

Untersuchungen zum Zelltodmechanismus ausgelöst durch das Phenylpropanoid Methyleugenol in Leberzellen



Vom Fachbereich Chemie der Rheinland-Pfälzisch Technischen Universität
Kaiserslautern-Landau zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte

Dissertation

D386

vorgelegt von

Max Johannes Carlsson

geb. in Homburg (Saar)

Betreuer: Prof. Dr. Jörg Fahrer

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 31.08.2023

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2019 bis April 2022 am Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Fahrer durchgeführt.

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 23.11.2022

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 31.08.2023

Promotionskommission

Vorsitz: Prof Dr. Antonio Pierik

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jörg Fahrer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Elke Richling

Für meinen Vater

Zusammenfassung

Methyleugenol (ME) ist ein nahrungsrelevanter, sekundärer Pflanzeninhaltsstoff und gehört zur Gruppe der Phenylpropanoide. Nach oraler Aufnahme wird es in der Leber metabolisiert und bildet durch Aktivierung über Cytochrom P450-Enzyme (CYPs) und Sulfotransferasen (SULT) DNA-Addukte. In Nagerversuchen konnte ME als kanzerogen identifiziert werden. Jedoch ist über die zellulären Effekte, die durch die DNA-Adduktbildung ausgelöst werden bisher wenig bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die ME-induzierten Effekte in der humanen Hepatoblastomlinie HepG2, sowie in wildtypischen und Nukleotidexzisionsreparatur (NER)-defizienten primären murinen Hepatozyten (pMH) untersucht. Da HepG2 kaum CYP-Enzyme exprimieren, wurde für die Untersuchungen der Hauptmetabolit 1'-Hydroxymethyleugenol (OHME) verwendet. Die Adduktbildung durch OHME in den verwendeten Testsystemen wurde massenspektrometrisch quantifiziert. In den Assays konnte nach 24 h kein Unterschied in den Adduktleveln von wildtypischen und NER-defizienten pMH festgestellt werden. In einem Reparaturassay in HepG2 konnte gezeigt werden, dass nach 24 h nur ca. 50 % der induzierten ME-Addukte repariert werden und die verbleibenden Addukte über 72 h persistieren.

Zur Untersuchung des OHME-induzierten Zelltods wurde zunächst gezeigt, dass der Metabolit zeit- und konzentrationsabhängig Apoptose in HepG2 auslöst. Das Tumorsuppressorprotein p53 wird nach OHME-Inkubation in HepG2 als auch in pMH induziert und konnte durch Verwendung spezifischer pharmakologischer Inhibitoren und siRNA-vermitteltem p53-Knockdown als Schlüsselprotein der OHME-induzierten Apoptose identifiziert werden. In Übereinstimmung mit der beobachteten p53-Akkumulation konnte eine Induktion von p21, welches einen Zellzyklusarrest einleitet, auf Gen- und Proteinebene nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde die transkriptionelle Induktion der proapoptotischen BH3only-Proteine Puma und Noxa demonstriert. Mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie konnte nachfolgend eine Aktivierung des proapoptotischen Effektors Bax demonstriert werden, was die Bildung von Poren in der äußeren mitochondriellen Membran und die Freisetzung von Cytochrom C induziert. Dies führte zur intrinsischen Apoptose, was durch Nachweis der Caspase 9 und -3 Spaltung, sowie Caspase 3/7-Aktivitätsmessung belegt wurde. Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass OHME das

BH3*only*-Protein Bim induziert, jedoch stellt die genaue Rolle dieses Proteins noch einen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen dar. Im Verlauf der Arbeit konnte eine Bim-defiziente HepG2-Linie verwendet werden, jedoch wurden hier verschiedene genetische Differenzen zu den standardmäßig verwendeten HepG2 festgestellt, welche die Verwendung dieser Zelllinie stark erschweren.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Dissertation erstmals der durch OHME-induzierte Apoptosemechanismus umfassend aufgeklärt werden. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass in HepG2-Zellen nur eine unvollständige Reparatur der OHME-induzierten Addukte erfolgt und erste Untersuchungen zum Thema des induzierten Reparaturmechanismus wurden durchgeführt. Die Signifikanz von ME als Humankanzerogen wurde in früheren Studien an humanen Leberbiopsien gezeigt, hier konnten in allen untersuchten Biopsien ME-Addukte nachgewiesen werden. Die Aufklärung des durch ME induzierten Apoptosemechanismus leistet einen Beitrag zum besseren Verständnis der zellulären Mechanismen, die durch solche Kanzerogene ausgelöst werden und kann in weiteren regulatorischen Maßnahmen in Betracht gezogen werden. In Zukunft sollte vor allem das Thema der persistierenden DNA-Addukte genauer untersucht werden, jedoch verbleiben auch noch einige Fragen zum ME-induzierten Apoptosemechanismus.

Abstract

Methyleugenol (ME) is a foodborne, secondary plant constituent, which belongs to the group of phenylpropenes. After oral consumption, it undergoes a hepatic metabolism via Cytochrome P450s (CYP) and sulfotransferases (SULT) that finally leads to the formation of DNA adducts. ME was identified as carcinogenic in different rodent studies. However, the cellular mechanisms that occur after DNA adduct formation are only incompletely understood.

In the present work the ME-induced effects were studied in the hepatoblastoma cell line HepG2 as well as in wildtype and nucleotide excision repair (NER)-deficient primary murine hepatocytes (pMH). Since HepG2 scarcely express CYP-enzymes the primary metabolite 1'-hydroxymethyleugenol (OHME) was used in the experiments. Adduct formation was quantified in the test systems via mass spectrometry. No significant differences in the DNA adduct levels in wild type and NER-deficient pMH were found after 24 h. In a recovery assay performed in HepG2 it was shown that only about 50 % of the induced DNA adducts are repaired after a recovery time of 24 h. Interestingly, the remaining adduct level persisted for up to 72 h.

Subsequently, OHME was shown to induce apoptotic cell death in a time- and dose-dependent manner in HepG2. The tumor suppressor protein p53 was induced in HepG2 and pMH after OHME-incubation and was identified as key player in OHME induced apoptosis by using pharmacological inhibitors and transient *p53*-knockdown. In accordance to p53 accumulation, induction of p21, which induces cell cycle arrest, could be observed on gene and protein level. Additionally, the expression of BH3-only proteins Puma and Noxa was transcriptionally increased. Furthermore, an activation of the proapoptotic effector Bax by OHME was revealed by confocal laser scanning microscopy, which led to mitochondrial outer membrane pore (MOMP) formation and leakage of cytochrome c. This resulted in caspase-9 and -3 cleavage, as assessed via western blot and activity assay. Additionally, an induction of the BH3-only protein Bim was identified within this work, whereas the concrete role of Bim in the OHME-induced effects is unclear at this point. We obtained a Bim-deficient HepG2 line, but were able to identify differential genetic responses to OHME in this line in comparison to our default HepG2-line, that hinder the use of the bim-deficient line.

Taken together, within this work the comprehensive mechanism for OHME-induced apoptosis in liver cells was elucidated for the first time. Additionally, we showed that adduct repair is incomplete in HepG2 and made first advances towards the topic of DNA adduct repair. The relevance of ME as a human carcinogen was demonstrated in earlier studies, where ME-adducts could be detected in a set of human liver biopsies. The clarification of the ME-induced apoptosis mechanism adds to the understanding of cellular effects that are induced by such carcinogens and may contribute to further regulatory decisions. In the future especially, the topic of persistent DNA adducts should be investigated, whereas there are still some open questions concerning ME-induced apoptosis.

I. Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung und theoretischer Hintergrund..... | 1 |
| 1.1 Toxikologie von Methyleugenol: aktueller Stand der Forschung | 2 |
| 1.1.1. Toxikokinetik von Methyleugenol | 2 |
| 1.1.2 Metabolismus von Methyleugenol | 2 |
| 1.1.3 Kanzerogenität von Methyleugenol | 5 |
| 1.1.4 Subchronische, subakute und akute Toxizität von Methyleugenol | 6 |
| 1.1.5 Genotoxizität und Mutagenität von Methyleugenol..... | 7 |
| 1.1.6 Risikobewertung und Regulation von Methyleugenol..... | 10 |
| 1.2 DNA-Schäden, die zelluläre Antwort und ihre Reparatur | 11 |
| 1.2.1 Die DNA-Schadensantwort | 13 |
| 1.2.2 DNA-Reparaturmechanismen | 16 |
| 1.3 Zelltod | 21 |
| 1.3.1 Extrinsische Apoptose..... | 22 |
| 1.3.2 Intrinsische Apoptose..... | 22 |
| 1.4 Das Tumorsuppressorprotein p53 | 25 |
| 1.4.1 Regulation von p53 | 25 |
| 1.4.2 Die Rolle von p53 in Zellzyklusarrest und Apoptose | 27 |
| 1.5 Die Familie der Bcl2-Proteine..... | 29 |
| 1.5.1 Die BH3 <i>only</i> -Proteine Noxa und Puma | 30 |
| 1.5.2 Das BH3 <i>only</i> Protein Bim..... | 33 |
| 1.5.3 Der pro-apoptotische Effektor Bax | 34 |
| 1.6 Zielsetzung der Arbeit | 35 |
| 2. Material und Methoden | 36 |
| 2.1 Geräte | 36 |
| 2.2 Verbrauchsmaterialien | 39 |
| 2.3 Chemikalien und kommerzielle Lösungen..... | 41 |

| | |
|---|----|
| 2.4 Puffer und Lösungen | 47 |
| 2.5. verwendete Antikörper | 53 |
| 2.6 Verwendete Primer..... | 54 |
| 2.7 Verwendete Zelllinien | 55 |
| 2.8 Kultivierung von HepG2-Zellen..... | 56 |
| 2.9 Isolation primärer muriner Hepatozyten (pMH)..... | 58 |
| 2.9.1 Genotypisierung der verwendeten Tiere | 58 |
| 2.9.2 Perfusion | 59 |
| 2.9.3 Kultivierung der gewonnenen Hepatozyten..... | 61 |
| 2.10 Erstellung von Proteinlysaten und Western Blot..... | 62 |
| 2.10.1 Direkte Lyse mit Laemmlipuffer..... | 62 |
| 2.10.2 Gesamtzelllyse | 62 |
| 2.10.3 Gewebelysate | 62 |
| 2.10.4 Bradfordassay zur Bestimmung des Proteingehalts..... | 63 |
| 2.10.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ... | 63 |
| 2.10.6 Western Blot und Immundetektion | 65 |
| 2.10.7 pH-Strippen | 66 |
| 2.10.8 Densitometrische Evaluierung..... | 66 |
| 2.11 siRNA-vermittelter Knockdown von p53 | 66 |
| 2.12 Durchflusszytometrische Assays..... | 67 |
| 2.12.1 Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung und Ermittlung der SubG1-Population..... | 67 |
| 2.12.2 Durchflusszytometrische Analyse des induzierten Zelltods mittels AnnexinV-FITC/PI-Färbung..... | 67 |
| 2.13 Messung der Zellviabilität mittels Resazurin-Reduktionstest..... | 68 |
| 2.14 Caspase 3/7-Aktivitätsassay | 68 |
| 2.15 DNA-Adduktanalytik | 69 |
| 2.15.1 DNA-Isolation | 70 |

| | |
|--|-----|
| 2.15.2 Enzymatische DNA-Hydrolyse | 71 |
| 2.15.3 Massenspektrometrische Analytik..... | 71 |
| 2.16 Immunfluoreszenzfärbungen | 74 |
| 2.16.1 γ H2AX-Färbung in pMH | 74 |
| 2.16.2 Färbung von Bim / Cytochrom c..... | 74 |
| 2.16.3 Färbung von aktivem Bax | 75 |
| 2.16.4 Cofärbungen mit MitoTracker..... | 76 |
| 2.17 Genexpressionsanalysen | 76 |
| 3. Ergebnisse..... | 78 |
| 3.1 Primäre murine Hepatozyten..... | 78 |
| 3.1.1 Genotypisierung der verwendeten NER-defizienten Tiere | 78 |
| 3.1.2 Untersuchung des SULT1A1-Status der verwendeten Tiere | 79 |
| 3.1.3 DNA-Adduktbildung nach OHME-Behandlung | 80 |
| 3.1.4 Untersuchungen zum Einfluss von OHME auf die Zellviabilität in pMH | 82 |
| 3.1.5 Analyse des Einflusses von OHME auf das p53-Level sowie die Phosphorylierung von H2AX als DNA-Schadensmarker..... | 83 |
| 3.2 HepG2-Zellen | 87 |
| 3.2.1 Untersuchung des SULT1A1-Status verschiedener Zelllinien..... | 87 |
| 3.2.2 Untersuchungen zur Reparatur der OHME-induzierten DNA-Addukte..... | 88 |
| 3.2.3 Einfluss von OHME auf die Zellviabilität sowie durchflusszytometrische Charakterisierung des induzierten Zelltods | 90 |
| 3.2.4 Untersuchungen zur Rolle von p53 im OHME-induzierten Zelltod | 93 |
| 3.2.5 Untersuchungen zu den Effekten von OHME auf transkriptioneller Ebene | 100 |
| 3.2.6 Untersuchungen zum Einfluss von OHME auf die mitochondrielle Integrität | 101 |
| 3.2.7 Untersuchungen zur Rolle des BH3 <i>only</i> Proteins Bim im OHME-induzierten Zelltod | 109 |

| | |
|--|-----|
| 3.3 Exkurs: Verwendung von pMH zur Untersuchung der Wirkung von Histondeacetylaseinhibitoren (HDACi) | 119 |
| 4. Diskussion | 121 |
| 4.1 Einordnung der verwendeten Testsysteme und Testkonzentrationen in den physiologischen Kontext..... | 121 |
| 4.1.1 HepG2 als immortalisierte Hepatoblastomlinie..... | 121 |
| 4.1.2 Primäre murine Hepatozyten | 122 |
| 4.1.3 Verwendete OHME-Konzentrationen im physiologischen Kontext..... | 123 |
| 4.2 Untersuchungen zur Reparatur von dGMiE und dAMiE | 124 |
| 4.3 OHME induziert zeit- und konzentrationsabhängig apoptotischen Zelltod | 132 |
| 4.4 OHME induziert DNA-Schäden und p53-Akkumulation in pMH | 136 |
| 4.5 Der Tumorsuppressor p53 als Schlüsselprotein für OHME-induzierte Apoptose | 137 |
| 4.6 OHME induziert mitochondrielle Apoptose | 141 |
| 4.7 Zur Rolle des BH3 <i>only</i> Protein Bim im OHME induzierten Zelltod | 146 |
| 5. Fazit & Ausblick | 149 |
| Literaturverzeichnis | 152 |
| Anhang | 164 |
| Lebenslauf..... | 165 |
| Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge | 166 |
| Danksagung | 168 |
| Erklärung zum selbstständigen Verfassen dieser Arbeit | 170 |

II. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1 in vivo-Metabolismus von Methyleugenol. | 3 |
| Abbildung 2 in vitro Metabolismus von ME..... | 4 |
| Abbildung 3 Mechanismus der Carbokationbildung und Struktur der gebildeten DNA-Addukte. | 7 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aktivierung von ATM und ATR und der nachgeschalteten zellulären Antwort.. | 15 |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung der NER. | 20 |
| Abbildung 6: Schematische Übersicht über extrinsische und intrinsische Apoptose. | 24 |
| Abbildung 7: Schematische Darstellung der MOMP durch Bcl2-Proteine. | 30 |
| Abbildung 8: Exemplarische Aufnahme der PCR-Produkte nach elektrophoretischer Auftrennung. | 79 |
| Abbildung 9: Exemplarischer Western Blot verschiedener Gewebe von wildtypischen, sowie XPA-defizienten Mäusen aus eigener Zucht, Hsp90 dient als Ladekontrolle. | 79 |
| Abbildung 10: Repräsentative Durchlichtaufnahmen von wildtypischen sowie XPA-defizienten pMH nach 24 h Behandlung. | 80 |
| Abbildung 11: DNA-Adduktanalysen in wildtypischen sowie XPA-defizienten pMH. | 81 |
| Abbildung 12: Ergebnisse des Resazurinreduktionstests in pMH. | 82 |
| Abbildung 13: A: Repräsentativer Western Blot von p53 und γ H2AX in wildtypischen sowie XPA-defizienten pMH nach Inkubation mit aufsteigenden OHME-Konzentrationen für 24 h. | 83 |
| Abbildung 14: Immunfluoreszenzmessung von γ H2AX in pMH nach 24h OHME-Behandlung. | 85 |
| Abbildung 15: Western Blot Analyse der SULT1A1-Expression in verschiedenen Zelllinien. | 87 |
| Abbildung 16: Analyse der DNA-Adduktbildung mittels LC-MS/MS nach Inkubation für 24-96 h mit OHME..... | 88 |
| Abbildung 17: Analyse der DNA-Adduktbildung mittels LC-MS/MS nach Inkubation mit OHME für 8h und anschließender Recoveryzeit..... | 90 |
| Abbildung 18: Untersuchungen zum OHME-induzierten Zelltod..... | 92 |
| Abbildung 19: Induktion von p53 nach OHME-Inkubation in HepG2.. | 93 |
| Abbildung 20: Untersuchungen zur Inkubation mit OHME mit siRNA vermitteltem Knockdown von p53. | 94 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 21: Analyse der Effekte von des p53-Inhibitors Pifithrin α auf die Proteinlevel von p53, p21 und Cl-Cas3 nach OHME-Inkubation. | 96 |
| Abbildung 22: Untersuchungen zur Wirkung des p53-Inhibitors Pifithrin α auf den OHME-induzierten Zelltod. | 97 |
| Abbildung 23: Untersuchungen zur Wirkung des Mdm2-Inhibitors Nutlin3a auf den OHME-induzierten Zelltod. | 99 |
| Abbildung 24: Genexpressionsanalyse verschiedener DNA-Reparatur- und Apoptose-assoziiierter Gene. | 100 |
| Abbildung 25: Expression von Bax nach OHME-Inkubation in HepG2. | 101 |
| Abbildung 26: Immunfluoreszenzfärbung von aktivem Bax und Zellkernen (blau) nach OHME-Behandlung inkl. statistischer Auswertung. | 103 |
| Abbildung 27: Cofärbung von aktivem Bax, Mitochondrien und Zellkernen. | 105 |
| Abbildung 28: Cofärbung von aktivem Bax, Mitochondrien und Zellkernen (Vergrößerungen). | 106 |
| Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung von Cytochrom c mit DAPI-Kernfärbung nach OHME-Behandlung. | 107 |
| Abbildung 30: Untersuchungen zu Caspasespaltung und -aktivität. | 108 |
| Abbildung 31: Immunfluoreszenzfärbung von Bim inkl. Kofärbung mit MitoTracker RedCMXRos. | 110 |
| Abbildung 32: Western Blot Analyse von Bim, p53, und cleaved-Caspase 3 sowie -9 nach dosisabhängiger Inkubation mit OHME für 24h in wildtypischen und Bim-defizienten HepG2. | 111 |
| Abbildung 33: Densitometrische Auswertungen der in Abbildung 32 dargestellten Western Blots. | 113 |
| Abbildung 34: Western Blot Analyse von Bim, p53, und cleaved-Caspase 3 sowie -9 nach zeitabhängiger Inkubation mit 75 μ M OHME in wildtypischen und Bim-defizienten HepG2. | 114 |
| Abbildung 35: Densitometrische Auswertungen der in Abbildung 32 dargestellten Western Blots. | 115 |
| Abbildung 36: Untersuchungen zum Einfluss von Bim auf den OHME-induzierten Zelltod. | 117 |
| Abbildung 37: Genexpressionsanalyse von wildtypischen und Bim-defizienten HepG2 nach OHME-Behandlung. | 118 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 38: Untersuchungen zu Zytotoxizität und möglicher DNA-schädigender Wirkung des HDACi Panobinostat..... | 119 |
| Abbildung 39: Immunfluoreszenz von pMH mit und ohne HDACi nach Behandlung mit verschiedenen DNA-schädigenden Substanzen..... | 120 |
| Abbildung 40: Struktur der dG-Addukte von ME und Estragol..... | 127 |
| Abbildung 41: Modell des OHME-induzierten Apoptosemechanismus..... | 145 |

III. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1: Übersicht über die DNA-Reparaturmechanismen der Zellen. | 16 |
| Tabelle 2: Verschiedene posttranslationale Modifikationen von p53. | 26 |
| Tabelle 3: Verwendete Geräte..... | 36 |
| Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien..... | 39 |
| Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und kommerziell erhältliche Lösungen..... | 41 |
| Tabelle 6: Angesetzte Puffer und Lösungen..... | 47 |
| Tabelle 7: Verwendete Antikörper..... | 53 |
| Tabelle 8 Verwendete Primer..... | 54 |
| Tabelle 9 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zelllinien..... | 55 |
| Tabelle 10 Verwendete Zellzahlen in HepG2..... | 57 |
| Tabelle 11: Mastermixzusammensetzung für die Genotypisierung der Zuchtmäuse..... | 58 |
| Tabelle 12: Verwendetes PCR-Protokoll..... | 59 |
| Tabelle 13: Verwendete Zellzahlen in pMH..... | 62 |
| Tabelle 14: Verwendete Gelzusammensetzungen zur SDS-PAGE..... | 64 |
| Tabelle 15: Verwendete Zellzahlen zur DNA-Adduktanalytik im Zeitverlauf..... | 69 |
| Tabelle 16: Substanzspezifische massenspektrometrische Parameter für dG, ¹⁵ N ₅ - dG, N2-MIE-dG, N6-MIE-dA, [¹⁵ N ₅]- N2-MIE-dG and [¹⁵ N ₅]- N6-MIE-dA..... | 73 |
| Tabelle 17 Berechnung hypothetischer physiologischer Molaritäten von ME..... | 124 |
| Tabelle 18 In der Literatur berichtete EC ₅₀ -Werte von OHME in verschiedenen Testsystemen..... | 133 |

IV. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|---|
| 2wayANOVA | Zweiseitige Varianzanalyse |
| 3-NBA | 3-Nitrobenzanthron |
| Apaf1 | <i>apoptotic protease activating factor 1</i> |
| ATF4 | aktivierender Transkriptionsfaktor 4 |
| ATM | <i>ataxia telangiectasia mutated</i> |
| ATR | <i>ataxia telangiectasia and Rad3 related</i> |
| ATRIP | <i>ATR-interacting protein</i> |
| Bad | <i>Bcl2 Antagonist of cell death</i> |
| Bak | <i>Bcl2 homologous antagonist killer</i> |
| BaP | Benzo[a]pyren |
| Bax | <i>Bcl2-associated X protein</i> |
| Bcl2 | <i>B-cell lymphoma 2</i> |
| BER | Basenexzisionsreparatur |
| BH3 | <i>Bcl2-homology domain 3</i> |
| Bid | <i>BH3 interacting-domain death agonist</i> |
| Bim | <i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i> |
| BPDE | Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| Bspw. | Beispielsweise |
| c-IAP | <i>Cellular inhibitor of apoptosis</i> |
| cdc25C | <i>cell division cycle 25c</i> |
| CDK | <i>cyclin-dependent kinase</i> |
| CHDL1 | <i>Chromodomain-helicase-DNA-binding-protein-like 1</i> |

| | |
|--------------------|---|
| Chk | Checkpointkinase |
| CHOP | <i>C/EPB homologous protein</i> |
| CNV | engl.: <i>copy number variations</i> |
| CSA/B | <i>Cockayne syndrome A/B</i> |
| CYP | Cytochrom P450 |
| dA-MiE | N ⁶ -methylisoeugenoldesoxyadenosin |
| DDB | <i>DNA damage binding protein</i> |
| ddH ₂ O | Doppelt destilliertes Wasser |
| DDR | engl.: DNA damage response = DNA-Schadensantwort |
| dG-MiE | N ² -methylisoeugenoldesoxyguanosin |
| DISC | <i>death-inducing signaling complex</i> |
| Dist. | distal |
| DLC1 | <i>Dynein light-chain 1</i> |
| DMEM HG | Dulbeccos modified Eagles Medium high glucose |
| DMEM LG | Dulbeccos modified Eagles Medium low glucose |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA-PK | <i>DNA-dependent protein kinase</i> |
| DSB | Doppelstrangbruch |
| dsDNA | engl.: <i>double stranded DNA</i> = doppelsträngige DNA |
| DTT | Dithiothreitol |
| DYRK2 | <i>dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2</i> |
| ECL | <i>Enhanced chemoluminescence</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |

| | |
|----------------|---|
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ERCC1 | <i>excision repair cross-complementation group 1</i> |
| ERK | <i>extracellular signal related kinase</i> |
| ETAA1 | <i>Ewings tumor associated antigen 1</i> |
| FADD | <i>FAS-associated death domain</i> |
| FEMA | <i>Flavor and Extract Manufacturers Association</i> |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FKS | Fötales Kälberserum |
| FOXO | <i>forkhead box protein O</i> |
| GG-NER | global genomic-NER |
| GRAS | <i>Generally recognised as safe</i> |
| GSK3 | <i>glycogen synthase kinase-3</i> |
| HBSS | <i>Hank's balanced salt solution</i> |
| HDAC | Histondeacetylase |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HIF-1 α | <i>Hypoxia-inducible factor 1α</i> |
| HIPK2 | <i>Homeodomain interacting protein kinase 2</i> |
| HNF | <i>Hepatocyte nuclear factor</i> |
| HPLC | engl.: <i>high performance liquid chromatography</i> = Hochleistungsflüssigchromatographie |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> |
| hSULT | Humane Sulfotransferasen |
| HUF | Humane uterine Fibroblasten |
| <i>i.p.</i> | <i>intraperitoneal</i> |

| | |
|------------------|--|
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| IQ | Ilimachinon |
| JNK | c-Jun-N-terminale Kinase |
| KG | Körpergewicht |
| LD ₅₀ | Lethale Dosis bei der 50 % der Testpopulation verstarben |
| LOAEL | <i>lowest observable adverse effect level</i> |
| LOD | engl.: <i>limit of detection</i> = Nachweisgrenze |
| LOQ | engl.: limit of quantification = Quantifizierungsgrenze |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Proteinkinasen |
| Mcl1 | <i>induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i> |
| Mdm2 | <i>mouse double minute 2</i> |
| ME | Methyleugenol |
| MEF | Murine Embryofibroblasten |
| MEKK4 | <i>mitogen activated protein kinase kinase kinase 4</i> |
| MGMT | O ⁶ -Methylguaninmethyl-transferase |
| MMR | <i>Mismatch repair</i> |
| MoE | <i>Margin of Exposure</i> |
| MOMP | <i>mitochondrial outer membrane pores</i> |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> |
| MRN-Komplex | Mre11, Rad50, Nbs1-Komplex |
| MS | Massenspektrometrie |
| mSULT | Murine Sulfotransferasen |
| MTD | <i>Mitochondrial target domain</i> |
| NER | Nukleotidexzisionsreparatur |

| | |
|-------|---|
| NHEJ | <i>Non-homologous end joining</i> |
| NOAEL | <i>no observable adverse effect level</i> |
| Noxa | <i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i> |
| NP-40 | Nonidet P-40 |
| Nrf2 | <i>Nuclear factor erythroid-derived 2</i> |
| ns | Nicht signifikant |
| NTP | <i>National toxicology programme</i> der US-Gesundheitsbehörden |
| Nut3a | Nutlin3a |
| OHME | 1'-Hydroxymethyleugenol |
| Pano | Panobinostat |
| PARP1 | Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 |
| PBS | Phosphat-gepufferte Saline |
| PCNA | Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen |
| PCP | Pentachlorphenol |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PI | Propidiumiodid |
| Pifa | Pifithrin α |
| pMH | Primäre murine Hepatozyten |
| PP | Phenylpropanoid |
| pRH | Primäre Rattenhepatozyten |
| Prox. | proximal |
| PS | Penicillin/Streptomycin |
| PTX2 | Pectenotoxin-2 |

| | |
|-----------|--|
| Puma | <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i> |
| qPCR | Quantitative PCR |
| Rb | Retinoblastom-Protein |
| RFC | <i>replication factor C</i> |
| RNAPol II | RNA-Polymerase II |
| ROS | engl.: <i>reactive oxygen species</i> = reaktive Sauerstoffspezies |
| RPA | <i>replication protein A</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| SCE | engl.: sister chromatide exchange = Schwesterchromatidaustausch |
| SCF | Scientific Committee on Food |
| scrRNA | <i>scrambled</i> RNA |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| siRNA | <i>small interfering</i> RNA |
| SSBR | Einzelstrangbruchreparatur |
| ssDNA | engl.: <i>single stranded DNA</i> = einzelsträngige DNA |
| SULT | Sulfotransferase |
| tBid | <i>truncated</i> Bid |
| TBS | TRIS-gepufferte Saline |
| TBS-T | TRIS-gepufferte Saline mit 0,05 % Tween20 |
| TC-NER | <i>transcription coupled</i> -NER |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TFIIH | <i>transcription initiation factor</i> IIH |
| TNF | <i>tumor necrose factor</i> |

| | |
|-----------|--|
| TopBP1 | <i>DNA-topoisomerase 2 binding protein 1</i> |
| TRAIL | <i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i> |
| TRIS | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UDS-Assay | <i>unscheduled DNA-synthesis-Assay</i> |
| USP7 | <i>Ubiquitin-specific-processing protease 7</i> |
| UV | ultraviolett |
| UVSSA | <i>UV-stimulated scaffold protein A</i> |
| XIAP | <i>X-linked inhibitor of apoptosis</i> |
| XP | <i>Xeroderma pigmentosum</i> |
| XPX | <i>Xeroderma pigmentosum complementation group X</i> |
| γH2AX | Phosphorylierung von Histon 2AX |
| z.B. | zum Beispiel |

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

Leberkrebs war 2018 mit 841.000 neuen Fällen die am sechst häufigsten diagnostizierte Krebsform und mit 782.000 Todesfällen die viert tödlichste Krebsart weltweit [3, 4]. Am häufigsten wird Leberkrebs in den Schwellenländern Nordafrikas, Ostasiens und Mikronesiens diagnostiziert [4]. Die wichtigsten Typen des Leberkrebses stellen das hepatozelluläre Karzinom mit 75-85 % der diagnostizierten Fälle, sowie das intrahepatische Gallengangskarzinom mit 10-15 % der diagnostizierten Fälle dar. Das Leberkrebsrisiko ist korreliert mit Hepatitis B und C-Infektionen, Fettleibigkeit, Alkohol- und Zigarettenkonsum sowie verschiedenen Nahrungsmittelkanzerogenen wie beispielsweise (bspw.) Aflatoxin B₁ [3, 4]. Zudem sind verschiedene sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie zum Beispiel (z.B.) Pyrrolizidinalkaloide und Phenylpropanoid mögliche humane Leberkanzerogene [5].

Methyleugenol (ME) ist ein Phenylpropanoid (PP), welches in diversen Kräuterpflanzen als Aromastoff, sowie in diversen anderen Nahrungsmittelpflanzen in Spuren vorkommt und so Eintrag in den menschlichen Körper findet [6]. Neben ME gehören bspw. Eugenol, Estragol und Anethol zu den nahrungsmittelrelevanten PP. Die Substanzklasse selbst kann in allylische und propenylische Verbindungen eingeteilt werden [6]. ME stellt hier einen Vertreter der allylischen PP dar, während bspw. Anethol ein propenylischer Vertreter ist. Diese können weiter unterteilt werden in *cis*- und *trans*-Verbindungen [6]. In verschiedenen Kanzerogenitätstudien wurde ME, sowie verschiedene Metaboliten positiv getestet [7]. In den letzten Jahren wurde der zugrundeliegende Metabolismus von ME in der Leber aufgeklärt, der zur Bildung des ultimalen Kanzerogens führt. Es konnte festgestellt werden, dass die genotoxischen Effekte auf der Bildung hochreaktiver, DNA-Addukt-bildender Carbokationen beruht [8, 9]. Während die Adduktbildung mechanistisch aufgeklärt ist und die Addukte von ME auch in humanen Leberproben nachgewiesen werden konnten [10] ist die zelluläre Reaktion auf diese Adduktbildung bis heute größtenteils ungeklärt. Die der Adduktbildung nachgeschalteten, zellulären Reaktionen sollen im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt und näher beleuchtet werden.

1.1 Toxikologie von Methyleugenol: aktueller Stand der Forschung

1.1.1. Toxikokinetik von Methyleugenol

Die Toxikokinetik von ME wurde sowohl an menschlichen Probanden als auch in Versuchstieren untersucht. Mittels Gaschromatographie gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie wurde das Blutserum von 206 US-amerikanischen Probanden analysiert. Hier konnte in 98 % der Proben ME nachgewiesen werden bei einer Nachweisgrenze (LOD) von 3,1 pg ME pro g Serum. Der Mittelwert lag bei 24 pg ME/g Serum und der Median bei 16 pg ME/g Serum [11]. Im Weiteren wurde die Toxikokinetik von ME untersucht. Hierzu wurde neun nüchternen Probanden eine Mahlzeit aus zwölf kommerziell erhältlichen Gewürzkeksen und Orangensaft gereicht. Die aufgenommene Menge ME betrug 216 µg, was hier einer durchschnittlichen Dosis von 3,16 µg/kg KG entsprach. Den Probanden wurde vor dem Verzehr, sowie 15, 30, 60 und 120 min nach dem Verzehr Blut abgenommen. Nüchtern betragen die ME-Gehalte im Serum der Probanden durchschnittlich 16,2 pg ME/g Serum. Maximale Serumsgehalte wurden mit 53,9 pg ME/g Serum bereits nach 15 min erreicht. Nach zwei Stunden waren noch durchschnittlich 25,2 pg ME/g Serum nachweisbar. Hieraus wurde eine ungefähre durchschnittliche Plasmahalbwertszeit von 90 min bestimmt [12].

Die rasche Resorption von ME im Menschen deckt sich mit den Ergebnissen verschiedener Tierversuche an männlichen und weiblichen F344/N-Ratten sowie B6C3F₁-Mäusen. Den Tieren wurden oral je 37, 75 und 150 mg/kg KG/d verabreicht. Maximale Plasmakonzentrationen wurden in beiden Geschlechtern und Spezies nach 5 bis 15 min erreicht. Plasmahalbwertszeiten lagen zwischen 30 und 120 min. Die Bioverfügbarkeit von ME lag in den durchgeführten Studien bei 3-20 %, zudem konnte festgestellt werden, dass innerhalb 72 h nach Verabreichung 85 % der Dosis in metabolisierter Form eliminiert wurden. Dies spricht für einen ausgeprägten *first pass*-Effekt von ME [7].

1.1.2 Metabolismus von Methyleugenol

Der *in vivo*-Metabolismus von ME wurde an männlichen Wistar-Ratten nach einmaliger Gabe von 200 mg/kg KG i.p. oder oral untersucht. Hierzu wurde der 24 h-Urin gesammelt, mit Glucuronidase und Sulfatase behandelt und die renal ausgeschiedenen Metaboliten mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

bestimmt. Abbildung 1 zeigt alle identifizierten Metaboliten, inklusive des prozentualen Anteils der Verbindung an der Wiederfindung der Gesamtdosis.

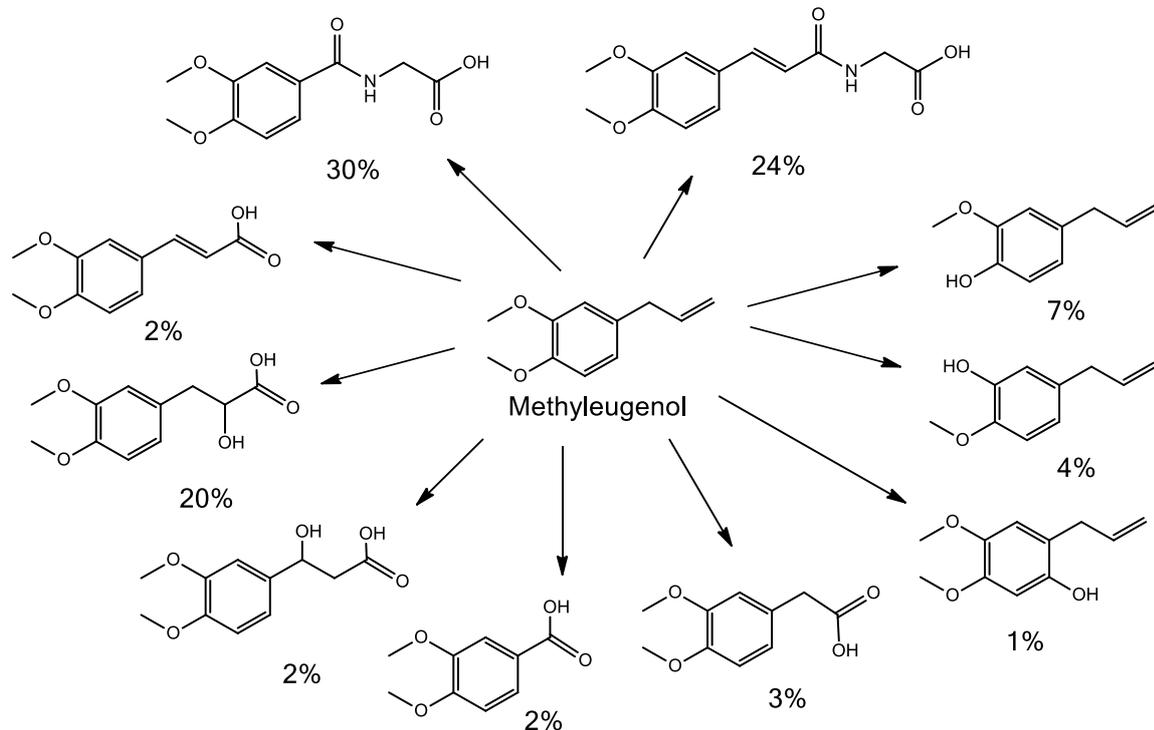


Abbildung 1 *in vivo*-Metabolismus von Methyleugenol. Nach [13]

Die Gesamtwiederfindung beträgt hier 95% der verabreichten Gesamtdosis ME und es konnte keinerlei unmetabolisierte Muttersubstanz detektiert werden. Das biliär ausgeschiedene Metabolitenspektrum wurde in selbiger Studie identifiziert, jedoch nicht quantifiziert. Grundsätzlich wurde eine ähnliches Substanzspektrum identifiziert, zusätzlich konnten noch 1'-Hydroxymethyleugenol (OHME), 3'-Hydroxymethylisoeugenol, 1'-Oxomethyleugenol, (RS)-2',3'-Dihydro-2',3'-dihydroxymethyleugenol, Veratrumaldehyd, 3,4-Dimethoxyphenylacetaldehyd und 3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3-oxopropionsäure identifiziert werden [13].

Der mikrosomale Metabolismus wurde anhand von Inkubationen von ME mit Mikrosomen verschiedener Spezies aufgeklärt. Es wurden humane, bovine sowie Rattenlebermikrosomen verwendet, zudem wurden Inkubationen mit primären

Rattenhepatozyten durchgeführt. Abbildung 2 stellt das Metabolitenspektrum dar.

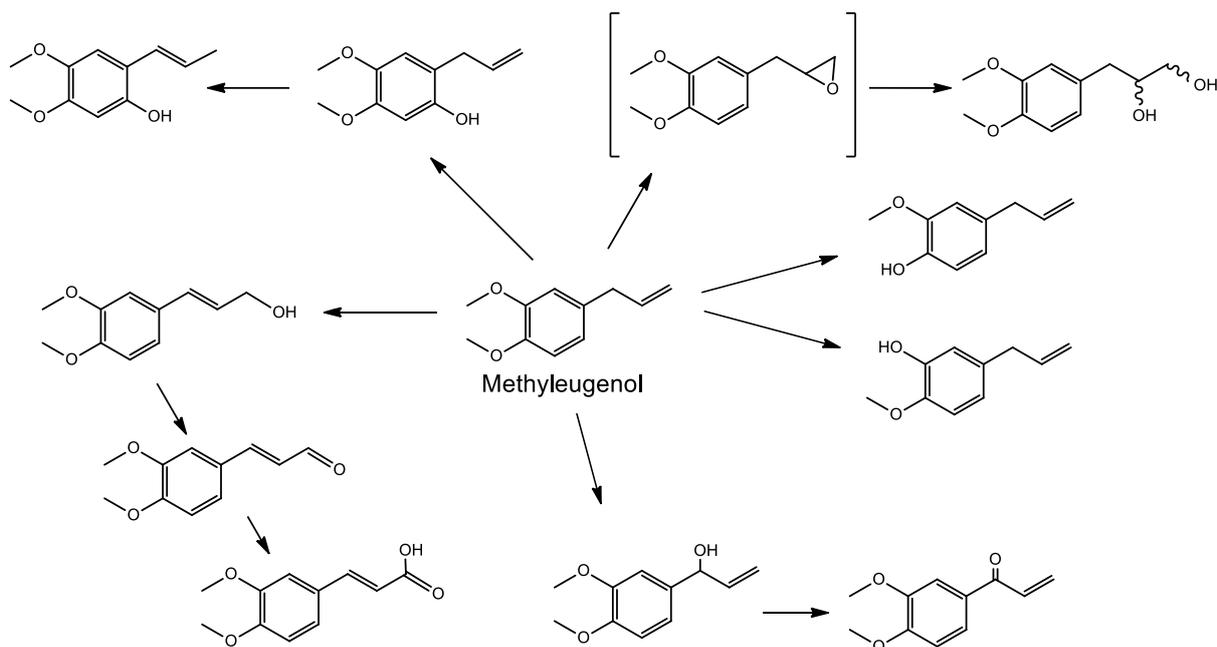


Abbildung 2 *in vitro* Metabolismus von ME. Nach [8]

Die seitenkettenhydroxylierten Verbindungen OHME und 3'-Hydroxymethyleugenol stellten sich sowohl in Mikrosomeninkubationen als auch in Inkubationen mit pRH als Hauptmetaboliten heraus, wobei das 3'-Derivat in intakten Zellen wahrscheinlich zügig weiter oxidiert wird. Die weiteren dargestellten Verbindungen sind Nebenprodukte. In selbiger Studie wurde die Fähigkeit der verschiedenen Metaboliten untersucht, in pRH die bekannten DNA-Addukte von ME zu bilden. Hier konnte eine Adduktbildung durch Inkubation mit der Muttersubstanz, OHME, 3'-Hydroxymethyleugenol und 3'-Oxomethyleugenol festgestellt werden, wobei die Inkubation mit OHME mit Abstand die höchsten Adduktlevel erzielte [8].

Bezüglich des Phase II-Metabolismus von ME konnten in Urin und Galle von männlichen Sprague Dawley Ratten verschiedene Glutathion- und Cysteinikonjugate detektiert werden, welche wahrscheinlich von den Epoxid-abgeleiteten Diolen, E-3'-Oxomethyleugenol und einem chinonmethidartigen Eugenolmetaboliten abstammen. Die genannten Verbindungen haben Potential als Biomarker der Exposition genutzt zu werden [14].

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

1.1.3 Kanzerogenität von Methyleugenol

Einige PP sind schon lange als hepatokanzerogen im Tierversuch bekannt. Erste Studien mit Safrol als Testsubstanz wurden in den 1960er Jahren durchgeführt und lieferten positive Ergebnisse [15, 16]. In den folgenden Jahren wuchs das Interesse an den strukturverwandten allylischen PP, zu denen auch ME gehört. Für ME wurde im Jahr 2000 im Auftrag des US-Gesundheitsministeriums im Rahmen des *National Toxicology Programs* (NTP) [7] eine systematische Reihe an Tierversuchen in Ratte und Maus zur Aufklärung der toxikologischen Eigenschaften von Methyleugenol durchgeführt [7]. Teil der genannten Versuchsreihen war eine Fütterungsstudie an B6C3F₁-Mäusen und F344/N-Ratten beider Geschlechter über zwei Jahre zur Charakterisierung der kanzerogenen Eigenschaften von ME. Gruppen von je 50 männlichen und weiblichen Tieren beider Spezies wurden Dosen von 0, 37, 75, 150 mg ME/kg KG mittels Gavage an fünf Tagen pro Woche verabreicht. Alle männlichen Ratten der beiden höchsten Dosisgruppen starben vor Beendigung der Studie, zudem wurde in der weiblichen 150 mg/kg KG-Gruppe der Ratten eine leicht verringerte Überlebensrate gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt. Des Weiteren wurde in allen behandelten weiblichen Mäusegruppen eine signifikant verringerte Überlebensrate festgestellt. Das durchschnittliche Körpergewicht aller Dosisgruppen war im Vergleich zu den Kontrollgruppen in beiden Spezies verringert. In Mäusen konnte in allen ME-behandelten Dosisgruppen beider Geschlechter eine erhöhte Anzahl an hepatozellulären Neoplasmen im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren festgestellt werden. Die Inzidenz für Hepatoblastome war in allen weiblichen Dosisgruppen erhöht, zudem ließ sich eine leichte Erhöhung in der zweithöchsten männlichen Dosisgruppe feststellen. Eine Induktion von Gallengangskarzinomen konnte in der zweithöchsten weiblichen Dosisgruppe beobachtet werden. Zudem konnte in zwei oder mehr Dosisgruppen beider Geschlechter eine Induktion von eosinophilen Foci, nekrotischen Hepatozyten, Ovalzellhyperplasien, Gallengangshyperplasien und Hemosiderinhyperpigmentation festgestellt werden. Zudem konnten vereinzelt maligne neuroendokrine Tumoren festgestellt werden. In Ratten konnten in allen Dosisgruppen und beiden Geschlechtern eine Induktion von hepato- sowie cholangiozellulären Adenomen und Karzinomen festgestellt werden. Zudem wurden benigne sowie maligne Tumore des Drüsenmagens festgestellt. Des Weiteren wurden in der zweithöchsten weiblichen Dosisgruppe eine Induktion von Tumoren des Vormagens festgestellt. In den Nieren männlicher Ratten konnte eine

Induktion von Nierenkanalhyperplasien sowie -adenomen festgestellt werden. Die Inzidenz für Nephropathien war in den weiblichen Dosisgruppen erhöht. In männlichen Dosisgruppen konnte des Weiteren ein positiver Trend für Mesotheliome, mit signifikanten Werten in den beiden höchsten Dosisgruppen festgestellt werden. Außerdem wurden in männlichen Ratten eine Induktion von Fibroadenomen der Milchdrüsen sowie Fibromen des Unterhautgewebes festgestellt [7, 17].

Neuere Studien beleuchteten tumorinitiierende Effekte von ME. Männliche F344/N-Ratten wurden über 16 Wochen dreimal pro Woche mit ME behandelt. Die Hälfte der behandelten Tiere wurde im Weiteren 20 Wochen lang mit der Tumorpromotor Phenobarbital (500 ppm im Futter) behandelt, während der Rest der Tiere eine Standarddiät erhielt. Nach jeweils 8, 16 und 40 Wochen wurden aus jeder Behandlungsgruppe Tiere untersucht. Mittels ^{32}P -Postlabeling konnte in allen ME-behandelten Gruppen dosisabhängig die Bildung von zwei Major-DNA-Addukten und einem Minoraddukt nachgewiesen werden. Immunhistochemisch konnte mittels *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA)-Färbung eine Induktion der Zellproliferation um mindestens 100% in allen ME-behandelten Gruppen beobachtet werden. Veränderte hepatische Foci waren in der höchsten Dosisgruppe bereits nach acht Wochen detektierbar, in mittlerer und niedriger Dosisgruppe zeigten sich diese erst nach 16 Wochen. Die Inzidenz für hepatozelluläre Adenome war sowohl in den Phenobarbital-behandelten Tieren als auch in nur mit ME behandelten Tieren erhöht, wobei Multiplizität und Größe der Adenome nach Tumorpromotion erhöht waren. Hier konnte klar dargestellt werden, dass ME in der Lage ist tumorinitiierende Schäden durch DNA-Adduktbildung zu setzen. Zudem scheint die Zellproliferation in der Leber erhöht, was die Fixation von Mutationen während der Replikation begünstigt [18].

1.1.4 Subchronische, subakute und akute Toxizität von Methyleugenol

Die akute Toxizität von ME wurde hauptsächlich in Maus und Ratte untersucht. Die Lethale Dosis bei der 50 % der Testpopulation verstarben (LD_{50}) für Mäuse liegt bei intraperitonealer Applikation bei 540 mg/kg KG [7]. Für die Ratte liegen die LD_{50} -Werte bei oraler Applikation zwischen 810 und 1560 mg/kg KG [7, 19, 20]. Zudem konnte in Ratten weder eine Irritation von Haut noch Augen nach Applikation von ME festgestellt werden [20].

Nach oraler Gabe von 18 mg/kg KG ME konnten nach 91 Tagen, abgesehen von einer geringen Zunahme des Lebergewichts, keine adversen Effekte festgestellt werden. In

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

einer 14-Wochen Studien an männlichen und weiblichen F344/N-Ratten und B6C3F1-Mäusen wurde ein *no observable adverse effect level* (NOAEL) von <10mg/kg KG festgelegt, wobei hier die niedrigste Dosisgruppe als *lowest observable adverse effect level* (LOAEL) definiert wurde. Bereits in der niedrigsten Dosisgruppe (37 mg/kg KG) konnte hier bei weiblichen eine Ratte eine signifikante Abnahme des Körpergewichts, sowie des Gewichts von Nieren und Milz festgestellt werden. Zudem konnten Veränderungen im Serumgastrin und in der Zellproliferation der Fundusdrüsen und des Pylorus festgestellt werden [21].

1.1.5 Genotoxizität und Mutagenität von Methyleugenol

Der Mechanismus der metabolischen Aktivierung der allylischen Phenylpropanoide wurde anhand von Safrol und Estragol aufgeklärt und konnte für ME bestätigt werden. Die 1'-hydroxylierten Derivate stellen das proximale Kanzerogen dar und werden im Weiteren durch Sulfotransferasen (SULT) sulfatiert. Das entstehende Sulfoxyderivat ist instabil, spaltet spontan anorganisches Sulfat ab und bildet ein reaktives, elektrophiles Carbokation, welches mit DNA reagieren kann [22-25]. Das gebildete Carbokation bindet an Desoxyguanosin und Desoxyadenosin und bildet hier die Addukte N²-methylisoeugenoldesoxyguanosin (dG-MiE) and N⁶-methylisoeugenoldesoxyadenosin (dA-MiE) [8]. Abbildung 3 stellt die metabolische Aktivierung von ME, inklusive der Strukturen der beiden hauptsächlich gebildeten DNA-Addukte dar.

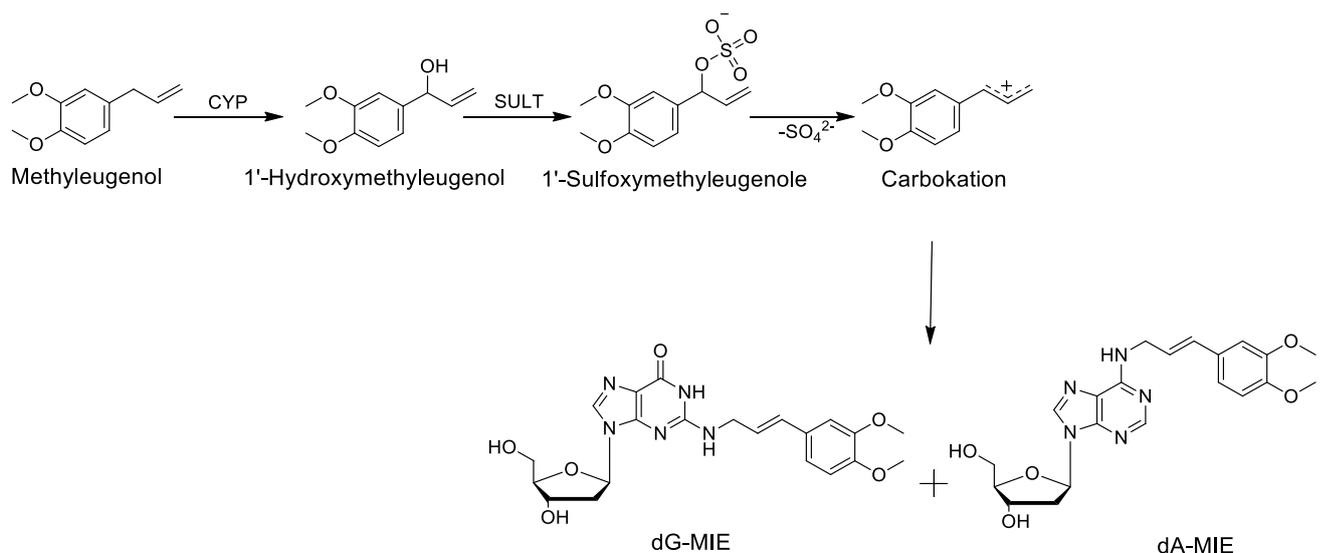


Abbildung 3 Mechanismus der Carbokationbildung und Struktur der gebildeten DNA-Addukte.
Nach [8]

Die Beteiligung der CYP450-Enzymisoformen an der gezeigten Reaktion wurde in verschiedenen Testsystemen untersucht. In humanen Lebermikrosomen zeigte CYP1A2 die höchsten Metabolisierungsraten bei physiologisch relevanten Konzentrationen. Zusätzlich sind 2C9, 2C19 und 2D6 im Stande, ME zu OHME umzusetzen [26]. Interessanterweise erwies sich in Rattenlebermikrosomen CYP2E1 als potenteste Isoform, zudem konnte in ME-behandelten Fischer 344-Ratten eine dosisabhängige Autoinduktion von CYP1A2 und 2B beobachtet werden [27].

Die Relevanz von SULT für die gezeigte Reaktion und die kanzerogene Wirkung von Methyleugenol wurde in diversen Studien belegt. Für das strukturverwandte Safrol konnte in Tierversuchen mit Mäusen gezeigt werden, dass eine gleichzeitige Behandlung der Tiere mit 1-Hydroxysafrol und Pentachlorphenol (PCP), einem potenten SULT-Inhibitor, zu keiner erhöhten Tumorinzidenz führt, wobei eine gleichzeitige Behandlung ohne PCP zur Induktion von Leberneoplasien führt [22].

ME liefert in pRH und pMH dosisabhängig positive Ergebnisse im Bereich von 1–500 µM im *unscheduled DNA-synthesis*-Assay (UDS-Assay), welche sich durch Koinkubation mit PCP auf ein annähernd basales Level reduzieren ließen [9]. Eine aktuellere Studie ergab eine Korrelation der ME-DNA-Adduktlevel in humanen Leberproben mit der SULT1A1-Expression. SULT1A1 unterliegt im Menschen verschiedenen Polymorphismen. Relevant ist hier vor allem die Anzahl der für SULT1A1 codierenden Kopien im Genom des Individuums (engl.: *copy number variations*, CNV). Hier konnte klar festgestellt werden, dass eine höhere SULT-Expression aufgrund höherer CNV mit einer Induktion des Adduktlevels einhergeht. Zusätzlich betont diese Studie noch einmal die Humanrelevanz von ME, in der Studie wurden 121 Leberbiopsien untersucht und in jeder Probe konnten DNA-Addukte von ME detektiert werden [10].

In den klassischen bakterienbasierten Mutagenitätsassays liefert ME unklare Ergebnisse. Im klassischen Ames-Test sowie im *E.coli*-Reversionsassay liefert ME negative Ergebnisse, wohingegen in DNA-Reparaturassays mit *Bacillus subtilis* positive Ergebnisse verzeichnet wurden. Zugabe von S9-Mix konnte mutagene Effekte erzeugen, jedoch liefert nicht jeder Stamm positive Ergebnisse [28]. Die dargestellten unklaren Effekte von ME sind darauf zurückzuführen, dass die meisten Bakterien keine adäquaten SULT-Isoformen exprimieren, die zur Metabolisierung von OHME fähig sind. Eine Studie mit *Salmonella typhimurium* TA100 mit Expression von hSULT1C2

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

zeigt eine klare Induktion von mutagenen Effekten nach Inkubation mit ME und S9-Mix [29]. Des Weiteren zeigten DNA-Adduktmessungen in *Salmonella typhimurium* TA100 mit Expression von humanem SULT1A1, 1A2, 1C2 und 1E1, dass SULT1A1 bei weitem die potenteste SULT-Isoform ist. Interessanterweise benötigt das murine SULT1A1-Ortholog wesentlich höhere Substratkonzentrationen [30]. Zusätzlich wurden Mausstudien an wildtypischen, SULT1A1-Knockout, SULT1A1/1A2-humanisierten Mäusen, sowie Tieren mit Kombinationen der genannten Genotypen (mSULT1A1^{-/-}, hSULT1A1/1A2^{+/+}) durchgeführt. Die Tiere wurden mit 50 mg/kg KG ME behandelt und DNA-Adduktlevel wurden bestimmt. Hier konnte festgestellt werden, dass die Bildung der Addukte annähernd vollständig vom Vorhandensein von SULT1A1-Isoformen abhängig ist [31].

Die Effekte von ME auf die chromosomale Stabilität scheinen sehr gering zu sein, zudem gibt es keine Evidenz für Chromosomenschäden *in vivo*. In Hefen lieferte ME positive Ergebnisse für interchromosomale Rekombinationen, jedoch waren die Ergebnisse nicht dosisabhängig [32]. Schwesterchromatidaustausche (SCE, engl.: sister chromatid exchange) wurden mit und ohne S9-Mix in CHO-Zellen untersucht. In Inkubationen ohne S9-Mix konnte keine Induktion von SCE beobachtet werden, wobei Koinkubationen mit S9-Mix zu einer dosisabhängigen Induktion von SCE im Bereich von 0-500 µg/ml ME führten. Chromosomale Aberrationen wurden in gleicher Weise wie SCE getestet, hier konnte keine Induktion festgestellt werden [7]. Im Mikrokerntest konnte eine signifikante, dosisabhängige Induktion von Mikrokernen in HT29-Zellen nach Inkubation mit den Metaboliten (R/S)-2',3'-Methyleugenolepoxid und (E)-3'-Oxomethylisoeugenol festgestellt werden [1]. Jedoch konnte *in vivo* keine Induktion von Mikrokernen in Erythrocyten von B6C3F₁-Mäusen nach 14-wöchiger ME-Behandlung mittels Gavage festgestellt werden [7].

Eine Charakterisierung der ausgelösten Mutationen in ME-induzierten Tumoren wurde an B6C3F₁-Mäusen durchgeführt. DNA aus den Tumoren wurde isoliert und einer Mutationsanalyse unterzogen. Hier konnte in 20 von 29 der ME-induzierten Tumoren Mutationen im β -Catenin-Gen festgestellt werden. In spontan aufgetretenen Tumoren konnte nur in 2 von 22 untersuchten Tumoren eine Mutation dieses Gens festgestellt werden. Es wurden hier Punktmutationen festgestellt. Gleichzeitig konnte eine mittels Western Blot und Immunhistochemie eine Akkumulation von β -Catenin bereits in

hepatozellulären Foci nachgewiesen werden. Das Protein akkumulierte hier an den Zellmembranen und nicht im Kern [33].

1.1.6 Risikobewertung und Regulation von Methyleugenol

Methyleugenol ist annähernd omnipräsender Inhaltsstoff der menschlichen Ernährung und findet zudem noch in verschiedensten kosmetischen Mitteln Verwendung. Die tägliche Aufnahme wurde an verschiedenen Stellen abgeschätzt. Für die US-amerikanische Bevölkerung wurde eine mittlere tägliche Aufnahme von 0,77 µg/kg KG/d berechnet [34]. Eine weitere Quelle berechnet mediane tägliche Aufnahmemengen von ME natürlichen Ursprungs von 80,5 µg/d für die USA und 9,6 µg/d für Europa [35]. An anderer Stelle wurde für die europäische Bevölkerung eine theoretische maximale tägliche Aufnahmemenge von 4,6 mg/d bzw. 66 µg/kg KG/d berechnet [36]. Die durchschnittliche Exposition der Gesamtbevölkerung wird in der Literatur mit 0,13–1,35 µg/kg KG/d angegeben, wobei Personen mit Verzehr ME-reicher Lebensmittel einer durchschnittlichen Exposition von 66–514 µg/kg KG/d ausgesetzt sind [36, 37]. Hierraus wurde ein *margin of exposure* (MoE) von 100-800 berechnet [36]. Andere Quellen berechnen den MoE anhand der ME-Gehalte verschiedener Lebensmittel und geben diesen mit 3084 an [38].

ME als Reinsubstanz darf innerhalb der Europäischen Union nach Verordnung der europäischen Gemeinschaft 1334/2008 weder Lebensmitteln noch Kosmetika zugesetzt werden. Die entsprechenden Umsetzungen in nationales Recht finden sich der Aromenverordnung und Kosmetikverordnung Anlage 1 zu §1. Für verschiedene Lebensmittel, denen Aromen oder Zutaten zugesetzt werden, die natürlicherweise ME enthalten, gelten bestimmte Grenzwerte. Die Grenzwerte bewegen sich im Bereich von 1 mg/kg für Alkoholika und 60 mg/kg für Suppen und Saucen. Bei der Verwendung von frischen, getrockneten und tiefgekühlten Kräutern und Gewürzen existieren keine Grenzwerte. Für Kosmetika gelten Höchstmengen für natürliches ME aus ätherischen Ölen zwischen 0,01 % in Parfüm und 0,0002 % in Erzeugnissen zur Mundpflege und sonstigen Mitteln, die auf der Haut verbleiben.

In den USA wurde die Reinsubstanz ME 1965 von der *Flavor and Extract Manufacturers Association* (FEMA) der Status *generally recognized as safe* (GRAS) zuerkannt. Nach einer Bestätigung des GRAS-Status 2009 wurde ME erst 2018 nach einer Überarbeitung der Vergabekriterien bzgl. der Genotoxizität von

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

Aromasubstanzen, von der GRAS-Liste entfernt [39]. Auf EU-Ebene beurteilte das ehemalige *Scientific Committee on Food* [40] ME im Jahre 2000 als genotoxisches Kanzerogen. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde eine Empfehlung ausgesprochen den Einsatz von ME einzuschränken [40]. Die *International Agency for Research on Cancer* (IARC) hat vor kurzem eine Neubewertung von ME vorgenommen. Hierbei wurde die Substanz von Kategorie 2B in Kategorie 2A höhergestuft und damit als wahrscheinlich krebserregend für den Menschen kategorisiert. Als Begründung hierfür wurden ausreichende Evidenz für kanzerogene Effekte in Tierstudien angeführt, sowie starke mechanistische Evidenz für einen kanzerogenen Effekt [41]. Obwohl ME in den meisten Ländern inzwischen als Reinsubstanz in Lebensmitteln und Kosmetika verboten ist, existieren pflanzliche Nahrungsergänzungsmittel auf Basis von Basilikum, Zimt, Muskatnuss oder Sassafras, die extrem hohe ME-Gehalte aufweisen können und kaum reguliert und untersucht sind [42].

1.2 DNA-Schäden, die zelluläre Antwort und ihre Reparatur

Die DNA jeder einzelner unserer Zellen wird täglich tausendfach auf unterschiedliche Arten und Weisen geschädigt [43]. Diese Läsionen können Replikation und Transkription blockieren und im Falle unzureichender Reparatur sogar Mutationen oder größere genomische Aberrationen induzieren und damit die Lebensfähigkeit der Zelle und auch des Gesamtorganismus gefährden [44]. Das Spektrum der DNA-Schäden reicht von kleinen Addukten wie bspw. O⁶-Methylguanin oder 8-Oxoguanin, welche durch methylierende Agenzien oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl.: *reactive oxygen species*) induziert werden, bis hin zu strukturellen Schäden der DNA wie Doppelstrangbrüchen (DSBs) oder chromosomalen Aberrationen, welche zur Bildung von Mikrokernen führen können. DNA-Schäden können durch von außen an den Organismus herangetragene Noxen, wie z.B. Chemikalien oder UV-Licht, entstehen. UV-Licht ist absolut gesehen wohl für die meisten umweltinduzierten DNA-Läsionen verantwortlich, so kann die UV-Strahlung bei starker Sonneneinstrahlung bis zu 100 000 Läsionen pro Zelle pro Stunde induzieren [45]. Gleichzeitig nimmt unser Körper dauerhaft potentiell DNA-schädigende Agentien auf. Nahrungskanzerogene wie Aflatoxin B1 aus *Aspergillus flavus*-kontaminierten Nussprodukten oder heterozyklische aromatische Amine aus erhitzten Fleischprodukten werden im Körper zu reaktiven Metaboliten verstoffwechselt, welche mit der DNA reagieren können und

sog. sperrige Addukte (engl.: *bulky adducts*) bilden [46]. Zusätzlich werden auch in großem Maße DNA-Schäden durch endogene Prozesse induziert. Beispielsweise produzieren Zellen endogene ROS, welche zum oben bereits genannten 8-Oxoguanin führen können [47]. Aufgrund dieses andauernden Sperrfeuers auf unsere DNA hat unser Organismus verschiedene Mechanismen entwickelt, um mit Schäden umzugehen und diese zu reparieren

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

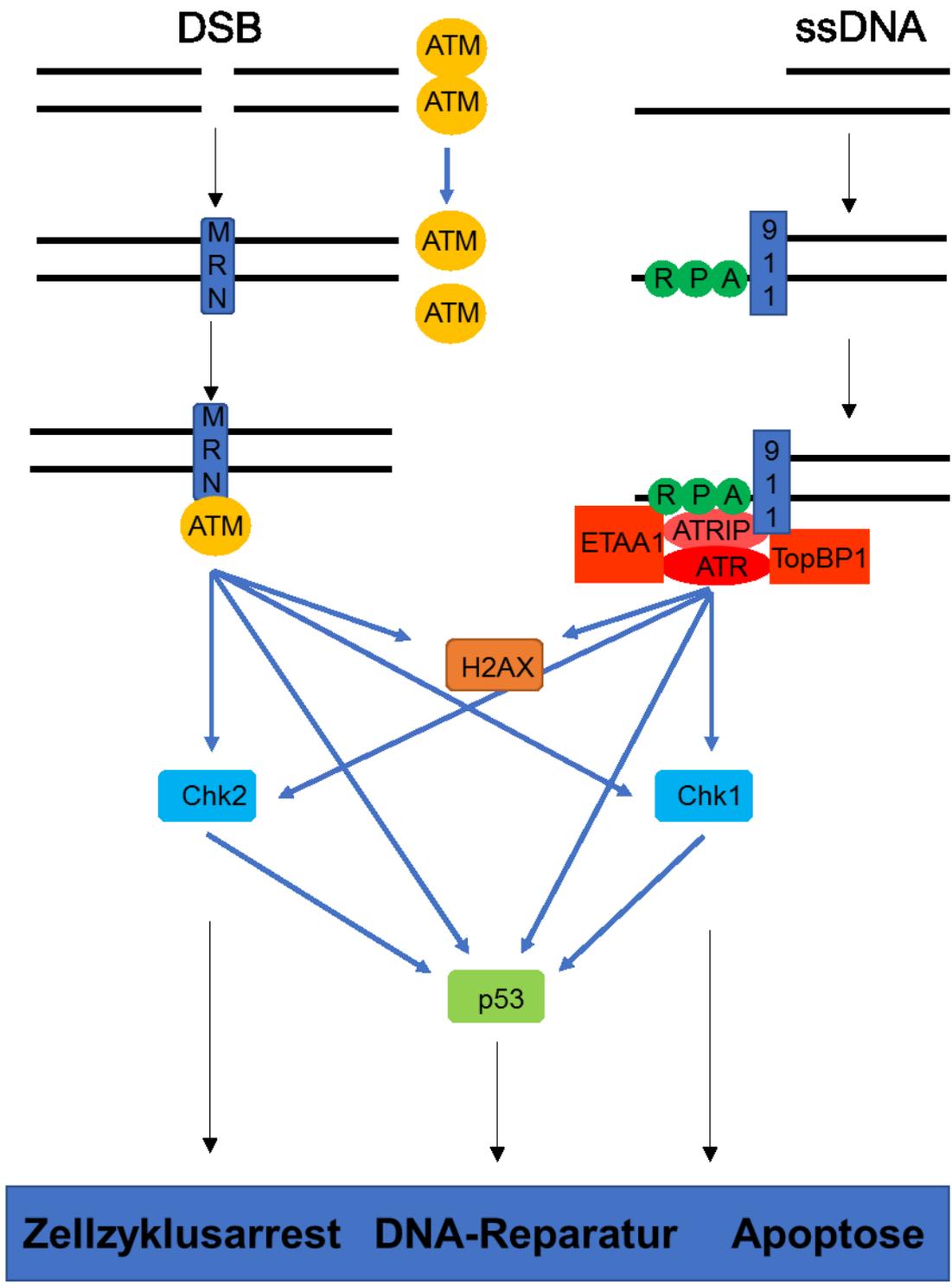
1.2.1 Die DNA-Schadensantwort

Nach DNA-Schädigung werden Signalkaskaden induziert, die im Weiteren über Überleben oder Tod der Zelle entscheiden. Man spricht von der DNA-Schadensantwort (DDR, engl.: *DNA damage response*). Diese wird aktiviert, wenn Schädigungen der DNA zu Strangbrüchen oder dem Stopp von Replikationsgabeln führen. Drei miteinander verknüpfte Systeme von Sensorproteinen können solche Schäden innerhalb von kurzer Zeit nach ihrer Entstehung detektieren [48]. Die zentralen Enzyme dieser Systeme sind die PI3K-verwandten Kinasen *ataxia telangiectasia mutated* (ATM), *ataxia telangiectasia and Rad3 related* (ATR) und *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PK). Aktivierung dieser Kinasen kann sowohl Mechanismen in Gang setzen, die das Überleben der Zelle sichern sollen, als auch apoptotische Vorgänge induzieren. In Abhängigkeit der Ausprägung des DNA-Schadens wird ein Zellzyklusarrest induziert, was der Zelle Zeit geben soll, um Läsionen zu reparieren. Ist der Schaden an der DNA jedoch zu groß, induziert die DDR Apoptose, so dass die Zelle zu Grunde geht, jedoch Mutationen verhindert werden können [49, 50]. Die genannten Kinasen werden durch (Auto-)Phosphorylierung aktiviert und phosphorylieren dann zahlreiche Substrate, darunter Checkpointkinase 1 oder 2 (Chk1/2). Diese wiederum stabilisieren einerseits p53 und inhibieren andererseits CDC25-Proteine, so dass ein Zellzyklusarrest eingeleitet wird [51]. Der Tumorsuppressor p53 spielt eine zentrale Rolle in den nachgeschalteten Effekten der DNA-Schadenantwort, da er als Transkriptionsfaktor sowohl Proteine induzieren kann die an DNA-Reparatur beteiligt sind, gleichzeitig jedoch auch pro-apoptische Proteine induzieren kann. Die Effekte der Stabilisierung von p53 sind genauer in Kapitel 1.4 dargestellt.

Die konkrete Aktivierung der drei oben genannten Kinasen erfolgt durch verschiedene Mechanismen, so dass eine gewisse Spezifität der Kinasen für bestimmte Läsionen entsteht. ATM wird hauptsächlich durch Doppelstrangbrüche aktiviert, ATR bindet über *replication protein A* (RPA) und *ATR-interacting protein* (ATRIP) an einzelsträngige DNA (ssDNA). DNA-PK bindet an Doppelstrangbrüche und nimmt in der Nicht-homologen End-zu-End-Verknüpfung (engl.: *non-homologous end joining*, NHEJ) eine wichtige Rolle ein [52]. ATM liegt in ungeschädigten Zellen größtenteils nukleär in einer inaktiven, homodimeren Form vor. Diese wird nach DNA-Schädigung durch Autophosphorylierung an Ser367, Ser1893 und Ser1981 in die aktive, monomere Form überführt [53, 54]. Nach Bindung des MRN-Komplexes (bestehend aus Mre11, Rad50

und Nbs1) rekrutiert dieser die monomere Form von ATM zum DSB [55]. ATM wird hier nur an glatte DSB oder DSB mit kurzen Überhängen der DNA rekrutiert. Längere einzelsträngige Überhänge werden von RPA erkannt und gebunden, was wiederum eine Aktivierung von ATR zur Folge hat [52, 56]. RPA ist zur Aktivierung von ATR unerlässlich. Dieses Protein bindet spezifisch an ssDNA und kann die DDR in Gang setzen. Zusätzlich zu RPA bindet der Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1)-Komplex an die Übergangsstelle von doppelsträngiger DNA (dsDNA) und ssDNA [57, 58]. ATR liegt nun üblicherweise gebunden an seinen Partner ATRIP vor. Dieses erkennt RPA und bringt so ATR zur ssDNA [59, 60]. Zur Aktivierung von ATR werden weitere Proteine wie *DNA-topoisomerase 2 binding protein 1* (TOPBP1) oder *Ewings tumor associated antigen 1* (ETAA1) benötigt. TOPBP1 bindet hier an den 9-1-1-Komplex [57], während ETAA1 an RPA bindet und an gestoppten Replikationsgabel akkumuliert [61]. Der genaue Aktivierungsmechanismus von ATR ist noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch spielen sowohl (Auto-)Phosphorylierungen an bspw. Thr1989, als auch Konformationsänderungen, welche durch TOPBP1 oder ETAA1 ausgelöst werden, eine Rolle [57, 62]. Abbildung 4 stellt schematisch die Aktivierung von ATM und ATR, sowie die nachgeschaltete zelluläre Antwort dar.

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund



Phosphorylierung

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aktivierung von ATM und ATR und der nachgeschalteten zellulären Antwort. Modifiziert nach (51-54,57).

1.2.2 DNA-Reparaturmechanismen

Aufgrund der großen Variabilität an DNA-Schäden hat die Zelle verschiedene Reparaturwege für verschiedene Schäden entwickelt. Die Reparaturmechanismen sind als Übersicht in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die DNA-Reparaturmechanismen der Zellen. Modifiziert nach [44].

| Reparaturmechanismus | Reparierte Läsionen | Schlüsselproteine |
|-----------------------------------|---|--|
| Direkte Reparatur | Photodimere O ⁶ -Alkylguanin | Photolyasen O ⁶ -Methylguanin DNA Methyltransferase (MGMT) |
| <i>Mismatch Repair</i> (MMR) | DNA-Fehlpaarungen, Insertionen/Deletionen aus der DNA-Replikation | MSH2-MSH6 und MSH2-MSH3 plus MLH1-PMS2, MLH1-PMS1, PLH1-MLH3, EXO1, Polymerase δ und ϵ , PCNA, RFC, RPA, Ligase I |
| Basenexzisionsreparatur (BER) | Veränderte DNA-Basen, einfache Addukte | DNA-Glykosylasen als Sensor, AP-Endonuklease, Polymerase β , δ , und ϵ , FEN1, DNA Ligase I oder Ligase III, XRCC1 |
| Einzelstrangbruchreparatur (SSBR) | Einzelstrangbrüche | PARP1, XRCC1, Polymerase β , DNA Ligase I oder Ligase III |
| Nukleotidexzisionsreparatur (NER) | Läsionen, die die Struktur der DNA stören, z.B. | XPC-HR23B, DDB1/2, XPA, XPE, XPF/ERCC1, |

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

| | | | | |
|---|--|---|-----|--|
| | | sperrige Addukte, UV- Photoprodukte | UV- | XPG, CSA, CSB, TFIIH, DNA-Polymerasen, RPA, DNA Ligase I |
| DNA-Transläsionssynthese | | Schäden, die Replikationsgabeln blockieren | die | Polymerase η , ι , κ , REV3 and REV1 |
| Nichthomologe End-Verknüpfung <i>Non-homologous joining</i> (NHEJ)) | End-zu- (<i>engl.:</i> <i>end</i>) | Doppelstrangbrüche, Intermediate somatischen Rekombination | der | Ku, DNA-PK _{cs} , XRCC4, XLF/Cernunnos, Artemis, DNA Ligase IV, MRE11- RAD50-NBS1-Komplex, PNK, Aprataxin, polymerases μ und λ |
| Homologe Rekombination | | Doppelstrangbrüche, blockierte Replikationsgabeln, Interstrang-Crosslinks, | | RAD51, XRCC2, XRCC3, RAD51B, RAD51C, RAD51D, DMC1, RAD52, RAD54, BRCA1/2, RPA, BLM, GEN1, DNA- Polymerasen |
| Fanconi-Anämie- <i>Pathway</i> | | Interstrang-Crosslinks | | FANC-A, -C, -D1/BRCA2, -D2, -E, -F, -G, -I, -J, -L, - M, -N |

1.2.2.1 Nukleotidexzisionsreparatur (NER)

Aufgrund der großen Relevanz der NER für die Arbeit soll diese hier im Detail erklärt werden. Die NER ist ein DNA- Reparaturweg welcher für die Entfernung von Helix-verzerrenden Schäden verantwortlich ist. Die Relevanz der NER für die Gesundheit des Organismus wird bei näherer Betrachtung genetischer Defekte klar, die die NER einschränken oder vollständig unterbinden. Angeborene Defekte in NER-Genen

verursachen ein weites Spektrum schwerer bis schwerster Krankheiten, die mit einer extremen Prädisposition für Hautkrebs, schweren Defiziten in der neurologischen Entwicklung und vorzeitiger Alterung einhergehen [63]. Hierzu zählen beispielsweise das Cockayne-Syndrom oder *Xeroderma pigmentosum* (XP) [64].

Der erste und essentiellste Schritt jedes DNA-Reparaturmechanismus ist die Erkennung geschädigter DNA. Im Fall der NER existieren zwei voneinander abgegrenzte Möglichkeiten der Schadenserkennung: erstens die globalgenomische NER (GG-NER) und zweitens die transkriptionsgekoppelte NER (TC-NER) [63]. Die GG-NER entfernt Läsionen im gesamten Genom, wohingegen die TC-NER durch Läsionen aktiviert wird, welche die Transkription blockieren. Im Falle der GG-NER fungiert *Xeroderma pigmentosum, complementation group C* (XPC) als Schadenssensor, welches durch Rad23B und Centrin 2 unterstützt und stabilisiert wird [65]. XPC bindet hierbei spezifisch an DNA-Strukturen, welche die Helix destabilisieren. Das Protein bindet an kurze ssDNA-Abschnitte, die gegenüber der Läsion liegen. Dies wiederum erklärt das weite Spektrum der von der GG-NER reparierten Schäden, da die Präsenz einzelsträngiger DNA eine Gemeinsamkeit der meisten NER-induzierenden Läsionen ist [63, 66, 67]. Des Weiteren kann die GG-NER durch den *DNA damage binding protein 1/2* (DDB1/2)-Komplex (= XPE-Komplex) in Gang gesetzt werden. Dieser Komplex bindet spezifisch an spezielle DNA-Läsionen wie bspw. Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere oder 6-4-Photoprodukte [68]. Der XPE-Komplex bindet im Weiteren Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 (PARP1) welches DDB2 PARyliert. Hierdurch wird die Helikase *Chromodomain-helicase-DNA-binding-protein-like 1* (CHDL1) rekrutiert, welche die DNA um den Schaden entwindet und so die Bindung weiterer Reparaturfaktoren ermöglicht [69].

Trotz des weiten Substratspektrums von XPC existieren Läsionen, die nur ineffizient von der GG-NER repariert werden [63]. Hier kommt die TC-NER zum Tragen, um eine Reparatur solcher Schäden zu bewerkstelligen. Aktiviert wird die TC-NER durch die blockierte RNA-Polymerase II (RNAPol II), welche die TC-NER-spezifischen Proteine *Cockayne syndrome A* (CSA), CSB, *UV-stimulated scaffold protein A* (UVSSA) und *Ubiquitin-specific-processing protease 7* (USP7) rekrutiert. Diese legen die Läsion frei und machen sie zugänglich für alle weiteren Proteine die zur Reparatur benötigt werden [70]. Die blockierte RNAPol II gleitet wahrscheinlich durch sog. *backtracking* einige Basen zurück auf dem DNA-Strang und schafft so Platz für die adäquate Bindung der Reparaturfaktoren [70]. Gleichzeitig existiert die Möglichkeit irreversibel

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

blockierte RNAPol II Ubiquitin-vermittelt abzubauen [71]. Nach diesem Erkennungsschritt ist die Funktionsweise beider NER-Wege identisch.

Die Erkennung einer NER-reparablen Läsion hat die Rekrutierung des Multiproteinkomplex *transcription initiation factor* IIH (TFIIH) zur Folge [72]. Teil dieses Komplexes sind die DNA-Helikasen XPB und XPD, welche die offene Konfiguration der DNA um die Läsion erweitern. XPB kommt an dieser Stelle zusätzlich eine Rolle in der Rekrutierung von TFIIH zur Läsion zu, während XPD hauptsächlich zur Verifikation des Schadens genutzt wird [73, 74]. Nach der Verifikation des Schadens muss die Exzision des schadhafte Teils der DNA und die Reparatur der entstandenen Lücke erfolgen. Die Inzision in den DNA-Strang ist irreversibel, in Folge dessen müssen alle nachfolgenden Schritte effizient verlaufen, um keine potentiell gefährlichen Reparaturintermediate zu erzeugen [63]. Die Exzision der Läsion wird von den strukturspezifischen Endonukleasen XPF-*excision repair cross-complementation group 1* (ERCC1) und XPG durchgeführt. Die Inzision erfolgt in geringer Distanz zur Läsion, sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung, so dass ein 22-30 Basen umfassendes Oligonukleotid ausgeschnitten wird [75]. Adäquate Koordination des Einschnitts bedarf der korrekten Organisation der Proteine XPA, XPG und RPA, wobei XPG eine der benötigten Endonukleasen darstellt, XPA die zweite Endonuklease XPF-ERCC1 rekrutiert und RPA an den der Läsion gegenüber liegenden Strang einzelsträngiger DNA bindet [76-78]. Nach erfolgter Exzision des Schadens wird die Resynthese der DNA und deren Ligation von PCNA, *replication factor* C (RFC), DNA Pol δ , DNA Pol ϵ und DNA Ligase 1 oder XRCC1–DNA Ligase 3 durchgeführt [79]. Abbildung 5 stellt die Abfolge von sowohl TC-NER as auch GG-NER bildlich dar.

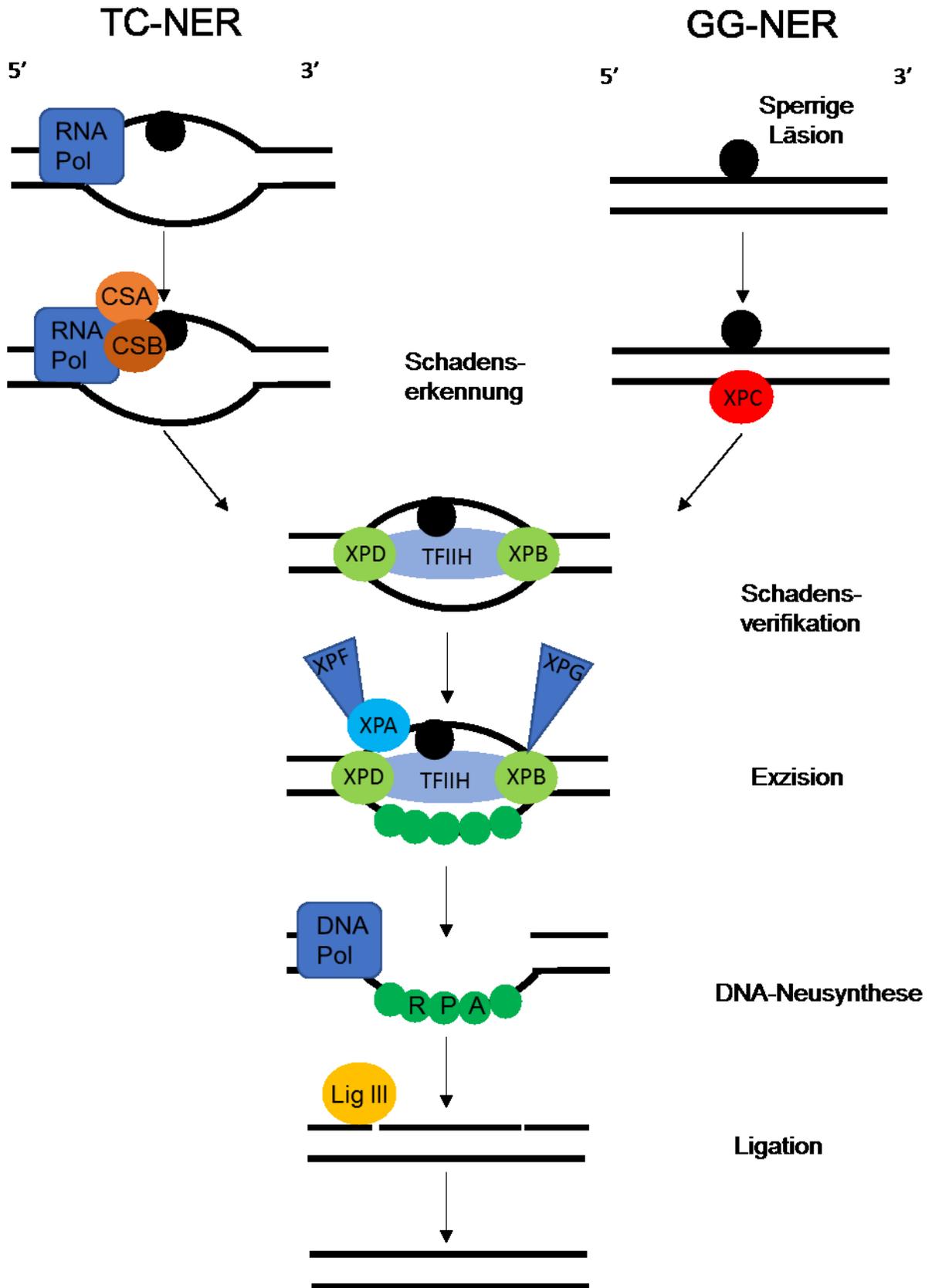


Abbildung 5: Schematische Darstellung der NER. Modifiziert nach [65, 70, 72-75, 79].

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

1.3 Zelltod

Regulierte Zelltodmechanismen spielen eine unersetzliche Rolle in der Biologie des Menschen. Ohne apoptotische Prozesse hätte ein 80-jähriger Mensch 2 t Knochenmark und Lymphgewebe, sowie einen 16 km langen Darmtrakt akkumuliert [80]. Klassischerweise sind zwei Hauptzelltodge Wege bekannt: Apoptose und Nekrose [81-83], wobei in den letzten Jahren noch weitere, mehr oder weniger stark regulierte Prozesse des Zelltods entdeckt wurden, bspw. Nekroptose, Pyroptose oder Ferroptose [81, 84, 85]. Die Autophagie, welche stellenweise als dritter Zelltodweg bezeichnet wird, stellt einen Prozess dar, in dem die Zelle eigene Organellen abbaut und verdaut, um gerade Zelltod zu vermeiden. So ist Autophagie *per se* ein Überlebensmechanismus, jedoch kann durchaus von Autophagie-assoziiertem Zelltod als einem regulierten biologischen Prozess ausgegangen werden, welcher in Verbindung mit der Entfernung seneszenten Zellen oder neoplastischer Läsionen steht [83, 86, 87]. Üblicherweise wird von der Apoptose als programmiertem Zelltod gesprochen. Programmiert bedeutet in diesem Zusammenhang, dass der Tod der Zelle durch genetisch klar definierte und regulierte Prozesse kontrolliert abläuft. Von Nekrose wird oft als unkontrolliertem Zelltod gesprochen, wobei die Forschung der letzten Jahre zeigt, dass auch nekrotische Prozesse einer genetischen Regulation unterliegen können. Man spricht von Nekroptose [83]. Apoptose und Nekrose lassen sich auf mikroskopischer Ebene anhand verschiedener Merkmale voneinander unterscheiden. In apoptotischen Zellen bleibt die Zellmembran fast bis zum Ende des Prozesses intakt, zudem bilden sich während des Prozesses charakteristische Bläschen auf der Membranoberfläche, was als sog. *apoptotic membrane blebbing* bezeichnet wird. In nekrotischen Zellen dagegen geht die Integrität der Plasmamembran früh verloren und erlaubt so einen Einstrom von extrazellulärer Matrix, sowie den Ausstrom von Plasmabestandteilen. Aufgrund der beschriebenen Membrancharakteristika schrumpfen apoptotische Zellen zusammen, während nekrotische Zellen anschwellen. Weitere mikroskopisch erkennbare Merkmale apoptotischer Zellen stellen die Kondensation des Chromatins, mit darauffolgender Fragmentierung des Kerns dar, sowie die Ausbildung apoptotischer Körperchen [88-90]. Im Allgemeinen wird Apoptose durch Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen, sog. Caspasen, vermittelt. Diese Caspasen spalten Strukturproteine wie z.B. Aktin, was zum Apoptose-typischen Zusammenschrumpfen der Zelle führt, zudem aktivieren sie verschiedene Nukleasen, welche wiederum den Abbau der DNA bedingen.

Caspasen werden klassischerweise in Initiator- und Effektorcaspasen unterteilt, wobei Erstere durch verschiedene Stimuli aktiviert werden können und im folgenden Zweitere aktivieren [91]. Die Apoptose kann in einen extrinsischen und einen intrinsischen Weg aufgeteilt werden. Auf die genauen Signalwege wird nun im Weiteren eingegangen.

1.3.1 Extrinsische Apoptose

Extrinsische Apoptose beschreibt einen Signalweg, der durch sogenannte Todesrezeptoren auf der Oberfläche der Zelle induziert wird. Nach Bindung eines Liganden lösen diese Rezeptoren eine Signalkaskade aus, welche letztendlich zur Aktivierung von Effektorcaspasen führt und damit die Apoptose einleitet. Es sind verschiedene Rezeptoren bekannt, deren Aktivierung zur Induktion von Apoptose führen kann, z.B. Rezeptoren der *tumor necrose factor* (TNF)-Familie oder *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL)-Rezeptoren. Nach Bindung der korrespondierenden Liganden kommt es zur intrazellulären Bildung eines Multiproteinkomplexes, des sog. *death-inducing signaling complex* (DISC), bestehend aus den Todesrezeptoren, *Fas-associated death domain protein* (FADD) und Procaspase 8. Letztere wird in ihre aktive Form gespalten und diese wiederum spaltet die Effektorcaspase 3 in ihre aktive Form [83, 92, 93]. Abbildung 6 stellt schematisch die Signalwege der Apoptose dar.

1.3.2 Intrinsische Apoptose

Der intrinsische Apoptoseweg wird auch mitochondriale Apoptose genannt. Pro-apoptotische Stimuli aktivieren hier einen oder mehrere Faktoren, welche das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen *B-cell lymphoma 2* (Bcl2)-Proteinen in Richtung der pro-apoptotischen Gruppe verschieben. Einer der relevantesten Aktivatoren an dieser Stelle ist das Tumorsuppressorprotein p53, jedoch können auch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) wie z.B. c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) oder p38 hier als Aktivator dienen. Die pro-apoptotischen *Bcl2-homology domain 3* (BH3)*only* Proteine binden an Komplexe aus pro- und anti-apoptotischen Bcl2-Proteinen und setzen so die pro-apoptotischen Effektoren *Bcl2-associated X protein* (Bax) und *Bcl2 homologous antagonist killer* (Bak) frei. Diese lagern sich in die äußere mitochondriale Membran ein, oligomerisieren dort und führen so zu einer Bildung von Poren. Man spricht bei diesem Prozess auch von *mitochondrial outer membrane permeabilization* (MOMP). Durch die gebildeten Poren können kleinere mitochondriale Proteine ausströmen, u.a. der an der Atmungskette beteiligte Elektronencarrier Cytochrom c. Dieser bindet im Zytosol an *apoptotic protease*

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

activating factor 1 (Apaf1) und sieben dieser Komplexe wiederum lagern sich zusammen und bilden das Apoptosom. Die Initiatorcaspase Procaspase-9 bindet an das Apoptosom und wird in die aktive Form gespalten. Aktive Caspase 9 wiederum spaltet die Effektorcaspasen 3 und 7 in ihre aktive Form [83, 90, 92]. Abbildung 6 stellt schematisch die Signalwege der Apoptose dar. Die p53-spezifischen Funktionen in der Apoptose, sowie Funktion der Bcl2-Proteinfamilie und einiger ausgewählter Vertreter werden später noch genauer dargelegt.

Die beschriebenen Signalwege der extrinsischen und intrinsischen Apoptose werden zusätzlich durch das BH3only Protein *BH3 interacting-domain death agonist* (Bid) verbunden. Bid liegt in inaktiver Form im Cytosol vor und stellt so ein Substrat für Caspase 8 dar. Nach Spaltung durch diese, man spricht nun von *truncatedBid* (tBid), kommt es zur Aktivierung von Bak und Bax und MOMP [94].

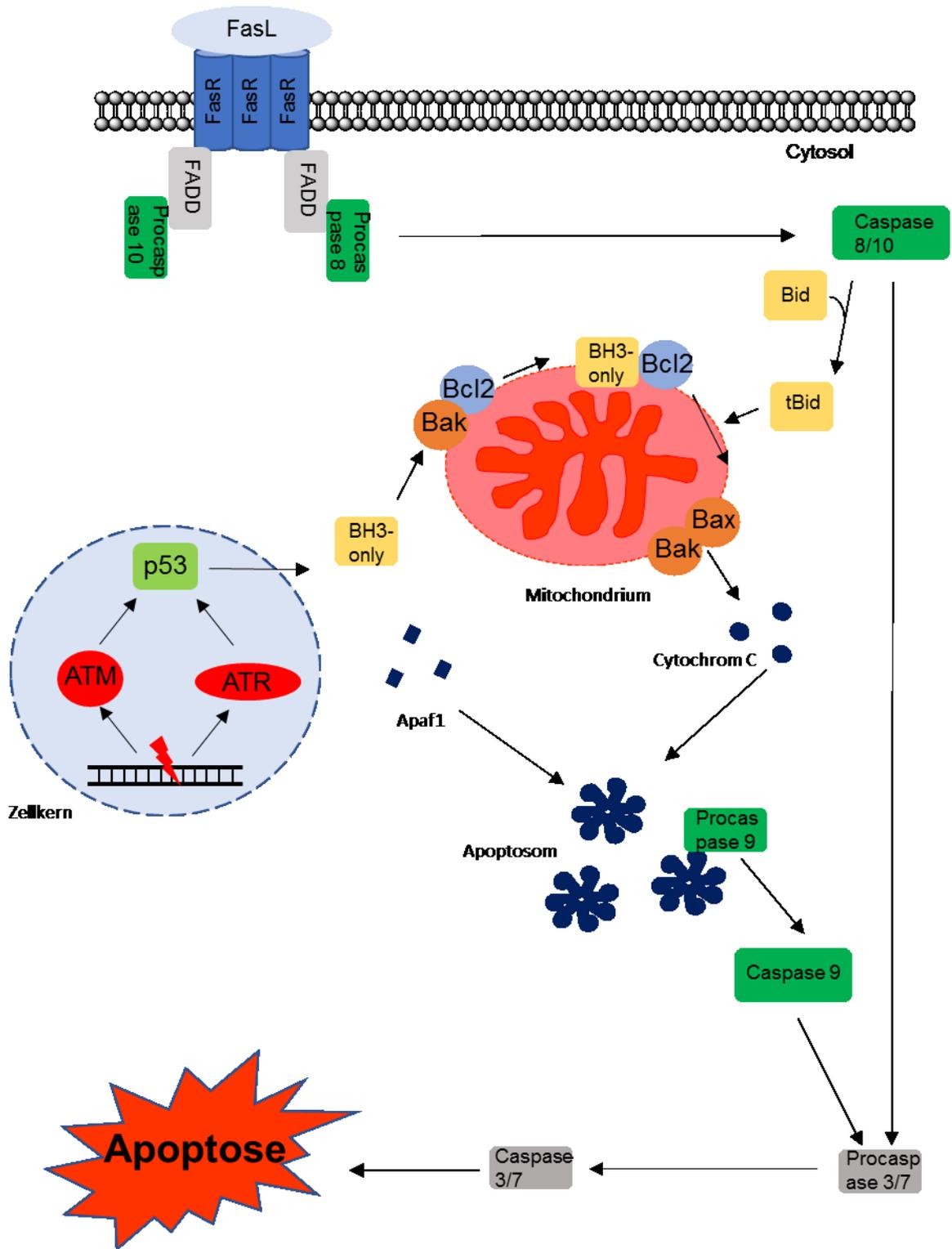


Abbildung 6: Schematische Übersicht über extrinsische und intrinsische Apoptose. Modifiziert nach (82, 89-93).

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

1.4 Das Tumorsuppressorprotein p53

TP53 codiert für das Tumorsuppressorprotein p53 und ist das am häufigsten mutierte Gen in allen Krebsarten. Als p53 entdeckt wurde, wurden verschiedene Experimente mit einer p53-Überexpression durchgeführt. Hier wurde eine Induktion des Zellwachstums festgestellt, was zu Annahme führte, dass p53 als Onkogen fungiert [2]. Bald wurde jedoch klar, dass die verwendeten Zelllinien Mutationen in p53 trugen. In Überexpressionsexperimenten mit wildtypischem p53 zeigte sich dann, dass erhöhte Expression von p53 mit Zelltod und unterdrücktem Wachstum einhergeht und p53 somit einen Tumorsuppressor darstellt. Inzwischen ist bekannt, dass p53 eine wichtige Rolle in zahlreichen zellulären Prozessen wie z.B. apoptotischen Zelltod, Seneszenz, Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur oder metabolischer Adaption spielt [95].

1.4.1 Regulation von p53

In Zellen, die keinerlei Stressfaktoren ausgesetzt sind, ist das p53-Level üblicherweise sehr gering, da p53 von der E3-Ubiquitinligase *mouse double minute 2* (Mdm2) zum proteasomalen Abbau markiert wird. Erst nach Stabilisierung durch posttranslationale Phosphorylierung oder Acetylierung akkumuliert p53 und induziert verschiedene Wirkungen. Bemerkenswert ist hier, dass Mdm2 selbst von p53 induziert wird, so dass der Tumorsuppressor hier seinen eigenen Abbau bedingt und ein autoregulatorischer Feedbackloop entsteht [96, 97]. Funktionell bildet p53 einen homotetrameren Transkriptionsfaktor, welcher an der Regulation von über 500 Genen beteiligt ist [98-100]. Die Induktion von p53 erfolgt größtenteils über eine Stabilisierung mittels posttranslationaler Modifikation. Die transkriptionelle Regulation von p53 spielt nur eine untergeordnete Rolle [101]. Jedoch sind Mechanismen bekannt, die p53 auf transkriptioneller Ebene beeinflussen können. Sowohl die TP53-mRNA-Level als auch die p53-Proteinlevel steigen beispielsweise nach Behandlung mit fötalem Kälberserum (FKS) an [102]. Im ersten Moment erscheint dieser Befund kontraintuitiv, da ein wachstumhemmendes Gen nach Inkubation mit Stimulantien verstärkt transkribiert wird, jedoch erhöht verstärktes Wachstum auch die Wahrscheinlichkeit für DNA-Schäden und Mutationen. Somit exprimiert die Zelle bei verstärktem Wachstum auch verstärkt p53, um möglichst zeitnah mittels Stabilisierung von p53 auf Noxen reagieren zu können [101]. Die posttranslationale Modifikation von p53 erfolgt durch diverse Mechanismen. Diese bedingen beispielweise dessen Stabilisierung oder Lokalisation, spielen jedoch auch eine große Rolle in zellulären Vorgängen wie Zellzyklusarrest,

DNA-Reparatur oder Apoptose. Tabelle 2 stellt die wichtigsten posttranslationalen Modifikationen von p53 dar.

Tabelle 2: Verschiedene posttranslationale Modifikationen von p53.

| Position | Modifikation | Protein | Effekt | Quelle |
|---|---------------------|---------------------------------|--|---------------|
| Ser15 | Phosphorylierung | ATM, ATR, DNA-PK, AMPK | Stabilisierung | [103, 104] |
| Ser46 | Phosphorylierung | HIPK2, p38, DYRK2 | Transition von Arrest und Reparatur zu Apoptose | [105, 106] |
| Ser6 | Phosphorylierung | CK1d, CK11 | Interaktion zwischen p53 und Smad | [107, 108] |
| Ser9 | Phosphorylierung | CK1d, CK11 | Interaktion zwischen p53 und Smad | [107, 108] |
| Lys370, 372,372, 381, 382, 386 | Ubiquitinylierung | Mdm2 | Proteasomaler Abbau | [96, 109] |
| Lys320 | Acetylierung | PCAF | Induktion von p21 | [110] |
| Lys120 | Acetylierung | hMOF, Tip60 | Akkumulation an den Mitochondrien | [111, 112] |

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

| | | | | |
|-----------------------|--------------|------------------|---|---------------|
| Glu2, 17, 28, Asp7 | PARylierung | PARP1 | Transaktivierung, Regulation der Genexpression, replikationsassoziierte Rekombination | [113] |
| Lys370 | Methylierung | SET8, SMYD2 | Schwächt Promotorbindung | [114, 115] |
| Lys372 | Methylierung | SET7/9 | Induziert transkriptionelle Aktivität | [116] |
| Lys386 | SUMOylierung | PIAS- Familie | Translokation vom Nukleus ins Cytosol, Autophagie | [117, 118] |

Tabelle 2 soll kein vollständiges Bild über die Modifikationen von p53 liefern, sondern einen groben Überblick geben, da p53 an über 50 verschiedenen Positionen verschiedene Modifikationen erfahren kann und zudem verschiedene Kombinationen der einzelnen Modifikationen zu unterschiedlichen zellulären Effekten führen können [119].

1.4.2 Die Rolle von p53 in Zellzyklusarrest und Apoptose

Nach der Stabilisierung induziert p53 verschiedene zelluläre Prozesse, von denen Zellzyklusarrest und Apoptose die prominentesten sind. Die Induktion eines Zellzyklusarrests erfolgt über transkriptionelle Aktivierung des *cyclin-dependent kinase* (CDK)-Inhibitors p21 [120]. Dieser bindet an Cyclin E/Cdk2 und Cyclin D/Cdk4 und inhibiert dadurch die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb). Unphosphoryliertes Rb bleibt an E2F1 gebunden und unterbindet so die transkriptionelle Aktivierung von Cyclin A/E, welche die Progression des Zellzyklus bedingen [121]. Zusätzlich bindet p21 PCNA und kann hierdurch die Replikation der DNA behindern [122]. Die beschriebenen Effekte induzieren einen G1-Arrest, gleichzeitig kann durch p53 nach DNA-Schädigung ein G2/M-Arrest induziert

werden. 14-3-3 σ ist ein weiteres, transkriptionell aktiviertes Zielgen von p53, welches mit einem G2/M-Arrest in Verbindung gebracht wird [123]. Zudem kann eine p53-vermittelte Repression des *cell division cycle 25c* (*cdc25C*)-Promotors zum G2/M-Arrest führen [124].

Neben dem Zellzyklusarrest spielt p53 eine entscheidende Rolle in der Apoptose. In Säugerzellen induziert p53 eine große Zahl an Genen, die sowohl an apoptotischer Signalweiterleitung als auch direkt an der Apoptose beteiligt sind. Sowohl Gene, die mit extrinsischer als auch intrinsischer Apoptose in Verbindung stehen, sind p53-Zielgene. Beispielsweise gehören *Fas*, *Dr4* und *Dr5* zum Substratspektrum. Somit kann eine Induktion von p53 eine Dimerisierung der Todesrezeptoren unterstützen und folglich den Beginn der extrinsischen Apoptosekaskade darstellen. Auf Seiten der intrinsischen Apoptose gehören verschiedene pro-apoptotische Mitglieder der Bcl2-Familie zu den Zielgenen von p53. Zu nennen sind hier *p53 upregulated modulator of apoptosis* (*Puma*), *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1* (*Noxa*), *Bcl2 Antagonist of cell death* (*Bad*), *Bak* oder *Bax*. Die drei erstgenannten codieren BH3only Proteine, welche eine inhibierende Wirkung auf die anti-apoptotisch wirkenden Mitglieder der Bcl2-Familie wie z.B. Bcl2 oder Bcl-xL haben. Bak und Bax hingegen zeigen direkte Wirkung am Mitochondrium und induzieren MOMP. Hierdurch wird die Signalkaskade der intrinsischen Apoptose in Gang gesetzt. Des Weiteren werden an der Ausführung der Apoptose beteiligte Proteine durch p53 transkriptionell aktiviert. Hierzu gehören beispielsweise Apaf1, welches an der Bildung des Apoptosoms beteiligt ist, oder die Effektorcaspase 6 [98, 125].

Abgesehen von den transkriptionellen Effekten von p53 sind auch direkte Wirkungen am Mitochondrium beschrieben. Zytosolisches p53 kann am Mitochondrium direkt an die anti-apoptotischen Proteine Bcl2 und Bcl-xL binden und so die pro-apoptotischen Effektoren Bak und Bax aus den jeweiligen Komplexen freisetzen [126-128]. Die Relevanz dieses Prozesses in der p53-induzierten Apoptose ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Apoptosedefekte in *Puma*-defizienten Mäusen und Mäusen mit mutierter p53-Transaktivierungsdomäne legen nahe, dass die transkriptionellen Wirkungen von p53 unerlässlich zur Induktion von Apoptose sind [129-131]. Jedoch zeigen Studien, dass eine geringe Menge p53 im Zytosol gebunden an Bcl2 vorliegt. Dieses wird nach transkriptioneller Aktivierung von Puma freigesetzt und kann im Weiteren die pro-apoptotischen Effektoren aktivieren. Dies legt nahe, dass

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

transkriptionelle und nicht-transkriptionelle Wirkungen von p53 unter physiologischen Bedingungen Hand in Hand gehen, um Apoptose zu induzieren [131, 132].

1.5 Die Familie der Bcl2-Proteine

Proteine der Bcl2-Familie spielen in verschiedenen zellulären Prozessen eine Rolle. Im Folgenden soll deren Funktion in der Apoptose genauer dargestellt werden. Bcl-2-Proteine teilen sich zwei hydrophobe und sechs amphiphile α -Helices als gemeinsames Strukturmotif, wobei die hydrophoben Helices für Protein-Membraninteraktionen verantwortlich sind. Sie führen die Interaktionen zwischen Membranen der Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum, Lysosomen, Peroxisomen und des Golgiapparat aus [133]. Üblicherweise werden Bcl2-Proteine in anti-apoptotische Proteine sowie pro-apoptotische Mediatoren und Effektoren eingeteilt. Sie alle bestehen aus bis zu vier konservierten, homologen BH-Domänen. Antiapoptotische Proteine beinhalten BH1, BH2, BH3, und BH4. Proapoptotische Effektoren beinhalten nur drei dieser Domänen: BH1, BH2, und BH3. Proapoptotische Mediatoren beinhalten lediglich die BH3-Domäne, werden daher auch *BH3only*-Proteine genannt [134-136]. *BH3only*-Proteine werden in Abhängigkeit ihrer Fähigkeit Bax und Bak [53] zu aktivieren weiter in zwei Gruppen unterteilt. Einerseits Aktivatoren, welche die Bindung von Bax an Membranen vermitteln, Bax/Bak-Monomere in Lösung aktivieren und deren Oligomerisierung induzieren. Andererseits Sensibilisatoren/Depressoren, welche MOMP indirekt induzieren, indem sie antiapoptotische Bcl-2-Proteine inhibieren [135, 137]. In ungeschädigten Zellen liegen die proapoptotischen Effektoren in Komplexen mit den antiapoptotischen Vertretern der Bcl2-Familie vor. Zur Einleitung der Apoptose werden nun je nach Stimulus verschiedene *BH3only*-Proteine induziert. Diese können einerseits die porenbildenden Bax und Bak aus den genannten Komplexen verdrängen und so aktivieren, andererseits durch direkte Bindung an Bax die Relokalisation an die Mitochondrien, sowie hier die Oligomerisierung erleichtern [135, 136, 138]. Abbildung 7 stellt die beschriebenen Funktionen schematisch dar. Die Regulation der Proteine der Bcl2-Familie ist in allen Fällen komplex, daher soll im Weiteren nur die Aktivierung der in dieser Arbeit relevanten proapoptotischen *BH3only*-Proteinen Puma, Noxa und *Bcl-2 interacting mediator of cell death* (Bim), sowie des proapoptotischen Effektors Bax beleuchtet werden.

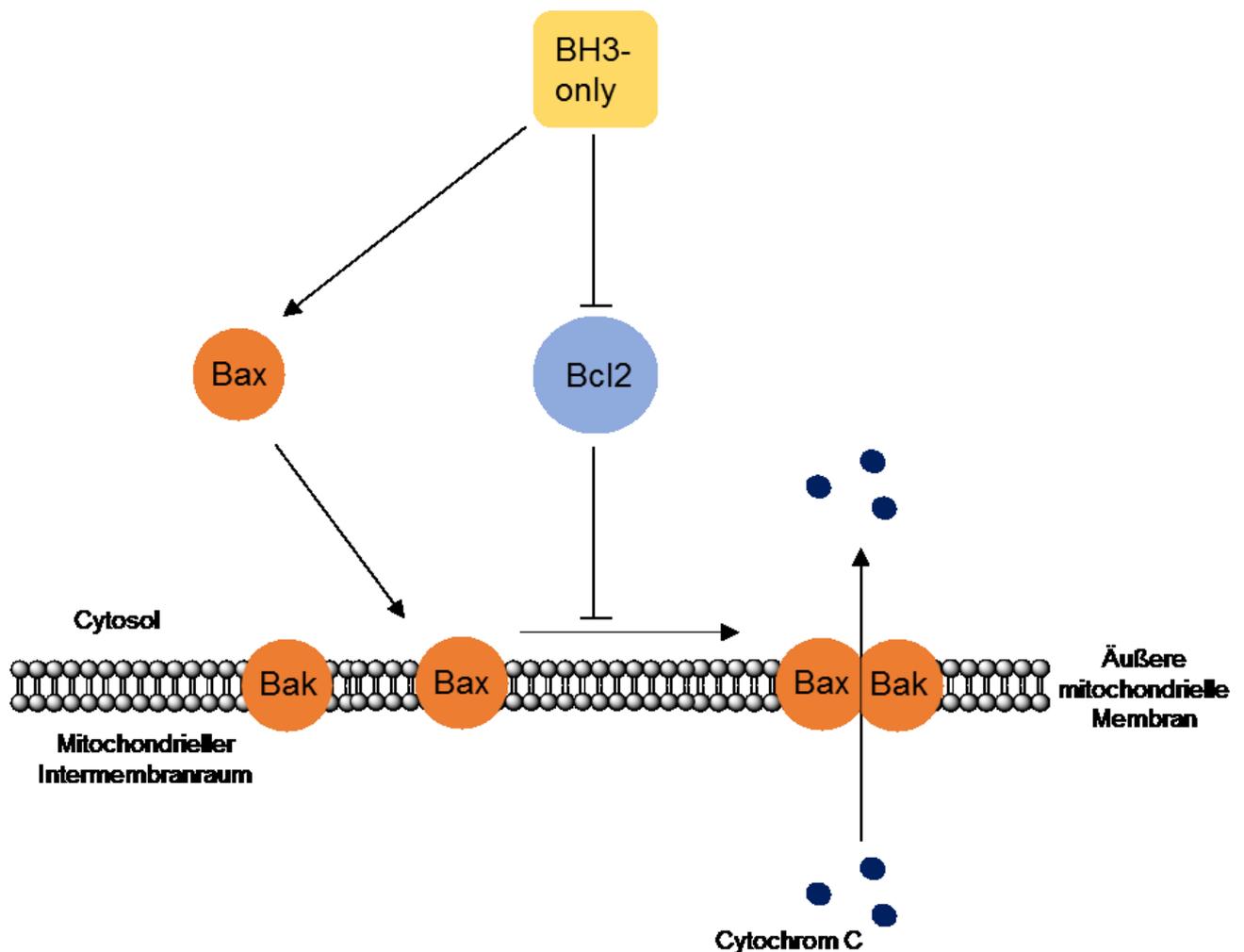


Abbildung 7: Schematische Darstellung der MOMP durch Bcl2-Proteine. Modifiziert nach [138].

1.5.1 Die BH3only-Proteine Noxa und Puma

Humanes Noxa ist ein Protein, welches aus 54 Aminosäuren besteht und neben der BH3-Domäne noch eine *mitochondrial target domain* (MTD) besitzt [139, 140]. Nach aktuellem Stand der Forschung existieren zwei weitere *splicing*-Varianten des Gens, jedoch enthalten beide keine BH3-Domäne und deren konkrete Funktion ist noch nicht aufgeklärt [141]. Der relevanteste Induktor von Noxa ist p53. Analyse der Promotorregion von *Noxa* zeigte eine p53-Bindestelle 196 Basenpaare vor dem Startpunkt der Transkription [139, 140]. Des Weiteren konnte in diversen Zelllinien nach Behandlung mit Strahlung oder DNA-schädigenden Agentien eine p53-abhängige Induktion von Noxa beobachtet werden [139, 142-144]. Nichtsdestotrotz wurden bisher auch andere, p53-unabhängige Induktionswege beobachtet. *Hypoxia-inducible factor 1α* (HIF1α) induziert Noxa in H719 und Saos-2-Zellen durch Interaktion

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

mit einem HIF1 α -Bindeelement in der Promotorregion von *Noxa* [145]. Auch die Überexpression des Adenovirusproteins E1A in den Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y (nicht-funktionelles p53) und SaOS-2 führt durch Aktivierung von p73 zu einer Induktion von *Noxa* [146]. Die Promotorregion von *Noxa* enthält zudem ein responsives Element für cyclisches Adenosinmonophosphat. Dementsprechend kann nach Induktion durch Wasserstoffperoxid der aktivierende Transkriptionsfaktor 4 (ATF4) binden und *Noxa* induzieren [147]. Des Weiteren konnte ein *forkhead box protein O* (FoxO)-Bindeelement in der Promotorregion von *Noxa* festgestellt werden, nachdem Jurkat-Zellen mit α -Tocopherylsuccinat behandelt wurden und daraufhin eine FoxO1-abhängige Induktion von *Noxa* beobachtet wurde [148]. Auf posttranslationaler Ebene konnten Ubiquitylierung und Phosphorylierung als relevante Regulations-mechanismen identifiziert werden. Ubiquityliertes *Noxa* konnte in HEK293T-Zellen sowohl mit als auch ohne Inhibition des Proteasoms durch MG132 festgestellt werden [149]. Gleichzeitig konnte bisher jedoch keine spezifische E3-Ubiquitinligase gefunden werden [138]. Eine Phosphorylierung von *Noxa* konnte an Ser13 durch CDK5 nachgewiesen werden [150]. Nach erfolgter Phosphorylierung zeigt *Noxa* keine pro-apoptotische Funktion mehr, da die Bindung an *induced myeloid leukemia cell differentiation protein* (Mcl1) unterbunden wird [151]. Jedoch ist die physiologische Relevanz dieser Phosphorylierungsstelle aufgrund mangelhafter Datenlage zum aktuellen Zeitpunkt zweifelhaft [138]. Intrazellulär lokalisiert *Noxa* an den Mitochondrien und bindet hier mehr oder weniger spezifisch die antiapoptotischen Proteine Mcl1 und A1. Die Spezifität dieser Bindung wird durch Schlüsselaminosäuren innerhalb der BH3-Domäne von *Noxa* verursacht. Durch genetische Alteration der Aminosäuren oder spezielle Versuchsbedingungen, die Mcl-1 degradieren, können andere Bcl2-Familienmitglieder gebunden werden oder die pro-apoptotische Funktion von *Noxa* gänzlich ausgeschaltet werden [139, 140, 152-155]. Es existieren verschiedene Studien, die die pro-apoptotische Funktion von *Noxa* unterstreichen. Jedoch existieren andererseits auch Studien, die Evidenz dafür liefern, dass eine alleinige Induktion oder Überexpression von *Noxa* nicht ausreichend ist, um Apoptose zu induzieren [152, 156, 157]. Dies scheint auf die beschriebene Spezifität der Bindefähigkeit von *Noxa* zurückzuführen zu sein, da eine Überexpression von *Noxa* und Bad, welches Bcl2, Bcl-xL und Bcl-W bindet, zu einer starken Induktion von Apoptose führt [156, 158].

Puma wird in vier verschiedenen Isoformen exprimiert (α - δ), wobei nur die α - und β -Form eine BH3-Domäne enthalten und somit pro-apoptotisch aktiv sind. Puma induziert Apoptose in hochgradig effizienter Art und Weise und es wird angenommen, dass Puma eines der am effektivsten wirkenden BH3*only* Proteine ist. Das *Puma*-Gen ist auf Chromosom 19q13.3 lokalisiert, eine Region, die in humanen Krebsarten einer Deletion unterliegt [159]. Intrazellulär ist Puma größtenteils an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert [160]. *Puma* wird meist als direktes Zielgen des Tumorsuppressors p53 beschrieben, jedoch existieren auch p53-unabhängige Regulationsmechanismen [161]. Die p53-abhängige Induktion von Puma stellt einen effizienten Mechanismus zur Inhibition von Wachstum und Teilung veränderter Zellen dar und spielt somit eine wichtige Rolle in der Prävention von Krebs. Fehlende Induktion von Puma ist häufig mit einer p53-Mutation assoziiert, welche in ca. 50% aller humanen Krebserkrankungen vorliegt. p53 induziert Puma in direkter Art und Weise nach DNA-Schädigung, oxidativem Stress, Hypoxie, Defizienz von Wachstumsfaktoren oder viraler Infektion [162]. Die Induktion von Puma durch p53 ist abhängig von *glycogen synthase kinase-3* (GSK3) und der Acetyltransferase Tip60 (syn.: KAT5). GSK3 phosphoryliert Tip60, welche daraufhin p53 an Lys120 acetyliert und damit einen Kontrollpunkt von p53 zwischen Zellzyklusarrest und Apoptose darstellt [163]. p53-unabhängige Regulation von Puma spielt insgesamt eine eher untergeordnete Rolle, jedoch wird Puma nach Ischämien und anschließender Reperfusion p53-unabhängig durch p73, E2F1 und den ER-Stress spezifischen Transkriptionsfaktor *C/EPB homologous protein* (CHOP) [81] induziert [164-166]. Der konkrete Mechanismus hinter diesem Vorgang ist noch nicht zur Gänze aufgeklärt, jedoch deutet die Beteiligung von CHOP auf eine ER-vermittelte Form der Apoptose hin [167, 168]. Mögliche posttranslationale Modifikationen von Puma sind zum aktuellen Zeitpunkt wenig untersucht. Bisher konnten einige verschiedene Phosphorylierungsstellen von Puma nachgewiesen werden, wobei Ser10 die relevanteste zu sein scheint [169]. Phosphorylierung an dieser Stelle verringert die intrazelluläre Halbwertszeit und ein Austausch von Serin gegen Alanin wiederum revertiert diesen Effekt. Dementsprechend scheint die Phosphorylierung von Puma an Ser10, ähnlich der Phosphorylierung von Noxa an Ser13, vor den pro-apoptotischen Effekten zu schützen und ein Überleben der Zelle zu begünstigen [169].

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

1.5.2 Das BH3only Protein Bim

Auch Bim gehört zur Gruppe der BH3only-Proteine und spielt eine Rolle in der Induktion von Apoptose. Als BH3only-Protein erfüllt Bim in der Apoptosekaskade eine deckungsgleiche Aufgabe wie Puma und Noxa, d.h. die Inhibition der anti-apoptotischen Bcl2-Proteine. Im Gegensatz zu Puma und Noxa wird Bim jedoch nicht direkt auf transkriptioneller Ebene durch p53 aktiviert. Bim wird in diversen *splicing*-Varianten exprimiert, von denen Bim_{EL}, Bim_L und Bim_S die bekanntesten und am besten beschriebenen sind. Die verschiedenen Varianten unterscheiden sich anhand der exprimierten Exons. Bim_{EL} enthält Exon 2-6, Bim_L enthält Exon 2,4,5 und 6 und Bim_S enthält nur 2,5 und 6 [170]. Exon 2 und 6 stellen jeweils das N- bzw. C-terminale Ende des Proteins dar, wobei Exon 6 einen hydrophoben Teil zur Bindung an die mitochondrielle Membran enthält [170]. Exon 3 enthält eine *extracellular signal related kinase* (ERK)-Bindestelle, sowie verschiedene Stellen zur posttranslationalen Phosphorylierung durch ERK [171, 172]. Exon 4 enthält ein Bindemotif für *Dynein light-chain 1* (DLC1), sowie verschiedene Phosphorylierungsstellen für *c-Jun-N-terminal kinase* (JNK) [173, 174]. Exon 5 stellt die BH3-Domäne von Bim dar [170].

Auf transkriptioneller Ebene ist FoxO3A klar als der Transkriptionsfaktor bestätigt, der Bim vor allem nach Cytokinentzug und Behandlung mit diversen Chemotherapeutika induziert [175-177]. Außerdem wurden *Nuclear factor erythroid-derived 2* (Nrf2), c-Myc, E2F1 und Smad3 in einzelnen Studien als weitere relevante Transkriptionsfaktoren identifiziert [178-181]. Jedoch wird von den genannten Isoformen nur Bim_S rein transkriptionell reguliert. Bim_{EL} und Bim_L werden hauptsächlich über das in Exon 4 befindliche Bindemotif für DLC1 posttranslational reguliert. Zudem existieren verschiedene Phosphorylierungsstellen innerhalb des Proteins, welche die pro-apoptotische Aktivität von Bim regulieren. Phosphorylierung von Bim_{EL} an Ser69 durch ERK1/2 markiert dieses für den proteasomalen Abbau und inhibiert so dessen pro-apoptotische Wirkung [182]. Nachfolgende Ubiquitylierung erfolgt an Lys3 und Lys112 durch die E3-Ubiquitin-Ligase c-Cbl, wobei dies nicht die einzig relevante Ligase zu sein scheint [183]. Des Weiteren unterbindet die Phosphorylierung von Bim_{EL} durch ERK1/2 die Interaktion von Bim mit Bax. Bim zeigt unterstützende Wirkung bei der Oligomerisierung von Bax, welche durch Phosphorylierung an Ser59, Ser 69 und Ser104 unterbunden wird [184]. Die dargestellten Phosphorylierungsmechanismen durch ERK1/2 inhibieren Bim_{EL} effektiv, was die reduzierte Effektivität in Zelltodassays erklären kann [185]. Jedoch werden die

anderen Bim-Isoformen hiervon nicht beeinflusst, da in diesen das Exon 3, welches die betreffenden Phosphorylierungsstellen enthält, nicht exprimiert wird. JNK potenziert im Gegensatz zu ERK die proapoptotische Aktivität von Bim durch Phosphorylierung derselben Aminosäurereste [186]. Dies erscheint kontraintuitiv und die konkreten Mechanismen dieser deckungsgleichen Phosphorylierungsstellen sind noch Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion. Vermutet wird aktuell, dass Ser69 als Phosphorylierungsstelle für ERK und JNK dienen, jedoch verschiedene andere Phosphorylierungsstellen, die von den jeweiligen Kinasen spezifisch bedient werden, für den letztendlichen Effekt der Phosphorylierung sorgen. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Phosphorylierung an Ser59/69/104, phosphoryliert JNK neben Ser69 noch Thr112, was zur Dissoziation von Bim von den Mikrotubuli führt, so dass dieses im Weiteren seine pro-apoptotische Aktivität entfalten kann [187].

1.5.3 Der pro-apoptotische Effektor Bax

Im Gegensatz zu den drei vorgenannten Bcl2-Proteinen, die alle *BH3only*-Proteine sind, ist Bax ein proapoptotischer Effektor und enthält insofern die BH-Domänen 1-3. Bax liegt in einem Gleichgewicht zwischen zytosolisch löslicher und mitochondrial gebundener Form vor, welches sich in Zellen ohne Stresstimulus stark auf Seiten der zytosolischen Form befindet und durch Bcl-xL vermittelt wird [188]. In der inaktiven, zytosolischen Form ist Bax ein globuläres Protein, in dem ein hydrophober Kern von fünf α -Helices maskiert wird. Dieser Kern enthält die hydrophoben Helices $\alpha 2$ - $\alpha 5$, als auch die C-terminale Transmembrandomäne von Helix $\alpha 9$ [189]. Nach Bindung eines *BH3only* Aktivators erfolgt eine Konformationsänderung, so dass die Transmembrandomäne den hydrophoben Kern verlässt und nun eine Bindung an die äußere mitochondrielle Membran möglich ist. Nach Membranbindung erfolgt eine weitere Konformationsänderung, wodurch die Helices $\alpha 2$ - $\alpha 5$ als Dimerisierungsdomäne freigelegt werden [190-192]. Das gebundene *BH3only* Protein dissoziiert und nachfolgend erfolgt die Dimerisierung von zwei Bax Molekülen [193]. Eine weitere Konformationsänderung sorgt nun letztendlich durch Insertion der beiden hydrophoben Dimerisierungsdomänen in die Membran und Oligomerisierung der Dimere für die Bildung eines Porenkomplexes [194]. Es kommt anschließend zum Ausstrom von Cytochrom c und der Einleitung der Apoptose. Der betreffende Signalweg ist in 1.3.2 genau beschrieben.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

ME ist ein sekundärer Pflanzeninhaltsstoff, der quasi ubiquitär in der Nahrung vorkommt [6]. Studien aus den 1980er Jahren haben ME klar als Nagerkanzerogen identifiziert [7, 17]. Neuere Untersuchungen haben DNA-Addukte in humanen Leberbiopsien nachgewiesen und damit die Humanrelevanz von ME untermauert [10]. Trotz der offensichtlichen Relevanz der Substanz sind die Effekte auf zellulärer Ebene, die der Adduktbildung nachfolgen bisher unzureichend untersucht. Unsere Arbeitsgruppe hat es sich zur Aufgabe gemacht, genau diese zellulären Effekte aufzuklären. Hierzu wurden bereits im Vorfeld der vorliegenden Dissertation Untersuchungen zur Relevanz der apikalen Kinasen der DDR durchgeführt und p53 als zentrales Protein der induzierten Effekte identifiziert. Die beschriebenen Ergebnisse sind in der Dissertationsschrift von Frau Dr. Anastasia Sophie Vollmer zu finden [195].

Ziel der nun vorliegenden Arbeit ist es, die Rolle von p53 als zentrales Protein der zellulären Antwort genauer zu charakterisieren und den Mechanismus der induzierten apoptotischen Effekte aufzuklären. Die Rolle von p53 wurde mittels siRNA-vermitteltem, transienten Knockdown, sowie unter Verwendung pharmakologischer Inhibitoren untersucht. Zur Aufklärung des apoptotischen Mechanismus wurden die Effekte von OHME auf p53-nachgeschaltete Ziele untersucht. Hierzu wurden quantitative PCR (qPCR), Western Blot, Immunfluoreszenz, sowie durchflusszytometrische Verfahren verwendet. Ein zweites Augenmerk dieser Arbeit liegt auf einer möglichen Reparatur der Addukte von ME. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde die Adduktbildung massenspektrometrisch untersucht. Des Weiteren sollten die in der Arbeitsgruppe vorhandenen zellulären Systeme um primäre murine Hepatozyten (pMH) als weiteres Testsystem erweitert werden. Nach Etablierung der Gewinnung der Hepatozyten konnten diese in verschiedenen Versuchen im Kontext von ME verwendet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte

| | Hersteller | Bezeichnung |
|-------------------------|---|----------------------------|
| Absaugpumpe | KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland | Laboport N96-KT18 |
| Absaugpumpe | IBS Integra Bioscience, Fernwald, Deutschland | Vacusafe |
| Brutschrank | Binder, Tuttlingen, Deutschland | CB-210 |
| Brutschrank | Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA | HERACell240i |
| Brutschrank | Eppendorf, Hamburg, Deutschland | CellXpert |
| Chemilumineszenz-Imager | Azure Biosystems Inc., Kalifornien, USA | c300 |
| Durchflusszytometer | Becton Dickinson, New Jersey, USA | FACSCanto II |
| Durchlichtmikroskop | Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland | Axiovert 25 |
| Durchlichtmikroskop | Leica, Wetzlar, Deutschland | DMi1 |
| Elektrophoresekammer | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland | Mini-PROTEAN Tetra Cell |

2. Material und Methoden

| | | |
|--|---|--|
| Feinwaage | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland | CPA224S |
| Fluoreszenzplattenphotometer | Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA | Fluoroskan Ascent FL |
| Geldokumentationssystem | Bio-Rad Laboratories GmbH, München | GelDoc XR+ |
| Immunfluoreszenz- Mikroskop, inkl. Kamera und LED-Quelle | Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland | Axio Observer, AxioCam 305 mono, Colibri 5 |
| Kolbenhubpipetten | Brand, Wertheim, Deutschland | Transferpette S Starter-Kit Midi |
| Konfokales laser scanning Mikroskop | Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland | LSM 900 |
| Mikrotiterplatten-Photometer | MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland | Sirius HT Injector |
| Peristaltikpumpe | Ismatec, Glattsbrugg- Zürich, Schweiz | Schlauchpumpe BVP |
| Pipettierhilfe | IBS Integra Bioscience, Fernwald, Deutschland | Pipetboy acu 2 |
| Rollinkubator | LLG Labware | LLG-uniRoller 6 |
| Spannungsquelle | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland | PowerPac Basic |

| | | |
|-------------------|---|----------------------------|
| Sterilbank | Kojair, Tampere, Finnland | KR-130 BW |
| Sterilbank | Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA | MSC Advantage 1.8 |
| Sterilbank | BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl- Genkingen, Deutschland | UVF-6.12S |
| Thermoschüttler | CellMedia, Zeitz, Deutschland | TS pro |
| Tischzentrifuge | Sunlab instruments, Mannheim, Deutschland | SU1550 |
| Überkopfschüttler | LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland | Intelli-Mixer RM-2L |
| Vakuumpzentrifuge | Eppendorf, Hamburg, Deutschland | Concentrator plus |
| Vortexer | Bioblock Scientific | Agitateur Top-Mix 11118 |
| Waage | Ohaus, New Jersey, USA | Scout |
| Wasserbad | Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland | EC |
| Wasserbad | Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, | Thermostat T MA 6 |

2. Material und Methoden

| | | |
|-----------------|--|----------------------|
| | Lauda-Königshofen, Deutschland | |
| Wasserbad | Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland | 1083 |
| Wet Blot System | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland | Mini Trans-Blot Cell |
| Wippschüttler | Labnet International | Rocker 35 EZ |
| Zentrifuge | Eppendorf, Hamburg, Deutschland | Centrifuge 5417 R |
| Zentrifuge | Eppendorf, Hamburg, Deutschland | Centrifuge 5804 R |
| Zentrifuge | Heraeus, Hanau, Deutschland | Megafuge 1.0 R |
| Zentrifuge | Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA | Biofuge fresco |

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

| | Größe | Hersteller |
|----------------|-------|--|
| 24-Well Platte | | Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland |
| 48-Well platte | | Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland |

| | | |
|----------------------------|----------------------|---|
| 6-Well Platte | | Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland |
| 96-half-Well Platte (weiß) | | Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland |
| 96-Well-Platte | | Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland |
| Autoklavierbeutel | | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Deckgläschen | 20 x 20 mm | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| FACS-Röhrchen | 5 ml, 75 x 12 mm, PS | Sarstedt AG & Co. KG, Numbrecht, Deutschland |
| Falcons | 50 ml | Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland |
| Falcons | 15 ml | Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland |
| Glaswaren | diverse | Schott, Mainz, Deutschland |
| Injektionsnadeln | versch. Größen | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland |
| Injektionsspritzen | versch. Größen | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland |
| Neubauer Zählkammer | | Marienfeld Superior, Lauda- Konigshofen, Deutschland |
| Objektträger | 76 x 26 mm | Diagonal GmbH & Co. KG, Munster, Deutschland |

2. Material und Methoden

| | | |
|--|----------------|---|
| Pipettenspitzen TipOne (Stecksystem) | | StarLab, Hamburg, Deutschland |
| Protran Nitrozellulose Membran 0,2 µm | | GE Healthcare Life Sciences, München, Deutschland |
| Safe-Lock Reaktionsgefäße | 0,5; 1,5; 2 ml | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Whatman 3MM Filterpapier | | GE Healthcare Life Sciences, München, Deutschland |
| Zellkulturflasche | 75 ml | Sarstedt AG & Co. KG, Numbrecht, Deutschland |
| Zellkulturschale | 35 mm | Sarstedt AG & Co. KG, Numbrecht, Deutschland |
| Zellkulturschale | 60 mm | Sarstedt AG & Co. KG, Numbrecht, Deutschland |
| Zellkulturschale | 100 mm | Sarstedt AG & Co. KG, Numbrecht, Deutschland |

2.3 Chemikalien und kommerzielle Lösungen

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und kommerziell erhältliche Lösungen

| Chemikalie/Lösung | Hersteller |
|---|--|
| ¹⁵ N-2'-Desoxyguanosin | Silantes GmbH, München, Deutschland |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| 2-Mercaptoethanol | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |

| | |
|--|--|
| 2'-Desoxyguanosin | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Ammoniumacetat | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Bromphenolblau | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Calciumchlorid | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| CaspaseGlo® 3/7-Assay | Promega, Madison, Wisconsin, USA |
| Chloroform | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Coomassie Brilliant Blue G250 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Dimethylformamid | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Dinatriumsuccinat-Hexahydrat | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Dulbeccos modified Eagles Medium high glucose (DMEM HG) | Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA |

2. Material und Methoden

| | |
|---|--|
| Dulbeccos modified Eagles Medium low glucose (DMEM LG) | Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA |
| Essigsäure (100 %) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethanol p.a. | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethanol, technisch | als Bulkware über Chemikalienausgabe der RPTU Kaiserslautern |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Extracta DNA Prep for PCR-Tissue | QuantaBio, Beverly, Massachusetts, USA |
| Fötale Kälberserum (FKS) | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Gentamycin | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Glycerin | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Isoamylalkohol | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Isopropanol | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |

| | |
|---|--|
| Kollagenase aus <i>Clostridium histolyticum</i> | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| L-Glycin | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Lipofectamin RNAiMAX | Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA |
| Luminol | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Magermilchpulver | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Magnesiumchlorid • Hexahydrat | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Methanol | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Midori Green Advance DNA Stain | Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Deutschland |
| Natriumchlorid | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumdesoxychololat | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumdodecylsulfat (SDS), Pellets | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumfluorid | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Natriumhydroxid | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |

2. Material und Methoden

| | |
|--|--|
| Natriumselenit | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Natriumvanadat | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Nonidet P-40 (NP-40) | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| PageRuler Plus Prestained Protein Ladder | Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA |
| Paraformaldehyd (PFA) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| PBS-Fertigpulver (DPBS) | PanBiotech, Aidenbach, Deutschland |
| p-Cumarsäure | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Penicillin/Strptomycin (x100, PS) | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Percoll | GE Healthcare Life Sciences, München, Deutschland |
| Phenylmethylsulfonylfluorid | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Phosphorsäure (85 %) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Ponceau S | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Proteaseinhibitorcocktail cOmplete, EDTA-frei | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland |

| | |
|---|--|
| Proteinase K | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland |
| Rattenschwanzkollagen I | Corning Inc., New York, USA |
| Resazurin (Natriumsalz) | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Ribonuklease A (RNase A), DNase- und Protease frei | Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA |
| ROTI®Phenol | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Salzsäure (37 %) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| siGENOME non-targeting siRNA (scrRNA) | Dharmacon Inc., Lafayette, Colorado, USA |
| siGENOME SMARTPool Human TP53 siRNA | Dharmacon Inc., Lafayette, Colorado, USA |
| Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Triton-X-100 | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Tween 20 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |

2. Material und Methoden

| | |
|--|---|
| VectaShield Eindeckmedium mit DAPI | Linaris Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, Deutschland |
| Wasserstoffperoxid 30 % | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Western Lightning Enhanced Luminol Reagent Plus | Perkin Elmer, Waltham, USA |
| Western Lightning Oxidizing Reagent Plus | Perkin Elmer, Waltham, USA |

2.4 Puffer und Lösungen

Einfache Lösungen aus Substanz X in Wasser sind an dieser Stelle nicht genauer spezifiziert, wenn nicht anders angegeben wurden alle einfachen Lösungen in ddH₂O angesetzt und falls notwendig autoklaviert oder sterilfiltriert.

Tabelle 6: Angesetzte Puffer und Lösungen

| Puffer /Lösung | Zusammensetzung |
|-------------------------------|---|
| 10x AnnexinV-FITC-Bindepuffer | 100 mM HEPES, pH 7,4 1400°mM NaCl 25 mM CaCl ₂ 1 %BSA |
| 10X Lauf-/ Blotting-Puffer | 200 mM TRIS 1,54 M L-Glycin |
| 10X TBS | 100 mM TRIS |

| | |
|--------------------|-------------------------------------|
| | 1,5 M NaCl |
| | pH 7,6 |
| 1x Blotting Puffer | 200 ml 10x Lauf-/ Blotting-Puffer |
| | 400 ml Methanol |
| | ad 2000 ml ddH ₂ O |
| 1x Laufpuffer | 200 ml Lauf-/ Blotting-Puffer |
| | 20 ml SDS (10 %) |
| | ad 2000 ml ddH ₂ O |
| 1x TBS-T | 200 ml 10x TBS |
| | 1 ml Tween 20 |
| | ad 2000 ml ddH ₂ O |
| 5x Laemmli-puffer | 200 mM TRIS-HCl, pH 6,8 |
| | 8 % SDS |
| | 40 % Glycerin |
| | 0,08 % Bromphenolblau |
| | 4 % 2-Mercaptoethanol |
| Blockierlösung | 5 % Magermilchpulver in 1x TBS-T |
| Bradfordreagenz | 10 mg Coomassie Brilliant Blue G250 |

2. Material und Methoden

| | |
|--------------------------------------|--|
| | 5 ml EtOH |
| | 10 ml Phosphorsäure (85 %) |
| | ad 100 ml ddH ₂ O |
| ECL Puffer A | 4,4 ml ddH ₂ O |
| | 500 µl 1 M TRIS-HCl pH 9 |
| | 50 µl 250 mM Luminol |
| | 22 µl 90 mM p-Cumarsäure |
| ECL Puffer B | 4,5 ml ddH ₂ O |
| | 500 µl 1 M TRIS-HCl, pH 9 |
| | 50 µl 30 % H ₂ O ₂ |
| Extraktionslösung 1 (DNA-Extraktion) | 25 ml RotiPhenol |
| | 24 ml Chloroform |
| | 1 ml Isoamylalkohol |
| Extraktionslösung 2 (DNA-Extraktion) | 24 ml Chloroform |
| | 1 ml Isoamylalkohol |
| Gesamtzelllysepuffer | 375 µl 1 M TRIS-HCl pH 8 |
| | 750 µl 100 mM EDTA |
| | 75 µl NP-40-Lösung (10%) |
| | 1,5 ml 5 M NaCl |

11 ml ddH₂O

Frischzugeben je 1 ml fertigen Puffer:

10 µl 100 mM PMSF

2 µl 1 M DTT

5 µl 200 mM Na₂VO₄

2 µl 1 M NaF

20 µl 50x Complete Protease Inhibitor

Kollagenlösung

Rattenschwanzkollagen I,
Konzentration variiert je nach Batch,
verdünnt auf 50 µg/ml mit 0,1 M
Essigsäure

Lysepuffer (DNA-Extraktion)

100 ml TAE-Puffer

10 ml SDS-Lösung (10%)

5 ml Triton-X-100-Lösung (10 %)

NaCl/Pi-Puffer

0,144 g KH₂PO₄

9,0 g NaCl

0,595 g Na₂HPO₄ x H₂O

ad 1 l ddH₂O

Pentobarbitallösung

50 mg/ml, erstellt nach [196]

2. Material und Methoden

| | |
|------------------------------|---|
| Perfusionsmedium I | 500 ml <i>Hanks balanced salt solution</i> (HBSS) 5 ml 1 M HEPES 500 µl 100 mM EGTA |
| Perfusionsmedium II | 500 ml DMEM LG 5 ml HEPES |
| Perfusionspuffer-Stamm (10x) | 81,82 g NaCl 3,73 g KCl 1,63 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O 2,85 g Na ₂ HPO ₄ 0,544 g KH ₂ PO ₄ ad 1000 ml mit dd H ₂ O; pH 7,4 |
| Ponceau S-Lösung | 5 % Essigsäure 0,1 % Ponceau S |
| Resazurinmedium | Resazurinpuffer: Zellkulturmedium ohne Zusätze, 1:10 |
| Resazurinpuffer | Resazurinstock: NaCl/Pi-Puffer, 1:1000 |

| | |
|-----------------|--|
| Resazurinstock | 11 mg Resazurin in 100 μ l Dimethylformamid |
| RIPA-Lysepuffer | 1,25 ml 1 M TRIS-HCl pH 8,0 1,5 ml 5 M NaCl 500 μ l NP40 2,5 ml 10 %ig Na-Desoxycholat 50 μ l 10 % SDS 400 μ l 0,25 M EDTA Frischzugeben je 1 ml fertigen Puffer: 10 μ l 100 mM PMSF 5 μ l 200 mM Na ₂ VO ₄ 2 μ l 1 M NaF 20 μ l 50x Complete Protease Inhibitor |
| Strip-Puffer A | 0,2 M L-Glycin 0,5 M NaCl pH 2,0 |
| Strip-Puffer B | 0,5 M TRIS-HCl pH 11,0 |
| Succinatpuffer | 6,75 g Dinatriumsuccinat-Hexahydrat 1,84 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O |

2. Material und Methoden

ad 250 ml mit ddH₂O, pH 6,0

TAE-Puffer

4,844 g TRIS

186 mg Na₂EDTA

1,144 ml Essigsäure

ad 1000 ml, pH 8,3

Waschpuffer (Perfusion)

500 ml DMEM LG ohne Phenolrot

3,5 ml BSA (30 %)

5 ml 1 M HEPES

5 ml PS

2.5. verwendete Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Antikörper

| Antikörper | Katalognummer | Hersteller |
|--|---------------|--|
| Anti-p53 (1C12), monoclonal mouse | 2524 | Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA |
| Anti-p53 (DO1), monoclonal mouse | sc-126 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany |
| Anti-p21 (C19), polyclonal rabbit | sc-397 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany |
| Anti-p21 (F-5), monoclonal mouse | sc-6246 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany |
| Anti-Hsp90 α/β , monoclonal mouse | sc-13119 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany |

| | | |
|--|-----------|--|
| Anti-cleaved Caspase 3, monoclonal rabbit | 9661 | Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA |
| Anti-cleaved Caspase 9, monoclonal rabbit | 7237 | Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA |
| Anti-SULT1A1, polyclonal rabbit | GTX55811 | Genetex, Irvine, California, USA |
| Anti-SULT1C2, polyclonal rabbit | ab243329 | Abcam, Cambridge, UK |
| Anti-γH2AX(Ser139), monoclonal rabbit | ab11174 | Abcam, Cambridge, UK |
| Anti-Bim (C3435), monoclonal rabbit | 2933 | Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA |
| Anti-Cytochrom c (6H2.B4), monoclonal mouse | 12963 | Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA |
| Anti-Bax (2D2), monoclonal mouse | 89477 | Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA |
| Goat-anti-Mouse -HRP (IgGk binding protein) | sc-516102 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany |
| Goat-anti-Rabbit-HRP | cs7074S | Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA |
| Goat-anti-Mouse-Alexa488 | #A48286 | Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA |
| Goat-anti-Rabbit-Alexa488 | #A11008 | Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA |

2.6 Verwendete Primer

Tabelle 8 Verwendete Primer.

2. Material und Methoden

| Zielgen | Forward Primer (5'-3') | Reverse primer (5'- 3') |
|-----------------|------------------------|-------------------------|
| <i>BAX</i> | CAGAAGGCACTAATCAAG | ATCAGATGTGGTCTATAATG |
| <i>BCL2</i> | TTCAGAGACAGCCAGGAGAAA | AGTACCTGAACCGGCACCT |
| <i>c-IAP1</i> | TTCCCAGGTCCCTCGTATCA | CCGGCGGGGAAAGTTGAATA |
| <i>c-IAP2</i> | TCACTCCCAGACTCTTTCCA | CCCCGTGTTCTACAAGTGTC |
| <i>FASR</i> | AGAACTTGGAAGGCCTGCAT | CTGGTTCATCCCCATTGACT |
| <i>GAPDH</i> | CATGAGAAGTATGACAACAG | ATGAGTCCTTCCACGAT |
| <i>MDM2</i> | ATCTTGATGCTGGTGTA | AGGCTATAATCTTCTGAGTC |
| <i>NOXA</i> | ACACGGTGGACGTCCTGT | ACGAAGCACTTGGGGAAGAT |
| <i>p21</i> | TACATCTTCTGCCTTAGT | TCTTAGGAACCTCTCATT |
| <i>PUMA</i> | GACGACCTCAACGCACAGTA | CTGGGTAAGGGCAGGAGTC |
| <i>Survivin</i> | ATGACTTGTGTGTGATGA | GTTTGTGCTATTCTGTGAA |

2.7 Verwendete Zelllinien

Tabelle 9 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zelllinien.

| Zelllinie | Mediumzusammensetzung | Quelle |
|--|--|--|
| HepG2 | DMEM HG, 10 % FKS, 1 % PS | Leibniz-Institut DSMZ, Braunschweig |
| HepG2 (Parentallinie für <i>Bim</i> ^{-/-}) | DMEM HG, 10 % FKS, 20 µg/ml Gentamycin | AG Prof. Dr. Thomas Brunner, Konstanz |
| HepG2 <i>Bim</i> ^{-/-} | DMEM HG, 10 % FKS, 20 µg/ml Gentamycin | AG Prof. Dr. Thomas Brunner, Konstanz |
| V79 | DMEM-Ham's F12, 5 % FKS, 1 % PS | Dr. Hansruedi Glatt, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke |
| V79 CS | DMEM-Ham's F12, 5 % FKS, 1 % PS | Dr. Hansruedi Glatt, Deutsches Institut für |

| | | |
|---------------------------|--------------------------|---|
| Hep3B | DMEM HG,10 % FKS, 1 % PS | Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke AG Prof. Dr. Elke Roeb, Justus liebige Universität, Gießen |
| HCT116-p53 ^{+/+} | DMEM HG,10 % FKS, 1 % PS | Dr. Bert Vogelstein, John Hopkins University, Baltimore, USA |
| HCT116 p53 ^{-/-} | DMEM HG,10 % FKS, 1 % PS | Dr. Bert Vogelstein, John Hopkins University, Baltimore, USA |

2.8 Kultivierung von HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 97 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Medium wurde DMEM HG mit 10 % FKS und 1 % PS verwendet. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert und dann passagiert. Passage der Zellen erfolgte zwei Mal pro Woche. Nach ca. 20 Passagen wurde eine Kultur verworfen und neu aufgetaut. Langfristige Lagerung der HepG2-Kulturen erfolgte als Kryostocks in flüssigem Stickstoff. Hier wurde das Kulturmedium zusätzlich mit 10 % DMSO versetzt. Zusätzlich zu den bereits im Arbeitskreis vorhandenen HepG2, konnte eine HepG2-Linie mit Bim-Knockout, inkl. des korrespondierenden Wildtyps von der AG Brunner der Universität Konstanz bezogen werden. Die Kultivierung erfolgte analog, jedoch wurde im Medium 20 µg/ml Gentamycin anstatt 1 % PS verwendet. Prüfung auf Kontamination mit Mykoplasmen erfolgte in regelmäßigen Abständen mittels PCR durch Frau Melanie Abel-Beckmann. Alle Lösungen die zur Zellkultur verwendet wurden, wurden auf 37 °C vorgewärmt.

Zum Passagieren wurde das Medium vom Zellrasen abgenommen, mit PBS gewaschen und 1 ml 1x Trypsin auf den Rasen gegeben. Die Kulturen wurden für wenige Minuten bei 37 °C inkubiert, bis die Zellen sich vom Flaschenboden abgelöst hatten. Die Trypsinreaktion wurde mit 9 ml Medium abgestoppt und die Zellsuspension mehrfach resuspendiert, um die Zellen zu vereinzeln. Eine adäquate Menge der

2. Material und Methoden

Zellsuspension wurde als Erhaltungskultur weitergeführt (Verdünnung 1:4-5), die restliche Suspension wurde für Versuche eingesetzt. Hierzu wurde die Zellkonzentration mit Medium eingestellt und die Suspension in Kulturschalen/Wellplatten gegeben. Verwendete Zelldichten sind in Tabelle 10 dargestellt. Wenn nicht anders angegeben wurden für alle Versuche die angegebenen Zelldichten verwendet.

Tabelle 10: Verwendete Zellzahlen in HepG2.

| Kulturgefäß | Zellzahl | Inkubationszeiten |
|-------------|----------|-------------------|
| 96-Well | 15000 | 72h |
| 96-Well | 30000 | 48h |
| 96-Well | 45000 | 24h |
| 6-Well | 300000 | 72h |
| 3,5cm | 1000000 | 24h |
| 3,5cm | 500000 | 48h |
| 96-Halfwell | 10000 | 24h |

Nach Versuchsaussaat wurden die Zellen 24 h anwachsen gelassen, dann erfolgte ein Mediumwechsel und der Start der Inkubation mit den Versuchssubstanzen. Wenn nicht anders angegeben wurden die Substanzen in DMSO gelöst und aus Stocks mit 1000-facher Endkonzentration verdünnt, so dass in jeder Inkubation eine maximale DMSO-Konzentration von 0,1 % entstand. In Koinkubationen mit verschiedenen Substanzen wurde die DMSO-Konzentration in der Negativkontrolle an die höchste Konzentration in den anderen Inkubationen angepasst.

2.9 Isolation primärer muriner Hepatozyten (pMH)

Zur Isolation primärer Hepatozyten wurden wildtypische und XPA-defiziente C57BL/6-Mäuse aus eigener Zucht verwendet. Zucht und Haltung der Tiere erfolgte im Tierhaus der TU Kaiserslautern unter standardisierten Bedingungen und wurde von den Tierpflegern des Tierhauses durchgeführt. Die Isolation der Hepatozyten erfolgte im Arbeitskreis und wurde eigenständig oder durch Frau Melanie Abel-Beckmann durchgeführt. Die Methode der Leberperfusion inkl. einer Methodik zur Immunfluoreszenzfärbung in pMH wurde jüngst von uns veröffentlicht [197].

2.9.1 Genotypisierung der verwendeten Tiere

Aufgrund der heterozygoten Zucht der XPA-Tiere wurde jeder Wurf vollständig mittels PCR genotypisiert. Hierzu wurden in aller Regel Ohrstanzungen verwendet, die vom Tierhaus bereitgestellt wurden. Die Durchführung der Genotypisierung erfolgte größtenteils durch Frau Melanie Abel-Beckmann.

Zur DNA-Extraktion wurde das Extracta DNA-Prep-Kit (QuantaBio, Massachusetts, USA) eingesetzt. Zu Ohrstanzungen wurden 50 µl Lysepuffer zugegeben, zu Schwanzspitzen wurden 100 µl Lysepuffer zugegeben. Die Proben wurden 30 min bei 95 °C belassen und hierbei gelegentlich gevortext. Nach dem Abkühlen wurde eine äquivalente Menge Neutralisationspuffer zugegeben. Die Proben wurden bis zur Analyse bei 4 °C gelagert. Zur PCR wurden 2,5 µl des Überstand mit 22,5 µl Mastermix gemischt und dem PCR-Protokoll unterzogen. Tabelle 11 stellt die Zusammensetzung des Mastermixes dar, Tabelle 12 stellt das PCR-Protokoll dar.

Tabelle 11: Mastermixzusammensetzung für die Genotypisierung der Zuchtmäuse.

| Komponente | Volumen |
|---------------------------------------|---------|
| Accu Start II Gel Track PCR Super Mix | 12,5 µl |
| Primer: XP26 | 0,6 µl |
| Primer: XP47 | 0,3 µl |
| Primer PGK2 | 0,3 µl |
| DEPC-H ₂ O | 6,6 µl |

2. Material und Methoden

Tabelle 12: Verwendetes PCR-Protokoll.

| Schritt | Dauer | Temperatur |
|----------------|----------------------|-------------------|
| 1 | 3 min | 95 °C |
| 2 | 30 s | 94 °C |
| 3 | 1 min | 72 °C |
| | GO TO Schritt 2, 35x | |
| 5 | 5 min | 72 °C |
| 6 | halten | 4 °C |

Die PCR-Produkte wurden auf ein 2 %-Agarosegel mit Midori Green Advance DNA Stain (5 µl/100 ml) als Fluoreszenzfarbstoff aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Trennung erfolgte für ca. 45 min bei 80 V in TBE-Puffer. Die Auswertung erfolgte nach Aufnahme der Fluoreszenz mittels BioRad GelDoc XR+.

2.9.2 Perfusion

2.9.2.1 Vorbereitungen zur Perfusion

Ca.150 ml Perfusionsmedium I sowie 100 ml Perfusionsmedium II (mit einem 50 ml-Falcon genau abgemessen) wurden unter der Sterilbank in sterile, mit Alufolie abgedeckte Erlenmeyerkolben gegeben und im Wasserbad auf 37 °C temperiert. Waschpuffer und Percolllösung wurden auf 37 °C temperiert. Ein Aliquot Collagenase in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß wurde bis zum Gebrauch in der Sterilbank gelagert. Der Präpariertisch wurde vorbereitet indem ein Styroporblock mit Alufolie umwickelt wurde und vier Klebebandstreifen zurecht geschnitten wurden. Das Präparierbesteck, sowie die benötigten Braunülen wurden auf ein Papiertuch links neben den Präpariertisch gelegt. Die Blasenfalle wurde geschlossen und die Silikonschläuche angebracht. Der erste Silikonschlauch führte von Perfusionsmedium I zur Peristaltikpumpe und von oben in die Blasenfalle. Der zweite Schlauch führt vom Ausgang der Blasenfalle zurück in das Mediumreservoir Die Schlauchpumpe wurde eingeschaltet, so dass sich die Blasenfalle füllte. Ist die Blasenfalle gefüllt, wurde der noch unbesetzte Ausgang mit einer Spritze verschlossen. Befanden sich Luftblasen in

dem Schlauchsystem, wurden diese vor Beginn der Perfusion durch leichtes Klopfen entfernt. Ein ca. 30 cm langer Faden wurde von innen in eine Ligationshilfe eingefädelt. Anschließend wurde der Faden in eine mit 70 % Ethanol gefüllte Petrischale gelegt. Das Tier wurde gewogen und eine adäquate Menge Pentobarbitallösung (0,1 g/kg/KG) *i.p.* gespritzt [198]. Die Vollständigkeit der Narkose wurde mittels Zwischenzehreflex überprüft. Falls die Narkose nach 10 min nicht vollständig war, wurde die halbe Dosis Pentobarbital nachgespritzt. Nach Vollständigkeit der Narkose wurde mit dem Perfusionsprozedere begonnen.

2.9.2.2 Durchführung der Perfusion

Die Maus wurde mit den vorbereiteten Klebestreifen auf dem Präpariertisch fixiert. Dann wurde das Abdomen mit Ethanol benetzt und mit einem V-förmigen Schnitt bis zum Ansatz des Rippenbogens eröffnet. Das Gedärm wurde vorsichtig zur Seite geschoben um Hohlvene und Pfortader freizulegen. Um die Pfortader wurde eine lockere Ligatur gelegt. Ein Venenkatheter wurde in die untere Hohlvene eingeführt und sofort mit dem Pufferreservoir verbunden. Die Pumpe wurde eingeschaltet (3,6 ml/min). Bei korrekter Durchführung blähte sich an dieser Stelle die Leber leicht auf. Die Pfortader wurde durchtrennt und der Pufferfluss auf 7,2 ml/min erhöht. Perfusionsmedium I wurde durch die Leber gespült bis diese blutleer war, dies konnte durch leichtes Massieren der Leber mit einer abgerundeten Pinzette oder durch kurzes Abdrücken der Pfortader unterstützt werden. Während der Entblutung der Leber wurde der Brustkorb der Maus entfernt und eine lockere Ligatur um die obere Hohlvene gelegt, zudem wurde die Kollagenase in Perfusionsmedium II gelöst. Nach vollständiger Entblutung wurde die Pumpe mit Perfusionsmedium II verbunden, die Ligatur um die Pfortader verschlossen und der rechte Vorhof des Herzens eingeschnitten. Durch das entstehende Loch wurde ein Venenkatheter in die obere Hohlvene eingeführt und mit der zugehörigen Ligatur fixiert. Perfusionsmedium II wurde nun solange durch die Leber gespült bis die eine Auflösung des zellulären Verbands zu erkennen war. Nun wurde die Leber vorsichtig heraus präpariert.

2. Material und Methoden

2.9.2.3 Aufreinigung der Hepatozyten

Die perfundierte Leber wurde in eine Sterilbank überführt. Hier wurde die Leberkapsel mit Hilfe eines Spatels geöffnet und die Leber mit Waschpuffer durch ein Nylonnetz (Maschenweite 250 µm) gestrichen. Die resultierende Suspension wurde erneut mit Hilfe des Spatels durch ein Nylonnetz (Maschenweite 100 µm) gestrichen. Die Zellsuspension wurde in 50 ml-Falcon überführt und zentrifugiert (3 min, 300 rcf, RT). Der Überstand wurde verworfen, 15 ml Waschpuffer pro Falcon zugegeben, das Pellet vorsichtig suspendiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wurde verworfen und erneut 15 ml Waschpuffer zugegeben, suspendiert und zentrifugiert (3 min, 500 rcf, RT). Der Überstand wurde verworfen, 3 ml Waschpuffer zu jedem Pellet gegeben, suspendiert und die Suspensionen vereinigt. Zu der Zellsuspension wurden 16 ml Percolllösung gegeben und zentrifugiert (5 min, 800 rcf, RT). Tote Zellen sammelten sich nach diesem Zentrifugationsschritt an der Flüssigkeitsoberfläche, während vitale Hepatozyten pelletiert wurden. Die toten Zellen wurden inkl. des Überstandes verworfen und die viablen Zellen in 6 ml Waschpuffer aufgenommen. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 90 µl Trypanblaulösung versetzt. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die Viabilität als Quotient aus ungefärbten Zellen und Gesamtzahl der Zellen berechnet. pMH wurden nur weiterverwendet, wenn die Viabilität über 85 % lag.

2.9.3 Kultivierung der gewonnenen Hepatozyten

Als Kulturmedium für pMH wurde DMEM LG mit 10 % FKS und 1 % PS verwendet. pMH wurden auf kollagenierten Zellkulturmaterialien ausgesät. Zum Kollagenieren der Materialien wurden diese dünn mit Kollagenlösung benetzt und diese über Nacht trocknen lassen. Die nach der Perfusion erhaltene Zellsuspension wurde mit Medium auf eine adäquate Zelldichte verdünnt und in die vorbereiteten Zellkulturmaterialien gegeben. Nach 3-4 h Anwachszeit erfolgte ein Mediumwechsel und die Inkubationen wurden gestartet. Tabelle 13 zeigt die verwendeten Zelldichten. Inkubationen erfolgten analog zu HepG2 (s. 2.6)

Tabelle 13: Verwendete Zellzahlen in pMH.

| Kulturgefäß | Zellzahl | Inkubationszeiten |
|-------------|----------|-------------------|
| 24-Well | 200000 | 24h |
| 3,5 cm | 1000000 | 24h |
| 10 cm | 7000000 | 24h |

2.10 Erstellung von Proteinlysaten und Western Blot

2.10.1 Direkte Lyse mit Laemmlipuffer

1x Laemmlipuffer wurde auf 95 °C vorgeheizt. Das Medium wurde von den Zellen abgenommen, der Zellrasen wurde mit eiskaltem PBS gewaschen und 100-300 µl, je nach Zelldichte/verwendeter Kulturschale, heißer Laemmlipuffer direkt auf den Zellrasen gegeben und die Zellen mit Hilfe einer Pipettenspitze abgekratzt. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, für 5 min auf 95 °C erhitzt, kurz zentrifugiert und bei -20 °C bis zur Analyse gelagert. Bei Inkubationen in denen stärkere zytotoxische Wirkungen zu erwarten waren, wurde das Medium aufgefangen, mit dem PBS vereinigt, kurz zentrifugiert und das entstandene Pellet in heißem Laemmlipuffer aufgenommen und mit dem restlichen Lysat vereinigt.

2.10.2 Gesamtzelllyse

Zellpellets wurden je nach Größe des Pellets in 100-200 µl Gesamtzelllysepuffer resuspendiert und für 15 min bei 4 °C im Überkopfschüttler belassen. Daraufhin wurden die Lysate zentrifugiert (5 min, 10000 rcf, 4 °C) und der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Proteingehalt des Lysats wurde mittels Bradfordassay bestimmt und die Lysate bei -20 °C bis zur Analyse gelagert.

2.10.3 Gewebelysate

Zur Herstellung von Gewebelysaten wurden 20-30 mg gefrorenes Gewebe verschiedener Organe verwendet. Die folgenden Schritte wurden stets auf Eis durchgeführt. Das Gewebe wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und in 200-300 µl eiskaltem RIPA-Lysepuffer mithilfe eines Metallpistills gemörsert. Anschließend erfolgten die Homogenisierung und der Aufschluss der Zellen mittels Ultraschallbehandlung für 10 Impulse (20 % Power, 50 % duty cycle) jeweils zweimal.

2. Material und Methoden

Dabei wurden die Proben stets auf Eis gehalten. Die Lysate wurden im Anschluss bei 4 °C mit 15000 ×g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert, der Proteingehalt mittels Bradfordassay bestimmt und bei -80 °C bis zur Analyse gelagert.

2.10.4 Bradfordassay zur Bestimmung des Proteingehalts

Proteingehalte der zum Western Blot eingesetzten Lysate wurden mittels Bradfordassay bestimmt. Die Messung beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blue G250 von 470 nm nach 595 nm nach Bindung an Proteine. Zur Messung wurde die Probe je nach erwartetem Proteingehalt verdünnt (1:10-1:50), 10 µl der verdünnten Probe bzw. der BSA-Standardreihe (0-300 µg/ml) in eine 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt und anschließend jeweils 110 µl Bradford-Reagenz hinzugegeben. Die Proben wurden 5 min bei RT inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 595 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer. Die Messung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Proteingehalte wurden gegen die mitgeführte Standardreihe berechnet.

2.10.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinlysaten erfolgte nach Molekulargewicht mittels SDS-PAGE. Hier maskiert das anionische Tensid SDS die Eigenladung der Proteine. Die resultierende negative Gesamtladung verhält sich linear zur molekularen Masse des Proteins. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die Proteine zur Anode. Es wurde ein diskontinuierliches Gelsystem, bestehend aus einem Trenn- und einem Sammelgel verwendet. Die Gele unterscheiden sich sowohl in der Porengröße als auch im pH-Wert des verwendeten Puffers. Im 5 %-igen Sammelgel mit neutralem pH-Wert (pH 6,8) werden die Proteine konzentriert und im höherprozentigen Trenngel bei einem pH von 8,8 nach den Molekulargewichten aufgetrennt. Der Acrylamidgehalt des Trenngels wurde je nach Größe der zu detektierenden Proteine gewählt. Tabelle 14 stellt die verwendeten Gelzusammensetzungen dar.

Tabelle 14: Verwendete Gelzusammensetzungen zur SDS-PAGE.

| Acrylamidgehalt | Sammelgel | | Trenngel | | |
|--|-----------|---------|----------|---------|---------|
| | 5% | 10 % | 12,5 % | 15 % | 20 % |
| TRIS, 0,625 M, pH 6,8 | 1,2 ml | - | - | - | - |
| TRIS, 1 M, pH 8,8 | - | 4,5 ml | 4,5 ml | 4,5 ml | 4,5 ml |
| Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1) | 0,75 ml | 4,5 ml | 5,625 ml | 6,75 ml | 9 ml |
| ddH ₂ O | 3,81 ml | 8,64 ml | 7,515 ml | 6,39 ml | 4,14 ml |
| SDS (10 %) | 120 µl | 180 µl | 180 µl | 180 µl | 180 µl |
| TEMED | 6 µl | 9 µl | 9 µl | 9 µl | 9 µl |
| Ammoniumperoxodisulfat 100 mg/ml | 60 µl | 90 µl | 90 µl | 90 µl | 90 µl |

Die Trenngellösung wurde zunächst zwischen zwei sauberen Glasplatten mit 1,5 mm-*Spacern* vorgelegt und mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation (ca. 30 min) wurde das Isopropanol abgenommen, die Sammelgellösung überschichtet und ein Kamm eingesetzt um Geltaschen zu formen. Die ausgehärteten Gele wurden entweder sofort zur SDS-PAGE eingesetzt oder in nasses Papier eingeschlagen bei 4°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Die Gele wurden in die vorgesehene Halterung der Elektrophoresekammer gespannt, diese wurde mit 1xSDS-Laufpuffer befüllt. Etwaige Gelreste in den Taschen wurden durch Spülen mit 1xSDS-Laufpuffer entfernt. Die Proben wurden bei bekanntem Proteingehalt mit ddH₂O auf den gleichen Proteingehalt eingestellt und mit einer adäquaten Menge 5x Laemmlipuffer versetzt, bei Proben die direkt mit Laemmlipuffer geerntet wurden wurde die Proteinmenge über das Volumen der aufgeladenen Proben näherungsweise eingestellt. Es wurden maximal 50 µl Lysat pro Tasche aufgetragen. Zudem wurde stets eine Tasche mit 5 µl *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA pro Gel im Sammelgel und 50 mA pro Gel im Trenngel.

2. Material und Methoden

2.10.6 Western Blot und Immundetektion

Nach erfolgter SDS-PAGE wurde das Gel auf einer zugeschnittenen Nitrozellulosemembran platziert und in ein Blotting-Sandwich eingespannt. Der Zusammenbau des Blotting-Sandwichs erfolgte in 1xBlottingpuffer, um gleichzeitig Membran und Filterpapiere im Puffer zu äquilibrieren. Während des Zusammenbaus wurde stets darauf geachtet, blasenfrei zu arbeiten. Das Blottingsandwich wurde so in die vorgesehene Halterung eingespannt, dass die Membran sich auf Anodenseite befand. Die Blottingkammer wurde mit 1xBlottingpuffer befüllt und die gesamte Apparatur zur Kühlung auf Eis gelagert. Der Proteintransfer erfolgte für 2 h bei 400 mA und wurde mittels Ponceau S-Färbung überprüft.

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran je nach zu detektierendem Protein anhand des Markers zugeschnitten. Anschließend erfolgte eine Blockierung freier Proteinbindestellen mit Blockierlösung für 1 h bei RT auf dem Wippschüttler. Daraufhin wurden die Membranen kurz mit TBS-T gewaschen und in die Primärantikörperlösungen gegeben. Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C im Überkopfschüttler. Die Primärantikörper wurden 1:1000 in TBS-T verdünnt. Nach erfolgter Primärantikörperinkubation wurden die Membranen 3x5 min mit TBS-T gewaschen und anschließend in den Sekundärantikörper gegeben. Die Sekundärantikörperinkubation erfolgte mindestens 1 h bei RT auf dem Rollenmischer. Die Sekundärantikörper wurden 1:2000 in Blockierlösung verdünnt. Nach der Sekundärantikörperinkubation wurde erneut 3x5 min mit TBS-T gewaschen.

Die Immundetektion erfolgte mittels gekaufter oder selbst hergestellter ECL-Lösung, je nach erwarteter Signalstärke. Die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase (HRP = engl. horseradish peroxidase) oxidiert Luminol in Anwesenheit von H_2O_2 zu 3-Aminophtalat. Hierbei wird ein Photon mit $\lambda = 438 \text{ nm}$ emittiert. Diese Chemilumineszenz kann gemessen werden und ist proportional zur Menge des Antikörpergebundenen Proteins. Zur Detektion wurde kurz vor Verwendung das ECL-Reagenz aus ECL-Puffer A und B (1:1, sowohl gekauftes als auch selbst hergestelltes Reagenz) angesetzt und direkt auf die Membranen gegeben. Detektion erfolgt mit Hilfe eines Chemilumineszenzimagers C300 von Azure.

2.10.7 pH-Strippen

Gebundene Antikörper wurden teilweise von Membranen mittels pH-Strippen wieder entfernt, um auf derselben Membran mehr als ein Protein spezifisch zu detektieren. Hierzu wurde die Membran nach erfolgter Detektion des ersten Proteins 5 min in Strip-Puffer A inkubiert und anschließend 15-20 Mal mit ddH₂O kurz gewaschen. Anschließend wurde die Membran 10 min in Strip-Puffer B inkubiert und erneut 15-20 Mal mit ddH₂O kurz gewaschen. Daraufhin wurden erneut freie Proteinbindestellen wie in 2.8.6 beschrieben blockiert und weiter wie beschrieben verfahren.

2.10.8 Densitometrische Evaluierung

Eine Quantifizierung der durchgeführten Western Blots erfolgte mittels densitometrischer Evaluierung. Die Auswertung erfolgte mittels AzureSpot 2.0.062. Signalintensitäten wurden hier auf die Signalintensitäten der stets mitgeführten Ladekontrollen normalisiert und anschließend auf eine Negativkontrolle bezogen, so dass relative Werte in Bezug auf die jeweilige Negativkontrolle erhalten wurden.

2.11 siRNA-vermittelter Knockdown von p53

Der siRNA-vermittelte Knockdown von p53 wurde in HepG2-Zellen durchgeführt. siRNA und scrRNA wurden nach Herstellerangaben gelöst, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Stockkonzentrationen der verwendeten RNAs betragen je 20 µM.

In 3,5 cm-Zellkulturschalen wurden 200000 Zellen pro Schale ausgesät und 24 h anwachsen gelassen. Für den Knockdown wurde eine Lösung von 150 µl zusatzfreiem Medium mit 1,5 µl RNA-Stock pro Schale erstellt. Zudem wurde eine Lösung von 150 µl zusatzfreiem Medium mit 3 µl Lipofectamin RNAiMAX pro Schale erstellt. Die Lösungen wurden 1:1 gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Das normale Kulturmedium wurde von den Zellen abgenommen und durch 1,2 ml DMEM HG mit 10 % FKS ersetzt. 300 µl der vorher erstellten RNA/Lipofectamin-Lösung wurden tröpfchenweise unter Schwenken in die Kulturschalen gegeben. Die RNA-Endkonzentration betrug so 20 nM. Die Zellen wurden nun 6 h inkubiert, daraufhin erfolgte ein Mediumwechsel zum standardmäßig verwendeten Kulturmedium. Die Zellen wurden nun über Nacht unter Standardbedingungen weiterkultiviert und am nächsten Tag wurden Inkubationen wie in 2.6 beschrieben gestartet.

2. Material und Methoden

2.12 Durchflusszytometrische Assays

Alle durchflusszytometrischen Analysen wurden an einem FACS Canto II der Firma Becton Dickinson mit der Hilfe der Software FACSDiva 6.1.1 durchgeführt.

2.12.1 Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusverteilung und Ermittlung der SubG1-Population

Es wurden Zellen wie in 2.6 beschrieben in 3,5 cm-Zellkulturschalen inkubiert. Nach beendeter Inkubation wurde das Medium in ein 15 ml Falcon transferiert und der Zellrasen mit 1 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde mit dem Medium vereinigt. Es wurden 0,5 ml Trypsin zum Zellrasen gegeben und die Schalen für wenige Minuten bis zur Ablösung der Zellen im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde mit 1,5 ml Medium abgestoppt und die Zellen durch wiederholtes resuspendieren vereinzelt. Die Zellsuspension wurde mit Medium/PBS vereinigt. Die Suspensionen wurden zentrifugiert (5 min, RT, 1000 rcf). Die Überstände wurden abgenommen und die Pellets in 1 ml PBS aufgenommen und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Suspensionen wurden erneut zentrifugiert (5 min, RT, 1000 g). Die Überstände wurden abgenommen und die Zellpellets in 70 % EtOH aufgenommen und zur Fixation mindestens über Nacht bei -20 °C gelagert. Nach der Fixation wurden die Suspensionen zentrifugiert (5 min, RT, 1000 rcf), die Überstände abgenommen und das Pellet in 333 µl PBS aufgenommen. Zu der Suspension wurde 1 µl RNase A (10 mg/ml) gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde 167 µl Propidiumiodid (50 µg/ml) zugegeben, die Suspension in FACS-Röhrchen überführt und bis zur Messung an einem BD FACS Canto II (FL-3-A) auf Eis gelagert. Es wurden 15000 Zellen pro Probe vermessen.

2.12.2 Durchflusszytometrische Analyse des induzierten Zelltods mittels AnnexinV-FITC/PI-Färbung

Es wurden Zellen wie in 2.6 beschrieben in 3,5 cm-Zellkulturschalen inkubiert. Nach beendeter Inkubation wurde das Medium in ein 15 ml Falcon transferiert und der Zellrasen mit 1 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde mit dem Medium vereinigt. Es wurden 0,5 ml Trypsin zum Zellrasen gegeben und die Schalen für wenige Minuten bis zur Ablösung der Zellen im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde mit 1,5 ml Medium abgestoppt und die Zellen durch wiederholtes resuspendieren vereinzelt. Die Zellsuspension wurde mit Medium/PBS vereinigt. Die Suspensionen wurden

zentrifugiert (5 min, RT, 1000 rcf). Die Überstände wurden abgenommen und die Pellets in 1 ml PBS aufgenommen und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Suspensionen wurden erneut zentrifugiert (5 min, RT, 1000 rcf). Die Überstände wurden erneut abgenommen und die Zellpellets in 50 µl AnnexinV-FITC-Bindepuffer aufgenommen. Es wurden je 2,5 µl AnnexinV-FITC-Lösung zugegeben und 15 min auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden 430 µl AnnexinV-FITC-Bindepuffer und 10 µl Propidiumiodid (50 µg/ml) zugegeben und die Suspension in FACS-Röhrchen überführt und bis zur Messung an einem BD FACS Canto II (FL-2-A vs FL-3-A) auf Eis gelagert. Es wurden 15000 Zellen pro Probe vermessen.

2.13 Messung der Zellviabilität mittels Resazurin-Reduktionstest

Der Resazurin-Reduktionstest beruht auf der Reduktion von Resazurin zum fluoreszenzaktiven Resorufin in viablen Zellen. Es wurde stets eine Lösemittelkontrolle mitgeführt, auf die alle anderen Inkubationen bezogen wurden. In 24-Wellplatten wurden Inkubationen stets als Duplikat, in 96-Wellplatten stets als Triplikat durchgeführt. Es wurden Zellen wie in 2.6 oder 2.7.3 beschrieben ausgesät und behandelt. Nach beendeter Inkubation wurde das Inkubationsmedium entfernt und Zellrasen einmal mit warmem PBS gewaschen. Anschließend wurde je nach verwendeter Wellplatte eine adäquate Menge Resazurinmedium (siehe 2.4) zugegeben und für 90 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion am Fluoroskan Ascent FL bei einer Anregungswellenlänge 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm.

2.14 Caspase 3/7-Aktivitätsassay

Die Caspase 3/7-Aktivität wurde mit Hilfe des Caspase-Glo® 3/7 Assays von Promega gemessen. Die Reagenzien wurden nach Herstellerangaben gelöst und à 500 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert. HepG2-Zellen wurden wie in 2.6 beschrieben in weißen 96-Halfwellplatten ausgesät und behandelt. Nach beendeter Inkubation wurden 45 µl des Caspase-Glo 3/7-Reagenz pro Well zugegeben. Die Wellplatten wurden in Alufolie eingeschlagen, 5 min bei 400 rpm geschüttelt und weitere 30 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde die Chemolumineszenz mit Hilfe des Fluoroskan Ascent FL gemessen im Bereich von 270-670 nm gemessen.

2. Material und Methoden

2.15 DNA-Adduktanalytik

Die DNA-Adduktanalytik erfolgte in Kooperation mit der AG Jun.Prof. Dr. Alexander Cartus und der AG Prof. Dr. Elke Richling an der TU Kaiserslautern. Die Isolation der genomischen DNA, sowie die enzymatische Hydrolyse erfolgten eigenständig, die massenspektrometrische Analyse erfolgte durch oder mit Unterstützung von Frau Julia Fuhlbrueck und Frau Dr. Simone Stegmüller. Die verwendeten Standards wurden von Frau Dr. Ruth Schulte-Hubbert und Frau Dr. Simone Stegmüller wie in [30] beschrieben synthetisiert.

pMH wurden behandelt wie in 2.8.3 genannt.

Adduktanalysen wurden in HepG2 in verschiedenen zeitabhängigen Setups durchgeführt. Einerseits wurden HepG2 für bis zu 96 h mit OHME behandelt. Hier wurden verschiedene Zellzahlen in 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät. Tabelle 15 stellt die verwendeten Zellzahlen dar.

Tabelle 15: Verwendete Zellzahlen zur DNA-Adduktanalytik im Zeitverlauf.

| Inkubationsdauer | Zellzahl |
|------------------|-----------------|
| 24 h | 7×10^6 |
| 48 h | 6×10^6 |
| 72 h | 5×10^6 |
| 96 h | 4×10^6 |

Zudem wurde ein Assay zur Untersuchung einer möglichen Reparatur von DNA-Addukten durchgeführt. Hier wurden 6×10^6 Zellen pro Schale ausgesät und nach 24 h Anwachszeit für 8 h behandelt. Daraufhin erfolgte ein Mediumwechsel zu DMEM HG mit 5 % FKS und 1 % PS. Die verringerte Serumkonzentration wurde verwendet um die Proliferation der Zellen zu verlangsamen. Nun wurden die Zellen nach verschiedenen Recoveryzeiten geerntet.

2.15.1 DNA-Isolation

Nach beendeter Inkubation wurde das Medium in ein 50 ml Falcon transferiert und der Zellrasen mit 5 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde mit dem Medium vereinigt. Es wurden 1 ml Trypsin zum Zellrasen gegeben und die Schalen für wenige Minuten bis zur Ablösung der Zellen im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde mit 5 ml Medium abgestoppt und die Zellen durch wiederholtes resuspendieren vereinzelt. Die Zellsuspension wurde mit Medium/PBS vereinigt. Die Suspension wurde zentrifugiert (5 min, RT, 1000 rcf). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert (5 min, RT, 1000 rcf). Der Überstand wurde erneut abgenommen und das Zellpellet bis zur Isolation der DNA bei -20 °C gelagert.

Das Zellpellet wurde in 800 µl Lysepuffer resuspendiert und die Suspension mit 15 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 5 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt. Die Suspension wurde über Nacht bei 55 °C und 500 rpm im Thermomixer inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden abkühlen gelassen und daraufhin wurden 800 µl Extraktionslösung 1 zugegeben und 10 s gevortext. Die Mischungen wurden 10 min bei 17000 rcf bei RT zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Lösungen wurden mit 1 µl RNase A versetzt und 20 min bei RT inkubiert. Die Lösungen wurden mit 700 µl Extraktionslösung 2 versetzt, 10 s gevortext und erneut 10 min bei 17000 rcf bei RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde erneut in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Reaktionsgefäße wurden mit eiskaltem Ethanol aufgefüllt und die DNA durch vorsichtiges Invertieren ausgefällt. Falls die DNA an dieser Stelle nicht ausfiel, wurden die Proben über Nacht bei -20 °C gelagert. Nach erfolgter Fällung wurde erneut zentrifugiert (10 min, 17000 rcf, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet in 250 µl ddH₂O gelöst. Die Lösung wurde mit 25 µl NaOAc (3 M) versetzt und daraufhin wurde die DNA erneut durch Zugabe von 250 µl eiskaltem Isopropanol gefällt. Es wurde erneut zentrifugiert (10 min, 17000 rcf, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet mit 700 µl eiskaltem EtOH (70 %) gewaschen. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, der Überstand verworfen und das Pellet an der Luft trocknen gelassen. Die DNA wurde in 50 µl ddH₂O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Konzentration und Güte der isolierten DNA wurden mittels spektralphotometrischer Messung am NanoDrop 1000 bestimmt. Das Gerät gibt Anhand der Absorption bei

2. Material und Methoden

260 nm direkt eine Konzentration der Lösung aus, zudem werden die Absorptionsverhältnisse 260/280 und 260/230 ausgegeben. Ersteres sollte gerundet bei 1,8 liegen, zweiteres Verhältnis sollte über 2,0 liegen.

2.15.2 Enzymatische DNA-Hydrolyse

Der DNA-Gehalt wurde mit ddH₂O in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen auf 30 µg DNA in 135 µl eingestellt. Es wurden 39 µl Succinatpuffer zugegeben, daraufhin wurden 7,95 µl mikrokokkale Nuklease (0,2 U/µl) und 12,6 µl Phosphodiesterase II (5 mU/µl) zugegeben und für mindestens 16 h bei 37 °C und 500 rpm im Thermomixer inkubiert. Nach beendeter Inkubation wurden 10 µl des internen Standards (je 5 nM ¹⁵N-dG-MIE und ¹⁵N-dA-MIE in ddH₂O) zugegeben. Zudem wurden 5 µl ¹⁵N-dG (200 µM) zugegeben. Daraufhin wurden 93 µl 0,5 M TRIS, pH 10,8 zugegeben und vorsichtig resuspendiert. Nun wurden 18 µl alkalische Phosphatase (1 mU/µl) zugegeben und über Nacht bei 37 °C und 500 rpm im Thermocycler inkubiert. Daraufhin wurden zur Proteinfällung 500 µl eiskalter Ethanol zugegeben und 15 min bei 20800 rcf bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die Lösungsmittel unter vermindertem Druck mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge entfernt. Die resultierenden gallertartigen Pellets wurden in 50 µl MeOH (75 %) aufgenommen und sorgfältig resuspendiert. Die erhaltenen Lösungen wurden erneut zentrifugiert (1 min, 13000 rcf, 4 °C) und der Überstand in HPLC-Vials überführt und zur Messung eingesetzt.

2.15.3 Massenspektrometrische Analytik

Die Analyse der DNA-Hydrolysate erfolgte an einem Agilent 1290 infinity UHPLC System bestehend aus seiner binären Pumpe (G4220A), einem Autosampler (G4226A) und einem Säulenofen (G1316C), gekoppelt mit einer Sciex QTrap 5500 MS. Zur Trennung wurde eine C18-Säule (U-VDSpher PUR C18-E 1.8 µm; 50×4.6 mm) mit korrespondierender Vorsäule (U-VDSpher PUR C-18-E, 1.8 µm 5×4 mm) verwendet. Als Eluenten wurden 0,1 % Essigsäure (A) und Methanol (UHPLC grade, B) verwendet. Der folgende Gradient wurde verwendet: min 0–1: 10 % B, min 1–1.20: 10–50 % B, min 1.20–3.50: 50–80 % B, min 3.50–3.51: 80–95 % B, min 3.51–5.00: 95 % B, min 5.00–5.01: 95–10 % B, 5.01–7.00: 10 % B. Die Flussrate betrug

0,8 ml/min, das Injektionsvolumen betrug 5 µl. Die Säule wurde auf 25 °C temperiert. Das Massenspektrometer wurde mittels Elektrosprayionisation im positiven Modus betrieben (ESI+). Die Analyse erfolgte im *multiple reaction monitoring* (MRM)-Modus. Die instrumentenspezifischen Parameter waren: Ionensprayspannung 5,5 kV, Quelltemperatur 500 °C, *curtain gas* 25 psi, *nebulizer gas* 65 psi, *heater gas* 60 psi. Zur Berechnung der Adduktlevel wurde zusätzlich der dG-Gehalt in den Proben bestimmt. Das LC-MS/MS-System bestand aus einem Agilent 1100 *series* System mit einem Autosampler (G1313A), einer quarternären Pumpe (G1311A), und einem Säulenofen (G1316A; Agilent, Waldkirch, Germany) gekoppelt mit einem Tripelquadrupol Massenspektrometer (API 2000, PE SCIEX, USA). Zur Trennung wurde eine C18-Säule (LiChrospher®, 5 µm, 4.0 mm × 125 mm, Merck, Darmstadt, Germany) mit korrespondierender Vorsäule (LiChrospher®, 5 µm, 4.0mm × 4.0 mm, Merck, Darmstadt, Germany) verwendet. Als Eluenten wurden 0,2 % Ameisensäure (A) und Methanol (B) verwendet. Der folgende Gradient wurde verwendet: min 0–6: 10-80 % B, min 6-13: 95 %B. Die Flussrate betrug 0,75 ml/min, das Injektionsvolumen betrug 5 µl. Die Säule wurde auf 20 °C temperiert. Das Massenspektrometer wurde mittels Elektrosprayionisation im positiven Modus betrieben (ESI+). Die Analyse erfolgte im MRM-Modus. Die gerätespezifischen Parameter waren: Ionensprayspannung 4,2 kV, Quelltemperatur 400 °C, *curtain gas* 20 psi, *nebulizer gas* 30 psi, *heater gas* 35 psi. Substanzspezifische Messparameter der Massenspektrometer sind in Tabelle 16 dargestellt.

2. Material und Methoden

Tabelle 16: Substanzspezifische massenspektrometrische Parameter für dG, ¹⁵N₅-dG, N²-MIE-dG, N⁶-MIE-dA, [¹⁵N₅]- N²-MIE-dG and [¹⁵N₅]- N⁶-MIE-dA.

| | Q1 | Q3 | DP | FP | EP | CEP | CE | CXP |
|--|---------|--------------------|----|-----|-----|-----|----|-----|
| dG | 268.175 | 151.9 ^b | 6 | 350 | 4.5 | 12 | 15 | 18 |
| | 268.175 | 134.9 | 6 | 350 | 4.5 | 12 | 47 | 20 |
| ¹⁵ N ₅ -dG | 273.083 | 157.3 ^b | 26 | 370 | 4 | 20 | 17 | 4 |
| | 273.083 | 138.9 | 26 | 370 | 4 | 20 | 49 | 4 |
| N ² -MIE-dG | 444.166 | 328.1 ^b | 46 | | 10 | | 17 | 34 |
| | 444.166 | 177.1 | 46 | | 10 | | 33 | 12 |
| N ⁶ -MIE-dA | 428.170 | 177.0 ^b | 71 | | 10 | | 35 | 14 |
| | 428.170 | 312.1 | 71 | | 10 | | 21 | 22 |
| [¹⁵ N ₅]- N ² - MIE-dG | 449.078 | 333.1 ^b | 61 | | 10 | | 15 | 24 |
| | 449.078 | 177.1 | 61 | | 10 | | 41 | 12 |
| [¹⁵ N ₅]- N ⁶ - MIE-dA | 433.094 | 177.1 ^b | 56 | | 10 | | 33 | 12 |
| | 433.094 | 317.1 | 56 | | 10 | | 21 | 18 |

^a Q1, quadrupole 1 [m/z]; Q3, quadrupole 3 [m/z]; DP, declustering potential [V]; FP, focusing potential; EP, entrance potential [V]; CEP, collision cell entrance potential [V]; CE, collision energy [V]; CXP, cell exit potential [V].

^b Massenübergänge wurden zur Quantifizierung genutzt.

Die analytischen Limits wurden anhand des Signal-zu-Rauschen-Verhältnisses der vermessenen Standardreihen ermittelt. Die Nachweisgrenze (LOD, engl.: *limit of detection*) lag für beide dGMiE und dAMiE bei 3 Addukten pro 10⁸ Nukleosiden. Die Quantifizierungsgrenze (LOQ, engl.: *limit of quantification*) lag für beide Addukte bei 11 Addukten pro 10⁸ Nukleoside.

2.16 Immunfluoreszenzfärbungen

2.16.1 γ H2AX-Färbung in pMH

pMH wurden auf Deckgläschen ausgesät, wie beschrieben kultiviert und inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal vorsichtig mit warmem PBS gewaschen. Es wurden je Schale 2 ml eiskalter MeOH zugegeben und 20 min bei -20 °C fixiert. Der MeOH wurde entfernt und zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden in eine feuchte Kammer transferiert und zur Blockierung und Permeabilisierung eine Stunde mit 5 % BSA in PBS mit 0,3 % Triton-X-100 inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und die Primärantikörperlösung (anti- γ H2AX, abcam, 1:1000 in 1 %BSA in PBS mit 0,3 % Triton-X-100) auf den Zellrasen gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Deckgläschen in 3,5 cm-Schalen transferiert, dreimal mit PBS und einmal mit PBS mit 0,4 M NaCl gewaschen und wieder zurück in die feuchte Kammer transferiert. Hier wurde die Sekundärantikörperlösung (G α R-Alexa488, 1:400 in 1 %BSA in PBS mit 0,3 % Triton-X-100) auf den Zellrasen gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Die Deckgläschen wurden in 3,5 cm-Schalen transferiert und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen mit VectaShield mit DAPI eingedeckelt und mit Klarlack versiegelt. Die Objektträger wurden bis zur Analyse bei 4 °C gelagert. Die Analyse erfolgte an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop cLSM900 mit einem Öbobjektiv mit 63-facher Vergrößerung (Plan-Apochromat 63x/1.40 DIC M27) mit Hilfe der Software ZEN 3.4 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). DAPI wurde mit einer Anregungswellenlänge von 353 nm und einer Emissionswellenlänge von 465 nm vermessen. Für Alexa488 wurden Anregungs-/Emissionswellenlängen von 493 bzw. 517 nm verwendet.

2.16.2 Färbung von Bim / Cytochrom c

HepG2 wurden auf Deckgläschen ausgesät und wie bereits beschrieben kultiviert und inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal vorsichtig mit warmem PBS gewaschen. Es wurden je Schale 2 ml 4 % PFA zugegeben und 15 min bei RT fixiert. Das PFA wurde entfernt und zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden in eine feuchte Kammer transferiert und zur Blockierung und Permeabilisierung eine Stunde mit 5 % BSA in PBS mit 0,3 % Triton-X-100 inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und die Primärantikörperlösung

2. Material und Methoden

(anti-Bim, Cell Signaling, 1:100 in 1 %BSA in PBS mit 0,3 % Triton-X-100; anti-Cytochrom c, Cell Signaling, 1:200 in 1 %BSA in PBS mit 0,3 % Triton-X-100) auf den Zellrasen gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Deckgläschen in 3,5 cm-Schalen transferiert, dreimal mit PBS gewaschen und wieder zurück in die feuchte Kammer transferiert. Hier wurde die Sekundärantikörperlösung (GαR-Alexa488, 1:400 in 1 %BSA in PBS mit 0,3 % Triton-X-100) auf den Zellrasen gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Die Deckgläschen wurden in 3,5 cm-Schalen transferiert und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen mit VectaShield mit DAPI eingedeckelt und mit Klarlack versiegelt. Die Objektträger wurden bis zur Analyse bei 4 °C gelagert. Die Analyse erfolgte an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop cLSM900 mit einem Öbektiv mit 63-facher Vergrößerung (Plan-Apochromat 63x/1.40 DIC M27) mit Hilfe der Software ZEN 3.4 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). DAPI wurde mit einer Anregungswellenlänge von 353 nm und einer Emissionswellenlänge von 465 nm vermessen. Für Alexa488 wurden Anregungs-/Emissionswellenlängen von 493 bzw. 517 nm verwendet.

2.16.3 Färbung von aktivem Bax

HepG2 wurden auf Deckgläschen ausgesät und wie bereits beschrieben kultiviert und inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal vorsichtig mit warmem PBS gewaschen. Es wurden je Schale 2 ml 4 % PFA zugegeben und 15 min bei RT fixiert. Das PFA wurde entfernt und zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Es wurden je 2 ml 0,2 % CHAPS in PBS zugegeben und zur Permeabilisierung 10 min inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und die Deckgläschen zweimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden in eine feuchte Kammer transferiert und zur Blockierung eine Stunde mit 5 % BSA in PBS inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und die Primärantikörperlösung (anti-Bax, Cell Signaling, 1:3200 in 1 %BSA in PBS) auf den Zellrasen gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Deckgläschen in 3,5 cm-Schalen transferiert, dreimal mit PBS gewaschen und wieder zurück in die feuchte Kammer transferiert. Hier wurde die Sekundärantikörperlösung (GαR-Alexa488, 1:400 in 1 %BSA in PBS) auf den Zellrasen gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Die Deckgläschen wurden in 3,5 cm-Schalen transferiert und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die

Deckgläschen mit VectaShield mit DAPI eingedeckelt und mit Klarlack versiegelt. Die Objektträger wurden bis zur Analyse bei 4 °C gelagert. Die Analyse erfolgte an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop cLSM900 mit einem Öbektiv mit 63-facher Vergrößerung (Plan-Apochromat 63x/1.40 DIC M27) mit Hilfe der Software ZEN 3.4 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland). DAPI wurde mit einer Anregungswellenlänge von 353 nm und einer Emissionswellenlänge von 465 nm vermessen. Für Alexa488 wurden Anregungs-/Emissionswellenlängen von 493 bzw. 517 nm verwendet.

2.16.4 Cofärbungen mit MitoTracker

Bim und aktives Bax wurden teilweise mit MitoTracker cogefärbt. Es wurde MitoTracker RedCMXRos eingesetzt. Der MitoTracker wurde in DMSO gelöst und aliquotiert (500 µM) bei -80 °C aufbewahrt.

30 min vor Ende der Inkubationszeit wurden je Schale 1 µl MitoTracker zugegeben (Endkonzentration: 250 nM). Sobald MitoTracker zugegeben war wurde möglichst unter Lichtausschluss gearbeitet, ansonsten wurde mit den Deckgläschen verfahren wie oben beschrieben. MitoTracker RedCMXRos wurde mit einer Anregungswellenlänge von 578 nm und einer Emissionswellenlänge von 598 nm vermessen.

2.17 Genexpressionsanalysen

Die dargestellten Genexpressionsanalysen erfolgten in Kooperation mit der AG Prof. Dr. Markus Christmann an der Universitätsmedizin Mainz. Hierzu wurden 6×10^6 HepG2-Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät und für 24 h anwachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen für 8, 24 und 48 h mit 75 µM OHME behandelt und nach beendeter Inkubation als Pellets geerntet. Die anschließende RNA-Isolation und qRT-PCR erfolgten durch die Kooperationspartner.

Hierzu wurden die Zellpellets direkt in Trizol lysiert und einer Trizol/Chloroform-Extraktion unterzogen. Die weitere Aufreinigung der RNA erfolgte durch das RNA II Isolation Kit (Macherey and Nagel). RNA wurde bei -80 °C gelagert und cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des Verso cDNA Kit (Thermo Scientific). RNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe des NanoDrop 1000 bestimmt. Die qRT-PCR wurde mit Hilfe des SensiMix™ SYBR Green & Fluorescein Kit (Biolone, London, UK) und

2. Material und Methoden

eines CFX96 Real-Time PCR Detection Systems (Biorad) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CFX Manager Software. Non-template Kontrollen wurden stets mitgeführt und Ergebnisse wurden auf *gapdh* und *β-actin* normalisiert [199].

3. Ergebnisse

Für die dargestellten Versuche wurde OHME als Testsubstanz eingesetzt. Dieses wurde von der ehemaligen AG Jun.Prof. Dr. Alexander Cartus synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Die Reinheit der Substanz liegt bei 99 %, ein ¹H-NMR-Spektrum ist in Anhang A2.11 dargestellt.

OHME stellt den Primärmetaboliten sowie das proximale Kanzerogen von ME dar [8]. Die hauptsächlich in dieser Arbeit verwendete Zelllinie sind HepG2-Zellen. Diese exprimieren kaum CYP450-Enzyme [200], daher ist ein direkter Einsatz von ME als Testsubstanz nicht möglich. Primäre murine Hepatozyten exprimieren Phase I-Enzyme, jedoch wurde auch hier aus Gründen der Vergleichbarkeit mit den anderen Versuchen in dieser Arbeit der Primärmetabolit eingesetzt. Zudem ist bekannt, dass die Expression der Phase I-Enzyme in Primärhepatozyten bereits wenige Stunden nach der Isolation stark abnimmt [201, 202].

3.1 Primäre murine Hepatozyten

3.1.1 Genotypisierung der verwendeten NER-defizienten Tiere

In allen dargestellten Versuchen wurden C57BL/6-Mäuse aus universitätsinterner Zucht eingesetzt. Für einige der dargestellten Versuche wurden NER-defiziente Tiere eingesetzt. Die NER-defiziente Mauslinie stammt ursprünglich aus der AG van Steen, es wurde *XPA* ausgeknockt [203]. Aufgrund der heterozygoten Verpaarung der Tiere wurde jeder Wurf vollständig mittels PCR genotypisiert. Die Genotypisierung wurde größtenteils von Frau Melanie Abel-Beckmann durchgeführt. Abbildung 8 stellt eine exemplarische Aufnahme der PCR-Produkte nach elektrophoretischer Auftrennung dar.

Die Auswertung erfolgte nach visuellen Kriterien. BXXX stellt die tierhausinterne Nummerierung der Tiere dar. *XPA*-defiziente Tiere wurden nur nach erfolgter PCR für Versuche verwendet, wildtypische Tiere wurden nach PCR aus der eigenen Zucht verwendet oder der Wildtypzucht des Tierhauses entnommen.

3. Ergebnisse

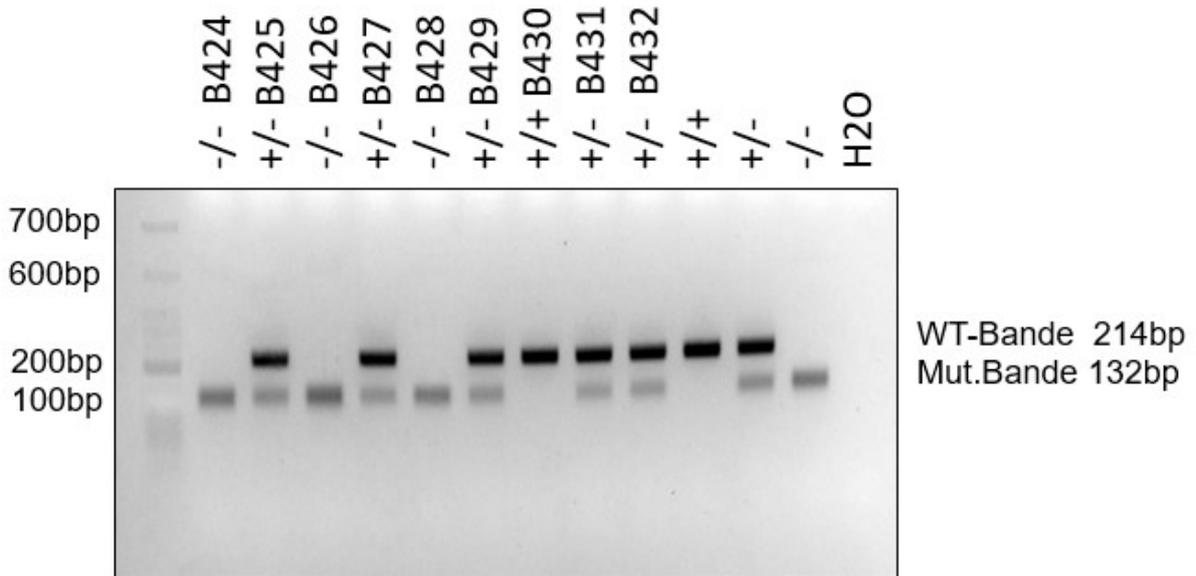


Abbildung 8: Exemplarische Aufnahme der PCR-Produkte nach elektrophoretischer Auftrennung.

3.1.2 Untersuchung des SULT-Status der verwendeten Tiere

SULT1A1 stellt die relevanteste Sulfotransferase für die Umsetzung von OHME zu 1'-Sulfoxymethyleugenol dar [10, 30, 31]. Zur Überprüfung der Eignung der von uns verwendeten Tiere zur Untersuchung der Effekte von ME und zur Sicherstellung, dass ein Knockout von XPA keinen Einfluss auf die SULT1A1-Expression hat, wurde diese mittels Western Blot in verschiedenen Geweben der verwendeten Mäuse überprüft.

Abbildung 9 stellt einen exemplarischen Blot dar.

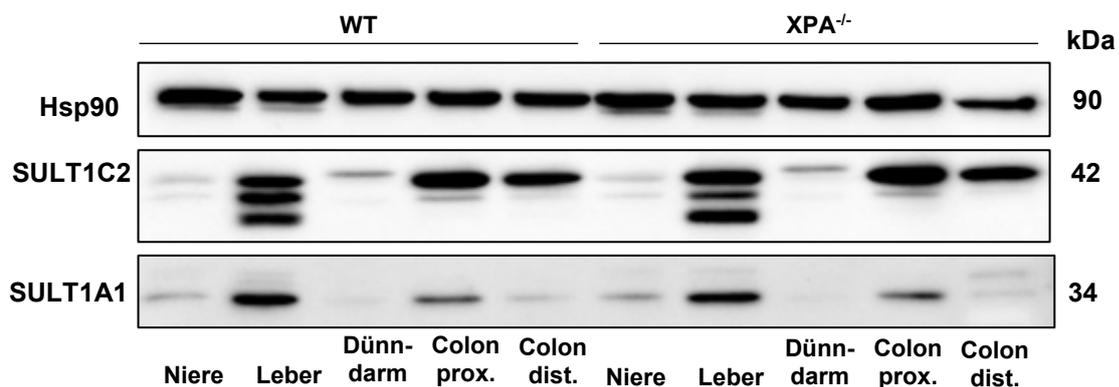


Abbildung 9: Exemplarischer Western Blot verschiedener Gewebe von wildtypischen, sowie XPA-defizienten Mäusen aus eigener Zucht, Hsp90 dient als Ladekontrolle.

Neben SULT1A1 als relevantester Isoform wurde SULT1C2 detektiert, da auch dieses die Sulfatierung von OHME katalysiert [29]. Geblottet wurden Gewebelysate von Niere, Leber, Dünndarm, sowie proximalem und distalem Colon. Hsp90 wurde als

Ladekontrolle verwendet. Wie erwartet zeigt die Leber die stärkste Expression von beiden SULT-Isoformen, gefolgt vom proximalen Colon. Geringe Expression zeigt sich in Niere und distalem Colon. Im Dünndarm wird kein SULT1A1 und nur wenig SULT1C2 exprimiert. Es zeigen sich keine Unterschiede zwischen wildtypischen und XPA-defizienten Tieren.

3.1.3 DNA-Adduktbildung nach OHME-Behandlung

Die von ME gebildeten DNA-Addukte sind wesentlich größer als typischerweise von der BER reparierte Läsionen wie beispielsweise 7-Methyladenin. Daher stellen dGMIE und dAMIE wahrscheinlich Substrate für die NER dar. Um sowohl die grundsätzliche DNA-Adduktbildung als auch den Einfluss der NER zu charakterisieren, wurden pMH von wildtypischen als auch XPA-defizienten Tieren für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen OHME behandelt. Daraufhin wurde die genomische DNA isoliert, hydrolysiert und mittels HPLC-MS/MS die Adduktbildung untersucht. Der Versuch wurde zwei Mal mit verschiedenen OHME-Konzentrationen durchgeführt, nachdem beim ersten Versuch überraschend hohe Adduktlevel nachgewiesen wurden und in durchlichtmikroskopischen Aufnahmen eine veränderte Morphologie in den XPA-defizienten pMH nach OHME-Inkubation festgestellt werden konnte (siehe Abbildung 10). Für den ersten Versuch wurde die Zellen wie in vorangehenden Versuchen in

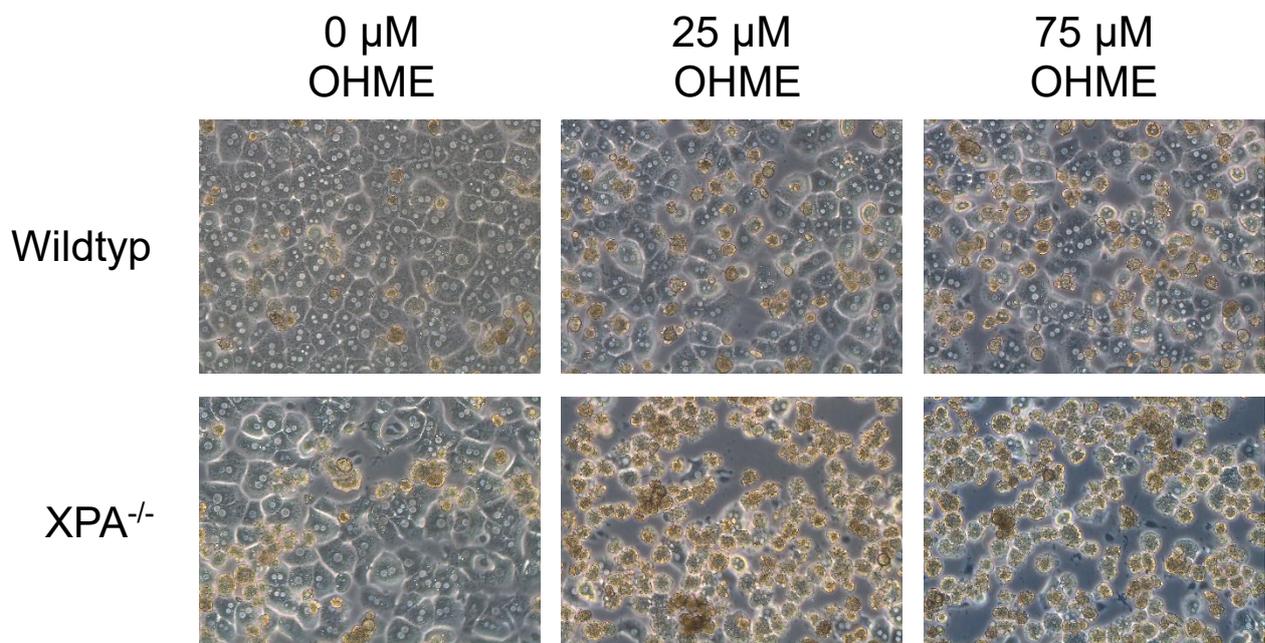


Abbildung 10: Repräsentative Durchlichtaufnahmen von wildtypischen sowie XPA-defizienten pMH nach 24 h Behandlung.

HepG2 mit 25 und 75 μM OHME behandelt, für den zweiten Versuch wurde mit 1 und

3. Ergebnisse

5 μM OHME behandelt, eine Lösemittelkontrolle wurde stets mitgeführt. Abbildung 11 stellt die Ergebnisse beider Versuche dar.

In beiden Versuchen konnte in beiden Genotypen eine konzentrationsabhängige

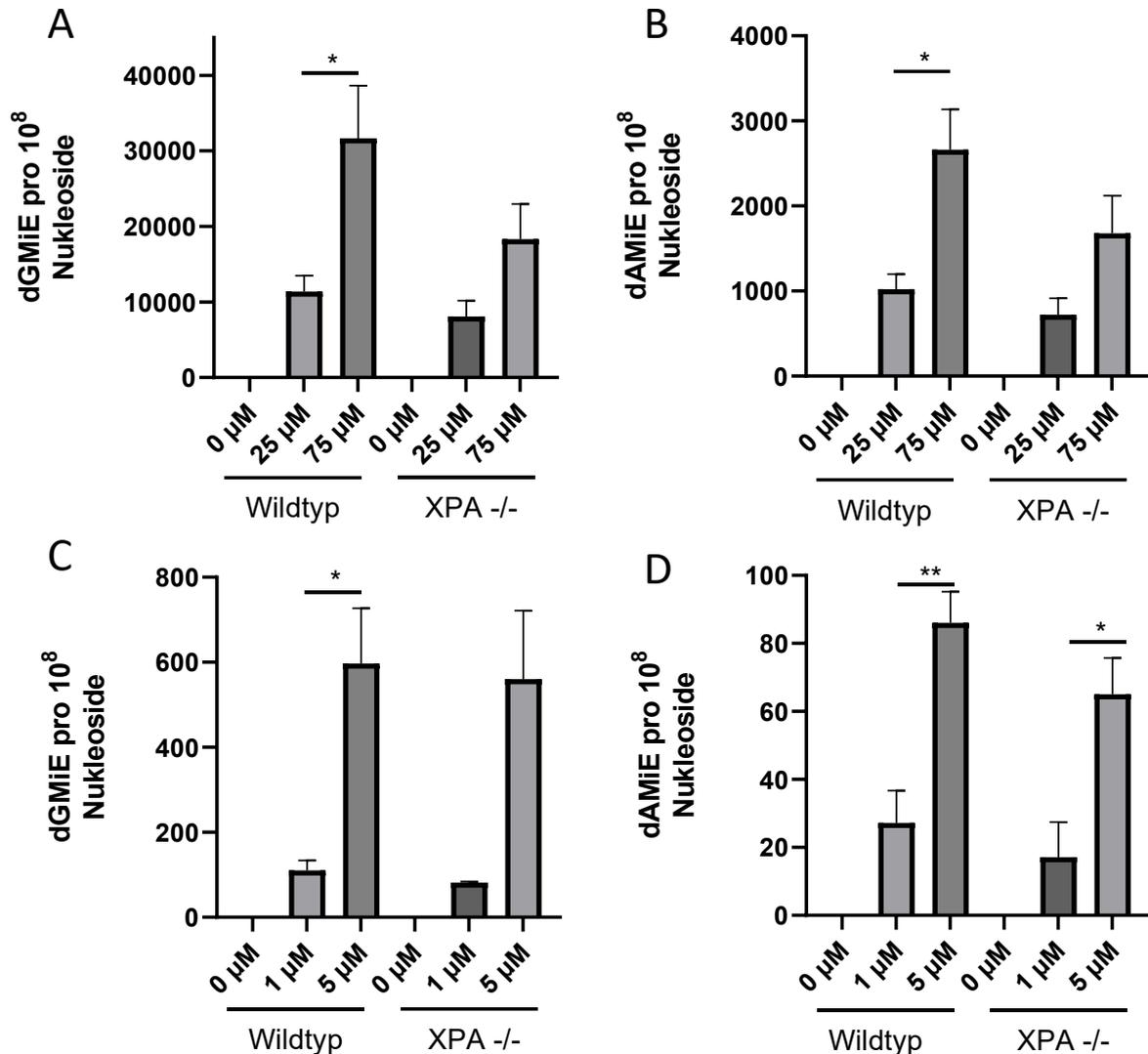


Abbildung 11: DNA-Adduktanalysen in wildtypischen sowie XPA-defizienten pMH. A+B Behandlung mit 0, 25 und 75 μM OHME, $n=4$, 24 h. C+D Behandlung mit 1 und 5 μM OHME, $n=4$, 24 h. Nicht signifikante Ergebnisse sind nicht markiert, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Induktion beider Addukte festgestellt werden. Der Versuch mit höheren OHME-Konzentrationen zeigt nicht signifikant, aber konsistent geringere Adduktlevel in XPA-defizienten pMH. Dieser Befund war im Versuch mit den niedrigeren Konzentrationen für dGMiE nicht und für dAMiE nur abgeschwächt reproduzierbar. Die dargestellten Signifikanzen wurden mittels t-Test zwischen den einzelnen Konzentrationen berechnet. Zusätzlich wurde eine zweiseitige Varianzanalyse (2way-ANOVA) durchgeführt, um einen möglichen signifikanten Einfluss des Genotyps, sowie auch

hier die Konzentration von OHME als zweite Variable zu untersuchen. Die 2wayANOVA ergab höchste Signifikanz für den Einfluss der OHME-Konzentration ($p \leq 0,0001$) und bestätigt damit die t-Tests. Jedoch zeigten sich keinerlei signifikante Einflüsse des Genotyps ($p = 0,0783$ bzw. $0,7730$ für den Versuch mit den höheren bzw. niedrigeren Konzentrationen). Da dGMIE das Hauptaddukt darstellt, wurden die Varianzanalysen an den dGMIE-Messwerten durchgeführt.

3.1.4 Untersuchungen zum Einfluss von OHME auf die Zellviabilität in pMH

Die Einflüsse von OHME auf die Zellviabilität von pMH wurden mittels Resazurinreduktionstest untersucht. Abbildung 12 stellt die Ergebnisse dar.

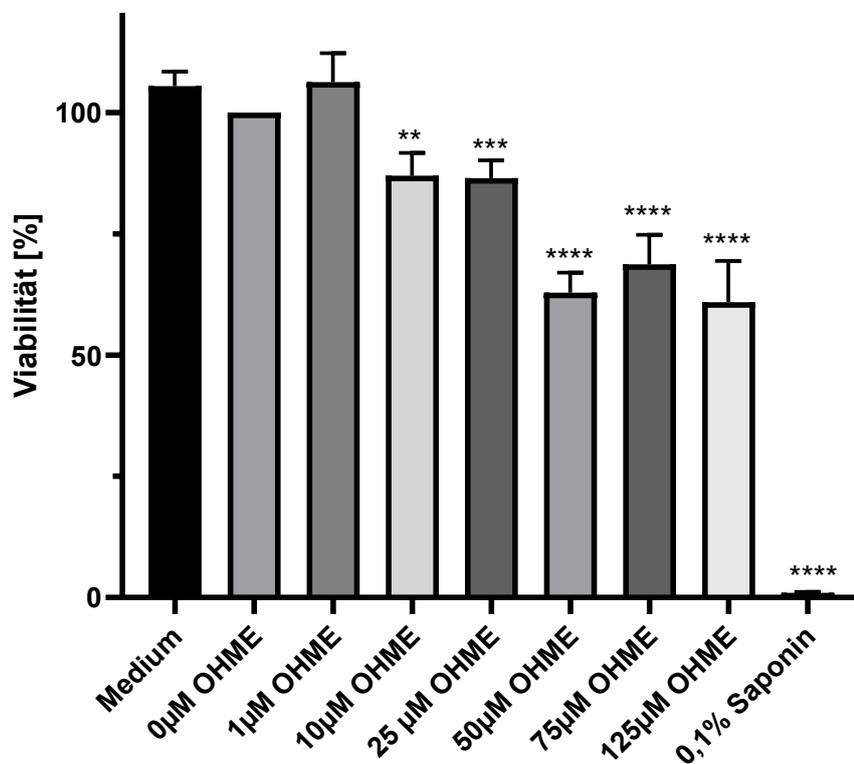


Abbildung 12: Ergebnisse des Resazurinreduktionstests in pMH. n=6, 24 h, nicht signifikante Ergebnisse sind nicht dargestellt, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Die Zellen wurden wie angegeben für 24 h mit OHME behandelt und daraufhin die Zellviabilität gemessen. OHME induziert eine signifikante, dosisabhängige Abnahme der Zellviabilität, wobei die Effekte insgesamt moderat ausfallen. Die Viabilitätswerte sinken bis zu einer Konzentration von 50 µM OHME auf ca. 60 % und scheinen dann in ein Plateau überzugehen. Höhere Konzentrationen als 125 µM wurden aufgrund

3. Ergebnisse

fehlender biologischer Relevanz nicht getestet. **3.1.5 Analyse des Einflusses von OHME auf das p53-Level sowie die Phosphorylierung von H2AX als DNA-Schadensmarker**

Neben den Untersuchungen der DNA-Adduktbildung und der Zellviabilität nach OHME-Behandlung wurde der Einfluss von OHME auf das p53-Level sowie auf die Phosphorylierung von Histon 2AX (yH2AX) als DNA-Schadensmarker untersucht. Hierzu wurden sowohl Western Blot- als auch Immunfluoreszenz-Analysen eingesetzt. Die Untersuchungen mittels Western Blot wurden in wildtypischen, als auch XPA-defizienten Hepatozyten durchgeführt. Die Immunfluoreszenzen wurden nur in wildtypischen pMH durchgeführt. Abbildung 13 zeigt einen repräsentativen Western Blot von p53 und yH2AX in wildtypischen sowie XPA-defizienten pMH nach Behandlung mit OHME.

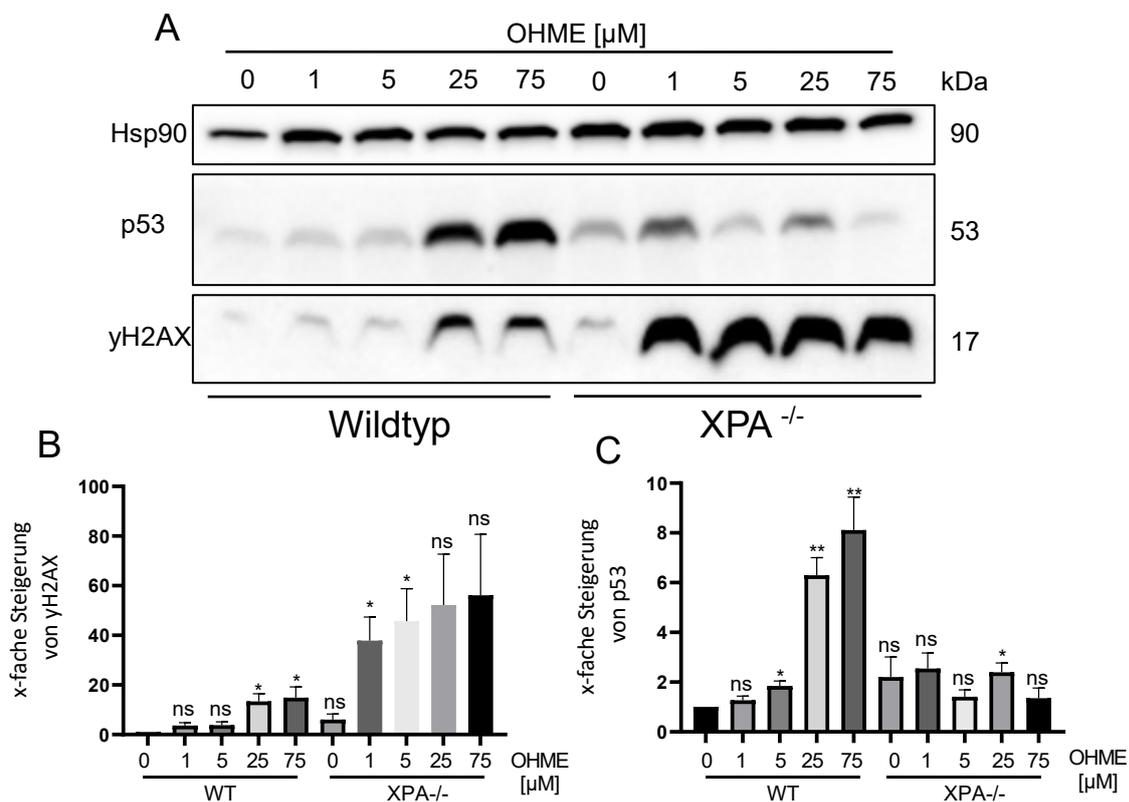


Abbildung 13: Repräsentativer Western Blot von p53 und yH2AX in wildtypischen sowie XPA-defizienten pMH nach Inkubation mit aufsteigenden OHME-Konzentrationen für 24 h (A) mit densitometrischen Auswertungen (B+C). n=3, 24 h, ns = nicht signifikant, *p≤0,05; **p≤0,01.

Der Versuch zeigt in wildtypischen pMH klar eine dosisabhängige Induktion von p53 und yH2AX. Die densitometrische Auswertung liefert signifikante Werte für yH2AX ab einer Konzentration von 25 µM OHME und für p53 bereits ab einer Konzentration von

5 μM OHME. In den XPA-defizienten pMH ist für p53 keinerlei Trend zu erkennen. Das Proteinlevel scheint insgesamt leicht, jedoch nicht signifikant erhöht zu sein im Vergleich zum Wildtyp, eine Induktion durch OHME ist nicht mehr zu erkennen. Für γH2AX zeigt sich bereits ab der niedrigsten eingesetzten Konzentration von 1 μM OHME eine massive Induktion des Proteinlevels. Diese ist dosisabhängig mit signifikanten Werten für 1 und 5 μM und deutlich ausgeprägter als in wildtypischen Zellen.

3. Ergebnisse

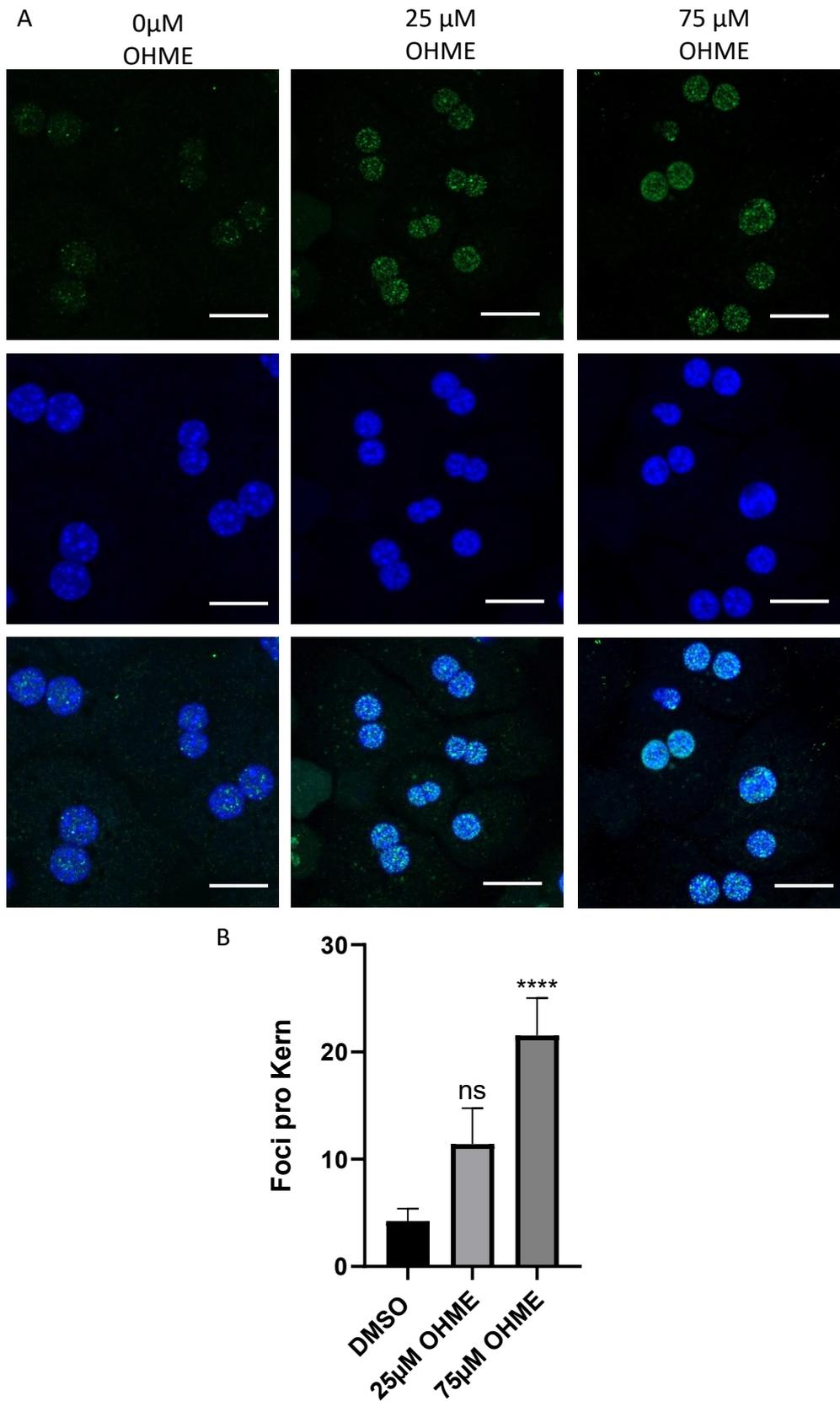


Abbildung 14: Immunfluoreszenzmessung von yH2AX in pMH nach 24h OHME-Behandlung. A: repräsentative Aufnahmen, oben: yH2AX, mitte (blau): DAPI, unten: Merge, aufgenommen als z-Stack mit anschließender *maximum intensity projection* (MIP), Größenmarker = 5 μ m, B: statistische Auswertung, n=3, ns= nicht signifikant, ****p<0.0001.

Die Induktion von γ H2AX als DNA-Schadensmarker wurde zusätzlich mittels Immunfluoreszenz bestätigt. Abbildung 14 stellt repräsentative Aufnahmen, sowie eine statistische Auswertung des Versuchs dar. Auch hier ist eine dosisabhängige Induktion des γ H2AX-Signals erkennbar. Die statistische Auswertung zeigt bei 75 μ M OHME höchstsignifikante Werte. γ H2AX bildet sogenannte Foci um einen DNA-Schaden. Zur Auswertung wurde hier im γ H2AX-Kanal ein Intensitätsschwellenwert definiert um Hintergrundsignale zu ignorieren, anschließend wurden die Foci mittels ImageJ ausgezählt. Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentative MIPs eines z-Stapels. Zur statistischen Auswertung wurde von jedem z-Stapel die mittlere Fokusebene ausgewählt. Da die dargestellten Messungen dreidimensional aufgenommen wurden und mittels MIP in ein zweidimensionales Bild umgewandelt wurden, überlagern sich hier die Signale der einzelnen Foci sehr stark, so dass ein automatisiertes Auszählen nicht mehr möglich ist. Zusammengefasst zeigen die Versuche, dass OHME in wildtypischen pMH DNA-Schäden induziert. γ H2AX wurde hier als Schadensmarker verwendet und die Induktion konnte im Western Blot, als auch mittels Immunfluoreszenz bestätigt werden. Zudem zeigen die dargestellten Western Blot-Versuche auch eine Induktion von p53. In XPA-defizienten pMH konnte eine massiv verstärkte Induktion von γ H2AX im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Bereits 1 μ M OHME erzeugen hier eine starke Induktion des DNA-Schadensmarkers. Für p53 konnte dagegen in XPA-defizienten Zellen keine Induktion mehr durch OHME festgestellt werden, dass p53-Level bleibt im gesamten verwendeten Konzentrationsbereich mehr oder weniger konstant.

3. Ergebnisse

3.2 HepG2-Zellen

3.2.1 Untersuchung des SULT1A1-Status verschiedener Zelllinien

SULT1A1 ist die relevanteste SULT-Isoform, welche die Umsetzung von OHME zu 1'-Sulfoxymethyleugenol katalysiert [10, 30, 31]. Da eine Verwendung von Zelllinien ohne adäquate SULT1A1-Expression zur Untersuchung der Effekte von OHME keinen Sinn ergibt, wurden die Proteinlevel verschiedener im Arbeitskreis vorhandener Zelllinien mittels Western Blot untersucht. Abbildung 15 stellt einen repräsentativen Blot dar.

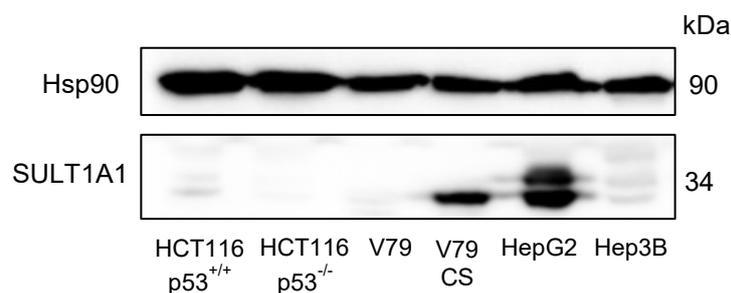


Abbildung 15: Western Blot Analyse der SULT1A1-Expression in verschiedenen Zelllinien. Hsp90 diente als Ladekontrolle.

In den ersten beiden Spuren sind wildtypische sowie p53-defiziente HCT116-Zellen [204], eine Colonkarzinomzelllinie. Die wildtypische Variante zeigt hier eine schwache Expression von SULT1A1, wohingegen in den p53-defizienten Zellen keinerlei Bande zu erkennen ist. Die nächsten beiden aufgetragenen Lysate stammen von wildtypischen V79-Zellen, sowie von V79-Zellen, die stabil mit CYP1A2 und SULT1A1 transfiziert wurden (V79 CS) [205]. V79-Zellen sind Lungenfibroblasten des Hamsters, dementsprechend zeigt die wildtypische Linie keine Expression von SULT1A1. Die erfolgreiche stabile Transfektion von SULT1A1 ist in V79 CS als starke Bande zu erkennen. Auffällig ist hier, dass das genetisch modifizierte Modell nur eine Einzelbande für SULT1A1 zeigt, wobei wildtypisches SULT1A1 als zwei Orthologe exprimiert wird. Die hinteren beiden Spuren zeigen die Leberkrebszelllinien HepG2 und Hep3B. HepG2 entstammen dem Hepatoblastom eines 15-jährigen Kaukasiers, wohingegen Hep3B dem hepatozellulären Karzinom eines achtjährigen Afroamerikaners entstammen [206]. HepG2-Zellen zeigen eine sehr starke Expression von SULT1A1. Hep3B-Zellen dagegen exprimieren kaum SULT1A1. Aufgrund der dargestellten Ergebnisse wurden in dieser Arbeit hauptsächlich HepG2-Zellen verwendet. Auch V79CS erscheinen im Bezug auf ihre SULT-Expression als valides Testsystem, erste Versuche wurden hier jedoch bereits im Rahmen der Dissertation

von Frau Anastasia Vollmer durchgeführt und zeigten eindeutig Adduktbildung und zytotoxische Effekte nach OHME-Inkubation [195]. V79CS exprimieren jedoch eine mutierte, nicht funktionelle Form von p53 und eignen sich daher nicht zur Untersuchung der p53-vermittelten Effekte von OHME [207].

3.2.2 Untersuchungen zur Reparatur der OHME-induzierten DNA-Addukte

OHME induziert in verschiedenen Testsystemen DNA-Addukte [8, 10, 31]. Eine mögliche Reparatur der induzierten Addukte wurde in HepG2-Zellen in zwei verschiedenen Setups getestet. Die massenspektrometrischen Messungen wurden in Kooperation mit der AG Jun.Prof. Dr. Alexander Cartus und der AG Prof. Dr. Elke Richling durchgeführt. Im ersten Setup wurden HepG2 ausgesät und nach erfolgter Adhäsion mit 2,5 und 25 μM OHME für 24-96 h behandelt. Negativkontrollen wurden mitgeführt. Abbildung 16 stellt die Ergebnisse für beide Konzentrationen und beide Addukte dar.

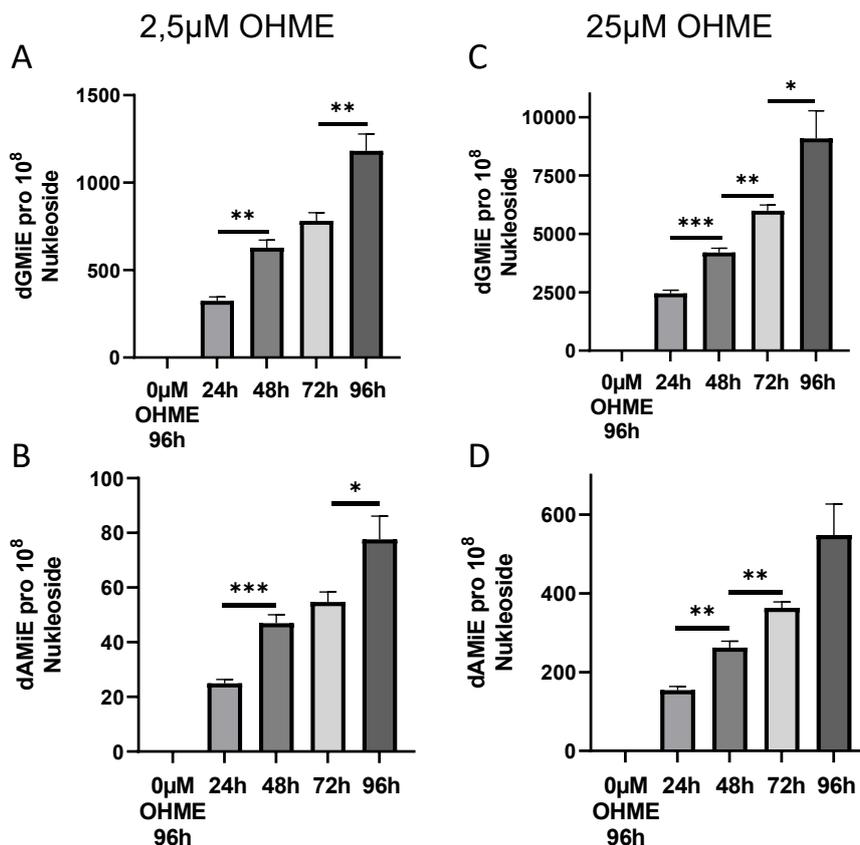


Abbildung 16: Analyse der DNA-Adduktbildung mittels LC-MS/MS nach Inkubation für 24-96 h mit OHME. n=4, nicht signifikante Ergebnisse sind nicht markiert, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

3. Ergebnisse

Die gezeigten Ergebnisse zeigen klar eine zeit- und konzentrationsabhängige Induktion von dG- und dA-MiE, wobei dG-MiE wie erwartet das Hauptaddukt darstellt. Da in den dargestellten Inkubationen OHME scheinbar noch nach langer Inkubationszeit nicht vollständig abreagiert ist und auch nach 96 h noch ein Anstieg des Adduktlevels zu beobachten ist, erwies sich das dargestellte Versuchssetup als inadäquat zur Untersuchung einer möglichen DNA-Addukt-reparatur. Aufgrund dessen wurde ein zweites Versuchssetup eingesetzt. Hier wurden HepG2-Zellen nach Aussaat und Adhäsion für 8 h mit den bereits verwendeten Konzentrationen OHME behandelt. Daraufhin wurde das Medium abgenommen, vorsichtig mit PBS gewaschen und frisches Medium zugegeben. Hier wurde Medium mit reduziertem FKS-Gehalt verwendet, um die Proliferation zu reduzieren und somit Verdünnungseffekte aufgrund des Zellwachstums auszuschließen. Anschließend wurde den Zellen 0 bis 72 h Zeit für die Reparatur gegeben. Negativkontrollen wurden mitgeführt. Abbildung 17 stellt die Ergebnisse dar.

Beide Addukte sind nach 8 h in beiden Konzentrationen detektierbar, für dA-MiE liegt das Adduktlevel bei der niedrigeren OHME-Konzentration jedoch zwischen LOD und LOQ, sodass an dieser Stelle auf die Berechnung von Signifikanzen aufgrund von fehlender Aussagekraft verzichtet wurde. In beiden Konzentrationen und für beide Addukte scheint zwischen 0 und 24 h eine Reparatur eines Teils der Addukte zu erfolgen. Nach 24 h hat sich ein Adduktlevel eingestellt, welches bis zum spätesten Zeitpunkt von 72 h erhalten bleibt.

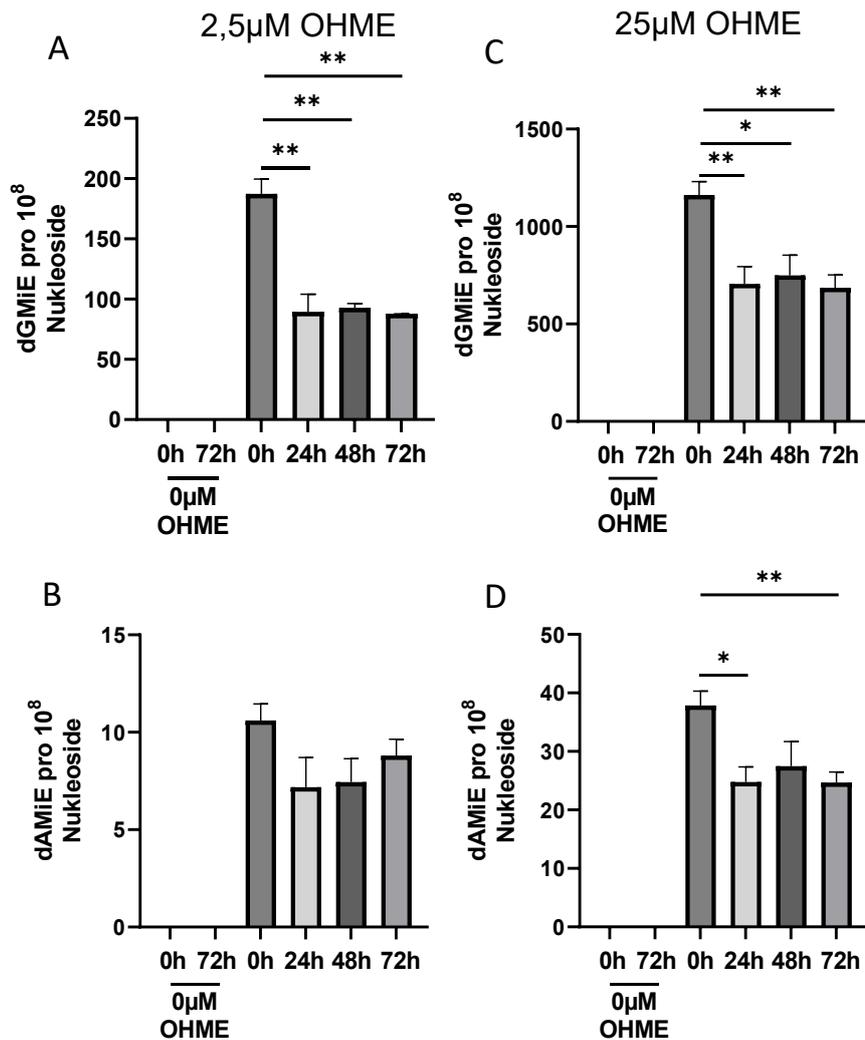


Abbildung 17: Analyse der DNA-Adduktbildung mittels LC-MS/MS nach Inkubation mit OHME für 8h und anschließender Recoveryzeit. n=4, nicht signifikante Ergebnisse sind nicht markiert, *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001; ****≤0,0001.

3.2.3 Einfluss von OHME auf die Zellviabilität sowie durchflusszytometrische Charakterisierung des induzierten Zelltods

Die Einflüsse von OHME auf die Viabilität von HepG2-Zellen wurden mittels Resazurinreduktionstest untersucht. Abbildung 18A stellt die Ergebnisse zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 h dar. Die Daten der Resazurinassays zeigen klar die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der zytotoxischen Effekte von OHME. Bei allen Zeitpunkten zeigt sich in niedrigen Konzentrationsbereichen bis maximal 25 μM OHME eine leichte Induktion der Zellviabilität und daraufhin eine konzentrationsabhängige Abnahme, welche mit längeren Inkubationzeiten stärker ausfällt. Die EC₅₀-Werte liegen bei 171 μM, 54 μM, und 25 μM für 24, 48 bzw. 72 h. Die non-linearen Fits die

3. Ergebnisse

zur Berechnung der EC_{50} -Werte herangezogen wurden sind in Anhang A2.1 zu finden. Zudem wurde eine AnnexinV-FITC/PI-Färbung durchgeführt und durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung 18B stellt die Ergebnisse inklusive repräsentativer Dot Plots dar. Die Daten wurden im Rahmen des Forschungspraktikums von Herrn Max Zeyer gewonnen. Mittels AnnexinV-FITC/PI-Färbung ist es möglich, lebende von apoptotischen und spätapoptotischen bzw. nekrotischen Zellen zu unterscheiden. Phosphatidylserin ist in lebenden Zellen zur Innenseite der Zellmembran orientiert und damit äußeren Reagenzien nicht zugänglich. In apoptotischen Zellen ist die Aktivität der Flippasen, die Phosphatidylserin auf der Innenseite der Membran halten, verringert, so dass dieses auch auf der äußeren Membran vorliegt [208]. AnnexinV-FITC besitzt nun die Eigenschaft, an Phosphatidylserin zu binden und damit apoptotische Zellen zu markieren. Diese erscheinen somit im Dot Plot in Quadrant Q4. Der Interkalanzfarbstoff PI kann intakte Zellmembranen nicht durchdringen und somit lebende, sowie apoptotische Zellen nicht färben. Erst nach Permeabilisierung der Zellmembran während der Nekrose bzw. in späten Phasen der Apoptose kann PI in die Zelle eindringen und an die DNA binden. Da AnnexinV-FITC auch durch beschädigte Membranen in die Zelle eindringen kann zeigen nekrotische bzw. spätapoptotische Zellen ein positives Signal für beide Farbstoffe und erscheinen somit in Quadrant Q2. Viable Zellen erscheinen in Q3. Die dargestellten Ergebnisse des AnnexinV-FITC/PI-Assays zeigen klar eine dosisabhängige Induktion von apoptotischen, sowie spätapoptotisch/nekrotischen Zellen. Im Falle der doppelt markierten Zellen ist, vor Allem aufgrund der im weiteren Verlauf dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse, davon auszugehen, dass es sich um spätapoptotische Zellen handelt und keine Nekrose induziert wird. Auch durchlichtmikroskopisch kann die zytotoxische Wirkung von OHME beobachtet werden. Abbildung 18C stellt repräsentative Aufnahmen von HepG2 nach OHME-Inkubation dar.

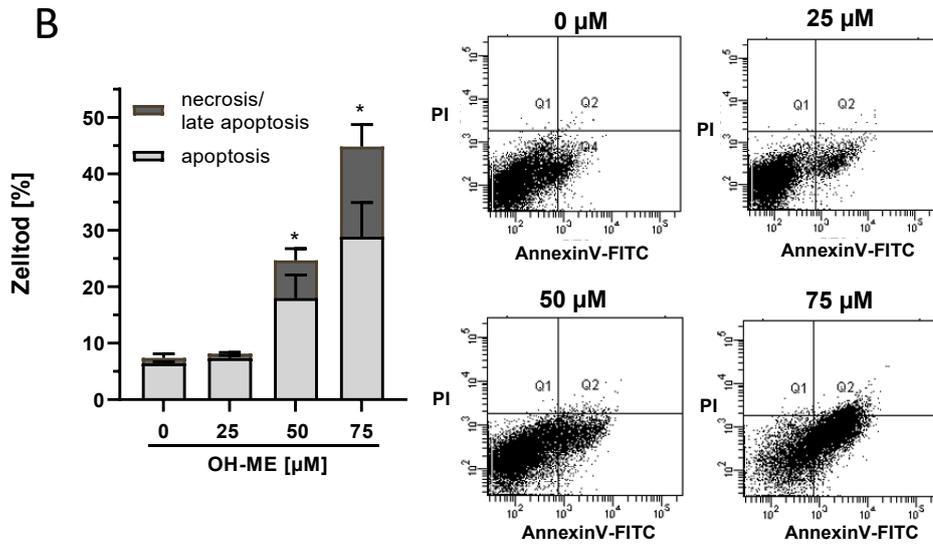
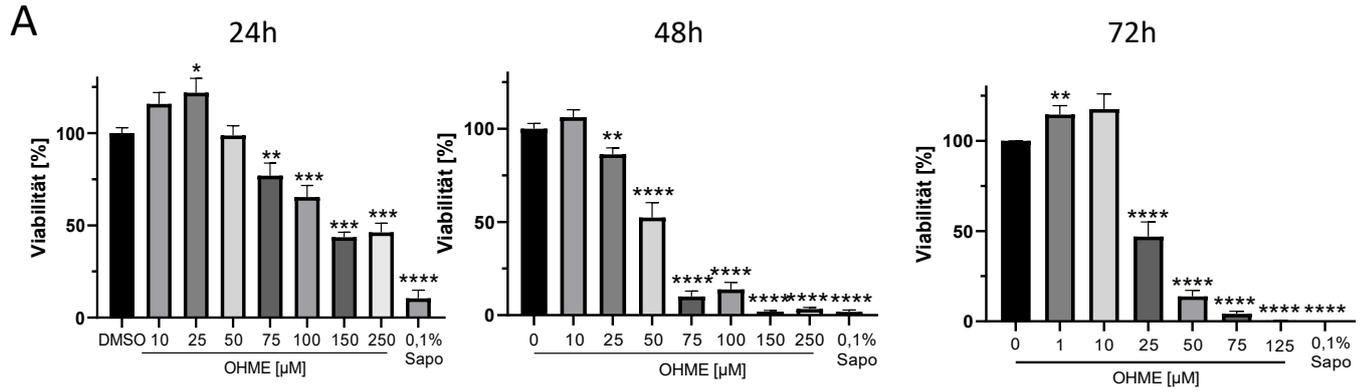


Abbildung 18: Untersuchungen zum OHME-induzierten Zelltod. A: Resazurinassay, HepG2 behandelt wie dargestellt, $n \geq 3$, keine Markierung = nicht signifikant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, Sapo = Saponin, B: AnnexinV-FITC/PI-Färbung, HepG2, 72h, $n = 3$, keine Markierung = nicht signifikant, * $p < 0.05$, inklusive repräsentativer Dot Plots. Der Datensatz wurde im Rahmen des Forschungspraktikums von Max Zeyer gewonnen. C: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von HepG2 nach Behandlung mit OHME, 48h, dargestellt sind repräsentative Aufnahmen mit zehnfacher Vergrößerung.

3. Ergebnisse

3.2.4 Untersuchungen zur Rolle von p53 im OHME-induzierten Zelltod

Inkubation mit OHME induziert p53 in pMH (s. 3.1.5) als auch, wie in Abbildung 19 dargestellt, in HepG2-Zellen. Die Blots, sowie deren Analyse wurden im Rahmen des Forschungspraktikums von Frau Nane Scheidt durchgeführt.

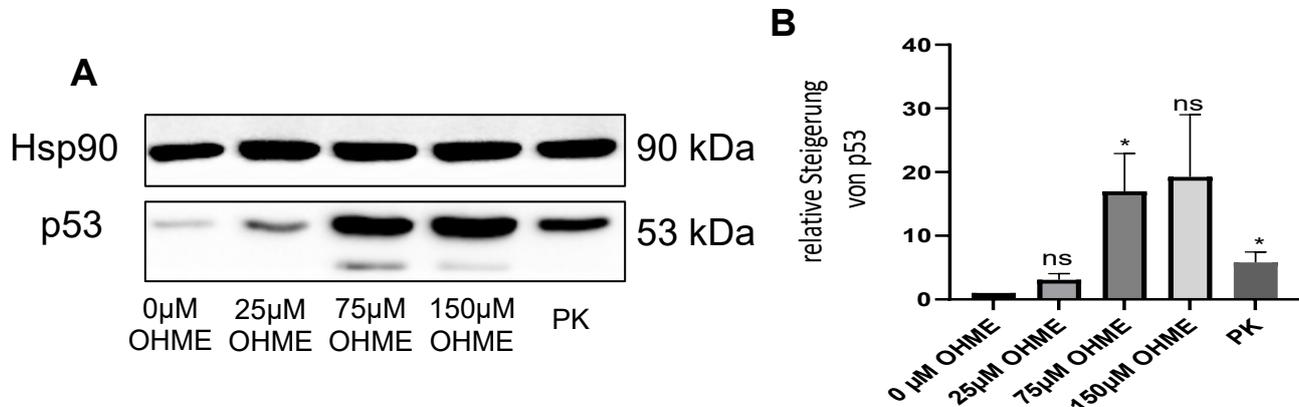


Abbildung 19: Induktion von p53 nach OHME-Inkubation in HepG2. A: repräsentativer Western Blot. B: Densitometrische Auswertung der Western Blots, 24h, n=4, ns=nicht signifikant, * $p \leq 0,05$, PK = 10 µM Etoposid. Die dargestellten Daten wurden im Rahmen des Forschungspraktikums von Frau Nane Scheidt gewonnen.

Da das Tumorsuppressorprotein p53 eine Schlüsselrolle in verschiedenen apoptotischen Prozessen spielt, wurde dessen Rolle im OHME-induzierten Zelltod im Weiteren durch verschiedene Herangehensweisen genauer untersucht.

3.2.4.1 siRNA-vermittelter Knockdown von p53

Zu genaueren Aufklärung der Rolle von p53 wurden verschiedene Versuche mit siRNA-vermitteltem Knockdown von p53 durchgeführt. Abbildung 20 stellt die Ergebnisse dieser Versuche dar. Alle Versuche wurden mit scrRNA als Kontrolle durchgeführt.

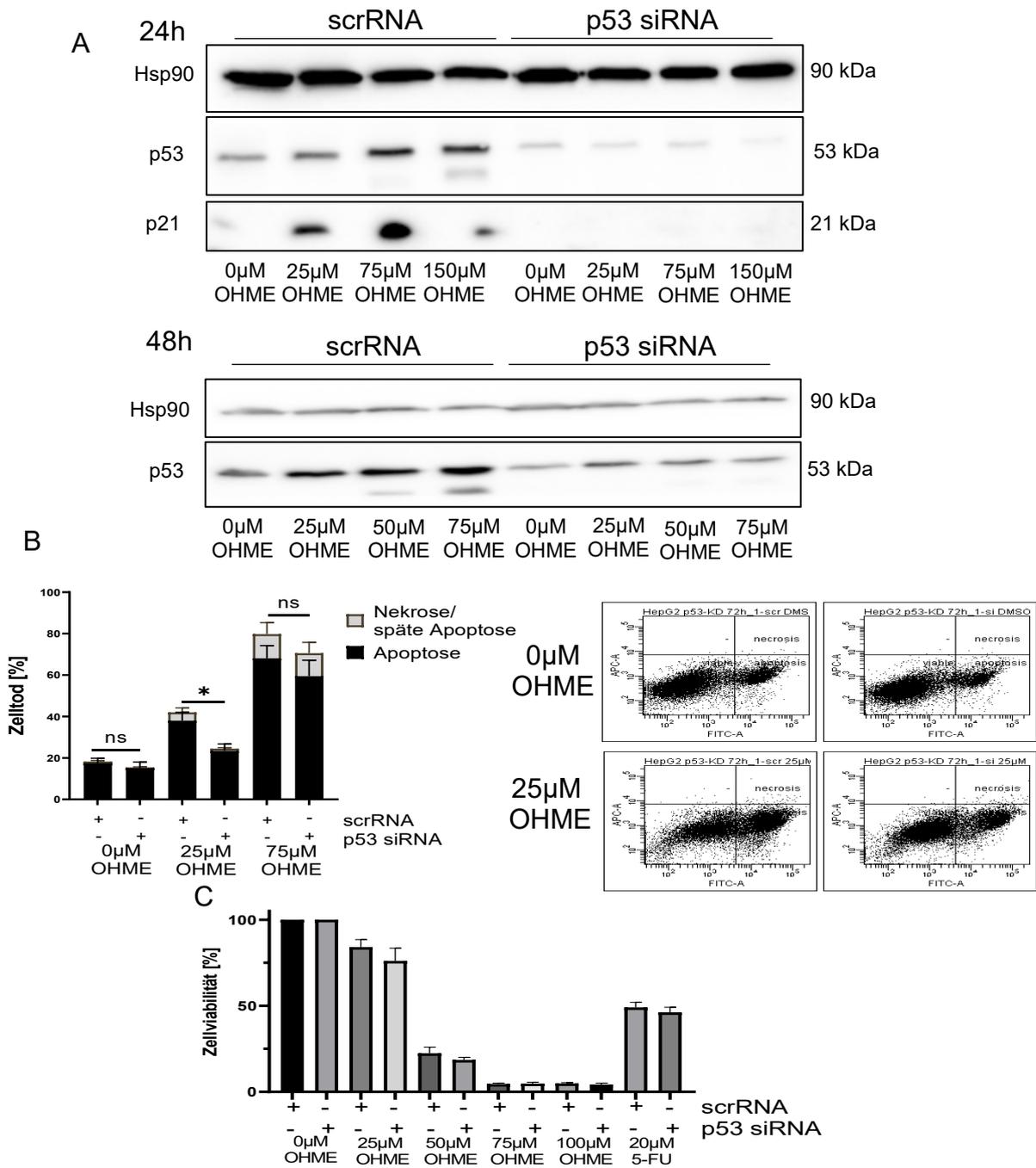


Abbildung 20: Untersuchungen zur Inkubation mit OHME mit siRNA vermitteltem Knockdown von p53. A Analyse der Effekte des p53-Knockdowns auf Proteinebene mittels Western Blot nach 24 und 48h, dargestellt sind repräsentative Blots. B: AnnexinV-FITC/PI-Färbung nach Behandlung scr/p53 siRNA und Inkubation mit OHME inklusive repräsentativer Dot Plots, 48h, n=5, ns=nicht signifikant, p<0,05. C: Resazurinassay nach Behandlung scr/p53 siRNA und Inkubation mit OHME, 48h, n=4, Signifikanzen wurden innerhalb der Inkubationen zwischen scr und siRNA berechnet, es wurden keine Signifikanzen festgestellt.

3. Ergebnisse

Die Effizienz des Knockdowns wurde in Abbildung 20A dargestellt. Zudem wurde ein Knockdownversuch ohne Behandlung mit OHME für bis zu 72 h durchgeführt. Auch hier bleibt der Knockdown bis zum Ende der Inkubationszeit stabil. Die Ergebnisse sind in Anhang A2.10 zu finden. Des Weiteren unterbindet die Behandlung mit siRNA eine Induktion von p21 als nachgeschaltetes Ziel von p53.

Zusätzlich zu den dargestellten Western Blots, wurden einerseits durchflusszytometrische AnnexinV-FITC/PI-Färbungen und andererseits Resazurinassays durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20B und 20C dargestellt. In der durchflusszytometrischen Analyse konnte in der Inkubation mit 25 μM OHME-Inkubation eine signifikant verringerte Zelltodrate im p53-Knockdown festgestellt werden. Für die 75 μM Inkubation zeigt sich die gleiche Tendenz, wohingegen die Daten hier keine statistische Signifikanz ergeben. In den dargestellten Resazurinassays zeigt OHME signifikante Effekte, jedoch zeigt der Knockdown von p53 keinerlei Unterschiede.

3.2.4.2 Inhibition von p53 mit Pifithrin α

Als weiterer Versuchsansatz wurde die Inhibition von p53 mit Hilfe des pharmakologischen Inhibitors Pifithrin α (Pifa) gewählt [209]. Hierzu wurden die Zellen eine Stunde vor Beginn der Inkubation mit OHME mit 20 μM Pifithrin α vorbehandelt und anschließend weiter wie in anderen Versuchreihen verfahren. Abbildung 21 stellt die Effekte einer Coinkubation mit Pifithrin α und OHME dar.

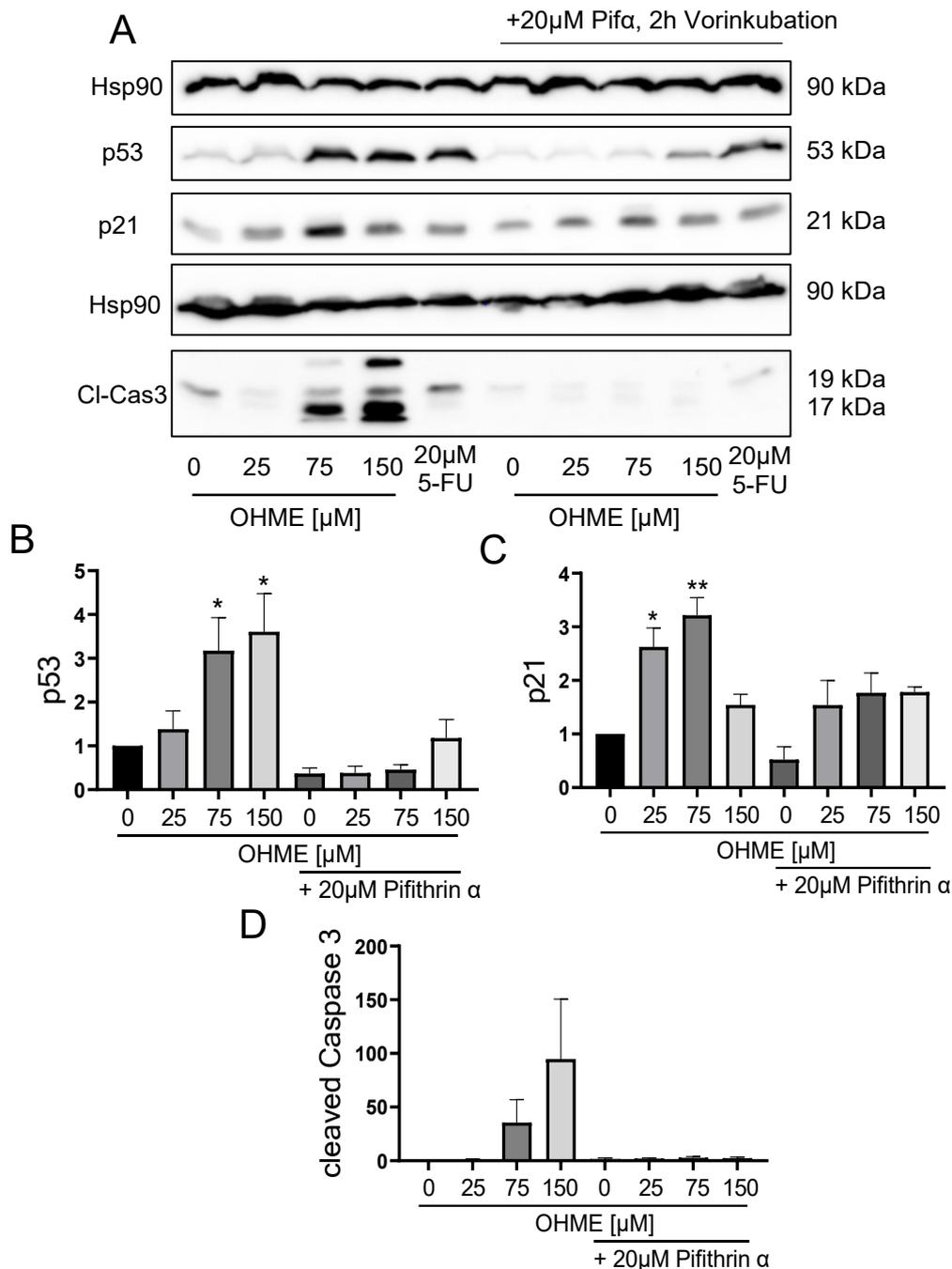


Abbildung 21: Analyse der Effekte von des p53-Inhibitors Pifithrin α auf die Proteinlevel von p53, p21 und Cl-Cas3 nach OHME-Inkubation. A: Repräsentativer Western Blot. B-D: Densitometrische Auswertungen, 24h, n=3, *p<0.05, **p<0.01.

Die Proteinlevel von p53, p21 und cleaved-Caspase 3 wurden auch hier mittels Western Blot untersucht. p53 wird durch OHME konzentrationsabhängig signifikant induziert. Pifithrin α unterdrückt diese Induktion, einzig in der Inkubation mit 150 μ M OHME ist ein leichter, nicht signifikanter Anstieg des Proteinlevels zu erkennen. Auch p21 wird signifikant von OHME induziert. Koinkubation mit Pifithrin α bewirkt auch hier eine Abschwächung der Induktion. Eine dosisabhängige Zunahme ist auch für

3. Ergebnisse

cleaved-Caspase 3 zu beobachten. Bemerkenswerterweise wird die Caspasespaltung durch Pifithrin α vollständig unterbunden.

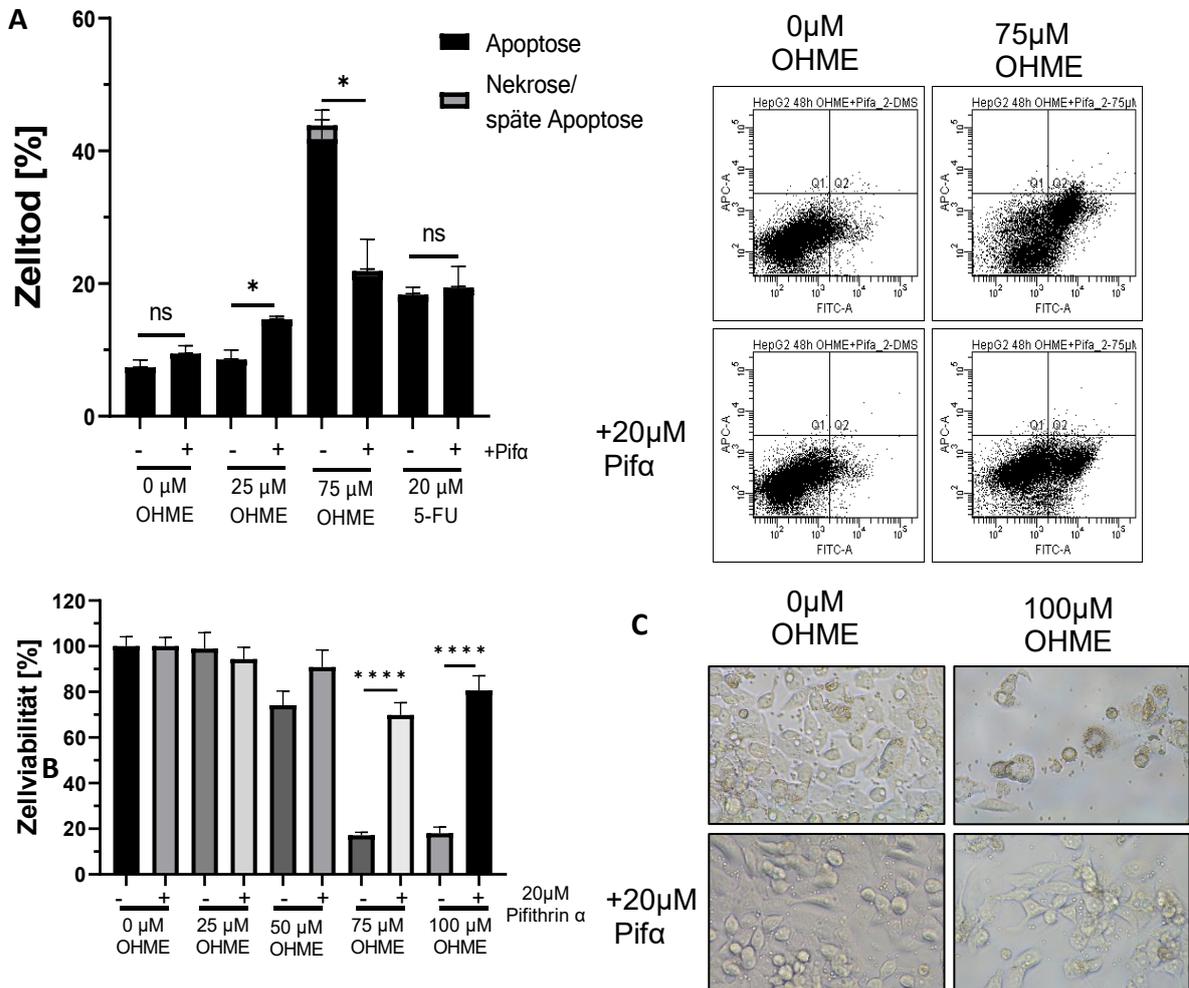


Abbildung 22: Untersuchungen zur Wirkung des p53-Inhibitors Pifithrin α auf den OHME-induzierten Zelltod. A: Durchflusszytometrische Analyse des OHME-induzierten Zelltods nach Koinkubation mit Pifithrin α , 48h, n=5, ns=nicht signifikant, *p<0,05, repräsentative Dot Plots sind dargestellt. B: Resazurinassay mit Koinkubation von OHME und Pifithrin α , 48h, n=4, nicht signifikante Ergebnisse sind nicht markiert, ****p<0,0001. C: durchlichtmikroskopische Aufnahmen von HepG2 inkubiert wie angegeben 48h, repräsentative Aufnahmen sind dargestellt.

In Ergänzung zu den dargestellten Western Blots wurden zusätzlich einerseits durchflusszytometrische AnnexinV-FITC/PI-Färbungen und andererseits Resazurinassays durchgeführt. Abbildung 22 stellt diese Ergebnisse inklusive repräsentativer Dot Plots und durchlichtmikroskopischer Aufnahmen dar.

In der durchflusszytometrischen Analyse des induzierten Zelltods mittels AnnexinV-FITC/PI-Färbung sind sowohl in den Inkubationen mit 25 μ M OHME als auch in den Inkubationen mit 75 μ M signifikante Effekte zu erkennen, wobei die Koinkubation in der niedrigeren Konzentration die Zytotoxizität von OHME leicht zu verstärken scheint. In der höheren Konzentration hingegen blockiert Pifithrin α effektiv die apoptotischen Effekte von OHME. Die Effekte des Inhibitors sind auch in den repräsentativen Dot Plots zu erkennen. Überraschenderweise werden die proapoptischen Effekte von 5-FU nicht durch Pifithrin α beeinflusst. Auch in den Daten aus den Resazurinassays inhibiert Pifithrin α effektiv den OHME-induzierten Zelltod, mit höchst signifikanten Werten ab 75 μ M OHME. Die leicht erhöhte Zytotoxizität in der Koinkubation von Pifithrin α und 25 μ M OHME konnte hier nicht repliziert werden. Auch in den dargestellten repräsentativen durchlichtmikroskopischen Aufnahmen sind die protektiven Effekte von Pifithrin α klar zu erkennen. Zusammenfassend belegen diese Versuche, dass eine Inhibition des Tumorsuppressors p53 mit Pifithrin α HepG2 Zellen vor OHME-induzierter Apoptose schützt.

3.2.4.3 Inhibition von Mdm2 mit Nutlin3a

Das Tumorsuppressorprotein p53 steht in einer autoregulatorischen Schleife mit der E3-Ubiquitin-Ligase Mdm2. Wird p53 induziert, induziert dieses wiederum selbst Mdm2, welche p53 ubiquitinyliert und damit für den proteasomalen Abbau markiert [96]. Aufgrund dieser Funktion von Mdm2 wurde der pharmakologische Inhibitor Nutlin3a (Nut3a) ausgewählt [210], um die Ubiquitinylierung von p53 zu unterbinden und damit die p53-assoziierten Effekte zu verstärken.

Zur Untersuchung der Effekte einer Koinkubation von OHME und Nutlin3a wurden einerseits mittels Western Blot die Proteinlevel von p53 und p21 untersucht, zudem wurde eine durchflusszytometrische Analyse des Zelltods mittels AnnexinV-FITC/PI-Färbung durchgeführt. Zellen wurden für 2 h mit 5 μ M Nutlin3a vorbehandelt, dann wurde OHME zugegeben. Abbildung 23 stellt die Ergebnisse dar, diese wurden teilweise im Rahmen der von mir betreuten Masterarbeit von Herrn Heiko Damm gewonnen.

3. Ergebnisse

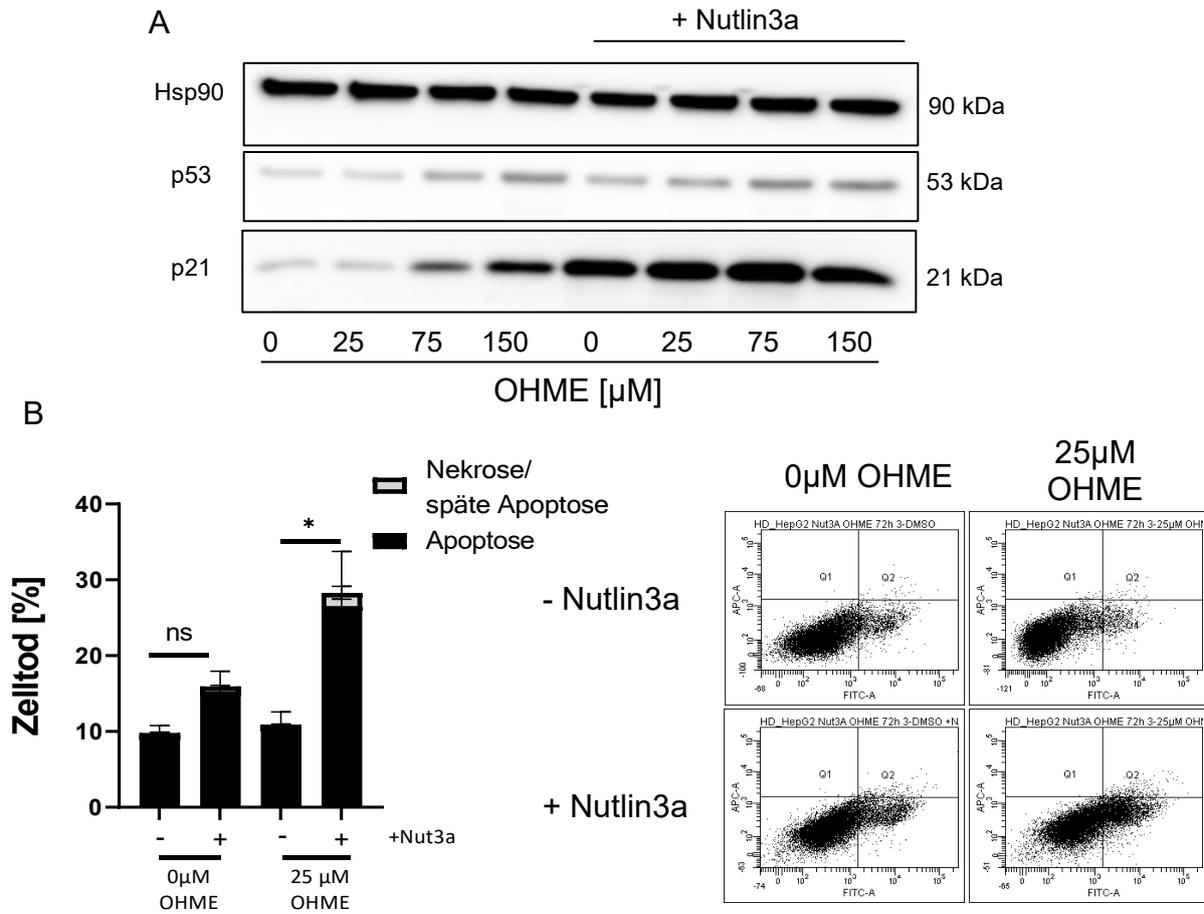


Abbildung 23: Untersuchungen zur Wirkung des Mdm2-Inhibitors Nutlin3a auf den OHME-induzierten Zelltod. A: Western Blot in HepG2, 24h, n=3, dargestellt ist ein repräsentativer Blot. B: AnnexinV-FITC/PI-Färbung von HepG2 nach Koinkubation mit OHME und 5 μM Nutlin3a inklusive repräsentativer Dot Plots, 48h, n=6, ns=nicht signifikant, *p<0,05. Die dargestellten Daten wurden größtenteils im Rahmen der Masterarbeit Heiko Damm gewonnen.

Auf Proteinebene zeigt sich überraschenderweise nur eine leichte Induktion von p53 durch die Koinkubation von OHME mit Nutlin3a im Vergleich zur Inkubation mit OHME allein. p21 als nachgeschaltetes, direktes Ziel von p53 hingegen wird durch Nutlin3a stark induziert. Auf Zelltodebene zeigt sich bei 25 μM OHME klar der Effekt von Nutlin3a. Hier sind durch OHME allein noch kaum bis keine zytotoxischen Effekte zu erwarten, bei Koinkubation mit Nutlin3a steigt die Apoptoserate signifikant auf knapp 30 % an.

3.2.5 Untersuchungen zu den Effekten von OHME auf transkriptioneller Ebene

Die Effekte von OHME auf verschiedene apoptoseassoziierte Gene wurden in Kooperation mit der AG Prof. Dr. Markus Christmann von der Universitätsmedizin Mainz auf transkriptioneller Ebene untersucht. Abbildung 24 stellt die Ergebnisse dar.

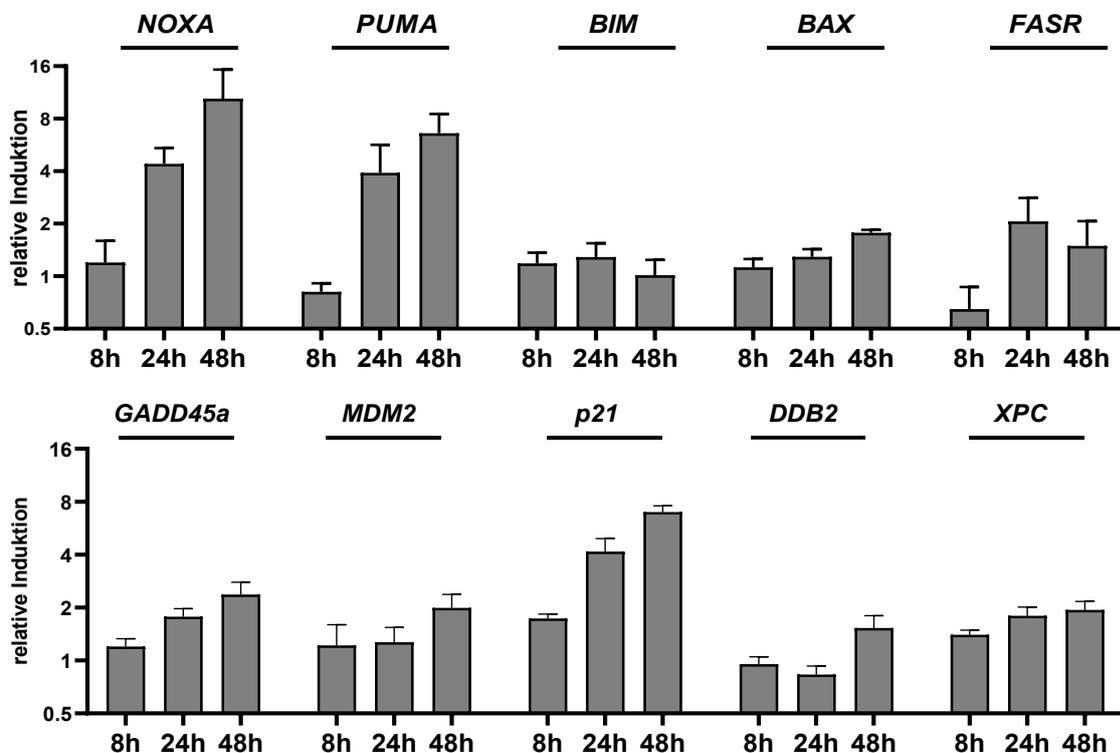


Abbildung 24: Genexpressionsanalyse verschiedener DNA-Reparatur- und Apoptose-assoziiierter Gene. n=4, 75 μ M OHME, DMSO-Kontrollen wurden für jeden Zeitpunkt mitgeführt und jeweils als eins gesetzt.

Mit *Noxa*, *Puma*, *Bim* und *Bax* wurden vier Vertreter der pro-apoptotischen Bcl2-Proteine untersucht, wobei die drei erst genannten BH3only Proteine sind und Bax ein pro-apoptotisches Effektorprotein darstellt. Noxa und Puma sind transkriptionell regulierte Ziele von p53 und zeigen in den durchgeführten Analysen eine starke Induktion durch OHME. Die Regulation von Bim ist komplex und genauer in Kapitel 1.5.2 dargestellt. Auf transkriptioneller Ebene scheint OHME keine Effekte auf Bim zu haben. Auch auf den pro-apoptotischen Effektor Bax scheinen die Effekte von OHME auf transkriptioneller Ebene nur gering zu sein. FasR ist ein Rezeptorprotein der TNF-Rezeptorfamilie, welches nach Bindung des passenden Liganden trimerisiert und dadurch extrinsische Apoptose induziert [48]. Die Effekte von OHME auf die Expression von *FasR* sind nicht klar zeitabhängig. Nach 8 h ist die Expression verringert, nach 24 h ist die Expression ungefähr doppelt so hoch wie in unbehandelten Zellen, wohingegen diese Induktion nach 48 h wieder leicht abnimmt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse für *FasR* uneindeutig sind,

3. Ergebnisse

die Effekte von OHME jedoch höchstens gering ausfallen. *Gadd45a* ist ein weiteres Zielgen von p53, kann jedoch auch über andere Mechanismen reguliert werden, und kann über Induktion von *mitogen activated protein kinase kinase kinase 4* (MEKK4) die MAP-Kinasen JNK und p38 aktivieren [211]. Für *Gadd45a* zeigt sich eine zeitabhängige Induktion der Transkription mit einem maximalen Induktionsfaktor von 2,4 nach 48 h. Auch für den negativen Regulator von p53, Mdm2, zeigt sich eine zeitabhängige Induktion mit einem Maximalwert von 2 nach 48 h. p21 stellt ein weiteres Zielgen von p53 dar, jedoch wirkt dieses nicht pro-apoptotisch, sondern induziert einen Zellzyklusarrest und gibt der Zelle somit Zeit, mögliche DNA-Schäden zu reparieren [212]. Für p21 konnte klar eine starke zeitabhängige Induktion mit einem Maximalwert von 7 für 48 h nachgewiesen werden. Die beiden DNA-Reparatur-assoziierten Gene DDB2 und XPC werden zeitabhängig induziert mit Maximalwerten von 1,5 bzw. 1,9 nach 48 h. Beide codieren für Erkennungsproteine der GG-NER [65, 68].

3.2.6 Untersuchungen zum Einfluss von OHME auf die mitochondrielle Integrität

3.2.6.1 OHME aktiviert den pro-apoptotischen Effektor Bax

Die Induktion von p53 durch OHME legt intrinsische Apoptose als den hauptsächlich induzierten Zelltodweg nahe. Intrinsische Apoptose geht mit dem Verlust der Integrität der äußeren mitochondrialen Membran durch MOMP-Bildung einher. Das pro-apoptotische Bcl2-Protein Bax stellt in diesem Prozess einen wichtigen Faktor dar, da dieses sich nach Aktivierung in die äußere mitochondrielle Membran einlagern kann

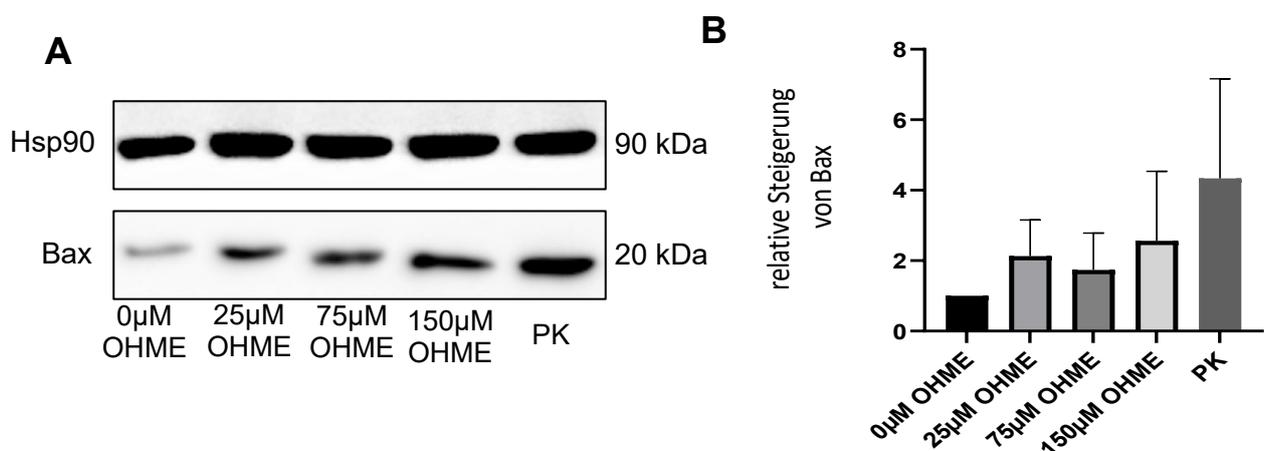


Abbildung 25: Expression von Bax nach OHME-Inkubation in HepG2. A: repräsentativer Western Blot. B: Densitometrische Auswertung der Western Blots, 24h, n=4, es wurden keine Signifikanzen gefunden, PK = 10 µM Etoposid. Die dargestellten Daten wurden im Rahmen des Forschungspraktikums von Frau Nane Scheidt gewonnen.

und dadurch Porenbildung induziert [93]. Die Proteinlevel von Bax wurden mittels Western Blot überprüft, Abbildung 25 stellt die Ergebnisse dar.

Auf Proteinebene, wie auch auf Genebene (s. 3.2.5) erfolgt maximal eine geringe Induktion von Bax. Da Bax jedoch in nicht apoptotischen Zellen an antiapoptotische Bcl2-Proteine gebunden vorliegt und erst nach Freisetzung aus diesem Komplex aktiv wird, wurde zusätzlich zum gezeigten Western Blot eine Induktion von aktivem Bax mittels Immunfluoreszenz untersucht. Abbildung 26 stellt repräsentative Aufnahmen, sowie eine statistische Auswertung des Versuchs dar.

3. Ergebnisse

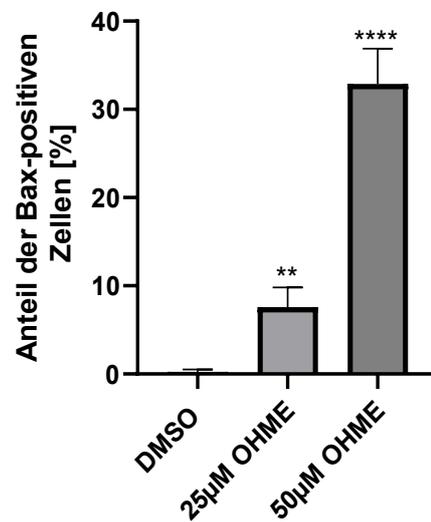
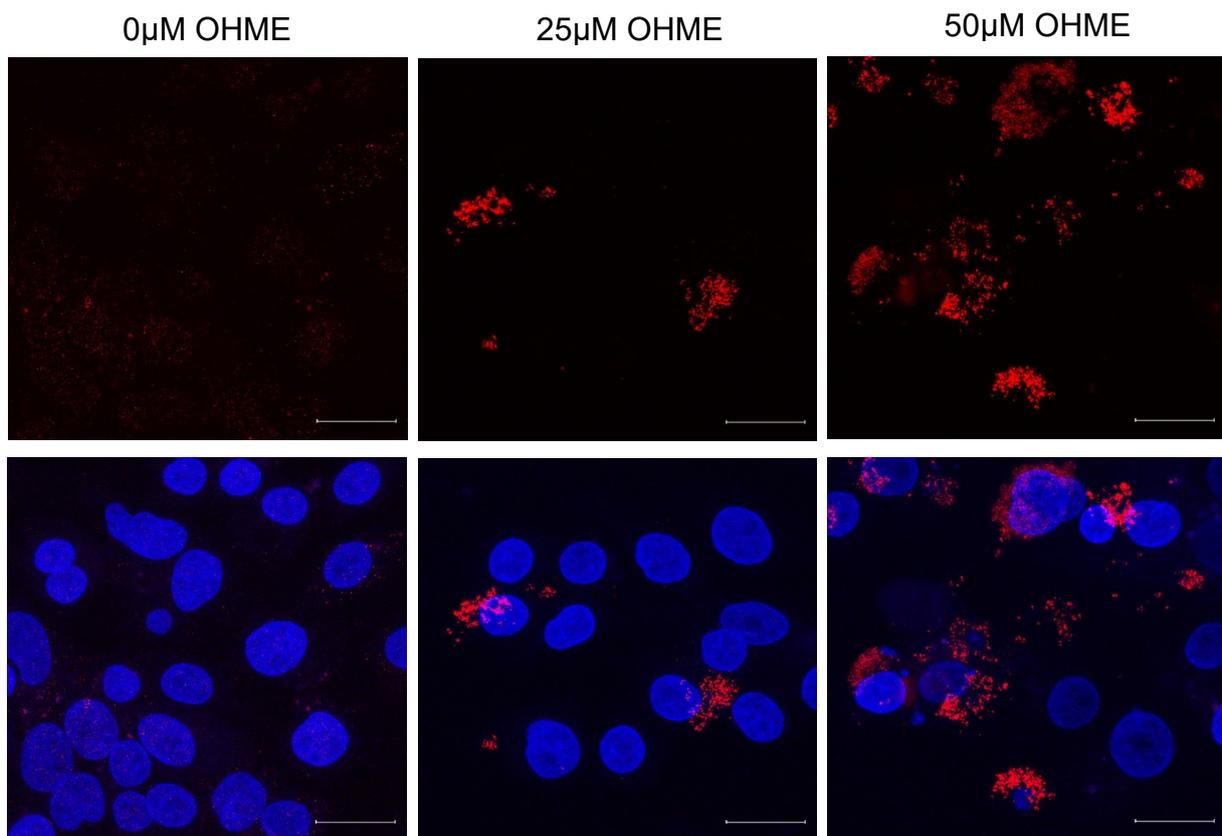


Abbildung 26: Immunfluoreszenzfärbung von aktivem Bax und Zellkernen (blau) nach OHME-Behandlung inkl. statistischer Auswertung. 48h, n=3, repräsentative Bilder sind dargestellt, Größenbalken = 20 µm, **p≤0,01; ****≤0,0001.

Abbildung 26 zeigt klar eine starke, dosisabhängige Aktivierung von Bax. Die Aufnahmen wurden dahingehend ausgewertet, dass Bax-positive Zellen gezählt wurden und Anhand der DAPI-Färbung die Gesamtzahl der Zellen bestimmt wurde und hieraus ein prozentualer Anteil der Bax-positiven Zellen berechnet wurde.

Zusätzlich zum dargestellten Versuch wurde eine Kofärbung von aktivem Bax und den Mitochondrien mittels MitoTracker RedCMXRos durchgeführt. Abbildung 27 stellt repräsentative Aufnahmen dar. Abbildung 28 zeigt Aufnahmen mit größerem Zoom, um die Lokalisation von Bax an den Mitochondrien besser ersichtlich zu machen.

Auch in Abbildung 27 ist klar eine dosisabhängige Induktion von aktivem Bax zu erkennen. Zudem ist an der Mitochondrienfärbung eine Abnahme des Fluoreszenzsignales nach Inkubation mit OHME zu erkennen, welches sehr wahrscheinlich auf den Verlust des Membranpotentials aufgrund der Bax-induzierten MOMP-Bildung zurückzuführen ist. Des Weiteren lassen sich auch am DAPI-Kanal Effekte von OHME erkennen. Die dargestellten Bax-positiven Zellen zeigen sowohl in der 25 μM als auch in der 50 μM OHME-Konzentration eine mehr oder weniger fortgeschrittene Kondensation der DNA.

Abbildung 28 zeigt zusätzlich eine Aufnahme mit höherer Vergrößerung im Vergleich zu den Aufnahmen aus Abbildung 27. Zudem wurde hier die Laserintensität im MitoTracker-Kanal erhöht um den Signalverlust aufgrund der Membrandepolarisation optisch auszugleichen, d.h. die Signalintensitäten im MitoTracker-Kanal von Abbildung 27 und Abbildung 28 sind nicht vergleichbar. Abbildung 28 illustriert hier die klare Lokalisation des aktivierten Bax an den Mitochondrien.

3. Ergebnisse

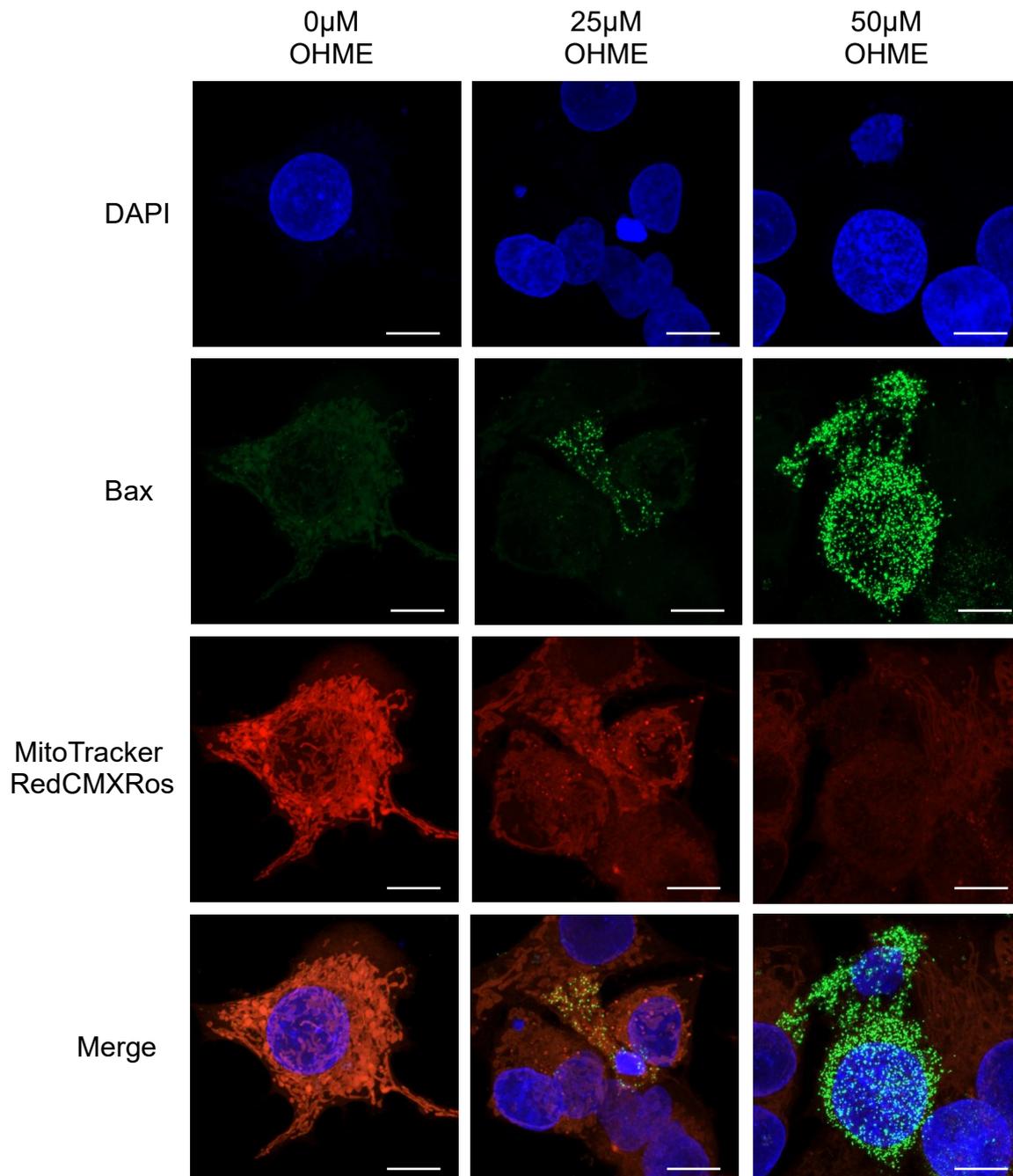


Abbildung 27: Cofärbung von aktivem Bax, Mitochondrien und Zellkernen. n=3, 48h, aktives Bax [1], Mitochondrien [2], Zellkerne (blau), dargestellt sind repräsentative Aufnahmen, Größenbalken = 10 μ m.

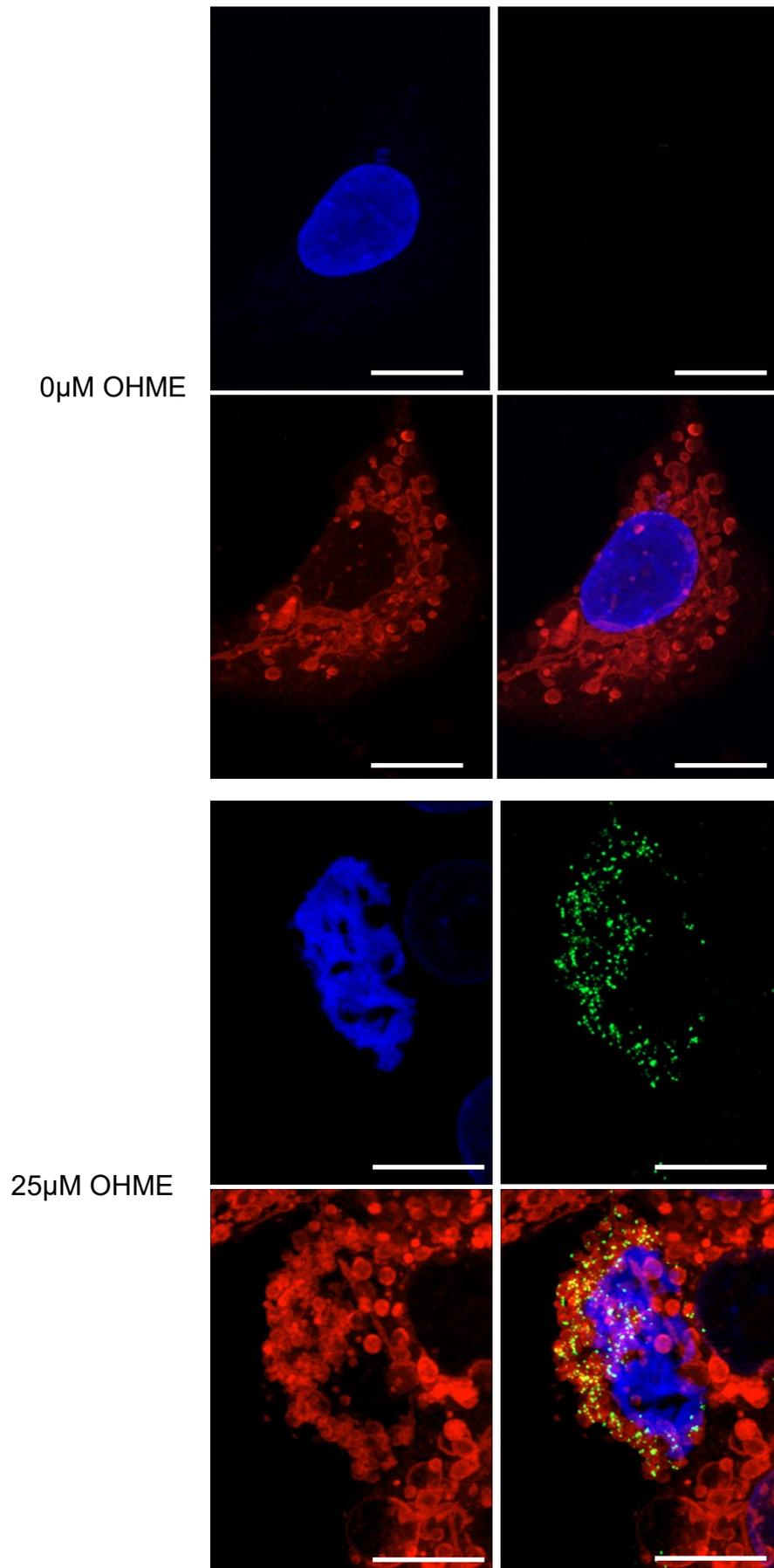


Abbildung 28: Cofärbung von aktivem Bax, Mitochondrien und Zellkernen (Vergrößerungen). Dargestellt sind Einzelzellen nach Behandlung mit oder ohne 25 μ M OHME., n=3, 48h, aktives Bax (grün), Mitochondrien (rot), Zellkerne (blau), dargestellt sind repräsentative Aufnahmen, Größenbalken = 10 μ m.

3. Ergebnisse

3.2.6.2 OHME induziert den Ausstrom von Cytochrom C aus den Mitochondrien

Wie im vorhergehenden Kapitel dargestellt induziert OHME die MOMP-Bildung durch Aktivierung des pro-apoptotischen Bcl2-Proteins Bax. Folge der Permeabilisierung ist ein Ausstrom von Cytochrom c aus den Mitochondrien, welcher üblicherweise als irreversibles Signal zur Einleitung der mitochondrialen Apoptose angesehen wird [93]. Daher wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von Cytochrom C durchgeführt (Abb. 29).

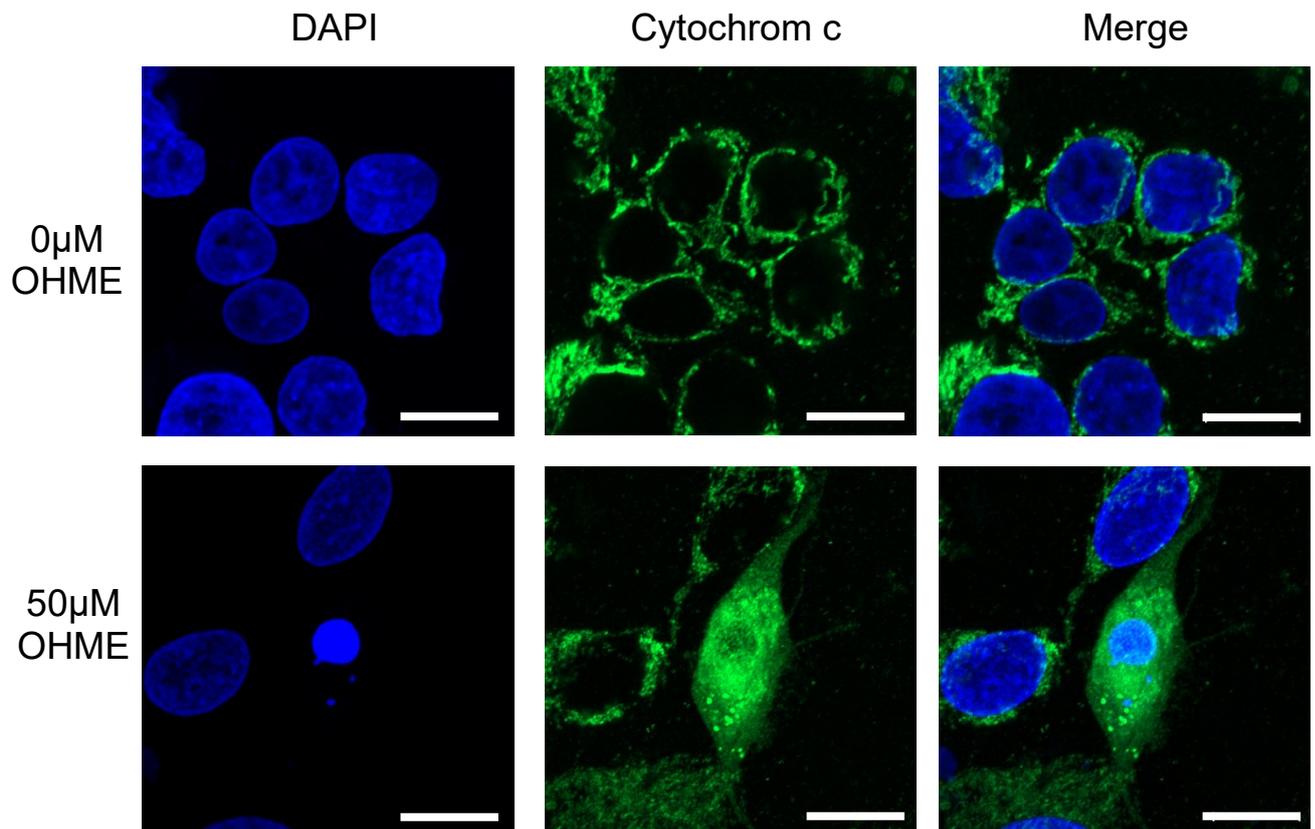


Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung von Cytochrom c mit DAPI-Kernfärbung nach OHME-Behandlung. 48h, n=3, dargestellt sind repräsentative Aufnahmen, Größenbalken = 10µm.

Hier ist zu erkennen, dass nach Inkubation mit OHME das Fluoreszenzsignal nicht mehr klar definiert in bestimmten zellulären Regionen vorliegt, sondern ein Ausstrom aus den Mitochondrien erfolgt und daher das Signal diffus im gesamten Zytoplasma und teilweise sogar intranukleär vorliegt.

3.2.6.3 OHME induziert Caspasespaltung

Konsequenz aus der in den vorhergehenden Kapiteln dargestellten Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran ist die Bildung des Apoptosoms aus Apaf1 und Cytochrom C im Zytoplasma. Diese wiederum aktiviert durch Spaltung Initiatorcaspasen, welche wiederum Effektorcaspasen aktivieren [212]. Die

Aktivierung dieser Caspasekaskade als Konsequenz des Verlusts der mitochondrialen Membranintegrität wurde mittels luminometrischem Assay gemessen und mittels Western Blot bestätigt. Abbildung 30 stellt die Ergebnisse dar.

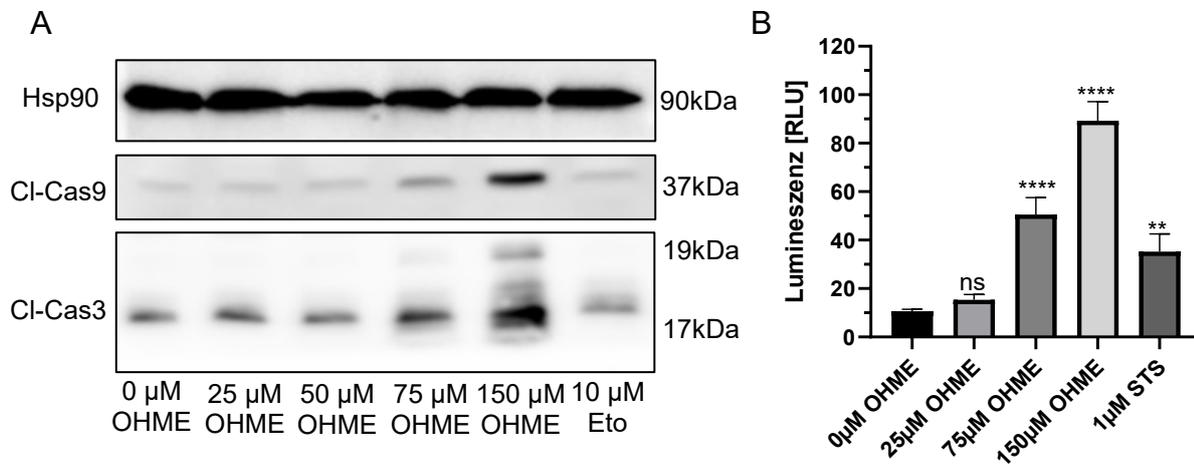


Abbildung 30: Untersuchungen zu Caspasespaltung und -aktivität. A: Western Blot Analyse von cleaved Caspase 3 und 9, 24h, n=1. B: Luminometrischer Caspase3/7-Aktivitätsassay. 24 h, n=3, ns = nicht signifikant, ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$, STS = Staurosporin.

Der Western Blot zeigt die Spaltprodukte von Procaspase 3 und 9. Hier ist eine konzentrationsabhängige Induktion sowohl für die Initiatorcaspase 9 als auch die Effektorcaspase 3 zu erkennen. Der dargestellte Assay detektiert luminometrisch die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7. Hier ist eine hochsignifikante, konzentrationsabhängige Steigerung der Caspaseaktivität zu erkennen.

3. Ergebnisse

3.2.7 Untersuchungen zur Rolle des BH3*only* Proteins Bim im OHME-induzierten Zelltod

3.2.7.1 Inkubation mit OHME führt zur Akkumulation von Bim an den Mitochondrien

Bim ist im Gegensatz zu Puma und Noxa ein BH3*only* Protein, welches nicht direkt von p53 reguliert wird [213, 214]. Aufgrund dessen könnte man bei einer Induktion von Bim durch OHME auf mögliche weitere proapoptotische Signalkaskaden Rückschlüsse ziehen. Die Effekte von OHME auf das Bim-Level, sowie auf dessen Lokalisation wurden mittels Immunfluoreszenzmessung in Kofärbung mit den Mitochondrien untersucht. Abbildung 31 stellt die Ergebnisse dar und zeigt eindeutig eine dosisabhängige Induktion des BH3*only*-Proteins Bim. Des Weiteren ist deutlich eine Kolo-kalisation von Bim mit den Mitochondrien zu erkennen. Zudem ist vor allem in den höheren Konzentrationen eine Kondensation der DNA im DAPI-Kanal zu erkennen. Die Färbungen wurden im Rahmen des Forschungspraktikums von Alexander Regier durchgeführt. Ilimachinon (IQ) wurde an dieser Stelle als Positivkontrolle verwendet, da sich in vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe gezeigt hat, dass IQ Bim stark induziert [215].

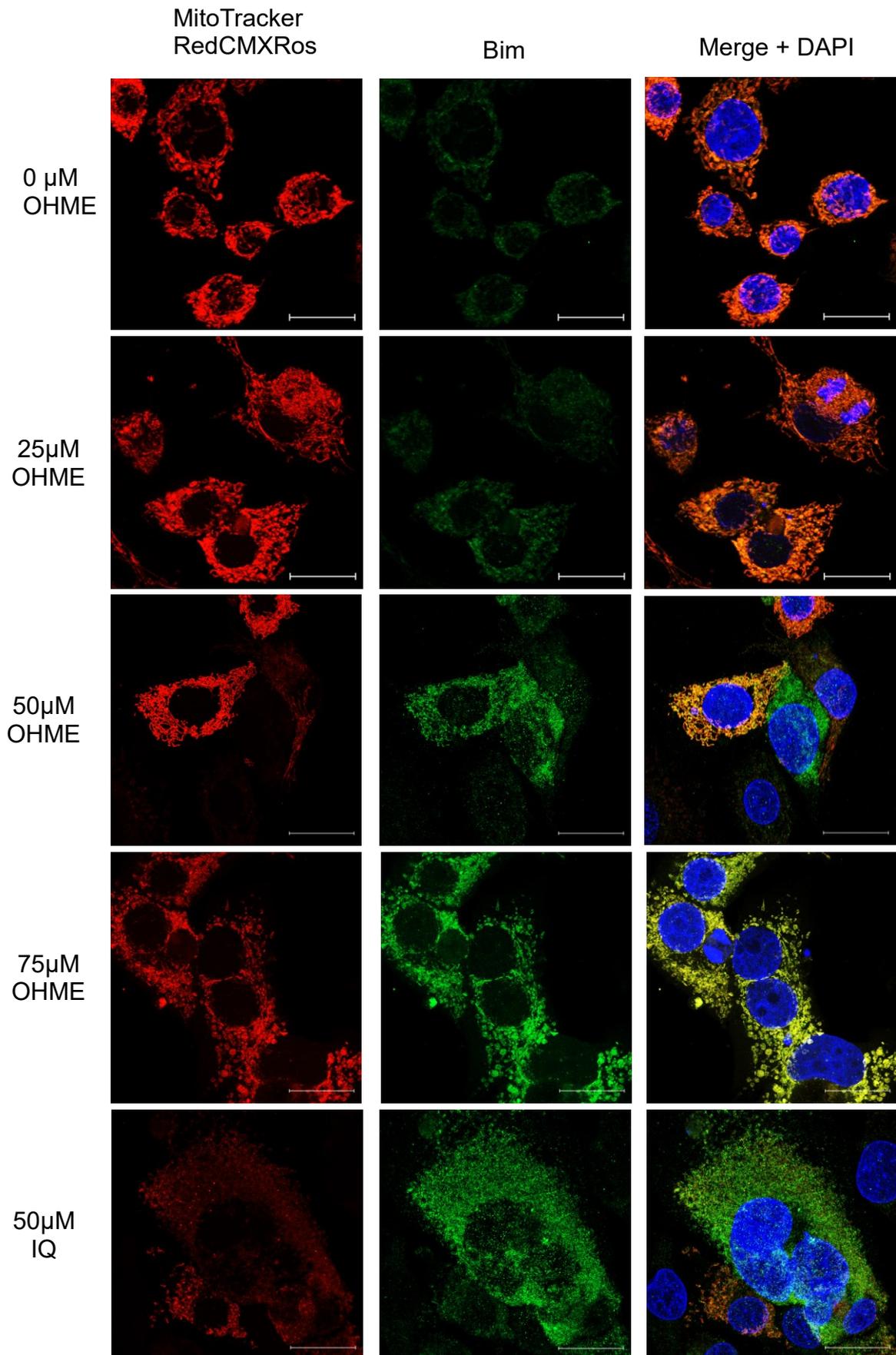


Abbildung 31: Immunfluoreszenzfärbung von Bim inkl. Kofärbung mit MitoTracker RedCMXRos. 48h, n=3, repräsentative Bilder sind dargestellt. Größenmarker = 20 μ m. Die dargestellten Daten wurden im Rahmen des Forschungspraktikums Alexander Regier gewonnen.

3. Ergebnisse

3.2.7.2 Untersuchungen zum Einfluss von Bim auf den OHME-induzierten Zelltod

Zur näheren Untersuchung der Rolle von Bim im OHME-induzierten Zelltod konnte eine Bim-defiziente HepG2-Linie von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Brunner in Konstanz bezogen werden. Zur Überprüfung der Effizienz des Bim-Knockouts sowie zur weiteren Untersuchung der Effekte von OHME auf das Bim-Level wurden zeit- und konzentrationsabhängige Western Blots von wildtypischen und Bim-defizienten HepG2 durchgeführt. Zudem wurde in denselben Lysaten p53 sowie die gespaltenen Caspasen 3 und 9 untersucht. Abbildung 32, 33, 34 und 35 stellen die Ergebnisse, inklusive densitometrischer Auswertungen dar. Die Daten wurden im Rahmen des Forschungspraktikums von Frau Svenja Lenhardt gewonnen.

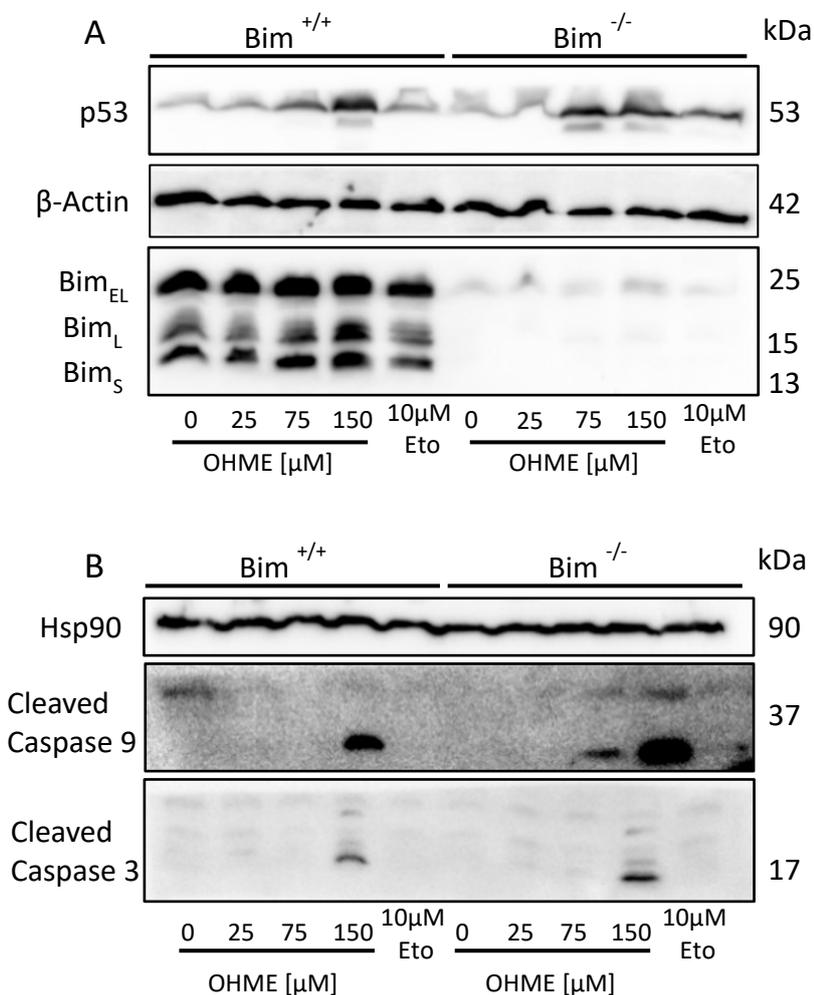


Abbildung 32: Western Blot Analyse von Bim, p53, und cleaved-Caspase 3 sowie -9 nach dosisabhängiger Inkubation mit OHME für 24h in wildtypischen und Bim-defizienten HepG2. Dargestellt sind repräsentative Blots, die dargestellten Daten wurden im Rahmen des Forschungspraktikums Svenja Lenhardt gewonnen.

In den beiden repräsentativen Abbildungen ist die Funktionalität des Bim-Knockouts klar zu erkennen. Bim wird in verschiedenen Isoformen exprimiert. Bim_{EL}, Bim_L und Bim_S stellen die relevantesten dar, alle drei können zuverlässig vom verwendeten Antikörper detektiert werden. Für Bim_{EL} zeigt sich im dosisabhängigen Blot eine schwache, jedoch konzentrationsabhängige und signifikante Induktion in den wildtypischen Zellen. Auch im zeitabhängigen Blot lässt sich eine schwache Induktion erkennen, jedoch ist diese nicht klar zeitabhängig und auch nicht signifikant. Für Bim_L zeigt sich konzentrationsabhängig eine leichte, nicht signifikante Induktion. Im zeitabhängigen Blot sind die induzierenden Effekte von OHME auf Bim_L stärker und signifikant zu erkennen. Bim_S zeigt ähnliche Trends wie Bim_L. Zusammenfassend bestätigen die dargestellten Blots inkl. der densitometrischen Auswertungen die in Kapitel 3.2.7.1 beschriebene Induktion von Bim durch OHME. Für p53 zeigt sich in den dargestellten Blots wie erwartet eine zeit- und dosisabhängige Induktion, wobei diese in den Bim-defizienten Zellen etwas schwächer auszufallen scheint. Diese Unterschiede zeigen jedoch keinerlei Signifikanz. Für beide Caspasen zeigt sich eine zeit- und konzentrationsabhängige, starke und signifikant vermehrte Bildung der Spaltprodukte in beiden Zelllinien. Die Ergebnisse sind jedoch uneindeutig in Abhängigkeit des Genotyps, In den dosisabhängigen Versuchen ist die Caspasespaltung in den Bim-defizienten HepG2 leicht verstärkt, im zeitabhängigen Versuch ist der Effekt gerade umgekehrt und die Induktion ist in der Knockoutlinie leicht vermindert. In beiden Fällen ergeben sich keine Genotyp-abhängigen Signifikanzen.

3. Ergebnisse

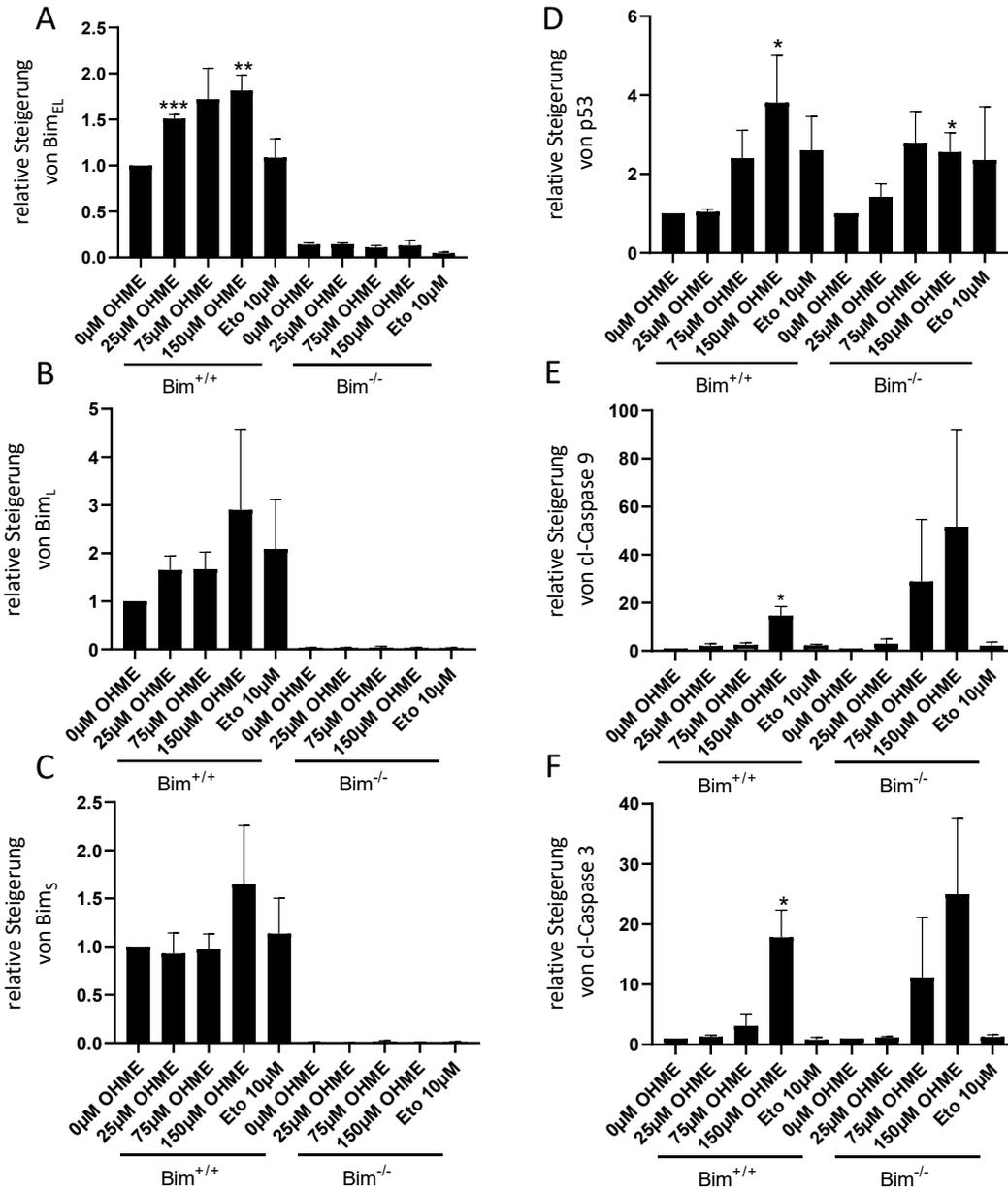


Abbildung 33: Densitometrische Auswertungen der in Abbildung 32 dargestellten Western Blots. A: Bim_{EL}, B: Bim_L, C: Bim_S, D: p53, E: cl-Caspase 9, F: cl-Caspase 3. n=3, nicht signifikante Ergebnisse sind nicht markiert, *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001; Die dargestellten Daten wurden im Rahmen des Forschungspraktikums Svenja Lenhardt gewonnen.

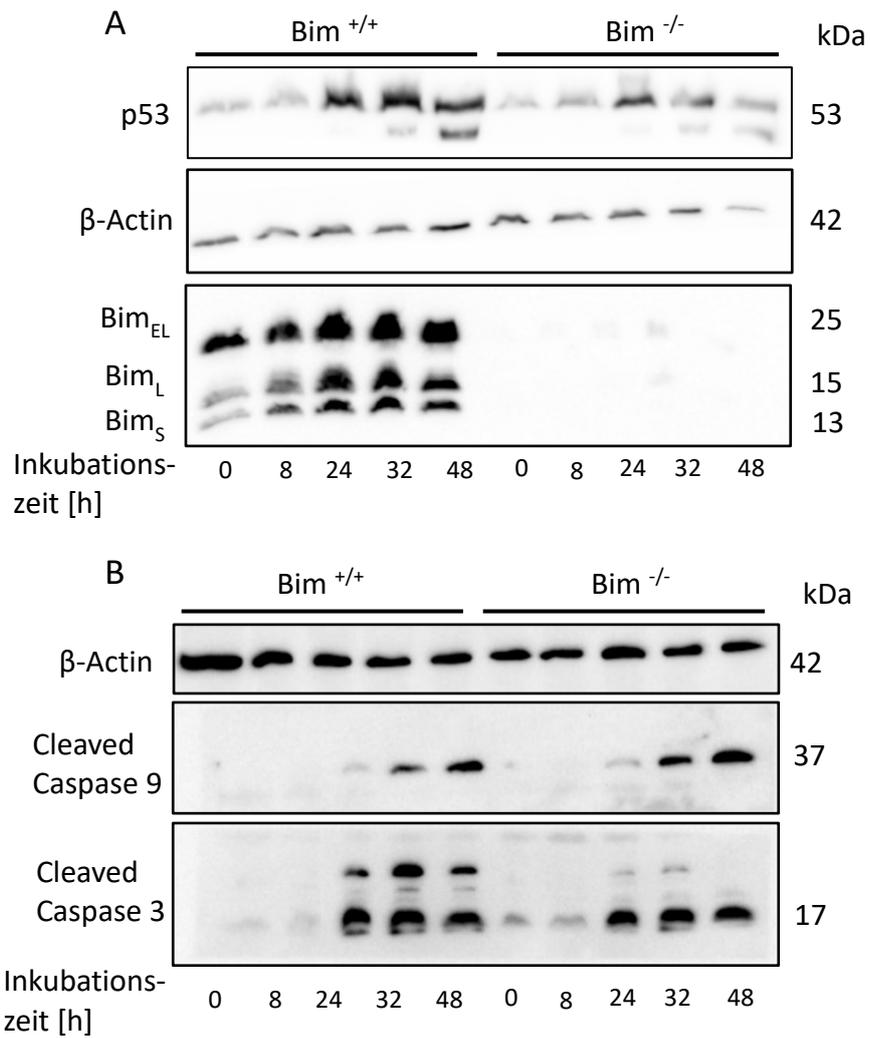


Abbildung 34: Western Blot Analyse von Bim, p53, und cleaved-Caspase 3 sowie -9 nach zeitabhängiger Inkubation mit 75µM OHME in wildtypischen und Bim-defizienten HepG2. Dargestellte sind repräsentative Aufnahmen. Die dargestellten Daten wurden im Rahmen des Forschungspraktikums Svenja Lenhardt gewonnen.

3. Ergebnisse

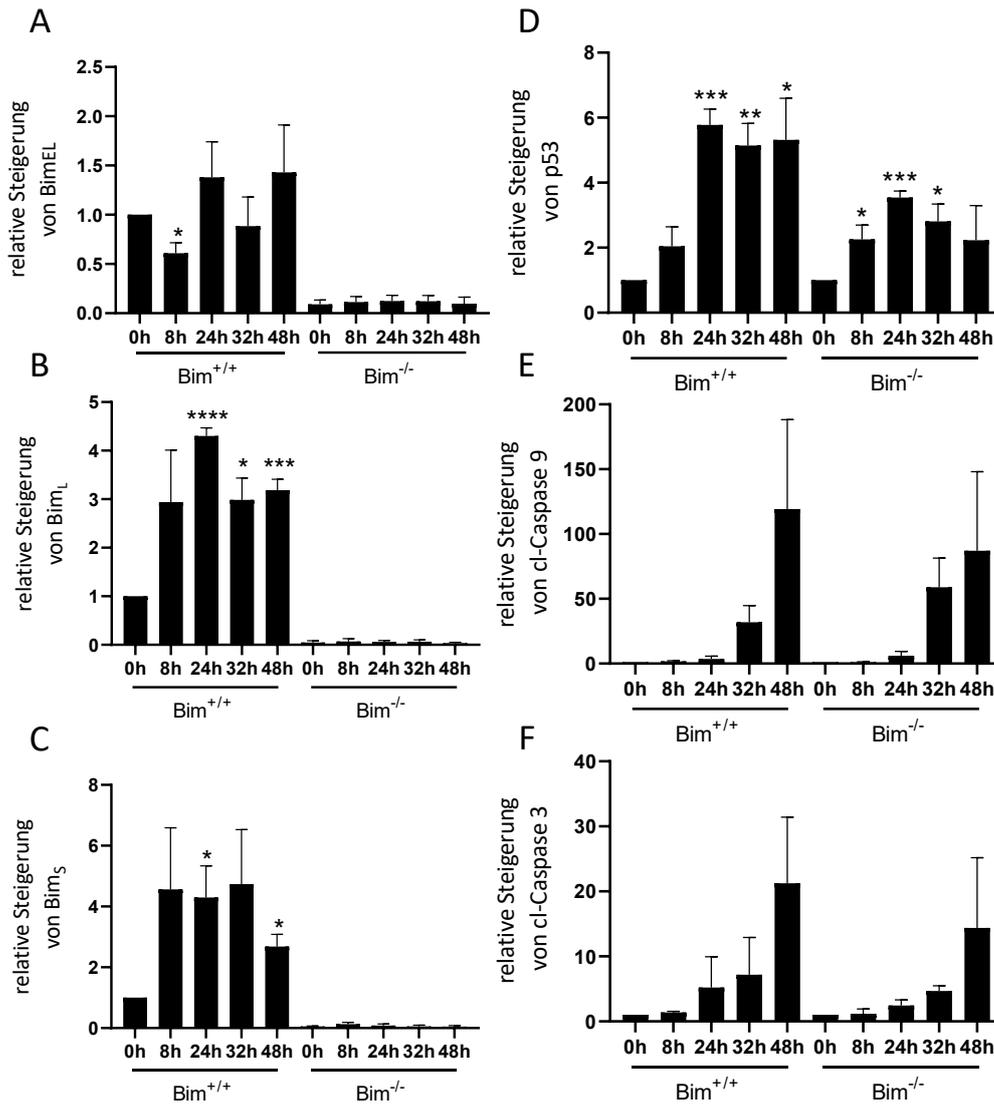


Abbildung 35: Densitometrische Auswertungen der in Abbildung 32 dargestellten Western Blots. A: Bim_{EL}, B: Bim_L, C: Bim_S, D: p53, E: cl-Caspase 9, F: cl-Caspase 3. n=3, nicht signifikante Ergebnisse sind nicht markiert, *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001; Die dargestellten Daten wurden im Rahmen des Forschungspraktikums Svenja Lenhardt gewonnen.

Die Effekte von OHME in der Bim-defizienten HepG2-Linie im Vergleich zum Wildtyp wurden des Weiteren mittels Resazurin- und SubG1-Assay untersucht. Abbildung 36 stellt die Ergebnisse dar. Ersterer Datensatz wurde im Rahmen des Forschungspraktikums Svenja Lenhardt gewonnen, der SubG1-Assay wurde im Verlauf des Praktikums von Frau Anna-Lena Ecker durchgeführt.

Abbildung 36 zeigt beide Assays. Es konnte in beiden Fällen eine Zelltodinduktion durch Behandlung mit OHME beobachtet werden. Im SubG1-Assay (Abbildung 36A) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden. Im Resazurinassay (Abbildung 36B) zeigen sich jedoch bei 25 μ M und 50 μ M Konzentration hochsignifikante Unterschiede zwischen beiden Genotypen, wobei der Bim-defiziente Typ vulnerabler gegenüber OHME ist.

Die dargestellten Ergebnisse stehen genau entgegengesetzt der initialen Erwartung, dass ein Bim-Knockout HepG2-Zellen resistenter gegenüber OHME macht. Daher wurde in Kooperation mit der AG Prof. Dr. Markus Christmann eine Genexpressionsanalyse von verschiedenen apoptoseassoziierten Genen durchgeführt. Abbildung 37 stellt die gewonnenen Ergebnisse dar, die Daten wurden im Rahmen des Forschungspraktikums von Anna-Lena Ecker gewonnen. Insgesamt zeigen jene Gene, welche deckungsgleich mit dem Versuch aus Kapitel 3.2.4 analysiert wurden, ähnliche Trends. Auffällig ist hier, dass keine Induktion von Noxa aufzutreten scheint. Auf Seite der pro-apoptotischen Gene scheinen FasR und p21 in der Bim-defizienten Linie stärker induziert zu werden. Auf Seite der antiapoptotischen Gene ist vor allem der große Unterschied zwischen den Genotypen in der Expression von Bcl2 auffällig. Sowohl Behandlung mit OHME als auch mit der Positivkontrolle IQ scheint die Expression von Bcl2 in der Bim-defizienten Linie annähernd vollständig zu unterdrücken, wohingegen im Wildtyp nur eine leichte Abnahme gegenüber der Negativkontrolle zu beobachten ist. *Cellular inhibitor of apoptosis 1* (c-IAP1) zeigt in keinem der beiden Genotypen signifikante Veränderungen, wohingegen c-IAP2 und *X-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP) im Bim-defizienten Genotyp stärker exprimiert werden. Die Expression des anti-apoptotischen Survivin wird in beiden Genotypen annähernd vollständig unterdrückt.

3. Ergebnisse

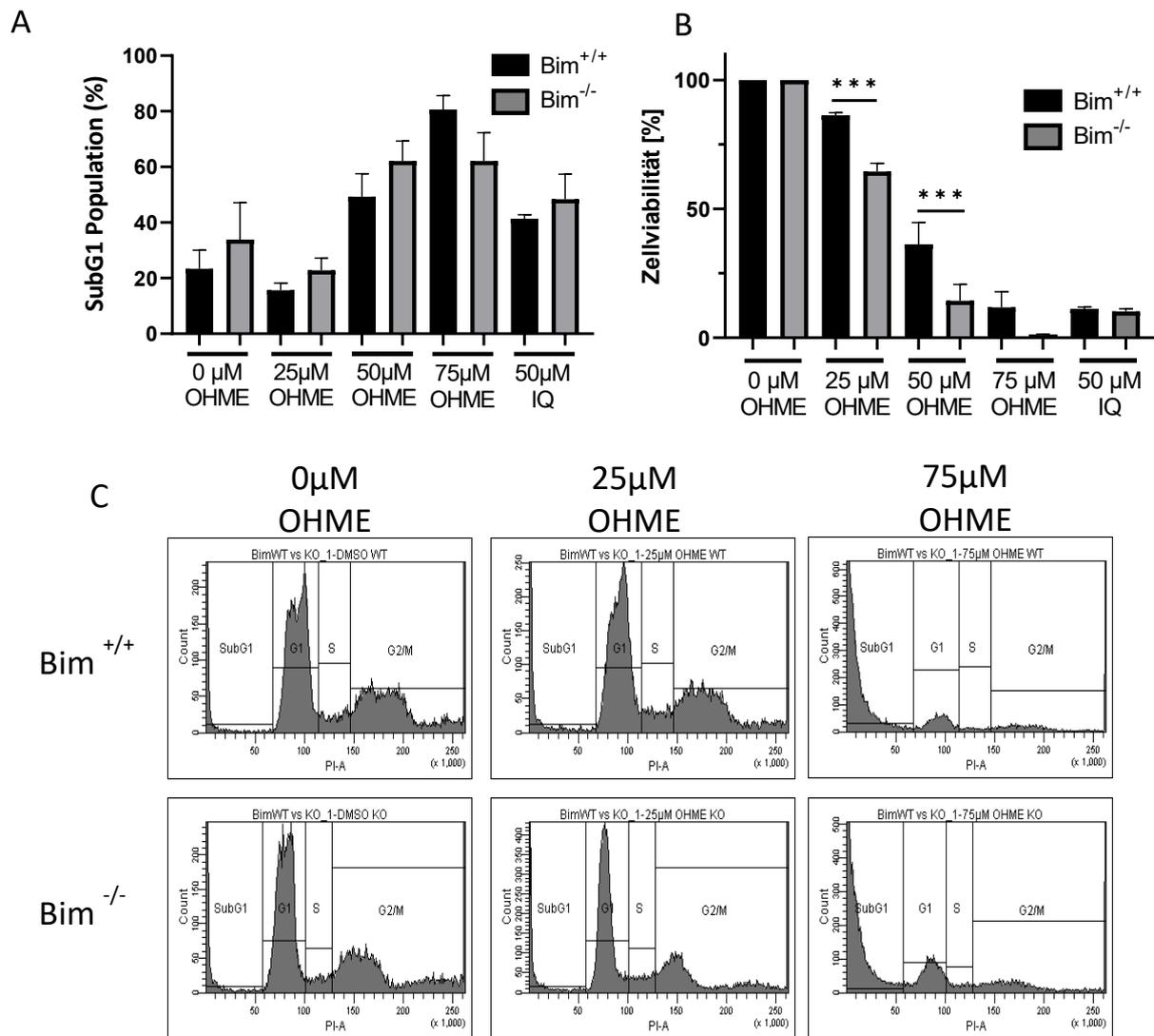


Abbildung 36: Untersuchungen zum Einfluss von Bim auf den OHME-induzierten Zelltod. A: SubG1-Messung in wildtypischen und Bim-defizienten HepG2 nach OHME-Behandlung, 48h, n=3, Signifikanzen wurden zwischen wildtypischen und Bim-defizienten Inkubationen berechnet, jedoch konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Repräsentative Histogramme in C. Der Datensatz wurde im Rahmen des Forschungspraktikums Anna-Lena Ecker gewonnen. B: Resazurinassay in wildtypischen und Bim-defizienten HepG2 nach OHME-Behandlung, 72h, n=3, ***p<0,001, nicht signifikante Ergebnisse sind nicht markiert. Der Datensatz wurde im Rahmen des Forschungspraktikums Svenja Lenhardt gewonnen.

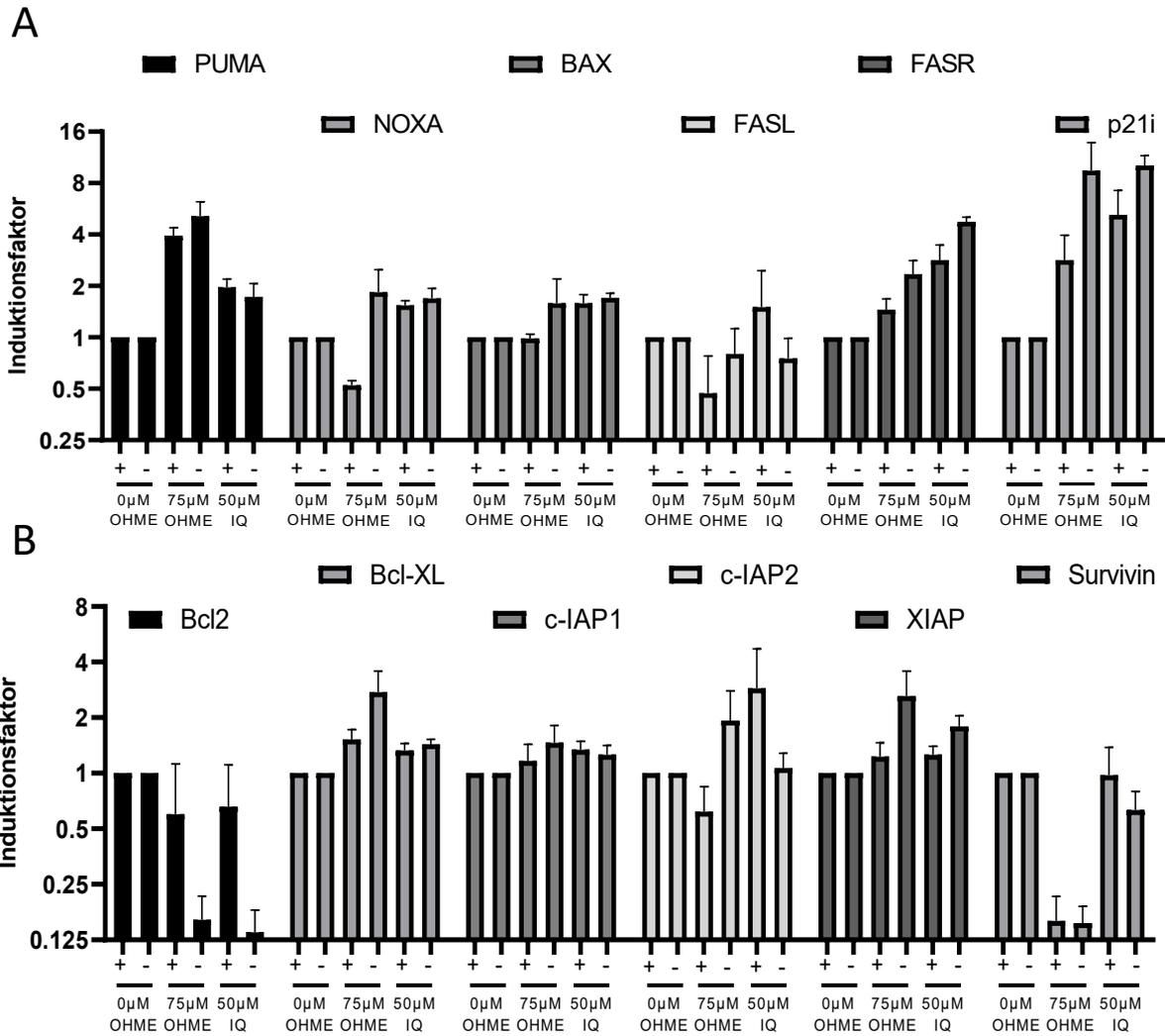


Abbildung 37: Genexpressionsanalyse von wildtypischen und Bim-defizienten HepG2 nach OHME-Behandlung. 48h, n=4, A: pro-apoptotische Gene, B: anti-apoptotische Gene. Die dargestellten Daten wurden im Rahmen des Forschungspraktikums Anna-Lena Ecker gewonnen.

3. Ergebnisse

3.3 Exkurs: Verwendung von pMH zur Untersuchung der Wirkung von Histondeacetylaseinhibitoren (HDACi)

Im Rahmen eines Nebenprojektes wurden pMH zur Untersuchung der Effekte des Histondeacetylase (HDAC)-Inhibitors Panobinostat (Pano) eingesetzt. Ziel war die Untersuchung des Einflusses der HDACi auf die Bildung des DNA-Schadensmarkers γ H2AX nach Inkubation mit genotoxischen Substanzen. Hierzu wurden Resazurinassays zur Findung einer adäquaten Dosis von Panobinostat eingesetzt, zudem wurde mittels Western Blot ausgeschlossen, dass Panobinostat selbst γ H2AX induziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 dargestellt.

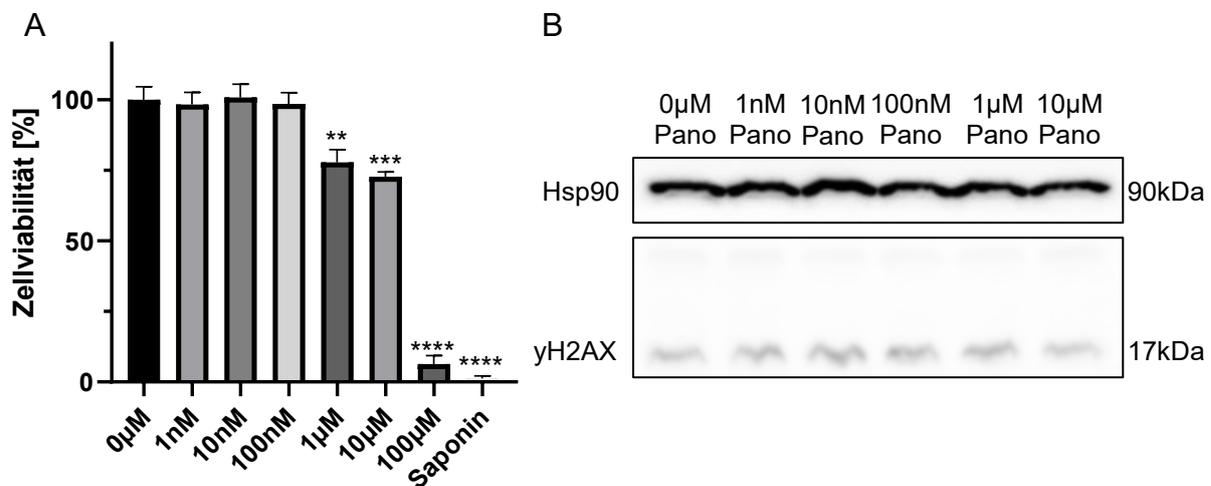


Abbildung 38: Untersuchungen zu Zytotoxizität und möglicher DNA-schädigender Wirkung des HDACi Panobinostat. A: Resazurinassay in pMH nach Behandlung mit HDACi, n=3, 24h, **p<0.01, ****p<0,0001. B: Western Blot von γ H2AX nach HDACi Behandlung, n=1, 24h.

Im Resazurinassay zeigen sich ab einer Konzentration von 1 μ M Panobinostat signifikant zytotoxische Effekte von Panobinostat, daher wurde in den weiteren Versuchen eine Konzentration von 100 nM Panobinostat verwendet (Abb. 38A). Im Western Bot zeigt sich klar, dass Panobinostat selbst γ H2AX nicht induziert (Abb. 38B).

Im Weiteren wurden nun pMH mit den genotoxischen Substanzen Etoposid und Methylmethansulfonat (MMS), sowie Panobinostat kokubiert und die γ H2AX Induktion mittels Immunfluoreszenz untersucht. Inkubationen ohne Panobinostat wurden als Vergleich mitgeführt. Abbildung 39 stellt die Ergebnisse der Versuche dar. In den dargestellten Aufnahmen ist klar eine verstärkte Bildung von γ H2AX durch Kokubation mit Panobinostat zu erkennen. Die statistische Analyse aller Aufnahmen bestätigt dies. Auf eine Berechnung von Signifikanzen wurde an dieser Stelle verzichtet, da hier nur zwei biologische Replikate vermessen wurden.

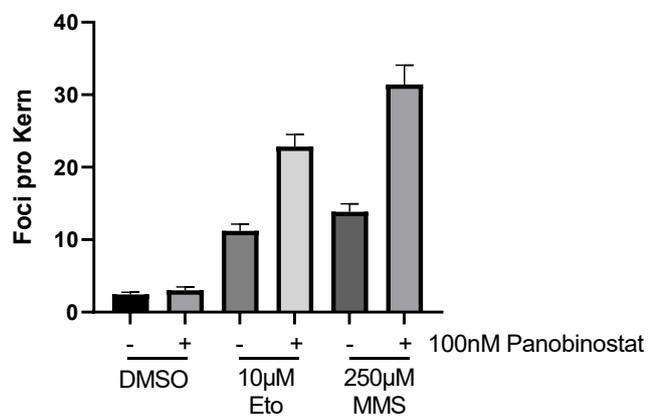
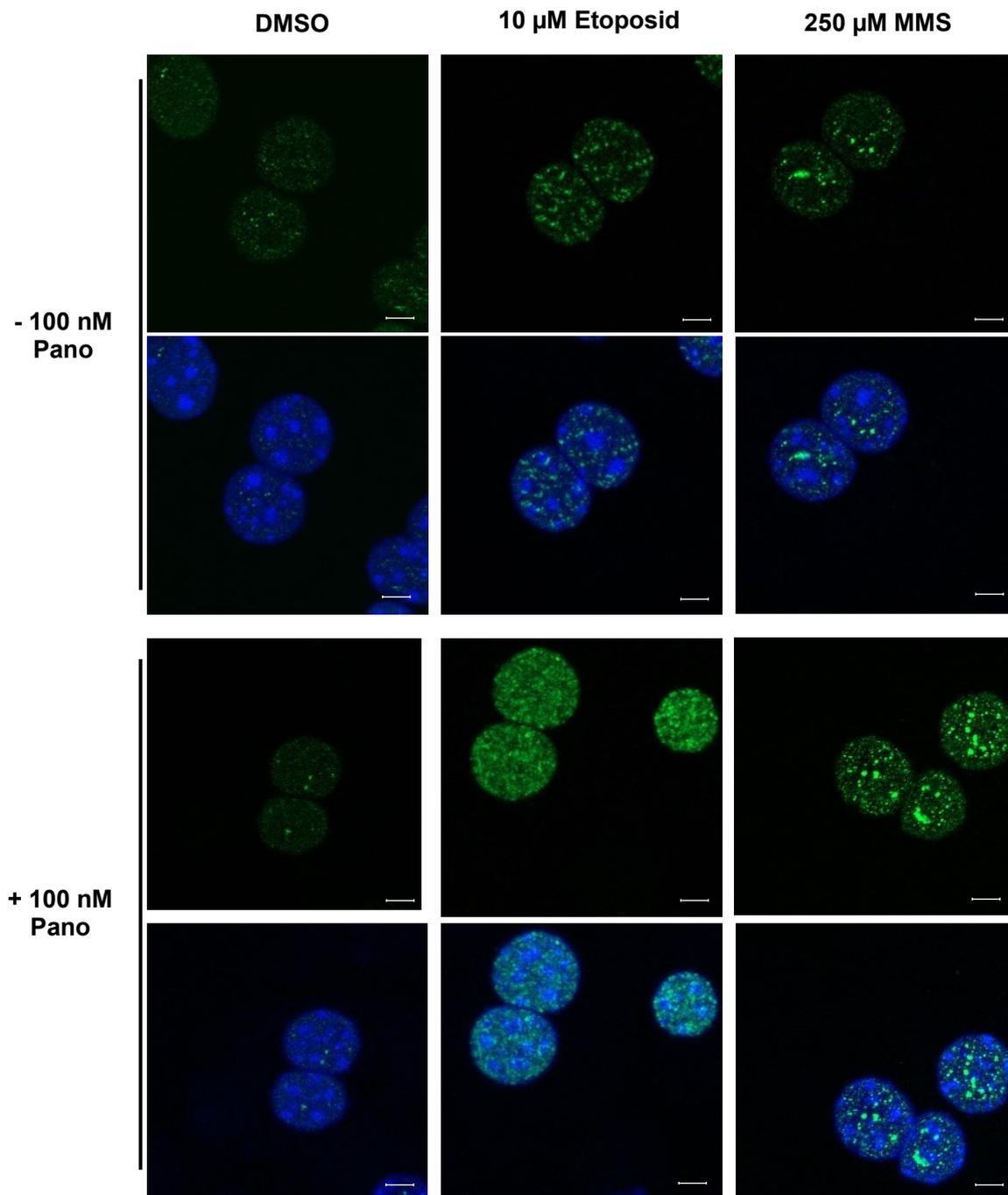


Abbildung 39: Immunfluoreszenz von pMH mit und ohne HDACi nach Behandlung mit verschiedenen DNA-schädigenden Substanzen. n=2, 24h, Repräsentative Bilder sind dargestellt, Größenbalken = 5 μm.

4. Diskussion

4.1 Einordnung der verwendeten Testsysteme und Testkonzentrationen in den physiologischen Kontext

4.1.1 HepG2 als immortalisierte Hepatoblastomlinie

HepG2-Zellen sind eine Zelllinie, die in der Erforschung möglicher hepatotoxischer Effekte seit vielen Jahren breite Anwendung findet. HepG2 teilen die vielen Vorteile immortalisierter Zelllinien in der praktischen Anwendung, jedoch ergeben sich auch einige Nachteile aus dem Kontext einer Krebs-abgeleiteten Zelllinie. Im Gegensatz zu primären Hepatozyten handelt es sich bei HepG2 um proliferierende Zellen. Zudem tragen Krebszelllinien häufig Mutationen, die sowohl Expression als auch Funktion von möglicherweise für eine Fragestellung relevanten Proteinen variieren können. Konkretestes Beispiel im vorliegenden Fall ist das Fehlen von diversen Phase I-Enzymen in HepG2, was die Verwendung von ME als direkte Testsubstanz obsoletiert [200, 216]. Aufgrund der beschriebenen Problematik wurde in dieser Arbeit mit dem Primärmetaboliten von ME, OHME, gearbeitet. ME wird nach Oxidation durch CYP-Enzyme zu OHME, durch SULTs weiter zum ultimalen Kanzerogen verstoffwechselt. Im Gegensatz zu den CYP-Enzymen des Phase I-Metabolismus, exprimieren HepG2-Zellen SULT1A1 als wichtigste SULT-Isoform in großer Menge wie Abbildung 15 zu entnehmen ist und wie auch in der Literatur beschrieben wird [200, 217]. Selbstverständlich kann eine Behandlung mit OHME nicht das gesamte Metabolitenspektrum abbilden, das in der Leber aus ME gebildet wird. Jedoch ist bekannt, dass OHME der Hauptmetabolit von ME ist und die anderen Metaboliten von ME, die zu adversen Effekten führen, letzten Endes dieselben DNA-Addukte bilden wie OHME [8]. Das Tumorsuppressorprotein p53, welches ein Schlüsselprotein dieser Arbeit darstellt, wird in HepG2 unverändert exprimiert [206]. DDR und NER sind relevante Signalwege im Rahmen dieser Arbeit. Die Literatur liefert auch hier keine Hinweise darauf, dass die Funktionalität dieser Wege in HepG2 kompromittiert sein sollte. Für die NER wurde im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. Anastasia Vollmer eine Untersuchung der XPA-Expression in verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Hier konnte keine XPA-Defizienz für HepG2 festgestellt werden [195]. Aufgrund der verschiedenen hier beschriebenen Sachverhalte sind HepG2 in Kombination mit dem Metaboliten OHME als geeignetes Testsystem für die in 1.6 definierten Fragestellungen anzusehen.

4.1.2 Primäre murine Hepatozyten

Primäre Hepatozyten sind ein in der pharmakologisch-toxikologischen Forschung vielfach eingesetztes und wertvolles Werkzeug zur Abschätzung von möglichen hepatotoxischen Effekten verschiedenster Substanzen. Im Gegensatz zu immortalisierten Zelllinien exprimieren pMH ein breites Spektrum an Phase I- und Phase II-Enzymen [218]. Jedoch muss bei dem Versuch die Toxizität einer Substanz auf humaner Ebene zu beurteilen beachtet werden, dass Hepatozyten unterschiedlicher Spezies teils massive Unterschiede aufweisen. Es ist bekannt, dass die Expression von einzelnen CYP-Isoformen in verschiedenen Spezies differiert. Zudem haben einzelne CYPs zum Teil unterschiedliche Substratspezifitäten in verschiedenen Spezies. Auch das Spektrum der exprimierten Influx- und Effluxtransporter kann Unterschiede aufweisen [219]. Zudem muss beachtet werden, dass bereits kurz nach Entnahme der Zellen aus dem biologischen System, die metabolische Kapazität der Zellen rapide sinkt und zudem eine hohe interindividuelle Varianz der hepatisch-metabolischen Kompetenz berichtet wurde [220, 221]. Eine längerfristige Kultivierung der Hepatozyten ist zudem unter einfachen Kulturbedingungen nicht möglich da es hier, neben der Abnahme der metabolischen Kapazität, zur Dedifferenzierung der Zellen kommt. Dies äußert sich in vermehrter Expression von Strukturproteinen wie Aktin, Tubulin oder Vimentin und ist vermutlich auf eine zeitabhängige Abnahme der Expression der hepatozytenspezifischen Kernfaktoren (HNFs, engl.: *hepatocyte nuclear factors*) zurückzuführen [218, 222]. Des Weiteren proliferieren pMH nicht, was die Untersuchung verschiedener biologischer Ziele und Effekte problematisch macht. Auch ist bekannt, dass Hepatozyten je nach Ihrer Lage innerhalb der Feinstruktur der Leber unterschiedliche Funktionen und Enzymspektren aufweisen. Es lassen sich hier periportale und perivenöse Hepatozyten als unterschiedliche Gruppen definieren, während die Hepatozyten in der Mitte eines Leberläppchens funktionell zwischen diesen Gruppen liegen. Im periportalen Bereich finden bspw. β -Oxidation, Aminosäurestoffwechsel, Gluconeogenese oder Schutzfunktionen vor oxidativem Stress statt, während im perivenösen Bereich eher Lipogenese, Glykolyse, Glutaminbildung und der Fremdstoffmetabolismus stattfinden [223, 224].

4. Diskussion

4.1.3 Verwendete OHME-Konzentrationen im physiologischen Kontext

In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten wurden OHME-Konzentrationen im Bereich zwischen 1 μM und 250 μM verwendet. Tabelle 16 stellt die Expositionsdaten für ME aus den in 1.1.6 genannten Studien, normiert auf einen Durchschnittsmenschen von 80 kg Körpergewicht dar [34-37]. Aus diesen wurden Molaritäten für das Gesamtblutvolumen, als auch das Leberblutvolumen berechnet. Für Ersteres bewegen sich diese in einem Bereich zwischen 8,9 nM und 38,5 μM , für Zweiteres liegen die Werte zwischen 71,8 nM und 307,6 μM . Grundsätzlich ist dieser Berechnungsansatz als vage zu betrachten, da die Metabolisierung von ME zu OHME nicht in Betracht gezogen wurde und zudem die grundsätzlichen Unsicherheiten der Expositionsermittlung zu bedenken sind. Jedoch lässt sich hier zumindest eine Größenordnung für OHME-Konzentrationen die physiologisch in der Leber vorkommen grob abschätzen. Da ME nach Aufnahme sehr schnell resorbiert und metabolisiert wird [7, 12], und somit davon auszugehen ist, dass eine verzehrte Dosis zügig und vollständig die Leber erreicht, erscheinen die Berechnungen mit dem Leberblutvolumen näher an der physiologischen Realität. Dies bedeutet, dass der Durchschnittsverzehrer unter keinen Umständen Dosen im mikromolaren Bereich ausgesetzt ist. Da jedoch ein Vielverzehrer mit Maximaldosen von bis zu 307,6 μM ME belastet wird, erscheinen die von uns verwendeten Dosen von maximal 250 μM OHME durchaus in einem physiologisch relevanten Bereich zu liegen. Zudem wurde die in dieser Arbeit verwendete Maximaldosis nur zur Bestimmung von EC_{50} -Werten in Abbildung 19 herangezogen und in allen weiteren Versuchen wurden geringere OHME-Konzentrationen genutzt. Hieraus lässt sich abschließend ableiten, dass dem verwendeten Konzentrationsbereich von 1-250 μM OHME durchaus physiologische Relevanz beizumessen ist.

Tabelle 17: Berechnung hypothetischer physiologischer Molaritäten von ME.

| | EU [35] | USA [36] | Weltweit [34, 36] | Vielverzehrer [37] |
|--|----------|-----------|-------------------|--------------------|
| Exposition (ME): | 9,6 µg/d | 80,5 µg/d | 10,4-108 µg/d | 5,28-41,12 mg/d |
| Molarität bei Blutvolumen = 6 l [225] | 8,9 nM | 75,3 nM | 9,7-101 nM | 4,9-38,5 µM |
| Molarität bei Leberblutvolumen ~ 750 ml [226, 227] | 71,8 nM | 602,2 nM | 77,8-807,9 nM | 39,5-307,6 µM |

4.2 Untersuchungen zur Reparatur von dGMiE und dAMiE

Die Bildung von ME-DNA-Addukten als treibende Kraft hinter den kanzerogenen Effekten von ME wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit in diversen Publikationen in verschiedenen Zelllinien (HepG2, V79CS, HCT116), pRH und humanen Leberbiopsien beschrieben [5, 8, 10]. Zellen haben verschiedene Mechanismen, um DNA-Addukte zu entfernen und sich selbst, und damit den gesamten Organismus, vor deren Folgen zu schützen. Erste Untersuchungen ob diese Reparaturmechanismen im Falle von dGMiE und dAMiE eine Rolle spielen, wurden im Rahmen der Dissertation von Anastasia Vollmer durchgeführt und wurden im Rahmen dieser Arbeit ergänzt und weitergeführt. Ein erster Versuchsansatz stellt die Langzeitinkubation für bis zu 96 h von HepG2-Zellen mit OHME dar. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 16 dargestellt. Der zugrundeliegende Gedanke dieses Versuchs beruhte darin, dass die Zellen das zugegebene OHME nach einiger Zeit aufgebraucht haben und ab diesem Zeitpunkt mögliche Reparatureffekte im Adduktlevel beobachtbar sein sollten. Diese Annahme konnte nicht bestätigt werden, da hier bis zum Zeitpunkt von 96 h eine zeitabhängige Zunahme des Adduktlevels beobachtet wurde. Dies deutet auf eine hohe Halbwertszeit von OHME im beschriebenen Testsystem hin, aufgrund derer eine Untersuchung der Adduktreparatur in diesem einfachen Versuchsaufbau nicht möglich

4. Diskussion

ist. Wahrscheinlich ist dieser Befund ein artifizielles Ergebnis, welches der Art des Versuchsaufbaus geschuldet ist. Es ist bekannt, dass SULT1A1 durch Substratüberschuss gehemmt wird [228]. Die Literatur beschreibt hier für das Beispielsubstrat *para*-Nitrophenol eine sukzessive Substratinhibition bei Konzentrationen über 2 μM . Der Mechanismus dieser Substrathemmung beruht darauf, dass SULT1A1 zwei katalytisch aktive Substrattaschen besitzt. Werden diese Substrattaschen bei niedrigen Substratkonzentrationen nicht gleichzeitig bedient, erfolgt die Dissoziation des Produkts ungehindert. Wenn bei höheren Konzentrationen Substrat gleichzeitig an beiden aktiven Stellen gebunden vorliegt, scheint eine Hinderung dieser Dissoziation aufzutreten [229]. Der durch diese Inhibition verlangsamte Metabolismus von OHME könnte gerade zu dem beobachteten Phänomen der stark verlängerten Zunahme des Adduktlevels führen. Um diese Problematik zu umgehen, wurde der Versuchsaufbau dahingehend abgeändert, dass HepG2-Zellen für 8 h mit OHME behandelt wurden, daraufhin ein Mediumwechsel durchgeführt wurde und den Zellen dann 0-72 h Zeit zur Reparatur gegeben wurde. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Proliferation der Zellen möglichst zu minimieren wurde nach Beendigung der OHME-Inkubation weiter mit serumreduziertem Medium (5 % statt 10 % FKS) inkubiert. In diesem Versuchsaufbau konnte eine Adduktbildung nach 8 h Inkubation mit OHME festgestellt werden. Nach 24 h Reparaturzeit halbiert sich das Adduktlevel ungefähr, jedoch erfolgt zu späteren Zeitpunkten keine weitere Reparatur.

Um den Mechanismus der Adduktreparatur genauer aufzuklären wurden des Weiteren Versuche in wildtypischen pMH und pMH mit Knockout von XPA durchgeführt. XPA ist ein zentrales Protein der NER, so dass sowohl GG-NER als auch TC-NER in den gentechnisch veränderten pMH nicht funktionell sind. Für diese Versuche wurden die Zellen für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen OHME behandelt und anschließend das Adduktlevel analysiert. Der Versuch wurde zweimal mit verschiedenen OHME-Konzentrationen durchgeführt, da beim ersten Versuch (25 und 75 μM OHME) insgesamt extrem hohe Adduktlevel im Vergleich zu HepG2 festgestellt wurden. Im zweiten Versuch wurden die Zellen mit 1 und 5 μM OHME behandelt (Abb. 11). In beiden Versuchen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten Genotypen festgestellt werden. Im Versuch mit den höheren OHME-Konzentrationen wurde festgestellt, dass die Adduktlevel in den pMH XPA^{-/-} nicht signifikant, jedoch in jeder Inkubation, niedriger sind als in wildtypischen pMH. Dieser

Befund ist nicht klar erklärbar, ist jedoch auch nicht im Versuch mit niedrigeren Konzentrationen reproduzierbar, hier legen die Adduktlevel durchweg in ähnlicher Höhe. Die Tatsache das keine Unterschiede zwischen den Genotypen festzustellen sind, widerspricht der anfänglich formulierten Hypothese, dass die Reparatur der Addukte durch NER bedingt wird, findet sich jedoch in der Literatur für andere NER-Substrate wieder. Die Arbeitsgruppe um Volker Arlt hat Versuche mit XPA-defizienten Mausembryofibroblasten bzw. humanen uterinen Fibroblasten durchgeführt und diese mit Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE) bzw. 3-Nitrobenzanthron (3-NBA) behandelt und Adduktlevel bestimmt. Beide Substanzen produzieren Addukte, die bekannte Substrate der NER darstellen. In beiden Fällen konnte festgestellt werden, dass die Adduktlevel der XPA-defizienten Zellen nicht signifikant von den wildtypischen Zellen abweichen [230, 231]. Die Analysen wurden für BPDE massenspektrometrisch, dementsprechend vergleichbar mit den Analysen dieser Arbeit durchgeführt. Für 3-NBA wurde ³²P-Postlabeling durchgeführt. Beide Versuchsansätze produzierten ähnliche Befunde. Auch die Behandlungsschemata in den beschriebenen Studien sind vergleichbar mit dem von uns gewählten Schema in pMH. Das von uns verwendete Versuchsssetup erscheint im Licht der genannten Studien als auch der von uns durchgeführten Versuche in HepG2 als nicht ideal. Dementsprechend sollten die Versuche in pMH mit einem angepassten Setup, ähnlich dem zweiten Versuch in HepG2 wiederholt werden.

Die Reparatur von ME-Addukten wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben, jedoch existieren aktuelle Studien zur Reparatur der Addukte des strukturverwandten Estragol. Die Arbeitsgruppe um Yvonne Rietjens an der Universität von Wageningen, Niederlande beschreibt in ihren Arbeiten eine ineffiziente Reparatur von Estragoladdukten. Yang et al. inkubieren pRH, CHO- und HepaRG-Zellen mit Estragol und 1'-Hydroxyestragol und untersuchen die Adduktlevel in einem ähnlichen Versuchsaufbau wie der in dieser Arbeit verwendete Aufbau. Die Zellen wurden für 2 h mit der jeweiligen Substanz behandelt und anschließend wurde das Adduktlevel nach 0-72 h Reparaturzeit untersucht. In allen verwendeten Zelltypen wurden die induzierten Estragoladdukte nur zu einem sehr geringen Level repariert. Zudem konnte in genetisch veränderten, NER-defizienten CHO-Zellen (UV5,24,41) [232, 233] eine noch weiter verringerte Adduktreparatur festgestellt werden. Zur Erklärung dieses Befunds wurden *in silico*-Berechnungen zur Konformation der DNA-Addukte durchgeführt. Hier konnte festgestellt werden, dass Estragoladdukte die Struktur der

4. Diskussion

DNA nur in sehr geringem Umfang verzerren und damit auch nur eine sehr schwache Destabilisierung der DNA-Struktur einhergeht [234]. Der Erkennungsfaktor der NER, XPC-Hhr23B erkennt keine spezifisch-chemischen Motive der DNA-Schädigung, sondern bindet an eine destabilisierte DNA-Helix [65, 66]. Yang et al. schlussfolgern, dass dementsprechend DNA-Addukte, welche die DNA nur schwach verzerren nur ungenügend repariert werden können. Diese Erklärung ist vor allem im Licht der beschriebenen Ergebnisse der Autoren absolut sinnig, jedoch wird hier die Aufteilung der NER in zwei verschiedene Schadenserkennungswege außer Acht gelassen. XPC-Hhr23B erkennt Schäden im Zuge der GG-NER. Eine Begründung warum Estragoladdukte nicht im Zuge der TC-NER erkannt und repariert werden sollten liefern die Autoren an dieser Stelle nicht, vor Allem da der induzierende Stimulus der TC-NER nicht die Destabilisierung der DNA-Struktur ist, sondern der Stopp einer Transkriptionsgabel. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit der Addukte von Estragol und ME (siehe z.B. Abbildung 40) ist hier eine gewisse Übertragbarkeit der Befunde der Arbeitsgruppe Rietjens zu erwarten.

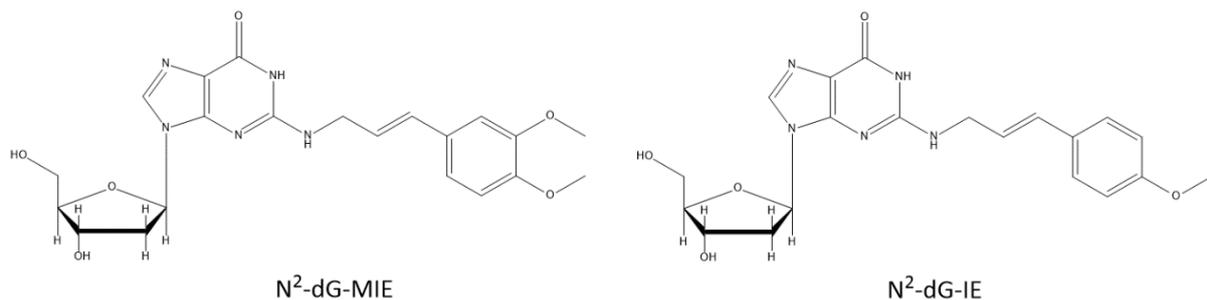


Abbildung 40: Struktur der dG-Addukte von ME und Estragol.

Eine weitere Studie zur DNA-Adduktkinetik von Estragol wurde 2020 von Schulte-Hubbert *et al.* durchgeführt. Die Adduktbildung wurde hier zeit- und konzentrationsabhängig in pRH untersucht. Estragol führte hier bereits bei einer Konzentration von 100 nM zu detektierbaren Adduktleveln nach 48 h Inkubation, ab 1 μ M Estragol waren Addukte bereits nach 1 h Inkubationszeit zu detektieren. In den niedrigen Konzentrationen bis 10 μ M zeigen sich die Adduktlevel hier sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig ansteigend. In den höheren verwendeten Konzentrationen bis 300 μ M Estragol sind die Ergebnisse weiterhin konzentrationsabhängig ansteigend, jedoch ergibt sich hier zeitabhängig ein maximales Adduktlevel bei 6 h Inkubationszeit. Nach 24 h liegt das Adduktlevel bei ca. 80 % des Levels vom 6 h-Zeitpunkt. Inkubation bis 48 h senkt das Adduktlevel nicht weiter herab [235]. Die Ergebnisse sind dementsprechend vergleichbar mit den

zentralen Daten von Yang et al. und zeigen Parallelen zum von uns durchgeführten Recoveryversuch mit OHME in HepG2. Schulte-Hubbert *et al.* führen das abnehmende Adduktlevel auf DNA-Reparatur oder Apoptose zurück. Bedauerlicherweise wurden an dieser Stelle keine Zytotoxizitätsassays o.ä. in pRH durchgeführt um das Phänomen genauer zu untersuchen. Im Weiteren führen die Autoren eine Modellierung der gewonnenen Adduktdata durch und betrachten hier einmal den gesamten Konzentrationsbereich und einmal nur den Bereich von 0-1 µM Estragol. Für die Modellierung des gesamten Dosisbereichs ergibt sich eine lineare Abhängigkeit von Adduktbildung und Estragolkonzentration. Bei ausschließlicher Betrachtung des niedrigen Konzentrationsbereichs zeigt sich hier jedoch erst beginnende Adduktbildung bei ca. 500 nM Estragol. Die Autoren postulieren hieraus eine Art praktischen Schwellenwert für die Bildung von Estragoladdukten. Diese Art der Modellierung ist jedoch kritisch zu betrachten, da die hier verwendete massenspektrometrische Methode ein LOQ aufweist (1 Addukt pro 10^8 Nukleoside für beide Addukte) und nicht infinitesimal kleine Addukt mengen messbar sind. Dementsprechend ergibt sich automatisch aus der Art der durchgeführten Analytik ein x-Achsenabschnitt größer 0 für die lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung. Zudem widerspricht die Modellierung an dieser Stelle den Ergebnissen dieser Studie. Für die dG-Addukte konnten nach Inkubation mit 100 nM Estragol nach 48 h Addukte nachgewiesen werden. Die Autoren geben für diese Messungen keine statistischen Daten an, dementsprechend ist davon auszugehen, dass der Wert hier zwischen LOD und LOQ lag, jedoch widerspricht dieses Ergebnis den durchgeführten Modellierungen und der Theorie des praktischen Schwellenwerts. Der LOD wird von den Autoren leider nicht konkret benannt. Neben den Adduktmessungen wurde ein Mikrokernassay vergleichend in wildtypischen, sowie CYP1A2-exprimierenden HepG2 durchgeführt. Hier wurde festgestellt, dass Estragol in HepG2 CYP1A2 nach 24 h Inkubation und anschließender Erholungszeit von 72 h dosisabhängig Mikrokerne induziert, während in wildtypischen HepG2 kein Effekt zu beobachten ist.

Auch für andere Substanzen sind Reparatur-resistente DNA-Addukte beschrieben. Prominentestes Beispiel stellt hier wahrscheinlich der polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoff Benzo[a]pyren (BaP) dar. BaP wird durch Epoxidierung, Hydrolyse, und erneute Epoxidierung zu BPDE umgesetzt [236]. Dieses bildet verschiedene dG- und dA-Addukte. Bei der metabolischen Aktivierung von BaP entstehen zwei verschiedene Stereoisomere von BPDE, welche wiederum bei der Reaktion mit

4. Diskussion

dA/dG eine Vielzahl stereochemisch differierender Addukte bilden können [237]. Zusätzlich zu dieser großen stereochemischen Varianz können die gebildeten Addukte verschiedene Konformationen annehmen, die unterschiedliche thermodynamische Stabilitäten aufweisen. Beispielsweise kann BPDE nach Bindung in die DNA interkalieren und durch diese Interkalation sowohl die gebundene Base, als auch die zugehörige Base auf dem gegenläufigen DNA-Strang aus der ursprünglichen DNA-Struktur verdrängen [238]. Gleichzeitig besteht auch die Möglichkeit, dass BPDE nach Bindung an dG in der kleinen Furche der DNA, keine größeren strukturellen Veränderungen der DNA auslöst [239]. Die Effizienz der NER ist nun sehr stark von den strukturellen Eigenschaften der gebildeten Addukte abhängig. Das beschriebene interkalierende Addukt wird bspw. ungefähr viermal effizienter repariert als das beschriebene dG-Addukt in der kleinen DNA-Furche [240]. Zusätzlich zu den direkten strukturellen Eigenschaften des Addukts spielt der Sequenzkontext der DNA eine Rolle bei der Effizienz der NER [241]. Alles in allem ergeben sich hochkomplexe Abhängigkeiten für die Effizienz der Adduktreparatur, welche für dGMiE und dAMiE bisher noch nicht untersucht wurden. Abgesehen von den bereits beschriebenen Studien von Yang *et al.* existieren auch für strukturell nah verwandte Verbindungen von ME keine Untersuchungen zum Einfluss von Stereoisomerie/Konformation bzw. des Sequenzkontexts auf die Reparatureffizienz. Insgesamt ist das Bild, dass sich für BaP-Addukte ergibt sehr komplex, da die metabolische Aktivierung bereits verschiedene Stereoisomere erzeugt, welche wiederum auf unterschiedliche Arten und Weisen mit verschiedenen Basen reagieren können. Für ME sollte sich hier grundsätzlich ein weniger komplexes Bild ergeben, da das ultimale Kanzerogen keine Stereozentren aufweist. Jedoch könnten verschiedenen Konformationen der Addukte bzw der Sequenzkontext für die unvollständige Reparatur von dGMiE/dAMiE in HepG2 verantwortlich sein.

In weiteren Arbeiten der AG Fahrer konnte mittels *DNA fibre assay* klar nachgewiesen werden, dass ME-Addukte dazu im Stande sind, die Replikationsgabeln zu blockieren [5]. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass auch die Transkription gestoppt werden kann und die TC-NER in Gang gesetzt wird. Dies könnte im Falle von ME die Reparatur von ~50 % der Addukte erklären. Die übrigbleibende Menge an Addukten ist potentiell auf Adduktbildung in nicht-transkribierten Teilen der DNA zurückzuführen, welche aufgrund nur schwacher Destabilisierung der DNA-Struktur nicht von den Erkennungsproteinen der GG-NER erkannt werden können.

Im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. Anastasia Vollmer wurden bereits erste Experimente zur Rolle der NER für die ME-vermittelten DNA-Schäden durchgeführt. Frau Vollmer hat hier die Effekte eines XPA-Knockdowns in HepG2-Zellen auf die Expression verschiedener DDR und Apoptose-relevanter Proteine untersucht und zudem Zelltodanalysen und Zytotoxizitätsassays mit XPA-Knockdown durchgeführt. Hier konnte in allen Assays eine verstärkte Antwort der Zellen auf OHME nach der Behandlung mit XPA siRNA festgestellt werden. Für γ H2AX, pChk2, p53 und *cleaved* Caspase 3 konnten stark erhöhte Signale, für p21, pChk1 und *cleaved* Caspase 9 leicht erhöhte Signale nach XPA-Knockdown festgestellt werden. Zudem wurden sowohl mittels Annexin-FITC-PI-Färbung als auch mittels MTS-Assay eine erhöhte Sensibilität der Zellen nach dem Knockdown festgestellt [195]. Die hier gefundenen Ergebnisse deuten weiter daraufhin, dass die NER eine Relevanz für die Reparatur von ME-Addukten hat, jedoch können hier keine konkret mechanistischen Erkenntnisse gewonnen werden, da ein Knockdown von XPA den Ausfall der gesamten NER zur Folge hat und nicht den Ausfall der einzelnen Erkennungswege. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proteine p53 und γ H2AX in wildtypischen sowie XPA-defizienten pMH nach OHME-Inkubation untersucht. Für γ H2AX hat sich das beschriebene Bild aus Frau Vollmers Dissertation bestätigt, bereits 1 μ M OHME induziert γ H2AX massiv in pMH XPA^{-/-} während im Wildtyp erst ab 25 μ M eine Induktion festzustellen ist. Für p53 konnten die Ergebnisse nicht bestätigt werden. Hier konnte in pMH XPA^{-/-} keine Induktion festgestellt werden, während im Wildtyp eine starke Induktion ab 25 μ M OHME vorliegt. Dieser Befund ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht klar erklärbar und steht nicht im Einklang mit den Ergebnissen in HepG2. Der Import von XPA in den Nukleus nach DNA-Schädigung ist abhängig von der Phosphorylierung von p53 an Ser15, jedoch ist an dieser Stelle auch noch nicht aufgeklärt welche Rolle p-p53(Ser15) hier einnimmt [242]. Aufgrund dieses Zusammenhangs lässt sich jedoch die Deregulation von p53 nach XPA-Knockout nicht erklären. Nach Beendigung des praktischen Teils der vorliegenden Arbeit konnte die Arbeitsgruppe Fahrer gentechnisch veränderte HeLa-Zellen mit GG-NER und TC-NER spezifischen Knockouts von DDB2 bzw. CSA gewinnen und für erste Versuche einsetzen. Im Rahmen der Masterarbeit von Frau Nina Pätzold wurden die genannten Zelllinien unter anderem mit OHME behandelt. Hier konnte festgestellt werden, dass die CSA-defiziente Linie sehr viel sensibler gegenüber OHME ist. Der IC₅₀-Wert für die wildtypischen HeLa-Zellen liegt bei 750 μ M OHME, während der Wert für CSA-

4. Diskussion

defiziente Zellen bei 250 μM liegt. Die Werte sind nicht mit den Werten in HepG2 vergleichbar, da HeLa-Zellen kein SULT1A1 exprimieren, jedoch eine Expression von SULT1C2 zeigen, welches in geringerem Umfang zur Verstoffwechslung von OHME befähigt ist. Zusätzlich hierzu konnte festgestellt werden, dass die CSA-Defizienz zu verstärkter γH2AX -Bildung, sowie verstärkter Caspase 3-Spaltung nach OHME-Inkubation führt. In der DDB2-defizienten Linie konnten keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden [243]. Diese vorläufigen Ergebnisse deuten weiter klar auf eine Beteiligung der TC-NER an der Reparatur von ME-Addukten. Des Weiteren scheint die GG-NER an dieser Stelle keine Rolle zu spielen, jedoch ist hier die Verwendung eines DDB2-Knockouts nicht ideal. DDB2 wird klassischerweise als Erkennungsprotein von UV-induzierten DNA-Schäden angesehen [244], während XPC ein wesentlich breiteres Schadensspektrum erkennt [65]. Beide Proteine werden durch OHME auf mRNA-Ebene induziert (Abbildung 24). Im Licht dieser Ergebnisse erscheint eine größere Rolle von DDB2 in der Reparatur von ME-Addukten unwahrscheinlich. Um die Beteiligung der GG-NER klar auszuschließen sollte, hier zusätzlich ein XPC-Knockout verwendet werden. Des Weiteren sollte mit den genannten Zelllinien Adduktanalysen mit ähnlichem Reparaturversuchsaufbau wie in HepG2 durchgeführt werden, um die Adduktreparatur direkt nachzuweisen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass ME-Addukte zu einem gewissen Umfang in HepG2 repariert werden. Ergebnisse aus anderen Arbeiten der Arbeitsgruppe Fahrer deuten auf die TC-NER als relevantesten Reparaturweg hin, was jedoch noch der experimentell eindeutigen Bestätigung mittels massenspektrometrischer Adduktanalyse bedarf. Des Weiteren sollten die Versuche in pMH mit abgewandeltem Versuchsaufbau wiederholt werden, um auch dieses physiologisch relevantere Zellsystem in das Gesamtbild mit einzufügen. Die Arbeiten der Arbeitsgruppe Rietjens liefern einen spannenden möglichen Erklärungsansatz für die unvollständige Reparatur der ME-Addukte. Die Destabilisierung der DNA-Struktur ist nicht ausreichend, um eine Induktion der GG-NER zu erreichen, so dass nur die Addukte im transkribierten Teil der DNA mittels TC-NER repariert werden und Addukte in nicht-transkribierten Teilen der DNA akkumulieren könnten. Da jedoch in den Arbeiten der AG Rietjens mit dem strukturverwandten Estragol gearbeitet wurde, bedarf es auch hier weiterer experimenteller Bestätigung dieser Theorie.

4.3 OHME induziert zeit- und konzentrationsabhängig apoptotischen Zelltod

Die Zelltod-induzierenden Eigenschaften von OHME wurden in verschiedenen Assays untersucht. Abbildung 19 stellt dosisabhängige Resazurinassays zu verschiedenen Zeitpunkten dar. Zudem sind die hieraus abgeleiteten EC_{50} -Werte dargestellt, welche von 171 μM OHME nach 24h nach 25 μM OHME nach 72 h abnehmen. Wie in Abbildung 12 dargestellt konnten in pMH nach 24h signifikante Effekte festgestellt werden, jedoch sank die Viabilität nicht unter 50 %. Dementsprechend wurde auf eine Berechnung des EC_{50} verzichtet und der Wert wird als größer 125 μM angenommen. Tabelle 18 stellt eine Übersicht über die bisher in der Literatur berichteten IC_{50} -Werte für OHME dar.

4. Diskussion

Tabelle 18: EC₅₀-Werte von OHME in verschiedenen Testsystemen.

| Testsystem | Assay | EC ₅₀ -Wert | Inkubationszeit | Quelle |
|------------|---------------|------------------------|-----------------|--------------|
| HepG2 | Resazurin | 171 µM | 24 h | Eigene Daten |
| HepG2 | Resazurin | 54 µM | 48 h | Eigene Daten |
| HepG2 | Resazurin | 25 µM | 72 h | Eigene Daten |
| pMH | Resazurin | >125 µM | 24 h | Eigene Daten |
| pRH | Resazurin | 46 µM | 24 h | [8] |
| pRH | LDH | 93 µM | 24 h | [8] |
| HepG2 | MTT | Kein Effekt | 4 h | [245] |
| V79WT | MTS | Kein Effekt | 72 h | [5] |
| V79CS | MTS | >250 µM | 72 h | [5] |
| V79WT | WST | Kein Effekt | 1 h | [246] |
| | | Kein Effekt | 24 h | |
| V79WT | Sulforhodamin | Kein Effekt | 24 h | [246] |
| | B (SRB) | >100 µM | 48 h | |
| | | ~100 µM | 72 h | |

In der Literatur finden sich bisher keine Angaben zur Zytotoxizität von OHME in HepG2. Die dargestellte Studie verwendet mit 4 h eine extrem kurze Inkubationszeit, da hier ein Hauptaugenmerk auf die Adduktbildung gelegt wurde. Nach so kurzer Inkubationszeit sind keine zytotoxischen Effekte zu erwarten und dies wird durch die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse bestätigt. In verschiedenen anderen Studien wurden wildtypische (V79WT), sowie mit humanem CYP1A2 und SULT1A1 transfizierte (V79CS) V79-Zellen zur Zytotoxizitätstestung verwendet. V79 Zellen sind Lungenfibroblasten des Hamsters und exprimieren daher kein bis kaum SULT1A1, welches zur metabolischen Aktivierung von OHME notwendig ist [5]. Daher ist in V79WT keine Zytotoxizität von OHME zu erwarten, was in den meisten Studien bestätigt wird. Einzig der SRB-Assay aus [246] stellt eine Ausnahme dar, dies ist

wahrscheinlich darauf zurückzuführen dass der SRB-Assay auf einer Bindung von Sulforhodamin B an Membranproteine beruht und nicht, wie bspw. Resazurin- oder MTS-Assay auf einer Messung der Reduktaseaktivität der Zelle. In der von uns publizierten Studie [5] wurden V79WT und V79CS verglichen. Hier ist klar zu erkennen, dass die stabile Transfektion mit SULT1A1 zu zytotoxischen Effekten durch OHME in V79 führt. Diese fallen jedoch viel schwächer aus als in HepG2, was darauf zurückzuführen ist, dass V79 Zellen lediglich eine mutierte, nicht funktionelle Form von p53 exprimieren und somit die Induktion von Apoptose gehemmt ist [207]. Weitere Untersuchungen zur Rolle von SULT1A1 im OHME-induzierten Zelltod wurden in der AG Fahrer nach Beendigung des praktischen Teils dieser Arbeit durchgeführt. In HepG2-Zellen wurde die SULT1A1-Expression mittels siRNA-vermitteltem Knockdown unterdrückt und anschließend mit OHME behandelt. Auch hier konnte festgestellt werden, dass die zytotoxischen Effekte von OHME sehr stark von SULT1A1 abhängig sind. 75µM OHME induzieren hier ca. 60 % Zelltod in scrRNA-behandelten Zellen, wohingegen in den SULT1A1siRNA behandelten Zellen nur ca. 25% Zelltod induziert werden [5]. Die stark differierenden Werte aus dieser Arbeit in pMH im Vergleich zu pRH [8] deuten auf spezies- und/oder geschlechtsspezifische Unterschiede in der Toxizität von OHME bzw. der Muttersubstanz ME hin. Bereits in früheren Untersuchungen konnte eine massiv erhöhte Toxizität von ME in männlichen Ratten festgestellt werden, während weibliche Ratten, sowie Mäuse beider Geschlechter vergleichbare Empfindlichkeiten zeigten. In der hier durchgeführten zweijährigen Kanzerogenitätsstudie verstarben alle männlichen Ratten der höchsten und zweithöchsten Dosisgruppe (300/150 mg ME/kg KG) vor Beendigung der Studie. In weiblichen Ratten und Mäusen beiderlei Geschlechts konnten keine verringerten Überlebensraten festgestellt werden [7]. Cartus *et al.* haben in Ihrer Studie ausschließlich Hepatozyten von männlichen Wistar-Ratten verwendet. Für die Gewinnung der in dieser Arbeit verwendeten pMH wurden Mäuse beiderlei Geschlechts verwendet. Dies mag eine Erklärung für die gefundenen Unterschiede liefern, jedoch ist bisher kein konkreter molekularer Mechanismus hinter der erhöhten Empfindlichkeit von männlichen Ratten nicht aufgeklärt.

Zur weiteren Charakterisierung des OHME-induzierten Zelltods wurde eine AnnexinV-FITC-PI-Färbung in HepG2-Zellen durchgeführt (siehe Abb. 19). OHME induziert hier nach 72 h klar dosisabhängig Zelltod. Die dargestellten Ergebnisse sind klar auf eine Induktion von apoptotischem Zelltod zurückzuführen, da nekrotischer Zelltod sich in

4. Diskussion

dem dargestellten Assay als Induktion der Population im oberen rechten Quadranten, ohne gleichzeitige Induktion im unteren rechten Quadranten darstellen würde. In der Literatur wurde bisher keine Charakterisierung des OHME-induzierten Zelltods vorgenommen. Einzig in der in 1.1.3 näher beschriebenen Studie von Johnson et al. wurde in höheren Dosen die Induktion von Nekrose in Hepatozyten von Mäusen festgestellt [17]. Für das strukturverwandte Estragol wurde die Induktion von apoptotischem Zelltod nach oraler Administration in *gpt* delta-Ratten beschrieben. Den Tieren wurden vier Wochen lang täglich Estragoldosen von 0-300 mg/kg KG pro Tag mittels Gavage verabreicht, die Nekropsie der Tiere erfolgte einen Tag nach der letzten Estragolgabe. Die Autoren konnten hier eine Induktion von Apoptose mittels histopathologischer Untersuchungen feststellen. Zudem wurde eine konzentrationsabhängige Induktion von p53, p-p53(Ser15) und cleaved Caspase 3 in kombinierten Leberhomogenaten von fünf Tieren mittels Western Blot festgestellt. Die Induktion von p53 wurde zusätzlich mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestätigt. Es konnte zudem eine signifikante Induktion von Chk1, sowie eine schwache, nicht signifikante Induktion von Chk2 festgestellt werden. Interessanterweise wurde in dieser Studie auch eine Induktion von pJNK, pERK, und p-p38 beobachtet [247]. Hierrauf wird in 4.7 noch einmal eingegangen. Diese Ergebnisse sind, vor Allem im Licht der im Weiteren beschriebenen Ergebnisse betrachtet, als valide zu betrachten und somit lässt sich hier schließen, dass OHME zeit- und konzentrationsabhängig apoptotischen Zelltod in HepG2 induziert.

4.4 OHME induziert DNA-Schäden und p53-Akkumulation in pMH

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten pMH als weiteres Testsystem in der AG Fahrer etabliert werden. Die Effekte von OHME auf pMH wurden zusätzlich zum bereits beschriebenen Resazurinassay mittels Adduktanalysen, Western Blot und Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Eine konzentrationsabhängige Adduktbildung konnte in beiden verwendeten Genotypen nachgewiesen werden. Zwischen den Genotypen konnten wie in 4.2 bereits diskutiert keine Unterschiede in der Adduktbildung nach 24 h festgestellt werden. Mittels Western Blot wurden Analysen des Proteinlevels von p53 und γ H2AX durchgeführt (siehe Abb. 13). Für beide Proteine zeigen sich eine starke, dosisabhängige Induktion durch OHME ab einer Konzentration von 25 μ M OHME. Die Ergebnisse für den DNA-Schadensmarker γ H2AX wurden zusätzlich mittels Immunfluoreszenzfärbung bestätigt. Repräsentative Aufnahmen und eine statistische Auswertung sind in Abbildung 14 zu finden. Auch hier zeigt sich eine Induktion von γ H2AX, die ab 75 μ M OHME höchst signifikant ist. Addukt- und γ H2AX-Bildung sollten an dieser Stelle Hand in Hand gehen, jedoch zeigt sich Adduktbildung bereits bei der kleinsten verwendeten Konzentration von 1 μ M OHME, γ H2AX akkumuliert jedoch erst ab 25 μ M OHME. Ein Faktor der diesen Befund teilweise erklärt ist die extrem hohe Sensitivität der zur Adduktanalytik verwendeten massenspektrometrischen Methode (LOQ: 11 Addukte pro 10^8 Nukleoside). Jedoch ist nicht final geklärt wie die entstehenden Addukte in pMH zur γ H2AX-Akkumulation führen. In proliferierenden Zellsystemen entstehen während der DNA-Synthese durch sperrige Addukte Doppelstrangbrüche, welche im Weiteren die DDR aktivieren und letztendlich über Aktivität von ATM/ATR/DNA-PK zur Bildung von γ H2AX führen (siehe Kapitel 1.2). Ein solcher OHME-induzierter Replikationsstress wurde von uns mittels *DNA fibre assay* sowohl in HCT116 als auch in HepG2 nachgewiesen [5]. In den nicht proliferierenden pMH hat dieser Mechanismus jedoch aufgrund fehlender Proliferation keine Relevanz. Die Bildung von γ H2AX in pMH ist hier wahrscheinlich auf Transkriptionsstress aufgrund einer Blockierung der RNAPol II zurückzuführen, welcher bekannterweise auch ATR als DDR-Kinase aktiviert [248]. Eine Blockierung von RNAPol II durch sperrige Addukte in primären Hepatozyten wurde bisher jedoch in der Literatur noch nicht nachgewiesen, somit Bedarf diese Hypothese noch einer experimentellen Bestätigung.

Die dargestellten Western Blot-Ergebnisse stehen im Einklang mit bereits durchgeführten Analysen im Testsystem HepG2 aus unserer Arbeitsgruppe [5]. Auch

4. Diskussion

hier konnte eine dosisabhängige Induktion der genannten Proteine festgestellt werden. Auch in V79CS ist eine Induktion von γ H2AX durch OHME festzustellen [5], wohingegen eine Analyse von p53 an dieser Stelle nicht zielführend ist, da V79-Zellen lediglich mutiertes p53 exprimieren [207]. Primäre Hepatozyten stellen einen Goldstandard in der Erforschung von hepatotoxischen Substanzen dar, da die metabolische Enzymausstattung hier am ehesten den nativen Bedingungen in der Leber entspricht. Dementsprechend ist eine Bestätigung der DNA-Schädigung und p53-Aktivierung in pMH essentiell um die Relevanz der in dieser Arbeit dargestellten Daten für den lebenden Organismus darzulegen. Es konnte hier klar gezeigt werden, der ME-Metabolit OHME zur Schädigung der DNA führt und letztlich eine Akkumulation von p53 bewirkt.

Die durchgeführten Versuche wurden im Bezug auf ihre Relevanz für die Fragestellung der Reparatur von OHME-Addukten bereits in 4.2 diskutiert.

4.5 Der Tumorsuppressor p53 als Schlüsselprotein für OHME-induzierte Apoptose

Eine grundsätzliche Induktion des Tumorsuppressorproteins p53 konnte in der Arbeitsgruppe Fahrer bereits vor Beginn der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von p53 über die ATR-pChk1-Achse verläuft [5, 195]. In dieser Arbeit sollte nun die genaue Rolle von p53 als Mediator der Apoptose aufgeklärt werden. Hierzu wurden verschiedene Versuchsansätze gewählt. Die Expression von p53 konnte erfolgreich mittels siRNA-vermitteltem Knockdown herunterreguliert werden und die hieraus resultierenden Effekte wurden mit AnnexinV-FITC-PI-Färbung und Western Blot untersucht. Des Weiteren wurden die pharmakologischen Inhibitoren Nutlin3a und Pifithrin α verwendet, um entweder den Abbau von p53 durch Inhibition der E3-Ubiquitinligase Mdm2 zu hemmen oder p53 selbst zu inhibieren.

Die Effizienz des transienten p53-Knockdowns wurde mittels Western Blot überprüft, zusätzlich wurde das direkte p53-Zielgen p21 untersucht (s. Abb. 20). Die Funktionalität des Knockdowns ist klar nach 24 h, sowie 48 h zu erkennen und auch die Induktion von p53 nach OHME-Inkubation wird unterdrückt. Gleichzeitig zeigt sich, dass auch eine Induktion von p21 effizient unterdrückt wird. Neben den Western Blot-

Analysen wurde eine AnnexinV-FITC-PI-Färbung nach p53-Knockdown durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt. Die durchflusszytometrische Zelltodanalyse zeigt bei Inkubation mit 25 μM OHME eine signifikante Hemmung der Zelltodinduktion durch p53-Knockdown, dieser Effekte zeigt sich auch bei 75 μM OHME, ist hier jedoch nicht signifikant. Zu beachten ist an dieser Stelle, dass der Lipofectamin-vermittelte Knockdown selbst zu einer leichten Induktion von Apoptose zu führen scheint. Übliche Apoptoseraten in DMSO-behandelten HepG2-Zellen liegen bei unter 10 %, wohingegen in den dargestellten Daten die Apoptoserate in der Negativkontrolle bei knapp 20 % liegt. Gleichzeitig scheint die Lipofektion HepG2-Zellen für den OHME-induzierten Zelltod zu sensibilisieren. Die Apoptoseraten in den Inkubationen mit OHME liegen hier ungefähr doppelt so hoch als in vergleichbaren Messungen ohne Lipofektion. Es scheint als würde der Knockdown von p53 zu einem kompensatorischen Effekt in HepG2-Zellen führen, der das Fehlen des Tumorsuppressors ausgleicht. Aufgrund der vielfältigen Verbindungen und Abhängigkeiten von p53 wäre eine Vorhersage, welche Signalwege im gezeigten System aktiviert werden reine Spekulation. Die Literatur liefert hier keine Anhaltspunkte in HepG2-Zellen. Eine Möglichkeit die auftretenden Effekte zu untersuchen, wäre eine Genexpressionsanalyse nach p53-Knockdown durchzuführen und Gene zu untersuchen, die proapoptotische Signalwege einschalten. Ein erster Hinweis könnte die in dieser Arbeit festgestellte Induktion des *BH3only*-Proteins Bim sein. Dieses wird nicht direkt von p53 reguliert, die Regulation von Bim durch die MAPKs p38, JNK und ERK ist jedoch klar beschrieben [170]. Vor allem p38 und JNK sind als proapoptotische Mediatoren bekannt und könnten hier eine Rolle in der Spaltung von Caspase 3 spielen. ERK ist eher als antiapoptotische Kinase bekannt, an dieser Stelle wäre eine mögliche Inhibition von ERK als proapoptotischer Stimulus denkbar.

Der pharmakologische Inhibitor Pifithrin α inhibiert p53 [209] und sollte damit proapoptotische Effekte von OHME, welche auf der Funktion von p53 beruhen effektiv unterdrücken. Der konkrete Inhibitionsmechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt, vermutlich greifen verschiedene Mechanismen ineinander. Bisher konnte nachgewiesen werden, dass Pifithrin α die Phosphorylierungen von p53 an Ser15 und 33 inhibiert und zudem die Transkription ausgewählter p53-Zielgene, darunter Puma und p21, unterdrückt [249]. In dieser Arbeit wurden die Effekte einer Koinkubation von OHME mit Pifithrin α mittels Western Blot, AnnexinV-FITC-PI-Färbung und

4. Diskussion

Resazurinassay untersucht (s. Abb. 21+22). Der Inhibitor zeigt im Western Blot seine Funktion klar dadurch, dass eine Induktion von p53 nahezu vollständig bis zu einer Konzentration von 150 μM OHME unterbunden wird. Auch das p53-Zielgen p21 zeigt eine abgeschwächte Induktion. Bemerkenswert ist in diesem Versuch die vollständige Blockierung der Caspase 3-Spaltung durch Pifithrin α , was den Inhibitor als effektiven Suppressor p53-vermittelter Apoptose identifiziert. Diese Funktion zeigt sich auch in der Zelltodanalyse bzw. dem Zytotoxizitätsassay. Während sich bei Inkubation mit 25 μM OHME keine Effekte des Inhibitors zeigen bzw. dieser in der AnnexinV-FITC-PI-Färbung sogar die Effekte von OHME leicht zu verstärken scheint, zeigt sich bei höheren Konzentrationen klar eine starke, signifikante Hemmung des proapoptotischen Effekts von OHME.

Weiterhin wurde Nutlin3a als Inhibitor von Mdm2 verwendet. Mdm2 ubiquitinyliert p53 und markiert dieses damit für den proteasomalen Abbau, zusätzlich induziert p53 selbst Mdm2 auf transkriptioneller Ebene, so dass eine autoregulatorische Schleife entsteht [96, 97, 210]. Eine Inhibition von Mdm2 sollte also den Abbau von p53 verhindern und somit seine Effekte verstärken. Die Effekte einer Koinkubation von OHME und Nutlin 3a auf HepG2-Zellen wurden mittels Western Blot und AnnexinV-FITC-PI-Färbung untersucht (s. Abb. 23). Auf Proteinebene wurden p53 selbst und sein Zielgen p21 untersucht. Für p53 zeigen sich nur schwache Effekte durch Nutlin3a, die Proteinlevel werden kaum beeinflusst. Für p21 zeigen sich jedoch sehr starke Effekte. Das Protein ist bereits in der Negativkontrolle sehr stark durch Nutlin3a induziert, aufgrund dessen lässt sich anhand des durchgeführten Western Blots nicht erkennen ob differentielle Effekte in Inkubationen mit und ohne Nutlin3a auftreten. Im Gegensatz zur den Western Blot-Versuchen zeigt die AnnexinV-FITC-PI-Färbung die erwarteten Ergebnisse. Hier zeigt sich bei einer Koinkubation von Nutlin3a mit 25 μM OHME eine starke Induktion von apoptotischem Zelltod, wohingegen in Inkubationen ohne Nutlin3a keine Induktion von Zelltod zu beobachten ist.

Um die Relevanz von p53 für die von OHME induzierten Effekte weiterhin genauer zu charakterisieren und mechanistische Informationen zu gewinnen, wurde eine zeitabhängige Genexpressionsanalyse von p53-Zielgenen in HepG2 durchgeführt. Eine breiter angelegte Genexpressionsanalyse ohne zeitabhängige Komponente wurde in der AG Fahrer bereits durch Frau Dr. Anastasia Vollmer durchgeführt und ist in der zugehörigen Dissertation [195] zu finden. Hier wurden HepG2-Zellen für 24 h

mit 75 μ M OHME behandelt. Es konnte eine Induktion verschiedener proapoptotischer Zielgene von p53, wie z.B. *Noxa*, *Puma*, *FasR* und *FasL* festgestellt werden. Des Weiteren wurde eine starke Induktion von *p21* und leichte Induktionen von *Mdm2*, *Gadd45a*, *POLH* und *POLK*, sowie *XPB* und *XPC* festgestellt. Gleichzeitig wurde die Expression von *CSA*, *XPA* und *c-IAP2* reduziert. Die Genexpression von *Bax*, *Bcl2*, *Survivin*, *REV1*, *Rev2*, *POLL*, *POLI*, *XPD*, *XPF*, *XPG*, *DDB2* und *CSB* wurden von OHME nicht beeinflusst. In der in dieser Arbeit dargestellten Genexpressionsanalyse wurden HepG2-Zellen für 8, 24 und 48 h mit 75 μ M OHME behandelt (s. Abb. 24). Hier konnte die bereits berichtete starke Induktion von *Puma* und *Noxa* zeitabhängig bestätigt werden. Beide Proteine sind proapoptotische BH3only Proteine, welche direkt von p53 transkriptionell reguliert werden. Für *FasR* zeigen sich die Ergebnisse zeitabhängig schwer zu interpretieren, nach 8 h zeigt sich eine leichte Abnahme von *FasR*, nach 24h zeigt sich eine leichte Induktion, welche nach 48 h wieder zurückgeht, jedoch immernoch leicht über dem Kontrolllevel liegt. Dementsprechend sind die bereits vorhandenen Ergebnisse als bestätigt anzusehen. Im Rahmen der Dissertation von Frau Anastasia Vollmer wurde zusätzlich die Spaltung verschiedener Procaspasen untersucht. Hier wurde festgestellt, dass OHME keinerlei Caspase 8-Spaltung induziert [195]. Somit kann eine Relevanz von *FasR* und damit des extrinsischen Apoptosewegs im OHME-induzierten Zelltod ausgeschlossen werden. Für *Gadd45a*, *Mdm2* und *p21* konnten die Ergebnisse von Frau Dr. Vollmer bestätigt werden, für alle drei Gene werden zeitabhängig induziert. Für den proapoptotischen Effektor *Bax* zeigt sich wie in Frau Dr. Vollmers Analyse keine Induktion nach bis zu 24 h, jedoch ergibt sich eine leichte Induktion nach 48 h. *Bax* ist zwar als transkriptionelles Ziel von p53 beschrieben [250], jedoch kann *Bax* sehr stark posttranslational reguliert werden, dementsprechend ist eine Relevanz von *Bax* für den OHME induzierten Zelltod anhand dieser Analyse nicht eindeutig belegt und wird im Weiteren noch anhand anderer Daten diskutiert. Zusätzlich zu den genannten Genen wurde *Bim* als nicht klassisch von p53 reguliertes Gen analysiert, da Hinweise auf eine Rolle von *Bim* im OHME-induzierten Zelltod gefunden wurden. Hier konnte keine Induktion von *Bim* auf transkriptioneller Ebene festgestellt werden. Dies deckt sich mit Untersuchungen zum Schwammxtoxin IQ. Hier konnte in anderen Studien unserer Arbeitsgruppe festgestellt werden, dass IQ in HCT116-Zellen *Bim* massiv auf Proteinebene induziert, jedoch auf transkriptioneller Ebene maximal eine schwache

4. Diskussion

Induktion zu beobachten ist [215]. Die Rolle von Bim und mögliche Implikationen dieser Ergebnisse werden in einem späteren Kapitel noch genauer diskutiert.

Nach Beendigung des praktischen Teils dieser Arbeit wurden weitere Versuche mit p53siRNA und OHME durchgeführt. Zum einen wurde die OHME-induzierte Genexpression nach Depletion von p53 untersucht und zum anderen wurde der Einfluss eines p53-Knockdowns auf die Aktivierung von Bax untersucht. In der Genexpressionsanalyse wurden *FasR*, *Bax*, *Puma*, *Noxa*, *Mdm2* und *p21* nach Inkubation mit 75 µM OHME für 24 h untersucht. Es konnte hier für alle Gene außer *Mdm2* festgestellt werden, dass die Induktion durch OHME durch Knockdown von p53 mindestens leicht verringert wird. Die Effekte auf die Aktivierung von Bax fallen noch überzeugender aus. Hier konnte nach 48 h Inkubation mit 50 µM OHME in den p53siRNA behandelten Zellen keinerlei Bax-Aktivierung mehr festgestellt werden. In den scrRNA behandelten Proben wiesen ähnlich viele Zellen aktives Bax auf wie in dem in Abbildung 26 dargestellten Versuch [5].

Zusammenfassend zeigt sich durch die beschriebenen Versuche klar die Schlüsselrolle von p53 in der OHME-induzierten Apoptose. Eine Unterbindung der Effekte von p53 durch einerseits siRNA-vermittelten Knockdown und andererseits den pharmakologischen Inhibitor Pifithrin α führen klar zu einer verminderten Induktion der OHME-vermittelten Apoptose. Gleichzeitig führt eine Stabilisierung von p53 durch Inhibition von *Mdm2* zu stark erhöhten Zelltodraten. Zusätzlich konnte eine starke, zeitabhängige Induktion der p53-Zielgene *Puma*, *Noxa* und *p21* nachgewiesen werden, welche mit Apoptose und Zellzyklusarrest assoziiert sind. Die Aktivierung von p53 über die ATR-Chk1-Achse wurde bereits in verschiedenen Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe untersucht. Die Phosphorylierung von ATR und Chk1 nach OHME Inkubation konnte mittels Westernblot nachgewiesen werden, zudem konnte die Abhängigkeit der Phosphorylierung von p53 an Ser15 von ATR mittels Versuchen mit Koinkubation mit OHME und einem ATR-Inhibitor nachgewiesen werden [5, 195].

4.6 OHME induziert mitochondrielle Apoptose

Wie im vorhergehenden Kapitel bereits beschrieben bewirkt OHME eine Akkumulation von p53, welches dann transkriptionell die Expression von *Noxa* und *Puma* induziert.

Beide Gene codieren für proapoptotische BH3*only* Proteine, die in der Literatur eine wichtige Rolle als proapoptotische Mediatoren im mitochondrialen Apoptoseweg einnehmen [138, 139]. Um den durch OHME ausgelösten Apoptoseweg genauer aufzuklären, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. BH3*only* Proteine binden nach der Expression sowohl an anti- als auch an pro-apoptotische Mitglieder der Familie der Bcl2-Proteine, wobei antiapoptotische Proteine inhibiert und die Funktion von proapoptotischen Proteinen unterstützt wird [138]. Infolgedessen kommt es zur Aktivierung der proapoptotischen Effektoren Bax und Bak, welche letztenendes MOMP-Bildung induzieren [194]. Die Expression von Bax kann zusätzlich transkriptionell durch p53 induziert werden. OHME induziert Bax auf dieser Ebene jedoch nur schwach, wie Abbildung 24 zu entnehmen ist. Diese Genexpressionsanalyse steht im Einklang zu Western Blot-Untersuchungen von Bax welche in Abbildung 25 zu finden sind, auch hier ist höchstens eine schwache Induktion festzustellen. Da die Aktivität von Bax, wie gerade beschrieben stark von posttranslationalen Mechanismen abhängig ist wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von aktiviertem Bax durchgeführt (Abb. 26). Hier konnte klar eine konzentrationsabhängige Aktivierung von Bax nach 48 h Inkubation festgestellt werden. Diese ist bereits ab einer Konzentration von 25 μ M OHME hochsignifikant. Zu beachten ist an dieser Stelle, dass höhere Konzentrationen als 50 μ M OHME nicht untersucht werden konnten, da die apoptotischen Effekte zu stark waren und nach der Fixation und Färbeprozedur keine auswertbaren Zellen mehr auf dem Objektträger verblieben sind. Um mitochondrielle Apoptose zu induzieren, müssen die proapoptotischen Effektoren an den Mitochondrien lokalisieren und hier MOMP induzieren [194]. Um die Lokalisation von Bax zu prüfen, wurde zusätzlich eine Cofärbung von aktivem Bax mit dem mitochondrienspezifischen Farbstoff MitoTracker RedCMXRos durchgeführt (s. Abb. 27 und 28). Hier ist klar die Lokalisation von aktivem Bax an den Mitochondrien zu erkennen. Zudem ist zu erkennen, dass die Intensität der MitoTracker-Färbung mit steigenden OHME-Konzentrationen abnimmt. Da die Intensität der MitoTracker RedCMXRos-Färbung vom Membranpotential der Mitochondrien abhängig ist [251], stellt dies einen Hinweis auf eine zunehmende Depolarisation der mitochondrialen Membran dar. Nach erfolgter MOMP-Bildung strömen verschiedene proapoptotische Proteine aus dem Mitochondrium. Zu diesen gehört Cytochrom C, welches im weiteren mit Apaf1 das Apoptosom bildet und die Caspasekaskade in Gang setzt [83]. Die apoptotische Relokalisation von Cytochrom

4. Diskussion

C wurde mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht (s. Abb. 29). In den Negativkontrollen ist eine scharfe Lokalisation des Cytochrom C-Signals zu erkennen, während nach 48 h Inkubation mit 50 μ M OHME Cytochrom C im gesamten Cytoplasma diffus lokalisiert ist. Die nachfolgende Aktivierung der Caspasekaskade wurde bereits in der Arbeitsgruppe Fahrer während der Dissertation von Dr. Anastasia Vollmer untersucht. Sie konnte mittels Western Blot feststellen, dass Caspase 9-Spaltung nach OHME-Inkubation induziert wird und im Weiteren auch Caspase 3 als Effektorcaspase gespalten wird. Zudem konnte festgestellt werden, dass OHME keine Caspase 8-Spaltung induziert [5, 195]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Caspase 9 und 3-Spaltung mittels Western Blot bestätigt, zudem wurde ein luminometrischer Caspase3/7-Aktivitätsassay durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt. Im luminometrischen Aktivitätsassay zeigt sich bereits nach 24 h eine dosisabhängige Induktion der Caspaseaktivität, welche sich auch im Western Blot zeigt.

Mit den beschriebenen Ergebnissen konnte der in der Literatur beschriebene intrinsische Apoptoseweg mehr oder weniger lückenlos nachskizziert werden. OHME induziert p53, welches daraufhin transkriptionell die *BH3only* Proteine Noxa und Puma induziert. Diese wiederum aktivieren den proapoptotischen Effektor Bax posttranslational. Es kommt zur Bildung von MOMP, Cytochrom C strömt aus den Mitochondrien und bildet mit Apaf1 das Apoptosom. Procaspase 9 wird als Initiatorcaspase gespalten und spaltet im weiteren Procaspase 3, welche als Effektorcaspase wirkt und letztendlich Apoptose induziert. Für eine Beteiligung des extrinsischen Apoptosewegs unter physiologischen Bedingungen konnte kein Hinweis gefunden werden. In Genexpressionsanalysen zeigt sich nur eine schwache Induktion von *FasR* als Schlüsselgen der extrinsischen Apoptose. Zudem konnte im Rahmen der Dissertation von Anastasia Vollmer festgestellt werden, dass OHME keine Spaltung von Caspase 8 induziert, welche typischerweise vom DISC-Komplex im Rahmen der rezeptorvermittelten Apoptose gespalten wird.

Bisher wurde in der Literatur die ME-assoziierte Apoptose kaum charakterisiert. Es existiert eine ältere Studie, die sich konkret mit Methyleugenol und seinen Metaboliten im Kontext der Apoptose beschäftigt. Hier wurden Phosphorylierungen von ATM, ATR, Chk1 und p53 nach Inkubation mit ME, OHME, Methyleugenolepoxid, sowie 3'-Oxomethylisoeugenol in HT29-Zellen untersucht. Es wurde eine schwache, aber

dosisabhängige Induktion der genannten Phosphorylierungen festgestellt und diese im weiteren auch mit G2/M-Arrest und Caspaseaktivierung korreliert [252]. Die genannte Studie sollte jedoch kritisch betrachtet werden. HT29-Zellen sind eine humane Darmkrebszelllinie und dementsprechend ist hier keinerlei CYP-Aktivität zu erwarten, dementsprechend stellt sich die Frage welcher molekulare Mechanismus hinter den beschriebenen Effekten von ME selbst steht, da die Zelllinie nicht zur Metabolisierung zum proximalen Kanzerogen OHME befähigt sein sollte. Folgerichtig haben die Autoren auch jene Metabolite von ME getestet, welche bereits als adduktbildend beschrieben waren. Im Falle von OHME ist zur Adduktbildung eine weitere Metabolisierung durch SULT1A1 notwendig. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass HT29-Zellen eine SULT1A1-Aktivität aufweisen [253], jedoch kann die Aktivität in HT29 nicht in Relation zur Aktivität in der Leber als relevantes Zielorgan gesetzt werden. Im Rahmen der Dissertation von Anastasia Vollmer wurden verschiedene in unserer Arbeitsgruppe verwendete Zelllinien auf ihre SULT1A1-Expression hin untersucht. Hier bestätigen sich die genannten Literaturergebnisse, HT29 weisen zwar eine schwache SULT1A1-Bande auf, diese ist jedoch viel schwächer als jene der in dieser Arbeit verwendeten HepG2-Zellen [195]. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Expression von SULT1A1 viel geringer ist als in Leberkrebszelllinien und stellen somit auch die Relevanz der von Groh *et al.* gefundenen Ergebnisse in Frage. Als letzter Kritikpunkt ist die Untersuchung von Phosphorylierungen von p53 zu erkennen. Aus dem Manuskript geht nicht klar hervor, welche Phosphorylierung von p53 untersucht wurde. Auf methodischer Ebene muss bemängelt werden, dass mit HT29 eine Zelllinie gewählt wurde, die eine Mutation in *TP53* trägt durch welche His273 durch Arginin ersetzt wird. Dies führt einerseits zur Überexpression von p53 und stellt zudem eine *gain of function*-Mutation dar [254]. Durch diese genetische Varianz entstehende Effekte werden in der Studie nicht in Betracht gezogen, wobei in der Literatur klar beschrieben ist, dass ein differierender p53-Status in hochgradig variierenden Effekten verschiedener Substanzen resultieren kann und dass vor allem im Kontext der Krebstherapie p53-Mutationen vielfach zu Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika führen können [255, 256]. Auch für strukturverwandte Substanzen wie bspw. Estragol finden sich in der Literatur kaum belastbaren Daten zu möglicher Relevanz im Kontext der Apoptose und dementsprechend auch keine konkrete Aufklärung des möglichen apoptotischen Mechanismus. Eine einzelne neuere Studie mit Estragol weist eine Induktion von p53,

4. Diskussion

p-p53(Ser15) und *cleaved* Caspase 3 in *gpt* delta-Ratten nach. Hier wird auch mittels histopathologischer Methoden eine Induktion von Apoptose nachgewiesen [247]. Dementsprechend wurde im Rahmen der Arbeiten in der Arbeitsgruppe Fahrer erstmals ein durch Phenylpropanoide induzierter Apoptosemechanismus klar aufgeklärt. Abbildung 41 stellt eine graphische Darstellung dieses Mechanismus dar. Die Abbildung beinhaltet die zentralen Ergebnisse dieser Arbeit, zudem wurden die Ergebnisse der Dissertation von Frau Dr. Anastasia Vollmer und weitere Ergebnisse der AG Fahrer in Betracht gezogen.

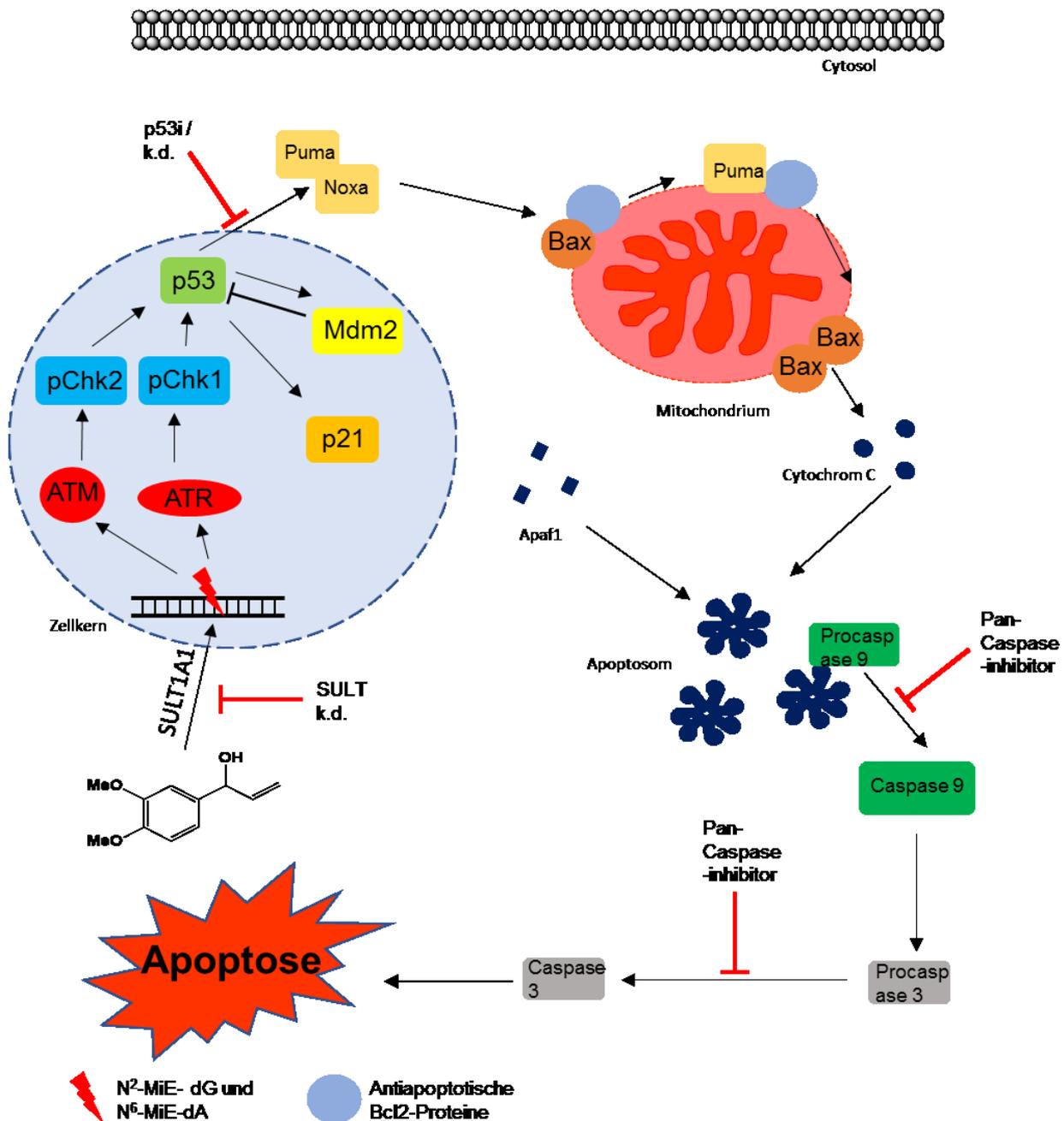


Abbildung 41: Modell des OHME-induzierten Apoptosemechanismus. Die Abbildung fasst die Ergebnisse dieser Arbeit, sowie der Arbeit von Frau Dr. Anastasia Vollmer und andere Ergebnisse der AG Fahrer zusammen [5, 195].

4.7 Zur Rolle des BH3only Protein Bim im OHME induzierten Zelltod

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Induktion von Bim nach OHME-Inkubation nachgewiesen werden. Abbildung 31 zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung von Bim in Kofärbung mit MitoTracker RedCMXRos und zeigt klar eine konzentrationsabhängige Induktion von Bim, sowie die Kolo-kalisation des Proteins mit den Mitochondrien. Um die genaue Funktion von Bim im OHME-induzierten Zelltod genauer zu untersuchen, wurde eine Bim-defiziente HepG2 Linie von der Arbeitsgruppe Thomas Brunner (Universität Konstanz) zur Verfügung gestellt. Alle Experimente wurden mit der Bim-defizienten Linie, sowie der korrespondierenden Wildtyp-Linie als Vergleich durchgeführt. Die Induktion von Bim konnte in den genannten HepG2-Linien mittels Western Blot zeit- und dosisabhängig bestätigt werden (Abb. 32-35). In den dargestellten Versuchen konnte nicht klar identifiziert werden, auf welche Isoform von Bim OHME den meisten-Einfluss hat. Während im dosisabhängigen Versuch (Abbildung 32/33) Bim_{EL} am stärksten induziert wird, zeigen sich im zeitabhängigen Versuch (Abbildung 34/35) nur geringe Effekte auf Bim_{EL}, jedoch eine starke Induktion von Bim_L und Bim_S. Des Weiteren wurden im selben Versuch die Effekte der Bim-Defizienz auf die Spaltung von Caspase 9 und 3 nach OHME-Inkubation untersucht. Hier konnten nur geringfügige Unterschiede festgestellt werden. Zusätzlich wurden ein SubG1- sowie ein Resazurinassay in dem beschriebenen Zelllinienpaar durchgeführt (Abb. 35). Im SubG1-Assay zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien. Im Resazurinassay zeigt sich die Bim-defiziente Zelllinie empfindlicher gegenüber OHME als der Wildtyp. Intuitiv erwartet man bei einem Knockout eines proapoptischen Proteins, dass eine Zelllinie unempfindlicher gegenüber apoptotischen Stimuli wird [257, 258]. Im Lichte dessen sind die beschriebenen Ergebnisse kontraintuitiv, da in den meisten Versuchen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien festgestellt werden konnten bzw. im Resazurinassay sogar gegenteilige Ergebnisse zu beobachten waren. Um diese Befunde weiter aufzuklären, wurde eine Genexpressionsanalyse in den betreffenden Zelllinien durchgeführt (s. Abb. 36). Die meisten Gene verhalten sich an dieser Stelle wie in der bereits beschriebenen Genexpressionsanalyse in wildtypischen HepG2. Auffällig sind die Ergebnisse für *Bcl2* und *Survivin*. *Bcl2* wird in der Bim-defizienten Zelllinie nach Inkubation mit OHME als auch der Positivkontrolle IQ extrem stark herabreguliert, wohingegen im Wildtyp keine Herabregulation stattfindet. *Bcl2* ist ein antiapoptisches Gen und steht damit in seiner Wirkung entgegengesetzt Bim.

4. Diskussion

Hierdurch könnte ein kompensatorischer Effekt entstehen, durch welchen die Effekte des Bim-Knockouts nicht mehr klar in den durchgeführten Assays darstellbar sind. Zusätzlich fällt an dieser Stelle auf, dass das antiapoptotische *Survivin* nach Inkubation mit OHME stark herabreguliert wird. *Survivin* wurde bereits im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. Anastasia Vollmer untersucht. In der hier durchgeführten Analyse konnte kein Effekt von OHME auf die Expression von *Survivin* festgestellt werden [195]. In Frau Vollmers Arbeit wurden die HepG2-Zellen nur für 24 h mit 75 μ M OHME behandelt, in der hier beschriebenen Analyse für 48 h, was die unterschiedlichen Befunde erklären könnte. Jedoch könnte sich hinter diesem Befund auch eine genetische Varianz zwischen der standardmäßig in der AG Fahrer verwendeten HepG2-Linie und der in der AG Brunner verwendeten Linie verbergen. Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass durch die CRISPR/Cas9-vermittelte genetische Modifikation der Zellen unbeabsichtigte Effekte auftreten. Die parentale HepG2-Linie zur *Bim*^{-/-}-Linie wurde als Negativkontrolle mit einem Leervektor transfiziert. Die resultierenden Klone wurden im Rahmen der betreffenden Doktorarbeit von Frau Dr. Janine Demgenski nur hinsichtlich ihrer *Bim*-Expression charakterisiert und nicht auf mögliche weitere, durch die genetischen Modifikationen entstehende Eigenheiten der neuen Zelllinie hin untersucht [259].

Zusammenfassend zeigen die hier beschriebenen Ergebnisse eindeutig, dass OHME *Bim* induziert. Die Western Blot Ergebnisse aus Abbildung 32 bis 35 waren nicht eindeutig genug, um eine spezifische Induktion einer einzelnen *Bim*-Isoform festzustellen. Zur Aufklärung des Induktionsmechanismus wäre eine Identifikation der Isoformen wichtig, da verschiedene Isoformen von *Bim* durch unterschiedliche Mechanismen reguliert werden. Die weiteren Experimente in dem *Bim*-defizienten HepG2-Paar lieferten kontraintuitive Ergebnisse, was durch den in der Genexpressionsanalyse beschriebenen Befund erklärbar ist. Jedoch zeigen diese Ergebnisse, dass das Zelllinienpaar nicht ideal zur Untersuchung der Effekte von OHME in diesem Kontext ist. *Bim* wird klassischerweise nicht direkt über p53 reguliert, sondern über die MAPKs JNK und ERK [170]. Eine Induktion von JNK bzw. eine Inhibition von ERK könnten für eine Induktion von *Bim* verantwortlich sein. Gleichzeitig existieren jedoch über verschiedene Wege indirekte Verbindungen zu p53. Beispielsweise ist *Gadd45a* ein Zielgen von p53, welches auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. *Gadd45a* aktiviert MEKK4, welche im weiteren JNK und p38 aktivieren kann [260]. Eine Aktivierung durch eine der genannten MAPK erscheint im

Licht der von Ishii et al. durchgeführten Studie wahrscheinlich. Eine detaillierte Beschreibung des Studienaufbaus befindet sich in 4.4. Hier konnte eine Induktion von pERK, pJNK und p-p38 in *gpt* delta-Ratten nach Administration des strukturverwandten Estragol festgestellt werden [247]. Der genaue Induktionsmechanismus von Bim durch OHME sollte aufgeklärt werden, um die Rolle von Bim im OHME-induzierten Zelltod genauer aufzuklären. Falls die Induktion p53-unabhängig erfolgt, könnte Bim eine Art Sicherungsmechanismus gegenüber der häufig vorkommenden p53-Defizienz in Krebs darstellen. Dies wurde in der Literatur beispielsweise für das marine Toxin Pectenotoxin-2 (PTX2) berichtet, welches Aktinfilamente destabilisiert [261]. Es konnte nachgewiesen werden, dass PTX2 in p53-defizienten, aber nicht in wildtypischen HCT116 Bim- und Bax-vermittelt intrinsische Apoptose induziert [262]. Ein ähnlicher Mechanismus könnte einen Erklärungsansatz für die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse des p53-Knockdownversuchs in HepG2 darstellen. Hier wurde festgestellt, dass trotz p53-Knockdown immer noch Zelltod durch OHME induziert wird. Zur Untersuchung dieser Fragestellungen könnten sowohl Versuche mit Bim- als auch p53-Knockdown durchgeführt werden. Zudem wäre der Einsatz von JNK- oder ERK-Inhibitoren vorstellbar. Auch eine direkte Untersuchung der aktivierten JNK-/ERK-Varianten mittels beispielsweise Western Blot wäre hier von Vorteil.

5. Fazit & Ausblick

Die Arbeitsgruppe Fahrer hat es sich zum Ziel gesetzt die der DNA-Adduktbildung nachfolgenden, zellulären Effekte von ME genauer zu charakterisieren. Bereits in der Dissertation von Frau Dr. Anastasia Vollmer konnte die Rolle der DDR-Kinase ATR herausgestellt und p53 als zentrales Protein der induzierten Apoptose identifiziert werden. In der nun vorliegenden Arbeit konnte die Rolle von p53 weiter vertiefend geklärt und letztendlich ein vollständiger Apoptosemechanismus demonstriert werden. Nach Aktivierung der DDR-Kaskade wird p53 stabilisiert und aktiviert auf transkriptioneller Ebene die proapoptotischen BH3*only* Proteine Puma und Noxa. Gleichzeitig wird ein Zellzyklusarrest durch Induktion von p21 eingeläutet. Puma und Noxa inhibieren nun antiapoptotische Bcl2-Proteine und aktivieren so den proapoptotischen Effektor Bax. Es kommt zur MOMP-Bildung, verschiedene Proteine des mitochondrialen Intermembranraums, z.B. Cytochrom C, strömen aus. Das Apoptosom formiert sich und löst eine Caspasekaskade aus und es kommt zur Apoptose.

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, dass das BH3*only* Protein Bim durch OHME induziert wird, die konkrete Rolle dessen und der Aktivierungsmechanismus konnten jedoch noch nicht aufgeklärt werden und stellen Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen dar. Bim wird klassischerweise nicht direkt durch p53 induziert, sondern durch die Aktivität verschiedener MAPKs. Hier sollte durch Knockdown- und Inhibitorversuche geklärt werden, welche MAPK für die Aktivierung von Bim verantwortlich sind. Da jedoch indirekte Verbindungen zwischen Bim und p53, bspw. über Gadd45a bestehen sollte hier z.B. mittels weiterer p53-Knockdownversuche geklärt werden ob die Bim-Induktion p53-abhängig stattfindet. Des Weiteren könnte mittels Bim-Knockdown die genaue Rolle von Bim in der OHME-induzierten Apoptose charakterisiert werden. Spezifische Bim-Inhibitoren sind bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Eine weitere Frage im Rahmen der Apoptose ist wie die Transition von Zellzyklusarrest zu Apoptose stattfindet. Ein relevantes Untersuchungsobjekt stellt hier die Phosphorylierung von p53 an Position Ser-46 dar. Die Stabilisierung von p53 mittels Phosphorylierung von Ser15 wurde in der AG Fahrer bereits bestätigt, jedoch beschreibt die Literatur Ser46 als Phosphorylierungsstelle die letzten Endes die proapoptotische Aktivität von p53 bedingt [105, 106]. Hier sollte zuerst auf

Proteinebene mittels Western Blot p-p53(Ser46) nachgewiesen werden. Im Weiteren sollte mit Hilfe von Inhibitor- oder Knockdownversuchen geklärt werden welche Kinase für diese Phosphorylierung verantwortlich ist. *Homeodomain interacting protein kinase 2* (HIPK2), *dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2* (DYRK2), ATM, p38 und Proteinkinase C- δ sind hier als potentiell relevante Kinasen zu sehen, da von diesen bekannt ist, dass sie p53 bei genotoxischem Stress direkt oder indirekt an Ser46 phosphorylieren [105].

Weiterhin konnten pMH als zusätzliches Testsystem in der Arbeitsgruppe etabliert und für verschiedene Versuche eingesetzt werden. Die Induktion von p53 und γ H2AX als DNA-Schadensmarker konnte in pMH bestätigt werden. Zudem konnten diese für DNA-Adduktmessungen eingesetzt werden und wurden in einem Nebenprojekt zur Untersuchung der Effekte von HDAC-Inhibitoren verwendet. Eine Addukt-reparatur konnte in HepG2-Zellen nachgewiesen werden, wobei hier noch weitere Aufklärung des Reparaturmechanismus notwendig ist. Das Thema der Addukt-reparatur liefert noch diverse offene Fragen. Wie bereits beschrieben sollten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Adduktanalysen in wildtypischen und XPA-defizienten pMH mit einem abgeänderten Versuchsaufbau wiederholt werden, um nachzuweisen, dass die NER auch in diesem Testsystem für die Reparatur der Addukte verantwortlich ist. Zudem sollten Versuche auf zellulärer Ebene zur Absicherung dieser Ergebnisse durchgeführt werden. Vorstellbar ist hier die Inkorporation von EdU nach OHME-Inkubation in pMH in einem Versuchsaufbau ähnlich dem früher angewendeten UDS-Assay zu testen. Da pMH nicht proliferieren, ist ein Einbau von EdU in die DNA auf Reparaturvorgänge zurückzuführen und könnte mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie direkt im Zellkern lokalisiert und quantifiziert werden. Auch dieser Versuch ist vergleichend zwischen wildtypischen und XPA-defizienten pMH vorstellbar. Zur Aufklärung des Reparaturmechanismus können die bereits erwähnten CSA- bzw. DDB2-defizienten HeLa-Zellen einen wichtigen Beitrag liefern. Die Addukt-bildung und -reparatur sollte hier zusätzlich zu den bereits im Rahmen der Masterarbeit von Frau Nina Pätzold durchgeführten Versuchen mittels Massenspektrometrie untersucht werden. Des Weiteren sollten die OHME-induzierten Reparaturwege auf Proteinebene untersucht werden. Da hier Western Blot-Versuche mit einfachen Ganzzelllysaten häufig problematisch sind, sollte eine Isolation von Chromatin durchgeführt werden und anschließend die Proteinfraction untersucht werden. So könnte die vermehrte Bindung von Reparaturfaktoren an die DNA

5. Fazit & Ausblick

nachgewiesen werden. Zur Differenzierung von GG- und TC-NER könnten hier CSA, CSB, DDB2 und XPC untersucht werden, auch XPA stellt ein interessantes Untersuchungsobjekt dar. Da bisherige Ergebnisse auf TC-NER als relevanteren Reparaturweg hindeuten, sollte die Blockierung von RNAPol II nachgewiesen werden. Hier könnte der Phosphorylierungsstatus dieser untersucht werden. Im Laufe des Transkriptionsprozess wird p-RNAPol II(Ser5) gebildet, danach wird Ser 2 phosphoryliert und Ser5 dephosphoryliert [263]. Eine Blockierung von RNAPol II während der Transkription sollte also zur Akkumulierung von p-RNAPol II(Ser5) führen und könnte mittels Western Blot nachgewiesen werden. Falls notwendig könnte auch hier eine Chromatinisolation vorgeschaltet werden. Die beschriebenen Versuche auf Proteinebene sollten in HepG2 als relevanteres Testsystem durchgeführt werden.

Literaturverzeichnis

1. Groh, I.A., et al., *Methyleugenol and oxidative metabolites induce DNA damage and interact with human topoisomerases*. Arch Toxicol, 2016. **90**(11): p. 2809-2823.
2. Wolf, D., N. Harris, and V. Rotter, *Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene*. Cell, 1984. **38**(1): p. 119-26.
3. Arnold, M., et al., *Global Burden of 5 Major Types of Gastrointestinal Cancer*. Gastroenterology, 2020. **159**(1): p. 335-349 e15.
4. Yang, J.D., et al., *A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019. **16**(10): p. 589-604.
5. Carlsson, M.J., et al., *p53 triggers mitochondrial apoptosis following DNA damage-dependent replication stress by the hepatotoxin methyleugenol*. Cell Death Dis, 2022. **13**(11): p. 1009.
6. Atkinson, R.G., *Phenylpropenes: Occurrence, Distribution, and Biosynthesis in Fruit*. J Agric Food Chem, 2018. **66**(10): p. 2259-2272.
7. NTP, N.T.P., *Toxicology and carcinogenesis studies of methyleugenol (CAS No. 93-15-12) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies)*. 2000: NIH Publication. p. 1-412.
8. Cartus, A.T., et al., *Metabolism of methyleugenol in liver microsomes and primary hepatocytes: pattern of metabolites, cytotoxicity, and DNA-adduct formation*. Toxicol Sci, 2012. **129**(1): p. 21-34.
9. Burkey, J.L., et al., *Cytotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners-- a mechanism of activation for methyleugenol*. Mutat Res, 2000. **453**(1): p. 25-33.
10. Tremmel, R., et al., *Methyleugenol DNA adducts in human liver are associated with SULT1A1 copy number variations and expression levels*. Arch Toxicol, 2017. **91**(10): p. 3329-3339.
11. Barr, D.B., et al., *Levels of methyleugenol in a subset of adults in the general U.S. population as determined by high resolution mass spectrometry*. Environ Health Perspect, 2000. **108**(4): p. 323-8.
12. Schecter, A., et al., *Human consumption of methyleugenol and its elimination from serum*. Environ Health Perspect, 2004. **112**(6): p. 678-80.
13. Solheim, E. and R.R. Scheline, *Metabolism of alkenebenzene derivatives in the rat. II. Eugenol and isoeugenol methyl ethers*. Xenobiotica, 1976. **6**(3): p. 137-50.
14. Yao, H., Y. Peng, and J. Zheng, *Identification of glutathione and related cysteine conjugates derived from reactive metabolites of methyleugenol in rats*. Chem Biol Interact, 2016. **253**: p. 143-52.
15. Homburger, F., et al., *Toxic and possible carcinogenic effects of 4-allyl-1,2-methylenedioxybenzene (Safrole) in rats on deficient diets*. Med Exp Int J Exp Med, 1961. **4**: p. 1-11.
16. Hagan, E.C., et al., *Toxic Properties of Compounds Related to Safrole*. Toxicol Appl Pharmacol, 1965. **7**: p. 18-24.
17. Johnson, J.D., et al., *Two-year toxicity and carcinogenicity study of methyleugenol in F344/N rats and B6C3F(1) mice*. J Agric Food Chem, 2000. **48**(8): p. 3620-32.
18. Williams, G.M., et al., *Methyleugenol hepatocellular cancer initiating effects in rat liver*. Food Chem Toxicol, 2013. **53**: p. 187-96.
19. Taylor, J.M., P.M. Jenner, and W.I. Jones, *A Comparison of the Toxicity of Some Allyl, Propenyl, and Propyl Compounds in the Rat*. Toxicol Appl Pharmacol, 1964. **6**: p. 378-87.
20. Beroza, M., et al., *Acute toxicity studies with insect attractants*. Toxicol Appl Pharmacol, 1975. **31**(3): p. 421-9.
21. Abdo, K.M., et al., *14-Week toxicity and cell proliferation of methyleugenol administered by gavage to F344 rats and B6C3F1 mice*. Food Chem Toxicol, 2001. **39**(4): p. 303-16.
22. Boberg, E.W., et al., *Strong evidence from studies with brachymorphic mice and pentachlorophenol that 1'-sulfooxysafrole is the major ultimate electrophilic and carcinogenic metabolite of 1'-hydroxysafrole in mouse liver*. Cancer Res, 1983. **43**(11): p. 5163-73.

Literaturverzeichnis

23. Miller, E.C., et al., *Sulfuric acid esters as ultimate electrophilic and carcinogenic metabolites of some alkenylbenzenes and aromatic amines in mouse liver*. *Carcinog Compr Surv*, 1985. **10**: p. 93-107.
24. Fennell, T.R., et al., *Major role of hepatic sulfotransferase activity in the metabolic activation, DNA adduct formation, and carcinogenicity of 1'-hydroxy-2',3'-dehydroestragole in infant male C57BL/6J x C3H/HeJ F1 mice*. *Cancer Res*, 1985. **45**(11 Pt 1): p. 5310-20.
25. Wiseman, R.W., et al., *Further characterization of the DNA adducts formed by electrophilic esters of the hepatocarcinogens 1'-hydroxysafrole and 1'-hydroxyestragole in vitro and in mouse liver in vivo, including new adducts at C-8 and N-7 of guanine residues*. *Cancer Res*, 1985. **45**(7): p. 3096-105.
26. Jeurissen, S.M., et al., *Human cytochrome p450 enzymes of importance for the bioactivation of methyleugenol to the proximate carcinogen 1'-hydroxymethyleugenol*. *Chem Res Toxicol*, 2006. **19**(1): p. 111-6.
27. Gardner, I., et al., *Cytochrome P450 mediated bioactivation of methyleugenol to 1'-hydroxymethyleugenol in Fischer 344 rat and human liver microsomes*. *Carcinogenesis*, 1997. **18**(9): p. 1775-83.
28. Sekizawa, J. and T. Shibamoto, *Genotoxicity of safrole-related chemicals in microbial test systems*. *Mutat Res*, 1982. **101**(2): p. 127-40.
29. Honda, H., et al., *Modified Ames test using a strain expressing human sulfotransferase 1C2 to assess the mutagenicity of methyleugenol*. *Genes Environ*, 2016. **38**: p. 1.
30. Herrmann, K., et al., *Identification of human and murine sulfotransferases able to activate hydroxylated metabolites of methyleugenol to mutagens in Salmonella typhimurium and detection of associated DNA adducts using UPLC-MS/MS methods*. *Mutagenesis*, 2012. **27**(4): p. 453-62.
31. Herrmann, K., et al., *Formation of hepatic DNA adducts by methyleugenol in mouse models: drastic decrease by Sult1a1 knockout and strong increase by transgenic human SULT1A1/2*. *Carcinogenesis*, 2014. **35**(4): p. 935-41.
32. Schiestl, R.H., et al., *Safrole, eugenol and methyleugenol induce intrachromosomal recombination in yeast*. *Mutat Res*, 1989. **224**(4): p. 427-36.
33. Devereux, T.R., et al., *Mutation of beta-catenin is an early event in chemically induced mouse hepatocellular carcinogenesis*. *Oncogene*, 1999. **18**(33): p. 4726-33.
34. Smith, R.L., et al., *Safety assessment of allylalkoxybenzene derivatives used as flavouring substances - methyl eugenol and estragole*. *Food Chem Toxicol*, 2002. **40**(7): p. 851-70.
35. Williams, G.M. and M. A., *Alkoxy-substituted allylbenzenes present in foods and essential oils and used as flavouring agents*. 2009. **69**(60): p. 351-480.
36. Smith, B., et al., *Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic: example: methyleugenol, CASRN: 93-15-2*. *Food Chem Toxicol*, 2010. **48 Suppl 1**: p. S89-97.
37. IARC and I.A.f.R.o. Cancer), *Some Chemicals present in industrial and consumer products, food and drinking water 2012*. **101**.
38. Grosch, S., et al., *Comparison of GC/MS and NMR for quantification of methyleugenol in food* *European Food Research and Technology* 2013. **236**: p. 267-275.
39. Cohen, S.M., et al., *Updated procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food*. *Food Chem Toxicol*, 2018. **113**: p. 171-178.
40. (SCF), S.C.o.F., *Opinion of the Scientific Committee on Food on Methyleugenol (4- Allyl-1,2-dimethoxybenzene)*, S.C.o.F. European Commission, Editor. 2000: SCF/CS/FLAV/FLAVOUR/4 ADDI FINAL, Brussels, 26 September 2001.
41. Riboli, E., et al., *Carcinogenicity of aspartame, methyleugenol, and isoeugenol*. *Lancet Oncol*, 2023. **24**(8): p. 848-850.
42. van den Berg, S.J., et al., *Safety assessment of plant food supplements (PFS)*. *Food Funct*, 2011. **2**(12): p. 760-8.

43. Lindahl, T. and D.E. Barnes, *Repair of endogenous DNA damage*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2000. **65**: p. 127-33.
44. Jackson, S.P. and J. Bartek, *The DNA-damage response in human biology and disease*. Nature, 2009. **461**(7267): p. 1071-8.
45. Ward, J.F., *DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1988. **35**: p. 95-125.
46. Wogan, G.N., et al., *Environmental and chemical carcinogenesis*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(6): p. 473-86.
47. Sarniak, A., et al., *Endogenous mechanisms of reactive oxygen species (ROS) generation*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2016. **70**(0): p. 1150-1165.
48. Roos, W.P., A.D. Thomas, and B. Kaina, *DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(1): p. 20-33.
49. Eich, M., et al., *Contribution of ATM and ATR to the resistance of glioblastoma and malignant melanoma cells to the methylating anticancer drug temozolomide*. Mol Cancer Ther, 2013. **12**(11): p. 2529-40.
50. Pusapati, R.V., et al., *ATM promotes apoptosis and suppresses tumorigenesis in response to Myc*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(5): p. 1446-51.
51. Smith, H.L., et al., *DNA damage checkpoint kinases in cancer*. Expert Rev Mol Med, 2020. **22**: p. e2.
52. Paull, T.T., *Mechanisms of ATM Activation*. Annu Rev Biochem, 2015. **84**: p. 711-38.
53. Bakkenist, C.J. and M.B. Kastan, *DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation*. Nature, 2003. **421**(6922): p. 499-506.
54. Kozlov, S.V., et al., *Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation*. EMBO J, 2006. **25**(15): p. 3504-14.
55. Uziel, T., et al., *Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage*. EMBO J, 2003. **22**(20): p. 5612-21.
56. Shiotani, B. and L. Zou, *Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks*. Mol Cell, 2009. **33**(5): p. 547-58.
57. Saldivar, J.C., D. Cortez, and K.A. Cimprich, *The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(10): p. 622-636.
58. Bermudez, V.P., et al., *Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1633-8.
59. Wold, M.S., *Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism*. Annu Rev Biochem, 1997. **66**: p. 61-92.
60. Yazinski, S.A. and L. Zou, *Functions, Regulation, and Therapeutic Implications of the ATR Checkpoint Pathway*. Annu Rev Genet, 2016. **50**: p. 155-173.
61. Bass, T.E., et al., *ETAA1 acts at stalled replication forks to maintain genome integrity*. Nat Cell Biol, 2016. **18**(11): p. 1185-1195.
62. Liu, S., et al., *ATR autophosphorylation as a molecular switch for checkpoint activation*. Mol Cell, 2011. **43**(2): p. 192-202.
63. Marteijn, J.A., et al., *Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(7): p. 465-81.
64. Natale, V. and H. Raquer, *Xeroderma pigmentosum-Cockayne syndrome complex*. Orphanet J Rare Dis, 2017. **12**(1): p. 65.
65. Sugasawa, K., et al., *Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair*. Mol Cell, 1998. **2**(2): p. 223-32.
66. Sugasawa, K., et al., *A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair*. Genes Dev, 2001. **15**(5): p. 507-21.
67. Maillard, O., et al., *DNA repair triggered by sensors of helical dynamics*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(11): p. 494-9.

Literaturverzeichnis

68. Wittschieben, B.O., S. Iwai, and R.D. Wood, *DDB1-DDB2 (xeroderma pigmentosum group E) protein complex recognizes a cyclobutane pyrimidine dimer, mismatches, apurinic/aprimidinic sites, and compound lesions in DNA*. J Biol Chem, 2005. **280**(48): p. 39982-9.
69. Pines, A., et al., *PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1*. J Cell Biol, 2012. **199**(2): p. 235-49.
70. Vermeulen, W. and M. Fousteri, *Mammalian transcription-coupled excision repair*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(8): p. a012625.
71. Anindya, R., O. Aygun, and J.Q. Svejstrup, *Damage-induced ubiquitylation of human RNA polymerase II by the ubiquitin ligase Nedd4, but not Cockayne syndrome proteins or BRCA1*. Mol Cell, 2007. **28**(3): p. 386-97.
72. Yokoi, M., et al., *The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIH to damaged DNA*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9870-5.
73. Compe, E. and J.M. Egly, *TFIIH: when transcription met DNA repair*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(6): p. 343-54.
74. Coin, F., V. Oksenyshyn, and J.M. Egly, *Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair*. Mol Cell, 2007. **26**(2): p. 245-56.
75. Fagbemi, A.F., B. Orelli, and O.D. Scharer, *Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair*. DNA Repair (Amst), 2011. **10**(7): p. 722-9.
76. Scharer, O.D., *Nucleotide excision repair in eukaryotes*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(10): p. a012609.
77. de Laat, W.L., et al., *DNA-binding polarity of human replication protein A positions nucleases in nucleotide excision repair*. Genes Dev, 1998. **12**(16): p. 2598-609.
78. Dunand-Sauthier, I., et al., *The spacer region of XPG mediates recruitment to nucleotide excision repair complexes and determines substrate specificity*. J Biol Chem, 2005. **280**(8): p. 7030-7.
79. Ogi, T., et al., *Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells*. Mol Cell, 2010. **37**(5): p. 714-27.
80. Melino, G., *The Sirens' song*. Nature, 2001. **412**(6842): p. 23.
81. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. Cell Death Differ, 2009. **16**(1): p. 3-11.
82. Majno, G. and I. Joris, *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 3-15.
83. D'Arcy, M.S., *Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy*. Cell Biol Int, 2019. **43**(6): p. 582-592.
84. Su, Z., et al., *Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis*. Mol Cancer, 2015. **14**: p. 48.
85. Tang, R., et al., *Ferroptosis, necroptosis, and pyroptosis in anticancer immunity*. J Hematol Oncol, 2020. **13**(1): p. 110.
86. Parzych, K.R. and D.J. Klionsky, *An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(3): p. 460-73.
87. Saha, S., et al., *Autophagy in health and disease: A comprehensive review*. Biomed Pharmacother, 2018. **104**: p. 485-495.
88. Golstein, P. and G. Kroemer, *Cell death by necrosis: towards a molecular definition*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(1): p. 37-43.
89. Festjens, N., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele, *Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1757**(9-10): p. 1371-87.
90. Adams, J.M. and S. Cory, *Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(5): p. 488-96.

91. Fan, T.J., et al., *Caspase family proteases and apoptosis*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2005. **37**(11): p. 719-27.
92. Carneiro, B.A. and W.S. El-Deiry, *Targeting apoptosis in cancer therapy*. Nat Rev Clin Oncol, 2020. **17**(7): p. 395-417.
93. Hotchkiss, R.S., et al., *Cell death*. N Engl J Med, 2009. **361**(16): p. 1570-83.
94. Billen, L.P., A. Shamas-Din, and D.W. Andrews, *Bid: a Bax-like BH3 protein*. Oncogene, 2008. **27 Suppl 1**: p. S93-104.
95. Aubrey, B.J., et al., *How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?* Cell Death Differ, 2018. **25**(1): p. 104-113.
96. Meng, X., et al., *MDM2-p53 pathway in hepatocellular carcinoma*. Cancer Res, 2014. **74**(24): p. 7161-7.
97. Wade, M., Y.C. Li, and G.M. Wahl, *MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(2): p. 83-96.
98. Riley, T., et al., *Transcriptional control of human p53-regulated genes*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(5): p. 402-12.
99. Kamada, R., et al., *Tetramer formation of tumor suppressor protein p53: Structure, function, and applications*. Biopolymers, 2016. **106**(4): p. 598-612.
100. Menendez, D., A. Inga, and M.A. Resnick, *The expanding universe of p53 targets*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(10): p. 724-37.
101. Oren, M., *Regulation of the p53 tumor suppressor protein*. J Biol Chem, 1999. **274**(51): p. 36031-4.
102. Reich, N.C. and A.J. Levine, *Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells*. Nature, 1984. **308**(5955): p. 199-201.
103. Loughery, J., et al., *Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(12): p. 7666-80.
104. Jones, R.G., et al., *AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint*. Mol Cell, 2005. **18**(3): p. 283-93.
105. Liebl, M.C. and T.G. Hofmann, *Cell Fate Regulation upon DNA Damage: p53 Serine 46 Kinases Pave the Cell Death Road*. Bioessays, 2019. **41**(12): p. e1900127.
106. Yoshida, S. and K. Yoshida, *Multiple functions of DYRK2 in cancer and tissue development*. FEBS Lett, 2019. **593**(21): p. 2953-2965.
107. Higashimoto, Y., et al., *Human p53 is phosphorylated on serines 6 and 9 in response to DNA damage-inducing agents*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 23199-203.
108. Adorno, M., et al., *A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis*. Cell, 2009. **137**(1): p. 87-98.
109. Dai, C. and W. Gu, *p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis*. Trends Mol Med, 2010. **16**(11): p. 528-36.
110. Knights, C.D., et al., *Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate*. J Cell Biol, 2006. **173**(4): p. 533-44.
111. Sykes, S.M., et al., *Acetylation of the DNA binding domain regulates transcription-independent apoptosis by p53*. J Biol Chem, 2009. **284**(30): p. 20197-205.
112. Juang, Y.C., et al., *OTUB1 co-opts Lys48-linked ubiquitin recognition to suppress E2 enzyme function*. Mol Cell, 2012. **45**(3): p. 384-97.
113. Fischbach, A., et al., *The C-terminal domain of p53 orchestrates the interplay between non-covalent and covalent poly(ADP-ribosylation) of p53 by PARP1*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(2): p. 804-822.
114. Huang, J., et al., *Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation*. Nature, 2006. **444**(7119): p. 629-32.
115. Shi, X., et al., *Modulation of p53 function by SET8-mediated methylation at lysine 382*. Mol Cell, 2007. **27**(4): p. 636-46.
116. Chuikov, S., et al., *Regulation of p53 activity through lysine methylation*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 353-60.

Literaturverzeichnis

117. Stehmeier, P. and S. Muller, *Regulation of p53 family members by the ubiquitin-like SUMO system*. DNA Repair (Amst), 2009. **8**(4): p. 491-8.
118. Naidu, S.R., A.J. Lakhter, and E.J. Androphy, *PIASy-mediated Tip60 sumoylation regulates p53-induced autophagy*. Cell Cycle, 2012. **11**(14): p. 2717-28.
119. Chen, L., S. Liu, and Y. Tao, *Regulating tumor suppressor genes: post-translational modifications*. Signal Transduct Target Ther, 2020. **5**(1): p. 90.
120. Weinberg, R.L., et al., *Comparative binding of p53 to its promoter and DNA recognition elements*. J Mol Biol, 2005. **348**(3): p. 589-96.
121. Harper, J.W., et al., *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*. Cell, 1993. **75**(4): p. 805-16.
122. Luo, Y., J. Hurwitz, and J. Massague, *Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1*. Nature, 1995. **375**(6527): p. 159-61.
123. Martin-Caballero, J., et al., *Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice*. Cancer Res, 2001. **61**(16): p. 6234-8.
124. St Clair, S., et al., *DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the cdc25C promoter*. Mol Cell, 2004. **16**(5): p. 725-36.
125. Tait, S.W. and D.R. Green, *Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(9): p. 621-32.
126. Mihara, M., et al., *p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria*. Mol Cell, 2003. **11**(3): p. 577-90.
127. Mihara, M. and U.M. Moll, *Detection of mitochondrial localization of p53*. Methods Mol Biol, 2003. **234**: p. 203-9.
128. Marchenko, N.D., A. Zaika, and U.M. Moll, *Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 16202-12.
129. Jeffers, J.R., et al., *Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways*. Cancer Cell, 2003. **4**(4): p. 321-8.
130. Brady, C.A., et al., *Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression*. Cell, 2011. **145**(4): p. 571-83.
131. Chen, J., *The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016. **6**(3): p. a026104.
132. Chipuk, J.E., et al., *PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53*. Science, 2005. **309**(5741): p. 1732-5.
133. Banjara, S., et al., *The Bcl-2 Family: Ancient Origins, Conserved Structures, and Divergent Mechanisms*. Biomolecules, 2020. **10**(1).
134. Yip, K.W. and J.C. Reed, *Bcl-2 family proteins and cancer*. Oncogene, 2008. **27**(50): p. 6398-406.
135. Kale, J., E.J. Osterlund, and D.W. Andrews, *BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death*. Cell Death Differ, 2018. **25**(1): p. 65-80.
136. Hardwick, J.M. and L. Soane, *Multiple functions of BCL-2 family proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(2).
137. Morselli, E., L. Galluzzi, and G. Kroemer, *Mechanisms of p53-mediated mitochondrial membrane permeabilization*. Cell Res, 2008. **18**(7): p. 708-10.
138. Roufayel, R., et al., *BH3-Only Proteins Noxa and Puma Are Key Regulators of Induced Apoptosis*. Life (Basel), 2022. **12**(2).
139. Oda, E., et al., *Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis*. Science, 2000. **288**(5468): p. 1053-8.
140. Seo, Y.W., et al., *The molecular mechanism of Noxa-induced mitochondrial dysfunction in p53-mediated cell death*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 48292-9.
141. Wang, Z. and Y. Sun, *Identification and characterization of two splicing variants of human Noxa*. Anticancer Res, 2008. **28**(3A): p. 1667-74.

142. Fei, P., E.J. Bernhard, and W.S. El-Deiry, *Tissue-specific induction of p53 targets in vivo*. *Cancer Res*, 2002. **62**(24): p. 7316-27.
143. Saha, M.N., et al., *RITA inhibits multiple myeloma cell growth through induction of p53-mediated caspase-dependent apoptosis and synergistically enhances nutlin-induced cytotoxic responses*. *Mol Cancer Ther*, 2010. **9**(11): p. 3041-51.
144. Raats, D.A., et al., *Synergistic killing of colorectal cancer cells by oxaliplatin and ABT-737*. *Cell Oncol (Dordr)*, 2011. **34**(4): p. 307-13.
145. Kim, H., et al., *Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies*. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(12): p. 1348-58.
146. Flinterman, M., et al., *E1A activates transcription of p73 and Noxa to induce apoptosis*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(7): p. 5945-59.
147. Aikawa, T., et al., *Noxa is necessary for hydrogen peroxide-induced caspase-dependent cell death*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(4): p. 681-8.
148. Valis, K., et al., *Hippo/Mst1 stimulates transcription of the proapoptotic mediator NOXA in a FoxO1-dependent manner*. *Cancer Res*, 2011. **71**(3): p. 946-54.
149. Baou, M., et al., *Role of NOXA and its ubiquitination in proteasome inhibitor-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells*. *Haematologica*, 2010. **95**(9): p. 1510-8.
150. Roufayel, R. and N. Murshid, *CDK5: Key Regulator of Apoptosis and Cell Survival*. *Biomedicines*, 2019. **7**(4).
151. Lowman, X.H., et al., *The proapoptotic function of Noxa in human leukemia cells is regulated by the kinase Cdk5 and by glucose*. *Mol Cell*, 2010. **40**(5): p. 823-33.
152. Chen, L., et al., *Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function*. *Mol Cell*, 2005. **17**(3): p. 393-403.
153. Gomez-Bougie, P., et al., *Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma*. *Cancer Res*, 2007. **67**(11): p. 5418-24.
154. Zhang, L., et al., *Selective involvement of BH3-only proteins and differential targets of Noxa in diverse apoptotic pathways*. *Cell Death Differ*, 2011. **18**(5): p. 864-73.
155. Lopez, H., et al., *Perturbation of the Bcl-2 network and an induced Noxa/Bcl-xL interaction trigger mitochondrial dysfunction after DNA damage*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(20): p. 15016-15026.
156. Willis, S.N., et al., *Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins*. *Genes Dev*, 2005. **19**(11): p. 1294-305.
157. Hagenbuchner, J., et al., *The anti-apoptotic protein BCL2L1/Bcl-xL is neutralized by pro-apoptotic PMAIP1/Noxa in neuroblastoma, thereby determining bortezomib sensitivity independent of prosurvival MCL1 expression*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(10): p. 6904-12.
158. Holzerland, J., et al., *BH3-only sensors Bad, Noxa and Puma are Key Regulators of Tacaribe virus-induced Apoptosis*. *PLoS Pathog*, 2020. **16**(10): p. e1008948.
159. Yu, J., et al., *PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells*. *Mol Cell*, 2001. **7**(3): p. 673-82.
160. Yu, J., et al., *PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(4): p. 1931-6.
161. Strasser, A., S. Cory, and J.M. Adams, *Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases*. *EMBO J*, 2011. **30**(18): p. 3667-83.
162. Hikisz, P. and Z.M. Kilianska, *PUMA, a critical mediator of cell death--one decade on from its discovery*. *Cell Mol Biol Lett*, 2012. **17**(4): p. 646-69.
163. Charvet, C., et al., *Phosphorylation of Tip60 by GSK-3 determines the induction of PUMA and apoptosis by p53*. *Mol Cell*, 2011. **42**(5): p. 584-96.
164. Wu, B., et al., *p53 independent induction of PUMA mediates intestinal apoptosis in response to ischaemia-reperfusion*. *Gut*, 2007. **56**(5): p. 645-54.
165. Webster, K.A., *Puma joins the battery of BH3-only proteins that promote death and infarction during myocardial ischemia*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **291**(1): p. H20-2.

Literaturverzeichnis

166. Toth, A., et al., *Targeted deletion of Puma attenuates cardiomyocyte death and improves cardiac function during ischemia-reperfusion*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **291**(1): p. H52-60.
167. Nickson, P., A. Toth, and P. Erhardt, *PUMA is critical for neonatal cardiomyocyte apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress*. *Cardiovasc Res*, 2007. **73**(1): p. 48-56.
168. Li, J., B. Lee, and A.S. Lee, *Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(11): p. 7260-70.
169. Fricker, M., et al., *Phosphorylation of Puma modulates its apoptotic function by regulating protein stability*. *Cell Death Dis*, 2010. **1**: p. e59.
170. Ley, R., et al., *Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK*. *Cell Death Differ*, 2005. **12**(8): p. 1008-14.
171. Ley, R., et al., *Extracellular signal-regulated kinases 1/2 are serum-stimulated "Bim(EL) kinases" that bind to the BH3-only protein Bim(EL) causing its phosphorylation and turnover*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(10): p. 8837-47.
172. Ley, R., et al., *Identification of a DEF-type docking domain for extracellular signal-regulated kinases 1/2 that directs phosphorylation and turnover of the BH3-only protein BimEL*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(18): p. 17657-63.
173. Puthalakath, H., et al., *The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex*. *Mol Cell*, 1999. **3**(3): p. 287-96.
174. Lei, K. and R.J. Davis, *JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(5): p. 2432-7.
175. Sunters, A., et al., *FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(50): p. 49795-805.
176. Essafi, A., et al., *Direct transcriptional regulation of Bim by FoxO3a mediates STI571-induced apoptosis in Bcr-Abl-expressing cells*. *Oncogene*, 2005. **24**(14): p. 2317-29.
177. Obexer, P., et al., *FKHRL1-mediated expression of Noxa and Bim induces apoptosis via the mitochondria in neuroblastoma cells*. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(3): p. 534-47.
178. Kohler, U.A., et al., *Activated Nrf2 impairs liver regeneration in mice by activation of genes involved in cell-cycle control and apoptosis*. *Hepatology*, 2014. **60**(2): p. 670-8.
179. Muthalagu, N., et al., *BIM is the primary mediator of MYC-induced apoptosis in multiple solid tissues*. *Cell Rep*, 2014. **8**(5): p. 1347-53.
180. Hershko, T. and D. Ginsberg, *Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(10): p. 8627-34.
181. Wildey, G.M., S. Patil, and P.H. Howe, *Smad3 potentiates transforming growth factor beta (TGFbeta)-induced apoptosis and expression of the BH3-only protein Bim in WEHI 231 B lymphocytes*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(20): p. 18069-77.
182. Ley, R., et al., *Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(21): p. 18811-6.
183. Akiyama, T., et al., *Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim*. *EMBO J*, 2003. **22**(24): p. 6653-64.
184. Harada, H., et al., *Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(43): p. 15313-7.
185. Putcha, G.V. and E.M. Johnson, Jr., *Men are but worms: neuronal cell death in C elegans and vertebrates*. *Cell Death Differ*, 2004. **11**(1): p. 38-48.
186. Shi, L., et al., *Activity deprivation-dependent induction of the proapoptotic BH3-only protein Bim is independent of JNK/c-Jun activation during apoptosis in cerebellar granule neurons*. *Neurosci Lett*, 2005. **375**(1): p. 7-12.
187. Becker, E.B. and A. Bonni, *Pin1 mediates neural-specific activation of the mitochondrial apoptotic machinery*. *Neuron*, 2006. **49**(5): p. 655-62.

188. Edlich, F., et al., *Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol*. Cell, 2011. **145**(1): p. 104-16.
189. Suzuki, M., R.J. Youle, and N. Tjandra, *Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization*. Cell, 2000. **103**(4): p. 645-54.
190. Gavathiotis, E., et al., *BH3-triggered structural reorganization drives the activation of proapoptotic BAX*. Mol Cell, 2010. **40**(3): p. 481-92.
191. Gavathiotis, E., et al., *BAX activation is initiated at a novel interaction site*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1076-81.
192. Czabotar, P.E., et al., *Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis*. Cell, 2013. **152**(3): p. 519-31.
193. Eskes, R., et al., *Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(3): p. 929-35.
194. Cosentino, K. and A.J. Garcia-Saez, *Bax and Bak Pores: Are We Closing the Circle?* Trends Cell Biol, 2017. **27**(4): p. 266-275.
195. Vollmer, A.S., *Untersuchung der DNA-Schadensantwort ausgelöst durch den Naturstoff Methyleugenol in humanen Leberkrebszellen*, in Rudolf-Buchheim Institut. 2021, Justus-Liebig-Universität Gießen.
196. Priest, S.M. and T.P. Geisbuhler, *Injectable sodium pentobarbital: Stability at room temperature*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2015. **76**: p. 38-42.
197. Carlsson, M.J. and J. Fahrner, *Analyzing the Effects of HDAC Inhibitors on DNA Damage and Associated Cytotoxicity in Primary Hepatocytes*. Methods Mol Biol, 2023. **2589**: p. 241-252.
198. Carlsson, K.H. and I. Jurna, *Interaction of pentobarbital and morphine in the tail-flick test performed on rats: synergism at the spinal and antagonism at the supraspinal level*. Neurosci Lett, 1986. **71**(3): p. 356-60.
199. Christmann, M., et al., *Adaptive upregulation of DNA repair genes following benzo(a)pyrene diol epoxide protects against cell death at the expense of mutations*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(22): p. 10727-10743.
200. Westerink, W.M. and W.G. Schoonen, *Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells*. Toxicol In Vitro, 2007. **21**(8): p. 1581-91.
201. George, J., et al., *Time-dependent expression of cytochrome P450 genes in primary cultures of well-differentiated human hepatocytes*. J Lab Clin Med, 1997. **129**(6): p. 638-48.
202. Maslansky, C.J. and G.M. Williams, *Primary cultures and the levels of cytochrome P450 in hepatocytes from mouse, rat, hamster, and rabbit liver*. In Vitro, 1982. **18**(8): p. 683-93.
203. de Vries, A., et al., *Increased susceptibility to ultraviolet-B and carcinogens of mice lacking the DNA excision repair gene XPA*. Nature, 1995. **377**(6545): p. 169-73.
204. Bunz, F., et al., *Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents*. J Clin Invest, 1999. **104**(3): p. 263-9.
205. Glatt, H., et al., *Bioactivation of the heterocyclic aromatic amine 2-amino-3-methyl-9H-pyrido [2,3-b]indole (MeAalphaC) in recombinant test systems expressing human xenobiotic-metabolizing enzymes*. Carcinogenesis, 2004. **25**(5): p. 801-7.
206. Qiu, G.H., et al., *Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B*. Cytotechnology, 2015. **67**(1): p. 1-12.
207. Chung, W., L.J. Mi, and R.J. Boorstein, *The p53 status of Chinese hamster V79 cells frequently used for studies on DNA damage and DNA repair*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(5): p. 992-4.
208. van Engeland, M., et al., *Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure*. Cytometry, 1998. **31**(1): p. 1-9.
209. Komarov, P.G., et al., *A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy*. Science, 1999. **285**(5434): p. 1733-7.
210. Vassilev, L.T., et al., *In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2*. Science, 2004. **303**(5659): p. 844-8.

Literaturverzeichnis

211. Salvador, J.M., J.D. Brown-Clay, and A.J. Fornace, Jr., *Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis*. Adv Exp Med Biol, 2013. **793**: p. 1-19.
212. Karimian, A., Y. Ahmadi, and B. Yousefi, *Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage*. DNA Repair (Amst), 2016. **42**: p. 63-71.
213. Shukla, S., et al., *BH3-only protein BIM: An emerging target in chemotherapy*. Eur J Cell Biol, 2017. **96**(8): p. 728-738.
214. Sionov, R.V., S.A. Vlahopoulos, and Z. Granot, *Regulation of Bim in Health and Disease*. Oncotarget, 2015. **6**(27): p. 23058-134.
215. Jiso, A., et al., *Natural Meroterpenes Activate the DNA Damage Response via DNA Strand Break Formation and Trigger Apoptotic Cell Death in p53-Wild-type and Mutant Colorectal Cancer*. Cancers (Basel), 2021. **13**(13).
216. Gerets, H.H., et al., *Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins*. Cell Biol Toxicol, 2012. **28**(2): p. 69-87.
217. Westerink, W.M. and W.G. Schoonen, *Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells*. Toxicol In Vitro, 2007. **21**(8): p. 1592-602.
218. Rowe, C., et al., *Network analysis of primary hepatocyte dedifferentiation using a shotgun proteomics approach*. J Proteome Res, 2010. **9**(5): p. 2658-68.
219. Hammer, H., et al., *Cross-species analysis of hepatic cytochrome P450 and transport protein expression*. Arch Toxicol, 2021. **95**(1): p. 117-133.
220. Kammerer, S. and J.-H. Küpper, *Human hepatocyte systems for in vitro toxicology analysis*. Journal of Cellular Biotechnology, 2018. **3**: p. 85-93.
221. Hewitt, N.J., et al., *Primary Hepatocytes: Current Understanding of the Regulation of Metabolic Enzymes and Transporter Proteins, and Pharmaceutical Practice for the Use of Hepatocytes in Metabolism, Enzyme Induction, Transporter, Clearance, and Hepatotoxicity Studies*. Drug Metabolism Reviews, 2007. **39**(1): p. 159-234.
222. Vinken, M., T. Vanhaecke, and V. Rogiers, *Primary hepatocyte cultures as in vitro tools for toxicity testing: quo vadis?* Toxicol In Vitro, 2012. **26**(3): p. 541-4.
223. Jungermann, K., *Functional heterogeneity of periportal and perivenous hepatocytes*. Enzyme, 1986. **35**(3): p. 161-80.
224. Cunningham, R.P. and N. Porat-Shliom, *Liver Zonation - Revisiting Old Questions With New Technologies*. Front Physiol, 2021. **12**: p. 732929.
225. Schwegler, J.S. and R. Lucius, *Der Mensch - Anatomie und Physiologie*. 2021: Thieme.
226. Sørensen, M., *Hepatic blood volume is decreased in patients with cirrhosis and does not decrease further after a meal like in healthy persons*. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 2021. **56**(10): p. 1205-1209.
227. Lauth, W.W. and C.V. Greenway, *Hepatic venous compliance and role of liver as a blood reservoir*. Am J Physiol, 1976. **231**(2): p. 292-5.
228. Raftogianis, R.B., T.C. Wood, and R.M. Weinshilboum, *Human phenol sulfotransferases SULT1A2 and SULT1A1: genetic polymorphisms, allozyme properties, and human liver genotype-phenotype correlations*. Biochem Pharmacol, 1999. **58**(4): p. 605-16.
229. Gamage, N.U., et al., *Structure of a human carcinogen-converting enzyme, SULT1A1. Structural and kinetic implications of substrate inhibition*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 7655-62.
230. Kucab, J.E., et al., *TP53 mutations induced by BPDE in Xpa-WT and Xpa-Null human TP53 knock-in (Hupki) mouse embryo fibroblasts*. Mutat Res, 2015. **773**: p. 48-62.
231. Kucab, J.E., et al., *TP53 and lacZ mutagenesis induced by 3-nitrobenzanthrone in Xpa-deficient human TP53 knock-in mouse embryo fibroblasts*. DNA Repair (Amst), 2016. **39**: p. 21-33.
232. Thompson, L.H., et al., *Genetic diversity of UV-sensitive DNA repair mutants of Chinese hamster ovary cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(6): p. 3734-7.

233. Thompson, L.H., K.W. Brookman, and C.L. Mooney, *Repair of DNA adducts in asynchronous CHO cells and the role of repair in cell killing and mutation induction in synchronous cells treated with 7-bromomethylbenzo[a]anthracene*. *Somat Cell Mol Genet*, 1984. **10**(2): p. 183-94.
234. Yang, S., et al., *Cellular levels and molecular dynamics simulations of estragole DNA adducts point at inefficient repair resulting from limited distortion of the double-stranded DNA helix*. *Arch Toxicol*, 2020. **94**(4): p. 1349-1365.
235. Schulte-Hubbert, R., et al., *Estragole: DNA adduct formation in primary rat hepatocytes and genotoxic potential in HepG2-CYP1A2 cells*. *Toxicology*, 2020. **444**: p. 152566.
236. Thakker, D.R., et al., *Metabolism of benzo[a]pyrene. VI. Stereoselective metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol to diol epoxides*. *Chem Biol Interact*, 1977. **16**(3): p. 281-300.
237. Cheng, S.C., et al., *DNA adducts from carcinogenic and noncarcinogenic enantiomers of benzo[a]pyrene dihydrodiol epoxide*. *Chem Res Toxicol*, 1989. **2**(5): p. 334-40.
238. Cosman, M., et al., *Solution conformation of the (+)-cis-anti-[BP]dG adduct in a DNA duplex: intercalation of the covalently attached benzo[a]pyrenyl ring into the helix and displacement of the modified deoxyguanosine*. *Biochemistry*, 1993. **32**(16): p. 4145-55.
239. Cosman, M., et al., *Solution conformation of the major adduct between the carcinogen (+)-anti-benzo[a]pyrene diol epoxide and DNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(5): p. 1914-8.
240. Mocquet, V., et al., *The human DNA repair factor XPC-HR23B distinguishes stereoisomeric benzo[a]pyrenyl-DNA lesions*. *EMBO J*, 2007. **26**(12): p. 2923-32.
241. Kropachev, K., et al., *The sequence dependence of human nucleotide excision repair efficiencies of benzo[a]pyrene-derived DNA lesions: insights into the structural factors that favor dual incisions*. *J Mol Biol*, 2009. **386**(5): p. 1193-203.
242. Li, Z., et al., *XPA-mediated regulation of global nucleotide excision repair by ATR Is p53-dependent and occurs primarily in S-phase*. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e28326.
243. Pätzold, N., *Beteiligung der Nukleotidexzisionsreparatur im Schutz gegenüber DNA-schädigenden Lebertoxinen*, in *Fachbereich Chemie*. 2022, TU Kaiserslautern.
244. Stoyanova, T., et al., *DDB2 (damaged-DNA binding protein 2) in nucleotide excision repair and DNA damage response*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(24): p. 4067-71.
245. Al-Subeihi, A.A., et al., *Inhibition of methyleugenol bioactivation by the herb-based constituent nevadensin and prediction of possible in vivo consequences using physiologically based kinetic modeling*. *Food Chem Toxicol*, 2013. **59**: p. 564-71.
246. Groh, I.A., et al., *Genotoxic potential of methyleugenol and selected methyleugenol metabolites in cultured Chinese hamster V79 cells*. *Food Funct*, 2012. **3**(4): p. 428-36.
247. Ishii, Y., et al., *Phosphorylation of protein phosphatase 2A facilitated an early stage of chemical carcinogenesis*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017. **336**: p. 75-83.
248. Ljungman, M., *The transcription stress response*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(18): p. 2252-7.
249. Zhu, J., et al., *Pifithrin-alpha alters p53 post-translational modifications pattern and differentially inhibits p53 target genes*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 1049.
250. Miyashita, T., et al., *Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo*. *Oncogene*, 1994. **9**(6): p. 1799-805.
251. Pendergrass, W., N. Wolf, and M. Poot, *Efficacy of MitoTracker Green and CMXrosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues*. *Cytometry A*, 2004. **61**(2): p. 162-9.
252. Groh, I.A.M. and M. Esselen, *Methyleugenol and selected oxidative metabolites affect DNA-Damage signalling pathways and induce apoptosis in human colon tumour HT29 cells*. *Food Chem Toxicol*, 2017. **108**(Pt A): p. 267-275.
253. Davies, E., et al., *Effects of culture with TNF-alpha, TGF-beta and insulin on sulphotransferase (SULT 1A1 and 1A3) activity in human colon and neuronal cell lines*. *Toxicol In Vitro*, 2004. **18**(6): p. 749-54.
254. Muller, P.A., et al., *Mutant p53 enhances MET trafficking and signalling to drive cell scattering and invasion*. *Oncogene*, 2013. **32**(10): p. 1252-65.

Literaturverzeichnis

255. Lei, G., et al., *TRIM29 Reverses Oxaliplatin Resistance of P53 Mutant Colon Cancer Cell*. Can J Gastroenterol Hepatol, 2021. **2021**: p. 8870907.
256. Di Agostino, S., et al., *Targeting mutant p53 in cancer: the latest insights*. J Exp Clin Cancer Res, 2019. **38**(1): p. 290.
257. Arnold, C., et al., *The Mitochondrial Disruptor Devimistat (CPI-613) Synergizes with Genotoxic Anticancer Drugs in Colorectal Cancer Therapy in a Bim-Dependent Manner*. Mol Cancer Ther, 2022. **21**(1): p. 100-112.
258. Zhang, J., et al., *Artesunate improves venetoclax plus cytarabine AML cell targeting by regulating the Noxa/Bim/Mcl-1/p-Chk1 axis*. Cell Death Dis, 2022. **13**(4): p. 379.
259. Demgenski, J., *Role of Bim and Kinases in the Synergistic Induction of Cell Death by TRAIL and Chemotherapy*, in *Fachbereich Biologie*. 2019, Universität Konstanz: Konstanz.
260. Takekawa, M. and H. Saito, *A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK*. Cell, 1998. **95**(4): p. 521-30.
261. Espina, B. and J.A. Rubiolo, *Marine toxins and the cytoskeleton: pectenotoxins, unusual macrolides that disrupt actin*. FEBS J, 2008. **275**(24): p. 6082-8.
262. Chae, H.D., et al., *Oocyte-based screening of cytokinesis inhibitors and identification of pectenotoxin-2 that induces Bim/Bax-mediated apoptosis in p53-deficient tumors*. Oncogene, 2005. **24**(30): p. 4813-9.
263. Bartkowiak, B. and A.L. Greenleaf, *Phosphorylation of RNAPII: To P-TEFb or not to P-TEFb?* Transcription, 2011. **2**(3): p. 115-119.

Anhang

Aufgrund der Größe der Datenmenge ist der Anhang rein elektronisch und befindet sich auf dem mit der Druckversion dieser Arbeit abgegebenen Datenträger. Zusätzlich findet sich zu der unten angegebenen Liste noch eine PDF-Datei dieser Arbeit auf dem Datenträger.

Liste der elektronischen Anhänge:

A1: Auswertungen Graphpad

A2: Rohdaten

- A2.1 Adduktmessungen
- A2.2 AnnexinV-FITC-PI-Färbungen
- A2.3 Caspase3+7-Aktivitätsassay
- A2.4 Densitometrie
- A2.5 Zellfotos
- A2.6 Genexpressionsanalysen
- A2.7 Immunfluoreszenzen
- A2.8 Resazurinassay
- A2.9 SubG1-Assay
- A2.10 Western Blots
- A2.11 NMR

Lebenslauf

Persönliches

Name Max Johannes Carlsson
Geburtstag [REDACTED]
Geburtsort [REDACTED]

Bildungsweg

Seit 01/2019 Technische Universität Kaiserslautern
Doktorand, Lebensmittelchemie und Toxikologie, AG
Prof. Dr. Jörg Fahrer

Seit 01/2019 Weiterbildung zum Fachtoxikologen (GT) der
deutschen Gesellschaft für Toxikologie als Teil der
deutschen Gesellschaft für experimentelle und
klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (Mainz)

12/2018 TU Kaiserslautern, Kaiserslautern
Master of Science in Lebensmittelchemie

07/2016 TU Kaiserslautern, Kaiserslautern
Bachelor of Science in Lebensmittelchemie

2012 Allgemeine Hochschulreife am Christian von
Mannlich Gymnasium, Homburg (Saar)

Berufliche Laufbahn

Seit 04/2022 Technische Universität Kaiserslautern
Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Lebensmittelchemie
und Toxikologie, AG Prof. Dr. Jörg Fahrer

06/2016 – 12/2018 KD Pharma Bexbach GmbH
Werkstudent, Qualitätskontrolle von Omega 3-
Konzentraten

Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Veröffentlichungen:

Hauptautor:

Carlsson, M.J., Vollmer, A.S., Demuth, P., Heylmann, D., Reich, D., Quarz, C., Rasenberger, B., Nikolova, T., Hofmann, T.G., Christmann, M., Fuhlbrueck, J.A., Stegmüller, S., Richling, E., Cartus, A.T., Fahrner, J. (2022) p53 triggers mitochondrial apoptosis following DNA damage-dependent replication stress by the hepatotoxin methyleugenol. *Cell death & disease*, 13, 1009.

Carlsson, M.J. and Fahrner, J. (2023) Analyzing the Effects of HDAC Inhibitors on DNA Damage and Associated Cytotoxicity in Primary Hepatocytes. *Methods in molecular biology*, 2589, 241-252.

Koautor:

Brat, C, Phuoc, H.P.H., Awad, O., Parmar, B.S., Hellmuth, N., Heinicke, U., Amr, S., Grimmer, J., Sürün, D., Husnjak, K., Carlsson, M.J., Fahrner, J., Bauer, T., Krieg S.C., Manolikakes, G., Zacharowski, K., Steinhilber, D., Münch, C., Maier, T.J., Roos, J., Endogenous anti-tumorigenic nitro-fatty acids are a novel type of direct and potent inhibitor of the 26S proteasome, *Cell Chemical Biology*, 2023, 2451-9456.

Tagungsbeiträge:

German Pharm-Tox Summit, Ulm, 2023 Vortrag: New insights into the mechanism of methyleugenol-derived apoptotic cell death and the role of nucleotide excision repair

German Pharm-Tox Summit, Ulm, 2023 Poster: Primary rodent hepatocyte models to assess the cytotoxicity and genotoxicity of nitrosamines

Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

33rd GUM meeting, Würzburg, 2022

Vortrag: Role of nucleotide excision repair in methyleugenol-derived DNA damage and apoptotic cell death

Restore, repair, repurpose: The many faces of DNA repair, Institute for Molecular Biology, Mainz, 2022

Poster: Role of nucleotide excision repair in methyleugenol-derived DNA damage and apoptotic cell death

Deutscher Lebensmittelchemikertag 2021, digital

Vortrag: Methyleugenol induziert p53-abhängige Apoptose in Leberzellen über den mitochondrialen Weg

German Pharm-Tox Summit, 2021, digital

Vortrag: The natural phenylpropene methyleugenol induces p53-mediated apoptosis in liver cells via the mitochondrial pathway

Regionalverbandstagung Südwest der LChG, 2021, digital

Vortrag: Methyleugenol induziert p53-abhängige mitochondriale Apoptose in Leberzellen

Deutscher Lebensmittelchemikertag 2019, Dresden

Poster: DNA-Schädigung durch das Phenylpropanoid Methyleugenol aktiviert die ATR-CHEK1-p53-Achse und verursacht Caspase-abhängigen Zelltod

Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Jörg Fahrer. Danke für die Möglichkeit diese Arbeit in den letzten Jahren in Ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Danke für das entgegengebrachte Vertrauen und die vielen hilfreichen Diskussionen und ein immer offenes Ohr. Danke dafür, dass Sie in den letzten Jahren eine Arbeitsgruppe aufgebaut haben in der die Arbeit selbst in schwierigen Coronazeiten sehr viel Spaß gemacht hat und bis heute noch macht.

Danke an alle Kollegen aus meiner Arbeitsgruppe. Danke Nina und Carina für die vielen Dinge die ihr mir zu Anfang meiner Promotion beigebracht habt. Danke Carina und Manu für die viele Zeit die wir gemeinsam in unserem Büro verbracht haben. Danke Manu, Simon und Philipp für die viele spaßige Zeit im Labor. Danke Melanie für die Unterstützung bei unzähligen Perfusionen. Auch Danke an alle „neuen“ Mitarbeiter, dafür, dass die Arbeit mit euch immernoch genauso viel Spaß macht wie am Anfang. Außerdem auch danke an alle Kollegen der AG Richling für die gute Atmosphäre in der Fachrichtung.

Danke an Frau Prof. Dr. Elke Richling für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit. Außerdem Danke für die Möglichkeit die massenspektrometrischen Messungen an Ihren Geräten und in Kooperation mit Ihnen und Ihren Mitarbeitern durchzuführen.

Danke an Herrn Prof. Dr. Antonio Pierik für die Übernahme des Vorsitzes meiner Prüfungskommission.

Danke an Herrn Dr. Alexander Cartus für die fruchtbare Kooperation als du noch hier an der Uni warst. Danke für deine Betreuung während meines Forschungspraktikums und meiner Masterarbeit, die viele Grundlagen für diese Arbeit gelegt hat.

Danke an Julia Fuhlbrück für die vielen MS-Messungen, die du für mich und mit mir durchgeführt hast. Danke, dass ich zu Anfang der Promotion noch dein Bürobuddy bleiben durfte, als bei uns noch ein wenig Chaos herrschte und Danke für die vielen Diskussionen, ob während der Arbeitszeit oder beim Tanzen.

Auch ein Dank an Dr. Simone Stegmüller für die MS-Messungen, die wir gemeinsam durchgeführt haben.

Danke an Prof. Dr. Markus Christmann und seine Arbeitsgruppe für die Durchführung der Genexpressionsanalysen.

Danksagung

Danke an Prof. Dr. Thomas Brunner für die Bereitstellung der Bim-defizienten HepG2-Linie.

Danke an alle Studenten deren Ergebnisse teilweise in diese Arbeit mit eingeflossen sind. Max Zeyer, Sandy Jesser, Nane Scheidt, Heiko Damm, Svenja Lenhardt, Anna-Lena-Ecker und Alexander Regier.

Last but not least, Danke an meine Familie und meine Freunde, die mich in den letzten Jahren in allen Lebenslagen unterstützt und motiviert haben.

Erklärung zum selbstständigen Verfassen dieser Arbeit

Hiermit erkläre ich, Max Johannes Carlsson, die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen zum Zelltodmechanismus ausgelöst durch das Phenylpropanoid Methyleugenol in Leberzellen“ selbstständig verfasst und dabei nur die in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Bestandteile dieser Arbeit wurden während der Promotion bereits vor der Erstellung dieser Dissertation auf Kongressen / als Paper veröffentlicht (siehe Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge). Die vorliegende Dissertation habe ich weder im Ganzen noch in Teilen als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht und kein anderes Promotionsverfahren bei einer Hochschule beantragt oder eröffnet. Die geltende Promotionsordnung des Fachbereichs Chemie der Universität Kaiserslautern vom 07. Oktober 1999 ist mir bekannt.

Homburg (Saar), den

Max Johannes Carlsson