

Induktion von Stress-aktivierten Signalwegen durch den gentoxischen Benzo[a]pyren-Metaboliten BPDE: Mechanismen und Konsequenzen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
vorgelegte

DISSERTATION

von

Ilona Schreck

aus Müllheim

2009

Dekan: Prof. Dr. S. Bräse

Referent: PD Dr. C. Weiss

Koreferent: Prof. Dr. H. Puchta

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2009

Erklärung der Selbstständigkeit

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, dass alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Quellen übernommen wurden, als solche kenntlich gemacht sind und dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Karlsruhe, den 14. Januar 2010

Iona Schreck

Zusammenfassung

Zellen sind fortwährend verschiedensten Stressfaktoren ausgesetzt. Um das zelluläre Gleichgewicht aufrecht zu erhalten, existieren in der Zelle Mechanismen, die auf die Reize reagieren können. Besonders die Reaktion der Zelle auf DNA-schädigende Faktoren ist wichtig für das zelluläre Überleben und die genomische Stabilität. Viele Komponenten der Gentoxin-induzierten zellulären Stressantwort wurden bis jetzt identifiziert, aber über die genauen Mechanismen, wie es zu der Aktivierung der verschiedenen Signalwege in der Zelle kommt und die daraus resultierenden Konsequenzen, ist erst wenig bekannt. Speziell die Frage nach der Generierung des primären Signals und wie die unterschiedlichen zellulären Antworten koordiniert werden, sind noch unzureichend geklärt.

Am Beispiel des gentoxischen Metaboliten Benzo[a]pyren-3,4-diol-9,10-epoxid (BPDE) wurden in dieser Arbeit die Mechanismen und Konsequenzen der BPDE-induzierten zellulären Stressantwort untersucht. BPDE ist der ultimale kanzerogene Metabolit des polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffes (PAK) Benzo[a]pyren (B[a]P). B[a]P ist ein in der Umwelt weitverbreiteter Schadstoff, dessen kanzerogene Wirkung hauptsächlich durch BPDE vermittelt wird. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass BPDE verschiedene Signalwege aktiviert, die abhängig von der DNA-Schadenserkenung sind. Mit Hilfe proteinbiochemischer Methoden konnte eine Aktivierung der Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK) p38 und JNK nachgewiesen werden, die überwiegend für proapoptotische Wirkungen verantwortlich sind. Es konnte gezeigt werden, dass das primäre Signal von der DNA-Schadenserkenung abhängt. ATM und ATR, die prominentesten DNA-Schadensmediatoren, werden nach BPDE-Exposition aktiviert, sind aber nicht an der BPDE-induzierten SAPK-Phosphorylierung beteiligt. Als Komponenten, die an der SAPK-Aktivierung nach BPDE-Exposition beteiligt sind, wurden die Src-ähnlichen Kinasen und die den SAPK übergeordneten MAPK-Kinasen identifiziert. Unabhängig von der SAPK-Aktivierung wird der AKT-Signalweg nach BPDE-Exposition aktiviert, dessen Aktivierung generell zum zellulären Überleben beiträgt. Als möglichen Sensor konnte ein bekanntes DNA-Schadenerkennungsprotein identifiziert werden, die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK). Als Konsequenz der zellulären Antwort auf Gentoxin-Exposition wurde die BPDE-induzierte Apoptose untersucht. Mit Hilfe von Inhibitoren konnte p38 als Vermittler der BPDE-induzierten Apoptose identifiziert werden. Um weitere bisher unbekannt Kandidaten der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung zu identifizieren, wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht im Hochdurchsatz genomweite RNAi-Analysen durchzuführen. Hierfür wurde ein Immunfluoreszenz-basierendes Protokoll mit einer automatisierten mikroskopischen Auswertung etabliert.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit folgende neuen Erkenntnisse bezüglich der BPDE-induzierten zellulären Stressantwort gewonnen: Die Aktivierung der SAPK ist abhängig von der DNA-Schadenserkenkung, jedoch nicht von den DNA-Schadensmediatoren ATM und ATR. Die Src-ähnliche Kinase Lyn ist an der BPDE-induzierten SAPK-Phosphorylierung beteiligt und die AKT-Aktivierung nach BPDE-Exposition erfolgt über DNA-PK. Hinsichtlich der zellulären Konsequenzen wird der BPDE-induzierte Zelltod über p38 und zum Teil über p53 vermittelt. Die Etablierung eines RNAi-basierenden Hochdurchsatz-Verfahrens erlaubt es zukünftig die zelluläre Antwort gegenüber Gentoxinen umfangreich zu untersuchen.

Abstract

Cells are constantly exposed to various forms of stress. Several mechanisms exist to maintain the cellular homeostasis in response to environmental stress. Especially the cellular response to DNA-damaging agents is important for the cellular survival and genomic-stability. Until now various signaling-components have been identified that are involved in the genotoxin-induced cellular stress response. However the exact mechanism by which these pathways are activated and the subsequent consequences are incompletely characterized. In particular the mechanisms of sensing the damage and the generation of the primary signal as well as the coordination of the different signaling pathways have to be elucidated.

In this PhD thesis the mechanisms and consequences of the genotoxin-induced cellular stress response was analysed by using the genotoxic metabolite benzo[a]pyrene-3,4-diol-9,10-epoxide (BPDE) as a model compound. BPDE is the ultimate carcinogenic metabolite of the polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene (B[a]P). B[a]P is one of the most widespread organic pollutants in the environment and exerts its carcinogenicity mainly via the generation of BPDE. The results of this thesis indicate that BPDE exposure leads to the activation of several pathways which are dependent on DNA-damage-recognition. Biochemical analyses showed an activation of the stress-activated protein kinases (SAPK) p38 and JNK after BPDE-exposure, which are known to function proapoptotic. Surprisingly ATM and ATR as prominent mediators of DNA-damage signaling are activated in response to BPDE but are not involved in the BPDE-induced SAPK activation. As signaling-components that are involved in the BPDE-induced SAPK activation the Src-like kinases and the upstream MAPK-kinases were identified. Independently of the SAPK activation BPDE induces the phosphorylation of AKT, which mainly mediates prosurvival signals. In this case a known DNA-damage signaling protein, the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) was identified that initiates BPDE-induced AKT-phosphorylation. As a consequence of the cellular response to genotoxin-exposure the BPDE-induced apoptosis was analysed. Inhibitor studies showed that p38 is a key mediator of BPDE-induced apoptosis. To identify further signaling components that are involved in activation of SAPK after BPDE-exposure, a genom-wide highthroughput RNAi-screening assay needs to be established. Therefore, an immuno-fluorescent based protocol was designed to analyse SAPK activation by an automated microscopic screening system.

In this study new components of the BPDE-induced cellular stress response were identified. The activation of the SAPK after BPDE-exposure is dependent on DNA-damage recognition but interestingly not on ATM and ATR signaling. Independently of

the SAPK activation AKT is phosphorylated after BPDE-exposure and this activation is mediated via DNA-PK. As an upstream component of the BPDE-induced SAPK activation the Src-like kinase Lyn was identified. Regarding the consequences BPDE induced apoptosis is mediated via p38/p53 signaling. In the future the established genom-wide highthrougput RNAi-screening platform will allow to investigate the mechanims of genotoxin-induced cellular stress response extensively.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	2
1.1.1	Benzo[a]pyren	3
1.1.2	Metabolismus von B[a]P	3
1.1.3	Kanzerogene Wirkung von BPDE	4
1.2	Aktivierung von Stress-induzierten Signalwegen	6
1.2.1	Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK)	7
1.2.2	Der PI3K/AKT-Signalweg	9
1.3	Signalwege der zellulären Antwort auf DNA-Schäden	11
1.3.1	ATM und ATR	12
1.3.2	Die DNA-abhängige Proteinkinase	14
1.3.3	Die Poly (ADP-Ribose) Polymerase	14
1.3.4	Die Nukleotidexzisionsreparatur	14
1.4	Zielsetzung der Arbeit	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Chemikalien	17
2.1.2	Induktoren und Inhibitoren	18
2.1.3	siRNA-Sequenzen	18
2.1.4	Antikörper	19
2.1.5	Verwendete Zelllinien	20
2.1.6	Zellkulturmaterialien und Plastikware	20
2.2	Methoden	21
2.2.1	Zellkultur	21
2.2.2	Proteinanalytik	23
2.2.3	Fluoreszenzmikroskopie	26
3	Ergebnisse	29
3.1	p38- und JNK-Aktivierung nach BPDE-Exposition in humanen Zellen	30
3.1.1	Der Signalweg der Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase (PI3K)/AKT ist nicht an der Aktivierung der SAPK durch BPDE beteiligt .	31

3.2	Identifizierung von Faktoren, die an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung beteiligt sind	34
3.2.1	Für die Phosphorylierung von p38 und JNK nach BPDE-Exposition sind die übergeordneten MAPK-Kinasen MKK3/6 und SEK1 wichtig	34
3.2.2	Die Beteiligung von Protein-Tyrosinkinasen an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung	35
3.3	Rolle der DNA-Schadenserkennung bei der BPDE-induzierten zellulären Stressantwort	38
3.3.1	Die DNA-Schadenserkennung ist eine Voraussetzung für die Aktivierung der SAPK durch reaktive PAK-Epoxide	38
3.3.2	Der ATM/ATR Signalweg wird durch BPDE aktiviert, ist aber für die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung erlässlich	40
3.4	Die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) ist für die Aktivierung der AKT nach BPDE-Exposition verantwortlich	43
3.4.1	Die BPDE induzierte AKT-Aktivierung ist abhängig von DNA-PK	44
3.5	Zelluläre Konsequenzen der BPDE-induzierten Stressantwort	45
3.5.1	BPDE induziert Apoptose	46
3.5.2	Die BPDE-induzierte Apoptose wird über p38/p53 vermittelt	49
3.6	Etablierung eines Mikroskopie-basierenden Hochdurchsatz-Verfahrens zur Detektion der SAPK-Aktivierung	52
4	Diskussion	57
4.1	BPDE-induzierte Aktivierung intrazellulärer Signalwege	58
4.1.1	Die Aktivierung der SAPK ist unabhängig von der BPDE-induzierten AKT-Phosphorylierung	58
4.1.2	Die Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinasen (MAPKK) und src-ähnlichen Kinasen sind an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung beteiligt	60
4.2	Die Rolle der DNA-Schadenserkennung in der BPDE-induzierten Aktivierung intrazellulärer Signalwege	62
4.2.1	PAK-Diolepid-induzierte DNA-Schäden, welche schlechter von DNA-Reparaturproteinen erkannt werden, führen zu keiner Aktivierung der SAPK und AKT	63
4.2.2	Die Aktivierung der SAPK nach BPDE-Exposition ist unabhängig von den DNA-Schadens-Signalproteinen ATM und ATR	64
4.2.3	Die Rolle von p53 an der frühen Aktivierung der SAPK nach BPDE-Exposition	66

4.2.4	DNA-PK ist für die BPDE- und UV-induzierte Aktivierung der AKT verantwortlich	67
4.2.5	Die Beteiligung von PARP und NER an der BPDE-induzierten zellulären Stressantwort	68
4.2.6	Modell der BPDE-induzierten zellulären Antwort	70
4.3	Zelluläre Konsequenzen der BPDE-induzierten Phosphorylierung von p38 und JNK	71
4.3.1	Modell der zellulären Konsequenzen nach BPDE-Exposition . .	73
	Literaturverzeichnis	75
	Abbildungsverzeichnis	93
	Tabellenverzeichnis	95
	Abkürzungsverzeichnis	97

1 Einleitung

Die Zelle ist kontinuierlich verschiedensten Reizen ausgesetzt. Diese können sowohl endogenen als auch exogenen Ursprungs sein und unterschiedliche zelluläre Antworten auslösen. Eine positive Wirkung auf die Zelle haben z.B. Wachstumsfaktoren, durch welche die Zellteilung, Differenzierung oder das Wachstum der Zelle angeregt werden. Stressfaktoren hingegen schädigen die Zelle und können unter anderem zum Zellzyklusblock, zu Entzündungsreaktionen oder dem Zelltod führen. Um nach schädigenden Einflüssen das zelluläre Gleichgewicht wiederherzustellen, existieren in der Zelle verschiedene, evolutionär konservierte Mechanismen. Diese sogenannte zelluläre Stressantwort ist insbesondere bei Schädigung der DNA von großer Bedeutung. Wird die DNA durch Gentoxine geschädigt und werden diese Schäden nicht korrekt repariert, so entstehen Mutationen, die zu Krebs, aber auch Erbgutveränderungen führen können, welche die Ursachen vieler Krankheiten sind. Die Zelle ist überwiegend umweltbedingten Gentoxinen wie UV- und ionisierender Strahlung ausgesetzt, aber auch Chemotherapeutika und viele andere chemische Fremdstoffe (Xenobiotika) lösen eine zelluläre Antwort aus. Die Aufklärung der Mechanismen, welche durch Gentoxine in der Zelle aktiviert werden, ist wichtig im Hinblick auf Krebsprävention und Entwicklung von Medikamenten.

Ein Gentoxin, über dessen zelluläre Stressantwort einiges bekannt ist, ist die UV-Strahlung. Sowohl über zytoplasmatische Komponenten, wie Protein-Tyrosinkinasen, aber auch über die DNA-Schädigung kommt es zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden, die über das zelluläre Schicksal entscheiden (Herrlich et al., 2008). Über die genauen Mechanismen, speziell wie die Erkennung der Schäden erfolgt und wie es zur Aktivierung der intrazellulären Signalkaskaden kommt, ist noch wenig bekannt. Dies gilt nicht nur für UV-Strahlung-induzierte Signaltransduktionswege, sondern generell für Gentoxine. Am Beispiel des gentoxischen Metaboliten Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE) des polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffs (PAK) Benzo[a]pyren soll deshalb in dieser Arbeit die Aktivierung von Stressreaktionen und ihre Konsequenzen näher untersucht und diskutiert werden.

1.1 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sind in der Umwelt weitverbreitete Stoffe, von denen einige als kanzerogen einzustufen sind. PAK entstehen durch unvollständige Verbrennungsprozesse von organischem Material, wie Holz, Kohle oder Fett. So sind sie beispielsweise natürliche Produkte bei Waldbränden und Vulkanausbrüchen, aber die Hauptquellen sind anthropogenen Ursprungs. Vor allem durch Industrie- und Autoabgase sind PAK in der Umwelt weitverbreitet, aber auch durch Tabakrauch und die Nahrungszubereitung entstehen PAK (Straif et al., 2005). Durch die Industrialisierung und den höheren Energiebedarf sind die PAK-Konzentrationen in der Umwelt im letzten Jahrhundert drastisch gestiegen. Der Mensch ist stetig gegenüber PAK ausgesetzt. In der Luft sind die PAK überwiegend an Feinstaub gebunden und können durch Inhalation in den Körper aufgenommen werden (Edwards, 1983; Nielsen et al., 1996). Auch über die Nahrungskette, z.B. durch Ablagerungen auf Pflanzen (Delschen et al., 1999), sowie durch die Zubereitung von Nahrungsmitteln ist der Körper gegenüber PAK exponiert. Durch zu langes Braten oder Grillen entstehen PAK, die über den Gastrointestinaltrakt in den Körper gelangen. Auch in Meeresfrüchten sind hohe Konzentrationen an PAK zu finden (Phillips, 1999).

PAK bestehen aus fusionierten aromatischen Ringen ohne Heteroatome oder Substituenten. Wegen ihrer Struktur sind sie sehr lipophil und damit schlecht wasserlöslich, weshalb sie sich in der Natur hauptsächlich in der Erde und in den Sedimenten ablagern. Aufgrund ihrer lipophilen Charakteristik zeigen die PAK eine hohe Bioverfügbarkeit im menschlichen Körper. Es konnte gezeigt werden, dass PAK in den meisten Organen nachweisbar sind und sich im Fettgewebe ablagern, von wo sie kontinuierlich abgegeben werden können (Rees et al., 1971). Die Organe, die am stärksten der PAK-Belastung ausgesetzt werden, sind die Lunge, der Gastrointestinaltrakt und die Haut. Die Lunge und der Atemtrakt werden durch Inhalation von z.B. Rauch sehr stark durch PAK belastet, wohingegen der Gastrointestinaltrakt durch PAK-haltige Nahrung exponiert wird. Die Aufnahme über die Haut erfolgt durch den Kontakt mit PAK-haltigem Material wie Kohle oder Teer. Einige Hautkrebsarten, aber auch Lungen-, Magen- und Blasenkrebs konnten mit PAK in Verbindung gebracht werden (Boffetta et al., 1997). Bei Schornsteinfegern und Teearbeitern konnte eine erhöhte Signifikanz an bestimmten Krebsarten festgestellt werden, die auf die Exposition gegenüber PAK zurückzuführen ist (Bolm-Audorff, 1996).

Die Toxizität der PAK ist sehr von ihrer Struktur abhängig. PAK selbst sind nahezu chemisch inert, erst durch Metabolisierung entwickeln sie ihre reaktive Wirkung.

Der am meisten untersuchte PAK mit stark kanzerogenem Potential ist Benzo[a]pyren (B[a]P). Anhand von B[a]P soll im nächsten Abschnitt die toxische Wirkung von PAK erläutert werden.

1.1.1 Benzo[a]pyren

Schon im 19. Jahrhundert wurde eine erhöhte Anfälligkeit von Arbeitern in der Steinkohleerindustrie und in Paraffinraffinerien gegenüber Hautkrebs festgestellt. Aber erst in den 30 er Jahren des 19. Jahrhunderts konnte B[a]P als Bestandteil von Steinkohleer nachgewiesen werden, der in Mäusen nach mehrmaliger Applikation nachweislich kanzerogene Wirkung besaß (Rubin, 2001). Dass B[a]P selbst kein Kanzerogen ist, sondern dass Metabolite für seine toxische Wirkung verantwortlich sind, wurde erst später herausgefunden. B[a]P besteht aus fünf aromatischen Kohlenwasserstoffringen und hat eine planare Struktur (Abb. 1.1). Aufgrund seines lipophilen Charakters kann B[a]P vom Körper nicht einfach ausgeschieden werden, sondern muss metabolisiert werden. Bei der Metabolisierung entstehen wasserlösliche Endprodukte, welche ausgeschieden werden können. Jedoch entstehen bei der Metabolisierung auch Zwischenprodukte, die sehr reaktiv sind und mit zellulären Molekülen wie DNA oder Proteinen interagieren und dadurch zu Schäden führen können. Der Vorgang des Fremdstoffmetabolismus im Allgemeinen und der Metabolismus von B[a]P im Detail soll im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

1.1.2 Metabolismus von B[a]P

Fremdstoffe im Körper werden vor allem über die Nieren (renal) oder die Galle (biliär) und letztlich über den Darm ausgeschieden. Eine Voraussetzung für die Ausscheidung über diese Wege ist eine sehr gute Wasserlöslichkeit der Stoffe. Damit lipophile Stoffe nicht im Körper akkumulieren, werden sie mit Hilfe fremdstoffmetabolisierender Enzyme zu hydrophilen Ausscheidungsprodukten umgewandelt. Der Fremdstoffmetabolismus wird in Phase I (Funktionalisierung) und Phase II (Konjugation) eingeteilt. Bei der Funktionalisierung werden funktionelle Gruppen durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse freigesetzt oder eingeführt, die als Angriffspunkte für die spätere Konjugation wichtig werden. Bei der Konjugation werden hydrophile Substrate an die Metabolite angehängt, wodurch sich deren Wasserlöslichkeit steigert und sie ausgeschieden werden können. Die Phase I und Phase II Reaktionen werden durch verschiedene Enzyme katalysiert. An der Funktionalisierung sind vor allem Oxidoreduktasen und Hydrolasen beteiligt. Zu den Oxidoreduktasen gehören unter anderem die Familie der Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (Cyp), die dafür sor-

gen, dass Sauerstoffmoleküle auf die Substrate übertragen werden. Im Zusammenhang mit Fremdstoffen wie PAK ist die Cyp1-Familie mit den Vertretern Cyp1A1, Cyp1A2 und Cyp1B1 zu nennen (Fujii-Kuriyama und Mimura, 2005), die hauptsächlich am Metabolismus dieser planaren, lipophilen Substanzen beteiligt sind. Bei den Phase II-Reaktionen spielen Transferasen eine Rolle. Beispiele hierfür sind die Glutathion-S-Transferasen und UDP-Glucuronosyltransferasen, aber auch Sulfo-, Acetyl oder Methyltransferasen, welche die entsprechenden Substrate auf die Metabolite übertragen. Die Endprodukte werden schließlich über spezielle Carrier-Systeme aus der Zelle transportiert und über die Ausscheidungsorgane aus dem Körper entfernt.

B[a]P selbst kann durch Bindung an den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) seinen eigenen Metabolismus induzieren. Der AhR ist ein ligandengesteuerter Transkriptionsfaktor, der nach Aktivierung in den Kern transloziert und dort zusammen mit seinem Dimerisierungspartner ARNT (*AhR nuclear translocator*) die Expression von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen wie Cyp1A1 reguliert (Nebert et al., 1993; Hankinson, 1995). Bei der Metabolisierung von B[a]P durch Cyp1A1 und Epoxidhydrolasen entstehen mehrere reaktive Zwischenprodukte (Abb. 1.1). B[a]P wird zuerst über Cyp1A1 zu B[a]P-7,8-oxid oxidiert und durch die mikrosomale Epoxidhydrolase zu B[a]P-7,8-dihydrodiol umgesetzt. Dies kann durch die Dihydrodioldehydrogenase in ein Katechol umgewandelt oder mit Glucuronsäure konjugiert werden. Die entstandenen hydrophilen Produkte können schließlich ausgeschieden werden. Wird jedoch das B[a]P-7,8-dihydrodiol weiter oxidiert, entsteht das ultimale Kanzerogen Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE) (Rubin, 2001). BPDE kann durch Konjugation mit Glutathion inaktiviert werden, aber auch durch die hochreaktive Epoxidgruppe an Makromoleküle wie DNA, RNA oder Proteine in der Zelle binden und zu Mutationen führen.

1.1.3 Kanzerogene Wirkung von BPDE

Die kanzerogene Wirkung von B[a]P und BPDE wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen. Es konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Exposition gegenüber B[a]P und BPDE und der Entstehung von z.B. Lungenkrebs, der häufig durch starken Zigarettenkonsum ausgelöst wird, hergestellt werden (Merimsky und Inbar, 1998; Smith et al., 2000; IARC, 2000). Die mutagene Wirkung von B[a]P wird dabei größtenteils über BPDE vermittelt. BPDE kann über die hochreaktive Epoxidgruppe mit den Basen Adenin und Guanin an der DNA reagieren (Jerina et al., 1991). Es entstehen dabei sogenannte sperrige DNA-Addukte. Diese Addukte können über DNA-Reparaturwege, wie die Nukleotidexzisionsreparatur, entfernt werden, aber sie sind auch der Grund für die Mutagenität der Substanz (Lindahl and Wood,

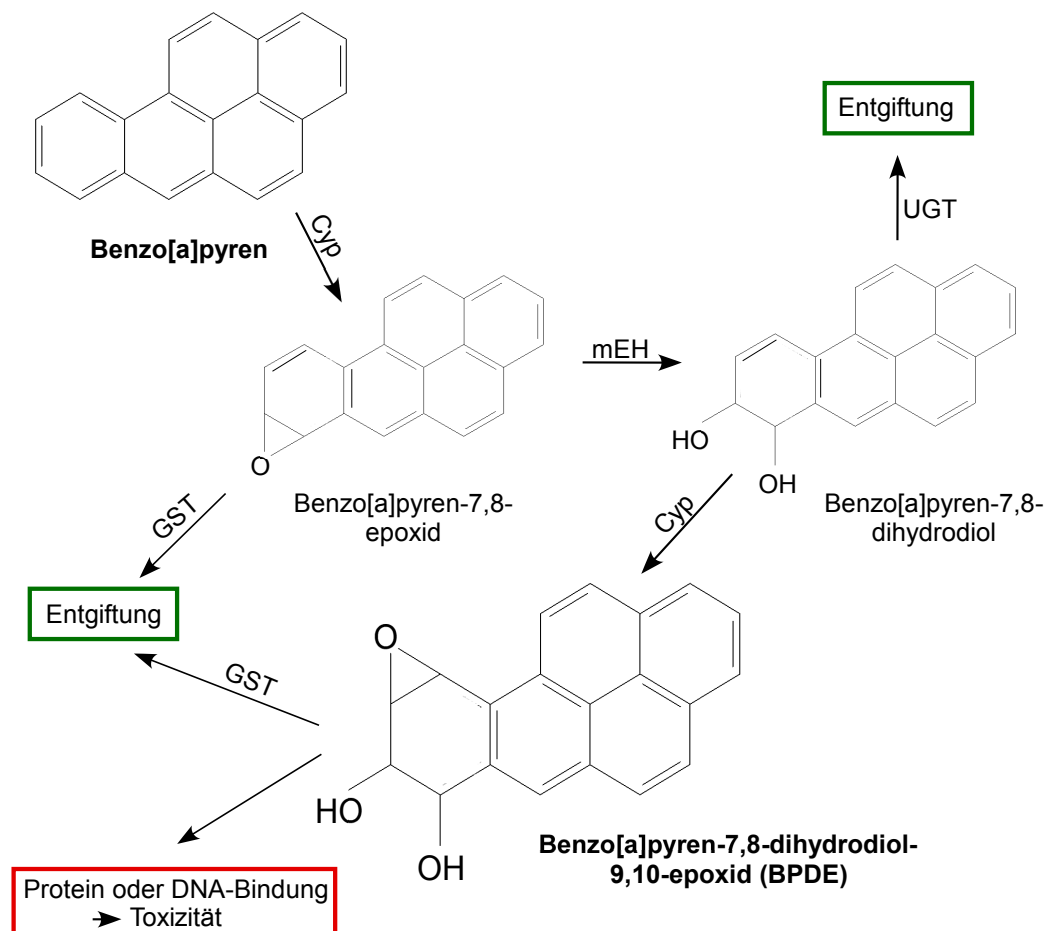


Abbildung 1.1: Metabolismus von B[a]P. Vereinfachte Darstellung des B[a]P Metabolismus. Gezeigt sind die Hauptmetabolite, über die es zur Bildung von BPDE kommt. Erläuterungen siehe Text. Cyp: Cytochrom P450; mEH: mikrosomale Epoxidhydrolase; GST: Glutathion-S-Transferasen; UGT: UDP-Glucuronosyltransferasen.

1999). Bei hoher Belastung mit BPDE ist die Reparatur oft nicht effizient genug oder es können Fehler auftreten, die zu Veränderungen in der Basenstruktur und dadurch zur krebsfördernden Wirkung beitragen. Die Hauptursache für die Mutationen nach DNA-Schäden ist der Vorgang der Translesionssynthese. In der Zelle existieren DNA-Polymerasen, die über DNA-Schäden hinweglesen können, wodurch ein Translationsblock verhindert wird. Jedoch kommt es dadurch häufig zum Einbau falscher Basen (Friedberg et al. 2001). In Bezug auf BPDE-DNA-Addukte ist die DNA-Polymerase η an der Tolerierung des Schadens beteiligt, die häufigsten Mutationen dabei sind G \rightarrow T Transversionen (Zhang et al., 2000a). Einzig der DNA-Polymerase κ ist es möglich, fehlerfrei über den DNA-Schaden hinwegzulesen (Zhang et al. 2000b).

Der Prozess der Kanzerogenese lässt sich in drei Stadien einteilen: Initiation, Promotion und Progression. Bei der Initiation kommt es zu Mutationen in der DNA durch z.B. chemische Substanzen, die in die DNA interkalieren. Mutationen erfolgen recht häufig und sind irreversibel. Aber erst durch die längerfristige Wirkung von Tumorpromotoren kommt es zur unkontrollierten Teilung der Zellen, die schließlich den Tumor bilden. Als Tumorpromotoren bekannt sind Substanzen wie der Phorbol-ester TPA, Dioxine oder Phenobarbitale, aber auch Wachstumsfaktoren wie EGF (*epidermal growth factor*) (Slaga et al., 1980; Schwarz et al., 2000; Yamamoto et al., 2004; Colburn et al., 1979). Unter dem Einfluss von Tumorpromotoren kommt es in einer initiierten Zelle zur klonalen Expansion und dadurch zum Krebs. BPDE kann sowohl Initiator als auch Tumorpromoter sein. Eine einmalige Applikation von BPDE auf die Maushaut, gefolgt von einer mehrwöchigen Applikation eines Tumorpromoters TPA führt zur Bildung von Hauttumoren (Slaga et al., 1979), sowie eine mehrfache Applikation von BPDE auf die Maushaut kann die Tumorbildung auslösen (Levin et al., 1977). Die tumorfördernde Wirkung beruht darauf, dass Tumorpromotoren in der Zelle zur Aktivierung von Signalwegen und Transkriptionsfaktoren führen. Einer der bekanntesten Transkriptionsfaktoren, der nach TPA oder EGF aktiviert wird, ist das Aktivatorprotein AP-1 (Lamph et al., 1988; Colburn et al., 1979). AP-1 ist ein Substrat der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK), die an vielen zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung aber auch Apoptose und Inflammation beteiligt sind (Weston und Davis, 2007; Han und Sun, 2007). Desweiteren ist dieser Signalweg auch bekannt dafür, dass er durch Stress ausgelöst werden kann. Erst kürzlich wurde ein weiterer wichtiger Signalweg der Zelle, der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/AKT Signalweg, identifiziert, der durch verschiedene Tumorpromotoren in einem Maushaut-Modell aktiviert wird (Lu et al., 2007). Da diese Wege im Allgemeinen eine wichtige Rolle beim zellulären Überleben bzw. der zellulären Stressantwort spielen, sollen sie im nächsten Kapitel etwas genauer betrachtet werden. Ob BPDE diese Signalwege auch aktiviert bzw. was über die BPDE-induzierte zelluläre Antwort schon bekannt ist, soll im Anschluss daran dargestellt werden.

1.2 Aktivierung von Stress-induzierten Signalwegen

Zu den Stressfaktoren für die Zelle zählen z.B. Infektionen, Veränderung der zellulären Bedingungen, Hunger, aber auch Schäden an der DNA. Der Stress kann sowohl endogenen als auch exogenen Ursprungs sein. Zu den exogenen Stressoren zählen unter anderem ionisierende oder UV-Strahlung, sowie Chemikalien und Medikamente, die zur Schädigung von intrazellulären Molekülen wie der DNA oder Proteinen führen. Endogenen Ursprungs sind es meist reaktive Metabolite, welche

bei verschiedenen Stoffwechselwegen entstehen, die eine Stressantwort der Zelle auslösen. Um zu gewährleisten, dass die Zelle durch den Stress nicht zu sehr geschädigt wird, existieren verschiedene Mechanismen, die darauf reagieren. Ist der Schaden durch ein (Gen)Toxin gering bzw. reparabel, werden Signalwege aktiviert, die das zelluläre Überleben sichern. Dazu gehören Wege, die zum Zellzyklusarrest und zur Schadensreparatur führen. Ist der Schaden aber so stark, dass das zelluläre Weiterleben beeinträchtigt wäre, werden Wege aktiviert, die den Zelltod einleiten (Kültz, 2005). Zwei prominente Wege, die durch (Gen)Toxine aktiviert werden, sind die Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK) und die Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3K)/AKT Signalwege.

1.2.1 Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK)

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

Ist von der zellulären Antwort auf Stress die Rede, werden vor allem die SAPK als zentrale Vermittler beschrieben. Die SAPK gehören zu der Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), welche die Weiterleitung von extrazellulären Signalen von der Zellmembran in den Zellkern gewährleisten. MAPK sind Serin/Threonin Kinasen und innerhalb der Eukaryoten evolutionär hochkonserviert. Sie sind an verschiedenen zellulären Prozessen wie Zellproliferation, Differenzierung, aber auch Inflammation und Apoptose beteiligt (Weston und Davis, 2007; Han und Sun, 2007). Zu den MAPK zählen drei Unterfamilien. Dazu gehören die Erk (*extracellular signal-related kinase*), die p38 MAP-Kinasen und die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK). JNK und p38 werden zusätzlich unter dem Begriff der Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK) zusammengefasst, da sie vor allem auf äußere Stressfaktoren wie UV-Strahlung, osmotischen Schock oder oxidativen Stress, aber auch auf inflammatorische Zytokine reagieren (Pearson et al., 2001; Kyriakis and Avruch 2001). Die MAPK Erk wird durch mitogene Signale, z.B. von Wachstumsfaktorrezeptoren, aktiviert, wodurch es zur Expression verschiedener Gene kommt, die eine Rolle beim Zellwachstum und der Entwicklung spielen. Die Aktivierung der MAPK erfolgt über eine dreistufige Aktivierungskaskade (Abb. 1.2). MAPK-Kinasen (MAPKK auch als MEK oder MKK bezeichnet) phosphorylieren und aktivieren damit die MAPK, wobei sie selber Substrate der MAPKK-Kinasen (MAPKKK oder auch MEKK) sind (Seger und Krebs, 1995). MAPK werden vor allem im Zytoplasma aktiviert und translozieren danach in den Zellkern. Dort werden verschiedene Substrate aktiviert, insbesondere von Transkriptionsfaktoren, welche die Expression verschiedener Gene kontrollieren. Die bekanntesten hierbei sind die dimeren AP-1 Transkriptionsfaktoren, z.B. Jun/Fos oder Jun/ATF Heterodimere (Karin et al., 1997).

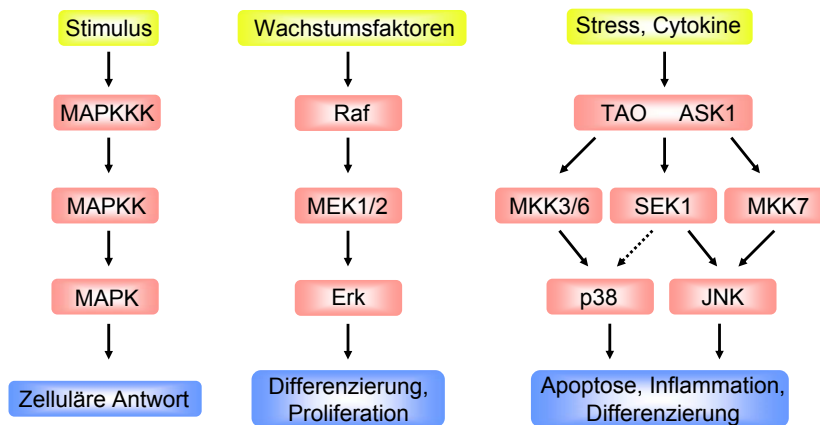


Abbildung 1.2: Der MAPK-Signalweg. Dargestellt ist die Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) über die MAPK-Kaskade. Nähere Erläuterungen siehe Text.

p38 und JNK

Die p38 MAPK wurde in einem pharmakologischen Screen als Protein identifiziert, das in humanen Monocyten nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) phosphoryliert wird (Han et al., 1994). Bis heute wurden vier Isoformen der p38 beschrieben: p38 α , β , γ und δ (Jiang et al., 1996; Li et al., 1996; Jiang et al., 1997). An der zellulären Stressantwort sind vor allem die Isoformen α und β beteiligt, die ubiquitär exprimiert werden, wohingegen die γ und δ Formen nur in bestimmten Organen vorkommen und dort spezifische Funktionen übernehmen. Die p38 γ wird hauptsächlich in den Skelettmuskeln exprimiert, p38 δ in Hoden, Bauchspeicheldrüse, Nieren und Dünndarm (Coulthard et al., 2009). Für die Phosphorylierung von p38 sind vor allem die MAPK-Kinasen MKK3 und MKK6 verantwortlich (Kyriakis und Avruch, 2001). Einzig die p38 α kann unter bestimmten Situationen zusätzlich von SEK1 (MKK4) aktiviert werden, deren Substrat auch die JNK ist (Lin et al., 1995).

Die JNK wurde basierend auf ihrer Fähigkeit das Onkoprotein c-Jun zu phosphorylieren, und dadurch dessen transkriptionelle Aktivität zu erhöhen, identifiziert (Hibi et al., 1993). Die JNK wird durch drei Gene kodiert, jnk1, jnk2 und jnk3 (Davis, 2000; Weston und Davis, 2002). JNK1 und 2 werden ubiquitär exprimiert, die JNK3 dagegen nur im Gehirn, Herz und Hoden. JNK wird typischerweise durch die MAPKK SEK1 (MKK4) und MKK7 dual an einem Serin und Threonin phosphoryliert (Weston und Davis, 2002; Kyriakis und Avruch, 2001).

Bei den MAPKK-Kinasen sind im Hinblick auf die zelluläre Stressantwort die Kinasen TAO (*Thousand and one amino acid*) und ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*) zu nennen. Nach DNA-Doppelstrangbrüchen, erzeugt durch ionisierende bzw. UV-Strahlung oder dem Zytostatikum Hydroxyharnstoff, konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von TAO über das DNA-Schadenserkennungsprotein ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) erfolgt und TAO daraufhin die Aktivierung von p38 über die MAPKK MKK3/6 vermittelt (Raman et al., 2007). Eine Stimulation von ASK1 durch oxidativen Stress führt zu einer Aktivierung der p38 und JNK, durch die schließlich Apoptose ausgelöst wird (Nagai et al., 2007). Es ist auch bekannt, dass proinflammatorische Zytokine wie Interleukin 1 zur Phosphorylierung von p38 und JNK führen und dadurch eine inflammatorische Antwort auslösen (Kumar et al., 2003; Coulthard et al., 2009). Substrate von p38 und JNK zeichnen sich durch die Ser-Pro oder Thr-Pro MAPK-Konsensussequenz aus, an denen sie phosphoryliert werden. Zu den Substraten zählen hauptsächlich Transkriptionsfaktoren wie z.B. ATF-2 (*activating transcription factor-2*), Elk-1 oder p53 oder andere Proteinkinasen wie die MAPKAP- Kinasen 2 (MK-2), MK-3 oder MSK-1 (*mitogen- and stress-activated protein kinase*), deren Zielproteine z.B. CREB (*cAMP response element-binding protein*) oder auch Hsp27 (*heat shock protein*) sind (Kyriakis und Avruch, 2001).

1.2.2 Der PI3K/AKT-Signalweg

Ein Signalweg, der eine zentrale Rolle beim zellulären Überleben spielt, ist der AKT-Signalweg. AKT gehört zur Familie der Serin/Threonin Kinasen und wird auch als Protein Kinase B (PKB) bezeichnet. Es existieren drei Isoformen, AKT1/PKB α , AKT2/PKB β und AKT3/PKB γ . AKT ist das zentrale Effektorprotein des Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Signalweges. Die aktivierte Form der PI3K trägt zur Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5 trisphosphat (PIP3) bei. AKT und PDK1 (*phosphoinositide-dependent-kinase*) interagieren mit PIP3 an der Membran, wobei AKT durch PDK1 phosphoryliert wird. Die Aktivierung der Substrate von AKT erfolgt durch Phosphorylierung von Serin/Threoninresten (Fayard et al., 2005). Substrate von AKT sind sowohl im Zytoplasma als auch im Kern lokalisiert.

Eine der wichtigsten Funktionen des AKT-Signalweges ist das Sichern des zellulären Überlebens. Dies erfolgt durch Inhibierung von proapoptotischen Proteinen, wie die Familie der Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only Proteinen oder Caspase 9. Zum Beispiel wird das BH3-only Protein BAD durch AKT direkt phosphoryliert und dadurch inhibiert (Datta et al., 1997). AKT hat auch einen Einfluss auf die Funktion des Tumorsuppressorproteins p53. Durch die Phosphorylierung von MDM2, einer E3 Ubiquitin Ligase, transloziert diese in den Zellkern und interferiert dort mit der

transkriptionellen Aktivität von p53 bzw. führt zum Abbau von p53 (Mayo und Donner, 2001). Neben der Inhibierung von proapoptotischen Proteinen, wird das zelluläre Überleben auch durch den Einfluss von AKT auf den Metabolismus und die Nährstoffaufnahme geregelt. Eine wichtige Rolle dabei spielt die Aktivierung der PI3K-ähnlichen Kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Der mTOR Komplex1 (mTORC1) ist an der Regulation des Zellwachstums, Zellproliferation und der Proteinsynthese beteiligt. Eine Aktivierung von AKT über Wachstumsfaktoren oder andere Nährstoffe, führt nicht direkt zu einer Phosphorylierung von mTORC1. AKT inhibiert vielmehr den TSC2-Komplex (*tuberous sclerosis complex*), einen negativen Regulator von mTORC1 (Inoki et al., 2002; Manning et al., 2002; Potter et al., 2002). Die Rolle von AKT beim zellulären Überleben ist am besten untersucht. Daneben kann AKT auch die Proliferation durch Phosphorylierung von Proteinen, die am Zellzyklus beteiligt sind, beeinflussen. Zellzyklusproteine wie p21, p27, CDK2 (*cyclin dependent kinase 2*) oder Zyklin D werden durch AKT reguliert (Liang und Slingerland, 2003; Maddika et al., 2008). Durch direkte Phosphorylierung von z.B. p27, einem Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinasen, wird dieser im Zytoplasma gehalten und kann so den Zellzyklus nicht inhibieren. (Liang et al., 2002; Sekimoto et al., 2004).

Bis vor kurzem wurde AKT lediglich als Kinase gesehen, die für das zelluläre Überleben sorgt. Aber einige Studien haben jetzt gezeigt, dass AKT auch Seneszenz und Zelltod auslösen kann (Los et al., 2009). Nogueira et al. konnten zeigen, dass eine Hyperaktivierung von AKT zu einer Erhöhung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt und dadurch der Zelltod ausgelöst wird. Ein Grund für die Erhöhung des oxidativen Stresses ist unter anderem die Hemmung der FoxO (*Forkhead-Class O*)-Transkriptionsfaktoren durch AKT. FoxO-Transkriptionsfaktoren sind normalerweise an der Regulation von antioxidativen Proteinen beteiligt. Die erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies ist auch der Grund für die AKT-induzierte Seneszenz, die durch einen permanenten Zellzyklusarrest definiert wurde (Nogueira et al., 2008). Die Phosphorylierung der CDK2 durch AKT kann je nach Stimulus zur Proliferation oder zur Apoptose der Zelle führen. Eine transiente Aktivierung von CDK2 durch AKT sorgt für einen geregelten Zellzyklus, wohingegen eine Hyperaktivierung von AKT nach Gabe von Krebsmedikamenten, wie Methotrexat, über CDK2 zum Zelltod führt (Maddika et al., 2008)(Abb. 1.3).

Eine Aktivierung der SAPK und PI3K/AKT-Signalwege nach BPDE-Exposition wurde für murine epidermale Zellen (C141) schon beschrieben (Li et al., 2004a). Durch Experimente mit Inhibitoren und dominant-negativen Kinasen konnte eine Verbindung zwischen der Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges und der Phosphorylierung von

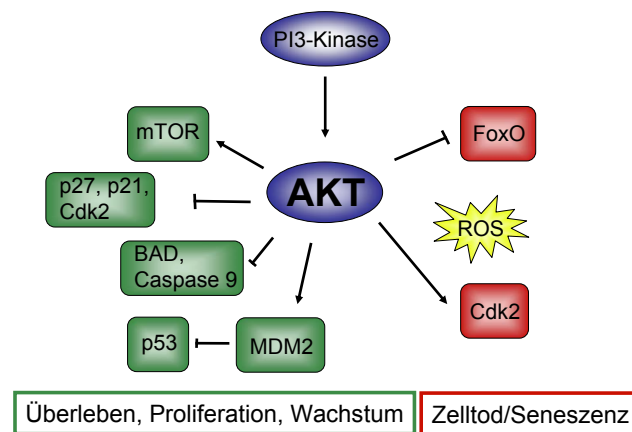


Abbildung 1.3: Der AKT-Signalweg. Dargestellt ist die Aktivierung von AKT durch PI3K und verschiedene Substrate von AKT mit ihren zellulären Wirkungen. Nähere Erläuterungen siehe Text.

JNK hergestellt werden. Offen blieben die Fragen, wo das Signal für die Aktivierung des PI3K/Akt/JNK-Signalweges nach BPDE-Exposition generiert wird und welche Konsequenzen diese Aktivierung hat. Da BPDE aufgrund seiner Epoxidgruppe sehr reaktiv ist und mit der DNA interagieren kann, könnten die DNA-Addukte die Initiatoren der BPDE-induzierten Aktivierung intrazellulärer Signalwege sein. In der Zelle gibt es Mechanismen, die für DNA-Schadenserkennung, Signalweiterleitung und Reparatur verantwortlich sind. Welche Möglichkeiten eine Zelle hat, um auf DNA-Schäden zu reagieren, soll im nächsten Kapitel aufgezeigt werden.

1.3 Signalwege der zellulären Antwort auf DNA-Schäden

Die Erkennung und korrekte Reparatur von DNA-Schäden, die durch Gentoxine entstehen, ist für das Überleben einer Zelle von essentieller Bedeutung. Fehlerhafte oder gar fehlende Reparaturmechanismen führen zu Mutationen, die Krebs auslösen können. Erfolgen diese Mutationen in den Keimzellen, können diese Schäden auch auf die Nachkommen übertragen werden und erblich bedingte Krankheiten auslösen, bzw. allgemein Auswirkungen auf das Überleben haben. Die Zelle hat deshalb Mechanismen entwickelt, um auf DNA-Schäden zu reagieren (Hakem, 2008). Mittlerweile wurden mehrere Signalkomplexe entdeckt, die unterschiedliche Schäden erkennen und eine Antwort darauf einleiten. Die Antwort auf DNA-Schäden erfolgt meist über Signaltransduktionskaskaden, die vereinfacht in drei Komponenten aufgegliedert werden können. Es gibt Sensor-Proteine, die an der DNA-Schadenserkennung direkt

beteiligt sind, Transduktoren, die für die Weiterleitung des Signals verantwortlich sind, und Effektoren, die schließlich für die zelluläre Antwort, wie Zellzyklusblock, Apoptose oder DNA-Reparatur sorgen (Harper und Elledge, 2007). Die verschiedenen Möglichkeiten einer Zelle auf DNA-Schäden zu reagieren, sollen in diesem Kapitel kurz beschrieben werden. Eine Zusammenfassung ist in Abbildung 1.4 dargestellt. Neben den am besten untersuchten PI3K-ähnlichen Kinasen, wird zusätzlich auf PARP (Poly(ADP-Ribose)Polymerase) und die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) eingegangen.

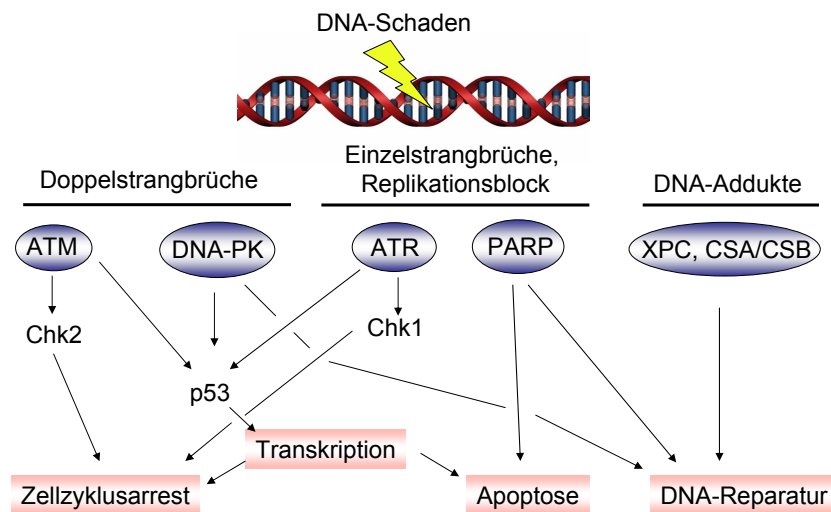


Abbildung 1.4: Mechanismen der DNA-Schadenserkennung. Dargestellt sind die wichtigsten Wege, die an der DNA-Schadenserkennung beteiligt sind und die Konsequenzen ihrer Aktivierung. Nähere Erläuterungen siehe Text.

1.3.1 ATM und ATR

ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ATM- and Rad3-related*) sind die bekanntesten Proteine, die nach DNA-Schäden aktiviert werden und für eine zelluläre Antwort darauf sorgen (Shiloh, 2003; Kastan und Bartek, 2004). ATM reagiert dabei bevorzugt auf DNA-Doppelstrangbrüche. DNA-Doppelstrangbrüche entstehen in der Zelle bei Rekombinationsprozessen wie der homologen Rekombination während der Meiose oder bei der somatischen Rekombination (V(D)J Rekombination) während der Antikörperproduktion. Aber auch äußere Einflüsse wie ionisierende Strahlung führen zu Doppelstrangbrüchen, an deren Erkennung und Reparatur ATM beteiligt ist (Lavin et al., 2005). Im Vergleich zu ATM ist ATR hauptsächlich bei der Signalweiterleitung nach Einzelstrangbrüchen z.B. induziert durch UV-Strahlung oder nach Replikationsblock involviert (Shiotani und Zou, 2009). Einzelstrangbrüche entstehen auch bei verschiedenen Reparaturmechanismen, wie der Nukleotidexzisionsreparatur

oder der Basenexzisionsreparatur. Dass ATM und ATR eine wichtige Funktion bei der DNA-Schadensantwort in der Zelle haben, wird deutlich in Patienten mit Defekten in den jeweiligen Genen.

Ataxia-telangiectasia (A-T) ist eine seltene autosomale rezessive Erbkrankheit, die durch einen Defekt im ATM-Gen herrührt. Charakteristische Symptome sind eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung und fortschreitende Neurodegeneration, kennzeichnend durch Bewegungsstörungen (Ataxie) und Gewebeschwund, insbesondere im Kleinhirn (Kleinhirn-Atrophie). Die Patienten leiden zudem an Immunschwäche und weisen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Krebs auf (O'Driscoll und Jeggo, 2006). Auf zellulärer Ebene zeigt sich eine chromosomale Instabilität, erhöhte Strahlungsensitivität und Beeinträchtigungen bei der Zellzykluskontrolle (Lavin und Shiloh, 1997).

Ein Defekt im ATR-Gen ist die Ursache für das Seckel-Syndrom. Es handelt sich hierbei auch um eine seltene autosomal rezessive Erbkrankheit, die sich durch eine schwere Form der Kleinwüchsigkeit auszeichnet. Zu den Symptomen gehören neben dem Kleinwuchs, Mikrozephalie, geistige Retardierung und Osteodysplasie (O'Driscoll und Jeggo, 2006). Die wichtige Funktion von ATM und ATR in der Zelle wird auch im Phänotyp von knockout Mäusen deutlich. Während ATM-knockout Mäuse lebensfähig sind, aber unter Wachstumsstörungen und Unfruchtbarkeit leiden, so sterben ATR-knockout Mäuse schon während der Embryogenese aufgrund von Mitoseaberrationen (Zhou und Elledge, 2000).

ATM/ATR sind Serin/Threonin Proteinkinasen und gehören zur Familie der PI3K-ähnlichen Kinasen. An der Aufklärung des Mechanismus der Aktivierung von ATM und ATR wird intensiv geforscht. Bisher konnte gezeigt werden, dass der Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) Komplex, ein Sensor für DNA-Doppelstrangbrüche, ATM aktivieren kann (Lee und Paull, 2005). Einzelstrangbrüche werden zuerst durch das Replikationsprotein A (RPA) erkannt, woran ATRIP (*ATR-interacting protein*) binden kann, die regulatorische Untereinheit von ATR. Somit kommt es zu einer Rekrutierung des ATR-ATRIP-Komplex an die geschädigte DNA (Ball et al., 2005; Namiki und Zou, 2006; Zou und Elledge, 2003). Zusammen mit anderen Regulatoren wie dem RAD17 und 9-1-1-Komplex wird die Antwort auf den DNA-Schaden eingeleitet. Durch die Rekrutierung von ATM und ATR an den DNA-Schaden kommt es zu einer Aktivierung ihrer Kinaseaktivität. ATM und ATR phosphorylieren verschiedenste Substrate, die für die Signalweiterleitung bzw. für die zelluläre Antwort sorgen. Dazu gehören Zellzykluskontrolle, Replikation und DNA-Reparatur. Die Haupt-Effektorsubstrate sind die Checkpointkinasen Chk1 und Chk2. Ihre Aktivierung führt zu einem Zellzyklusarrest. Andere Substrate wie H2AX sind wichtig für die Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen zur Stelle des DNA-Schadens (Zhou und Elledge, 2000).

1.3.2 Die DNA-abhängige Proteinkinase

Ein weiteres Mitglied der PI3K-ähnlichen Kinasen ist die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK). DNA-PK ist an der nicht-homologen Rekombination beteiligt, d.h. DNA-PK wird wie ATM hauptsächlich durch Doppelstrangbrüche aktiviert (Yang et al., 2003). DNA-PK wird über die Ku70/80 Proteine an den DNA-Schaden rekrutiert, wo es zur Aktivierung der katalytischen Untereinheit DNA-PK_{cs} kommt. DNA-PK kann sich dabei selbst phosphorylieren und dadurch aktivieren (Cui et al., 2005). Substrate von DNA-PK sind Proteine, die an der DNA-Schadensregulation beteiligt sind. Unter anderem wurden RPA, H2AX oder auch p53 als solche identifiziert (Collis et al., 2005). Dass DNA-PK eine wichtige Rolle für die genomische Stabilität besitzt, wird in DNA-PK defizienten Mäusen sehr gut deutlich. Die sogenannten SCID (*severe combined immunodeficient*) Mäuse besitzen kein funktionierendes Immunsystem aufgrund eines Defekts in der V(D)J Rekombination (Bogue et al., 1998). DNA-PK-defiziente Zellen weisen, ähnlich wie ATM-defiziente Zellen, eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit auf, da die Reparatur von Doppelstrangbrüchen beeinträchtigt ist (Smith et al., 1999).

1.3.3 Die Poly (ADP-Ribose) Polymerase

Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) ist vor allem an der Antwort auf Einzelstrangbrüche beteiligt. Eine schnelle Aktivierung erfolgt auf Exposition mit alkylierenden Agenzien, Strahlung und Oxidantien (Oliver et al., 1999). PARP ist ein nukleäres Enzym, das die Bildung von ADP-Ribose Einheiten durch NAD und den Transfer auf sich selbst und andere mit Chromatin assoziierten Proteinen (Histone, Topoisomerasen) katalysiert. Dadurch können sich Proteine der DNA-Reparatur an die DNA anlagern und den DNA-Schaden reparieren. Vor allem Proteine der Basenexzisionsreparatur werden durch PARP aktiviert (Durkacz et al., 1980; de Murcia et al., 1997; Molinete et al., 1993). Eine zytoprotektive Wirkung durch PARP ist aber nur bei geringen Dosen an Gentoxinen gegeben. Bei einer Überaktivierung von PARP kann, aufgrund des immer niedriger werdenden NAD-Levels, Nekrose ausgelöst werden (Ha and Snyder, 1999).

1.3.4 Die Nukleotidexzisionsreparatur

Sperrige DNA-Addukte, die z.B. durch UV-Strahlung, Chemotherapeutika oder andere mutagene Substanzen wie PAK entstehen, werden über die Nukleotidexzisions-

reparatur (NER) entfernt. Die NER teilt sich auf in einen global-genomischen (GG-NER) und einen transkriptionsgekoppelten (TC-NER) Weg (Maillard et al., 2008). Die GG-NER wird durch Schäden im gesamten Genom aktiviert, wohingegen die TC-NER Schäden in transkriptionell aktiven Bereichen der DNA erkennt. Die NER lässt sich in mehrere Schritte einteilen. Nach der Detektion des DNA-Schadens werden Reparaturproteinen rekrutiert. Die DNA wird durch Helikasen aufgewunden und der DNA-Strang rechts und links des Schadens wird durch Endonukleasen geschnitten (Inzision). Daraufhin wird der geschädigte Nukleotidstrang entfernt und es entsteht eine Lücke von ca. 28 Nukleotiden (Exzision). Diese Lücke wird durch DNA-Polymerasen wieder aufgefüllt und durch DNA-Ligasen mit dem DNA-Strang verknüpft (Dip et al., 2004). Die Reparaturschritte und die daran beteiligten Proteine sind bis auf den ersten Schritt, der DNA-Schadenserkennung, zwischen der GG-NER und TC-NER identisch. Bei der GG-NER ist das Protein XPC (*xeroderma pigmentosum complementation group C*) und DDB1/DDB2 (*damaged DNA binding 1/2*) an der Schadenserkennung beteiligt, wohingegen bei der TC-NER die Erkennung über einen Block der DNA-Polymerase und über die Proteine CSA und CSB (*Cockayne Syndrome complementation group A/B*) vermittelt wird (Maillard et al., 2008). Defekte in der NER führen beim Menschen zu schwerwiegenden Krankheiten. XP (*xeroderma pigmentosum*)-Patienten leiden an einer extremen Lichtempfindlichkeit mit einer damit erhöhten Hautkrebsrate. Auch neurologische und ophtalmologische (die Augenheilkunde betreffende) Symptome, wie Konjunktivitis und Neoplasien, sind häufig (Boer und Hoeijmakers, 2000). CS (*Cockayne Syndrome*) ist eine seltene autosomale rezessive Erkrankung und wie bei den XP Patienten durch eine erhöhte Lichtempfindlichkeit aber ohne erhöhtes Hautkrebsrisiko gekennzeichnet. Dafür zeigen sie Symptome wie Kleinwüchsigkeit und Erkrankungen des zentralen Nervensystems (Boer und Hoeijmakers, 2000).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Mechanismen der BPDE-induzierten Aktivierung der intrazellulären Stressantwort zu identifizieren. Aufgrund von veröffentlichten Daten in Mauszellen, wird der Schwerpunkt dabei speziell auf die Aktivierung der Stress-aktivierten Proteinkinasen und des AKT-Signalweges in humanen Zellen gelegt. Die Fragestellungen, die geklärt werden sollen, sind:

- Was ist der primäre Angriffspunkt von BPDE bzw. wo wird das Signal für die zelluläre Stressantwort generiert?
- Welche zwischengeschalteten Faktoren sind an der SAPK Aktivierung beteiligt?
- Was sind die Konsequenzen dieser Aktivierung?

Desweiteren sollte eine Methode entwickelt werden, die eine genomweite Analyse aller Gene bzw. Proteine ermöglicht, die an der Aktivierung der SAPK durch BPDE beteiligt sein könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Feinchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben von Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe bezogen.

Chemikalien	Bezugsquelle
Acrylamid/Bis-Acrylamid (30/0,8)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Casyton	Schärfe Systems, Reutlingen
4,6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
ECL-Lösung	GE Healthcare, Freiburg
Entwickler und Fixierer	Kodak GmbH, Stuttgart
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
®Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
® Tween 20	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien und Bezugsnachweise

2.1.2 Induktoren und Inhibitoren

Induktoren/Inhibitoren	Bezugsquelle
Benzo[c]phenanthren-3,4-diol-1,2-epoxid	Albrecht Seidel, Großhansdorf
Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE)	Karl Platt, Mainz
DNA-PK Inhibitor II, NU7026	Calbiochem, Darmstadt
Doxorubizin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
PP1 (Src-Inhibitor)	Biomol, Hamburg
Rapamycin (mTOR-Inhibitor)	Calbiochem, Darmstadt
SB203580 (p38-Inhibitor)	LC Laboratories, Boston
SP600125 (Jnk-Inhibitor)	ENZO LIFE SCIENCES GmbH, Lörrach
Wortmannin (PI3K-Inhibitor)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

Tabelle 2.2: Verwendete Induktoren und Inhibitoren

2.1.3 siRNA-Sequenzen

Die siRNA-Oligonukleotide wurden von Qiagen (Hilden) oder MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen. Die siRNAs von MWG wurden mit Hilfe der siMAX™ Design-Software von Eurofins MWG Operon designed.

Gen	seq	siRNA Sequenzen bzw. Artikelnummern	refseq
AKT1	1	SI02757244 Qiagen, Hilden	
	2	SI00287742 Qiagen, Hilden	
AKT2	1	SI00287672 Qiagen, Hilden	
	2	SI00287679 Qiagen, Hilden	
ATM	1	5'-AAC AUA CUA CUC AAA GAC AUU-3'	NM_000051.3
	2	5'-UGG UGC UAU UUA CGG AGC U-3'	
ATR	1	5'-AAC CUC CGU GAU GUU GCU UGA-3'	NM_001184.3
	2	5'-CGA GAC UUC UGC GGA UUG C-3'	
dsr (red fluorescent protein)		5'-AGU UCC AGU ACG GCU CCA A-3'	
MKK3	1	SI02222969 Qiagen, Hilden	
	2	SI02222976 Qiagen, Hilden	
MKK6	1	SI03089072 Qiagen, Hilden	
	2	SI02222997 Qiagen, Hilden	
lyn	1	5'-AGA UCC AGA GGA ACA AGG ATT-3'	NM_001111097.1
	2	5'-GUC UGG AUA AUG GGG GCU ATT-3'	
PI3K (p110)	1	SI02665369 Qiagen, Hilden	
	2	SI02622207 Qiagen, Hilden	

Tabelle 2.3: Verwendete siRNA

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
primäre Antikörper	
anti-AKT1/2 (H-136)	Santa Cruz, Heidelberg
anti-ATM (D2E2)	Cell Signalling, Frankfurt
anti-ATR (N-19)	Santa Cruz, Heidelberg
anti-Chk2 (clone 7)	Millipore, Schwalbach
anti-DNA-PK	Santa Cruz, Heidelberg
anti-JNK2 (D2)	Santa Cruz, Heidelberg
anti-Lamin B (Ab-1)	Calbiochem, Darmstadt
anti-Lyn (H-6)	Santa Cruz, Heidelberg
anti-MKK3/6 (H-90)	Santa Cruz, Heidelberg
anti-MKK7 (H-160)	Santa Cruz, Heidelberg
anti-p38 (C-20)	Santa Cruz, Heidelberg
anti-PARP	BD, Heidelberg
anti-PI3K (p110)	Cell Signalling, Frankfurt
anti-SEK1 (H-98)	Santa Cruz, Heidelberg
primäre phosphospezifische Antikörper	
anti-phospho p38 (Thr180/Tyr182)	Cell Signalling, Frankfurt
anti-phospho p38 (Thr180/Tyr182)(3D7) für IF	Cell Signalling, Frankfurt
anti-phospho JNK (Thr183/Tyr185)	Cell Signalling, Frankfurt
anti-phospho AKT (Ser473)	Cell Signalling, Frankfurt
anti-phospho Chk2 (Thr68)	Cell Signalling, Frankfurt
anti-phospho ATM (Ser1981)	Cell Signalling, Frankfurt
anti-phospho DNA-PK (T2609)	Cell Signalling, Frankfurt
anti-phospho MKK3/6 (Ser189/207)	Cell Signalling, Frankfurt
anti-phospho MKK7	Cell Signalling, Frankfurt
anti-phospho p70S6K	Cell Signalling, Frankfurt
anti-phospho SEK-1 (Thr261)	Cell Signalling, Frankfurt
sekundäre Antikörper	
anti-mouse-HRP	DakoCytomation GmbH, Hamburg
anti-rabbit-HRP	DakoCytomation GmbH, Hamburg
anti-goat-HRP	DakoCytomation GmbH, Hamburg
anti-rabbit Alexa488	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Tabelle 2.4: Verwendete Antikörper

2.1.5 Verwendete Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden in der Arbeit verwendet:

Zelllinie	Charakterisierung	Bezugsquelle
ATM profiziente Zellen	humane Fibroblasten, SV40 transformiert	CCR, GM00637
ATM defiziente Zellen	humane Fibroblasten, SV40 transf., ATM defizient	CCR, GM05849
HCT116	humane Kolonkarzinom Zellen	C. Blattner
HCT116 p53 -/-	humane Kolonkarzinom Zellen, p53 defizient	C. Blattner
HeLa	humane Zervixkarzinom Zellen	ATCC
HepG2	humane Hepatozyten Karzinom Zelllinie	ATCC, HB-8065
MEF p53wt	embryonale Mausfibroblasten	C. Blattner
MEF p53-/-	embryonale Mausfibroblasten, p53 defizient	C. Blattner
SCID	embryonale Mausfibroblasten, DNA-PK defizient	C. Blattner

Tabelle 2.5: Verwendete Zelllinien

Das Medium für die ATM-profizienten und defizienten Zellen bestand aus MEM, supplementiert mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin. Alle anderen verwendeten Zellen wurden in DMEM-Medium supplementiert mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Medium/Zusatz	Bezugsquelle
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Fetales Kälber Serum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
L-Glutamin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
MEM (Minimum Essential Medium)	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
PBS ($-CaCl_2/-MgCl_2$)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe

Tabelle 2.6: Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze

2.1.6 Zellkulturmaterialien und Plastikware

Alle Zellkultur- und Plastikwaren wurden von Greiner Labortechnik (Nürtingen) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Kultivierung der Zelllinien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO₂-Atmosphäre in einem Brutschrank der Firma Heraeus Christ (Fellbach). Nach Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsin für 5 min bei 37 °C vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Durch Zugabe von Medium (5-faches Volumen der Trypsinmenge) wurde die Trypsinreaktion gestoppt und die Zellen konnten in der gewünschten Dichte auf neue Zellkulturflaschen ausgesät werden.

Langzeitkonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Langzeitkonservierung wurden die Zelllinien bei –196 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierfür wurden die Zellen wie zuvor beschrieben von der Zellkulturflasche abgelöst und in ein steriles Falcon überführt. Die Zellen wurden bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in Einfriermedium (DMSO:FCS im Verhältnis 1:10) resuspendiert und in Kryogefäße überführt. Damit die Zellen nicht zu schnell einfrieren, wurden sie eine halbe Stunde auf Eis gelagert und dann in einem Einfriergefäß (NalgeneTM, Labware, USA) mit kaltem Isopropanol bei –80 °C ü.N. gelagert. Danach wurden die Kryogefäße in den Stickstofftank überführt. Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Kryogefäße in einem 37 °C Wasserbad schnell aufgetaut und die Zellsuspension in eine frische, mit Kulturmedium versetzte, Zellkulturflasche überführt. Nach dem Anheften der Zellen wurde das Medium gewechselt und die Zellen wie im vorherigen Abschnitt beschrieben kultiviert.

Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem Casy1®-Cell Counter (Schärfe Systems, Reutlingen). Hierfür wurden 200 µl der Zellsuspension 1:100 in Casyton® verdünnt und die Lebendzellzahl bestimmt. Die Zellzahlerfassung erfolgt durch eine Widerstandsmessung über die Membran der Zellen. Es lassen sich dadurch lebende von toten Zellen unterscheiden. Die Messung erfolgte nach Herstellerangaben.

Behandlung von Zellen

Damit die Zellen mit den Substanzen behandelt werden konnten, wurden sie zuerst auf geeignete Zellkulturschalen ausgesät. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Zellen immer zu 60 % Konfluenz ausgesät. Am nächsten Tag, wenn die gesamte Fläche mit Zellen bedeckt war, wurden die Zellen ü.N. serumgehungert, d.h. das Kulturmedium wurde durch Medium ohne FCS ersetzt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit den entsprechenden Substanzen inkubiert. Hierfür wurde etwas Medium von der Schale abgenommen, mit der Substanz gemischt und tropfenweise wieder auf der Schale verteilt, so dass die Substanz gleichmäßig über die Schale verteilt wurde. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Zellen je nach Anwendung weiterprozessiert.

siRNA-Transfektion

Mit Hilfe der RNAi (*RNA-interference*) Technologie ist es möglich, zielgerichtet die Expression von Genen zu verhindern. Kleine doppelsträngige siRNA-Oligos, bestehend aus 18-22 Nukleotiden, werden in der Zelle von dem sogenannten RISC (*RNA-Induced-Silencing-Complex*)-Komplex gebunden und aktivieren dadurch Prozesse, die zum Abbau der komplementären zellulären Zielgene führen. Unter Verwendung des Transfektionsreagenz HiPerfect (Qiagen, Hilden) wurden die Zellen mit der siRNA transfiziert. Dabei wurde sowohl die vorwärtsgerichtete als auch reverse Transfektionsmethode verwendet.

	24-well Platte	96-well Platte
Zellzahl	1×10^5	1×10^4
siRNA (pM)	20 bzw. 50	5
HiPerfect (μ l)	3	0,75

Tabelle 2.7: siRNA-Transfektion

Bei der vorwärtsgerichteten Transfektion wurden zuerst die Zellen in 500 μ l Medium auf den Zellkulturplatten (24-well) ausgesät und gewartet, bis sie sich angeheftet hatten. Dann erfolgte die Transfektion mit dem siRNA-Transfektionsreagenz-Gemisch. Hierfür wurde die siRNA (20 - 50 pM) mit 3 μ l HiPerfect in 50 μ l serumfreien Medium gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Gemisch tropfenweise auf den Zellen verteilt. Bei der reversen Transfektion wurden 5 pM siRNA mit 0.75 μ l HiPerfect in den Zellkulturplatten (96-well) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l Zellsuspension dazugegeben. Nach 2-3 Tagen Inkubation im Brutschrank konnte die Knockdown-Effizienz im Western Blot bestimmt

oder die Zellen serumgehungert und mit Gentoxinen behandelt werden. Die Zellen wurden schließlich entweder für die Immunfluoreszenzanalysen fixiert und gefärbt oder für Western Blot-Analysen lysiert.

2.2.2 Proteinanalytik

Herstellung von Gesamtzell-Lysaten

Nach Beendigung einer Inkubation der Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen direkt in 400 µl Lysepuffer (bei 21 cm² Zellkulturschalen) aufgenommen. Die Menge des Lysepuffers wurde für kleinere bzw. größere Zellkulturschalen entsprechend angepasst. Die Lysate wurden für 5 min bei 95 °C gekocht, zur Scherung der DNA 10 s mit einem Ultraschallgerät (Branson sonifier, USA) sonifiziert und zentrifugiert. Danach wurden die Proben entweder direkt auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen oder bis zur weiteren Verwendung kurzfristig bei -20 °C oder längerfristig bei -80°C gelagert.

4x Lysepuffer	
1M Tris pH 6,8	12.5 ml
H ₂ O	17.5 ml
Glycerin	20 ml
SDS	4 g
Bromphenolblau	25 mg
β-Mercaptoethanol	10 %

Tabelle 2.8: Zusammensetzung des Lysepuffers

SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Hierfür wurde ein Laufgel verwendet, bestehend aus einem 4% Sammelgel und je nach Größe der aufzutrennenden Proteine einem 6, 10 oder 15% Trenngel. Die Proben wurden im Sammelgel, das zuerst durchlaufen wird, konzentriert und im anschließenden Trenngel in scharfe Banden aufgetrennt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Laufpuffer in einem vertikalen Gelelektrophoresesystem (Bio-Rad, München) bei einer Spannung von 170 V, so lange, bis der Blaumarker das untere Ende der Glasplatte erreicht hatte. Um das Molekulargewicht bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein Größenmarker mitaufgetrennt (PageRuler, Fermentas).

4% Sammelgel	
Rotiphorese	4 %
Tris-HCl pH 6,8	125 mM
SDS	0.1 %
APS	0.1 %
TEMED	0.01 %

Tabelle 2.9: Zusammensetzung des Sammelgels

6%–15% Trenngel	
Rotiphorese	6-15 %
Tris-HCl pH 8,8	375 mM
SDS	0.1 %
APS	0.1 %
TEMED	0.01 %

Tabelle 2.10: Zusammensetzung des Trenngels

Laufpuffer	
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0.1 %

Tabelle 2.11: Zusammensetzung des Laufpuffers

Western Blot

Um die aufgetrennten Proteine immunologisch nachweisen zu können, wurden sie auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, 0,45 μ M Porengröße, Millipore GmbH, Schwalbach) übertragen. Dies erfolgte nach dem Nassblotverfahren von Herrmann und Wiche (1987). Damit die Proteine an die PVDF Membran binden können, wurde diese zuerst mit 100 % Methanol aktiviert und zusammen mit dem Gel in eine sogenannte Blot-Kassette gepresst. Der Transfer erfolgte in einer gekühlten, mit Blotpuffer gefüllten, Blot-Kammer (Bio-Rad, München) für 60 min bei 100 V.

Blotpuffer	
Tris-BASE	25 mM
Glycin	200 mM
Methanol (v/v)	10 %

Tabelle 2.12: Zusammensetzung des Blotpuffers

Immunologischer Nachweis von Proteinen

Nach dem Transfer auf die PVDF Membran wurde diese in 5 % (w/v) Milchpulver/TBS/0,1 % Tween (TBST) für 1 h inkubiert, um die freien Proteinbindestellen auf der Membran abzusättigen. Für die Inkubation mit phosphospezifischen Antikörpern wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBST gewaschen und anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem jeweiligen Antikörper in 3 % BSA/TBST inkubiert. Antikörper gegen nicht phosphorylierte Proteine wurden mit der Membran für 1 h in 5 % Milchpulver/TBST inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen für 10 min mit TBST entfernt. Die primäre Antikörperdetektion erfolgte mit einem sekundären, gegen die Spezies des Erst-Antikörper gerichteten, Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper. Die Membran wurde eine Stunde mit dem Antikörper in 5 % Milchpulver/TBST inkubiert und anschließend wiederum zweimal mit TBST gewaschen. Die Visualisierung der Antikörper-Proteinkomplexe erfolgte durch Zugabe des Substrates (ECL-Lösung, GE Healthcare, Freiburg) für die Peroxidase. Bei dieser Reaktion katalysiert die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase die Oxidation von Luminol (ECL-Substrat) und löst dabei eine Chemilumineszenz aus, die mit Hilfe eines lichtempfindlichen Filmes detektiert werden kann. Hierfür wurden die beiden ECL-Komponenten 1:1 gemischt und auf die Membran gegeben. Nach 1 min Inkubation wurde das überschüssige ECL entfernt und die Membran im Dunkeln mit einem Film exponiert, der anschließend in einer Entwicklungslösung solange geschwenkt wurde, bis die Banden sichtbar wurden. Die Fixierung des Filmes erfolgte in einem Fixierbad. Die quantitative Auswertung der Signale erfolgte mit Hilfe des Odyssey 2.0 Software-Programmes (Li-Cor Biosciences, Bad Homburg). Die Signalintensität wurde auf die geladene Proteinmenge normalisiert und graphisch dargestellt.

TBS	
Tris-HCl	20 mM
NaCl	150 mM
pH 7,6	

Tabelle 2.13: Zusammensetzung von TBS

Entfernen der phosphospezifischen Antikörper von der Membran

Bei Versuchen mit phosphospezifischen Antikörpern wurde die geladene Gesamtproteinmenge mit Hilfe von Antikörpern bestimmt, welche die nicht-phosphorylierte Form des Proteins erkennen. Hierfür mussten die phosphospezifischen Antikörper von der Membran wieder abgelöst werden (*stripping*). Dies erfolgte durch 30 min

Schwenken der Membran in Stripping-Puffer bei 50 °C im Wasserbad. Im Anschluss wurde die Membran wie im Abschnitt zuvor beschrieben mit Milchpulver geblockt und mit Antikörpern inkubiert.

Stripping-Puffer	
Tris pH 7,6	62,5 mM
SDS	2%
β-Mercaptoethanol	100 mM

Tabelle 2.14: Zusammensetzung des Stripping-Puffer

2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Fixieren und immunologische Färbung von Zellen

Die Fixierung der Zellen für die immunologische Färbung erfolgte mit 4 % PFA/PBS für 10 min bei Raumtemperatur (RT). Nach anschließendem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,2 % Triton X-100/PBS für 5 min permeabilisiert. Die Zellen wurden erneut einmal mit PBS gewaschen und für 1 h mit 2 % BSA/PBS geblockt. Der Blockierungspuffer wurde durch einmaliges Waschen mit PBS entfernt und es folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper. Der primäre Antikörper wurde in 0,2 % BSA/0,01 % Tween/PBS verdünnt (phospho-p38 1:200; p38 1:500). Nach einer Inkubation von 2 h bei RT wurde der primäre Antikörper abgenommen und zur Wiederverwendung bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und 1 h mit dem zweiten Antikörper (AlexaFluo488, 1:1000 in 0.2 % BSA/0.01 % Tween/PBS) im Dunkeln inkubiert. Der Zellkern wurde anschließend mit DAPI (300nM) für 15 min gefärbt. Die DAPI-Lösung wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Zellen im 96-well wurden zum Schutz vor Austrocknung mit PBS überschichtet und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Auswertung der Immunfluoreszenzen am Mikroskop

Die Aufnahme der gefärbten Zellen erfolgte an einem Mikroskop IX81 der Firma Olympus. Es wurden 4 Bildauschnitte pro well einer 96-well-Platte mit einem 20 er Objektiv aufgenommen. Von jedem Bildauschnitt wurde sowohl das DAPI- als auch das AlexaFluo (488 nm)-Signal detektiert und gespeichert. Die quantitative Auswertung des Fluoreszenzsignals erfolgte mit der Scan®-Analysis Software von Olympus. Sowohl die Aufnahme der Zellen mit dem Mikroskop als auch die Auswertung der Signale erfolgte automatisiert. Zur Ermittlung der Gesamtzahl der analysierten Zellen wurde die DAPI-Färbung genutzt. Durch die DAPI-Färbung wurden alle Zellkerne

gefärbt, die der Gesamtzellzahl entsprechen. Es wurde eine sogenannte Maske mit der Software generiert, die über das DAPI-Signal gelegt wurde (Abb. 2.1). Die Anzahl der Masken wurde von der Software ermittelt und die Gesamtzahl der Zellen daraus hergeleitet. Zur Bestimmung des p-p38 Fluoreszenzsignals wurde über die DAPI-Maske der Zellkern bestimmt und das p-p38 Fluoreszenzsignal darin ermittelt. Die erhaltenen Werte wurden tabellarisch ausgegeben und konnten graphisch dargestellt werden.

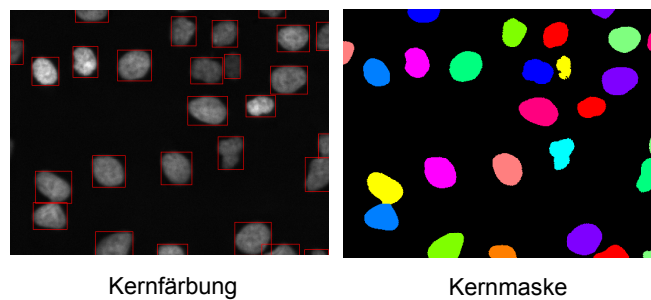


Abbildung 2.1: Darstellung der Kernmaske. Linkes Bild: DAPI-Färbung von HeLa Zellkernen, aufgenommen mit einem Olympus IX81 Mikroskop; rechtes Bild: Kernmasken generiert von der Olympus Scan®-Analysis Software. Die Anzahl der Kernmasken wird von der Software als Gesamtzellzahl ausgegeben.

Analyse apoptotischer Zellen

Die Analyse der apoptotischen Zellen erfolgte über eine Hoechst-Färbung des Zellkerns. Lebende Zellen wurden mit Hoechst (10 μM) für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und direkt anschließend die Bilder am Mikroskop aufgenommen. Es wurden wie im Abschnitt zuvor beschrieben, 4 Bildausschnitte pro well einer 96-well-Platte mit dem 20er Objektiv aufgenommen. Für die statistische Auswertung wurde jeder Ansatz zusätzlich im Quadruplikat (4 wells) durchgeführt. Neben der Hoechst Fluoreszenz wurde noch jeweils das Hellfeldbild mit aufgenommen, um die Änderung des Zellphänotyps während der Apoptose zu dokumentieren. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Scan®-Analysis Software von Olympus. Es wurde, wie im Abschnitt zuvor beschrieben, eine Kern-Maske, diesmal über die Hoechst Färbung, generiert, über welche die Gesamtzahl der Zellen bestimmt wurde. Die apoptotischen Zellen wurden anhand der Intensität des Fluoreszenzsignals definiert. Apoptotische Zellen zeichnen sich unter dem Mikroskop durch eine sehr intensive DNA-Färbung und veränderte Zellform aus. Früh apoptotische Zellen weisen eine stark kondensierte DNA auf und sind phänotypisch klein und rund, bei spätapoptotischen

Zellen ist eine Fragmentierung der DNA zu erkennen (Abb. 2.2). Ab einem bestimmten Schwellenwert der Kernintensität wird die Zelle als apoptotisch erkannt. Die Anzahl der apoptotischen Zellen, sowie die Gesamtzahl der Zellen können in ein Verhältnis gesetzt und so der Prozentsatz der apoptotischen Zellen bestimmt werden.

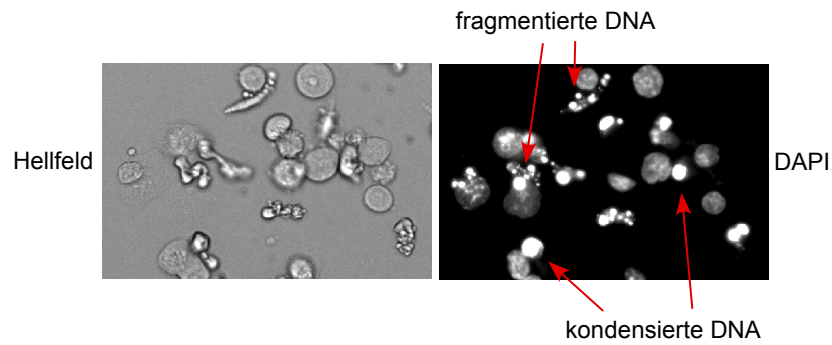


Abbildung 2.2: Kondensation und Fragmentierung der DNA in apoptotischen Zellen. Linkes Bild: Hellfeld-Aufnahme von lebenden und apoptotischen HeLa Zellen; rechtes Bild: DAPI-Färbung der HeLa Zellen. Beispiele für kondensierte oder fragmentierte DNA sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

Benzo[a]pyren-7,8-diol 9,10-epoxid (BPDE) ist das ultimale Kanzerogen, das beim Metabolismus des polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffes (PAK) Benzo[a]pyren (B[a]P) entsteht. Da PAK erst durch Metabolisierung toxisch werden, wurde zu Beginn der Arbeit zunächst untersucht, ob in der Zelle durch die Aktivierung des Metabolismus zusätzlich auch protektive Mechanismen angeregt werden, um der Toxizität der Metabolite entgegenzuwirken.

Der Metabolismus und damit die Toxizität der PAK wird über den Transkriptionsfaktor Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) vermittelt. Eine Aktivierung des AhR durch PAK oder durch halogenierte Dibenzo-p-Dioxine (auch kurz als Dioxine bezeichnet) führt zur Expression verschiedener Enzyme, die am Fremdstoffmetabolismus beteiligt sind, unter anderem Mitglieder der Cytochrom P450-Familie, UDP-Glucuronosyl-Transferasen oder Glutathion-S-Transferasen. Durch eine chronische Aktivierung des AhR konnten weitere Zielgene des AhR identifiziert werden, dazu gehören das Zellzyklus-Inhibitor Gen p27^{kip1} (Weiss et al., 1996; Kolluri et al., 1999) und die Proto-Onkogene c-jun und junD (Weiss et al., 2005 und 2008). Diese Zielgene sind für die toxische Wirkung von z.B. Dioxinen verantwortlich. Im Hinblick auf mögliche weitere protektive Funktionen des AhR ist neben der Aktivierung der oben schon beschriebenen Enzymen nichts bekannt.

Da die Toxizität der PAK vor allem über die Diolepoxid-Metabolite (z.B. BPDE), die mit der DNA interagieren können, vermittelt wird, wurde untersucht, ob der AhR eine Rolle bei der DNA-Schadensreparatur und dem zellulären Überleben hat. Die Ergebnisse dazu wurden bereits veröffentlicht und werden zur Wahrung des inhaltlichen Zusammenhangs hier nicht gezeigt (siehe Anhang, Schreck et al., 2009). Durch die Verwendung von murinen Mausleberzellen, die defizient für den AhR oder seinen Dimerisierungspartner ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) waren, konnte zunächst bestätigt werden, dass die Toxizität von B[a]P AhR abhängig ist. Außerdem konnte eine Vorbehandlung der Zellen mit einem nicht-gentoxischen AhR-Aktivator die Toxizität von B[a]P nicht verhindern. Die Beteiligung des AhR an der Expression von DNA-Reparatur-Genen, speziell der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) wurde mit Hilfe von quantitativer Realtime-PCR untersucht. Sowohl B[a]P als

auch das Dioxin TCDD führten zu einer Erhöhung des mRNA-Levels von xpc und der DNA-Polymerase κ , ein Effekt der jedoch auf Proteinebene nicht bestätigt werden konnte. Die Gentoxine BPDE und Cisplatin führten sogar zu einer Verringerung der NER-Genexpression. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der AhR keinen Effekt auf die Mengen von NER-Proteinen hat und dass der durch Gentoxin verursachte Zelltod durch gleichzeitige AhR-Aktivierung nicht verhindert werden kann.

Da keine zytoprotektive Funktion des AhR nach B[a]P Behandlung nachweisbar war, wurde der Schwerpunkt der Arbeit auf die toxische Wirkung von BPDE gelegt. Über die Mechanismen, wie intrazelluläre Signalwege nach Gentoxin-Exposition aktiviert werden und was die zellulären Konsequenzen sind, ist wenig bekannt. Ein prominenter Signalweg, der durch verschiedene Gentoxine aktiviert wird, ist der Signalweg der Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK), zu denen p38 und JNK zählen. Erst in zwei Arbeiten konnte gezeigt werden, dass reaktive Epoxide, unter anderem BPDE, in murinen epidermalen Zellen eine Aktivierung der p38 und JNK induzieren (Li et al., 2004a und b). Ein weiterer Signalweg der dabei identifiziert wurde, ist der Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Weg. Die BPDE-induzierte Aktivierung der JNK ist dabei abhängig von AKT. Wie es zu der Aktivierung der Signalwege kommt, also über welchen Sensor es zur Signalgenerierung kommt, welche weiteren Komponenten an der Weiterleitung beteiligt sind und welche Konsequenzen die Aktivierung der SAPK hat, ist noch ungeklärt. Diesen Fragen soll im Folgenden nachgegangen werden. Dabei wird auch die Relevanz für den Menschen durch Verwendung humaner Zelllinien untersucht.

3.1 p38- und JNK-Aktivierung nach BPDE-Exposition in humanen Zellen

Um zu zeigen, dass die in murinen Zellen gezeigte Aktivierung der SAPK nach BPDE ein konservierter Mechanismus und auch relevant für den Menschen ist, wurden humane Zelllinien verwendet. Zum einen wurden humane Leberkarzinomzellen (HepG2) und Zervixkarzinomzellen (HeLa) verwendet, zum andern konnten die Ergebnisse aber auch mit humanen Fibroblasten bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Zellen wurden für verschiedene Zeitpunkte mit BPDE induziert und die Zelllysate im Western Blot-Verfahren auf die Aktivierung, d.h. Phosphorylierung der SAPK, untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1 dargestellt. Eine Aktivierung der p38 und JNK ist in den humanen Zelllinien detektierbar. Sowohl HeLa als auch HepG2 Zellen zeigen nach einer Behandlung mit BPDE eine frühe Aktivierung der

p38 und JNK. Eine Phosphorylierung der Proteine ist nach 30 bzw. 60 Minuten im Western Blot zu erkennen, die über den untersuchten Zeitraum von 120 Minuten persistiert (Abb. 3.1). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Resultaten in murinen Zellen. Die Aktivierung des Signalweges durch BPDE ist sowohl in humanen als auch murinen Zellen möglich.

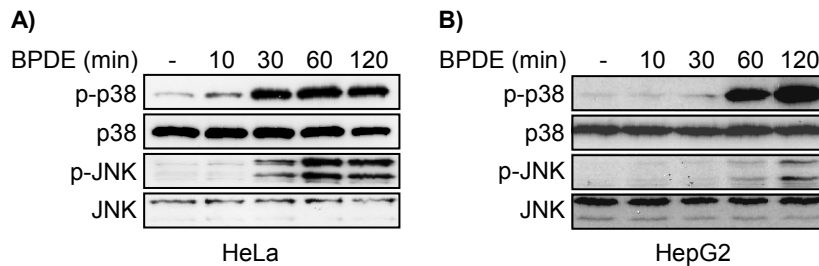


Abbildung 3.1: p38 und JNK werden durch BPDE in humanen Zellen aktiviert (A) HeLa und (B) HepG2 Zellen wurden über Nacht serumgehungert und für die angegebenen Zeitpunkte mit 2 μ M BPDE oder 0,1 % DMSO behandelt. Die Aktivierung von p38 und JNK wurde im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern detektiert. Die geladene Gesamtproteinmenge wurde mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierte Form der Proteine bestimmt.

3.1.1 Der Signalweg der Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase (PI3K)/AKT ist nicht an der Aktivierung der SAPK durch BPDE beteiligt

Li et al. konnten neben einer Aktivierung der SAPK auch eine Phosphorylierung der AKT nach BPDE Gabe nachweisen. Eine Verbindung zwischen der AKT-Phosphorylierung und der JNK-Aktivierung konnte hergestellt werden (Li et al., 2004a). Um zu bestätigen, dass auch in den humanen Zellen BPDE eine AKT-Aktivierung induzieren kann, wurden BPDE-behandelte Proben auf die Phosphorylierung der AKT untersucht. Im Western Blot ist eine AKT-Phosphorylierung nach 30 Minuten zu detektieren, die über den untersuchten Zeitraum von 120 Minuten persistiert (Abb. 3.2). Die Aktivierungskinetik ist vergleichbar mit der Kinetik der p38 und JNK-Phosphorylierung. Aufgrund dieser zeitlichen Korrelation zwischen der AKT- und SAPK-Aktivierung besteht die Möglichkeit, dass es einen Zusammenhang zwischen den Kinasen gibt. Um festzustellen, ob die AKT-Phosphorylierung an der SAPK-Aktivierung beteiligt ist, wurden Inhibitorstudien durchgeführt.

Ein bekannter Inhibitor der AKT-Aktivierung ist der PI3K Inhibitor Wortmannin. Die PI3K ist für die Phosphorylierung von AKT nach verschiedenen Stimuli verantwortlich. Nach Vorbehandlung der Zellen mit dem Inhibitor Wortmannin und anschließender Induktion mit BPDE wurde die Aktivierung der AKT, JNK und p38 im Western

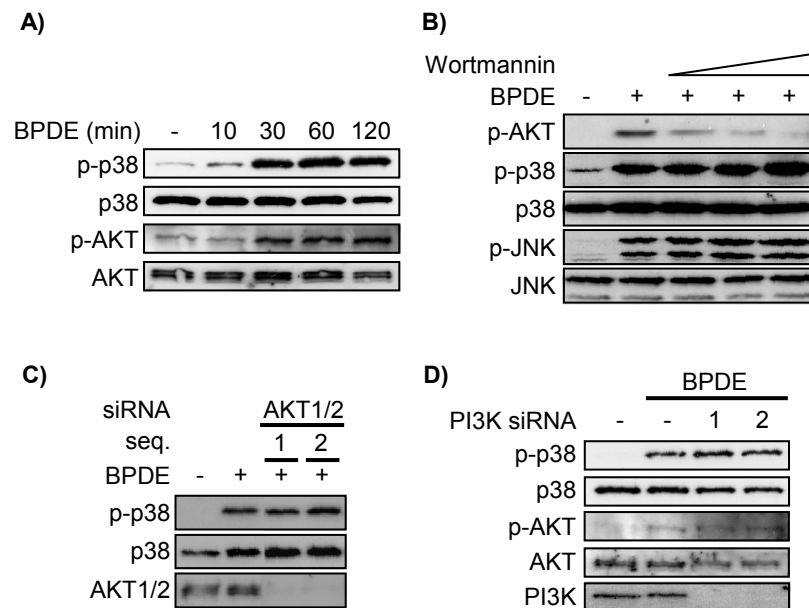


Abbildung 3.2: BPDE aktiviert den SAPK-Signalweg unabhängig vom AKT-Signalweg. A) AKT wird mit einer ähnlichen Zeitkinetik wie die SAPK durch BPDE aktiviert. Konfluente HeLa Zellen wurden über Nacht serumgehungert und für die angegebenen Zeitpunkte mit 2 µM BPDE oder 0,1 % DMSO behandelt. Die Aktivierung von AKT und p38 wurde im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern detektiert. Die geladene Gesamtproteinmenge wurde mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierte Form der Proteine bestimmt. B) Der SAPK Signalweg wird unabhängig vom AKT-Signalweg durch BPDE aktiviert. HeLa Zellen wurden für 15 min mit steigenden Konzentrationen des AKT-Inhibitors Wortmannin (0,1 - 10 µM) vorbehandelt bzw. in C) für 72 h mit siRNA gegen AKT1 und AKT2 transfiziert und anschließend für 60 min mit 2 µM BPDE induziert. Die Analyse der Proteine erfolgte wie in A). D) Die p38 und AKT Aktivierung erfolgt nicht über die PI3K. HeLa Zellen wurden für 72 h mit siRNA gegen die p110 Untereinheit der PI3K transfiziert und wie in C) beschrieben weiterprozessiert.

Blot detektiert. Wie in Abbildung 3.2 B dargestellt, wird die AKT-Aktivierung mit steigenden Inhibitorkonzentrationen gehemmt, während die JNK- und p38-Phosphorylierung nicht beeinflusst wird. JNK und p38 scheinen in HeLa und HepG2 Zellen aber auch in murinen Fibroblasten (Grico, 2007) unabhängig von AKT durch BPDE aktiviert zu werden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Resultaten in murinen Epithelialzellen, wo eine Verbindung zwischen dem PI3K/AKT-Signalweg und der JNK-Aktivierung nach BPDE hergestellt werden konnte.

Unterstützt wurde dieses Ergebnis durch einen weiteren Versuch, bei dem mit Hilfe von RNA Interferenz AKT herunterreguliert wurde. Von AKT existieren drei Isoformen AKT1, 2 und 3, von denen aber nur AKT1 und 2 eine essentielle Rolle

im Zusammenhang mit der Aktivierung durch Hormone oder Wachstumsfaktoren spielen. AKT3 wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert und ist dort wichtig für die Entwicklung (Tschopp et al., 2005). Aufgrund einer möglichen Redundanz wurde sowohl AKT1 als auch AKT2 gleichzeitig herunterreguliert. Dabei wurden je zwei unabhängige siRNA-Sequenzen (seq1 und seq2) verwendet. In Abbildung 3.2 C ist zu erkennen, dass das AKT-Protein sehr effizient herunterreguliert wurde, aber dennoch eine p38-Aktivierung nach BPDE stattfand.

Desweiteren wurde untersucht, ob die PI3K bei der Aktivierung der SAPK eine Rolle spielt. In murinen Epithelialzellen ist die AKT-Aktivierung nach BPDE-Exposition abhängig von der PI3K (Li et al., 2004a). Die PI3K besteht aus einer katalytischen (p110) und regulatorischen (p85) Untereinheit (Carpenter et al., 1990). Mit Hilfe einer siRNA gegen die p110 Untereinheit der PI3K wurde diese herunterreguliert, wodurch auch ihre Funktion gehemmt wurde. Die Aktivierung von p38, exemplarisch für die SAPK, und AKT nach BPDE-Exposition wurde im Western Blot detektiert. Auch in diesem Fall ist trotz Fehlen der PI3K kein Effekt auf die Phosphorylierung der p38 auszumachen (Abb. 3.2 D). Interessanterweise ist aber auch die Aktivierung der AKT nicht gehemmt, was darauf schließen lässt, dass die AKT-Aktivierung unabhängig von der PI3K ist.

Als nächster Schritt wurde untersucht, ob BPDE weitere bekannte Komponenten des AKT-Signalweges aktivieren kann. Abhängig von AKT wird unter anderem der mTOR (*mammalian target of Rapamycin*) Signalweg aktiviert. mTOR ist ein Enzym, das für das zelluläre Überleben und Wachstum wichtig ist. Ein Substrat von mTOR ist die p70S6-Kinase (p70S6K). Die Aktivierung der p70S6K kann mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers nachgewiesen werden. In Abbildung 3.3 ist die Aktivierung der p70S6K nach BPDE Behandlung zu erkennen. Durch Hemmung des mTOR Signalweges mit Rapamycin ist die Phosphorylierung der p70S6K nach BPDE-Gabe inhibiert. Weder die AKT noch die p38- und JNK-Phosphorylierung ist durch die Inhibitorvorbehandlung beeinträchtigt. Somit konnte mTOR als weiterer Signalweg identifiziert werden, der durch BPDE aktiviert wird, jedoch nicht an der SAPK-Aktivierung beteiligt ist.

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse, dass der AKT-Signalweg zwar nach BPDE-Gabe aktiviert wird, aber diese Aktivierung keine Voraussetzung für die BPDE-induzierte SAPK-Phosphorylierung ist. Somit werden in humanen Zellen die zwei Signalwege unabhängig voneinander aktiviert. Wie kommt es nun zu dieser Aktivierung der Signalwege? Wo wird das Signal generiert und welche zwischengeschalteten Faktoren spielen eine Rolle? Im nächsten Kapitel soll auf weitere Mediatoren eingegangen werden, die an der BPDE-induzierten Aktivierung der p38 und JNK beteiligt sein könnten.

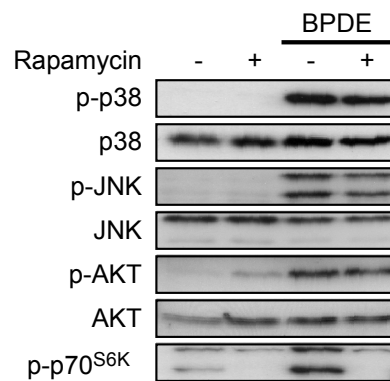


Abbildung 3.3: Der mTor-Signalweg wird nach BPDE-Behandlung aktiviert.
 A) HeLa Zellen wurden mit Rapamycin (100 nM) für 30 min vorbehandelt und anschließend für 60 min mit 2 μ M BPDE oder 0,1 % DMSO behandelt. Die Aktivierung der betrachteten Proteine wurde im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern detektiert. Die geladene Gesamtproteinmenge wurde mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierte Form der Proteine bestimmt.

3.2 Identifizierung von Faktoren, die an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung beteiligt sind

3.2.1 Für die Phosphorylierung von p38 und JNK nach BPDE-Exposition sind die übergeordneten MAPK-Kinasen MKK3/6 und SEK1 wichtig

Die SAPK werden über eine Kinasekaskade aktiviert. Deshalb stellte sich zunächst die Frage, welche übergeordneten Kinasen für die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung wichtig sind. MAPK-Kinasen (MAPKK), die zu einer Phosphorylierung der SAPK führen können, sind unter anderem MKK3/6, MKK7 und SEK1 (siehe Kapitel 1.3.1). Um zu testen, ob diese Kinasen auch nach BPDE-Gabe aktiviert werden, wurden HeLa Zellen für unterschiedliche Zeitpunkte mit BPDE behandelt. Im Western Blot wurde die Aktivierung von MKK3/6, SEK1, MKK7 mit phosphospezifischen Antikörpern detektiert. Eine Aktivierung konnte für MKK3/6 und SEK1, aber nicht für MKK7 nachgewiesen werden. Zeitlich gesehen korrelierte diese Aktivierung mit der Aktivierung von p38 und JNK. In den HeLa Zellen war eine Phosphorylierung der jeweiligen Kinasen nach 30 Minuten zu sehen (Abb. 3.4). Das gleiche Ergebnis konnte auch in den HepG2 Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass MKK3/6 und SEK1 nach BPDE-Exposition aktiviert werden, aber noch nicht, ob sie auch für die Aktivierung der p38 und JNK verantwortlich sind. Um das herauszufinden, wurde ein Ansatz gewählt, bei dem die Proteine MKK3

und MKK6 mit Hilfe von siRNA herunterreguliert wurden. Falls diese Kinasen an der Aktivierung von p38 beteiligt sind, sollte die Phosphorylierung der p38 nach BPDE-Exposition reduziert sein. In Abbildung 3.4 B ist ein Western Blot der Lysate mit und ohne spezifische siRNA Vorbehandlung dargestellt. Die Proteinmenge von MKK3 und MKK6 ist sichtlich reduziert, d.h. die Herunterregulation war erfolgreich. Bei der Betrachtung der Aktivierung der p38 nach BPDE-Gabe ist deutlich eine verringerte Phosphorylierung in den Proben zu sehen, in denen MKK3/6 fehlt. Das lässt darauf schließen, dass MKK3/6 nicht nur nach BPDE aktiviert werden, sondern auch wichtig für die Aktivierung von p38 sind.

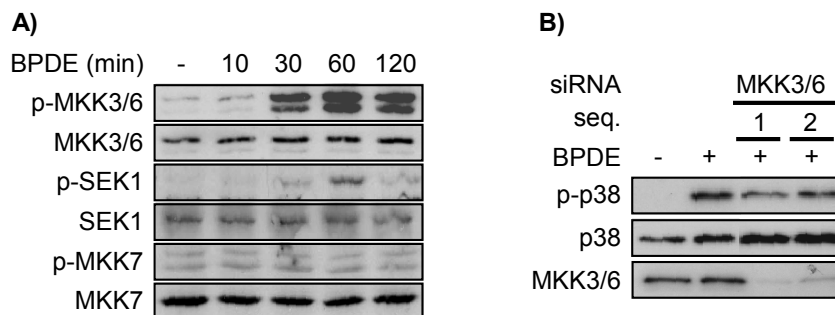


Abbildung 3.4: BPDE aktiviert die MAPKK MKK3/6 und SEK1 aber nicht MKK7. A) HeLa Zellen wurden über Nacht serumgehungert und für die angegebenen Zeitpunkte mit 2 μ M BPDE oder 0,1 % DMSO behandelt. Die Aktivierung der MAPKK wurde im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern detektiert. Die geladene Gesamtproteinmenge wurde mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierte Form der Proteine bestimmt. B) MKK3/6 ist an der BPDE-induzierte p38-Aktivierung beteiligt. HeLa Zellen wurden mit siRNA gegen MKK3/6 oder einer Kontroll-siRNA (dsr) transfiziert, nach 2 Tagen über Nacht serumgehungert und am dritten Tag für eine Stunde mit 2 μ M BPDE behandelt und die Proteine wie in A) beschrieben detektiert.

3.2.2 Die Beteiligung von Protein-Tyrosinkinasen an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung

Bis jetzt konnte gezeigt werden, dass in humanen Zellen eine BPDE-Exposition zu einer Aktivierung der SAPK p38 und JNK sowie der übergeordneten Kinasen MKK3/6 und SEK1 führt. MKK3/6 ist dabei verantwortlich für die BPDE-induzierte p38-Phosphorylierung. Bei der Suche nach weiteren Komponenten, die für die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung wichtig sind, wurden die Protein-Tyrosinkinasen in Betracht gezogen. Für einige Mitglieder der zytosolischen Tyrosinkinasen wurde schon berichtet, dass sie an der zellulären Antwort nach Gentoxin-Exposition beteiligt sind und zu einer Aktivierung der SAPK führen können. C-Abl wird z.B. nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung, MMS (Methylmethansulfonat) oder Cisplatin aktiviert und ist an der JNK-Aktivierung beteiligt (Kharbanda et al., 1995;

Kharbanda et al., 1996b; Yuan et al., 1996b). Die src-ähnliche Kinase Lyn wird im Kern durch ionisierende Strahlung aber auch durch einen Replikationsblock aktiviert, wodurch JNK phosphoryliert wird (Yoshida et al., 2000; Kharbanda et al., 1994).

Src-ähnliche Kinasen führen zur Aktivierung der SAPK nach BPDE-Exposition

Zu den Mitgliedern der Src-ähnlichen Kinasen gehören neben Src und Lyn, die Kinasen Fyn, Lck, Hck, Fgr, Blk, Yrk und c-Yes. Ob diese Kinasen an der BPDE-induzierten Aktivierung der SAPK beteiligt sind, wurde mit einem Inhibitor gegen die src-ähnlichen Kinasen getestet.

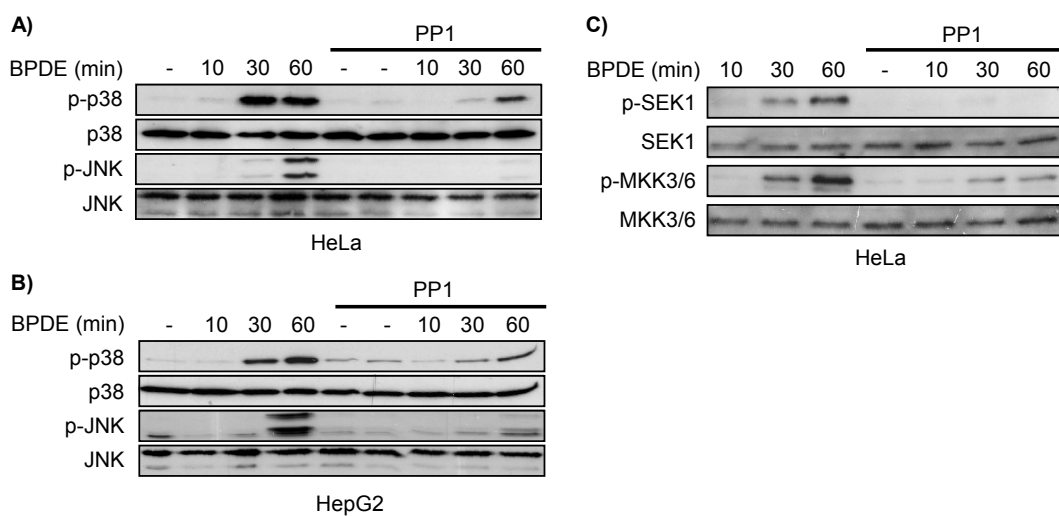


Abbildung 3.5: Src-ähnliche Kinasen sind an der BPDE- induzierten SAPK-Aktivierung beteiligt. (A+C) HeLa und (B) HepG2 Zellen wurden mit dem Inhibitor PP1 (20 µg/ml) für 15 min vorbehandelt und anschließend für die angegebenen Zeiten mit 2 µM BPDE oder 0,1 % DMSO behandelt. Die Aktivierung der betrachteten Proteine wurde im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern detektiert. Die geladene Gesamtproteinmenge wurde mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierte Form der Proteine bestimmt.

Zur Inhibierung der src-ähnlichen Kinasen wurde PP1 verwendet. Die HeLa und HepG2 Zellen wurden für 15 Minuten mit oder ohne Inhibitor vorbehandelt und anschließend für 10, 30 und 60 Minuten mit BPDE behandelt. Im Western Blot (Abb. 3.5) ist ohne Inhibitorvorbehandlung die bereits bekannte zeitabhängige Aktivierung der p38 und JNK zu erkennen. Interessanterweise ist diese Aktivierung aber für p38 in den Proben, die mit dem Inhibitor vorbehandelt wurden, reduziert bzw. für JNK nicht mehr zu detektieren. Desweiteren wurde die Aktivierung der übergeordneten Kinasen MKK3/6 und SEK1 in untersucht. Auch diese Kinasen werden durch den Src-Kinase

Inhibitor gehemmt. Somit sind die Src-ähnlichen Kinasen für die Aktivierung der SAPK nach BPDE-Exposition verantwortlich. Welche Kinase ist nun für diesen Effekt verantwortlich? Mit Hilfe von siRNA-Oligonukleotiden gegen einzelne Mitglieder der Familie sollte diese Frage geklärt werden.

Die Src-ähnliche Kinase Lyn vermittelt die BPDE-induzierte p38- und JNK-Phosphorylierung

Da für Lyn schon bekannt war, dass es im Kern nach DNA-Schäden aktiviert werden kann, wurde zuerst Lyn mit siRNA herunterreguliert und die Aktivierung der SAPK nach BPDE-Gabe detektiert.

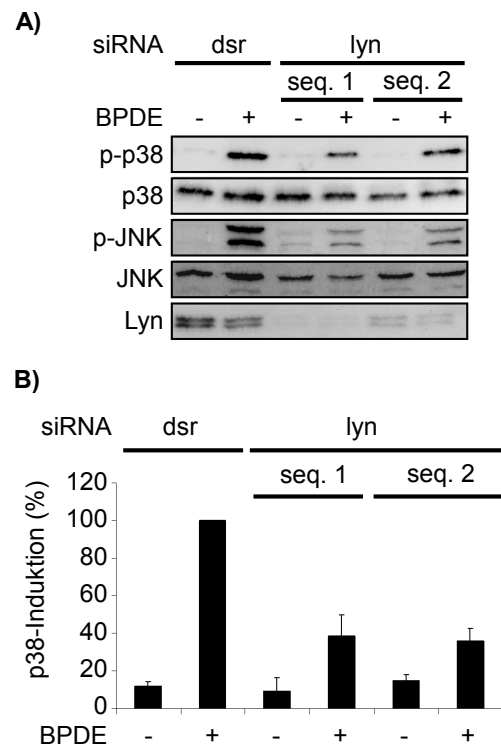


Abbildung 3.6: Eine Herunterregulation von Lyn reduziert die durch BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung. A) HeLa Zellen wurden mit siRNA gegen lyn oder einer Kontroll-siRNA (dsr) transfiziert, nach 2 Tagen über Nacht serumgehungert und am dritten Tag für eine Stunde mit 2 μ M BPDE behandelt. Die Gesamtzelllysate wurden im Western Blot auf die Aktivierung der SAPK mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern untersucht. Die geladene Gesamtproteinmenge wurde mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierte Form der Proteine bestimmt. Die Effizienz der Herunterregulation des Lyn Proteins wurde mit einem Antikörper gegen Lyn detektiert. In B) wurde die Phosphorylierung der p38 quantifiziert. Dargestellt ist das Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Herunterregulation von Lyn war effizient und es konnte ein Effekt auf die p38- und JNK-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Sowohl die p38- als auch JNK-Phosphorylierung war in den Proben, in denen Lyn herunterreguliert wurde, im Vergleich zur Kontrolle reduziert (Abb. 3.6). Exemplarisch wurde die p38-Phosphorylierung quantifiziert und es war ein Rückgang der p38-Phosphorylierung auf 40 % der Gesamtaktivierung auszumachen. Somit konnte Lyn als ein Mitglied der Src-ähnlichen Kinasen identifiziert werden, das für die Aktivierung der p38 und JNK nach BPDE-Exposition verantwortlich ist.

Die Beteiligung der Src-ähnlichen Kinase Lyn an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung deutet darauf hin, dass das primäre Signal auch durch den BPDE-induzierten DNA-Schaden entstehen kann. Deshalb wurde im Folgenden die Rolle der DNA-Schadenserkennung untersucht.

3.3 Rolle der DNA-Schadenserkennung bei der BPDE-induzierten zellulären Stressantwort

Durch seine reaktive Epoxidgruppe kann BPDE mit Proteinen der Zelle und vor allem mit Nukleotiden der DNA reagieren. Dabei entstehen sogenannte sperrige Addukte, die zu einem Transkriptions- oder Replikationsblock führen können. Die Zelle reagiert darauf mit der Aktivierung von Signalwegen, die für die Reparatur der DNA oder je nach Ausmaß der Schädigung sogar für den Zelltod verantwortlich sind. Im Folgenden soll nun untersucht werden, ob die DNA-Schadenserkennung eine Rolle bei der BPDE-induzierten SAPK- und AKT-Aktivierung spielt.

3.3.1 Die DNA-Schadenserkennung ist eine Voraussetzung für die Aktivierung der SAPK durch reaktive PAK-Epoxide

Benzo[c]phenanthren-3,4-diol-1,2-Epoxid (B[c]PhDE) ist ein kanzerogener, hoch reaktiver PAK-Metabolit, der sehr gut an die DNA bindet und Addukte bildet, die aber schlecht von Reparaturproteinen der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) in humanen Zervixkarzinom Zellen (HeLa) erkannt werden (Buterin et al., 2000). Die Strukturformel ist in Abbildung 3.7 A dargestellt. Da diese Addukte schlecht erkannt werden, ist dies eine Möglichkeit, um zu untersuchen, ob die DNA-Schadenserkennung wichtig für die PAK-induzierte SAPK-Aktivierung ist. Hierfür wurden HeLa Zellen mit B[c]PhDE für verschiedene Zeitpunkte behandelt, und den BPDE-Versuchen entsprechende Konzentration eingesetzt. Die Zellysate wurden im Anschluss im Western Blot auf die

Phosphorylierung von p38 und JNK untersucht und zusätzlich zum Vergleich noch Proben aus BPDE-Behandlungen aufgetragen (Abb. 3.7 B). Es war deutlich zu sehen, dass nach Induktion mit B[c]PhDE weder eine Phosphorylierung der p38 noch der JNK stattfand. In den BPDE-exponierten Extrakten dagegen war die schon bekannte Aktivierung nach 30 Minuten zu sehen. Interessanterweise war auch keine Aktivierung der AKT in den B[c]PhDE-behandelten Proben zu detektieren. Somit scheint sowohl die SAPK- als auch AKT-Aktivierung von der DNA-Schadenserkennung abhängig zu sein.

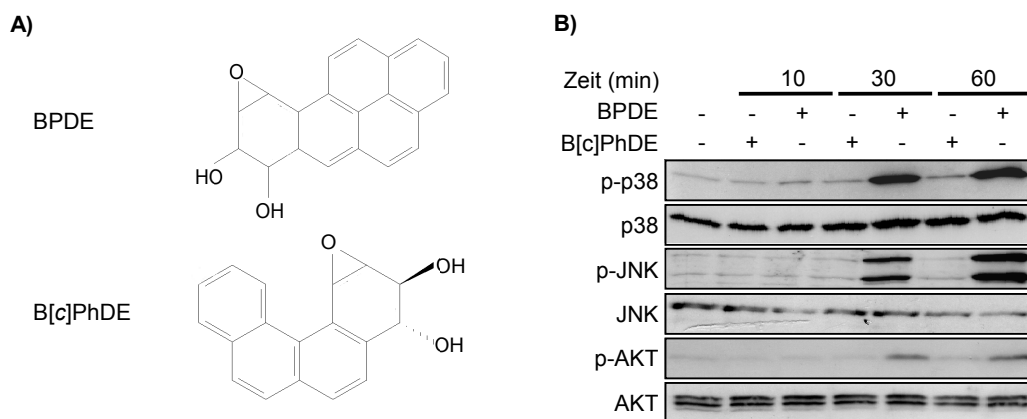


Abbildung 3.7: Die DNA-Schadenserkennung ist wichtig für die SAPK- und AKT-Aktivierung durch PAK. A) Strukturformel von BPDE und B[c]PhDE B) HeLa Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 2 μ M B[c]PhDE, 2 μ M BPDE oder 0,1 % DMSO behandelt. Die Aktivierung von p38 und JNK wurde im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern detektiert. Die geladene Gesamtproteinmenge wurde mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierte Form der Proteine bestimmt.

Welche Möglichkeiten besitzt eine Zelle, um auf DNA-Schäden zu reagieren? Eine zentrale Rolle bei der zellulären Antwort auf DNA-Schäden spielen die Proteine ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ATM- und RAD3-related*). Der ATM/ATR Signalweg ist der Hauptweg, über den die Zelle Gentoxin-induzierte Schäden detektiert. ATM und ATR sind Sensorproteine, die an der DNA-Schadenserkennung und Signalweiterleitung beteiligt sind. ATM wird vor allem nach Doppelstrangbrüchen und ATR nach Einzelstrangbrüchen (z.B. Blockierung der Replikationsgabel) aktiviert (Yang et al., 2003). Um eine Beteiligung von ATM und ATR an den durch BPDE-aktivierten intrazellulären Prozessen zu bestätigen, wurde zuerst die Aktivierung von ATM untersucht.

3.3.2 Der ATM/ATR Signalweg wird durch BPDE aktiviert, ist aber für die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung erlässlich

ATM-Phosphorylierung nach BPDE-Exposition

ATM liegt im inaktiven Zustand unphosphoryliert als Dimer im Kern vor und wird nach Aktivierung phosphoryliert und dissoziiert von seinem Partner. Als Monomer aktiviert ATM verschiedene Substrate wie H2AX oder die Checkpoint Kinase Chk2 (Harper und Elledge, 2007). Die Aktivierung von ATM wurde mit einem phosphospezifischen Antikörper in HeLa Zellen getestet. Die Zellen wurden, wie in den Versuchen zuvor, mit BPDE für unterschiedliche Zeitpunkte behandelt und die Lysate im Western Blot untersucht. Wie in Abbildung 3.8 dargestellt, wurde ATM nach BPDE-Exposition phosphoryliert. Die Zeitkinetik entsprach dabei wieder dem Muster der SAPK-Aktivierung. Infolgedessen stellte sich die Frage, ob die Aktivierung von ATM auch wichtig für die BPDE-induzierte SAPK-Phosphorylierung ist.

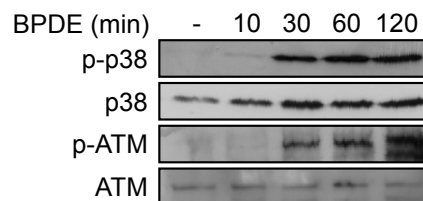


Abbildung 3.8: ATM wird nach BPDE-Gabe phosphoryliert. HeLa Zellen wurden über Nacht serumgehungert und für die angegebenen Zeitpunkte mit 2 μ M BPDE oder 0,1 % DMSO behandelt. Die Gesamtzellextrakte wurden im Western Blot mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen ATM inkubiert. Die geladene Gesamtproteinmenge wurde mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierte Form der Proteine bestimmt. Zum Vergleich wurde die Aktivierung von p38 detektiert.

Die SAPK-Aktivierung in ATM-defizienten Zellen

Um eine Beteiligung von ATM an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung zu untersuchen, wurden ATM-defiziente Fibroblasten verwendet. Ist ATM wichtig für die Phosphorylierung der SAPK, so sollte in den ATM-defizienten Fibroblasten keine Aktivierung detektierbar sein. Bei einer Exposition der ATM-defizienten Zellen mit BPDE konnte aber immer noch eine Aktivierung der p38 und JNK detektiert werden, die mit der Induktion in den Wildtyp Zellen vergleichbar war (Abb. 3.9). Die Chk2 Aktivierung war aber in den ATM-defizienten Zellen gehemmt. ATM ist demnach nicht für eine Aktivierung der p38 und JNK wichtig. Möglicherweise übernimmt aber auch das noch in den Zellen vorhandene ATR diese Aufgabe. Um eine Redundanz zwischen

ATM und ATR auszuschließen, wurden deshalb siRNA Versuche durchgeführt, in denen sowohl ATM als auch ATR gemeinsam herunterreguliert wurden.

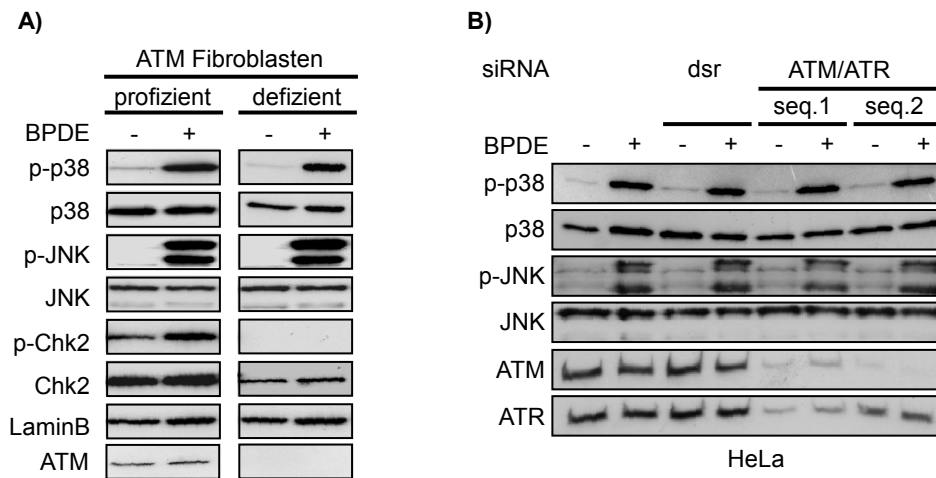


Abbildung 3.9: ATM/ATR-unabhängige Aktivierung der SAPK nach BPDE-Gabe. A) Charakterisierung der ATM-defizienten Zellen. ATM-profiziente und ATM-defiziente Zellen wurden für eine Stunde mit 2 μ M BPDE oder 0,1% DMSO behandelt. Die Gesamtzelllysate wurden im Western Blot auf die Aktivierung der dargestellten Proteine mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern untersucht. Die geladene Gesamtproteinmenge wurde mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierte Form der Proteine bzw. gegen LaminB, einem Kontrollprotein, bestimmt. B) Die Herunterregulation von ATM und ATR zeigte keinen Effekt auf die BPDE-induzierte p38- und JNK-Phosphorylierung. HeLa Zellen wurden mit siRNA gegen ATM und ATR oder einer Kontroll-siRNA (dsr) transfiziert, nach 2 Tagen über Nacht serumgehungert und am dritten Tag für eine Stunde mit 2 μ M BPDE behandelt. Die Detektion der Proteine erfolgte wie in A) beschrieben.

ATM/ATR Herunterregulation in HeLa Zellen

Zur gleichzeitigen Herunterregulation von ATM und ATR wurden die HeLa Zellen verwendet. Dabei wurden zwei unabhängige siRNA Sequenzen getestet. Die Effizienz der Herunterregulation wurde im Western Blot bestätigt. Sowohl die ATM als auch ATR-Proteinexpression war deutlich reduziert (Abb. 3.9 B). Jedoch bei Betrachtung der Phosphorylierung von p38 und JNK war erneut kein Effekt im Vergleich zu den Kontrollen zu detektieren. Die Ergebnisse demonstrieren, dass der ATM/ATR Signalweg zwar nach BPDE-Exposition aktiviert wird, aber die SAPK-Aktivierung unabhängig davon zu sein scheint.

In einem weiteren Versuch sollte zusätzlich gezeigt werden, dass eine Aktivierung des ATM/ATR Signalweges nicht unbedingt mit einer gleichzeitigen Aktivierung der SAPK einhergeht.

Die ATM/ATR-Aktivierung nach Doxorubizin bewirkt keine frühe Phosphorylierung der SAPK

Ob eine ATM/ATR-Aktivierung gleichzeitig eine Aktivierung der SAPK bewirkt, wurde mit Hilfe eines bekannten ATM/ATR-Aktivators, Doxorubizin, getestet. Das Krebsmedikament Doxorubizin ist ein Topoisomerase II Inhibitor, durch den es zu Doppelstrangbrüchen in der DNA kommt, die den ATM/ATR Signalweg aktivieren. Nach einer einstündigen Behandlung von HeLa Zellen mit Doxorubizin war eine starke Aktivierung der Chk2, aber keine Phosphorylierung von p38 und JNK zu erkennen. Erst nach späteren Zeitpunkten war ein Anstieg in der SAPK-Phosphorylierung zu detektieren. Nach 8 Stunden trat ein deutliches Signal bei p38 und JNK nach Doxorubizin-Exposition auf (Abb. 3.10 A). In ATM-defizienten Zellen ist im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen diese späte SAPK-Aktivierung nicht detektierbar (Abb. 3.10 B). Eine späte Aktivierung der SAPK wird somit durch ATM/ATR reguliert, wohingegen die frühe Aktivierung der SAPK unabhängig von ATM und ATR ist.

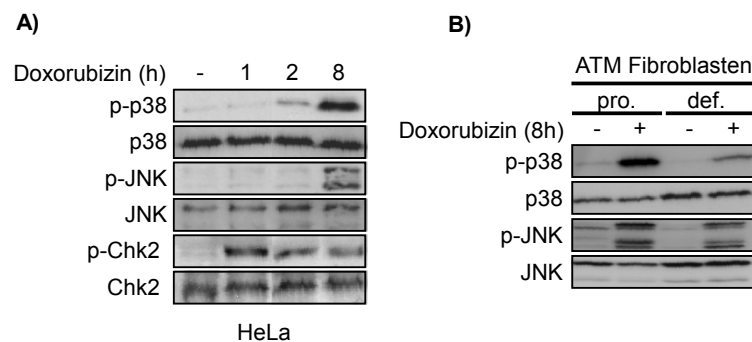


Abbildung 3.10: Eine frühe ATM/ATR-Aktivierung führt nicht zu einer Phosphorylierung von p38 und JNK. A) HeLa Zellen wurden über Nacht serumgehungert und für die angegebenen Zeitpunkte mit 10 μ M Doxorubizin oder 0,1 % DMSO behandelt. Die Aktivierung von p38, JNK und Chk2 wurde im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern detektiert. Die geladene Gesamtproteinmenge wurde mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierte Form der Proteine bestimmt. B) Zu späteren Zeitpunkten ist die SAPK Phosphorylierung ATM und ATR abhängig. ATM-profiziente (pro.) und defiziente (def.) Zellen wurden für 8 h mit 10 μ M Doxorubizin behandelt und die Lysate wie in A) beschrieben im Western Blot analysiert.

Die Rolle von p53 bei der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung

Ein weiteres Zielprotein von ATM/ATR ist p53. p53 ist das bekannteste Tumorsuppressorprotein und der zentrale Vermittler von Zellzyklusblock bzw. Apoptose nach Gentoxin-Exposition (Lavin und Gueven, 2006). ATM/ATR-Aktivierung führt zur Phosphorylierung von p53 und damit zur Aktivierung der entsprechenden Signalwe-

ge, die zum Zellzyklusblock oder Zelltod führen. Eine Stabilisierung von p53 nach 16 Stunden BPDE-Exposition konnte schon in Maushepatomzellen gezeigt werden (Schreck et al., 2009). Um auszuschließen, dass eine frühe Aktivierung von p53 nach BPDE-Exposition an der SAPK-Aktivierung beteiligt ist, wurden Versuche mit Zellen durchgeführt, die defizient für p53 sind. p53-defiziente Mausfibroblasten und die korrespondierenden Wildtyp-Zellen wurden mit BPDE für 10, 30 und 60 Minuten behandelt und im Western Blot die Aktivierung der SAPK detektiert. In den Wildtyp Zellen war eine mit den p53-defizienten Zellen vergleichbare Phosphorylierung der SAPK nachweisbar (Abb. 3.11). p53 scheint keinen Einfluss auf die BPDE-induzierte p38- und JNK-Aktivierung zu haben. Das gleiche Resultat konnte auch in humanen p53-profizienten und defizienten Kolonkarzinom-Zellen erzielt werden (mündliche Aussage N. Grico).

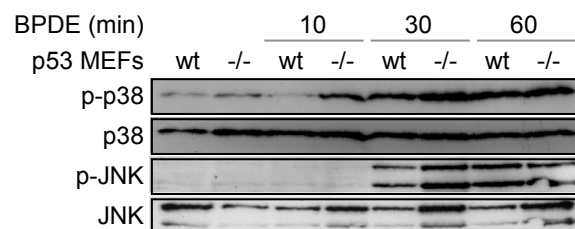


Abbildung 3.11: Die SAPK-Aktivierung nach BPDE-Exposition ist p53 unabhängig. p53-Wildtyp und defiziente (-/-) Fibroblasten wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 2 μ M BPDE oder 0,1 % DMSO behandelt und die Aktivierung von p38 und JNK im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern detektiert. Die geladene Gesamtproteinmenge wurde mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierte Form der Proteine bestimmt.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass ATM und ATR nicht an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung beteiligt sind. Zwar wird der Signalweg aktiviert, aber dies vermittelt nicht die p38- und JNK-Aktivierung. Welche weiteren DNA-Schadensabhängigen Signalwege durch BPDE aktiviert werden und ob diese wichtig für die BPDE-induzierte Aktivierung der SAPK sind, wurde als Nächstes untersucht.

3.4 Die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) ist für die Aktivierung der AKT nach BPDE-Exposition verantwortlich

ATM und ATR zählen zu PI3K-ähnlichen Kinasen, zu deren Familie auch die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) und mTor gehören. DNA-PK spielt eine Rolle bei der DNA-Schadenserkennung und Reparatur nach Doppelstrangbrüchen, weshalb die

Beteiligung dieser Kinase an der BPDE-induzierten Aktivierung der SAPK untersucht wurde.

3.4.1 Die BPDE induzierte AKT-Aktivierung ist abhängig von DNA-PK

Zunächst wurde mit einem phosphospezifischen Antikörper eine Aktivierung der DNA-PK nach BPDE-Exposition nachgewiesen. Im Western Blot war eine Phosphorylierung der DNA-PK nach 30 Minuten nachweisbar, die auch noch nach 120 Minuten persistierte (Abb. 3.12 A). Um zu testen, ob DNA-PK an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung beteiligt ist, wurde ein Inhibitor gegen DNA-PK verwendet. HeLa Zellen wurden mit dem Inhibitor vorbehandelt, anschließend mit BPDE behandelt und die Lysate analysiert. Auch in Anwesenheit des DNA-PK-Inhibitors wurden sowohl p38 als auch JNK nach BPDE-Exposition phosphoryliert. Interessanterweise aber wurde die AKT-Phosphorylierung durch den DNA-PK-Inhibitor reduziert (Abb. 3.12 B). Auch die Phosphorylierung der p70S6K, deren Aktivierung über AKT vermittelt wird, war gehemmt. Das deutet darauf hin, dass die BPDE-induzierte AKT-Aktivierung über DNA-PK vermittelt wird.

In der Literatur wurde schon beschrieben, dass DNA-Doppelstrangbruch-induzierende Agenzien über DNA-PK zu einer Aktivierung der AKT und p53 führen (Bozulich et al., 2008; Boehme et al., 2008). Die Resultate in dieser Arbeit deuten darauf hin, dass dies auch für BPDE-induzierte DNA-Schäden gelten kann. Ob dieses Ergebnis auch für andere Gentoxine gilt, die wie BPDE keine Doppelstrangbrüche induzieren, wurde durch die Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht getestet. UV-Strahlung kann in murinen Epithelialzellen über reaktive Sauerstoffspezies eine Aktivierung der AKT bewirken (Huang et al., 2001). In den HeLa Zellen konnte ebenfalls eine AKT-Phosphorylierung nach UV-Bestrahlung detektiert werden, die durch Vorbehandlung mit dem DNA-PK-Inhibitor gehemmt wurde (Abb. 3.12 B). Sowohl BPDE als auch UV-Strahlung induzieren eine DNA-PK-abhängige AKT-Phosphorylierung. Um diese Aussage weiter zu festigen, wurden noch Versuche in Zellen durchgeführt, die defizient für DNA-PK sind. Die sogenannten SCID Zellen (*severe combined immunodeficiency syndrome cells*) zeigten nach BPDE-Behandlung eine Aktivierung der p38 und JNK nicht aber von AKT (Abb. 3.12 C). Zusammengefasst zeigen diese Versuche eine DNA-PK-abhängige AKT-Aktivierung, wohingegen p38 und JNK unabhängig von DNA-PK aktiviert werden.

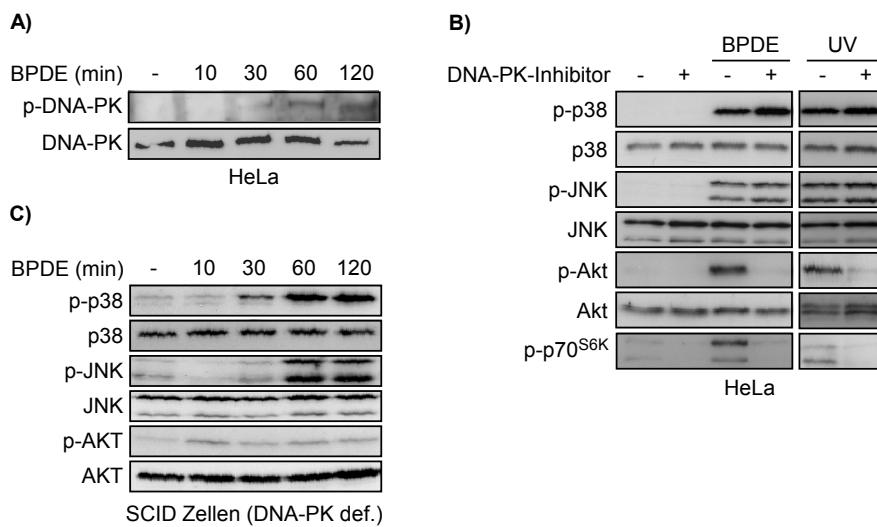


Abbildung 3.12: DNA-PK ist für die Aktivierung der AKT jedoch nicht der SAPK nach BPDE-Exposition verantwortlich. A) DNA-PK wird nach BPDE-Exposition aktiviert. HeLa Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 2 μM BPDE behandelt und die Aktivierung der betrachteten Proteine im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern detektiert. Die geladene Gesamtproteinmenge wurde mit Antikörpern gegen die nicht-phosphorylierte Form der Proteine bestimmt. B) Die BPDE-induzierte AKT-Aktivierung ist abhängig von DNA-PK. HeLa Zellen wurden mit einem Inhibitor gegen DNA-PK (10 μM) für 30 min vorbehandelt und anschließend für 60 min mit 2 μM BPDE oder 0,1 % DMSO behandelt. Die Lysate wurden im Western Blot, wie in A) beschrieben, analysiert C) DNA-PK-defiziente Zellen (SCID) wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 2 μM BPDE oder 0,1 % DMSO behandelt und anschließend die Lysate im Western Blot, wie in A) beschrieben, analysiert.

3.5 Zelluläre Konsequenzen der BPDE-induzierten Stressantwort

Welche Konsequenzen hat nun eine Aktivierung der SAPK durch BPDE? In der Literatur ist beschrieben, dass BPDE in humanen Leberkarzinomzellen (HepG2) Apoptose induziert. Nach Behandlung mit BPDE kommt es zur Cytochrom C Freisetzung in den Zellen sowie zur Spaltung von PARP und Aktivierung von proapoptotischen Proteinen (Chen et al., 2003).

Die genauen Mechanismen, welche die BPDE-induzierte Apoptose auslösen, sind aber noch ungeklärt.

3.5.1 BPDE induziert Apoptose

Um die Mechanismen der BPDE induzierten Apoptose aufzuklären, wurden humane Kolonkarzinomzellen (HCT116) verwendet. Die HCT116 Zellen sind in Bezug auf BPDE-Exposition eine relevante Zelllinie, da PAK hauptsächlich durch die Nahrung aufgenommen werden und dadurch mit Zellen des Gastrointestinaltraktes in Kontakt kommen. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass ein erhöhtes Risiko für kolorektale-Adenome durch die Aufnahme von Fleisch mit erhöhtem PAK-Gehalt besteht (Sinha et al., 2005). Die HCT116 Zellen sind auch ein gutes Modellsystem um die Apoptosevorgänge zu untersuchen, da eine p53-defiziente Zelllinie vorhanden ist, in welcher p53 durch homologe Rekombination spezifisch inaktiviert wurde.

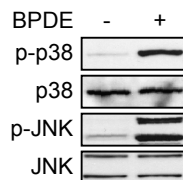


Abbildung 3.13: Die SAPK-Aktivierung nach BPDE-Exposition in HCT116 Zellen. HCT116 Zellen wurden für 60 min mit 2 μ M BPDE oder 0,1 % DMSO behandelt und die Lysate im Western Blot analysiert. Die Aktivierung der betrachteten Proteine wurde mit phosphospezifischen Antikörpern, die Gesamtproteinmenge mit Antikörpern gegen die nicht phosphorylierte Form bestimmt.

Zunächst wurde die Aktivierung der JNK und p38 in HCT116 Zellen untersucht, um sicherzugehen, dass die SAPK auch in diesem Zellsystem aktiviert werden. HCT116 Zellen reagierten, wie zuvor schon für die Hela und HepG2 Zellen gezeigt, mit einer Aktivierung der p38 und JNK nach BPDE-Exposition (Abb. 3.13). Zum Nachweis der Apoptose wurde ein Mikroskopie-basierendes Verfahren etabliert, das es erlaubt, automatisiert und in hohem Durchsatz Bilder von Zellen aufzunehmen und diese zu analysieren. Hierfür wurden die Zellen für 8 - 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen BPDE behandelt und anschließend die DNA mit einem DNA-Farbstoff (Hoechst) angefärbt. Die Färbung und Auswertung erfolgte dabei direkt mit lebenden Zellen, da Versuche mit fixierten Zellen gezeigt hatten, dass die Fixierung und die anschließenden Waschschrte zum Verlust von apoptotischen Zellen in der Kulturschale führte. Die Aufnahme der Zellen erfolgte schließlich am Mikroskop.

Apoptotische Zellen zeichnen sich durch eine sehr intensive DNA-Färbung und veränderte Zellform aus. Frühapoptotische Zellen weisen eine stark kondensierte DNA auf und sind phänotypisch klein und rund, bei spätapoptotischen Zellen sind eine Fragmentierung der DNA und Membranabschnürungen zu erkennen. In Abbildung

3.14 A sind Bilder von unbehandelten und BPDE-behandelten Zellen dargestellt. Die als apoptotisch deklarierten Zellen sind in der Vergrößerung rot umrandet. Für die Auswertung wurden 4 Bilder je Ansatz im Quadruplikat aufgenommen, wobei pro Ausschnitt ca. 50 Zellen detektiert wurden. Mit Hilfe der Software Scan®-Analysis wurden sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Anzahl an apoptotischen Zellen pro Bildausschnitt bestimmt. Die Gesamtzahl der Zellen wurde über die Kernfärbung bestimmt, die apoptotischen Zellen über die Form und die Intensität der Kernfärbung. Bei der Etablierung der mikroskopischen Auswertung von apoptotischen Zellen war eine Hauptaufgabe, Einstellungen zu finden, die nur apoptotische Zellen detektieren. Deswegen wurden zu Beginn die apoptotischen Zellen zusätzlich von Hand ausgezählt und mit den Werten der Software verglichen. Die Abweichungen zwischen computer-gestützter und von Hand ausgezählter Zellzahl war vernachlässigbar gering.

In der quantitativen Auswertung war deutlich ein zeitabhängiger und auch konzentrationsabhängiger Anstieg der apoptotischen Zellen zu erkennen. Bei Behandlung mit 0,5 μM BPDE stieg die Anzahl der apoptotischen Zellen nach 24 Stunden auf 15 %, wohingegen bei 1 und 2 μM BPDE-Behandlung schon die Hälfte aller Zellen apoptotisch waren (Abb. 3.14). Die Analyse der Gesamtzellzahl zeigte, dass ab 1 μM BPDE die Zellzahl nach 16 und 24 Stunden im Vergleich zu den Kontrollzellen verringert war (Abb. 3.14 B, rechte Seite). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen humanen (HepG2, HeLa) und murinen Zelllinien (NIH/3T3; Hepa C7) beobachtet (Daten nicht gezeigt). Es konnte somit bestätigt werden, dass BPDE Apoptose induziert.

BPDE induziert die Spaltung von PARP

Für die Apoptose ist neben Zellmorphologieveränderungen, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung auch eine Spaltung der Poly-[ADP-Ribose]-Polymerase 1 (PARP) charakteristisch. PARP wird während der Apoptose durch Caspase 3 gespalten und dadurch inaktiviert (Kaufmann et al., 1993). Eine PARP-Spaltung nach BPDE-Exposition wäre ein weiterer Hinweis darauf, dass die Zellen in Apoptose gehen. HeLa Zellen wurden hierfür für 24 Stunden mit BPDE behandelt und die Lysate im Western Blot auf gespaltene PARP analysiert. In Abbildung 3.15 ist ein repräsentativer Blot dargestellt. Der PARP-Antikörper detektiert zwei Banden. Die obere entspricht der intakten PARP, während die untere das größere Spaltprodukt repräsentiert. Es war zu erkennen, dass die untere im Vergleich zur oberen PARP-Bande nach BPDE-Behandlung zunahm. Das deutet darauf hin, dass PARP nach BPDE gespalten wird und die Zellen in Apoptose gehen. Auch andere Apoptosemarker wie Caspase 3-Spaltung werden durch BPDE aktiviert (mündliche Aussage J. Donauer).

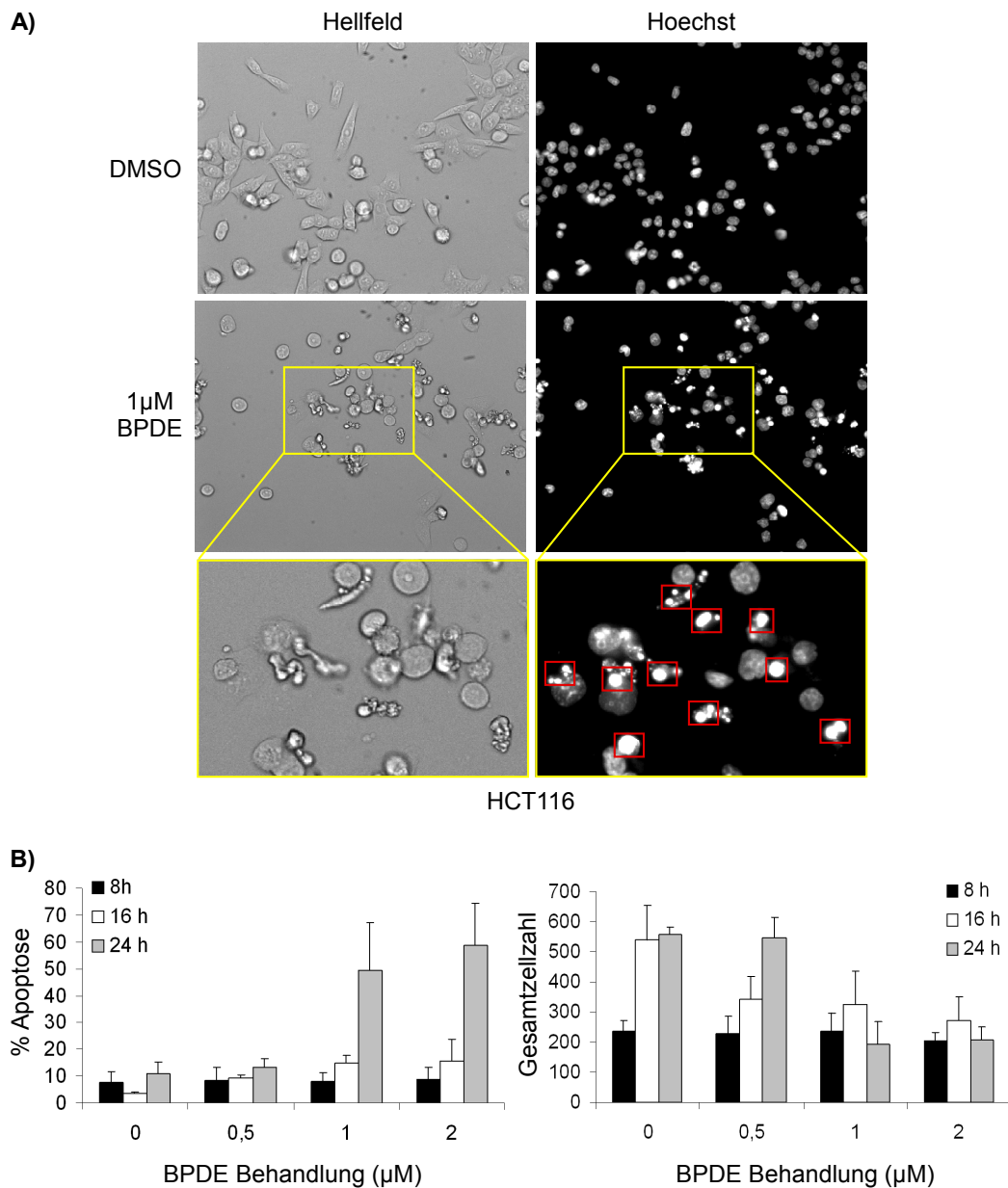


Abbildung 3.14: BPDE induziert Apoptose. A) HCT116 Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit den angegebenen Konzentrationen BPDE oder 0,1 % DMSO behandelt und die DNA mit Hoechst angefärbt. Zur bildlichen Darstellung wurde ein Olympus IX81 Mikroskop verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der Scan®-Software von Olympus. Die als apoptotisch erkannten Zellen sind in der Vergrößerung rot umrandet. Eine quantitative Analyse der apoptotischen Zellen und die Gesamtzellzahl ist in B) dargestellt.

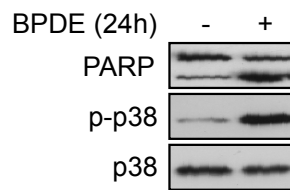


Abbildung 3.15: PARP wird nach BPDE-Gabe gespalten. HeLa Zellen wurden für 24 h mit 2 μ M BPDE oder 0,1 % DMSO behandelt und anschließend die Lysate im Western Blot mit spezifischen Antikörpern analysiert.

3.5.2 Die BPDE-induzierte Apoptose wird über p38/p53 vermittelt

Wie wird diese Apoptose nun ausgelöst? Eine zentrale Rolle bei der Apoptose spielt die Stabilisierung des Tumor-Suppressorproteins p53. Eine Stabilisierung von p53 nach BPDE-Exposition konnte in murinen Hepatomzellen bereits nachgewiesen werden. Nach 8 - 16 Stunden war eine erhöhte Proteinmenge an p53 und des Zielgens p21 im Western Blot zu detektieren (Schreck et al., 2009). Ein ähnliches Ergebnis lieferte auch die Behandlung der humanen HCT116 Zellen mit BPDE (mündliche Aussage N. Grico). In einer anderen Veröffentlichung wurde eine p53-abhängige Apoptose nach BPDE-Exposition durch eine Messung der Caspase 3/7 Aktivität in HCT116 Zellen beobachtet. In p53-defizienten HCT116 Zellen war im Vergleich zu den Wildtyp Zellen kein Anstieg der Caspase 3/7 Aktivität nach 24 Stunden BPDE-Behandlung detektierbar (Hockley et al., 2008). Um dies zu bestätigen, wurden HCT116 Wildtyp und HCT116 p53-defiziente Zellen für 24 Stunden mit BPDE behandelt und mit dem schon beschriebenen Apoptoseverfahren analysiert. Anhand der mikroskopischen Bilder war deutlich eine verringerte Apoptose in den p53-defizienten Zellen erkennbar. Die quantitative Analyse ergab, dass die p53-defizienten Zellen resistenter gegenüber Apoptose sind. Nach 24 Stunden Behandlung mit 2 μ M BPDE sind erst 30 %, im Vergleich zu 60 % der Wildtyp-Zellen, apoptotisch (Abb. 3.16). Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass p53 nach BPDE stabilisiert wird, belegen, dass p53 die BPDE-induzierte Apoptose, zumindest zum Teil, vermittelt.

Welche Rolle spielen die SAPK an der BPDE-induzierten Apoptose? SAPK sind dafür bekannt, dass sie Apoptose auslösen können. Eine Verbindung zwischen p38 und p53 wurde schon von Bulavin et al. in mit UV-Licht-bestrahlten Mammakarzinom Zellen (MCF-7) gezeigt. p38 kann p53 phosphorylieren und ist wichtig für die p53-vermittelte Apoptose (Bulavin et al., 1999). Ob auch die Aktivierung des p53-Signalweges nach BPDE und damit auch die Apoptose über p38 verläuft, sollte im Folgenden getestet werden. Hierfür wurde ein Inhibitor gegen p38 (SB203580) verwendet.

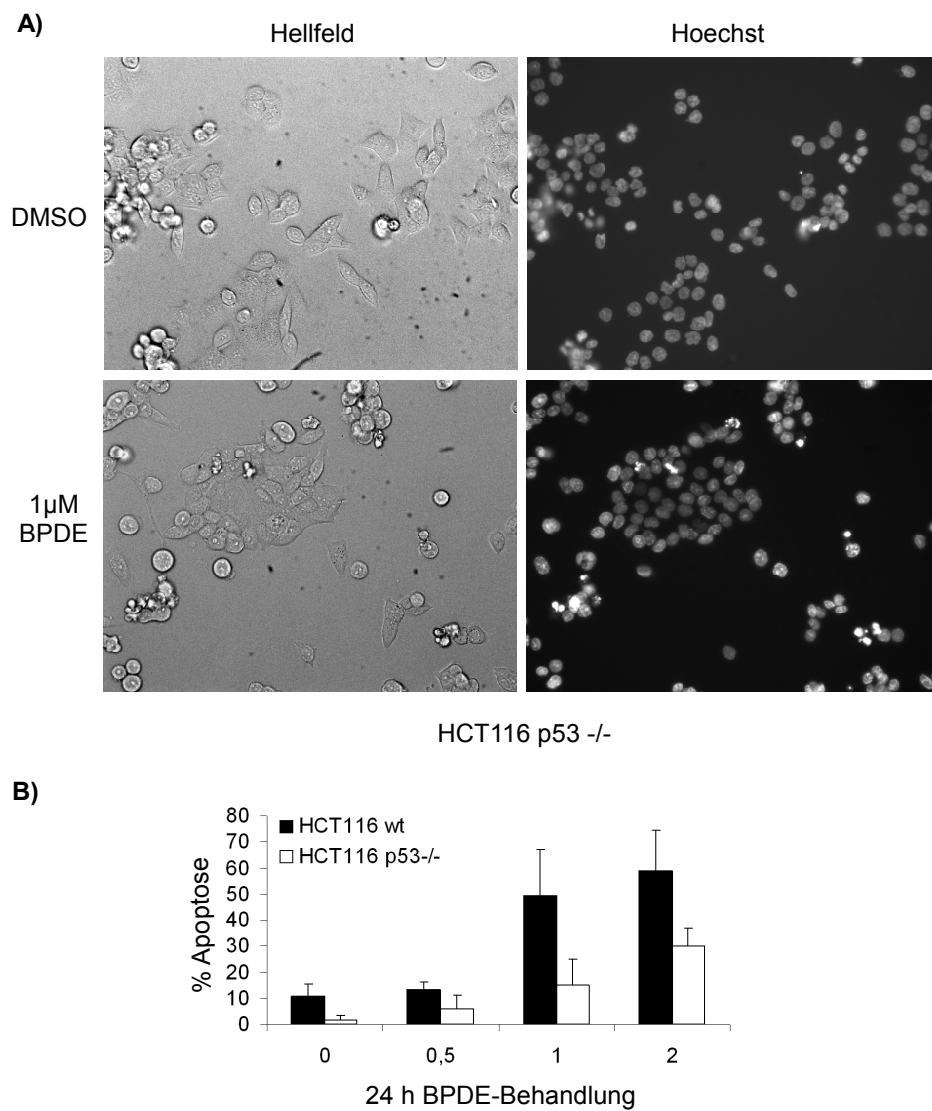


Abbildung 3.16: Die BPDE-induzierte Apoptose ist p53-vermittelt. A) HCT116 Wildtyp und p53-defiziente Zellen wurden für 24 h mit den angegebenen Konzentrationen BPDE behandelt und anschließend die DNA mit Hoechst gefärbt. Zur bildlichen Darstellung wurde ein Olympus IX81 Mikroskop verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der Scan®-Software von Olympus. Eine quantitative Analyse ist in B) dargestellt.

HCT116 Zellen wurden mit dem Inhibitor für 15 Minuten vorbehandelt, anschließend die Zellen mit BPDE für unterschiedliche Zeitpunkte behandelt und die DNA mit Hoechst angefärbt. Die quantitative Analyse der Anzahl an apoptotischen Zellen ergab, dass nach Inhibitorvorbehandlung die Apoptoserate geringer war als ohne Inhibitorvorbehandlung. Ohne Inhibitor lag der Prozentsatz der apoptotischen Zellen nach 24 h Behandlung mit 2 μ M BPDE bei 50 %, mit Inhibitor bei 15 % (Abb. 3.17 A). Im zeitlichen Verlauf ist deutlich eine Zunahme des Unterschiedes zwischen den mit und ohne Inhibitor behandelten Zellen zu erkennen. Auch konzentrationsabhängig ist dieser Effekt nachweisbar (Abb. 3.17 B). Dies deutet darauf hin, dass die BPDE-induzierte Apoptose über p38 vermittelt wird. Eine Beteiligung der JNK konnte nicht nachgewiesen werden. Eine Vorbehandlung der Zellen mit dem JNK-Inhibitor (SP600125) hatte keinen Einfluss auf die BPDE-induzierte Apoptose (Abb. 3.17). Um sicher zu sein, dass die Inhibitoren funktionell waren, wurde die Aktivierung von MAPKAP-2, einem Substrat der p38, und c-Jun, dem Substrat der JNK, im Western Blot getestet. Beide Inhibitoren konnten die BPDE-induzierte Phosphorylierung der Substrate hemmen (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend konnte demonstriert werden, dass BPDE Apoptose induziert, die über p38 und zum Teil auch über p53 vermittelt wird.

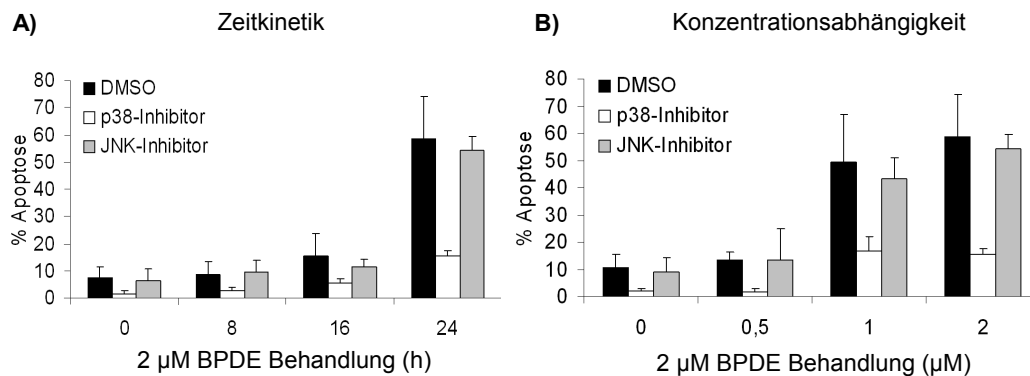


Abbildung 3.17: Die Rolle von p38 in der BPDE-induzierten Apoptose. HCT116 Zellen wurden mit dem p38-(SB203580) oder JNK-(SP600125) Inhibitor (je 25 μ M) für 30 min vorbehandelt und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen BPDE oder 0,1 % DMSO für die angegebenen Zeitpunkte behandelt. Die DNA wurde mit Hoechst angefärbt und die Zellen mit dem Olympus IX81 Mikroskop aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der Scan®-Software von Olympus. In A) ist die Zeitabhängigkeit und in B) die Konzentrationsabhängigkeit der BPDE-induzierten Apoptose dargestellt.

3.6 Etablierung eines Mikroskopie-basierenden Hochdurchsatz-Verfahrens zur Detektion der SAPK-Aktivierung

Bis jetzt wurden Inhibitorstudien und siRNA-Versuche gegen ausgewählte Signalwege bzw. Signalproteine beschrieben, von denen bekannt ist, dass sie an der SAPK-Aktivierung beteiligt sein können. Durch die Inhibitoren wurden Komponenten beteiligter Signalwege identifiziert. Da Inhibitoren aber meistens nicht spezifisch für ein Protein sind, wurde versucht mittels siRNA spezifisch einzelne Proteine der jeweiligen Signalkaskaden herunterzuregulieren. Dadurch wurde die Beteiligung von z.B. Lyn als Src-ähnliche Kinase entdeckt. Jedoch sind immer noch einige Fragen offen. Wie werden z.B. die Src-ähnlichen Kinasen aktiviert, bzw. wie wird das Signal von den Src-ähnlichen Kinasen zu den MAPK weitergeleitet? Welche anderen Proteine spielen an der BPDE-induzierten Aktivierung der SAPK eine Rolle? Um mögliche weitere Kandidaten zu identifizieren, die an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung beteiligt sind, wurde eine Methode etabliert, die es erlaubt im Hochdurchsatz genomweite siRNA-Analysen durchzuführen.

Der Einsatz der siRNA-Technologie hat in letzter Zeit starken Anklang gefunden. Mit genomweiten siRNA-Bibliotheken ist es möglich geworden, jedes Gen einzeln zu inaktivieren und so in unvoreingenommenen Analysen Komponenten von Signalkaskaden zu identifizieren. Mit einem geeigneten Protokoll kann in kürzester Zeit das gesamte Genom auf eine bestimmte Fragestellung hin durchgescannt werden. Die Fragestellung in dieser Arbeit war die Identifizierung neuer möglicher Komponenten von Signalwegen, welche an der Aktivierung von p38 nach BPDE-Exposition beteiligt sind. Dahingehend sollte ein Protokoll entwickelt werden, das zunächst die genomweite Herunterregulation von Proteinen ermöglicht und im Anschluss den Einfluss auf die BPDE-induzierte Aktivierung von p38 detektieren kann. Um ein solches Projekt durchzuführen, muss bedacht werden, dass eine genomweite siRNA-Bibliothek gegen ca. 17.000 Gene gerichtet ist und diese Proben prozessiert werden müssen. Für ein solches Hochdurchsatzverfahren (*High-throughput*) wird ein Protokoll benötigt, das im besten Falle automatisiert werden kann. Wichtige Eckpunkte bei der Durchführung sind ein einfaches und robustes Ablaufprotokoll sowie die Handhabung in kleinem Format (96-well, optimal 384-well-Format). Durch Miniaturisierung und Automatisierung können zum einen Kosten und Zeit gespart sowie eine bessere Reproduzierbarkeit erzielt werden. Die Generierung sehr großer Datenmengen bei solch einem genomweiten Verfahren stellt die Analyse und somit die Auswertung vor weitere Probleme. Daher ist ein automatisiertes Ausleseverfahren und Datenauswertung auch hierfür von Vorteil.

Eine Methode mit der viele Parameter detektiert werden können, ist die Hochdurchsatz-Mikroskopie (*high-content microscopy*). Mit Hilfe von automatisierten Mikroskopen können unterschiedlichste Eigenschaften der Zellen detektiert werden. Allein durch die Anfärbung der Kerne können schon Aussagen über die Zellzahl, den Zellzyklus oder Apoptose getroffen werden. Durch Fluoreszenz-Markierung von Proteinen können weitere Informationen auf Einzelzellebene erhalten werden.

In dieser Arbeit wurde deshalb ein mikroskopisches Ausleseverfahren angewendet. Das Prinzip hierfür basiert auf der Akkumulation der aktivierten Form von p38 im Zellkern. In Abbildung 3.18 ist die Translokation der phosphorylierten Form von p38 in den Zellkern dargestellt. Hierfür wurden die Zellen für die angegebenen Zeitpunkte mit BPDE behandelt, fixiert, permeabilisiert und anschließend die Kerntranslokation mit einem Fluoreszenz-gekoppelten phosphospezifischen Antikörper gegen p38 im Mikroskop sichtbar gemacht. Der Zellkern wurde mit DAPI angefärbt. Eine Lokalisation von aktiviertem p38 im Kern ist nach 30 Minuten zu erkennen, zeitlich gesehen korreliert diese Aktivierung mit den Ergebnissen der Proteinanalysen im Western Blot. Auch für andere p38-Aktivatoren wie H_2O_2 oder Anisomycin ist die Kerntranslokation von p38 nachweisbar (Abb. 3.19). Der Vorteil einer mikroskopischen Auswertung besteht darin, dass neben der Information zur p38-Lokalisation auch noch die Zellzahl bzw. die Toxizität der siRNA ausgewertet werden kann.

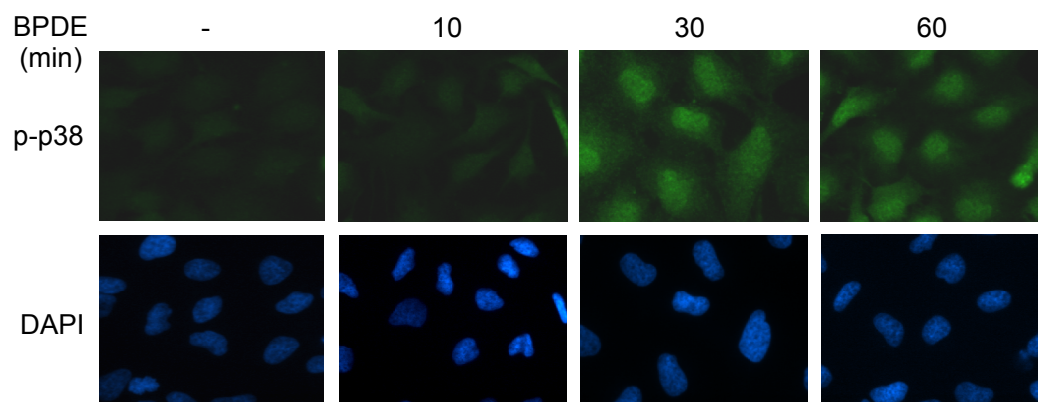


Abbildung 3.18: Aktivierte p38 akkumuliert im Kern. A) HeLa Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit 2 μM BPDE oder 0,1 % DMSO behandelt. Danach wurden die Zellen fixiert und die aktivierte Form der p38 mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Dargestellt sind repräsentative Bilder der p-p38-Lokalisation nach BPDE-Gabe.

Die Etablierung des Fluoreszenz-basierenden Protokolls wurde in 24-well Platten durchgeführt. Für das genomweite siRNA-Verfahren wurde das Protokoll auf 96- und

384-well-Format angepasst. Zusätzlich wurde das Protokoll für die siRNA-Transfektion der Zellen optimiert. Der Ablauf soll kurz dargestellt werden.

Die siRNAs liegen auf den Zellkultur-Platten vor und werden zuerst mit dem Transfektionsmedium (HiPerfect, Qiagen) versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation werden die Zellen zu dem siRNA-Transfektionsreagenzgemisch zugegeben und für zwei Tage im Brutschrank inkubiert (Reverse Transfektion). Die Zellen werden über Nacht serumgehungert und am dritten Tag für 1 Stunde mit BPDE behandelt. Anschließend erfolgt das Protokoll für die Immunfluoreszenz wie zuvor beschrieben. Die Auswertung erfolgt mit einem Mikroskop von Olympus (IX81) und der Scan@-Software.

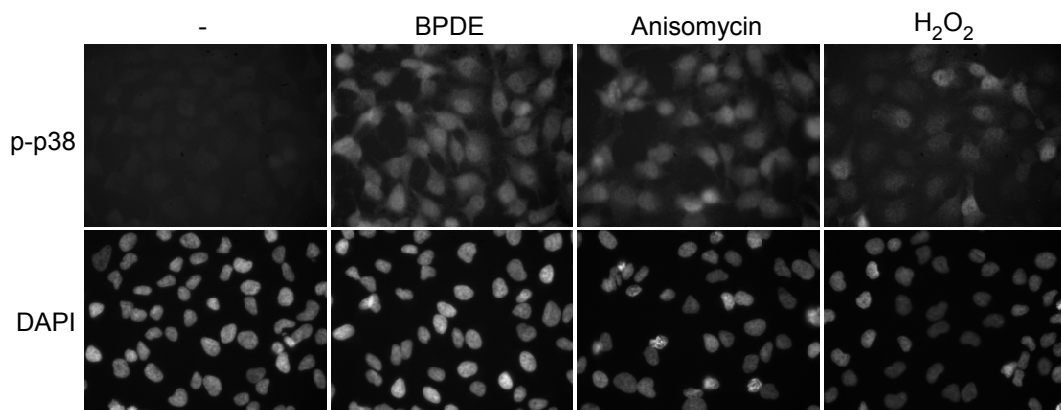


Abbildung 3.19: p38-Kerntranslokation durch verschiedene p38-Aktivatoren
HeLa Zellen wurden für 60 min mit 2 μ M BPDE oder 30 min mit 5 μ g/ml Anisomycin, 300 nM H_2O_2 oder DMSO (0,1%) behandelt, fixiert und die aktivierte Form der p38 mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Dargestellt sind repräsentative Bilder.

In Abbildung 3.20 ist die Auswertung eines Experiments dargestellt, in dem direkt p38 α herunterreguliert wurde. Ohne siRNA ist deutlich eine Aktivierung der p38 auf das 9-fache zu erkennen. Erfolgt die Herunterregulation der p38 mittels siRNA, so kann eine deutlich reduzierte Aktivierung der p38 nach BPDE-Gabe festgestellt werden. Die Effizienz der Herunterregulation wurde im Western Blot veranschaulicht (Abb. 3.20 B). Repräsentative Immunfluoreszenzbilder sind in Abbildung 3.20 A dargestellt.

Soweit wurden die einzelnen Schritte des Protokolls für das genomweite siRNA-Hochdurchsatzverfahren im 96-well-Format etabliert. Zur Handhabung des Verfahrens mit 384-well-Platten wurde eine Roboter-Plattform aufgebaut, mit deren Hilfe das Protokoll automatisiert werden sollte. Das Aussäen der Zellen auf die bereits mit siRNA und Transfektionsreagenz präparierten Platten erfolgt mit einem speziell dafür ausgerichteten Gerät (Multidrop Combi, Thermo Scientific), welches eine homogene Verteilung der Zellen in den einzelnen wells gewährleistet. Für die weiteren Ver-

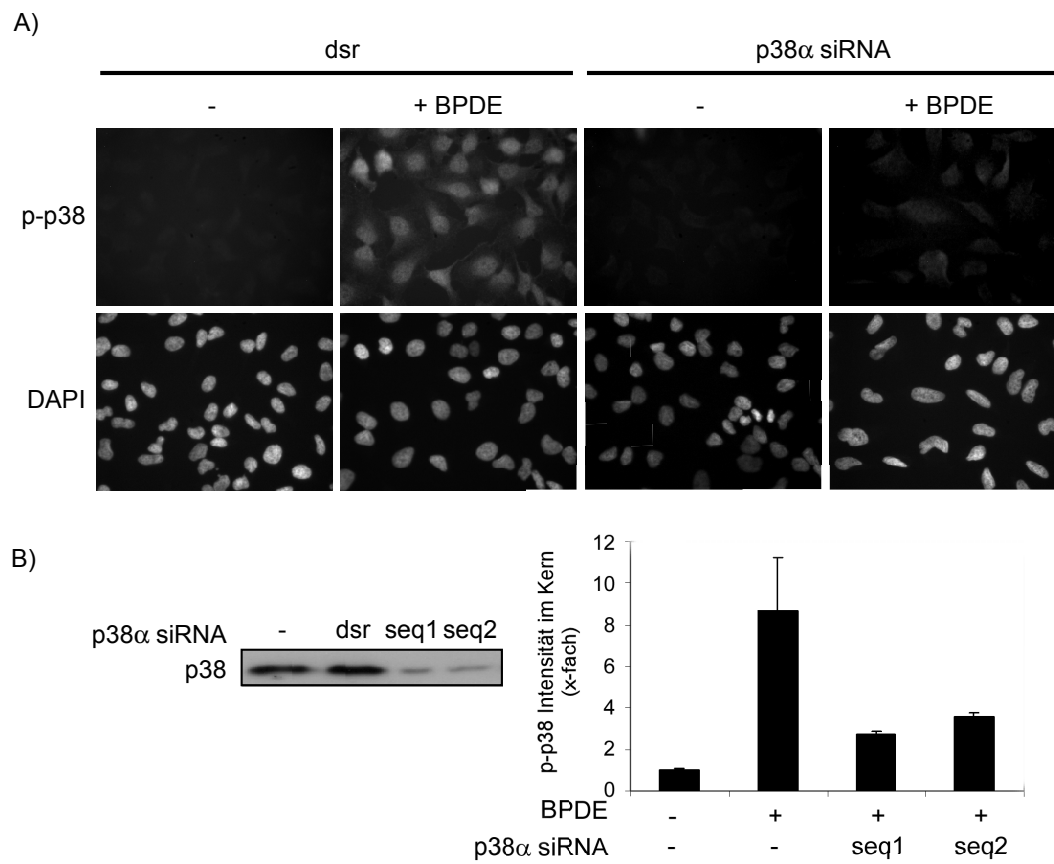


Abbildung 3.20: Quantitative Auswertung der p-p38 im Zellkern. A) HeLa Zellen wurden mit Kontroll siRNA oder siRNA gegen p38 transfiziert und nach 2 Tagen mit 2 μ M BPDE für 1 h behandelt. Danach wurden die Zellen fixiert und die aktivierte p38 mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Dargestellt sind repräsentative Bilder der p-p38 Lokalisation nach BPDE. Die Effizienz der Herunterregulation von p38 wurde im Western Blot getestet. Die Quantifizierung der nukleären p-p38 Intensität ist grafisch in B) dargestellt.

schrittweise (Behandlung der Zellen mit BPDE und das Immunfluoreszenzprotokoll) wurde eine Plattform mit einem 96-Kopf-Pipettierroboter aufgebaut, welcher die einzelnen Pipettierschritte des Protokolls, wie Fixierung, Blocken und Antikörperzugabe, übernehmen sollte. Die Waschschrte erfolgen separat an einem speziellen Platten-"Waschgerät" (ELISA-Washer). Die automatisierte Aufnahme der Bilder und Auswertung erfolgt, wie zuvor schon beschrieben, mit dem Olympus Mikroskop (IX81) und der Scan®-Analysis-Software.

Eine Hauptaufgabe bei der Etablierung des Hochdurchsatzverfahrens ist es, die einzelnen Schritte des gewünschten Protokolls auf die Plattform zu übertragen. Zum jetzigen Zeitpunkt sind die Vorbereitungen für das siRNA-Hochdurchsatzverfahren

abgeschlossen. In den folgenden Schritten soll das Protokoll auf die Plattform übertragen und die ersten Versuche mit bereits etablierten siRNAs durchgeführt werden, um den reibungslosen Ablauf der Prozesse zu testen. Nach erfolgreich durchlaufenen Testversuchen können die eigentlichen genomweiten Analysen erfolgen. Im Anschluss daran müssen die Ergebnisse analysiert und positive Treffer validiert werden.

4 Diskussion

Stress bedeutet für eine Zelle, dass das zelluläre Gleichgewicht gestört wurde. Um das Weiterleben zu gewährleisten, existieren in der Zelle deshalb Mechanismen, die auf diese Reize reagieren können. Die zelluläre Stressantwort kann sowohl durch endogene (z.B. Nährstoffmangel, reaktive Sauerstoffspezies), als auch exogene Stressfaktoren (z.B. UV- und ionisierende Strahlung oder chemische reaktive Verbindungen) ausgelöst werden. Stressfaktoren verursachen vor allem Schädigungen an Proteinen und DNA. Die Reaktion auf DNA-schädigenden Agenzien (Gentoxine) ist hinsichtlich der genomischen Stabilität und Integrität von besonderer Bedeutung. Schäden, die nicht erkannt und repariert werden, führen zu Mutationen und damit zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Kanzerogenese.

Die zelluläre Stressantwort kann allgemein in drei Stadien eingeteilt werden: Schadenserkennung, Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden und daraus resultierende Konsequenzen. Über die an der Gentoxin-induzierten zellulären Stressantwort beteiligten Signalwege und deren biologischen Antworten ist einiges bekannt. Über Signaltransduktionskaskaden wird das Stresssignal weitergeleitet, bis es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren kommt, die eine bestimmte zelluläre Antwort auslösen. Die Aktivierung der verschiedenen Signalwege führt generell entweder dazu, dass das zelluläre Überleben gesichert wird oder dass die Zelle stirbt. Vieles, was über die Gentoxin-induzierte zelluläre Stressantwort bekannt ist, ist auf Untersuchungen mit UV-Strahlung zurückzuführen. UV-Strahlung aktiviert in der Zelle mehrere Signalwege, sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern, die einen Zellzyklusblock, DNA-Reparatur, Entzündungsreaktionen aber auch den Zelltod auslösen können.

Der prominenteste Signalweg, der als Antwort auf die Exposition gegenüber Gentoxinen aktiviert wird, ist der Signalweg der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Insbesondere die MAPK p38 und JNK, auch bezeichnet als die Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK), werden durch UV-Strahlung aber auch durch andere Gentoxine wie reaktive Sauerstoffspezies, Zytostatika oder alkylierende Agenzien aktiviert (Liu et al., 1996; van Dam et al., 1995; Rosette und Karin, 1996). Trotz zahlreicher Untersuchungen sind die genauen Mechanismen der zellulären Stressantwort noch unzureichend geklärt. Die Identifizierung des primären Schadenssensors,

der zur Aktivierung der verschiedenen Signaltransduktionskaskaden führt, ist eine der Hauptaufgaben, die es zu erarbeiten gibt. Trotz der Existenz verschiedener DNA-Schadenserkennungsproteine in der Zelle, konnte bislang der primäre Signalgeber noch nicht identifiziert werden. Desweiteren konnte bis jetzt nicht beantwortet werden, wie die unterschiedlichen Signale in der Zelle in einer entsprechenden zellulären Antwort resultieren. Durch die Aktivierung verschiedener Signalwege werden auch unterschiedliche Gene exprimiert, die möglicherweise gegensätzliche Wirkung zeigen. Wovon hängt es ab, ob die Zelle z.B. weiterlebt, ein Zellzyklusblock oder Apoptose ausgelöst wird?

Diese Fragen bildeten die Grundlage für die vorliegende Arbeit. Als Modells substanz wurde das Gentoxin Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE) verwendet. BPDE ist ein Metabolit des polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffes (PAK) Benzo[a]pyren (B[a]P) und nachweislich kanzerogen. Seine Fähigkeit, als Tumorinitiator und Tumorpromoter zu agieren, wurde bereits in Maushautmodellen bewiesen, bei denen topische Applikationen von BPDE Tumorbildung auslösten (Bresnick et al., 1977; Levin et al., 1977; Slaga et al., 1979; Albert et al., 1991).

Die Untersuchungen der BPDE-induzierten Aktivierung intrazellulärer Signalwege wurde in humanen Zellen durchgeführt. Für murine Epithelialzellen konnte schon gezeigt werden, dass unter anderem die SAPK nach BPDE-Exposition aktiviert werden (Li et al., 2004a). Die humanen Zellen wurden verwendet, um zu zeigen, dass es sich bei der BPDE-induzierten zellulären Antwort um einen generellen, spezieübergreifenden Mechanismus handelt. Neben der SAPK-Aktivierung wurde zusätzlich die Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges untersucht, dessen Aktivierung in den murinen Zellen auch schon gezeigt werden konnte. Interessant sind diese beiden Signalwege vor allem hinsichtlich ihrer zellulären Konsequenzen. Die SAPK sind hauptsächlich für ihre proapoptotische Funktion bekannt, wohingegen AKT als Vermittler zellulären Überlebens gilt. Die Aufklärung der Mechanismen, wie es zur Aktivierung der beiden Signalwege kommt, gibt möglicherweise auch Auskunft über die Regulation der zellulären Antwort.

4.1 BPDE-induzierte Aktivierung intrazellulärer Signalwege

4.1.1 Die Aktivierung der SAPK ist unabhängig von der BPDE-induzierten AKT-Phosphorylierung

Eine Exposition von humanen Zervixkarzinom Zellen (HeLa) bzw. humanen Leberkarzinomzellen (HepG2) mit BPDE zeigte eine frühe Aktivierung der SAPK und der

AKT (Kapitel 3.1). In murinen Epithelialzellen (C141) wurden sowohl die MAPK p38, JNK und Erk als auch der PI3K/AKT Signalweg nach BPDE-Exposition aktiviert (Li et al., 2004a). In den humanen Zellen konnte keine Erk-Phosphorylierung detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die zeitliche Korrelation der Phosphorylierung von p38, JNK und AKT deutete auf einen möglichen Zusammenhang der beiden Signalwege hin. Für die murinen epithelialen Zellen ist bekannt, dass die Aktivierung der JNK vom PI3K/AKT Signalweg abhängt. Durch die Überexpression einer dominant-negativen AKT-Mutante konnte spezifisch die BPDE-induzierte JNK-Aktivierung, aber nicht die von Erk oder p38, geblockt werden. Um zu überprüfen, ob dies im humanen Zellsystem auch zutrifft, wurde die AKT-Phosphorylierung mit Hilfe des Inhibitors Wortmannin gehemmt. Eine Hemmung von AKT hatte aber interessanterweise weder einen Effekt auf die Aktivierung der JNK, noch auf die p38 nach BPDE-Behandlung (Abb.3.2). Um dieses Ergebnis zu untermauern, wurde zusätzlich AKT mit Hilfe von siRNA herunterreguliert und exemplarisch für die SAPK die Aktivierung der p38 nach BPDE-Gabe untersucht. Auch diese Versuche zeigten, dass die p38-Aktivierung unabhängig von der AKT-Phosphorylierung stattfindet.

AKT kann durch die PI3K aktiviert werden. Die PI3K ist ein dimeres Enzym, das aus einer katalytischen (p110) und einer regulatorischen Untereinheit (p85) besteht (Carpenter et al., 1990). Die Beteiligung der PI3K an der BPDE-induzierten SAPK- und AKT-Aktivierung wurde mittels siRNA gegen die katalytische Untereinheit p110 untersucht. Die Versuche zeigten, dass AKT auch in Abwesenheit der PI3K phosphoryliert werden kann und die p38-Aktivierung durch das Fehlen der PI3K nicht beeinträchtigt ist. Die PI3K ist demnach in den humanen Zellen nicht an der BPDE-induzierten AKT- und SAPK-Aktivierung beteiligt. Die Hemmung von AKT durch Wortmannin kann dadurch zu erklären sein, dass Wortmannin nicht nur die PI3K sondern auch die PI3K-ähnlichen Kinasen, wie die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), hemmen kann (Wipf und Halter, 2005). Die DNA-PK-abhängige AKT-Phosphorylierung nach BPDE-Exposition ist eine neue Erkenntnis dieser Arbeit, die in Abschnitt 4.2.4. noch diskutiert wird.

Diese Resultate weichen von den Ergebnissen in murinen Epithelialzellen ab, in denen eine Verbindung zwischen PI3K, AKT und JNK nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise gibt es zelltypspezifische Unterschiede in der zellulären Antwort auf BPDE. Darauf deutet auch, dass in den murinen Epithelialzellen eine Erk-Aktivierung detektiert werden konnte, aber nicht in den untersuchten humanen Zellen. Auch in Mausfibroblasten (NIH/3T3) war keine Erk-Aktivierung detektierbar und eine Hemmung der AKT-Phosphorylierung durch Wortmannin hatte keinen Einfluss auf die SAPK-Aktivierung nach BPDE-Exposition (Grico, 2007).

Zusammenfassend konnte für die humanen Zellen gezeigt werden, dass BPDE eine Aktivierung der SAPK und AKT induziert, die aber unabhängig voneinander sind. Der nächste Schritt war nun Signalkomponenten zu identifizieren, die an der Aktivierung der SAPK und AKT in den humanen Zellen beteiligt sind.

4.1.2 Die Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinasen (MAPKK) und src-ähnlichen Kinasen sind an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung beteiligt

SAPK werden über eine Signalkaskade aktiviert, wobei die SAPK durch die MAPK-Kinasen (MAPKK) dual an einem Tyrosin und Threoninrest phosphoryliert werden. Die MAPKK die p38 aktivieren sind MKK3 und MKK6 (Enslin et al., 1998). JNK wird durch SEK1 (MKK4) oder MKK7 phosphoryliert (Davis, 2000; Tournier et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die MAPKK MKK3/6 und SEK1, aber nicht MKK7 nach BPDE-Exposition aktiviert wurden und dass MKK3/6 für die Aktivierung der p38 verantwortlich war (Abb.3.4). Eine Aktivierung der SEK-1 und nicht der MKK7 passt zu Ergebnissen anderer Gruppen, die zeigen konnten, dass SEK1 hauptsächlich durch extrazelluläre Stressoren und MKK7 durch TNF α (*tumor necrosis factor*) und Zytokine aktiviert wird (Tournier et al., 2001; Weston und Davis, 2002). Da MAPKK selber auch durch MAPKK-Kinasen (MAPKKK) aktiviert werden, wäre der nächste Schritt, die beteiligten MAPKKK zu identifizieren.

Ein möglicher Kandidat für die Aktivierung der p38 nach BPDE-Exposition ist ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*). Verschiedene Stressfaktoren können ASK1 aktivieren und dadurch selektiv zu einer Phosphorylierung der p38 und JNK führen. Zu den Stressoren zählen unter anderem reaktive Sauerstoffspezies, TNF α oder Lipopolysaccharide (LPS) (Tobuime et al., 2001; Nagai et al., 2006). Interessant ist auch, dass AKT nach H₂O₂ Exposition ASK1 in Endothelzellen phosphorylieren und inaktivieren kann, wodurch die ASK1/p38 vermittelte Apoptose verhindert wird (Zhang et al. 2005). Bisher konnte aber noch keine Beteiligung von ASK1 an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung nachgewiesen werden, da der kommerziell erhältliche Antikörper in den verwendeten Zellen nicht geeignet war. Eine andere Kinase, die in Verbindung mit Gentoxin-induzierter p38-Aktivierung gebracht wird, ist TAO (*thousand and one amino acid*). Nach ionisierender und UV-Strahlung sowie nach Hydroxyharnstoff-Gabe wird TAO durch ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), einer der Hauptkinasen, die an der Signalweiterleitung nach DNA-Schäden beteiligt ist, aktiviert und vermittelt die Aktivierung der p38 (Raman et al., 2007). Neben ASK1 oder TAO können aber auch andere MAPKKK beteiligt sein.

Der Fokus dieser Arbeit lag darin, den primären Angriffspunkt und damit den Beginn der zellulären Signalkaskade, die durch BPDE aktiviert wird, zu identifizieren. Eine Proteinfamilie, die für die Übertragung extrazellulärer Signale ins Zellinnere bekannt ist, sind die Protein-Tyrosinkinasen (PTK). PTK wie der EGF-Rezeptor (*epidermal growth factor-receptor*) können durch verschiedene Genotoxine wie UV-Strahlung aktiviert werden und sind sowohl an der Kontrolle des zellulären Überlebens aber auch an der Apoptose beteiligt (Sachsenmaier et al., 1994; Warmuth et al., 1994; Knebel et al., 1996; Rosette und Karin, 1996; Schlessinger, 2000). Membranständige PTK, auch als Rezeptortyrosinkinasen (RTK) bekannt, werden über eine extrazelluläre Domäne durch Liganden aktiviert und leiten das Signal in das Zellinnere weiter. Für die Untersuchungen zur BPDE-induzierten Aktivierung der SAPK wurden die RTK schon im voraus ausgeschlossen, da in murinen Mausfibroblasten durch Inhibitorstudien schon gezeigt wurde, dass die RTK nicht an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung beteiligt sind (Grico, 2007).

Neben den RTK gibt es noch die nicht-rezeptorassoziierten Tyrosinkinasen, die im Zytoplasma lokalisiert sind. Zu den nicht-rezeptorassoziierten Tyrosinkinasen gehört die Familie der Src-ähnlichen Kinasen. Für verschiedene Stressoren wie reaktive Sauerstoffspezies, ionisierende oder UV-Strahlung konnte gezeigt werden, dass sie zu einer Aktivierung der Src-ähnlichen Kinasen führen (Sato et al., 2005; Devary et al., 1992, Yoshida et al., 2000; Sanguinetti et al., 2003). In dieser Arbeit konnte durch Inhibierung der Src-ähnlichen Kinasen mit dem Inhibitor PP1 eine Reduktion der p38- und JNK-Phosphorylierung sowohl in HeLa, als auch HepG2 Zellen erzielt werden (Abb.3.5). Die JNK Aktivierung in den HeLa Zellen war sogar vollständig gehemmt. Ähnlich verhielten sich auch die übergeordneten Kinasen. Die MKK3/6 Phosphorylierung war ähnlich wie bei p38 reduziert, während die SEK1 als übergeordnete Kinase von JNK keine Aktivierung mehr aufwies. Es konnten somit die src-ähnlichen Kinasen als Vermittler der BPDE-induzierten Aktivierung der SAPK identifiziert werden.

Zur Familie der Src-ähnlichen Kinasen gehören neun Mitgliedern: Src, Yes, Fyn, Fgr, Lck, Hck, Blk, Lyn, and Frk. Welche der Kinasen an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung beteiligt sind, wurde mit Hilfe von siRNA Experimenten untersucht. Eine Src-ähnliche Kinase, die vor allem nach DNA-Schäden aktiviert wird, ist Lyn (Kharbanda et al., 1996a; Kharbanda et al., 1994a und b; Yuan et al., 1996a). Durch die Herunterregulation von Lyn konnte die BPDE-induzierte p38- und JNK-Aktivierung zum Teil gehemmt werden (Abb.3.6). Dies lässt darauf schließen, dass die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung über Lyn vermittelt wird. Da die Phosphorylierung von p38 und JNK jedoch nicht vollständig gehemmt werden konnte, sind wahrscheinlich noch andere Proteine an dem Signalweg beteiligt.

Ein Teil der Wirkung könnte auch über eine andere Protein-Tyrosinkinase c-Abl zu erklären sein. C-Abl weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Src-ähnlichen Kinasen auf und kann auch durch den PP1-Inhibitor gehemmt werden. C-Abl wird unter anderem, ähnlich wie Lyn, durch DNA-Schäden aktiviert, so ist c-Abl z.B. an der zellulären Antwort nach Gentoxin-Exposition wie ionisierender Strahlung, MMS oder Cisplatin beteiligt. Eine Verbindung zwischen Gentoxin-induzierter c-Abl-Aktivierung und der Aktivierung der JNK konnte schon gezeigt werden (Kharbanda et al., 1995; Kharbanda et al., 1996b; Yuan et al., 1996b). In c-Abl-defizienten murinen Fibroblasten konnte im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen eine um 20 % verringerte JNK-Phosphorylierung nach BPDE-Exposition detektiert werden (Grico, 2007). In humanen Zellen wurde die Beteiligung von c-Abl noch nicht untersucht. Eine Herunterregulation von c-Abl mit siRNA könnte zeigen, ob diese Kinase eine Rolle bei der BPDE-induzierten Signalkaskade spielt. Interessant wäre auch eine gleichzeitige Herunterregulation von Lyn und c-Abl, da Lyn und c-Abl im Kern einen Komplex mit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) bilden (Kharbanda et al., 1997; Kumar et al., 1998) und möglicherweise auf diesem Weg eine zelluläre Antwort auslösen. DNA-PK gehört zu der Familie der PI3K-ähnlichen Kinasen und ist ein wichtiger Mediator der zellulären Antwort nach DNA-Schäden. Es wäre möglich, dass c-Abl und Lyn zusammen für die zelluläre Antwort nach BPDE-Exposition wichtig sind. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass der PP1-Effekt, bei dem die JNK-Aktivierung komplett gehemmt werden konnte, zum Teil durch unspezifische Hemmung von PP1 herrührt. Für PP1 konnte gezeigt werden, dass die SAPK (*Casein kinase 1*) mit den eingesetzten Konzentrationen auch gehemmt werden können (Bain et al., 2003).

4.2 Die Rolle der DNA-Schadenserkenung in der BPDE-induzierten Aktivierung intrazellulärer Signalwege

Die kanzerogene Wirkung von BPDE beruht darauf, dass BPDE aufgrund seiner reaktiven Epoxidgruppe mit der DNA interagieren kann und so zu DNA-Schäden führt. Deshalb wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass der DNA-Schaden selbst bzw. dessen Erkennung an der Aktivierung der SAPK beteiligt sein könnte. BPDE bildet an der DNA sogenannte sperrige Addukte (*bulky adducts*). Diese Addukte können sowohl die Replikation als auch Transkription der DNA stören. Schädigungen der DNA werden durch DNA-Schadenserkenungswege registriert, wodurch Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden, die meist einen Zellzyklusstop einleiten und Reparaturproteine rekrutieren, die den Schaden beheben. Ist der Schaden zu groß, kann auch der Zelltod eingeleitet werden (Kastan und Bartek, 2004; Zhou und

Elledge, 2000). Die Expression des Tumorsuppressorproteins p53 wird z.B. direkt über Strangbrüche aktiviert, wodurch es zur Expression von Proteinen kommt, die an der DNA-Reparatur und der Zellzykluskontrolle beteiligt sind (Nelson und Kastan, 1994; Adimoolam und Ford, 2003). Desweiteren gibt es Hinweise darauf, dass SAPK durch DNA-Schäden aktiviert werden können. Zelllinien, die einen Defekt in der DNA-Reparatur von Cisplatin und UV-Strahlung induzierten DNA-Schäden aufweisen, reagieren im Vergleich zu Wildtypzellen mit einer reduzierten Aktivierung der JNK (Nehme et al., 1997 und 1999). Für UV-induzierte DNA-Schäden in transkribierten Bereichen des Genoms wurde postuliert, dass JNK und die MAPK-Phosphatase 1 sowohl als Sensor, als auch Effektoren wirken können. Hierfür wurden Zellen mit Defekten in der Nukleotidexzisionsreparatur (NER), speziell der transkriptionsgekoppelten NER, verwendet (Hamdi et al., 2005). In einer anderen Studie konnte aber auch gezeigt werden, dass in Zellen, die einen Defekt in der Erkennung der globalen-genomischen NER aufweisen, nach UV-Strahlung keine Phosphorylierung der JNK mehr detektierbar war (Damrot et al., 2009). Für das alkylierende Agens MMS konnte eine späte Aktivierung der JNK mit der DNA-schädigenden Wirkung von MMS in Verbindung gebracht werden (Fritz und Kaina, 2005). Eine Verbindung zum ATM/ATR Signalweg konnte durch Exposition von ATM- und ATR-defizienten Zellen gegenüber UV-Strahlung demonstriert werden. Die Aktivierung der JNK war in diesen Zellen reduziert (Zhang et al., 2002). In p53-defizienten Zellen wird die Aktivierung der p38 über den ATM/ATR Signalweg nach Doppelstrangbrüchen vermittelt (Reinhardt et al., 2007). Aufgrund dieser Resultate und der Tatsache, dass BPDE DNA-Addukte bildet, die von der Nukleotidexzisionsreparatur erkannt und repariert werden können, wurde zunächst untersucht, ob die DNA-Schadenserkennung wichtig ist für die BPDE induzierte SAPK-Aktivierung.

4.2.1 PAK-Diolepoxid-induzierte DNA-Schäden, welche schlechter von DNA-Reparaturproteinen erkannt werden, führen zu keiner Aktivierung der SAPK und AKT

Metabolite von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK), welche die stärkste Kanzerogenität aufweisen, sind die Diolepoxide (Phillips et al., 1991). Das 3,4-Diol-1,2-Epoxid des PAK Benzo[c]phenanthren (B[c]PhDE) ist BPDE strukturell sehr ähnlich und sehr reaktiv (Abb. 3.7). B[c]PhDE bindet mit hoher Affinität an die DNA und weist in Mausmodellen ein hohes Potential an Tumorigenität auf (Levin et al. 1986; Hecht et al., 1994) Im Vergleich zu BPDE-DNA-Addukten werden aber die DNA-Schäden nach B[c]PhDE in HeLa Zellen nicht richtig durch Reparaturproteine der NER erkannt und dadurch auch nicht repariert (Buterin et al., 2000). B[c]PhDE

eignet sich deshalb gut zur Überprüfung, ob die DNA-Schadenserkenkung wichtig für die Aktivierung der SAPK nach Gentoxin-Behandlung ist. Eine Behandlung der Zellen mit B[c]PhDE zeigte im Vergleich zu BPDE keine Aktivierung der SAPK und auch die Aktivierung der AKT war in den B[c]PhDE-behandelten Proben gehemmt. Aus diesen Resultaten lässt sich schließen, dass die Aktivierung der SAPK und AKT nach BPDE-Behandlung abhängig von der DNA-Schadenserkenkung ist.

4.2.2 Die Aktivierung der SAPK nach BPDE-Exposition ist unabhängig von den DNA-Schadens-Signalproteinen ATM und ATR

Die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität einer Zelle ist wichtig im Hinblick auf die Entstehung von Krebs und anderen genetischen Erkrankungen. Die Erkennung und korrekte Reparatur von DNA-Schäden ist hierfür unerlässlich. In der Zelle existieren mehrere Signalkomplexe, die auf unterschiedliche DNA-Schäden reagieren können. Die Hauptsignalwege, die für einen Zellzyklusarrest und die Initiation von DNA-Reparatur nach DNA-Schäden verantwortlich sind, sind der ATM- und ATR- (*ATM- and RAD3 related*) Signalweg. Die Weiterleitung der Signale erfolgt für ATM vor allem über die Checkpointkinase CHK2 und für ATR über Chk1 (Bartek und Lukas, 2003; Shiloh 2003). ATM/Chk2 wird vorwiegend nach DNA-Doppelstrangbrüchen aktiviert, wohingegen ein Replikationsblock, ausgelöst durch z.B. sperrige Addukte, zur Aktivierung von ATR/Chk1 führt (Zhou und Elledge, 2000; Auclair et al., 2008). Eine Aktivierung von ATM in humanen Zellen geht mit einer Autophosphorylierung an Serin 1981 einher, wodurch sich ATM von seinem Dimerpartner löst und seine Kinase Aktivität ausführen kann (Bakkenist und Kastan, 2003). Die Aktivierung von ATM über Phosphorylierung an Serin 1981 wird bislang noch kontrovers diskutiert. Eine Substitution des Serin 1987, dem homolog in Mäusen, in Alanin verhindert nicht die Aktivierung von ATM, was darauf hindeutet, dass die ATM-Phosphorylierung eher eine Konsequenz der ATM-Aktivierung ist (Pellegrini et al., 2006). Möglicherweise gibt es aber speziesspezifische Unterschiede, welche die Diskrepanz erklären könnten.

In der vorliegenden Arbeit war in BPDE-exponierten Lysaten eine frühe Phosphorylierung von ATM an Serin 1981 zu detektieren, die mit der SAPK-Aktivierung korrelierte (Abb. 3.8). Auch die Mediatoren des ATM und ATR Signalweges, Chk1 und Chk2 wurden nach BPDE aktiviert (Daten nicht gezeigt). BPDE-Exposition führte somit zu einer Aktivierung von ATM und ATR. Die Resultate deuteten darauf hin, dass die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung von ATM und ATR abhängig sein könnte. Eine Verbindung zwischen ATM/ATR und p38 konnte kürzlich nach Doppelstrangbrüchen, induziert durch ionisierende Strahlung oder dem Chemotherapeutikum Doxorubi-

zin (Topoisomeraseinhibitor) nachgewiesen werden. In p53-defizienten Zellen wird p38/MK2 (MAPKAP Kinase-2) in Abhängigkeit von ATM und ATR nach Exposition gegenüber Doppelstrangbruch-induzierenden Agenzien aktiviert (Reinhardt et al., 2007).

Interessant sind diese Ergebnisse für die Tumorthherapie, speziell von p53-defizienten Krebszellen. In p53-profizienten Zellen wird über p53 ein Zellzyklusblock ausgelöst, der zum Überleben der Zellen führt. In p53-defizienten Zellen übernimmt diese Aufgabe p38. Die Autoren postulieren, dass durch Inhibierung des p38-Signalweges Tumore besser behandelt werden könnten, da die Nebenwirkungen möglicherweise schwächer als bei Chk1-Inhibitoren sein könnten. In einer anderen Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass in ATM-defizienten Zellen Doxorubizin im Vergleich zu den Wildtyp Zellen keine Aktivierung der p38 zu späten Zeitpunkten induziert (Raman et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl die späte Aktivierung der p38 und JNK nach Exposition gegenüber dem Zytostatikum Doxorubizin als auch die Abhängigkeit der späten SAPK-Phosphorylierung von ATM bestätigt werden (Abb. 3.10). ATM war für eine späte Aktivierung der p38 und JNK nach Doppelstrangbruch-induzierenden Agenzien verantwortlich. Dass auch die späte JNK-Phosphorylierung von ATM abhängt, ist eine neue Erkenntnis dieser Arbeit. Eine Behandlung der ATM-defizienten Zellen mit BPDE hatte jedoch keinen Effekt auf die p38- und JNK-Phosphorylierung im Vergleich zu den Wildtyp Zellen (Abb. 3.9).

Um auszuschließen, dass ATR für die verbleibende Aktivierung verantwortlich ist, wurden sowohl ATM als auch ATR gleichzeitig mit siRNA herunterreguliert. Durch die Herunterregulation beider Kinasen konnte auch die Problematik der Redundanz umgangen werden. Die Ergebnisse zeigten, dass trotz Fehlen von ATM und ATR die Aktivierung von p38 immer noch stattfinden konnte. Zwar werden ATM und ATR durch BPDE aktiviert, aber sie sind für die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung erlässlich. Interessant ist, welche Aufgabe die BPDE-induzierte Aktivierung von ATM und ATR hat. In Zellzyklusstudien konnte schon gezeigt werden, dass BPDE konzentrationsabhängig einen Chk1-vermittelten S-Phase-Block auslöst (Guo et al., 2002) und es ist sehr wahrscheinlich, dass ATM und ATR als Aktivatoren der Checkpoint-kinasen dabei eine Rolle spielen. Untersuchungen mit ATM- und ATR-defizienten Zellen, bzw. Experimente mit siRNAs gegen ATM und ATR könnten darüber Aufschluss geben.

4.2.3 Die Rolle von p53 an der frühen Aktivierung der SAPK nach BPDE-Exposition

Einer der Haupteffektoren der Signalwege, die durch DNA-Schäden aktiviert werden, ist das Tumorsuppressorprotein p53 (Harris und Levine, 2005). p53 wird nach verschiedenen genotoxischen Stimuli durch posttranslationale Modifikationen stabilisiert und vermittelt verschiedenste zelluläre Antworten, wie Zellzyklusarrest, Apoptose oder DNA-Reparatur (Lavin und Gueven, 2006; Smith und Seo, 2002). Über p21, einem Inhibitor Zyklin-abhängiger Kinasen, wird z.B. der Zellzyklusarrest in der G1-Phase ausgelöst (Harper et al., 1993). Die Expression proapoptotischer Gene wie Bax, PUMA oder Bid wird von p53 reguliert (Vousden et al., 2002) und eine Rolle von p53 bei der Regulation der Nukleotidexzisionsreparatur konnte ebenso gezeigt werden (Adimoolam und Ford, 2003). Im Zusammenhang mit MAPK ist bekannt, dass p38 p53 phosphorylieren und damit aktivieren kann (Wu, 2004). Ebenso ist p53 ein Substrat der JNK (Serge et al., 1998). Nach UV-Strahlung oder oxidativem Stress phosphoryliert JNK direkt p53 und führt dadurch zur Expression verschiedener p53 Zielgene (Wu, 2004). Eine negative Regulation von p38 über p53 konnte im Zusammenhang mit der p53-regulierten Aktivierung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen wie Wip1 (*wildtype p53-induced protein-1*) gezeigt werden. p53 wird durch p38 nach UV-Strahlung aktiviert und dadurch kommt es zu einer erhöhten Expression von Wip1. Über eine negative Rückkopplung wird p38 von Wip1 dephosphoryliert und so der Signalweg inaktiviert (Takekawa et al., 2000).

Eine positive Regulation von p38 durch p53 wurde bisher noch nicht beschrieben. Der Vergleich zwischen p53 Wildtyp und p53-defizienten Zellen in der p38-Aktivierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten könnte darüber Aufschluss geben. Zu späteren Zeitpunkten konnte eine Stabilisierung von p53 in Maushepatomzellen nach BPDE-Behandlung beobachtet werden (Schreck et al., 2007). Die späte Stabilisierung von p53 schließt aber nicht aus, dass p53 schon zu früheren Zeitpunkten an der Stressantwort beteiligt ist. p53 kann sowohl transkriptionsabhängige als auch transkriptionsunabhängige Reaktionen in der Zelle auslösen (Oren, 2003; Yee und Vousden, 2005). Transkriptionsunabhängige Reaktionen erfolgen meist direkt über Protein-Proteinwechselwirkungen. p53 interagiert z.B. mit Proteinen der NER oder Basenexzisionsreparatur (Wang et al., 1995; Offer et al., 2001). Es sollte deshalb untersucht werden, ob p53 an der frühen SAPK-Aktivierung beteiligt sein könnte. Dies wurde in p53-defizienten Mausfibroblasten untersucht. Die Phosphorylierung von JNK und p38 in den p53-defizienten Zellen war vergleichbar mit der Induktion in den korrespondierenden Wildtypzellen (Abb. 3.11). Auch in humanen Kolonkarzinomzellen konnten diese Resultate bestätigt werden (mündliche Aussage N. Grico). Das bedeutet, p53 spielt

bei der frühen Aktivierung der SAPK nach BPDE-Exposition keine Rolle, wird aber zu späteren Zeitpunkten stabilisiert und ist, worauf später noch näher eingegangen wird, an der BPDE-induzierten Apoptose beteiligt.

4.2.4 DNA-PK ist für die BPDE- und UV-induzierte Aktivierung der AKT verantwortlich

Da ATM und ATR nicht an der Aktivierung der SAPK nach BPDE-Exposition beteiligt waren, wurden weitere Signalwege, die auf DNA-Schäden reagieren, untersucht. Zu der Familie der PI3K-ähnlichen Kinasen gehört neben ATM und ATR noch die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), die eine wichtige Komponente bei der nicht-homologen Rekombination darstellt. Zu Beginn wurde untersucht, ob DNA-PK nach BPDE-Gabe aktiviert d.h. phosphoryliert wird. Eine Autophosphorylierung von DNA-PK ist wichtig für die Kinase-Aktivität. Die Experimente ergaben, dass DNA-PK nach BPDE-Exposition aktiviert wird (Abb. 3.12). Mit einem Inhibitor gegen DNA-PK und Zellen, die keine DNA-PK-Aktivität besitzen, wurde die Beteiligung von DNA-PK an der BPDE-induzierten intrazellulären Signaltransduktionskaskade getestet. Eine Inhibierung der DNA-PK-Aktivität hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von p38 und JNK nach BPDE-Gabe. Jedoch konnte die BPDE-induzierte AKT-Phosphorylierung gehemmt werden. Dieses Ergebnis konnte in SCID-Zellen (*severe combined immunodeficiency*), die einen Defekt im DNA-PK-Gen aufweisen, bestätigt werden. JNK und p38 wurden zeitabhängig aktiviert, wohingegen keine Phosphorylierung der AKT nach BPDE-Exposition zu detektieren war. Die DNA-PK ist also für die BPDE-induzierte AKT-Aktivierung verantwortlich.

Für DNA-Doppelstrangbruch induzierende Agenzien, wie ionisierende Strahlung, wurde kürzlich veröffentlicht, dass mittels DNA-PK AKT und p53 aktiviert werden (Bozulich et al., 2008; Boehme et al., 2008). Es sollte deshalb auch untersucht werden, ob in den BPDE-exponierten Zellen eine Verbindung zwischen DNA-PK und p53 nachgewiesen werden kann. DNA-PK ist dafür bekannt, dass sie durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert wird. Diese Brüche können endogenen Ursprungs sein, wie bei der V(D)J Rekombination während der Antikörperbildung und bei der meiotischen Rekombination, oder exogen durch ionisierende Strahlung entstehen (Burma und Chen, 2004). Ein Zusammenhang zwischen DNA-PK und der AKT-Aktivierung nach Gentoxinen, die Einzelstrangbrüche verursachen, wurde bisher nicht veröffentlicht. Um zu testen, ob es sich dabei um einen spezifischen Effekt gegenüber BPDE-Exposition handelt, wurden zusätzlich noch Experimente mit UV-Strahlung durchgeführt. Nach Exposition gegenüber UV-Strahlung wird AKT vor allem durch die UV-vermittelte Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies phos-

phoryliert (Huang et al., 2001) Auch für die Behandlung mit UV-Strahlung konnte gezeigt werden, dass DNA-PK für die AKT-Aktivierung wichtig ist. Somit scheint dies ein neuer Weg zu sein, über den Einzelstrangbruch-auslösende Gentoxine eine Aktivierung von AKT bewirken können.

Die vollständige Aktivierung von AKT erfordert eine duale Phosphorylierung zum einen an Serin 473 und zum anderen an Threonin 308. Thr308 wird durch PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent kinase 1*) phosphoryliert. Für Ser473 konnte gezeigt werden, dass nach gentoxischem Stimulus DNA-PK für dessen Phosphorylierung verantwortlich ist (Alessi et al., 1997; Feng et al., 2004). Es wird postuliert, dass die Phosphorylierung von Ser473 eine Voraussetzung für die Phosphorylierung von Thr308 durch PDK1 ist (Scheid et al., 2002). Der Antikörper, der in dieser Arbeit zum Nachweis der Phosphorylierung von AKT verwendet wurde, war gegen Ser473 gerichtet. Interessant wäre es, die Phosphorylierung von Thr308 und eine mögliche Verbindung zur Ser473-Phosphorylierung zu untersuchen.

Eine Aktivierung der PDK1 ist eine Voraussetzung für die anschließende Phosphorylierung von AKT. Der Verlauf der AKT-Phosphorylierung nach BPDE- oder UV-Exposition ist aber bislang noch nicht geklärt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die PDK1-Aktivität über Src und das Hsp90 (*heat shock protein*) Protein reguliert werden kann (Yang et al., 2008). Dass Src-ähnliche Kinasen an der Aktivierung BPDE-induzierter SAPK-Aktivierung beteiligt sind, konnte in dieser Arbeit schon gezeigt werden. Möglicherweise gibt es auch eine Verbindung zwischen den Src-Kinasen, PDK1 und der Aktivierung des AKT-Signalweges nach BPDE-Exposition.

4.2.5 Die Beteiligung von PARP und NER an der BPDE-induzierten zellulären Stressantwort

BPDE-induzierte AKT-Aktivierung erfolgt über das DNA-Schadenserkennungsprotein DNA-PK. Die bisher untersuchten Signalwege zeigten keinen Effekt auf die p38- und JNK-Aktivierung. Weitere Kandidaten für die DNA-Schadenserkennung nach BPDE könnten PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1) oder die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) sein. PARP wird hauptsächlich durch sogenannte "nicks"(DNA-Einzelstrangbrüche) in der DNA aktiviert, die unter anderem durch verschiedene Gentoxine, wie alkylierende Agenzien, entstehen können. Durch PARP kommt es unter Verbrauch von NAD zur poly-ADP-Ribosylierung unterschiedlicher Proteine, die unter anderem zur Rekrutierung von Reparaturproteinen, die den Schaden beseitigen, benötigt werden (de Murcia and de Murcia, 1994). Eine PARP-Antwort ist aber nur nach moderaten DNA-Schäden hilfreich für die Zelle. Eine Überaktivierung von PARP durch stark geschädigte DNA führt aufgrund des hohen Verbrauchs

an NAD zum Zelltod durch Nekrose (Ha and Snyder, 1999). Durch den Einsatz eines PARP-Inhibitors konnte die Beteiligung von PARP an der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung jedoch ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

DNA-Addukte, wie sie durch BPDE entstehen, aber auch UV-Schäden können von der NER erkannt und repariert werden. Dabei wird der geschädigte Strang erkannt, ausgeschnitten und wieder korrekt synthetisiert und ligiert. Durch das Herausschneiden der geschädigten Nukleotide entstehen Einzelstrangbrüche, die mit dem Comet-Assay, einer Methode bei der man über Einzelzellgelelektrophorese sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche detektieren kann, nachgewiesen werden können. In Mausfibroblasten korrelierte die Induktion von Einzelstrangbrüchen nach BPDE-Stimulus mit der Aktivierung der SAPK (Grico, 2007). Doppelstrangbrüche konnten hierbei nicht nachgewiesen werden. Die NER lässt sich in zwei Wege aufteilen. Die globale-genomische NER (GG-NER) und die transkriptionsgekoppelte NER (TC-NER). Unterschieden werden die beiden Wege dabei durch die Art der DNA-Schadenserkenntnis. XPC (*xeroderma pigmentosum complementation group C*) ist an der Erkennung bei der GG-NER beteiligt, CSA und CSB (*cockayne syndrome complementation group A/B*) an der TC-NER (Maillard et al., 2008). Während dieser Arbeit konnte in unserer Arbeitsgruppe in XPC-defizienten Mausfibroblasten eine verringerte SAPK-Aktivierung nach BPDE-Exposition im Vergleich zu Wildtyp Zellen nachgewiesen werden. CSA- und CSB-defiziente Mausfibroblasten dagegen zeigten im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtyp Zellen keinen Unterschied in der BPDE-induzierten SAPK-Phosphorylierung (Grico, 2007). In murinen Zellen konnte somit das DNA-Schadenserkenntnisprotein XPC als Vermittler der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung identifiziert werden.

Für humane Zellen konnte dies bis jetzt jedoch noch nicht bestätigt werden. Eine Herunterregulation von XPC mit siRNA führte zu keiner signifikanten Reduktion der SAPK-Phosphorylierung nach BPDE-Exposition (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise spielen spezieabhängige Unterschiede eine Rolle. Nach UV-Exposition wurde gezeigt, dass die NER-Regulation in humanen und murinen Zellen unterschiedlich ist. Als Grund hierfür wurden die Proteine DDB1 und DDB2 (*damage specific DNA-binding protein*) identifiziert. In humanen Zellen ist der DDB1/2 Komplex für die Erkennung von UV-induzierten Cyclobutanpyrimidindimeren (CPDs) durch XPC von zentraler Bedeutung (Fitch et al., 2003). DDB1/2 wird in murinen Zellen dagegen kaum exprimiert und die GG-NER funktioniert unabhängig davon (Tan and Chu, 2002). Bei der Suche nach Faktoren, die in humanen Zellen nach Gentoxin-Exposition beteiligt sind, sollten deshalb auch die Proteine DDB1 und DDB2 miteinbezogen werden. Experimente mit siRNA gegen DDB1 oder DDB2 demonstrierten keine verminderte Phosphorylierung der SAPK nach BPDE-Exposition (Daten nicht gezeigt).

Möglicherweise sind DDB1 und 2 nur bei der Exposition gegenüber UV-Strahlung wichtig und nicht gegenüber BPDE. Somit sind in humanen Zellen weitere bisher unbekannte Signalproteine an der BPDE-induzierten Aktivierung der SAPK beteiligt.

Zur Identifizierung von Kandidaten, die zur SAPK-Aktivierung nach BPDE-Exposition führen, wurde in dieser Arbeit ein genomweites RNAi-Verfahren entwickelt. Dadurch ist es möglich, automatisiert und im Hochdurchsatz nach Komponenten der BPDE-induzierten zellulären Stressantwort zu suchen, um ein genaueres Bild darüber zu erhalten.

4.2.6 Modell der BPDE-induzierten zellulären Antwort

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass BPDE verschiedene Signalwege in der Zelle abhängig von der DNA-Schadenserkennung aktiviert. In Abbildung 4.1 ist ein Modell der BPDE-induzierten zellulären Signalwege in humanen Zellen basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit dargestellt. Neben der Aktivierung der SAPK und AKT Signalwege, konnte eine Aktivierung des ATM/ATR Signalweges gezeigt werden. Neben ATM und ATR wurden auch die Effektorkinasen Chk1 und Chk2 nach BPDE Exposition aktiviert. Ein Zusammenhang zwischen der SAPK- und ATM/ATR-Aktivierung konnte nicht gefunden werden. Die Phosphorylierung der SAPK erfolgte über die übergeordneten MAPKK MKK3/6 und SEK1. Welche übergeordneten MAPKKK beteiligt sind, gilt es noch zu klären. Mögliche Kandidaten wären ASK1 oder TAO. Desweiteren konnte eine Beteiligung der Src-ähnlichen Kinasen, insbesondere der Kinase Lyn für die p38- und JNK-Aktivierung gefunden werden. Bis jetzt gibt es aber noch keine Hinweise darauf, wie die Src-ähnliche Kinase aktiviert wird. Lyn bildet im Zellkern einen Komplex mit c-Abl und DNA-PK und vielleicht spielen Proteininteraktionen eine Rolle bei der Aktivierung von Lyn nach BPDE-Exposition. Eine Phosphorylierung von Lyn konnte bisher nicht detektiert werden. Möglicherweise ist die angewandte Methode nicht sensitiv genug um die Phosphorylierung zu detektieren, oder die Lyn-Aktivierung ist unabhängig von der Phosphorylierung und Lyn wird als Ankerprotein benötigt.

Der primäre Signalgeber konnte in Mauszellen als DNA-Schadenserkennungsprotein der globalen-genomischen NER identifiziert werden. In humanen Zellen ist die Frage danach noch offen. Für die Aktivierung der AKT konnte DNA-PK als Initiator des Signals identifiziert werden. Diese neue Erkenntnis scheint nicht auf BPDE-Exposition beschränkt zu sein, sondern gilt auch für UV-Strahlung. UV-bestrahlte Zellen zeigten eine DNA-PK-abhängige Aktivierung der AKT. Als ein Substrat von AKT konnte zudem die Aktivierung des mTOR Signalweges gezeigt werden.

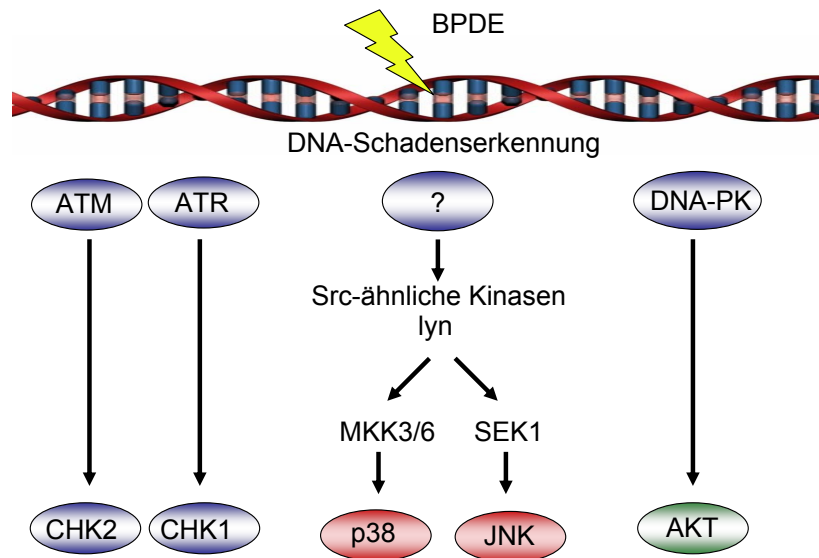


Abbildung 4.1: Modell der BPDE-induzierten Aktivierung intrazellulärer Signalwege. Nähere Erläuterungen siehe Text

4.3 Zelluläre Konsequenzen der BPDE-induzierten Phosphorylierung von p38 und JNK

Die zellulären Konsequenzen Genotoxin-induzierter Aktivierung von intrazellulären Signalwegen lassen sich generell unterteilen in Überleben, Apoptose oder Seneszenz. Im Detail kann die Aktivierung der unterschiedlichen Signalwege zur veränderter Genexpression, Zellzyklusarrest, Entzündungsreaktionen aber auch zu Proliferation, Migration und Differenzierung führen. In humanen Leberkarzinomzellen (HepG2) induziert BPDE Apoptose, charakterisiert durch Cytochrom C Freisetzung, PARP-Spaltung und Regulation von proapoptischen Proteinen der Bcl-2 Familie (Chen et al., 2003). Eine andere Möglichkeit, apoptotische Zellen zu identifizieren ist anhand ihres Phänotyps und der DNA-Fragmentierung. Phänotypisch zeichnen sich apoptotische Zellen dadurch aus, dass sie kleiner werden, Membranbläschen bilden (*“blebbing”*) und schließlich nur noch sogenannte apoptotische Körperchen übrig bleiben, die im Organismus von Makrophagen des Immunsystems phagozytiert werden. In der Zellkultur runden sich die Zellen ab und lösen sich vom Boden der Zellkulturschale. Die DNA, die sich leicht durch Fluoreszenzfarbstoffe wie DAPI oder Hoechst anfärben lässt, kondensiert und zu späteren Zeitpunkten kann die Fragmentierung unter dem Mikroskop beobachtet werden.

In dieser Arbeit wurde eine automatisierte mikroskopische Aufnahme und computer-gestützte Auswertung apoptotischer Zellen etabliert. Verschiedene murine (NIH/3T3; HepaC7) und humane Zelllinien (HCT116, HepG2, Hela) zeigten eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme an apoptotischen Zellen nach BPDE-Exposition (Abb. 3.14 und Daten nicht gezeigt). Auch eine Spaltung von PARP war nachweisbar (Abb. 3.15). Um die Mechanismen, die zur BPDE-induzierten Apoptose führen, aufzuklären, wurden die humanen Kolonkarzinomzellen (HCT116) verwendet. Die Zellen wurden deshalb gewählt, weil zum einen Zellen des Gastrointestinaltraktes durch die Nahrung am stärksten gegenüber Benzo[a]pyren exponiert werden und zum anderen, weil für diese Zellen schon Daten bezüglich der BPDE-induzierten Apoptose veröffentlicht wurden. Desweiteren existiert von dieser Zelllinie eine HCT116 p53-defiziente Zelllinie. Mit Hilfe dieser p53-defizienten Zelllinie konnte die Rolle von p53 an der BPDE-induzierten Apoptose untersucht werden. In den p53-defizienten Zellen war die Apoptose im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen reduziert, was zur Annahme führt, dass die BPDE-induzierte Apoptose zum Teil über p53 verläuft (Abb. 3.16). Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten einer anderen Arbeitsgruppe überein, die zeigen konnten, dass die p53-defizienten Zellen resistenter gegenüber BPDE-induzierter Apoptose sind. Eine Messung der Caspase 3/7-Aktivität nach BPDE-Exposition zeigte deutlich einen konzentrationsabhängigen Anstieg in den Wildtyp-Zellen nach 24 Stunden, der in den p53-defizienten Zellen nicht zu detektieren war (Hockley et al., 2008). Die Rolle von p38 in der BPDE-induzierten Apoptose wurde mit Hilfe einer Inhibitors gegen p38 untersucht. Nach Inhibitorvorbehandlung führte BPDE zu einer konzentrations- und zeitabhängigen verringerten Apoptoserate in den HCT116 Wildtyp-Zellen (Abb.3.17). Eine Inhibierung der JNK zeigte keinen Effekt auf die BPDE-induzierte Apoptoserate. Somit konnte p38 als Mediator für die BPDE-induzierte Apoptose identifiziert werden. Der Effekt der p38-Inhibierung auf die Apoptoserate war stärker als der Effekt in den p53-defizienten Zellen, was darauf schließen lässt, dass ein Teil der p38-vermittelten Apoptose p53-unabhängig erfolgt. Tatsächlich konnte eine Inhibierung der p38 in p53-defizienten Zellen die verbleibende Apoptose hemmen (Daten nicht gezeigt).

In der Literatur ist beschrieben, dass Chemotherapeutika zu einer Aktivierung von p38 führen, wodurch p53 phosphoryliert wird und damit zur Expression proapoptotischer Gene beiträgt (Sanchez-Prieto et al., 2000). Es existieren aber auch Daten, das p38 unabhängig von p53 Apoptose auslösen kann. p38 kann direkt über die Phosphorylierung proapoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie Apoptose vermitteln (Cai et al., 2006). Für die BPDE-induzierte Apoptose konnte schon gezeigt werden, dass proapoptotische Proteine der Bcl-2 Familie aktiviert werden. Mit Hilfe von p38-Inhibitorstudien in den p53-defizienten Zellen könnte die Beteiligung von p38 an der Aktivierung der Bcl-2 Proteine geklärt werden.

Desweiteren ist es interessant, welche Aufgabe die AKT-Aktivierung in Bezug auf das zelluläre Überleben hat. AKT vermittelt nicht nur nach Exposition gegenüber Wachstumsfaktoren sondern auch nach Stress das zelluläre Überleben (Marte und Downward, 1997). Die Funktion proapoptotischer Proteine, beispielsweise der Bcl-2 Proteine, wird durch AKT gehemmt (Datta et al., 1997). AKT inhibiert die Expression von proapoptotischen Genen auch auf transkriptioneller Ebene durch Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren. Eine Phosphorylierung des FoxO (*Forkhead-Class O*)-Transkriptionsfaktors beispielsweise führt zu einem Block der Transkription von FoxO-Zielgenen. Diese sind unter anderem beteiligt am Zellzyklusblock und Apoptose (Tran et al., 2003; Manning und Cantley, 2007). Die zellulären Antworten der AKT-Aktivierung sind somit für das zelluläre Überleben, die der SAPK für Apoptose verantwortlich.

Wie gelingt es der Zelle nun, diese Signale zu koordinieren und zu entscheiden, ob es zum Zelltod kommt oder nicht. Möglicherweise gibt es konzentrationsabhängig Unterschiede in der zellulären Antwort auf BPDE-Exposition. In dieser Arbeit wurde nur eine Konzentration an BPDE verwendet. Um eine Antwort darauf zu erhalten, wie die Zelle die unterschiedlichen Signale verarbeitet, sollten sowohl konzentrations- als auch zeitabhängige Untersuchungen durchgeführt werden. Möglicherweise ist der AKT Signalweg bei niedrigen Gendoxindosen verstärkt aktiv, um das zelluläre Überleben zu vermitteln, wohingegen bei höheren Konzentrationen, deren Schäden nicht mehr reparabel sind, die SAPK aktiviert werden und zu Apoptose führen.

4.3.1 Modell der zellulären Konsequenzen nach BPDE-Exposition

In Abbildung 4.2 sind die Ergebnisse der zellulären Konsequenzen nach BPDE-Exposition dargestellt. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die BPDE-induzierte Apoptose über p38 und zum Teil über p53 vermittelt und eine Beteiligung der JNK konnte dabei ausgeschlossen werden. Die Rolle der AKT wurde bereits diskutiert. Die Konsequenzen der ATM/ATR-Aktivierung wurden nicht näher untersucht. Bereits veröffentlicht wurde, dass BPDE über Chk1 einen Zellzyklusblock vermittelt (Chen und Sanchez, 2004).

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass dieser S-Phase-Block durch die Transläsionspolymerase κ aufgehoben werden konnte. In Abwesenheit der Polymerase wird der Zelltod aufgrund des Replikationsblocks über ATM/Chk2 vermittelt (Bi et al., 2005). Eine weitere zelluläre Konsequenz, auf die nicht näher eingegangen wurde, ist die Beteiligung der SAPK an der Expression inflammatorischer Genen. Entzündungsreaktionen spielen vor allem eine kritische Rolle bei der Entstehung von Krebs (Coussens

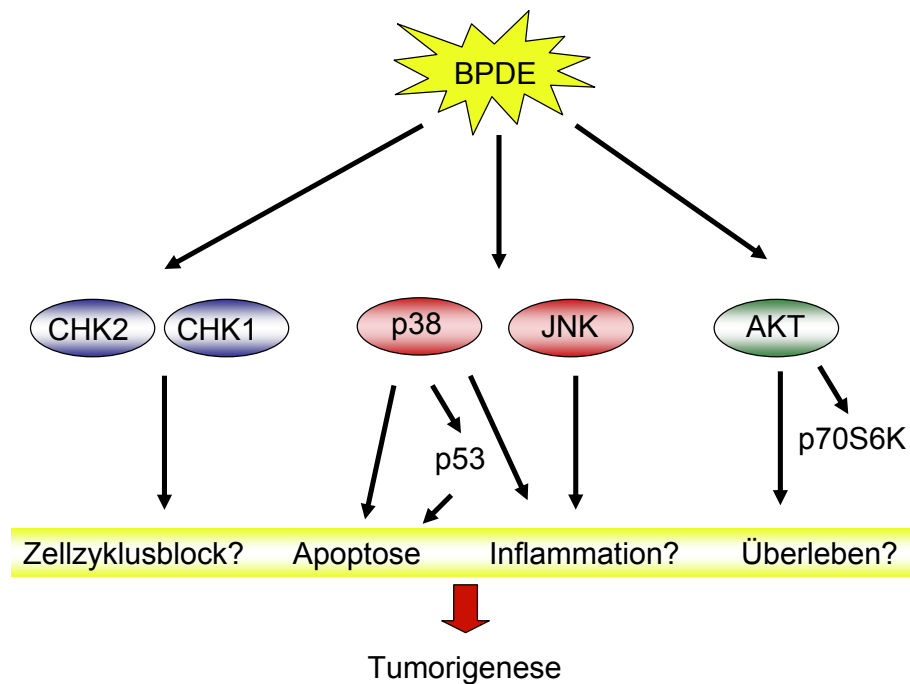


Abbildung 4.2: Modell der zellulären Konsequenzen nach BPDE Exposition in humanen Zellen. Nähere Erläuterungen siehe Text

and Werb, 2002). Als Konsequenz auf Exposition z.B. gegenüber $\text{TNF}\alpha$ oder LPS vermitteln die SAPK eine inflammatorische Antwort. Erste Experimente haben gezeigt, dass BPDE die Expression verschiedener inflammatorischer Gene, wie $\text{TNF}\alpha$, Cox-2 (Cyclooxygenase), Interleukin- 1β oder Interleukin-6 induzieren kann. Sind die SAPK an der Expression dieser Gene beteiligt, so sollte eine Vorbehandlung der Zellen mit dem p38- oder JNK-Inhibitor zu einer reduzierten Expression der inflammatorischen Gene nach BPDE-Gabe führen.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden im Zellkultursystem erzielt. Um zu zeigen, dass die Ergebnisse auch eine Relevanz für lebende Organismen hat, sollten zukünftig in vivo Studien miteinbezogen werden.

Literaturverzeichnis

- Adimoolam, Shanthi and James M Ford (2003). p53 and regulation of dna damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* 2(9): 947–954.
- Albert, R. E., M. L. Miller, T. Cody, A. Andringa, R. Shukla, and C. S. Baxter (1991). Benzo[a]pyrene-induced skin damage and tumor promotion in the mouse. *Carcinogenesis* 12(7): 1273–1280.
- Alessi, D. R., S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese, and P. Cohen (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase balpha. *Curr Biol* 7(4): 261–269.
- Auclair, Yannick, Raphael Rouget, El Bachir Affar, and Elliot A Drobetsky (2008). Atr kinase is required for global genomic nucleotide excision repair exclusively during s phase in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(46): 17896–17901.
- Bain, Jenny, Hilary McLauchlan, Matthew Elliott, and Philip Cohen (2003). The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J* 371(Pt 1): 199–204.
- Bakkenist, Christopher J and Michael B Kastan (2003). Dna damage activates atm through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421(6922): 499–506.
- Ball, Heather L, Jeremy S Myers, and David Cortez (2005). Atrip binding to replication protein a-single-stranded dna promotes atr-atrip localization but is dispensable for chk1 phosphorylation. *Mol Biol Cell* 16(5): 2372–2381.
- Bartek, Jiri and Jiri Lukas (2003). Chk1 and chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3(5): 421–429.
- Barthel, Andreas and Lars-Oliver Klotz (2005). Phosphoinositide 3-kinase signaling in the cellular response to oxidative stress. *Biol Chem* 386(3): 207–216.
- Bi, Xiaohui, Damien M Slater, Haruo Ohmori, and Cyrus Vaziri (2005). Dna polyme-

- rase kappa is specifically required for recovery from the benzo[a]pyrene-dihydrodiol epoxide (bpde)-induced s-phase checkpoint. *J Biol Chem* 280(23): 22343–22355.
- Boehme, Karen A, Roman Kulikov, and Christine Blattner (2008). p53 stabilization in response to dna damage requires akt/pkb and dna-pk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(22): 7785–7790.
- Boffetta, P., N. Jourenkova, and P. Gustavsson (1997). Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control* 8(3): 444–472.
- Bogue, M. A., C. Jhappan, and D. B. Roth (1998). Analysis of variable (diversity) joining recombination in dnadependent protein kinase (dna-pk)-deficient mice reveals dna-pk-independent pathways for both signal and coding joint formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15559–15564.
- Bolm-Audorff, U. (1996). Dose response relationship between occupational pah exposure and lung cancer—an overview. *Cent Eur J Public Health* 4 Suppl: 40.
- Bozulic, Lana, Banu Surucu, Debby Hynx, and Brian A Hemmings (2008). Pkbalpha/akt1 acts downstream of dna-pk in the dna double-strand break response and promotes survival. *Mol Cell* 30(2): 203–213.
- Bresnick, E., T. F. McDonald, H. Yagi, D. M. Jerina, W. Levin, A. W. Wood, and A. H. Conney (1977). Epidermal hyperplasia after topical application of benzo (a) pyrene, benzo (a) pyrene diol epoxides, and other metabolites. *Cancer Res* 37(4): 984–990.
- Burma, Sandeep and David J Chen (2004). Role of dna-pk in the cellular response to dna double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 3(8-9): 909–918.
- Buterin, T., M. T. Hess, N. Luneva, N. E. Geacintov, S. Amin, H. Kroth, A. Seidel, and H. Naegeli (2000). Unrepaired fjord region polycyclic aromatic hydrocarbon-dna adducts in ras codon 61 mutational hot spots. *Cancer Res* 60(7): 1849–1856.
- Cai, Beibei, Sandra H Chang, Esther B E Becker, Azad Bonni, and Zhengui Xia (2006). p38 map kinase mediates apoptosis through phosphorylation of bimel at ser-65. *J Biol Chem* 281(35): 25215–25222.
- Carpenter, C. L., B. C. Duckworth, K. R. Auger, B. Cohen, B. S. Schaffhausen, and L. C. Cantley (1990). Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver. *J Biol Chem* 265(32): 19704–19711.

- Chen, Shujuan, Nghia Nguyen, Kumiko Tamura, Michael Karin, and Robert H Tukey (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.
- Chen, Yinhuai and Yolanda Sanchez (2004). Chk1 in the dna damage response: conserved roles from yeasts to mammals. *DNA Repair (Amst)* 3(8-9): 1025–1032.
- Colburn, N. H., B. F. Former, K. A. Nelson, and S. H. Yuspa (1979). Tumour promoter induces anchorage independence irreversibly. *Nature* 281(5732): 589–591.
- Collis, Spencer J, Theodore L DeWeese, Penelope A Jeggo, and Antony R Parker (2005). The life and death of dna-pk. *Oncogene* 24(6): 949–961.
- Coulthard, Lydia R, Danielle E White, Dominic L Jones, Michael F McDermott, and Susan A Burchill (2009). p38(mapk): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends Mol Med* 15(8): 369–379.
- Coussens, Lisa M and Zena Werb (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917): 860–867.
- Cui, Xiaoping, Yaping Yu, Shikha Gupta, Young-Moon Cho, Susan P Lees-Miller, and Katheryn Meek (2005). Autophosphorylation of dna-dependent protein kinase regulates dna end processing and may also alter double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell Biol* 25(24): 10842–10852.
- Damrot, Julia, Lars Helbig, Wynand P Roos, Steve Q Barrantes, Bernd Kaina, and Gerhard Fritz (2009). Dna replication arrest in response to genotoxic stress provokes early activation of stress-activated protein kinases (sapk/jnk). *J Mol Biol* 385(5): 1409–1421.
- Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh, and M. E. Greenberg (1997). Akt phosphorylation of bad couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91(2): 231–241.
- Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the jnk group of map kinases. *Cell* 103(2): 239–252.
- de Boer, J. and J. H. Hoeijmakers (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21(3): 453–460.

- de Murcia, G. and J. Ménessier Murcia (1994). Poly(adp-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci* 19(4): 172–176.
- de Murcia, J. M., C. Niedergang, C. Trucco, M. Ricoul, B. Dutrillaux, M. Mark, F. J. Oliver, M. Masson, A. Dierich, M. LeMeur, C. Walztinger, P. Chambon, and G. Murcia (1997). Requirement of poly(adp-ribose) polymerase in recovery from dna damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(14): 7303–7307.
- Delschen, T., A. Hembrock-Heger, J. Leisner-Saabber, and D. Sopczak (1999). Verhalten von pak im system boden/pflanze. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 11(2): 79–87.
- Devary, Y., R. A. Gottlieb, T. Smeal, and M. Karin (1992). The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of src tyrosine kinases. *Cell* 71(7): 1081–1091.
- Dip, Ramiro, Ulrike Camenisch, and Hanspeter Naegeli (2004). Mechanisms of dna damage recognition and strand discrimination in human nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* 3(11): 1409–1423.
- Durkacz, B. W., O. Omidiji, D. A. Gray, and S. Shall (1980). (adp-ribose)_n participates in dna excision repair. *Nature* 283(5747): 593–596.
- Edwards, N.T. (1983). Polycyclic hydrocarbons (pahs) in the terrestrial environment. a review. *J. Environ. Qual.* 12: 427–441.
- Enslin, H., J. Raingeaud, and R. J. Davis (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.
- Fayard, Elisabeth, Lionel A Tintignac, Anne Baudry, and Brian A Hemmings (2005). Protein kinase b/akt at a glance. *J Cell Sci* 118(Pt 24): 5675–5678.
- Feng, Jianhua, Jongsun Park, Peter Cron, Daniel Hess, and Brian A Hemmings (2004). Identification of a pkb/akt hydrophobic motif ser-473 kinase as dna-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 279(39): 41189–41196.
- Fitch, Maureen E, Irina V Cross, Stephanie J Turner, Shanthi Adimoolam, Cindy X Lin, Kevin G Williams, and James M Ford (2003). The ddb2 nucleotide excision repair gene product p48 enhances global genomic repair in p53 deficient human fibroblasts. *DNA Repair (Amst)* 2(7): 819–826.

- Fuchs, S. Y., V. Adler, M. R. Pincus, and Z. Ronai (1998). Mek1/jnk signaling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10541–10546.
- Fujii-Kuriyama, Y. and J. Mimura (2005). Molecular mechanisms of ahr functions in the regulation of cytochrome p450 genes. *Biochem Biophys Res Commun* 338(1): 311–317.
- Grico, N. (2007). Regulation der Stress-aktivierten Proteinkinasen durch den genotoxischen Benzo[a]pyren-Metaboliten BPDE. Dissertation, University Mainz.
- Guo, Ning, Douglas V Faller, and Cyrus Vaziri (2002). Carcinogen-induced s-phase arrest is chk1 mediated and caffeine sensitive. *Cell Growth Differ* 13(2): 77–86.
- Ha, H. C. and S. H. Snyder (1999). Poly(adp-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by atp depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24): 13978–13982.
- Hakem, Razqallah (2008). Dna-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO J* 27(4): 589–605.
- Hamdi, Mohamed, Jaap Kool, Paulien Cornelissen-Steijger, Francoise Carlotti, Herman E Popeijus, Corina Burgt, Josephine M Janssen, Akira Yasui, Rob C Hoeben, Carrol Terleth, Leon H Mullenders, and Hans Dam (2005). Dna damage in transcribed genes induces apoptosis via the jnk pathway and the jnk-phosphatase mkp-1. *Oncogene* 24(48): 7135–7144.
- Han, J., J. D. Lee, L. Bibbs, and R. J. Ulevitch (1994). A map kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265(5173): 808–811.
- Han, Jiahuai and Peiqing Sun (2007). The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends Biochem Sci* 32(8): 364–371.
- Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 307–340.
- Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S. J. Elledge (1993). The p21 cdk-interacting protein cip1 is a potent inhibitor of g1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75(4): 805–816.
- Harper, J. Wade and Stephen J Elledge (2007). The dna damage response: ten years after. *Mol Cell* 28(5): 739–745.

- Harris, Sandra L and Arnold J Levine (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24(17): 2899–2908.
- Hecht, S. S., K. Bayoumy, A. Rivenson, and S. Amin (1994). Potent mammary carcinogenicity in female cd rats of a fjord region diol-epoxide of benzo[c]phenanthrene compared to a bay region diol-epoxide of benzo[a]pyrene. *Cancer Res* 54(1): 21–24.
- Herrlich, Peter, Michael Karin, and Carsten Weiss (2008). Supreme enlightenment: damage recognition and signaling in the mammalian uv response. *Mol Cell* 29(3): 279–290.
- Hildesheim, Jeffrey and Albert J Fornace (2004). The dark side of light: the damaging effects of uv rays and the protective efforts of map kinase signaling in the epidermis. *DNA Repair (Amst)* 3(6): 567–580.
- Hockley, Sarah L, Volker M Arlt, Gunnar Jahnke, Andrea Hartwig, Ian Giddings, and David H Phillips (2008). Identification through microarray gene expression analysis of cellular responses to benzo(a)pyrene and its diol-epoxide that are dependent or independent of p53. *Carcinogenesis* 29(1): 202–210.
- Huang, C., J. Li, M. Ding, S. S. Leonard, L. Wang, V. Castranova, V. Vallyathan, and X. Shi (2001). Uv induces phosphorylation of protein kinase b (akt) at ser-473 and thr-308 in mouse epidermal cl 41 cells through hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 276(43): 40234–40240.
- IARC (2004). Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 83: 1–1438.
- Inoki, Ken, Yong Li, Tianquan Zhu, Jun Wu, and Kun-Liang Guan (2002). Tsc2 is phosphorylated and inhibited by akt and suppresses mtor signalling. *Nat Cell Biol* 4(9): 648–657.
- Jerina, D. M., A. Chadha, A. M. Cheh, M. E. Schurdak, A. W. Wood, and J. M. Sayer (1991). Covalent bonding of bay-region diol epoxides to nucleic acids. *Adv Exp Med Biol* 283: 533–553.
- Jiang, Y., C. Chen, Z. Li, W. Guo, J. A. Gegner, S. Lin, and J. Han (1996). Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 271(30): 17920–17926.
- Jiang, Y., H. Gram, M. Zhao, L. New, J. Gu, L. Feng, F. Di Padova, R. J. Ule-

- vitch, and J. Han (1997). Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem* 272(48): 30122–30128.
- Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi (1997). Ap-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9(2): 240–246.
- Kastan, Michael B and Jiri Bartek (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432(7015): 316–323.
- Kaufmann, S. H., S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N. E. Davidson, and G. G. Poirier (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(adp-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53(17): 3976–3985.
- Kharbanda, S., A. Bharti, D. Pei, J. Wang, P. Pandey, R. Ren, R. Weichselbaum, C. T. Walsh, and D. Kufe (1996). The stress response to ionizing radiation involves c-abl-dependent phosphorylation of shptp1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(14): 6898–6901.
- Kharbanda, S., R. Ren, P. Pandey, T. D. Shafman, S. M. Feller, R. R. Weichselbaum, and D. W. Kufe (1995). Activation of the c-abl tyrosine kinase in the stress response to dna-damaging agents. *Nature* 376(6543): 785–788.
- Kharbanda, S., A. Saleem, Z. M. Yuan, S. Kraeft, R. Weichselbaum, L. B. Chen, and D. Kufe (1996). Nuclear signaling induced by ionizing radiation involves colocalization of the activated p56/p53lyn tyrosine kinase with p34cdc2. *Cancer Res* 56(16): 3617–3621.
- Kharbanda, S., Z. M. Yuan, E. Rubin, R. Weichselbaum, and D. Kufe (1994a). Activation of src-like p56/p53lyn tyrosine kinase by ionizing radiation. *J Biol Chem* 269(32): 20739–20743.
- Kharbanda, S., Z. M. Yuan, N. Taneja, R. Weichselbaum, and D. Kufe (1994b). p56/p53lyn tyrosine kinase activation in mammalian cells treated with mitomycin c. *Oncogene* 9(10): 3005–3011.
- Kharbanda, S., Z. M. Yuan, R. Weichselbaum, and D. Kufe (1997). Functional role for the c-abl protein tyrosine kinase in the cellular response to genotoxic stress. *Biochim Biophys Acta* 1333(2): O1–O7.
- Kim, M-A., H-J. Kim, H. J. Jee, A. J. Kim, Y-S. Bae, S. S. Bae, and J. Yun (2009).

- Akt2, but not akt1, is required for cell survival by inhibiting activation of jnk and p38 after uv irradiation. *Oncogene* 28(9): 1241–1247.
- Kültz, Dietmar (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol* 67: 225–257.
- Knebel, A., H. J. Rahmsdorf, A. Ullrich, and P. Herrlich (1996). Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J* 15(19): 5314–5325.
- Kolluri, S. K., C. Weiss, A. Koff, and M. Götlicher (1999). p27(kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes Dev* 13(13): 1742–1753.
- Kumar, S., P. Pandey, A. Bharti, S. Jin, R. Weichselbaum, D. Weaver, D. Kufe, and S. Kharbanda (1998). Regulation of dna-dependent protein kinase by the lyn tyrosine kinase. *J Biol Chem* 273(40): 25654–25658.
- Kumar, Sanjay, Jeffrey Boehm, and John C Lee (2003). p38 map kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2(9): 717–726.
- Kyriakis, J. M. and J. Avruch (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81(2): 807–869.
- Lamph, W. W., P. Wamsley, P. Sassone-Corsi, and I. M. Verma (1988). Induction of proto-oncogene jun/ap-1 by serum and tpa. *Nature* 334(6183): 629–631.
- Lavin, M. F. and N. Gueven (2006). The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* 13(6): 941–950.
- Lavin, M. F. and Y. Shiloh (1997). The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annu Rev Immunol* 15: 177–202.
- Lavin, Martin F, Geoff Birrell, Philip Chen, Sergei Kozlov, Shaun Scott, and Nuri Gueven (2005). Atm signaling and genomic stability in response to dna damage. *Mutat Res* 569(1-2): 123–132.
- Lee, Ji-Hoon and Tanya T Paull (2005). Atm activation by dna double-strand breaks through the mre11-rad50-nbs1 complex. *Science* 308(5721): 551–554.

- Levin, W., R. L. Chang, A. W. Wood, D. R. Thakker, H. Yagi, D. M. Jerina, and A. H. Conney (1986). Tumorigenicity of optical isomers of the diastereomeric bay-region 3,4-diol-1,2-epoxides of benzo(c)phenanthrene in murine tumor models. *Cancer Res* 46(5): 2257–2261.
- Levin, W., A. W. Wood, P. G. Wislocki, J. Kapitulnik, H. Yagi, D. M. Jerina, and A. H. Conney (1977). Carcinogenicity of benzo-ring derivatives of benzo(a)pyrene on mouse skin. *Cancer Res* 37(9): 3356–3361.
- Li, Jingxia, Haobin Chen, Moon-Shong Tang, Xianglin Shi, Shantu Amin, Dhimant Desai, Max Costa, and Chuanshu Huang (2004a). 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.
- Li, Jingxia, Moon Tang, Bingci Liu, Xianglin Shi, and Chuanshu Huang (2004b). 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, Z., Y. Jiang, R. J. Ulevitch, and J. Han (1996). The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of map kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 228(2): 334–340.
- Liang, Jiyong and Joyce M Slingerland (2003). Multiple roles of the pi3k/pkb (akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2(4): 339–345.
- Liang, Jiyong, Judit Zubovitz, Teresa Petrocelli, Rouslan Kotchetkov, Michael K Connor, Kathy Han, Jin-Hwa Lee, Sandra Ciarallo, Charles Catzavelos, Richard Beniston, Edmee Franssen, and Joyce M Slingerland (2002). Pkb/akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated g1 arrest. *Nat Med* 8(10): 1153–1160.
- Lin, A., A. Minden, H. Martinetto, F. X. Claret, C. Lange-Carter, F. Mercurio, G. L. Johnson, and M. Karin (1995). Identification of a dual specificity kinase that activates the jun kinases and p38-mpk2. *Science* 268(5208): 286–290.
- Lindahl, T. and R. D. Wood (1999). Quality control by dna repair. *Science* 286(5446): 1897–1905.
- Liu, Z. G., R. Baskaran, E. T. Lea-Chou, L. D. Wood, Y. Chen, M. Karin, and J. Y. Wang (1996). Three distinct signalling responses by murine fibroblasts to genotoxic stress. *Nature* 384(6606): 273–276.

- Los, Marek, Subbareddy Maddika, Bettina Erb, and Klaus Schulze-Osthoff (2009). Switching akt: from survival signaling to deadly response. *Bioessays* 31(5): 492–495.
- Lu, Jerry, Okkyung Rho, Erik Wilker, Linda Beltran, and John Digiovanni (2007). Activation of epidermal akt by diverse mouse skin tumor promoters. *Mol Cancer Res* 5(12): 1342–1352.
- Maddika, Subbareddy, Sudharsana Rao Ande, Emilia Wiechec, Lise Lotte Hansen, Sebastian Wesselborg, and Marek Los (2008). Akt-mediated phosphorylation of cdk2 regulates its dual role in cell cycle progression and apoptosis. *J Cell Sci* 121(Pt 7): 979–988.
- Maillard, Olivier, Ulrike Camenisch, Krastan B Blagoev, and Hanspeter Naegeli (2008). Versatile protection from mutagenic dna lesions conferred by bipartite recognition in nucleotide excision repair. *Mutat Res* 658(3): 271–286.
- Manning, Brendan D, Andrew R Tee, M. Nicole Logsdon, John Blenis, and Lewis C Cantley (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell* 10(1): 151–162.
- Marte, B. M. and J. Downward (1997). Pkb/akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem Sci* 22(9): 355–358.
- Mayo, L. D. and D. B. Donner (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway promotes translocation of mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20): 11598–11603.
- Merimsky, O. and M. Inbar (1998). Cigarette smoking and skin cancer. *Clin Dermatol* 16(5): 585–588.
- Molinete, M., W. Vermeulen, A. Bürkle, J. Ménissier Murcia, J. H. Küpper, J. H. Hoeijmakers, and G. Murcia (1993). Overproduction of the poly(adp-ribose) polymerase dna-binding domain blocks alkylation-induced dna repair synthesis in mammalian cells. *EMBO J* 12(5): 2109–2117.
- Nagai, Hiroaki, Takuya Noguchi, Kohsuke Takeda, and Hidenori Ichijo (2007). Pathophysiological roles of ask1-map kinase signaling pathways. *J Biochem Mol Biol* 40(1): 1–6.

- Namiki, Yuka and Lee Zou (2006). Atrip associates with replication protein a-coated ssdna through multiple interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(3): 580–585.
- Nebert, D. W., A. Puga, and V. Vasiliou (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.
- Nehmé, A., R. Baskaran, S. Aebi, D. Fink, S. Nebel, B. Cenni, J. Y. Wang, S. B. Howell, and R. D. Christen (1997). Differential induction of c-jun nh2-terminal kinase and c-abl kinase in dna mismatch repair-proficient and -deficient cells exposed to cisplatin. *Cancer Res* 57(15): 3253–3257.
- Nehmé, A., R. Baskaran, S. Nebel, D. Fink, S. B. Howell, J. Y. Wang, and R. D. Christen (1999). Induction of jnk and c-abl signalling by cisplatin and oxaliplatin in mismatch repair-proficient and -deficient cells. *Br J Cancer* 79(7-8): 1104–1110.
- Nelson, W. G. and M. B. Kastan (1994). Dna strand breaks: the dna template alterations that trigger p53-dependent dna damage response pathways. *Mol Cell Biol* 14(3): 1815–1823.
- Nielsen, T., H. E. Jørgensen, J. C. Larsen, and M. Poulsen (1996a). City air pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and other mutagens: occurrence, sources and health effects. *Sci Total Environ* 189-190: 41–49.
- Nielsen, T., H. E. Jørgensen, J. C. Larsen, and M. Poulsen (1996b). City air pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and other mutagens: occurrence, sources and health effects. *Sci Total Environ* 189-190: 41–49.
- Nogueira, Veronique, Youngkyu Park, Chia-Chen Chen, Pei-Zhang Xu, Mei-Ling Chen, Ivana Tonic, Terry Unterman, and Nissim Hay (2008). Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell* 14(6): 458–470.
- O’Driscoll, Mark and Penny A Jeggo (2006). The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet* 7(1): 45–54.
- Offer, H., I. Zurer, G. Banfalvi, M. Reha’k, A. Falcovitz, M. Milyavsky, N. Goldfinger, and V. Rotter (2001). p53 modulates base excision repair activity in a cell cycle-specific manner after genotoxic stress. *Cancer Res* 61(1): 88–96.
- Oliver, F. J., J. Menissier Murcia, and G. Murcia (1999). Poly(adp-ribose) polymerase

- in the cellular response to dna damage, apoptosis, and disease. *Am J Hum Genet* 64(5): 1282–1288.
- Oren, M. (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 10(4): 431–442.
- Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M. H. Cobb (2001). Mitogen-activated protein (map) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22(2): 153–183.
- Pellegrini, Manuela, Arkady Celeste, Simone Diflippantonio, Rong Guo, Weidong Wang, Lionel Feigenbaum, and André Nussenzweig (2006). Autophosphorylation at serine 1987 is dispensable for murine atm activation in vivo. *Nature* 443(7108): 222–225.
- Phillips, D. H., A. Hewer, A. Seidel, T. Steinbrecher, R. Schrode, F. Oesch, and H. Glatt (1991). Relationship between mutagenicity and dna adduct formation in mammalian cells for fjord- and bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem Biol Interact* 80(2): 177–186.
- Potter, Christopher J, Laura G Pedraza, and Tian Xu (2002). Akt regulates growth by directly phosphorylating tsc2. *Nat Cell Biol* 4(9): 658–665.
- Raman, Malavika, Svetlana Earnest, Kai Zhang, Yingming Zhao, and Melanie H Cobb (2007). Tao kinases mediate activation of p38 in response to dna damage. *EMBO J* 26(8): 2005–2014.
- Rees, E. D., P. Mandelstam, J. Q. Lowry, and H. Lipscomb (1971). A study of the mechanism of intestinal absorption of benzo(a)pyrene. *Biochim Biophys Acta* 225(1): 96–107.
- Reinhardt, H. Christian, Aaron S Aslanian, Jacqueline A Lees, and Michael B Yaffe (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.
- Rosette, C. and M. Karin (1996). Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the jnk cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* 274(5290): 1194–1197.
- Rubin, H. (2001). Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic

- hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis* 22(12): 1903–1930.
- Sachsenmaier, C., A. Radler-Pohl, R. Zinck, A. Nordheim, P. Herrlich, and H. J. Rahmsdorf (1994). Involvement of growth factor receptors in the mammalian uv response. *Cell* 78(6): 963–972.
- Saitoh, M., H. Nishitoh, M. Fujii, K. Takeda, K. Tobiume, Y. Sawada, M. Kawabata, K. Miyazono, and H. Ichijo (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ask) 1. *EMBO J* 17(9): 2596–2606.
- Sanchez-Prieto, R., J. M. Rojas, Y. Taya, and J. S. Gutkind (2000). A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 60(9): 2464–2472.
- Sanguinetti, Amy R, Haiming Cao, and Cynthia Corley Mastick (2003). Fyn is required for oxidative- and hyperosmotic-stress-induced tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *Biochem J* 376(Pt 1): 159–168.
- Sato, Mahito, Keiko Kawai-Kowase, Hiroko Sato, Yuko Oyama, Hiroyoshi Kanai, Yoshio Ohyama, Tatsuo Suga, Toshitaka Maeno, Yasuhiro Aoki, Junichi Tamura, Hiroyuki Sakamoto, Ryozi Nagai, and Masahiko Kurabayashi (2005). c-src and hydrogen peroxide mediate transforming growth factor-beta1-induced smooth muscle cell-gene expression in 10t1/2 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(2): 341–347.
- Scheid, Michael P, Paola A Marignani, and James R Woodgett (2002). Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase b. *Mol Cell Biol* 22(17): 6247–6260.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103(2): 211–225.
- Schreck, Ilona, Doreen Chudziak, Sandra Schneider, Albrecht Seidel, Karl L Platt, Franz Oesch, and Carsten Weiss (2009). Influence of aryl hydrocarbon- (ah) receptor and genotoxins on dna repair gene expression and cell survival of mouse hepatoma cells. *Toxicology* 259(3): 91–96.
- Schwarz, M., A. Buchmann, S. Stinchcombe, A. Kalkuhl, and K. Bock (2000). Ah receptor ligands and tumor promotion: survival of neoplastic cells. *Toxicol Lett* 112-113: 69–77.

- Seger, R. and E. G. Krebs (1995). The mapk signaling cascade. *FASEB J* 9(9): 726–735.
- Sekimoto, Toshihiro, Masahiro Fukumoto, and Yoshihiro Yoneda (2004). 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27(kip1). *EMBO J* 23(9): 1934–1942.
- Shiloh, Yosef (2003). Atm and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3(3): 155–168.
- Shiotani, Bunsyo and Lee Zou (2009). Atr signaling at a glance. *J Cell Sci* 122(Pt 3): 301–304.
- Sinha, Rashmi, Ulrike Peters, Amanda J Cross, Martin Kulldorff, Joel L Weissfeld, Paul F Pinsky, Nathaniel Rothman, and Richard B Hayes (2005). Meat, meat cooking methods and preservation, and risk for colorectal adenoma. *Cancer Res* 65(17): 8034–8041.
- Slaga, T. J., W. J. Bracken, G. Gleason, W. Levin, H. Yagi, D. M. Jerina, and A. H. Conney (1979). Marked differences in the skin tumor-initiating activities of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo(a)pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides. *Cancer Res* 39(1): 67–71.
- Slaga, T. J., S. M. Fischer, K. Nelson, and G. L. Gleason (1980). Studies on the mechanism of skin tumor promotion: evidence for several stages in promotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(6): 3659–3663.
- Smith, G. C., N. Divecha, N. D. Lakin, and S. P. Jackson (1999). Dna-dependent protein kinase and related proteins. *Biochem Soc Symp* 64: 91–104.
- Smith, L. E., M. F. Denissenko, W. P. Bennett, H. Li, S. Amin, M. Tang, and G. P. Pfeifer (2000). Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst* 92(10): 803–811.
- Smith, Martin L and Young R Seo (2002). p53 regulation of dna excision repair pathways. *Mutagenesis* 17(2): 149–156.
- Straif, Kurt, Robert Baan, Yann Grosse, Béatrice Secretan, Fatiha El Ghissassi, Vincent Coglianò, and W. H. O. International Agency Cancer Monograph Working Group (2005). Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Lancet Oncol* 6(12): 931–932.

- Takekawa, M., M. Adachi, A. Nakahata, I. Nakayama, F. Itoh, H. Tsukuda, Y. Taya, and K. Imai (2000). p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 mapk-p53 signaling in response to uv radiation. *EMBO J* 19(23): 6517–6526.
- Tan, Thomas and Gilbert Chu (2002). p53 binds and activates the xeroderma pigmentosum ddb2 gene in humans but not mice. *Mol Cell Biol* 22(10): 3247–3254.
- Tobiume, K., A. Matsuzawa, T. Takahashi, H. Nishitoh, K. Morita, K. Takeda, O. Minowa, K. Miyazono, T. Noda, and H. Ichijo (2001). Ask1 is required for sustained activations of jnk/p38 map kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2(3): 222–228.
- Tournier, C., C. Dong, T. K. Turner, S. N. Jones, R. A. Flavell, and R. J. Davis (2001). Mkk7 is an essential component of the jnk signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev* 15(11): 1419–1426.
- Tran, Hien, Anne Brunet, Eric C Griffith, and Michael E Greenberg (2003). The many forks in foxo's road. *Sci STKE* 2003(172): RE5.
- Tschopp, Oliver, Zhong-Zhou Yang, Daniela Brodbeck, Bettina A Dummmler, Maja Hemmings-Mieszczak, Takashi Watanabe, Thomas Michaelis, Jens Frahm, and Brian A Hemmings (2005). Essential role of protein kinase b gamma (pkb gamma/akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 132(13): 2943–2954.
- van Dam, H., D. Wilhelm, I. Herr, A. Steffen, P. Herrlich, and P. Angel (1995). Atf-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J* 14(8): 1798–1811.
- Vivanco, Igor and Charles L Sawyers (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase akt pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2(7): 489–501.
- Vousden, Karen H and Xin Lu (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2(8): 594–604.
- Wang, X. W., H. Yeh, L. Schaeffer, R. Roy, V. Moncollin, J. M. Egly, Z. Wang, E. C. Freidberg, M. K. Evans, and B. G. Taffe (1995). p53 modulation of tfiih-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet* 10(2): 188–195.
- Weiss, C., D. Faust, I. Schreck, A. Ruff, T. Farwerck, A. Melenberg, S. Schneider, B. Oesch-Bartlomowicz, J. Zatloukalová, J. Vondráček, F. Oesch, and C. Dietrich

- (2008). Tcdd deregulates contact inhibition in rat liver oval cells via ah receptor, jun and cyclin a. *Oncogene* 27(15): 2198–2207.
- Weiss, C., S. K. Kolluri, F. Kiefer, and M. Göttlicher (1996). Complementation of ah receptor deficiency in hepatoma cells: negative feedback regulation and cell cycle control by the ah receptor. *Exp Cell Res* 226(1): 154–163.
- Weiss, Carsten, Dagmar Faust, Heike Dürk, Siva Kumar Kolluri, Anke Pelzer, Sandra Schneider, Cornelia Dietrich, Franz Oesch, and Martin Göttlicher (2005). Tcdd induces c-jun expression via a novel ah (dioxin) receptor-mediated p38-mapk-dependent pathway. *Oncogene* 24(31): 4975–4983.
- Weston, Claire R and Roger J Davis (2002). The jnk signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev* 12(1): 14–21.
- Weston, Claire R and Roger J Davis (2007). The jnk signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 19(2): 142–149.
- Wipf, Peter and Robert J Halter (2005). Chemistry and biology of wortmannin. *Org Biomol Chem* 3(11): 2053–2061.
- Wu, Gen Sheng (2004). The functional interactions between the p53 and mapk signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 3(2): 156–161.
- Yamamoto, Yukio, Rick Moore, Thomas L Goldsworthy, Masahiko Negishi, and Robert R Maronpot (2004). The orphan nuclear receptor constitutive active/androstane receptor is essential for liver tumor promotion by phenobarbital in mice. *Cancer Res* 64(20): 7197–7200.
- Yang, Jun, Yingnian Yu, Hope E Hamrick, and Penelope J Duerksen-Hughes (2003). Atm, atr and dna-pk: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* 24(10): 1571–1580.
- Yang, Keum-Jin, Sanghee Shin, Longzhen Piao, Eulsoon Shin, Yuwen Li, Kyeong Ah Park, Hee Sun Byun, Minho Won, Janghee Hong, Gi Ryang Kweon, Gang Min Hur, Jeong Ho Seok, Taehoon Chun, Derek P Brazil, Brian A Hemmings, and Jongsun Park (2008). Regulation of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (pdk1) by src involves tyrosine phosphorylation of pdk1 and src homology 2 domain binding. *J Biol Chem* 283(3): 1480–1491.

- Yee, Karen S and Karen H Vousden (2005). Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis* 26(8): 1317–1322.
- Yoshida, K., R. Weichselbaum, S. Kharbanda, and D. Kufe (2000). Role for lyn tyrosine kinase as a regulator of stress-activated protein kinase activity in response to dna damage. *Mol Cell Biol* 20(15): 5370–5380.
- Yuan, Z. M., Y. Huang, M. M. Fan, C. Sawyers, S. Kharbanda, and D. Kufe (1996). Genotoxic drugs induce interaction of the c-abl tyrosine kinase and the tumor suppressor protein p53. *J Biol Chem* 271(43): 26457–26460.
- Yuan, Z. M., S. Kharbanda, and D. Kufe (1995). 1-beta-d-arabinofuranosylcytosine activates tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and its association with the src-like p56/p53lyn kinase in human myeloid leukemia cells. *Biochemistry* 34(14): 4908.
- Zhang, Rong, Dianhong Luo, Robert Miao, Lanfang Bai, Qingyuan Ge, William C Sessa, and Wang Min (2005). Hsp90-akt phosphorylates ask1 and inhibits ask1-mediated apoptosis. *Oncogene* 24(24): 3954–3963.
- Zhang, Y., F. Yuan, X. Wu, O. Rechkoblit, J. S. Taylor, N. E. Geacintov, and Z. Wang (2000a). Error-prone lesion bypass by human dna polymerase eta. *Nucleic Acids Res* 28(23): 4717–4724.
- Zhang, Y., F. Yuan, X. Wu, M. Wang, O. Rechkoblit, J. S. Taylor, N. E. Geacintov, and Z. Wang (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. and S. J. Elledge (2000). The dna damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408(6811): 433–439.
- Zou, Lee and Stephen J Elledge (2003). Sensing dna damage through atrip recognition of rpa-ssdna complexes. *Science* 300(5625): 1542–1548.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Metabolismus von B(a)P	5
1.2	MAPK-Signalweg	8
1.3	AKT-Signalweg	11
1.4	Mechanismen der DNA-Schadenserkennung	12
2.1	Darstellung der Kernmaske	27
2.2	Apoptotische Zellen	28
3.1	p38 und JNK werden durch BPDE in humanen Zellen aktiviert.	31
3.2	BPDE aktiviert den SAPK-Signalweg unabhängig vom AKT-Signalweg.	32
3.3	Der mTor-Signalweg wird nach BPDE-Behandlung aktiviert	34
3.4	BPDE aktiviert die MAPKK MKK3/6 und SEK1 aber nicht MKK7	35
3.5	Src-ähnliche Kinasen sind an der BPDE- induzierten SAPK-Aktivierung beteiligt	36
3.6	Eine Herunterregulation von Lyn reduziert die durch BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung	37
3.7	Die DNA-Schadenserkennung ist wichtig für die SAPK- und AKT- Aktivierung durch PAK.	39
3.8	ATM wird nach BPDE-Gabe phosphoryliert	40
3.9	ATM/ATR-unabhängige Aktivierung der SAPK nach BPDE-Gabe	41
3.10	Eine frühe ATM/ATR-Aktivierung führt nicht zu einer Phosphorylie- rung von p38 und JNK	42
3.11	Die SAPK-Aktivierung nach BPDE-Exposition ist p53 unabhängig	43
3.12	DNA-PK ist für die Aktivierung der AKT jedoch nicht der SAPK nach BPDE-Exposition verantwortlich	45
3.13	Die SAPK-Aktivierung nach BPDE-Exposition in HCT116 Zellen	46
3.14	BPDE induziert Apoptose	48
3.15	PARP wird nach BPDE-Gabe gespalten	49
3.16	Die BPDE-induzierte Apoptose ist p53-vermittelt	50
3.17	Die Rolle von p38 in der BPDE-induzierten Apoptose	51
3.18	Aktivierter p38 akkumuliert im Kern	53
3.19	p38-Kerntranslokation durch verschiedene p38-Aktivatoren	54

3.20	Quantitative Auswertung der p-p38 im Zellkern	55
4.1	Modell der BPDE-induzierten Aktivierung intrazellulärer Signalwege.	71
4.2	Modell der zellulären Konsequenzen nach BPDE Exposition	74

Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Chemikalien und Bezugsnachweise	17
2.2	Verwendete Induktoren und Inhibitoren	18
2.3	Verwendete siRNA	18
2.4	Verwendete Antikörper	19
2.5	Verwendete Zelllinien	20
2.6	Verwendete Zellkulturmedien und Zusätze	20
2.7	siRNA-Transfektion	22
2.8	Zusammensetzung des Lysepuffers	23
2.9	Zusammensetzung des Sammelgels	24
2.10	Zusammensetzung des Trenngels	24
2.11	Zusammensetzung des Laufpuffers	24
2.12	Zusammensetzung des Blotpuffers	24
2.13	Zusammensetzung von TBS	25
2.14	Zusammensetzung des Stripping-Puffer	26

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AhR	Arylhydrocarbonrezeptor
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARNT	“AhR nuclear translocator”
ASK1	“apoptosis signal-regulating kinase 1”
ATM	“ataxia telangiectasia mutated”
ATR	“ATM and Rad 3 related”
B[a]P	Benzo[a]pyren
B[c]PhDE	Benzo[c]phenanthren-3,4-Diol-1,2-Epoxid
BPDE	Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid
BSA	Rinderserumalbumin (“bovine serum albumine”)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Chk	“Checkpoint”-Kinase (Kontrollpunkt-Kinase)
CDK2	Zyclin-abhängige Kinase 2
CSA	Cockayne Syndrom Komplementationsgruppe A
CSB	Cockayne Syndrom Komplementationsgruppe B
Cyp	Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindolhydrochlorid
DDB	“DNA damage binding”
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	“epidermal growth factor”
Erk	Extrazellulär regulierte Kinase
et al.	und andere (“et alii”)

FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GG-NER	Globale Genom-Nukleotidexzisionsreparatur
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(“hour”)
HRP	Meerrettichperoxidase (‘‘horseradish peroxidase’’)
J	Joule
JNK	c-Jun-N-terminale Proteinkinase
k	Kilo
kD	Kilodalton
l	Liter
m	Meter, milli
M, mM	Mol pro Liter; Millimol pro Liter
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPKK-Kinase
min	Minuten
MMS	Methylmethansulfonat
mTOR	‘‘mammalian target of rapamycin’’
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PKD	‘‘Phosphatidylinositol-dependent kinase’’
PFA	Paraformaldehyd
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (‘‘phosphate buffered saline’’)
PP1	4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo-D-3,4-pyrimidin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase(n) (‘‘stress-activated protein kinase’’)
SB203580	p38 Kinase Inhibitor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	‘‘short-interference RNA’’
TAO	‘‘thousand and one amino acid’’

TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (“tris buffered saline”)
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TC-NER	Transkriptionsgekoppelte Nukleotidexzisionsreparatur
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin
TLS	Transläsionssynthese
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethen-sorbitan-monolaurat
U	Enzymeinheit (“unit”)
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
wt	Wildtyp
XPA	Xeroderma Pigmentosum Komplementationsgruppe A
XPC	Xeroderma Pigmentosum Komplementationsgruppe C
z.B.	Zum Beispiel