuchung, ob XPA spezifisch zur Aktivierung der SAPK durch BPDE benötigt wird, wurden XPA-defiziente und XPA-profiziente Mausfibroblasten (NIH3T3) mit BPDE behandelt. Die Aktivierung der SAPK wurde im Western Blot mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper untersucht.

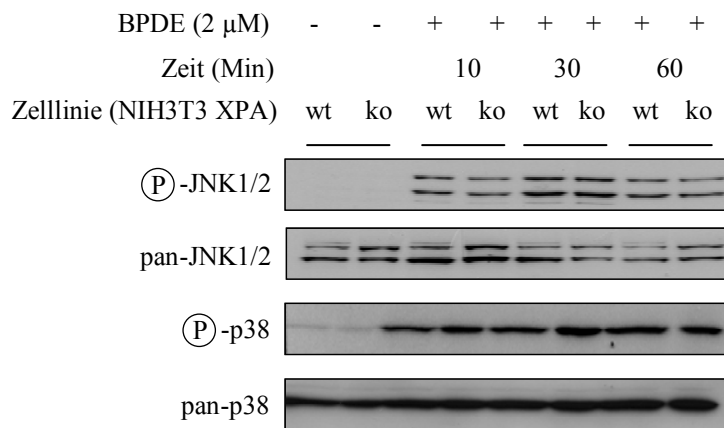


Abb. 39: Die BPDE-induzierte p38- und JNK-ist unabhängig von XPA.

Konfluent gewachsene XPA-defiziente und -profiziente immortalisierte Mausfibroblasten (NIH3T3) wurden über Nacht serumgehungert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 10, 30 und 60 Minuten mit 2 μ M BPDE bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung von p38 und JNK bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Proteine.

Abb. 39 zeigt die BPDE-abhängige Phosphorylierung von JNK und p38 in XPA-Knockout und Wildtypmausfibroblasten. In beiden untersuchten Zelllinien induziert die Behandlung mit 2 μ M BPDE eine Aktivierung der SAPK. Zu allen untersuchten Zeitpunkten sind keine Unterschiede der Phosphorylierungsintensität zwischen beiden untersuchten Zelllinien erkennbar.

Der NER-Reparaturfaktor XPA scheint demnach keine Voraussetzung für die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung zu sein. Obwohl BPDE in XPA-defizienten Zellen keine Strangbrüche induziert, werden trotzdem die SAPK aktiviert. Wie mit Hilfe der Topoisomeraseinhibitoren bereits gezeigt, scheinen DNA-Strangbrüche keine Voraussetzung für die SAPK-Aktivierung zu sein. Wenn die ausbleibenden BPDE-induzierten DNA-Einzelstrangbrüche in XPC-defizienten Zellen nicht die Ursache für die

fehlende SAPK-Aktivierung sind, wofür wird dann XPC benötigt? Eine Möglichkeit ist die Abhängigkeit der SAPK-Aktivierung von der Erkennung der BPDE-induzierten DNA-Läsionen durch XPC. Ist dies der Fall, so würden DNA-Läsionen, die nur schlecht durch XPC erkannt werden, lediglich ein geringes Potential zur SAPK-Aktivierung besitzen.

3.5 Untersuchung Benzo[c]phenanthren-3,4-Diol-1,2-Epoxid-induzierter DNA-Schäden mit Hilfe des alkalischen Comet Assays

Im vorhergehenden Abschnitt wurde gezeigt, dass die Induktion von DNA-Strangbrüchen zur Aktivierung der SAPK nicht ausreichend ist. Die Möglichkeit, dass die Erkennung der BPDE-induzierten DNA-Schäden durch XPC Voraussetzung für die SAPK-Aktivierung ist, soll mit Hilfe eines PAK untersucht werden, dessen DNA-Addukte nur sehr schlecht von XPC erkannt und repariert werden. Ein solcher PAK ist Benzo[c]phenanthren-3,4-Diol-1,2-Epoxid (B[c]PhenDE), dessen DNA-Addukte nur geringfügig repariert werden verglichen mit zum Beispiel BPDE-induzierten PAK-DNA-Addukten (Buterin *et al.*, 2000). Induziert B[c]PhenDE, entsprechend der beeinträchtigten Erkennung der B[c]PhenDE-DNA-Addukte durch XPC, eine geringere SAPK-Aktivierung als BPDE? Zuerst sollte mit Hilfe des alkalischen Comet Assays untersucht werden, ob B[c]PhenD-DNA-Addukte, wie in der Literatur beschrieben (Buterin *et al.*, 2000), schlechter als BPDE-DNA-Addukte erkannt und repariert werden.

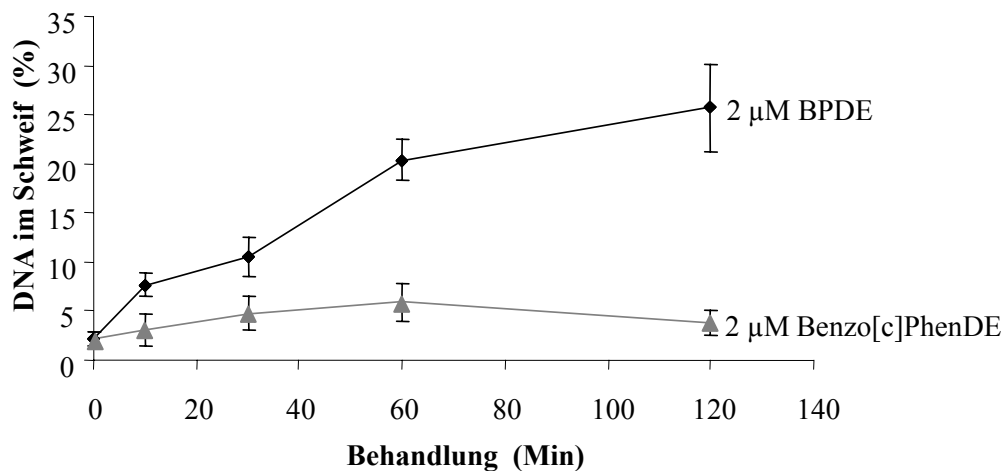


Abb. 40: Benzo[c]phenanthren-3,4-Diol-1,2-Epoxid (B[c]PhenDE) induziert keine DNA-Strangbrüche.

Konfluent gewachsene, über Nacht serumgehungerte NIH3T3-Wildtypmausfibroblasten wurden mit 2 μM BPDE bzw. 2 μM B[c]PhenDE für 10 bis 60 Minuten bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die Zellen wurden, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, dem alkalischen Comet Assay unterzogen. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop mit der Auswertungssoftware Viscomet 1.6.2.

Abb. 40 zeigt das Ergebnis des alkalischen Comet Assays von B[c]PhenDE- und BPDE-behandelten konfluenten, serumgehungerten Mausfibroblasten. Betrachtet man die zeitliche Kinetik der entstandenen Strangbrüche, so induziert B[c]PhenDE nach zehnminütiger Behandlung nur eine geringe DNA-Migration in den Kometenschweif, die nicht signifikant höher ist als in der DMSO-Kontrolle. Auch eine längerfristige Behandlung mit B[c]PhenDE erhöht die Anzahl der DNA-Strangbrüche nicht. Nach 120-minütiger B[c]PhenDE-Behandlung ist wieder der Ausgangswert erreicht. Grundsätzlich übersteigt der Prozentsatz der DNA im Kometenschweif nach B[c]PhenDE-Behandlung nie 5% und liegt damit nur gering über dem Wert der Kontrollbehandlung von ca. 3%.

Im Gegensatz zu B[c]PhenDE induziert BPDE, wie bereits gezeigt (Abb. 23), bereits nach 10 Minuten signifikant DNA-Schäden in konfluenten Wildtypmausfibroblasten (Migration von ca. 8% fragmentierter Kern-DNA in den Kometenschweif). Mit zunehmender Behandlungsdauer steigt auch die Anzahl der BPDE-induzierten DNA-Schäden, gemessen als in den Schweif gewanderte, fragmentierte DNA, kontinuierlich an. Nach der maximalen Behandlungszeit von 120 Minuten sind bereits ca. 25% der DNA aus dem Kern in den Schweif gewandert.

Verglichen mit BPDE induziert B[c]PhenDE keine signifikante Erhöhung von DNA-Strangbrüchen. Dies ist wahrscheinlich auf die schlechtere Erkennung von B[c]PhenDE-DNA-Addukten zurückzuführen. Ob das Ausbleiben der Detektion der B[c]PhenDE-DNA-Addukte Konsequenzen auf die SAPK-Aktivierung besitzt, wird im nächsten Abschnitt untersucht.

3.6 Induziert B[c]PhenDE, dessen DNA-Addukte nicht durch XPC erkannt werden, die SAPK p38 und JNK?

Wie in Abb. 40 dargestellt, induziert die Behandlung von Mausfibroblasten mit B[c]PhenDE keine DNA-Strangbrüche. Wahrscheinlich beruht diese Eigenschaft auf der schlechten Erkennung der B[c]PhenDE-DNA-Addukte durch XPC (Buterin *et al.*, 2000). Ist B[c]PhenDE dazu in der Lage, die SAPK zu aktivieren oder ist die SAPK-Aktivierung von der Erkennung von DNA-Addukten abhängig? Um diese Frage zu beantworten, wurden Wildtypmausfibroblasten (NIH3T3) für verschiedene Zeiten mit B[c]PhenDE behandelt und die p38- und JNK-Aktivierung mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper im Western Blot untersucht.

Ergebnisse

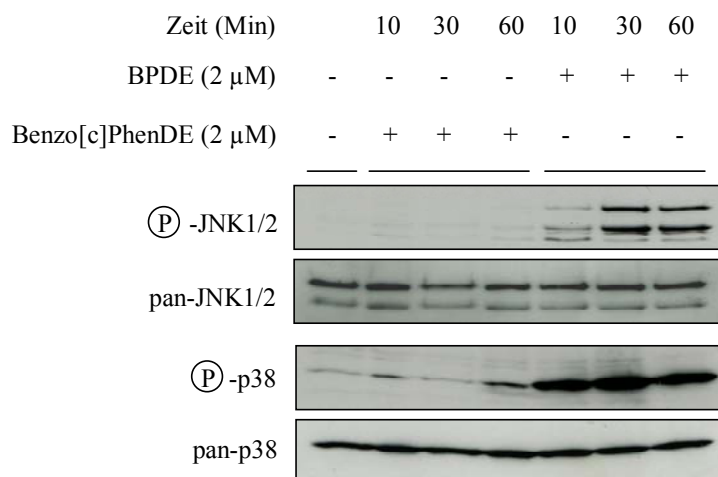


Abb. 41: B[c]PhenDE induziert, im Gegensatz zu BPDE, keine signifikante p38- und JNK-Phosphorylierung.

Konfluent gewachsene immortalisierte Mausfibroblasten (NIH3T3) wurden über Nacht serumgehungert und anschließend für 10, 30 und 60 Minuten mit 2 μ M BPDE, 2 μ M B[c]PhenDE bzw. dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Die Gesamtzellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe von Western Blot-Analyse und phosphospezifischen Antikörpern wurde die Phosphorylierung von p38 und JNK bestimmt. Als Ladekontrolle diente die Detektion der Membran mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierten Proteine.

In Abb. 41 ist gezeigt, dass B[c]PhenDE-Behandlung zu keinem untersuchten Zeitpunkt (10 bis 60 Minuten) eine signifikante Phosphorylierung der SAPK JNK und p38 induziert. BPDE hingegen induziert bereits nach 10-minütiger Behandlung eine deutliche Aktivierung der SAPK, die mit steigender Behandlungsdauer an Intensität zunimmt. Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass B[c]PhenDE, anders als BPDE, keine DNA-Strangbrüche induziert. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass B[c]PhenDE-DNA-Addukte schlecht oder gar nicht durch NER-Proteine (zum Beispiel XPC) erkannt werden. Darüber hinaus induziert B[c]PhenDE, im Gegensatz zu BPDE, keine SAPK-Phosphorylierung. Ausgehend von diesen Ergebnissen scheint die BPDE-induzierte SAPK-Induktion von der Erkennung der BPDE-DNA-Addukte durch XPC abhängig zu sein.

4 DISKUSSION

Wie in der Einleitung beschrieben, sind polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) ubiquitäre Verschmutzungen der Umwelt. Sie entstehen durch unvollständige Verbrennung von organischem Material und sind unter anderem in Auto- und Industrieabgasen, aber auch in gegrilltem Fleisch und Zigarettenrauch enthalten. Unter den PAK ist Benzo[a]pyren (B[a]P) der wahrscheinlich bekannteste Vertreter und dient als Leitsubstanz für die Messung von PAK-Verunreinigungen der Umwelt und der PAK-Exposition von zum Beispiel Arbeitsplätzen. Über die Atemluft oder die Nahrung in den Körper aufgenommen, wird B[a]P durch Enzyme des Fremdstoffmetabolismus umgesetzt. Diese so genannte metabolische Aktivierung führt unter anderem zur Bildung des reaktiven, elektrophilen Moleküls Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE), welches auf Grund der genannten Eigenschaften an zelluläre Makromoleküle wie DNA und Proteine binden kann. Die kovalente Bindung von BPDE an die DNA-Basen Guanin oder Adenin resultiert in der Entstehung von Mutationen, wenn diese BPDE-DNA-Addukte nicht durch DNA-Reparaturmechanismen entfernt werden. Manifestieren sich diese Mutationen im Genom, können Gewebezellen zu Tumorzellen transformieren.

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war die Untersuchung BPDE-induzierter intrazellulärer Signalkaskaden in murinen Fibroblasten. Darüber hinaus sollten die Mechanismen dieser Signalkaskaden und die sich aus der Induktion der Signalkaskaden ergebenden Konsequenzen bezüglich des zellulären Schicksals untersucht werden.

Für viele (gen)toxische Agenzien ist bekannt, dass sie intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren können, an denen u.a. die Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK) JNK (c-Jun N-terminale Proteinkinase) und p38 und die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) ERK („extracellular signal regulated kinase“), beteiligt sind. SAPK werden durch zelluläre Stressfaktoren wie z.B. UV-Strahlung, ionisierende Strahlung und osmotischen Stress, aber auch durch Zytokine aktiviert. Die MAPK ERK hingegen wird hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren, aber auch durch Tumorpromotoren wie zum Beispiel Phorbolester (z.B. TPA, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat) aktiviert (Chen *et al.*, 1996; Bulavin und Fornace, 2004). Die durch verschiedene Stimuli ausgelösten intrazellulären Signalkaskaden sind u.a. wichtig für die Reaktion der betroffenen Zelle auf veränderte Umweltbedingungen.

4.1 BPDE-induzierte intrazelluläre Signalkaskaden

Zuerst soll auf die zentrale Frage eingegangen werden, welchen Einfluss BPDE-Behandlung auf die MAPK ausübt. Werden die MAPK ERK bzw. die zu den MAPK gehörenden SAPK (Stress-aktivierte Proteinkinasen) p38 und JNK durch BPDE-Behandlung aktiviert? Zur Beantwortung dieser Frage wurden spontan-immortalisierte NIH3T3-Mausfibroblasten untersucht. Diese Zelllinie

eignet sich sehr gut zur Untersuchung intrazellulärer Signalwege, da eine Reihe von etablierten Knockout-Zelllinien und dazu korrespondierenden Wildtyp-Zelllinien verfügbar sind, welche defizient für verschiedene an Signalkaskaden beteiligte Proteine sind.

Um die Aktivierung BPDE-induzierter Signalkaskaden zu untersuchen, wurden NIH3T3-Wildtypzellen für verschiedene Zeitpunkte (10 bis 120 Minuten) mit BPDE behandelt und die Aktivierung von ERK, JNK und p38 im Western Blot mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper untersucht. Wie in Abb. 13 gezeigt, werden die SAPK p38 und JNK innerhalb kurzer Zeit aktiviert und diese Aktivierung persistiert über mehrere Stunden. Verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO wird die MAPK ERK durch BPDE erst nach 120 Minuten aktiviert. Diese Aktivierung ist jedoch, verglichen mit der Positivkontrolle EGF („epidermal growth factor“), nur sehr schwach. Damit konnte zum ersten Mal eine Aktivierung von p38 und JNK im Minutenbereich nach BPDE-Behandlung detektiert werden. Um die dieser Signaltransduktionskaskade zu Grunde liegenden Mechanismen zu untersuchen, wurde in den darauf folgenden Experimenten die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung im Zeitraum von bis zu 60 Minuten untersucht.

Wie in der Einleitung beschrieben, entsteht BPDE durch metabolische Aktivierung des chemisch nahezu inerten Moleküls B[a]P (Kapitel 1.1.3). Werden die SAPK p38 und JNK auch durch den nicht-reaktiven PAK B[a]P aktiviert oder ist die elektrophile Epoxidgruppe des BPDE essentiell für die SAPK-Aktivierung? Im Gegensatz zu einer einstündigen BPDE-Behandlung induziert die einstündige B[a]P-Behandlung weder JNK noch p38 (Abb. 13). Dies deutet darauf hin, dass für die SAPK-Aktivierung die Epoxidgruppe, bzw. die reaktiven Eigenschaften, des BPDE wichtig sind.

Welche intrazellulären Signalmoleküle an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung beteiligt sind, wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

4.1.1 Welche intrazellulären Signalkaskaden führen zur BPDE-abhängigen SAPK-Aktivierung?

Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei Publikationen veröffentlicht, die sich mit der schnellen, durch Diolepoxide (BPDE bzw. 5-Methylchrysen-1,2-diol-3,4-epoxid) induzierten, Aktivierung von Signalkaskaden befassen (Li *et al.*, 2004a; Li *et al.*, 2004b). Li *et al.* konnten zeigen, dass BPDE in epidermalen murinen Zellen (Cl41) eine Signalkaskade induziert, an der die PI3-Kinase und Akt beteiligt sind. Als Endpunkt dieser Signalkaskade wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 gemessen. Durch die Vorbehandlung mit chemischen Inhibitoren der PI3-Kinase, LY294002 und Wortmannin, konnte die BPDE-induzierte Aktivierung von AP-1 verhindert werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass an der BPDE-induzierten Signalkaskade die SAPK JNK beteiligt ist, denn die Aktivierung sowohl der JNK als auch des Transkriptionsfaktors AP-1 (Aktivator-Protein-1) ließ sich durch Überexpression einer dominant-negativen, katalytisch-inaktiven Mutante von Akt verhindern. PI3-Kinase und Akt sind also wahrscheinlich an den BPDE-induzierten Signalwegen in

Cl41-Zellen beteiligt. Trifft diese Aussage auch auf murine Fibroblasten (NIH3T3) zu? Diese Frage wurde durch zwei verschiedene Ansätze untersucht. Der erste Ansatz basiert auf der Tatsache, dass die verschiedenen Faktoren bzw. Proteine einer Signalkaskade zeitlich versetzt aktiviert werden. Ein Protein, das in der Aktivierungskaskade nahe der eigentlichen Signalgenerierung liegt, wird früher aktiviert als ein Protein, das am Ende der Kaskade angesiedelt ist. Wird nun durch BPDE eine Signalkaskade induziert, in der zuerst die PI3-Kinase und Akt aktiviert werden und deren Aktivierung notwendig ist für die SAPK-Aktivierung, so müssten die PI3-Kinase und Akt zeitlich früher aktiviert werden als JNK und p38. Diese Fragestellung wurde an vier verschiedenen Zelllinien (p38 α -defizienten und korrespondierenden Wildtypmausfibroblasten und JNK1/2-defizienten und korrespondierenden Wildtypmausfibroblasten) untersucht. In drei der vier untersuchten Zelllinien korrespondiert die Akt-Aktivierung nicht mit der SAPK-Aktivierung. So wird in einigen Mausfibroblastenzelllinien (JNK1/2 ko, p38 α wt und p38 α ko) die Akt-Kinase durch BPDE, im Vergleich mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO, nicht spezifisch aktiviert, die SAPK hingegen werden zeitabhängig aktiviert (Abb. 16). Daraus lässt sich schließen, dass BPDE in verschiedenen Zellen eine Signalkaskade induziert, durch die JNK und p38 aktiviert werden, die aber unabhängig von der Akt-Kinase-Aktivierung ist.

Zur weiteren Untersuchung der Beteiligung von PI3-Kinase und Akt an den BPDE-induzierten Signalwegen wurden Zellen, die in dem vorherigen Versuch eine deutliche Akt-Aktivierung durch BPDE zeigten, mit einem Inhibitor der PI3-Kinase, Wortmannin, vorbehandelt. Steigende Wortmanninkonzentrationen inhibieren die BPDE-induzierte Aktivierung der Akt-Kinase bis zur völligen Hemmung der Akt-Phosphorylierung. Die BPDE-induzierte Aktivierung von p38 und JNK ist durch die Wortmannin-Vorbehandlung allerdings nicht beeinflusst, sie zeigen auch mit der höchsten Wortmannin-Konzentration keine Änderungen in ihrer Aktivierung bzw. Phosphorylierung (Abb. 17). Sowohl aus den Kinetik- als auch den Inhibitor-Experimenten kann man schließen, dass an der BPDE-induzierten p38- und JNK-Aktivierung die PI3-Kinase und Akt keine Rolle spielen. Eine BPDE-induzierte Akt-Aktivierung ist demnach keine Voraussetzung für die Aktivierung von JNK und p38. Dies widerspricht nicht unbedingt den publizierten Ergebnissen, da es sich um unterschiedliche Zelllinien handelt. Es wäre möglich, dass BPDE in verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Signalkaskaden induziert, die zu einer SAPK-Aktivierung führen. Außerdem wurden die publizierten Experimente u.a. durch Überexpression rekombinanter Kinasen durchgeführt. Überexpression einer dominant-negativen Akt-Mutante, bei der sowohl das Tyrosin³⁰⁸ als auch das Serin⁴⁷³, welche zur Akt-Aktivierung durch PDK („PI-dependent kinase“, PI-abhängige Kinase) phosphoryliert werden, mit Alanin ersetzt wurde, führt in Cl41-Zellen zur Hemmung der SAPK-Aktivierung durch BPDE. Die dauerhafte Expression einer dominant-negativen Form von Akt könnte, als Nebeneffekt, zur Herunterregulierung von zellulären Faktoren, zum Beispiel Signalmolekülen, geführt haben, deren Aktivierung allgemein wichtig für die SAPK-Aktivierung ist. Die detektierte Hemmung der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung in Zellen mit dominant-negativer Akt-Kinase wäre demnach

kein direkter Effekt fehlender Akt-Aktivierung. Zur Klärung dieser Frage hätte man die Zellen, welche die dominant-negative Akt-Kinase exprimieren, mit anderen bekannten Induktoren der SAPK, wie zum Beispiel Anisomyzin oder UV-Strahlung, behandeln können, deren Signalkaskade unabhängig von Akt ist. Wenn diese Stimuli noch zu einer SAPK-Aktivierung geführt hätten, wäre die detektierte Hemmung der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung spezifisch. Eine andere Möglichkeit zur Untersuchung der direkten Abhängigkeit der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung von vorheriger Akt-Aktivierung in murinen Epithelzellen wäre die Hemmung der Akt durch den chemischen Inhibitor Wortmannin und die Untersuchung der SAPK-Aktivierung durch kurzzeitige BPDE-Behandlung gewesen, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde. Beide Versuchsansätze wurden jedoch von Li *et al.* leider nicht untersucht.

In immortalisierten Mausfibroblasten induziert BPDE die Aktivierung der Akt-Kinase, die jedoch nicht zur Aktivierung der SAPK benötigt wird. Es liegt daher nahe, dass es sich um zwei unabhängige Signalkaskaden handelt. Welche Bedeutung hat die Akt-Aktivierung durch BPDE für die behandelte Zelle? Es ist bekannt, dass Akt in Folge der Aktivierung der PI3-Kinase durch Wachstumsfaktoren, zum Beispiel den epidermalen Wachstumsfaktor EGF („epidermal growth factor“), welche an membranständige Rezeptoren binden, aktiviert wird und diese Aktivierung zur Hemmung der Apoptose führt (Yao und Copper, 1995). Möglicherweise ist die durch BPDE-induzierte Akt-Aktivierung in murinen Fibroblasten (NIH3T3) ebenfalls an der Apoptose-Regulation beteiligt. Dieser Aspekt wurde jedoch, genauso wie der Mechanismus der BPDE-induzierten Akt-Aktivierung, in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

4.1.2 Durch welchen Mechanismus induziert BPDE die Aktivierung der SAPK JNK und p38?

Zur Untersuchung des der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung zu Grunde liegenden Mechanismus wurde der Einfluss der Zellproliferation auf die Signalinduktion untersucht.

Behandlung proliferierender Zellen mit genotoxischen Agenzien führt häufig zu einer Beeinträchtigung der Replikation. Die fehlerfreie DNA-Replikation und die akkurate Reparatur beschädigter DNA sind allerdings wichtig für die Aufrechterhaltung genomischer Stabilität. Fehler in diesen zellulären Prozessen können zum Auftreten von Mutationen und Chromosomenaberrationen und in Folge dessen auch zur Entstehung von Krebs führen. Die Behandlung mit genotoxischen Agenzien führt deshalb meistens zu einem Arrest des Zellzyklus. Das Vorkommen von DNA-Schäden während der Replikation führt zur Blockierung von DNA-Polymerasen. Dieser Replikationsblock dient dazu, die entstandenen Läsionen zu reparieren, um Fehler bei der DNA-Neusynthese zu vermeiden, bevor die Zelle in die Mitose eintritt. Um auf DNA-Schäden oder Inhibitoren der Replikation adäquat reagieren zu können, werden so genannte Replikations-Kontrollpunkte („checkpoints“) aktiviert. An diesen Kontrollpunkten sind die DNA-Schaden-erkennenden Proteinkinasen ATM („Ataxia Telangiectasia

mutated kinase“) und ATR („ATM and Rad3 related“) beteiligt, welche jeweils die Kinasen Chk2 bzw. Chk1 aktivieren können (Bartek und Lukas, 2003). ATM und ATR fungieren als so genannte zelluläre Sensoren für DNA-Schäden in Form von DNA-Einzel- und DNA-Doppelstrangbrüchen (z.B. verursacht durch γ -Strahlung). Sie können sowohl Reparaturmechanismen als auch Apoptose induzieren. Wird ATM zum Beispiel durch UV-induzierte DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert, kommt es zur Induktion von Signalkaskaden, welche die Phosphorylierung der Kontrollpunkt-Kinase („checkpoint“-Kinase) Chk2 beinhalten (Lavin *et al.*, 2005). Die genannten Signalkaskaden führen als Reaktion auf vorliegende DNA-Schäden u.a. zur Aktivierung des Tumorsuppressor-Proteins p53 und somit zu einem G₁-Arrest oder zur Apoptose-Induktion, wenn das Ausmaß der DNA-Schäden zu hoch ist (Vogelstein *et al.*, 2000; Fridman und Lowe, 2003). Chk2 ist, wie ATM und ATR, eine Proteinkinase und kann die Phosphatase Cdc25C durch Phosphorylierung inaktivieren. Cdc25C reguliert den Übergang von der G₂-Phase in die Mitose-Phase durch Dephosphorylierung (Aktivierung) der Cyclin-abhängigen Kinase Cdc2. Die ausbleibende Dephosphorylierung von Cdc2 bei vorliegenden DNA-Läsionen inhibiert den Übergang von der G₂- in die Mitose-Phase (M-Phase) und blockiert auf diese Weise die Progression des Zellzyklus (Übersicht in Shiloh, 2001). Außerdem kann über die Chk1-abhängige Phosphorylierung von Cdc25A/C ein G₁/S-Zellzyklusarrest induziert werden (Lam und Rosen, 2004). Die Phosphataseaktivität von Cdc25C ist essentiell für den Eintritt in die S-Phase und zwar durch die Dephosphorylierung der Kinasen Cdk2/CyclinE. Tumorzellen hingegen sind meist defizient für diesen p53-abhängigen Signalweg und somit auch für den G₁-Zellzyklusblock (Vogelstein *et al.*, 2000). Die Aktivierung von ATM/ATR stellt eine Möglichkeit dar, wie DNA-Schäden, über die Induktion eines Replikationsblocks, zur SAPK-Induktion führen können.

BPDE kann, wie oben dargelegt, auf Grund seiner elektrophilen Eigenschaften kovalente Addukte mit DNA-Molekülen eingehen. Diese Addukte stören, wie DNA-Doppelstrangbrüche (DSB), die Replikation. Existiert für BPDE-induzierte zelluläre Schäden ein ähnlicher, von einem Replikationsblock abhängiger, Signaltransduktionsmechanismus, wie der DSB-ATM/ATR-Chk1/Chk2-Signaltransduktionsweg und welche Signaltransduktionsmoleküle sind daran beteiligt?

Wie oben bereits erläutert, kann ein Replikationsblock als Auslöser für Signaltransduktionskaskaden fungieren, die dazu führen, dass die behandelte Zelle effizient auf die genotoxischen Schäden reagieren kann (Zellzyklusblock und Reparatur oder Zelltod). Der Einfluss der Replikation auf die JNK- und p38-Aktivierung durch BPDE wurde in proliferierenden, logarithmisch wachsenden Zellen verglichen mit der SAPK-Aktivierung in konfluent gewachsenen Mausfibroblasten, die über Nacht serumgehungert wurden (zur Induktion eines Replikationsstops), untersucht. Überprüft wurde der durch den Serumentzug induzierte Replikationsstop mit Hilfe des BrdU Assays (siehe Kapitel 2.9). Der BrdU Assay beruht auf dem Nachweis neu-synthetisierter DNA durch Einbau eines Thymidinanalogs (BrdU, 5'-Bromo-2'-deoxyuridin) während der Replikation, welches mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert werden kann.

Konfluent gewachsene Zellen, die über Nacht serumgehungert wurden (Entzug von Wachstumsfaktoren), sind in ihrer Replikation geblockt und zeigen keine DNA-Neusynthese. Unterscheidet sich die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung in proliferierenden und konfluenten Zellen? In konfluenten Zellen, die zusätzlich über Nacht serumgehungert wurden, um deren Proliferation zu hemmen, kann BPDE genauso wie in logarithmisch wachsenden Kulturen p38 und JNK aktivieren (Abb. 11). Dies zeigt, dass eine Interferenz mit der Replikation keine Grundvoraussetzung für die BPDE-abhängige SAPK-Aktivierung darstellt. Die beobachtete JNK- und p38-Aktivierung erfolgt auch in Gegenwart des Transkriptioninhibitors Actinomycin D, weshalb eine zwischengeschaltete, BPDE-abhängige, neu-induzierte Genexpression für die JNK- und p38-Aktivierung nicht notwendig ist.

In den folgenden Abschnitten werden weitere mögliche Mechanismen der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung diskutiert. Begonnen wird mit der Rolle bekannter MAPK-Signalwege, wie sie bereits für andere gentoxische Agenzien, z.B. UV-Strahlung, beschrieben wurden.

Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), zu denen p38 und JNK auf Grund ihrer Aktivierung durch Stressfaktoren eine Untergruppe als SAPK bilden, werden durch Übertragung einer Phosphatgruppe von ATP auf eine spezifische Aminosäure der MAPK aktiviert. Diese Reaktion wird von einer so genannten MAPK-Kinase katalysiert (MAPKK; siehe Kapitel 1.3.1). Diese Phosphorylierungskaskade besteht aus drei Proteinkinasen, bei der jede Kinase von ihrem Vorgänger phosphoryliert wird (Enslin und Davis, 2001). Die MAPKK wiederum werden von in der Signaltransduktionskaskade stromaufwärts gelegenen Serin-Threonin-spezifischen MAPKK-Kinasen phosphoryliert. Wie in Abb. 6 schematisch dargestellt, kann die JNK durch die MAPK-Kinasen SEK-1 (auch als MKK4 bezeichnet) und MKK7, die jeweils für die Übertragung von Phosphatgruppen auf die MAPK zuständig sind, aktiviert werden. Die MAPKK SEK-1 kann auch die p38-Kinase aktivieren (Dérillard *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1995). Dagegen kann die MAPKK MKK7 selektiv nur JNK aktivieren (Tournier *et al.*, 1997). Zwei weitere MAPKK sind MKK3 und MKK6, welche als MKK3/6 zusammengefasst werden und p38 phosphorylieren können. BPDE-Behandlung aktiviert die MAPKK SEK-1 und MKK3/6 aber nicht die MKK7 (Abb. 18). BPDE induziert also eine Signalkaskade, die über SEK-1 sowohl p38 als auch JNK aktivieren kann, und über MKK3/6 kann die p38-Kinase aktiviert werden (siehe Abb. 42). Auch die Aktivierungskinetiken der MAPKK (MKK3/6 und SEK-1) und der SAPK korrelieren miteinander. Wie in der Einleitung dargestellt, kann die JNK von MKK7 und/oder SEK-1 aktiviert werden. Dass durch BPDE nur die SEK-1 aktiviert wird, korreliert mit Ergebnissen, wonach extrazelluläre Stressoren SEK-1-abhängig zu einer Aktivierung der JNK führen und MKK7 hauptsächlich durch Cytokine und TNF α aktiviert wird (Tournier *et al.*, 2001; Weston und Davis, 2002).

4.1.3 Was ist der primäre Ansatzpunkt für BPDE?

Für den primären Ansatzpunkt von BPDE, also den Ausgangspunkt der BPDE-induzierten Signaltransduktion, gab es zu Beginn meiner Doktorarbeit verschiedene Arbeitshypothesen: 1. Beteiligung von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, 2. Aktivierung von zellulären Faktoren wie Src-ähnliche Kinasen und 3. BPDE-induzierte DNA-Schäden sind an der Induktion der Signaltransduktion beteiligt.

Für andere genotoxische Stimuli, wie zum Beispiel UV-Strahlung, wurde eine Beteiligung von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren an der Generierung einer intrazellulären Signalkaskade nachgewiesen, dabei induziert beispielsweise UV-Strahlung die Autophosphorylierung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors („epidermal growth factor receptor“, EGFR) (Sachsenmaier *et al.*, 1994; Warmuth *et al.*, 1994). Ein Mechanismus zur Aufrechterhaltung dieses Signals ist möglicherweise die UV-abhängige Hemmung der Dephosphorylierung, wie sie für den EGF-Rezeptor gezeigt wurde (Knebel *et al.*, 1996). Durch einen solchen Mechanismus kommt es zur Aktivierung der MAPK ERK. Die Behandlung von Zellen mit UV-Strahlung führt über die Aktivierung von membranständigen Wachstumsfaktorrezeptoren und Zytokinrezeptoren (TNF-Rezeptor, Tumor-Nekrose Faktor, siehe Abb. 6) ebenfalls zur JNK-Aktivierung (Rosette und Karin, 1996).

Die Beteiligung von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (GFR, „growth factor receptor“) an den BPDE-induzierten Signalwegen wurde mit zwei verschiedenen Ansätzen untersucht. Einerseits durch die Untersuchung der Aktivierung eines GFR-assoziierten Proteins, Shc, und andererseits durch den Einsatz eines kompetitiven Inhibitors von Wachstumsfaktorrezeptor-abhängigen Signalkaskaden, Suramin. Behandlung mit BPDE führt, im Gegensatz zur Behandlung mit dem Liganden des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors EGF, zu keiner Aktivierung des Adapterproteins Shc (Abb. 20). Auch die BPDE-induzierte Aktivierung von JNK und p38 wird durch Hemmung der Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren durch Suramin-Behandlung nicht beeinträchtigt (Abb. 19). BPDE induziert die SAPK demnach wahrscheinlich unabhängig von membranständigen Wachstumsfaktorrezeptoren.

Eine andere Möglichkeit für den Ansatzpunkt der BPDE-induzierten Signalkaskaden ist die Aktivierung von intrazellulären Src-ähnlichen Kinasen (Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen), zu denen u.a. c-Src selbst und, auf Grund seiner strukturellen Ähnlichkeit, c-Abl zählen. Behandlung von Zellen mit UV-Strahlung führt c-Src-abhängig zur JNK-Aktivierung (Devary *et al.*, 1992). Für c-Abl ist bekannt, dass diese Kinase sowohl im Zytoplasma als auch im Kern lokalisiert ist (Laneville, 1995). Aktivatoren von c-Abl sind hauptsächlich genotoxische Agenzien wie das Chemotherapeutikum Cisplatin (CDDP), alkylierende Agenzien wie zum Beispiel Methylmethansulfonat (MMS) und ionisierende Strahlung. Für diese Agenzien wurde darüber hinaus gezeigt, dass die nicht-rezeptorassoziierte Protein-Tyrosinkinase c-Abl wichtig für die Aktivierung der SAPK JNK ist (Kharbanda *et al.*, 1995).

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe eines Inhibitors Src-ähnlicher Kinasen (PP1, 4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(*t*-butyl)pyrazolo-D-3,4-pyrimidin), welcher als kompetitiver Inhibitor der ATP-Bindung wirkt (Hanke *et al.*, 1996), erstmals eine Beteiligung dieser Kinasen an BPDE-induzierten Signalkaskaden nachgewiesen werden, welche zur Aktivierung der SAPK führen. Vorbehandlung mit PP1 hemmt die Aktivierung von JNK und p38 zu nahezu 100% (Abb. 21). Die Beteiligung von c-Src an BPDE-induzierten Signalkaskaden wurde mit Hilfe c-Src-defizienter und korrespondierender Wildtypzellen untersucht. Verglichen mit der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung in Wildtypzellen zeigten die c-Src-defizienten Zellen jedoch keine reduzierte Aktivierung von p38 und JNK (Daten nicht gezeigt). Demnach ist c-Src selbst nicht an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung beteiligt. Eine andere zelluläre Kinase, welche durch PP1-Behandlung gehemmt wird und Ähnlichkeiten mit c-Src aufweist, ist die c-Abl-Kinase. Die direkte Beteiligung von c-Abl, einem Vertreter Src-ähnlicher Kinasen, an BPDE-induzierter SAPK-Aktivierung wurde mit Hilfe c-Abl-defizienter muriner Fibroblasten getestet. Für die BPDE-induzierte p38-Aktivierung konnte eine Beteiligung von c-Abl ausgeschlossen werden. Die BPDE-abhängige JNK-Aktivierung jedoch scheint, zumindest teilweise, abhängig von c-Abl zu sein (Abb. 22). Die Beteiligung weiterer Src-ähnlicher Kinasen an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung wird in einer anderen Doktorarbeit gerade untersucht (I.S.).

Eine andere Hypothese für den primären Ansatzpunkt der BPDE-induzierten Signalkaskaden sind durch BPDE induzierte DNA-Schäden. BPDE ist der reaktive Metabolit von B[a]P und besitzt eine elektrophile Epoxidgruppe, welche an nukleophile Makromoleküle, u.a. DNA, binden kann. BPDE kann, unter Öffnung seines Epoxidrings, zum Beispiel an die N²-Aminogruppe der Base Guanin binden. Konsequenz ist die kovalente Modifikation der DNA. Diese Addukte behindern u.a. die DNA-Replikation (Busbee *et al.*, 1984) und können Mutationen verursachen, wenn sie nicht repariert werden. BPDE-DNA-Addukte stören die DNA-Helixkonformation und werden deshalb als sperrige Addukte („bulky adducts“) bezeichnet. Der wichtigste zelluläre Mechanismus zur Entfernung dieser Läsionen ist die Nukleotidexzisionsreparatur (NER), welche solche BPDE-DNA-Addukte aus dem Genom entfernt (siehe Kapitel 1.2).

Die Detektion von BPDE-induzierten DNA-Schäden erfolgte mit dem Comet Assay, welcher sich unter verschiedenen Bedingungen durchführen lässt. Bei dem alkalischen Comet Assay werden Zelllyse und Elektrophorese in alkalischem Puffer durchgeführt (pH>13). Unter diesen Bedingungen trennen sich die beiden DNA-Stränge voneinander und es können sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche detektiert werden. Unter neutralen Bedingungen werden hingegen nur Doppelstrangbrüche detektiert (siehe Kapitel 2.8). Untersucht man BPDE-behandelte Zellen unter beiden Versuchsbedingungen, so kann man nur mit dem alkalischen Comet Assay Strangbrüche detektieren (Abb. 23 und Abb. 24). Dies bedeutet, dass BPDE nur Einzelstrangbrüche induziert. Welche Bedeutung diese BPDE-induzierten DNA-Schäden für die SAPK-Aktivierung haben, soll im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

Bereits eine zehnminütige BPDE-Behandlung führt in Mausfibroblasten zur Entstehung von DNA-Strangbrüchen, welche mit Hilfe des alkalischen Comet Assays detektiert wurden. Mit steigender Behandlungsdauer erhöht sich auch das Ausmaß der DNA-Schäden, gemessen als prozentuale Zunahme der DNA im Kometenschweif (Abb. 23). Diese Zunahme der Strangbruchrate mit steigender BPDE-Behandlungsdauer korreliert allerdings nicht mit dem zeitlichen Verlauf der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung. Die BPDE-induzierte Aktivierung der JNK erreicht bereits nach 30 Minuten Behandlungsdauer ihr Maximum (Abb. 13 A). Das Aktivierungsmaximum der p38-Kinase wird bereits nach zehn Minuten erreicht. Das Ausmaß BPDE-induzierter DNA-Schäden nimmt aber auch nach 30-minütiger BPDE-Behandlung weiter zu. Die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung ist zeitlich früher detektierbar als BPDE-induzierte DNA-Schäden. Die detektierten BPDE-abhängigen Strangbrüche treten wahrscheinlich als Konsequenz der Erkennung von sperrigen BPDE-DNA-Addukten durch Proteine der NER auf. Während der DNA-Reparatur kommt es durch die enzymatische Aktivität von Nukleasen zur Induktion von DNA-Strangbrüchen, um die geschädigte Base, zusammen mit umliegenden Nukleotiden, aus dem Genom zu entfernen. Die BPDE-abhängigen DNA-Einzelstrangbrüche treten zeitlich versetzt zur BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung auf. Die Aktivierung der SAPK durch BPDE scheint demnach an einen Faktor gekoppelt zu sein, der früh nach Entstehung der DNA-Läsionen aktiviert wird, d.h. die SAPK-Induktion scheint abhängig von der Erkennung BPDE-induzierter DNA-Schäden durch Faktoren der NER zu sein. Bei diesem Faktor könnte es sich um Proteine handeln, die BPDE-induzierte DNA-Schäden erkennen, denn dies ist der erste Schritt, der zur Entfernung der DNA-Läsionen durch die Nukleotidexzisionsreparatur führt (Übersicht in Batty und Wood, 2000). Es ist also möglich, dass die BPDE-abhängigen DNA-Schäden bzw. deren Reparatur das primäre Signal zur JNK- und p38-Aktivierung darstellen. Diese Möglichkeit wurde mit Hilfe NER-defizienter Mausfibroblasten untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente werden im nächsten Abschnitt diskutiert.

4.1.4 BPDE-induzierte DNA-Schäden: Bedeutung von NER-Faktoren für die JNK- und p38-Aktivierung

Wie in der Einleitung beschrieben, verursacht BPDE durch kovalente Bindung an DNA-Basen so genannte sperrige Addukte, die mit Hilfe der NER repariert werden. An der Erkennung des DNA-Schadens bei der NER sind mehrere Faktoren beteiligt, darunter das Heterodimer XPC/hHR23B bei der globalen Genom-Nukleotidexzisionsreparatur (GGR) (He *et al.*, 1995). Das XPC-Protein wird ausschließlich für die GGR benötigt. Ohne XPC können die DNA-Stränge im Bereich der Läsion nicht geöffnet werden (Evans *et al.*, 1997a; Evans *et al.*, 1997b). XPC/hHR23B ist sowohl für den kritischen Schritt der Schadenserkenung als auch der späteren Rekrutierung weiterer NER-Reparaturfaktoren wiez.B. TFIIH, XPG, XPA, ERCC1/XPF und RPA verantwortlich (Sugasawa *et al.*, 1998).

Möglicherweise unterstützt der Dimerisierungspartner von XPC hHR23B die Stabilität des XPC-Proteins oder beeinflusst die XPC-DNA-Bindung (Sugasawa *et al.*, 1996).

UV-Strahlung ist ein Beispiel für ein genotoxisches Agens, dessen DNA-Läsionen durch die NER repariert werden. Der Hauptteil der durch UV-Strahlung induzierten DNA-Schäden wird durch die Veränderung benachbarter Pyrimidine in so genannte Cyclobutanpyrimidindimere (CPD, Thymidindimer) oder so genannte (6-4)-Pyrimidin-Photoprodukte (6-4-PP) verursacht. Mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen diese Photoprodukte (Mizuno *et al.*, 1991; Mori *et al.*, 1991) kann XPC innerhalb von Minuten, durch Fluoreszenzmikroskopie, an diesen DNA-Läsionen detektiert werden (Volker *et al.*, 2001; Fitch *et al.*, 2003).

Basierend auf den im vorigen Abschnitt diskutierten Ergebnissen der BPDE-induzierten DNA-Strangbrüche, verglichen mit der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung, ist es denkbar, dass frühe Ereignisse während der DNA-Schadenserkennung durch Proteine der NER wichtig für die Signalkaskade sind, welche zur SAPK-Aktivierung führt. Die DNA-Schaden-erkennenden Proteine unterscheiden sich in den beiden Wegen der NER. Bei der globalen Genom-NER (GGR) wird die Läsion wie oben beschrieben von XPC erkannt. In der transkriptionsgekoppelten NER (TCR) hingegen agiert die geblockte RNA Polymerase II zusammen mit CSA und CSB (Cockayne Syndrom Komplementationsgruppe A bzw. B) als Schadenssensor (Abb. 5).

Die Bedeutung der Erkennung BPDE-induzierter DNA-Schäden durch Proteine der TCR für die SAPK-Induktion wurde in CSB-Knockoutzellen und korrespondierenden Wildtypzelllinien untersucht. Zu allen untersuchten Zeiten ist die BPDE-induzierte JNK- und p38-Aktivierung in CSB-defizienten Zellen verglichen mit Wildtypzellen nicht beeinträchtigt (Abb. 25). Die Erkennung von BPDE-DNA-Addukten durch CSB scheint demnach keine Voraussetzung für die SAPK-Induktion zu sein.

Schäden, welche im aktiv transkribierten Bereich des Genoms liegen, werden schneller erkannt und repariert als in transkriptionell inaktiven Abschnitten des Genoms durch die GGR (Hanawalt, 1994). Es gibt aber noch andere Eigenschaften, welche TCR-Defizienz von GGR-Defizienz unterscheidet. Dies wird deutlich an der autosomal rezessiv vererbten Krankheit Xeroderma Pigmentosum (XP), bei der die GGR defekt ist. XP-Patienten besitzen eine um den Faktor 1000 erhöhte Hautkrebsrate. Cockayne Syndrom (CS)-Patienten hingegen, die Defekte in der TCR besitzen, z.B. Fehlen eines der beiden CS-Proteine (CSA oder CSB), zeigen kein erhöhtes Risiko, an Hautkrebs zu erkranken. Auch andere TCR-defiziente Zellen zeigen nach UV-Behandlung keine höhere Sensitivität als Wildtypzellen (Ljungman und Zhang, 1996). GGR-defiziente Zellen hingegen, z.B. XPC-defiziente Zellen, zeigen eine höhere Sensitivität gegenüber UV-Exposition als korrespondierende Wildtypzellen (Sugasawa, 2006).

Die kanzerogene Wirkung von PAK wurde mit Hilfe von Applikationsversuchen auf die Haut von u.a. Mäusen untersucht. Wiederholtes, zeitlich versetztes, Auftragen von PAK führt zur Induktion von Papillomen und Sarkomen in den behandelten Hautarealen (Rubin, 2001). Ist es möglich, dass BPDE eine XPC-abhängige Signalkaskade induziert, die wichtig für die Kanzerogenität dieser Substanz ist?

In den oben genannten Versuchen zur kanzerogenen Wirkung von PAK wurde gezeigt, dass murine Fibroblasten dazu in der Lage sind, auf zellulärer Ebene auf BPDE zu reagieren. Dies unterstützt die Relevanz des verwendeten Zelltyps für die Untersuchung zellulärer Reaktionen auf BPDE, denn in der vorliegenden Arbeit wurden immortalisierte murine Fibroblasten zur Untersuchung BPDE-induzierter Signalkaskaden verwendet.

Zur Untersuchung der Rolle von XPC, als DNA-Schaden-erkennendes Protein bei der GGR, für die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung wurden XPC-defiziente und korrespondierende Wildtypzellen für verschiedene Zeiträume mit BPDE behandelt. In XPC-Wildtypmausfibroblasten induziert die BPDE-Behandlung zu allen untersuchten Zeitpunkten eine deutliche Aktivierung sowohl der JNK als auch der p38-Kinase. Untersucht wurde die frühe Aktivierung, bis zu einer Stunde, von JNK und p38. Im Gegensatz dazu induziert BPDE in XPC-defizienten Mausfibroblasten eine deutlich reduzierte Phosphorylierung sowohl der JNK als auch der p38 zu allen untersuchten Zeiten (Abb. 26). Die Tatsache, dass die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung in Zellen, welche defizient für XPC sind, schlechter verläuft als in Wildtypzellen, deutet darauf hin, dass die Erkennung des BPDE-induzierten DNA-Schadens wichtig für die Induktion der SAPK-Phosphorylierung ist. Die Aktivierung der SAPK in XPC-Knockoutzellen ist allerdings nicht 100-prozentig reduziert, eine geringe Aktivierung ist zu allen Zeitpunkten noch detektierbar. Die Induktion der Signalkaskade durch BPDE ist also wahrscheinlich noch von anderen Faktoren, außer der Schadenserkenkung durch XPC, abhängig.

In den diskutierten Versuchen zur Involvierung von XPC an der SAPK-Aktivierung durch BPDE wurde die Signalinduktion in einem relativ kurzen Zeitraum von maximal einer Stunde in konfluenten, serumgehungerten Zellen untersucht. Führt auch längere BPDE-Behandlung, bis zu 24 Stunden, in proliferierenden Zellen zur SAPK-Induktion und welche Rolle spielt dabei die DNA-Schadenserkenkung durch XPC? Auch Langzeitbehandlung (1 bis 24 Stunden) von proliferierenden Wildtypmausfibroblasten mit BPDE führt zu jedem untersuchten Zeitpunkt zu einer Induktion von JNK und p38. Die JNK- und p38-Aktivierung in XPC-defizienten Mausfibroblasten hingegen ist zu allen Zeitpunkten, verglichen mit der Induktion in korrespondierenden Wildtypzellen, reduziert (Abb. 27). XPC ist also auch für die SAPK-Induktion durch Langzeit-BPDE-Behandlung in proliferierenden Zellen wichtig.

Die bisher diskutierten Ergebnisse zur Detektion des primären Signalgenerierungspunktes und der Abhängigkeit der SAPK-Aktivierung von der Detektion des BPDE-induzierten DNA-Schadens durch das NER-Protein XPC wurden in NIH3T3-Zellen durchgeführt. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um immortalisierte murine Fibroblasten, welche durch spontane Mutationen in Genen, die das Zellwachstum kontrollieren, generiert wurden. Auf Grund dessen ist es möglich, dass die reduzierte BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung in XPC-defizienten Zellen auf klonale zelllinienspezifische Effekte und nicht auf das Fehlen des XPC-Proteins zurückzuführen sind. Aus diesem Grund wurden diese Experimente mit primären, d.h. nicht-immortalisierten, Mausfibroblasten (MEF, „mouse embryonic fibroblast“) wiederholt.

In den Wildtyp-MEF induziert BPDE, wie bereits für immortalisierte XPC-Wildtypmausfibroblasten gezeigt, eine deutliche Aktivierung der SAPK p38 und JNK. Diese SAPK-Aktivierung ist, wie in den immortalisierten Zellen, in den primären XPC-defizienten Zellen deutlich reduziert (Abb. 28). Die reduzierte BPDE-abhängige SAPK-Aktivierung in immortalisierten XPC-defizienten Zellen ist demnach kein klonaler Effekt dieser Zelllinie und zurückzuführen auf die möglicherweise durch die Immortalisierung veränderte Genexpression oder anderer zellulärer Prozesse, welche die zelluläre Reaktion auf BPDE beeinflussen könnten.

Welche Konsequenzen sich aus der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung für die behandelten Zellen ergeben und welche Rolle XPC und die Aktivierung der p38-Kinase spielen, soll im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

4.1.5 Konsequenzen der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung für das zelluläre Wachstum und Überleben

Die gezeigte BPDE-induzierte Aktivierung der SAPK p38 und JNK wirft die Frage nach der biologischen Konsequenz dieser Aktivierung auf. Wie in der Einleitung beschrieben, sind MAPK an verschiedenen zellulären Prozessen wie Proliferation, Genexpression, Reaktion auf gentoxische Stimuli, wie z.B. UV-Strahlung, Differenzierung, Zellzyklusprogression und auch an der Regulierung des Zelltodes beteiligt (Porras *et al.*, 2004; Ventura *et al.*, 2004). MAPK-Signalwege sind evolutionär hoch konserviert und kommen in allen eukaryotischen Zellen vor (Widmann *et al.*, 1999). Für verschiedene gentoxische Agenzien wurde bereits gezeigt, dass SAPK an der Induktion des Zelltodes beteiligt sind. Abhängig vom gentoxischen Agens, mit dem die Zelle behandelt wird, kann die JNK-Aktivierung sowohl pro- als auch anti-apoptotische Funktion besitzen. Gezeigt wurde die pro-apoptotische Funktion der JNK am Beispiel von UV-Strahlung. JNK1/2-defiziente Mausfibroblasten zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber UV-induzierter Apoptose (Tournier *et al.*, 2000). UV-Bestrahlung aktiviert die JNK, welche in diesem Kontext pro-apoptotisch wirkt, indem sie ATF2, c-Jun und Mitglieder der proapoptotischen Bcl-2-Familie aktivieren kann (Lei und Davis, 2003). Außerdem besitzt die JNK eine wichtige Rolle in der UV-induzierten direkten Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins p53. Diese posttranslationelle Modifizierung von p53 resultiert in der Akkumulation des transkriptionell aktiven Proteins und in Folge dessen in Zellzyklusarrest oder Apoptoseinduktion (Buschmann *et al.*, 2001). Für das Zytostatikum Cisplatin, das DNA-Schäden in Form von Intra- und Interstrangverknüpfungen induziert, besitzt JNK ebenfalls pro-apoptotische Funktion. Zellen, in denen die JNK nicht mehr dephosphoryliert und dadurch inaktiviert wird, sind sensitiv gegenüber Cisplatin-induziertem Zelltod (Wang *et al.*, 2006). Für ein anderes gentoxisches Agens, H₂O₂, das über die Bildung von ROS zur DNA-Schädigung führt, wurde eine anti-apoptotische Wirkung der JNK-Aktivierung gezeigt. JNK-Defizienz führt zu erhöhter

Sensitivität H₂O₂-behandelter Zellen (Ventura *et al.*, 2004). Die JNK-Aktivierung durch ROS ist demnach wichtig für das Überleben der H₂O₂-behandelten Zellen.

Die Rolle von p38 in der Apoptose hängt sowohl vom Stimulus als auch vom Zelltyp ab. Anti-apoptotische Funktionen besitzt p38 z.B. in Kardiomyozyten (Zechner *et al.*, 1998) und aktivierten Makrophagen (Park *et al.*, 2002). Andererseits ist p38 auch an pro-apoptotischen Signalkaskaden beteiligt, z.B. nach TNF α -Behandlung (Valladares *et al.*, 2000) oder als Antwort auf oxidativen Stress (Zhuang *et al.*, 2000) und UV-Strahlung (Porras *et al.*, 2004). Eine Möglichkeit, die pro-apoptotischen Eigenschaften von p38 zu erklären, ist die Phosphorylierung eines Mitglieds der Bcl-2-Familie und dadurch erhöhte Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Zhuang *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass BPDE in murinen Fibroblasten eine intrazelluläre Signalkaskade induziert, welche abhängig von Src-ähnlichen Kinasen, zur SAPK-Aktivierung führt. Darüber hinaus basiert diese Signalkaskade wahrscheinlich auf der Erkennung BPDE-induzierter DNA-Schäden durch XPC. Welche Konsequenzen die BPDE-abhängige SAPK-Aktivierung für die betroffene Zelle besitzt, wurde mit Hilfe SAPK-defizienter Zellen untersucht.

Werden proliferierende p38 α -defiziente Mausfibroblasten und korrespondierende Wildtypzellen über einen Zeitraum von insgesamt drei Tagen mit BPDE bzw. der Lösungsmittelkontrolle DMSO behandelt, resultiert dies in einem Absterben der behandelten Zellen. Bereits eine 24-stündige BPDE-Behandlung führt zu einer Reduktion der Zellzahl von p38 α -defizienten Zellen, verglichen mit der DMSO-behandelten Kontrolle. Die korrespondierenden Wildtypmausfibroblasten hingegen sind resistenter gegenüber BPDE (Abb. 33). Diese, verglichen mit den Wildtypzellen, erhöhte Sensitivität gegenüber BPDE zeigt sich in allen untersuchten Zeitpunkten. Erklären ließe sich diese reduzierte Zellzahl der BPDE-behandelten p38 α -defizienten Zellen mit einer erhöhten Apoptose- bzw. Nekroserate. Für verschiedene Zeiträume mit BPDE behandelte p38 α -defiziente Zellen zeigen jedoch keine erhöhten Apoptose- oder Nekrose-Raten (mündliche Mitteilung von J.D.). Eine andere Erklärung für die erhöhte Sensitivität p38 α -defizienter Zellen gegenüber BPDE ist eine reduzierte Proliferationsrate dieser Zellen. Diese Möglichkeit wurde mit Hilfe des BrdU Assays, mit dem sich die Proliferation von Zellen durch Messung der DNA-Neusynthese bestimmen lässt, untersucht (siehe Kapitel 2.9). Auf diese Weise konnte ein früher Effekt von BPDE auf den Zellzyklus detektiert werden. Bereits eine vierstündige BPDE-Behandlung führt zu verminderter Zellproliferation in p38 α -Wildtypzellen. Vorbehandlung mit einem Inhibitor der p38-Kinase (SB203580) bewirkt nach vier- bzw. achtstündiger BPDE-Behandlung eine noch geringere Proliferationsrate. Ebenso führt BPDE-Exposition zu einer verminderten Zellproliferation in p38 α -defizienten Zellen im Vergleich mit BPDE-behandelten Wildtypzellen. Die p38-Aktivierung in Folge BPDE-induzierter DNA-Schädigung scheint wichtig für die Zellproliferation nach BPDE-Exposition zu sein. Die bessere Proliferation p38 α -profizienter Zellen verglichen mit Zellen, in denen diese Kinase nicht mehr aktivierbar ist, z.B.

durch chemische Inhibition oder in p38 α -defizienten Zellen, könnte mit einer effizienteren Reparatur BPDE-induzierter DNA-Schäden erklärt werden. Möglicherweise wird p38 zur Aktivierung von Reparaturfaktoren benötigt. Zum Beispiel könnte p38 an einer Signaltransduktionskaskade beteiligt sein, welche zur Rekrutierung von Reparaturfaktoren zur Läsion benötigt wird. In Kapitel 4.1.2 wurde beschrieben, wie DNA-Schäden einen Replikationsblock induzieren können, damit der Zelle zusätzliche Zeit zur Verfügung steht für die Reparatur der Läsionen. Möglicherweise ist p38 an der Aufhebung dieses Replikationsblocks beteiligt. Eventuell interagiert p38 mit Proteinen, welche für die Zellzyklusregulation verantwortlich sind.

Die Rolle der JNK-Aktivierung durch BPDE für das zelluläre Schicksal wurde mit JNK1/2-defizienten immortalisierten Mausfibroblasten untersucht. Im Gegensatz zu p38 α -defizienten Zellen zeigen JNK1/2-defiziente Zellen keine unterschiedliche Sensitivität im Vergleich zu JNK1/2-Wildtypzellen. Zur Untersuchung der Rolle von XPC für das zelluläre Schicksal nach BPDE-Behandlung wurden XPC-defiziente- und XPC-profiziente immortalisierte Mausfibroblasten untersucht. Wie auch die p38 α -defizienten Zellen, sind XPC-defiziente Mausfibroblasten sensitiver gegenüber BPDE verglichen mit korrespondierenden Wildtypmausfibroblasten. Sowohl p38- als auch XPC-Defizienz führen verglichen mit korrespondierenden Wildtypzellen zu stärker reduzierten Zellzahlen, verursacht durch BPDE. XPC und p38 sind demnach wichtig für das zelluläre Überleben nach Behandlung mit dem Gentoxin BPDE und schützen die Zelle vor den negativen Auswirkungen der BPDE-induzierten DNA-Schäden.

Im nächsten Abschnitt soll deshalb diskutiert werden, ob die SAPK-Aktivierung abhängig von DNA-Strangbrüchen ist. Diese Hypothese wurde mit Hilfe DNA-Doppel- oder DNA-Einzelstrangbruch-induzierender Agenzien (Topoisomerase-Inhibitoren) untersucht.

4.1.6 Bedeutung von DNA-Einzel- und DNA-Doppelstrangbrüchen für die SAPK-Aktivierung

Im Allgemeinen wird jeder DNA-Schaden von für die jeweilige Läsion spezifischen Reparaturfaktoren erkannt, die mit einem individuellen Reparatursystem gekoppelt sind. Zum Beispiel werden oxidierte oder alkylierte DNA-Basen durch die Basenexzisionsreparatur (BER) erkannt und repariert, UV-induzierte Photoprodukte, zum Beispiel Thymidindimere, und sperrige Läsionen durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und Doppelstrangbrüche (DSB) von der DSB-Reparatur (DSBR).

Eine gezielte Induktion von Einzel- und Doppelstrangbrüchen wird bei der Krebstherapie zur Behandlung von Tumoren eingesetzt. Angriffspunkt dieser Tumorthapeutika ist das Enzym Topoisomerase, das in der Zelle in zwei Formen (I und II) vorkommt. Topoisomerasen sind an der Entwindung bestimmter Chromosomenabschnitte beteiligt. Bei der Replikation sind sie für das Öffnen und anschließende Wiederverknüpfen von DNA-Strängen verantwortlich.

Die Topoisomerase I überführt superhelikale DNA in entspannte DNA, indem sie einen der beiden DNA-Stränge vorübergehend spaltet. Dadurch verändert sich die Verknüpfungszahl um eine Windung. Die Topoisomerase II besteht aus zwei identischen Untereinheiten, bindet an die DNA und spaltet transient beide DNA-Stränge, um dadurch den Durchtritt eines benachbarten DNA-Stranges durch die so entstandene Lücke („cleavable complex“, Enzym-DNA-Intermediat) zu ermöglichen. Inhibitoren von Topoisomerasen stören das Gleichgewicht zwischen DNA-Spaltung und Religation, dies führt zu einem Anstieg von nicht-ligierten Strangbrüchen, wodurch der so genannte „cleavable complex“ stabilisiert und die Halbwertszeit von Doppelstrangbrüchen verlängert wird. Zur Spaltung der DNA wird Energie in Form von ATP benötigt.

Hemmstoff der Topoisomerase I ist u.a. Camptothecin, ein Chinolin-Alkaloid aus der Rinde des chinesischen Baums *Camptotheca acuminata*. Ein Derivat des Camptothecins, Topotecan, wird bei metastasierenden Ovarialkarzinomen zur Therapie eingesetzt. Die Topoisomerase II wird u.a. durch das Anthracyclinantibiotikum Doxorubicin gehemmt. Doxorubicin ist aus einem Tetrazyklinring aufgebaut, der glykosidisch mit dem Aminozucker Daunosamin verbunden ist. Doxorubicin wird zur Therapie einer Vielzahl solider Tumore (z.B.: Mamma-, Bronchialkarzinome und Lymphome) verwendet.

Doxorubicin induziert unterschiedliche intrazelluläre Effekte, wie z.B. die Bildung freier Radikale, Hemmung der Topoisomerase II und Interkalation in DNA (Benchekroun *et al.*, 1993; Ramachandran *et al.*, 1993; Fornari *et al.*, 1996). Durch diese Wirkungsweise führt Doxorubicin zur Hemmung der DNA-Replikation und Induktion von DNA-Schäden in Form von Doppelstrangbrüchen (Gewirtz, 1999). Die Induktion von DNA-Schäden durch Doxorubicin führt zur Apoptose, wenn das Ausmaß der Schäden die Reparaturkapazität der Zelle überschreitet (Jaffrezou *et al.*, 1996). Die durch Doxorubicin und andere DNA-schädigende Agenzien induzierte Apoptose ist assoziiert mit der SAPK-Induktion (Panaretakis *et al.*, 2005).

Die Behandlung von Zellen mit dem Topoisomerase I-Hemmstoff Camptothecin führt zur Induktion von Apoptose (Kaufmann, 1989). Es konnte gezeigt werden, dass an diesem Prozess die JNK-Aktivierung involviert ist (Seimiya *et al.*, 1997).

Zur Überprüfung, ob die Induktion von DNA-Schäden durch BPDE Voraussetzung für die Aktivierung der SAPK ist, oder ob die SAPK-Aktivierung generell abhängig von DNA-Strangbrüchen ist, wurden Wildtypmausfibroblasten mit den Topoisomeraseinhibitoren Camptothecin und Doxorubicin behandelt und ihr Potential zur Induktion von DNA-Strangbrüchen mit Hilfe des Comet Assays (alkalisch und neutral) untersucht. Sowohl Camptothecin- als auch Doxorubicin-Behandlung führt in Mausfibroblasten (NIH3T3) zur Induktion von DNA-Strangbrüchen. Dabei induziert Camptothecin-Behandlung sowohl Einzel- und auch Doppelstrangbrüche und Doxorubicin nur DNA-Doppelstrangbrüche (Abb. 35). Weder Camptothecin- noch Doxorubicin-Behandlung führen zu einer Aktivierung der SAPK.

Es konnte gezeigt werden, dass DNA-Strangbrüche alleine kein Potential zur frühen SAPK-Aktivierung besitzen. Für längere Behandlungszeiten allerdings wurde gezeigt, dass Topoisomerase-Inhibitoren die SAPK aktivieren können und diese Aktivierung ist an der Induktion der Apoptose der behandelten Zellen beteiligt. Möglicherweise werden die SAPK erst später durch die Akkumulierung von DNA-Schäden induziert und stellen eine Art zellulären Sensor für vorliegende DNA-Schäden dar. Welche Bedeutung BPDE bei der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung spielt, wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.1.7 Rolle von XPC in der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung

Bisher konnte gezeigt werden, dass die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung in XPC-defizienten Zellen verglichen mit Wildtypzellen stark reduziert ist. Wie bereits gezeigt, ist XPC ein Faktor der GGR und deshalb im Zellkern lokalisiert. Aus diesem Grund stellt sich die Frage, ob die SAPK im Zellkern oder im Zytoplasma aktiviert werden. Führt BPDE-Behandlung zur SAPK-Aktivierung im Zellkern, also am Ort des DNA-Schadens? Voraussetzung dafür ist das Vorliegen unphosphorylierter SAPK im Zellkern. Hinweise dafür gibt es durch vorläufige Versuche mit Immunfluoreszenzfärbungen unbehandelter Zellen mit Antikörpern gegen nicht-phosphorylierte p38-Kinase. In unbehandelten Zellen ist p38 im Kern detektierbar und könnte daher im Zellkern, also in der Nähe der BPDE-induzierten DNA-Schäden, aktiviert werden (Daten nicht gezeigt). Tatsächlich zeigen vorläufige Experimente, dass ebenfalls die phosphorylierte Form der p38-Kinase nach lokaler UV-Bestrahlung, bei der die Zellen durch einen Polykarbonatfilter mit einer Porenweite von 5 μm bestrahlt werden, in definierten Kernbereichen detektiert werden kann. Eine andere Möglichkeit stellt die Aktivierung der SAPK im Zytoplasma dar.

Wie gezeigt, ist die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung abhängig von der Erkennung BPDE-abhängiger DNA-Addukte durch das NER-Protein XPC. Welche zwischengeschalteten Schritte werden für die XPC-abhängige SAPK-Aktivierung benötigt? Ist es möglich, dass XPC, oder andere Proteine, nach der Schadensdetektion und Induktion weiterer Reparaturfaktoren aus dem Nukleus ins Zytoplasma transloziert? Ein solcher Mechanismus der Translokation nukleärer Proteine ins Zytoplasma zur Induktion von Signalkaskaden wurde für die NF- κ B-Aktivierung durch DNA-Doppelstrangbrüche gezeigt (Wu *et al.*, 2006). DNA-Doppelstrangbrüche führen zur Aktivierung der Kinase ATM im Zellkern. Danach bindet ATM an NEMO (NF- κ B essential modulator, auch als IKK γ bezeichnet) und dieses Heterodimer transloziert aus dem Nukleus ins Zytoplasma. Im Zytoplasma bindet NEMO, immer noch an ATM gebunden, mit IKK α und IKK β . NEMO ist die regulatorische Untereinheit der I κ B-Kinase. Die Bindung von NEMO an IKK α und IKK β , die beiden katalytischen Untereinheiten von IKK (I κ B-Kinase) führt zur Aktivierung des zytoplasmatischen IKK-Komplexes. IKK phosphoryliert daraufhin das an NF- κ B gebundene inhibitorische Protein I κ B, dieses wird anschließend ubiquitiniert und degradiert (Wu *et al.*, 2006). Dies führt zur Aktivierung des

Transkriptionsfaktors NF- κ B, welcher in den Kern transloziert und dort verschiedene Zielgene reguliert.

Auch die Behandlung von Wildtypmausfibroblasten mit verschiedenen genotoxisch wirkenden Agenzien, wie z.B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das über die ROS-Bildung zu DNA-Schäden führt und dem Zytostatikum Cisplatin (CDDP), dessen DNA-Schäden – zumindestens teilweise – durch Proteine der NER detektiert und aus dem Genom entfernt werden, führen zu einer Aktivierung der SAPK JNK und p38. Interessanterweise ist auch für diese Gentoxine die SAPK-Aktivierung in Zellen, die defizient für das schadenserkennende Protein der NER XPC sind, reduziert (Abb. 29 und Abb. 30). Die Erkennung des primären DNA-Schadens durch XPC ist also auch bei diesen genotoxischen Agenzien wichtig für die Induktion von Signalkaskaden. Im Gegensatz dazu ist die SAPK-Aktivierung durch das translationshemmende Antibiotikum Anisomyzin und hyperosmolare Kochsalzlösung (NaCl) in XPC-defizienten Zellen nicht vermindert (Abb. 30).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Induktion von DNA-Schäden durch genotoxische Agenzien spezifisch über die Erkennung durch das NER-Protein XPC zur Induktion der SAPK JNK und p38 führen. Der Befund, dass XPC für die Induktion der SAPK-Aktivierung durch das genotoxische Agens BPDE benötigt wird, koppelt Reaktionen der DNA-Reparatur mit intrazellulären SAPK-Signalkaskaden, die unter anderem an der Vermittlung von Proliferation, Differenzierung, aber auch am Zelltod beteiligt sind.

Wie bereits dargestellt, induzieren die reaktiven Metabolite von PAK, z.B. BPDE, sperrige DNA-Läsionen, die durch die NER repariert werden. XPC ist dabei das schadenserkennende Protein und an der Rekrutierung der Nukleasen XPF und XPG beteiligt. Die Aktivität der Endonukleasen XPF und XPG führt zur Entfernung der geschädigten Base mit umliegenden Nukleotiden in einer Länge von 24 bis 32 Basen (Huang *et al.*, 1992). Fehlt XPC, so unterbleibt die Rekrutierung dieser Nukleasen und es können mit Hilfe des alkalischen Comet Assays keine DNA-Einzelstrangbrüche detektiert werden (Abb. 37). Die detektierten Strangbrüche nach BPDE-Behandlung von XPC-Wildtypzellen resultieren also aus der Reparatur der BPDE-DNA-Addukte durch die NER. Demnach ist die Erkennung von DNA-Läsionen durch das NER-Protein XPC eine wesentliche Voraussetzung für die detektierten BPDE-induzierten Einzelstrangbrüche. Wie bereits diskutiert, werden die SAPK in XPC-defizienten Zellen deutlich schwächer aktiviert als in XPC-Wildtypzellen. Das Ausbleiben der XPC-Rekrutierung und die nicht erfolgende Reparatur der BPDE-DNA-Addukte könnte die reduzierte SAPK-Aktivierung in XPC-defizienten Zellen erklären, vorausgesetzt, dass die BPDE-induzierten DNA-Einzelstrangbrüche der Signalgeber für die Generierung einer Signalkaskade sind, die zur SAPK-Aktivierung führt.

Wie gezeigt, sind die nach BPDE-Behandlung nachgewiesenen Einzelstrangbrüche Resultat der Entfernung der DNA-Addukte durch Proteine der NER. Wie in der Einleitung beschrieben, teilt sich die NER in zwei Wege. Die globale Genom-NER (GGR), welche Schäden im gesamten Genom detektiert und repariert, und die transkriptionsgekoppelte NER, die Schäden nur in gerade

transkribierten DNA-Bereichen repariert. Die beiden Wege unterscheiden sich in der Erkennung der DNA-Schäden und vereinen sich wieder ab der XPA-Rekrutierung, die wichtig für die Rekrutierung weiterer Reparaturfaktoren, wie Nukleasen, ist (Abb. 5). XPA-Knockout-Fibroblasten zeigen nach BPDE-Behandlung wie XPC-defiziente Zellen ebenfalls keine DNA-Strangbrüche (Abb. 38). Dies bestätigt die Folgerung, dass die durch BPDE induzierten DNA-Strangbrüche das Resultat der Reparatur der BPDE-DNA-Addukte sind. Interessanterweise ist die SAPK-Aktivierung in den XPA-Knockout-Zellen nicht beeinträchtigt. Das Ausbleiben von DNA-Strangbrüchen in XPC-defizienten Zellen im Gegensatz zu Wildtypfibroblasten scheint demnach nicht der Grund für die geringere Aktivierung der SAPK in XPC-defizienten Mausfibroblasten zu sein. Das zu den BPDE-DNA-Addukten rekrutierte NER-Protein XPC scheint eine Signaltransduktionskaskade zu induzieren, die spezifisch zur Aktivierung von JNK und p38 führt. Durch welchen Mechanismus die SAPK durch die Erkennung des DNA-Schadens induziert werden, ist bislang nicht untersucht. Möglicherweise gibt es eine direkte Interaktion zwischen XPC und den SAPK p38 und JNK, welche zur Aktivierung dieser Kinasen beiträgt. Denkbar wäre auch eine indirekte Aktivierung der SAPK durch die DNA-Schadenserkenntnis. XPC könnte zwischengeschaltete Proteine aktivieren, die wiederum eine Signalkaskade induzieren, welche die SAPK-Aktivierung bewirkt. Möglicherweise ist ein NER-Faktor für die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung verantwortlich, der in der NER zwischen der Erkennung der Läsion durch XPC und der XPA-Rekrutierung liegt. Solche NER-Faktoren könnten der TFIIH-Komplex oder die Helikasen XPB und XPD sein. Wäre beispielsweise die Rekrutierung von Helikasen defekt, so könnte der doppelsträngige Bereich um die DNA-Läsion nicht mehr entwunden werden. In diesem Fall wäre den Nukleasen der „Zugang“ zum beschädigten Abschnitt der DNA verwehrt. In diesem Fall würden keine DNA-Strangbrüche mehr induziert werden. Wenn die SAPK-Aktivierung abhängig von BPDE-induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen wäre, unterbliebe auch die Aktivierung von JNK und p38.

Die Ergebnisse, dass die SAPK-Aktivierung in XPC-defizienten Zellen für NER-spezifische Agenzien reduziert ist, sprechen dafür, dass die Induktion der SAPK abhängig von NER-Faktoren, z.B. XPC, ist. Werden die SAPK durch BPDE-Behandlung im Zellkern oder Zytoplasma aktiviert? Dazu gibt es mehrere Hypothesen. Setzt man eine direkte Interaktion zwischen XPC (oder andere Faktoren) und den SAPK voraus, muss entweder XPC (oder zwischengeschaltete Faktoren) aus dem Zellkern ins Zytoplasma translozieren (wie für ATM gezeigt; Wu *et al.*, 2006) und dort mit den inaktiv vorliegenden SAPK interagieren oder die nicht-aktivierten SAPK liegen unter nicht-induzierenden Bedingungen im Zellkern vor. Die Möglichkeit, dass die SAPK im Zellkern aktiviert werden, wird durch vorläufige Ergebnisse zur lokalen UV-Bestrahlung unterstützt. Werden Zellen durch einen Polykarbonatfilter mit bestimmter Porengröße mit UVC bestrahlt, kann man die phosphorylierte Form der p38 in lokalen Arealen im Zellkern nachweisen, deren Größe der Porenweite entspricht. p38 würde demnach nur in den Bereichen aktiviert, die mit UVC exponiert waren.

Ist die Erkennung NER-spezifischer Läsionen Voraussetzung für die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung? Diese Hypothese wurde mit Hilfe eines PAK-Diolepoxides untersucht (Benzo[c]phenanthren-3,4-Diol-1,2-Epoxid), dessen DNA-Addukte schlecht von XPC erkannt werden. Auf Grund dessen werden sie nicht oder nur teilweise repariert und persistieren im Genom (Geacintov *et al.*, 2002).

4.1.8 Abhängigkeit der SAPK-Aktivierung von der DNA-Schadenserkennung

Zu Diolepoxiden metabolisch aktivierte PAK lassen sich entsprechend ihrer Struktur in zwei Gruppen aufteilen: Bay- und Fjord-Region-Diolepoxide. Ein Beispiel für ein Bay-Region-Diolepoxid ist BPDE. Benzo[c]phenanthren-3,4-Diol-1,2-Epoxid (B[c]PhenDE) hingegen besitzt eine Fjord-Region. Diese Einteilung wird aufgrund struktureller Unterschiede der Epoxidringposition im Gesamtmolekül vorgenommen. Die Epoxidgruppe in der Fjord-Region verursacht eine Veränderung der Planarität des angrenzenden aromatischen Ringes. Bei Molekülen mit einer Bay-Region ist diese sterische Behinderung weniger stark ausgeprägt und das aromatische Ringsystem ist planar. Diese planare Struktur führt zu einer stärkeren Veränderung der DNA-Helix, wenn Bay-Region-Diolepoxide (z.B. BPDE) kovalente Addukte mit der DNA bilden.

Versuche mit Zellextrakten zur Bestimmung der Reparatur von DNA-Schäden, verursacht durch Bay- und Fjord-Region-PAK, haben gezeigt, dass die Enzyme der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) eine breite Palette von Bay-Region-BPDE-Läsionen wie z.B. (+)-*anti*-BPDE-dAdenin-Addukte entfernen können. Die Fjord-Region-(+)- oder (-)-*trans-anti*-B[c]PhenDE-N⁶-dA-Addukte hingegen können durch die NER nicht entfernt werden (Buterin *et al.*, 2000; Geacintov *et al.*, 2002). Nach dem Modell zur Nukleotidexzisionsreparatur (NER), welche u.a. PAK-DNA-Schäden repariert, benutzen NER-Enzyme ein zweistufiges System zur Erkennung von DNA-Schäden (Hess *et al.*, 1997; Buschta-Hedayat *et al.*, 1999). Die Detektion eines sperrigen DNA-Adduktes durch die GGR erfolgt durch das Heterodimer XPC/hHR23B. Nach dem genannten Modell erkennt die NER DNA-Läsionen effektiver, wenn sie die Watson-Crick-Basenpaarung beeinträchtigen und DNA-Basen chemisch modifizieren. Für die effiziente Reparatur von DNA-Schäden ist es wichtig, in welchem Ausmaß eine Läsion diese beiden Parameter verändert. Darüber hinaus kann die Integrität der DNA durch Veränderungen der helikalen Parameter, wie Entwindung und Störungen der Helixkonformation, beeinträchtigt werden. Die effiziente Erkennung und Entfernung von PAK-DNA-Schäden ist demnach abhängig von den DNA-destabilisierenden Eigenschaften der vorliegenden Läsionen (messbar als thermale Stabilität der DNA durch Absorption bei 260 nm, also die Dissoziation der DNA-Stränge). BPDE-DNA-Addukte destabilisieren die DNA, weil das Ringsystem nicht planar ist, die beiden DNA-Stränge entfernen sich voneinander und die DNA-Helix wird ein Stück weit entwunden. BPDE-DNA-Addukte werden deshalb mit einer relativ guten Reparatureffizienz aus dem Genom entfernt (Krzeminski *et al.*, 1999). B[c]PhenDE-DNA-Addukte hingegen besitzen einen höheren Schmelzpunkt als BPDE-DNA-

Addukte, weil das Ringsystem von B[c]PhenDE kompakter aufgebaut ist und besser zwischen die Basen interkalieren kann. Die Integrität der DNA-Helix wird aus diesem Grund geringfügiger gestört als durch BPDE (Ruan *et al.*, 2002). Da die schadenserkennenden Proteine der NER einen DNA-Schaden umso besser erkennen, je größer die Integrität der DNA beeinträchtigt ist, werden BPDE-DNA-Addukte effizienter erkannt und entfernt als B[c]PhenDE -DNA-Addukte (Geacintov *et al.*, 2002). Vergleicht man das Potential zur Tumorauslösung der reaktiven Metabolite (Epoxide) von Bay- und Fjord-Region-PAK miteinander, so sind Fjord-Region-PAK aus diesem Grund potenter (Amin *et al.*, 1995).

Die Hypothese, nach der die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung von der Erkennung des primären DNA-Schadens (BPDE-DNA-Addukte) durch XPC abhängig ist, wurde durch Vergleich von BPDE und B[c]PhenDE hinsichtlich der DNA-Schäden und des Potentials, die SAPK zu induzieren, untersucht.

Falls B[c]PhenDE in Mausfibroblasten schlecht durch DNA-Reparatur-Proteine erkannt werden, sollten sie auch keine DNA-Strangbrüche induzieren. Das Potential zur DNA-Strangbruch-Induktion von B[c]PhenDE wurde mit Hilfe des alkalischen Comet Assays überprüft. B[c]PhenDE-Behandlung induziert in Mausfibroblasten, im Gegensatz zu BPDE, keine signifikante Erhöhung der DNA-Strangbruchrate (Abb. 40). Das Ausbleiben der DNA-Strangbrüche kann durch die fehlende oder schwächere Erkennung der B[c]PhenDE-induzierten DNA-Schäden durch XPC erklärt werden. B[c]PhenDE-DNA-Addukte führen zu keinen größeren Veränderungen der DNA-Helix und destabilisieren die DNA nicht, deshalb werden diese Läsionen nicht oder nur sehr schlecht von NER-Reparaturfaktoren erkannt. Durch die ausbleibende Erkennung des DNA-Schadens unterbleibt auch die Rekrutierung der Nukleasen und es werden keine DNA-Strangbrüche induziert.

Ob B[c]PhenDE-Behandlung von Mausfibroblasten die SAPK aktivieren kann, wurde im Western Blot untersucht. Im Gegensatz zu BPDE induziert B[c]PhenDE keine Aktivierung von p38 und JNK (Abb. 41). Das Ausbleiben der SAPK-Induktion durch B[c]PhenDE ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Erkennung von DNA-Läsionen wichtig für die BPDE-induzierte Aktivierung der SAPK p38 und JNK ist.

4.2 Modell zur BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass BPDE in Mausfibroblasten zeitabhängig eine intrazelluläre Signalkaskade induziert, welche zur Aktivierung der Stress-aktivierten-Proteinkinasen (SAPK) p38 und JNK führt. Diese Aktivierung ist wahrscheinlich auf folgenden Mechanismus zurückzuführen: BPDE bindet als elektrophile Substanz an die DNA. Diese BPDE-DNA-Addukte werden durch das NER-Protein XPC erkannt und es kommt zur Rekrutierung weiterer NER-Proteine, darunter auch der Nukleasen XPF und XPG, welche das DNA-Rückgrat schneiden können, um die Läsion zu entfernen. Die SAPK-Aktivierung ist allerdings nicht abhängig

von DNA-Strangbrüchen an sich, sondern vielmehr von dem primären BPDE-induzierten DNA-Schaden, sperrigen BPDE-DNA-Addukten. Basierend auf der Erkennung des Schadens durch XPC kommt es zur Induktion der SAPK p38 und JNK. Dabei handelt es sich um einen allgemeinen Mechanismus der Kinase-Aktivierung durch genotoxische Agenzien, deren DNA-Läsionen, zumindest teilweise, durch die NER entfernt werden, da auch die SAPK-Aktivierung durch CDDP-Exposition in XPC-defizienten Zellen geringer ist als in Wildtypzellen. An der BPDE-induzierten Signalkaskade sind die MAPKK MKK3/6 und SEK-1 beteiligt. Inhibitorexperimente deuten auf eine Rolle der Src-ähnlichen Kinasen in dieser Signalkaskade hin. Eine Beteiligung der PI3-Kinase und Akt an der BPDE-abhängigen SAPK-Aktivierung, wie sie für murine Epithelzellen gezeigt wurde, konnte durch Analyse der Aktivierungskinetiken und durch Inhibitorexperimente ausgeschlossen werden. Konsequenz der XPC-abhängigen p38-Aktivierung ist eine erhöhte Resistenz gegenüber genotoxischem Stress verursacht durch BPDE.

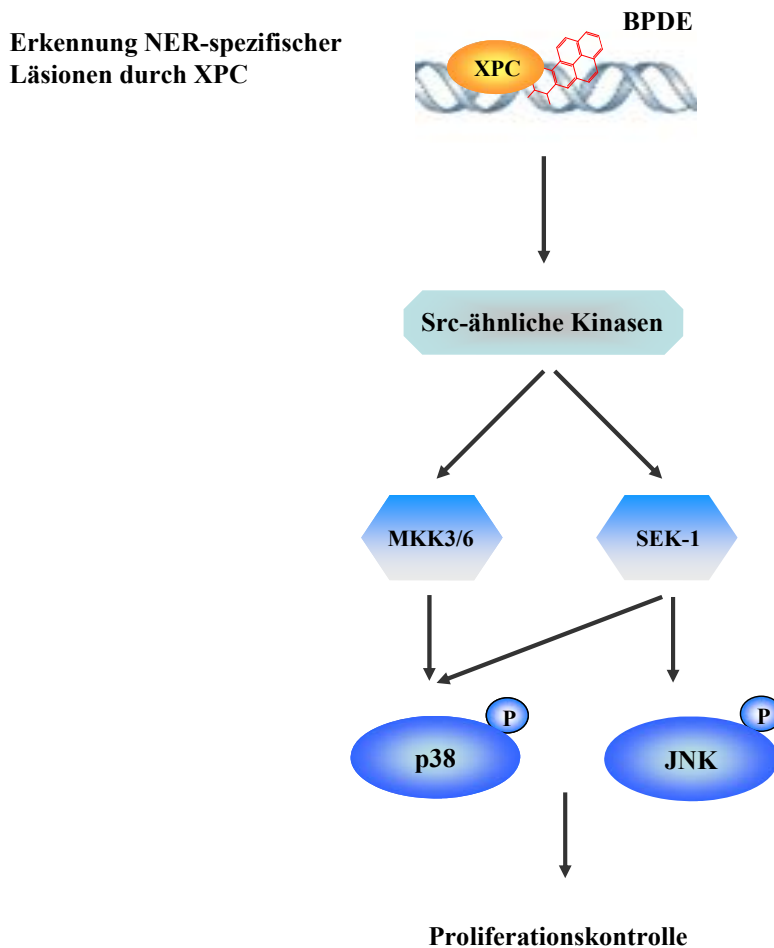


Abb. 42: Modell zur BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung.

Erläuterungen im Text. BPDE: Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid; JNK: c-Jun-N-terminale Kinase; NER: Nukleotidexzisionsreparatur; PAK: Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe; XPC: Xeroderma Pigmentosum Komplementationsgruppe C.

5 Zusammenfassung

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sind ubiquitäre Verschmutzungen der Umwelt und entstehen während der unvollständigen Verbrennung organischen Materials wie Holz, Kohle und Erdöl. Werden diese chemisch nicht reaktiven PAK in den Körper aufgenommen, durchlaufen sie eine Reihe von enzymatischen Umsetzungen, die unter der Bezeichnung Fremdstoffmetabolismus zusammengefasst werden. Die chemische Umsetzung des PAK und Prokarzinogens Benzo[a]pyren (B[a]P) führt u.a. zur Bildung des reaktiven Metaboliten B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE). BPDE ist stark elektrophil und kann auf Grund dieser Eigenschaft an nukleophile Makromoleküle wie Proteine und DNA binden. Die Bildung von BPDE-DNA-Addukten resultiert in der Entstehung von Mutationen und kann zur Tumorbildung führen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung von BPDE als Modellsubstanz für gentoxische Agenzien auf intrazelluläre Signalkaskaden und die Konsequenzen der BPDE-Exposition bezüglich der Zellaktivität untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass BPDE-Behandlung von Mausfibroblasten eine intrazelluläre Signalkaskade induziert, welche zur Aktivierung der Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK) JNK und p38 führt. An dieser Signalkaskade sind Src-ähnliche Kinasen beteiligt. BPDE-Behandlung führt in den untersuchten Mausfibroblasten zur Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen, deren Auftreten zeitlich mit der SAPK-Aktivierung korreliert. Die BPDE-induzierten DNA-Strangbrüche sind die Folge der Entfernung dieser Läsionen aus dem Genom durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER). Erkannt werden BPDE-DNA-Addukte durch die NER-Proteine XPA und XPC (Xeroderma Pigmentosum Komplementationsgruppe A und C). Nach der Erkennung von BPDE-DNA-Addukten kommt es zur Rekrutierung von Nukleasen, welche die vorliegende Läsion und umliegende Nukleotide aus dem Genom entfernen. In XPA- und XPC-defizienten Mausfibroblasten induziert BPDE daher keine DNA-Strangbrüche. Jedoch ist nur in XPC-defizienten Zellen, aber nicht in XPA-defizienten Zellen, die SAPK-Aktivierung drastisch reduziert. Behandlung von Mausfibroblasten mit Benzo[c]phenanthren-3,4-Diol-1,2-Epoxid, einem PAK, dessen DNA-Addukte schlecht durch NER-Faktoren erkannt und repariert werden, führt zu keiner SAPK-Aktivierung. Die Aktivierung von p38 und JNK scheint demnach abhängig zu sein von der Erkennung des primären DNA-Schadens. Die XPC-abhängige SAPK-Aktivierung schützt die Zellen vor BPDE-abhängiger Toxizität, da sowohl XPC- als auch p38-defiziente Mausfibroblasten eine höhere Sensitivität gegenüber BPDE zeigen als korrespondierende Wildtypzellen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein neuer Signalweg beschrieben werden, in dem DNA-Schäden, verursacht durch BPDE, über die XPC-abhängige DNA-Schadenserkenung, die Aktivierung der SAPK induziert. Diese Aktivierung der SAPK schützt vor BPDE-induzierter Toxizität.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are ubiquitous environmental pollutants formed during incomplete combustion of organic material e.g. wood, coal and crude oil. Ingested into the human body these non reactive PAHs are enzymatically metabolised. These reactions are summarised as xenobiotic metabolism. The chemical transformation of the PAH and procarcinogen benzo[a]pyrene (B[a]P) results in the formation of the highly reactive metabolite B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (BPDE). BPDE is a strongly electrophilic compound and can therefore bind to nucleophilic macromolecules such as proteins and DNA. The formation of BPDE-DNA-adducts is able to cause mutations and can therefore result in tumor formation.

In this PhD thesis BPDE serves as a model compound for genotoxic agents and their effects on intracellular signaling cascades and the consequences on the cellular survival. It could be shown that BPDE treatment of immortalised murine fibroblasts (NIH3T3) leads to the induction of intracellular signaling cascades in which the stress activated protein kinases (SAPKs) JNK and p38 are involved. Moreover src-like-kinases are involved in this signalling cascade.

BPDE treatment of murine fibroblasts leads to induction of DNA single strand breaks which coincide with the activation of SAPKs. BPDE induced DNA strand breaks are the consequence of the removal of BPDE-DNA adducts by NER (nucleotide excision repair). The BPDE-DNA adducts are recognised by the NER proteins XPA and XPC (Xeroderma Pigmentosum complementation group A and C). After recognition of BPDE-DNA adducts the repair process leads to recruitment of nucleases which excise the lesion and adjacent nucleotides from the genome. Therefore in XPA- and XPC- deficient murine fibroblasts BPDE is not able to induce DNA strand breaks. However only XPC-, but not XPA-deficient cells show dramatically reduced BPDE induced SAPK activation. Treatment of murine fibroblasts with the PAH benzo[c]phenanthren-3,4-Diol-1,2-epoxide, whose DNA adducts are only weakly recognised and repaired by NER factors, does not induce significant SAPK activation. Therefore it seems that the induction of JNK and p38 by BPDE depends on the recognition of the primary BPDE induced DNA damage. The XPC dependent SAPK activation by BPDE protects the cell from BPDE induced toxicity as XPC- and p38-deficient cells show higher BPDE dependent sensitivity towards BPDE treatment.

In summary, in this PhD thesis a new signaling cascade is identified in which SAPK activation by BPDE depends on the XPC-dependent recognition of BPDE induced DNA lesions. This SAPK activation protects against BPDE induced toxicity.

6 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	ATP binding cassette transporter
Act.D	Actinomycin D
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF	Aktivierender Transkriptionsfaktor
ATM	“Ataxia Telangiectasia mutated kinase”
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	ATM and Rad 3 related
B[a]P	Benzo[a]pyren
B[c]PhenDE	Benzo[c]phenanthren-3,4-Diol-1,2-Epoxid
BPDE	Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid
BrdU	5'-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumine“)
bzw.	Beziehungsweise
c	Zellulär („cellular“)
Ca.	Circa
°C	Grad Celsius
CDDP	Cisplatin (cis-Pt(NH ₃) ₂ Cl ₂)
CDK	Zyclin-abhängige Kinase („cyclin dependent kinase“)
CPD	Cyclobutanpyrimidindimer (Thymidindimer)
Chk	“Checkpoint”-Kinase (Kontrollpunkt-Kinase)
CSA	Cockayne Syndrom Gruppe A
CSB	Cockayne Syndrom Gruppe B
CYP	Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindolhydrochlorid
Dest.	Destilliert
d.h.	Das heißt
DMBA	Dimethylbenz[a]anthrazen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
E	Extinktion

ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Endkonz.	Endkonzentration
engl.	Englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERCC1	Excision repair cross complementing group 1
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase („extracellular signal regulated kinase“)
<i>et al.</i>	Und andere („et alii“)
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GCPR	G-protein-coupled receptor
GGR	Globale Genom-Nukleotidexzisionsreparatur
Grb2	“Growth factor receptor-bound protein 2”
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
HRP	Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase“)
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-Kinase
IP	Immunpräzipitation
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
IR	Ionisierende Strahlung („ionizing irradiation“)
J	Joule
JNK	c-Jun-N-terminale Proteinkinase
k	Kilo
kD	Kilodalton
ko	Knockout
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter, milli
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAP-Kinase-Kinase

MAPKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
MCDE	5-Methylchrysen-1,2-diol-3,4-epoxid
MDR	„Multidrug resistance“
MEF	„Mouse embryonic fibroblast“, primäre Mausfibroblasten
MEK	MAPK/ERK-Kinase
MEKK	MEK-Kinase
mg	Milligramm (10^{-3} Gramm)
µg	Mikrogramm
Min.	Minute(n)
Mind.	Mindestens
MKK	MAP-Kinase-Kinase
ml	Milliliter
µl	Mikroliter (10^{-6} Liter)
mM	Millimolar (10^{-3} Mol)
MMS	Methylmethansulfonat
MW	Mittelwert
n	Nano
NCS	Newborn calf serum
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PARP	Poly(ADP-ribose)Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDK	„Phosphatidylinositol-dependent kinase“ (PI-abhängige Kinase)
pH	„Potentium hydrogenium“ (pH-Wert)
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
6-4-PP	(6-4)-Pyrimidin-Photoprodukte
PP1	4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo-D-3,4-pyrimidin
PTEN	“Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten “
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	Replikationsprotein A

rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase(n) („stress-activated protein kinase“)
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
SH2	„Src-homology 2“
spez.	Spezifische
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TCR	Transkriptionsgekoppelte Nukleotidexzisionsreparatur
TLS	Translänionssynthese
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit („unit“)
u.a.	Unter anderem
UGT	UDP-Glukuronosyl-Transferase
UK	United Kingdom
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
wt	Wildtyp
XPA	Xeroderma Pigmentosum Komplementationsgruppe A
XPC	Xeroderma Pigmentosum Komplementationsgruppe C
z.B.	Zum Beispiel
z.T.	Zum Teil

7 Literaturverzeichnis

- Adler, V., Polotskaya, A., Wagner, F., Kraft, A.S. (1992). Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity. *J Biol Chem.*: **267 (24)**, 17001-17005.
- Alessi, D.R., Andjolkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.*: **15 (23)**, 6541-6551.
- Amin, S., Huie, K., Melikian, A.A., Leszczynska, J.M., Hecht, S.S. (1985). Comparative metabolic activation in mouse skin of the weak carcinogen 6-methylchrysene and the strong carcinogen 5-methylchrysene. *Cancer Res.*: **45 (12 Pt 1)**, 6406-6442.
- Amin, S., Krzeminski, J., Rivenson, A., Kurtzke, C., Hecht, S.S., el-Bayoumy, K. (1995). Mammary carcinogenicity in female CD rats of fjord region diol epoxides of benzo[c]phenanthrene, benzo[g]chrysene and dibenzo[a,l]pyrene. *Carcinogenesis*: **16 (8)**, 1971-1974.
- Angerer, J., Mannschreck, C., Gündel, J. (1997). Biological monitoring and biochemical effect monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int Arch Occup Environ Health*: **70**, 365-377.
- Araújo, S.J., Wood, R.D. (1999). Protein complexes in nucleotide excision repair. *Mutat Res.*: **435 (1)**, 23-33.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Toxicological Profile for Naphthalene* (Update). Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. 1995.
- Bardwell, L., Thorner, J. (1996). A conserved motif at the amino termini of MEKs might mediate high-affinity interaction with the cognate MAPKs. *Trends Biochem Sci.*: **21 (10)**, 373-374.
- Bartek, J., Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*: **3 (5)**, 421-429.
- Barzilai, A., Yamamoto, K. (2004). DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*: **3 (8-9)**, 1109-1115.
- Batty, D.P., Wood, R.D. (2000). Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene*: **241**, 193-204.
- Benchekroun, M.N., Sinha, B.K., Robert, J. (1993). Doxorubicin-induced oxygen free radical formation in sensitive and doxorubicin-resistant variants of rat glioblastoma cell lines. *FEBS Lett.*: **326 (1-3)**, 302-305.
- Binaschi, M., Zunino, F., Capranico, G. (1995). Mechanism of action of DNA topoisomerase inhibitors. *Stem Cells*: **13 (4)**, 369-379

- Blaikie, P., Immanuel, D., Wu, J., Li, N., Yajnik, V., Margolis, B. (1994). A region in Shc distinct from the SH2 domain can bind tyrosine-phosphorylated growth factor receptors. *J Biol Chem.*: **269 (51)**, 32031-32034.
- Bonfini, L., Migliaccio, E., Pelicci, G., Lanfrancone, L., Pelicci, P.G. (1996). Not all Shc's roads lead to Ras. *Trends Biochem Sci.*: **21 (7)**, 257-261.
- Boström, C., Gerde, P., Hanberg, A., Jernström, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Rannug, A., Törnqvist, M., Victorin, K., Westerholm, K. (2002). Cancer Risk Assessment, Indicators, and Guidelines for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Ambient Air. *Environ Health Perspect.*: **110 (Suppl. 3)**, 451-488.
- Bootsma, D., Weeda, G., Vermeulen, W., van Vuuren, H., Troelstra, C., van der Spek, P., Hoeijmakers, J. (1995). Nucleotide excision repair syndromes: molecular basis and clinical symptoms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*: **347 (1319)**, 75-81.
- Boysen, G., Hecht, S.S. (2003). Analysis of DNA and protein adducts of benzo[a]pyrene in human tissues using structure-specific methods. *Mutat Res.*: **543 (1)**, 17-30.
- Bregman, D.B., Halaban, R., van Gool, A.J., Henning, K.A., Friedberg, E.C., Warren, S.L. (1996). UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **93 (21)**, 11586-11590.
- Brookes, P., Osborne, M.R. (1982). Mutation in mammalian cells by stereoisomers of anti-benzo[a]pyrene-diolepoxide in relation to the extent and nature of the DNA reaction products. *Carcinogenesis*: **3 (10)**, 1223-1226.
- Brooks, P.J., Wise, D.S., Berry, D.A., Kosmoski, J.V., Smerdon, M.J., Somers, R.L., Mackie, H., Spoonde, A.Y., Ackerman, E.J., Coleman, K., Tarone, R.E., Robins, J.H. (2000). The oxidative DNA lesion 8,5'-(S)-cyclo-2'-deoxyadenosine is repaired by the nucleotide excision repair pathway and blocks gene expression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*: **275 (29)**, 22355-22362.
- Bulavin, D.V., Fornace, A.J. Jr. (2004). p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. *Adv Cancer Res.*: **92**, 95-118.
- Burchiel, S.W., Davis, D.A., Gomez, M.P., Montano, R.M., Barton, S.L., Seamer, L.C. (1990). Inhibition of lymphocyte activation in splenic and gut-associated lymphoid tissues following oral exposure of mice to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Toxicol Appl Pharmacol.*: **105 (3)**, 434-442.
- Burchiel, S.W., Davis, D.A., Ray, S.D., Barton, S.L. (1993). DMBA induces programmed cell death (apoptosis) in the A20.1 murine B cell lymphoma. *Fundam Appl Toxicol.*: **21 (1)**, 120-124.
- Busbee, D.L., Joe, C.O., Norman, J.O., Rankin, P.W. (1984). Inhibition of DNA synthesis by an electrophilic metabolite of benzo[a]pyrene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*: **81**, 5300-5304.

- Buschmann, T., Potapova, O., Bar-Shira, A., Ivanov, V.N., Fuchs, S.Y., Henderson, S., Fried, V.A., Minamoto, T., Alarcon-Vargas, D., Pincus, M.R., Gaarde, W.A., Holbrook, N.J., Shiloh, Y., Ronai, Z. (2001). Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol Cell Biol.*: **21 (8)**, 2743-2754.
- Buschta-Hedayat, N., Buterin, T., Hess, M.T., Missura, M., Naegeli, H. (1999). Recognition of nonhybridizing base pairs during nucleotide excision repair of DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*: **96**, 6090-6095.
- Buterin, T., Hess, M.T., Luneva, N., Geacintov, N.E., Amin, S., Kroth, H., Seidel, A., Naegeli, H. (2000). Unrepaired fjord region polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in ras codon 61 mutational hot spots. *Cancer Res.*: **60**, 1849-1856.
- Buterin, T., Meyer, C., Giese, B., Naegeli, H. (2005). DNA quality control by conformational readout on the undamaged strand of the double helix. *Chem Biol.*: **12 (8)**, 913-922.
- Cambier, J.C., Pleiman, C.M., Clark, M.R. (1994). Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptors. *Annu Rev Immunol.*: **12**, 457-486.
- Chen, Y.R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R.J., Tan, T.H. (1996). The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem.*: **271 (50)**, 31929-31936.
- Chen, E.Y., Mazure, N.M., Cooper, J.A., Giaccia, A.J. (2001). Hypoxia activates a platelet-derived growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation. *Cancer Res.*: **61 (6)**, 2429-2433.
- Chen, S., Nguyen, N., Tamura, K., Karin, M., Tukey, R.H. (2003). The role of the Ah receptor and p38 in benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced apoptosis. *J Biol Chem.*: **278 (21)**, 19526-19533.
- Cheo, D.L., Ruven, H.J., Meira, L.B., Hammer, R.E., Burns, D.K., Tappe, N.J., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H., Friedberg, E.C. (1997). Characterization of defective nucleotide excision repair in XPC mutant mice. *Mutat Res.*: **374 (1)**, 1-9.
- Coffey, R.J. Jr, Leof, E.B., Shipley, G.D., Moses, H.L. (1987). "Suramin inhibition of growth factor receptor binding and mitogenicity in AKR-2B cells." *J Cell Physiol.*: **132 (1)**, 143-148.
- Cohen, P. (1997). The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends Cell Biol.*: **7 (9)**, 353-361.
- Conney, A.H., Chang, R.L., Jerina, D.M., Wei, S.J. (1994). Studies on the metabolism of benzo[a]pyrene and dose-dependent differences in the mutagenic profile of its ultimate carcinogenic metabolite. *Drug Metab Rev.*: **26 (1-2)**, 125-63.

- Cosman, M., de los Santos, C., Fiala, R., Hingerty, B.E., Singh, S.B., Ibanezi, V., Margulis, L.A., Live, D., Geacintov, N.E., Broyde, S., Patel, D.J. (1992). Solution conformation of the major adduct between the carcinogen (+)-anti-benzo[a]pyrene diol epoxide and DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*: **89**, 1914-1918.
- Cotelle, S., Féraud, J.F. (1999). Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environ Mol Mutagen.*: **34 (4)**, 246-255.
- Crossthwaite, A.J., Hasan, S., Williams, R.J. (2002). Hydrogen peroxide-mediated phosphorylation of ERK1/2, Akt/PKB and JNK in cortical neurones: dependence on Ca(2+) and PI3-kinase. *J Neurochem.*: **80 (1)**, 24-35.
- Culp, S.J., Warbritton, A.R., Smith, B.A., Li, E.E., Beland, F.A. (2000). DNA adduct measurements, cell proliferation and tumor mutation induction in relation to tumor formation in B6C3F1 mice fed coal tar or benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis*: **21 (7)**, 1433-1440.
- Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev.*: **13 (22)**, 2905-2927.
- Davila, D.R., Davis, D.P., Campbell, K., Cambier, J.C., Zigmond, L.A., Burchiel, S.W. (1995). Role of alterations in Ca(2+)-associated signaling pathways in the immunotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Toxicol Environ Health*: **45 (2)**, 101-126.
- Davila, D.R., Romero, D.L., Burchiel, S.W. (1996). Human T cells are highly sensitive to suppression of mitogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and this effect is differentially reversed by alpha-naphthoflavone. *Toxicol Appl Pharmacol.*: **139 (2)**, 333-341.
- Davis, D.A., Burchiel, S.W. (1992). Inhibition of calcium-dependent pathways of B-cell activation by DMBA. *Toxicol Appl Pharmacol.*: **116 (2)**, 202-208.
- Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*: **103 (2)**, 239-252.
- Day, B.W., Naylor, S., Gan, L.S., Sahali, Y., Nguyen, T.T., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. (1990). Molecular dosimetry of polycyclic aromatic hydrocarbon epoxides and diol epoxides via hemoglobin adducts. *Cancer Res.*: **50 (15)**, 4611-4618.
- Day, B. W., Naylor, S., Gan, L.S., Sahali, Y., Nguyen, T.T., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. (1991). Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of diols and tetrols from reactions of polycyclic aromatic hydrocarbon epoxides with hemoglobin. *J Chromatogr.*: **562 (1-2)**, 563-571.
- Dérijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J., Davis, R.J. (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science*: **267 (5198)**, 682-685.
- D'Errico, M., Lemma, T., Calcagnile, A., Proietti De Santis, L., Dogliotti, E. (2007). Cell type and DNA damage specific response of human skin cells to environmental agents. *Mutat Res.*: **614 (1-2)**, 37-47.

- Devary, Y., Gottlieb, R.A., Smeal, T., Karin, M. (1992). The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of src tyrosine kinases. *Cell*: **71 (7)**, 1081-1091.
- Doll, R., Peto, R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst.*: **66 (6)**, 1191-1308.
- Drablos, F., Feyzi, E., Aas, P.A., Vaagbo, C.B., Kavli, B., Bratlie, M.S., Penza-Diaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., Krokan, H.E. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)*: **3 (11)**, 1389-1407.
- Dreij, K., Seidel, A., Jernström, B. (2005). Differential removal of DNA adducts derived from anti-diol epoxides of dibenzo[a,l]pyrene and benzo[a]pyrene in human cells. *Chem Res Toxicol.*: **18 (4)**, 655-664.
- Ehrenberg, L., Granath, F., Törnqvist, M. (1996). Macromolecule adducts as biomarkers of exposure to environmental mutagens in human populations. *Environ Health Perspect.*: **104 (Suppl 3)**, 423-428.
- Enslin, H., Raingeaud, J., Davis, R.J. (1998). Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem.*: **273 (3)**, 1741-1748.
- Enslin, H., Davis, R.J. (2001). Regulation of MAP kinases by docking domains. *Biol Cell.*: **93 (1-2)**, 5-14.
- Evans, E., Fellows, J., Coffey, A., Wood, R.D. (1997a). Open complex formation around lesion during nucleotide excision repair provides a structure for cleavage by human XPG protein. *EMBO J.*: **16**, 625-638.
- Evans, E., Moggs, J.G., Hwang, J.R., Egly, J.M., Wood, R.D. (1997b). Mechanism of open complex and dual incision formation by nucleotide excision repair factors. *EMBO J.*: **16 (21)**, 6559-6573.
- Finkel T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol.*: **10 (2)**, 248-253.
- Finlayson-Pitts, B.J., Pitts, J.N. Jr. (1997). Tropospheric Air Pollution: Ozone, Airborne Toxics, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, and Particles. *Science*: **276 (5315)**, 1045-1051.
- Fitch, M.E., Nakajima, S., Yasui, A., Ford, J.M. (2003). In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane dimers by the DDB2 gene product. *J. Biol. Chem.*: **278**, 46906-46910.
- Flowers, L., Bleczinski, W.F., Burczynski, M.E., Harvey, R.G., Penning, T.M. (1996). Disposition and biological activity of benzo[a]pyrene-7,8-dione. A genotoxic metabolite generated by dihydrodiol dehydrogenase. *Biochemistry*: **35 (42)**, 13664-13672.
- Flowers, L., Ohnishi, S.T., Penning, T.M. (1997). DNA strand scission by polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinones: role of reactive oxygen species, Cu(II)/Cu(I) redox cycling, and o-semiquinone anion radicals. *Biochemistry*: **36 (28)**, 8640-8648.

- Fornari, F.A. Jr, Jarvis, D.W., Grant, S., Orr, M.S., Randolph, J.K., White, F.K., Gewirtz, D.A. (1996). Growth arrest and non-apoptotic cell death associated with the suppression of c-myc expression in MCF-7 breast tumor cells following acute exposure to doxorubicin. *Biochem Pharmacol.*: **51 (7)**, 931-940.
- Frank, S., Renner, T., Ruppert, T., Scherer, G. (1998). Determination of albumin adducts of (+)-anti-benzo[a]pyrene-diol-epoxide using an high-performance liquid chromatographic column switching technique for sample preparation and gas chromatography-mass spectrometry for the final detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*: **713 (2)**, 331-337.
- Fridman, J.S., Lowe, S.W. (2003). "Control of apoptosis by p53." *Oncogene*: **22 (56)**, 9030-9040.
- Friedberg, E.C., Fischhaber, P.L., Kisker, C. (2001). Error-Prone DNA Polymerases: Novel Structures and the Benefits of Infidelity. *Cell*: **107**, 9-12.
- Fruehauf, J.P., Meyskens, F.L. Jr. (2007). Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res.*: **13 (3)**, 789-794.
- Gärtner, R.R., Thériault, G.P. (2002). Risk of bladder cancer in foundry workers: a meta-analysis. *Occup Environ Med.*: **59 (10)**, 655-663.
- Geacintov, N.E., Broyde, S., Buterin, T., Naegeli, H., Wu, M., Yan, S., Patel, D.J. (2002). Thermodynamic and Structural Factors in the Removal of Bulky DNA Adducts by the Nucleotide Excision Repair Machinery. *Biopolymers (Nucleic Acid Sciences)*: **65**, 202-210.
- Georgiadis, P., Topinka, J., Vlachodimitropoulos, D., Stoikidou, M., Gioka, M., Stephanou, G., Autrup, H., Demopoulos, N.A., Katsouyanni, K., Sram, R., Kyrtopoulos, S.A. (2005). Interactions between CYP1A1 polymorphisms and exposure to environmental tobacco smoke in the modulation of lymphocyte bulky DNA adducts and chromosomal aberrations. *Carcinogenesis*: **26 (1)**, 93-101.
- Gewirtz, D.A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.*: **57 (7)**, 727-7241.
- Gotoh, N., Tojo, A., Shibuya, M. (1996). A novel pathway from phosphorylation of tyrosine residues 239/240 of Shc, contributing to suppress apoptosis by IL-3. *EMBO J.*: **15 (22)**, 6197-6204.
- Gunz, D., Hess, M.T., Naegeli, H. (1996). Recognition of DNA adducts by human nucleotide excision repair. Evidence for a thermodynamic probing mechanism. *J Biol Chem.*: **271 (41)**, 25089-25098.
- Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A.J., Cavanaugh, J., Sluss, H.K. (1996). "Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors." *EMBO J.*: **15**, 2760-2770.
- Hanawalt, P.C. (1994). Transcription-coupled repair and human disease. *Science*: **266 (5193)**, 1957-1958.
- Hanawalt, P.C. (2000). DNA repair. The bases for Cockayne syndrome. *Nature*: **405 (6785)**, 415-416.

- Hanke, J.H., Gardner, J.P., Dow, R.L., Changelian, P.S., Brissette, W.H., Weringer, E.J., Pollok, B.A., Connelly, P. (1996). Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem.*: **271** (2), 695-701.
- Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*: **35**, 307-340.
- Harper, S.J., LoGrasso, P. (2001). Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38. *Cell Signal.*: **13** (5), :299-310.
- He, Z., Henrickson, L.A., Wold, M.S., Ingles, C.J. (1995). RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair. *Nature*: **374**, 566-569.
- Hecht, S.S., LaVoie, E., Mazzaresse, R., Amin, S., Bedenko, V., Hoffmann, D. (1978). 1,2-dihydro-1,2-dihydroxy-5-methylchrysene, a major activated metabolite of the environmental carcinogen 5-methylchrysene. *Cancer Res.*: **38** (7), 2191-2194.
- Hecht, S.S., Amin, S., Huie, K., Melikian, A.A., Harvey, R.G. (1987). Enhancing effect of a bay region methyl group on tumorigenicity in newborn mice and mouse skin of enantiomeric bay region diol epoxides formed stereoselectively from methylchrysenes in mouse epidermis. *Cancer Res.*: **47** (20), 5310-5315.
- Herrmann, H., Wiche, G. (1987). Plectin and IFAP-300K are homologous proteins binding to microtubule-associated proteins 1 and 2 and to the 240-kilodalton subunit of spectrin. *J Biol Chem.*: **262** (3), 1320-1325.
- 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. *Moll Cell Biol.*: **17**, 7069-7076.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that bind and potentiate the c-Jun activation domain. *Genes Dev.*: **7**, 2135-2148.
- Hoeijmakers, J.H. (1993). Nucleotide excision repair. II: From yeast to mammals. *Trends Genet.*: **9** (6), 211-217.
- Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance: mechanisms for preventing cancer. *Nature*: **411**, 366-374.
- Huang, J.C., Svoboda, D.L., Reardon, J.T., Sancar, A. (1992). Human nucleotide excision nuclease removes thymine dimers from DNA by incising the 22nd phosphodiester bond 5' and the 6th phosphodiester bond 3' to the photodimer. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **89** (8), 3664-3668.
- Hyde, S.C., Emsley, P., Hartshorn, M.J., Mimmack, M.M., Gileadi, U., Pearce, S.R., Gallagher, M.P., Gill, D.R., Hubbard, R.E., Higgins, C.F. (1990). Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*: **346** (6282), 362-365.

- IARC (International Agency for Research on Cancer), (1983). Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1: Chemical Environmental and Experimental Data. **Vol.32**. International Agency for research on Cancer, Lyon, France. 66-67.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), (2004). Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval. Carcinog. Risks Hum.* **83**, 1-1438.
- Jaffrézou, J.P., Levade, T., Bettaïeb, A., Andrieu, N., Bezombes, C., Maestre, N., Vermeersch, S., Rouse, A., Laurent, G. (1996). Daunorubicin-induced apoptosis: triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis. *EMBO J.*: **15 (10)**, 2417-2424.
- Jerina, D.M., Chadha, A., Cheh, A.M., Schurdak, M.E., Wood, A.W., Sayer, J.M. (1991). Covalent bonding of bay-region diol epoxides to nucleic acids. *Adv Exp Med Biol.*: **283**, 533-553.
- Kallunki, T., Su, B., Tsigelny, I., Sluss, H.K., Dérijard, B., Moore, G., Davis, R., Karin, M. (1994). JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev.*: **8 (24)**, 2996-3007.
- Kamataki, T., Fujieda, M., Kiyotani, K., Iwano, S., Kunitoh, H. (2005). Genetic polymorphism of CYP2A6 as one of the potential determinants of tobacco-related cancer risk. *Biochem Biophys Res Commun.*: **338 (1)**, 306-310.
- Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R.W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.*: **51 (23)**, 6304-6311.
- Kastan, M.B., Zhan, Q., el-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B., Fornace, A.J. Jr. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*: **71 (4)**, 587-597.
- Kastan, M.B., Bartek, J. (2004). "Cell-cycle checkpoints and cancer." *Nature*: **432 (7015)**, 316-323.
- Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J., Waterfield, M.D. (2001). Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.*: **17**, 615-675.
- Kaufmann, S.H. (1989). Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res.*: **49 (21)**, 5870-5878.
- Kennedy, N.J., Davis, R.J. (2003). Role of JNK in tumor development. *Cell Cycle*: **2 (3)**, 199-201.
- Kharbanda, S., Ren, R., Pandey, P., Shafman, T.D., Feller, S.M., Weichselbaum, R.R., Kufe, D.W. (1995). Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature*: **376 (6543)**, 785-788.
- Knebel, A., Rahmsdorf, H.J., Ullrich, A., Herrlich, P. (1996). Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.*: **15 (19)**, 5314-5325.

- Knize, M.G., Salmon, C.P., Pais, P., Felton, J.S. (1999). Food heating and the formation of heterocyclic aromatic amine and polycyclic aromatic hydrocarbon mutagens/carcinogens. *Adv Exp Med Biol.*: **459**, 179-193.
- Konishi, H., Matsuzaki, H., Tanaka, M., Ono, Y., Tokunaga, C., Kuroda, S., Kikkawa, U. (1996). Activation of RAC-protein kinase by heat shock and hyperosmolarity stress through a pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **93 (15)**, 7639-7643.
- Kraemer, K.H., Lee, M.M., Andrews, A.D., Lambert, W.C. (1994). The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Arch Dermatol.*: **130 (8)**, 1018-1021.
- Krieger, J.A., Born, J.L., Burchiel, S.W. (1994). Persistence of calcium elevation in the HPB-ALL human T cell line correlates with immunosuppressive properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol.*: **127 (2)**, 268-274.
- Krieger, J.A., Davila, D.R., Lytton, J., Born, J.L., Burchiel, S.W. (1995). Inhibition of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPases (SERCA) by polycyclic aromatic hydrocarbons in HPB-ALL human T cells and other tissues. *Toxicol Appl Pharmacol.*: **133 (1)**, 102-108.
- Krzeminski, J., Ni, J., Zhuang, P., Luneva, N., Amin, S., Geacintov, N.E. (1999). Total synthesis, mass spectrometric sequencing, and stabilities of oligonucleotide duplexes with single trans-anti-BPDE-N6-dA lesions in the N-ras codon 61 and other sequence contexts. *Polycyclic Aromat. Compd.*: **17**, 1-10.
- Kyriakis, J.M., Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.*: **81 (2)**, 807-869.
- de Laat, W.L., Jaspers, N.G., Hoeijmakers, J.H. (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.*: **13 (7)**, 768-785.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*: **227**, 680-685.
- Lainé, J.P., Egly, J.M. (2006). Initiation of DNA repair mediated by a stalled RNA polymerase II. *EMBO J.*: **25 (2)**, 387-397.
- Lam, M.H., Rosen, J.M. (2004). Chk1 versus Cdc25: chking one's levels of cellular proliferation. *Cell Cycle*: **(11)**, 1355-1357.
- Laneuville, P. (1995). Abl tyrosine protein kinase. *Semin Immunol.*: **7 (4)**, 255-266.
- Lavin, M.F., Birrell, G., Chen, P., Kozlov, S., Scott, S., Gueven, N. (2005). ATM signaling and genomic stability in response to DNA damage. *Mutat Res.*: **569 (1-2)**, 123-132.
- Lee, B.M., Yin, B.Y., Herbert, R., Hemminki, K., Perera, F.P., Santella, R.M. (1991). Immunologic measurement of polycyclic aromatic hydrocarbon-albumin adducts in foundry workers and roofers. *Scand J Work Environ Health.*: **17 (3)**, 190-194.

- Lehmann, A.R. (2003). DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie*: **85**, 1101-1111.
- Lei, K., Davis, R.J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **100 (5)**, 2432-2437.
- Lemaire, M., Froment, C., Boutros, R., Mondesert, O., Nebreda, A.R., Monsarrat, B., Ducommun, B. (2006). CDC25B phosphorylation by p38 and MK-2. *Cell Cycle*: **5 (15)**, 1649-1653.
- Lewis, D.F., Ioannides, C., Parke, D.V. (1998). Cytochromes P450 and species differences in xenobiotic metabolism and activation of carcinogen. *Environ Health Perspect.*: **106 (10)**, 633-641.
- Li, J., Tang, M. S., Liu, B., Shi, X., Huang, C. (2004 a) "A critical role of PI-3K/Akt/JNKs pathway in benzo[a]pyrene diol-epoxide (B[a]PDE)-induced AP-1 transactivation in mouse epidermal Cl41 cells." *Oncogene*: **23 (22)**, 3932-3944.
- Li, J., Chen, H., Tang, M.S., Shi, X., Amin, S., Desai, D., Costa, M., Huang, C. (2004 b). PI-3K and Akt are mediators of AP-1 induction by 5-MCDE in mouse epidermal Cl41 cells. *J Cell Biol.*: **165 (1)**, 77-86.
- Lin, A., Minden, A., Martinetto, H., Claret, F.X., Lange-Carter, C., Mercurio, F., Johnson, G.L., Karin, M. (1995). Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science*: **268 (5208)**, 286-290.
- Lin, R.Z., Hu, Z.W., Chin, J.H., Hoffman, B.B. (1997). Heat shock activates c-Src tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in NIH3T3 fibroblasts. *J Biol Chem.*: **272 (49)**, 31196-31202.
- Ljungman, M., Zhang, F. (1996). Blockage of RNA polymerase as a possible trigger for u.v. light-induced apoptosis. *Oncogene*: **13 (4)**, 823-831.
- Lindahl, T., Wood, R.D. (1999). "Quality control by DNA repair." *Science*: **286**, 1897-1905.
- Lukas, J., Lukas, C., Bartek, J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)*: **3 (8-9)**, 997-1007.
- Luzi, L., Confalonieri, S., Di Fiore, P.P., Pelicci, P.G. (2000). Evolution of Shc functions from nematode to human. *Curr Opin Genet Dev.*: **10 (6)**, 668-674.
- Maehama, T., Dixon, J.E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem.*: **273 (22)**, 13375-13378.
- Maillard, O., Solyom, S., Naegeli, H. (2007). An aromatic sensor with aversion to damaged strands confers versatility to DNA repair. *PLoS Biol.*: **5 (4)**, e79.
- Masutani, C., Sugasawa, K., Yanagisawa, J., Sonoyama, T., Ui, M., Enomot, T., Takio, K., Tanaka, K., van der Spek, P.J., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H.J., Hanaoka, F. (1994). Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *EMBO J.*: **13**, 1831-1843.

- Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K., Hanaoka, F. (1999). The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature*: **399**, 700-704.
- Melikian, A.A., Amin, S., Hecht, S.S., Hoffmann, D., Pataki, J., Harvey, R.G. (1984). Identification of the major adducts formed by reaction of 5-methylchrysene anti-dihydrodiol-epoxides with DNA in vitro. *Cancer Res.*: **44 (6)**, 2524-2529.
- Mensing, T., Marczynski, B., Engelhardt, B., Wilhelm, M., Preuss, R., Kappler, M., Angerer, J., Kafferlein, H.U., Scherenberg, M., Seidel, A., Brüning, T. (2005). DNA adduct formation of benzo[a]pyrene in white blood cells of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int J Hyg Environ Health.*: **208 (3)**, 173-178.
- Merimsky, O., Inbar, M. (1998). Cigarette smoking and skin cancer. *Clin Dermatol.*: **16 (5)**, 585-588.
- Mittelstadt, P.R., Salvador, J.M., Fornace, Jr. A.J., Ashwell, J.D. (2005). Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase. *Cell Cycle*: **4 (9)**, 1189-1192.
- Mizuno, T., Matsunaga, T., Ihara, M., Nikaido, O. (1991). Establishment of a monoclonal antibody recognizing cyclobutane-type thymine dimers in DNA: a comparative study with 64M-1 antibody specific for (6-4)photoproducts. *Mutat Res.*: **254 (2)**, 175-184.
- Mori, T., Nakane, M., Hattori, T., Matsunaga, T., Ihara, M., Nikaido, O. (1991). Simultaneous establishment of monoclonal antibodies specific for either cyclobutane pyrimidine dimer or (6-4)photoproduct from the same mouse immunized with ultraviolet-irradiated DNA. *Photochem Photobiol.*: **54 (2)**, 225-232.
- Mullenders, L., Berneburg, M. (2001). Photoimmunology and nucleotide excision repair: impact of transcription coupled and global genome excision repair. *J. of Photochemistry and Photobiology*: **56**, 97-100.
- Naylor, S., Gan, L.S., Day, B.W., Pastorelli, R., Skipper, P.L., Tannenbaum, S.R. (1990). Benzo[a]pyrene diol epoxide adduct formation in mouse and human hemoglobin: physicochemical basis for dosimetry. *Chem Res Toxicol.*: **3 (2)**, 111-117.
- Nebert, D.W., Puga, A., Vasiliou, V. (1993). Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann N Y Acad Sci.*: **685**, 624-640.
- Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B., Gonzalez, F.J. (2004). Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem.*: **279 (23)**, 23847-23850.
- Nelson, W.G., Kastan, M.B. (1994). DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol.*: **14 (3)**, 1815-1823.
- Oesch, F., Arand, M. (1999). "Xenobiotic metabolism" In *Toxicology* (Marquardt, H., Schäfer, S., McClellan, R., Welsch, F., ed), Academic Press, S.83-109.
- Orrenius, S., McCabe, M.J. Jr, Nicotera, P. (1992). Ca(2+)-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol Lett.*: **64-65** Spec No: 357-364.

- Osborn, A.J., Elledge, S.J., Zou, L. (2002). Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol.*: **12 (11)**, 509-516.
- Ostling, O., Johanson, K.J. (1984). Microelectroporetic study of radiation-induced DNA Damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*: **123 (1)**, 291-298.
- Pallardy, M., Mishal, Z., Lebec, H., Bohuon, C. (1992). Immune modification due to chemical interference with transmembrane signalling: application to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int J Immunopharmacol.*: **14 (3)**, 377-382.
- Panaretakis, T., Laane, E., Pokrovskaja, K., Björklund, A.C., Moustakas, A., Zhivotovsky, B., Heyman, M., Shoshan, M.C., Grandér, D. (2005). Doxorubicin requires the sequential activation of caspase-2, protein kinase Cdelta, and c-Jun NH2-terminal kinase to induce apoptosis. *Mol Biol Cell.*: **16 (8)**, 3821-3831.
- Park, J.M., Greten, F.R., Li, Z.W., Karin, M. (2002). Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science*: **297 (5589)**, 2048-2051.
- Park, J.H., Gopishetty, S., Szewczuk, L.M., Troxel, A.B., Harvey, R.G., Penning, T.M. (2005). Formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dGuo) by PAH o-quinones: involvement of reactive oxygen species and copper(II)/copper(I) redox cycling. *Chem Res Toxicol.*: **18 (6)**, 1026-1037.
- Pavanello, S., Gabbani, G., Mastrangelo, G., Brugnone, F., Maccacaro, G., Clonfero, E. (1999). Influence of GSTM1 genotypes on anti-BPDE-DNA adduct levels in mononuclear white blood cells of humans exposed to PAH. *Int Arch Occup Environ Health.*: **72 (4)**, 238-246.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.*: **22 (2)**, 153-183.
- Pei, X.H., Nakanishi, Y., Takayama, K., Bai, F., Hara, N. (1999). Benzo[a]pyrene activates the human p53 gene through induction of nuclear factor kappaB activity. *J Biol Chem.*: **274 (49)**, 35240-35246.
- Pellicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G., Nicoletti, I., Grignani, F., Pawson, T., Pellicci, P.G. (1992). A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell*: **70 (1)**, 93-104.
- Penning, T.M., Ohnishi, S.T., Ohnishi, T., Harvey, R.G. (1996). Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. *Chem Res Toxicol.*: **9 (1)**, 84-92.
- Pillaire, M.J., Nebreda, A.R., Darbon, J.M. (2000). Cisplatin and UV radiation induce activation of the stress-activated protein kinase p38gamma in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.*: **278 (3)**, 724-728.

- Porras, A., Zuluaga, S., Black, E., Valladares, A., Alvarez, A.M., Ambrosino, C., Benito, M., Nebreda, A.R. P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol Biol Cell*: **15 (2)**, 922-933.
- Preuss, R., Angerer, J., Drexler, H. (2003). Naphthalene-an environmental and occupational toxicant. *Int Arch Occup Environ Health*: **76 (8)**, 556-576.
- Ramachandran, C., Samy, T.S., Huang, X.L., Yuan, Z.K., Krishan, A. (1993). Doxorubicin-induced DNA breaks, topoisomerase II activity and gene expression in human melanoma cells. *Biochem Pharmacol*: **45 (6)**, 1367-1371.
- Raman, M., Chen, W., Cobb, M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*: **26 (22)**, 3100-3112.
- Ratner, J.N., Balasubramanian, B., Corden, J., Warren, S.L., Bregman, D.B. (1998). Ultraviolet radiation-induced ubiquitination and proteasomal degradation of the large subunit of RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair. *J Biol Chem*: **273 (9)**, 5184-5189.
- Reardon, J.T, Sancar, A. (2003). Recognition and repair of the cyclobutane thymine dimer, a major cause of skin cancers, by the human excision nuclease. *Genes Dev*: **17 (20)**, 2539-2551.
- Reinhardt, H.C., Aslanian, A.S, Lees, J.A., Yaffe, M.B. (2007). p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell*: **11 (2)**, 175-189.
- Riedl, T., Hanaoka, F., Egly, J.M. (2003). The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *EMBO J*: **22 (19)**, 5293-5303.
- Rojas, M., Cascorbi, I., Alexandrov, K., Kriek, E., Auburtin, G., Mayer, L., Kopp-Schneider, A., Roots, I., Bartsch, H. (2000). Modulation of benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism. *Carcinogenesis*: **21 (1)**, 35-41.
- Roos, P.H., Tschirbs, S., Welge, P., Hack, A., Theegarten, D., Mogilevski, G., Wilhelm, M. (2002). Induction of cytochrome P450 1A1 in multiple organs of minipigs after oral exposure to soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Arch Toxicol*: **76 (5-6)**, 326-334.
- Rosette, C., Karin, M. (1996). Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science*: **274 (5290)**, 1194-1197.
- Rotman, G., Shiloh, Y. (1999). ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene*: **18 (45)**, 6135-6144.
- Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., Mbamalu, G., Pelicci, G., Daly, R., Li, W., Batzer, A., Thomas, S., Brugge, J., Pelicci, P.G., Schlessinger J., Pawson T. (1992). Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature*: **360 (6405)**, 689-692.

- Ruan, Q., Kolbanovskiy, A., Zhuang, P., Chen, J., Krzeminski, J., Amin, S., Geacintov, N.E. (2002). Synthesis and Characterization of Site-Specific and Stereoisomeric Fjord Dibenzo[*a,l*]pyrene Diol. *Chem. Res. Toxicol.*: **15**, 249-261.
- Rubin, H. (2001). Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis*: (**12**), 1903-1930.
- Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Zinck, R., Nordheim, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H.J. (1994). Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell*: **78**, 963-972.
- Salas, V.M., Burchiel, S.W. (1998). Apoptosis in Daudi human B cells in response to benzo[*a*]pyrene and benzo[*a*]pyrene-7,8-dihydrodiol. *Toxicol Appl Pharmacol.*: **151 (2)**, 367-376.
- Sarkaria, J.N., Tibbetts, R.S., Busby, E.C., Kennedy, A.P., Hill, D.E., Abraham, R.T. (1998). Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. *Cancer Res.*: **58**, 4375-4382.
- Sato, H., Sato, M., Kanai, H., Uchiyama, T., Iso, T., Ohyama, Y., Sakamoto, H., Tamura, J., Nagai, R., Kurabayashi, M. (2005). Mitochondrial reactive oxygen species and c-Src play a critical role in hypoxic response in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.*: **67 (4)**, 714-722.
- Satoh, M.S., Lindahl, T. (1994). Enzymatic repair of oxidative DNA damage. *Cancer Res.*: **90**, 1899-1901.
- Sarker, A.H., Tsutakawa, S.E., Kostek, S., Ng, C., Shin, D.S., Peris, M., Campeau, E., Tainer, J.A., Nogales, E., Cooper, P.K. (2005). Recognition of RNA Polymerase II and Transcription Bubbles by XPG, CSB, and TFIIH: Insights for Transcription-Coupled Repair and Cockayne Syndrome. *Molecular Cell*: **20**, 187-198.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*: **103 (2)**, 211-225.
- Seimiya, H., Mashima, T., Toho, M., Tsuruo, T. (1997). c-Jun NH₂-terminal kinase-mediated activation of interleukin-1 β converting enzyme/CED-3-like protease during anticancer drug-induced apoptosis. *J Biol Chem.*: **272 (7)**, 4631-4636.
- Shaw, M., Cohen, P., Alessi, D.R. (1998). The activation of protein kinase B by H₂O₂ or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. *Biochem J.*: **336 (Pt 1)**, 241-246.
- Shiloh, Y. (2001). ATM (ataxia telangiectasia mutated): expanding roles in the DNA damage response and cellular homeostasis. *Biochem Soc Trans.*: **29 (Pt 6)**, 661-666.
- Shivji, M.K.K., Podust, V.N., Hubsher, U., Wood, R.D. (1995). Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RCF and RPA. *Biochemistry*: **34**, 5011-5017.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.*: **175 (1)**, 184-191.
- Skipper, P.L., Tannenbaum, S.R. (1990). Protein adducts in the molecular dosimetry of chemical carcinogens. *Carcinogenesis*: **11 (4)**, 507-518.

- Skipper, P.L., Peng, X., Soohoo, C.K., Tannenbaum, S.R. (1994). Protein adducts as biomarkers of human carcinogen exposure. *Drug Metab Rev.*: **26 (1-2)**, 111-124.
- Smith, L.E., Denissenko, M.F., Bennett, W.P., Li, H., Amin, S., Tang, M., Pfeif, G.P. (2000). Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst.*: **92 (10)**, 803-811.
- Smithgall, T.E., Harvey, R.G., Penning, T.M. (1988). Spectroscopic identification of ortho-quinones as the products of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol oxidation catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. A potential route of proximate carcinogen metabolism. *J Biol Chem.*: **263 (4)**, 1814-1820.
- Solhaug, A., Refsnes, M., Holme, J.A. (2004). Role of cell signalling involved in induction of apoptosis by benzo[a]pyrene and cyclopenta[c,d]pyrene in Hepa1c1c7 cells. *J Cell Biochem.*: **93 (6)**, 1143-1154.
- Sordet, O., Khan, Q.A., Kohn, K.W., Pommier, Y. (2003). Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *Curr Med Chem Anticancer Agents*: **3 (4)**, 271-290.
- Sugasawa, K., Masutani, C., Uchida, A., Maekawa, T., van der Spek, P.J., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H., Hanaoka F. (1996). HHR23B, a human Rad23 homolog, stimulates XPC protein in nucleotide excision repair in vitro. *Mol Cell Biol.*: **16 (9)**, 4852-4861.
- Sugasawa, K., Ng, J.M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P.J., Eker, A.P., Hanaoka, F., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H. (1998). Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell*: **2 (2)**, 223-232.
- Sugasawa, K. (2006). UV-induced ubiquitylation of XPC complex, the UV-DDB-ubiquitin ligase complex, and DNA repair. *J Mol Histol.*: **37 (5-7)**, 189-202.
- Tang, D.L., Rundle, A., Warburton, D., Santella, R.M., Tsai, W.Y., Chiamprasert, S., Hsu, Y.Z., Perera, F.P. (1998). Associations between both genetic and environmental biomarkers and lung cancer: evidence of a greater risk of lung cancer in women smokers. *Carcinogenesis*: **19 (11)**, 1949-1953.
- Tapias, A., Auriol, J., Forget, D., Enzlin, J.H., Scharer, O.D., Coin, F., Coulombe, B., Egly, J.M. (2004). Ordered conformational changes in damaged DNA induced by nucleotide excision repair factors. *J Biol Chem.*: **279 (18)**, 19074-19083.
- Thoma, F. (1999). Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. *EMBO J.*: **18 (23)**, 6585-6598.
- Thomas, S.M., Brugge, J.S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol.*: **13**, 513-609.
- Tournier, C., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Barrett, T., Davis, R.J. (1997). Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **94 (14)**, 7337-7342.

- Tournier, C., Hess, P., Yang, D.D., Xu, J., Turner, T.K., Nimmual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S.N., Flavell, R.A., Davis, R.J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*: **288 (5467)**, 870-874.
- Tournier, C., Dong, C., Turner, T.K., Jones, S.N., Flavell, R.A., Davis, R.J. (2001). MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev.*: **15 (11)**, 1419-1426.
- Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol.*: **8 (2)**, 205-215.
- U.S. Environmental Protection Agency. (EPA) *Health and Environmental Effects Profile for Naphthalene*. EPA/600/x-86/241. Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Cincinnati, OH. 1986.
- Valladares, A., Alvarez, A.M., Ventura, J.J., Roncero, C., Benito, M., Porras, A. (2000). p38 mitogen-activated protein kinase mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in rat fetal brown adipocytes. *Endocrinology*: **141 (12)**, 4383-4395.
- van der Valk, P., van Kalken, C.K., Ketelaars, H., Broxterman, H.J., Scheffer, G., Kuiper, C.M., Tsuruo, T., Lankelma, J., Meijer, C.J., Pinedo, H.M., Scheper, R.J. (1990). Distribution of multi-drug resistance-associated P-glycoprotein in normal and neoplastic human tissues. Analysis with 3 monoclonal antibodies recognizing different epitopes of the P-glycoprotein molecule. *Ann Oncol.*: **1 (1)**, 56-64.
- van Hoffen, A., Balajee, A.S., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H.F. (2003). Nucleotide excision repair and its interplay with transcription. *Toxicology*: **193**, 79-90.
- van Schooten, F.J., Hillebrand, M.J.X., van Leeuwen, F.E., Lutgerink, J.T., van Zandwijk, N., Jansen, H.M., Kriek, E. (1990). Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in lung tissue from lung cancer patients. *Carcinogenesis*: **11 (9)**, 1677-1681.
- Ventura, J.J., Cogswell, P., Flavell, R.A., Baldwin, A.S., Davis, R.J. Jr (2004). JNK potentiates TNF-stimulated necrosis by increasing the production of cytotoxic reactive oxygen species. *Genes Dev.*: **18 (23)**, 2905-2915.
- Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*: **408 (6810)**, 307-310.
- Volker, M., Mone, M.J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H.J., van Driel, R., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H.F. (2001). Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors *in vivo*. *Mol. Cell*: **8**, 213-224.
- Wada, T., Penninger, J.M. (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*: **23 (16)**, 2838-2849.
- Wakasugi, M., Sancar, A. (1998). Assembly, subunit composition, and footprint of human DNA repair excision nuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **95 (12)**, 6669-6674.

- Walker, M.P., Jahnke, G.D., Snedeker, S.M., Gladen, B.C., Lucier, G.W., DiAugustine, R.P. (1992). 32P-postlabeling analysis of the formation and persistence of DNA adducts in mammary glands of parous and nulliparous mice treated with benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis*: **13 (11)**, 2009-2015.
- Wang, G., Chuang, L., Zhang, X., Colton, S., Dombrowski, A., Reiners, J., Diakiw, A., Xu, X.S. (2004). The initiative role of XPC protein in cisplatin DNA damaging treatment-mediated cell cycle regulation. *Nucl. Acid Res.*: **32 (7)**, 2231-2240.
- Wang, Z., Xu, J., Zhou, J.Y., Liu, Y., Wu, G.S. (2006). Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 Is Required for Cisplatin Resistance. *Cancer Res.*: **66 (17)**, 8870-8877.
- Warmuth, I., Harth, Y., Matsui, M.S., Wang, N., DeLeo, V.A. (1994). Ultraviolet radiation induces phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.*: **54 (2)**, 374-376.
- Wei, S.J., Chang, R.L., Wong, C.Q., Bhachech, N., Cui, X.X., Hennig, E., Yagi, H., Sayer, J.M., Jerina, D.M., Preston, B.D., Conney, A.H. (1991). Dose-dependent differences in the profile of mutations induced by an ultimate carcinogen from benzo[a]pyrene. *Proc Natl Acad Sci U S A*: **88 (24)**, 11227-11230.
- Weiss, A., Littman, D.R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*: **76 (2)**, 263-274.
- Weston, A., Willey, J.C., Manchester, D.K., Wilson, V.L., Brooks, B.R., Choi, J.S., Poirier, M.C., Trivers, G.E., Newman, M.J., Mann, D.L. (1988). Dosimeters of human exposure to carcinogens: polycyclic aromatic hydrocarbon-macromolecular adducts. *IARC Sci Publ.*: **89**, 181-189.
- Weston, C.R., Davis, R.J. (2002). The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev.*: **12 (1)**, 14-21.
- Weston, C.R., Davis, R.J. (2007). The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol.*: **19 (2)**, 142-149.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.*: **79 (1)**, 143-180.
- Wilstermann, A.M., Osheroff, N. (2003). Stabilization of eukaryotic topoisomerase II-DNA cleavage complexes. *Curr Top Med Chem.*: **3 (3)**, 321-338.
- Wood, S.C., Holsapple, M.P. (1993). Effects of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene on the superantigen toxic shock syndrome toxin (TSST-1)-induced proliferation and antibody secretion by human lymphocytes. *Fundam Appl Toxicol.*: **20 (3)**, 280-287.
- Wu, Z.H., Shi, Y., Tibbetts, R.S., Miyamoto, S. (2006). Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science*: **311 (5764)**, 1141-1146.
- Wymann, M.P., Pirola, L. (1998). Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta.*: **1436 (1-2)**, 127-150.

- Xu, H., Swoboda, I., Bhalla, P.L., Sijbers, A.M., Zhao, C., Ong, E.K., Hoeijmakers, J.H., Singh, M.B. (1998). Plant homologue of human excision repair gene ERCC1 points to conservation of DNA repair mechanisms. *Plant J.*: **13 (6)**, 823-829.
- Yao, R., Cooper, G.M. (1995). Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science*: **267**, 2003–2006.
- Zarubin, T., Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.*: **15 (1)**, 11-8.
- Zechner, D., Craig, R., Hanford, D.S., McDonough, P.M., Sabbadini, R.A., Glembotski, C.C. (1998). MKK6 activates myocardial cell NF-kappaB and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner. *J Biol Chem*: **273 (14)**, 8232-8239.
- 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 eta. *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 kappa 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.
- Zhou, B.B., Bartek, J. (2004). Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer.*: **4 (3)**, 216-225.
- Zhuang, S., Demirs, J.T., Kochevar, I.E. (2000). p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J Biol Chem*: **275 (34)**, 25939-25948.

Lebenslauf



Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich meine Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

Mainz, den 16.11.2007

Nina Grico