

Regulation von Zellzyklus und Apoptose durch Metabolite polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)-Universitätsbereich

vorgelegte

DISSERTATION

von

Julia Donauer

aus Völklingen

2010

Dekan: Prof. Dr. S. Bräse

Referent: PD Dr. C. Weiss

Koreferent: Prof. Dr. H. Puchta

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 2010

Meinen Eltern Marlene und Franz Donauer

Danksagung

Ich danke Carsten für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen.

Vielen Dank an Nina Ilona, Christine, Ute und Jessica für die harmonische Zusammenarbeit im Labor 509.

Besonderen Dank auch Nina, Ilona und Clarissa fürs geduldige Korrekturlesen.

Ein herzliches Dankeschön an Dorit für deine tatkräftige Hilfe in der „heißen Phase“.

Danke an alle Toxis, ihr wart und seid die beste Arbeitsgruppe, die ich mir vorstellen kann. Ich werde euch nicht nur in Verbindung mit unseren Seminaren und Journal Clubs und viel Spaß im Labor in bester Erinnerung behalten.

Danke Dominik für die nächtliche Hilfe beim Formatieren und deine Geduld mit mir in der Endphase.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Ohne eure Unterstützung wäre ich nie so weit gekommen.

Zusammenfassung

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sind weitverbreitete organische Umweltschadstoffe, mit denen wir täglich in Kontakt kommen. Sie entstehen bei der unvollständigen Verbrennung organischen Materials und sind chemisch inert und lipophil. In den Körper mit der Nahrung oder durch Inhalation aufgenommen werden sie durch den körpereigenen Metabolismus umgeformt, um als hydrophilere Metabolite ausgeschieden werden zu können. Als Zwischenprodukte dieses Fremdstoffmetabolismus entstehende Diolepoxide sind jedoch zum Teil hochreaktiv und können mit zellulären Bestandteilen wie DNA Addukte bilden. Da diese sich als Mutationen manifestieren und zur Entstehung von Krebs führen können, gelten PAK als Kanzerogene.

Es haben sich evolutionär hochkonservierte Mechanismen entwickelt, um solche DNA-Schäden zu entfernen oder die geschädigte Zelle zu Vermeidung von Krebs aus dem Gesamtorganismus zu eliminieren. Dabei gibt es ein Netz von Signalwegen, das durch DNA-Schäden aktiviert werden und je nach Art und Schwere des Schadens und Zelltyp bzw. Zustand der Zelle unterschiedliche zelluläre Reaktionen auslösen kann. So kann das Fortschreiten des Zellzyklus angehalten werden, um Zeit zur Reparatur von Schäden zu gewinnen und die Manifestierung der Schäden während der Replikation zu vermeiden. Andererseits kann bei irreparablen Schäden der Zelltod in Form von Apoptose, Nekrose oder Seneszenz eingeleitet werden.

Eine wichtige Rolle bei der Initiation der beteiligten Signalwege spielen ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ATM and Rad 3 related*), die DNA-Schäden erkennen, daran binden und dort weitere Signalmoleküle aktivieren und DNA-Reparaturproteine zum Schaden rekrutieren können. Zu ihren Substraten gehört auch der Tumorsuppressor p53, der sowohl an der Regulation des Zellzyklus und der DNA-Schadensreparatur als auch an der Einleitung von Apoptose beteiligt ist. Weitere wichtige Faktoren sind die Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK) p38 und JNK (c-jun N-terminale Kinase), die durch Gentoxine im Rahmen einer Kinasekaskade aktiviert werden können und ebenfalls essentielle zelluläre Vorgänge wie Proliferation und Apoptose regulieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde Benzo[a]pyren-7,8-Dihydrodiol-9,10-Epoxid (BPDE) als Modellsubstanz bezüglich der Dosisabhängigkeit der zellulären Konsequenzen in der

humanen Kolonkarzinomzelllinie Hct116 untersucht. Dabei konnten ATR/ATM als wichtige Mediatoren des BPDE-vermittelten Zellzyklusblocks identifiziert werden. Des Weiteren spielt p53 sowohl direkt in den Mitochondrien als auch indirekt über transkriptionelle Aktivität eine Rolle bei der BPDE-induzierten Apoptose über den intrinsischen Weg. Der extrinsische Weg sowie die SAPK sind ebenfalls an der BPDE-induzierten Apoptose beteiligt, aber p53-unabhängig.

Um die Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse auf andere PAK-Diolepoxide zu überprüfen, wurden zwei weitere Vertreter, Benzo[c]phenanthren-3,4-Dihydrodiol-1,2-Epoxid (BPhenDE) und Dibenzo[a,l]pyren-11,12-Dihydrodiol-13,14-Epoxid (DBPDE) bezüglich der aktivierten Signalwege und der zellulären Reaktionen verglichen. Es konnte bei allen untersuchten PAK-Diolepoxiden die Beteiligung der oben genannten Signalwege sowie vergleichbarer Konsequenzen nachgewiesen werden, jedoch unterscheiden sich die untersuchten Substanzen in der Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Effekte.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are widespread organic pollutants we are exposed to in our daily life. They are created during incomplete combustion of organic materials and are chemically inert and lipophilic. Taken up via food intake or inhalation they are substrates to our xenobiotics metabolism to be excreted as more hydrophilic metabolites. Diolepoxides as intermediates of this metabolism are highly reactive and can form adducts with cellular components such as DNA. As those can manifest as mutations and lead to cancer formation, PAH are known carcinogens.

Highly conserved mechanisms have evolved to remove such DNA damage or to eliminate the damaged cell to protect the whole organism from cancer formation. Therefore a signal transduction network can be activated leading to different cellular reactions according to type and severity of damage as well as cell type and status. Thus the ongoing cell cycle can be stopped to gain time for DNA repair and to prevent manifestation of mutations during replication. Furthermore, cell death can occur as apoptosis, necrosis or senescence as a consequence of irreparable damage.

An important role in signaling initiation play ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) and ATR (*ATM and Rad 3 related*). They recognize and bind to DNA damage sites thereby activating signaling molecules as well as recruiting DNA repair factors. One of their substrates is the tumor suppressor p53 which is involved in regulation of cell cycle progression and DNA repair as well as in apoptosis initiation. Further importance have the stress activated protein kinases (SAPK) p38 and JNK (c-jun N-terminal kinase), which are activated in response to genotoxins and likewise regulate essential cellular processes like proliferation and apoptosis.

In the present work the model substance benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (BPDE) was examined regarding dose dependency of cellular consequences in the human colon carcinoma cell line Hct116. ATR and ATM could be identified as important mediators of the BPDE induced cell cycle stop. In addition, p53 plays an important role in BPDE induced intrinsic apoptosis both directly in the mitochondria and indirectly via transcriptional activities. The extrinsic apoptotic pathway as well as the SAPK are likewise involved in apoptosis, but in a p53 independent manner.

To check a possible application of the gained information about BPDE on other PAH diolepoxides two additional compounds, benzo[c]phenanthrene-3,4-dihydrodiol-1,2-epoxide (BPhenDE) und dibenzo[a,l]pyrene-11,12-dihydrodiol-13,14-epoxide (DBPDE), were examined concerning signaling and cellular reactions. All analyzed components showed activation of the above mentioned signaling pathways but showed differences in concentration dependency.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	1
1.1.1	Struktur, Entstehung und Exposition	1
1.1.2	Metabolismus und Toxizität.....	2
1.2	Zelluläre Konsequenzen von Gentoxinen	6
1.2.1	Apoptose.....	7
1.2.2	DNA-Schäden führen zu DNA-Reparatur und Zellzyklusblock.....	11
1.3	Wichtige Gentoxin-induzierte Signalwege	13
1.3.1	ATM und ATR	13
1.3.2	Ein wichtiger Mediator zellulärer Konsequenzen nach DNA-Schaden: p53.....	15
1.3.3	Stressabhängige Proteinkinasen	17
1.4	Zielsetzung der Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Materialien und Bezugsquellen.....	20
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	20
2.1.2	Inhibitoren und Induktoren.....	22
2.1.3	Zelllinien	22
2.1.4	Antikörper	23
2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Zellkultur	26
2.2.2	Proteinanalytik	28
2.2.3	Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie.....	36
2.2.4	Mikroskopische Apoptoseanalyse mittels Hoechst-Färbung in lebenden Zellen ..	37

2.2.5 Bestimmung der Mitoserate anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen Hoechst-gefärbter Zellen.....	39
2.2.6 CaspaseGlo® 3/7 Assay (Promega).....	40
3 Ergebnisse	42
3.1 BPDE verursacht eine Verminderung der Zellzahl.....	42
3.2 BPDE induziert in Hct116 Apoptose, aber nicht Nekrose.....	44
3.3 Die BPDE-induzierte Apoptose ist abhängig von Caspasen und es sind sowohl extrinsische als auch intrinsische Komponenten involviert.....	47
3.4 p53 wird durch BPDE aktiviert und beeinflusst die Aktivierung von Komponenten des intrinsischen, aber nicht des extrinsischen Apoptoseweges.....	52
3.5 Die BPDE-induzierte Apoptose ist teilweise abhängig von Bax.....	57
3.6 Die SAPK p38 und JNK werden nach BPDE aktiviert und spielen eine Rolle bei der BPDE-induzierten Apoptose, aber nicht der Caspase-Aktivierung.....	60
3.7 BPDE hemmt die Proliferation und löst einen dosis- und zeitabhängigen Zellzyklusblock in Hct116 aus.....	65
3.8 Der BPDE-abhängige Zellzyklusblock ist nicht abhängig von p53, p21 oder den SAPK p38 und JNK.....	70
3.9 Der BPDE-abhängige Zellzyklusblock wird über ATR/ATM vermittelt.....	73
3.10 Epoxide anderer polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe zeigen mit BPDE vergleichbare Wirkungen.....	75
4 Diskussion	81
4.1 Mechanismen des BPDE-induzierten Zellzyklusblocks	83
4.1.1 Der intra-S-Block	83
4.1.2 Der G2/M-Block	85
4.1.3 Der <i>stealth</i> -Effekt.....	87
4.2 Mechanismen der BPDE-induzierten Apoptose.....	89

4.3	Dosisabhängigkeit von Zelltod, Proliferationshemmung und Zellzyklusblockaden nach BPDE.....	96
4.4	Vergleich der BPDE-induzierten zellulären Antwort mit der auf andere Diolepoxide polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe	100
4.5	Ausblick	103
5	Literaturverzeichnis.....	105
6	Anhang	124
6.1	Abbildungsverzeichnis	124
6.2	Tabellenverzeichnis.....	126
6.3	Abkürzungsverzeichnis	127
6.4	Erklärung.....	132
6.5	Lebenslauf	133
6.6	Veröffentlichungen.....	135

1 Einleitung

1.1 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

1.1.1 Struktur, Entstehung und Exposition

Die Substanzklasse der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) stellt die Gruppe der meistverbreiteten organischen Schadstoffe dar. Wie aus ihrer Bezeichnung bereits ersichtlich, bestehen die PAK aus mehreren kondensierten aromatischen Ringen. Die Struktur bedingt auch ihre geringe Wasserlöslichkeit. Sie entstehen bei der Pyrolyse oder unvollständigen Verbrennung organischen Materials, so zum Beispiel natürlicherweise bei Waldbränden oder Vulkanausbrüchen (Edwards NT 1983), aber auch bei der Zubereitung von Nahrungsmitteln wie u. A. Grillen oder Räuchern; außerdem sind sie im Rauch von Zigaretten ebenso wie in Industrie- und Autoabgasen zu finden. In der Luft liegen PAK meist an Feinstäube gebunden vor. Wenn diese sich absetzen, gelangen die PAK auch in Böden und Gewässer, wo sie sich aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften hauptsächlich im Sediment ablagern.

Der Hauptaufnahmeweg beim Menschen ist über kontaminierte Nahrungsmittel (Hattmer-Frey HA 1992; Ramesh A *et al.* 2004). Verunreinigungen mit PAK konnten z.B. in Gemüse und Getreide (Speer K *et al.* 1990) nachgewiesen werden, da sich PAK aus der Luft auf den Pflanzen ablagern und sich auch teilweise mit der wachsartigen Pflanzenoberfläche verbinden können. Stark belastet sind vor allem gegrillte oder geräucherte Nahrungsmittel wie Fisch und Fleisch (Phillips DH 1999), da durch die lange Zubereitung bei hohen Temperaturen PAK entstehen. In gegrilltem Fleisch können dabei PAK-Konzentrationen bis zu 320 µg/kg erreicht werden. Der bekannteste Vertreter ist das pentazyklische Benzo[a]pyren (B[a]P), das als Prototyp der PAK angesehen und häufig als Referenz bei Angaben zur Belastung mit PAK angegeben wird.

Erhöhte Expositionsraten durch Inhalation oder Hautkontakt treten z.B. bei Arbeitern in der Koks- und Aluminiumproduktion oder in Teergruben, bei Straßenbauarbeitern oder auch

1. Einleitung

Schornsteinfegern auf (Boffetta P *et al.* 1996). Die kanzerogene Wirkung der PAK wurde erstmals durch den englischen Arzt Percivall Pott dokumentiert, der im 18. Jahrhundert vermehrtes Auftreten von Hodenkrebs bei Schornsteinfegern mit deren Tätigkeit in Verbindung brachte (Brown JR und Thornton JL 1957). Zahlreiche epidemiologische Studien konnten inzwischen zeigen, dass PAK an der Entstehung verschiedener Krebsarten wie u. A. Lungen- und Darmkrebs beteiligt sind (de Kok TCM und van Maanen JMS 2000; Zhang Y *et al.* 2009).

Beim Menschen kommen also hauptsächlich Haut, Lunge und Gastrointestinaltrakt mit PAK in Kontakt. Durch die lipophilen Eigenschaften wird jedoch die Ausscheidung erschwert. Um eine Akkumulation im Körper zu verhindern werden PAK durch Enzyme des Fremdstoffmetabolismus wasserlöslich gemacht, um ihre Ausscheidung zu ermöglichen.

1.1.2 Metabolismus und Toxizität

Unser Organismus ist ständig verschiedenen, mitunter toxischen Einflüssen ausgesetzt. Um eine Akkumulation aufgenommener Fremdstoffe im Körper zu verhindern, werden diese metabolisiert, entgiftet und ausgeschieden. Die Ausscheidung kann renal über die Nieren oder biliär über die Galle erfolgen. Lipophile Stoffe müssen dafür zunächst durch Enzyme des Fremdstoffmetabolismus wasserlöslich gemacht werden. Phase-I-Enzyme, zu denen auch die Cytochrom-P-450-abhängigen Monooxygenasen (CYPs) gehören, führen in einem ersten Schritt elektrophile funktionelle Gruppen in das Fremdstoffmolekül ein. Diese Zwischenmetabolite werden in Phase II mit hydrophilen Molekülen wie Glutathion konjugiert und können dann über Transporter aus der Zelle geschleust und ausgeschieden werden.

Auch PAK werden durch den körpereigenen Fremdstoffmetabolismus umgesetzt und ausgeschieden. Die einzelnen Schritte sind am Beispiel des Benzo[a]pyrens (B[a]P) in Abbildung 1.1 in einem vereinfachten Schema erläutert. Die chemisch nahezu inerte, lipophile Muttersubstanz B[a]P kann in der Zelle an den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) binden, wodurch dieser die Transkription von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus induziert. B[a]P wird dann durch mehrere enzymatische Schritte wasserlöslich gemacht und

1. Einleitung

schließlich ausgeschieden. In einem ersten Schritt wird durch die Cytochrom-P450-abhängige-Monooxygenase 1A1 (CYP1A1) eine Epoxidgruppe eingeführt, die durch die mikrosomale Epoxidhydrolase (mEH) zum Diol umgesetzt wird. Dieses kann direkt durch die Dihydrodioldehydrogenase (DDH) zum Katechol oxidiert oder durch die UDP-Glucuronyltransferase mit Glucuronsäure konjugiert und ausgeschieden werden. Alternativ dazu kann es auch durch CYP weiter zu Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-Epoxid (BPDE) oxygeniert werden. Bei diesem Zwischenprodukt handelt es sich um eine durch die Epoxidgruppe hochreaktive Substanz, die nicht durch Epoxidhydrolasen umgesetzt, sondern nur durch die Glutathion-S-Transferase (GST) mit Glutathion konjugiert und dadurch entgiftet werden kann. Liegt B[a]P in zu hohen Konzentrationen vor, kann BPDE nicht schnell genug detoxifiziert werden und über die Epoxidgruppe auch an Bestandteile der Zelle binden. Addukte kann BPDE dabei außer mit Proteinen auch mit den DNA-Basen Adenin und Guanin bilden, wodurch es zu Mutationen und letztendlich zur Entstehung von Krebs kommen kann (Rubin H 2001).

Obwohl die zum Metabolismus und zur späteren Ausscheidung der PAK benötigten Enzyme in vielen Geweben exprimiert sind, weisen jüngere Studien darauf hin, dass hauptsächlich der Intestinaltrakt und nicht die Leber für den Abbau der PAK zuständig ist (Shi Z *et al.* 2010). PAK-Epoxide entstehen auch beim Metabolismus anderer PAK, von denen zwei weitere auch in dieser Arbeit untersucht wurden. Diese, namentlich Benzo[c]phenanthren-3,4-Dihydrodiol-1,2-Epoxid (BPhenDE) und Dibenzo[a,l]pyren-11,12-Dihydrodiol-13,14-Epoxid (DBPDE), sind in Abbildung 1.1B gezeigt. Die jeweiligen Muttersubstanzen Benzo[c]Phenanthren und Dibenzo[a,l]pyren entstehen wie B[a]P bei Verbrennungsprozessen aus organischen Materialien.

1. Einleitung

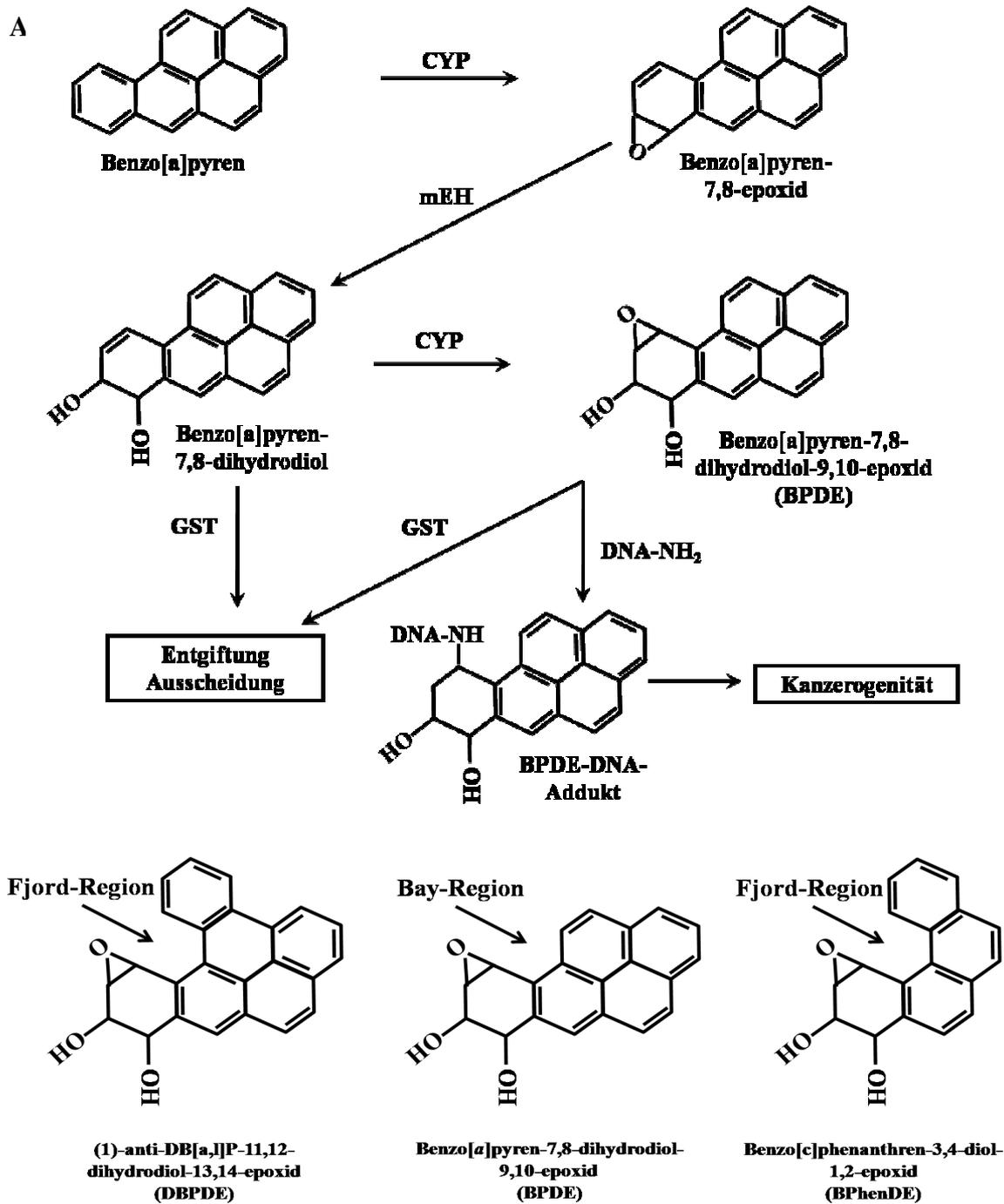


Abbildung 1.1.: Vereinfachte Darstellung des Benzo[a]pyren-Metabolismus und Bildung des ultimativen Kanzerogens BPDE und Strukturformeln der in der vorliegenden Arbeit untersuchten PAK-Diolepoide

A: Metabolismus des B[a]P: Alternativ zu BPDE kann auch das entsprechende Katechol gebildet werden, dies ist aber aus Gründen der Übersichtlichkeit hier nicht dargestellt. Nähere Erläuterungen siehe Text

B: Strukturformeln der verwendeten Substanzen BPDE, BPhenDE und DBPDE

1. Einleitung

BPhenDE und DBPDE zeigen ein deutlich höheres mutagenes und kanzerogenes Potential als z.B. BPDE (Glatt H *et al.* 1991; Hecht SS *et al.* 1994; Amin S *et al.* 1995). Wie ist dies zu erklären? Die Bindung an die DNA erfolgt wie bereits erwähnt über die Epoxid-Gruppe der PAK. Daher ist die Umgebung dieser Epoxidgruppe wichtig für Stabilität und DNA-Adduktbildung. In den 1970ern wurde die Bay-Region-Theorie aufgestellt. Diese postuliert, dass dasjenige Epoxid das höchste mutagene und kanzerogene Potential besitzt, welches an einem gesättigten, angular anellierten Ring gebildet wird (Bay-Region) (Lehr RE und Jerina DM 1977). Später wurde in Erweiterung der Bay-Theorie die Fjord-Region definiert (Abbildung 1.1B). Wie in Abbildung 1.1B dargestellt enthält BPDE eine Bay-Region, während BPhenDE und DBPDE eine Fjord-Region aufweisen. Fjord-Region-PAK-Diolepoxide haben ein höheres kanzerogenes Potential als strukturell ähnliche Substanzen mit einer Bay-Region (Lehr RE und Jerina DM 1977; Amin S *et al.* 1995; Amin S *et al.* 2003; Fuhrmann GF *et al.* 2006). Während Bay-Regionen die Planarität eines PAK bewahren, führen Fjord-Regionen, wie sie z.B. im BPhenDE und DBPDE auftreten, zu einer gewinkelten Molekülstruktur (Katz AK *et al.* 1998). Durch diese Form kann das Molekül besser zwischen den Basen interkalieren und führt zu einer weniger ausgeprägten Störung der DNA-Doppelhelix bezüglich Verdrehung des Rückgrats und Basenpaarung (Wu M *et al.* 2002). BPDE-DNA-Addukte werden durch die Nukleotidexzisions-Reparatur (NER) repariert (siehe auch Abschnitt 1.2.2). Der Schaden wird dabei zunächst durch XPC (*Xeroderma Pigmentosum Complementation Group C*) erkannt. Dieses wird durch DNA-Bereiche mit Einzelstrang-Charakter aktiviert, wie sie durch die starken Störungen der Basenpaarung durch BPDE-Addukte entstehen (Gunz D *et al.* 1996; Maillard O *et al.* 2007). Da XPC die DNA-Addukte mit Fjord-Region-PAK-Diolepoxiden aufgrund der geringeren Störung der DNA-Helixstruktur nicht erkennt, führt dies zu einer deutlich schlechteren Reparatur dieser Schäden. Die höhere Kanzerogenität dieser Substanzen ist also strukturbedingt und resultiert aus ihrer schlechteren Reparatur.

Welche körpereigenen Maßnahmen es gibt, um nach potentiell kanzerogenen DNA-Schäden die Krebsentstehung zu verhindern, soll im nächsten Abschnitt dargestellt werden.

1.2 Zelluläre Konsequenzen von Gentoxinen

Es gibt verschiedene körpereigene Mechanismen, mit Gentoxin-induzierten DNA-Schäden umzugehen. Im Wesentlichen kann entweder der Schaden repariert werden, so dass die geschädigte Zelle weiterleben kann, oder der Schaden wird als zu hohes Risiko für den Organismus eingestuft und die Zelle wird eliminiert. Dies kann unter Energieverbrauch mittels des programmierten Zelltods (Apoptose) oder bei einer vorangegangenen Energie-Depletion der Zelle in Form von Nekrose stattfinden. Diese Vorgänge werden detailliert in Abschnitt 1.2.1 beschrieben. Eine andere Art des durch DNA-Schäden induzierten Zelltods stellt die Autophagie dar (Kim R *et al.* 2005). Dabei handelt es sich um einen partiellen Selbstverdau der Zelle, wobei geschädigte Organellen lysosomal abgebaut werden. Dies kann durch Energiegewinn zum Überleben der Zelle bei Mangel an Nährstoffen beitragen oder durch Abbau von überlebenswichtigen Zellbestandteilen zum Zelltod führen (Gozuacik D und Kimchi A 2007; Scarlatti F *et al.* 2008). Eine mögliche Konsequenz nicht reparierter DNA-Schäden, die sich als Mutationen im Genom manifestieren, ist die Seneszenz. Bei diesem auch als Zellalterung bezeichneten Prozess kommt es in Folge der durch endogene ROS-Produktion oder durch exogene Quellen wie ultraviolette Strahlung (UV) oder Umweltschadstoffe entstehende DNA-Schäden zu einem permanenten Zellzyklusarrest im postmitotischen Stadium. Senescente Zellen bleiben über längere Zeit lebensfähig und metabolisch aktiv. Dennoch sind sie von nicht seneszenten Zellen mikroskopisch anhand ihrer veränderten Morphologie (flach, vergrößert, granulär) oder durch Nachweis des Seneszenzmarkers SA- β -Gal (Seneszenz-assoziierte Beta-Galaktosidase) unterscheidbar (Chen JH *et al.* 2007). Seneszenz und Autophagie wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht, daher werden die zu Grunde liegenden Mechanismen nicht genauer erläutert. Tritt keiner der genannten Mechanismen zum Schutz der Zelle und des Organismus in Kraft kann es zur Entstehung von Krebs kommen. Die Kanzerogenese ist nicht durch eine Einzelmutation zu erklären, sondern es handelt sich dabei um einen Mehrstufenprozess (Vogelstein B und Kinzler KW 1993). Die Zelle muss mehrere Eigenschaften durch Ausschalten oder Überexpression bestimmter Gene erlangen, um zu einer Krebszelle zu werden. Zu diesen Eigenschaften gehören Vermeidung von

1. Einleitung

Apoptose, Unempfindlichkeit gegen proliferationshemmende Signale, von Wachstumsfaktoren unabhängige Proliferation, Angiogenese zur Versorgung des Tumors mit Nährstoffen, unbeschränktes replikatives Potential sowie Invasion von Gewebe und Metastasierung (Hanahan & Wienberg, 2000).

In den folgenden Abschnitten werden typische Abläufe und Signalwege der verschiedenen Gentoxin-induzierten zellulären Reaktionen dargestellt.

1.2.1 Apoptose

Apoptose ist ein streng regulierter Vorgang, bei dem unter Energieverbrauch die Zelle in membranumschlossene Einheiten, so genannte Vesikel, verpackt wird, die dann von Makrophagen aufgenommen werden können. Sie ist abzugrenzen von der Nekrose, die eine andere häufige Art des Zelltods darstellt. Im Gegensatz zur Apoptose kommt es beim nekrotischen Zelltod zum Aufplatzen der Zelle, so dass der Zellinhalt in Kontakt mit der Umgebung kommt und Inflammation auslöst. Nekrose tritt daher nur bei Energiemangel oder z.B. bei mechanischer Ruptur von Zellen auf (Krysko DV *et al.* 2008; Han SI *et al.* 2008). Dennoch handelt es sich auch bei Nekrose um einen regulierten Vorgang (Henriquez M *et al.* 2008). Der Ablauf des programmierten Zelltods umfasst den enzymatischen Abbau der zellulären DNA durch Kondensation und Fragmentierung. Die Zelle verliert die Anheftung an die Umgebung und kugelt sich ab, die Zellmembran bildet Ausstülpungen (*blebbing*) und wird schließlich in Vesikel (*apoptotic bodies*) aufgeteilt. An diesen Vorgängen beteiligt sind aspartatspezifische Cystein-Proteasen, so genannte Caspasen (*cysteine-dependent aspartyl-specific protease*), die im Rahmen einer Kaskade durch Spaltung aktiviert werden (Pop C und Salvesen GS 2009). Hierbei werden aus inaktiven Procaspasen die aktiven Caspasen. Diese führen durch Proteolyse zum Abbau von z.B. zellulären Strukturproteinen wie Aktin, aber auch zur Aktivierung von Nukleasen, die die nukleäre DNA abbauen. Zu unterscheiden sind hierbei Initiatorcaspasen, wie Caspasen 8 und 9, die am Anfang der Kaskade stehen, von Effektorcaspasen wie z.B. Caspasen 3 und 7, die durch erstere aktiviert werden und die Apoptose einleiten. Es gibt auch Caspasen, die nicht an Apoptose, sondern an anderen zellulären Prozessen wie Inflammation beteiligt

1. Einleitung

sind. Zu ihnen zählt z.B. Caspase 1, zu deren Substraten der inflammatorische Botenstoff Interleukin 1 gehört. Man unterscheidet prinzipiell zwei Caspase-abhängige Apoptosewege nach ihrer Initiation (Abbildung 1.2).

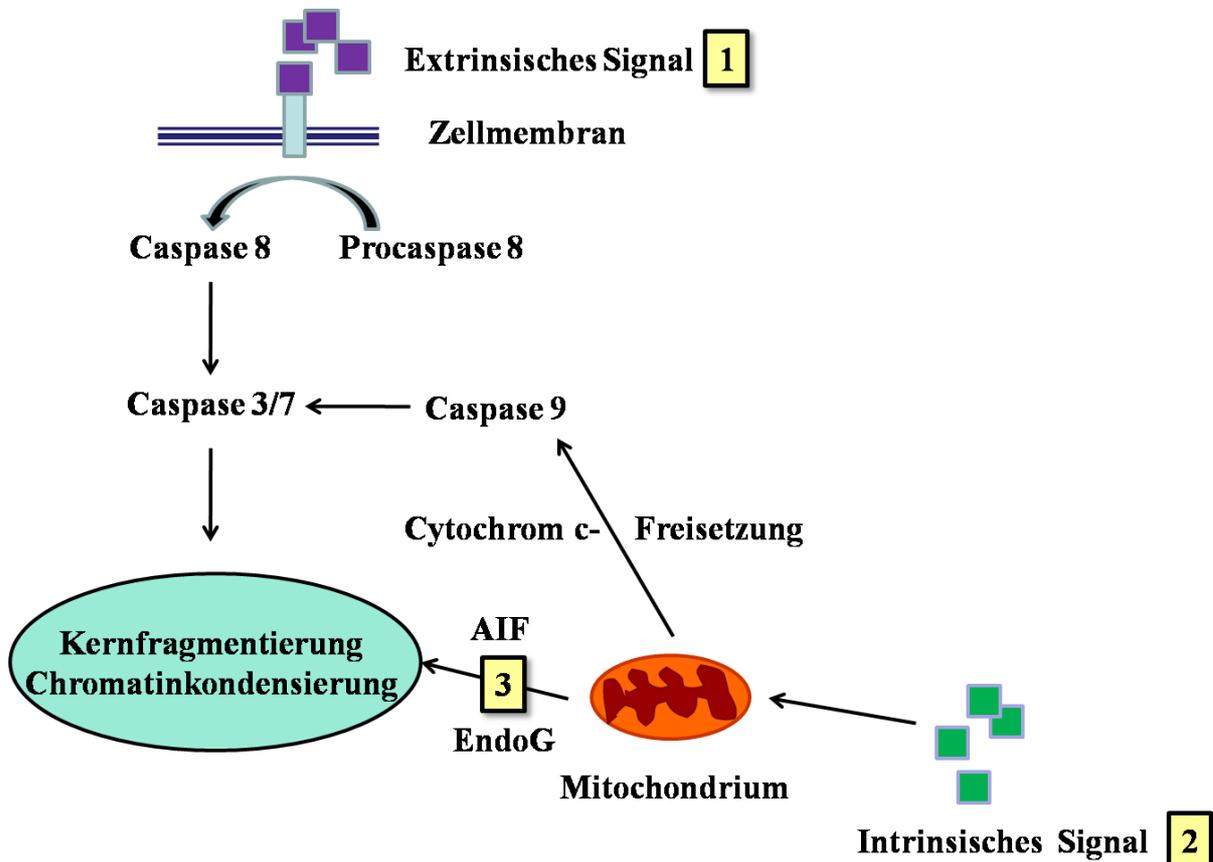


Abbildung 1.2: Vereinfachte Darstellung der Caspase-abhängigen und -unabhängigen Apoptosewege. [1] stellt den extrinsischen, [2] den intrinsischen Caspase-abhängigen Weg dar, während [3] den Caspase-unabhängigen Weg über AIF (*apoptosis inducing factor*) und EndoG (Endonuklease G) kennzeichnet. Nähere Erläuterungen im Text

Der extrinsische Weg wird über extrazelluläre Signale angeschaltet, die einen membranständigen Rezeptor (z.B. Fas) aktivieren. Die Bindung des Liganden führt zur Dimerisierung der membranständigen Rezeptoren und Rekrutierung des Adapterproteins FADD (*Fas-Associated Death Domain protein*), das seinerseits Procaspase 8 bindet. Der sich bildende Komplex aus dem Rezeptor, FADD und Procaspase 8 wird DISC (*death*

1. Einleitung

inducing signalling complex) genannt und führt zur proteolytischen Spaltung der Procaspase 8. Die aktive Caspase dissoziiert von DISC ab und spaltet die Effektorcaspasen 3 und 7.

Der intrinsische oder mitochondriale Weg wird durch intrazelluläre Signale wie DNA-Schäden oder oxidativen Stress ausgelöst. Wichtige Mediatoren dieses Apoptosewegs sind die Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2)-Proteine. Diese Proteinfamilie umfasst sowohl anti- als auch proapoptotische Mitglieder, die in der gesunden Zelle in einem Gleichgewichtszustand vorliegen. Durch Einflüsse wie z.B. unterschiedliche Stressfaktoren (DNA-Schädigung, oxidativer Stress usw.) wird dieses Gleichgewicht gestört und es kommt zur Initiation der Apoptose. Die antiapoptotischen Vertreter der Bcl-2-Familie, zu denen Bcl-2 und Bcl-XL gehören, zeichnen sich durch das Vorhandensein aller vier *Bcl Homology* (BH) Domänen aus. Diese Domänen sind wichtig für die Interaktion mit anderen Bcl-2-Proteinen. An sie sind in der gesunden Zelle die proapoptotischen Proteine des Multidomäentyps (besitzen die BH-Domänen 1-3, z.B. Bax) gebunden und werden so an ihrer Funktion gehindert. Wird in der Zelle Apoptose ausgelöst, kommt es zur Aktivierung proapoptotischer Bcl-2-Vertreter der *BH3 only*-Typs (besitzen ausschließlich die dritte BH Domäne, z.B. Bid, Bad), die in der aktiven Form ihrerseits mit den antiapoptotischen Proteinen interagieren. Diese Bindung stört jedoch die Interaktion mit den Multidomäntyp-Bcl-2-Vertretern wie Bax, so dass diese freigesetzt werden und die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (*mitochondria outer membrane permeabilisation*, MOMP) einleiten können. Im Normalzustand liegt Bax im Cytosol als Monomer vor. Nach Aktivierung transloziert es in die äußere Mitochondrienmembran und bildet dort als Oligomer Poren, durch die proapoptotische Faktoren wie Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Cytosol gelangen. Cytochrom c bildet im Cytosol mit APAF-1 (*apoptosis protease activating factor*) und Procaspase 9 einen Komplex, das so genannte Apoptosom. Es kommt zur Aktivierung der intrinsischen Initiatorcaspase 9 und damit der Caspasekaskade und letztendlich zum Zelltod (Brunelle JK und Letai A 2009).

Als ein Zielprotein der Effektorcaspasen ist auch die Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase (PARP) zu nennen, die ein Substrat der Caspase 3 ist. PARP ist ein zelluläres, DNA-bindendes Zinkfingerprotein, das Funktionen im Bereich der DNA-Reparatur, -Replikation

1. Einleitung

und Apoptose hat. Durch genotoxischen Stress aktiviert transferiert es unter NAD^+ -Verbrauch ADP-Ribose-Einheiten auf Akzeptormoleküle wie auch Chromatin. Durch die Spaltung wird der DNA-bindende Bereich vom katalytischen getrennt, so dass zwei Fragmente mit einer Größe von 89 und 24 kDa entstehen. Das Enzym verliert dadurch seine Aktivität, da es nicht mehr durch DNA-Schäden aktiviert werden kann. Seine Spaltung dient dem Schutz der Zelle vor NAD^+ - und ATP-Depletion durch erhöhte PARP-Aktivität nach Apoptose-bedingter DNA-Fragmentierung. Jedoch scheint es auch eine aktive Rolle für gespaltenes PARP bei der Apoptose zu geben (Boulares AH *et al.* 1999). In PARP-defizienten Mausfibroblasten konnte gezeigt werden, dass PARP wichtig für die Aufrechterhaltung der Genomintegrität ist (Wang ZQ *et al.* 1997). Wie in Mausstudien gezeigt werden konnte, ist PARP auch an der Basenexzisionsreparatur (BER) beteiligt (Dantzer F *et al.* 1999). Daher wird PARP auch als Ziel für Medikamente in der Krebstherapie diskutiert, da durch die mit PARP-Inhibition einhergehende Hemmung der BER die Cytotoxizität von Bestrahlung und auch Chemotherapie gesteigert werden kann. Dieser Ansatz ist besonders vielversprechend bei Tumoren, die Mutationen in anderen DNA-Reparaturmechanismen haben, wie z.B. BRCA (*breast cancer*), das häufig in Brustkrebszellen mutiert und wichtig für die homologe Rekombination ist (Comen EA und Robson M 2010).

Es gibt auch Caspase-unabhängige Wege der Apoptose, in der andere Proteine die proteolytischen Aufgaben der Caspasen übernehmen. Ein Beispiel dafür sind AIF (*apoptosis inducing factor*) und EndoG (Enduklease G), die in gesunden Zellen im Intermembranraum der Mitochondrien vorliegen. Auf apoptotische Signale hin translozieren diese Nukleasen Bcl-2-abhängig in den Zellkern und führen dort zur teilweisen Fragmentierung und Kondensierung der DNA (Mathiasen IS und Jäättelä M 2002; Lorenzo HK und Susin SA 2004). So konnte z.B. gezeigt werden, dass nach Inkubation von humanen Lungenepithelzellen mit Holzrauchextrakt abhängig von ROS (reaktive Sauerstoffspezies, *reactive oxygen species*) Apoptose eingeleitet wurde, die nicht Caspase-abhängig war aber mit einer nukleären Translokation von AIF und EndoG einherging (Liu PL *et al.* 2005).

1. Einleitung

AIF ist ein Flavoprotein, das in gesunden Zellen vermutlich Funktionen als Redoxprotein in den Mitochondrien erfüllt (Lorenzo & Susin, 2004). Wichtiger ist jedoch seine Rolle in der Apoptose, denn AIF ist im Mausmodell essentiell für die frühe Morphogenese (Joza N *et al.* 2001). Der programmierte Zelltod während der Embryonalentwicklung ist in defizienten Mäusen massiv gestört. Apoptotische Stimuli bewirken eine Bcl-2-abhängige Translokation von AIF durch das Cytosol in den Zellkern, wo es Chromatinkondensierung und grobe DNA-Fragmentierung bewirkt. AIF ist z.B. zusammen mit Caspase-abhängigen Mechanismen an der Cisplatin-induzierten Apoptose beteiligt (Yang X *et al.* 2008; Lei Liu *et al.* 2009).

EndoG ist eine Mg^{2+} -abhängige, sequenzunspezifische Endonuklease, die fest an die innere Mitochondrienmembran gebunden ist. Sie ist gewebespezifisch exprimiert, so z.B. in Niere und Hirn, aber nicht in der Milz von Mäusen (Apostolov EO *et al.* 2007). EndoG spielt eine Rolle bei Verletzungen von adultem Gewebe, während sie in embryonalen Zellen wenig oder gar nicht exprimiert ist. In gesunden Zellen erfüllt sie Aufgaben bei der Reparatur und Replikation der mitochondrialen DNA. Sie besitzt z.B. auch RNase-Aktivität und generiert so Primer für die DNA-Polymerase γ -abhängige Replikation der mitochondrialen DNA. Durch apoptotische Stimuli transloziert sie wie AIF in den Nukleus, um dort die DNA in oligonukleosomale Fragmente abzubauen. Sie ist eine der aktivsten und zytotoxischsten Endonukleasen, die bei Überexpression einer extramitochondrialen Mutante ohne Beteiligung zusätzlicher Faktoren in Zellkultur zum Abbau der DNA führt (Schafer P *et al.* 2004).

1.2.2 DNA-Schäden führen zu DNA-Reparatur und Zellzyklusblock

Der DNA-Reparaturmechanismus hängt von der Art des DNA-Schadens und damit vom Gentoxin ab. Über die in dieser Arbeit untersuchten PAK ist bekannt, dass die von ihnen gebildeten DNA-Addukte durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) repariert werden. Dabei wird aus dem DNA-Strang mit dem Base-PAK-Addukt ein mehrere Nukleotide umfassendes Stück durch Exonukleasen entfernt, und die Sequenz anhand des komplementären Stranges von DNA-Polymerasen neu synthetisiert und die entstandene Lücke im DNA-Rückgrat durch Ligasen geschlossen (Hoeijmakers JHJ 2001). Auch UV-

1. Einleitung

induzierte DNA-Schäden werden durch die NER repariert. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass die Mengen an zellulären NER-Proteinen durch UV p53-abhängig hochreguliert werden können (Adimoolam S und Ford JM 2003). Patienten mit Defekten in der NER (*Xeroderma Pigmentosum*, XP) sind sehr anfällig für Krebs durch DNA-Schäden, die durch diesen Mechanismus repariert werden. Es gibt hierbei sieben Gene, die betroffen sein können und unterschiedliche NER-Gene umfassen. Sie werden als XP Komplementationsgruppe A bis G bezeichnet. Bedingt durch die mangelnde Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden entwickeln XP-Patienten schon durch Kontakt mit Sonnenlicht Hautkrebs (Cleaver JE 1990). Um XP und NER besser zu verstehen wurden auch Mausmodelle mit entsprechenden Defizienzen in den XP-Proteinen generiert und untersucht (Wijnhoven SWP *et al.* 2007).

Um zu verhindern, dass geschädigte DNA im Rahmen der Zellteilung der Replikation unterzogen wird und sich dabei nicht reparierte DNA-Schäden als Mutationen manifestieren, gibt es im Zellzyklus so genannte Kontrollpunkte. Dort werden Parameter wie z.B. Größe der Zelle, aber auch Integrität der DNA überprüft und entsprechende Mängel behoben, bevor die Zellteilung fortschreitet. An der Regulation dieser Kontrollpunkte sind die Cycline und cyclinabhängigen Kinasen (*cyclin dependent kinases*, Cdk) beteiligt. Cycline sind zyklisch exprimierte Proteine, die die regulatorische Untereinheit der Cyclin/Cdk-Komplexes darstellen. Sie werden nur exprimiert, wenn die Voraussetzungen für die nächste Phase des Zellzyklus erfüllt sind und nach ihrem Einsatz durch das Ubiquitin-Proteasom-System wieder abgebaut. Die katalytische Untereinheit Cdk ist nur in Anwesenheit des passenden Cyclins aktiv, seine Aktivität wird also über die Verfügbarkeit des Cyclins reguliert. Zusätzlich werden Cdk aber auch durch Phosphorylierung oder verschiedene Inhibitoren reguliert. Zu den Substraten der Cdk gehören z.B. Transkriptionsfaktoren, die zur Expression von Genen führen, die für die nächste Zellzyklusphase wichtig sind. Ein Beispiel ist das Retinoblastomprotein RB, das die Transkription verschiedener Replikationsproteine hemmt und durch Phosphorylierung durch G1-Phase-Cdks inaktiviert wird.

Wie in diesem Abschnitt dargestellt gibt es also verschiedene Möglichkeiten, wie die Zelle auf DNA-Schäden reagieren kann. Wie es zur Abwägung der Schwere des Schadens und

zur adäquaten zellulären Antwort darauf kommt, ist erst im Ansatz verstanden. Einige Beispiele wichtiger, Gentoxin-aktivierter Signalwege und ihrer Konsequenzen sollen im Folgenden erläutert werden.

1.3 Wichtige Gentoxin-induzierte Signalwege

1.3.1 ATM und ATR

Die Rolle als „Richter“ über das Schicksal einer Zelle nach DNA-Schäden wird z.B. ATM und ATR (*ataxia telangiectasia mutated, ATM-and Rad3-related*) zugeschrieben (Shiloh Y 2001). Diese Proteine agieren als Sensoren für DNA-Schäden und als Initiatoren für nachfolgende Signalwege, die je nach Art und Schwere des Schadens zu Apoptose oder auch Zellzyklusarrest und Reparatur führen können (Yang J *et al.* 2004). Dabei wird ATM eher durch Doppelstrangbrüche, ATR durch Replikationsstopps und längere einzelsträngige DNA-Abschnitte, wie sie z.B. im Rahmen der Reparatur auftreten, aktiviert. Es handelt sich bei ATR und ATM um Serin/Threonin-Kinasen aus der Familie der PI3K-ähnlichen Kinasen. Ihre Substrate umfassen unter anderem die Checkpoint-Kinasen Chk1 und Chk2, p53 und die MAPK (*mitogen activated protein kinase*). Die Aktivierung von ATM/ATR nach DNA-Schaden kann Zellzyklusblockaden an unterschiedlichen Kontrollpunkten zur Folge haben (Abbildung 1.3).

1. Einleitung

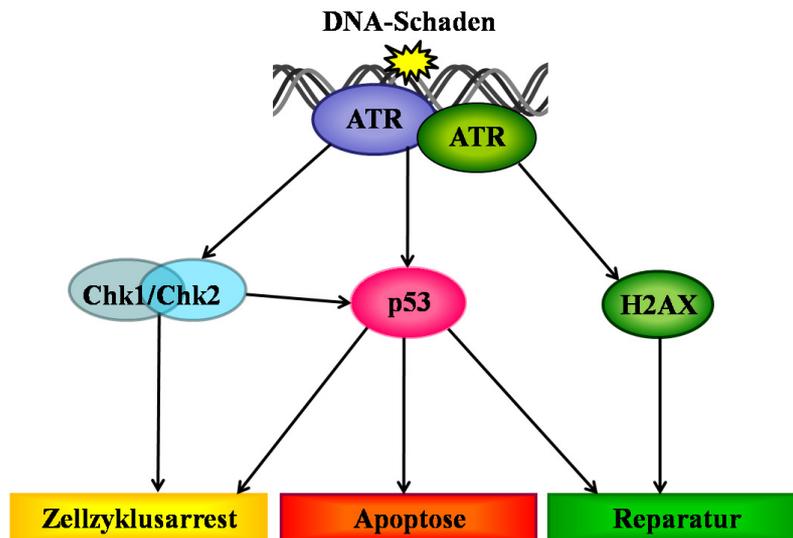


Abbildung 1.3: ATM und ATR erkennen DNA-Schäden und lösen unterschiedliche Signalwege aus. Nähere Erläuterungen siehe Text

Ein Zellzyklusarrest nach DNA-Schaden kann durch ATR/ATM-abhängige Phosphorylierung der Checkpoint-Kinasen eingeleitet werden. Diese können ihrerseits verschiedene Isoformen von Cdc25 (*cell division cycle*) phosphorylieren und dadurch deren Ubiquitinierung und proteasomale Degradation einleiten. Cdc25 ist eine Phosphatase, deren Substrat Cdk nur im nicht phosphorylierten Zustand das Fortschreiten des Zellzyklus ermöglicht. Durch DNA-schadensabhängigen ATR/ATM und Chk1/Chk2-vermittelten Abbau von Cdc25A wird so z.B. über inhibitorische Hyperphosphorylierung von Cdk2/Cyclin E die Initiation der Replikation unterbunden und damit ein G1-Block ausgelöst (Falck J *et al.* 2001; Heffernan TP *et al.* 2002). Der G2/M Block verläuft analog über die Isoform Cdc25C und Cyclin B/cdc2 (Liu Q *et al.* 2000). Alternativ kann p53 über ATM/ATR direkt oder indirekt über die Checkpoint-Kinasen aktiviert werden und über p21 zu einem G1-Block führen oder Apoptose auslösen (Abschnitt 1.3.2). Die Phosphorylierung eines weiteren Substrates, H2AX, führt zur Rekrutierung von DNA-

1. Einleitung

Reparatur-Faktoren zur geschädigten Stelle (Bassing CH *et al.* 2003; Celeste A *et al.* 2003; Stucki M und Jackson SP 2006).

Wie ihre vielfältigen Aufgaben bei der zellulären Antwort auf DNA-Schäden schon vermuten lassen, haben Mutationen in ATM/ATR weitreichende Konsequenzen für die betroffenen Patienten. Bei der namensgebenden Ataxia telangiectasia (auch Louis-Bar-Syndrom) handelt es sich um eine seltene, autosomal rezessiv vererbte Mutation des ATM-Gens. Die Symptome umfassen neuromuskuläre Störungen verbunden mit unsicherer Koordination der Muskelbewegungen (Ataxie), auffälliger Erweiterung der Blutgefäße (Telangiektasie), progressiver mentaler Retardierung sowie erhöhter Infekt- und Krebsanfälligkeit. Die Patienten überschreiten selten das 20. Lebensjahr. Ein anderes Beispiel ist das sehr seltene, autosomal rezessive Seckel-Syndrom, bei dem eine Mutation im ATR-Gen Auslöser für Kleinwüchsigkeit, Mikrozephalie und mentale Retardierung ist. Ein knockout ist in Mäusen im Fall von ATR embryonal letal (O'Driscoll M 2009), während ATM-knockout-Mäuse zwar lebensfähig, aber unfruchtbar sind und unter Wachstumsstörungen leiden (Barlow C *et al.* 1996).

1.3.2 Ein wichtiger Mediator zellulärer Konsequenzen nach DNA-Schaden: p53

Die Entdeckung von p53 gelang 1979 unabhängig durch zwei Arbeitsgruppen (Lane DP und Crawford LV 1979; Linzer DIH und Levine AJ 1979). Seine Funktionen sind vielfältig und umfassen die Kontrolle von wichtigen zellulären Prozesse wie Proliferation, Zellzyklus und Apoptose. Ein genetischer Defekt in p53 liegt beim so genannten Li Fraumeni Syndrom vor (Malkin D 1993). Die Krankheit wird autosomal dominant vererbt und Patienten erkranken bereits in jungen Jahren an Krebs. Die klassische Rolle von p53 als Tumorsuppressor wird weiterhin durch Mutationen in mehr als 50 % humaner Tumoren verdeutlicht. Auch Viren können gezielt p53 ausschalten, so z.B. SV40 (*simian virus 40*), das auch zur Immortalisierung von Kulturzellen verwendet wird. Das Virus enthält das so genannte *Large T Antigen*, das p53 bindet und inaktiviert. Auf die gleiche Art wird p53 durch das E6-Protein von humanen Papillomaviren inaktiviert (Chung CH und Gillison ML 2009). Der Vorteil für die Viren dabei ist, dass ein Verlust von p53 zu unkontrolliertem Wachstum der Wirtszelle und damit schnellerer Vermehrung der Viren führt.

1. Einleitung

Das p53-Protein hat normalerweise eine geringe Halbwertszeit, da es durch seinen Interaktionspartner Mdm2 (*mouse double minute 2*) ständig der Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System zugeführt wird (Piette J *et al.* 1997). Durch Stimuli wie DNA-Schäden kommt es zur Phosphorylierung von p53, die die Interaktion mit Mdm2 aufhebt und damit zu ansteigendem p53-Proteinlevel in der Zelle führt. Zu den verantwortlichen Kinasen gehören z.B. ATR/ATM und deren Substrate Chk1/Chk2, aber auch die SAPK (*stress activated protein kinases*, stressabhängige Proteinkinasen) p38 und JNK (*c-jun-N-terminal kinase*). Im Kern kann p53 als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Zielgene bewirken (Menendez D *et al.* 2009), darunter auch p21. Dabei handelt es sich um einen Inhibitor verschiedener cyclinabhängiger Proteinkinasen, der zum Zellzyklusarrest in der G1- oder G2-Phase (Taylor WR und Stark GR 2001) führt, damit DNA-Schäden vor der Replikation bzw. Mitose repariert werden können. Gleichzeitig werden auch DNA-Reparaturproteine wie z.B. XPC von p53 reguliert (Adimoolam S und Ford JM 2003). Bei irreparablen DNA-Schäden aktiviert p53 proapoptotische Zielgene wie z.B. Bax und leitet so den programmierten Zelltod ein. Im Rahmen des so genannten mitochondrialen p53-Wegs wurde auch eine direkte Funktion von p53 in der Apoptose postuliert, wobei eine Translokation von p53 in die Mitochondrien stattfindet (Vaseva AV und Moll UM 2009; Lee SK *et al.* 2010). Dabei ist p53 an der Translokation von Bax in die Mitochondrien beteiligt (Lee *et al.*, 2010), die wie im Abschnitt 1.2.1 beschrieben zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem Mitochondrium führt. p53 besitzt also ebenfalls eine Rolle als „Richter“ über DNA-schadensabhängige zelluläre Antwort in Form von Zellzyklusstopp oder Apoptose. Dazu wurde die Hypothese aufgestellt, dass die für einen Proliferationsstopp benötigten p53-Zielgene wie p21 p53-Bindestellen mit höherer p53-Affinität besitzen als proapoptotischen Zielgene, wie z.B. Bax (Zinkel S *et al.* 2006). Dadurch werden bei geringen p53-Mengen, bedingt durch geringfügigen DNA-Schaden, zunächst nur die Gene aktiviert, die einen Proliferationsstopp auslösen. Apoptose wird dagegen erst nach höheren p53-Mengen ausgelöst, die nach schwerwiegenderem Schaden vorhanden sind.

1.3.3 Stressabhängige Proteinkinasen

Stressfaktoren bewirken in der Zelle die Aktivierung von Signalkaskaden, an deren Ende die zelluläre Reaktion auf den Stressfaktor liegt. Wie die Bezeichnung stressabhängige Proteinkinasen (SAPK) schon impliziert, handelt es sich bei diesen Proteinen um Komponenten solcher Signalwege. Die SAPK p38 und JNK bilden zusammen mit ERK (*extracellular signal regulated kinase*) die drei Unterfamilien der evolutionär hochkonservierten Familie der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK). Die Aktivierung der MAPK erfolgt durch Phosphorylierung in einer dreistufigen Kinasekaskade. Die MAPK werden dabei von den MAPK-Kinasen (MAPKK oder MEK), diese wiederum von den MAPKK-Kinasen (MAPKKK oder MEKK) phosphoryliert. Während ERK hauptsächlich durch mitogene Signale wie Wachstumsfaktoren aktiviert wird, werden p38 und JNK durch Stressfaktoren wie reaktive Sauerstoffspezies, osmotischen Schock oder UV-Strahlung angeschaltet. Nach ihrer Phosphorylierung kommt es zur Bildung von Homodimeren und Translokation in den Zellkern, wo sie als prolängerichtete Serin/Threonin-Kinasen Substrate wie z.B. den Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren und die Expression von Zielgenen regulieren. Sie beeinflussen wichtige Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, aber auch Inflammation und Apoptose. Es wurde postuliert, dass beständige Aktivierung der SAPK an der Entstehung neurodegenerativer Krankheiten wie Alzheimer oder Parkinson beteiligt ist (Cuenda A und Rousseau S 2007; Kim EK und Choi EJ 2010). Die Bedeutung der SAPK für den Organismus zeigt sich auch darin, dass p38- und JNK-knockout bei Mäusen embryonal letal ist (Wang X *et al.* 2007; Wood CD *et al.* 2009).

1994 konnte p38 in Säugerzellen als durch Lipopolysaccharid (LPS) aktiviertes Mitglied einer Endotoxin-abhängigen Kinasekaskade identifiziert werden (Han J *et al.* 1994). Von p38 existieren vier Gene, die für die Isoformen α bis δ codieren. Während p38 α und β ubiquitär exprimiert sind (Jiang Y *et al.* 1996), kommen γ und δ nur in bestimmten Geweben vor. Die γ -Isoform wird hauptsächlich in der Skelettmuskulatur (Li Z *et al.* 1996), p38 δ in Lunge und Niere (Jiang Y *et al.* 1997) exprimiert. Die Aktivierung der p38 verläuft über die MAPKK MKK3/6 sowie im Fall der p38 α durch MKK4 (SEK1). Ein p38 (α und β)-spezifisches Substrat ist die MAPKAP2 oder MK2 (*MAP kinase-activated*

1. Einleitung

protein kinase 2), eine weitere Kinase, die Funktionen z.B. in der Regulation des Zellzyklus (Reinhardt HC und Yaffe MB 2009), Migration und Cytokinproduktion hat (Kotlyarov A *et al.* 2002). Nach ihrer Phosphorylierung durch p38 sorgt MK2 für deren Export aus dem Kern als p38-MK2-Heterodimer, da p38 keine eigene NES (*nuclear export sequence*) besitzt (Ben-Levy R *et al.* 1998; Engel K *et al.* 1998).

Die JNK wurden 1990 erstmals als eine durch den Proteinsynthesehemmer Cycloheximid aktivierte Proteinkinase entdeckt (Kyriakis JM und Avruch J 1990; Barr RK und Bogoyevitch MA 2001). Ihren Namen bekamen sie aber erst 1993, als sie in ihrer namensgebenden Funktion als Kinase von c-jun entdeckt wurden (Hibi M *et al.* 1993). Sie umfassen drei Gene, die als JNK1-JNK3 bezeichnet werden und in der SDS-PAGE zwei Banden bei 46 und 54 kDa ergeben, und mehr als zehn durch alternatives Splicing entstehende Isoformen (Kyriakis JM *et al.* 1994). Während JNK1 und JNK2 in allen Geweben vorkommen, wird JNK3 nur in Gehirn, Herz und Testis exprimiert (Mohit AA *et al.* 1995). JNK1 und JNK2 haben teilweise redundante Funktionen, da nur der Doppelknockout embryonal letal ist. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass sie ihr Substrat c-jun differentiell regulieren (Sabapathy K und Wagner FE 2004). Ihre Aktivierung verläuft über MKK4 (SEK1) und MKK7 (Kyriakis JM und Avruch J 2001).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen die zellulären Wirkungen von Metaboliten der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe in der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie Hct116 untersucht werden. Als Modellsubstanz dient der B[a]P-Metabolit BPDE. Der Fokus wurde hierbei auf zwei mögliche Reaktionen der Zelle nach DNA-Schaden gerichtet:

- Zelltod: Kommt es zu Apoptose oder Nekrose, und welche Mechanismen sind beteiligt?
- Proliferation und Zellzyklus: Wird die Proliferation beeinflusst und kommt es zu einem Zellzyklusblock? Welche Signalmoleküle sind beteiligt?

Die Übertragbarkeit der beobachteten BPDE-induzierten zellulären Reaktionen sollte des Weiteren durch Vergleich von BPDE mit zwei weiteren PAK, DBPDE und BPhenDE, in ausgewählten Experimenten überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Bezugsquellen

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat	Roth, Karlsruhe
BCA Protein Assay Reagent A	Thermo Scientific, Rockford, USA
BSA Fraktion V	Sigma, Deisenhofen
Casyton	Schärfe Systems, Reutlingen
CuSO ₄	Roth, Karlsruhe
CyStain DNA 1Step, DAPI-Färbelösung	Partec, Münster
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Calbiochem (VWR), Bruchsal
DMEM	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe
ECL-Lösung	Amersham, Freiburg
EDTA	Roth, Karlsruhe
EGTA	Roth, Karlsruhe
Entwickler und Fixierer	Kodak GmbH, Stuttgart
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FACS Flow, FACS Clean, FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Kanülen G26	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

2. Material und Methoden

Kulturmedien	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe
Kryoröhrchen	Corning
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
NP40 (IGEPAL CA-630)	Sigma, Steinheim
PageRuler, Größenmarker für Proteingele	Fermentas, St. Leon-Rot
PBS (steril)	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe
Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF), 0,45 μ M Porengröße	Millipore GmbH, Schwalbach
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
1 ml Spritzen BD Plastipak	Becton Dickinson, Heidelberg
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl, Tris-Base	Roth, Karlsruhe
TritonX-100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Gibco (Invitrogen), Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Whatman 3MM-Papier	Schleicher&Schuell, Dassel
Zellkulturmaterial und Plastikwaren	Greiner Labortechnik, Nürtingen

2. Material und Methoden

2.1.2 Inhibitoren und Induktoren

Tabelle 2.1: Verwendete Inhibitoren, Bezugsquelle, Lösungsmittel und eingesetzte Konzentrationen

Bezeichnung	Bezugsquelle	Lösungsmittel	Endkonzentration
ATR/ATM-Inhibitor	Calbiochem (VWR international), Bruchsal	DMSO	10 μ M
SB203580 (p38-Inhibitor)	Enzo Life Sciences, Lörrach	DMSO	25 μ M
SP600125 (JNK-Inhibitor)	Enzo Life Sciences, Lörrach	DMSO	10 μ M

Tabelle 2.2.: verwendete Induktoren, Bezugsquelle und Lösungsmittel

Bezeichnung	Bezugsquelle	Lösungsmittel
Benzo[c]phenanthren-3,4-diol-1,2-epoxid (BPhenDE)	Albrecht Seidel, Großhansdorf	DMSO
Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE)	Karl Platt, Mainz	DMSO
(1)-anti-DB[a,l]P-11,12-dihydrodiol-13,14-epoxid (DBPDE)	Albrecht Seidel, Großhansdorf	DMSO

2.1.3 Zelllinien

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um humane Kolonkarzinomzellen der Linie HCT116, die freundlicherweise von Christine Blattner ⁽¹⁾ und von Bert Vogelstein vom John Hopkins University Cell Center ⁽²⁾ zur Verfügung gestellt wurden (Bunz F *et al.*

2. Material und Methoden

1998; Zhang L *et al.* 2000). In Tabelle 2.3 sind die jeweilige Bezeichnung und der Genotyp angegeben.

Tabelle 2.3: Verwendete HCT116 Zelllinien mit Bezeichnung und Genotyp

Bezeichnung	Genotyp
p53 wt	p53+/+ ¹
p53 ko	p53-/- ¹
Cell line #36 Bax control	Bax +/- ²
Cell line #37 Bax ko	Bax -/- ²

2.1.4 Antikörper

Alle phosphospezifischen Antikörper (Tabelle 2.4) sowie die Antikörper gegen Caspase-Spaltprodukte (Tabelle 2.5) wurden in der jeweils angegebenen Verdünnung in 3 % BSA in 1 x TBST eingesetzt. Die Membranen wurden je nach Größe mit 3-5 ml des verdünnten Antikörpers eingeschweißt und über Nacht bei 4°C unter ständigem Schwenken inkubiert.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.4: Verwendete phosphospezifische Antikörper (Cell Signalling, Frankfurt/Main, Deutschland) und die eingesetzte Verdünnung in 3 % BSA/TBST

Antikörper	Verdünnung
Phospho-Chk2 Ser345	1:1000
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	1:1000
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	1:1000
Phospho-p53(Ser15)	1:1000

Tabelle 2.5: Verwendete Antikörper gegen Caspase-Spaltprodukte (Cell Signalling, Frankfurt/Main, Deutschland) und die jeweils eingesetzte Verdünnung in 3 % BSA/TBST

Antikörper	Verdünnung
Caspase 7 Cleaved product (Asp198)	1:1000
Caspase 8 Cleaved product (1C12)	1:1000
Caspase 9 Cleaved product (Asp315) und D330	1:1000

Der Endonuklease G Antikörper mit der Bezeichnung Anti-Endonuclease G (56-70) von Merck wurde ebenfalls 1:1000 in 3 % BSA und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Alle übrigen Antikörper (Tabelle 2.6) wurden in 5 % Milchpulver in TBST in der angegebenen Verdünnung eingesetzt und die mit 3-5 ml Antikörperlösung eingeschweißten Membranen ebenfalls bei 4 °C über Nacht unter ständigem Schwenken inkubiert.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.6: Verwendete Antikörper der Firma Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland und die jeweils eingesetzte Verdünnung in 5 % Milchpulver/TBST

Antikörper	Verdünnung
AIF H-300	1:1000
Chk2 (clone 7)	1:1000
ERK2 C-14	1:1000
JNK2 D-2	1:500
p21 SX-118	1:1000
p38 C-20	1:1000
p53 FL-393	1:1000
PARP H-250	1:1000
PCNA PC-10	1:1000

Die sekundären Antikörper sind in Tabelle 2.7 aufgeführt. Sie sind zwecks ihrer Detektion mit ECL mit Meerrettichperoxidase (*horseraddish peroxidase*, HRP) gekoppelt. Die Inkubation der Membranen mit der Sekundärantikörperlösung erfolgte eingeschweißt in 5 % Milchpulver/TBST bei Raumtemperatur für die Dauer von einer Stunde.

Tabelle 2.7 Verwendete sekundäre Antikörper der Firma DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland und die jeweils eingesetzte Verdünnung in 5 % Milchpulver/TBST

Antikörper	Verdünnung
Ziege anti-Maus	1:5000
Ziege anti-Kaninchen	1:5000
Kaninchen anti-Ziege	1:5000

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingefroren. Hierzu wurden Zellen von der Kulturflasche abtrypsiniert (siehe auch 2.2.1.2) und in Medium aufgenommen. Die Suspension wurde dann bei 1500 rpm 5 min abzentrifugiert und der Überstand mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (10:1 FCS:DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquotiert (zwei Röhrchen pro konfluente T75 Kulturflasche). Die Zellen wurden zunächst auf Eis 30 min heruntergekühlt, in ein mit kaltem Isopropanol gefülltes Einfriergefäß (NalgeneTM Labware, USA) gestellt und dieses ü.N. bei -80 °C gelagert. Anschließend konnten die gefrorenen Zellen zur langfristigen Lagerung in den Stickstofftank überführt werden.

Um gefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese schnell bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in vortemperiertem Medium aufgenommen. Die Suspension wurde zum Entfernen von DMSO-Rückständen abzentrifugiert (5 min, 1500 rpm), das Pellet in Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um nicht angeheftete Zellen zu entfernen, und die Zellen wie im nächsten Abschnitt beschrieben kultiviert.

2.2.1.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ausgesät und bis zu einer Dichte von 80-90 % im Inkubator (Heraeus Christ, Fellbach) bei 37 °C , 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchte kultiviert. Zum Versuchsansatz wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen kurz mit 1 x PBS -Mg -Ca gewaschen und 2 ml 0,25 % Trypsin pro 75 cm^2 Kulturfläche tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach ca. 3 min im Inkubator war die Ablösung vom Kulturflaschenboden durch Lösen der Zellkontakte zueinander und

2. Material und Methoden

zum Flaschenboden erfolgt und die Trypsinreaktion wurde durch Mediumzugabe von 8 ml gestoppt. Die Zellsuspension konnte nun wie gewünscht zum Experiment verwendet oder weiter kultiviert werden.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Um bei allen Experimenten die gleichen Wachstumsbedingungen zu haben, wurde immer dieselbe Zellzahl verwendet. Hierzu wurden wie unter 2.2.1.1 beschrieben die Zellen trypsiniert und in Medium aufgenommen. Von dieser Suspension wurde die Lebendzellzahl pro ml mittels des Casy®-Cell Counter (Schärfe Systems, Reutlingen) bestimmt. Das Messprinzip beruht hierbei auf der Messung des elektrischen Widerstandes der Zellen, der sich bei lebenden Zellen durch deren intakte Membran von dem von toten Zellen, die die Membranintegrität verlieren, unterscheidet.

Die Experimente wurden unter proliferierenden Bedingungen durchgeführt; die jeweils verwendeten Zellzahlen sind in Tabelle 2.8 angegeben. Abweichungen sind ggf. unter Ergebnisse beim entsprechenden Experiment vermerkt.

Tabelle 2.8: Verwendete Zellzahlen im jeweiligen Kulturschalen-Format

Format	Zellzahl pro well
6-well	7×10^4
96-well	$8 \cdot 10^3$
15 cm Petrischale	$3 \cdot 10^6$

2.2.1.4 Behandlung von Zellen

Zur Durchführung eines Experiments wurden die Zellen wie im vorangehenden Abschnitt erläutert proliferierend ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung der Zellen mit den jeweiligen Substanzen. Hierzu wurde etwas Medium aus der Kulturschale abgenommen und in einem Eppendorfgefäß mit der zu testenden Substanz gemischt. Dieses Gemisch wurde nun tropfenweise auf die Zellen gegeben und diese achterförmig

2. Material und Methoden

geschwenkt. Dies ist nötig, um eine gleichmäßige Verteilung der Substanz in der Schale zu gewährleisten.

2.2.2 Proteinanalytik

2.2.2.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten wurde das Medium entfernt und 100 μ l 2 x Probenpuffer (Tabelle 2.9) pro 6-well in die wells gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber im Puffer von der Kulturfläche abgeschabt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Das Zelllysate wurde für 5 min bei 95 °C im Heizblock (Stuart®, Staffordshire) gekocht und anschließend zur Scherung der DNA mit einem Branson Sonifier (Branson Sonifier Power, Danbury, USA) sonifiziert. Danach wurden die Proben erneut 5 min lang gekocht und anschließend sofort auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 2.9: Zusammensetzung des 4 x Probenpuffers nach Laemmli. Zur Herstellung des verwendeten 2 x Puffers wurde 1:1 mit H₂O dest. verdünnt.

Puffer	Zusammensetzung
4 x Probenpuffer	12,5 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8 20 ml Glycerin 17,5 ml H ₂ Odest. 4 g SDS 25 mg Bromphenolblau 10 % β -Mercaptoethanol vor Gebrauch frisch dazugeben.

2.2.2.2 Herstellung von Kernextrakten

Zur Untersuchung der Translokation verschiedener Proteine vom Cytosol in den Zellkern wurden die Zellen lysiert und in Cytosol- und Kernfraktion getrennt. Pro Probe wurde eine 15 cm-Petrischale mit 3×10^6 Zellen ausgesät, und die am nächsten Tag noch proliferierenden Zellen für eine Dauer von 16 h mit $1 \mu\text{M}$ BPDE behandelt. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Abschaben in 10 ml eiskaltem $1 \times \text{PBS}$ pro Schale und anschließender Zentrifugation bei 1500 rpm und 4°C . Das Pellet wurde zweimal in 5 ml eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 500 μl Puffer A (hypotonisch, Tabelle 2.10) resuspendiert. 50 μl wurden davon als Input abgenommen, 1:1 mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden für 25 min auf Eis schwellen gelassen, dann wurde NP40 in einer Endkonzentration von 0,5 % hinzugegeben und zehn Sekunden gevortext; dies dient dem Aufschluss der Zellmembran. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 3000 rpm und 4°C wurden die Kerne pelletiert. Der Überstand enthielt die cytosolische Fraktion und wurde nach einem weiteren Zentrifugationsschritt zur Entfernung etwaiger Kernreste 1:1 mit $2 \times \text{Laemmli}$ versetzt, 5 min bei 95°C auf dem Heizblock erhitzt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Das Pellet wurde dreimal in Puffer A ohne NP40 gewaschen und dann in 100 μl Puffer B resuspendiert. Zur Lyse der Kernmembran wurde NP40 in einer Endkonzentration von 1 % hinzugefügt, die Probe wurde zehn Sekunden gevortext und 30 min auf Eis bei 500 rpm geschüttelt (KS10, Edmund Bühler Laborgerätebau, Glasbau, Umwelttechnik). Durch einen erneuten Zentrifugationsschritt bei 3000 rpm und 4°C wurden Membranfragmente u.ä. pelletiert. Der Überstand enthielt die gelösten Kernproteine und wurde ebenfalls 1:1 in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die Proben wurden anschließend im Western Blot untersucht.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.10: Zusammensetzung der Puffer für die Kernextraktion mit NP40. DTT und der Protease-Inhibitor-Mix wurden jeweils erst kurz vor Gebrauch zugegeben.

Puffer A	Puffer B
10 mM Hepes	20 mM Hepes
10 mM KCl	400 mM NaCl
0,1 mM EDTA	1 mM EDTA
1 mM DTT	1 mM DTT
1 x Protease-Inhibitor-Mix	1 x Protease-Inhibitor-Mix

2.2.2.3 Isolierung von Mitochondrien aus Zelllysaten

Zur Untersuchung von Translokationen verschiedener Proteine in oder aus den Mitochondrien wurden diese mit einem Kit der Firma Imgenex isoliert. Hierzu wurden pro Probe zwei 15 cm-Petrischalen mit 3×10^6 Zellen ausgesät und die am Folgetag proliferierenden Zellen mit $1 \mu\text{M}$ BPDE behandelt. Die Mitochondrienisolierung wurde mit Ausnahme des Zellaufschlusses gemäß der Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Hersteller empfiehlt den Aufschluss mit einem Pestle-Homogenizer mit 30-50 Stößen, dies führte jedoch nicht zum Aufschluss der Zellen. Dieser wurde mittels Trypanblau-Färbung überprüft. Der Farbstoff lagert sich nur in Zellen mit beschädigter Membran ein und führt zu deren Blaufärbung, intakte Zellen erscheinen bei Betrachtung im Lichtmikroskop weiß. Alternativ wurden die Zellen durch wiederholtes Aufziehen (ca. 50 x) durch G26 Kanüle aufgeschlossen.

Mit den nach Durchführung des Protokolls erhaltenen Cytosol- und Mitochondrienfraktionen wurde zur Proteinbestimmung ein BCA-Assay durchgeführt und die Proben so mit Laemmli-Probenpuffer verdünnt, dass sie gleiche Proteinmengen enthielten.

2.2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration mit BCA-Assay

Um die Konzentration von Proteinen in wässriger Lösung zu bestimmen wurde der BCA-Assay verwendet. Dieser Assay beruht auf einer Zwei-Schritt-Reaktion, in der zunächst die Proteine Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert werden. Das BCA-Reagenz (Bichinoninsäure) bildet im zweiten Reaktionsschritt mit Cu(I) einen violetten Farbkomplex, dessen Absorption bei 568 nm im ELISA-Reader detektiert werden kann. Um aus der gemessenen Absorption der Proben die Proteinmenge zu ermitteln wurde bei jeder Messung eine BSA-Standardreihe mitgeführt, anhand derer eine Eichgerade aufgestellt und die Proteinkonzentration der Probe berechnet wurde.

Es wurden 10 μl Standard in Doppelbestimmung oder 2 μl Probe in eine 96-well-Platte vorgelegt und 200 μl BCA-Reagenz bestehend aus 20 μl 4 % CuSO_4 pro ml BCA-Reagenz hinzugefügt. Die Platte wurde mit Folie verschlossen und dann 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 568 nm gemessen und daraus die Proteinkonzentration der Probe berechnet.

2.2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der im Zellysate enthaltenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli, 1970, verwendet. Bei diesem Verfahren wird ein Polyacrylamidgel eingesetzt, das aus einem grobmaschigen 4 % igen Sammelgel, welches zur Aufkonzentrierung der Proben dient, und einem engmaschigen 6-15 % Trenngel, in dem die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden, besteht. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde in jedem Gel ein Größenmarker (PageRuler, Fermentas) mitgeführt. Die Elektrophorese findet dabei unter denaturierenden Bedingungen statt, um Effekte der Faltung der Proteine auf die Laufgeschwindigkeit zu unterbinden. Als reduzierendes Agens diente hierbei β -Mercaptoethanol. Durch Verwendung von SDS werden die Proteine stark negativ geladen, so dass sie im elektrischen Feld zur Anode wandern und die Eigenladung die Laufgeschwindigkeit im Gel nicht beeinflusst. Die Gelelektrophorese erfolgte im Laufpuffer mit dem vertikalen Gelelektrophoresesystem von Bio-Rad, München bei 170 V

2. Material und Methoden

bis die Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte. Die Zusammensetzung der Puffer und Gele ist in Tabelle 2.11 aufgeführt.

Tabelle 2.11: Zusammensetzung der Puffer und Gele für SDS PAGE

Gel/Puffer	Zusammensetzung
4 % Sammelgel (10 ml)	7,5 ml H ₂ O dest 1,7 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8) 0,625 ml 2 M Tris pH 6,8 0,1 ml 10 % SDS 0,01 ml 10 % APS 0,001 ml TEMED
6 % Trenngel (10 ml)	6 ml H ₂ O 2 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8) 1,88 ml 2 M Tris pH 8,8 0,1 ml 10 % SDS 0,01 ml APS 0,001 ml TEMED
10 % Trenngel (10 ml)	7,5 ml H ₂ O 3,3 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8) 1,88 ml 2 M Tris pH 8,8 0,1 ml 10 % SDS 0,01 ml 10 % APS 0,001 ml TEMED

2. Material und Methoden

12 % Trenngel (10 ml)	4 ml H ₂ O 4 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8) 1,88 ml 2 M Tris pH 8,8 0,1 ml 10 % SDS 0,01 ml 10 % APS 0,001 ml TEMED
Laufpuffer nach Laemmli	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS

2.2.2.6 Western Blot

Zum immunologischen Nachweis der Proteine mussten diese aus dem Acrylamid-Gel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen werden. Dies erfolgte mit dem Nassblotverfahren nach Hermann und Wiche, 1987 im Tankblotsystem von Bio-Rad, München. Hierzu wurde die Membran zur Proteinbindung zunächst in 100 % Methanol aktiviert und dann nach dem in Abbildung 2.12 gezeigten Schema mit dem Gel als „Blotsandwich“ in eine Blotkassette gepresst. Diese wurde in einen mit einem Kühlakku versehenen und mit vorgekühltem Blotpuffer (Tabelle 2.2.2.3) gefüllten Tank gestellt. Zum Proteintransfer aus dem Gel auf die Membran wurde für die Dauer von einer Stunde eine Spannung von 100 V angelegt.

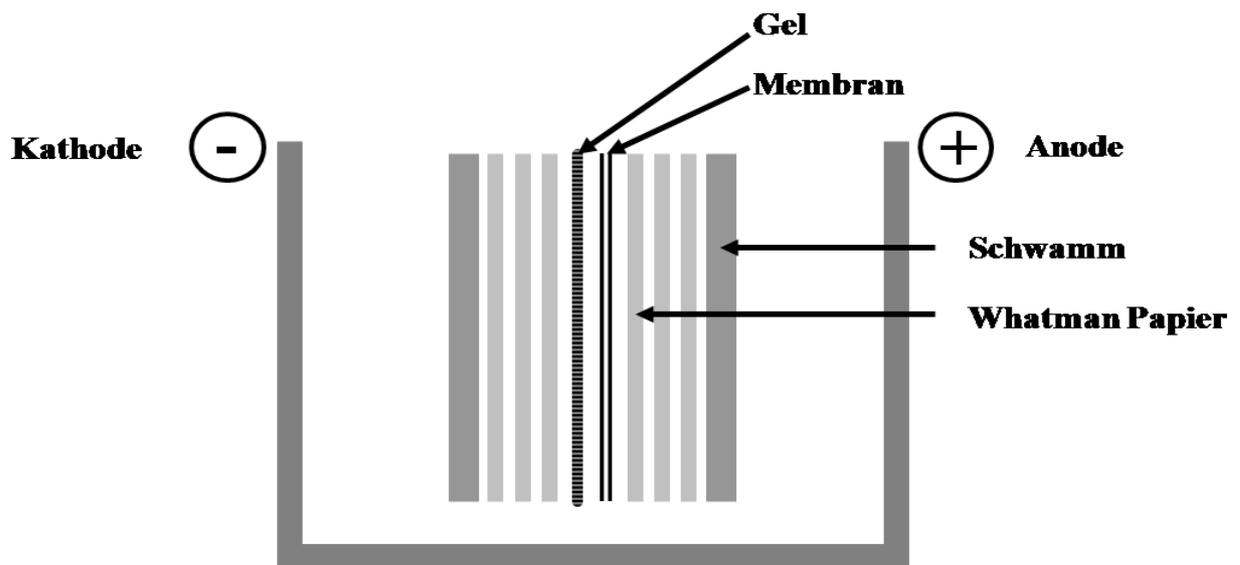


Abbildung 2.1: Aufbau eines Blotsandwiches. Verändert nach Georgia Institute of Technology, School of Biomedical Engineering

Tabelle 2.12: Zusammensetzung des Blotpuffers

Puffer	Zusammensetzung
Blotpuffer	200 mM Glycin
	25 mM Tris-Base
	20% Methanol

2.2.2.7 Antikörperinkubation und chemilumineszenzbasierende Detektion der Protein-Antikörperkomplexe

Nach dem Blotvorgang wurde die Membran für eine Stunde in 5% Milchpulver in TBST (Tabelle 2.13) durch Schwenken bei Raumtemperatur zur Absättigung unspezifischer Bindungen geblockt. Die Membran wurde anschließend zweimal für 15 min in TBST auf dem Schüttelinkubator bei Raumtemperatur gewaschen.

Die so geblockte Membran wurde nun mit den Primärantikörpern je nach Antikörper (siehe auch 2.1.4) in 5% Milchpulver/TBST oder 3% BSA/TBST in Folie eingeschweißt und über

2. Material und Methoden

Nacht bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für 15 min in TBST erfolgte die Inkubation mit dem zur späteren Detektion mit Meerrettichperoxidase gekoppelten Zweitantikörper in 5 % Milch/TBST, ebenfalls in Folie eingeschweißt und für eine Stunde unter Schwenken bei Raumtemperatur. Danach erfolgten wiederum zwei Waschschrte in TBST für jeweils 15 min.

Tabelle 2.13: Zusammensetzung der Puffer zur Antikörperinkubation

Puffer	Zusammensetzung
Blockierungslösung	5 % Milchpulver in 1xTBST
Lösung zur Antikörperinkubation	5 % Milchpulver oder 3 % BSA in 1xTBST
1 x TBST:	20 mM Tris-Base 150 mM NaCl pH 7,6 0,01 % Tween 20

Die Detektion des gewünschten Proteins erfolgte mit ECL (enhanced chemiluminescence) Western Blot Detektionslösung von GE Healthcare, Freiburg, die gemäß der Angaben des Herstellers im Verhältnis 1:1 aus den beiden ECL-Komponenten hergestellt und sofort auf die Membran aufgetropft wurde. Nach ca. einminütiger Inkubation wurde die überschüssige ECL abgenommen und im Rotlicht ein lichtempfindlicher Film auf die Membran aufgelegt. Die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase oxidiert das im ECL enthaltene Substrat Luminol unter Entstehung von Chemilumineszenz, die mit einem lichtempfindlichen Film detektiert werden kann. Der Film wurde anschließend im Dunkeln in Entwicklerlösung geschwenkt, bis Banden sichtbar wurden, kurz in destilliertem Wasser gewaschen und dann mit Fixierer fixiert.

2.2.2.8 Entfernen von Antikörpern von der Membran („Stripping“)

Antikörper können wieder von der Membran entfernt werden, z.B. um nach der Menge an phosphoryliertem Protein auch die gesamte Menge des jeweiligen Proteins zu bestimmen. Dies geschah mittels des passenden pan-Protein Antikörper, der sowohl phosphoryliertes als auch nicht phosphoryliertes Protein erkennt. Dazu wird die Membran für 30 min in Stripping Buffer (Tabelle 2.14) bei 50 °C im Wasserbad geschwenkt. Nach zweimaligem Waschen für 15 min in TBST kann die Membran nun erneut geblockt und wie unter 2.2.2.4 beschrieben mit Antikörper inkubiert werden.

Tabelle 2.14: Zusammensetzung des Stripping Buffers

Puffer	Zusammensetzung
Stripping Buffer	62,5 mM Tris pH 7,6 0,5% SDS direkt vor Gebrauch pro 100 ml Puffer 713 µl β-Mercaptoethanol zugeben.

2.2.3 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie

Die Zellzyklusuntersuchungen erfolgten mit Hilfe eines Durchflusszytometers (LSR, Becton Dickinson). Hierfür wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen und die Kulturschale mit 1 x PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 ml Trypsin vom Boden abgelöst, in 3 ml Medium aufgenommen und in ein 15 ml Falcon überführt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden bei 4 °C und 1500 rpm für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellen anschließend auf dem Vortex (Bender & Holbein AG, Zürich) bei Stufe 2 durch tropfenweise Zugabe von 3 ml eiskaltem reinem Ethanol fixiert. Um den Fixiervorgang abzuschließen wurden sie über Nacht bei -20 °C gelagert.

2. Material und Methoden

Die fixierten Zellen wurden dann für 5 min bei 4 °C und 1500 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 500 µl Cystain DNA-Färbelösung aufgenommen. Die DNA-Färbung erfolgte wiederum über Nacht lichtgeschützt bei 4 °C.

Die gefärbten Zellen wurden am Durchflusszytometer auf ihre Zellzyklusverteilung hin untersucht. Das Messprinzip beruht hierbei auf der DNA-Färbung mit DAPI, einem fluoreszierenden DNA-Interkalator. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur DNA-Menge, so dass durch Auftragen der gezählten Zellen gegen ihre Fluoreszenzintensität ein so genanntes Zellzyklusprofil entsteht, das Aufschluss über die Anteile der gemessenen Zellen an den einzelnen Zellzyklusphasen gibt (Abbildung 2.2). Die verwendete Software cell quest pro (BD) berechnet dabei den prozentualen Anteil der einzelnen Zellzyklusphasen am gesamten Zellzyklus.

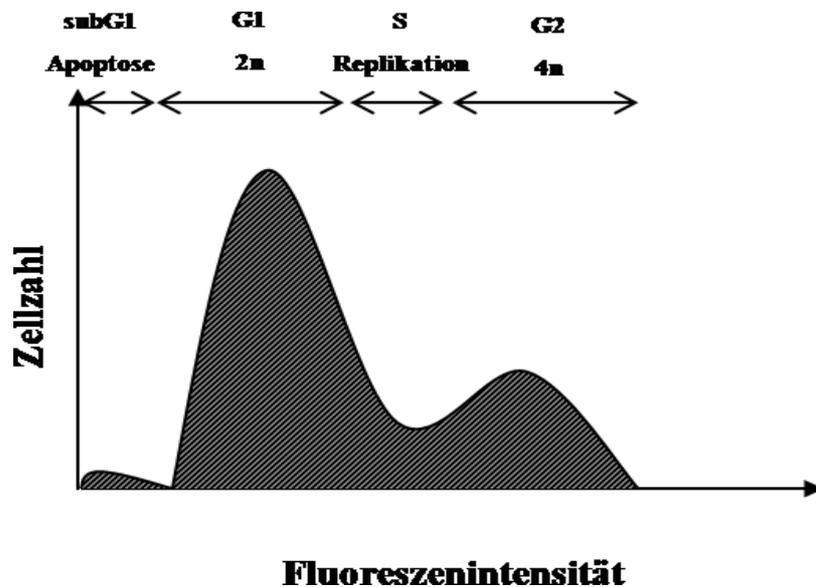


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines Zellzyklusprofils

2.2.4 Mikroskopische Apoptoseanalyse mittels Hoechst-Färbung in lebenden Zellen

Die Versuche wurden im 96-well-Format als Dreifachbestimmung durchgeführt und die Zellen nach der angegebenen Behandlungszeit für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit 10 µM Hoechst gefärbt. Mit einem Mikroskop IX81 der Firma Olympus wurden

2. Material und Methoden

sowohl im Hellfeld- als auch Hoechstkanal pro well vier Bildausschnitte mit 20facher Vergrößerung aufgenommen.

Ein Merkmal der Apoptose ist die Kondensierung und Fragmentierung der chromosomalen DNA, dies kann nach Färbung der DNA mit dem DNA-Interkalator Hoechst mit dem Mikroskop beobachtet werden. Dabei zeichnen sich die Kerne apoptotischer im Vergleich zu lebenden Zellen durch eine stärkere Fluoreszenz sowie geringere Größe aus. Diese Parameter konnten in einem automatisierten Verfahren mit der Software ScanR-Analys (Olympus) erfasst und ausgewertet werden, wobei einerseits die Gesamtzellzahl und andererseits die Anzahl apoptotischer Zellen mit höherer Fluoreszenzintensität im analysierten Bildausschnitt ermittelt wurde (Abbildung 2.3).

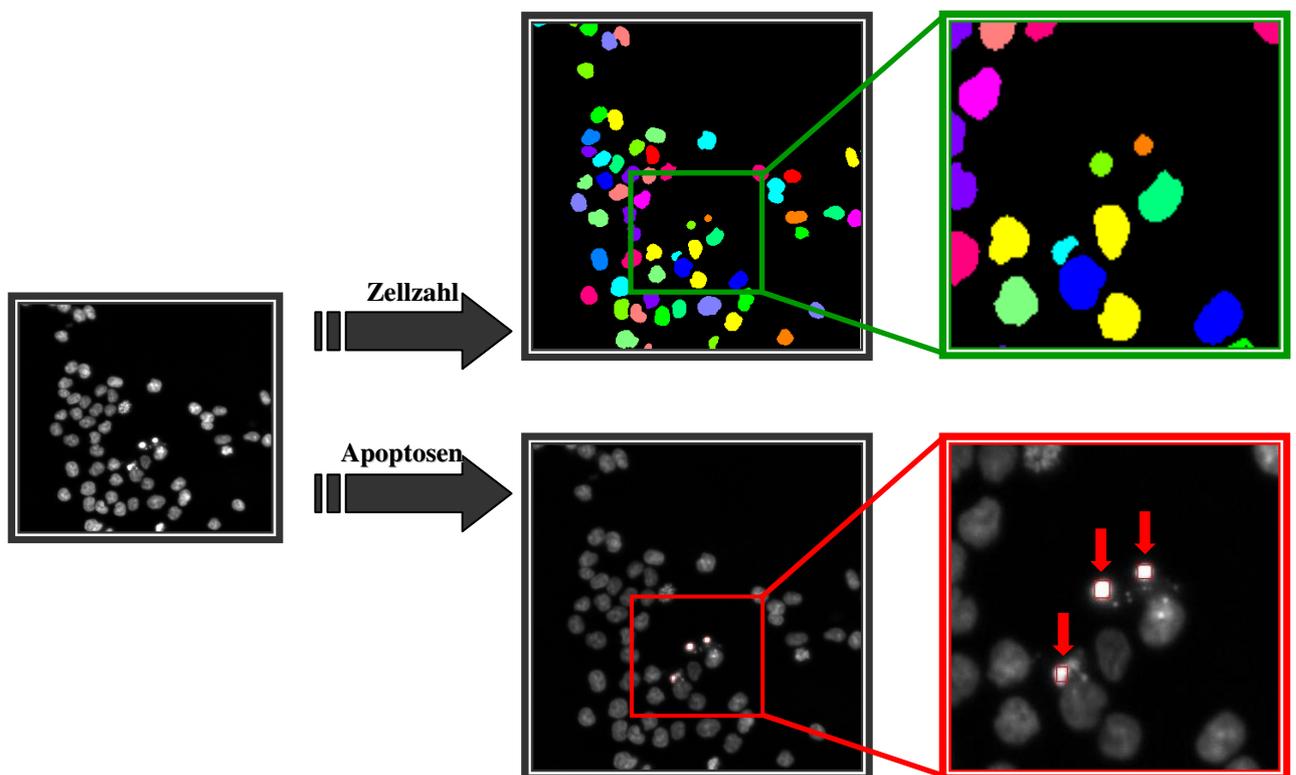


Abbildung 2.3: Bestimmung von Zellzahl und Apoptoserate durch Hoechstfärbung und Auswertung mikroskopischer Aufnahmen mit der ScanR Software.

2. Material und Methoden

Um Apoptosen von Nekrosen zu unterscheiden, wurde zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PI) gefärbt. Es handelt sich dabei ebenfalls um einen DNA-Interkalator, der jedoch im Gegensatz zu Hoechst nicht die intakte Zellmembran zu passieren vermag. Daher werden hierbei nur solche Zellen angefärbt, deren Membran geschädigt ist. Dies tritt in spätapoptotischen und bei nekrotischen Zellen auf, so dass mit einer Hoechst-PI-Doppelfärbung gesunde (nur Hoechst-gefärbt, DNA nicht kondensiert), frühapoptotische (nur Hoechst-gefärbt, kondensierte DNA) und spätapoptotische bzw. nekrotische Zellen (Hoechst- und PI-gefärbt) voneinander unterschieden werden können. Die Färbung erfolgte parallel mit der Hoechstfärbung in einer Konzentration von 240 μM und konnte im cfp-Kanal detektiert werden.

2.2.5 Bestimmung der Mitoserate anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen Hoechst-gefärbter Zellen

Die Mitoserate wurde anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen per Hand ausgezählt. Mitotische Zellen sind klar zu erkennen (Abbildung 2.4), da die kondensierten Chromosomen in den verschiedenen Phasen der Apoptose gut von den Interphase-Kernen gesunder Zellen und den apoptotischen Zellkernen zu unterscheiden sind.

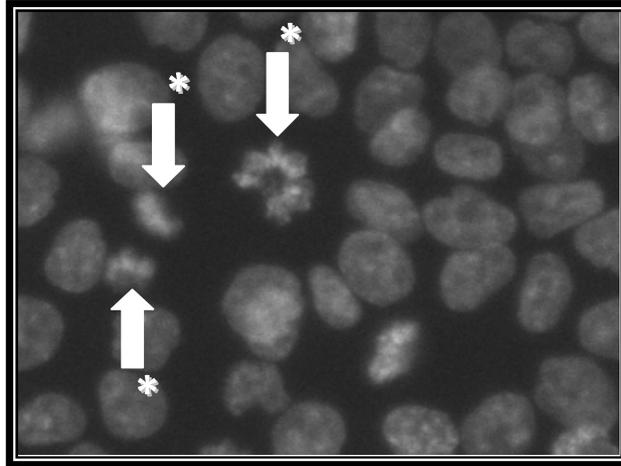


Abbildung 2.4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Hoechst-gefärbter Zellen. Die Mitosen sind mit Pfeilen hervorgehoben, * markiert eine Zelle, in der gerade die Chromosomen zu den Spindelpolen gezogen werden, ** zeigt sich kondensierende Chromosomen.

2.2.6 CaspaseGlo® 3/7 Assay (Promega)

Der CaspaseGlo® 3/7 Assay der Firma Promega ist ein Lumineszenz-basierender Assay zur Bestimmung der Caspase 3/7 Aktivität in Säugerzellkultur. Im gelieferten Reagenz sind ein Detergenz, ein prolyuminogenes Caspase 3/7-Substrat sowie Luciferase enthalten. Das Caspase 3/7 Substrat enthält die Tetrapeptidsequenz DEVD als Caspase-Schnittstelle. Das Reagenz führt bei Zugabe zum Medium ins Kulturgefäß zur Zellyse. Die aus der Zelle freigesetzten Caspasen spalten das Substrat, wobei das Luciferasesubstrat Aminoluciferin entsteht. Die ebenfalls im Reagenz enthaltene Luciferase generiert dann ein über lange Zeit stabiles Lumineszenzsignal (Abb. 2.5). Die Lumineszenz ist dabei proportional zur vorhandenen Caspaseaktivität und kann deshalb als Maß für caspaseabhängige Apoptose verwendet werden.

Der Assay wurde im 96-well-Format gemäß der Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurde zunächst das lyophilisierte Substrat im mitgelieferten Puffer gelöst und dieses dann zu den im well befindlichen, auf Raumtemperatur abgekühlten Zellen im Verhältnis 1:1 zum Mediumvolumen hinzugegeben. Nach 30-sekündigem Schütteln

2. Material und Methoden

(300 rpm) zur Zellyse wurde alle 10 min für 10 Sekunden die Lumineszenz über einen Zeitraum von 3 h hinweg gemessen. Zur Auswertung wurde der Messzeitpunkt mit der maximalen Lumineszenz verwendet, welcher bei etwa 1,5 h lag. Jeder Versuch wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt.

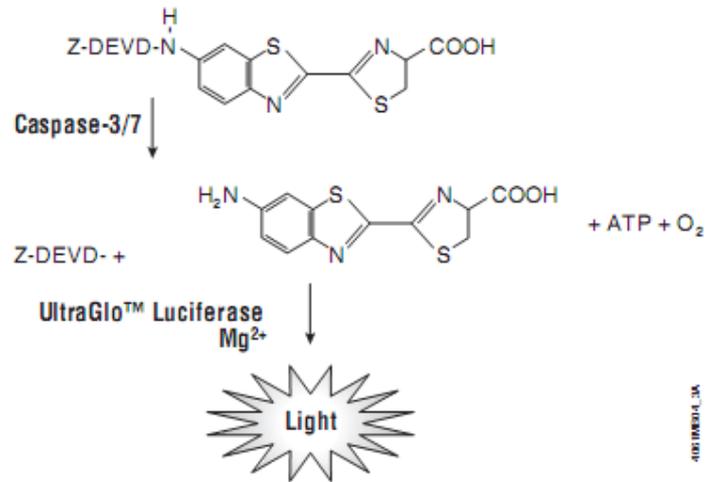


Abbildung 2.5: Prinzip des Caspase-Glo® 3/7 Assays, nach Promega, technical bulletin caspase 3/7 assay, 2006

3 Ergebnisse

Wie bereits in der Einleitung erläutert kann die Exposition mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) bei Tier und Mensch zur Entstehung von Krebs führen. Die Toxizität kommt dabei primär durch Zwischenprodukte des Fremdstoffmetabolismus zustande (Rubin H 2001). Die Zelle kann auf derartige Stresssignale in unterschiedlicher Weise reagieren, um entweder den entstandenen Schaden zu beheben oder die geschädigte Zelle als Risikofaktor für Kanzerogenese zu eliminieren (Zhou BB und Elledge SJ 2000; Roos WP und Kaina B 2006). Um die Wirkungen der PAK zu studieren, wurden detaillierte Untersuchungen an der Modellsubstanz Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-Epoxid (BPDE) durchgeführt, das als ultimatives Kanzerogen aus dem Metabolismus der Muttersubstanz Benzo[a]pyren (B[a]P) entsteht. Dabei wurde der Fokus auf Apoptose, Proliferation und Zellzyklus sowie der damit verbundenen Signalwege gelegt und besonders die Dosisabhängigkeit der zellulären Antwort genauer betrachtet. Im letzten Teil der Arbeit wurden zwei weitere PAK, Dibenzo[a,l]pyren-Diolepoxid (DBPDE) und Benzo[c]Phenanthren-Diolepoxid (BPhenDE), in ausgewählten Experimenten mit BPDE verglichen, um die Anwendbarkeit der in den BPDE-Studien gewonnenen Erkenntnisse auf andere PAK zu überprüfen. Da der Hauptaufnahmeweg der PAK, wie zuvor erwähnt, über Nahrungsmittel verläuft, wurde als Zellmodell für alle Versuche die humane Kolonkarzinomzelllinie Hct116 gewählt.

3.1 BPDE verursacht eine Verminderung der Zellzahl

BPDE führt in der murinen Leberzelllinie Hepa1c1c7 nach 25 h ab einer Dosis von 0,5 μM zu einer starken Verringerung der Lebendzellzahl (Solhaug A *et al.* 2005), während sowohl humane nicht transformierte Lungenzellen (SAE) als auch die Lungenkarzinomzelllinie A549 auch nach zwei Tagen keine verminderte Anzahl adhärenter Zellen nach BPDE-Dosen von bis zu 10 μM zeigten (Jyonouchi H *et al.* 1999). Um die Wirkungen von BPDE auf Hct116-Zellen zu untersuchen wurden zunächst die Zellzahlen BPDE-behandelter Zellen mit denen der Lösungsmittelkontrolle DMSO verglichen. Dazu wurden die Zellen für einen Zeitraum von 24 h mit unterschiedlichen BPDE-Konzentrationen oder DMSO behandelt. Die lebenden Zellen wurden daraufhin 15 min mit dem fluoreszierenden DNA-

3. Ergebnisse

Farbstoff Hoechst gefärbt und durch ein automatisiertes Mikroskop Aufnahmen der fluoreszierenden Kerne gemacht. Die Zellzahl aus je vier Bildausschnitten von drei wells wurde anhand der ScanR-Software bestimmt, die die fluoreszierenden Kerne anhand der Form des Fluoreszenzsignals erfassen kann. Wie in Abbildung 3.1 dargestellt reduziert die BPDE-Behandlung die Zellzahl bereits bei einer Konzentration von 0,5 μM auf ca. 50 % der Kontrolle. Erhöhung der Konzentrationen auf 1 und 2 μM führten zu keiner weiteren Reduktion.

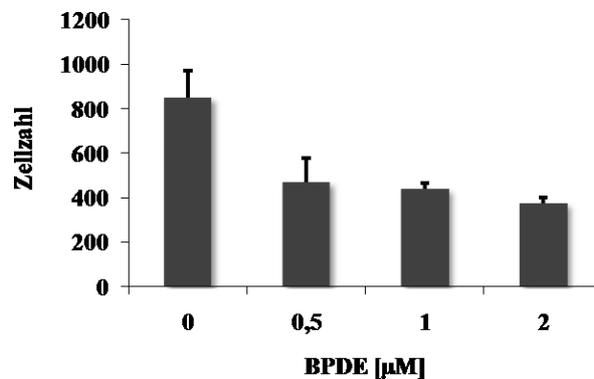


Abbildung 3.1: BPDE-Behandlung führt zu einer reduzierten Zellzahl.

Die Zellen wurden mit einer Startzellzahl von 8000 Zellen pro well in einer 96-well-Platte ausgesät und am Folgetag mit unterschiedlichen BPDE-Konzentrationen behandelt. Nach 24 h erfolgte die Zellzahlbestimmung anhand von Hoechst-Färbung der unfixierten Zellen, unmittelbar anschließender Aufnahme fluoreszenzmikroskopischer Bilder und deren Auswertung mittels der ScanR Software. Es ist ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

Eine Abnahme der Zellzahl kann unterschiedliche Ursachen haben. Zum Einen kann BPDE ein Absterben der Zellen induzieren und so die Zellzahl verringern, zum Anderen kann dem beobachteten Effekt eine verminderte Proliferation zu Grunde liegen. Zunächst wurde die Möglichkeit des Absterbens der Zellen untersucht, da in Mauszellen bereits Apoptose und in geringerem Maß auch Nekrose als Konsequenzen nachgewiesen werden konnten (Solhaug A *et al.* 2005).

3.2 BPDE induziert in Hct116 Apoptose, aber nicht Nekrose

Eine Art des Zelltods stellt die Apoptose dar. Dieser Prozess ist komplex reguliert und kann durch unterschiedliche Methoden auf mehreren Ebenen nachgewiesen werden. Ein Merkmal der Apoptose ist die Kondensierung des Chromatins, welche mit dem Hoechst-Assay nachgewiesen und quantifiziert wurde. In Abbildung 3.2A sind repräsentative Bilder des Hoechst-Assays dargestellt. Im Hellfeld ist die verringerte Zellzahl in BPDE-behandelten Proben zu erkennen. Während die Mehrheit der DMSO-behandelten Zellen sich auf dem Boden des Kulturgefäßes ausbreiten, sind deutlich mehr abgerundete, sich vom Kulturschalenboden ablösende Zellen in den BPDE-behandelten Proben vorhanden. Die Bilder im Hoechstkanal zeigen eine deutliche Erhöhung des Anteils an apoptotischen Kernen mit kondensierter und fragmentierter DNA in BPDE-behandelten Zellen. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen in der murinen Leberzelllinie Hepa1c1c7 (Solhaug A *et al.* 2005). Eine weitere, von Apoptose abzugrenzende Art des Zelltods stellt die Nekrose dar, die im Allgemeinen weniger kontrolliert und meist ohne Chromatinkondensierung und Kernfragmentierung abläuft. Im Unterschied zur Apoptose kommt es hierbei zum frühen Verlust der Membranintegrität, was zum spezifischen Nachweis der Nekrose genutzt werden kann. Die BPDE-Muttersubstanz B[a]P löst in der humanen Leberkarzinomzelllinie HepG2 durch PARP-abhängige NAD⁺-Depletion Nekrose aus (Lin T und Yang MS 2008). Um auch eine mögliche BPDE-bedingte Nekrose in den Hct116-Zellen zu erfassen, wurde als zusätzlicher Fluoreszenzmarker Propidiumiodid (PI) eingesetzt. Dabei handelt es sich ebenfalls um einen DNA-Farbstoff, der jedoch ausschließlich in Zellen mit beschädigter Membran eindringen kann. Während in frühapoptotischen Zellen die Membran noch intakt ist, kommt es bei der späten Apoptose sowie der Nekrose zum Verlust der Membranintegrität. PI kann in solche Zellen eindringen und an die DNA binden, so dass sie anhand des PI-Signals fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden können. Bei Hct116 konnte jedoch unter den getesteten Bedingungen nach BPDE im PI-Kanal kein Zuwachs an nekrotischen Zellen verzeichnet werden (Abbildung 3.2A).

In Abbildung 3.2B ist die Quantifizierung des Experiments dargestellt. Die Apoptoserate erreicht bereits bei 0,5 µM einen Anteil von 33,4 % der Gesamtzellzahl. Interessanterweise geht die Apoptoserate bei den höheren Konzentrationen wieder zurück auf 14,5 % bei

3. Ergebnisse

1 μM bzw. 6 % bei 2 μM , so dass die vergleichbaren Zellzahlen der untersuchten Konzentrationen (Abbildung 3.1) nicht mit Apoptose allein erklärt werden können. Wie in Abbildung 3.2B dargestellt konnte jedoch keine BPDE-abhängige Nekrose nachgewiesen werden. Der maximale prozentuale Anteil lag nach 0,5 μM BPDE bei 0,62 %. Dieser geringe Anteil an PI-positiven Zellen ist vermutlich auf basale Nekrose sowie spätapoptotische Zellen zurückzuführen, die ebenfalls die Membranintegrität verlieren und für PI durchlässig werden.

3. Ergebnisse

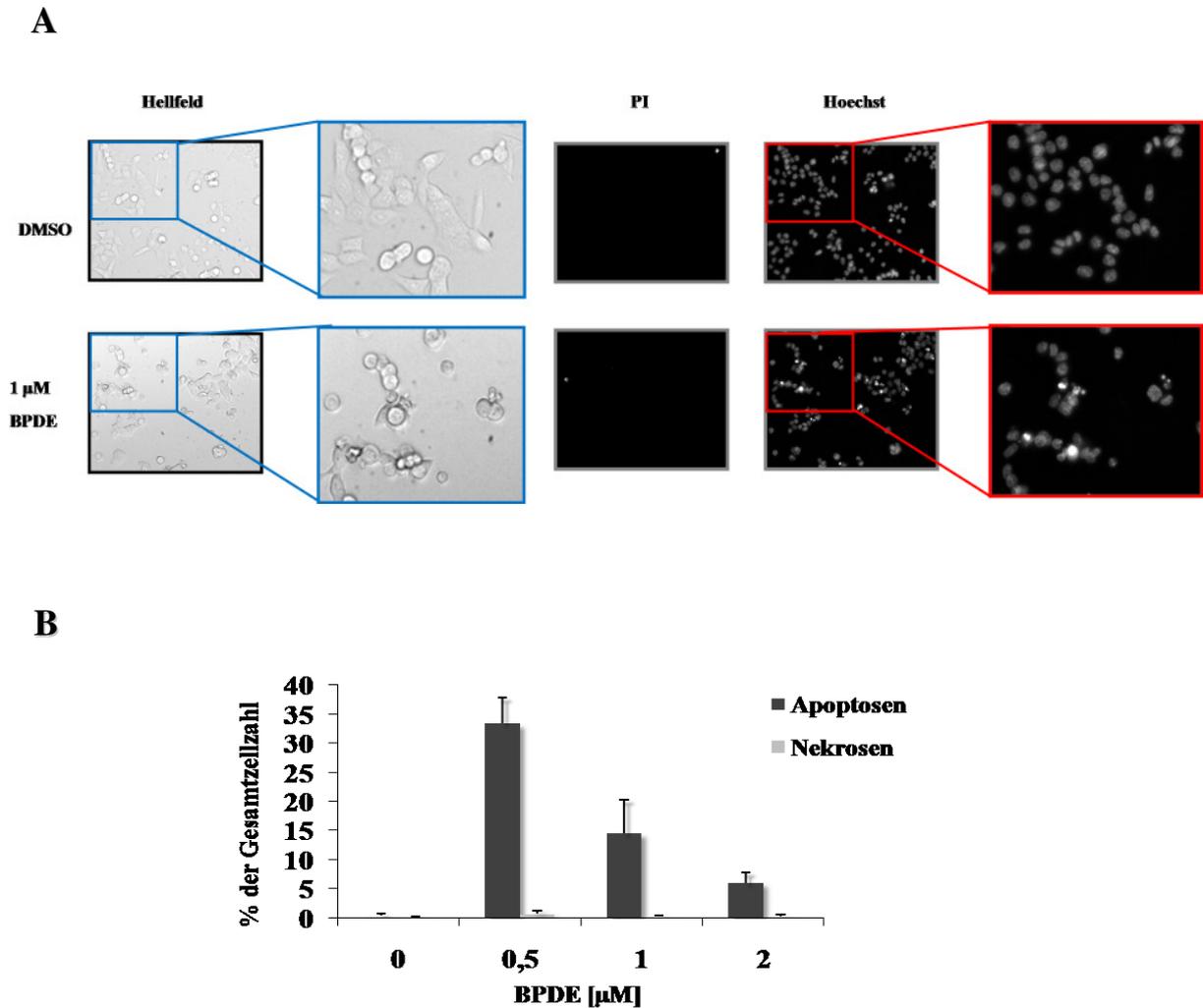


Abbildung 3.2: BPDE löst in Hct116 Apoptose, aber nicht Nekrose aus.

Proliferierende Hct116 wurden für 24 h mit unterschiedlichen BPDE-Konzentrationen behandelt.

A: Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen von mit Hoechst und PI gefärbten Hct116-Zellen nach 1 µM BPDE- oder Kontrollbehandlung

B: Prozentualer Anteil an apoptotischen und nekrotischen Zellen

Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgte mittels der ScanR Software anhand mikroskopischer Aufnahmen der mit Hoechst und PI angefärbten Zellen. Es ist ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

BPDE verursacht also Apoptose in Hct116. Die Frage, wie es trotz der geringeren Apoptoserate bei 1 und 2 µM im Vergleich zu 0,5 µM BPDE zu einem vergleichbaren

Abfall der Zellzahl kommt, konnte nicht mit bei höheren Konzentrationen auftretender Nekrose erklärt werden. Doch bevor weitere mögliche Ursachen dieses Phänomens geklärt werden, möchte ich zunächst die Mechanismen der BPDE-induzierten Apoptose näher untersuchen.

3.3 Die BPDE-induzierte Apoptose ist abhängig von Caspasen und es sind sowohl extrinsische als auch intrinsische Komponenten involviert

Die beobachtete Kondensierung der DNA im Rahmen der Apoptose kann durch den klassischen Apoptoseweg ausgelöst werden. Hierbei wird eine Kaskade von Caspasen aktiviert, die die so genannte CAD (Caspase-aktivierte DNase) im Kern aktivieren, die wiederum die DNA fragmentiert (Nagata S *et al.* 2003). Die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 beim BPDE-induzierten Zelltod konnte in Hct116 bereits nachgewiesen werden (Hockley SL *et al.* 2008). Um dies zu bestätigen, wurde ihre Aktivierung mittels eines lumineszenzbasierenden Assays untersucht. In Einklang mit Hockley *et al.* ist in Abbildung 3.3A klar zu erkennen, dass nach 16 h eine Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 stattgefunden hat.

Es gibt zwei Caspase-abhängige Apoptosewege, den intrinsischen und den extrinsischen, die sich in den am Anfang der Kaskade stehenden so genannten Initiatorcaspasen unterscheiden (Abbildung 1.2). Zu Beginn des extrinsischen Weges steht die Caspase 8. Wie in Abbildung 3.3B dargestellt kann nach 16-stündiger BPDE-Behandlung das Spaltprodukt der Caspase 8 nachgewiesen werden. Der intrinsische Apoptoseweg wird durch Caspase 9 eingeleitet, und aus Abbildung 3.3B ist auch deren Aktivierung ersichtlich. Übereinstimmend mit den Ergebnissen des Hoechst-Assays ist die Aktivität sowohl der extrinsischen als auch intrinsischen Caspasen bei 0,5 μ M maximal und geht bei höheren Dosen wieder zurück (Abb. 3.3A und B).

Bei PARP handelt es sich um ein Substrat der Caspasen, das in gesunden Zellen an der DNA-Reparatur beteiligt ist und während der Apoptose durch Caspase 3-abhängige Spaltung inaktiviert wird (Boulares AH *et al.* 1999; Woodhouse BC und Dianov GL 2008). Auch BPDE-induzierte PARP-Spaltprodukte konnten im Western Blot nachgewiesen werden, die Dosisabhängigkeit verhält sich hierbei wie bei den Caspasen (Abbildung 3.3B).

3. Ergebnisse

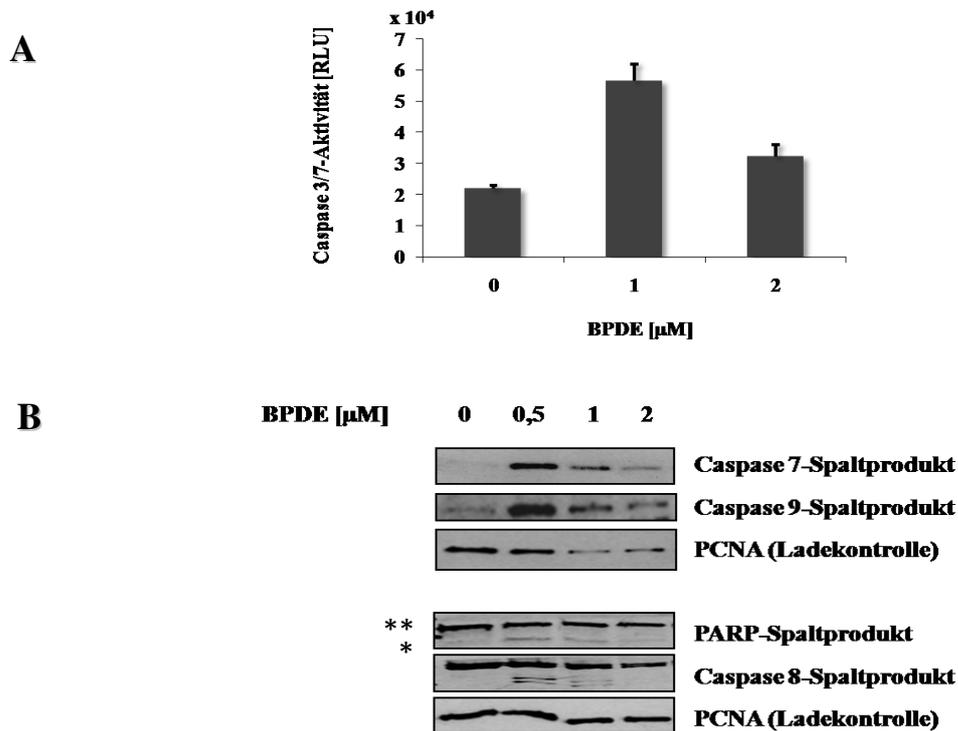


Abbildung 3.3: BPDE führt zur Aktivierung von Komponenten des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges.

Proliferierende Hct116 wurden 16 h mit unterschiedlichen BPDE-Konzentrationen behandelt. Der Nachweis von Apoptose erfolgte mittels des CaspaseGlo Assays (Promega) anhand von Lumineszenzmessung (A) und des Western Blots mit spezifischen Antikörpern gegen PARP- und Caspase-Spaltprodukte (B). Bei PARP ist oben das ungeschnittene Protein mit einer Größe von 116 kDa (**), unten das Spaltprodukt mit 89 kDa (*) zu sehen. Es ist ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

Um die Caspaseabhängigkeit der BPDE-induzierten Apoptose zu bestätigen wurde der pan-Caspase-Inhibitor ZVAD im Hoechst-Assay eingesetzt (Abbildung 3.4.A). Mit dem Inhibitor vorbehandelte Zellen zeigen kaum BPDE-bedingte Apoptose, während mit dem Lösungsmittel DMSO vorbehandelte Kontrollzellen nach BPDE-Behandlung wie zuvor gezeigt eine hohe Apoptoserate aufweisen.

Im Lauf der Apoptose kommt es zunächst zur Kondensierung einzelner, häufig am Rand des Kerns gelegener DNA-Bereiche. Hierbei wird die DNA in 50-300 kB große Fragmente

3. Ergebnisse

gespalten, die von der Kernmatrix abgeschnittenene DNA-Schleifen darstellen (Lagarkova MA *et al.* 1995). Erst später kommt es zur vollständigen Kondensierung und Fragmentierung der DNA, der so genannten internukleosomalen Spaltung, aus der oligonukleosomale DNA-Fragmente entstehen (Wildlak P und Garrard WT 2005). Der frühe Phänotyp kommt dadurch zustande, dass anfangs die äußeren Bereiche der DNA am besten für Nukleasen zugänglich sind, die mit der Kernlamina interagieren. Werden diese abgebaut, bricht das Chromatingerüst zusammen und erst dann kann die DNA vollständig abgebaut werden. Bei Betrachtung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ist erkennbar, dass in mit ZVAD vorbehandelten Zellen nach BPDE das Chromatin stärker fluoreszierende, also kondensierte Bereiche aufweist, die mit dem Hoechst-Assay nicht als apoptotisch erfasst werden (Abbildung 3.4B, in C vergrößert und mit Pfeil markiert). Diese entsprechen den beschriebenen frühapoptotischen Stufen der DNA-Kondensierung. Es muss also Caspase-unabhängige Wege geben, die zwar eine teilweise Kondensierung, aber nicht den vollständig kondensierten apoptotischen Phänotyp nach BPDE-Behandlung vermitteln. Die mittels des Hoechst-Assays als apoptotisch erfassten stark kondensierten und zum Teil fragmentierten Kerne sind kaum vorhanden. In Abbildung 3.4C ist die Quantifizierung der Apoptosen und der Zellzahlen nach Kontrollbehandlung oder ZVAD dargestellt. Während in Kontrollzellen nach BPDE ein Anstieg von 2,02 % auf 18,24 % Apoptosen stattfindet, steigt die Apoptoserate durch Vorbehandlung mit Caspase-Inhibitor von basal 1,01 % auf lediglich 2,77 % nach BPDE an. Demnach ist die Apoptose gemessen an der vollständigen Chromatinkondensierung von Caspasen abhängig, jedoch sind an dieser Kondensierung vermutlich weitere Faktoren beteiligt. Die Zellzahlen werden durch BPDE-Behandlung unabhängig von ZVAD verringert, so dass andere Mechanismen als Apoptose an diesem Effekt beteiligt sein müssen.

Die Zellzahl nimmt in mit ZVAD vorbehandelten Zellen trotz der nachgewiesenen Hemmung der BPDE-abhängigen Apoptose in gleichem Maß ab wie in der Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 3.4A). Im PI-Kanal konnten keine nekrotischen Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt), so dass es sich hierbei möglicherweise um einen proliferationsbedingten Effekt handeln muss. Dies wird in Abschnitt 3.7 untersucht.

3. Ergebnisse

Die Aktivierung der Caspasen und ihre Rolle in der BPDE-induzierten Apoptose konnte somit nachgewiesen werden. Als nächstes wurde untersucht, welche Komponenten an der BPDE-bedingten Caspase-Aktivierung beteiligt sind.

3. Ergebnisse

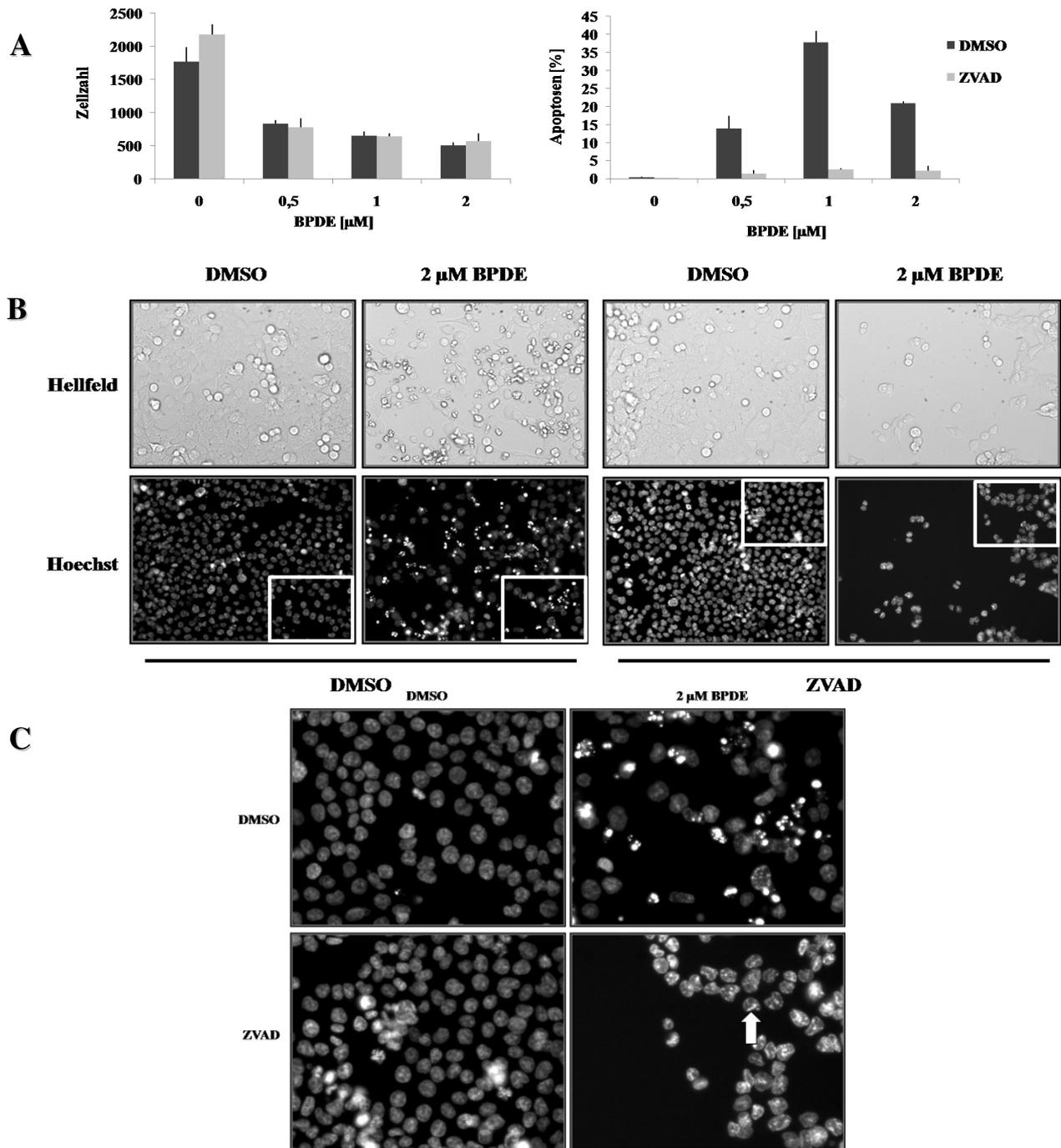


Abbildung 3.4: Hemmung der Caspasen verhindert Apoptose nach BPDE, jedoch nicht eine teilweise Chromatinkondensierung

Hct116 wurden 16 h mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO oder BPDE behandelt und anschließend mit Hoechst gefärbt.

A: Quantifizierung der Apoptosen in Abhängigkeit von Vorbehandlung der Zellen mit dem pan-Caspase-Hemmer ZVAD. Es ist ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

B: Repräsentative Mikroskopieaufnahmen, der weiß umrahmte Bereich ist in C vergrößert dargestellt.

C: Vergrößerung aus B; der Pfeil bezeichnet kondensierte Bereiche in Kernen BPDE-behandelter Zellen.

3.4 p53 wird durch BPDE aktiviert und beeinflusst die Aktivierung von Komponenten des intrinsischen, aber nicht des extrinsischen Apoptoseweges

Ein Faktor, der häufig nach Gentoxin-induziertem Stress eine Rolle bei der zellulären Reaktion spielt, ist p53 (Aylon Y und Oren M 2007). In Hct116 treten nach BPDE zahlreiche Änderungen der Genexpression auf, von denen ein großer Teil p53 abhängig ist. Darunter finden sich auch verschiedene an der Apoptose beteiligte Proteine (Hockley SL *et al.* 2008). p53 kann über die vorhandene Proteinmenge, aber auch durch verschiedene posttranslationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierung an mehreren Aminosäuren in seiner Aktivität beeinflusst werden (Prives C und Hall P 1999). Um eine mögliche BPDE-abhängige Aktivierung von p53 zu untersuchen wurde im Western Blot mit spezifischen Antikörpern sowohl die Stabilisierung als auch der Phosphorylierungsstatus an Serin 15 (Ser15) von p53 nach BPDE-Behandlung untersucht. Die Phosphorylierung an Ser15 tritt nach gentoxischem Stress wie z.B. nach UV-Bestrahlung auf (Saito S *et al.* 2003). Des Weiteren wurde auch die Induktion von p21, einem Zielgen von p53, untersucht. Wie in Abbildung 3.5 dargestellt wird p53 durch BPDE-Behandlung stabilisiert und phosphoryliert. Es fällt hierbei auf, dass die Stabilisierung ähnlich der Apoptoserate ihr Maximum bei 0,6 μM erreicht, dann aber wieder abnimmt. Die Phosphorylierung nimmt dagegen, besonders im Hinblick auf die abnehmende p53-Menge bei 1 und 2 μM , im untersuchten Konzentrationsbereich mit der Dosis zu. Die Proteinmenge des p53-Zielgens p21 steigt bei 0,3 und 0,6 μM zunächst an, sinkt jedoch bei höheren Dosen sogar unter das Basislevel bei unbehandelten Zellen ab. In p53-defizienten Zellen war nach 16 h bei keiner der untersuchten BPDE-Konzentrationen eine p21-Induktion feststellbar (vgl. Abbildung 3.19C).

3. Ergebnisse

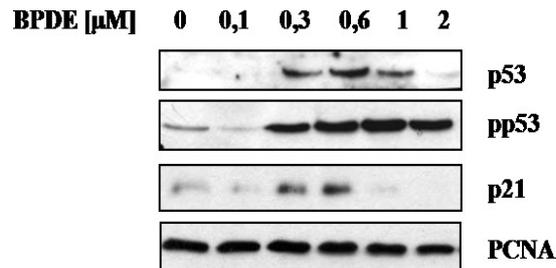


Abbildung 3.5: p53 wird durch BPDE-Behandlung aktiviert.

Proliferierende Hct116 wurden 16 h mit den angegebenen BPDE-Konzentrationen inkubiert.

Die Menge an p53-Protein sowie die Serin 15-Phosphorylierung an p53 in Gesamtzelllysaten wurden mittels spezifischer Antikörper im Western Blot nachgewiesen. Es ist ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

Somit konnte eine BPDE-induzierte Aktivierung von p53 nachgewiesen werden. p53 kann über zahlreiche Mechanismen Apoptose regulieren (Schuler M und Green DR 2001). Aber ist p53 auch wichtig für die BPDE-induzierte Apoptose? Um diese Frage zu beantworten, wurde eine p53-defiziente Hct116-Linie verwendet und die BPDE-induzierte Apoptoserate im Hoechst-Assay mit den p53-profizienten Wildtyp-Zellen verglichen. Wie Abbildung 3.6 zu entnehmen ist, führen 0,5 μM BPDE in p53-defizienten Zellen nur zu einer Erhöhung der Apoptoserate von basal 2,1 % auf 10,6 %, während die Wildtyp-Zellen zu mehr als 36,1 % apoptotisch sind. Die Zellzahlen werden in den beiden Zelllinien nach BPDE-Behandlung gleichmäßig vermindert.

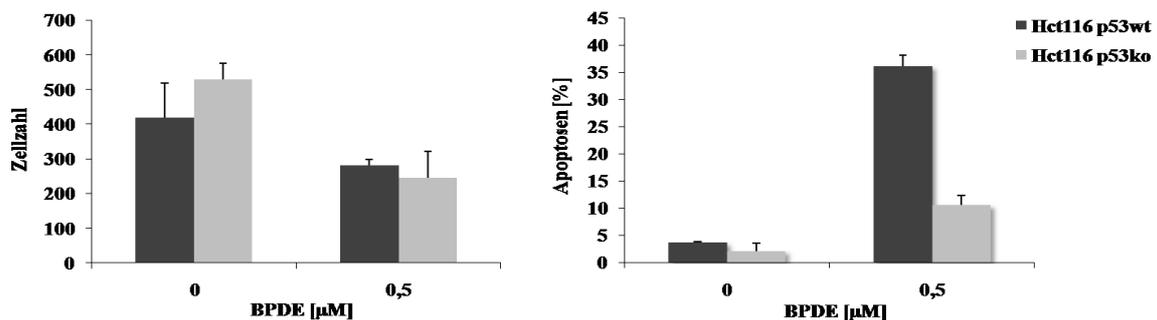


Abbildung 3.6: p53 ist wichtig für die BPDE-induzierte Apoptose.

p53-profiziente und -defiziente proliferierende Hct116 wurden 24 h mit 0,5 μM BPDE behandelt und die Apoptoseraten mittels des Hoechst-Assays bestimmt. Es ist ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

3. Ergebnisse

Wo ist p53 in der Signaltransduktionskaskade zu finden? Zunächst wurde die Aktivierung der unterschiedlichen Caspasen in p53-profizienten und -defizienten Zellen untersucht. In Abbildung 3.7A ist das Ergebnis eines Caspase 3/7-Assays dargestellt. Deutlich ist die schwächere Aktivierung der Caspasen in den p53-defizienten Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen zu sehen.

p53-abhängige Apoptose kann sowohl über den extrinsischen als auch den intrinsischen Apoptoseweg erfolgen (Pietsch EC *et al.* 2008). Um der Rolle von p53 bei der BPDE-abhängigen Caspase-Aktivierung weiter nachzugehen wurde die Dosisabhängigkeit der Aktivierung der verschiedenen Caspasen in Wildtyp- und p53-defizienten Zellen untersucht (Abbildung 3.7.B). Auch hier ist die verminderte Aktivierung der Effektorcaspase 7 in den p53-defizienten Zellen zu sehen. Die intrinsische Initiatorcaspase 9 wird in Wildtyp-Zellen deutlich aktiviert. Bei p53-defizienten Zellen wird durch BPDE keine deutliche Zunahme des im Vergleich zum Wildtyp erhöhten Basislevels an Caspase 9-Spaltprodukt induziert. Anders sieht es bei der extrinsischen Caspase 8 aus; diese wird in beiden Zelllinien vergleichbar stark durch BPDE aktiviert.

3. Ergebnisse

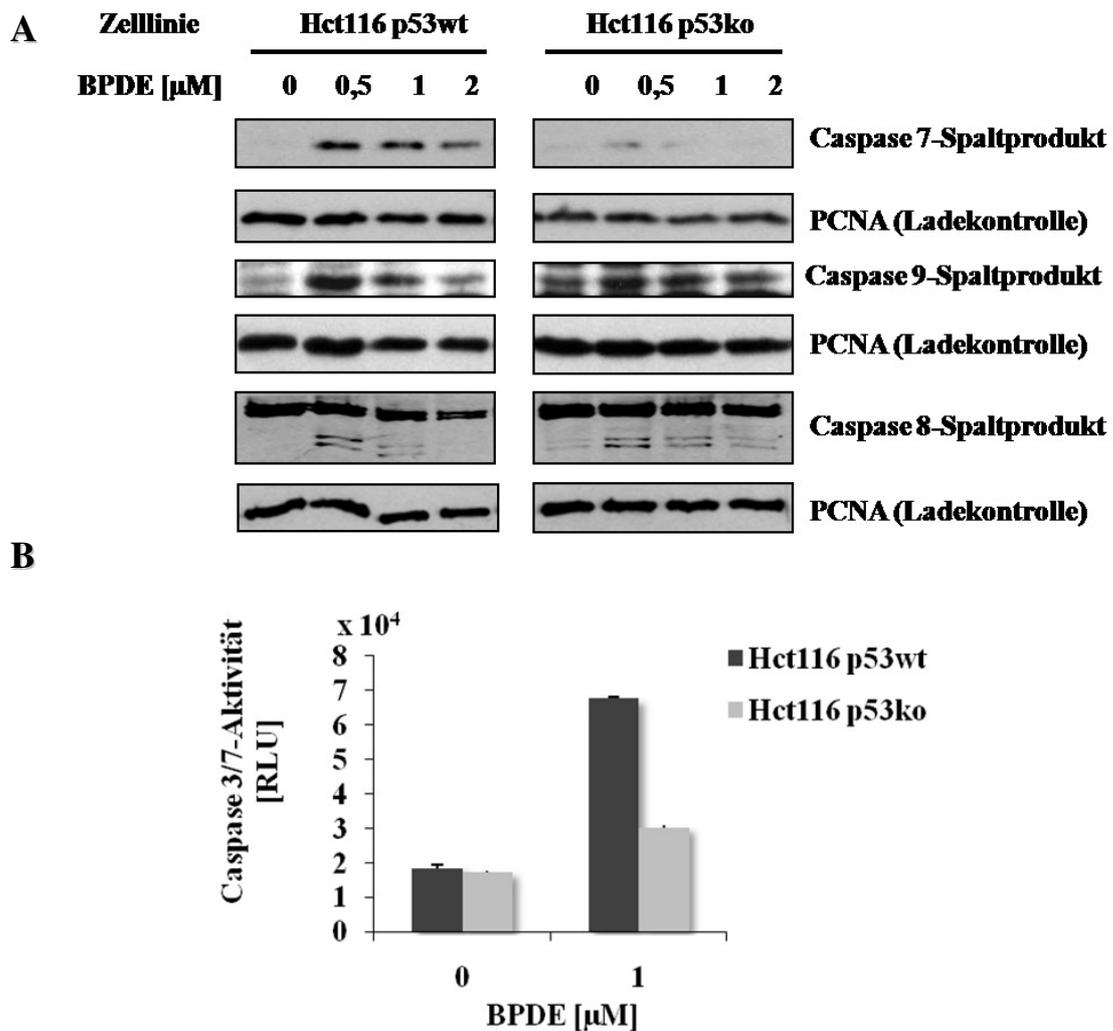


Abbildung 3.7: p53 spielt eine Rolle beim intrinsischen, aber nicht beim extrinsischen BPDE-induzierten Apoptoseweg

A: p53-profiziente und –defiziente Hct116 wurden im CaspaseGlo-Assay auf Aktivierung der Caspasen 3 und 7 nach 16 h 1 μ M BPDE untersucht.

B: Im Western Blot wurden p53-profiziente und –defiziente Hct116 auf die Spaltung der Caspasen 7, 8 und 9 mit spezifischen Antikörpern untersucht.

Es ist jeweils ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

p53 kann nach Aktivierung als Transkriptionsfaktor im Kern wirken und indirekt durch Transkription von Zielgenen die Apoptose einleiten, aber auch selbst direkt in den Mitochondrien Apoptose auslösen. Um die genaue Rolle von p53 in der BPDE-induzierten Apoptose zu untersuchen, wurden Zellen fraktioniert und die p53-Lokalisierung in den

3. Ergebnisse

verschiedenen Fraktionen im Western Blot untersucht. In Abbildung 3.8A ist die Verteilung von p53 zwischen Cytosol und Kern gezeigt. Es wurde hierfür eine Kernextraktion durchgeführt und Input, Kern- und Cytosol-Fraktion mittels Western Blot miteinander verglichen. Als Cytosolmarker wurde Aktin verwendet, als Kernmarker diente Lamin B. Im Input ist die zuvor schon gezeigte Stabilisierung von p53 nach BPDE zu sehen, in der Kernfraktion ist dann eine starke Anreicherung von p53 in BPDE-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen.

Um auch einen möglichen BPDE-induzierten mitochondrialen p53-Weg zu untersuchen wurden aus Gesamtzelllysaten die cytosolische Fraktion und die Mitochondrien isoliert. In Ermangelung eines Mitochondrienmarkers wurde die Lademenge der Mitochondrienfraktion durch eine Proteinbestimmung bestimmt und angeglichen. Wie in Abbildung 3.8B dargestellt transloziert p53 nach BPDE-Behandlung auch in die Mitochondrien.

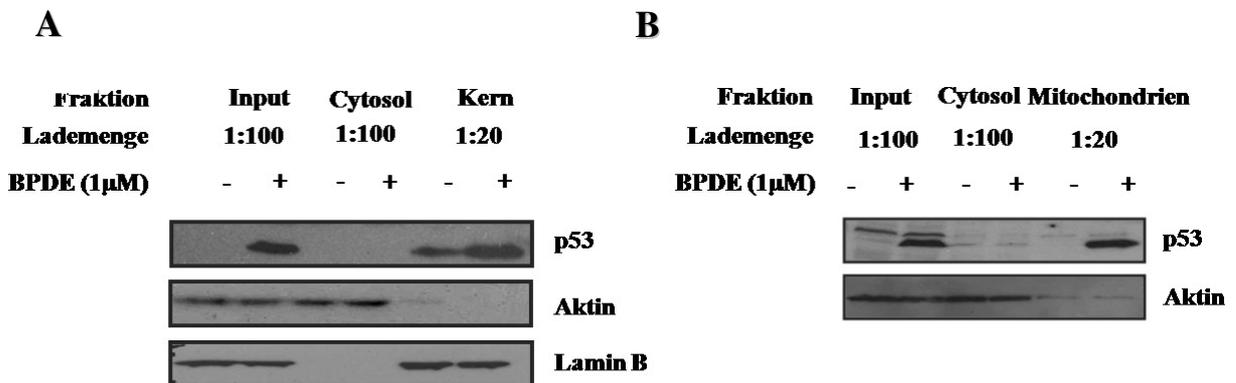


Abbildung 3.8: p53 transloziert nach BPDE-Behandlung in den Kern und die Mitochondrien

A: Mit NP40 wurden Cytosol- und Kernfraktion hergestellt und im Western Blot auf p53 untersucht.

B: Mitochondrien- und Cytosolfraktionen wurden anhand eines Kits isoliert und im Western Blot auf p53 untersucht.

Es ist jeweils ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

3. Ergebnisse

Im letzten Abschnitt konnte also gezeigt werden, dass nach BPDE Apoptose ausgelöst wird, die hauptsächlich p53-abhängig über die Caspasen des intrinsischen Weges abläuft. B[a]P führt in Hepa1c1c7 zur Anreicherung und Phosphorylierung von Bad, das als Mitglied der Bcl-2-Familie eine Rolle bei der intrinsischen Apoptose spielt (Solhaug A *et al.* 2004b). Eine weitere Schlüsselkomponente des intrinsischen Apoptoseweges ist Bax, das aus dem Cytosol in die Mitochondrien transloziert und dort die Perforation der äußeren Membran einleiten kann („*mitochondrial outer membrane permeabilisation*“, MOMP). Bei Bax handelt es sich um ein proapoptotisches Zielgen von p53, dessen Promoter p53-Bindestellen enthält (Riley T *et al.* 2008). Weiterhin wird es auch als direkter Interaktionspartner von p53 während der intrinsischen Apoptose beschrieben (Green DR und Kroemer G 2009). Im nächsten Abschnitt soll geklärt werden, inwiefern auch Bax nach BPDE aktiviert wird und einen Einfluss auf die BPDE-induzierte Apoptose ausübt.

3.5 Die BPDE-induzierte Apoptose ist teilweise abhängig von Bax

Um zu untersuchen, ob auch Bax bei der BPDE-induzierten Apoptose eine Rolle spielt, wurde eine Bax-defiziente Hct116-Linie mit den korrespondierenden Wildtyp-Zellen im Hoechst-Assay verglichen (Abbildung 3.9). Bax-defiziente Zellen zeigen hierbei eine deutlich geringere Apoptoserate als die Bax-profizienten Wildtyp-Zellen.

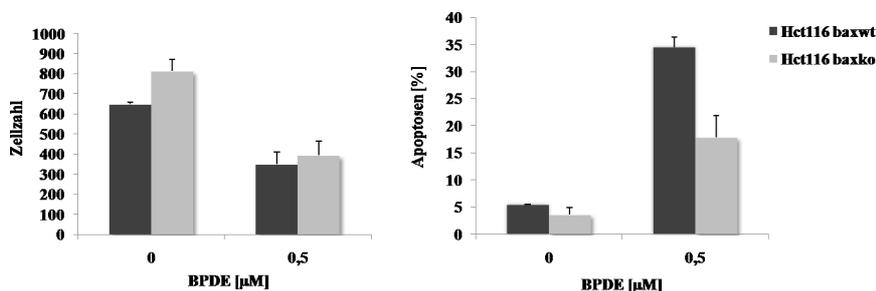


Abbildung 3.9: Bax ist an der BPDE-induzierten Apoptose beteiligt.

Hct116 baxwt und baxko wurden 24 h mit 0,5 µM BPDE behandelt und die Apoptoseraten im Hoechst-Assay verglichen. Es ist ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

3. Ergebnisse

Um die Rolle von Bax in der BPDE-induzierten Apoptose zu bestätigen, wurden Bax-profiziente und -defiziente Zellen im Western Blot bezüglich der BPDE-abhängigen Spaltung von PARP und der Caspasen verglichen (Abbildung 3.10A). Die Spaltung von PARP sowie der Caspasen 7 und 9 ist in Bax-defizienten Zellen nicht detektierbar, so dass das Ergebnis des Hoechst-Assays und damit eine Beteiligung von Bax an der BPDE-induzierten (intrinsischen) Apoptose bestätigt werden konnte. Auch Caspase 8-Spaltung tritt in Bax-defizienten Zellen erst bei höheren BPDE-Dosen (ab 0,6 μM) auf als in Wildtyp-Zellen (schon ab 0,1 μM), die Aktivierung ist jedoch generell schwach und ab 1 μM ist die Intensität der Banden wieder vergleichbar. Es wurde berichtet, dass p53 Bax im Rahmen des intrinsischen Apoptoseweges aktivieren kann (Chipuk JE und Green DR 2006). Umgekehrt ist aber auch Stabilisierung von p53 sowie die Induktion von p21 nach BPDE in Bax-defizienten im Vergleich zu Wildtyp-Zellen vermindert (Abbildung 3.10B), so dass möglicherweise Bax auch einen Einfluss auf p53 hat. Die BPDE-bedingte Phosphorylierung von p53 ist dagegen unbeeinträchtigt von Bax, in Anbetracht der geringeren Proteinmenge in Bax-defizienten Zellen ist sie sogar eher stärker als in Wildtypzellen.

3. Ergebnisse

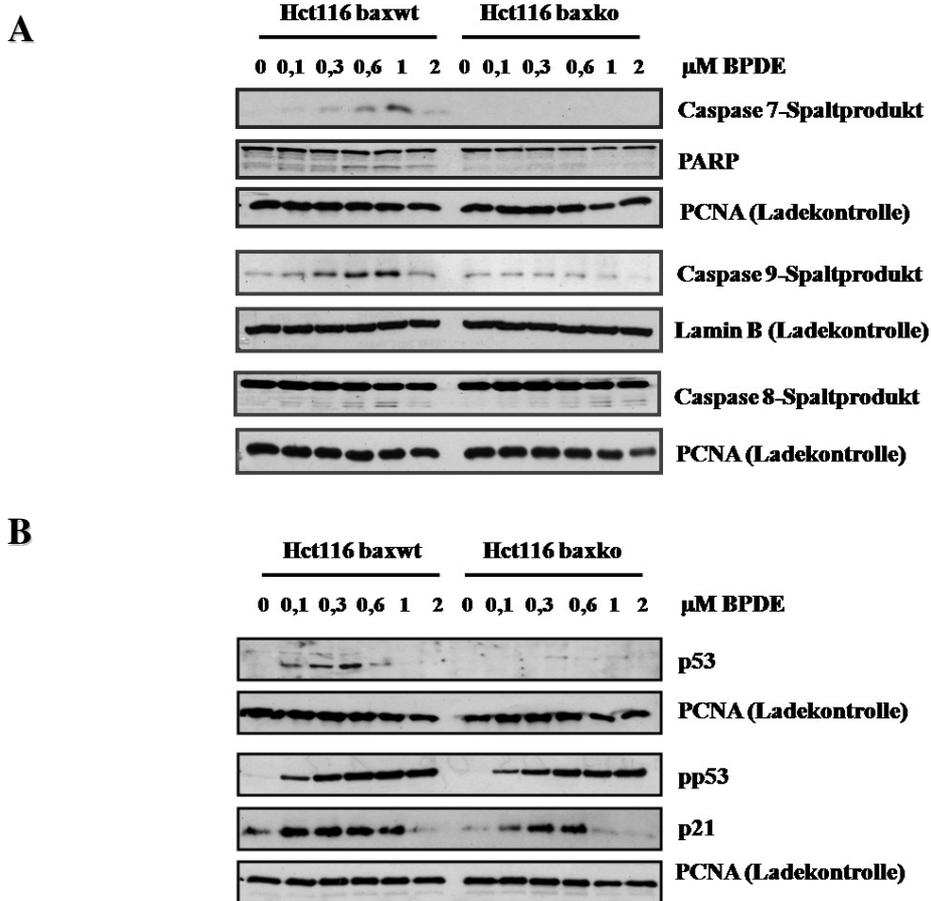


Abbildung 3.10: Bax ist wichtig für die BPDE-induzierte Spaltung von PARP und Caspase 7 und spielt eine Rolle bei der p53-Stabilisierung und der p21-Induktion, aber nicht bei der Phosphorylierung von p53 oder der SAPK.

Bax-profiziente und -defiziente Hct116 wurden 16 h mit den angegebenen BPDE-Dosen behandelt und anschließend die Gesamtzelllysate im Western Blot mit spezifischen Antikörpern auf die angegebenen Proteine untersucht. Es ist ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

A: Caspase- und PARP-Spaltung

B: Aktivierung von p53 und p21

Auf der Suche nach weiteren an der apoptotischen Signaltransduktion beteiligten Mediatoren wurden die stressabhängigen Proteinkinasen (SAPK) p38 und JNK untersucht. Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse dieser Studien zusammengestellt.

3.6 Die SAPK p38 und JNK werden nach BPDE aktiviert und spielen eine Rolle bei der BPDE-induzierten Apoptose, aber nicht der Caspase-Aktivierung

Gentoxine wie BPDE können die SAPK aktivieren (Li J *et al.* 2004a; Li J *et al.* 2004b). Diese Aktivierung geht einher mit einer Phosphorylierung der SAPK durch übergeordnete Kinasen (siehe auch Abschnitt 1.3.3). Im Western Blot wurde daher mit phosphospezifischen Antikörpern die BPDE-induzierte SAPK-Aktivierung untersucht (Abbildung 3.11). Als Ladekontrolle für die phosphorylierte Form von p38 diente die Gesamtproteinmenge, die mittels eines pan-p38-Antikörpers bestimmt wurde. Da der pan-JNK-Antikörper nur schwache Signale ergab wurde für die phosphorylierte JNK statt dessen PCNA als Ladekontrolle gewählt. Es ist eine dosisabhängige Aktivierung der p38 und der JNK zu erkennen, die für p38 bereits ab 0,3 μM , für JNK ab 0,6 μM auftritt und mit der Dosis zunimmt.

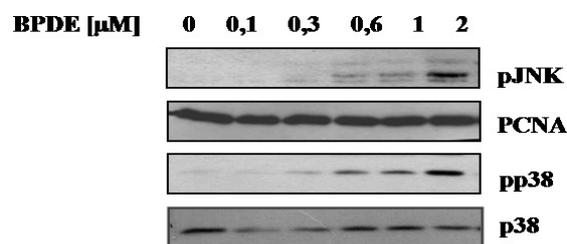


Abbildung 3.11: Die SAPK p38 und JNK werden nach BPDE aktiviert.

Hct116 wurden 16 h mit den angegebenen BPDE-Konzentrationen behandelt und die Gesamtzelllysate im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern untersucht. Es ist ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

SAPK werden nach Gentoxin-induzierter Aktivierung u. A. Funktionen in der Regulation der Apoptose zugeschrieben (Wada T und Penninger JM 2004; Dhanasekaran DN und Reddy EP 2008). Da der Dosisbereich, in dem die SAPK-Phosphorylierung beginnt, auch der Bereich ist, in dem Apoptose stattfindet, wurde die Rolle der SAPK in der BPDE-induzierten Apoptose genauer betrachtet. Hierfür wurde ein Hoechst-Assay durchgeführt

3. Ergebnisse

und die Zellen mit spezifischen SAPK-Inhibitoren (p38-Inhibitor SB und JNK-Inhibitor SP) vorbehandelt. Wie Abbildung 3.12 zu entnehmen ist, war bei vergleichbarer Verminderung der Zellzahl die Apoptoserate in Inhibitor-vorbehandelten Zellen (SB: 15,92 %, SP:22,47 %) im Vergleich zur Kontrolle (34,45 %) verringert.

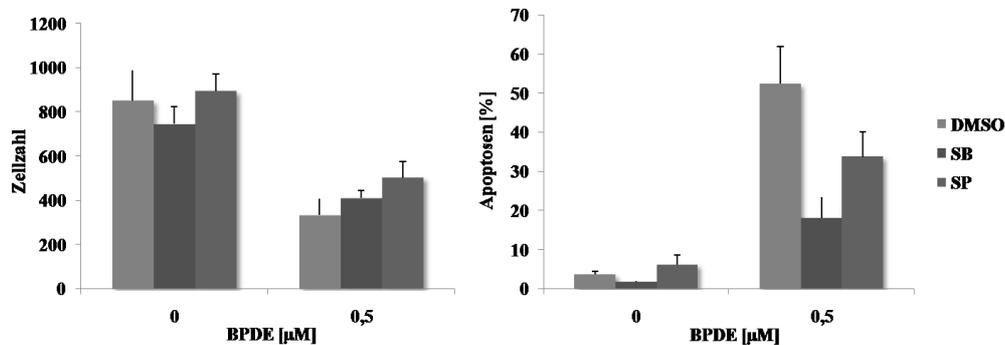


Abbildung 3.12: Die SAPK p38 und JNK beeinflussen die Apoptoserate nach BPDE-Behandlung.

Hct116 wurden mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO oder spezifischen SAPK-Inhibitoren (SB: p38, SP: JNK) präinkubiert und dann für 24 h mit 0,5 µM BPDE behandelt und die Apoptoserate mit dem Hoechst-Assay bestimmt. Es ist ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

Über p38 wurde berichtet, dass es in humanen Lungenkarzinomzellen (A549) nach UV-induzierter Aktivierung p53 während der Apoptose phosphorylieren und damit ebenfalls aktivieren kann (Takekawa M *et al.* 2000; Harris SL und Levine AJ 2005). Stehen die SAPK bei der BPDE-induzierten Apoptose mit dem bereits untersuchten p53-abhängigen Weg in Verbindung? Um diese Möglichkeit zu überprüfen wurden Zellextrakte mit SAPK-Inhibitoren vorbehandelter und BPDE-behandelter Zellen im Western Blot getestet und die p53-Stabilisierung sowie -Phosphorylierung mit der in Kontrollzellen verglichen. Wie in Abbildung 3.13A dargestellt ist jedoch kein Unterschied zu nicht mit Inhibitor vorbehandelten Zellen detektierbar.

Ist umgekehrt p53 verantwortlich für die Aktivierung der SAPK? In Abbildung 3.13B wurden p53-defiziente Zellen mit Wildtyp-Zellen im Western Blot bezüglich der Aktivierung der SAPK verglichen. Auch hier ist kein Unterschied erkennbar, der auf einen

3. Ergebnisse

gemeinsamen Mechanismus hinweisen würde. Es ist also davon auszugehen, dass die SAPK an einem anderen, p53-unabhängigen Apoptoseweg beteiligt sind.

In Abbildung 3.13C wird die Aktivierung der SAPK durch BPDE in Bax-defizienten und Wildtyp-Zellen verglichen. Es konnte hierbei kein Unterschied festgestellt werden, so dass die SAPK entweder in der Signalkaskade vor Bax aktiviert werden oder (wie anhand der nicht durch SAPK-Inhibitoren hemmbaren Caspaseaktivierung bereits vermutet) die Apoptoserate auf einem anderen Weg beeinflussen.

3. Ergebnisse

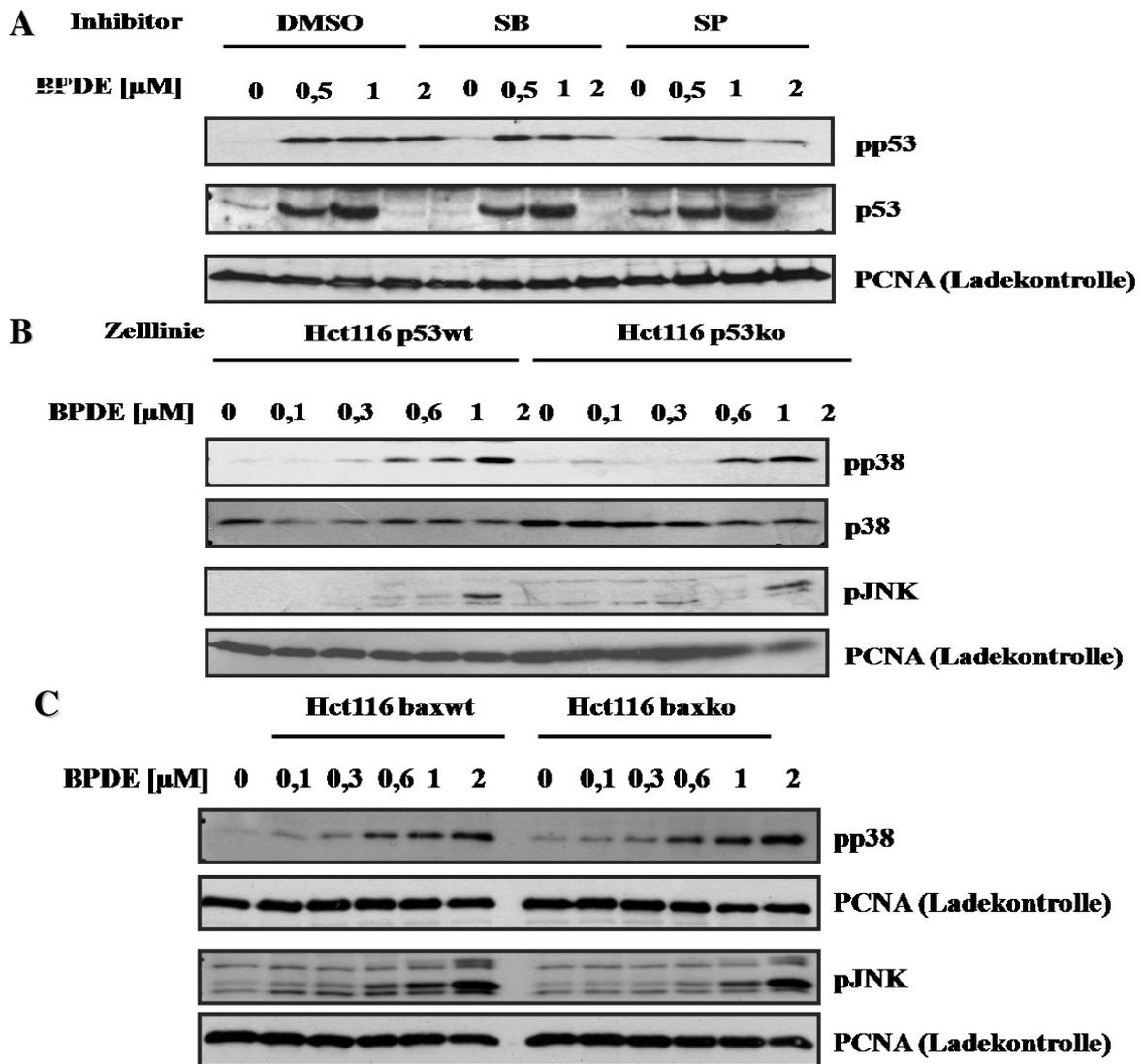


Abbildung 3.13: Die Aktivierung von p53 und den SAPK ist unabhängig voneinander, und die SAPK-Aktivierung ist unabhängig von Bax.

Hct116 wurden 16 h mit unterschiedlichen BPDE-Konzentrationen behandelt.

A: Hct116 p53wt wurden mit Lösungsmittelkontrolle DMSO, p38-Inhibitor (SB) oder JNK-Inhibitor (SP) vorbehandelt und im Western Blot auf p53-Stabilisierung und -Phosphorylierung untersucht.

B: Hct116 p53wt und p53ko wurden im Western Blot bezüglich der SAPK-Aktivierung verglichen.

C: Hct116 Baxwt und Baxko wurden im Western Blot bezüglich der SAPK-Aktivierung verglichen.

Es ist jeweils ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

3. Ergebnisse

In HepG2 verursacht eine Hemmung der MAPK eine Verminderung der BPDE-induzierten PARP-Spaltung (Chen S *et al.* 2003). Um die Rolle der SAPK bei der BPDE-induzierten Apoptose in Hct116 auf Proteinebene zu betrachten wurde die Caspase-Aktivierung in Inhibitor-vorbehandelten Zellen im Western Blot untersucht (Abbildung 3.14). Überraschenderweise ist weder die Aktivierung der intrinsischen, noch der extrinsischen Caspasen durch einen der beiden Inhibitoren beeinträchtigt.

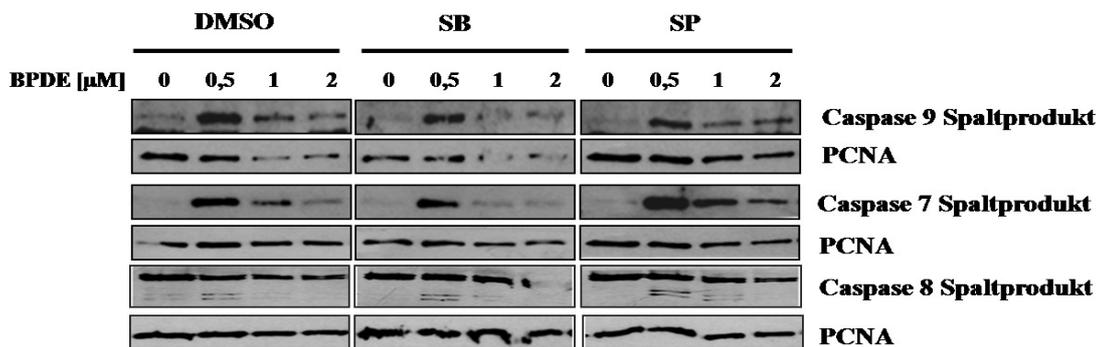


Abbildung 3.14: Die SAPK p38 und JNK nehmen keinen Einfluss auf die BPDE-induzierte Caspase-Aktivierung.

Hct116 wurden mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO oder den spezifischen SAPK-Inhibitoren SB gegen p38 bzw. SP gegen JNK präinkubiert und anschließend 16 h mit den angegebenen BPDE-Konzentrationen behandelt. Die Gesamtzelllysate wurden im Western Blot mittels spezifischer Antikörper auf Caspase-Spaltprodukte untersucht. Es ist ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

Neben den untersuchten Caspase-abhängigen Apoptosewegen gibt es auch Caspase-unabhängige Apoptose, bei der mitochondriale Nukleasen in den Kern translozieren und dort DNA-Fragmentierung und -Kondensierung bewirken können (Lorenzo HK und Susin SA 2004). Auch die teilweise Kondensierung der DNA nach ZVAD (Abb. 3.4) legt nahe, dass Caspase-unabhängige Mechanismen an der BPDE-induzierten Apoptose beteiligt sind. Ist ein solcher Mechanismus Grundlage des hemmenden Effektes von SAPK-Inhibitoren auf die BPDE-induzierte Apoptose?

Wie in der Einleitung erläutert spielen bei der Caspase-unabhängigen Apoptose mitochondriale Nukleasen eine Rolle. Diese werden durch apoptotische Signale aktiviert

3. Ergebnisse

und translozieren in den Kern, um dort die DNA zu fragmentieren. Um eine mögliche Translokation der mitochondrialen Nukleasen AIF (*apoptosis inducing factor*) und EndoG (Endonuklease G) zu untersuchen, wurden Kernextrakte mit BPDE behandelter Zellen im Western Blot auf diese Proteine untersucht (Abbildung 3.15). Es war keine Anreicherung der Proteine im Kern detektierbar, und auch die Mitochondrienfraktionen aus einer entsprechenden Isolierung wiesen keinen Verlust an AIF-Proteinmenge nach BPDE-Behandlung auf (Daten nicht gezeigt).

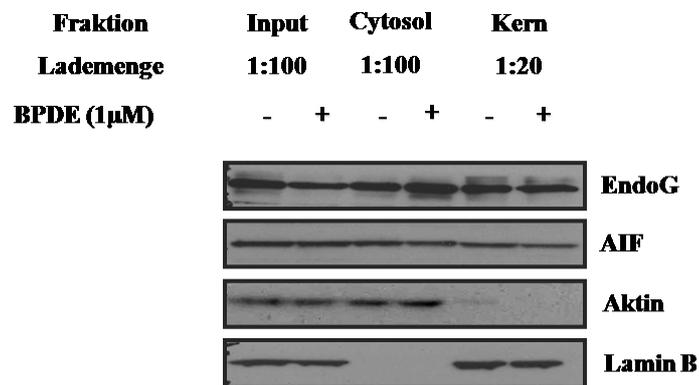


Abbildung 3.15: BPDE bewirkt keine Translokation der mitochondrialen Nukleasen EndoG und AIF in den Kern.

Hct116 wurden 16 h mit 1 µM BPDE behandelt und Cytosol- und Kernfraktion mit NP40 getrennt. Im Western Blot wurden die Fraktionen mit spezifischen Antikörpern auf AIF und EndoG untersucht. Aktin diente als Cytosol- und Lamin B als Kernkontrolle. Es ist ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

3.7 BPDE hemmt die Proliferation und löst einen dosis- und zeitabhängigen Zellzyklusblock in Hct116 aus.

Alternativ zum Absterben kann die Zelle nach einem DNA-Schaden auch versuchen, einen nicht fatalen Schaden zu reparieren. Zu diesem Zweck wird die Proliferation unterbunden und die Schäden mittels spezieller, schadensspezifischer Mechanismen repariert, um eine Manifestation der DNA-Schäden als Mutationen zu verhindern (Zhou BB und Elledge SJ 2000; Kastan MB und Bartek J 2004). Solche Unterbrechungen des Zellzyklus können an so genannten Kontrollpunkten des Zellzyklus ausgelöst werden. Eine Ansammlung der Zellen in der entsprechenden Zellzyklusphase kann durch Quantifizierung des DNA-

3. Ergebnisse

Gehaltes der Zelle z.B. nach DNA-Färbung mit DAPI mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden.

In humanen B-Zell-Lymphozyten konnte nach Behandlung mit PAK ein Wachstumsarrest beobachtet werden (Allan LL *et al.* 2006). Bereits zu Anfang der vorliegenden Arbeit stellte sich die Frage nach der Ursache der verminderten Zellzahl nach BPDE-Behandlung in Hct116. Diese war aufgrund der von der Caspase-Hemmung unbeeinträchtigten verringerten Zellzahl nicht durch Apoptose erklärbar. In humanen B-Zell-Lymphozyten konnte nach Behandlung mit PAK ein Wachstumsarrest beobachtet werden (Allan LL *et al.* 2006). Im folgenden Abschnitt soll daher ein möglicher proliferationshemmender Effekt von BPDE untersucht werden.

Zur Ermittlung der Mitoserate wurde wie beim Apoptose-Assay nach 24 h Behandlung eine Hoechst-Färbung der lebenden Zellen durchgeführt und fluoreszenzmikroskopische Bilder aufgenommen. Die mitotischen Zellen wurden ausgezählt und ihr prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl ermittelt (Abbildung 3.16). Schon bei 0,5 μM tritt eine deutliche Reduktion der Mitoserate auf, bei den höheren Dosen von 1 und 2 μM waren keine Mitosen mehr feststellbar. Damit konnte gezeigt werden, dass BPDE die Proliferation in Hct116 stark hemmt. Da p53 schon als wichtiger Faktor bei der BPDE-induzierten Apoptose identifiziert werden konnte, wurden auch p53-defiziente Hct116 auf ihre Proliferation nach BPDE-Behandlung untersucht. Hier konnte ebenfalls eine starke Reduktion der Mitoserate bis hin zum vollständigen Verlust mitotischer Zellen bei 2 μM festgestellt werden. p53 spielt also keine Rolle bei der BPDE-bedingten Hemmung der Proliferation.

3. Ergebnisse

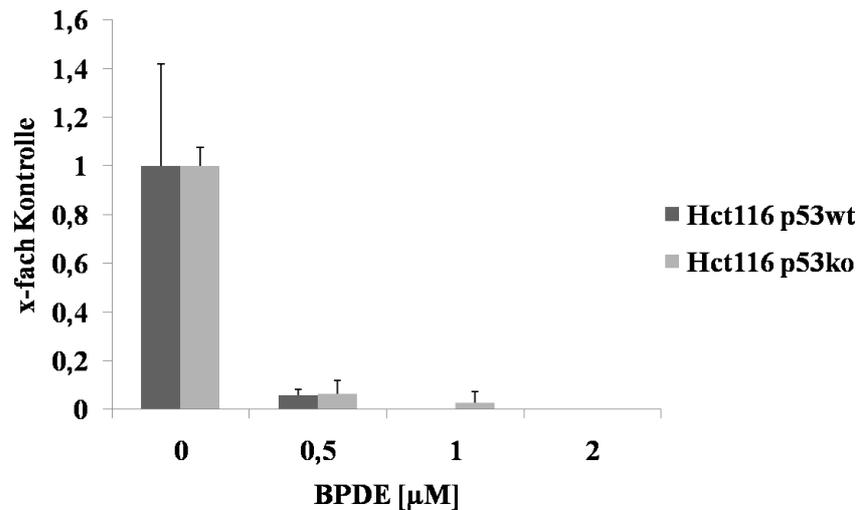


Abbildung 3.16: BPDE verringert die Mitoserate.

Hct116 p53wt und p53ko wurden 24 h mit den angegebenen BPDE-Dosen behandelt und anschließend mit Hoechst gefärbt. Pro well wurden vier Bildausschnitte aufgenommen, die Mitosen ausgezählt und der prozentuale Anteil mitotischer Zellen berechnet. Es ist die Mittelung aus drei Experimenten gezeigt.

Um den zu Grunde liegenden Mechanismus genauer zu untersuchen, wurde das Zellzyklusprofil mittels fixierter, DAPI-gefärbter Zellen nach 16 h Behandlung mit verschiedenen BPDE-Konzentrationen am Durchflusszytometer untersucht. In humanen Lymphoblasten verursacht BPDE eine Ansammlung der Zellen in der S-Phase (Black KA *et al.* 1989), dies konnte später auch in Hct116 gezeigt werden (Hockley SL *et al.* 2008). Dagegen löst BPDE in humanen bronchoalveolaren Zellen einen Block in G2/M aus (Caino MC *et al.* 2007). Wie in Abbildung 3.17 dargestellt, kommt es bei 0,1 μM BPDE zu einer Anreicherung der Zellen in G2/M, während bei 0,3 und 0,6 μM eine Anreicherung in der S-Phase stattfindet. Bei 1 und 2 μM ist kein Unterschied zum Profil der unbehandelten Zellen festzustellen.

3. Ergebnisse

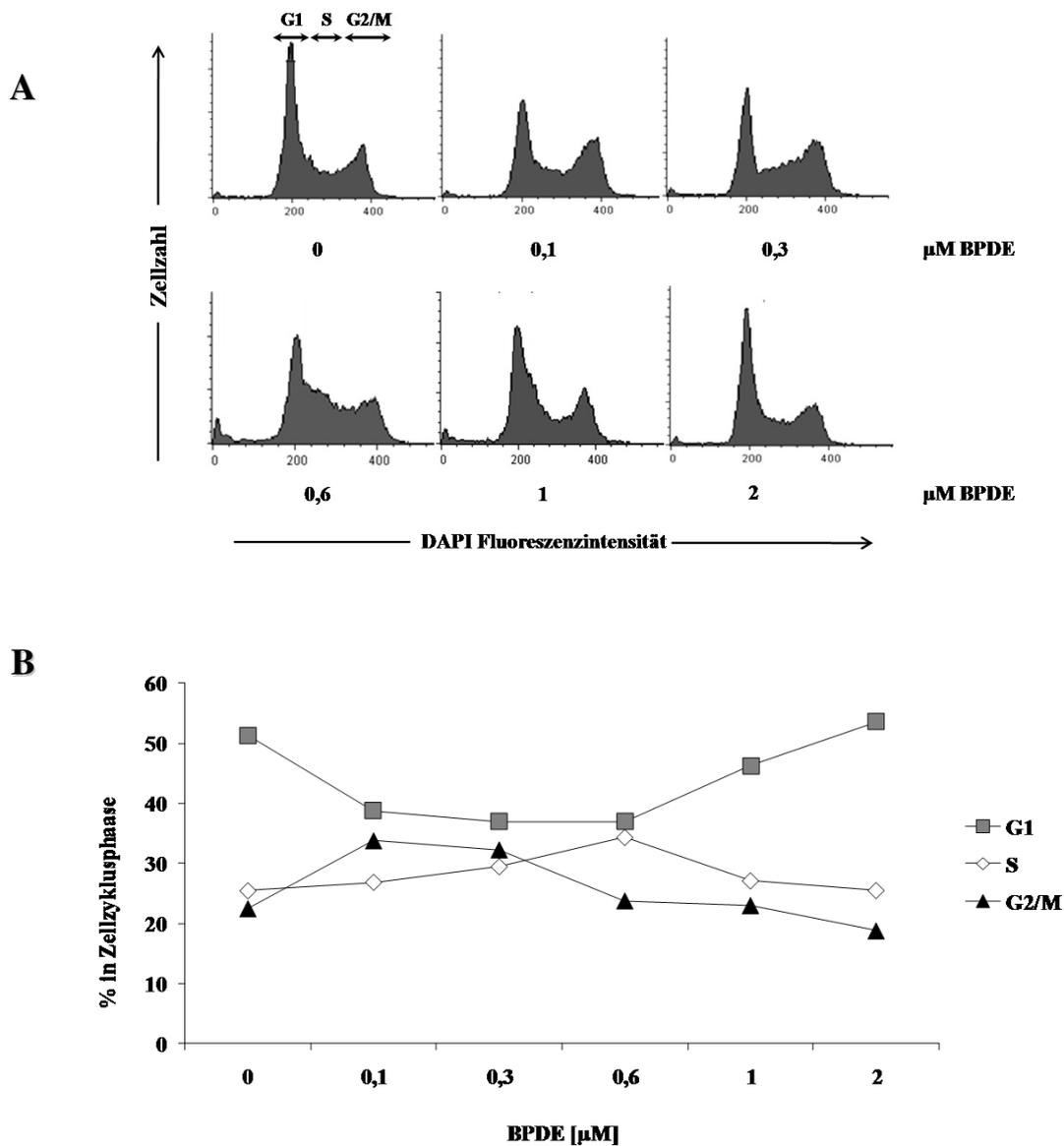


Abbildung 3.17: BPDE löst dosisabhängig einen Zellzyklusblock aus.

Hct116 wurden 16 h mit den angegebenen BPDE-Dosen behandelt und der Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie untersucht.

A: Repräsentative Zellzyklusprofile aus einem von drei vergleichbaren Experimenten

B: Grafische Darstellung der prozentualen Anteile an G1-, S- und G2/M-Phase in Abhängigkeit von der Dosis aus dem in A gezeigten Experiment.

Um den zeitlichen Verlauf dieser Zellzyklusblocks zu verfolgen, wurde die Verteilung der Zellzyklusphasen nach unterschiedlichen BPDE-Konzentrationen in einer Zeitkinetik

3. Ergebnisse

untersucht (Abbildung 3.18). Betrachtet man den Graphen zu 0,6 μM , so kommt es bereits nach 6 h zu einer beginnenden Anreicherung der Zellen in der S-Phase von basal 18,4 % auf 20,4 %, während noch kein Unterschied im G2/M-Phase-Anteil zu erkennen ist (20,9 % basal, 20,4 % nach 6 h). Nach 16 h steigt G2/M um 2,1 % an, der S-Phase-Anteil erreicht sein Maximum von 23,6 %. Nach 24 h hat die S-Phase wieder annähernd Kontroll-Level und dafür der G2/M-Phase-Block sein Maximum von 32,3 % erreicht. Bei 0,3 μM erreicht der S-Phase-Block ebenfalls nach 16 h sein Maximum (von basal 18,4 % auf 21,8 %). Die Zellen gehen hier aber bereits nach 16 h aus dem S- in den G2/M-Phase-Block über (von 20,9 % basal auf 29,8 % nach 16 h), der nach 24 h aber auch wieder abnimmt (auf 27,8 %). Hier beginnt auch der G1-Phase-Anteil wieder, sich zu erhöhen. Es findet also sowohl ein dosis- als auch ein zeitabhängiger Zellzyklusblock statt, der mit einem S-Phase-Block beginnt und dann in einen G2/M-Phase-Block übergeht. Danach scheint sich der Zellzyklus wieder zu normalisieren. Dieser Effekt zeigt eine dosisabhängige Zeitkinetik, bei der der Zellzyklus zunächst während der Replikation und noch einmal vor bzw. während der Mitose angehalten wird. Niedrigere Dosen erlauben einen früheren Übergang aus dem S-Phase- in den G2/M-Phase-Block.

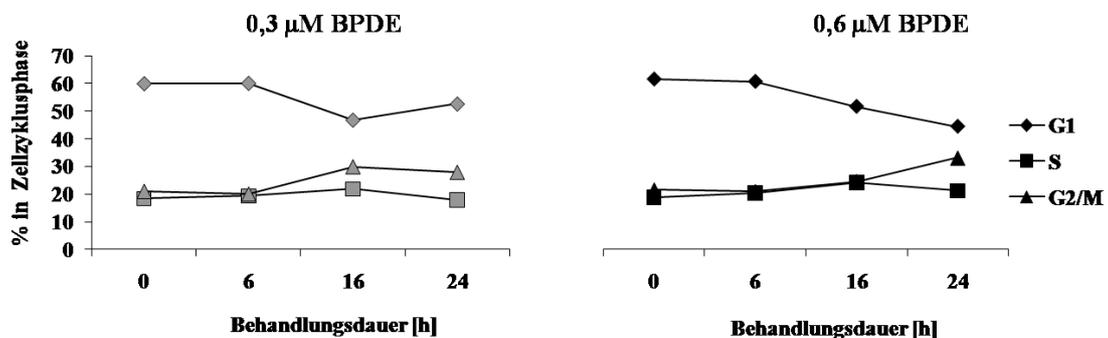


Abbildung 3.18: Der BPDE-abhängige Zellzyklusblock ist zeitabhängig

Hct116 wurden für unterschiedliche Behandlungszeiträume mit BPDE inkubiert und die Verteilung der Zellzyklusphasen mit dem Durchflusszytometer bestimmt. Links ist die Verteilung bei 0,3 μM , rechts bei 0,6 μM dargestellt. Es ist ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

BPDE verursacht also einen dosis- und zeitabhängigen Zellzyklusblock. Welche Signalmoleküle sind an diesem Mechanismus beteiligt?

3.8 Der BPDE-abhängige Zellzyklusblock ist nicht abhängig von p53, p21 oder den SAPK p38 und JNK.

Nach DNA-Schäden kann über p53 durch Transkription entsprechender Zielgene reguliert werden, ob nach mäßigem Schaden der Zellzyklus angehalten und der Schaden repariert wird, oder nach schwerem Schaden statt dessen die Expression proapoptotischer Faktoren induziert wird (Das S *et al.* 2007; Tanaka T *et al.* 2007). Wie schon in Abschnitt 3.4 gezeigt werden konnte, aktiviert BPDE p53 und auch dessen Zielgen p21, von denen auch Funktionen bei verschiedenen Kontrollpunkten und Gentoxin-induzierten Zellzyklusblocks berichtet werden (Taylor WR und Stark GR 2001). Um eine mögliche Rolle bei den BPDE-induzierten Zellzyklusblocks zu untersuchen, wurden zunächst p53-defiziente und p53-profiziente Zellen nach 16 h Behandlung mit unterschiedlichen BPDE-Dosen einer Zellzyklusanalyse unterzogen und die Profile miteinander verglichen. Wie aus Abbildung 3.19A hervorgeht wird p53 nicht für den BPDE-induzierten Zellzyklusblock benötigt, da die p53-defizienten Zellen genau wie die Kontrollzellen sowohl den G2/M- als auch den S-Phase-Block aufweisen. Die Dosisabhängigkeit der p53-defizienten Zellen ist ebenfalls vergleichbar mit der der Wildtyp-Zellen. Andere Untersuchungen in Hct116 ergaben, dass der G2/M-Block nach 0,5 μ M BPDE erst nach 48 h und ausschließlich in p53-profizienten Zellen auftritt (Hockley SL *et al.* 2008), was in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden konnte.

UVC-induzierte DNA-Schäden lösen über das p38-Substrat MK2 einen G2/M-Phase-Arrest aus, und eine Rolle der MK2 beim Gentoxin-induzierten S-Phase-Block konnte ebenfalls gezeigt werden (Manke IA *et al.* 2005). Auch JNK konnte als wichtiger Regulator des G2/M-Blocks nach gentoxischem Stress identifiziert werden (Goss VL *et al.* 2003). Daher wurde eine mögliche Rolle der SAPK auf den BPDE-abhängigen Zellzyklusblock untersucht. Hierfür wurden die spezifischen Inhibitoren SB und SP eingesetzt und die Zellzyklusprofile nach unterschiedlichen BPDE-Dosen verglichen (3.19B). Da die Inhibitoren, besonders der SP-Inhibitor, bereits ohne BPDE einen Einfluss auf die

3. Ergebnisse

Verteilung der Zellzyklusphasen zeigen, wurden die Inhibitor-Versuche zur besseren Übersichtlichkeit auf die Kontrolle normiert. Unten ist die Verteilung der Zellzyklusphasen in der jeweiligen Kontrolle, auf die normiert wurde, im Vergleich dargestellt. Auch die mit SAPK-Inhibitoren vorbehandelten Zellen zeigen sowohl den S-Phase- als auch den G2/M-Block. Eine Hemmung der p38 scheint den BPDE-Effekt leicht abzuschwächen, wie aus dem flacheren Verlauf der G1-Kurve zu erkennen ist. Hemmung der JNK führt dagegen zu einem stärkeren G2/M- und S-Phase-Block. Jedoch hemmt der SP-Inhibitor allein schon die Proliferation, da im Vergleich der DMSO-Kontrollen im unteren Bild ein höherer G1-Anteil sowie ein geringerer S-Phase-Anteil zu erkennen ist. Dadurch erscheint der S-Phase-Block nach der Normierung höher, obwohl er prozentual gesehen bei 0,6 μ M sogar noch unter der nicht inhibierten Kontrolle liegt (28 % mit SP, 34,4 % mit DMSO). Da abgesehen von der geringfügigen Abschwächung (SB) bzw. Verstärkung (SP) der BPDE-induzierten Blocks sowohl G2/M als auch S-Phase-Block vorhanden sind, spielen die SAPK keine direkte Rolle beim BPDE-induzierten Zellzyklusblock.

Bei Doxorubicin handelt es sich um einen Topoisomerase II-Hemmer und DNA-Addukt-Bildner (Swift LP *et al.* 2006). In p53-defizienten MEF (*mouse embryonic fibroblasts*) ist der durch Doxorubicin-induzierte G2/M-Zellzyklusblock noch vorhanden, aber im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen durch Herunterregulation des p38-Substrates MK2 hemmbar (Reinhardt HC *et al.* 2007). Daher wurde auch in p53-defizienten Hct116-Zellen mit SB-Inhibitor vorbehandelt und sowohl mit BPDE als auch Doxorubicin behandelt. Der Doxorubicin-induzierte Zellzyklusblock konnte in p53-defizienten Zellen durch SB-Vorbehandlung zwar aufgehoben werden, jedoch kam es auch hier zu einem mit der Kontrolle vergleichbaren BPDE-induzierten Zellzyklusblock (Daten nicht gezeigt).

Da p21 als Mediator eines G2/M-Blocks auch unabhängig von p53 aktiviert werden kann (Dangi S *et al.* 2006), wurde mittels Western Blot in p53-profizienten und -defizienten Zellen die BPDE-abhängige p21-Induktion überprüft. Wie in Abbildung 3.19C dargestellt kommt es zu keiner p21-Expression in p53-defizienten Zellen.

Die bereits zuvor identifizierten von BPDE aktivierten Signalmoleküle haben also keinen Einfluss auf den Zellzyklusblock.

3. Ergebnisse

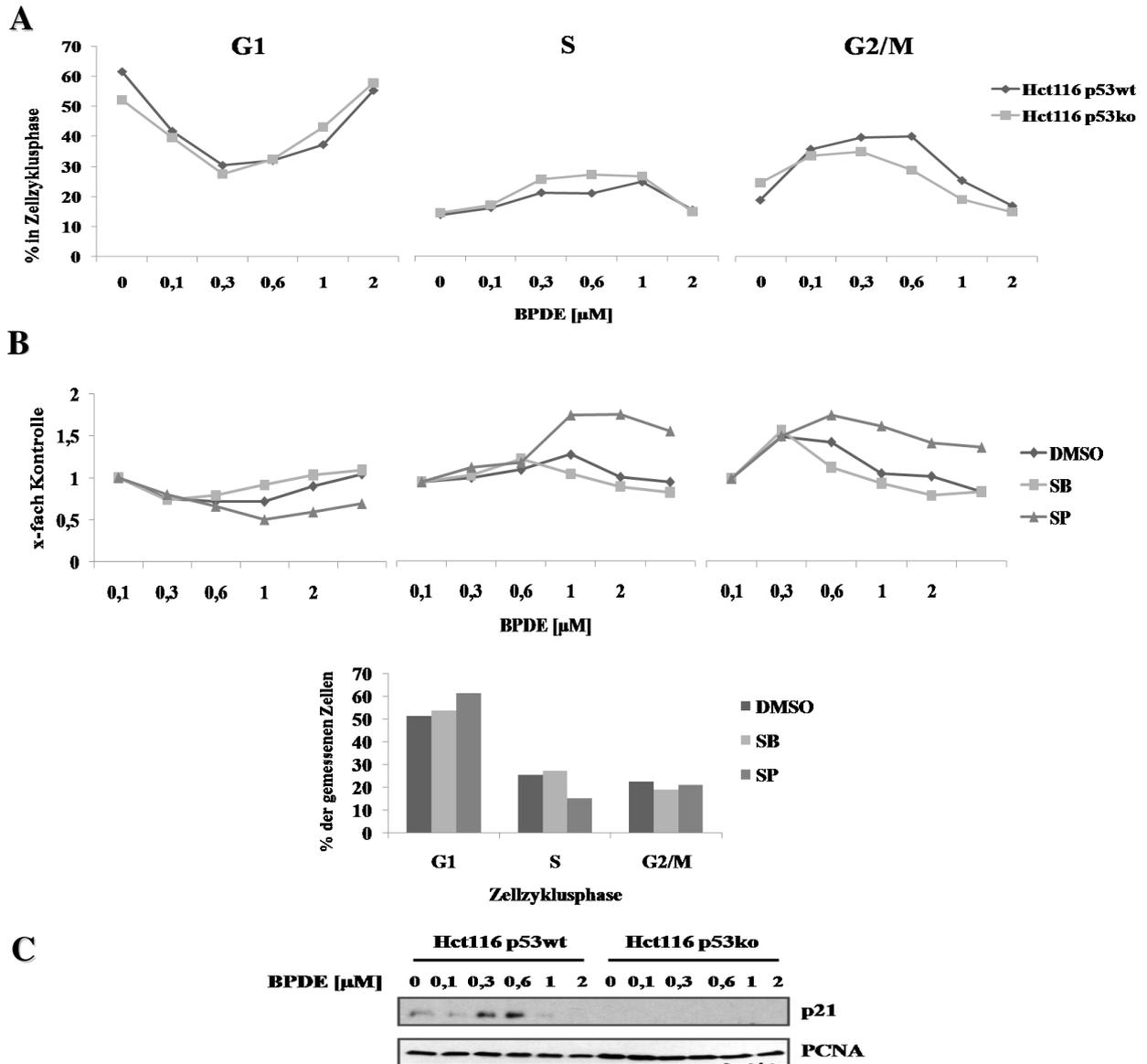


Abbildung 3.19: p53, p21 und die SAPK spielen keine Rolle beim BPDE-induzierten Zellzyklusblock.

Hct116 wurden 16 h mit den angegebenen BPDE-Konzentrationen behandelt und anschließend fixiert, mit DAPI gefärbt und mittels Durchflusszytometrie ihre Zellzyklusverteilung untersucht. Es ist jeweils ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

A: Vergleich von p53wt- und p53ko-Zellen

B: Oben: Hct116 Wildtyp wurden vor der BPDE-Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO oder den SAPK-Inhibitoren SB oder SP vorbehandelt. Die Werte wurden auf die Kontrolle normiert. **Unten:** Zellzyklusverteilung in mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO oder den Inhibitoren vorbehandelter Zellen ohne BPDE

C: p53wt und p53ko Zellen wurden 16 h mit den angegebenen BPDE-Dosen behandelt und die Gesamtzelllysate im Western Blot auf p21-Induktion untersucht.

3.9 Der BPDE-abhängige Zellzyklusblock wird über ATR/ATM vermittelt

Wie bereits in der Einleitung erläutert wurde, kann BPDE über die Epoxidgruppe an DNA binden und dadurch DNA-Schäden verursachen (Rubin H 2001). Solche Schäden an der DNA können von bestimmten Proteinen erkannt werden, die an die geschädigte Stelle binden und Reparaturproteine rekrutieren oder zelluläre Mediatoren anschalten und so auf Proliferation und Überleben einwirken. Bekannte Proteine, die DNA-Schäden erkennen und weitere Signalwege anschalten können, sind ATR/ATM, die auch an Zellzyklusblocks z.B. nach UV-bedingten DNA-Schäden beteiligt sind (Yang J *et al.* 2004).

Zunächst wurde im Western Blot mit spezifischen Antikörpern untersucht, ob das ATM-Zielprotein Chk2 nach BPDE-Behandlung phosphoryliert und damit aktiviert wird (Abbildung 3.20). BPDE führt zu einer Phosphorylierung von Chk2, deren Maximum bei der niedrigsten getesteten Konzentration von 0,5 μM bereits erreicht war und bei 2 μM wieder das Level unbehandelter Zellen erreicht hatte.

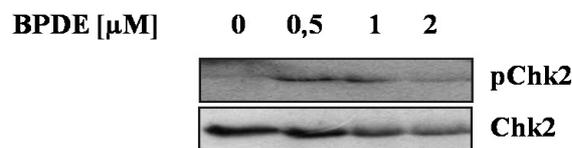


Abbildung 3.20: BPDE aktiviert Chk2.

Nach 16-stündiger Behandlung mit den angegebenen BPDE-Dosen wurden die Zellen geerntet und im Western Blot mit spezifischen Antikörpern auf Chk2-Phosphorylierung untersucht. Es ist ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

Die Signalweiterleitung durch ATR/ATM ist z.B. wichtig für den Zellzyklusblock nach UV (Kaufmann WK 2009). In humanen Lungenzellen wurde auch eine Abhängigkeit des BPDE-induzierten Zellzyklusblocks von ATR/ATM gezeigt (Guo N *et al.* 2002; Liu P *et al.* 2006). Aber sind ATR/ATM auch am beobachteten Zellzyklusblock in Hct116 beteiligt? Um diese Frage zu beantworten, wurde ein spezifischer Inhibitor gegen ATR/ATM

3. Ergebnisse

eingesetzt und dessen Einfluss auf den BPDE-induzierten Zellzyklusblock mit dem Durchflusszytometer untersucht (Abbildung 3.20).

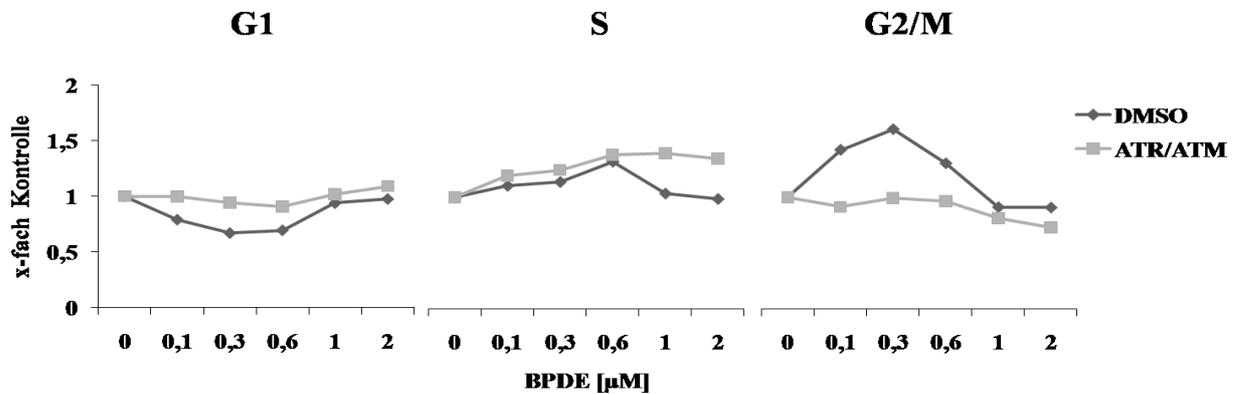


Abbildung 3.21: ATR/ATM spielen ein Rolle beim BPDE-induzierten Zellzyklusblock.

Die Zellen wurden vor der 16-stündigen BPDE-Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO oder dem ATR/ATM-Inhibitor präinkubiert und ihr Zellzyklusprofil im Durchflusszytometer untersucht. Es ist ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt. Unten: Vergleich der prozentualen Verteilung der Zellzyklusphasen ohne BPDE nach Lösungsmittelkontrolle oder ATR/ATM-Inhibitor.

Der ATR/ATM-Inhibitor bewirkt bereits an sich eine Ansammlung der Zellen in G2/M (Abbildung 3.10 unten). Zur übersichtlicheren Darstellung wurde daher wieder auf die Kontrolle normiert. Nach der Vorbehandlung mit dem Inhibitor sind die Profile der behandelten Zellen in allen Konzentrationen ähnlich dem der nicht mit BPDE behandelten Kontrolle. Es tritt kein Einbruch der G1-Phase auf, auch die Anhäufung in G2/M ist nicht nachweisbar (Abbildung 3.21 oben). In der Quantifizierung ist zu sehen, dass die S-Phase nicht wie die Lösungsmittelkontrolle ein Maximum bei 0,3-0,6 µM erreicht, sondern kontinuierlich leicht mit der Dosis ansteigt. Bei der Betrachtung der Profile ist jedoch kein typisches Maximum mit anschließendem Abfall wie beim S-Phase-Block in der Lösungsmittelkontrolle vorhanden. Demnach sind ATR/ATM Mediatoren für den BPDE-induzierten G2/M- und vermutlich auch S-Phase-Block.

3.10 Epoxide anderer polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe zeigen mit BPDE vergleichbare Wirkungen

Nachdem die Wirkungen und die zu Grunde liegenden Mechanismen von BPDE als Modell-PAK genauer untersucht wurden, stellt sich nun die Frage nach der Anwendbarkeit der Ergebnisse auf andere Epoxide polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe.

Aus diesem Grund wurden zwei weitere PAK, Benzo[c]phenanthren-3,4-diol-1,2-epoxid (BPhenDE), sowie (1)-anti-DB[a,l]P-11,12-dihydrodiol-13,14-epoxid (DBPDE) in ausgewählten Experimenten mit BPDE verglichen. Diese beiden PAK können ebenfalls DNA-Addukte bilden (Bigger CA *et al.* 1989; Ralston SL *et al.* 1995) und zeigen sogar ein höheres kanzerogenes Potential als BPDE (Levin W *et al.* 1986; Hecht SS *et al.* 1994; Prahalad AK *et al.* 1997).

Zunächst wurden die beiden PAK auf Veränderungen der Zellzahl sowie Apoptose im Hoechst-Assay untersucht. Wie in Abbildung 3.22A dargestellt führen auch BPhenDE und DBPDE zu einer Verminderung der Zellzahl, die mit der von BPDE induzierten vergleichbar ist. Ebenfalls festgestellt werden konnte bei beiden PAK Apoptose, die jedoch bei den untersuchten Dosen nicht die maximale durch BPDE ausgelöste Apoptoserate erreichte. Auch der Rückgang der Apoptoserate bei höheren Dosen konnte nicht beobachtet werden, die Raten blieben zwischen 0,5 und 2 μM etwa gleich. Im Western Blot wurde daraufhin auch die Caspase-Aktivierung nach Exposition mit den einzelnen PAK verglichen (Abbildung 3.22B). In unterschiedlicher Ausprägung werden auch bei BPhenDE und DBPDE sowohl Komponenten des extrinsischen als auch des intrinsischen Wegs aktiviert, und auch die Spaltung der Effektorcaspase 7 konnte nachgewiesen werden. Bei BPhenDE war eine sehr starke Caspase 7-Aktivierung bei der geringsten untersuchten Konzentration (0,1 μM) zu verzeichnen, die sich auch in der frühen Aktivierung der Caspase 8 wiederfand. DBPDE zeigte deutlich geringere Aktivierung aller Caspasen als BPDE und BPhenDE. Am stärksten war die Aktivierung der Caspase 9 zu sehen, wobei die Dosisabhängigkeit mit der bei BPDE vergleichbar war.

3. Ergebnisse

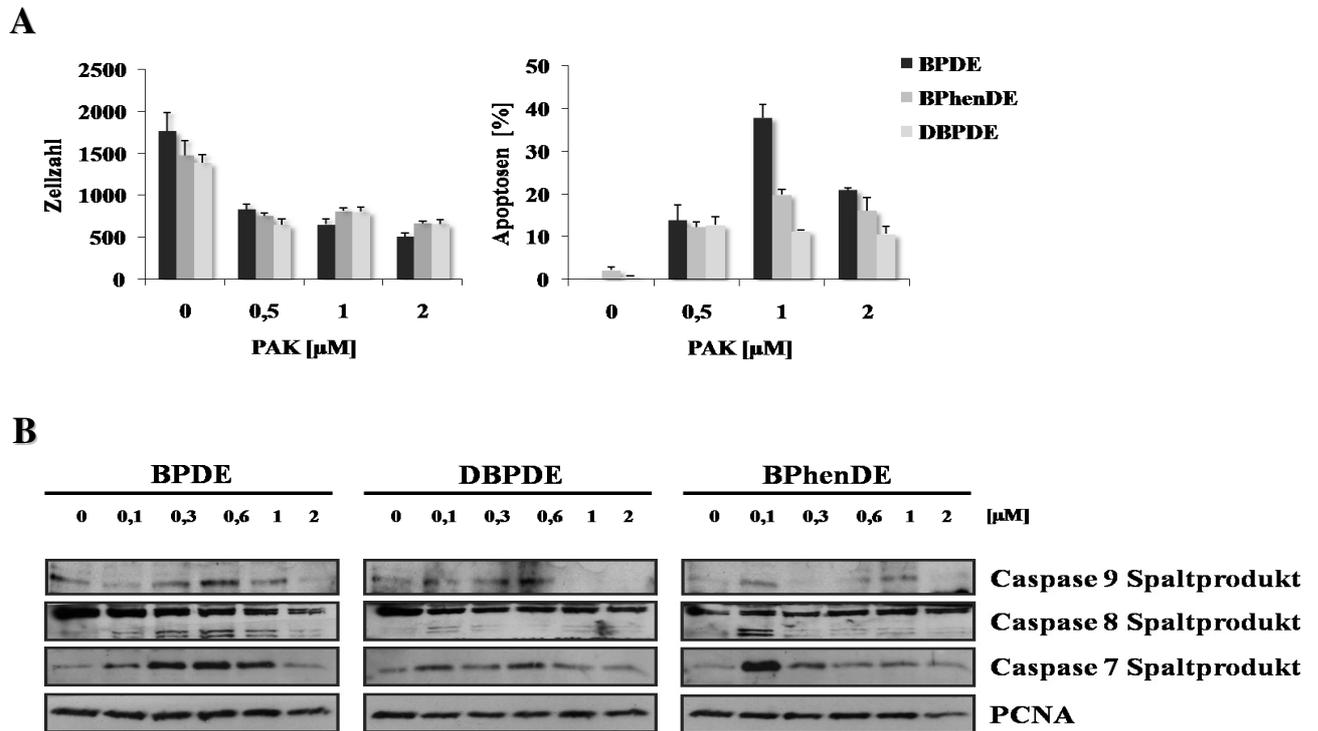


Abbildung 3.22: BPhenDE und DBPDE lösen Apoptose in Hct116 aus.

A: Die Zellen wurden 24 h mit den angegebenen Konzentrationen der jeweiligen PAK behandelt und die Apoptoserate mittels des Hoechst-Assays bestimmt.

B: Die Zellen wurden 16 h mit den angegebenen PAK-Dosen behandelt und die Aktivierung der Caspasen wurde im Western Blot untersucht.

Es ist jeweils ein repräsentatives aus zwei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

Somit konnte gezeigt werden, dass auch andere PAK in Hct116 Apoptose auslösen. Aber ist auch die Hemmung der Proliferation mit der nach BPDE vergleichbar? Um dieser Frage nachzugehen wurden die Mitoseraten BPhenDE- oder DBPDE-behandelter Zellen ermittelt (Abbildung 3.23). BPhenDE ist dabei potenter als BPDE und bewirkt bei allen getesteten Konzentrationen eine komplette Hemmung der Proliferation. DBPDE zeigt die schwächste Wirkung und reduziert die Proliferation zwar schon stark bei 0,5 und 1 µM, führt aber erst bei der höchsten Konzentration von 2 µM zu einem vollständigen Proliferationsstopp.

3. Ergebnisse

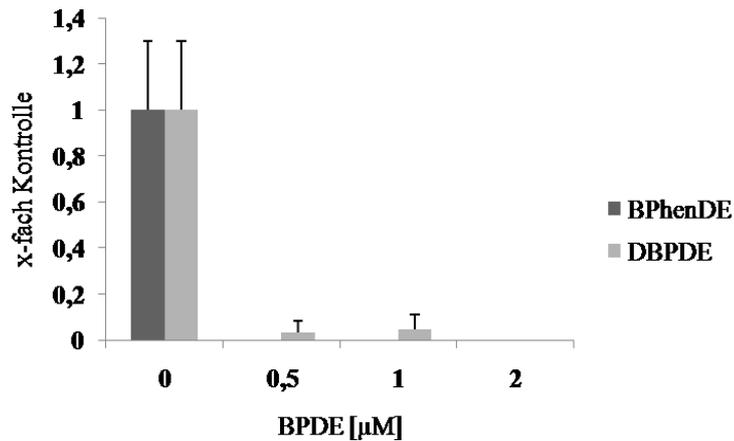


Abbildung 3.23: BPhenDE und DBPDE hemmen die Proliferation.

Hct116 wurden 24 h mit den angegebenen PAK-Dosen behandelt, mit Hoechst gefärbt und anschließend fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen gemacht. Die Mitosen wurden ausgezählt und ihr prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl berechnet. Es ist die Mittelung aus drei Experimenten gezeigt.

Doch sind die aktivierten Signalwege mit denen nach BPDE vergleichbar? In Abbildung 3.24 sind Western Blots gezeigt, in denen die Wirkung der beiden Substanzen im Vergleich zu BPDE bezüglich der Aktivierung der zuvor identifizierten Signalmoleküle untersucht wurde. Obwohl es dosisabhängige Unterschiede gibt, konnte die Aktivierung derselben Signalwege nachgewiesen werden. In 3.24A ist die Aktivierung von p53 dargestellt. Die Stabilisierung von p53 ist bei allen PAK festzustellen. Bei DBPDE und BPhenDE ist das Maximum bereits bei der geringsten getesteten Konzentration von 0,1 μM erreicht, bei BPDE wie auch schon zuvor beobachtet bei 0,6 μM . Während bei BPhenDE wie auch bei BPDE die Proteinmenge nach Erreichen des Maximums langsam bei steigenden Konzentrationen abnimmt, ist bei DBPDE bereits ab einer Dosis von 0,6 μM kein p53 mehr detektierbar. Die Ser15-Phosphorylierung konnte ebenfalls bei allen untersuchten PAK bereits bei einer Konzentration von 0,1 μM festgestellt werden. Bei DBPDE lässt die Phosphorylierung mit steigender Dosis schnell nach und ist bei 1 und 2 μM nicht mehr detektierbar. In Anbetracht des stark abgefallenen Proteinlevels war dies jedoch zu erwarten. BPDE und BPhenDE führen bei allen untersuchten Konzentrationen zur Ser15-Phosphorylierung von p53.

3. Ergebnisse

In Abbildung 3.24B ist die SAPK-Aktivierung durch die unterschiedlichen PAK dargestellt. Bei allen PAK konnte eine Aktivierung von p38 detektiert werden, obwohl auch hier wieder Unterschiede in der Dosisabhängigkeit vorhanden sind. Die Phosphorylierung nach DBPDE ist vergleichbar mit BPDE und steigt mit der Dosis an. Detektierbar ist der Anstieg der Phosphorylierung bereits nach 0,1 μM DBPDE, für BPDE erst bei 0,3 μM . Auch das maximale Signal ist am stärksten bei DBPDE. Nach BPhenDE erfolgt die p38-Aktivierung wie auch die p53-Phosphorylierung hauptsächlich nach der niedrigsten Dosis von 0,1 μM und nimmt dann wieder ab.

Auch für die Checkpointkinase Chk2 konnte eine Aktivierung bei allen PAK-Metaboliten nachgewiesen werden (Abbildung 3.24B).

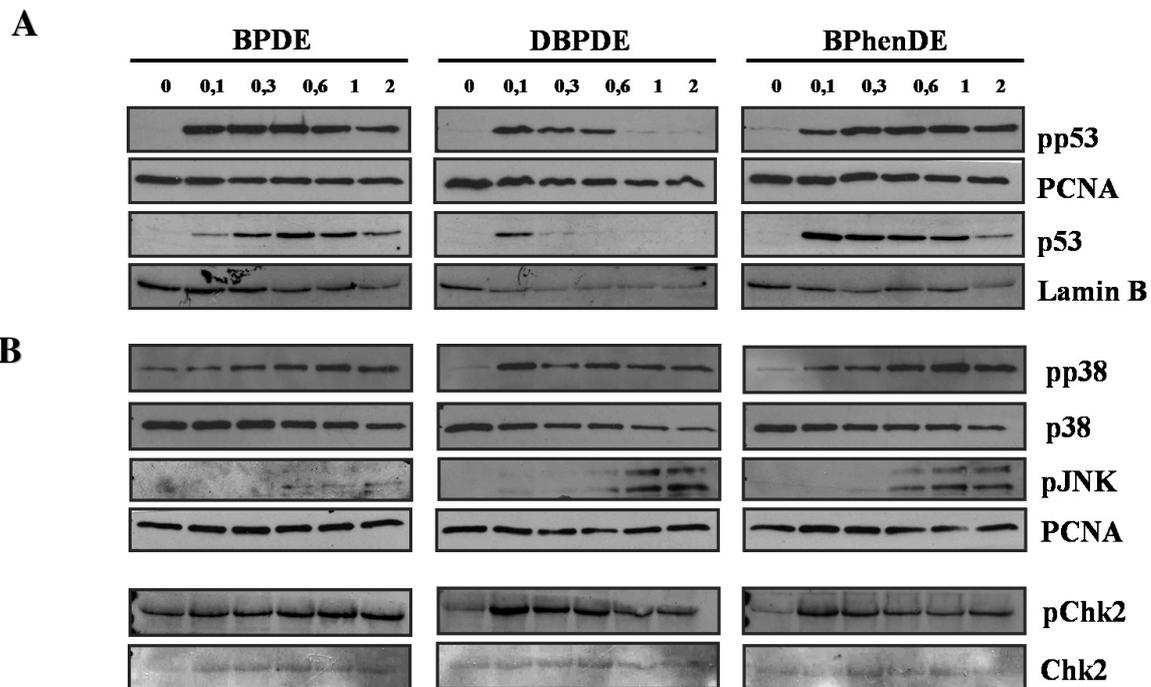


Abbildung 3.24: BPhenDE und DBPDE aktivieren dieselben Signalmoleküle wie BPDE.

Hct116 wurden 16 h mit den angegebenen PAK-Dosen behandelt und die Gesamtzelllysate im Western Blot mittels spezifischer Antikörper untersucht. Es ist repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

A: p53-Stabilisierung und -Phosphorylierung

B: Aktivierung der SAPK und der Chk2

3. Ergebnisse

Weist die Chk2-Aktivierung auf einen Zellzyklusblock ähnlich dem bei BPDE beobachteten hin? Um auch die PAK-Wirkungen auf den Zellzyklus zu vergleichen, wurden Hct116 16 h mit BPhenDE behandelt und die Zellzyklusprofile nach verschiedenen Dosen betrachtet (Abbildung 3.25). BPhenDE verursacht genau wie BPDE nach 16 h einen G2/M-, bei höheren Dosen einen S-Phase-Block. Die Schwankungen in der prozentualen Verteilung der Zellzyklusphasen sind hierbei deutlich stärker als bei BPDE (vgl. Abbildung 3.17), die Dosisabhängigkeit ist jedoch vergleichbar. Der G2/M-Block zeigt sein Maximum bei 0,1 μM , der S-Phase-Block bei 0,3 μM . Vorläufige Ergebnisse konnten auch eine Abhängigkeit des BPhenDE-induzierten Zellzyklusblocks von ATR/ATM zeigen (Daten nicht gezeigt).

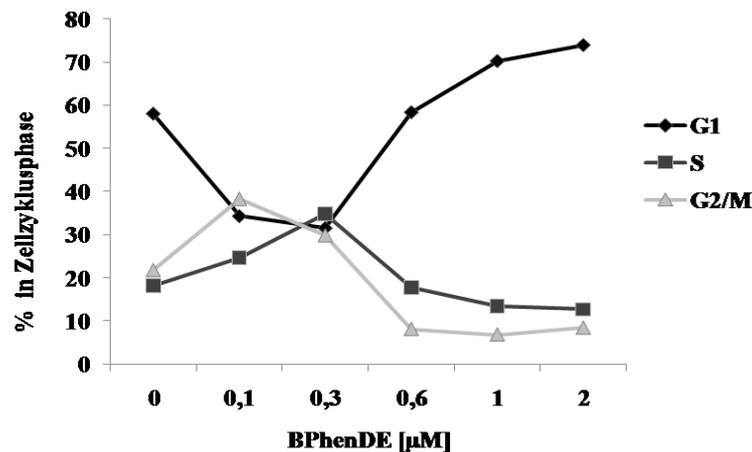


Abbildung 3.25: BPhenDE verursacht wie BPDE einen dosisabhängigen Zellzyklusblock.

Hct116 wurden 16 h mit den angegebenen BPhenDE-Dosen behandelt, fixiert, mit DAPI gefärbt und der Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen ist als Diagramm dargestellt. Es ist ein repräsentatives aus drei vergleichbaren Experimenten gezeigt.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die über BPDE gewonnenen Erkenntnisse bezüglich Einleitung von Apoptose, Hemmung der Proliferation und Auslösen eines Zellzyklusblocks im Allgemeinen für andere Epoxide polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe gelten. Auch die untersuchten Signalmoleküle p53, SAPK sowie Chk2 werden von allen untersuchten PAK aktiviert. Es konnten jedoch Unterschiede in der

3. Ergebnisse

Dosisabhängigkeit bei der Aktivierung der unterschiedlichen Signalwege festgestellt werden. So wurden die untersuchten Signalmoleküle bei DBPDE und BPhenDE bei geringeren Dosen aktiviert als bei BPDE.

4 Diskussion

Durch endogene und exogene Quellen ist der Mensch ständig mutagenen Einflüssen ausgesetzt. Mutationen sorgen für Weiterentwicklung und Anpassung an sich verändernde Lebensbedingungen und sind somit Grundlage der Evolution. Ein Übermaß führt jedoch zu einer starken Veränderung der Zelle, die die Lebensfähigkeit beeinträchtigen oder zu unkontrolliertem Wachstum und der Entstehung von Krebs führen kann. Um den Gesamtorganismus zu schützen haben sich evolutionär hochkonservierte Mechanismen entwickelt, um mit potentiell kanzerogenen Einflüssen umzugehen. Enzyme des Fremdstoffmetabolismus können kanzerogene Substanzen entgiften und ihre Ausscheidung aus dem Körper herbeiführen. Entsteht dennoch ein DNA-Schaden, gibt es unterschiedliche DNA-Reparaturmechanismen, die jeweils spezielle Arten von DNA-Schäden reparieren können. Werden DNA-Addukte nicht repariert, manifestieren sie sich als Mutationen im Genom. Wird die Zelle nicht eliminiert, droht maligne Transformation und Entstehung von Krebs. Um dies zu vermeiden können geschädigte Zellen aus dem Organismus durch unterschiedliche Arten des Zelltods wie Apoptose, Nekrose oder Autophagie eliminiert werden oder die Transformation durch den Austritt der Zelle aus dem Zellzyklus im Rahmen der Seneszenz verhindert werden (siehe auch Abschnitt 1.2).

Potentiell gefährliche Einflüsse auf die Zelle bezeichnet man auch als Stressfaktoren. Die zelluläre Stressantwort kann man grob in drei Stufen einteilen. Am Anfang steht die Erkennung des Stressfaktors wie z.B. des DNA-Schadens. Das Signal wird daraufhin über Signalmoleküle weitergeleitet und schließlich die zelluläre Antwort auf den Stressfaktor eingeleitet. Diese Vorgänge sind hochkomplex und umfassen ein Netzwerk von Signalmolekülen, deren gegenseitige Regulation bis heute nicht vollkommen verstanden ist. Die Stressantwort hängt außer vom auslösenden Signal auch vom Zelltyp und dem Zustand der Zelle, z.B. der aktuellen Zellzyklusphase, ab.

Über PAK (polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, siehe auch Abschnitt 1.1.1) ist bekannt, dass sie Krebs auslösen können. Als wohl bekanntestes Beispiel ist der durch Inhalation von Zigarettenrauch ausgelöste Lungenkrebs zu nennen (Denissenko MF *et al.* 1996). Der Hauptaufnahmeweg der PAK verläuft jedoch über die Nahrung. Es konnte

4. Diskussion

BPDE-DNA-Adduktbildung in der humanen Kolonmukosa nachgewiesen und diese auch mit der Entstehung von Darmkrebs in Verbindung gebracht werden (Alexandrov K *et al.* 1996; Santarelli RL *et al.* 2008). Die Kanzerogenität von PAK wird jedoch erst durch den körpereigenen Fremdstoffmetabolismus erreicht, wenn es zur Anhäufung von reaktiven Zwischenprodukten in der Zelle und daraus resultierender Adduktbildung mit der DNA kommt (Abschnitt 1.1.2). Die nicht metabolisierte, chemisch inerte Muttersubstanz von BPDE, B[a]P, aktiviert durch Bindung des AhR die Transkription von Genen des Fremdstoffmetabolismus wie z.B. CYP1A1. Durch diese körpereigenen Enzyme wird der Metabolismus von B[a]P über mehrere Zwischenstufen katalysiert, was schlussendlich zur Ausscheidung der vormals lipophilen Substanz führt. Das dabei als Zwischenmetabolit entstehende BPDE kann als ultimatives Kanzerogen bei nicht ausreichend schneller Entgiftung über GST DNA-Addukte bilden. Das mutagene Potential konnte auch in Bakterien, Säugerzellen (Wislocki PG *et al.* 1976) und in *in vivo* Mausversuchen (Kapitulnik J *et al.* 1977) gezeigt werden. Für die Cyto- und Gentoxizität von B[a]P ist daher der AhR vonnöten, da erst die durch den Metabolismus entstehenden Zwischenprodukte, besonders das ultimative Kanzerogen BPDE, eine Gefahr für die Zelle darstellen (Chen S *et al.* 2003). BPDE-abhängige Apoptose konnte z.B. in humanen Lungenkarzinomzellen gezeigt werden (Xiao H *et al.* 2007).

In der vorliegenden Arbeit sollte mehr über zelluläre Reaktionen auf kanzerogene PAK-Metabolite und die Konsequenzen der Aktivierung unterschiedlicher Signalwege herausgefunden werden. Dabei wurde besonderer Fokus auf die Dosisabhängigkeit der beobachteten Reaktionen gelegt.

Für alle Versuche wurden Kolonkarzinomzellen verwendet, die aufgrund ihrer *in vivo*-Relevanz – der Darm als Kontaktpunkt mit den durch die Nahrung aufgenommenen PAK - als geeignetes Modell erschienen. Die Hct116-Linie erwies sich dabei als besonders vorteilhaft, da verschiedene *knockout*-Zelllinien erhältlich sind, die defizient für möglicherweise bei BPDE-induzierten zellulären Vorgängen relevante Proteine sind.

4.1 Mechanismen des BPDE-induzierten Zellzyklusblocks

4.1.1 Der intra-S-Block

Nach DNA-Schäden durch chemische Gentoxine wie auch ionisierende oder UV-Strahlung kommt es zur Aktivierung so genannter Kontrollpunkte im Zellzyklus. Besonders wichtig ist ein Anhalten des Zellzyklus bei Schäden während der S-Phase, da sich Schäden bei fortlaufender Replikation als Mutationen festsetzen und zur Kanzerogenese beitragen können (Zegerman P und Diffley JFX 2009; Lazzaro F *et al.* 2009). Das Anhalten des Zellzyklus während der Replikation wird auch als intra-S-Block bezeichnet und kann bei vielen Gentoxinen wie z.B. UV beobachtet werden (Gottifredi V und Prives C 2005). Anhand durchflusszytometrischer Untersuchungen des Zellzyklus konnte dies auch als Konsequenz der Behandlung von Hct116 mit BPDE gezeigt werden, das im Konzentrationsbereich zwischen 0,3 und 0,6 μM nach 16 h eine Akkumulation der Zellen in der S-Phase bewirkte (Abbildung 3.17). Bei einem solchen S-Phase-Block wird die Entstehung neuer Replikationsursprünge unterbunden, die laufende Replikation arretiert und angehaltene Replikationsgabeln stabilisiert (Conti C *et al.* 2007). Durch die daraus resultierende Verlangsamung der Replikation wird Zeit für die Reparatur der entstandenen DNA-Schäden gewonnen, für die es je nach Art des Schadens unterschiedliche Mechanismen gibt (Hakem R 2008). Bereits 1987 konnte gezeigt werden, dass BPDE DNA-Addukte in CHO (*chinese hamster ovarian cells*) bildet und dies in replizierenden Zellen zu einem Rückgang der DNA-Syntheserate führt (Yamanishi DT *et al.* 1987). Kurze Zeit später konnte mit BPDE-DNA-Addukt-spezifischen Antikörpern elektronenmikroskopisch gezeigt werden, dass die Addukte bevorzugt an Replikationsgabeln zu finden sind, also vermutlich die Replikation stören (Paules RS *et al.* 1988). Inzwischen wurde beschrieben, dass BPDE-DNA-Addukte die Topoisomerase II (Topo2) an ihrer Funktion hindern (Khan QA *et al.* 2003). Dabei handelt es sich um ein

4. Diskussion

Protein, das die bei der Replikation überspiralisierte DNA durch Einführung von Brüchen, Entwindung der Stränge und Religation der Brüche wieder entspannt (Burden DA und Osheroff N 1998). Durch die Inhibition ihrer Funktion kommt es zum Anhalten der Replikationsgabel. Da ein andauernder Stopp der Replikationsgabeln in proliferierenden Zellen zum Zelltod führt, werden Topoisomerasehemmer auch als Krebstherapeutika eingesetzt (Wilstermann AM und Osheroff N 2003; Giles GI und Sharma RP 2005). Auch Antibiotika, die speziell die bakterielle Topoisomerase (Gyrase) hemmen, kommen in der Medizin zum Einsatz (Zimmer C *et al.* 1990). Es gibt auch Polymerasen, die in der so genannten Transläsionssynthese über DNA-Schäden hinweg lesen und diese fehlerfrei (*error-free*) oder auch unter Einbau falscher Basen (*error-prone*) replizieren können (Friedberg EC *et al.* 2001). BPDE-DNA-Addukte können von Polymerase κ fehlerfrei repliziert werden (Zhang Y *et al.* 2000b), während Polymerase η häufig falsche Basen einbaut (Zhang Y *et al.* 2000a). In embryonalen Mausfibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts*, MEF) konnte gezeigt werden, dass DNA-Polymerase κ essentiell ist, um den S-Phase-Block zu überwinden. Polymerase κ -defiziente MEF verharrten im Gegensatz zu -profizienten Zellen im S-Phase-Block und wiesen eine geringere Überlebensrate nach BPDE auf als Wildtyp-Zellen (Bi X *et al.* 2005). Die oben beschriebenen angehaltenen Replikationsgabeln ziehen die Aktivierung von ATR nach sich (Lowndes NF und Murguia JR 2000), das ein wichtiger Initiator für die zelluläre Schadensantwort in Form von Reparatur, Zellzyklusblock oder auch Apoptose ist (Yang J *et al.* 2004). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine Funktion von ATR/ATM beim BPDE-induzierten Zellzyklusblock gezeigt werden (Abbildung 3.20). Doch wie führt die Aktivierung von ATR/ATM zum beobachteten Zellzyklusblock?

Gut untersucht ist der S-Phase-Block nach ultravioletter (UV) Strahlung (Heffernan TP *et al.* 2002; Kaufmann WK 2009). Demnach kommt es nach kurzwelliger UV-Strahlung (UVC) zur Aktivierung von ATR/Chk1. Chk1-abhängige Phosphorylierung inhibiert daraufhin die Phosphatase Cdc25A, die nur im hypophosphorylierten Zustand den Cdk2/CyclinE-Komplex aktivieren und neue Replikationsursprünge initiieren kann. Auch beim intra-S-Kontrollpunkt nach BPDE und UV-Strahlung in jeweils niedriger Dosis ($< 0,1 \mu\text{m}$ für BPDE) konnte in HT1299 (humane Lungenkarzinomzellen) eine Aktivierung

4. Diskussion

von ATR und Chk1 gezeigt werden (Kaufmann WK 2007; Broderick R und NasheuernHP 2009). Über sie wird dann Cdc45, das wichtig für die Rekrutierung von DNA-Replikationsfaktoren ist, an der Initiation neuer Replikationsursprünge gehindert. Dieser Faktor bindet an die DNA, um die DNA-Primase-Polymerase α zu rekrutieren, die die Synthese von Okazaki-Fragmenten initiiert. Obwohl der Mechanismus nicht genau geklärt ist, ist vermutlich die Dbf4-abhängige Kinase Cdc7 beteiligt, die vor dem S-Phase-Eintritt Substrate phosphoryliert, die Teil des Prä-Replikations-Komplexes sind (Lei M. und Tye BK 2001; Kaufmann WK 2007). Bei höheren Dosen ($> 0,6 \mu\text{M}$) wurde zusätzlich die Verlängerung vorhandener Replikationsgabeln verhindert und Chk2 phosphoryliert (Guo N *et al.* 2002; Liu P *et al.* 2006). Auch in Hct116 konnte eine Aktivierung von Chk2 nachgewiesen werden, die ab $0,5 \mu\text{M}$ BPDE auftrat (Abbildung 3.20). Der intra-S-Phase-Block war darüber hinaus zumindest teilweise abhängig von ATR/ATM, also liegt hier möglicherweise derselbe Mechanismus zugrunde, der auch in HT1299 identifiziert wurde.

4.1.2 Der G2/M-Block

Ein weiterer wichtiger Kontrollpunkt befindet sich am Ende der Replikation, bevor die DNA in der Mitose auf zwei Tochterzellen aufgeteilt wird. Dort werden Schäden repariert, die im intra-S-Phase-Kontrollpunkt nicht entfernt wurden, oder aufgrund von Schäden nicht replizierte DNA-Bereiche vervollständigt. Durch eine Zeitkinetik konnte gezeigt werden, dass BPDE in Hct116 zunächst einen S-Phase-, dann einen G2/M-Block auslöst. Der Zeitpunkt des Übergangs erfolgt mit steigender Dosis nach längerer Behandlungsdauer (Abbildung 3.18). Über die Mechanismen des G2/M-Blocks nach BPDE ist wenig bekannt. Wie in Abschnitt 4.1.1 bereits erwähnt bewirken BPDE-DNA-Addukte eine Hemmung der Topoisomerase II. Auch andere Topo2-Hemmer bewirken eine Stabilisierung des DNA-Topo2-Komplexes, so dass es zur DNA-Spaltung kommt. Dadurch kommt es zu einem G2/M-Block, da die Cdk1, die für die Einleitung der Mitose zuständig ist, durch entstehende DNA-Brüche oder Anhalten der Replikation ATR/ATM-abhängig inhibiert wird (Larsen AK *et al.* 2003). Im Gegensatz dazu kommt es durch BPDE-abhängige Topo2-Hemmung nicht zur DNA-Spaltung, da das Addukt die Nukleaseaktivität der Topo2

4. Diskussion

stört (Khan QA *et al.* 2003). Versuche mit einer Vorstufe von BPDE, dem Benzo[a]pyren-7,8-Dihydrodiol (BPD), in humanen Lungenkarzinomzellen (H358) führten zu einem G2/M-Block, der abhängig vom AhR und der CYP450-abhängigen Umsetzung von BPD zu BPDE war (Caino MC *et al.* 2007). Hierbei konnte BPD-induzierte Aktivierung von Chk1 und H2AX als ATR/ATM-Substrate gezeigt werden. Der beschriebene Mechanismus verläuft über eine inhibitorische Hyperphosphorylierung von Cdk1. Dabei handelt es sich um die Cyclin-abhängige Kinase, die für den G2/M-Übergang zuständig ist. Cdk1 kann ähnlich der Cdk2 beim S-Phase-Kontrollpunkt (siehe Abschnitt 4.1.1) durch ATM/ATR, Chk1/2 und Cdc25C-Phosphatase in seiner Aktivität gehemmt werden (Lukas J *et al.* 2008). Auch p53 kann u. A. über Transkription des Cdk-Inhibitors p21 den CyclinB/Cdk1-Komplex hemmen. In p53-defizienten Hct116 konnte jedoch ebenfalls der G2/M-Block beobachtet werden (Abbildung 3.19A). In einer anderen Studie in Hct116 konnte in p53-defizienten Zellen lediglich der S-Phase, nicht aber der G2/M-Phase-Block beobachtet werden. Letzterer wurde ausschließlich in p53-Wildtyp-Zellen festgestellt (Hockley SL *et al.* 2008). In dieser Studie wurde eine Zeitreihe mit 0,5 µM BPDE durchgeführt, bei der allerdings nach 6, 24 und 48 h die durchflusszytometrische Untersuchung der Verteilung der Zellzyklusphasen stattfand. Da in der vorliegenden Arbeit der Zellzyklus nach 16 h untersucht wurde, könnten die unterschiedlichen Ergebnisse damit zu erklären sein, dass der G2/M-Block sich zwischen den von Hockley gemessenen Zeitpunkten abspielte und zum Messzeitpunkt bereits nicht mehr detektierbar war. In humanen Lungenkrebszellen (H460) wurde durch eine Herunterregulierung von p53 dagegen sogar eine Verstärkung des BPDE-induzierten G2/M und S-Phase-Blocks erreicht (Xiao H und Singh SV 2007), was für Hct116 unter den untersuchten Bedingungen aber ebenfalls nicht bestätigt werden konnte. BRCA1 kann ebenfalls als Transkriptionsfaktor für p21 dienen, so dass auch in p53-defizienten Zellen ein G2/M-Kontrollpunkt vorhanden ist (Somasundaram K *et al.* 1997). Gegen einen BRCA1-abhängigen BPDE-induzierten G2/M-Block spricht allerdings, dass in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 nach BPDE eine Herunterregulation von BRCA1 stattfindet (Jeffy BD *et al.* 2000). Um eine p53-unabhängige Rolle von p21 zu untersuchen wurde die p21-Induktion in p53-defizienten Zellen untersucht jedoch konnte kein p21-Protein detektiert werden (Abbildung 3.19C). In gesunden Zellen kann nach

Reparatur der DNA-Schäden Cdc25B-abhängig der Mitoseeintritt erfolgen (Srivastava SK *et al.* 2007).

Auf der Suche nach weiteren Faktoren, die in den G2/M-Block nach BPDE involviert sind, wurden die SAPK in Betracht gezogen. Wie bereits in Abbildung 3.11 gezeigt werden diese durch BPDE aktiviert. Für p38 wurden diverse Rollen in der Regulation des Zellzyklus beim Übergang G1/S und G2/M beschrieben (Thornton TM und Rincon M 2008). Hexavalentes Chrom (Cr(VI)), ein ebenfalls genotoxischer und kanzerogener Umweltschadstoff, verursacht einen ATR/ATM-abhängigen Zellzyklusblock in S-Phase und G2/M, der durch p38-Inhibition aufgehoben werden kann (Wakeman TP *et al.* 2005). Auch nach UVC konnte in humanen Zervixkarzinomzellen (HeLa), die über kein funktionelles p53 verfügt (Raman M *et al.* 2007), sowie der humanen Osteosarkomzelllinie U2OS (wildtyp-p53) ein von dem p38-Substrat MK2 (MAPKAP Kinase 2) abhängiger G2/M-Block gezeigt werden (Manke IA *et al.* 2005). Der p38-abhängige Zellzyklusblock nach UV konnte auch in HeLa sowie verschiedenen murinen Zelllinien gezeigt werden (Bulavin DV *et al.* 2001). Der Doxorubicin-induzierte G2/M-Block dagegen verläuft nur in p53-defizienten MEF über p38 (Reinhardt HC *et al.* 2007). Dies könnte auf speziesabhängige Unterschiede in der genotoxinabhängigen Zellzyklusregulation hinweisen oder darauf, dass verschiedene genotoxische Einflüsse trotz vergleichbarer Reaktionen der Zelle über unterschiedliche Signalwege ausgelöst werden. Auch für JNK konnte eine Rolle nach UV-Strahlung bei der inhibitorischen Phosphorylierung von Cdc25C gezeigt werden, die zum G2/M-Block führt (Gutierrez GJ *et al.* 2010). Als möglicherweise involvierte Signaltransduktoren wurden daher die SAPK p38 und JNK bezüglich ihres Einflusses auf den BPDE-induzierten Zellzyklusblock untersucht. Vorbehandlung der Zellen mit spezifischen Inhibitoren gegen p38 oder JNK hatten jedoch keinen Einfluss auf den BPDE-induzierten Zellzyklusblock (Abbildung 3.19B).

4.1.3 Der *stealth*-Effekt

Aber wieso tritt der Zellzyklusblock nach solchen mutagenen Schäden erst nach Beginn der Replikation ein, während derer sich Schäden leicht als Mutationen manifestieren können? Wäre ein Zellzyklusarrest vor dem S-Phase-Eintritt, also nach oder während der G1-Phase,

4. Diskussion

für die Vermeidung der Krebsentstehung nicht effektiver? In der Tat ist eine häufige Reaktion auf DNA-Schäden ein G1-Block, der z.B. nach UV-bedingten DNA-Schäden wie in Abschnitt 1.3.2 erwähnt p53-abhängig ausgelöst wird (Kastan MB *et al.* 1991). Dabei induziert p53 die p21-Expression, das als Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen wirkt. Letztere können infolgedessen nicht das Retinoblastomprotein (RB) durch Hyperphosphorylierung inhibieren. Dieses kann dann als Inhibitor von Transkriptionsfaktoren wie E2F wirken und so die Transkription von Genen verhindern, die zum S-Phase-Eintritt nötig sind (Zetterberg A *et al.* 1995; Bartek J und Lukas J 2001). Trotz der BPDE-induzierten Stabilisierung von p53 und der Induktion von p21 (Abbildung 3.5) konnte unter den untersuchten Bedingungen kein G1-Phase-Arrest festgestellt werden (Abbildung 3.17). BPDE aktiviert in den humanen Zelllinien MCF-7 (Mammakarzinom) und A549 (Lungenkarzinom) durch die Bildung von DNA-Addukten p53 (Rämet M *et al.* 1995), löst aber auch hier keinen G1-Block aus. Diese Eigenschaft, den G1-Block zu umgehen, wurde von Khan 1997 nach dem PAK-Diolepoxid Benzo[g]chrysen-11,12-Dihydrodiol-13,14-Epoxyd in MCF-7 beschrieben und als *stealth property* (frei übersetzt: Tarneigenschaft) bezeichnet. Zunächst wurde angenommen, dass p53 zwar stabilisiert, aber nicht transkriptionell aktiv wird und daher keine p21-Induktion stattfindet (Khan QA *et al.* 1997). Dies konnte aber übereinstimmend mit Abbildung 3.5 in mehreren Publikationen für BPDE und in der letztgenannten Publikation auch für Benzo[g]chrysen-11,12-Dihydrodiol-13,14-Epoxyd in MCF-7 sowie in A549 widerlegt werden (Kaspin LC und Baird WM 1996; Khan QA und Dipple A 2000; Khan QA und Anderson LM 2001), in denen die p53-abhängige Transkription von p21 gezeigt wurde. Es wurde berichtet, dass die p21-Induktion deutlich später als die p53-Stabilisierung (Kaspin LC und Baird WM 1996) und im Vergleich zu anderen G1-Block auslösenden Agenzien nur sehr schwach auftrat (Khan QA *et al.* 1999). Der Effekt konnte auch in nicht transformiertem Mausgewebe gezeigt werden (Stuart D *et al.* 2001). Dem *stealth effect* wird durch Erhöhung des kanzerogenen Potentials der auslösenden Substanzen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Lungenadenomen zugeschrieben (Khan QA und Anderson LM 2001), ohne dass der Mechanismus dafür vollständig geklärt werden konnte. Durch Proteasehemmer konnte jedoch in MCF-7-Zellen und in der murinen Lungenzelllinie E10 eine Erhöhung des p21-

Proteinlevels sowie ein G1-Block nach BPDE gezeigt werden, so dass vermutlich ein Protease-vermittelter Abbau von p21 für den fehlenden G1-Arrest sorgt (Khan QA *et al.* 2002). Der Abbau von p21 wurde auch nach UV-Strahlung beobachtet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass dies Voraussetzung für die Rekrutierung der DNA-Polymerase η ist, die wie bereits erwähnt über DNA-Schäden hinweglesen kann (Soria G *et al.* 2008; Soria G und Gottifredi V 2010).

4.2 Mechanismen der BPDE-induzierten Apoptose

BPDE löst unter den untersuchten Bedingungen in Hct116 Zelltod in Form von Apoptose aus (Abschnitt 3.2). Bei diesem Prozess handelt es sich um einen komplex regulierten Vorgang, der über unterschiedliche Signalwege ablaufen kann und an dem eine Vielzahl von Komponenten beteiligt sind (Abbildung 1.2). Eine Proteinfamilie, die an fast allen apoptotischen Signalwegen beteiligt ist, stellen die Cystein-Aspartat-Proteasen oder Caspasen dar, die vor der Entdeckung Caspase-unabhängiger Apoptosewege untrennbar mit dem Begriff des programmierten Zelltods verbunden waren (Henkart PA 1996). Man unterscheidet innerhalb der Caspase-abhängigen Apoptose den intrinsischen und den extrinsischen Weg. Am Ende beider Wege stehen die so genannten Effektorcaspasen 3 und 7, die die Apoptose einleiten. Ihre BPDE-abhängige Aktivierung konnte in Hct116-Zellen wie auch in Abbildung 3.3 dargestellt gezeigt werden (Hockley SL *et al.* 2008). Zu ihren Substraten gehören Strukturproteine, aber auch weitere durch Spaltung aktivierte Proteine, die eine Funktion während der Apoptose innehaben. Dazu gehören u.A. die Caspase-abhängige DNase CAD, die zur Fragmentierung der chromosomalen DNA beiträgt, sowie PARP, dessen BPDE-bedingte Spaltung ebenfalls in Abbildung 3.3 gezeigt werden konnte. Die Effektorcaspasen werden ihrerseits durch Spaltung aktiviert, die durch so genannte Initiatorcaspasen katalysiert wird. Letztere unterscheiden sich nach dem auslösenden Signal.

Durch von außen kommende apoptotische Signale wie die Bindung bestimmter extrazellulärer Liganden an ihren membranständigen Rezeptor wird die extrinsische Initiatorcaspase 8 aktiviert (siehe auch Abschnitt 1.2.1). In B-Zellen wurde nach PAK-Behandlung eine Aktivierung der Caspase 8 beobachtet (Page TJ *et al.* 2002), die jedoch

4. Diskussion

unabhängig von der Aktivierung des Todesrezeptors war (Ryu HY *et al.* 2005). In Hepa1c1c7 löst BPDE Caspase 8-Spaltung Apoptose aus (Solhaug A *et al.* 2004b). Dies konnte in Hct116 bestätigt werden (Abbildung 3.3). Die Spaltung der Caspase 8 scheint teilweise von Bax abhängig zu sein, da die Spaltung in Bax-defizienten Zellen erst nach höheren Dosen feststellbar war (Abbildung 3.10). Der klassische Weg zur Aktivierung der Caspase 8 verläuft über membranständige Rezeptoren (siehe auch Abschnitt 1.2.1 und Abbildung 1.2). Jedoch wurde wie oben erwähnt im Zusammenhang mit einem weiteren PAK, dem 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA) berichtet, dass es in humanen B-Zellen Caspase 3-abhängig und ohne Beteiligung von Todesrezeptoren Caspase 8 aktivieren kann (Ryu HY *et al.* 2005). So könnte auch unter den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Bedingungen die Aktivierung der Caspase 8 zumindest teilweise und bei niedrigen Konzentrationen Bax-abhängig über den intrinsischen Weg aktiviert werden.

Auch der intrinsische Weg wird nach BPDE in verschiedenen Zelllinien aktiviert. In embryonalen Mausfibroblasten (MEF) löst BPDE Apoptose aus, die mit einer Cytochrom c-Freisetzung ins Cytosol verbunden ist (Chen S *et al.* 2003). Cytosolisches Cytochrom c gilt als Marker für den intrinsischen Apoptoseweg. Hierbei kommt es durch Mitglieder der Bcl-2-Familie bei der so genannten MOMP (*mitochondrial outer membrane permeabilisation*) zur Ausbildung von Poren in der äußeren Mitochondrienmembran, durch die der Austritt von Cytochrom c ins Cytosol ermöglicht wird (Brunelle JK und Letai A 2009). Die MOMP stellt demnach das Schlüsselement des BPDE-induzierten intrinsischen Apoptosewegs dar. Sie wird über die Proteinmengen der pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie gesteuert (siehe auch Abschnitt 1.2.1). Ein an der Porenbildung direkt beteiligtes Mitglied der Bcl-2-Familie ist Bax, das im Normalzustand der Zelle an antiapoptotische Vertreter gebunden im Cytosol vorliegt. Kommt es zu einem apoptotischen Signal, werden Bax selbst oder proapoptotische BH3-only-Proteine hochreguliert. Letztere binden die antiapoptotischen Vertreter, was zur Freisetzung von Bax führt. Dieses kann dann direkt an die äußere Mitochondrienmembran binden, dort oligomerisieren und so Poren bilden (MOMP), durch die Cytochrom c ins Cytosol austreten kann. In der humanen Lungenkrebszelllinie H460 löst BPDE Apoptose aus und verändert wie gerade beschrieben das Gleichgewicht zwischen pro- und

4. Diskussion

antiapoptotischen Vertretern der Bcl-2-Familie (Xiao H *et al.* 2007). Die Rolle von Bax in der BPDE-induzierten Apoptose unter den untersuchten Bedingungen konnte durch Vergleich von Wildtyp- mit Bax-defizienten Zellen gezeigt werden (Abbildungen 3.9). Als Folge der Cytochrom c-Freisetzung ins Cytosol kann Bax mit Apaf-1 und Procaspase 9 einen als Apoptosom bezeichneten Komplex bilden, der Spaltung und damit verbundene Aktivierung der Caspase 9 bewirkt. Diese aktiviert ihrerseits die Effektorcaspase 7, deren Spaltprodukt wie auch das der Caspase 9 in Bax-defizienten Zellen nach BPDE-Behandlung nicht detektiert werden konnte (Abbildung 3.10). Somit beeinflusst Bax nach BPDE den intrinsischen und auch teilweise den extrinsischen Apoptoseweg. Da die BPDE-induzierte Apoptose jedoch in Bax-defizienten Zellen nicht völlig zum Erliegen kommt (Abbildung 3.9), und bei höheren Konzentrationen auch in Bax-defizienten Zellen eine Caspase 8-Spaltung auftrat, müssen weitere Mechanismen daran beteiligt sein.

Ein bekannter Transkriptionsfaktor, der die Expression von Bax aber auch von proapoptotischen BH3-only-Proteinen aktivieren, bzw. die der antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie (z.B. Bcl-2) reprimieren kann, ist p53 (Bellamy COC 1997; Vaseva AV und Moll UM 2009). p53 spielt eine wichtige Rolle bei BPDE-induzierten Veränderungen des Expressionsmusters in Hct116 (Hockley SL *et al.* 2008), und Herunterregulierung von p53 in der oben genannten Studie führte zu einer Verringerung der BPDE-induzierten Apoptose (Xiao H und Singh SV 2007). Unter den in dieser Arbeit untersuchten Bedingungen kommt es ebenfalls zu einer Stabilisierung und Phosphorylierung von p53, und auch der Einfluss von p53 auf die Apoptoserate konnte nachgewiesen werden (Abbildungen 3.5 und 3.6), der auf den intrinsischen Weg beschränkt ist (Abbildung 3.7). Zusätzlich konnte die BPDE-abhängige Translokation von p53 in den Zellkern nachgewiesen werden, die auf transkriptionelle Aktivität von p53 schließen lässt (Abbildung 3.8A), was durch die Induktion des p53-Zielgens p21 bekräftigt wird (Abbildung 3.5). Abgesehen von seiner Rolle als Transkriptionsfaktor im Kern kann p53 aber auch im Cytosol mit Vertretern der Bcl-2-Familie wechselwirken. Dabei kann es z.B. mit Bax direkt interagieren und es aktivieren, so dass es zur MOMP kommt. Andererseits kann p53 auch antiapoptotische Bcl-2-Proteine binden, die daraufhin BH3-only-Proteine freisetzen, die ihrerseits Bax aktivieren (Chipuk JE und Green DR 2006). In diesem

4. Diskussion

Zusammenhang konnte eine Translokation von p53 in die Mitochondrien gezeigt werden (Vaseva AV und Moll UM 2009). Auch dies konnte in BPDE-behandelten Hct116 nachgewiesen werden (Abbildung 3.8B), so dass für p53 eine doppelte Rolle während der BPDE-induzierten Apoptose gezeigt werden konnte: zum Einen akkumuliert es im Kern und wird dort transkriptionell aktiv, zum Anderen wirkt es direkt am intrinsischen Apoptoseweg mit und transloziert dabei in die Mitochondrien. In p53-defizienten Zellen konnte noch eine - wenn auch im Vergleich zum Wildtyp abgeschwächte - Aktivierung der Caspase 7 detektiert werden (Abbildung 3.7). Vermutlich ist hier der extrinsische Apoptoseweg beteiligt, da die Spaltung der Caspase 8 in p53-defizienten Zellen unbeeinträchtigt blieb. Interessanterweise kommt es in Bax-defizienten Zellen zu einer Verminderung der p53-Stabilisierung und p21-Induktion, aber nicht der p53-Phosphorylierung (Abbildung 3.10B). Dies wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Es besteht die Möglichkeit einer positiven Rückkopplung der p53-Interaktion mit Bax auf seine Stabilisierung, die jedoch noch mit siRNA oder ähnlichen Techniken bestätigt werden muss um einen Zelllinien-spezifischen Effekt auszuschließen.

Wichtige Stressmediatoren nach DNA-Schaden stellen die stressaktivierten Proteinkinasen (SAPK) p38 und JNK dar. Diese Proteine werden nach unterschiedlichen Stressfaktoren durch eine Kinasekaskade aktiviert (Krishna M und Narang H 2008) und spielen wichtige Rollen bei der Regulation von Proliferation und Differenzierung, aber auch Entzündung, Transformation und Apoptose (Tibbles LA und Woodgetts JR 1999; Pearson G *et al.* 2001). DNA-Schäden, z.B. nach ionisierender Strahlung (IR), stellen ebenfalls ein Signal zur Aktivierung der SAPK dar (Dent P *et al.* 2003). Auch BPDE löst die Aktivierung der p38 und JNK in epidermalen Mauszellen aus (Li J *et al.* 2004a; Li J *et al.* 2004b). In Hct116 konnte dies ebenfalls nachgewiesen werden (Abbildung 3.11). Anhand spezifischer Inhibitoren wurde eine Rolle der BPDE-induzierten SAPK-Aktivierung in der Apoptose festgestellt (Abbildung 3.12). Dieses Ergebnis steht teilweise im Widerspruch zu publizierten Daten aus murinen Hepa1c1c7-Zellen, in denen nur p38- aber nicht JNK-Inhibition einen hemmenden Effekt auf die BPDE-induzierten Apoptoseraten zeigte (Solhaug A *et al.* 2004a). Dies könnte auf spezies- oder zelltypabhängige Unterschiede hindeuten. In der vorliegenden Arbeit ging interessanterweise die Verminderung der

4. Diskussion

Apoptoserate durch SAPK-Inhibition nicht mit einer verminderten Caspase-Spaltung einher (Abbildung 3.14). In HepG2 konnte nach B[a]P eine p38-abhängige Ser15-Phosphorylierung von p53 gezeigt werden (Lin T *et al.* 2008), jedoch hatte p38 in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die p53-Phosphorylierung (Abbildung 3.13). Es besteht aber die Möglichkeit, dass die SAPK im untersuchten Modell über Phosphorylierung von p53 an einer anderen Aminosäure als dem untersuchten Serin 15 dessen Aktivität beeinflussen. Sowohl p38 als auch JNK können p53 an mehreren anderen Stellen phosphorylieren (Wu GS 2004), dies wurde aber in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Somit konnte kein Zusammenhang der SAPK-Aktivierung mit p53 oder Bax gezeigt werden (Abbildung 3.13), so dass auf einen weiteren, vom intrinsischen Apoptoseweg unabhängigen Signalweg geschlossen wurde. Ein Caspase-unabhängiger Signalweg wurde bereits durch die fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse nach Vorbehandlung der Zellen mit dem pan-Caspase-Inhibitor ZVAD vermutet. Die Hemmung der Caspasen verhinderte den vollständig kondensierten apoptotischen Phänotyp der behandelten Zellkerne, der als Apoptosemerkmal im Hoechst-Assay quantifiziert wurde (Abbildung 3.4A). Jedoch waren meist am Zellkernrand liegende, stärker fluoreszierende Bereiche in behandelten Zellen vorhanden, die ein Merkmal früher Apoptose sind (Abbildung 3.4B und C). Diese kondensierten Bereiche entstehen durch Endonukleasebedingte Chromatinspaltung in den Kernrandbereichen. Es kommt dadurch zur Ablösung der DNA-Schleifen von der Kernmembran, so dass die Chromatinstruktur zusammenbricht und dies nach DNA-Färbung als Bereich höherer Fluoreszenz sichtbar wird (Lagarkova MA *et al.* 1995). Caspase-unabhängige Mechanismen sind in Form der mitochondrialen Nukleasen EndoG und AIF bekannt. Diese sind in nicht apoptotischen Zellen im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert und werden durch apoptotische Stimuli aktiviert. Sie können dann durch das Cytosol in den Zellkern translozieren und dort Caspase-unabhängig die DNA fragmentieren (Mathiasen IS und Jäätelä M 2002; Lorenzo HK und Susin SA 2004). Für PAK wurde noch keine Aktivierung von AIF oder EndoG beschrieben. Es ist jedoch bekannt, dass sie durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in humanen Lungenepithel- und mesenchymalen Vorläuferzellen aktiviert werden können (Liu PL *et al.* 2005; Whiteman M *et al.* 2007) und zu Caspase-unabhängigem

4. Diskussion

apoptotischem Zelltod führen. Beim metabolischen Abbau von PAK kommt es ebenfalls zur Bildung von ROS, was bisher allerdings nur für einen zur Entstehung von BPDE alternativen Abbauweg von B[a]P über B[a]P-Katechol beschrieben wurde (Flowers L *et al.* 1996). Daher wurden Kernextrakte und Mitochondrienextrakte auf BPDE-induzierte Translokation von AIF und EndoG untersucht, jedoch konnte unter den getesteten Versuchsbedingungen keine solche festgestellt werden (Abbildung 3.15, Daten nicht gezeigt). Möglicherweise kann durch Variation von Behandlungsdauer und BPDE-Dosis ein entsprechender Effekt gezeigt werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter verfolgt. Wie die SAPK nun die Apoptose beeinflussen bleibt damit weiterhin ungeklärt. Weiterhin könnte der beobachtete Effekt über einen weiteren, gänzlich unbekanntem Weg zustande kommen. Das Vorhandensein der kondensierten DNA-Bereiche durch BPDE in mit Caspase-Inhibitor vorbehandelten Zellen lässt darüber hinaus auf die Beteiligung Caspase-unabhängiger Faktoren schließen, deren Identität jedoch noch nicht geklärt werden konnte.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass durch BPDE in Hct116 einerseits über ATR und ATM ein Zellzyklusblock, andererseits über p53, Bax und die SAPK Apoptose ausgelöst wird. An letzterer sind die Caspasen 3 und 7 beteiligt, die sowohl über den extrinsischen Weg über Caspase 8 als auch den intrinsischen Weg über Caspase 9 aktiviert werden. Die SAPK beeinflussen die Apoptose über einen Caspase-unabhängigen Weg, wobei keine Beteiligung der mitochondrialen Nukleasen AIF und EndoG nachgewiesen werden konnte. Die identifizierten Signalwege der BPDE-induzierten zellulären Reaktionen sind in Abbildung 4.1 noch einmal zusammengefasst. Wie aus den gewonnenen Erkenntnissen klar wird, spielt die Dosis bei der Aktivierung der identifizierten Signalwege und den zellulären Konsequenzen eine wichtige Rolle. Daher wird dieser Aspekt im folgenden Abschnitt noch einmal für alle beobachteten zellulären Reaktionen in Zusammenhang gesetzt und diskutiert.

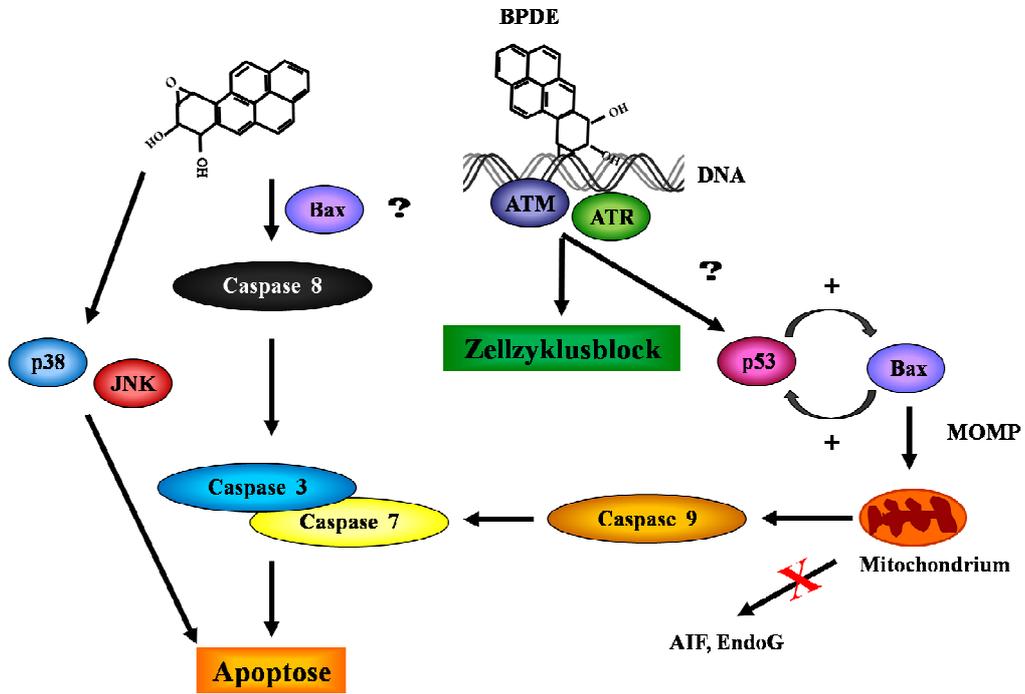


Abbildung 4.1: Zusammenfassung der identifizierten Signalwege der BPDE-induzierten zellulären Reaktionen.

BPDE aktiviert über unterschiedliche Faktoren sowohl den intrinsischen als auch den extrinsischen Apoptoseweg sowie einen Zellzyklusarrest. Nähere Erläuterungen siehe Text

4.3 Dosisabhängigkeit von Zelltod, Proliferationshemmung und Zellzyklusblockaden nach BPDE

Wie in Abbildung 3.1 gezeigt führt BPDE in Hct116 zu einer Verringerung der Zellzahl. Mittels des Fluoreszenzmikroskopie-basierenden Hoechst-Assays konnte gezeigt werden, dass Apoptose dabei hauptsächlich im mittleren Dosisbereich von 0,5 μM eine Rolle spielt (Abbildung 3.2). Im Einklang damit erreichen auch die Caspasen ihr Aktivitätsmaximum bei 0,5 μM , wobei dies sowohl für die intrinsischen und extrinsischen Initiatorcaspasen 9 bzw. 8 als auch für die Effektorcaspase 7 zutrifft (Abbildung 3.3). BPDE-induzierte Apoptose konnte mittels des Hoechst-Assays auch in anderen Zelllinien gezeigt werden (Daten nicht gezeigt) so z.B. der murinen Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3, aber auch in anderen humanen Linien wie HeLa (Zervixkarzinom) und HepG2 (Leberkarzinom). Da die umfassendsten weiterführenden Untersuchungen aus den oben genannten Gründen in Hct116 durchgeführt wurden, werden hier nur diese Daten gezeigt. Wie ebenfalls aus den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen hervorgeht, führt BPDE im untersuchten Dosisbereich nicht zu Nekrose in Hct116. Ein Anstieg an PI-positiven Zellen war zwar vorhanden, aber im Vergleich zur Apoptoserate verschwindend gering und könnte auch von spätapoptotischen Zellen herrühren, die ebenfalls für PI zugänglich sind. Dafür spricht auch, dass nach Vorbehandlung mit dem Caspase-Inhibitor ZVAD keine PI-positiven Zellen mehr detektiert wurden (Daten nicht gezeigt). In HepG2-Zellen löst dagegen die Muttersubstanz B[a]P Nekrose aus (Lin T und Yang MS 2008), und in Hepa1c1c7 bewirkt B[a]P zu etwa gleichen Teilen Apoptose und Nekrose (Solhaug A *et al.* 2004b). Lin *et al.* untersuchten auch die genauen Mechanismen der B[a]P-induzierten Nekrose in HepG2 und konnten PARP dabei als wichtigen Faktor identifizieren. PARP wird durch DNA-Schäden aktiviert und kann dann unter NAD^+ -Verbrauch Poly-(ADP-Ribose)-Einheiten auf Substrate übertragen. Durch B[a]P-Metabolismus entstehen wie bereits erläutert Diolepoxide, die DNA-Schäden verursachen und so zu einer Aktivierung von PARP führen. Die damit verbundene Energiedepletion der Zelle führt dann zum nekrotischen Zelltod, da die zur Apoptose nötige Energie durch PARP verbraucht wird. In einer weiteren Veröffentlichung konnte in HepG2 eine Rolle der MAPK bei der PARP-abhängigen Nekrose nach B[a]P gezeigt werden (Lin T *et al.* 2008). Da in den beiden genannten

4. Diskussion

Publikationen die Muttersubstanz und nicht wie in der vorliegenden Arbeit das ultimative Kanzerogen BPDE eingesetzt wurde, könnten für den nekrotischen Effekt andere Metabolite oder die Muttersubstanz selbst verantwortlich sein. Ein BPDE-induzierter, nekrotischer Zelltod über PARP kann auch ausgeschlossen werden, da PARP-Spaltung im Western Blot nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.3B). Dies ist ein Merkmal der Apoptose, da die Apoptose-bedingte Fragmentierung der DNA eine permanente Aktivierung der PARP zu Folge hätte. Durch die Caspase-abhängige Spaltung von PARP wird die zur Aktivierung benötigte DNA-Bindungsdomäne abgetrennt. Damit wird die PARP-abhängige Depletion der für die Apoptose benötigten Energie in der Zelle verhindert. Wie die Western Blot-Untersuchungen der PARP zeigen (Abbildung 3.3) ist im Dosisbereich der höchsten Apoptoserate (0,5 μM) auch die stärkste PARP-Spaltung zu verzeichnen, bei 2 μM ist sie dagegen kaum noch detektierbar. Diese Beobachtungen legen nahe, dass BPDE bei höheren als den verwendeten Dosen Nekrose statt Apoptose auslösen könnte. Dies wurde aber hier nicht untersucht. Ein anderer möglicher Faktor ist die Dauer der Behandlung, da Nekrose möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt als Apoptose ausgelöst wird und zu den untersuchten Zeitpunkten noch nicht detektierbar war. Diese Hypothese unterstützt, dass in der oben erwähnten Studie die nekrotischen Effekte von B[a]P in HepG2 ebenfalls erst nach einer Dosis von 10 μM und 48 h Behandlungsdauer detektiert werden konnten (Lin T und Yang MS 2008).

Was passiert aber in den mit 1 oder 2 μM BPDE behandelten Zellen? Hier kommt es ebenfalls zu einer reduzierten Zellzahl, die mit der in mit 0,5 μM BPDE-behandelten Zellen vergleichbar, aber nicht auf Apoptose zurückzuführen ist (Abbildung 3.1 und 3.2). Auch die verminderte Zellzahl trotz Inhibition der Caspase-abhängigen Apoptose bedarf einer Erklärung (Abbildung 3.4). Als weitere Möglichkeit wurde die Proliferation in Form der Mitoserate behandelter Zellen betrachtet. Hierbei ergab sich, dass bei 0,5 μM BPDE, wobei die höchste Apoptoserate festgestellt wurde, auch noch ein geringer Anteil mitotischer Zellen vorhanden war (Abbildung 3.16). Gentoxine können in proliferierenden Zellen deutlich größeren Schaden anrichten als in nicht proliferierenden, da sich bei der Replikation geschädigter DNA Mutationen manifestieren können. Von diesem Prinzip wird z.B. auch beim Einsatz von Chemotherapeutika in der Krebstherapie Gebrauch gemacht, da

4. Diskussion

die stark proliferierenden Tumorzellen wesentlich empfindlicher auf die eingesetzten Gentoxine reagieren als die gesunden Zellen. So ist es möglich, dass der proliferationshemmende Effekt bei den höheren Dosen überwiegt, während bei niedrigeren Dosen noch Proliferation stattfindet und dadurch die Apoptoserate im Vergleich zu höheren Dosen steigt.

Ausgehend von dieser Vorstellung erwartet man einen mit steigender Dosis stärker werdenden Zellzyklusblock. In Abbildung 3.17 zeigen jedoch niedrige Dosen den stärksten Effekt in Form eines G2/M-Blocks bei 0,1 μM und S-Phase-Blocks bei 0,3-0,6 μM , während bei höheren Konzentrationen das Profil dem der Kontrolle gleicht. Eine Erklärung dafür ist, dass bei den hohen Dosen der Zellzyklus komplett angehalten wird, und daher keine Akkumulation in einer Zellzyklusphase erkennbar ist. Dafür spricht, dass ab einer Konzentration von 1 μM keine Proliferation mehr detektiert werden konnte (Abbildung 3.16) und auch nach Hemmung der Caspasen die Zellzahl gleichermaßen wie in der Lösungsmittelkontrolle abnahm (Abbildung 3.4A).

Der Dosisbereich, in dem die Zellzyklusblocks feststellbar waren, erstreckt sich also von 0,1-0,6 μM und überschneidet sich damit mit dem Bereich der maximalen Cytotoxizität, der im Hoechst-Assay und Western Blot bei 0,5 μM detektiert wurde (Abbildung 3.2 und 3.21). Wie aus der Zeitkinetik hervorgeht, normalisiert sich nach 24 h das Zellzyklusprofil nach niedrigen BPDE-Konzentrationen (0,3 μM) wieder (Abbildung 3.18), so dass nach diesen Zeitpunkten die DNA-Schäden vermutlich repariert sind und die Zellen die Proliferation wieder aufnehmen.

Die BPDE-induzierten zellulären Konsequenzen sind also vielfältig und abhängig von der Dosis. Zusammenfassend kann man sagen, dass bei den niedrigsten untersuchten BPDE-Konzentrationen ein Zellzyklusblock auftritt, der sich in der G2/M- bzw. bei etwas höheren Konzentrationen in der S-Phase abspielt. Ab 0,5 μM ist eine Hemmung der Proliferation feststellbar, die ab 1 μM in einen vollständigen Proliferationsstopp übergeht. Der Proliferationsstopp geht einher mit einem „Einfrieren“ des Zellzyklusprofils, also einem Stopp in allen Zellzyklusphasen, so dass keine Akkumulation der Zellen in einer bestimmten Phase detektiert werden konnte. Die Apoptose findet ihren Höhepunkt im

4. Diskussion

mittleren Dosisbereich, um bei höheren Konzentrationen wieder abzunehmen. Dieses konzentrationsabhängige Maximum und der anschließende Abfall der Apoptoserate kommt möglicherweise durch die trotz des Zellzyklusblock noch stattfindenden Proliferation zustande, durch die DNA-Schäden sich als Mutationen manifestieren und zum Absterben der Zelle führen. Ab 1 μM ist dagegen keine Proliferation mehr vorhanden und auch die prozentuale Apoptoserate nimmt ab. Dies ist in Abbildung 4.1 noch einmal veranschaulicht.

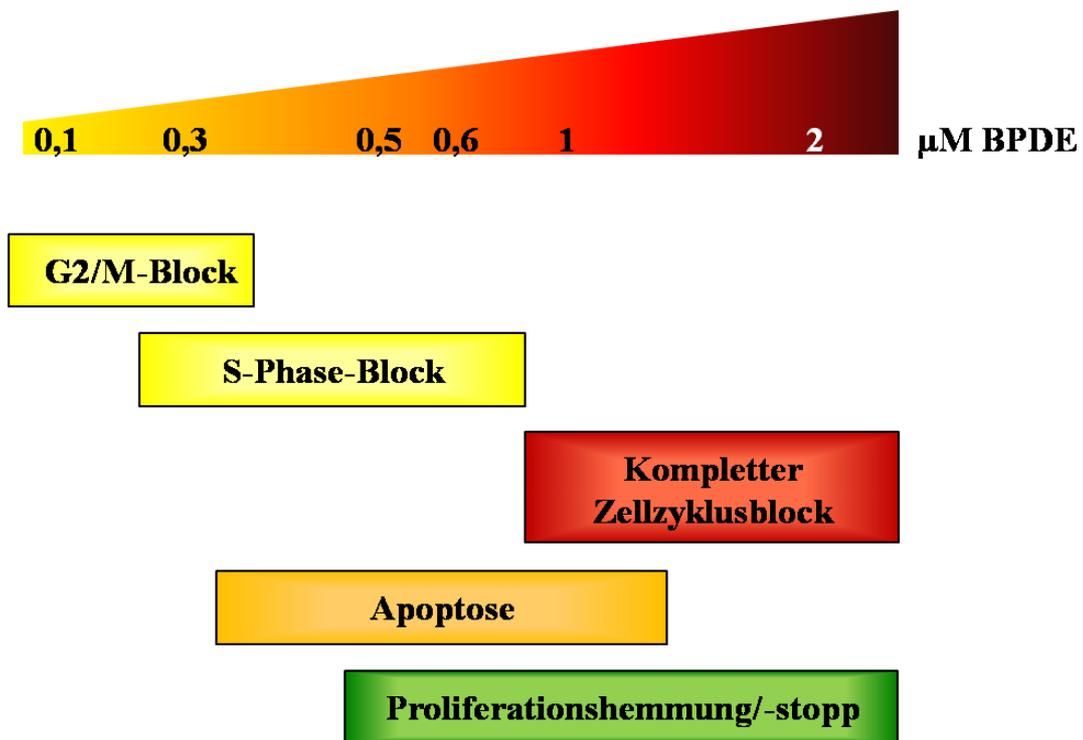


Abbildung 4.2: Übersicht über die Dosisabhängigkeit der BPDE-induzierten zellulären Reaktionen.

Je nach Dosis löst BPDE unterschiedliche Reaktionen der Zelle aus, die zu Veränderungen der Proliferation, Apoptose oder Zellzyklusarrest führen können. Nähere Angaben siehe Text

4.4 Vergleich der BPDE-induzierten zellulären Antwort mit der auf andere Diolepoxide polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe

Um zu untersuchen, ob sich die für BPDE gewonnenen Erkenntnisse auch auf andere Vertreter der PAK anwenden lassen, wurden ausgewählte vergleichende Experimente mit BPDE und zwei weiteren PAK-Diolepoxiden durchgeführt. Wie in Abschnitt 1.1.2 bereits beschrieben handelt es sich bei den beiden anderen untersuchten PAK-Metaboliten Benzo[c]phenanthren-Diolepoxid (BPhenDE) und Dibenzo[a,l]pyren-Diolepoxid (DBPDE) um so genannte Fjord-Region-PAK, während BPDE eine Bay-Region besitzt. Fjord-Region-PAK können aufgrund ihrer gewinkelten Molekülstruktur besser in die DNA interkalieren, was zu einer schlechteren Erkennung und Entfernung durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und infolge dessen zu einer höheren Kanzerogenität im Vergleich zu strukturell ähnlichen, planaren Bay-Region-PAK wie BPDE führt (Lehr RE und Jerina DM 1977; Amin S *et al.* 1995; Amin S *et al.* 2003). Es gibt jedoch andere Reparaturmechanismen, über die entsprechende Schäden entfernt werden können. So können BPhenDE-Addukte teilweise über die Fehlpaarungsreparatur (*mismatch repair*, MMR) entfernt werden (Wu J *et al.* 2003). DBPDE-DNA-Addukte werden in der humanen Lungenkarzinomzelllinie A549 nicht nur aufgrund ihrer schlechten Erkennung durch die NER in geringerem Maß repariert, sondern es bilden sich bei gleichen Dosen auch deutlich mehr Addukte als nach BPDE (Dreij K *et al.* 2005). Durch fehlerhafte Reparatur der Addukte kommt es in Experimenten mit präneoplastischer Maushaut durch Depurinierung zu abasischen Stellen, die sich als Mutationen manifestieren (Chakravarti D *et al.* 2000). Bei der Entfernung von DBPDE-induzierten Läsionen sind in Hamsterzellen die Basenexzisionsreparatur (BER) sowie Homologe Rekombination (HR) von Bedeutung (Meschini R *et al.* 2010). Doch wie finden sich diese Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den Versuchsergebnissen wieder?

Wie in Abbildung 3.21 dargestellt lösen auch die beiden Fjord-Region-PAK-Diolepoxide Apoptose in Hct116 aus. Jedoch erreichen beide im untersuchten Konzentrationsbereich nicht wie BPDE eine maximale Apoptoserate, die bei höheren Konzentrationen wieder abnimmt, sondern die Apoptoserate bleibt etwa gleich und tendenziell unter der von BPDE.

4. Diskussion

Bedeutet das, dass die Fjord-Region-PAK-Diolepoxide eine geringere Cytotoxizität als BPDE besitzen? Betrachtet man dazu die Spaltung der Effektorcaspase 7 fällt auf, dass BPhenDE ein klares Maximum der Aktivierung bereits bei der geringsten getesteten Konzentration von 0,1 μM zeigt, während DBPDE bei allen untersuchten Konzentrationen nur eine schwache Caspase 7-Spaltung bewirkt. Es ist zu vermuten, dass die DNA-Adduktrate eine Rolle bei der Induktion der Apoptose spielt. BPhenDE wurde mit BPDE und anderen PAK-Diolepiden bezüglich der verursachten Schäden in Exon 8 von p53 verglichen und zeigte dort tendenziell geringere Effekte (Smith LE *et al.* 2000). Da sich jedoch die verschiedenen PAK-Diolepiden bezüglich der Stellen im Exon unterschieden, wo sie den Schaden verursachten, ist dieses Ergebnis nicht mit einer Untersuchung der generellen Adduktrate gleichzusetzen, da BPhenDE eventuell in anderen DNA-Abschnitten mehr Addukte liefert als BPDE. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Mutationsmuster von Bay- und Fjord-Region-PAK-Diolepiden sich unterschieden, die beiden Gruppen aber in sich höhere Gemeinsamkeit aufwiesen. Sollte die höhere dosisbezogene Adduktrate von DBPDE (s.o.) ein gemeinsames Merkmal der Fjord-Region-PAK-Diolepiden sein, könnte der Bereich der maximalen Apoptose bei DBPDE noch unter den getesteten 0,1 μM liegen, während für BPhenDE der Dosisbereich der maximalen Apoptose bereits bei 0,1 μM erreicht ist. Um diese Annahme zu überprüfen, müssen die Adduktraten der drei PAK-Metaboliten in Hct116 bestimmt und verglichen werden. Gibt es solche Verschiebungen der Dosisabhängigkeit auch bei den im Western Blot untersuchten an der Apoptose beteiligten Signalmediatoren? Tatsächlich findet sich ein solches Bild auch für die Stabilisierung von p53 (Abbildung 3.24A). Auch hier ist die maximale Proteinmenge, die für BPDE bei etwa 0,6 μM erreicht ist, bei BPhenDE bereits bei 0,1 μM erreicht, während p53 bei DBPDE lediglich bei 0,1 und 0,3 μM überhaupt detektierbar ist. Es bleibt zu vermuten, dass auch hier die maximale Stabilisierung bei niedrigeren Konzentrationen erreicht wird und die Proteinmenge im untersuchten Dosisbereich bereits wieder abnimmt. Ähnliche Ergebnisse zeigte ein Vergleich der Muttersubstanzen B[a]P und DB[a,l]P bezüglich der p53-Stabilisierung in MCF-7-Zellen. Hier genügten 10 nM DB[a,l]P um vergleichbare p53-Mengen zu stabilisieren wie 1 μM B[a]P (Pliskova M *et al.* 2005). Ein ähnliches Bild ergibt sich auch für die phosphorylierte Form der p38 (Abbildung 3.24B).

4. Diskussion

Während die Aktivierung bei BPDE mit der Dosis stetig zunimmt, erreicht die Phosphorylierung bei DBPDE bereits bei 0,1 μM ihr Maximum. BPhenDE weist hier allerdings eine vergleichbare Dosisabhängigkeit wie BPDE auf. JNK zeigt ein ähnliches Aktivierungsmuster bei DBPDE und BPhenDE, wird jedoch auch bei hohen BPDE-Konzentrationen nur schwach aktiviert. Möglicherweise führen höhere BPDE-Dosen zu einer stärkeren Aktivierung. Sicherlich abhängig von der Adduktrate ist die Phosphorylierung von Chk2, da es ein direktes Substrat der DNA-Schadenserkennungsproteine ATR/ATM ist. Betrachtet man das Phosphorylierungsmuster der Chk2 in Abbildung 3.24B findet sich auch hier eine maximale Phosphorylierung im niedrigen Dosisbereich bei 0,1 μM für die beiden Fjord-Region-PAK-Diolepoxide, während bei BPDE erst im höheren Dosisbereich ab etwa 0,6 μM die Phosphorylierung der Chk2 zunimmt und bei 1 μM ihr Maximum erreicht. Anhand der vorliegenden Daten wurde daher darauf geschlossen, dass die untersuchten PAK-Diolepoxide dieselben Signalwege anschalten. Dabei kann verallgemeinernd gesagt werden, dass Fjord-Region-PAK-Diolepoxide im Vergleich zu Bay-Region-Diolepoxiden ihre Wirkung bereits bei niedrigeren Konzentrationen entfalten. Diese Theorie deckt sich mit der Beobachtung, dass Fjord-Region-PAK eine höhere Kanzerogenität und im Fall von DBPDE auch eine höhere Adduktrate pro eingesetzter Substanzmenge bewirken, und die vorhandenen Addukte zusätzlich auch schlechter repariert werden. Um dieses Modell zu bestätigen müssen jedoch Versuche in einem breiteren Dosisbereich durchgeführt werden.

Wie passen die Ergebnisse der Zellzyklusuntersuchung von BPhenDE in dieses Bild (Abbildung 3.25)? Wie BPDE verursacht auch BPhenDE bei niedrigeren Dosen einen G2/M, bei mittleren einen S-Phase-Block, während bei hohen Dosen die Zellzyklusphasenverteilung sich wieder der Kontrolle annähert. Interessanterweise ergibt sich hier eine vergleichbare Dosisabhängigkeit wie mit BPDE, was gegen die Theorie der höheren Adduktrate pro Substanzmenge spricht. Die Schwankungen der Zellzyklusphasen sind dabei deutlich höher als nach Behandlung mit BPDE (Abbildung 3.17). Interessant wäre auch hier die Untersuchung der Zeitabhängigkeit, um zu sehen ob die schlechtere Reparatur eventuell verhindert, dass der Block wieder aufgehoben wird. Dies würde auch die stärkere Anhäufung von Zellen in der jeweiligen Phase nach 16 h erklären, da nach

4. Diskussion

BPDE-Behandlung Zellen mit repariertem Schaden bereits wieder den normalen Zellzyklus aufgenommen haben. Für DB[a]P, die Muttersubstanz des DBPDE, wurde in einer vergleichenden Studie mit B[a]P in MCF-7 gezeigt, dass sie nach 72 h ebenfalls eine Akkumulation der Zellen in der S-Phase herbeiführt, die bereits bei 0,1 μM , einem Zehntel der in dieser Studie eingesetzten B[a]P Dosis, einen deutlich stärkeren Effekt aufwies. Höhere Konzentrationen senkten den S-Phase-Anteil der Zellen wieder, so dass auch hier auf einen dosisabhängigen Zellzyklusblock geschlossen werden kann (Pliskova M *et al.* 2005). Abweichend davon konnte in humanen Hautfibroblasten (*human dermal fibroblasts*, HDF) gezeigt werden, dass DBPDE einen G1-Block auslöst, der mit p53 und p21 aufgrund ihres Nachweises im Western Blot in Verbindung gebracht wurde. Dieser Effekt wurde allerdings bei Konzentrationen von 0,028 μM beobachtet (Mahadevan B *et al.* 2001).

Zusammen mit den Erkenntnissen aus aktuellen Publikationen kann man also aus den vorliegenden Daten schließen, dass die Mitglieder der Gruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe zwar ähnliche Wirkungen haben, die sich aber substanzspezifisch in der Konzentrationsabhängigkeit der ausgelösten Signalwege und endgültigen Konsequenzen ihrer Aktivierung unterscheiden. Der Vergleich der beiden hier verwendeten Fjord-Region-PAK-Diolepoxide BPhenDE und DBPDE mit dem Bay-Region-PAK-Diolepoxid BPDE weist auf eine stärkere Wirkung der Fjord-Region-Vertreter hin, die jedoch in einem Vergleich einer größeren Anzahl von Vertretern dieser PAK-Klassen bestätigt werden muss.

4.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten neue Einblicke in die Mechanismen der BPDE-induzierten zellulären Reaktionen gewonnen werden. Dabei konnte p53 als wichtiger Faktor in der BPDE-induzierten Apoptose sowohl in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor als auch direkt in den Mitochondrien identifiziert werden. Über die genaue Funktion von p53 in den Mitochondrien ist noch nicht viel bekannt, so dass hier noch weitere Untersuchungen wie Interaktionsstudien mit Bax oder anderen Bcl-2-Vertretern interessant wären. Auch ist bezüglich der Apoptose die Aktivierung des

4. Diskussion

extrinsischen Weges noch nicht geklärt. Hier bleibt zu klären ob und wenn ja, welche Rezeptoren durch BPDE aktiviert werden, oder ob Caspase 8 über einen anderen Weg aktiviert wird. Auch die Rolle von Bax in diesem Zusammenhang bedarf weiterer Untersuchungen. Die Rolle der SAPK konnte noch nicht aufgeklärt werden, auch hier könnten weiterführende Experimente Aufschluss bringen. Alternativen zum apoptotischen Zelltod stellen Nekrose, Seneszenz und Autophagie dar. Während erstere unter den untersuchten Bedingungen nicht beobachtet werden konnte, wurden Seneszenz und Autophagie in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und stellen einen weiteren interessanten Endpunkt dar.

Zum BPDE-induzierten Zellzyklusblock und den beteiligten Mechanismen ist schon vieles bekannt, doch die Hintergründe des *stealth*-Effekts sind noch nicht geklärt (wie wird der proteasomale Ablauf von p21 geregelt, und welche Proteasen sind beteiligt?) und ob die beschriebenen Abläufe in G2/M und S-Phase-Block auch für die in dieser Arbeit untersuchte Zelllinie gilt ist durch die Beteiligung von ATR/ATM zwar wahrscheinlich, bleibt aber auch noch zu beweisen.

Wie unter 4.3 diskutiert gibt es bei den unterschiedlichen untersuchten PAK Gemeinsamkeiten in der Art und Unterschiede in der Dosisabhängigkeit der zellulären Antwort. Um allgemeingültige Aussagen zu PAK und ihrer Toxizität treffen zu können, und genauer zu untersuchen wie strukturelle Merkmale wie Bay- oder Fjord-Region die zelluläre Antwort beeinflussen, sollte des Weiteren eine größere Anzahl an Vertretern experimentell verglichen werden, wobei auch die Adduktrate mit einbezogen werden sollte.

Eine weitere bekannte Konsequenz der PAK ist die Induktion der inflammatorischen Antwort (Goulaouic S *et al.* 2008; Dreij K *et al.* 2010). Dieser Aspekt wurde in dieser Arbeit nicht betrachtet, stellt aber ebenfalls einen wichtigen Gesichtspunkt dar, der das Bild der zellulären Reaktionen auf BPDE vervollständigen würde.

Da alle Versuche in einer Zelllinie durchgeführt wurden, sollten die gewonnenen Erkenntnisse *in vivo* im Tierversuch bestätigt werden und dabei die Konsequenzen für den Gesamtorganismus betrachtet werden.

5 Literaturverzeichnis

Adimoolam S und Ford JM. p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair* 2(9), 947-954. 18-9-2003.

Alexandrov K, Rojas M, Kadlubar FF, Lang NP und Bartsch H. Evidence of anti-benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct formation in human colon mucosa. *Carcinogenesis* 17(9), 2081-2083. 1-9-1996.

Allan LL, Schlezinger JJ, Shansab M und Sherr DH. CYP1A1 in polycyclic aromatic hydrocarbon-induced B lymphocyte growth suppression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342(1), 227-235. 31-3-2006.

Amin S, Krzeminski J, Rivenson A, Kurtzke C, Hecht SS. und El-Bayoumy K. Mammary carcinogenicity in female CD rats of fjord region diol epoxides of benzo[c]phenanthrene, benzo[g]chrysene and dibenzo[a,l]pyrene. *Carcinogenesis* 16(8), 1971-1974. 1-8-1995.

Amin S, Lin JM, Krzeminski J, Boyiri T, Desai D und El-Bayoumy K. Metabolism of Benzo[c]chrysene and Comparative Mammary Gland Tumorigenesis of Benzo[c]chrysene Bay and Fjord Region Diol Epoxides in Female CD Rats. *Chemical Research in Toxicology* 16(2), 227-231. 25-1-2003. American Chemical Society.

Apostolov EO, Wang X, Shah SV und Basnakian AG. Role of EndoG in development and cell injury. *Cell Death Differ* 14(11), 1971-1974. 31-8-2007. Nature Publishing Group.

Aylon Y und Oren M. Living with p53, Dying of p53. *Cell* 130(4), 597-600. 24-8-2007.

Barlow C, Hirotsune S, Paylor R, Liyanage M, Eckhaus M, Collins F, Shiloh Y, Crawley JN, Ried T, Tagle D und Wynshaw-Boris A. Atm-Deficient Mice: A Paradigm of Ataxia Telangiectasia. *Cell* 86(1), 159-171. 12-7-1996.

Barr RK und Bogoyevitch MA. The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33(11), 1047-1063. 2001.

Bartek J und Lukas J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Current Opinion in Cell Biology* 13(6), 738-747. 1-12-2001.

Bassing CH, Suh H, Ferguson DO, Chua KF, Manis J, Eckersdorff M, Gleason M, Bronson R, Lee C und Alt FW. Histone H2AX: A Dosage-Dependent Suppressor of Oncogenic Translocations and Tumors. *Cell* 114(3), 359-370. 8-8-2003.

Bellamy COC. p53 and apoptosis. *British Medical Bulletin* 53(3), 522-538. 1-1-1997.

Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF und Marshall CJ. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Current Biology* 8(19), 1049-1057. 24-9-1998.

Bi X, Slater DM., Ohmori H und Vaziri C. DNA Polymerase kappa Is Specifically Required for Recovery from the Benzo[a]pyrene-Dihydrodiol Epoxide (BPDE)-induced S-phase Checkpoint. *Journal of Biological Chemistry* 280(23), 22343-22355. 10-6-2005.

Bigger CA, Stransberg J, Yagi H, Jerina DM und Dipple A. Mutagenic specificity of a potent carcinogen, benzo[c]phenanthrene (4R,3S)-dihydrodiol (2S,1R)-epoxide, which reacts with adenine and guanine in DNA. *PNAS* 86, 2291-2295. 1989.

Black KA, McFarlans RD, Grisham JW und Smith GJ. S-phase block and cell death in human lymphoblasts exposed to benzo[a]pyrene diol epoxide or N-acetoxy-2-acetylaminofluorene. *Toxicol Appl Pharmacol.* 97(3), 463-472. 1-3-1989.

Boffetta P, Jourenkova N und Gustavsson P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cent Eur J Public Health* . 1996.

Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S und Smulson M. Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Cleavage in Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 274(33), 22932-22940. 13-8-1999.

Broderick R und NasheuernHP. Regulation of Cdc45 in the cell cycle and after DNA damage. *Biochemical Society Transactions* 037(4), 926-930. 1-8-2009.

Brown JR und Thornton JL. Percivali Pott (1714-1788) and Chimney Sweepers' Cancer of the Scrotum. *BRITISH JOURNAL OF INDUSTRIAL MEDICINE* 14(1), 68-70. 1957.

Brunelle JK und Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *Journal of Cell Science* 122(4), 437-441. 15-2-2009.

Bulavin DV, Higas, moto Y, Popoff II., Gaarde WA, Basrur V, Potapova O, Appella E und Fornace AJ. Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature* 411(6833), 102-107. 3-5-2001.

Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW und Vogelstein, B. Requirement for p53 and p21 to Sustain G2 Arrest After DNA Damage. *Science* 282(5393), 1497-1501. 20-11-1998.

Burden DA und Osheroff N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1400(1-3), 139-154. 1-10-1998.

Caino MC, Oliva JL, Jiang H, Penning TM und Kazanietz MG. Benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol Promotes Checkpoint Activation and G2/M Arrest in Human Bronchoalveolar Carcinoma H358 Cells. *Molecular Pharmacology* 71(3), 744-750. 2007.

Celeste A, Difilippantonio S, Difilippantonio MJ, Fernandez-Capetillo O, Pilch DR, Sedelnikova OA, Eckhaus M, Ried T, Bonner WM und Nussenzweig A. H2AX Haploinsufficiency Modifies Genomic Stability and Tumor Susceptibility. *Cell* 114(3), 371-383. 8-8-2003.

Chakravarti D, Mailander PC, Cavalieri EC und Rogan EG. Evidence that error-prone DNA repair converts dibenzo[a,l]pyrene-induced depurinating lesions into mutations: formation, clonal proliferation and regression of initiated cells carrying H-ras oncogene mutations in early preneoplasia. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 456(1-2), 17-32. 30-11-2000.

Chen JH, Hales CN und Ozanne SE. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Research* 35(22), 7417-7428. 3-12-2007.

Chen S, Nguyen N, Tamura K, Karin M und Tukey RH. 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. *Journal of Biological Chemistry* 278(21), 19526-19533. 23-5-2003.

Chipuk JE und Green DR. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ* 13(6), 994-1002. 17-3-2006.

Chung CH und Gillison ML. Human Papillomavirus in Head and Neck Cancer: Its Role in Pathogenesis and Clinical Implications. *Clinical Cancer Research* 15(22), 6758-6762. 15-11-2009.

Cleaver JE. Do we know the cause of xeroderma pigmentosum? *Carcinogenesis* 11(6), 875-882. 1-6-1990.

Comen EA und Robson M. Inhibition of Poly(ADP)-Ribose Polymerase as a Therapeutic Strategy for Breast Cancer. *Oncology* 24(1). 26-1-2010.

Conti C, Seiler J und Pommier Y. The Mammalian DNA Replication Elongation Checkpoint: Implication of Chk1 and Relationship with Origin Firing as Determined by Single DNA Molecule and Single Cell Analyses. *Cell Cycle* 6(22), 2760-2767. 15-11-2007.

Cuenda A und Rousseau S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1773(8), 1358-1375. 2007.

Dangi S, Chen FM und Shapiro P. Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in G2 phase delays mitotic entry through p21CIP1. *Cell Proliferation* 39(4), 261-279. 7-7-2006.

Dantzer F, Schreiber V, Niedergang, C., Trucco C, Flatter E, De La Rubia G, Oliver J, Rolli V, Menissier-de Murcia J und de Murcia G. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair. *Biochimie* 81(1-2), 69-75. 2-1-1999.

Das S, Boswell SA, Aaronson SA und Lee SW. p53 promoter selection: choosing between life and death. *Cell Cycle* 7(2), 154-157. 15-1-2007.

de Kok TCM und van Maanen JMS. Evaluation of fecal mutagenicity and colorectal cancer risk. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 463(1), 53-101. 2000.

Denissenko MF, Pao P, Tang MS und Pfeifer GP. Preferential Formation of Benzo[a]pyrene Adducts at Lung Cancer Mutational Hotspots in P53. *Science* 274(5286), 430-432. 18-10-1996.

Dent P, Yacoub A, Fisher PB, Hagan MP und Grant S. MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* 22(37), 5885-5896. 2003. Nature Publishing Group.

Dhanasekaran DN und Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27(48), 6245-6251. 2008. Macmillan Publishers Limited.

Dreij K, Rhissorrakrai K, Gunsalus K, Geacintov NE und Scicchitano DA. Benzo[a]pyrene Diol Epoxide Stimulates an Inflammatory Response in Normal Human Lung Fibroblasts through a p53 and JNK Mediated Pathway. *Carcinogenesis* 0(2010). 9-4-2010.

Dreij K, Seidel A und Jernstrom B. Differential Removal of DNA Adducts Derived from anti-Diol Epoxides of Dibenzo[a,l]pyrene and Benzo[a]pyrene in Human Cells. *Chemical Research in Toxicology* 18(4), 655-664. 24-3-2005. American Chemical Society.

Edwards NT. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH's) in the Terrestrial Environment A Review. *Journal of Environmental Quality* 12(4), 427-441. 1-10-1983.

Engel K, Kotlyarov A und Gaestel M. Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation. *EMBO J* 17(12), 3363-3371. 15-6-1998. European Molecular Biology Organization.

Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J und Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410(6830), 842-847. 12-4-2001. Macmillian Magazines Ltd.

Flowers L, Bleczynski WF, Burczynski ME, Harvey RG und Penning TM. Disposition and Biological Activity of Benzo[a]pyrene-7,8-dione. A Genotoxic Metabolite Generated by Dihydrodiol Dehydrogenase. *Biochemistry* 35(42), 13664-13672. 22-10-1996. American Chemical Society.

Friedberg EC, Fischhaber PL und Kisker C. Error-Prone DNA Polymerases - Novel Structures and the Benefits of Infidelity. *Cell* 107, 9-12. 5-10-2001.

Fuhrmann GF, Aigner A, Büch T, Legrum W und Steffen S. Karzinogenese, Genotoxische Stoffe und Stoffklassen. *Toxikologie für Naturwissenschaftler - Einführung in die Theoretische und Spezielle Toxikologie*. (9), 365-423. 2006. Wiesbaden, B.G. Teubner Verlag.

Giles GI und Sharma RP. Topoisomerase Enzymes as Therapeutic Targets for Cancer Chemotherapy. *Medicinal Chemistry* 1, 383-394. 2005.

Glatt H, Piee A, Pauly K, Steinbrecher T, Schrode R, Oesch F und Seidel A. Fjord- and Bay-Region Diol-Epoxides Investigated for Stability, SOS Induction in *Escherichia coli*, and Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* and Mammalian Cells. *Cancer Research* 51(6), 1659-1667. 15-3-1991.

Goss VL, Cross JV, Ma K, Qian Y, Mola PW und Templeton DJ. SAPK/JNK regulates *cdc2/cyclin B* kinase through phosphorylation and inhibition of *cdc25c*. *Cellular Signalling* 15(7), 709-718. 2003.

Gottifredi V und Prives C. The S phase checkpoint: When the crowd meets at the fork. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 16(3), 355-368. 2005.

Goulaouic S, Foucaud L, Bennisroune A, Laval-Gilly P und Falla J. Effect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Carbon Black Particles on Pro-Inflammatory Cytokine Secretion: Impact of PAH Coating Onto Particles. *Journal of Immunotoxicology* 5(3), 337-345. 1-1-2008.

Gozuacik D und Kimchi A. Autophagy and Cell Death. Gerald, P. Schatten. Current Topics in Developmental Biology. Volume 78, 217-245. 2007. Academic Press.

Green DR und Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. Nature 458(7242), 1127-1130. 30-4-2009. Macmillan Publishers Limited. All rights reserved.

Gunz D, Hess MT und Naegeli H. Recognition of DNA Adducts by Human Nucleotide Excision Repair. Journal of Biological Chemistry 271(41), 25089-25098. 11-10-1996.

Guo N, Faller DV und Vaziri C. Carcinogen-induced S-Phase Arrest Is Chk1 Mediated and Caffeine Sensitive. Cell Growth Differentiation 13(2), 77-86. 1-2-2002.

Gutierrez GJ, Tsuji T, Cross, J., Davis RJ, Templeton DJ, Jiang W und Ronai ZA. JNK-mediated Phosphorylation of Cdc25C Regulates Cell Cycle Entry and G2/M DNA Damage Checkpoint. Journal of Biological Chemistry 285(19), 14217-14228. 7-5-2010.

Hakem R. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. EMBO J 27(4), 589-605. 20-2-2008. European Molecular Biology Organization.

Han J, Lee JD, Bibbs L und Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. Science 265(5173), 808-811. 5-8-1994.

Han SI, Kim YS und Kim TH. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. BMB reports online 41(1), 1-10. 31-1-2008.

Harris SL und Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. Oncogene 24(17), 2899-2908. 2005.

Hattemer-Frey HA, T. CC. Benzo-a-pyrene: environmental partitioning and human exposure. Toxicol Ind Health. 8(3), 213-219. 1992.

Hecht SS, El-Bayoumy K, Rivenson A und Amin S. Potent Mammary Carcinogenicity in Female CD Rats of a Fjord Region Diol-Epoxyde of Benzo[c]phenanthrene Compared to a Bay Region Diol-Epoxyde of Benzo[a]pyrene. Cancer Research 54(1), 21-24. 1-1-1994.

Heffernan TP, Simpson DA, Frank AR, Heinloth AN, Paules RS, Cordeiro-Stone M und Kaufmann WK. An ATR- and Chk1-Dependent S Checkpoint Inhibits Replicon Initiation following UVC-Induced DNA Damage. Molecular and Cellular Biology 22(24), 8552-8561. 15-12-2002.

Henkart PA. ICE Family Proteases: Mediators of All Apoptotic Cell Death? *Immunity* 4(3), 195-201. 1-3-1996.

Henriquez M, Armisen R, Stutzin a und Quest AFG. Cell Death by Necrosis, a Regulated Way to Go. *Current Molecular Medicine* 8, 187-206. 2008.

Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A und Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes & Development* 7(11), 2135-2148. 1993.

Hockley SL, Arlt VM, Jahnke G, Hartwig A, Giddings I und Phillips DH. 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. 1-1-2008.

Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411(6835), 366-374. 17-5-2001. Nature Publishing Group.

Jeffy BD, Chen EJ, Gudas JM und Romagnolo DF. Disruption of Cell Cycle Kinetics by Benzo[a]pyrene: Inverse Expression Patterns of BRCA-1 and p53 in MCF-7 Cells Arrested in S and G2. *Neoplasia* 2(5), 460-470. 10-4-2000.

Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S und Han J. Characterization of the Structure and Function of a New Mitogen-activated Protein Kinase (p38+). *Journal of Biological Chemistry* 271(30), 17920-17926. 26-7-1996.

Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, Di Padova F, Ulevitch RJ und Han J. Characterization of the Structure and Function of the Fourth Member of p38 Group Mitogen-activated Protein Kinases, p38+. *Journal of Biological Chemistry* 272(48), 30122-30128. 28-11-1997.

Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CYJ, Sasaki T, Elia AJ, ChengHYM, Ravagnan L, Ferri, K. F., Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G und Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410(6828), 549-554. 29-3-2001. Macmillian Magazines Ltd.

Jyonouchi H, Sun S, Iijima K, Wang M und Hecht SS. Effects of anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene on human small airway epithelial cells and the protective effects of myo-inositol. *Carcinogenesis* 20(1), 139-145. 1-1-1999.

Kapitulnik J, Levin W, Conney AH, Yagi H und Jerina DM. Benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol is more carcinogenic than benzo[a]pyrene in newborn mice. *Nature* 266(5600), 378-380. 24-3-1977.

Kaspin LC und Baird WM. anti-Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide Treatment Increases Levels of the Proteins p53 and p21WAF1 in the Human Mammary Carcinoma Cell Line MCF-7. *Polycyclic Aromatic Compounds* 10(1), 299-306. 4-11-1996.

Kastan MB und Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432(7015), 316-323. 18-11-2004.

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B und Craig RW. Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage. *Cancer Research* 51(23_Part_1), 6304-6311. 1-12-1991.

Katz AK, Carrell HL und Glusker JP. Dibenzo[a,l]pyrene (dibenzo[def,p]chrysene): fjord-region distortions. *Carcinogenesis* 19(9), 1641-1648. 1-9-1998.

Kaufmann WK. The human intra-S checkpoint response to UVC-induced DNA damage. *Carcinogenesis* 31(5), 751-765. 30-9-2009.

Kaufmann WK. Initiating the uninitiated: replication of damaged DNA and carcinogenesis. *Cell Cycle* 6(12), 1460-1467. 15-6-2007.

Khan QA und Anderson LM. Hydrocarbon Carcinogens Evade Cellular Defense Mechanism of G1 Arrest in Nontransformed and Malignant Lung Cell Lines. *Toxicology and Applied Pharmacology* 173(2), 105-113. 1-6-2001.

Khan QA und Dipple A. Diverse chemical carcinogens fail to induce G1 arrest in MCF-7 cells. *Carcinogenesis* 21(8), 1611-1618. 1-8-2000.

Khan QA, Dipple A und Anderson LM. Protease inhibitor-induced stabilization of p21waf1/cip1 and cell-cycle arrest in chemical carcinogen-exposed mammary and lung cells. *Mol.Carcinog.* 33(1), 1-8. 22-1-2002.

Khan QA, Kohlhagen G, Marshall R, Austin CA, Kalena GP, Kroth H, Sayer JM, Jerina DM und Pommier Y. Position-specific trapping of topoisomerase II by benzo[a]pyrene diol epoxide adducts: Implications for interactions with intercalating anticancer agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(21), 12498-12503. 14-10-2003.

Khan QA, Vousden KH und Dipple A. Lack of p53-Mediated G1 Arrest in Response to an Environmental Carcinogen. *Oncology* 57(3), 258-264. 1999.

Khan QA, Vousden KH und Dipple A. Cellular response to DNA damage from a potent carcinogen involves stabilization of p53 without induction of p21(waf1/cip1). *Carcinogenesis* 18(12), 2313-2318. 1-12-1997.

Kim EK und Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1802(4), 396-405. 2010.

Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S, Uchida Y und Arihiro K. Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *The Journal of Pathology* 208(3), 319-326. 1-11-2005.

Kotlyarov A, Yannoni Y, Fritz S, Laass K, Telliez JB, Pitman D, Lin LL und Gaestel M. Distinct Cellular Functions of MK2. *Molecular and Cellular Biology* 22(13), 4827-4835. 1-7-2002.

Krishna M und Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(22), 3525-3544. 1-11-2008.

Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K und Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 44(3), 205-221. 2008.

Kyriakis JM und Avruch J. pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *Journal of Biological Chemistry* 265(28), 17355-17363. 5-10-1990.

Kyriakis JM und Avruch J. Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. *Physiological Reviews* 81(2), 807-869. 1-4-2001.

Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J und Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369(6476), 156-160. 12-5-1994.

Lagarkova MA, Iarovaia OV und Razin SV. Large-scale Fragmentation of Mammalian DNA in the Course of Apoptosis Proceeds via Excision of Chromosomal DNA Loops and Their Oligomers. *Journal of Biological Chemistry* 270(35), 20239-20241. 1-9-1995.

Lane DP und Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. *Nature* 278(5701), 261-263. 15-3-1979.

Larsen AK, Escargueil AE und Skladanowski A. From DNA damage to G2 arrest: the many roles of topoisomerase II. *Progress in Cell Cycle Research* 5, 295-300. 2003.

Lazzaro F, Giannattasio M, Puddu F, Granata M, Pelliccioli A, Plevani P und Muzi-Falconi M. Checkpoint mechanisms at the intersection between DNA damage and repair. *DNA Repair* 8(9), 1055-1067. 2-9-2009.

Lee SK, Kim YS, Song SB und Kim YS. Stabilization and translocation of p53 to mitochondria is linked to Bax translocation to mitochondria in simvastatin-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391(4), 1592-1597. 22-1-2010.

Lehr RE und Jerina DM. Relationships of quantum mechanical calculations, relative mutagenicity of benzo[a]anthracene diol epoxides, and "bay region" concept of aromatic hydrocarbon carcinogenicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 2(6), 1259-1265. 1977. Taylor & Francis.

Lei Liu, Da Xing und Wei R.Chen. μ -Calpain regulates caspase-dependent and apoptosis inducing factor-mediated caspase-independent apoptotic pathways in cisplatin-induced apoptosis. *International Journal of Cancer* 125(12), 2757-2766. 2009.

Lei M. und Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *Journal of Cell Science* 114(8), 1447-1454. 15-4-2001.

Levin W, Chang RL, Wood AW, Thakker DR, Yagi H, Jerina DM und Conney AH. Tumorigenicity of Optical Isomers of the Diastereomeric Bay-Region 3,4-Diol-1,2-epoxides of Benzo(c)phenanthrene in Murine Tumor Models. *Cancer Research* 46(5), 2257-2261. 1-5-1986.

Li J, Chen H, Ke Q, Feng Z, Tang MS, Liu B, Amin S, Costa M und Huang C. Differential effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on transactivation of AP-1 and NF-B in mouse epidermal cl41 cells. *Mol.Carcinog.* 40(2), 104-115. 24-5-2004a.

Li J, Tang MS, Liu B, Shi X und Huang C. A critical role of PI-3K//Akt//JNKs pathway in benzo[*l*sqb]a[*r*sqb]pyrene diol-epoxide (B[*l*sqb]a[*r*sqb]PDE)-induced AP-1 transactivation in mouse epidermal Cl41 cells. *Oncogene* 23(22), 3932-3944. 12-4-2004b. Nature Publishing Group.

Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ und Han J. The Primary Structure of p38[γ]: A New Member of p38 Group of MAP Kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 228(2), 334-340. 12-11-1996.

Lin T, Mak NK und Yang MS. MAPK regulate p53-dependent cell death induced by benzo[a]pyrene: Involvement of p53 phosphorylation and acetylation. *Toxicology* 247(2-3), 145-153. 21-5-2008.

Lin T und Yang MS. Benzo[a]pyrene-induced necrosis in the HepG2 cells via PARP-1 activation and NAD⁺ depletion. *Toxicology* 245(1-2), 147-153. 12-3-2008.

Linzer DIH und Levine AJ. Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17(1), 43-52. 1979.

Liu P, Barkley LR, Day T, Bi X, Slater DM, Alexandrow MG, Nasheuer HP und Vaziri C. The Chk1-mediated S-phase Checkpoint Targets Initiation Factor Cdc45 via a Cdc25A/Cdk2-independent Mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 281(41), 30631-30644. 13-10-2006.

Liu PL, Chen YL, Chen YH, Lin SJ und Kou YR. Wood smoke extract induces oxidative stress-mediated caspase-independent apoptosis in human lung endothelial cells: role of AIF and EndoG. *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiology* 289(5), L739-L749. 1-11-2005.

Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA und Elledge SJ. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. *Genes & Development* 14(12), 1448-1459. 15-6-2000.

Lorenzo HK und Susin SA. Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death. *FEBS Letters* 557(1-3), 14-20. 16-1-2004.

Lowndes NF und Murguia JR. Sensing and responding to DNA damage. *Current Opinion in Genetics & Development* 10(1), 17-25. 1-2-2000.

Lukas J, Lukas C und Bartek J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair* 3(8-9), 997-1007. 2008. 2004.

Mahadevan B, Luch A, Seidel A, Pelling JC und Baird WM. Effects of the (-)-anti-11R,12S-dihydrodiol 13S,14R-epoxide of dibenzo[a,l]pyrene on DNA adduct formation and cell cycle arrest in human diploid fibroblasts. *Carcinogenesis* 22(1), 161-169. 1-1-2001.

Maillard O, Solyom S und Naegeli H. An Aromatic Sensor with Aversion to Damaged Strands Confers Versatility to DNA Repair. *PLoS Biol* 5(4), e79. 13-3-2007. Public Library of Science.

Malkin D. p53 and the Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 66(2), 83-92. 1993.

Manke IA, Nguyen A, Lim D, Stewart MQ, Elia AEH und Yaffe MB. MAPKAP Kinase-2 Is a Cell Cycle Checkpoint Kinase that Regulates the G2/M Transition and S Phase Progression in Response to UV Irradiation. *Molecular Cell* 17(1), 37-48. 7-1-2005.

Mathiasen IS und Jäättelä M. Triggering caspase-independent cell death to combat cancer. *Trends in Molecular Medicine* 8(5), 212-220. 1-5-2002.

Menendez D, Inga A und Resnick MA. The expanding universe of p53 targets. *Nat Rev Cancer* 9(10), 724-737. 2009. Nature Publishing Group.

Meschini R, Berni A, Marotta E, Filippi S, Fiore M, Mancinelli P, Natarajan AT und Palitti F. DNA Repair Mechanisms Involved in the Removal of DBPDE-Induced Lesions Leading to Chromosomal Alterations in CHO Cells. *Cytogenet Genome Res* . 13-4-2010.

Mohit AA, Martin JH und Miller CA. p493F12 kinase: A novel MAP kinase expressed in a subset of neurons in the human nervous system. *Neuron* 14(1), 67-78. 1995.

Nagata S, Nagase H, Kawane K, Mukae N und Fukuyama H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* 10(1), 108-116. 2003.

O'Driscoll M. Mouse models for ATR deficiency. *DNA Repair* 8(11), 1333-1337. 2-11-2009.

Page TJ, O'Brien S, Jefcoate CR und Czuprynski CJ. 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene Induces Apoptosis in Murine Pre-B Cells through a Caspase-8-Dependent Pathway. *Molecular Pharmacology* 62(2), 313-319. 1-8-2002.

Paules RS, Cordeiro-Stone M, Mass MJ, Poirier MC, Yuspa SH und Kaufman DG. Benzo[alpha]pyrene diol epoxide I binds to DNA at replication forks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(7), 2176-2180. 1988.

Pearson G, Robinson F, Beers GT, Xu B, Karandikar M, Berman K und Cobb MH. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews* 22(2), 153-183. 1-4-2001.

Phillips DH. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 443(1-2), 139-147. 15-7-1999.

Pietsch EC, Sykes SM, McMahon SB und Murphy ME. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 27(50), 6507-6521. 27-10-2008. Macmillan Publishers Limited.

Piette J, Neel H und Maréchal V. Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene* 15(9), 1001-1010. 28-8-1997.

Pliskova M, Vondracek J, Vojtesek B, Kozubik A und Machala M. Deregulation of Cell Proliferation by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells Reflects Both Genotoxic and Nongenotoxic Events. *Toxicological Sciences* 83(2), 246-256. 1-2-2005.

Pop C und Salvesen GS. Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. *Journal of Biological Chemistry* 284(33), 21777-21781. 14-8-2009.

Prahalad AK, Ross JA, Nelson GB, Roop BC, King LC, Nesnow S und Mass MJ. Dibenzo[a,l]pyrene-induced DNA adduction, tumorigenicity, and Ki-ras oncogene mutations in strain A/J mouse lung. *Carcinogenesis* 18(10), 1955-1963. 1-10-1997.

Prives C und Hall P. The p53 pathway. *The Journal of Pathology* 187(1), 112-126. 24-9-1999.

Ralston SL, Seidel A, Luch A, Platt KL und Baird WM. Stereoselective activation of dibenzo[a,l]pyrene to (–)-anti(11R, 12S, 13S, 14R)- and (+)-syn(11S, 12R, 13S, 14R)- 11, 12-diol-13, 14-epoxides which bind extensively to deoxyadenosine residues of DNA in the human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Carcinogenesis* 16(12), 2899-2907. 1-12-1995.

Raman M, Earnest S, Zhang K, Zhao Y und Cobb MH. TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage. *EMBO J* 26(8), 2005-2014. 18-4-2007. European Molecular Biology Organization.

Ramesh A, Walker SAS, Hood DB, Guillen MD, Schneider K und Weyand EH. Bioavailability and Risk Assessment of Orally Ingested Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *International Journal of Toxicology* 23(5), 301-333. 1-9-2004.

Rämet M, Castren K, Järvinen K, Pekkala K, Turpeenniemi-Hujanen T, Soini Y, Pääkkö P und Vähäkangas K. p53Protein expression is correlated with benzo[a]pyrene-DNA adducts in carcinoma cell lines. *Carcinogenesis* 16(9), 2117-2124. 1-9-1995.

Reinhardt HC, Aslanian AS, Lees JA und Yaffe MB. 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. 13-2-2007.

Reinhardt HC und Yaffe MB. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Current Opinion in Cell Biology* 21(2), 245-255. 2009.

Riley T, Sontag E, Chen P und Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(5), 402-412. 2008. Nature Publishing Group.

Roos WP und Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in Molecular Medicine* 12(9), 440-450. 2006.

Rubin H. Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis* 22(12), 1903-1930. 1-12-2001.

Ryu HY, Emberley JK, Schlezinger JJ, Allan LL, Na S und Sherr DH. Environmental Chemical-Induced Bone Marrow B Cell Apoptosis: Death Receptor-Independent Activation of a Caspase-3 to Caspase-8 Pathway. *Molecular Pharmacology* 68(4), 1087-1096. 2005.

Sabapathy K und Wagner FE. JNK2: A Negative Regulator of Cellular Proliferation. *Cell Cycle* 3(12), 1520-1523. 2004.

Saito S, Yamaguchi H, Higashimoto Y, Chao C, Xu Y, Fornace AJ, Appella E und Anderson CW. Phosphorylation Site Interdependence of Human p53 Post-translational Modifications in Response to Stress. *Journal of Biological Chemistry* 278(39), 37536-37544. 26-9-2003.

Santarelli RL, Pierre P und Corpet DE. Processed Meat and Colorectal Cancer: A Review of Epidemiologic and Experimental Evidence. *Nutrition and Cancer* 60(2), 131-144. 2008. Routledge.

Scarlatti F, Granata R, Meijer AJ und Codogno P. Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell Death Differ* 16(1), 12-20. 4-7-2008. Nature Publishing Group.

Schafer P, Scholz SR, Gimadutdinow O, Cymerman IA, Bujnicki JM, Ruiz-Carrillo A, Pingoud A und Meiss G. Structural and Functional Characterization of Mitochondrial EndoG, a Sugar Non-specific Nuclease which Plays an Important Role During Apoptosis. *Journal of Molecular Biology* 338(2), 217-228. 23-4-2004.

Schuler M und Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions* 29(Pt 6), 684-688. 1-12-2001.

Shi Z, Dragin N, Galvez-Peralta M, Jorge-Nebert LF, Miller ML, Wang B und Nebert DW. Organ-Specific Roles of CYP1A1 during Detoxication of Oral Benzo[a]pyrene. *Molecular Pharmacology* . 6-4-2010.

Shiloh Y. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Current Opinion in Genetics & Development* 11(1), 71-77. 1-2-2001.

Smith LE, Denissenko MF., Bennett WP, Li H, Amin S, Tang MS und Pfeifer GP. Targeting of Lung Cancer Mutational Hotspots by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 92(10), 803-811. 17-5-2000.

Solhaug A, Ovrebo S, Mollerup S, Lag M, Schwarze PE, Nesnow S und Holme JA. Role of cell signaling in B[a]P-induced apoptosis: characterization of unspecific effects of cell signaling inhibitors and apoptotic effects of B[a]P metabolites. *Chemico-Biological Interactions* 151(2), 101-119. 15-1-2005.

Solhaug A, Refsnes M und Holme JA. Role of cell signalling involved in induction of apoptosis by benzo[a]pyrene and cyclopenta[c,d]pyrene in Hepal1c7 cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 93(6), 1143-1154. 24-9-2004a.

Solhaug A, Refsnes M, Lag M, Schwarze PE, Husoy T und Holme JA. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce both apoptotic and anti-apoptotic signals in Hepal1c7 cells. *Carcinogenesis* 25(5), 809-819. 1-5-2004b.

Somasundaram K, Zhang H, Zeng YX, Houvras Y, Peng Y, Zhang H, Wu GS, Licht JD, Weber BL und El-Deiry WS. Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/Cip1. *Nature* 389(6647), 187-190. 11-9-1997.

Soria G und Gottifredi V. PCNA-coupled p21 degradation after DNA damage: The exception that confirms the rule? *DNA Repair* 9(4), 358-364. 4-4-2010.

Soria G, Speroni J, Podhajcer OL., Prives C und Gottifredi V. p21 differentially regulates DNA replication and DNA-repair-associated processes after UV irradiation. *Journal of Cell Science* 121(19), 3271-3282. 1-10-2008.

Speer K, Horstmann P, Steeg E, Kühn T und Montag A. Zur Analytik von Polycyclen in Gemüseproben. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 191(6), 442-448. 17-4-1990.

Srivastava SK, Bansal P, Oguri T, Lazo JS und Singh SV. Cell Division Cycle 25B Phosphatase Is Essential for Benzo(a)Pyrene-7,8-Diol-9,10-Epoxide Induced Neoplastic Transformation. *Cancer Research* 67(19), 9150-9157. 1-10-2007.

Stuart D, Khan QA, Brown R und Dipple A. Hydrocarbon carcinogens induce p53 activity in normal mouse tissue. *Cancer Letters* 173, 111-114. 28-11-2001.

Stucki M und Jackson SP. γ H2AX and MDC1: Anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair* 5(5), 534-543. 10-5-2006.

Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Phillips DR und Cutts SM. Doxorubicin-DNA Adducts Induce a Non-Topoisomerase II-Mediated Form of Cell Death. *Cancer Research* 66(9), 4863-4871. 1-5-2006.

Takekawa M, Adachi M, Nakahata A, Nakayama I, Itoh F, Tsukuda H, Taya Yi und Imai K. 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. 1-12-2000. European Molecular Biology Organization.

Tanaka T, Ohkubo S, Tatsuno I und Prives C. hCAS/CSE1L Associates with Chromatin and Regulates Expression of Select p53 Target Genes. *Cell* 130(4), 638-650. 24-8-2007.

Taylor WR und Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20(15), 1803-1815. 5-4-2001.

Thornton TM und Rincon M. Non-Classical P38 Map Kinase Functions: Cell Cycle Checkpoints and Survival. *Int J Biol Sci* 5(1), 44-52. 19-12-2008.

Tibbles LA und Woodgetts JR. The stress-activated protein kinase pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55(10), 1230-1254. 1-8-1999.

Vaseva AV und Moll UM. The mitochondrial p53 pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787(5), 414-420. 2009.

Vogelstein B und Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics* 9(4), 138-141. 1993.

Wada T und Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23(16), 2838-2849. 2004. Nature Publishing Group.

Wakeman TP, Wyczechowska D und Xu B. Involvement of the p38 MAP kinase in Cr(VI)-induced growth arrest and apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 279(1-2), 69-73. 11-11-2005.

Wang X, Destrumont A und Tournier C. Physiological roles of MKK4 and MKK7: Insights from animal models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1773(8), 1349-1357. 2007.

Wang ZQ, Stingl L, Morrison C, Jantsch M, Los M, Schulze-Osthoff K und Wagner EF. PARP is important for genomic stability but dispensable in Γ Çäapoptosis. *Genes & Development* 11(18), 2347-2358. 15-9-1997.

Whiteman M, Chu SH, Siau JL, Rose, P., Sabapathy K, Schantz JT, Cheung NS, Spencer JPE und Armstrong JS. The pro-inflammatory oxidant hypochlorous acid induces Bax-dependent mitochondrial permeabilisation and cell death through AIF-/EndoG-dependent pathways. *Cellular Signalling* 19(4), 705-714. 2007.

Wijnhoven SWP, Hoogervorst EM, de Waard H, van der Horst GTJ und van Steeg H. Tissue specific mutagenic and carcinogenic responses in NER defective mouse models. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 614(1-2), 77-94. 3-1-2007.

Wildlak P und Garrard WT. Discovery, Regulation, and Action of the Major Apoptotic Nucleases DFF40/CAD and Endonuclease G. *Journal of Cellular Biochemistry* 94(6), 1078-1087. 18-2-2005.

Wilstermann AM und Osheroff N. Stabilization of Eukaryotic Topoisomerase II-DNA Cleavage Complexes. *Current Topics in Medical Chemistry* 3(3), 321-338. 2003.

Wislocki PG, Wood AW, Chang RL, Levin W, Yagi H, Hernandez O, Jerina DM und Conney AH. High mutagenicity and toxicity of a diol epoxide derived from benzo[a]pyrene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 68(3), 1006-1012. 9-2-1976.

Wood CD, Thornton TM, Sabio G, Davis RA und Rincon M. Nuclear Localization of p38 MAPK in Response to DNA Damage. *Int J Biol Sci* . 2009.

Woodhouse BC und Dianov GL. Poly ADP-ribose polymerase-1: An international molecule of mystery. *DNA Repair* 7(7), 1077-1086. 1-7-2008.

Wu GS. The functional Interactions Between the MAPK and p53 Signaling Pathways. *cancer biology and therapy* 3(2), 146-151. 2004.

Wu J, Zhu BB, Yu J, Zhu H, Qiu L, Kindy MS, Gu L, Seidel A und Li GM. In vitro and in vivo modulations of benzo[c]phenanthrene-DNA adducts by DNA mismatch repair system. *Nucleic Acids Research* 31(22), 6428-6434. 15-11-2003.

Wu M, Yan S, Patel DJ, Geacintov NE und Broyde S. Relating repair susceptibility of carcinogen-damaged DNA with structural distortion and thermodynamic stability. *Nucleic Acids Research* 30(15), 3422-3432. 1-8-2002.

Xiao H, Rawal M, Hahm ER und Singh SV. Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide causes caspase-mediated apoptosis in H460 human lung cancer cell line. *Cell Cycle* 6(22), 2826-2834. 15-11-2007.

Xiao H und Singh SV. p53 Regulates Cellular Responses to Environmental Carcinogen Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide in Human Lung Cancer Cells. *Cell Cycle* 6(14), 1753-1761. 15-7-2007.

Yamanishi DT, Bowden GT und Cress AE. An analysis of DNA replication in synchronized CHO cells treated with benzo[a]pyrene diol epoxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 910(1), 34-42. 9-10-1987.

Yang J, Xu ZP, Huang Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ und Yu YN. ATM and ATR: Sensing DNA damage. *World J Gastroenterol* . 15-1-2004.

Yang X, Fraser M, Abedini MR, Bai T und Tsang BK. Regulation of apoptosis-inducing factor-mediated, cisplatin-induced apoptosis by Akt. *Br J Cancer* 98(4), 803-808. 19-2-2008. Cancer Research UK.

Zegerman P und Diffley JFX. DNA replication as a target of the DNA damage checkpoint. *DNA Repair* 8(9), 1077-1088. 2-9-2009.

Zetterberg A, Larsson O und Wiman KG. What is the restriction point? *Current Opinion in Cell Biology* 7(6), 835-842. 1995.

Zhang L, Yu J, Park BH, Kinzler KW und Vogelstein B. Role of BAX in the Apoptotic Response to Anticancer Agents. *Science* 290(5493), 989-992. 3-11-2000.

Zhang Y, Tao S, Shen H und Ma J. Inhalation exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbons and lung cancer risk of Chinese population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(50), 21063-21067. 15-12-2009.

Zhang Y, Yuan F, Wu X, Rechkoblit O, Taylor JS, Geacintov NE. und Wang Z. Error-prone lesion bypass by human DNA polymerase {eta}. *Nucleic Acids Research* 28(23), 4717-4724. 1-12-2000a.

Zhang Y, Yuan F, Wu X, Wang M, Rechkoblit O, Taylor JS, Geacintov NE und Wang Z. Error-free and error-prone lesion bypass by human DNA polymerase {kappa} in vitro. *Nucleic Acids Research* 28(21), 4138-4146. 1-11-2000b.

Zhou BB und Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408(6811), 433-439. 23-11-2000.

Literaturverzeichnis

Zimmer C, Störl K und Störl J. Microbial DNA topoisomerases and their inhibition by antibiotics. *J Basic Microbiol.* 30(3), 209-224. 1990.

Zinkel S, Gross A und Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ* 13(8), 1351-1359. 9-6-2006. Nature Publishing Group.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.1: Vereinfachte Darstellung des Benzo[a]pyren-Metabolismus und Bildung des ultimativen Kanzerogens BPDE und Strukturformeln der in der vorliegenden Arbeit untersuchten PAK-Diolepoxide	4
Abbildung 1.2: Vereinfachte Darstellung der Caspase-abhängigen und –unabhängigen Apoptosewege.	8
Abbildung 1.3: ATM und ATR erkennen DNA-Schäden und lösen unterschiedliche Signalwege aus. Nähere Erläuterungen siehe Text	14
Abbildung 2.1: Aufbau eines Blotsandwiches. Verändert nach Georgia Institute of Technology, School of Biomedical Engineering	34
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines Zellzyklusprofils	37
Abbildung 2.3: Bestimmung von Zellzahl und Apoptoserate durch Hoechstfärbung und Auswertung mikroskopischer Aufnahmen mit der ScanR Software.....	38
Abbildung 2.4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Hoechst-gefärbter Zellen.	40
Abbildung 2.5: Prinzip des Caspase-Glo® 3/7 Assays, nach Promega, technical bulletin caspase 3/7 assay, 2006	41
Abbildung 3.1: BPDE-Behandlung führt zu einer reduzierten Zellzahl.	43
Abbildung 3.2: BPDE löst in Hct116 Apoptose, aber nicht Nekrose aus.	46
Abbildung 3.3: BPDE führt zur Aktivierung von Komponenten des intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweges.	48
Abbildung 3.4: Hemmung der Caspasen verhindert Apoptose nach BPDE, jedoch nicht eine teilweise Chromatinkondensierung	51
Abbildung 3.5: p53 wird durch BPDE-Behandlung aktiviert.	53

Anhang

Abbildung 3.6: p53 ist wichtig für die BPDE-induzierte Apoptose.....	53
Abbildung 3.7: p53 spielt eine Rolle beim intrinsischen, aber nicht beim extrinsischen BPDE-induzierten Apoptoseweg	55
Abbildung 3.8: p53 transloziert nach BPDE-Behandlung in den Kern und die Mitochondrien	56
Abbildung 3.9: Bax ist an der BPDE-induzierten Apoptose beteiligt.....	57
Abbildung 3.10: Bax ist wichtig für die BPDE-induzierte Spaltung von PARP und Caspase 7 und spielt eine Rolle bei der p53-Stabilisierung und der p21-Induktion, aber nicht bei der Phosphorylierung von p53 oder der SAPK.	59
Abbildung 3.11: Die SAPK p38 und JNK werden nach BPDE aktiviert.	60
Abbildung 3.12: Die SAPK p38 und JNK beeinflussen die Apoptoserate nach BPDE-Behandlung.....	61
Abbildung 3.13: Die Aktivierung von p53 und den SAPK ist unabhängig voneinander, und die SAPK-Aktivierung ist unabhängig von Bax.	63
Abbildung 3.14: Die SAPK p38 und JNK nehmen keinen Einfluss auf die BPDE-induzierte Caspase-Aktivierung.	64
Abbildung 3.15: BPDE bewirkt keine Translokation der mitochondrialen Nukleasen EndoG und AIF in den Kern.....	65
Abbildung 3.16: BPDE verringert die Mitoserate.....	67
Abbildung 3.17: BPDE löst dosisabhängig einen Zellzyklusblock aus.	68
Abbildung 3.18: Der BPDE-abhängige Zellzyklusblock ist zeitabhängig.....	69
Abbildung 3.19: p53, p21 und die SAPK spielen keine Rolle beim BPDE-induzierten Zellzyklusblock.	72
Abbildung 3.20: BPDE aktiviert Chk2.	73
Abbildung 3.21: ATR/ATM spielen ein Rolle beim BPDE-induzierten Zellzyklusblock.	74

Abbildung 3.22: BPhenDE und DBPDE lösen Apoptose in Hct116 aus.....	76
Abbildung 3.23: BPhenDE und DBPDE hemmen die Proliferation.....	77
Abbildung 3.24: BPhenDE und DBPDE aktivieren dieselben Signalmoleküle wie BPDE. ...	78
Abbildung 3.25: BPhenDE verursacht wie BPDE einen dosisabhängigen Zellzyklusblock... 79	
Abbildung 4.1: Zusammenfassung der identifizierten Signalwege der BPDE-induzierten zellulären Reaktionen.....	95
Abbildung 4.2: Übersicht über die Dosisabhängigkeit der BPDE-induzierten zellulären Reaktionen.....	99

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Inhibitoren, Bezugsquelle, Lösungsmittel und eingesetzte Konzentrationen	22
Tabelle 2.2.: verwendete Induktoren, Bezugsquelle und Lösungsmittel	22
Tabelle 2.3: Verwendete HCT116 Zelllinien mit Bezeichnung und Genotyp.....	23
Tabelle 2.4: Verwendete phosphospezifische Antikörper (Cell Signalling, Frankfurt/Main, Deutschland) und die eingesetzte Verdünnung in 3 % BSA/TBST.....	24
Tabelle 2.5: Verwendete Antikörper gegen Caspase-Spaltprodukte (Cell Signalling, Frankfurt/Main, Deutschland) und die jeweils eingesetzte Verdünnung in 3 % BSA/TBST	24
Tabelle 2.6: Verwendete Antikörper der Firma Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland und die jeweils eingesetzte Verdünnung in 5 % Milchpulver/TBST.....	25
Tabelle 2.7: Verwendete sekundäre Antikörper der Firma DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland und die jeweils eingesetzte Verdünnung in 5 % Milchpulver/TBST	25
Tabelle 2.8: Verwendete Zellzahlen im jeweiligen Kulturschalen-Format	27

Tabelle 2.9: Zusammensetzung des 4 x Probenpuffers nach Laemmli. Zur Herstellung des verwendeten 2 x Puffers wurde 1:1 mit H ₂ O dest. verdünnt.....	28
Tabelle 2.10: Zusammensetzung der Puffer für die Kernextraktion mit NP40. DTT und der Protease-Inhibitor-Mix wurden jeweils erst kurz vor Gebrauch zugegeben.....	30
Tabelle 2.11: Zusammensetzung der Puffer und Gele für SDS PAGE.....	32
Tabelle 2.12: Zusammensetzung des Blotpuffers	34
Tabelle 2.13: Zusammensetzung der Puffer zur Antikörperinkubation.....	35
Tabelle 2.14: Zusammensetzung des Stripping Buffers.....	36

6.3 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated Kinase
ATR	ATM and Rad3 Related
B[a]P	Benzo[a]pyren
BER	Basenexzisionsreparatur
BPD	Benzo[a]pyren-7,8-Dihydrodiol
BPDE	Benzo[a]pyren-7,8-Dihydrodiol-9,10-Epoxid
BPhenDE	Benzo[c]phenanthren-3,4-Diol-1,2-Epoxid
BSA	Rinderserumalbumin (“bovine serum albumine”)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAD	Caspase-aktivierte DNase
°C	Grad Celsius

Anhang

cdc	Cell division cycle
CDK	Cyklinabhängige Kinase („cyclin dependent kinase“)
Chk	„Checkpoint“ Kinase
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindolhydrochlorid
DBPDE	Dibenzo[a,l]pyren-11,12-Dihydrodiol-13,14-Epoxid
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonekleinsäure
Dx	Doxorubicin
ECL	Enhanced Chemoluminescence
<i>et al.</i>	und andere („et alii“)
FCS	fötales Käüberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GGR	Globale Genomreparatur
h	Stunde(n) („hour“)
HRP	Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase“)
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
k	Kilo
kD	kilodalton
ko	knockout
l	Liter

Anhang

M	Mol pro Liter
m	Meter, milli
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MMR	<i>mismatch repair</i> , Fehlpaarungsreparatur
MMS	Methylmethansulfonat
MOMP	Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, „mitochondrial outer membrane permeabilisation“
MW	Molekulargewicht („molecular weight“) oder Mittelwert
n	nano
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PARP	Poly(ADP-ribose)Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)
PI	Propidiumjodid
pH	„Potentium hydrogenum“ (pH-Wert)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RB	Retinoblastomprotein

Anhang

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase(n) („stress-activated protein kinase“)
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
Ser15	Serin 15
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TCR	Transkriptionsgekoppelte Nukleotidexzisionsreparatur („transcription coupled repair“)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Topo2	Topoisomerase II
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
u.A.	unter Anderem
ü.N.	über Nacht
V	Volt
Vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp
XP	Xeroderma pigmentosum
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

6.4 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Regulation von Zellzyklus und Apoptose durch Metabolite polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich und inhaltlich übernommene Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht und die Satzung der Universität Karlsruhe (TH) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der gültigen Fassung beachtet.

Karlsruhe, den 2. Juni 2010

Julia Donauer

6.5 Lebenslauf

Hochschulausbildung

seit Februar 2007	Dissertation „ Regulation von Zellzyklus und Apoptose durch Metabolite polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe“ am Institut für Toxikologie und Genetik, Karlsruher Institut für Technologie, Campus Nord unter der Leitung von Dr. Carsten Weiss
Oktober 2006	Erlangung des Diploms der Biologie mit der Gesamtnote 1,3
ab Januar 2006	Diplomarbeit „Expressionsoptimierung von Adrenodoxin in Minimalmedien und Herstellung von Adrenodoxin-Reduktase Mutanten für NMR-Studien“ betreut durch Frau Prof. Dr. Rita Bernhardt der Fakultät Biochemie an der Universität des Saarlandes
August bis Oktober 2005	Diplomprüfungen im Hauptfach Biochemie (1,3) und den Nebenfächern Strukturbiologie (1,0) und Pharmakologie/Toxikologie (1,7)
November 2003	Vordiplom mit der Gesamtnote 1,9
ab Oktober 2001	Studium der Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes

Auslandspraktikum

Januar bis März 2005

Praktikum an der University of Edinburgh betreut durch Dr. Christopher J. Kenyon in der Endocrinology Unit des Centre for Cardiovascular Science zum Thema „The Role of Adrenocorticosteroid Hormones in the Development of Cardiovascular Disease and Obesity“

Schulische Ausbildung

1992-2001

Realgymnasium Völklingen (heute Albert-Einstein-Gymnasium)

Leistungskurse: Biologie, Deutsch, Englisch

1988-1992

Grundschule Heidstock, Völklingen

6.6 Veröffentlichungen

Eine Publikation zum in meiner Diplomarbeit bearbeiteten Thema wurde im April 2010 unter dem Titel: “*A Solution Model of the Complex Formed by Adrenodoxin and Adrenodoxin Reductase Determined by Paramagnetic NMR Spectroscopy*” von Keizers, Peter; Mersinli, Berna; Reinle, Wolfgang; Donauer, Julia; Hiruma, Yoshitaka; Hannemann, Frank; Overhand, Mark; Bernhardt, Rita; Ubbink, Marcellus bei Biochemistry eingereicht.

Poster:

- 2008: Molecular Toxicology of Genotoxins and Nanomaterials

M. Al-Rawi, S. Andraschko, J. Budde, J. Donauer, N. Grico, C. Marquardt, D. Mattern, A. Panas, I. Schreck, A. Wagner, S. Strack, W. Thies, C. Weiss

- 2008: Mechanisms and Consequences of Genotoxin induced Activation of Stress-Activated-Protein-Kinases in Mammalian Cells

Nina Grico, Ilona Schreck, Julia Donauer, Dorit Mattern and Carsten Weiss

- 2009: Toxicity of 3-Nitro-L-Tyrosine in plant and animal cell cultures

Aleksandra Jovanović¹, Julia Donauer²

¹Institute of Botany I, Molecular Cellbiology, University of Karlsruhe, Kaiserstr. 2, 76128 Karlsruhe, Germany

²Institut für Toxikologie und Genetik, Forschungszentrum Karlsruhe