Die Rolle von p53 in der zellulären Antwort auf Natriumselenit und Selenomethionin

vorgelegt von Diplom-Lebensmittelchemikerin

Viola Klaus

aus Gräfelfing

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften

der Technischen Universität Berlin (TU)

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat.-

Genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. J. Kurreck

Berichter: Prof. Dr. A. Hartwig

Berichter: Prof. Dr. L. W. Kroh

Berichter: Prof. Dr. L.-O. Klotz

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 05.07.2010

Berlin 2010

D83

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung 1

2 Einleitung 4

2.1 Selen 4

2.1.1 Vorkommen und Bedarf 4

2.1.2 Aufnahme und Metabolismus 5

2.1.3 Funktion 7

2.1.4 Toxikologie 8

2.1.5 Einfluss auf Aspekte der humanen Gesundheit 8

2.2 Tumorsuppressorprotein p53 12

2.2.1 Funktion und Struktur 12

2.2.2 Regulation über Phosphorylierung 14

2.2.3 Rolle von p53 in der DNA-Reparatur 15

2.2.3 Rolle von p53 in der Zellzykluskontrolle 18

2.2.4 Rolle von p53 in der Apoptose 20

2.3 Bedeutung von Selen für die genomische Stabilität 22

3 Fragestellung 24

4 Material und Methoden 26

4.1 Zellkultur 26

4.1.1 Zelllinien 26

4.1.2 Kulturbedingung und Behandlung 26

4.2 Koloniebildungsfähigkeit 27

4.3 Aufnahmeuntersuchung mittels AAS 27

4.4 Immunologischer Nachweis zellulärer Proteine 29
4.4.1 Western Blot 29
4.4.2 Konformationsspezifische Immunopräzipitation von p53 31
4.5 Genexpression 32
4.6 Alkalische Entwindung 35
4.7 Zellzyklusuntersuchungen mittels Durchflusszytometer 37
4.8 Kernlokalisation von AIF 38
4.9 Aktivität der Effektor-Caspasen 3/7 39
5 Ergebnisse und Diskussion 40
5.1 Zytotoxizität der Selenverbindungen 40
5.1.1 Zytotoxizität in HCT116 Zellen 40
5.1.2 Zytotoxizität in A549 Zellen 45
5.2 Zelluläre Aufnahme 47
5.2.1 Aufnahme in HCT116 Zellen 47
5.2.2 Aufnahme in A549 Zellen 51
5.3 Konformationsspezifische Analyse von p53 53
5.4 Phosphorylierung von p53 55
5.5 Oxidative DNA-Schäden 59
5.5.1 Bestimmung von oxidativen DNA-Schäden mittels alkalischer Entwindung 59
5.5.2 Stabilisierung von p53 62
5.5.3 Genexpression und Proteingehalt von BER-Proteinen 63
5.5.4 Genexpression und Proteingehalt von NER-Proteinen 66
5.5.5 Bewertung der Ergebnisse 70
5.6 Zellzykluskontrolle 75

5.6.1 Zellzyklusuntersuchungen mittels Durchflusszytometer 75

5.6.2 Genexpression und Proteingehalt von Zellzykluskontrollproteinen 82

5.6.3 Bewertung der Ergebnisse 85

5.7 Apoptose 89

5.7.1 Kernlokalisation von AIF 89

5.7.2 Genexpression von *Bax* 91

5.7.3 Aktivität der Effektor-Caspasen 3/7 93

5.7.4 SubG1 Peak 95

5.7.5 Bewertung der Ergebnisse 98

5.8 Inhibierung der p53-abhängigen zellulären Antwort durch Cadmiumchlorid 101

6 Zusammenfassende Diskussion 104

7 Literatur 111

8 Anhang 125

8.1 Abkürzungsverzeichnis 125

8.2 Chemikalien 127

8.3 Antikörper 130

8.4 Puffer und Lösungen 131

8.5 Geräte 134

8.6 Verbrauchsmaterialien 136

8.7 PCR-Primer-Systeme 137

8.8 Sequenz des *Bax*-Gens und Lage der Primer 138

8.9 Gelelektrophoretische Überprüfung des Amplifikat 139

9 Publikationsliste 140

10 Danksagung 144

1 Zusammenfassung

Das Spurenelement Selen wird aufgrund seiner antioxidativen und postulierten krebspräventiven Wirkung als Nahrungsergänzungsmittel angeboten. Den antioxidativen Eigenschaften als Bestandteil verschiedener Selenoproteine, wie der plasmatischen Glutathion-Peroxidase, steht jedoch das prooxidative Verhalten reduzierbarer Selenverbindungen gegenüber. Neben Selenhefe, die vorwiegend das vollständig reduzierte Selenomethionin beinhaltet, wird häufig Natriumselenit angeboten, in dem das Selen in einer reduzierbaren Oxidationsstufe vorliegt. Auch aufgrund des reduktiven Metabolismus von Natriumselenit sind Oxidationen von sensitiven Strukturen, wie der DNA oder Proteinen, durch das redoxaktive Element denkbar. Als potentielle Angriffspunkte sind Thiolgruppen in Zink-bindenden Strukturen, wie sie z. B. in Transkriptionsfaktoren oder DNA-Reparaturproteinen vorkommen, zu nennen. Ein Beispiel ist das Tumorsuppressorprotein p53, das in seiner DNA-Bindungsdomäne ein Zinkion koordiniert. Nur wenn diese Struktur intakt ist, kann p53 als Transkriptionsfaktor von Genen der Zellzykluskontrolle, der DNA-Reparatur und der Apoptose zur Erhaltung der genomischen Stabilität beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der direkte Einfluss von Natriumselenit und Selenomethionin auf die Wildtyp-Konformation von p53 sowie die Rolle des Tumorsuppressors bei der zellulären Antwort auf diese Selenverbindungen untersucht. In einem subzellulären Testsystem zeigte sich eine inaktivierende Entfaltung der nativen Konformation von p53 durch Natriumselenit, während Selenomethionin keinen Einfluss hatte. Diese Inaktivierung von p53 durch reduzierbare Selenverbindungen könnte auf eine oxidative Zinkfreisetzung zurückzuführen sein. Dieser Mechanismus schien jedoch im zellulären System aus p53-profizienten und p53-defizienten HCT116 Kolonkarzinomzellen nicht relevant zu sein. Vielmehr war die zelluläre Antwort nach Inkubation mit Natriumselenit stark abhängig vom p53-Status der Zellen. So reagierten die p53-profizienten Zellen sensitiver auf Natriumselenit als die p53-defizienten Zellen. Einhergehend damit wurden p53 stabilisiert und p53-abhängig die Zellzykluskontrolle, die DNA-Reparatur und die Apoptose eingeleitet. Z. B. wurde das Zellzykluskontrollgen p21 induziert, für das p53 als Transkriptionsfaktor fungiert. Daraus resultierte eine Arretierung der p53-profizienten Zellen vornämlich in der G1-Phase. Erst in vergleichsweise hoher Konzentration an Natriumselenit kam es zu der Ausbildung eines p53-unabhängigen S-Phase-Arrests. Zudem traten bis in vergleichsweise hohe Konzentrationen an Natriumselenit in den p53-profizienten Zellen keine oxidativen DNA-Schäden auf, erst unter stark zytotoxischen Bedingungen konnten Fpg-sensitive Läsionen und DNA-Strangbrüche detektiert werden. Neben verschiedenen

Angriffspunkten innerhalb der Basenexzisionsreparatur (BER) wurde die Induktion von p53-abhängigen Genen der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) als möglicher Mechanismus, über den p53 die Kapazität der BER steigert, identifiziert. Schon mit beginnender Zytotoxizität, bevor DNA-Schäden akkumulierten, wurden in den p53-profizienten Zellen zudem apoptotische Prozesse beobachtet. Die Apoptose wurde ohne Steigerung der Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 über den intrinsischen Weg eingeleitet. Die Induktion des proapoptotischen Bcl-2-Gens *Bax* führte zur Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien. Die Apoptose wurde durch die Bildung apoptotischer Körperchen abgeschlossen, die als SubG1-Peak nachgewiesen wurden. Im Vergleich dazu akkumulierten die p53-defizienten Zellen bereits in nicht-zytotoxischen Konzentrationen an Natriumselenit hohe Gehalte an DNA-Strangbrüchen, und bei vergleichsweise hohen Konzentrationen traten wie in den p53-profizienten Zellen gleichermaßen Fpg-sensitive Läsionen und DNA-Strangbrüche auf. Trotz DNA-Schädigung wurden zunächst keine tumorsuppressiven Reaktionen eingeleitet. Wiederum erst unter stark zytotoxischen Bedingungen arretierten die p53-defizienten Zellen in der S-Phase. Dabei könnte das Zellzykluskontrollgen *GADD45* eine Rolle gespielt haben. Auch der Zelltod, der als SubG1-Peak bestimmt wurde, setzte erst im oberen Konzentrationsbereich ein und wurde weder durch die Aktivierung von Effektor-Caspasen, die Induktion von *Bax* noch die Kernlokalisation von AIF begleitet.

Durch die Koinkubation mit Cadmiumchlorid konnte in den p53-defizienten Zellen eine gewisse p53-Defizienz simuliert werden. Cadmiumionen führen zur Entfaltung des Tumorsuppressors in eine inaktive Konformation, sodass die p53-abhängige Schadens-antwort nach Natriumselenit-Exposition trotz DNA-Schädigung inhibiert wurde.

Im Vergleich dazu spielte p53 bei der zellulären Reaktion auf Selenomethionin kaum eine Rolle. Unabhängig vom p53-Status der Zellen war Selenomethionin erst in viel höheren Konzentrationen als Natriumselenit zytotoxisch. Auch DNA-Strangbrüche wurden erst im höheren Konzentrationsbereich detektiert. Darauf reagierten beide Zelllinien mit der Induktion von Zellzyklusarresten und dem Zelltod. Letztere wurde jedoch nicht von der Induktion von *Bax* oder der Kernlokalisation von AIF begleitet. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Selenverbindungen zeigte sich in ihrer zellulären Aufnahme. Während Natriumselenit erst bei Erreichen der Zytotoxizität zur Akkumulation von intrazellulärem Selen führte, reicherten sich große Mengen an Selen bereits bei sehr niedrigen Inkubationskonzentrationen an Selenomethionin an. Dies kann auf den unspezifischen Einbau von Selenomethionin im Austausch für Methionin in zelluläre Proteine erklärt werden.

Insgesamt macht diese Arbeit in Zellkulturversuchen deutlich, wie unterschiedlich die Eigenschaften verschiedener Selenverbindungen sind, die gleichermaßen in der Nahrungs-ergänzung eingesetzt werden. Die prooxidative Wirkung des Natriumselenits bedingt seine

vergleichsweise hohe Zytotoxizität und Genotoxizität. Verglichen damit wirkt Selenomethionin kaum zytotoxisch, akkumuliert jedoch intrazellulär sehr viel stärker, und wirkt bei Überladung der Zelle genotoxisch. Überraschend ist vor allem die unterschiedliche Rolle von p53 bei der zellulären Schadensantwort auf die beiden Verbindungen. Während Selenomethionin keine entscheidenden p53-abhängigen Prozesse induziert, wird p53 als Reaktion auf die DNA-schädigende Wirkung des Natriumselenits durch Phosphorylierung stabilisiert und leitet tumorsuppressive Reaktionen ein. In Abwesenheit des Tumor-suppressors akkumulieren die Zellen DNA-Schäden, ohne dass die Proliferation verringert wird. Dies könnte z. B. in premalignen und malignen Strukturen, die häufig Mutationen im p53-Gen aufweisen, zur weiteren Entartung führen.

2 Einleitung

2.1 Selen

2.1.1 Vorkommen und Bedarf

Das essentielle Spurenelement Selen wird vorwiegend über die Nahrung aufgenommen. Pflanzliche Nahrungsmittel enthalten z. B. die Aminosäure Selenomethionin. Dabei hängt die enthaltene Menge vornehmlich vom Selengehalt des Bodens ab. So kann Getreide zwischen 10 und 500 mg/kg Selen aufweisen. Besonders reich an Selen ist die in Südamerika wachsende Paranuss mit bis zu 5000 µg Selen/kg. In tierischen Produkten ist die Hauptselenquelle das Selenocystein. Je nach Selengehalt des Futters oder erfolgter Supplementation enthält Muskelfleisch zwischen 20-150 µg Selen/kg (zusammengefasst in RKI, 2006). Zum Einsatz in Nahrungsergänzungsmitteln sind laut Nahrungsergänzungsmittelverordnung nur die anorganischen Salze Natriumselenat, Natriumhydrogenselenit und Natriumselenit (Abbildung 1) zugelassen (NemV, 2004). Zudem gibt es eine Übergangsregelung für Stoffe, für die eine Zulassung in Deutschland beantragt wurde. In dieser Liste finden sich L-Selenomethionin (Abbildung 1) und selenangereicherte Hefe, welche somit ebenfalls eingesetzt werden dürfen (Bundesanzeiger, 2006). Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung schätzt den Bedarf auf 30-70 µg Selen/Tag (DGE, 2000). Die Versorgungssituation der deutschen Bevölkerung lässt sich nur ungefähr abschätzen, da die Aufnahme regional unterschiedlich ist, liegt aber etwa im unteren bis mittleren Bereich der DGE-Empfehlung (BfR, 2004 a).

Selenomethionin Natriumselenit

Abbildung 1: Strukturformeln und Oxidationsstufen von Natriumselenit und Selenomethionin. Natriumselenit enthält Selen in einer reduzierbaren Oxidationsstufe, während das Selenatom in Selenomethionin vollständig reduziert vorliegt. Weiterhin unterscheiden sich die beiden Selenverbindungen in der Aufnahme, dem Metabolismus und ihren Eigenschaften.

2.1.2 Aufnahme und Metabolismus

Über die Effizienz der Absorption von Selen aus seinen anorganischen Salzen oder organischen Verbindungen, wie z. B. Aminosäuren, findet man in der Literatur differierende Angaben. Zum einen wird berichtet, dass die Effizienz gleichermaßen bei 70-95 % je nach Matrix liegt (zusammengefasst in Schomburg and Köhrle, 2007), zum anderen soll die Absorption von Selenomethionin besser sein als die von Natriumselenit (95-97 % zu 44-70 %) (zusammengefasst in Whanger, 1998). Ein Grund für diese Diskrepanz könnte in der Betrachtung verschiedener Parameter zur Messung der Aufnahme bestehen. Wird nach Supplementation die Ausscheidung von Selen oder der Anstieg der Plasma-Selenkonzentration bestimmt, zeigt sich, dass Selenomethionin zu einer geringeren Ausscheidung und höheren Plasmaspiegeln führt. Dies kann auf den unspezifischen Einbau von Selenomethionin in Proteine erklärt werden. Im Vergleich dazu zeigt sich bei der Induktion der Aktivität der plasmatischen Glutathion-Peroxidase kein Unterschied zwischen den beiden Selenverbindungen. Insgesamt sollte deshalb zwischen Aufnahme und Bioverfügbarkeit unterschieden werden.

Die Selenverbindungen werden im Zwölffinger- sowie Dünndarm aber über verschiedene Transportmechanismen resorbiert. So wird Selenomethionin wie Methionin über ein Na^+-abhängiges Aminosäure-Carriersystem aufgenommen. Für Natriumselenit wird zum einen ein Na^+-unabhängiger, passiver Transport (zusammengefasst in Schomburg and Köhrle, 2007) als auch ein Transport analog zum Sulfit diskutiert (Park and Whanger, 1995).

Nach Resorption werden die Selenverbindungen nach Konjugation an Glutathion zur Leber transportiert (zusammengefasst in Schomburg and Köhrle, 2007). Selenit wird unter anderem auch in den Erythrozyten zu Hydrogenselenid reduziert (zusammengefasst in RKI, 2006). In der Leber wird Selenoprotein P, in welchem Selenocystein gespeichert und transportiert wird, synthetisiert. Selenoprotein P macht so auch die Hauptform des Selens im humanen Plasma aus. Daneben findet man als selenhaltiges Protein z. B. die plasmatische Glutathion-Peroxidase. Nur wenn große Mengen von Selenomethionin aufgenommen werden, dominiert dieses gebunden im Hämoglobin und Plasmaalbumin, da es unspezifisch im Austausch für Methionin eingebaut wird (zusammengefasst in Whanger, 1998).

Der zelluläre Metabolismus von Selenomethionin und Natriumselenit ist in Abbildung 2 dargestellt. Selenomethionin wird in Abhängigkeit vom Methionin-Haushalt freigesetzt und durch Transsulfurierung in Selenocystein überführt und gelangt mittels der Selenocystein-Lyase in den Hydrogenselenid-Pool. Zum anderen kann Selenomethionin von der γ-Lyase zu Monomethylselenid metabolisiert werden. Im Vergleich dazu wird Natriumselenit mittels Glutathion reduziert und NADPH-abhängig von der Glutathion-Reduktase zu Hydrogen-selenid verstoffwechselt. Ausgehend vom Hydrogenselenid kann eine ATP-abhängige

Aktivierung zum Selenophosphat erfolgen, welches zum Einbau von Selenocystein in Selenoproteine benötigt wird (zusammengefasst in Brigelius-Flohé, 2008; Ip, 1998). Hydrogenselenid und Monomethylselenid können jeweils ineinander überführt werden (Ohta and Suzuki, 2008). Folgen weitere Methylierungen entstehen Dimethylselenid, welches exhaliert wird, und Trimethylselenonium-Ionen, welche über den Urin ausgeschieden werden (zusammengefasst in Brigelius-Flohé, 2008; Ip, 1998). Weitere wichtige Stoffwechselprodukte, die auch im Urin gefunden werden, sind Selenozucker (Kuehnelt et al., 2005).

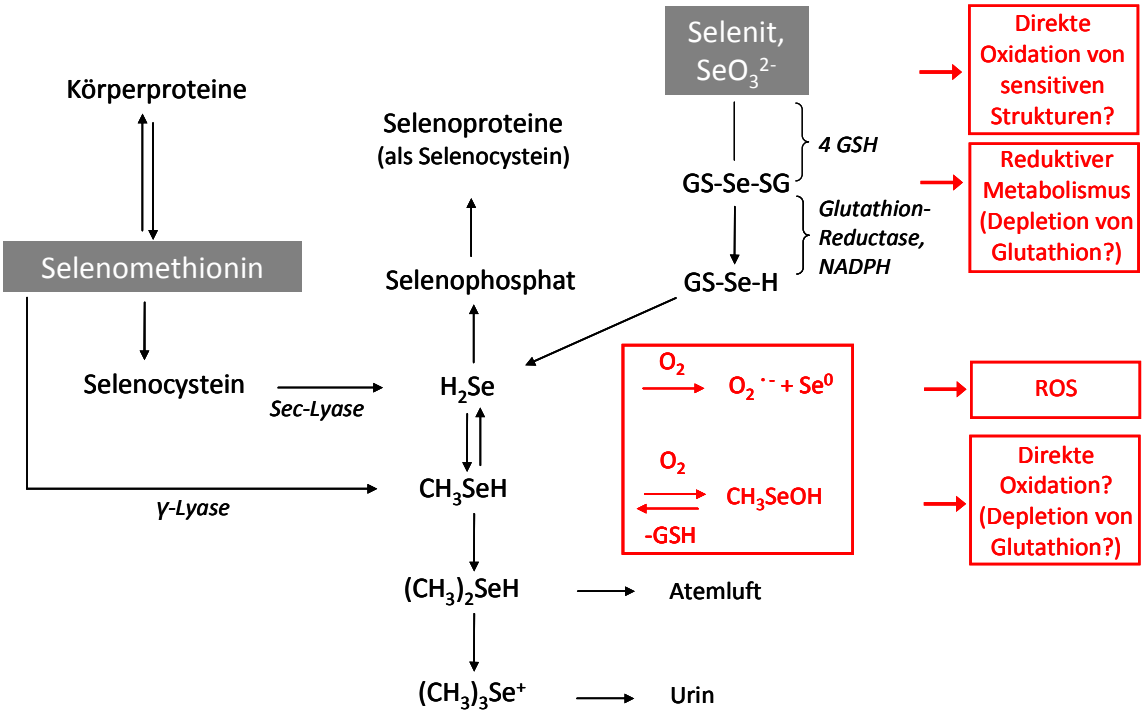


Abbildung 2: Metabolismus von Natriumselenit und Selenomethionin. Selenit wird reduktiv metabolisiert, während Selenomethionin enzymatisch zu den gemeinsamen Zwischenmetaboliten Hydrogenselenid (H_2Se) und Monomethylselenid (CH_3SeH) umgesetzt wird. Nach der Aktivierung zum Selenophosphat folgt die Inkorporation in Selenoproteine. Durch Methylierung entstehen Ausscheidungsprodukte. Prooxidative Mechanismen können vom Selenit aber auch von den Metaboliten ausgehen.

Als oxidative Mechanismen wären direkte Reaktionen des Selenits, wie z. B. die Bildung von gemischten Disulfiden, oder auch die Depletion von Glutathion während des reduktiven Selenit-Metabolismus zu nennen. Weiterhin wird jedoch auch ein oxidatives Potential wichtiger Metaboliten postuliert. So soll Hydrogenselenid mit Sauerstoff zu Superoxid-radikalen und elementarem Selen regieren und auf diesem Wege Apoptose induzieren können. Ebenso wird die Reaktion von Monomethylselenid mit Sauerstoff zu Selenensäuren

diskutiert. Diese können wiederum direkt mit oxidationsempfindlichen Strukturen angreifen oder unter Glutathion-Depletion zurückreagieren (zusammengefasst in Brigelius-Flohé, 2008).

Zudem wurde in dieser Arbeit Phenylseleninsäure verwendet. Über den Metabolismus dieser reduzierbaren Selenverbindung ist aus der Literatur nichts bekannt. Analog zu den Selensäuren sind prooxidative Reaktionen denkbar (Abbildung 3).

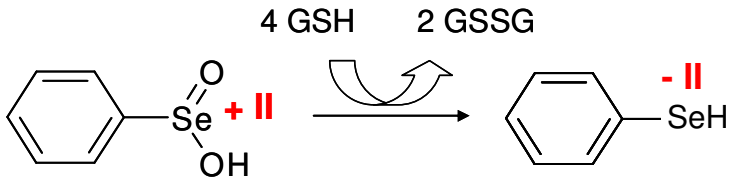


Abbildung 3: Strukturformel und Oxidationsstufe von Phenylseleninsäure. In Phenylseleninsäure weist das Selenatom eine Oxidationsstufe von +II auf. Unter Oxidation von Glutathion kann Phenylselenol entstehen.

2.1.3 Funktion

Selen übt seine biologische Funktion vor allem in Form der Selenoproteine aus, in die es als Selenocystein eingebaut ist. Selenocystein hat durch das Selenatom einen geringeren pKa-Wert als Cystein (5,2 zu 8,3) und eine höhere Reaktivität. Somit ist Selen entscheidender Bestandteil des aktiven Zentrums dieser Enzyme. Der Einbau des Selenocysteins ist genetisch über ein sonst als Translationsstopp fungierendes UGA-Codon codiert und erfolgt im Zusammenspiel mit einem Selenocystein-Insertions-Sequenz-Element (Secis-Element) sowie SECIS-bindenen Proteinen. Die benötigte Selenocysteinyl-tRNA wird aus einer tRNA mit Serylrest und aktiviertem Selenophosphat syntethisiert. Bisher wurden 25 humane Selenoproteine identifiziert. Eine der am besten untersuchten Selenoprotein-Familien ist die der Glutathion-Peroxidasen (GPx). Die einzelnen Mitglieder sind für den Glutathion-abhängigen Abbau von Peroxiden verantwortlich, wobei sie sich z. T. in ihren Substraten, wie z. B. Wasserstoffperoxid oder Lipidperoxiden, und in der Lokalisation unterscheiden. So trägt z. B. die GPx-3 zur antioxidativen Kapazität im Plasma bei. Eine weitere Familie bilden die Thioredoxin-Reduktasen, die über die Regeneration von Thioredoxin an Redox-Prozessen verschiedener Gewebe, wie z. B. der Nukleotid-Synthese, teilhaben. Daneben gibt es die Iod-Thyronin-Deiodasen, welche z. B. die Aktivierung bzw. Inaktivierung von Schilddrüsen-hormonen steuern. Zudem sind die Selenophosphat-Syntethase, die Methionin-Sulfoxid-Reduktase und weitere Selenoproteine, die mit Buchstaben benannt wurden, deren Funktionen jedoch weitestgehend ungeklärt sind, bekannt. Für das Selenoprotein P wird vor

allem eine Funktion als Speicher- und Transportform des Selens angenommen, zudem jedoch auch eine Schwermetall-komplexierende Wirkung diskutiert (zusammengefasst in Schomburg and Köhrle, 2007; Reeves and Hoffmann, 2009).
Weiterhin werden Selenoprotein-unabhängige Funktionen einzelner Selenspezies diskutiert (siehe Abschnitt 2.1.5).

2.1.4 Toxikologie

Bei einer Aufnahme von unter 20 µg Selen pro Tag können Selenmangelerscheinungen, wie Müdigkeit, Muskelschwäche, Haarausfall und Weißfärbung der Nägel, auftreten. Schwere Selenmangelerkrankungen, wie sie in selenarmen Gebieten Chinas vorkommen, treten im Vergleich dazu wahrscheinlich erst im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren auf. So scheint die Schwächung des Immunsystems durch einen Selenmangel zur gesteigerten Virulenz des Coxsackie-Virus und somit zur Keshan-Krankheit, einer Herzmuskelerkrankung, zu führen. Die Kashin-Beck-Krankheit, bei der das Knochenwachstum gestört ist, wird hingegen erst durch einen zusätzlichen Iodmangel hervorgerufen (zusammengefasst in Schomburg and Köhrle, 2007).
Die tolerierbare Höchstaufnahmemenge (UL, tolerable upper intake level) wird je nach Gremium auf 300 bis 450 µg Selen pro Tag geschätzt bzw. der NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) auf 800 bis 850 µg Selen pro Tag (Scientific Committee on Food, SCF: 300 bzw. 850 µg/Tag; Food and Nutrition Board: 400 bzw. 800 µg/Tag; Expert group on Vitamin and Minerals, EVM: 450 µg/Tag) (zusammengefasst in BfR, 2004 a). Ab einer Aufnahme von etwa 1000 µg Selen pro Tag können Symptome einer Selenintoxikation (Selenosis), wie z. B. Veränderung der Nägel, Haare und Zähne bis hin zu deren Verlust, Hautausschläge, knoblauchartiger Atemgeruch (verursacht durch Dimethylselenid) und Leistungsschwäche, auftreten (zusammengefasst in RKI, 2006). Aktuell wird die Erhöhung der Diabetesprävalenz durch Selen diskutiert (siehe Abschnitt 2.1.5). Auf dieser Grundlage wurde der MAK-Wert von Selen und seinen anorganischen Verbindungen (einschließlich Selenwasserstoff) auf 0,02 mg/Selen/m^3 abgesenkt (DFG, 2010). Die genannten Stoffe sind hinsichtlich ihrer krebserzeugenden Wirkung in die Kategorie 3 B eingeordnet worden (DFG, 2010).

2.1.5 Einfluss auf Aspekte der humanen Gesundheit

<u>Studien zur postulierten krebspräventiven Wirkung</u>
Nach seiner Entdeckung galt Selen als Gift, erst 1957 wurde seine Essentialität erkannt und mittlerweile wird diesem Element eine postulierte krebspräventive Wirkung zugesprochen.

Insgesamt werden die Ergebnisse der Studien zur krebspräventiven Wirkung des Selens jedoch kontrovers diskutiert.

Das *Nutritional Prevention of Cancer Trial* (NPC) war die erste große Interventionsstudie auf diesem Gebiet (Clark et al., 1996). Ansatzpunkt für die Studie war eine Fall-Kontroll-Studie, die zeigte, dass Hautkrebspatienten niedrigere Plasma-Selenspiegel als andere Patienten hatten (0,141 vs 0,155 µg/g) (Clark et al., 1984). In der NPC-Studie wurde daraufhin der Einfluss einer Supplementation mit 200 µg Selen als Selenhefe auf das Wiederauftreten von Hautkrebs in einem US-amerikanischen Hautkrebsrisikokollektiv untersucht. Bei der Auswertung der Daten von 1983 bis 1993 zeigte sich kein präventiver Effekt auf das Primärziel, jedoch war die allgemeine Krebsrate, die Rate an Prostata-, Lungen- und Dickdarmkrebs sowie die allgemeine krebsbedingte Mortalitätsrate in der Selen-supplementierten Gruppe signifikant gesenkt (Clark et al., 1996). Nach Auswertung aller Daten bis 1996 wurden die präventiven Einflüsse des Selens geringer und waren hinsichtlich Lungen- und Dickdarmkrebs nicht mehr vorhanden (Duffield-Lillico, 2002). Duffield-Lillico et al. (2002) wiesen darauf hin, dass die Biopsieraten in den verschiedenen Probandengruppen bei abnormal hohen Werten an PSA (prostate-specific antigen) unterschiedlich hoch war. In der Selen-supplementierten Gruppe wurde seltener biopsiert, sodass Krebsfälle unentdeckt geblieben sein könnten. Dies ist ein starker Kritikpunkt, der sich zudem auf die Ergebnisse der Gesamtkrebsrate und -mortalität ausgewirkt haben könnte. Zudem bleiben die Definierung sekundärer Endpunkte erst nach Randomisierung sowie die Verallgemeinerung der Ergebnisse aus einem Risikokollektiv kritisch zu betrachten.

Die NPC-Studie war ein Ansatzpunkt für das *Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial* (SELECT), das mit über 30.000 männlichen Probanden die bisher größte Interventionsstudie zur chemopräventiven Wirkung von Selen ist (Lippman et al., 2009). In dieser Studie wurden 200 µg Selen als Selenomethionin und Vitamin E, jeweils allein oder in Kombination, verabreicht, um primär den Einfluss auf das Prostatakrebsrisiko zu untersuchen. In keiner Gruppe wurde eine präventive Wirkung festgestellt. Vielmehr zeigte sich nach siebenjähriger Laufzeit eine nicht-signifikante Steigerung des Prostatakrebsrisikos in der mit ausschließlich Vitamin E supplementierten Gruppe und ein nicht-signifikant erhöhtes Diabetes Mellitus Typ II-Risiko in der Selen-supplementierten Gruppe. Daraufhin wurde die Studie im Oktober 2008 vorzeitig abgebrochen. Auch sekundäre Endpunkte, wie das Lungen-, Darm- und Gesamtkrebsrisiko sowie die Gesamtkrebsmortalitätsrate waren in keiner Supplementationsgruppe beeinflusst. Insgesamt wurden die Ergebnisse der NPC-Studie hier also nicht bestätigt. Lippman et al. (2009) wiesen darauf hin, dass in der NPC-Studie, nur Probanden mit niedrigen Basis-Plasma-Selenspiegel profitierten, die Spiegel von 78 % der Probanden der SELECT-Studie sogar über dem mittleren Terzil lagen. Die Probanden der NPC-Studie stammten von der Ostküste der USA, wo die Selenaufnahme vergleichsweise

niedrig ist (Clark et al., 1996). Korreliert man die Prostatakrebsinzidenzen mit den Selengehalten der Böden in den einzelnen Staaten der USA, wird diese Hypothese jedoch nicht belegt (Abbildung 4). Jedoch ist die Aussagekraft dieser Korrelation aufgrund von Migration und Import von Lebensmitteln begrenzt. Auf der anderen Seite liegt die Prostatakrebsinzidenz in Deutschland trotz geringerer Selenaufnahme mit etwa 100 Fällen/100.000 (2002) deutlich unter dem US-Durchschnitt (RKI, 2007).

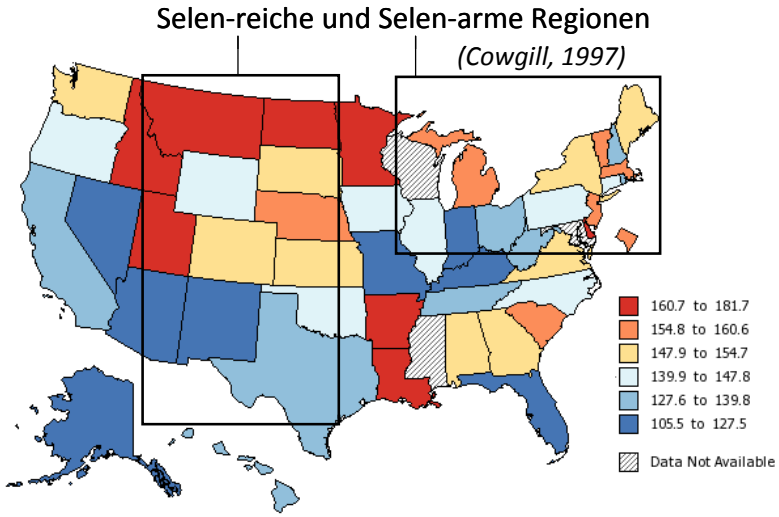


Abbildung 4: Prostatakrebs-Insidenz in den USA (2005). Dargestellt sind die Prostatakrebsfälle pro 100.000 Einwohner. (http://statecancerprofiles.cancer.gov/cgi-bin/quickprofiles/profile.pl?00&066)

Eine Fall-Kontroll-Studie beschreibt eine inversive Korrelation zwischen dem Selengehalt in Fußnägeln und der Prostatakrebsinzidenz (Yoshizawa et al., 1998). Bei näherer Betrachtung der veröffentlichten Daten, zeigt sich jedoch vielmehr in vier Quintilen kein Effekt und nur im Quintil der niedrigsten Selengehalte eine fragliche Steigerung der Inzidenz. Zudem lassen Fall-Kontroll-Studien keinen Schluss auf eine Ursache-Wirkungsbeziehung zu. In der SU.VI.MAX-Studie (supplémentation en vitamines et minéraux antioxydants), einer Interventionsstudie, in der Selen in Kombination mit Antioxidantien und Mineralstoffen eingesetzt wurde, konnte auch keine signifikante Reduktion eines Prostatakrebsrisikos belegt werden (Meyer et al., 2005). Weiterhin konnte in der „Nurses' Health-Studie" kein Zusammenhang zwischen Selenaufnahme und Gesamtkrebs und Brustkrebs bei Frauen festgestellt werden (Garland et al., 1995). Insgesamt zeigten also die großangelegte SELECT-Studie sowie einige weitere Studien keine Prävention vor Prostatakrebs oder Gesamtkrebs, während es starke Kritik an der NPC-Studie, in der ein präventiver Effekt auftrat, gibt. Ob Studien in Ländern mit einer geringeren Selenversorgung als den USA andere Ergebnisse geliefert hätten, ist fraglich und bleibt offen, da weitere Interventionsstudien aufgrund

neuerer Erkenntnisse zum Einfluss von Selen auf das Diabetes Mellitus Typ 2 Risiko unwahrscheinlich sind.

Einfluss auf das Risiko von Diabetes Mellitus Typ 2

Aktuell wird der Einfluss von Selen auf ein erhöhtes Diabetes Mellitus Typ 2 Risiko diskutiert und damit auch wieder das Zusammenspiel der prooxidativen und antioxidativen Eigenschaften des Selens. Die Erkrankung an Diabetes wird mit oxidativem Stress in Zusammenhang gebracht, sodass Antioxidantien einen postulierten präventiven Effekt haben sollen. Dies konnte in der SU.VI.MAX-Studie, in der eine Kombination verschiedener Antioxidantien und Mineralstoffe, darunter auch Selen, verabreicht wurden, nicht bestätigt werden (Czernichow et al., 2006). Vielmehr wurde in einem Follow-up der NPC-Studie unerwartet ein erhöhtes Diabetes Mellitus Typ 2 Risiko in der Selen-supplementierten Gruppe gefunden. Dieser Zusammenhang war im Terzil der Probanden mit den höchsten Basis-Plasma-Selenspiegeln signifikant (Stranges et al., 2007). In der SELECT-Studie zeigte sich ebenfalls die Korrelation zwischen Selen und Diabetes, jedoch war diese hier nicht-signifikant (Lippman et al., 2009). Dies ist vielleicht auf die kürzere Zeit des Follow-up zurückzuführen. Da zu Beginn der Studie die Basis-Plasma-Selenspiegel nur von ca. 3 % der Probanden bestimmt wurden, ist zudem eine Auswertung der einzelnen Terzile nicht möglich. Zudem wurde in der Studie NHANES III (Third National Examination Survey) eine Korrelation zwischen hohen Selenspiegeln und der Inzidenz von Diabetes in einer US-amerikanischen Population festgestellt (Bleys et al., 2007; Laclaustra et al., 2009).

Diabetes Mellitus Typ 2 ist mit einer Insulin-Resistenz verbunden. Diese kann sowohl von den prooxidativen Eigenschaften einiger Selenverbindungen, wie z. B. der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Bleys et al., 2007), als auch durch die antioxidativen Eigenschaften erklärt werden. So wurde eine Insulin-Resistenz in Mäusen beobachtet, welche die Glutathion-Peroxidase 1 überexprimieren (McClung et al., 2004). In weiteren *in vitro*-Studien und Tierexperimenten stellte sich die insulin-antagonistische Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (PTP1B) als Schlüsselenzym im Zusammenhang zwischen Selen und Diabetes heraus (Müller, 2008). Dieses Enzym wird redox-reguliert, eine Oxidation führt zur Inhibierung während die Reduktion eine Aktivierung und bei dauerhafter Aktivierung schlussendlich eine Resistenz gegenüber Insulin verursacht. Zudem wird durch Selen die PTP1B-Expression verstärkt. Insgesamt scheint ein ausgewogenes Verhältnis aus antioxidativen Effekten, wie die der GPx-1, sowie prooxidativen Eigenschaften der reduzierbaren Selenverbindungen für den Glucose-Metabolismus und den Schutz vor Diabetes von Vorteil zu sein. Selenat, das zusätzlich auch noch eine insulinomimetische Wirkung hat (zusammengefasst in Stapleton, 2000), scheint dahingehend sehr geeignet zu sein (Müller, 2008).

2.2 Tumorsuppressorprotein p53

P53 wurde 1979 erstmals beschrieben (Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979). Zunächst wurde p53 eine fördernde Rolle in der malignen Transformation gesunder Zellen zu Tumorzellen zugeschrieben und erst 1988 wurde es zu den Tumorsuppressoren gezählt (zusammengefasst in Gannon, et al, 1990). Die Prävalenz von p53-Mutationen ist vom Tumortyp abhängig und liegt z. B. bei Darmkrebs bei 50 % der Tumoren (Greenblatt, 1994).

2.2.1 Funktion und Struktur

Das Tumorsuppressorprotein p53 spielt vor allem als Transkriptionsfaktor von Genen, welche die Zellzykluskontrolle, die DNA-Reparatur und die Apoptose regulieren, eine große Rolle bei der Erhaltung der genomische Integrität. Aber auch über direkte Mechanismen, wie der Interaktion mit anderen Proteinen, übt p53 seine tumorsuppressive Wirkung aus. In normalen Zellen wird der Proteingehaltes an p53 durch ständige Degradation relativ gering gehalten, sodass das Protein Zelltyp-abhängig nur eine Halbwertszeit von 5-20 Minuten hat (zusammengefasst in Giaccia and Kastan, 1998). Erst nach genotoxischem oder nicht-genotoxischem Stress wird p53 stabilisiert und akkumuliert im Zellkern.
P53 hat ein Molekulargewicht von 53 k Da, besteht aus 393 Aminosäuren (AS) und wird in drei Abschnitte, den N-Terminus (AS 1-100), die Core-Domäne (AS 100-300) und den C-Terminus (AS 300-393), unterteilt (Abbildung 5). Diese formalen Bereiche enthalten wiederum verschiedene Domänen. So gliedert sich der N-Terminus in die Transaktivierungs- und eine prolinreiche Domäne (AS 1-42 bzw. 43-100), während die Core-Domäne die DNA-Bindungsdomäne (AS 200-300) beinhaltet. Der C-Terminus setzt sich aus der Tetramerisierungs- und Regulationsdomäne (AS 300-360 bzw. 360-393) zusammen.
Die Transaktivierungsdomäne dient zur Steuerung der transkriptionellen Aktivierung oder Repression der p53-abhängigen Gene, z. B. über die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, wie TFIID (Thut et al., 1995). Zudem liegt in diesem Bereich auch die Bindungsstelle des negativen Regulators Mdm2 (Kussie et al., 1996). Namengebend für die prolinreiche Domäne sind die fünf Wiederholungen der Aminosäureabfolge PXXP, wobei P für Prolin und X für eine beliebige Aminosäure steht. Dieses Motiv (AS 64-90) ist eine Bindungsstelle für SH3-Domänen (src homology domain) und somit eine wichtige Struktur für die Protein-Protein-Interaktion. Fehlt der N-Terminus, können wichtige Gene wie *MDM2*, B*ax* und *GADD45* nicht mehr p53-abhängig exprimiert werden (Zhu et al., 1998).

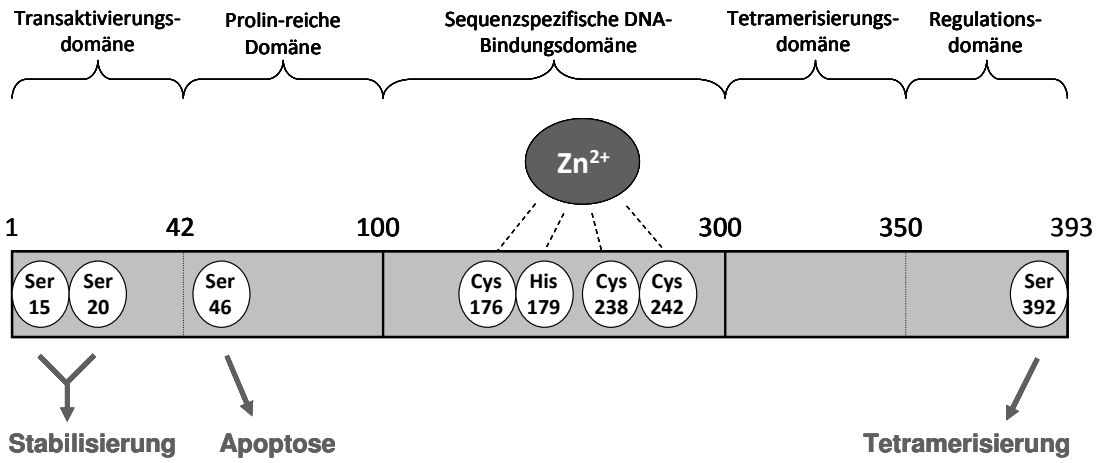


Abbildung 5: Struktur des Tumorsuppressorproteins p53. P53 gliedert sich in verschiedene Domänen. Die Phosphorylierung wichtiger Serin-Reste (Ser) reguliert die Funktion des Tumorsuppressors. Drei Cysteine (Cys) und ein Histidin (His) koordinieren ein Zinkion und stabilisieren die Konformation der DNA-Bindungsdomäne.

Weiterhin ist die DNA-Bindungsdomäne entscheidend für die Funktionsfähigkeit des Transkriptionsfaktors. Innerhalb dieser Domäne wird ein Zinkion über drei Cysteine (Cys 176, 238 und 242) und ein Histidin (His 179) koordiniert (Cho et al., 1994). Diese Zink-bindende Struktur ist keine „Zinkfinger"-Struktur, wie sie in vielen Transkriptionsfaktoren direkt an der DNA-Bindung beteiligt ist. Vielmehr stabilisiert das koordinierte Zinkion die Tertiärstruktur relativ weit auseinander liegender Proteinketten. Die Zinkbindung ist essentiell für die DNA-Bindungsfähigkeit und abhängig von den Redox-Bedingungen. Oxidationen der an der Zinkbindung beteiligten Aminosäuren führen zur Entfaltung der DNA-Bindungsdomäne und zum Verlust der Funktion (Hainaut and Milner, 1993a; Hainaut and Milner, 1993b; Delphin, 1994). Auch Agenzien, welche die Zinkbindung über andere Mechanismen inhibieren, wie Metall-Chelatoren (Hainaut and Milner, 1993a) oder Cadmium (Méplan et al., 1999; Thuy, 2006; Schwerdtle et al., 2010) inaktivieren den Transkriptionsfaktor. Die Konsensussequenz der spezifischen DNA-Bindungsdomäne lautet 5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy-3' (Pu: A/G; Py: T/A) und muss in zwei Kopien auftreten (El-Deiry et al., 1992).

Im C-Terminus liegt die Tetramerisierungsdomäne, innerhalb derer die Aminosäure 323 bis 355 über hydrophobe Wechselwirkungen für die Tetramerisierung von p53 verantwortlich sind (Jeffrey et al, 1995). Weiterhin befinden sich Kernexport- und Kernlokalisierungssignale im C-terminalen Ende von p53. Erst als kernlokalisiertes Tetramer ist der Transkriptionsfaktor funktionsfähig. Die Regulationsdomäne bindet unspezifisch an DNA-Strukturmerkmale, wie z. B. Deletionsschlaufen (deletion loop) oder DNA-Enden, und erhöht daraufhin die spezifische DNA-Bindung der DNA-Bindungsdomäne in der Core-Domäne.

2.2.2 Regulation über Phosphorylierung

In normalen Zellen ist p53 inaktiv und hat je nach Zelltyp eine Halbwertszeit von ca. 5-20 Minuten (zusammengefasst in Giaccia and Kastan, 1998). Erst nach nicht-genotoxischem oder genotoxischem Stress, wie z. B. oxidativem Stress, wird p53 nicht transkriptionell, sondern über posttranslationale Modifikationen auf der Proteinebene stabilisiert und als Transkriptionsfaktor aktiviert. Vor allem Phosphorylierungen an Serin- und Threoninresten durch Kinasen, wie z. B. ATM und ATR, sind von entscheidender Bedeutung (zusammengefasst in Meek, 1998 und Giaccia and Kastan, 1998). Die bekannten Phosphorylierungen am p53-Protein sind bereits in Abbildung 5 dargestellt. Aber auch andere Modifikationen, wie z. B. Acetylierungen (Sakaguchi et al., 1998) und Sumoylierungen (Rodriguez et al., 1999), spielen eine Rolle. Mechanistisch bewirken die Modifikationen eine Veränderung der Interaktion mit anderen Proteinen, indem Phosphorylierungen die negative Ladung erhöhen, während Acetylierungen und Sumoylierungen die Ladung am Protein verringern. Zudem wird diskutiert, ob Phosphorylierungen zu leichten Konformationsänderungen führen, welche die Stabilität und Aktivität beeinflussen könnten (Shieh et al., 1997).

Die Phosphorylierung von N-terminalen Serinen und Threoninen in der Transaktivierungsdomäne im N-Terminus von p53 (Serin-6, -9, -15, -20, -33 und -37 sowie Threonin-18) wird mit einer Stabilisierung des Proteins in Verbindung gebracht (Chehab et al., 2000; Honda et al., 1999; Pise-Masison et al., 1998; Sakaguchi et al., 1998; Shieh et al., 1997). Sakaguchi et al. (1998) beschreiben die Phosphorylierung an Threonin-18 als entscheidend für die Stabilisierung von p53, wobei diese Modifikation am Ende einer Phosphorylierungskaskade steht und somit weitere Phosphorylierungen, z. B. von Serin-15, notwendig sind (Sakaguchi et al., 2000). Die negative Ladung der Phosphatgruppen behindert die Interaktion mit der hydrophoben Bindungstasche des negativen Regulators Mdm2. Dieser bindet an eine helikale Struktur von p53, die von den Aminosäuren 18 bis 23 gebildet wird (Kussie et al., 1996). Die Interaktion mit Mdm2 führt zur Ubiquitin-abhängigen, proteasomalen Degradation von p53. Neben der Stabilisierung von p53 beeinflussen die Phosphorylierungen im N-Terminus auch die transkriptionelle Aktivität des Tumorsuppressors (Siliciano et al., 1997), da sie die Interaktion mit verschiedenen Coaktivatoren, wie p300 (Avantaggiati et al., 1997), verbessern.

In der prolinreichen Region des N-Terminus wird die Phosphorylierung von Serin-46 mit der Induktion von Apoptose in Verbindung gebracht (siehe Abschnitt 2.2.4). Innerhalb der Core-Domäne und vor allem der dort enthaltenen DNA-Bindungsdomäne ist wenig über Phosphorylierungsstellen bekannt. Buschmann et al. (2001) zeigten, dass die Phosphorylierung an Threonin-81, welches außerhalb der DNA-Bindungsdomäne liegt, die transkriptionelle Aktivität von p53 erhöht.

In der Tetramerisierungsdomäne des C-terminalen Endes von p53 begünstigt die Phosphorylierung von Serin-392 die Tetramerisierung des Tumorsuppressors (Sakaguchi et al., 1997). Eine Konformationsänderung ausgelöst durch diese Phosphorylierung soll dabei die Stabilisierung des Tetramers katalysieren (Hupp, 1999). Dies steigert die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor, da tetramerisiertes p53 eine stärkere sequenzspezifische DNA-Bindung aufweist (Hupp et al., 1993). Auch Dephosphorylierung kann die Aktivität erhöhen. So wird Serin-376 nach Behandlung mit ionisierender Strahlung dephosphoryliert, wodurch die sequenzspezifische DNA-Bindungsfähigkeit gesteigert wird (Waterman et al., 1998). Als Transkriptionsfaktor induziert p53 Gene der Zellzykluskontrolle (*p21*), der DNA-Reparatur (*p48*, *XPC*) und der Apoptose (*Bax*).

2.2.3 Rolle von p53 in der DNA-Reparatur

Basenexzisionsreparatur (BER)

Oxidative DNA-Schäden, wie oxidative Basenmodifikationen, Strangbrüche und abasische Stellen, werden über die Basenexzisionsreparatur repariert. Im Fall von oxidativen Basenmodifikationen wird zunächst die geschädigte Base von einer DNA-Glykosylase, wie hOGG1 (8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase 1), ausgeschnitten, dann wird durch die Endonuklease APE1 (Apurin/Apyrimidin-Endonuklease 1) ein Strangbruch gesetzt und durch die DNA-Polymerase Polß ein neues Nukleotid eingesetzt. Bei der „short patch"-Reparatur bereinigt Polß das 3'-Ende, sodass die Ligase III in einem Komplex mit XRCC1 (X-ray-repair-cross-complementing) den Strang wieder ligieren kann. Im Vergleich dazu wird im PCNA-abhängigen (proliferating cell nuclear antigen) „long patch"-Reparaturweg von der Polymerase δ ein Oligonukleotid syntethisiert, das 3'-Ende durch die Flap-Endonuklease 1 (FEN-1) bereinigt und der Strang von der DNA-Ligase 1 geschlossen (siehe Abbildung 6) (zusammengefasst in Hegde et al., 2008).

P53-profiziente Zellen haben eine höhere BER-Kapazität als p53-defiziente Zellen (Achanta and Huang, 2004). P53 wird in der BER vorwiegend eine direkte Rolle zugeschrieben, da es im C-Terminus unspezifisch mit schadhafter DNA und im N-Terminus mit den Reparaturenzymen hOGG1, APE-1 und Polß interagieren kann (Achanta and Huang, 2004; Zhou et al., 2001). Durch Zusammenführung von hOGG1 mit geschädigter DNA könnte p53 somit an der Schadenserkennung beteiligt sein. In jedem Fall erhöht p53 die Aktivität von hOGG1. Dies wurde in subzellulären Testsystemen gezeigt und ist somit unabhängig von einer transkriptionellen Induktion (Achanta and Huang, 2004). Zusätzlich scheint aber auch die Genexpression von *hOGG1* vom p53-Status der Zellen abzuhängen (Chatterjee et al., 2006).

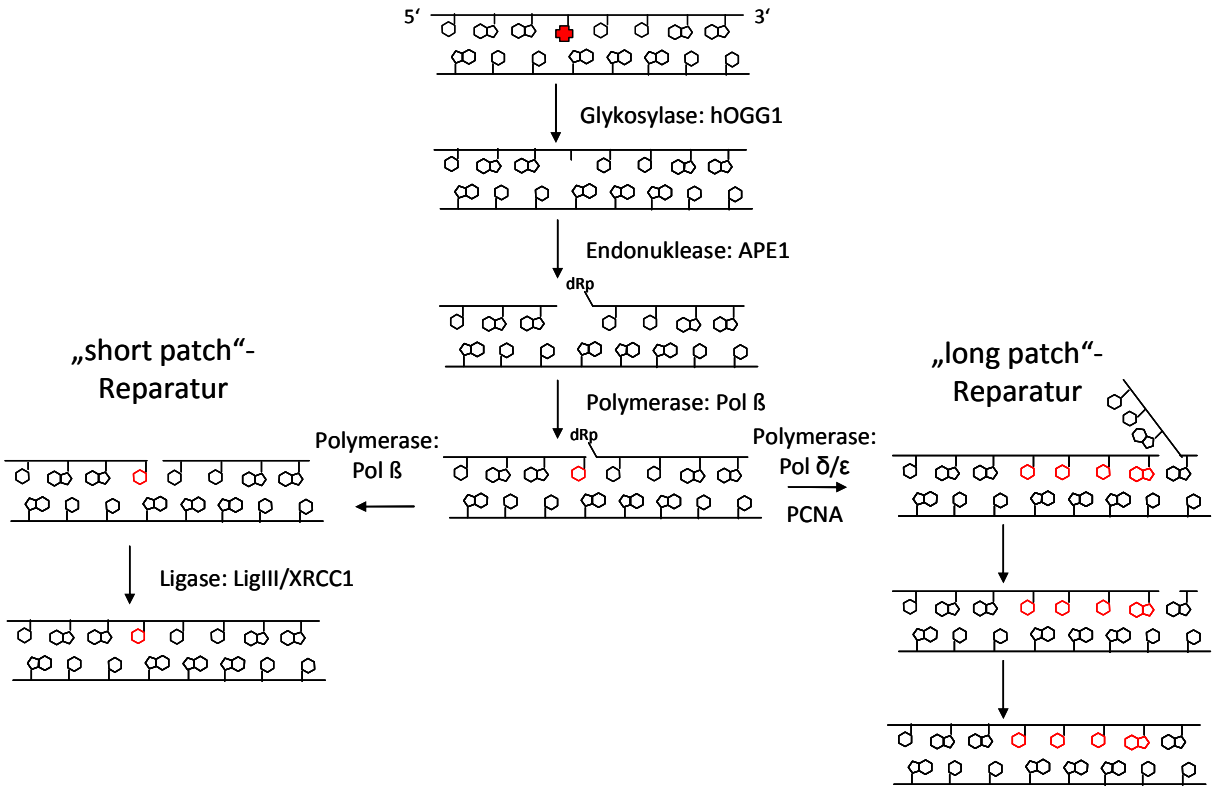


Abbildung 6: Ablauf der Basenexzisionsreparatur. Oxidative DNA-Schäden können über die „short patch"- oder die „long patch"-Reparatur prozessiert werden.

Welchen Einfluss p53 auf die Aktivität dieser Reparaturenzyme hat, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Seo et al. (2002 a) berichten, dass p53 weder zu einer Zunahme des APE1-Spiegels noch zu einer erhöhten Aktivität führt, während Achanta and Huang (2004) durchaus eine Steigerung der Aktivität finden. Zudem kann p53 nach starker, Camptothecin-induzierter DNA-Schädigung als negativer Regulator von APE1 auf der Ebene der Genexpression fungieren und zur Akkumulation von oxidativen DNA-Schäden führen. Dies wird als ein Mechanismen diskutiert, über den p53 Apoptose einleiten kann (Zaky et al., 2008).

Im Falle von Polß soll p53 zur Stabilisierung und Anreicherung beitragen (Seo et al., 2002 a) und zusätzlich die enzymatischen Reaktionen von Polß begünstigen. Letzteres geschieht über die Stabilisierung der Bindung von Polß an abasische DNA. Dadurch wird z. B. die Bereinigung des 3'-Endes, ein limitierender Schritt der BER, begünstigt (Zhou et al., 2001). Cabelof et al. (2002) zeigten, dass oxidativer Stress zur Stabilisierung von p53, zur Anreicherung von Polß und einer gesteigerten BER-Kapazität führt. Zudem wäre es denkbar, dass p53 mit seiner proof-reading-Aktivität die Fehlerrate von Polß senkt.

Nukleotidexzisionsreparatur (NER)

Über die NER werden Helix-verzerrende DNA-Schäden repariert. Neben der globalen genomischen Reparatur (GGR) gibt es die transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR). Letztere ist nicht im gesamten Genom sondern in den transkribierten Bereichen aktiv und unterscheidet sich vor allem in der Schadenserkennung. Die GGR gliedert sich in die Schadenserkennung, die Bildung des Inzisionskomplexes, das Ausschneiden des Schadens, die Reparatursynthese und die Ligation des Stranges. In diesem komplexen Reparaturweg mit über 30 beteiligten Proteinen greift p53 vor allem als Transkriptionsfaktor von DDB2 und XPC ein. Dabei reguliert p53 sowohl die basale Expression als auch die Induktion dieser beiden an der Schadenserkennung der GGR beteiligten Faktoren nach DNA-Schädigung (zusammengefasst in Ford, 2005). Ein weiteres Protein, das jedoch p53-unabhängig transkribiert wird, ist das Zink-bindende XPA. Dieses ist für die Bildung des Inzisionskomplexes notwendig.

Schnittstellen zwischen der NER und BER

Obwohl über die BER und NER sehr unterschiedliche Schadenstypen repariert werden, gibt es Schnittstellen zwischen den beiden Reparaturwegen (Abbildung 7). XPC, welches an der Schadenserkennung während der NER beteiligt ist, scheint zudem die Aktivität und den Substratumsatz von hOGG1, einer Glykosylase der BER, zu steigern. Angenommen wird, ob dies auf eine Verdrängung von hOGG1 von der AP-Stelle zurückzuführen ist (D'Errico et al., 2006). Insgesamt wird die NER als möglicher „Back up"-Mechanismus für die BER diskutiert, da oxidativer Stress zur Induktion von NER-Genen, wie XPC und XPA, führt (Langie et al., 2007). Unterstützend dazu wurde gezeigt, dass gewisse Polymorphismen im *xpa*-Gen zu höheren Gehalten an Strangbrüchen in Lymphozyten eines mit Asbest und Steinwolle exponierten Kollektivs (Dušinská et al., 2006). Dies wurde von den Autoren als Beweis für eine gesenkte BER-Kapazität diskutiert.

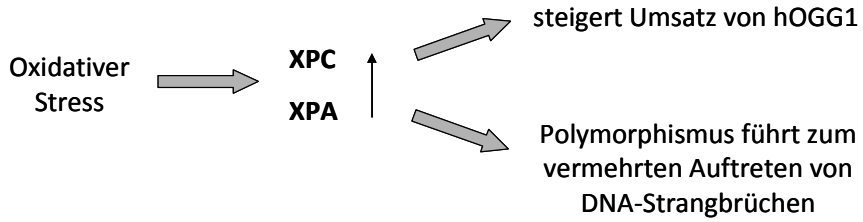


Abbildung 7: Rolle von NER-Proteinen in der BER.

2.2.3 Rolle von p53 in der Zellzykluskontrolle

Der Zellzyklus gliedert sich in die Mitose und die Interphase, wobei letztere die G0-, G1-, S- und G2-Phase umfasst. Sich nicht teilende Zellen verbleiben in der Ruhe-/G0-Phase. In der G1-Phase bereitet sich die Zelle auf die anschließende Synthese-/S-Phase vor, indem sie z. B. Nukleotide synthetisiert. Während der S-Phase wird die DNA repliziert und nach der Vorbereitung in der G2-Phase, erfolgt die Mitose. Die komplexe Regulation des Zellzyklus wird vorwiegend von Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks) und deren Aktivierung durch Komplexbildung mit den dazugehörigen Cyclinen bestimmt. Dazu kommen aktivierende Prozesse, wie z. B. die Phosphorylierung der Cdks durch Cdk-aktivierende Kinasen (CAK), und inhibierenden Prozesse, wie z. B. die direkte Protein-Protein-Interaktion mit p21 (zusammengefasst in Malumbres and Barbacid, 2005). Die Substrate der aktivierten Cdks sind z. B. Transkriptionsfaktoren, die nach Phosphorylierung Proteine zum Fortschreiten des Zellzykluses induzieren. Der Zellzyklus kann jedoch an Kontrollpunkten in der G1-, S- und G2-Phase angehalten werden. Dies geschieht z. B. nach DNA-Schädigung, um der DNA-Reparatur Zeit zu verschaffen und eine Replikation geschädigter DNA bzw. eine Zellteilung mit geschädigtem Genom zu verhindern. Bei der Aktivierung der Kontrollpunkte zum Ende der G1- und der G2-Phase wird p53 eine große Bedeutung zugesprochen, wobei zum Teil auch p53-unabhängige Mechanismen existieren. Im Vergleich dazu ist eine Beteiligung von p53 am Intra-S-Phase-Arrest noch unklar und wird sehr kontrovers diskutiert (zusammengefasst in Giono and Manfredi, 2006). Die Rolle von p53 in der Zellzykluskontrolle ist Abbildung 8 zusammengefasst.

Bei der Aktivierung des G1-Kontrollpunktes spielt p53 eine wichtige Rolle als Transkriptionsfaktor von p21. P21 inhibiert die Aktivierung des CycA/Cdk2- und des CycE/Cdk2-Komplexes, sodass das Retinoblastom-Protein (pRB) von der Cdk2 nicht phosphoryliert wird. Das hypophosphorylierte pRB bindet und inhibiert den Transkriptionsfaktor E2F, sodass die Expression wichtiger Gene zum Fortgang des Zellzykluses in die S-Phase nicht stattfindet (zusammengefasst in Giono and Manfredi, 2006). Zudem kann das Zellzyklusprotein GADD45, das p53-abhängig und p53-unabhängig induziert werden kann, zur Arretierung in der G1-Phase führen, wobei der Mechanismus noch unklar ist (Smith et al., 1994).

Der Intra-S-Phase-Arrest ist meist weniger persistent als die Arreste in der G1- und G2-Phase und wird in der Literatur oft als p53-unabhängig beschrieben (zusammengefasst in Iliakis et al., 2003). Trotzdem gibt es Hinweise darauf, dass p53 zum Teil doch involviert ist, z. B. beim durch Cdc7-induzierten S-Phase-Arrest (zusammengefasst in Giono and Manfredi, 2006). Ebenso ist die Rolle von p21 im S-Phase-Arrest widersprüchlich. P21 ist ein Inhibitor von PCNA (proliferating cell nuclear antigen), welches an der Replikation aber auch an der

DNA-Reparatur beteiligt ist. Allgemein wird von einer gezielten Degradation von p21 während des S-Phase-Arrests ausgegangen. In Abwesenheit von p21 kann somit die PCNA-abhängige Reparatur von DNA-Schäden während eines transienten S-Phase-Arrests ablaufen. Es wird diskutiert, ob bei stark geschädigtem Genom eine p53-abhängige Induktion von p21 und Hemmung von PCNA für eine Verlängerung und Persistenz des S-Phase-Arrests sorgt (zusammengefasst in Gottifredi and Prives, 2005).

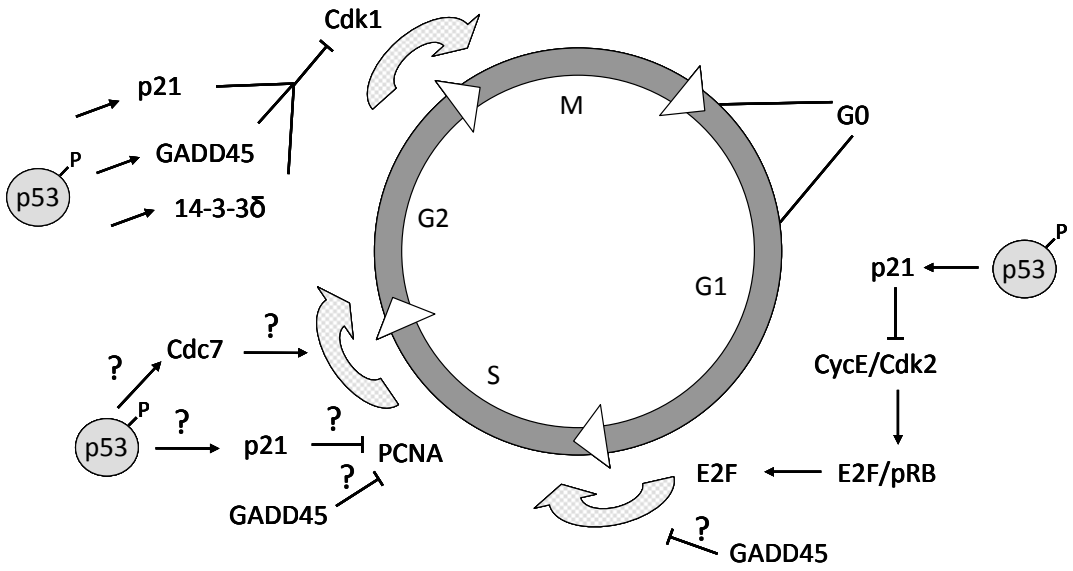


Abbildung 8: Rolle von p53 in der Zellzykluskontrolle

Weiterhin kann der Zellzyklus p53-abhängig in der G2-Phase vor dem Eintritt in die Mitose angehalten werden. Die für die Überschreitung dieses Checkpoints und zum Eintritt in die Mitose entscheidende Cdk1, kann von p53 durch verschiedenste Mechanismen inhibiert werden. Zum einen hemmt p53 die Expression der Cdk2 selbst aber auch des aktivierenden Cyclins B1. Zum anderen inhibieren die p53-abhängig induzierten Proteine GADD45, p21 und 14-3-3σ die Cdc2. Ein p53-unabhängiger G2-Arrest kann z. B. über Chk1 und 2 hervorgerufen werden, die von ATM und ATR aktiviert werden. Ein weiteres Substrat dieser Kinasen ist p53, sodass unterschiedliche Wege zur Aktivierung des Kontrollpunktes führten (zusammengefasst in Taylor and Stark, 2001).

2.2.4 Rolle von p53 in der Apoptose

Es gibt zahlreiche Formen von Zelltod, von denen die Apoptose und die Nekrose die bekanntesten sind (zusammengefasst in Kroemer et al., 2009). Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose ein aktiver, genetisch gesteuerter Prozess, bei dem die Zellmembran kontrahiert, das Zytoskelett abgebaut, Ausstülpungen der Plasmamembran abgeschnürt und die DNA in membranumschlossenen, sogenannten apoptotischen Körperchen verpackt werden.

Die Apoptose kann durch extrinsische (z. B. Sauerstoffmangel) oder intrinsische (z. B. DNA-Schäden) Signale ausgelöst werden. Beim extrinsischen Signalweg werden nach Bindung eines Liganden an einen membrangebundenen Todesrezeptor kaskadenartig zunächst die Initiator-Caspasen (cysteinyl-aspartate specific protease) und anschließend die Effektor-Caspasen aktiviert. Die Aufgabe letzterer besteht in der proteolytischen Deaktivierung von antiapoptotischen Proteinen, der proteolytischen Aktivierung von apoptotischen Proteinen, wie z. B. DNasen und der Degradation von Strukturproteinen, wie z. B. Aktin (zusammengefasst in Fan et al., 2005). Der intrinsische Signalweg geht von den Mitochondrien aus. Das Membranpotential der Mitochondrien wird vom Verhältnis von antiapoptotischen (z. B. Bcl-2) zu proapoptotischen (z. B. Bax (Bcl-2-associated X protein)) Proteinen der Bcl2-Familie bestimmt. Überwiegen die proapoptotischen Proteine wird die Membran permeabel für Cytochrom C, welches aus dem Intermembranraum ins Zytoplasma ausgeschüttet wird. Dort bildet Cytochrom C mit weiteren Faktoren das Apoptosom, welches die Effektor-Caspasen aktiviert und somit die oben beschriebenen Mechanismen auslöst. Daneben kann die intrinsische Apoptose jedoch auch Caspase-unabhängig über AIF (apoptosis inducing factor) ablaufen. Das mitochondriale Flavoprotein wird während der Apoptose ins Zytosol ausgeschüttet dort aktiviert und transloziert als DNase in den Kern, wo es die DNA-Fragmentierung einleitet (zusammengefasst in Huerta et al., 2007). In der Literatur wird AIF vorwiegend mit der Caspase-unabhängigen Apoptose in Zusammenhang gebracht, wobei auch Verknüpfungspunkte mit der Caspase-Kaskade diskutiert werden (zusammengefasst in Candé et al., 2002; Cregan et al., 2004).

P53 ist ein Schlüsselprotein in der durch DNA-Schäden induzierten Apoptose (zusammengefasst in Roos and Kaina, 2006). Es wird angenommen, dass z. B. bei einer geringen Anzahl an Doppelstrangbrüchen der Gehalt an p53 nur so stark ansteigt, dass das Zellzyklus-kontrollgen p21 exprimiert wird. Erst wenn hohe Schadensraten zu einer Akkumulation von p53 über einen Schwellenwert führen, werden dieser Hypothese nach proapoptotische Gene induziert (zusammengefasst in Roos and Kaina, 2006). Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung von p53 an Serin-46 essentiell für die transkriptionelle Aktivierung proapoptotischer Gene ist (Oda et al., 2000). Kurihara et al. (2007) zeigen jedoch, dass diese

Phosphorylierung nicht immer zur Apoptose, sondern zum Teil auch zur Seneszenz führen kann. Zu den p53-abhängigen proapoptotischen Genen gehören z. B. die Todesrezeptoren Fas/Apo1 (TNF) und Killer/DR5 (TRAIL), Bax, PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis), NOXA, PIGs (p53 induced genes), IGF-BP3, p53AIP1 (p53-regulated apoptosis-inducing protein1), PAG608 und p85 (zusammengefasst in Moll and Zaika, 2001). Die basale Expression von AIF ist in p53-profizienten Zellen stärker, wobei p53 nach DNA-Schädigung nicht zu einer weiteren Induktion von AIF führt (Stambolsky et al., 2006). Zudem ist p53 an der Kernlokalisation von AIF beteiligt, da die Ausschüttung von AIF aus den Mitochondrien in das Zytoplasma z. B. von Bax induziert werden kann (Cregan et al., 2002). P53-abhängige Apoptose kann jedoch trotz gehemmter transkriptioneller Aktivierung proapoptotischer Gene ablaufen, sodass auch andere Mechanismen ablaufen müssen. Einer davon ist die transkriptionelle Repression von antiapoptotischen Genen, wie Bcl-2, MAP4 und Galectin-3 (Cecchinelli, B., 2006; zusammengefasst in Ho and Benchimol, 2003), und Genen, die DNA-Reparaturproteine codieren, wie APE1 (Zaky et al. 2008; siehe Abschnitt 2.2.3), durch p53.

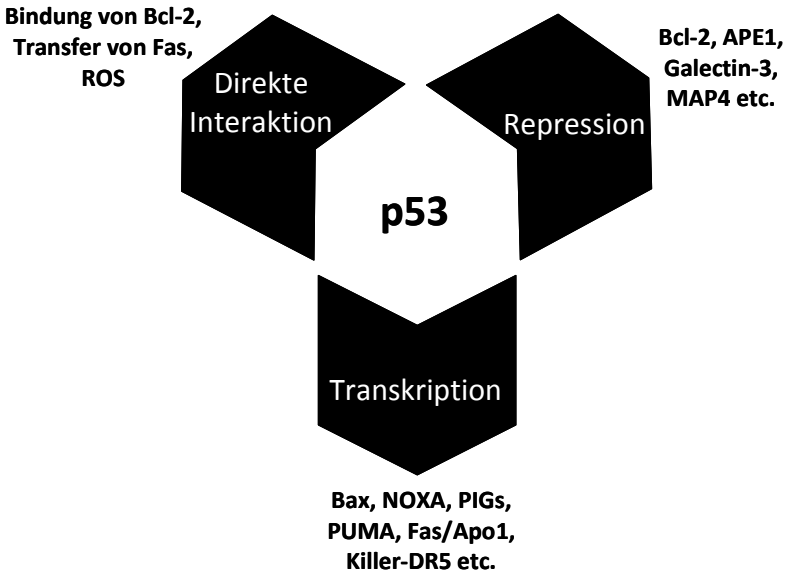


Abbildung 9: Rolle von p53 in der Apoptose. P53 kann über transkriptionelle Induktion oder Repression von Genen bzw. direkte Interaktionen mit Proteinen Apoptose einleiten.

Neben den transkriptionellen Mechanismen werden auch direkte Einflüsse auf das mitochondriale Membranpotential durch Bindung an antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie (Mihara et al., 2003), den Transfer von bestehenden Fas-Proteinen zur Kernmembran, die Generation von ROS und eine FADD-unabhängige Aktivierung von Caspase-8 diskutiert (zusammengefasst in Schuler and Green, 2001). Die Rolle von p53 in der Apoptose ist in Abbildung 9 zusammengefasst.

2.3 Bedeutung von Selen für die genomische Stabilität

Die Versorgung der deutschen Bevölkerung mit dem Spurenelement Selen liegt nur im unteren bis mittleren Bereich der empfohlenen Zufuhrmenge von 30-70 µg/Tag, welche die Deutsche Gesellschaft für Ernährung als Schätzwert angibt (DGE, 2000; BfR, 2004 a). Es stellt sich deshalb die Frage, ob eine Supplementation sinnvoll ist und welche Selenverbindung dafür geeignet wäre. Häufig in der Nahrungsergänzung angeboten werden das anorganische, reduzierbare Natriumselenit oder das organische, vollständig reduzierte Selenomethionin in Form von Selenhefe. Diese beiden Selenverbindungen unterscheiden sich in der Oxidationsstufe des Selenatoms sowie in ihrer Aufnahme, ihrem Metabolismus und ihren Eigenschaften. Aufgrund der antioxidativen Wirkung des Selens, als essentieller Bestandteil der plasmatischen Glutathion-Peroxidase, werden diesem Spurenelement viele positive Wirkungen auf die menschliche Gesundheit zugeschrieben. Postuliert werden z. B. präventive Effekte auf kardiovaskuläre Erkrankung und Krebsentstehung, wobei Studien zur Krebsprävention uneinheitlich sind (siehe Abschnitt 2.1.5). Neben den antioxidativen Eigenschaften werden hinsichtlich der postulierten chemopräventiven Wirkungen zudem Selenoprotein-unabhängige, zum Teil prooxidative Mechanismen diskutiert, wie der Einfluss auf die Regulation der Zellzykluskontrolle und der Zinkhomöostase (Chen and Maret, 2001) sowie auf die Induktion von Apoptose, DNA-Reparatur (Seo et al., 2002 b) oder Phase-II-Enzymen (zusammengefasst in Brigelius-Flohé, 2008). Für Redox-Reaktionen ist Selen geeignet, da es in den Oxidationsstufen von –II bis +VI vorliegen kann. Dabei ist die Begünstigung der genannten prooxidativen Mechanismen vor allem durch reduzierbare Selenverbindungen oder reaktive Zwischenmetabolite wie Hydrogenselenid denkbar. Mechanistisch kann dabei die Modifikation von Thiolen an Proteinen zugrunde liegen, wie sie z. B. bei der Redox-Regulation von Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielt (zusammengefasst in Jackson and Combs, 2008). Entsprechend könnte die Bereitstellung von Zink aus dem Zinkspeicherprotein Metallothionein, welches sieben Zinkionen über 20 Cysteine koordinieren kann, ablaufen. Jacob et al. (1999) zeigten, dass reduzierbare Selenverbindungen im isolierten System auch im Überschuss von reduziertem Glutathion in der Lage waren, Zink aus Metallothionein freizusetzen. Damit werden jedoch auch oxidative Schädigungen empfindlicher Strukturen, wie der DNA oder von Proteinen, möglich. So belegen Studien unserer Arbeitsgruppe, dass reduzierbare Selenverbindungen oxidative DNA-Schäden induzieren und Zink aus den isolierten Zinkfingerproteinen Fpg und XPA freisetzten können (Blessing et al., 2004; Hall, 2008). Die Interaktion mit Reparaturproteinen könnte eine Hemmung von DNA-Reparaturwegen zur Folge haben. Z. B. ist XPA an der Reparatur Helix-verzerrender DNA-Schäden, der NER, beteiligt. Bei der Betrachtung der Reparatur von Benzo[a]pyren (BPDE)-induzierter DNA-Schäden zeigte sich, dass

Natriumselenit in vergleichsweise geringen Konzentrationen und Selenomethionin in zytotoxischen Konzentrationen die Reparatur der BPDE-Addukte hemmen (Hall, 2008). Demgegenüber stehen Arbeiten von Seo et al. (2002), in denen Selenomethionin die NER-Kapazität nach UV-Schädigung p53-abhängig verstärkte. Dies wurde auf die Generierung einer reduktiven Umgebung zurückgeführt, welche die Oxidation von Thiolgruppen verhindert und damit die DNA-Bindungsfähigkeit des Tumorsuppressorproteins p53 steigert. Insgesamt stellen die Zink-bindenden Thiole von p53 jedoch auch Angriffspunkte für die prooxidative Wirkung reduzierbarer Selenverbindungen dar. Dadurch können p53-abhängige Mechanismen wie Zellzykluskontrolle, verschiedene DNA-Reparaturwege oder Apoptose inhibiert werden. Das Redox-aktive Selen kann demnach in Form seiner Verbindungen unterschiedliche Eigenschaften haben und so in unterschiedlichster Weise in die Redox-Regulation der Zelle eingreifen. Ein gut reguliertes Verhältnis zwischen antioxidativen und prooxidativen Kapazitäten könnte dabei entscheidend für die Erhaltung der genomischen Stabilität sein.

3 Fragestellung

Es wird kontrovers diskutiert, ob die deutsche Bevölkerung ausreichend mit dem Spurenelement Selen versorgt ist oder ob eine Supplementation zu empfehlen ist. Es ist eine Vielzahl von selenhaltigen Nahrungsergänzungsmitteln erhältlich, die mit der antioxidativen Wirkung des Selens als Bestandteil der Selenoproteine, wie z. B. der plasmatischen Glutathion-Peroxidase, werben. Dabei werden verschiedene Selenquellen mit differierenden Eigenschaften eingesetzt, wie Selenhefe, die hauptsächlich die Aminosäure Selenomethionin enthält, oder anorganische Salze, wie Natriumselenit. Während das Selen im Selenomethionin vollständig reduziert vorliegt, kann es im Natriumselenit reduziert werden. Das Redox-aktive Element kann jedoch in Form von reduzierbaren Selenverbindungen auch prooxidative Einflüsse auf sensitive Strukturen von Proteinen, wie Zink-bindene Thiole, oder der DNA ausüben. Vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe belegen die Oxidation der isolierten Zinkfingerproteine Fpg und XPA durch reduzierbare Selenverbindungen (Blessing et al., 2004; Hall, 2008). Eine Interaktion mit DNA-Reparaturproteinen oder Transkriptionsfaktoren könnte die genomische Stabilität beeinflussen.

Im Fokus dieser Arbeit steht die Integrität und Funktion des Tumorsuppressorproteins p53, das in seiner DNA-Bindungsdomäne ebenfalls eine Zink-bindende Struktur enthält. Nach DNA-Schädigung induziert p53 als Transkriptionsfaktor Gene der Zellzykluskontrolle, der DNA-Reparatur und der Apoptose. P53 spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung der genomischen Stabilität und dementsprechend steht seine Inaktivierung, z. B. durch Mutationen, im Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs. Zunächst soll in dieser Arbeit ein direkter Einfluss von Natriumselenit und Selenomethionin auf die intakte Konformation des Tumorsuppressors in einem subzellulären System untersucht werden. Eine mögliche Inaktivierung von p53 soll daraufhin im zellulären System verfolgt werden. Als Modellsystem dienen HCT116 Kolonkarzinomzellen, die p53 exprimieren, sowie deren isogene, p53-defiziente Zelllinie. Zunächst sollen in beiden Zelllinien grundlegende Endpunkte wie die Zytotoxizität und die Aufnahme der Selenverbindungen betrachtet werden. Als weiterer Parameter für prooxidative Mechanismen werden oxidative DNA-Schäden quantifiziert, auch hier steht der Einfluss des p53-Status der Zellen im Vordergrund. Als Folge von zytotoxischen und genotoxischen Effekten soll eine Stabilisierung und Phosphorylierung von p53 sowie die Einleitung tumorsuppressiver Reaktionen untersucht werden. Dabei wird wiederum die p53-Abhängigkeit der zellulären Schadensantwort ermittelt. Als Endpunkte werden dafür die Einleitung von Zellzyklusarresten, die Induktion von Zellzykluskontrollproteinen sowie DNA-Reparaturproteinen auf Gen- und Proteinebene

und die Einleitung von Apoptose herangezogen. Die Induktion der Apoptose soll zudem auch mechanistisch näher betrachtet werden, wofür mehrere geeignete Methoden ausgewählt werden. Z. B. wird ein real time RT-PCR-System zur Bestimmung der Genexpression des proapoptotischen Proteins Bax etabliert.

Um zelltypspezifische Unterschiede, z. B. in der Zytotoxizität oder der Aufnahme der beiden Selenverbindungen, zu erfassen, werden A549 Lungenadenokarzinomzellen zum Vergleich herangezogen. Daneben wird der Einfluss der Oxidationsstufe des Selens durch Vergleiche mit Phenylseleninsäure näher betrachtet. Das Selenatom dieser Selenverbindung ist ebenfalls reduzierbar, hat jedoch eine niedrigere Oxidationsstufe als im Natriumselenit.

Insgesamt soll in dieser Arbeit der Einfluss von Natriumselenit und Selenomethionin auf p53 sowie die Rolle des Tumorsuppressors bei der zellulären Antwort auf diese Selenverbindungen untersucht werden.

4 Material und Methoden

4.1 Zellkultur

Die verwendeten Chemikalien, Lösungen und Puffer sowie Geräte und Verbrauchsmaterialien sind im Anhang aufgelistet.

4.1.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden p53-profiziente HCT116 Kolonkarzinomzellen sowie die isogene p53-defiziente Knock-out-Zelllinie (Bunz et al., 1998) verwendet. HCT116 Zellen haben einen Defekt im Mismatch-Reparaturweg (Parsons, 1993). Zudem wurden A549 Lungenadenokarzinomzellen eingesetzt, die ebenfalls Wildtyp-p53 exprimieren. A549 Zellen weisen eine Mutation im Protoonkogen K-ras auf (Imai et al, 1994) und sind nicht in der Lage, das am Zellzyklus beteiligte Gen p16 zu exprimieren (Otterson et al, 1994).

4.1.2 Kulturbedingung und Behandlung

Die verwendeten Zelllinien wurden im Zellkulturmedium DMEM, versetzt mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) sowie 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, bei 37 °C, 5 % Kohlendioxid und 100 % Luftfeuchte kultiviert. Die adhärent als Monolayer wachsenden Zellen wurden zwei- bis dreimal pro Woche vereinzelt und weitergesetzt. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen mit Trypsin gespült, erneut für 30 s mit Trypsin versetzt und wiederum abgesaugt. Die HCT116 Zelllinien wurden dann für etwa 2 min und die A549 Zellen für etwa 3 min in den Brutschrank gestellt. Die Zellen wurden in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und Aliquots in neue Zellkulturschalen überführt. Die Zellen wurden dabei ggf. mit einem automatischen Zellzählgerät gezählt (Casy). Nach etwa zwanzig Passagen wurden die Zellen entsorgt und neue Zellen in Kultur genommen. Dazu wurden die HCT116 Zelllinien in einem Einfriermedium bestehend aus 70 % DMEM versetzt mit FKS und Antibiotika, 20 % FKS und 10 % DMSO und die A549 Zellen in 90 % FKS und 10 % DMSO bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.
Für das sterile Arbeiten wurden Medien, Puffer und Lösungen sterilfiltriert, Glaspipetten heißsterilisiert sowie Schott-Flaschen mit Kunststoffdeckeln und Verbrauchsmaterialien, wie Pipettenspitzen, autoklaviert.

Zur Inkubation der Zellen wurden mit bidestilliertem Wasser Stammlösungen mit Konzentrationen von 100 mM Selenomethionin, 10 mM Natriumselenit bzw. 10 mM Phenylseleninsäure hergestellt und durch einen Spritzenfilter sterilfiltriert. Die Stammlösungen wurden bei 4 °C gelagert bzw. im Falle der Phenylseleninsäure immer frisch angesetzt. Aus den Stammlösungen wurden mit sterilem, bidestilliertem Wasser Verdünnungen hergestellt, von denen entsprechende Mengen in das Kulturmedium gegeben wurden.

4.2 Koloniebildungsfähigkeit

Während die Bestimmung der Zellzahl nach Inkubation der Zellen etwas über die akute Zytotoxizität aussagt, werden durch die Koloniebildungsfähigkeit die längerfristigen Effekte erfasst.

Dafür wurden 3,5 x 10^5 A549 oder HCT116 Zellen in Zellkulturschalen (60 mm) ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit der jeweiligen Verbindung inkubiert. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen abgelöst, mit einem automatischen Zellzählgerät (Casy) gezählt und mindestens 1:20 in Zellkulturmedium verdünnt. Es wurden dreimal 300 Zellen in Schalen (60 mm) weitergesetzt und für 7 bis 9 Tage zu mit bloßem Auge sichtbaren Kolonien wachsen gelassen. Danach wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Schalen mit 2 ml PBS versetzt und erneut abgesaugt. Die Zellen wurden mit 2 ml Ethanol (-20 °C) ca. 5 min fixiert und nach Absaugen des Ethanols mit Giemsa-Lösung (5 % in Wasser) für 30 min gefärbt. Die Färbelösung wurde abgegossen und die Schalen mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Kolonien wurden ausgezählt und auf Kontrollzellen bezogen als „% der Kontrolle“ angegeben.

4.3 Aufnahmeuntersuchung mittels AAS

Mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) wurde die intrazelluläre Selenkonzentration nach einer nassen, sauren Veraschung von Zellpellets bestimmt. Diese Methode beruht auf der Resonanzabsorption von Gasen im atomaren Zustand. Durch die Absorption von Strahlung einer für das Element charakteristischen Wellenlänge, gehen Elektronen in einen angeregten Zustand über. Als Strahlungsquelle diente in dieser Arbeit eine elektrodenlose Entladungslampe (EDL). Die Atomisierung fand in einem Graphitrohrofen statt.

Zellkultur und Aufarbeitung

Es wurden 1 x 10^6 A549 oder HCT116 Zellen in Zellkulturschalen (10 cm) ausgesät. Nach 24 h folgten 24 h Inkubation mit der jeweiligen Verbindung. Danach wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, mit 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen, in ein 15 ml-Röhrchen überführt und bei 4 °C und 314 g für 4 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml PBS II (4 °C) resuspendiert und die Zellzahl, sowie das mittlere Zellvolumen am Zellzählgerät (Casy) bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet mit 750 µl PBS II in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Röhrchen wurde mit weitern 750 µl PBS II gespült und die Fraktionen vereinigt. Anschließend wurde bei 1000 g und 4 °C für 4 min zentrifugiert und das Pellet bis zum Zellaufschluss bei -20 °C gelagert.

Für den Aufschluss der Zellen wurden die Pellets mit 500 µl eines 1:1-Gemisches aus 65 %iger HNO_3 und 30 %igem H_2O_2 versetzt und auf einem Thermoschüttler zunächst bei 65 °C für 30 min und dann bei 95 °C für 7-10 h verascht. Die Asche wurde in bidestilliertem Wasser aufgenommen. Die Lagerung der Probenlösung bis zur Messung erfolgte bei 4 °C.

AAS-Messung

Die Messungen wurden an einem Graphitrohrofen-Atomabsorptionsspektrometer (AAnalyst800, Perkin-Elmer) durchgeführt. Die Messung und die Signalauswertung erfolgten mithilfe der Software AA Winlab32. Es wurde über die Peakflächen quantifiziert. Das verwendete Temperaturprogramm ist in Tabelle 1 aufgeführt. Argon wurde als Schutzgas verwendet. Es wurde eine 5-Punkt-Kalibrierung im Bereich von 2–10 µg Se/l durch Verdünnung einer Selen-Atomspektroskopie-Standardlösung (c_{Se}=100 µg/l; Fluka) mit 0,14 N HNO_3 vorgenommen. Jeweils 20 µl der Probenlösungen wurden mit 5 µl Modifier-Lösung (0,005 mg Palladium, 0,003 mg Magnesium pro Messung) mittels AAS-Autosampler AS800 in das Graphitrohr pipettiert.

Tabelle 1: Temperaturprogramm

Schritt	**Temperatur [°C]**	**Anstiegszeit [s]**	**Haltezeit [s]**	**Gasfluss [ml/min]**
Trocknung der Probe	110	1	10	250
Trocknung der Probe	130	35	30	250
Pyrolyse	1200	10	30	250
Atomisierung	2000	0	3	0
Ausheizen	2450	1	3	250

Die Nachweisgrenze betrug 0,2 µg Selen/l, die Erfassungsgrenze 0,4 µg Selen/l und die Bestimmungsgrenze 0,6 µg Selen/l. Die Wiederfindung lag bei allen verwendeten Zelllinien im Mittel bei 74 % (Schneider, 2009).

4.4 Immunologischer Nachweis zellulärer Proteine

4.4.1 Western Blot

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung lassen sich Proteine auf eine Membran transferieren, mittels spezifischer Antikörper detektieren und über Chemilumineszenz densitometrisch quantifizieren.

Präparation der Proteinextrakte

Es wurden 1 x 10^6 A549 oder HCT116 Zellen in Zellkulturschalen (100 mm) ausgesät und nach 24 h mit der jeweiligen Verbindung inkubiert. Nach der Inkubationszeit (24 h oder 45 h) wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in PBS, versetzt mit 5 % FKS, aufgenommen und in einem 15 ml-Röhrchen bei 340 g und 4 °C für 4 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml PBS gewaschen, in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und bei 2500 g und 4 °C für 3 min zentrifugiert. Für die Lyse wurde das Pellet in 100 µl RIPA-Puffer aufgenommen und 15 min auf Eis geschüttelt. Nach einer Zentrifugation bei 16000 g und 4 °C für 20 min wurde der Proteinextrakt abgenommen.

Proteingehaltsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt. Diese photometrische Messung beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie bei der Komplexbildung mit Proteinen. Dazu wurden die Proteinextrakte mindestens 1:150 verdünnt, davon je 20 µl in eine 96-Lochplatte pipettiert und mit 180 µl verdünntem Bradford-Reagenz (Mastermix: Probenzahl x (40 µl + 140 µl dest. Wasser); Bio-Rad-Protein-Assay-Reagenz) versetzt. Zur Quantifizierung wurde jeweils eine Kalibrierung aus Rinderserumalbumin (BSA) mit den Konzentrationen 0, 10, 25, 50 und 75 µg/ml mitgeführt. Nach 5 min wurde die Absorption bei 595 nm am Mikrotiterplattenlesegerät (TECAN Spektra Fluor) gemessen.

Die Proben wurden mit Wasser, Ladepuffer (1:5) und DTT (1:20) (beides Fermentas) versetzt, sodass eine Endkonzentration von 3 µg Protein/µl resultierte. Es folgte eine 5 minütige Denaturierung bei 95 °C im Heizschüttler.

Elektrophorese und Western Blot

Es wurden Gele (8 x 10 cm) bestehend aus einem 12 %igen Trenn- und 4 %igen Sammelgel hergestellt. Die Elektrophoresekammer wurde mit zwei Gelen bestückt und mit Lämmli-Laufpuffer gefüllt. Es wurden pro Probe 45 µg Protein und in einer Tasche 3 µl eines Molekulargewichtsmarkers (Fermentas) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bis zum Übergang ins Trenngel bei 80 V (ca. 30 min), anschließend für ca. 2 h bei 100 V.

Nach Abbruch der Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel in Transferpuffer equilibriert. Die PVDF-Membran wurde auf Größe des Trenngels zugeschnitten und 10 s in Methanol, 5 min in destilliertem Wasser und 20 min in Transferpuffer geschwenkt. Zugeschnittenes Whatman-Papier (6 Stück je Gel) wurde in Transferpuffer getränkt.

Für den Transfer wurden Stapel aus drei Whatman-Papieren, der Membran, dem Gel und erneut drei Whatman-Papieren in eine Semidry-Blot-Apparatur eingebracht. Die Proteine wurden für 1 h bei 1,2 mA pro cm^2 auf die Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran mit PBS gespült und 1 h in Blockierlösung gegeben.

Detektion

Der jeweilige primäre Antikörper wurden in Blockierlösung verdünnt (von 1:500 bis 1:5000; siehe Anhang 8.3) und mit der Membran in Kunststofffolie eingeschweißt. Es folgte eine Inkubation über Nacht unter Drehbewegung im Kühlschrank. Die Membran wurde dreimal 5 min in PBS-T (PBS mit 0,05 % Tween 20) gewaschen und 1 h mit dem jeweiligen sekundären Antikörper (1:2500 verdünnt in Blockierlösung) inkubiert. Dazu wurde die Membran erneut eingeschweißt und bei Raumtemperatur auf einem Rotator gedreht. Danach wurde die Membran wiederum dreimal 5 min in PBS-T gewaschen und einmal 2 min in PBS gespült. Die Membran wurde 1 min mit etwa 750 µl des ECL-Detektionsreagenz inkubiert. Im Geldokumentationsgerät (LAS 3000; Bildauswertesoftware: Aida, Raytest) wurde die Chemilumineszenz gemessen. Die Messung beruht auf der Oxidation von Luminol durch eine Meerrettich-Peroxidase, die an den sekundären Antikörper gekoppelt ist. Das Substrat wird somit in einen angeregten Zustand überführt, und beim Rückfall in den Grundzustand wird die Lumineszenz emittiert.

Phosphorylierung von p53

Zur Detektion von bestimmten Phosphorylierungen an p53 wurde das Protokoll abgewandelt. Anstelle von PBS bzw. PBS-T wurde jeweils TBS bzw. TBS-T (TBS mit 0,1 % Tween-20) verwendet. Zudem wurde ECL Advance-Detektionsreagenz verwendet, welches eine sensitivere Detektion ermöglicht. Mit diesem wurde die Membran vor der Messung 5

min inkubiert. Als Positivkontrolle wurden 0,5 µM Doxorubicin (24 h Inkubation) mitgeführt (Thompson, 2004).

4.4.2 Konformationsspezifische Immunopräzipitation von p53

Die Wildtyp-Konformation von p53 wird durch ein Zinkion in der DNA-Bindungsdomäne stabilisiert. Durch Zink-Freisetzung entsteht eine entfaltete, inaktive Konformation. Diese Konformationen können mittels spezifischer Antikörper in einer Immunopräzipitation (IP) getrennt werden (Méplan et al., 1999).

Es wurden je 5 x 10^6 A549 Zellen pro Zellkulturschale (150 mm) ausgesät. Nach 48 h wurde das Medium abgesaugt und zweimal mit je 10 ml kaltem PBS gewaschen. Dieser und die folgenden Schritte wurden auf Eis, im Kühlschrank oder in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge durchgeführt. 500 µl IP-Puffer wurden auf die Zellen gegeben, diese mit dem Zellschaber geerntet und in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Die Schale wurde mit weiteren 500 µl IP-Puffer gespült, sodass pro Schale etwa 1 ml Zellextrakt erhalten wurden. Es folgte eine 30 minütige Lyse auf dem Rotor. Im Anschluss folgte die Inkubation mit der jeweiligen Verbindung und Konzentration für 8 min bei 37 °C. Die Proben wurden 5 min bei 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur Vorklärung mit einem unspezifischen Antikörper (normal mouse antigen, 1 µg pro Probe) und 20 µl Protein A/G-Suspension versetzt. Nach 45 min Inkubation unter Drehbewegung wurden die Proben 2 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzt (siehe Abschnitt 4.4.1). Von jeder Probe wurden zwei Aliquots mit der gleichen Proteinmenge (zwischen 2000-3000 µg; innerhalb eines Versuchs für alle Proben die gleiche Proteinmenge) abgenommen und mit IP-Puffer auf gleiches Volumen gebracht. Für die Immunopräzipitation wurde nun jeweils ein Aliquot mit 1 µg des Antikörpers spezifisch für die Wildtyp-Konformation (PAb 1620) bzw. für die entfaltete Konformation (PAb 240) versetzt. Zusätzlich wurden je 15 µl Protein A/G-Suspension hinzugefügt und die Proben über Nacht auf dem Rotor inkubiert. Das Präzipitat wurde durch eine 2 minütige Zentrifugation bei 10000 g separiert und zweimal mit je 500 µl IP-Puffer und einmal mit PBS gewaschen. Das Volumen des Präzipitats wurde bestimmt und entsprechend mit Lämmli-Ladepuffer (vierfach konzentriert) versetzt, bei 95 °C 10 min denaturiert und vollständig für die Gelelektrophorese (3 h, 300 V) eingesetzt. Es wurden große Gele (16 x 18 cm) und etwa 4 l Laufpuffer verwendet. Die weitern Schritte wurden analog zum Western Blot durchgeführt (siehe Abschnitt 4.4.1). Zur Detektion auf der Membran wurde ein polyklonaler, gegen p53 gerichteter Antikörper (NCL-P53-CM1), der im Kaninchen erzeugt

wurde, verwendet. Die Verwendung eines monoklonalen, in der Maus generierten p53-Antikörpers würde die Detektion der p53-Bande stören, da der sekundäre gegen Mausproteine gerichtete Antikörper zudem die schwere Kette der spezifischen, zur Immunopräzipitation eingesetzten Antikörper erkennen würde.

4.5 Genexpression

Zur Bestimmung der Expression von Genen wurde die real time Reverse Transkriptase-PCR (real time RT-PCR) verwendet. Dazu wurde die RNA aus Kontrollzellen und inkubierten Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels spezifischer Primer wurde die relative Expression von Genen in Bezug auf das Haushaltsgen *Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase* (*GAPDH*) bestimmt. Zur Quantifizierung wurde der interkalierende DNA-Farbstoff SYBR® Green eingesetzt. Da dieser Farbstoff unspezifisch doppelsträngige DNA detektiert, folgte nach jeder PCR eine Schmelzkurvenanalyse des Amplifikats.

Zellkultur

Es wurden 1 x 10^6 HCT116 Zellen in Zellkulturschalen (100 mm) ausgesät und nach 24 h mit der jeweiligen Verbindung inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in PBS, versetzt mit 5 % FKS, aufgenommen und bis zu 5 x 10^6Zellen in einem 15 ml-Röhrchen bei 340 g und 4 °C für 4 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml PBS gewaschen, in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und bei 850 g und 4 °C für 3 min zentrifugiert. Die Pellets wurden bei – 20 °C gelagert.

RNA-Isolierung und -Quantifizierung

Zur RNA-Isolierung wurde nach Anleitung des MN Nucleo Spin II-Kits durchgeführt. Die Durchführung erfolgte bei Raumtemperatur. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde die Säule in einem neuen Reaktionsgefäß positioniert. Die Pellets wurden mit je 100 µl PBS resuspendiert und zur Zelllyse mit 350 µl RA1-Puffer und 3,5 µl Mercaptoethanol versetzt und gründlich auf dem Vibrationsmischer gemischt. Durch fünfmaliges Aufziehen der Proben durch ein 0,4 mm Kanüle wurden die Proben durch Scherung verflüssigt. Nach Zugabe von 350 µl Ethanol (70 %) wurde wiederum gut gemischt, die Probe auf die Säule gegeben und 30 s bei 7700 g zentrifugiert. Die Säule wurde mit 350 µl Membrane-desalting-buffer (MDB) gewaschen. Nach 1 min Zentrifugation bei 11500 g fand ein DNA-Verdau statt. Dazu wurde die Säule mit 95 µl DNase-Lösung (1:10 mit DNase Reaktionspuffer verdünnt) 15 min inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl RA2-Puffer wurde 30 s bei 7700 g zentrifugiert. Es folgte ein Waschschritt mit 600 µl RA3-Puffer und eine Zentrifugation für 30 s bei 7700 g. Nach Zugabe von 250 µl RA2-Puffer wurde für 2 min bei 16000 g zentrifugiert. Zur Elution der RNA

in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurde die Säule zweimal mit je 50 µl RNase-freiem Wasser versetzt und für je 1 min bei 16000 g zentrifugiert. Die RNA wurde bei – 80 °C gelagert.
Die Quantifizierung der RNA erfolgte durch Messung der Absorption der unverdünnten Probe bei 260 nm am NanoDrop-Spektralphotometer.
Die Integrität der RNA nach Isolierung mittels des MN Nucleo Spin II-Kitsystems wurde über eine denaturierende RNA-Elektrophorese geprüft. Die Durchführung erfolgte nach Thuy (2006).

cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde nach Anleitung des qScript™ cDNA Synthesis Kits durchgeführt. Es wurden 1 µg RNA jeder Probe mit RNase-freiem Wasser auf 15 µl ergänzt und mit 5 µl eines Mastermixes aus Reaktionspuffer und Enzym ((4 µl + 1 µl) x Probenzahl) versetzt. Die Reverse Transkription erfolgte im Thermocycler iCycler (BioRad) nach dem in Tabelle 2 aufgeführten Temperaturprogramm.

Tabelle 2: Temperaturprogramm der cDNA-Synthese

Schritt	**Temperatur**	**Zeit**
Annealing der random Primer	25 °C	5 min
Reverse Transkription	42 °C	30 min
Inaktivierung des Enzyms	85 °C	5 min
Ende	4 °C	hold

Real time RT-PCR

Das Reaktionsvolumen der PCR-Ansätze betrug jeweils 25 µl. Zur Detektion wurde der B-R SYBR® Green SuperMix for iQ™ (Quanta) verwendet, der zweifach konzentriert ist. Zunächst wurde pro Primersystem ein Mastermix aus SYBR® Green, beiden Primern und Wasser (ad 15 µl) hergestellt. Zudem wurde die DNA 1: 10 mit Wasser verdünnt und jeweils 10 µl pro Reaktion eingesetzt. Nachfolgend ist ein beispielhaftes Pipettierschema für das GAPDH-Primersystem dargestellt:

	Pipettiervolumen	Ausgangskonz.	Endkonz.
SYBR® Green SuperMix	12,5 µl x Probenzahl	2fach	1fach
Primer (je forward/revers)	0,5 µl x Probenzahl	10 pmol/µl	0,2 µM
Wasser (ad 25 µl)	1,5 µl x Probenzahl		
cDNA	1 µl x Probenzahl		
Wasser (ad 10 µl)	9 µl x Probenzahl		

In PCR-Reaktionsgefäßen wurde zunächst der SYBR® Green-Primer-Mastermix vorgelegt, die verdünnte DNA dazugegeben und der Ansatz herunterzentrifugiert. Die real time RT-PCR wurde im Thermocycler iCycler (BioRad) mit dem in Tabelle 3 aufgeführten Temperaturprogramm durchgeführt.

Tabelle 3: Temperaturprogramm der real time RT-PCR

Schritt (Zyklenzahl)	**Prozess**	**Temperatur [°C]**	**Zeit [min:s]**
1 (1x)	Enzymaktivierung	95,0	1:30
2 (40x)	Denaturierung	95,0	0:30
	Annealing	60,0	1:00
	Elongation	72,0	0:15
3 (1x)	Denaturierung	95,0	1:00
4 (1x)	Bildung doppelsträngiger Produkte	60,0	1:00
5 (70x)	Schmelzkurve	60,0 (steigender Gradient um je 0,5 °C)	0:10
6 (1x)	Ende	4,0	hold

Zur Quantifizierung werden die sogenannten threshold cycle (Ct)-Werte heranzogen, die angeben, bei welcher Zyklenzahl das Signal aus dem Untergrund in eine exponentielle Phase übergeht. Es handelt sich um eine relative Quantifizierung, da die Ct-Werte der betrachteten Gene in Bezug zu den Ct-Werten des Haushaltsgens GAPDH gesetzt werden. Zudem fließt die Effizienz (E) der Amplifikationsreaktion mit in die Bestimmung der relativen Expression (R) ein:

$$R = \frac{(E_{Gen})^{(Ct_{Kontrolle,GenX} - Ct_{Behandlet,GenX})}}{(E_{GAPDH})^{(Ct_{Kontrolle,GAPDH} - Ct_{Behandlet,GAPDH})}}$$

Die Effizienzen der einzelnen Primersysteme, die nach der Vermessung von Verdünnungsreihen von der Software berechnet wurden, sind im Anhang (8.7) aufgeführt.

Design von Primern und Optimierung der PCR-Bedingungen

Es wurde ein PCR-System zur Bestimmung der Genexpression von *Bax* etabliert. Dazu wurde zunächst mithilfe NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov/) die Gensequenz ermittelt (Anhang 8.8). Mittels der Software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) wurden innerhalb dieser Sequenz Primer der Länge von etwa 20 Nukleotiden und einer Schmelztemperatur von etwa 60 °C generiert. Es

wurde darauf geachtet, dass die Primer nicht in anderen Bereichen des menschlichen Genoms fehlpaaren oder Primerdimere bilden. Das Amplifikat sollte etwa 100 bp lang sein. In diesem Fall waren beide Primer 20-mere, die zu einem Amplifizierungsprodukt von 99 bp führen.

Die Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) lyophilisiert geliefert und in TE-Puffer (Gibco) aufgenommen (Stammlösung: 100 pmol/µl). Weitere Verdünnungen wurden mit Wasser (NucleoSpin RNA II Kit) vorgenommen (Arbeitslösung: 10 pmol/µl). Zunächst wurde die Primer-Annealing-Temperatur optimiert. Dazu wurde die PCR bei fünf Temperaturen zwischen 55,5 und 60 °C durchgeführt. Da sich keine Unterschiede in der Effizienz der Reaktion zeigten, wurde analog zu den bereits etablierten Primersystemen eine Temperatur von 60 °C ausgewählt. Zudem wurde die optimale Primerkonzentration bestimmt, indem die Effizienzen bei Konzentrationen zwischen 0,2 und 0,8 µM verglichen wurden. Eine Konzentration von 0,5 µM erwies sich als optimal. Zu dieser Konzentration wurde die Effizienz anhand einer Verdünnungsreihe (acht Konzentrationen in Dreifachbestimmung) ermittelt.

4.6 Alkalische Entwindung

DNA-Strangbrüche lassen sich mittels alkalischer Entwindung quantifizieren. Durch den Zusatz der Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg) können zu dem auch oxidative Basenmodifikationen und Läsionen, wie z. B. 8-Oxoguanin, imidazolringoffene Purine und abasische Stellen, bestimmt werden. Das bakterielle Reparaturenzym setzt bei Läsionen, die zu seinem Substratspektrum gehören, einen Strangbruch. Nach Lyse der Zellen führt eine hochkonzentrierte Salzlösung zur Trennung der Histone von der DNA. Diese wird dadurch zugänglicher für die Fpg. Im Bereich von DNA-Strangbrüchen entwindet sich die doppelsträngige DNA im alkalischen Milieu (pH 12,3). Nach Sonifikation entstandene einzelsträngige DNA wird durch eine Hydroxylapatit-Chromatographie von doppelsträngiger DNA getrennt. Die Fraktionen werden mit einem DNA-Farbstoff gefärbt und die Fluoreszenzsignale gemessen. Aus dem Verhältnis der einzelsträngigen zur doppelsträngigen DNA lässt sich die Anzahl an DNA-Schäden berechnen (Hartwig et al., 1996; zusammengefasst in Hartwig, 1998).

Alkalische Entwindung

Zur Vermeidung zusätzlicher oxidativer DNA-Schäden wurde der Versuch in abgedunkelten Räumen durchgeführt. Es wurden je 4 x 10^4 Zellen in 30 Zellkulturschalen ausgesät. 24 h nach dem Ansetzen wurden die Zellen für 45 h in Dreifachbestimmung mit der jeweiligen Verbindung inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden das Zellkulturmedium

entfernt, die Schalen mit 2 ml PBS versetzt und auf Eis gestellt. Das PBS wurde abgesaugt und die Schalen 5 min mit Lyse-Puffer versetzt. Nach Absaugen wurde für 2 min mit Salzlösung inkubiert und 8 min nachinkubiert. Es folgte eine 30 minütige Inkubation von je drei von sechs Schalen einer Konzentration mit Fpg-Protein (1:1000 Verdünnung eines Fpg-haltigen Zellextrakts in Fpg-Puffer) bzw. dem enzymfreien Puffer bei 37 °C. Im Anschluss wurden die Schalen in 1 minütigem Abstand mit alkalischer Lösung versetzt. Jede Schale wurde nach Ablauf einer 30 min Inkubation mit 0,1 N Salzsäure auf pH 6,80 +/- 0,02 neutralisiert. Das benötigte Volumen an Salzsäure wurde dazu mithilfe eines pH-Meters vor dem Versuch bestimmt. Die Proben wurden gut gemischt, in Glasröhrchen überführt, 15 s bei 30 Watt auf Eis sonifiziert, mit 15 µl einer 10 %igen SDS-Lösung versetzt und wiederum gemischt. Bis zur Chromatographie wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Hydroxylapatit-Chromatographie

Für die Hydroxylapatit-Chromatographie wurden die verwendeten Puffer, Proben und Säulen auf 60 °C temperiert. Zur Präparation der Chromatographie-Säulen wurde Hydroxylapatit in 0,01 M Natriumphosphatpuffer (1 g/ml) 30 min quellen gelassen. 2 ml-Spritzen wurden mit Glasfaserfiltern, 1 ml Hydroxylapatit-Suspension und einem weiteren Glasfaserfilter bestückt. Die Säulen wurden mit 1,5 ml 0,5 M Kaliumphosphatpuffer stringent gewaschen und mit 1,5 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer vorkonditioniert. Die Proben wurden auf die Säulen gegeben und nicht-bindende Bestandteile mit 2,5 ml 0,01 M Natriumphosphatpuffer entfernt. Danach wurde die einzelsträngige DNA mit 1,5 ml 0,15 M Kaliumphosphatpuffer in 24-Loch-Platten eluiert. Mit 1,5 ml 0,35 M Kaliumphosphatpuffer wurde im nächsten Schritt ebenso die doppelsträngige DNA eluiert. Auf jeder Platte wurde ein Puffer-Blindwert mitgeführt. Die Säulen wurden für je drei Durchläufe verwendet.
Zur Detektion wurden die Proben mit 4,25 µl Höchst-Farbstoff 33258 (4,1 mg/25ml; Endkonzentration 7,5 x 10^{-7} M) versetzt. Nach 30 min Inkubation im Dunklen wurde die Fluoreszenz bei einer Emission von 455 nm (Anregung bei 360 nm) im Mikrotiterplattenlesegerät (TECAN Spektra Fluor) gemessen.

Berechnung der DNA-Läsionen

Die Anzahl der DNA-Läsionen wurde nach Hartwig et al. (1996) berechnet. Zunächst wurde dafür der Anteil doppelsträngiger DNA (ds DNA) bestimmt:

$$\text{ds DNA} = \frac{\text{relative Fluoreszenz (Doppelstrang)}}{\text{relative Fluoreszenz (Doppelstrang)} + 2{,}1 \times \text{relative Fluoreszenz (Einzelstrang)}}$$

Der Korrekturfaktor 2,1 gleicht die unterschiedliche Affinität des Höchstfarbstoffes zu einzelsträngiger bzw. doppelsträngiger DNA aus (Hartwig et al., 1993).
Zur Berechnung der DNA-Strangbrüche pro Zelle wurden die Proben ohne Fpg-Inkubation auf die Kontrollen ohne Fpg-Inkubation bezogen. Analog dazu wurden die Fpg-sensitiven Stellen pro Zelle berechnet, indem die Proben mit Fpg-Inkubation auf die Mittelwerte der Proben ohne Fpg-Inkubation bezogen wurden. Der Korrekturfaktor 16666 ergibt sich aus der Kalibrierung nach DNA-Schädigung mit Röntgenstrahlung (Hartwig et al., 1996).

$$\text{Anzahl der DNA-Strangbrüche/Zelle} = -\ln \frac{\text{ds DNA (Probe ohne Fpg)}}{\text{ds DNA (Mittelwert der Kontrollen ohne Fpg)}} \times 16666$$

Zur Umrechnung von DNA-Läsionen pro Zelle auf die Anzahl von Schäden pro 10^6 Basenpaare wurde durch 6000 dividiert.

$$\text{Anzahl der DNA-Läsionen/}10^6\text{ Basenpaare} = \frac{\text{Anzahl der DNA-Läsionen/Zelle}}{6000}$$

4.7 Zellzyklusuntersuchungen mittels Durchflusszytometer

Mittels Durchflusszytometrie lassen sich Zellen in Abhängigkeit von ihrer Größe, Gestalt, Granularität und spezifischen Markierungen unterscheiden und zählen. Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung wird die DNA der Zellen mit dem Farbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), der an AT-reiche Regionen der DNA bindet, gefärbt. Da der DNA-Gehalt der Zellen während des Zellzyklus durch Replikation während der S-Phase zunimmt, können die Zellen der G1-, S- und G2-Phase unterschieden werden. Zudem lässt sich über den sogenannten SubG1-Peak die Induktion von Apoptose bestimmen. In der späten Phase der Apoptose wird die DNA fragmentiert und in sogenannten apoptotischen Körperchen verpackt. Es entstehen demnach Partikel mit geringerem DNA-Gehalt, die im Histogramm vor dem G1-Peak auftreten. Da nekrotische Zellen ihre DNA nicht in membranumschlossenen Partikeln abgeben, erfordert dieses Testsystem keine Nekrose-Gegenfärbung (Frederich et al., 2003; Erhart et al., 2005; Wu et al., 2008).

Es wurden 3 x 10^5 Zellen in Zellkulturschalen (60 mm) ausgesät und nach 24 h mit der jeweiligen Verbindung inkubiert. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in PBS, versetzt mit 5 % FKS, aufgenommen und in einem 15 ml-Röhrchen bei 340 g und 4 °C für 4 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und auf dem Vibrationsmischer langsam mit 3 ml Ethanol (4 °C) versetzt. Die

Proben wurden mindestens über Nacht bei – 20 °C gelagert. Vor der Vermessung am Durchflusszytometer wurden die Proben erneut zentrifugiert (siehe oben) und das Pellet in 1 ml DAPI-Färbelösung (CyStainDNA, Partec) resuspendiert. Nach 4 h bei 4 °C erfolgte die Messung. Dazu wurden die Proben in spezielle Messröhrchen pipettiert und diese im Probenhalter des Durchflusszytometers positioniert. Nach Anregung des Farbstoffes durch eine UV-Lampe wurde die Fluoreszenz (435-475 nm) auf Einzelzellebene gemessen und so Histogramme aus Zellen unterschiedlichen DNA-Gehaltes erstellt. Die Messung sowie die Auswertung der Zellzyklusverteilung bzw. des subG1-Peaks erfolgten mit der Software FloMax (Partec).
Zur Bestimmung des SubG1-Peaks wurde in Abweichung dazu das Zellkulturmedium mit bereits abgelösten toten Zellen mit den abtrypsinierten Zellen vereinigt und für die Messung am Durchflusszytometer herangezogen.

4.8 Kernlokalisation von AIF

Während der Apoptose wird AIF (apoptosis inducing factor) aus den Mitochondrien freigesetzt, welches im Zellkern akkumuliert und dort Chromatin-Kondensation sowie DNA-Fragmentierung einleitet. Der Nachweis von AIF erfolgte mittels Immunofluoreszenz-mikroskopie. Mithilfe eines spezifischen Antikörpers gegen AIF und einem fluoreszenzgekoppelten, sekundären Antikörper wurde das Fluoreszenzsignal im Zellkern bestimmt. Als Schablone wurde dazu der Zellkern mit dem DNA-Farbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt.

Deckgläschen (12 mm) wurden in Diethylether 5 min entfettet, 10 min mit Alcian-Blue (1 mg/ml in Ethanol) gefärbt, mit 70 %igem Ethanol und zweimal mit destilliertem Wasser gespült, poliert und autoklaviert. Auf die beschichten Deckgläschen wurden in 6-Loch-Platten je Kavität 2,5 x 10^5 HCT116 Zellen in 2 ml Kulturmedium ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit der jeweiligen Verbindung für die entsprechende Zeit inkubiert. Als Positivsubstanz wurde Staurosporin mitgeführt (800 nM, 16 h).
Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte die Fixierung der Zellen auf den Deckgläschen. Dazu wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Deckgläschen in PBS II (4 °C) gespült und 10 min in Methanol (-20 °C) auf Eis fixiert. Anschließend wurden für 1 h je 50 µl Blockierlösung (5 % FKS in PBS II) auf die Deckgläschen gegeben. Die 1 h Inkubation mit dem primären Antikörper (Anti-AIF H300; 1:50 verdünnt in Blockeierlösung; 50 µl pro Deckgläschen) fand bei 37 °C statt. Es folgten drei Waschschritte mit je 50 µl Blockierlösung und die 1 h Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen, H+L, Rhodamin; 1:400 verdünnt

in Blockierlösung) bei 37 °C. Es wurde wiederum dreimal gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit Vectashield Mounting Medium (DAPI) auf Objektträgern eingedeckt.
Am Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.M1, Carl Zeiss) wurden mit 63facher Vergrößerung im DAPI- und Rhodamin-Kanal pro Objekt ca. 20 Bilder aufgenommen. Die Software AxioVision unterstütze dabei sowohl die Bildaufnahme als auch die quantitative Auswertung der Signale.

4.9 Aktivität der Effektor-Caspasen 3/7

Die Effektor-Caspasen 3 und 7 stellen Schlüsselfaktoren im Ablauf der Apoptose dar, da sie proapoptotische Proteine, wie Nukleasen, aktivieren und antiapoptotische Enzyme inaktivieren oder Strukturproteine abbauen. Zum Nachweis der Enzymaktivität wurde der „Caspase-Glo® 3/7 Assay“ (Promega) verwendet. Durch Reagenzzugabe werden die Zellen lysiert und die Caspasen freigesetzt. Das Reagenz enthält ein Caspase 3/7-Substrat und eine Luciferase. Nach Abspaltung eines Tetrapeptids vom Substrat durch die Caspasen setzt die Luciferase das Produkt um, und es entsteht ein quantifizierbares Lumineszenz-Signal.

In einer nicht-transparenten 96-Lochplatte (Brand) wurden pro Kavität 1 x 10^4 Zellen in 100 µl Kulturmedium ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit der jeweiligen Verbindung für bis zu 4,5 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurde 1 µM Staurosporin (3 - 4,5 h) mitgeführt. Im Anschluss an die Inkubation wurde das Volumen des Mediums bestimmt und die äquivalente Menge an Caspase-Glo® 3/7-Reagenz dazugegeben und 30 s im Mikrotiterplattenlesegerät (infinite M200, Tecan) geschüttelt (Amplitude 1 mm, linear). Die Messung erfolgte nach 60 min im gleichen Gerät mit der Software Tecan i-Control (Integration time: 1000 ms).

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Zytotoxizität der Selenverbindungen

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde sowohl die Zellzahl als auch die Koloniebildungsfähigkeit ermittelt. Dabei ist die Zellzahl ein Maß für die akute Toxizität einer Substanz, während die Koloniebildungsfähigkeit längerfristige Effekte, die z. B. auch eine starke Wachstumshemmung beinhalten, erfasst. Durch die Verwendung von p53-profizienten HCT116 Zellen sowie der isogenen p53-Knock-out-Zelllinie konnte die p53-Abhängigkeit der Effekte ermittelt werden. Zelltypspezifische Unterschiede wurden durch den Vergleich der HCT116 Kolonkarzinomzellen mit A549 Lungenadenokarzinomzellen, die ebenfalls Wildtyp-p53 exprimieren, bestimmt.

5.1.1 Zytotoxizität in HCT116 Zellen

Die p53-profizienten HCT116 Zellen reagierten sehr viel sensitiver auf Natriumselenit als die p53-defiziente Zelllinie (Abbildung 10). Bei den p53-defizienten Zellen zeigten sich zytotoxische Effekte auf die Zellzahl und die Koloniebildungsfähigkeit erst bei der vergleichsweise hohen Konzentration von 8 µM Natriumselenit. Dagegen hatten bereits 3 µM Natriumselenit in der p53-profizienten Zelllinie eine zytotoxische Wirkung. Ab dieser Konzentration unterschieden sich sowohl die Zellzahl als auch die Koloniebildungsfähigkeit signifikant zwischen den beiden Zelllinien. Z.B. lag die Koloniebildungsfähigkeit bei 3 µM Natriumselenit in den p53-profizienten Zellen im Mittel nur noch bei 61 % der Kontrolle, während sie in den p53-defizienten Zellen 103 % betrug.
Králová et al. (2009) zeigten kürzlich im gleichen Zellsystem, dass p53 die Zellen gegenüber Selenit sensibilisiert. Dafür verwendeten sie Proliferationstests, wie die Messung von DNA-Synthese (BrdU-ELISA), des Gesamtproteingehaltes (Coomassie Brillant Blue Assay) oder der Integrität der Atmungskette (WST-1; water soluble tetrazolium). Die beiden erstgenannten Methoden lieferten vergleichbare Ergebnisse zu der hier angewendeten Koloniebildungsfähigkeit, während das WST-1-Testsystem vergleichsweise unsensitiv war und die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien relativ gering ausfielen. Generell liefern verschiedene Zytotoxizitätstests differierende Ergebnisse (Schröterová et al., 2009), sodass die Wahl eines guten Testsystems entscheidend ist. Empfohlen werden Tests, die das „clonal survival“ betrachten (Komissarova et al., 2005). Die Koloniebildungsfähigkeit ist somit die Methode der Wahl.

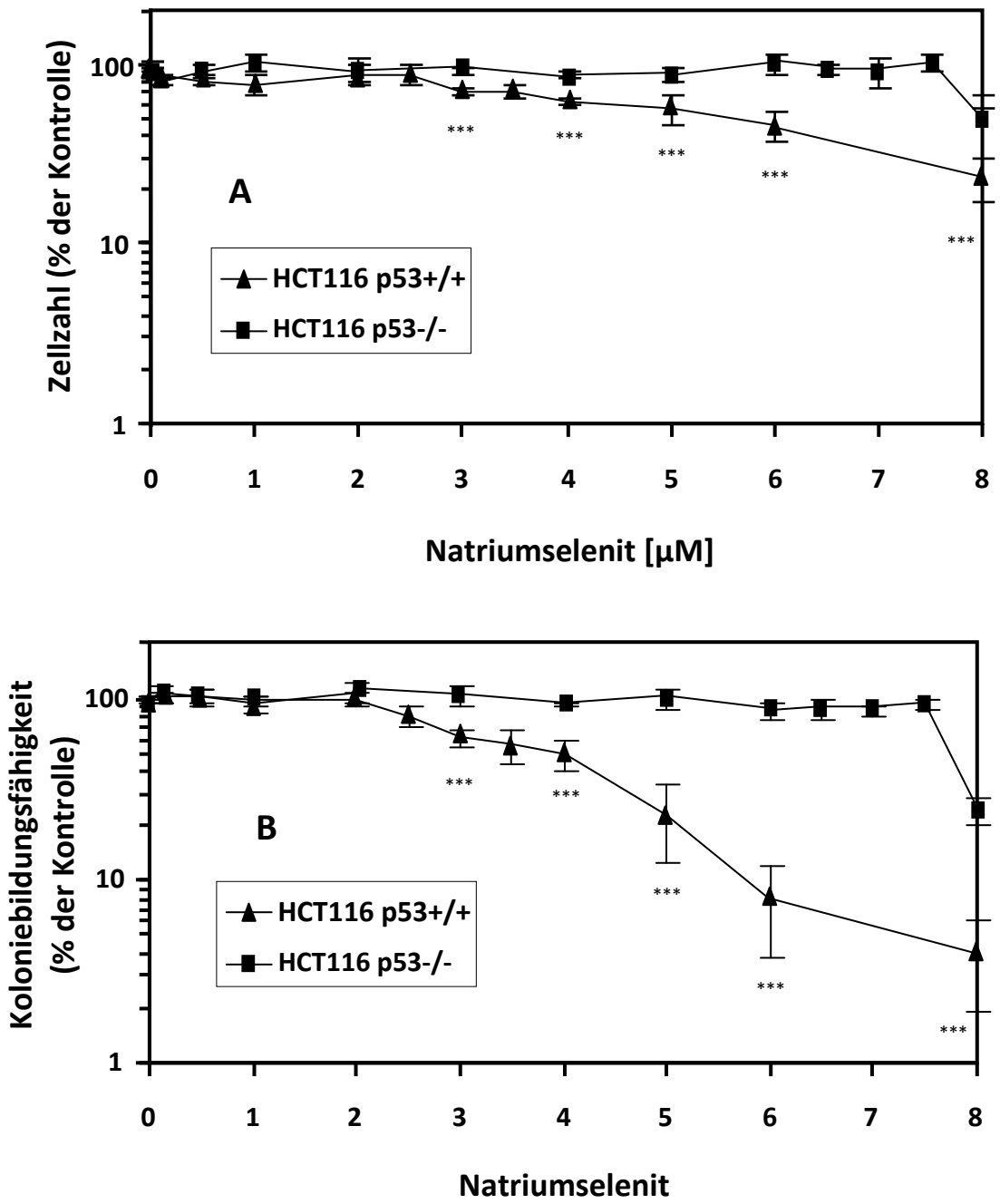


Abbildung 10: p53-abhängige Zytotoxizität von Natriumselenit. P53-profiziente und p53-defiziente HCT116 Zellen wurden 24 h mit Natriumselenit inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte der Zellzahl (A) und der Koloniebildungsfähigkeit (B) aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen ± SD. Signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien: *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001 (Student' scher t-Test).

Im Vergleich dazu war die Zytotoxizität von Selenomethionin unabhängig vom p53-Status der Zellen (Abbildung 11). In beiden Zelllinien setzte die zytotoxische Wirkung bei 250 µM Selenomethionin ein (Zellzahl: 65 % der Kontrolle; Koloniebildungsfähigkeit: 75 % der Kontrolle). Auch Goel et al. (2006) fanden im gleichen Zellmodell mittels MTT-Test nach 24 h keinen Einfluss des p53-Status auf die Zytotoxizität. Allerdings zeigte sich dort, dass p53 die

Zellen nach längeren Inkubationszeiten gegenüber Selenomethionin sensibilisierte (z. B. 100 µM nach 72 h).

Natriumselenit ist sehr viel zytotoxischer als Selenomethionin. Nur in einer Studie wurden für Selenomethionin und Natriumselenit in verschiedenen Darmkrebszelllinien mittels MTT-Test eine vergleichbare Zytotoxizität gefunden: In HT29 und SW 480 Zellen waren beide Verbindungen bereits ab 1 µM zytotoxisch und in SW 620 Zellen jeweils ab 16 µM (Schröterová et al., 2009). Ein deutlicher Unterschied in der Zytotoxizität der beiden Selenverbindungen ist jedoch sehr viel plausibler. Zum einen weist das reduzierbare Natriumselenit direkte prooxidative Eigenschaften auf. Zum anderen spielen auch die Unterschiede im Metabolismus eine Rolle (vgl. Abschnitt 2.1.2). Selenomethionin wird zunächst vorwiegend unspezifisch anstelle von Methionin in zelluläre Proteine eingebaut und steht dem Metabolismus nicht unmittelbar zur Verfügung. Besonders deutlich wird das Ausmaß der Fähigkeit von Zellen Selenomethionin zu akkumulieren bei der Bestimmung der intrazellulären Selenkonzentration mittels AAS nach Inkubation der Zellen (siehe Abschnitt 5.2). Der Selenomethionin-Metabolismus bei moderater Selenomethionin-Zufuhr ist abhängig vom Methionin-Metabolismus und erst bei einer Überladung mit Selenomethionin kommt es zu einer verstärkten Verstoffwechselung. Dabei entstehen auf enzymatischem Wege die beiden Metabolite Hydrogenselenid und Monomethylselenid. Diese können durch Reaktionen mit Sauerstoff ROS induzieren bzw. durch Depletion von Glutathion zu oxidativen Stress führen (siehe Abschnitt 2.1.2). Im Vergleich dazu wird Natriumselenit unmittelbar zu diesen beiden Metaboliten umgesetzt. Dies ist zudem ein reduktiver Prozess, der Glutathion- und NADPH-abhängig ist und somit bereits antioxidative Kapazitäten der Zelle nutzt.

Die Zytotoxizität von Phenylseleninsäure war ebenfalls p53-unabhängig (Abbildung 12) und lag hinsichtlich der Konzentration zwischen den beiden oben genannten Selenverbindungen. Ebenso liegt die Oxidationsstufe des Selenatoms in der Phenylseleninsäure mit +II zwischen denen von Natriumselenit (+IV) und Selenomethionin (-II).

Für die reduzierbare Phenylseleninsäure wird ähnlich wie Natriumselenit ein reduktiver Metabolismus angenommen. Es kann an dieser Stelle nicht geklärt werden, weshalb die Zytotoxizität von Phenylseleninsäure im Vergleich zu Natriumselenit unabhängig vom p53-Status der Zellen ist, da nur wenig über diese Selenverbindung in zellulären Systemen bekannt ist. Auffallend ist, dass die Zellzahl im Vergleich zur Koloniebildungsfähigkeit deutlich schneller sinkt. So beginnt der zytotoxische Bereich, wenn man die Zellzahl heranzieht, bereits bei einer Konzentration von 30 µM Phenylseleninsäure (etwa 60 % der Kontrolle), während vergleichbare Effekte auf die Koloniebildungsfähigkeit erst ab 75 µM auftreten.

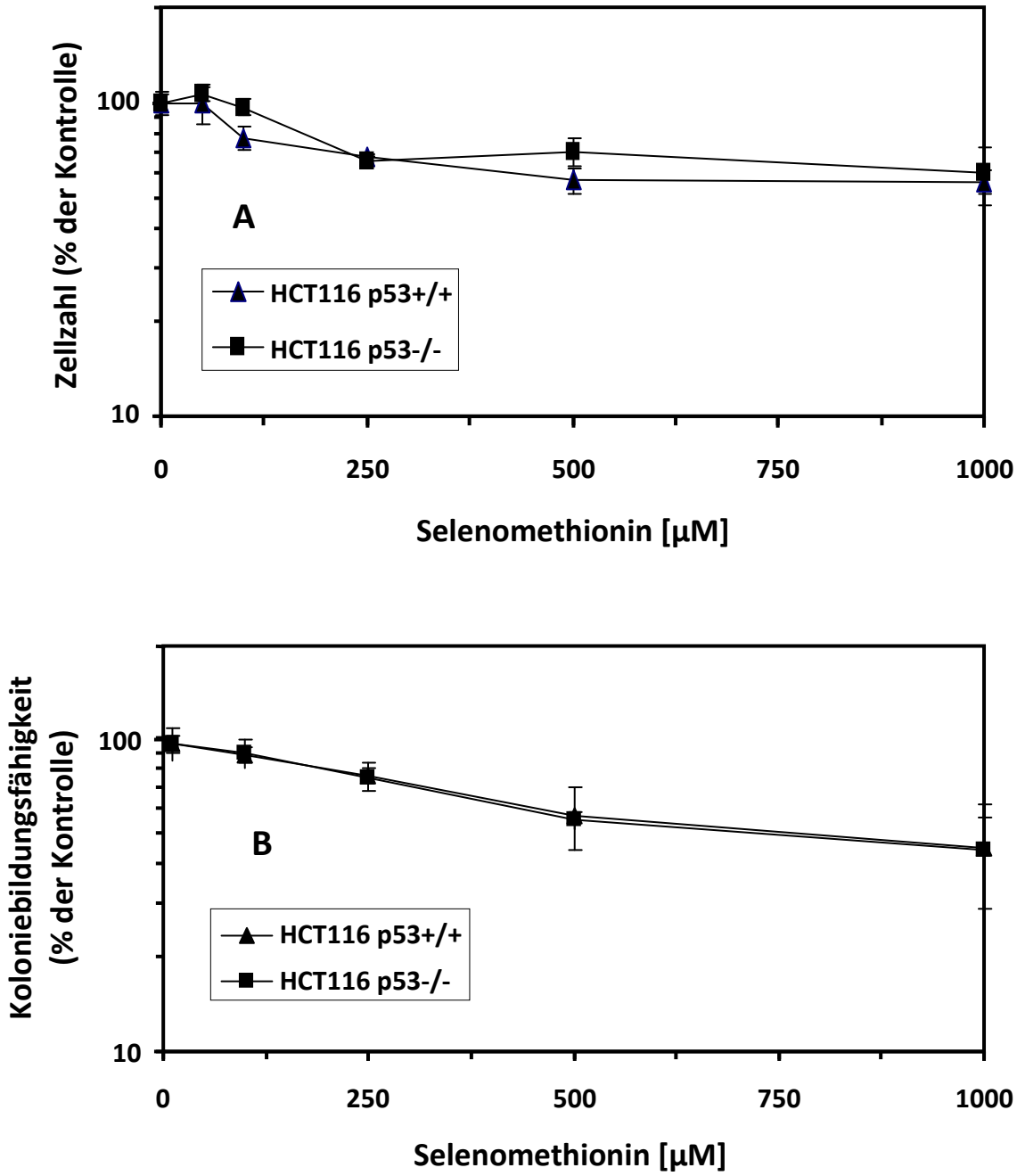


Abbildung 11: p53-unabhängige Zytotoxizität von Selenomethionin. P53-profiziente und p53-defiziente HCT116 Zellen wurden 24 h mit Selenomethionin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte der Zellzahl (A) und der Koloniebildungsfähigkeit (B) aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen ± SD. Signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien: *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001 (Student' scher t-Test).

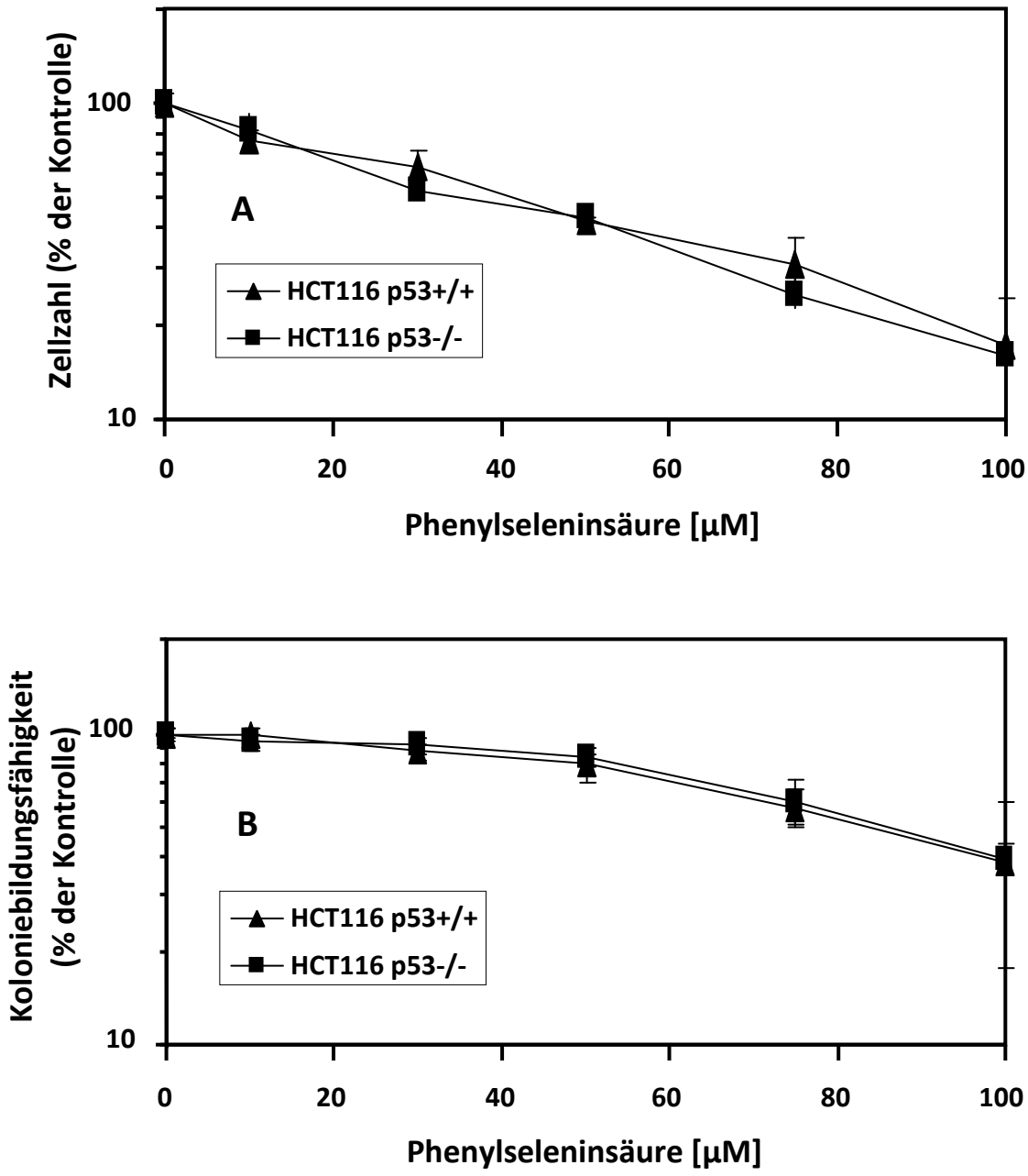


Abbildung 12: p53-unabhängige Zytotoxizität von Phenylseleninsäure. P53-profiziente und p53-defiziente HCT116 Zellen wurden 24 h mit Phenylseleninsäure inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte der Zellzahl (A) und der Koloniebildungsfähigkeit (B) aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen ± SD. Signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien: *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001 (Student' scher t-Test).

5.1.2 Zytotoxizität in A549 Zellen

Die Zytotoxizität der drei Selenverbindungen in A549 Zellen folgte der gleichen Reihenfolge wie in den HCT116 Zelllinien: Natriumselenit > Phenylseleninsäure > Selenomethionin (Abbildung 13).

Der zytotoxische Bereich begann in den A549 Zellen bei 4 µM Natriumselenit, da die Koloniebildungsfähigkeit bei dieser Konzentration bereits auf 56 % der Kontrolle abfiel, während die Zellzahl erst bei 5 µM Natriumselenit auf etwa 70 % sank. Damit reagierten die A549 Zellen weniger sensitiv auf Natriumselenit als die p53-profizienten HCT116 Zellen, jedoch sensitiver als die p53-defiziente Zelllinie.

Auf Selenomethionin reagierten die A549 Zellen nur geringfügig toleranter als die HCT116 Zelllinien. Während in den HCT116 Zellen 250 µM Selenomethionin bereits zytotoxisch waren, lag in A549 Zellen bei dieser Konzentration der Übergang vom nicht-zytotoxischen in den zytotoxischen Bereich (Zellzahl und Koloniebildungsfähigkeit bei etwa 78 %). Bei 500 µM Selenomethionin zeigten sich dann in A549 Zellen starke zytotoxische Effekte; die Koloniebildungsfähigkeit fiel auf 56 % der Kontrolle.

Auch Phenylseleninsäure wirkte in A549 Zellen etwas weniger zytotoxisch als in den HCT116 Zelllinien. Sowohl die Zellzahl als auch die Koloniebildungsfähigkeit lagen bis 50 µM Phenylseleninsäure bei über 80 % der Kontrolle und sanken bei 100 µM auf etwa 60 % der Kontrolle in den zytotoxischen Bereich.

Vergleicht man abschließend den Einfluss des Zelltyps auf die Zytotoxizität der eingesetzten Selenverbindungen lässt sich sagen, dass die Lungenadenokarzinomzellen und Kolonkarzinomzellen bei gleichem p53-Status vergleichbare zytotoxische Reaktionen zeigten, wobei die Lungenzellen jeweils etwas weniger sensitiv waren. Die p53-defizienten Kolonkarzinomzellen waren nur hinsichtlich einer Exposition mit Natriumselenit deutlich resistenter, da sich dessen Zytotoxizität als p53-abhängig herausgestellt hatte.

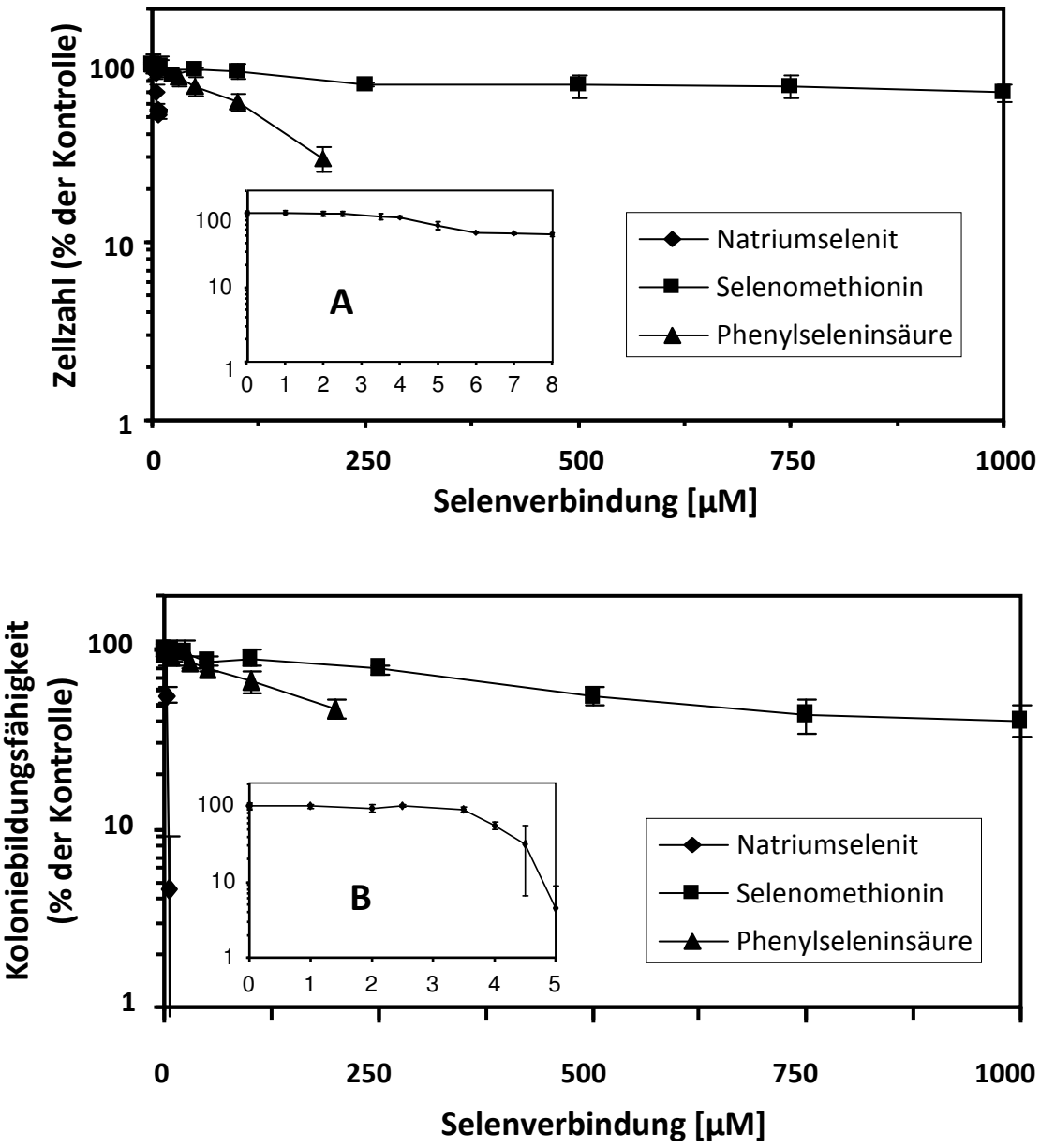


Abbildung 13: Zytotoxizität von Natriumselenit, Selenomethionin und Phenylseleninsäure in A549 Zellen. A549 Zellen wurden 24 h mit der jeweiligen Selenverbindung inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte der Zellzahl (A) und der Koloniebildungsfähigkeit (B) aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen ± SD.

5.2 Zelluläre Aufnahme

Generell werden gemessene Endpunkte in Zellkulturversuchen mit der Inkubationskonzentration korreliert. Dies sagt jedoch nichts über aufgenommene Menge und somit die intrazellulären Konzentrationen einer Substanz aus. So ist neben äquimolaren intra- und extrazellulären Konzentrationen auch eine schwache Aufnahme oder eine starke Akkumulation möglich. Zudem bleiben Unterschiede in der Aufnahme zwischen verschiedenen Zelllinien unberücksichtigt.
Zur Bestimmung der tatsächlichen Aufnahme der Selenverbindungen wurde die intrazelluläre Selenkonzentration nach einer nassen, sauren Veraschung von Zellpellets mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) gemessen. Diese Elementbestimmung kann Zelltyp- und Substanz-abhängige Unterschiede in der Aufnahme sichtbar machen. Da es sich jedoch nicht um eine Spezies-Analyse handelt, können keine Aussagen über den Grad der Metabolisierung gemacht werden.

5.2.1 Aufnahme in HCT116 Zellen

Die Aufnahme von Natriumselenit war in p53-profizienten und –defizienten HCT116 Zellen sehr unterschiedlich. Die p53-profizienten Zellen nahmen über den gesamten Inkubationsbereich jeweils mehr Natriumselenit auf, wobei sich die intrazellulären Selenkonzentrationen erst ab einer Inkubationskonzentration von 3 µM Natriumselenit signifikant von denen der p53-defizienten Zellen unterschieden (Abbildung 14).
Die p53-profizienten Kontrollzellen enthielten ohne Natriumselenit-Inkubation bereits etwa 1 µM Selen. Im unteren Inkubationsbereich bis 4 µM Natriumselenit verlief die Aufnahme in etwa äquimolar, während es im Bereich darüber zu einem starken Anstieg der intrazellulären Selenkonzentration kam. So resultierte z. B. aus einer Konzentration von 5 µM Natriumselenit im Medium ein doppelt so hoher Gehalt in den Zellen. Ein Maximum wurde bei der Inkubationskonzentration von 7 µM Natriumselenit erreicht; hier wurden 120 µM Selen in der Zelle gemessen.
Im Vergleich dazu wiesen die p53-defizienten Kontrollzellen mit etwa 0,5 µM Selen nur ungefähr die Hälfte des Gehaltes an diesem Spurenelement auf als die Wildtyp-Zelllinie. Bis zu einer Inkubationskonzentration von 5 µM Natriumselenit waren die intrazellulären Selenkonzentrationen jeweils geringer als im Medium. Bei 6 µM Natriumselenit waren die intrazelluläre sowie extrazelluläre Konzentration annähernd äquimolar. Bei höheren Inkubationskonzentrationen akkumulierten die Zellen das Selen intrazellulär.

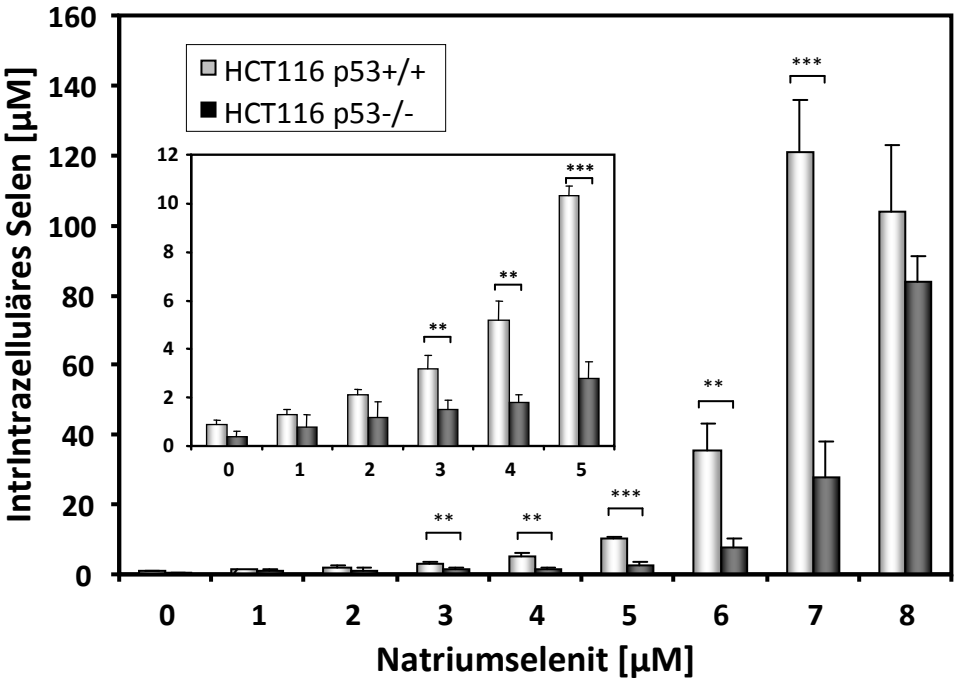


Abbildung 14: Aufnahme von Natriumselenit in HCT116 Zellen. P53-profiziente und p53–defiziente Zellen wurden 24 h mit Natriumselenit inkubiert. Die intrazelluläre Selenkonzentration wurde mittels AAS bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

Es stellt sich die Frage, ob p53 eine Rolle in der zellulären Aufnahme von Selenit spielen kann. Insgesamt ist weitestgehend ungeklärt, in welcher Form und über welche Transporter Selen in die einzelnen Zellen aufgenommen wird (zusammengefasst in Rosen and Liu, 2009). Ganyc und Self (2008) schlussfolgern aus Versuchen in einem Keratinozyten-Modell, dass Selenit passiv über einen Anionen-Transporter aufgenommen wird. Erst die extrazelluläre Reduktion zum Hydrogenselenid soll die Selen-Aufnahme enorm steigern, die dann aktiv über einen ATP-abhängigen Mechanismus über einen weiteren Anionentransporter funktioniert. Ebenso zeigten Olm et al. (2009), dass die Aufnahme von Selenit in Lungenzellen begünstigt ist, wenn extrazellulär Thiole zur Reduktion bereitstehen. Die Menge an extrazellulären Thiolen kann erhöht werden, indem Cystein aus der Zelle ausgeschleust und nach Oxidation als Cystin wieder aufgenommen wird. Die Transkription der Transportproteine für diesen Kreislauf, der XC^--Antiporter und MRPs (multidrug resistance proteins) wird über das regulatorische Element ARE (antioxidant response elements) gesteuert (Olm et al., 2009). Gene, die AREs in ihrem Promoter enthalten, werden jedoch von p53 gehemmt (Faraonio et al., 2006). Dies spricht gegen eine p53-abhängige Aufnahme von Selenit. Anhand von Literaturergebnissen lässt sich somit die höhere Aufnahme von Selenit in die p53-profizienten HCT116 Zellen bisher nicht erklären, trotzdem sollte ein direkter Einfluss von p53 nicht ausgeschlossen werden.

Neben dem direkten Einfluss von p53 auf die Aufnahme von Selenit wären auch indirekte Einflüsse denkbar. Hier wäre z. B. ein p53-abhängiger Verlust der Zellintegrität zu nennen, welches aufgrund von Membranveränderungen wiederum eine passive Aufnahme des Selenits beeinflussen könnte. Dagegen spricht allerdings, dass die p53-profizienten Zellen bereits im nicht-zytotoxischen Bereich jeweils höhere Selengehalte aufweisen. Zudem handelt es sich hier um apoptotische Prozesse (siehe Abschnitt 5.7), die sich dadurch auszeichnen, dass die Membranintegrität weitestgehend bewahrt bleibt. Trotzdem bleibt es auffällig, dass jeweils mit Erreichen der Zytotoxizität von Natriumselenit die Akkumulation von intrazellulärem Selen stark zunimmt.

Im Vergleich zur Aufnahme von Natriumselenit war die Aufnahme von Selenomethionin unabhängig vom p53-Status der Zellen. Die Inkubation mit Selenomethionin führte zudem zu einer viel stärkeren Akkumulation von Selen in der Zelle (Abbildung 15).
Wiederum enthielten die p53-profizienten Zellen ohne Seleninkubation etwa 1 µM Selen und die p53-defizienten Zellen etwa 0,5 µM Selen. Bei einer Inkubationskonzentration von 10 nM Selenomethionin zeigte sich noch kein Unterschied zu den Kontrollzellen, wohingegen bereits 50 nM Selenomethionin im Medium den intrazellulären Selengehalt beider Zelllinien gleichermaßen auf über 2 µM anstiegen ließen. Die intrazelluläre Selenkonzentration war also etwa 40mal höher als die Selenomethioninkonzentration im Medium. Dies war auch bei höheren Inkubationskonzentrationen der Fall: aus 1 µM Selenomethionin im Medium resultierten etwa 40 µM Selen in der Zelle, nach Inkubation mit 5 µM Selenomethionin wurden über 200 µM intrazelluläres Selen gemessen und 50 µM Selenomethionin führten zu einer Akkumulation von fast 2000 µM Selen in der Zelle. Bei höheren Inkubations-konzentrationen war die Akkumulation weniger stark, so resultierten aus 100 µM, 500 µM bzw. 1000 µM Selenomethionin im Medium etwa 3000 µM, 5000 µM bzw. 5500 µM Selen in der Zelle (Abbildung 15).
Die starke Akkumulation von Selen in der Zelle nach Inkubation mit Selenomethionin ergibt sich aus dem unspezifischen Einbau dieser Aminosäure in zelluläre Proteine im Austausch für Methionin. In dieser Speicherform ist Selen jedoch nicht unmittelbar bioverfügbar, da dazu erst eine Umwandlung zu den Metaboliten Hydrogenselenid oder Monomethylselenid stattfinden muss. Der Grad der Metabolisierung kann mit einer Elementanalyse wie der AAS nicht bestimmt werden. Da die Akkumulation bei hohen Inkubationskonzentrationen von Selenomethionin stagnierte, kann von einer Ausschöpfung der Speicherkapazität ausgegangen werden, die zu einer Überladung und zum Absterben der Zelle führt. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Koloniebildungsfähigkeit, nach denen der zytotoxische Bereich bei 250 µM Selenomethionin beginnt (siehe Abschnitt 5.1).

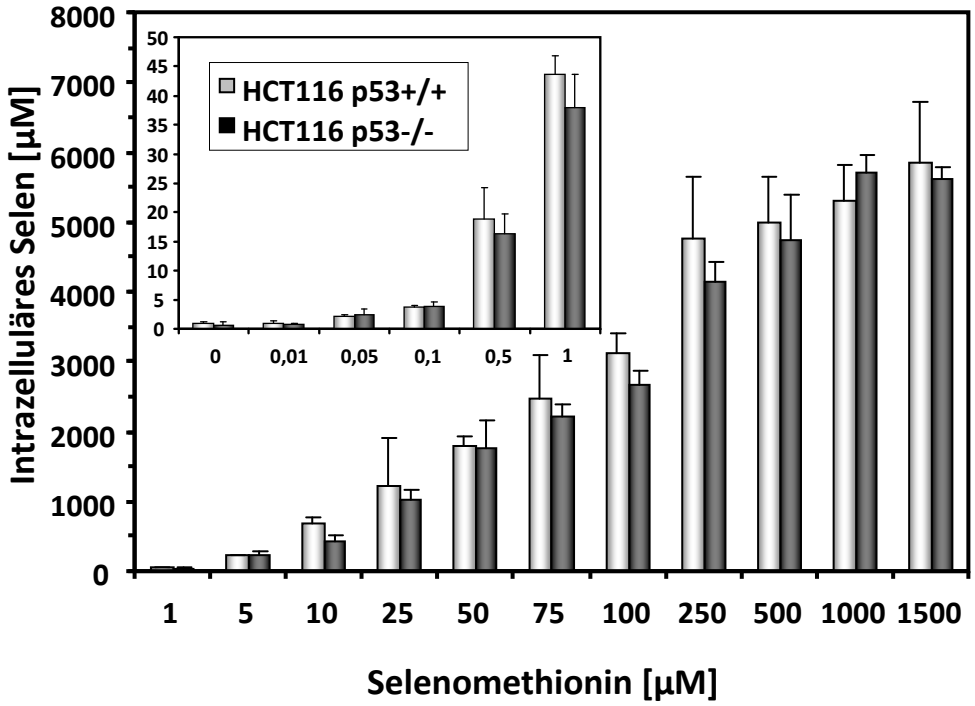


Abbildung 15: Aufnahme von Selenomethionin in HCT116 Zellen. P53-profiziente und p53–defiziente Zellen wurden 24 h mit Natriumselenit inkubiert. Die intrazelluläre Selenkonzentration wurde mittels AAS bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student'scher t-Test).

Weiterhin soll hier die gemessene Selenkonzentration in den Kontrollzellen diskutiert werden. Diese zeigt, dass die Zellen Selen aus dem Kulturmedium akkumulieren können. Das verwendete DMEM enthielt nach Herstellerangaben kein Selen. Dies wurde durch eigene AAS-Messungen bestätigt (Daten nicht gezeigt). Im FKS hingegen konnte ein Selengehalt von etwa 1,4 µg/l bestimmt werden. Daraus resultiert eine Konzentration von etwa 2 nM Selen im gebrauchsfertigen Zellkulturmedium (Schneider, 2009). Es ist schwer die gefundene Selenkonzentration der uninkubierten HCT116 Zellen mit der in realem Darmgewebe zu vergleichen. In der Literatur wird z. B. eine Konzentration von 0,22 µg Selen/g Feuchtgewebe (kanadische Probanden) angegeben (ATSDR, 2003). Unter der vereinfachten Annahme, dass 1000 g einem Volumen von 1 l entsprichen, errechnet sich eine Konzentration von etwa 2,8 µM. Insgesamt bleibt die Frage, ob die Zellen durch das Kulturmedium adäquat mit Selen versorgt werden. Zum Teil wird eine Supplementation von Zellkulturen mit z. B. 100 nM Natriumselenit empfohlen (mündliche Mitteilung von Prof. Josef Köhrle).

Zu erwähnen bleibt, dass die Wiederfindung in allen drei Zelllinien bei etwa 75 % lag. Dies konnte auch durch die Variation des nassen, sauren Aufschlusses nicht verbessert werden (Schneider, 2009). Als Alternative sollte ein Mikrowellenaufschluss in Betracht gezogen werden.

5.2.2 Aufnahme in A549 Zellen

Die Aufnahme von Natriumselenit in A549 Zellen (Abbildung 16) war von der Größenordnung vergleichbar mit der Aufnahme in die HCT116 Zelllinien. Die A549 Zellen wiesen ohne Inkubation Gehalte zwischen 0,5 und 1 µM Selen auf. Bis zu einer Inkubationskonzentration von 6 µM akkumulierten die A549 Zellen etwas mehr Selen als die p53-profizienten HCT116 Zellen. Bereits bei einer Inkubationskonzentration von 4 µM Natriumselenit kam es zu einer Akkumulation auf Gehalte von 12 µM intrazellulärem Selen. Bei Inkubationskonzentrationen von 6 bis 8 µM wurden in den A549 Zellen geringere Selenkonzentrationen als in den p53-profizienten HCT116 Zellen gemessen. Die intrazellulären Selenkonzentrationen stagnierten in diesem hochzytotoxischen Bereich zwischen 40 und 60 µM.

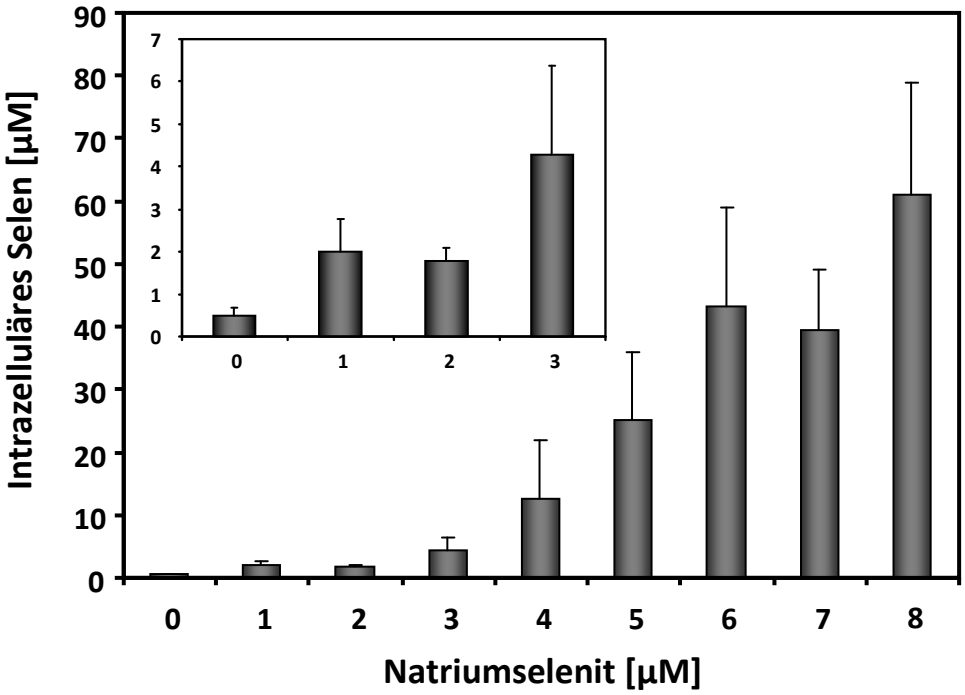


Abbildung 16: Aufnahme von Natriumselenit in A549 Zellen. A549 Zellen wurden 24 h mit Natriumselenit inkubiert. Die intrazelluläre Selenkonzentration wurde mittels AAS bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD.

Hinsichtlich der Aufnahme von Selenomethionin unterschieden sich die A549 Zellen kaum von den beiden HCT116 Zelllinien. Auch in den A549 Zellen kam es zu einer starken Akkumulation von Selen in der Zelle, welche mit Beginn des zytotoxischen Inkubationsbereichs stagnierte (Abbildung 17). Dies ist vermutlich wiederum auf den unspezifischen Einbau von Selenomethionin in zelluläre Proteine bis zur Überladung der Zelle zurückzuführen (siehe Abschnitt 5.2.1).

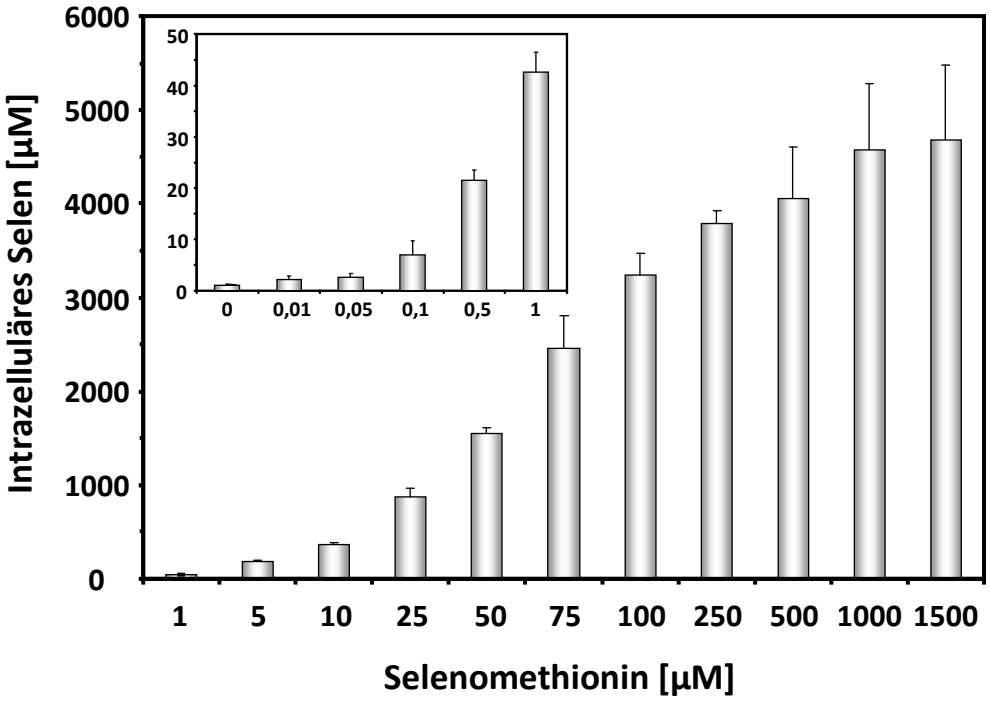


Abbildung 17: Aufnahme von Selenomethionin in A549 Zellen. A549 Zellen wurden 24 h mit Selenomethionin inkubiert. Die intrazelluläre Selenkonzentration wurde mittels AAS bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD.

Es ist schwer die gefundene Selenkonzentration in den unbehandelten A549 Zellen mit der in realem Lungengewebe zu vergleichen. In der Literatur finden sich z. B. Gehalte von 0,13 µg/g (deutsche Probanden) bis 0,30 µg/g (US amerikanische Probanden) jeweils bezogen auf das Feuchtgewicht (zusammengefasst ATSDR, 2003). Unter der vereinfachenden Annahme, dass 1000 g einem Volumen von 1 l entsprichen, erhält man Konzentrationen von 1,7 – 3,8 µM.

5.3 Konformationsspezifische Analyse von p53

Die Integrität der Zink-bindenden Domäne von p53 ist entscheidend für die Funktionsfähigkeit des Tumorsuppressors (zusammengefasst in Abschnitt 2.2.1). Kommt es zum Verlust des Zinkions durch Metall-Chelatoren (Hainaut and Milner, 1993a), eine Verdrängung durch z. B. Cadmium (Méplan et al., 1999; Thuy, 2006; Schwerdtle et al., 2010) oder zu einer Oxidation von Thiolen, die an der Bindung beteiligt sind (Hainaut and Milner, 1993a; Hainaut and Milner, 1993b; Delphin, 1994), entfaltet sich die native, aktive Wildtyp-Konformation in eine fehlgefaltete, inaktive Konformation. Letztere ist nicht mehr in der Lage als Transkriptionsfaktor an DNA zu binden. Diesen Verlust der tumorsuppressiven Wirkung kennt man sonst vor allem von Phänotypen von p53-Mutanten mit Mutationen wichtiger Aminosäuren in der DNA-Bindungsdomäne, weshalb die Zink-freie Konformation auch als sogenannte „mutante“ Konformation bezeichnet wird. Arbeiten in diesem Arbeitskreis konnten zeigen, dass reduzierbare Selenverbindungen Zink aus der Zinkfingerdomäne des XPA-Proteins freisetzten und die Aktivität des Zinkfingerproteins Fpg inhibieren können (Blessing et al., 2004 a). In diesem Zusammenhang wurde zudem in ersten Versuchen der Einfluss von Phenylseleninsäure auf eine Entfaltung von p53 betrachtet. Diese reduzierbare Selenverbindung war in der Lage p53 in Zelllysaten von MCF7 Zellen in hohen Konzentrationen (300 µM) vollständig zu entfalten. Nach Inkubation von intakten MCF7 Zellen konnte mit beginnender Zytotoxizität (70 µM Phenylseleninsäure) höchstens eine marginale Bildung der inaktiven Konformation bei gleichbleibend hoher Konzentration an Wildtyp-p53 beobachtet werden (Blessing, 2004 b).

In dieser Arbeit sollte nun der Einfluss von Natriumselenit und Selenomethionin, zweier für die Ernährung relevanter Selenverbindungen, untersucht werden. Dazu wurde in einer Immunopräzipitation mittels konformationsspezifischer Antikörper die native Wildtyp- und die entfaltete, inaktive Konformation separiert und nachgewiesen. Dazu wurden Zelllysate von A549 Zellen verwendet, um unabhängig von Aufnahme, Metabolisierung und anderen Einflüssen einen generellen Effekt der Selenverbindungen auf die Konformation von p53 zu detektieren. In diesem subzellulären System können zudem hohe Konzentrationen gewählt werden, da es keine Limitierungen durch die Zytotoxizität z. B. von Natriumselenit gibt. Es zeigte sich, dass p53 in A549 Zellen fast vollständig in der Wildtyp-Konformation vorliegt. Hohe Konzentrationen des reduzierbaren Natriumselenits waren in der Lage p53 nach Inkubation des Zelllysats vollständig zu entfalten. Fast ebenso stark war der Effekt der Phenylseleninsäure, während die Wildtyp-Konformation durch das vollständig reduzierte Selenomethionin unbeeinflusst blieb (Abbildung 18 A).

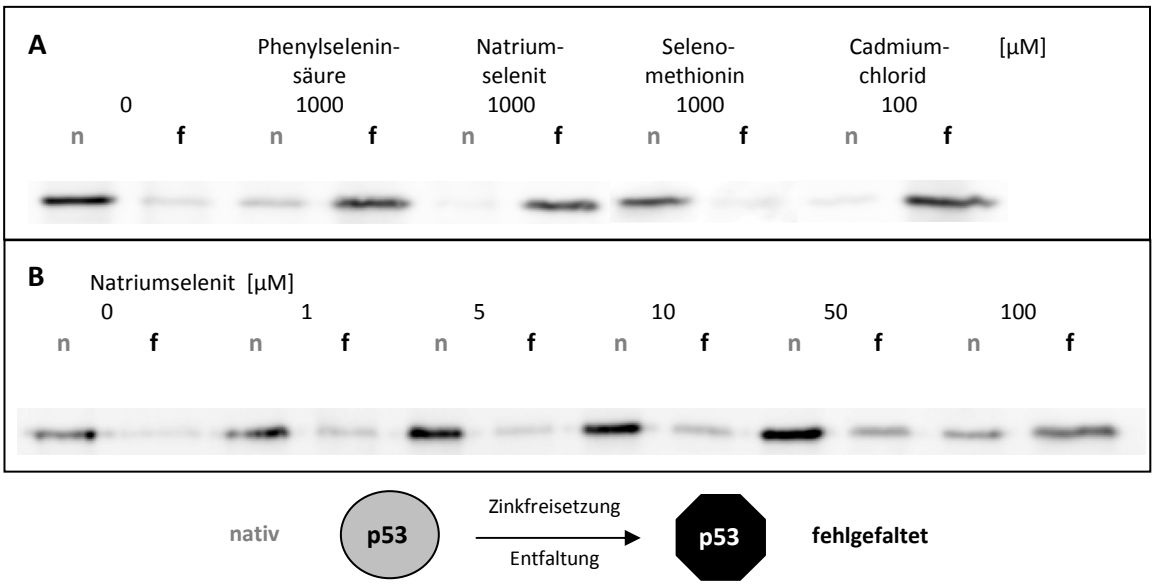


Abbildung 18: Konformationsspezifische Analyse von p53. Zelllysate von A549 Zellen wurden 8 min bei 37 °C mit vergleichsweise hohen Konzentrationen verschiedener Selenverbindungen (A) bzw. mit verschiedenen Natriumselenitkonzentrationen (B) inkubiert. Die native Wildtyp- (n) bzw. fehlgefaltete (f) Konformation wurden nach Immunopräzipitation mit konformationsspezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. Dargestellt sind repräsentative Western Blots. Cadmiumchlorid wurde als Positivkontrolle mitgeführt (Méplan et al., 1999).

Natriumselenit führte bereits bei niedrigen mikromolaren Konzentrationen konzentrationsabhängig zur Zunahme der inaktiven Konformation, wobei auch die Wildtyp-Konformation zunahm. Erst nach einer Inkubation mit 100 µM Natriumselenit lag p53 zum Großteil entfaltet vor (Abbildung 18 B). Diese Konzentration ist vergleichsweise hoch, selbst wenn man berücksichtigt, dass Natriumselenit in intakten Zellen akkumulieren kann. Die AAS-Messungen zeigten, dass nach Inkubation mit z. B. 4 µM Natriumselenit, einer beginnend zytotoxischen Konzentration, intrazellulär ein Gehalt von etwa 13 µM Selen resultiert (siehe Abschnitt 5.2.2). Diese Element-spezifische Analyse sagt jedoch nichts darüber aus, inwieweit das gemessene Selen noch als Natriumselenit vorliegt. Der reduktive Metabolismus von Natriumselenit und ein Redoxcycling der prooxidativen Metabolite könnte den oxidativen Stress und somit den inaktivierenden Einfluss auf p53 verstärken (siehe Abschnitt 2.1.2). Inwiefern aus den subzellulären Versuchen abgeleitet werden kann, in welchem Maße Natriumselenit die Konformation von p53 in intakten Zellen beeinflusst, ist spekulativ.

Insgesamt sollte jedoch auch die Bildung von geringen Mengen der Zink-freien p53-Konformation nicht unterschätzt werden. Dieser dominant-negative Phänotyp kann zum einen eine Aggregation von Wildtyp-p53 verursachen (Butler and Loh, 2003) und zum

anderen in einem Heterotetramer mit Wildtyp-p53 dessen tumorsuppressiven Eigenschaften inhibieren (Nicholls et al., 2002).

5.4 Phosphorylierung von p53

Neben einer möglichen Inaktivierung von p53 durch Natriumselenit aufgrund von Thioloxidationen in der DNA-Bindungsdomäne ist auch eine Stimulation von p53 durch die DNA-schädigende Wirkung von Natriumselenit denkbar. P53 wird nach genotoxischem oder nicht-genotoxischem Stress durch Phosphorylierungen auf der Proteinebene stabilisiert und aktiviert (siehe Abschnitt 2.2.2).

Nach 24 h Inkubation von A549 Zellen mit Natriumselenit resultierte eine Phosphorylierung von p53 an den Serin-Resten 15, 20 und 392 (Abbildung 19 A). Dies war jeweils ab 6 µM Natriumselenit, also einer stark zytotoxischen Konzentration, der Fall. Die Phosphorylierung an Serin-15 und -20 werden zum einen mit der Stabilisierung des Proteins (Shieh et al., 1997; Chehab et al., 2000) in Zusammenhang gebracht. Zum anderen erhöht die Phosphorylierung an Serin-15 auch die transkriptionelle Aktivität (Chehab et al., 2000). Einhergehend mit diesen beiden Phosphorylierungen wurde tatsächlich eine Zunahme des Proteingehaltes an p53 beobachtet (Abbildung 19 A).

Die ebenfalls beobachtete Phosphorylierung an Serin-392 nach Natriumselenit-Exposition (Abbildung 19 A), begünstigt die Tetramerisierung von p53 (Sakaguchi et al., 1997). Als Tetramer weist der Transkriptionsfaktor seine stärkste spezifische DNA-Bindungsfähigkeit auf (Hupp et al., 1993). Weiterhin wurde die Phosphorylierung an Serin-46, die eine Rolle bei der Induktion von p53-abhängier Apoptose spielen soll (Oda et al., 2000), untersucht. Dieser Serin-Rest wurde unter den gewählten Versuchsbedingungen durch Natriumselenit nicht phosphoryliert (Abbildung 19 A).

Im Vergleich zu Natriumselenit hatte die Inkubation von A549 Zellen mit Selenomethionin keine Phosphorylierung von p53 an den untersuchten Serin-Resten und keine Zunahme von Gesamt-p53 zur Folge (Abbildung 19 B). Dies deutet daraufhin, dass selbst in zytotoxischen Konzentrationen von Selenomethionin, welche antiproliferative Prozesse (Zellzyklusarreste, Zelltod) induzierten, p53 mechanistisch keine Rolle spielt.

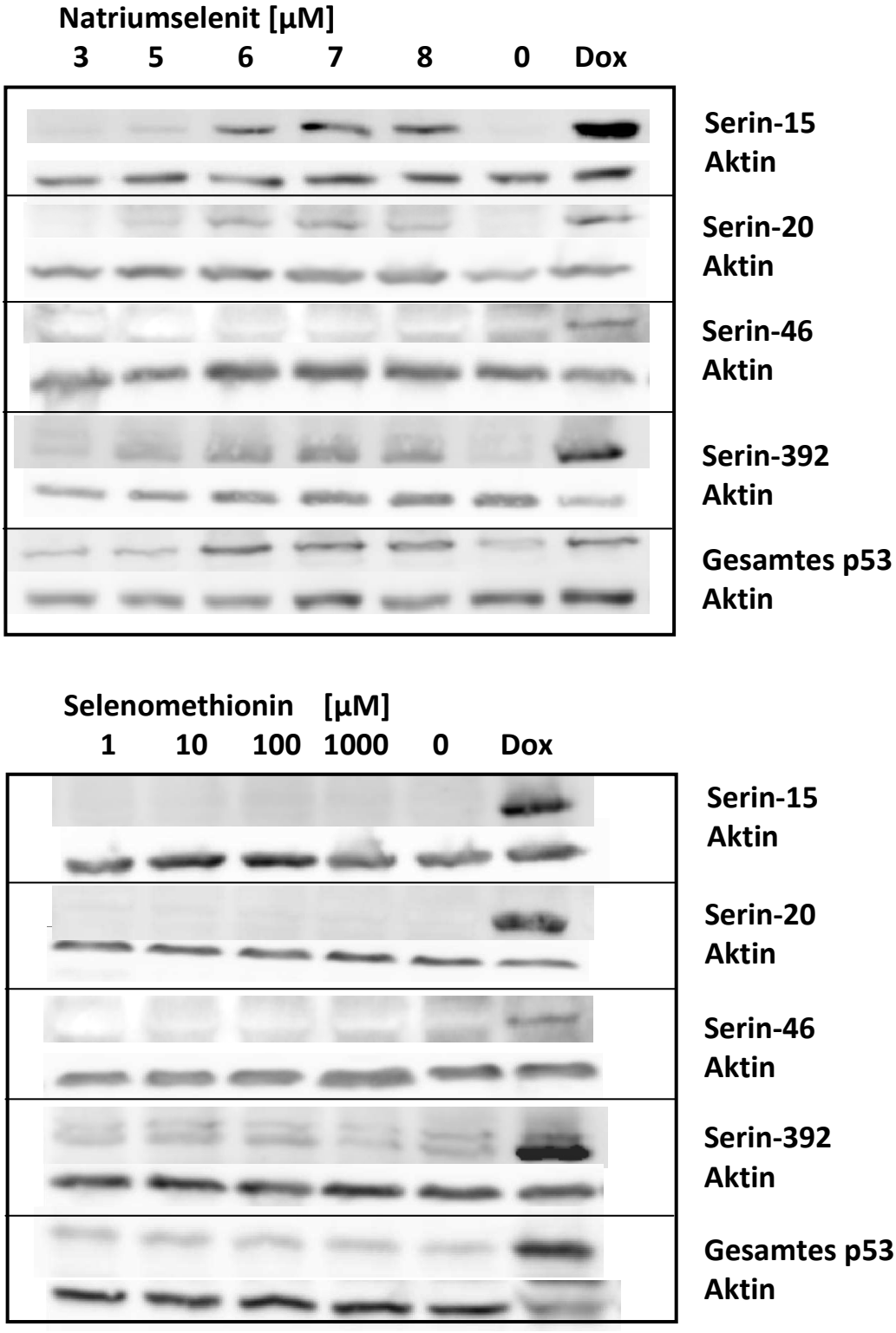


Abbildung 19: Phosphorylierung von p53 durch Natriumselenit und Selenomethionin. A549 Zellen wurden 24 h mit Natriumselenit (A) bzw. Selenomethionin (B) inkubiert. In Western Blot-Analysen wurde das Phosphorylierungsmuster bzw. Gesamt-p53 bestimmt. Aktin wurde jeweils als Ladekontrolle mitgeführt. Doxorubicin (Dox) phosphoryliert p53 an diversen Serin-Resten (Thompson et al., 2004) und wurde als Positivkontrolle verwendet. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen.

Phenylseleninsäure führte bereits in nicht-zytotoxischen Konzentrationen zur Phosphorylierung von p53 an Serin-20 und Serin-392 sowie zum Anstieg des Gesamt-p53-Gehaltes. Im Vergleich dazu wurde Serin-15 erst in vergleichsweise hohen Konzentrationen phosphoryliert. Die Stabilisierung von p53 als Reaktion auf diese Selenverbindung scheint demnach anders als beim Natriumselenit unabhängig von der Modifizierung an Serin-15 zu sein, könnte also über Serin-20 ablaufen. Die Phosphorylierung an Serin-392 weist auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors hin. Auch nach Inkubation mit Phenylseleninsäure wurde kein an Serin-46 phosphoryliertes p53 detektiert (Abbildung 20).

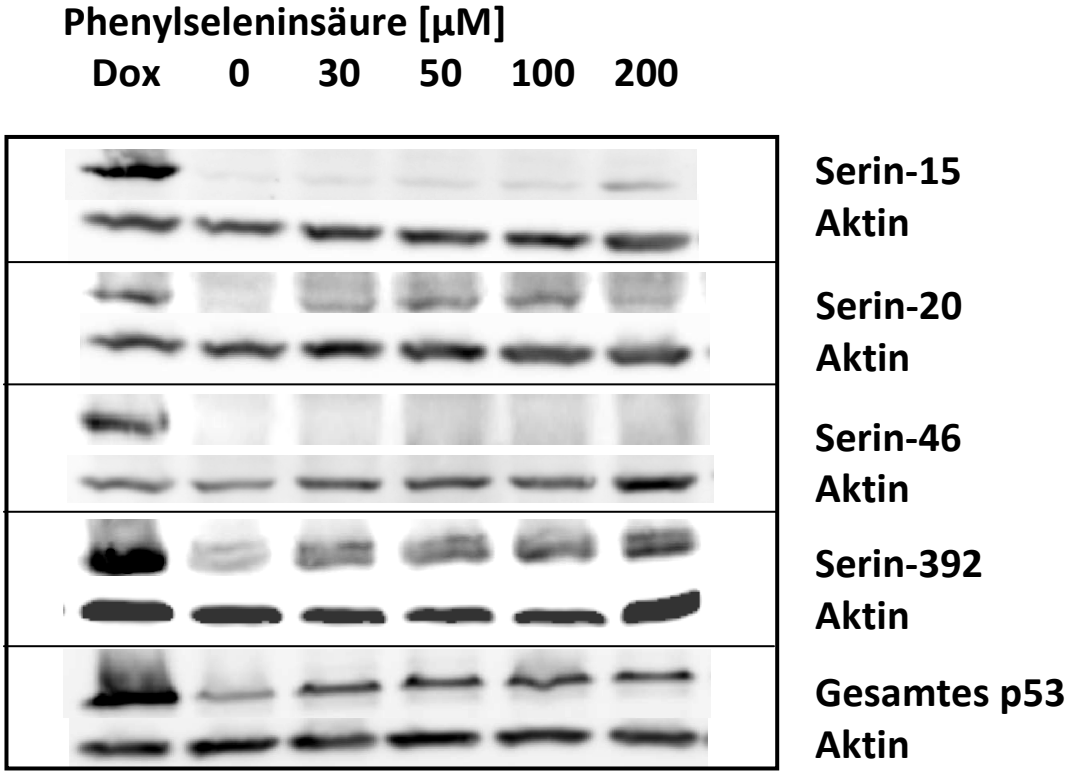


Abbildung 20: Phosphorylierung von p53 durch Phenylseleninsäure. A549 Zellen wurden 24 h mit Phenylseleninsäure inkubiert. In Western Blot-Analysen wurde das Phosphorylierungsmuster bzw. Gesamt-p53 bestimmt. Aktin wurde jeweils als Ladekontrolle mitgeführt. Doxorubicin (Dox) wurde als Positivkontrolle verwendet (Thompson et al., 2004). Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Versuchen. Von einer densiometrische Quantifizierung und Darstellung in der Einheit „% der Kontrolle“ wurde abgesehen, da es aufgrund von nichtvorhandenem phosphorylierten p53 in Kontrollzellen hierbei zu großen Schwankungen kommen würde.

Insgesamt gliedern sich die Ergebnisse weitestgehend stimmig in die Literatur ein. In H1299 Lungenkrebszellen (p53-/-, mit Wildtyp-p53-Gen transfiziert) wurde nach Natriumselenit-Exposition die Phosphorylierung von p53 an Serin-20, -37 und -46 beobachtet, während Selenomethionin darauf keinen Einfluss hatte (Smith et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte im Vergleich dazu kein durch Natriumselenit an Serin-46-phosphoryliertes p53 detektiert werden. Um die Funktionsfähigkeit des verwendeten Anti-phospho-p53 (Ser-46)-Antikörpers zu überprüfen, wurden die Zellen mit Doxorubicin, welches in der DNA interkaliert und die Topoisomerase II hemmt, inkubiert (Abbildung 19). Dieses genotoxische Anthracyclin führt zur starken Phosphorylierung an den entscheidenden Serin-Resten von p53 (Thompson et al., 2004). Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Sensitivität nicht ausreichend war, um Effekte durch Natriumselenit zu detektieren. Die Arbeitsgruppe um Lü zeigte in Prostatakrebszellen, dass Selenit zur Phosphorylierung von p53 an Serin-15 und -20 führt (Jiang et al., 2004 a; Hu et al., 2006). Zudem beschrieben sie, dass ihre Detektionsmethode (Röntgenfilm) zu wenig sensitiv war, um die Phosphorylierungen an Serin-6, -37, -46 und -392 untersuchen zu können (Jiang et al., 2004 a). In der vorliegenden Arbeit traten Probleme bei der Detektion von phosphoryliertem p53 an den Serinen 6, 9 und 37 auf. Dies wurde weitestgehend auf die unspezifischen Eigenschaften der primären Antikörper zurückgeführt, da hier zum Teil starke unspezifische Banden detektiert wurden. Die Phosphorylierung von p53 an Serin-15 wurde zudem auch in HeLa Hep-2 Zellen beobachtet (Rudolf et al., 2008).

Saito et al. (2003) zeigten, dass A549 und HCT116 Zellen auf diverse genotoxische und nicht-genotoxische Stimuli mit dem gleichen Phosphorylierungsmuster von p53 reagieren. Insgesamt kann also davon ausgegangen werden, dass die hier beschriebenen Ergebnisse nach Inkubation mit den Selenverbindungen in A549 Zellen auf die HCT116 Zellen übertragbar sind.

5.5 Oxidative DNA-Schäden

In mehreren Studien wurde beschrieben, dass die reduzierbare Selenverbindung Natriumselenit DNA-Strangbrüche induziert (Lu et al., 1995; Kim et al., 2001; Rudolf et al., 2008). DNA-Strangbrüche führen mehr als andere DNA-Läsionen zur Stabilisierung von p53 und zur Einleitung einer p53-abhängigen Signaltransduktion (Nelson et al., 1994). Oxidative DNA-Schäden werden über die BER repariert. Es wird diskutiert, ob die NER dabei als „Back up"-Mechanismus fungieren kann (Langie et al., 2007). In dieser Arbeit wurde mittels Alkalischer Entwindung die Induktion von DNA-Strangbrüchen und Fpg-sensitiven Basenmodifikationen durch verschiedene Selenverbindungen in Abhängigkeit des p53-Status der Zellen bestimmt. Zudem wurde die Induktion von Proteinen der BER und NER auf Gen- und Proteinebene betrachtet.

5.5.1 Bestimmung von oxidativen DNA-Schäden mittels alkalischer Entwindung

Die Bestimmung der oxidativen DNA-Schäden in Abhängigkeit des p53-Status der Zellen wurde nach 45 h Inkubation durchgeführt. Diese vergleichsweise lange Inkubationszeit wurde gewählt, da die Stabilisierung von p53 erst nach 45 h deutlich wurde und die Expression verschiedener p53-abhängiger Gene sich erst zu diesem Zeitpunkt in den beiden Zelllinien deutlich unterschied (siehe Abschnitt 5.5.2/4).

Die beiden HCT116 Zelllinien zeigten nach Natriumselenit-Inkubation sehr unterschiedliche Gehalte an oxidativen DNA-Schäden. Die p53-defizienten HCT116 Zellen akkumulierten bereits bei nicht-zytotoxischen Konzentrationen an Natriumselenit hohe Gehalte an DNA-Strangbrüchen, während die p53-profizienten Zellen bis in den zytotoxischen Konzentrationsbereich kaum DNA-Schäden aufwiesen (Abbildung 21). Erst ab 5 µM Natriumselenit traten in der p53-defizienten Zelllinie zudem Fpg-sensitive Läsionen auf. Bei der vergleichsweise hohen Konzentration von 8 µM Natriumselenit wurde in beiden Zelllinien gleichermaßen hohe Gehalte an DNA-Schäden detektiert, dabei war bei dieser Konzentration das Verhältnis zwischen DNA-Strangbrüchen und Fpg-sensitiven Läsionen ausgeglichen.

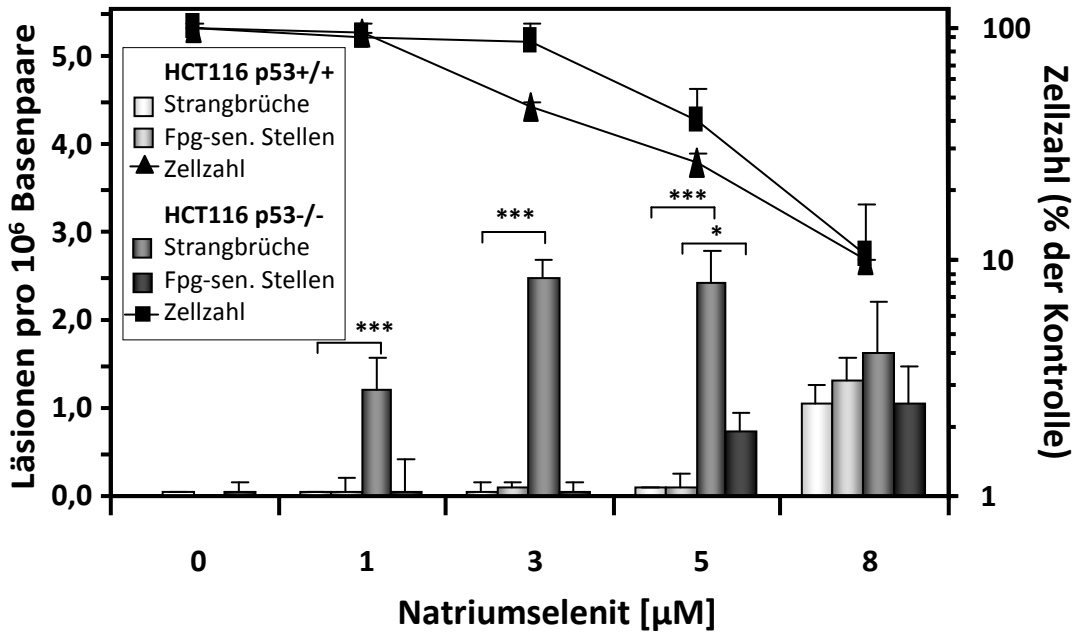


Abbildung 21: Oxidative DNA-Schäden nach Inkubation mit Natriumselenit. P53-profiziente und p53-defiziente Zellen wurden 45 h mit Natriumselenit inkubiert. Mittels Alkalischer Entwindung wurden Strangbrüche und Fpg-sensitive Stellen quantifiziert. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

Im Vergleich dazu war das Auftreten von DNA-Schäden nach Inkubation mit Selenomethionin unabhängig vom p53-Status der Zellen. Ab 500 µM Selenomethionin stieg in beiden Zelllinien der Gehalt an DNA-Strangbrüchen an (Abbildung 22).

Phenylseleninsäure induzierte in beiden Zelllinien DNA-Strangbrüche beginnend bei einer Konzentration von 20 µM, wobei die DNA-Schädigung in den p53-defizienten Zellen marginal höher war (Abbildung 23).

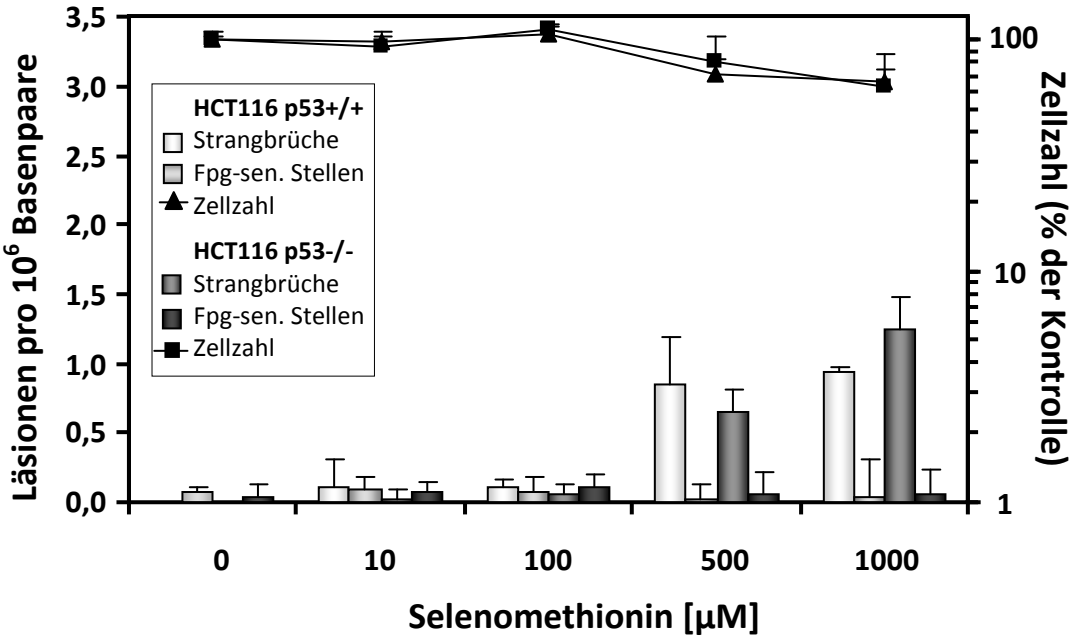


Abbildung 22: Oxidative DNA-Schäden nach Inkubation mit Selenomethionin. P53-profiziente und p53-defiziente Zellen wurden 45 h mit Selenomethionin inkubiert. Mittels Alkalischer Entwindung wurden Strangbrüche und Fpg-sensitive Stellen quantifiziert. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

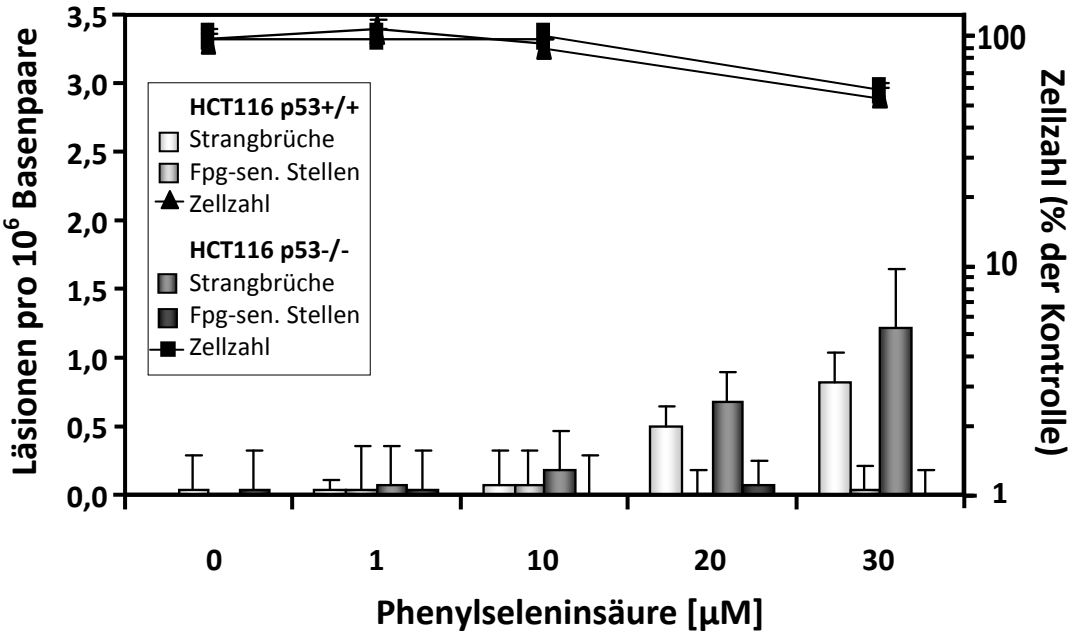


Abbildung 23: Oxidative DNA-Schäden nach Inkubation mit Phenylseleninsäure. P53-profiziente und p53-defiziente Zellen wurden 45 h mit Phenylseleninsäure inkubiert. Mittels Alkalischer Entwindung wurden Strangbrüche und Fpg-sensitive Stellen quantifiziert. Zudem wurde die Zellzahl bestimmt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD.

5.5.2 Stabilisierung von p53

Infolge von genotoxischem Stress wird p53 stabilisiert. Daher wurde der p53-Proteingehalt mittels Western Blot nach Inkubation mit Natriumselenit bzw. Selenomethionin bestimmt.
Natriumselenit stabilisierte p53: Nach 24 h Inkubation führten 5 µM Natriumselenit zu einer signifikanten Steigerung des Proteingehaltes um 40 %, wobei diese Zunahme bei 8 µM nicht mehr vorhanden war. Nach 45 h Inkubation war bereits bei niedrigen Konzentrationen ein marginaler Anstieg zu verzeichnen. Bei 5 µM Natriumselenit hatte sich der basale p53-Gehalt annähernd verdoppelt und blieb auch bei 8 µM konstant erhöht (Abbildung 24).
In den p53-defizienten Zellen akkumulierten DNA-Strangbrüche nach 45 h Inkubation bereits ab 1 µM Natriumselenit. Es ist auffällig, dass die Stabilisierung nach 45 h Inkubation jedoch erst ab 5 µM Natriumselenit deutlich zunahm. Daraus lässt sich ableitet, dass bereits der basale Gehalt von p53 die BER-Kapazität erhöht.

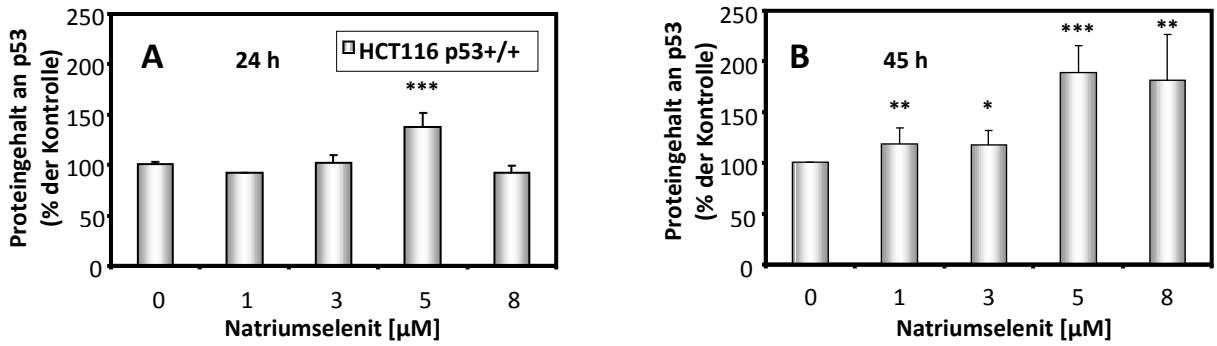


Abbildung 24: Proteingehalt an p53 nach 24 h bzw. 45 h Inkubation mit Natriumselenit. P53-profiziente Zellen wurden 24 h (A) bzw. 45 h (B) mit Natriumselenit inkubiert. Der Proteingehalt wurde in Western Blot-Analysen ermittelt (A, B). Aktin wurde als Ladekontrolle mitgeführt. Mittels Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen +SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

Nach 45 h resultierte auch aus der Selenomethionin-Exposition eine Stabilisierung von p53 (Abbildung 25). Diese trat bei 100 µM Selenomethionin ein, der Konzentration bei der bereits DNA-Strangbrüche detektiert wurden (vgl. Abschnitt 5.5.1).

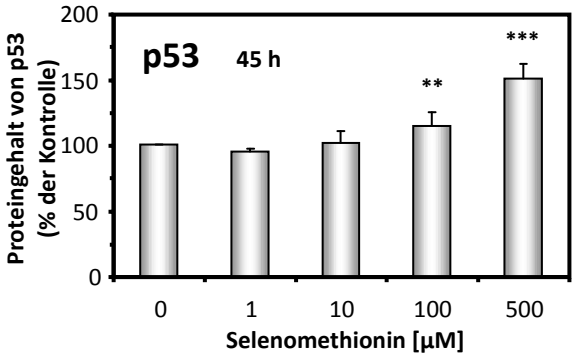


Abbildung 25: Proteingehalt an p53 nach 45 h Inkubation mit Selenomethionin. P53-profiziente Zellen wurden 45 h mit Selenomethionin inkubiert. Der Proteingehalt wurde in Western Blot-Analysen ermittelt. Aktin wurde als Ladekontrolle mitgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen +SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

5.5.3 Genexpression und Proteingehalt von BER-Proteinen

Oxidative DNA-Schäden werden mittels BER repariert. Es wird zwischen dem „short patch"- und „long-patch"-Reparaturweg unterschieden. Bei starker Expression von p21 wird PCNA und damit die PCNA-abhängige „long patch"-Reparatur inhibiert (zusammengefasst in Fortini and Dogliotti, 2007). Da Natriumselenit p53-abhängig zur Induktion von p21 führte (siehe Abschnitt 5.6.2), wurde in dieser Arbeit die Expression der Gene der „short patch"-Reparatur betrachtet. Analog zu der Bestimmung der oxidativen DNA-Schäden wurde eine Inkubationszeit von 45 h gewählt.

In der Literatur wird p53 nicht mit einer erhöhten Transkription von *hOGG1* nach DNA-Schädigung sondern mit einer Erhöhung des Basalgehaltes an hOGG1 in Zusammenhang gebracht (Chatterjee et al., 2005). Daher wurde die basale Expression verschiedener BER-Gene (*hOGG1*, *APE1*, *Polß*, *LigIII*, *XRCC1*) in den p53-profizienten und p53-defizienten HCT116 Zellen verglichen. Es zeigte sich, dass die basale Expression in den p53-defizienten Zellen jeweils höher war (Abbildung 26 A). Damit weisen die hier vorgelegten Ergebnisse auf erhöhten endogenen, oxidativen Stress bei p53-Defizienz hin.

Natriumselenit hatte in den p53-profizienten Zellen keinen Einfluss auf die Expression von *hOGG1*, *APE1*, *LigIII* und *XRCC1* (Abbildung 26 B, C, E, F). Jedoch wurde eine deutliche Induktion von *Polß* bei 3 µM und 5 µM Natriumselenit detektiert (Abbildung 26 D). Bei 8 µM Natriumselenit wurde *Polß*, evtl. aufgrund der hochzytotoxischen Inkubationsbedingungen, nur marginal induziert. Im Vergleich dazu war die Expression von *Polß* in den p53-defizienten Zellen trotz Natriumselenit-Inkubation konstant, wobei die basale Expression verglichen mit

den p53-profizienten Zellen bereits um den Faktor 1,5 gesteigert war. Die Transkription der anderen betrachteten Gene wurden in den p53-defizienten Zellen durch Natriumselenit reprimiert. Dabei war die Repression nur bei *hOGG1* und *APE1* signifikant (Abbildung 26 B, C, E, F).

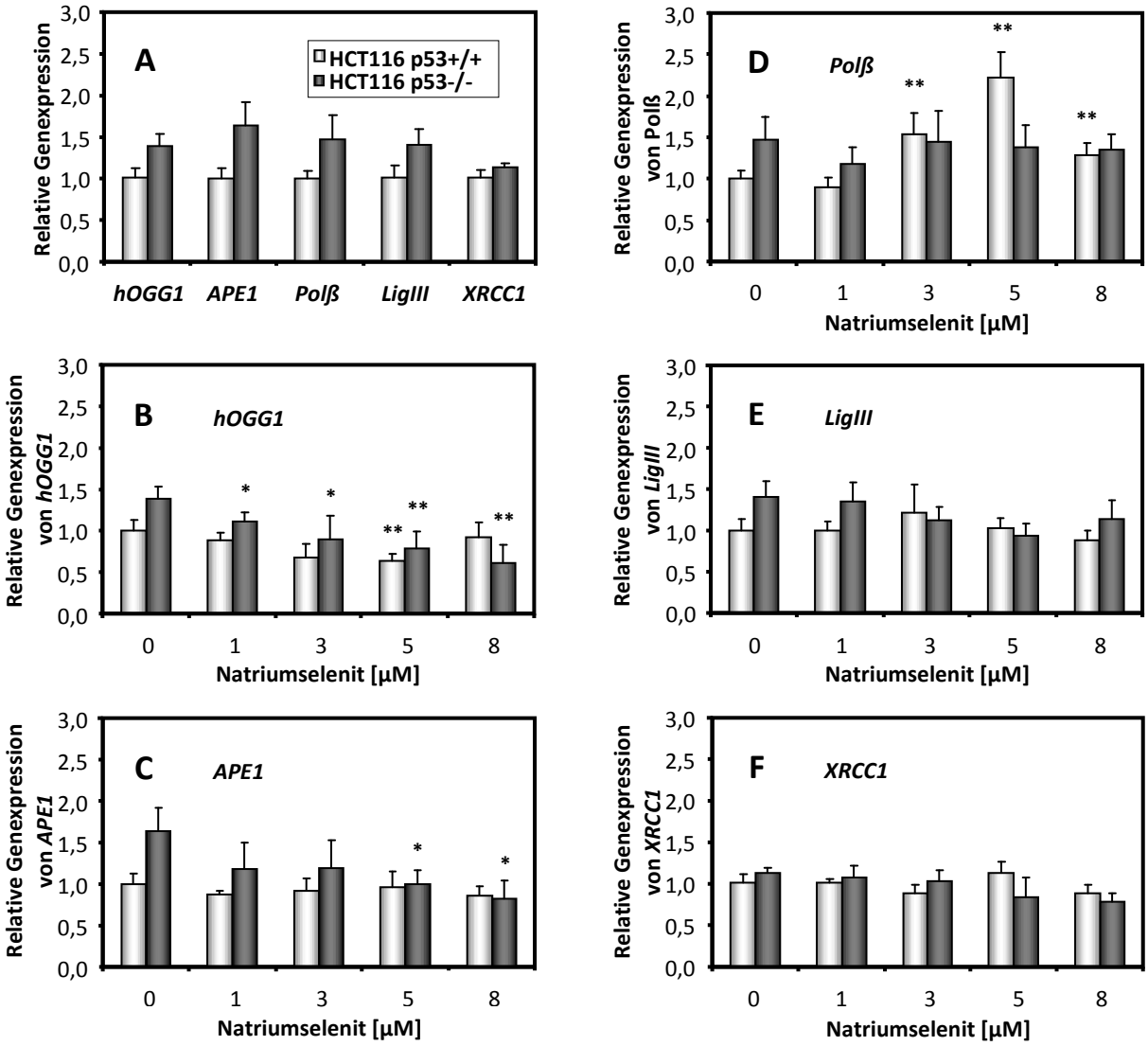


Abbildung 26: Expression von BER-Genen nach Inkubation mit Natriumselenit. P53-profiziente und p53-defiziente Zellen wurden 45 h mit Natriumselenit inkubiert. Mittels real time RT-PCR wurde die relative Genexpression von *hOGG1* (B), *APE1* (C), *Polß* (D), *LigIII* (E) und *XRCC1* (F) bestimmt. Die basale Expression in den beiden Zelllinien wurde verglichen (A). Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen +SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

Überraschenderweise ergaben Western Blot-Analysen mit einem gegen Polß gerichteten Antikörper auf der Proteinebene ein anderes Bild. Hier hatte Natriumselenit in beiden Zelllinien gleichermaßen vielmehr einen repressiven Effekt, der mit der Zeit zunahm und bei

45 h bereits bei 3 µM Natriumselenit begann (Abbildung 27). Zudem sind diese Ergebnisse inkonsistent zu Studien von Seo et al. (2002), nach denen p53 durch direkte Protein-Protein-Interaktion zur Stabilisierung des Polß-Proteins führen soll.

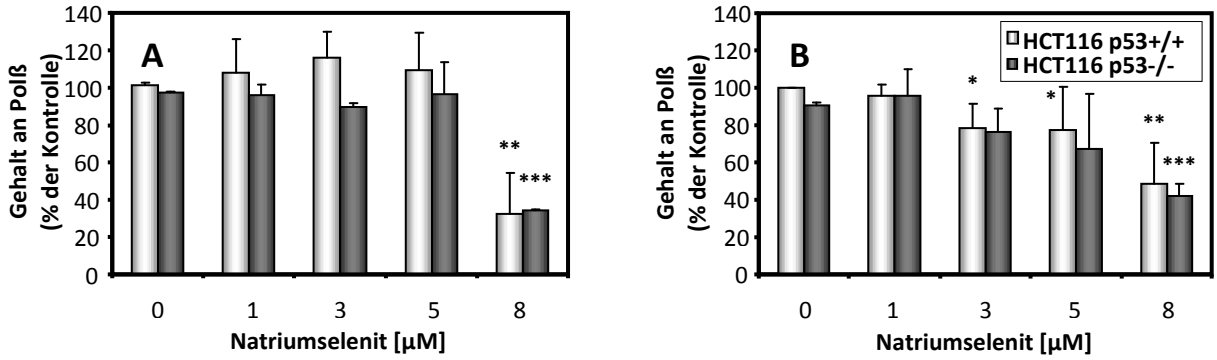


Abbildung 27: Proteingehalt an Polß nach Inkubation mit Natriumselenit. P53-profiziente und p53-defiziente Zellen wurden 24 h (A) bzw. 45 h (B) mit Natriumselenit inkubiert. In Western Blot-Analysen wurde der Gehalt an Polß bestimmt. Aktin wurde jeweils als Ladekontrolle mitgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen +SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

Da die Akkumulation von DNA-Strangbrüchen im Falle von Selenomethionin unabhängig von p53 erfolgte, wurde auf Expressionsstudien der BER-Gene verzichtet. Interessanterweise zeigte sich jedoch auf der Proteinebene, dass Polß beginnend bei 100 µM Selenomethionin induziert/stabilisiert wurde (Abbildung 28). Bei dieser Konzentration wurden zudem DNA-Strangbrüche detektiert (siehe Abschnitt 5.5.1).

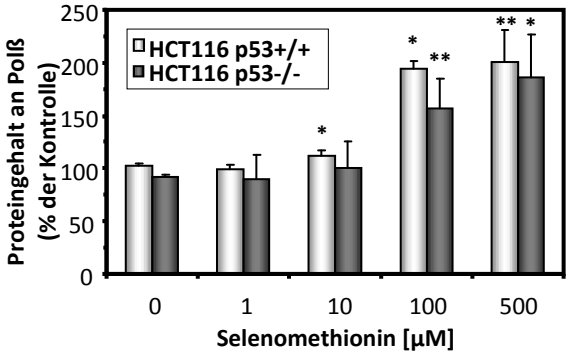


Abbildung 28: Proteingehalt an Polß nach Inkubation mit Selenomethionin. P53-profiziente und p53-defiziente Zellen wurden 45 h mit Selenomethionin inkubiert. In Western Blot-Analysen wurde der Gehalt an Polß bestimmt. Aktin wurde jeweils als Ladekontrolle mitgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen +SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

5.5.4 Genexpression und Proteingehalt von NER-Proteinen

Im Vergleich zur BER wird p53 in der NER ein viel stärkerer transkriptioneller Einfluss zugeschrieben (zusammengefasst in Seo and Jung, 2004). Zudem wird die NER und hier vor allem die Induktion von XPC und XPA als „Back up"-Mechanismus für die BER diskutiert (Langie et al., 2007). Deshalb wurde die Induktion von NER-Proteinen auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Neben XPC und p48, für die p53 als wichtiger Transkriptionsfaktor fungiert, wurde auch XPA ausgewählt, welches p53-unabhängig transkribiert wird.

Der p53-Status der Zellen sowie die Stabilisierung von p53 (vgl. Abschnitt 5.5.2) wirkten sich auf die p53-abhängigen NER-Gene, *p48* und *XPC*, aus. Die basale Expression von *p48* lag in den p53-defizienten Zellen etwa 40 % niedriger. In den p53-profizienten Zellen wurde *p48* nach Natriumselenit-Inkubation induziert. Hinsichtlich Inkubationskonzentration und –zeit verlief die *p48*-Induktion weitestgehend analog zur Stabilisierung von p53. Nach 24 h stieg die Expression beginnend mit 5 µM Natriumselenit an und nahm bei 8 µM jedoch weiter, insgesamt auf das Zweifache der basalen Expression, zu. Nach 45 h Inkubation führten bereits niedrige Natriumselenitkonzentrationen zu einer geringen Zunahme an *p48*-mRNA, und ein starker Anstieg der Genexpression auf das Vierfache war ab 5 µM zu verzeichnen. Im Vergleich dazu hatte Natriumselenit keinen induzierenden Einfluss auf *p48* in der p53-defizienten Zelllinie. Eher zeigte sich eine marginale Repression (Abbildung 29).

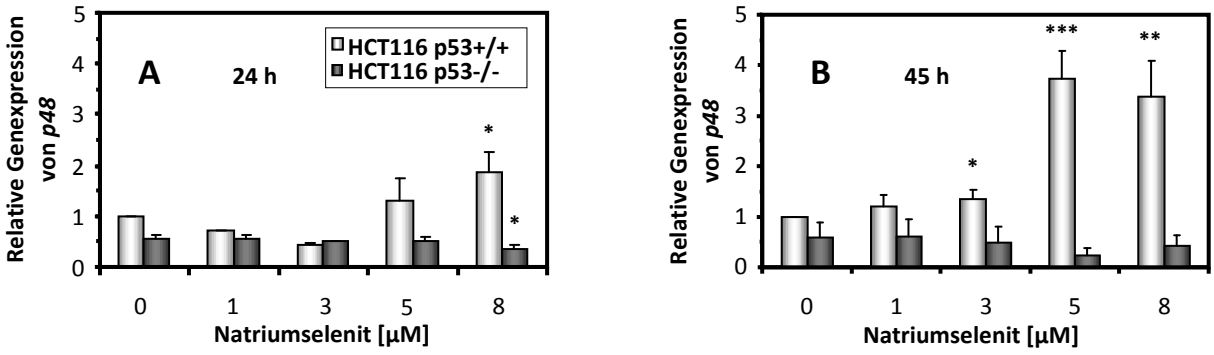


Abbildung 29: Genexpression von *p48* nach 24 h bzw. 45 h Inkubation mit Natriumselenit. P53-profiziente und p53-defiziente Zellen wurden 24 h (A) bzw. 45 h (B) mit Natriumselenit inkubiert. Mittels real time RT-PCR wurde die relative Genexpression bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen +SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

Im Falle von *XPC* gab es Unterschiede in der basalen Expression nach den verschiedenen Inkubationszeiten. Nach 24 h war der Grundgehalt an mRNA in der p53-profizienten Zelllinie

geringfügig höher, während die p53-defizienten Zellen nach 45 h eine etwa 1,5fach gesteigerte Genexpression aufwiesen. Diese Diskrepanz ist schwer zu erklären, vor allem da diese sich auch nicht auf die Proteinebene auszuwirken schien. Hier lag der Gehalt an XPC in den p53-profizienten Zellen jeweils geringfügig höher.

Die Induktion der Genexpression von *XPC* nach Natriumselenit-Inkubation zeigte analog zu *p48* ein vergleichbares Bild. Nach 24 h Inkubation stieg der mRNA-Gehalt in den p53-profizienten Zellen erst bei vergleichsweise hohen Konzentrationen an Natriumselenit. Bei längerer Inkubationszeit begann die Induktion bereits bei 3 µM Natriumselenit und stieg ab 5 µM sprunghaft auf das Vierfache der basalen Expression an. In den p53-defizienten Zellen blieb die Expression nach 24 h Inkubation konstant, nach 45 h war tendenziell eher ein repressiver Effekt durch Natriumselenit erkennbar (Abbildung 30 A, B).

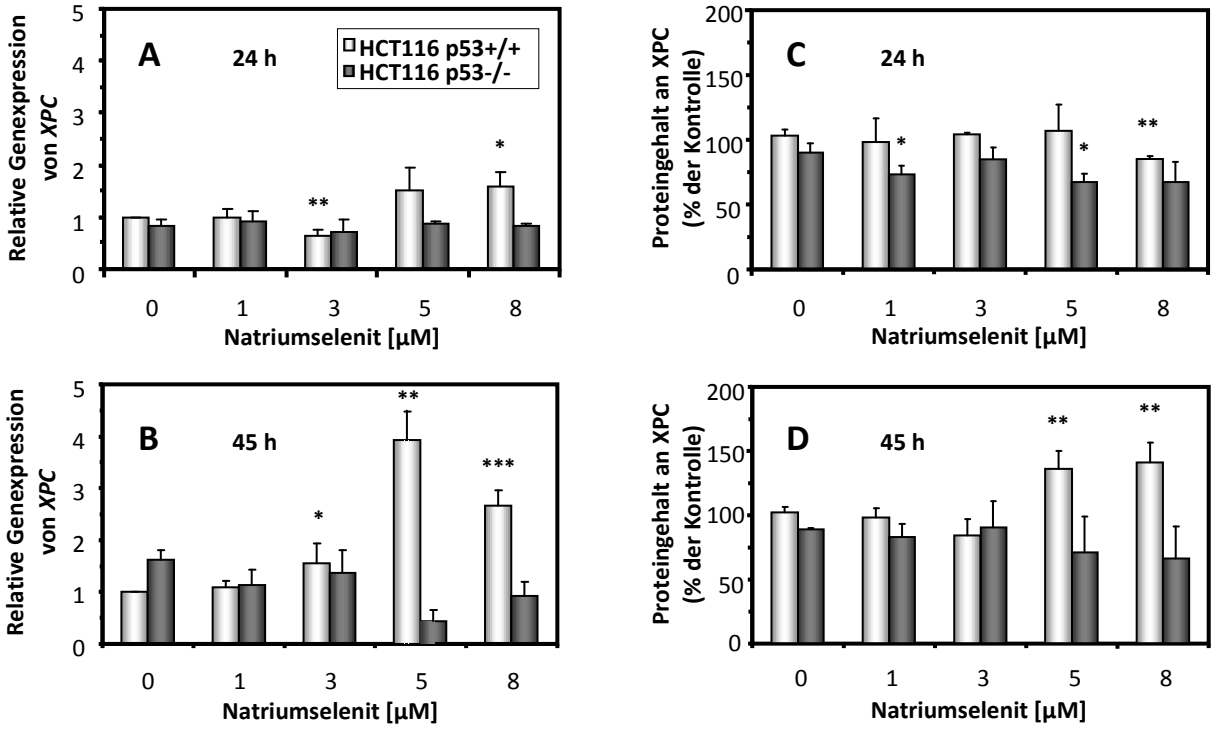


Abbildung 30: Genexpression und Proteingehalt von *XPC* nach 24 h bzw. 45 h Inkubation mit Natriumselenit. P53-profiziente und p53–defiziente Zellen wurden 24 h (A, C) bzw. 45 h (B, D) mit Natriumselenit inkubiert. Mittels real time RT-PCR wurde die relative Genexpression von *XPC* bestimmt (A, B). Der Proteingehalt wurde in Western Blot-Analysen ermittelt (C, D). Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

Die p53-abhängige Steigerung der Genexpression von *XPC* spiegelte sich nach 24 h nicht auf der Proteinebene wieder. Erst ab 45 h Inkubation nahm der Proteingehalt an XPC ab 5 µM Natriumselenit um den Faktor 1,5 zu. In der p53-defizienten Zelllinie kam es zu beiden

Zeitpunkten zu einer geringfügigen Senkung des Proteingehalt nach Natriumselenit-Exposition (Abbildung 30 C, D). Ein genereller Effekt auf die Genexpression wird jedoch ausgeschlossen, da die Bestimmung der Genexpression von *XPA*, welches p53-unabhängig reguliert wird, andere Ergebnisse brachte.

Die basale Expression von *XPA* war in den p53-defizienten Zellen höher als in den p53-profizienten Zellen. Dies wirkte sich gleichsinnig auf den basalen Proteingehalt aus. XPA wurde im Vergleich zu XPC und p48 durch Natriumselenit nicht p53-abhängig induziert. Nach 45 h Inkubation mit Natriumselenit blieb die Genexpression von *XPA* in den p53-profizienten Zellen konstant. In der p53-defizienten Zelllinie fiel der mRNA-Gehalt mit steigender Konzentration an Natriumselenit ab, jedoch nicht signifikant und nicht unter den Gehalt in der p53-profizienten Zelllinie. Ebenfalls war der Gehalt an XPA-Protein nach Inkubation mit Natriumselenit in den p53-defizienten Zellen jeweils höher. Nach 24 h Inkubation waren die Gehalte bis 5 µM Natriumselenit konstant und fielen bei 8 µM. Nach 45 h Inkubation war die Repression in beiden Zelllinien ausgeprägter (Abbildung 31).

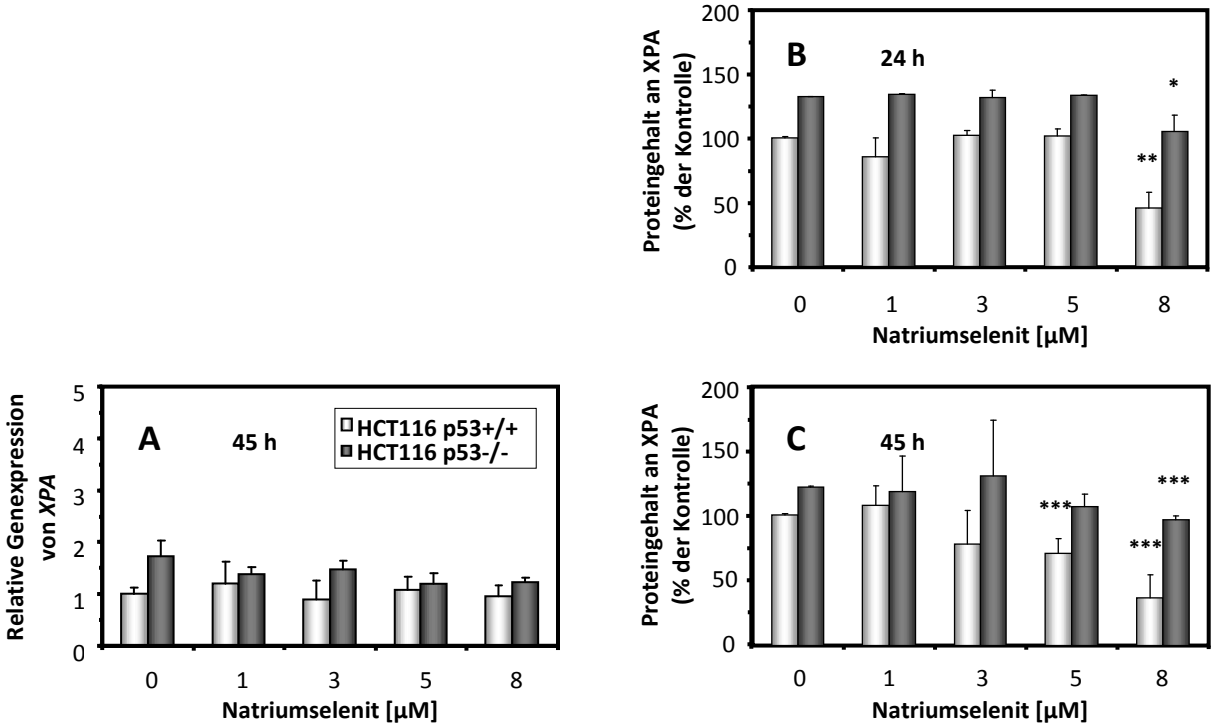


Abbildung 31: Genexpression und Proteingehalt von *XPA* nach 24 h bzw. 45 h Inkubation mit Natriumselenit. P53-profiziente und p53–defiziente Zellen wurden 24 h (B) bzw. 45 h (A, C) mit Natriumselenit inkubiert. Mittels real time RT-PCR wurde die relative Genexpression von *XPA* bestimmt (A). Der Proteingehalt wurde in Western Blot-Analysen ermittelt (B, C). Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

Selenomethionin induzierte weder p48 noch XPC p53-abhängig. Die Genexpression von *p48* und *XPC* blieb nach 24 h Inkubation in beiden Zelllinien relativ konstant. Daraufhin wurde der Proteingehalt an XPC erst nach 45 h bestimmt. Hier kam es nur marginal zu einer p53-unabhängigen Erhöhung. Im Falle von XPA hatte Selenomethionin in den p53-defizienten Zellen weder einen Einfluss auf die Genexpression nach 24 h bzw. auf den Proteingehalt nach 45 h. In der p53-profizienten Zelllinie war die Transkription ebenfalls nicht beeinflusst, während sich eine geringfügige Reduktion im Proteingehalt von XPA zeigte (Abbildung 32).

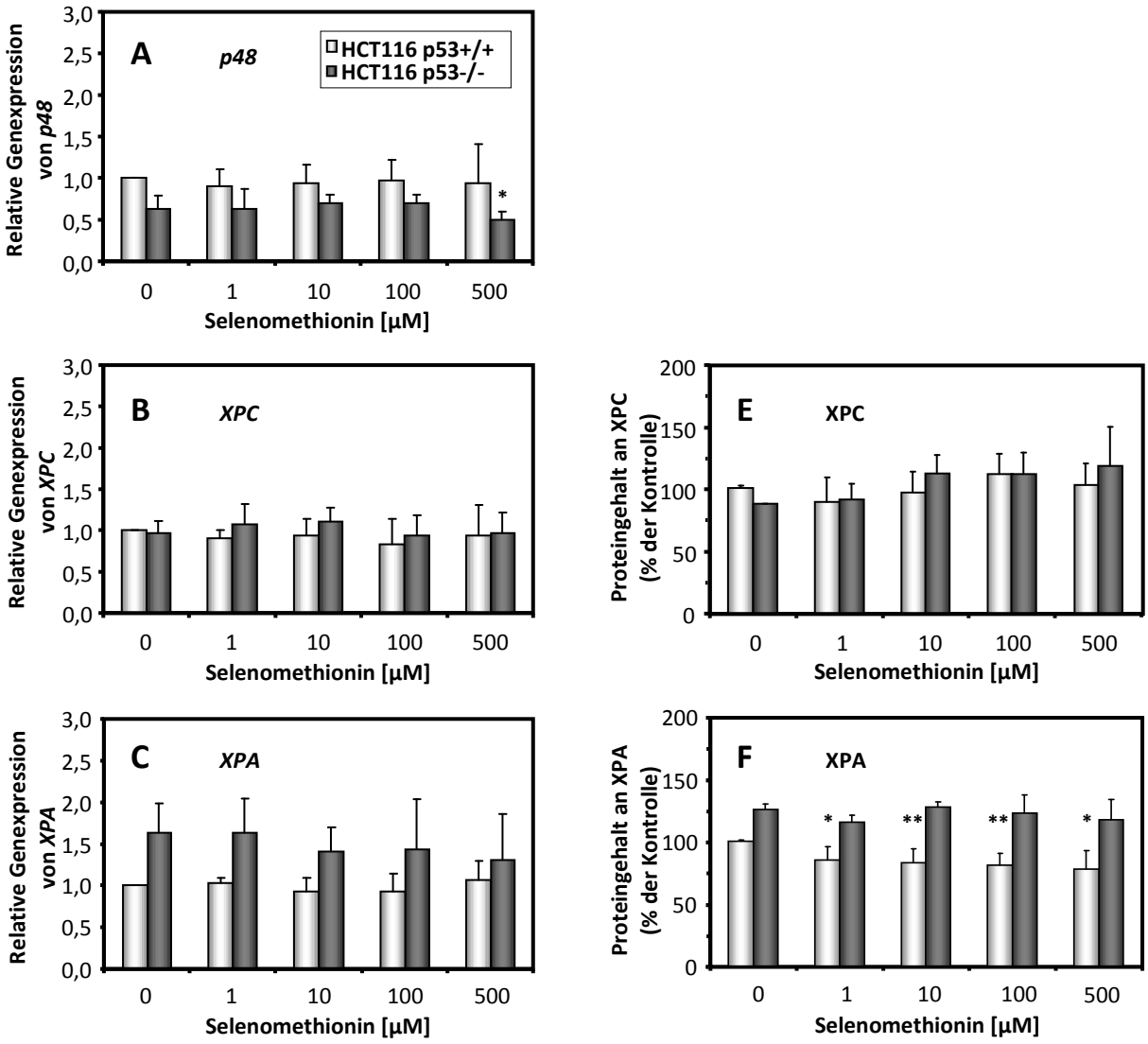


Abbildung 32: Genexpression und Proteingehalt von NER-Proteinen nach 24 h bzw. 45 h Inkubation mit Selenomethionin. P53-profiziente und p53–defiziente Zellen wurden 24 h (A, B, C) bzw. 45 h (D, E, F) mit Selenomethionin inkubiert. Mittels real time RT-PCR wurde die relative Genexpression von *p48*, *XPC* und *XPA* bestimmt (A, B, C). Der Proteingehalt von XPC und XPA wurde in Western Blot-Analysen ermittelt (D, E, F). Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

5.5.5 Bewertung der Ergebnisse

Die Akkumulation von DNA-Strangbrüchen war nur im Falle von Natriumselenit abhängig vom p53-Status der Zellen. Dabei konnte nur in den p53-defizienten Zellen bereits in nicht-zytotoxischen Konzentrationen an Natriumselenit hohe Gehalte an DNA-Strangbrüchen detektiert werde. Erst bei einer vergleichsweise hohen Konzentration wiesen beide Zelllinien gleichermaßen DNA-Strangbrüche und Fpg-sensitive Läsionen auf. In der Literatur finden sich Beispiele zur Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Natriumselenit in p53-profizienten und p53-defizienten Zellen. Kim et al. (2001) fanden in HL-60 Zellen (p53-defizient) nach 24 h Inkubation mit 20 µM Natriumselenit Einzel- und Doppelstrangbrüche. In murinen Brustkrebszellen (p53-Status nicht bekannt) wurden hohe Gehalte an DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen bereits nach 2 h Inkubation mit 5 µM Natriumselenit detektiert (Lu et al., 1995). In HeLa Hep-2 Zellen (p53-profizient) wurden DNA-Strangbrüche durch 5 µM und 50 µM Natriumselenit induziert, die zeitabhängig beginnend bei 6 h Inkubation zunahmen. Allerdings wurde in diesen drei Studien jeweils kein Fpg oder eine andere Glykosylase verwendet, so dass ausschließlich DNA-Strangbrüche aber keine DNA-Basenmodifikationen oder AP-Stellen detektiert werden konnten. In Arbeiten von Stewart et al. (1999) wurde zudem die oxidative Basenmodifikation 8-Hydroxydeoxyguanosin mittels HPLC-Methode nach Inkubation von murinen Keratinozyten (p53-profizient) mit 5 µM Natriumselenit nachgewiesen. Mechanistisch wird die DNA-schädigende Wirkung des Natriumselenits mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in Verbindung gebracht. So konnte der Gehalt an DNA-Strangbrüchen nach Vorinkubation mit MnTMPyP (Mn[III] Tetrakis[4-Benzoesäure] Porphyrin), einem Superoxid-Dismutase- und Katalase-Mimetic, gesenkt werden, während BSO (Buthioninsulfoximin), eine Glutathion-depletierende Substanz, diesen steigerte (Rudolf et al., 2008). Insgesamt wurde das Superoxidanion als Auslöser für die DNA-Schädigung identifiziert (Hu et al., 2006; Li et al., 2007). Studien unserer Arbeitsgruppe sprechen ebenfalls dafür, dass die DNA-Schädigung nicht auf einem direkten Mechanismus beruht, sondern auf eine ROS-Produktion während der Metabolisierung zurückzuführen ist. So konnten bei der Inkubation von isolierter PMII-DNA selbst bei Konzentrationen von 1000 µM Natriumselenit weder DNA-Strangbrüche noch Fpg-sensitive Läsionen detektiert werden (unpublizierte Daten).

Oxidative DNA-Schäden werden über die Basenexzisionsreparatur repariert. Unter normalen Bedingungen werden DNA-Einzelstrangbrüche relativ schnell repariert (Dally and Hartwig, 1997). Die gemessenen hohen DNA-Strangbruchgehalte in den p53-defizienten Zellen könnten demnach aus einer anhaltenden Schädigung durch die Natriumselenit-Exposition in Kombination mit einer weniger effizienten Reparatur resultieren. Die DNA-Strangbrüche

könnten dabei zum einen direkt induziert oder als Reparatur-Intermediate aus Fpg-sensitiven Läsionen gebildet worden sein. Folgende kinetische Untersuchungen können evtl. Aufschluss bringen.

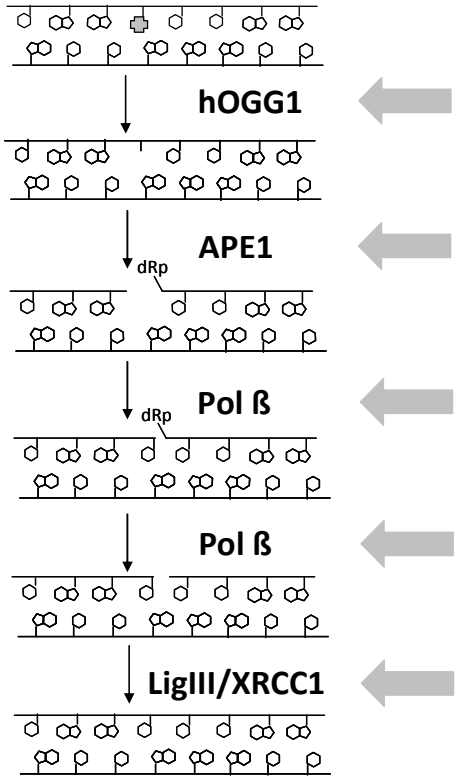
Um die protektive Rolle von p53 hinsichtlich der DNA-Schädigung durch Natriumselenit zu untersuchen, wurde zunächst die Expression der BER-Gene in den beiden Zelllinien verglichen. Interessanterweise war die basale Expression der an dem „short patch"-Reparaturweg beteiligten Proteine in der p53-defizienten Zelllinie höher. Dies deutet auf einen endogen erhöhten oxidativen Stress in Abwesenheit von p53 hin und unterstreicht die Funktion von p53 bei der Zellantwort bereits bei einem „steady state-Level" an oxidativen DNA-Schäden. Abweichend davon fanden Chatterjee et al. (2005), dass p53-profiziente HCT116 Zellen im Vergleich zur isogenen p53-defizienten Zelllinie sowohl eine höhere Expression an *hOGG1* als auch eine höhere Aktivität dieser Glykosylase aufweisen. Dies steht im Widerspruch zu den hier vorgestellten Ergebnissen sowie zu weiteren Studien unserer Arbeitsgruppe zur hOGG1-Aktivität. So hatten die p53-defizienten Zellen in einem Inzisionstest basal aber auch nach Inkubation mit Cadmium oder Kupfer jeweils eine höhere hOGG1-Aktivität als die p53-profizienten Zellen (Hamann, 2009; König, 2010).

In der p53-defizienten Zelllinie resultierten aus der Natriumselenit-Exposition eine Akkumulation von DNA-Strangbrüchen. Natriumselenit hatte in diesen Zellen jedoch keinen Einfluss auf die Expression von *Polß* und einen repressiven Einfluss insbesondere auf *hOGG1* und *APE1*. Im Folgenden wird diskutiert, ob eine Repression dieser beiden Gene nach Inkubation mit Natriumselenit zur Akkumulation von DNA-Strangbrüchen geführt haben könnte. Wenn Natriumselenit DNA-Strangbrüche induziert, kann eine Repression von *hOGG1* nicht zu deren Akkumulation führen, da hOGG1 nicht an deren Reparatur beteiligt ist. Sollten Fpg-sensitive Läsionen als Ursprungsschäden aufgetreten sein, würde man bei einer Repression von *hOGG1* eine Akkumulation von Fpg-sensitiven Läsionen nicht aber von Strangbrüchen erwarten. Im Gegensatz dazu gibt es zwei mögliche Mechanismen, die bei starker Repression von APE1 zur Akkumulation von DNA-Einzelstrangbrüchen führen. Der erste Mechanismus hängt mit der Lyase-Aktivität von hOGG1 zusammen. Die Lyase-Aktivität dieser bifunktionellen Glykosylase ist nur sehr schwach ausgeprägt, sodass AP-Stellen das Hauptprodukt darstellen. Erst bei fehlender APE1 öffnet hOGG1 den Strang via ß-Eliminierung und bildet dabei Enden, die zunächst von APE1 bereinigt werden müssen, bevor sie von Polß prozessiert werden können (zusammengefasst in Hedge et al., 2008). Auf ähnliche Weise akkumulieren ROS-induzierte DNA-Strangbrüche in Abwesenheit von APE1, da diese oft unbereinigte 3'-Enden aufweisen (Izumi et al., 2000). Die Repression von *APE1* in den p53-defizienten Zellen erklärt die starke Akkumulation der DNA-Strangbrüche jedoch nicht vollständig, da die Genexpression trotz Repression in den p53-defizienten Zellen noch über oder auf Höhe der Expression in den p53-profizienten Zellen lag. Der repressive Einfluss

von Natriumselenit in den p53-defizienten Zellen auf *LigIII* und *XRCC1* war zu gering, um hier den Grund für die unterschiedlichen Gehalte an DNA-Schäden in den beiden Zelllinien zu finden.

In der p53-profizienten Zelllinie blieb die Genexpression von *hOGG1*, *APE1*, *LigIII* und *XRCC1* nach Natriumselenit-Exposition weitestgehend konstant. Dabei wäre ein repressiver Einfluss auf *APE1* in der p53-profizienten Zellen eher zu erwarten gewesen, da p53 unter zytotoxischen Bedingungen ein negativer Regulator von APE1 auf der Genexpressionsebene ist (Zaky et al., 2008). Dies wird als Mechanismus diskutiert, über den p53 Apoptose einleitet. Bei der Reparatur von DNA-Strangbrüchen kann unter gewissen Umständen auch Polß ein limitierender Faktor sein (Izumi et al., 2000). Ein heterozygoter Polß-„Knockout" in Mäusen führt zur Akkumulation von DNA-Strangbrüchen (Cabelof et al., 2002). Im Gegensatz zu den p53-defizienten Zellen zeigte sich in den p53-profizienten Zellen ab 3 µM Natriumselenit ein induktiver Einfluss auf die Genexpression von *Polß*. Trotzdem wurde in den p53-profizienten Zellen auf der Proteinebene keine Zunahme an Polß detektiert, sondern vielmehr eine Abnahme in beiden Zelllinien gleichermaßen. Dies überrascht, da aus der Literatur bekannt ist, dass p53 Polß auf der Proteinebene stabilisiert (Seo et al., 2002) und generell der Gehalt an Polß nach oxidativer DNA-Schädigung steigt (Cabelof et al., 2002). Trotzdem ist es möglich, dass die p53-profizienten Zellen unter unseren Versuchsbedingungen eine höhere Polß-Aktivität aufgewiesen haben, da p53 durch direkte Interaktion die DNA-Bindungsfähigkeit von Polß verbessert (Cabelof et al., 2002). In Abbildung 33 sind Einflüsse von p53 auf Gene bzw. Proteine der BER, die in der Literatur beschrieben werden, zusammengefasst und unseren Ergebnissen nach Natriumselenit-Exposition gegenüber gestellt.

Interessant könnte auch die Rolle von GADD45 sein, einem „down stream"-Gen von p53, welches jedoch auch p53-unabhängig transkribiert werden kann. GADD45 wird vor allem mit der Zellzykluskontrolle (Smith et al., 1994) aber auch mit der NER in Verbindung gebracht (zusammengefasst in Zhan, 2005). Weniger bekannt ist die Funktion von GADD45 in der BER. So weisen GADD45-defiziente Zellen eine verlangsamte BER auf. Dies wird z. B. darauf zurückgeführt, dass GADD45 die Funktionsfähigkeit von APE1 positiv beeinflussen soll (Jung et al., 2007). Die Konsequenzen eines inaktivierenden Einflusses auf APE1 wurden bereits diskutiert. Die Genexpressionsanalysen zeigten, dass *GADD45* auch von den p53-defizienten Zellen nach Natriumselenit-Exposition induziert werden konnte, die Expression nach 45 h Inkubation mit 3 µM oder 5 µM Natriumselenit jedoch in den p53-defizienten Zellen deutlich höher lag (siehe Abschnitt 5.6.2).



Literatur	Ergebnisse
➢ P53-abhängiger Basallevel *(Chatterjee et al., 2005)*	Basallevel in den p53-defizienten Zellen höher; Einfluss von Natriumselenit: p53-unabhängige Repression
➢ Aktivität unabhängig vom p53-Status *(Seo et al., 2002)* ➢ P53 als negativer Regulator auf der Genebene (Zaky et al., 2008) ➢ Inaktivierung führt zu Einzelstrangbrüchen (Izumi et al., 2000)	Basallevel in den p53-defizienten Zellen höher; Einfluss von Natriumselenit: Repression nur in den p53-defizienten Zellen
➢ P53-abhängige Stabilisierung des Proteins (Seo et al., 2002) ➢ Proteingehalt steigt nach oxidativer DNA-Schädigung (Cabelof et al., 2002) ➢ Direkte Interaktion mit p53 verbessert DNA-Bindung (Zhou et al., 2001)	Basallevel in den p53-defizienten Zellen höher; Einfluss von Natriumselenit: Induktion auf mRNA-Ebene nur in der p53-profizienten Zelllinie; jedoch keine Induktion auf der Proteinebene, vielmehr Repression in beiden Zelllinien
	Basallevel in den p53-defizienten Zellen jeweils höher; Einfluss von Natriumselenit: jeweils konstante Expression in den p53-profizienten Zellen; jeweils marginale Repression in den p53-defizienten Zellen

Abbildung 33: Einfluss von p53 auf die Gene bzw. Proteine der BER und Zusammenfassung der Ergebnisse nach Natriumselenit-Exposition.

Während die BER für die Reparatur oxidativer DNA-Schäden verantwortlich ist, repariert die NER Helix-verzerrende DNA-Schäden. Trotzdem werden NER-Proteine wie XPC, XPA und ERCC4 durch oxidativen Stress hochreguliert (Langie et al., 2007). Zudem zeigte sich ein Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus im *XPA*-Gen und dem erhöhten Auftreten von oxidativen DNA-Schäden bei Asbest-exponierten Arbeitern (Dušinaká et al., 2006). Für XPC wurde gezeigt, dass es die Aktivität von hOGG1 steigert, wahrscheinlich indem es die Glykosylase nach dem Ausschneiden der Base von der AP-Stelle verdrängt und somit ihren Umsatz steigert (D'Errico et al., 2006). Da die NER deshalb als „Back up"-Mechanismus für die BER diskutiert wird, wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss von Natriumselenit auf die Expression von NER-Genen in den beiden HCT116 Zelllinien untersucht. Es zeigte sich, dass die Genexpression von *XPC* und *p48* tatsächlich p53-abhängig induziert wurde. Dies wirkte sich gleichsinnig auf den Proteingehalt von XPC aus. Dabei war die Induktion dieser Gene, für die p53 ein wichtiger Transkriptionsfaktor darstellt, auch begleitet von einer Stabilisierung von p53 auf der Proteinebene. Im Vergleich wurde unabhängig vom p53-Status der Zellen

keine Induktion von *XPA* detektiert. Neben dem oben diskutierten Einflüssen auf APE1, Polß und GADD45 könnten somit die p53-abhängigen NER-Gene eine Rolle bei der unterschiedlichen BER-Kapazität in den beiden HCT116 Zelllinien gespielt haben. Dies könnte z. B. anhand von XPC-defizienten Zellen überprüft werden.

Im Vergleich zum Natriumselenit akkumulierten beide Zelllinien nach Inkubation mit Selenomethionin gleichermaßen erst bei vergleichsweise hohen Konzentrationen DNA-Strangbrüche. Aufgrund der gleichen prooxidativen Zwischenmetabolite ist diese DNA-Schädigung, die jedoch geringer ist als beim Natriumselenit nicht überraschend und wurde in der Literatur bereits beschrieben (zusammengefasst in Letavayová et al., 2006). Interessant ist hingegen, dass das Auftreten von DNA-Strangbrüchen unabhängig vom p53-Status ist, zumal p53 die BER-Kapazität generell erhöht (Zhou et al., 2001) und DNA-Strangbrüche ein sehr starker Induktor von p53 sind (Nelson et al., 1994). Selenomethionin führte in unseren Versuchen auch tatsächlich zur Stabilisierung von p53. Dies wurde auch von Goel et al. (2006) nach 72 h Inkubation in den von uns verwendeten HCT116 Zellen beschrieben. Deshalb kann abschließend auch nicht erklärt werden, warum nicht auch im Falle von Selenomethionin die DNA-Strangbrüche vermehrt in der p53-defizienten Zelllinie auftraten. Überraschend war hier zudem, dass Selenomethionin p53-unabhängig den Proteingehalt an Polß steigerte, beginnend bei der Konzentration, bei der auch die DNA-schädigende Wirkung eintrat. Hingegen wird in der Literatur beschrieben, dass die Stabilisierung von Polß auf der Proteinebene durch p53 verbessert wird (Seo et al., 2002). Bezüglich der NER-Gene bzw. -Proteine hatte Selenomethionin unabhängig vom p53-Status der Zellen keinen induzierenden Einfluss.

In Natriumselenit liegt das Selenatom im Vergleich zum Selenomethionin reduzierbar vor. Es wurde als weitere reduzierbare Selenverbindung die Phenylseleninsäure hinsichtlich ihrer DNA-schädigenden Wirkung in den beiden Zelllinien untersucht. Auch diese Verbindung generiert DNA-Strangbrüche weitestgehend unabhängig vom p53-Status der Zellen. Die Gehalte an DNA-Strangbrüchen lagen zwar in den p53-defizienten Zellen leicht über denen der p53-profizienten Zellen, traten jedoch jeweils bei den gleichen Inkubations-konzentrationen auf. Zur Induktion von DNA-Schäden durch Phenylseleninsäure ist der Literatur nichts beschrieben.

5.6 Zellzykluskontrolle

Die Zellzykluskontrolle ist ein wichtiger Prozess bei der Erhaltung der genomischen Stabilität. Dabei wird p53 eine Rolle in der Induktion von Zellzyklusarresten in der G1- und G2-Phase zugeschrieben, während seine Beteiligung bei einer Arretierung in der S-Phase weniger ausgeprägt zu sein scheint (siehe Abschnitt 2.2.3). In dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Selenverbindungen sowohl auf die Zellzykluskontrolle als auch auf die Induktion der Zellzykluskontrollproteine p21 und GADD45 (Genexpression und Proteinebene) in p53-profizienten und p53-defizienten HCT116 Zellen untersucht. Durch die Inhibierung verschiedener Cyclin-abhängiger Kinasen führt p21 zur Arretierung der Zellen in der G1- bzw. G2-Phase. P21 kann zudem infolge der inhibierenden Interaktion mit PCNA einen S-Phase-Arrest induzieren. Über vergleichbare Mechanismen wird der Zellzyklus durch GADD45 in der S- bzw G2-Phase arretiert, während die Rolle von GADD45 bei der Induktion eines G1-Phase-Arrest mechanistisch noch unklar ist (vgl. Abschnitt 2.2.3).

5.6.1 Zellzyklusuntersuchungen mittels Durchflusszytometer

Der Einfluss von Natriumselenit auf den Zellzyklus war weitestgehend abhängig vom p53-Status der HCT116 Zellen. So induzierten 3 – 6 µM Natriumselenit in den p53-profizienten Zellen nach 24 h Inkubation signifikant einen G1-Phase-Arrest, während in diesem Konzentrationsbereich die Zellzyklusverteilung der p53-defizienten Zellen unbeeinflusst war. Erst bei der vergleichsweise hohen Konzentration von 8 µM Natriumselenit arretierten beide Zelllinien p53-unabhängig in der S-Phase (Abbildung 34). Somit traten die Zellzyklusarreste nach 24 h Inkubation in beiden Zelllinien jeweils mit beginnender Zytotoxizität des Natriumselenits ein (siehe Abschnitt 5.1.1).
Nach 45 h Inkubation war der G1-Phase-Arrest in den p53-profizienten Zellen nicht mehr signifikant ausgeprägt. Neben einer leichten Arretierung in der S-Phase zeigte sich vielmehr ein p53-abhängiger G2-Phase-Arrest bei vergleichsweise hohen Konzentrationen an Natriumselenit. In der p53-defizienten Zelllinie zeigte sich nach der längeren Inkubationszeit eine Verstärkung des S-Phase-Arrests (Abbildung 35).
Im Vergleich dazu war der Einfluss von Selenomethionin weniger stark vom p53-Status der HCT116 Zellen abhängig. Nach 24 h Inkubation führte Selenomethionin in nicht-zytotoxischen Konzentrationen nicht zur Induktion von Zellzyklusarresten. Erst über 250 µM Selenomethionin wurde die Zellzyklusverteilung in beiden Zelllinien beeinflusst. So kam es p53-unabhängig zur Depletion der S-Phase und gleichzeitig zu G1-und G2-Phase-Arresten,

wobei der G1-Phase-Arrest in der p53-profizienten Zelllinie stärker ausgeprägt war und die p53-defizienten Zellen vor allem in der G2-Phase arretierten (Abbildung 36).

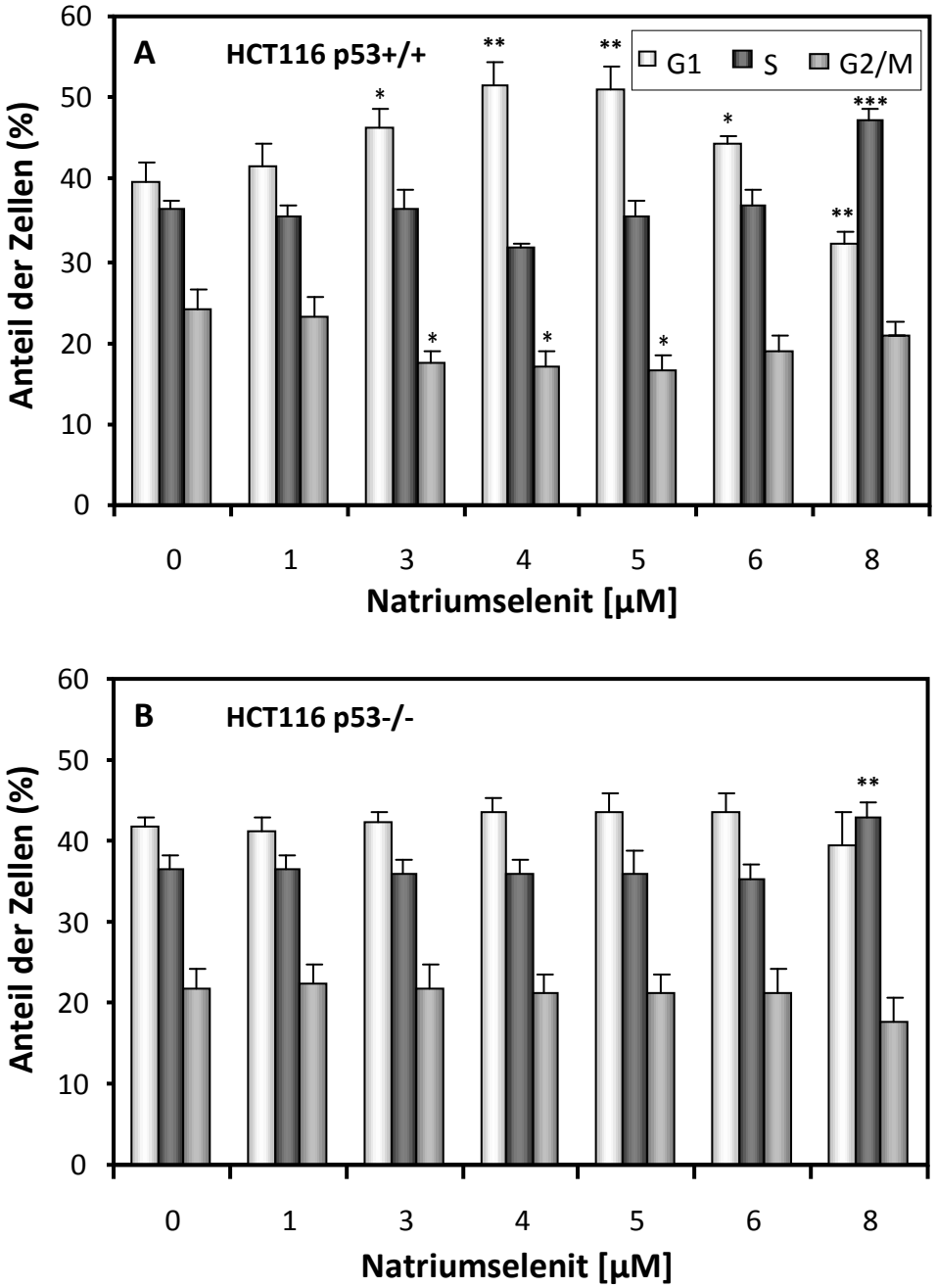


Abbildung 34: Zellzyklusverteilung nach Inkubation mit Natriumselenit nach 24 h Inkubation. P53-profiziente (A) und p53–defiziente (B) Zellen wurden 24 h mit Natriumselenit inkubiert. Am Durchflusszytometer wurde der Anteil der Zellen in der G1-, S- bzw. G2/M-Phase bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

Nach 45 h Inkubation fiel der Einfluss von Selenomethionin auf den Zellzyklus jeweils geringer aus. In beiden Zelllinien war weiterhin der Anteil der Zellen in der S-Phase gesenkt, wobei dieser Effekt in den p53-defizienten Zellen nicht mehr signifikant war. Zudem zeigte sich in beiden Zelllinien ein leichter G2-Arrest (Abbildung 37).

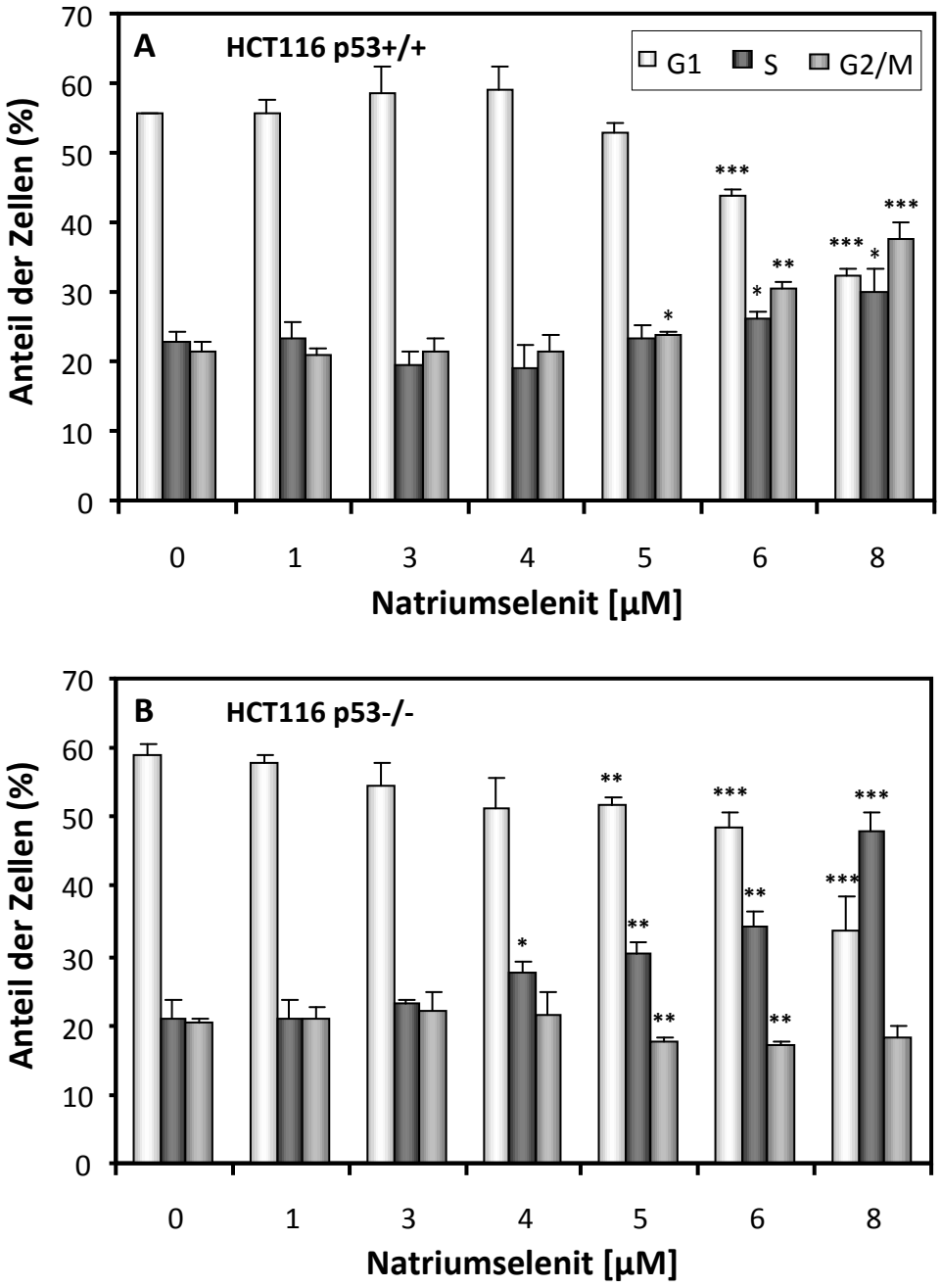


Abbildung 35: Zellzyklusverteilung nach Inkubation mit Natriumselenit nach 45 h Inkubation. P53-profiziente (A) und p53–defiziente (B) Zellen wurden 45 h mit Natriumselenit inkubiert. Am Durchflusszytometer wurde der Anteil der Zellen in der G1-, S- bzw. G2/M-Phase bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

Nach 45 h wurde jeweils eine Zunahme der Kontrollzellen in der G1-Phase detektiert. Dies ist wahrscheinlich auf den Übergang der Zellen in die G0-Phase nach dieser verhältnismäßig langen Wachstumszeit zurückzuführen.

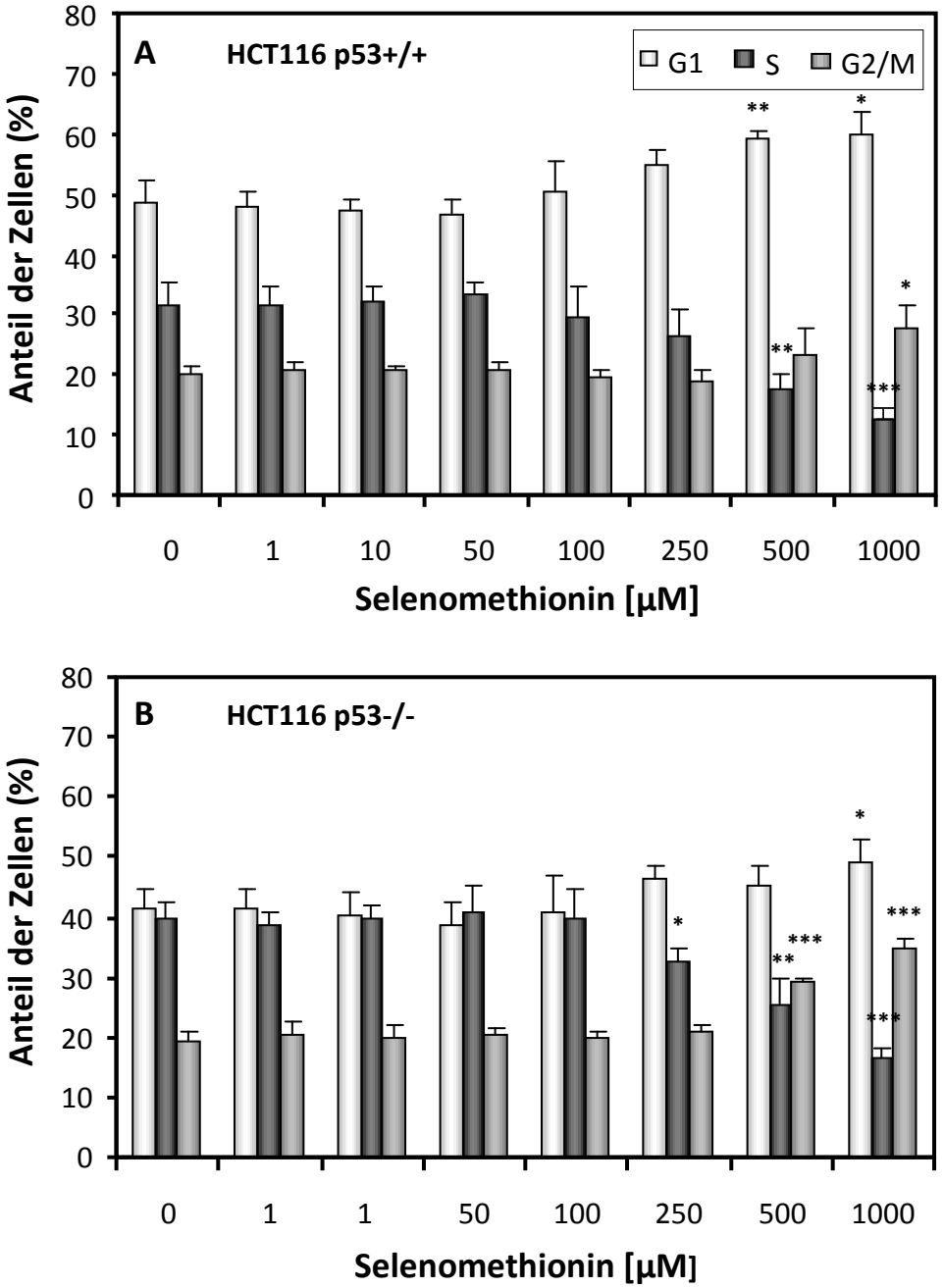


Abbildung 36: Zellzyklusverteilung nach Inkubation mit Selenomethionin nach 24 h Inkubation. P53-profiziente (A) und p53–defiziente (B) Zellen wurden 24 h mit Selenomethionin inkubiert. Am Durchflusszytometer wurde der Anteil der Zellen in der G1-, S- bzw. G2/M-Phase bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

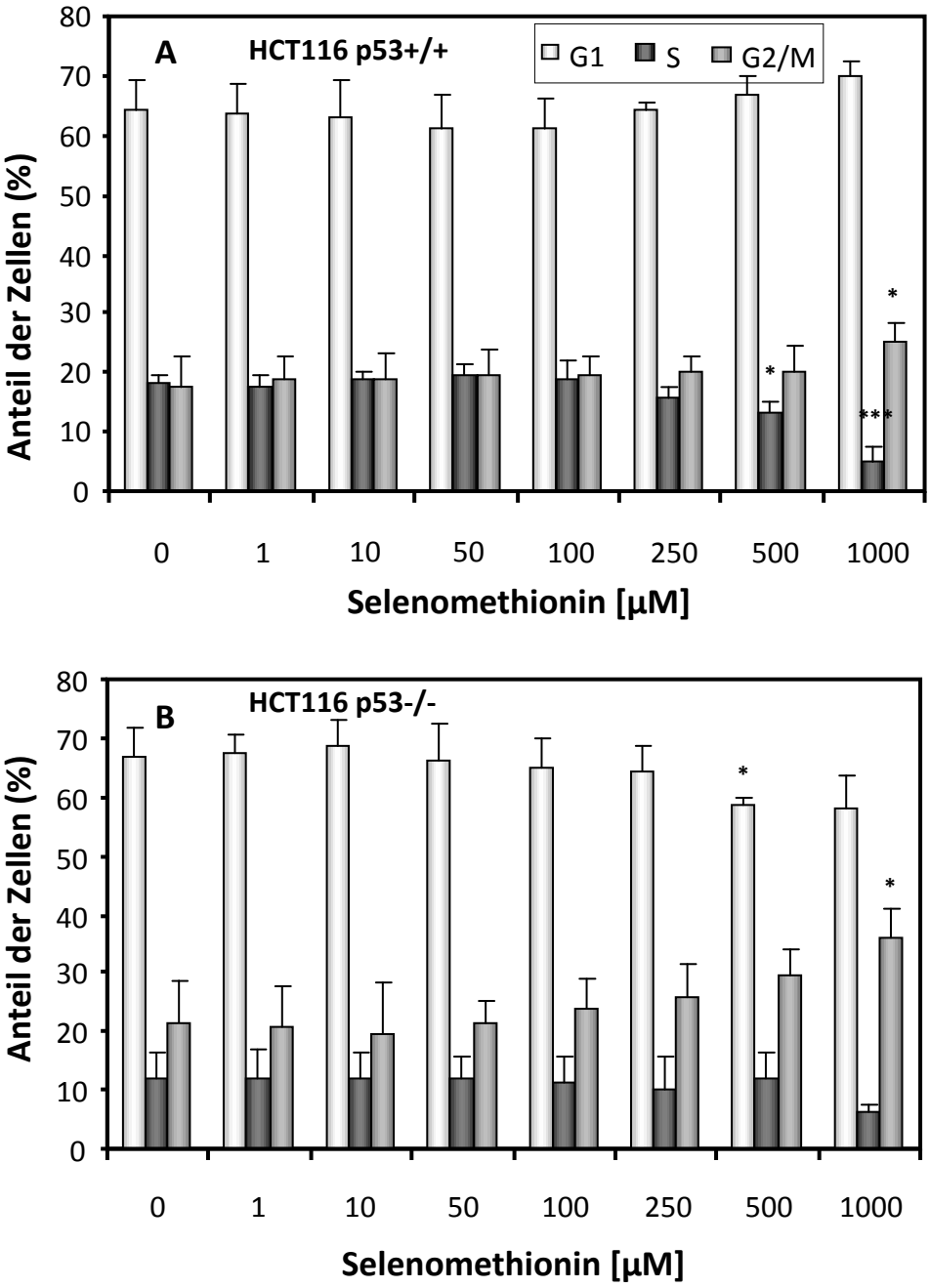


Abbildung 37: Zellzyklusverteilung nach Inkubation mit Selenomethionin nach 45 h Inkubation. P53-profiziente (A) und p53–defiziente (B) Zellen wurden 45 h mit Selenomethionin inkubiert. Am Durchflusszytometer wurde der Anteil der Zellen in der G1-, S- bzw. G2/M-Phase bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

Nach 24 h Inkubation führten 10 µM Phenylseleninsäure zu Änderungen im Zellzyklus beider Zelllinien: Während die p53-profizienten Zellen einen S-Phase-Arrest induzierten, arretierten die p53-defizienten Zellen vielmehr in der G2-Phase (Abbildung 38). Im Vergleich dazu

induzierten 45 h Inkubation p53-unabhängig einem leichten S-Phase- und G2-Phase-Arrest (Abbildung 39).

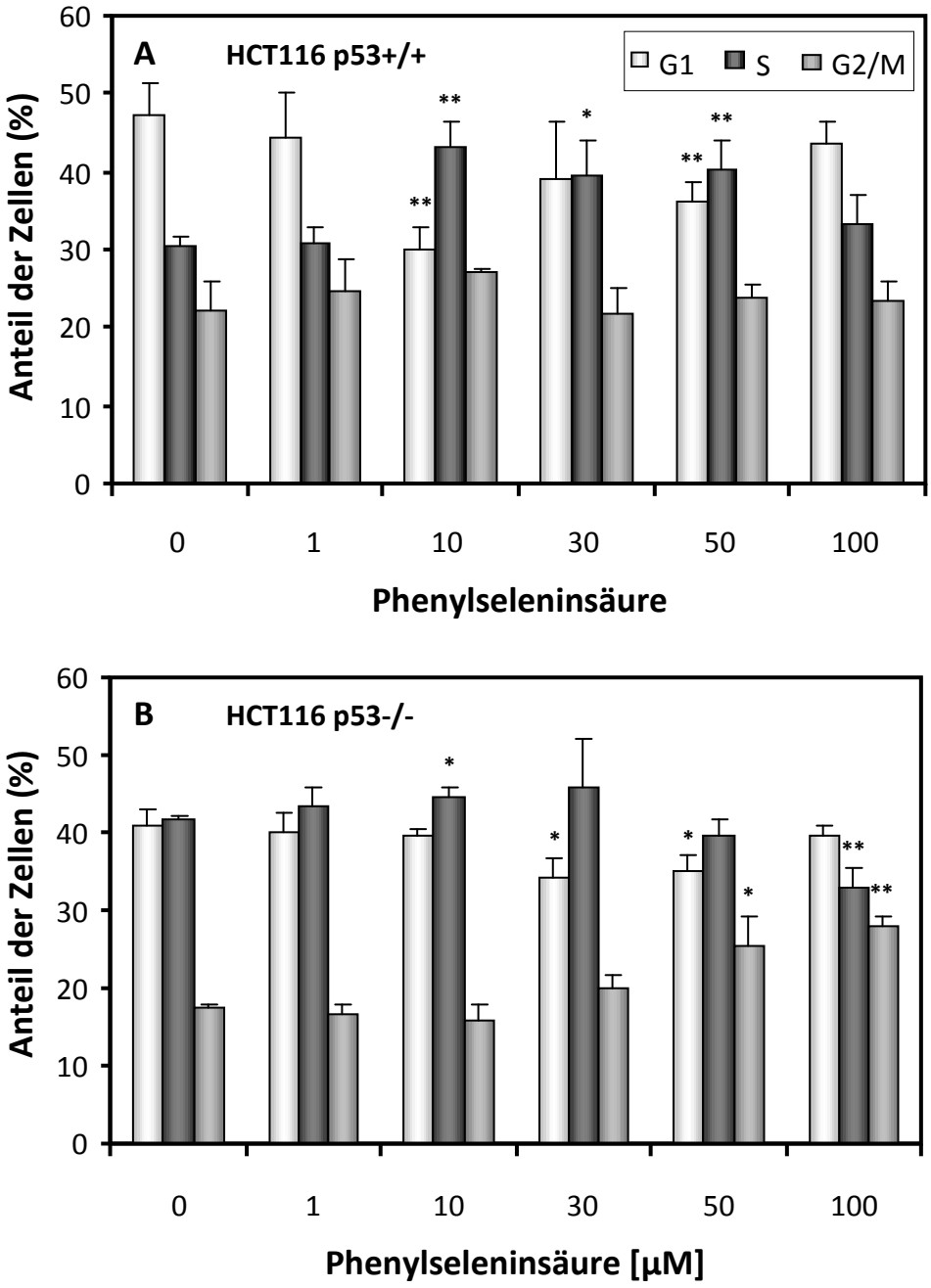


Abbildung 38: Zellzyklusverteilung nach Inkubation mit Phenylseleninsäure nach 24 h Inkubation. P53-profiziente (A) und p53–defiziente (B) Zellen wurden 24 h mit Phenylseleninsäure inkubiert. Am Durchflusszytometer wurde der Anteil der Zellen in der G1-, S- bzw. G2/M-Phase bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

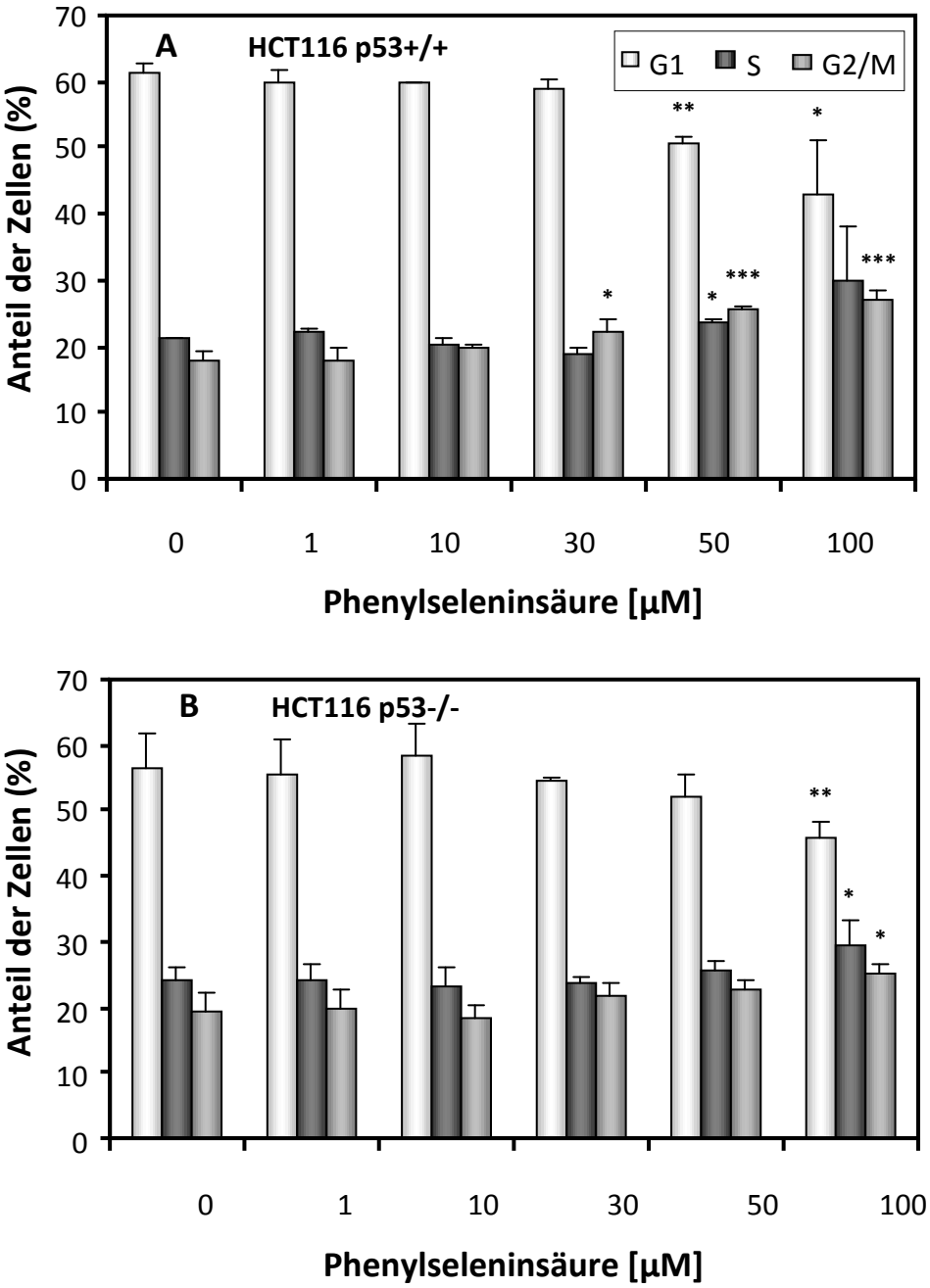


Abbildung 39: Zellzyklusverteilung nach Inkubation mit Phenylseleninsäure nach 45 h Inkubation. P53-profiziente (A) und p53–defiziente (B) Zellen wurden 45 h mit Phenylseleninsäure inkubiert. Am Durchflusszytometer wurde der Anteil der Zellen in der G1-, S- bzw. G2/M-Phase bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

5.6.2 Genexpression und Proteingehalt von Zellzykluskontroll-proteinen

Aufgrund der Bedeutung von p21 für die Zellzykluskontrolle wurde seine Induktion in Abhängigkeit vom p53-Status der Zellen betrachtet. Die basale Expression von p21 war in den p53-profizienten und p53-defizienten HCT116 Zellen unterschiedlich ausgeprägt. So fand sich in den p53-defizienten Zellen nur ein Drittel an p21-mRNA verglichen mit den p53-profizienten Zellen. Auf der Proteinebene zeigte sich ein ähnliches Bild (siehe Abbildung 40).

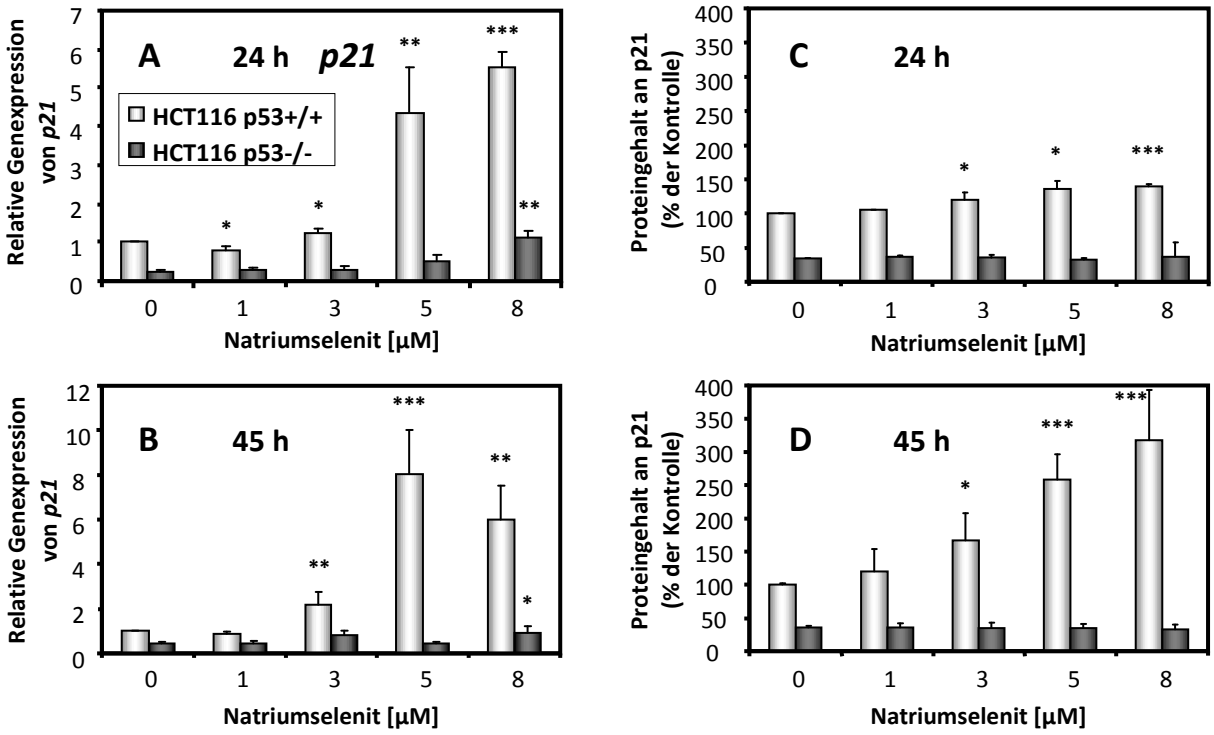


Abbildung 40: Genexpression und Proteingehalt von *p21* nach 24 h bzw. 45 h Inkubation mit Natriumselenit. P53-profiziente und p53–defiziente Zellen wurden 24 h (A, C) bzw. 45 h (B, D) mit Natriumselenit inkubiert. Mittels real time RT-PCR wurde die relative Genexpression von *p21* bestimmt (A, B). Der Proteingehalt wurde in Western Blot-Analysen ermittelt (C, D). Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

Zudem war auch die Induktion von p21 nach Inkubation mit Natriumselenit p53-abhängig. In der p53-profizienten Zelllinie stieg die Expression von p21 ab 5 µM Natriumselenit nach 24 h Inkubation stark an (4,4-fach). Zwar nahm auch in der p53-defizienten Zelllinie die Expression nach Natriumselenit-Inkubation zu, stieg jedoch nur auf die basale Expression der p53-profizienten Zellen (Abbildung 40 A). Auf der Proteinebene zeigte sich in p53-

profizienten Zellen zu diesem Zeitpunkt eine leichte Zunahme an p21 um z. B. 35 % der Kontrolle bei einer Inkubationskonzentration von 5 µM Natriumselenit, während der p21-Gehalt in den p53-defizienten Zellen konstant blieb (Abbildung 40 C).

Nach 45 h Inkubation stieg der p21-mRNA-Gehalt bereits deutlich bei 3 µM Natriumselenit und die Expression bei 5 µM Natriumselenit war auf das 8,1-fache gesteigert (Abbildung 40 B). Ein Rückgang der relativen Expression bei 8 µM Natriumselenit kann auf die hochzytotoxischen Bedingungen zurückgeführt werden. Aus der Induktion von p21 auf der Genexpressionsebene resultierte ein starker Anstieg des Proteingehaltes bereits bei vergleichsweise niedrigen Konzentrationen an Natriumselenit. Beispielsweise enthielten die p53-profizienten Zellen nach 45 h Inkubation mit 5 µM Natriumselenit 2,5mal mehr p21 als Kontrollzellen (Abbildung 40 D). In der p53-defizienten Zelllinie wurde nach 45 h Inkubation mit Natriumselenit erneut nur eine geringfügige Induktion von p21 detektiert, die sich wiederum nicht auf eine Steigerung des Proteingehaltes auswirkte (siehe Abbildung 40 B, D).

Verglichen mit p21 schien GADD45 zum Teil auch stark über p53-unabhängige Mechanismen transkriptionell reguliert zu sein. Z. B. war die basale Expression in beiden Zelllinien vergleichbar (siehe Abbildung 41 und 42 C). Die Induktion von *GADD45* nach Inkubation mit Natriumselenit war in p53-profizienten Zelllinie zwar stärker ausgeprägt, jedoch fiel der Unterschied zwischen den beiden Zelllinien deutlich geringer aus als bei der Induktion von p21. Bei hochzytotoxischen Inkubationsbedingungen (8 µM Natriumselenit, 45 h) fand sich in den p53-defizienten Zellen sogar eine höhere Expression an *GADD45* (Abbildung 41).

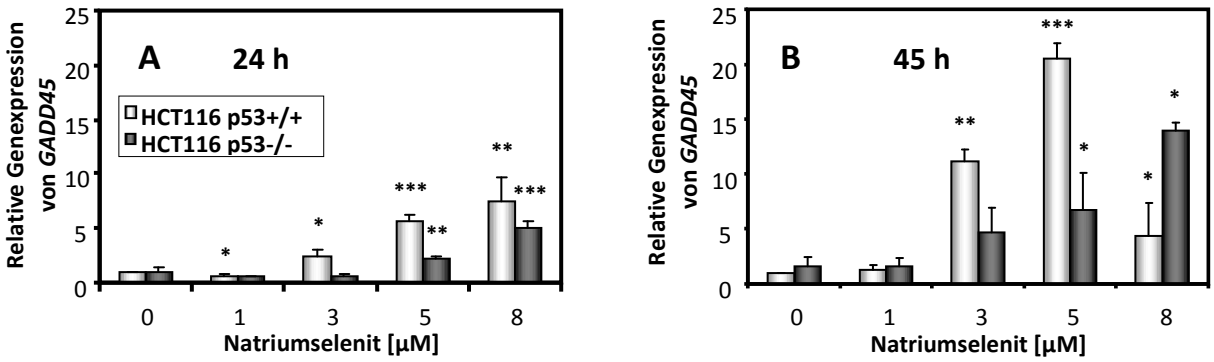


Abbildung 41: Genexpression von *GADD45* nach Inkubation mit Natriumselenit. P53-profiziente und p53–defiziente Zellen wurden 24 h (A) bzw. 45 h (B) mit Natriumselenit inkubiert. Mittels real time RT-PCR wurde die relative Genexpression von *p21* bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

Im Vergleich zum Natriumselenit führte Selenomethionin in sehr viel geringerem Maße zur Induktion der beiden Zellzykluskontrollgene. Selbst zytotoxische Konzentrationen an Selenomethionin steigerten nach 24 h Inkubation die Genexpression von p21 in der p53-profizienten Zelllinie nicht. In den p53-defizienten Zellen kam es zwar zu einer Verdoppelung des mRNA-Gehaltes, welcher jedoch aufgrund der niedrigen basalen Expression weiterhin noch unter dem basalen mRNA-Gehalt der p53-profizienten Zellen lag (Abbildung 42 A). Da nach 24 h Inkubation demnach keine Auswirkungen auf die Proteinebene zu erwarten waren, wurden Western Blot-Analysen erst nach 45 h Inkubation mit Selenomethionin durchgeführt. Hier zeigte sich eine deutliche Zunahme des p21-Gehaltes in den p53-profizienten Zellen sowie eine marginale Steigerung in der p53-defizienten Zelllinie (Abbildung 42 B). Im Falle von GADD45 verdoppelte sich die relative Genexpression bei vergleichsweise hohen Konzentrationen an Selenomethionin nach 24 h Inkubation. Der Effekt schien in der p53-defizienten Zelllinie bei etwas niedrigeren Konzentrationen einzusetzen und geringfügig stärker ausgeprägt zu sein (Abbildung 42 C).

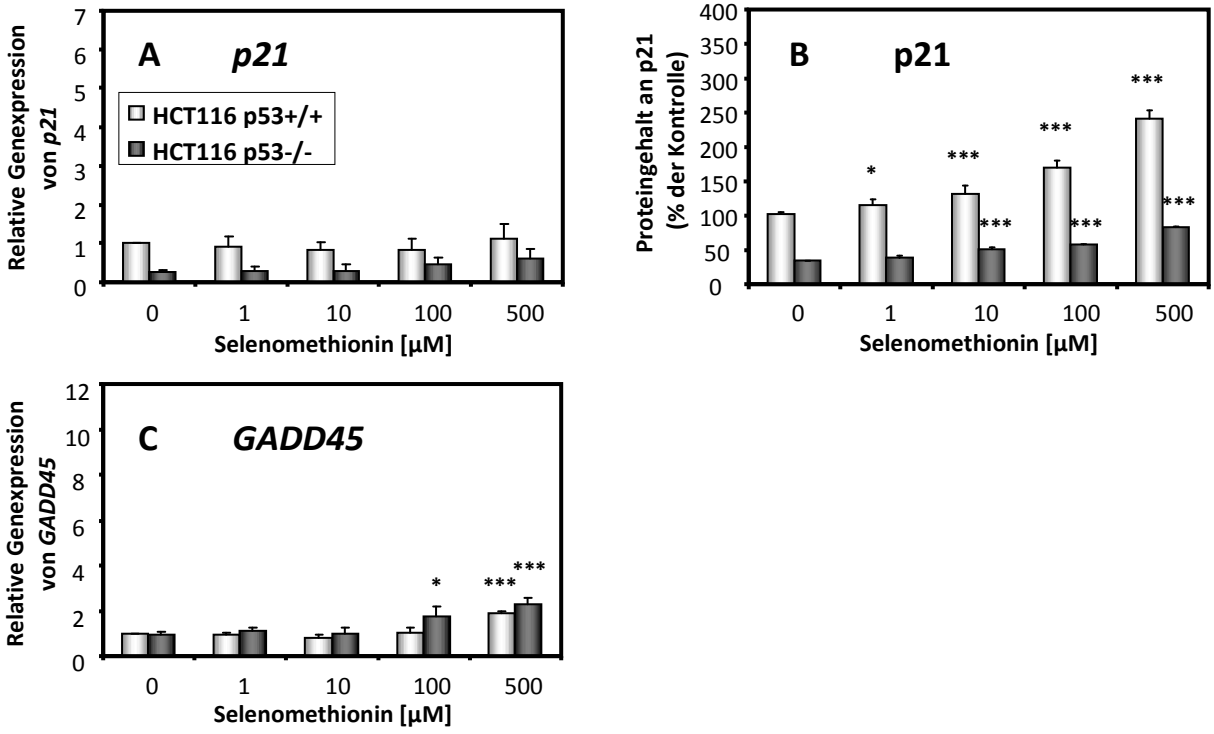


Abbildung 42: Genexpression und Proteingehalt von p21 und GADD45 nach Inkubation mit Selenomethionin. P53-profiziente und p53–defiziente Zellen wurden 24 h (A, C) bzw. 45 h (B) mit Selenomethionin inkubiert. Mittels real time RT-PCR wurde die relative Genexpression von *p21* (A) und *GADD45* (C) bestimmt. Der Proteingehalt von p21 wurde in Western Blot-Analysen ermittelt (B). Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

5.6.3 Bewertung der Ergebnisse

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Natriumselenit im Vergleich zu Selenomethionin die Zellzykluskontrolle p53-abhängig beeinflusst. Je nach Inkubationszeit wurden in den p53-profizienten Zellen durch Natriumselenit G1- bzw. G2-Phase-Arreste induziert, während erst in vergleichsweise hohen Konzentrationen p53-unabhängige S-Phase-Arreste auftraten. Die einhergehende Expression des Zellzykluskontrollgens *p21* war weitestgehend p53-abhängig. P53 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor für *p21*, wobei dieses jedoch auch p53-unabhängig exprimiert werden kann. Dies wird auch in unseren Studien deutlich. So ist *p21*-mRNA in p53-defizienten HCT116 Zellen detektierbar, der Basallevel liegt jedoch in der p53-profizienten Zelllinie um das 3Fache höher. Zudem fanden sich relevante Induktionen von p21 nur in der Gegenwart von p53. P21 könnte somit ein Faktor in der p53-abhängigen Zellzykluskontrolle nach Natriumselenit-Inkubation sein. Im Vergleich zur Expression von *p21* waren die p53-defizienten Zellen in der Lage, vergleichsweise hohe Mengen an *GADD45* zu exprimieren. GADD45 wird ebenfalls über p53-abhängige und p53-unabhängige Mechanismen reguliert (zusammengefasst in Zhan, 2005). In Folge von genotoxischem und nicht-genotoxischem Stress wird GADD45 induziert und soll z. B. über die Interaktion mit p21, PCNA oder Cdc2 zu G2/M-Arresten führen. (zusammengefasst in Sheikh et al., 2000). Zudem wurde beschrieben, dass GADD45 den G1-Phase-Checkpoint aktivieren kann, sodass die Zellen in der G1-Phase arretieren (Smith et al., 1994). Die beschriebene Bindung von GADD45 an PCNA könnte die Bereitstellung von PCNA für die Replikation mindern (Smith et al., 1994). Demnach wäre es denkbar, dass GADD45 zur Arretierung in der S-Phase führt. Dies wäre ein ähnlicher Mechanismus, wie er bereits für p21 diskutiert wird (siehe Abschnitt 2.2.3). Somit könnte GADD45 eine Funktion bei der Induktion der beobachteten p53-unabhängigen Zellzyklusarreste gespielt haben.
Bei der zellulären Reaktion auf Selenomethionin schien p53 eine weniger große Rolle zu spielen, da die Zellzykluskontrolle in beiden Zelllinien bei gleichen Konzentrationen eingeleitet wurde und der Anteil der Zellen in der S-Phase gleichermaßen sank. Jedoch war die Prävalenz des jeweiligen Arrests vom p53-Status abhängig. So arretierten die p53-profizienten Zellen stärker in der G1-Phase, während die p53-defizienten Zellen vor allem einen G2-Phase-Arrest einleiteten. Insgesamt lässt sich sagen, dass prinzipiell sowohl der G1- als auch der G2-Phase-Arrest p53-unabhängig eingeleitet werden können. Trotzdem wird p53 bei der Einleitung des G1-Phase-Arrests eine größere Rolle zugeschrieben (zusammengefasst in Abschnitt 2.2.3). Letzteres gilt ebenso für p21. Nach Inkubation mit Selenomethionin wurden wiederum nur in den p53-profizienten Zellen hohe Gehalte an p21

erreicht, wobei die Induktion erst nach verhältnismäßig langer Inkubationszeit einsetzte. Die Induktion von *GADD45* war in beiden Zelllinien vergleichsweise gering.

Basierend auf der Hypothese, dass Selen vor allem bei Prostatakrebs präventiv wirkt, finden sich in der Literatur Studien, die den Einfluss von Natriumselenit auf die Zellzykluskontrolle in verschiedenen Prostatakrebszelllinien untersuchen. In humanen DU145 Prostatakrebszellen, die mutiertes p53 exprimieren, wurde nach Natriumselenit-Inkubation ein S-Phase-Arrest detektiert. Dieser Arrest war demnach p53-unabhängig. Zudem spielte auch p21 keine Rolle (Jiang et al., 2002). Dies entspricht den hier beschriebenen Ergebnissen in der p53-defizienten Zelllinie HCT116. Auf der anderen Seite zeigte sich aber durch Natriumselenit sowohl in p53-profizienten (LNCaP) als auch p53-defizienten (PC3) Prostatakrebszellen kein Einfluss auf den Zellzyklus. Trotzdem wurde unabhängig vom p53-Status eine Induktion von p21 auf der Proteinebene detektiert (Zhao et al., 2009). Dies entspricht den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen nicht, da Natriumselenit in den HCT116 Zellen je nach Konzentration und Inkubationszeit verschiedene Zellzyklusarreste induzierte und die Induktion von p21 vor allem auf der Proteinebene p53-abhängig war. Insgesamt zeigt der Vergleich mit der Literatur demnach, dass Unterschiede je nach Zelltyp und Zelllinie auftreten können. Neben Studien in Prostatakrebszellinien gibt es auch Daten aus Darmkrebszelllinien. So führten zytotoxische Konzentrationen an Natriumselenit in HAT-29 Zellen, die mutiertes p53 exprimieren, zur Arretierung in der S- und G2-Phase und zur Induktion von *p21* und *GADD45* auf mRNA-Ebene (Zeng and Davis, 2003). Im Vergleich dazu wurde in der vorliegenden Arbeit in p53-defizienten HCT116 Zellen nach Natriumselenit-Exposition nur einen S-Phase-Arrest beobachtet. Die Expression der beiden Zellzykluskontrollgene war auch hier gesteigert, wobei gerade die Induktion von p21 im Vergleich zu der p53-profizienten Zelllinie marginal erschien und sich nicht auf die Proteinebene auswirkte. Die Proteinmenge wurde von Zeng und Davis jedoch nicht betrachtet. In der Literatur wurde aktuell auch über den Einfluss von Natriumselenit auf Zellzyklusprozesse in dem von uns gewählten Darmkrebszellmodell berichtet. Kráolvá et al. (2009) inkubierten p53-profiziente und p53-defizintente HCT116 Zellen mit 10 µM Natriumselenit (8 – 48 h) und untersuchten mittels Western Blot die Gehalte an PCNA, Cyclin B1, Cyclin D1, Cdc2, und p21. Die Autoren beschreiben, dass sie in beiden Zelllinien nach 24 h Inkubation eine Suppression von PCNA und Cyclin D1 und eine Induktion der restlichen Faktoren fanden. Daraus wurde gefolgert, dass Natriumselenit wahrscheinlich eine Arretierung in der G2-Phase p53-unabhängig verursachte. Die publizierten Western Blots zeigten jedoch ein anderes Bild: Der Gehalt an PCNA lag bei 196 % der Kontrolle und der Gehalt an Cdc2 bei 76 %. Zudem war die Suppression bzw. Induktion von Cyclin B1 und Cdc2 gegensätzlich, sodass die vorgenommene Argumentation hinfällig ist. Insgesamt ersetzt die

Betrachtung einiger Zellzykluskontrollproteine jedoch nicht eine durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklusverteilung. Diese wurde von Kráolvá et al. (2009) nur teilweise erbracht. Dargestellt waren Histogramme der Zellzyklusverteilung nach 24 h Inkubation mit 2,5, 5 und 10 µM Natriumselenit. Die Autoren bestimmten den Anteil der Zellen im SubG1-Peak und wiesen allgemein auf eine Veränderung der Zellzyklusverteilung hin, ohne gezielt einen Phase-Arrest zu benennen oder Daten einer Software-unterstützte Auswertung wiederzugeben. Visuell ist eine Auswertung der gezeigten Histogramme jedoch kaum möglich, wobei erschwerend eine uneinheitliche Skalierung hinzukommt. Insgesamt ist es also kaum möglich, diese Daten mit denen aus dieser Arbeit zu vergleichen. Jedoch zeigen unserer Ergebnisse davon abweichend, dass nur die p53-profizienten Zellen nach verhältnismäßig langer Inkubationszeit (45 h) und vergleichsweise hohen Konzentrationen an Natriumselenit in einen G2-Phase-Arrest gingen, während nach 24 h Inkubation konzentrationsabhängig ein G1- bzw. S-Phase-Arrest vorherrschte. Die p53-defizienten Zellen arretierten im Vergleich dazu bei hohen Konzentrationen unabhängig von der Zeit in der S-Phase.

Auch im Falle von Selenomethionin wurde in der Literatur der Einfluss auf den Zellzyklus p53-profizienter und p53-defizienter Prostatakrebszellen betrachtet. Dabei wurde in LNCaP Zellen (p53+/+; Androgenrezeptor vorhanden) nach Inkubation mit 150 µM Selenomethionin (24 h bis 72 h Inkubation) ein G1-Phase-Arrest und eine deutliche Reduktion von Zellen in der S-Phase gefunden, während in PC3 Zellen (p53-/-; Androgenrezeptor nicht vorhanden) ein leichter G2-Phase-Arrest ohne Beeinflussung des Anteils von Zellen in der S-Phase auftrat (Venkateswaran et al., 2002). Es wurde nicht abschließend geklärt, ob die Arretierung in der G1- bzw. G2-Phase tatsächlich vom p53-Status der Zellen abhing. Es wurde jedoch gezeigt, dass der Unterschied im Verlauf der S-Phase durch das Vorhandensein bzw. Fehlen des Androgenrezeptors beeinflusst wurde. Zudem konnten nur die LNCaP Zellen p21 induzieren, während es in den PC3 Zellen sogar zu einer Repression von p21 als Antwort auf 150 µM Selenomethionin kam. In dieses Bild fügen sich unsere Ergebnisse stimmig ein. Auch in der vorliegenden Arbeit führte Selenomethionin zur Depletion der Zellen in der S-Phase und zur Präferenz der p53-profizienten Zellen in der G1-Phase zu arretieren, während in den p53-defizienten Zellen der G2-Phase-Arrest ausgeprägter war. Ebenso konnte eine starke Zunahme an p21-Protein in den p53-profizienten Zellen nach verhältnismäßig langer Inkubationszeit detektieren. Im Gegensatz zu den Literaturdaten in Prostatakrebszellen zeigten die p53-defizienten HCT116 Zellen jedoch keine Repression von p21 sondern eine marginale Induktion, was sich z. B. auf Zelltyp-spezifische Unterschiede zurückführen lassen könnte.

Weiterhin wurden Studien zur Zellzyklusverteilung mit Selenomethionin auch in p53-profizienten und p53-defizienten HCT116 Zellen gemacht. So beschrieben Goel et al. (2006),

dass Konzentrationen bis 100 µM Selenomethionin nach 48 h nicht zur Veränderung des Zellzykluses führten und nach 72 h Inkubation nur bei der höchsten Konzentration von 100 µM ein G2-Phase-Arrest in den p53-profizienten Zellen detektiert wurde. Analog zu den anderen Testsystemen führten wir die Versuche auch bei kürzeren Inkubationszeiten (24 h und 45 h) und höheren Konzentrationen (bis zu 1000 µM) durch. Dabei fanden wir Zellzyklusarreste erst bei Konzentrationen über 250 µM, sodass sich kein Widerspruch mit den Literaturdaten ergibt.

5.7 Apoptose

Natriumselenit führt über die Bildung von Superoxid einhergehend mit der Induktion von DNA-Strangbrüchen zur Apoptose (Hu et al., 2006; Li et al., 2007). Die Apoptose-induzierende Wirkung von Natriumselenit wurde mit diversen Testsystemen in verschiedenen Zelllinien gezeigt (Jiang et al., 2004 a; Hu et al., 2006; Li et al., 2007; Rudolf et al., 2008; Zhao et al., 2009; Králová et al., 2009).
Davon ausgehend wurde in dieser Arbeit die Induktion von Apoptose durch Natriumselenit und Selenomethionin in Abhängigkeit des p53-Status der Zellen untersucht. Dazu wurden Parameter bzw. Testsysteme ausgewählt, mit denen die Induktion verschiedener Apoptose-Merkmale untersucht werden konnten: Eine Beteiligung von Caspasen wurde über die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 betrachtet, während die Initiierung des intrinsischen Wegs über eine AIF-Kernlokalisation untersucht wurde. Der transkriptionelle Einfluss von p53 sowie der Ablauf über einen mitochondrialen Weg wurden über die Genexpression von *Bax* bestimmt. Zur Untersuchung einer abschließenden DNA-Fragmentierung wurde die Messung des SubG1-Peaks herangezogen.

5.7.1 Kernlokalisation von AIF

Während der Apoptose wird der apoptosis inducing factor (AIF) aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Zytosol abgegeben. Dort wird AIF durch die Interaktion mit Cyclophilin A aktiviert und translokalisiert als aktive DNase in den Zellkern, wo diese zur Fragmentierung der DNA in vergleichsweise große Bruchstücke von 50 kB führt und eine Chromatinkondensation initiiert (zusammengefasst in Cregan et al., 2004; Huerta et al., 2007).
Natriumselenit führte nach 24 h Inkubation in den p53-profizienten HCT116 Zellen zur Kernlokalisation von AIF (Abbildung 43). Dieser Effekt setzte bei 3 µM Natriumselenit, also mit beginnender Zytotoxizität, ein. In den p53-defizienten Zellen konnte keine Zunahme des AIF-Fluoreszenzsignals nach 24 h Inkubation detektiert werden. Nach 48 h Inkubation verstärkte sich der Effekte in den p53-profizienten Zellen: Bereits 1 µM Natriumselenit induzierte die Lokalisation von AIF im Kern und 3 µM Natriumselenit führten zu einer Verdopplung des AIF-Signals verglichen mit der 24 h Inkubation (Daten nicht gezeigt). Die stark zytotoxische Wirkung von 5 µM Natriumselenit nach 48 h Inkubation erschwerte die Fixierung der Zellen auf den Deckgläschen, sodass mit diesem Testsystem keine vertrauenswürdigen Ergebnisse mehr gewonnen werden konnten.

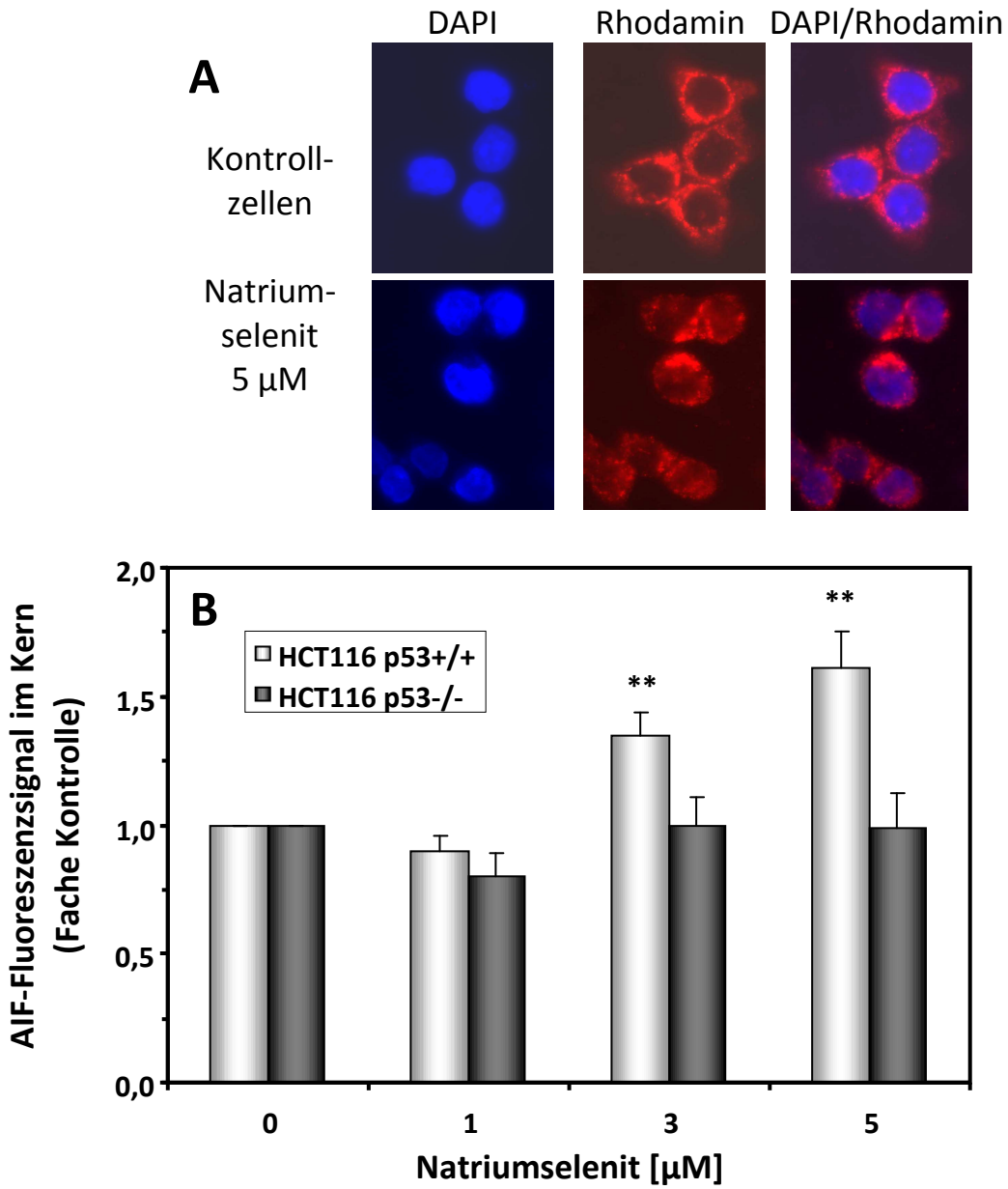


Abbildung 43: AIF-Kernlokalisation nach Natriumselenit-Exposition. P53-profiziente und p53-defiziente Zellen wurden 24 h mit Natriumselenit inkubiert. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisation von AIF im Kern detektiert. Dargestellt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des DAPI- und des Rhodamin-Kanals bzw. beider Kanäle (A) und die Mittelwerte aus mindestens 4 unabhängigen Versuchen (B) +SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

Im Vergleich dazu induzierten 24 h Inkubation mit Selenomethionin weder in p53-profizienten noch in p53-defizienten Zellen die Anreicherung von AIF im Kern (Abbildung 44). Dies war selbst bei zytotoxischen Konzentrationen an Selenomethionin der Fall.

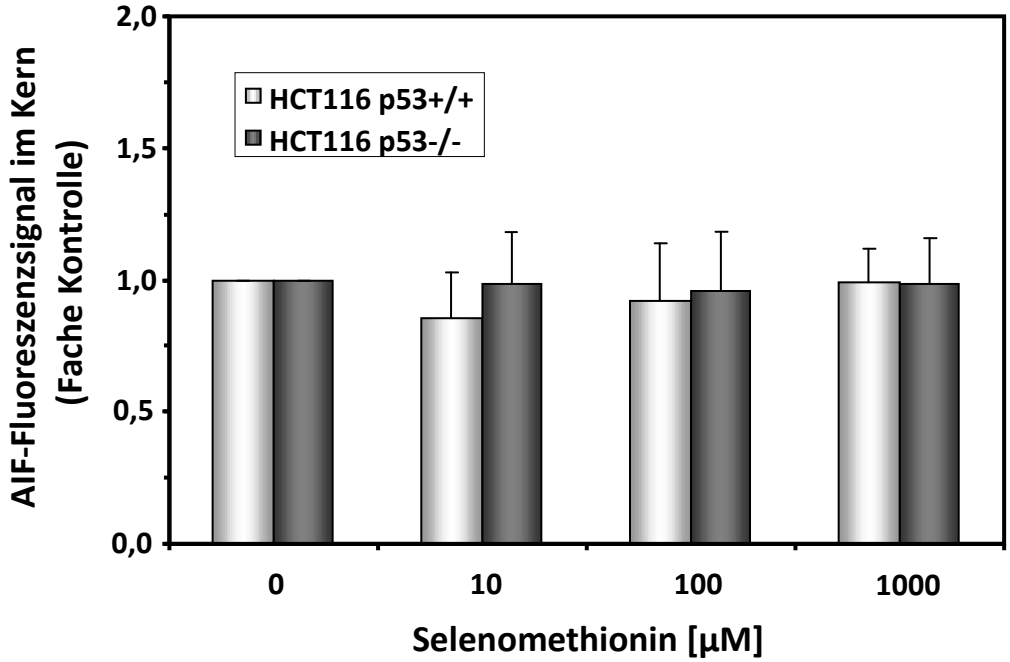


Abbildung 44: AIF-Kernlokalisation nach Selenomethionin-Exposition. P53-profiziente und p53-defiziente Zellen wurden 24 h mit Selenomethionin inkubiert. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisation von AIF im Kern detektiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 4 unabhängigen Versuchen +SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

5.7.2 Genexpression von *Bax*

Bax ist ein proapoptotisches Mitglied der Bcl2-Familie, das p53-abhängig induziert werden kann und dann zu den Mitochondrien translokalisiert. Das Membranpotential der Mitochondrien wird vom Verhältnis an proapoptotischen zu antiapototischen Mitgliedern der Bcl2-Familie in der Mitochondrienmembran bestimmt. Überwiegen die proapototischen Proteine, wie Bax, wird zum einen AIF und zum anderen Cytochrom C ausgeschüttet (Cregan et al., 2002).

Durch Auswahl geeigneter Primer und die Optimierung der Amplifikationsbedingungen wurde ein PCR-System zur Detektion der relativen Expression des Gens *Bax* etabliert. Beide Primer waren 20-mere, die zu einem Amplifizierungsprodukt von 99 bp führten. Mithilfe einer gelelektrophoretischen Auftrennung und einer Schmelzpunktanalyse wurde bestätigt, dass mit diesem PCR-System nur ein Amplifikat gebildet wurde (siehe Anhang 9.9). Es wurde eine optimale Annealing-Temperatur von 60 °C und eine optimale Primerendkonzentration von 0,5 µM bestimmt. Unter diesen Bedingungen ergab sich eine Effizienz der PCR von 1,919.

Natriumselenit führte in HCT116 Zellen zu einer p53-abhängigen *Bax*-Induktion: Nach 24 h Inkubation stieg die relative Expression beginnend mit 5 µM Natriumselenit in den p53-profizienten Zellen auf 1,6, während sich kein Einfluss auf die p53-defiziente Zelllinie zeigte (Abbildung 45 A).

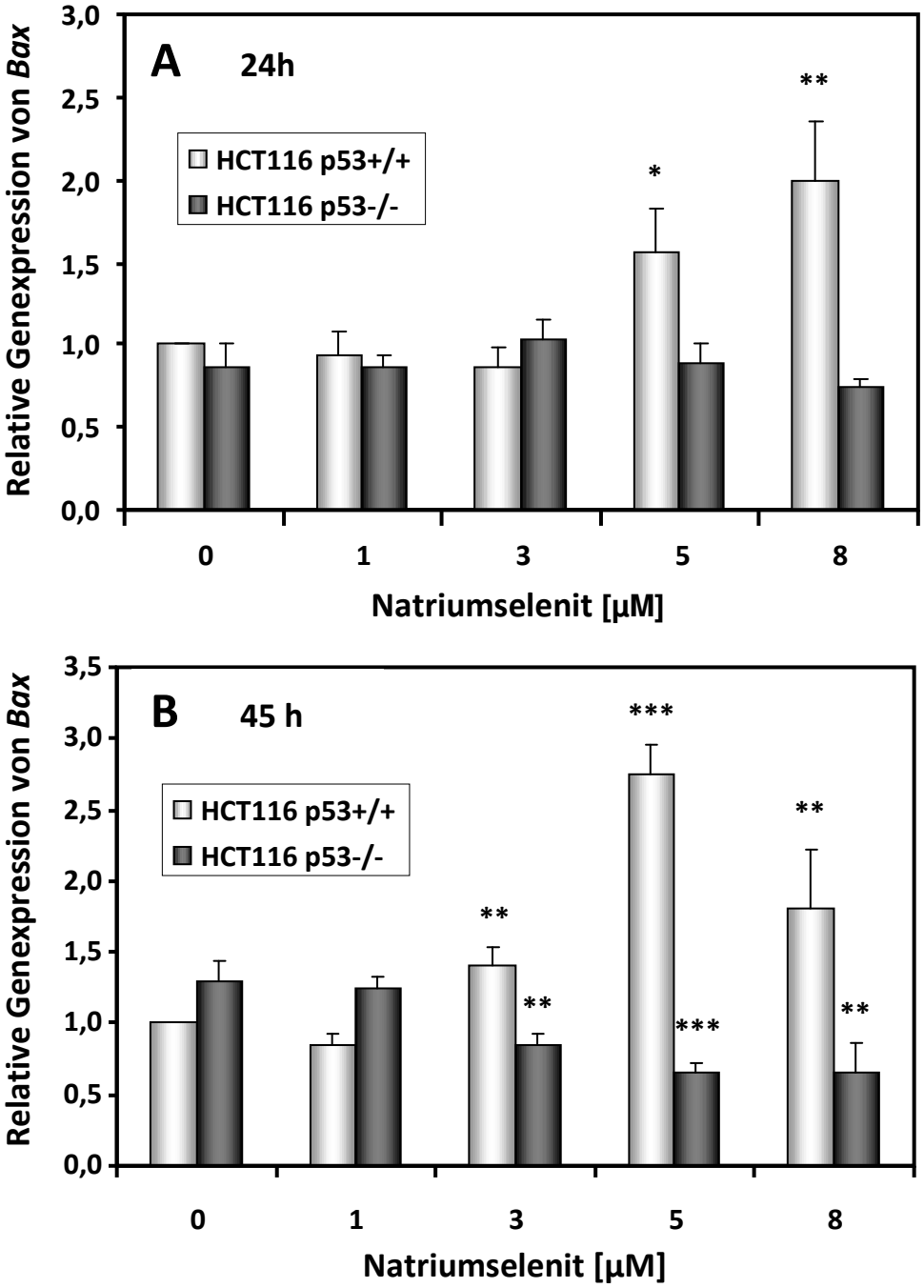


Abbildung 45: Genexpression von *Bax* nach Natriumselenit-Exposition. P53-profiziente und p53-defiziente Zellen wurden 24 h (A) und 45 h (B) mit Natriumselenit inkubiert. Mittels real time RT-PCR wurde die relative Genexpression von *Bax* bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen aus 3 (A) bzw. 2 (B) unabhängigen Versuchen +SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

Nach 45 h verstärkte sich der Effekt in den p53-profizienten Zellen, indem die *Bax*-Induktion bereits bei 3 µM Natriumselenit signifikant war und bei 5 µM Natriumselenit bereits 2,8 betrug. Überraschenderweise hatte Natriumselenit in den p53-defizienten HCT116 Zellen nach 45 h Inkubation einen suppressiven Einfluss auf die *Bax*-Expression. Lag der Basallevel in den p53-defizienten Zellen noch leicht über dem der p53-profizienten Zellen, halbierte sich der mRNA-Gehalt von *Bax* bei höheren Konzentrationen an Natriumselenit (Abbildung 45 B). Ein genereller, induzierender Effekt auf die Genexpression in den p53-profizienten Zellen durch Natriumselenit wird ausgeschlossen, da keine Induktion von *XPA* aufgetreten war (siehe Abschnitt 5.5.4).

24 h Inkubation mit Selenomethionin zeigten weder in den p53-profizienten noch in den p53-defizienten HCT116 Zellen einen signifikanten Einfluss auf die Genexpression von *Bax* (Abbildung 46).

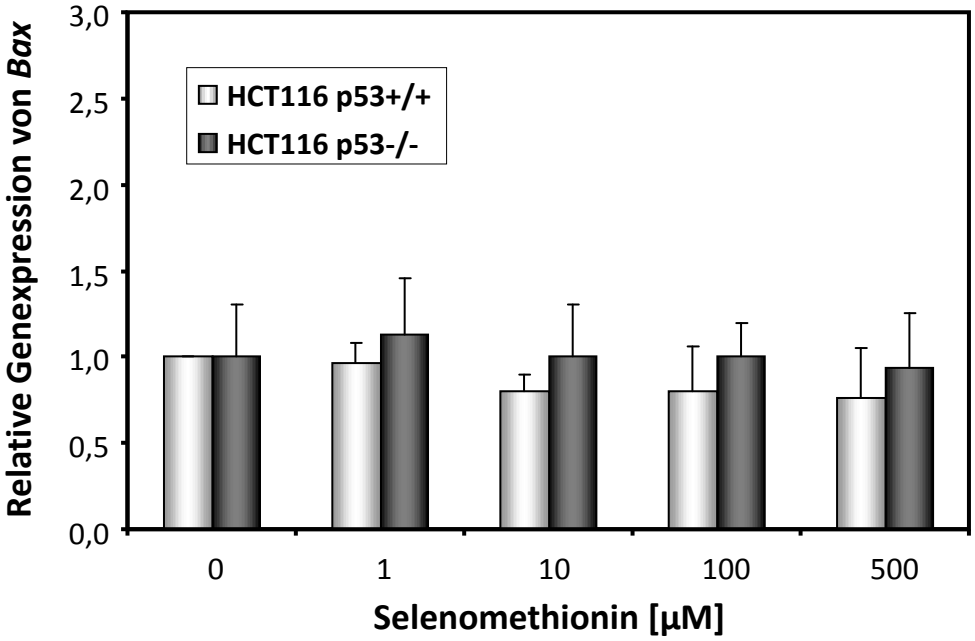


Abbildung 46: Genexpression von *Bax* nach Selenomethionin-Exposition. P53-profiziente und p53-defiziente Zellen wurden 24 h mit Selenomethionin inkubiert. Mittels real time RT-PCR wurde die relative Genexpression von *Bax* bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen +SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

5.7.3 Aktivität der Effektor-Caspasen 3/7

Die Effektor-Caspasen sind wichtige Faktoren bei der Exekution der Caspase-abhängigen Apoptose. Sie können zum einen über den Rezeptor-vermittelten, extrinsischen Signalweg von den Initiator-Caspasen und zum anderen über den mitochondrialen Weg nach

Cytochrom C-Ausschüttung aktiviert werden. Um eine Aktivierung über den erstgenannten Pfad zu untersuchen, sollten vergleichsweise kurze Inkubationszeiten gewählt werden (siehe Abschnitt 5.7.5). Zu den Substraten der Effektor-Caspasen 3 und 7 gehören z. B. Procaspasen und PARP (zusammengefasst in Fan et al., 2005).

Natriumselenit hatte in den p53-profizienten Zellen nach 4,5 h Inkubation keinen Einfluss auf die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7. Jedoch zeigte sich in den p53-defizienten Zellen ein signifikanter, konzentrationsabhängiger Abfall in der Caspase-Aktivität bereits bei nicht-zytotoxischen Konzentrationen an Natriumselenit. Bei 5 µM Natriumselenit z. B. betrug die Reduktion etwa 20 % (Abbildung 47).

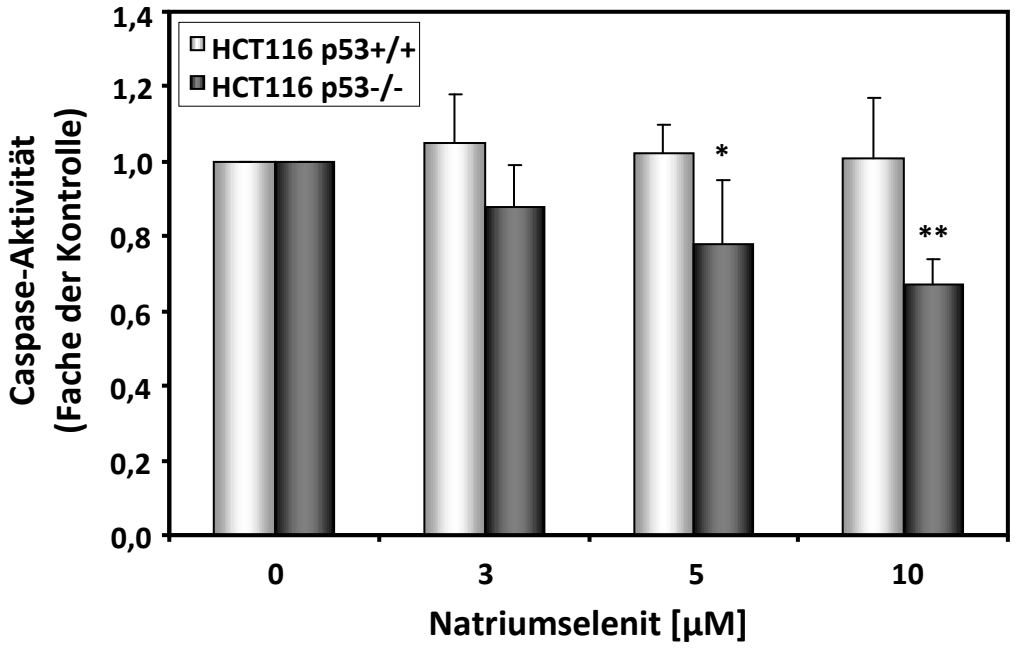


Abbildung 47: Einfluss von Natriumselenit auf die Effektor-Caspase-Aktivität. P53-profiziente und p53-defiziente Zellen wurden 4,5 h mit Natriumselenit inkubiert. Mittels Caspase-Glo® 3/7-Kit wurde die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen +SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

Im Vergleich dazu erhöhte Selenomethionin ab einer Konzentration von 100 µM die Caspase-Aktivität in den p53-profizienten Zellen um etwa 20 % und reduzierte diese in den p53-defizienten Zellen um etwa 20 % (Abbildung 48).

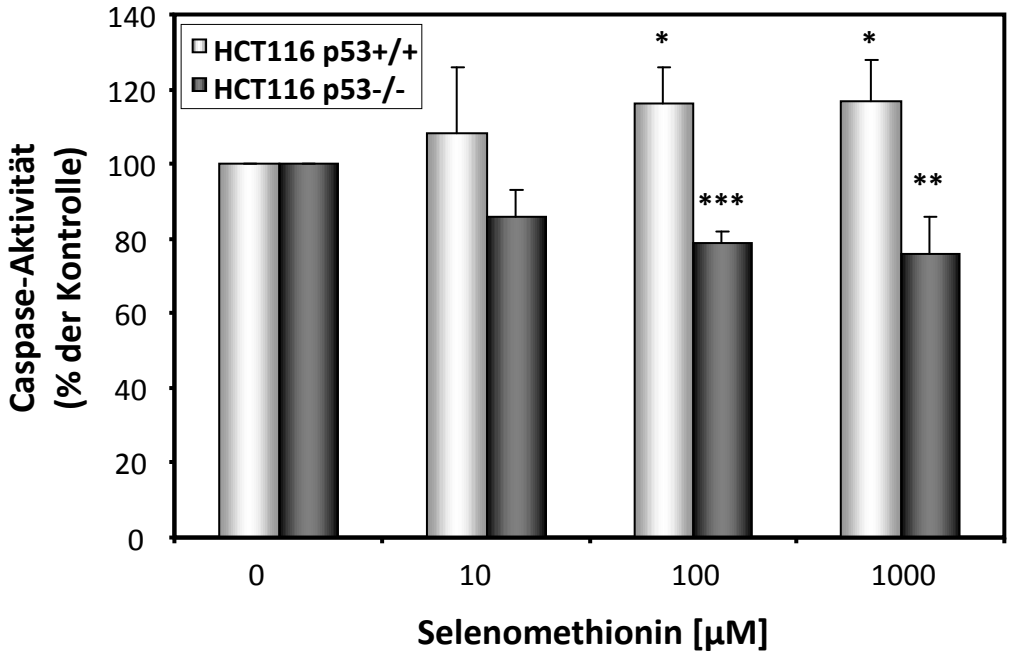


Abbildung 48: Einfluss von Selenomethionin auf die Effektor-Caspase-Aktivität. P53-profiziente und p53-defiziente Zellen wurden 4,5 h mit Selenomethionin inkubiert. Mittels Caspase-Glo® 3/7-Kit wurde die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen +SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

5.7.4 SubG1 Peak

Während der Apoptose wird die DNA durch Nukleasen fragmentiert und in sogenannten apoptotischen Körperchen abgetrennt. Diese DNA-enthaltenden, membranumschlossenen Partikel können nach DNA-Färbung am Durchflusszytometer vor dem G1-Peak der Zellzyklusverteilung detektiert werden. In Kombination mit weiteren Apoptose-Parametern gibt die Bestimmung des SubG1-Peaks Auskunft über eine abgeschlossene apoptotische Reaktion. Die Methode wurde unter Verwendung der Apoptose-induzierenden Substanz Staurosporin etabliert (Graupner, 2009).

Natriumselenit führte zur Zunahme der Signale im SubG1-Bereich. Dabei waren die Effekte stark abhängig vom p53-Status der Zellen. In den p53-profizienten Zellen stieg ab 5 µM Natriumselenit der Anteil der Zellen im SubG1-Bereich sprunghaft auf etwa 22 % an. Demgegenüber zeigte sich in den p53-defizienten Zellen erst ab 8 µM ein signifikanter Anstieg an apoptotischen Zellen auf etwa 19 % (Abbildung 49).

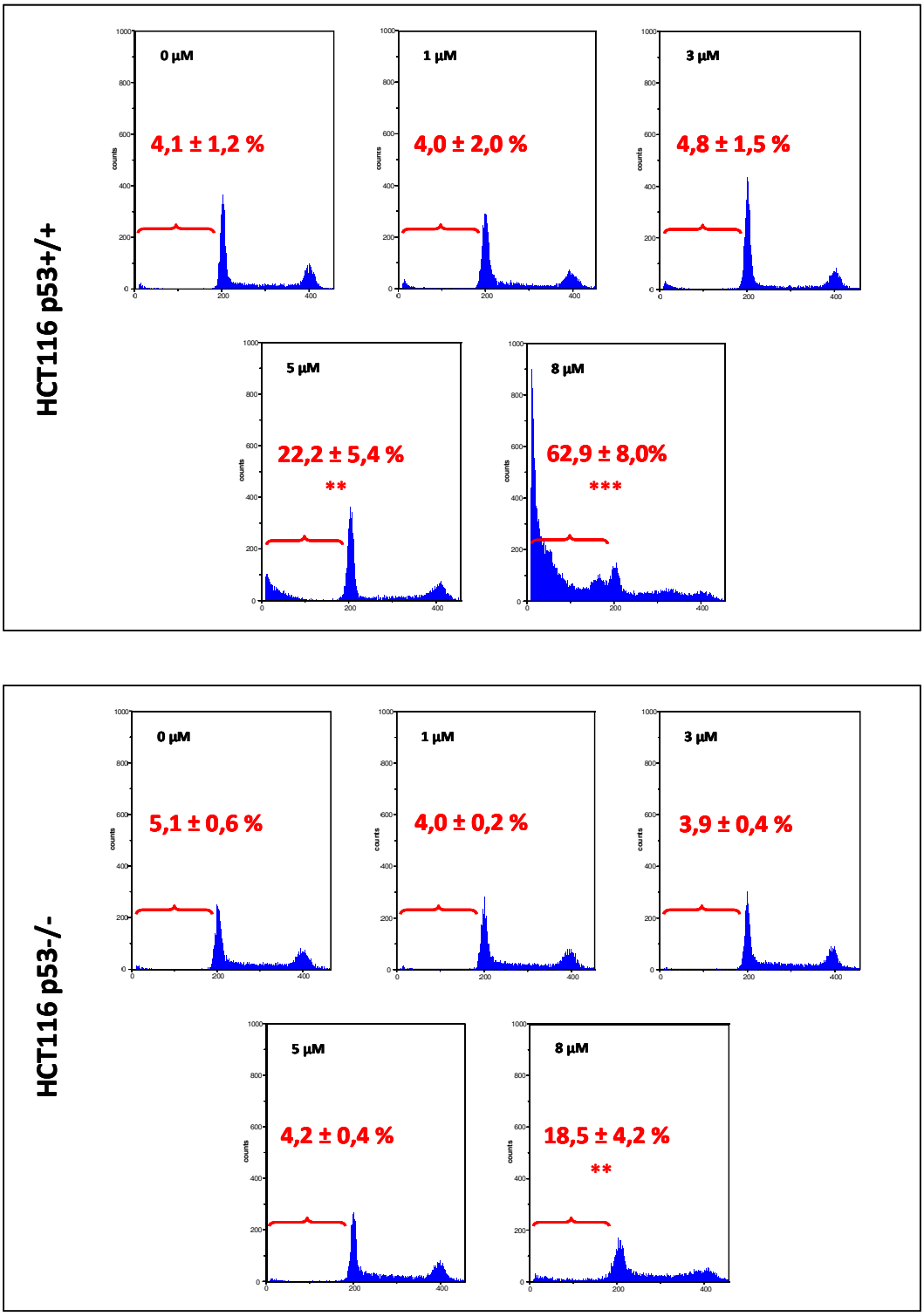


Abbildung 49: SubG1-Peak nach Inkubation mit Natriumselenit. P53-profiziente (A) und p53-defiziente (B) Zellen wurden 24 h mit Natriumselenit inkubiert. Mittels Durchflusszytometer wurde der SubG1-Peak bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Histogramme und die mittlere Partikelzahl im SubG1-Bereich aus 3 unabhängigen Versuchen ±SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

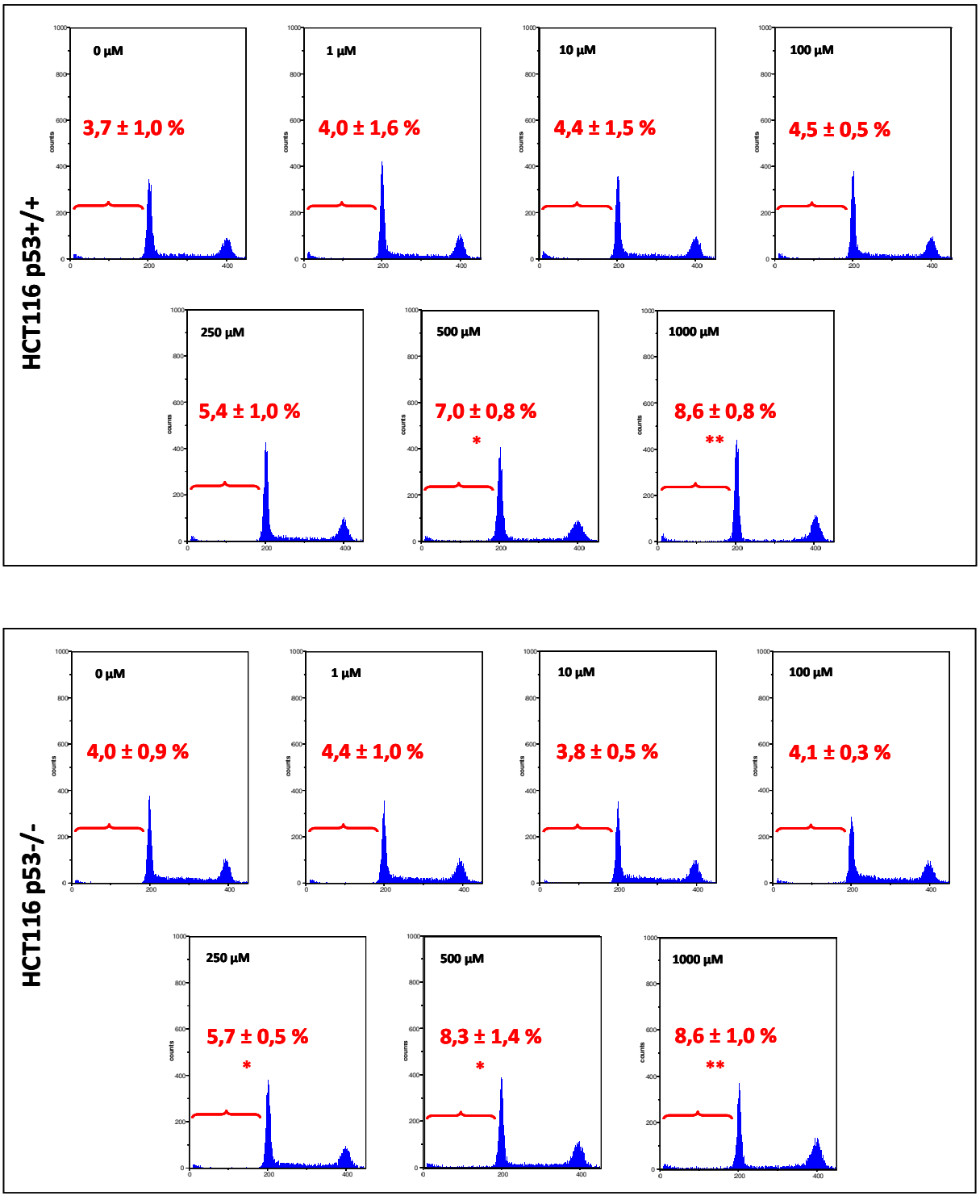


Abbildung 50: SubG1-Peak nach Inkubation mit Selenomethionin. P53-profiziente (A) und p53-defiziente (B) Zellen wurden 24 h mit Selenomethionin inkubiert. Mittels Durchflusszytometer wurde der SubG1-Peak bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Histogramme und die mittlere Partikelzahl im SubG1-Bereich aus 3 unabhängigen Versuchen ±SD. Statistisch signifikant verschieden von der jeweiligen Kontrolle: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Student' scher t-Test).

Im Vergleich dazu war die Entwicklung des SubG1-Peaks nach Inkubation mit Selenomethionin in den beiden Zelllinien vergleichbar und war generell, auch bei vergleichsweise hohen Konzentrationen, weniger ausgeprägt als bei Natriumselenit. So betrug der Anteil an Signalen im SubG1-Bereich nach Inkubation mit 1000 µM Selenomethionin in beiden Zelllinien etwa 9 % (Abbildung 50).

5.7.5 Bewertung der Ergebnisse

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Natriumselenit p53-abhängig Apoptose über den intrinischen Weg einleitet. Dies geschah ohne Aktivierung der Effektor-Caspasen 3 und 7 über einen AIF-vermittelten Weg. Die Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien kann dabei über die Induktion von *Bax* erklärt werden, für das p53 als Transkriptionsfaktor fungiert. Der apoptotische Prozess endete mit der Fragmentierung der DNA, welche als SubG1-Peak detektiert wurde. In den p53-defizienten Zellen konnten selbst bei zytotoxischen Konzentrationen keine apoptotischen Merkmale detektiert werden. Dies lässt in Abwesenheit von p53 auf Nekrose schließen, die jedoch erst bei vergleichsweise hohen Konzentrationen an Natriumselenit einsetzt.

Die verschiedenen Aspekte werden im Folgenden in die bestehende Literatur eingeordnet. Bax führt zur Ausschüttung von AIF ins Zytosol (Cregan et al., 2002) und wird während der Natriumselenit-induzierten Apoptose in verschiedenen Zelltypen hochreguliert (Hu et al., 2006; Xiao et al., 2006; Rudolf et al., 2008; Zhao et al., 2009).

Eine Translokalisation von AIF durch Natriumselenit wurde kürzlich erstmals in HeLa Hep-2 Zellen beobachtet (Rudolf et al., 2008). Während der resultierenden Apoptose wurde keine Steigerung der Caspase 3-Aktivität detektiert (Rudolf et al., 2004; Rudolf et al., 2008). Weitere Studien zeigen ebenfalls keine Zunahme einer Caspase 3-Aktivität während der Selenit-induzierten Apoptose (Jiang et al., 2002, Jiang et al., 2004). Auf der anderen Seite gibt es Arbeiten, die eine Aktivierung von Caspasen belegen. So haben Králová et al. (2009) analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kürzlich berichtet, dass die p53-profiziente HCT116 Zelllinie sensitiver auf Natriumselenit reagieren als die p53-defizienten Zellen, da sie vermehrt in die Apoptose gehen. Gezeigt wurde dies jedoch bei 10 µM Natriumselenit, einer sehr hohen Konzentration, die zum Teil bis zu 48 h inkubiert wurde. Als Parameter wurden dafür die Spaltung von PARP1, die Aktivierung der Caspase 3 sowie der SubG1-Peak herangezogen. Nach 24 h zeigte sich hier tatsächlich in beiden Zelllinien eine gesteigerte Effektor-Caspase-Aktivität, welche in den p53-profizienten Zellen ausgeprägter war. Wir fanden nach Kurzzeitinkubation ebenfalls einen Unterschied in den beiden Zelllinien: Während Natriumselenit in der p53-profizienten Zelllinie keinen Einfluss hatte,

kam es in der p53-defizienten Zelllinie sogar zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Caspase-Aktivität. Die Daten von Králová et al. (2009) stehen nicht unmittelbar im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, sondern können anhand der Versuchsführung erklärt werden. Um die Induktion von Apoptose über eine Caspasen-Kaskade zu untersuchen, wird eine Inkubationszeit von 4 h empfohlen (Promega, Caspase-Glo®3/7 Assay, Technical Bulletin, 2005). Es wurde sichergestellt, dass diese Inkubationsdauer unter Verwendung der Positivsubstanz Staurosporin zum positiven Nachweis einer gesteigerten Effektor-Caspase-Aktivität führt (Graupner, 2009). Daraufhin wurde für die Selenverbindungen ebenfalls 4 h Inkubation gewählt. Bei einer Messung zu späteren Zeitpunkten kann nicht mehr unterschieden werden, ob die Effektor-Caspasen von den Initiator-Caspasen oder über einen mitochondrialen Weg aktiviert wurden. Letzteres ergibt sich dadurch, dass die AIF-Ausschüttung aus den Mitochondrien auch die Freisetzung von Cytochrom C stimuliert, was wiederum die Effektor-Caspasen aktiviert (Candé et al., 2002). Aus der Wahl der Inkubationszeit ergibt sich somit der jeweilige Endpunkt bzw. die eigentliche Aussage. In dieser Arbeit stand dabei die Frage im Vordergrund, über welche Mechanismen Natriumselenit den Beginn der Apoptose einleitet.

Insgesamt ist also davon auszugehen, dass die Natriumselenit-induzierte Apoptose zunächst Caspase-unabhängig eingeleitet wird. Vielmehr kommt es zur p53-abhängigen Induktion von Bax und der Kernlokalisation von AIF. Dieser Weg kann nachgeschaltet durch die Cytochrom C-vermittelte Aktivierung der Effektor-Caspasen unterstützt werden.

Übereinstimmend damit wurde gezeigt, dass die Selenit-induzierte Apoptose in Prostatakrebszellen durch Caspase-Inhibitoren nur zum Teil aufgehoben werden kann (Li et al., 2007). Auch in der zitierten Studie wurde die p53-Abhängigkeit der Apoptose belegt, da sich p53-Mutationen protektiv auswirkten. Ebenso zeigten Hu et al. (2006) in Prostatakrebszellen, dass Natriumselenit zu einer p53-abhängigen Induktion von Bax und einer Aktivierung von Effektor-Caspasen, letzteres wiederum zu vergleichsweise späten Zeitpunkten, führte. Unter Verwendung einer anderen p53-defizienten Prostatakrebszelllinie beobachteten Zhao et al. (2009) jedoch auch eine p53-unabhängige Zunahme von Bax auf Proteinebene und Apoptose nach Selenit-Inkubation, wobei die Apoptose-Inzidenz in den p53-profizienten Zellen deutlich höher war. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass Natriumselenit nicht auf verschiedenste zelluläre Zielmoleküle wirkt und so die unterschiedlichsten apoptotischen Prozesse in Gang setzt. Dies kann zudem je nach Zeitpunkt, Konzentration und Zelltyp differieren.

Eine Fragmentierung der DNA, also der Abschluss der Apoptose, nach Natriumselenit-Exposition wurde in verschiedenen Zelllinien und Studien dokumentiert: So wurde z. B. in murinen Nervenzellen und in Prostakrebszellen ein stark ausgeprägter SubG1-Peak sowie eine „DNA-Leiter“ beobachtet (Jiang et al., 2002; Jiang et al., 2004 a; Xiao et al., 2006).

Kürzlich wurde zudem die p53-Abhängigkeit des SubG1-Peaks in unserem HCT116–Zellmodell publiziert (Králová et al., 2009). Abweichend davon fanden Rudolf et al. (2004) während der Natriumselenit-induzierten Apoptose in Hela Hep-2 Zellen nicht die typische oligonukleosomale DNA-Fragmentierung, sodass unterschiedliche Reaktionen in Abhängigkeit vom Zelltyp möglich sein können.
Überraschenderweise konnte trotz einer p53-Abhängigkeit der Selenit-induzierten Apoptose keine Phosphorylierung von p53 an Serin-46 detektiert werden. Diese Modifizierung wird mit der p53-abhängigen Apoptose in Zusammenhang gebracht (Oda et al., 2000) und wurde in H1299 Lungenkrebszellen, die mit p53 transfiziert wurden, nach Natriumselenit-Exposition gefunden (Smith et al., 2004). Ein Grund könnte die Sensitivität des verwendeten Antikörpers sein (siehe Abschnitt 5.4).

Im Fall von Selenomethionin wurde weder eine Aktivierung der Caspase-abhängigen noch der AIF-vermittelten Apoptose gefunden. Zudem zeigte sich keine Induktion des p53-abhängigen Gens *Bax* und nur ein gering ausgeprägter SubG1-Peak. Dies alles war unabhängig vom p53-Status der Zellen. Im Gegensatz dazu detektierten Goel et al. (2006) p53-abhängige Apoptose im gleichen Zellmodell mithilfe einer durchflusszytometrischen Methode mittels Annexin V. Dabei betrug die Inkubationszeit jedoch mindestens 48 h, während in der vorliegenden Arbeit bis zu 24 h inkubiert wurde. Selenomethionin-induzierte Apoptose ist auch in A549 Zellen (Wildtyp-p53) und HT29 Zellen bekannt, wobei dies nur anhand der Morphologie mittels Mikroskopie belegt wurde (Redman et al., 1997).

5.8 Inhibierung der p53-abhängigen zellulären Antwort durch Cadmiumchlorid

Die Einleitung tumorsuppressiver Reaktionen nach Natriumselenit-Exposition verlief p53-abhängig. Es ist bekannt, dass Cadmiumchlorid zur Entfaltung der Wildtyp-Konformation des p53-Proteins führt und somit den Tumorsuppressor inaktiviert (Méplan et al., 1999; Thuy, 2006; Schwerdtle et al., 2010). Daher wurden Kotoxizitätsstudien von Natriumselenit und Cadmiumchlorid durchgeführt. Als Endpunkt wurde die Koloniebildungsfähigkeit gewählt.

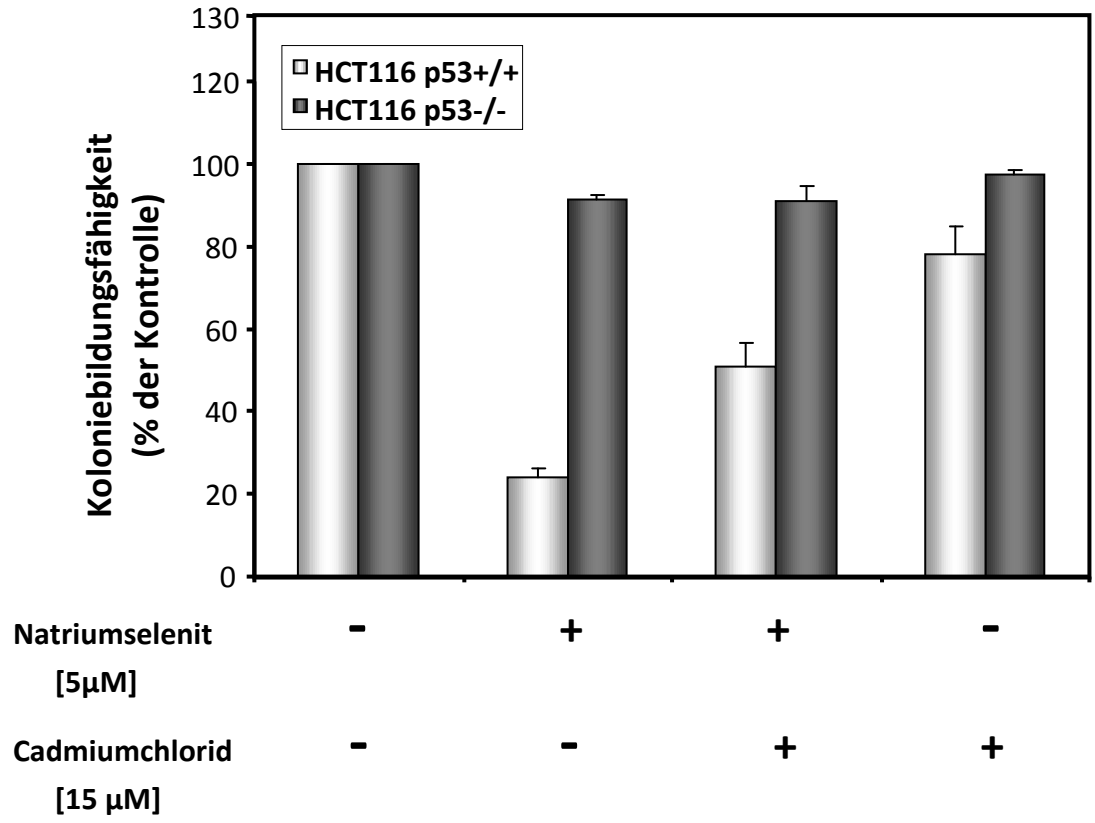


Abbildung 51: Kotoxizität von Natriumselenit und Cadmiumchlorid. P53-profiziente und p53-defiziente Zellen wurden 2 h mit Cadmiumchlorid vorinkubiert und 24 h mit Natriumselenit und Cadmiumchlorid koinkubiert. Es wurde die Koloniebildungsfähigkeit bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen + SD.

Zunächst wurden die Zellen 2 h mit Cadmiumchlorid vorinkubiert, um eine Inaktivierung von p53 bereits zu Beginn der Natriumselenit-Exposition zu gewährleisten. Es folgte eine Koinkubation von Natriumselenit und Cadmiumchlorid für 24 h. Eingesetzt wurden 15 µM Cadmiumchlorid. Diese Konzentration war in beiden Zelllinien nicht-zytotoxisch, wobei die p53-defizienten Zellen sensitiver reagierten. Daneben wurden 5 µM Natriumselenit gewählt,

welche in Abwesenheit von Cadmiumchlorid in den p53-profizienten Zellen zur Senkung der Koloniebildungsfähigkeit auf 24 % der Kontrolle führten, während die Koloniebildungsfähigkeit in den p53-defizienten Zellen unbeeinflusst blieb (vgl. Abschnitt 5.1.1). Nach Koinkubation der beiden Verbindungen betrug die Koloniebildungsfähigkeit in der p53-profizienten Zelllinie 51 % der Kontrolle und war damit etwa doppelt so hoch verglichen mit der Natriumselenit-Exposition in Abwesenheit von Cadmiumchlorid. Im Vergleich dazu hatte Cadmiumchlorid in den p53-defizienten Zellen keinen Einfluss auf die Zytotoxizität von Natriumselenit (Abbildung 51). Damit stellte sich die Frage, inwiefern oxidative DNA-Schäden trotz gesteigerter Proliferation in den p53-profizienten Zellen auftreten.

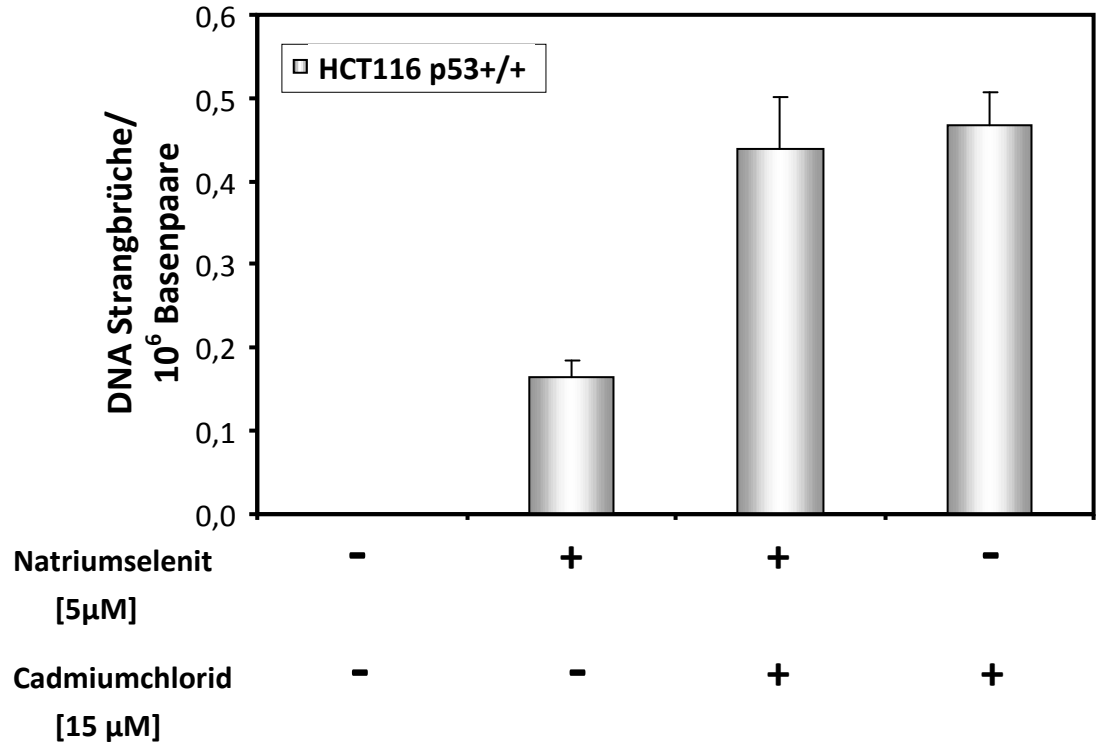


Abbildung 52: Kotoxizität von Natriumselenit und Cadmiumchlorid. P53-profiziente und p53-defiziente Zellen wurden 2 h mit Cadmiumchlorid vorinkubiert und 24 h mit Natriumselenit und Cadmiumchlorid koinkubiert. Es wurden die DNA-Strangbrüche mittels Alkalischer Entwindung bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen + SD.

Während Natriumselenit in Abwesenheit von Cadmiumchlorid nur eine geringfügige DNA-Schädigung zufolge hatte, traten bei Koinkubation mit Cadmiumchlorid mit etwa 0,44 DNA-Strangbrüchen pro 10^6 Basenpaare deutlich höhere Gehalte an DNA-Schäden auf. In etwa die gleiche Menge an DNA-Strangbrüchen wurde durch die Inkubation mit Cadmiumchlorid

in Abwesenheit von Natriumselenit induziert (Abbildung 52). Fpg-sensitive Läsionen traten nicht auf (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt reduzierte Cadmiumchlorid die Zytotoxizität von Natriumselenit in Abhängigkeit des p53-Status der Zellen. Dies könnte darauf hinweisen, dass p53-abhängige Prozesse durch Cadmiumchlorid inhibiert wurden. Entscheidend könnte hier die Hemmung der Natriumselenit-induzierten Apoptose gewesen sein.

6 Zusammenfassende Diskussion

Das Tumorsuppressorprotein p53 leitet nach DNA-Schädigung die Zellzykluskontrolle, die DNA-Reparatur und die Apoptose ein. Wie wichtig p53 für die Erhaltung der genomischen Stabilität ist, wird dadurch deutlich, dass in 50 % der Darmkrebstumore p53 mutiert vorliegt (Greenblatt, 1994). In dieser Arbeit wurde zum einen die direkte Entfaltung der aktiven Wildtyp-Konformation von p53 durch reduzierbare Selenverbindungen und zum anderen der Einfluss von p53 auf die Toxizität verschiedener Selenverbindungen sowie auf die resultierenden zellulären Reaktionen untersucht.

In einem subzellulären Testsystem konnte zunächst gezeigt werden, dass die reduzierbaren Selenverbindungen Natriumselenit und Phenylseleninsäure die DNA-Bindungsdomäne von p53 entfalten. Dieser Effekt trat im Falle von Natriumselenit bereits bei niedrigen mikromolaren Konzentrationen auf, konnte jedoch nicht bei dem vollständig reduzierten Selenomethionin nachgewiesen werden. Die Entfaltung der Wildtyp-Konformation könnte auf einer oxidativen Zinkfreisetzung durch Selen in reduzierbaren Oxidationsstufen beruhen. In der entfalteten Konformation kann p53 nicht mehr als Transkriptionsfaktor fungieren und verliert somit wesentliche tumorsuppressive Eigenschaften.

Deshalb wurde in einem weiteren Teil der Arbeit der Einfluss von Natriumselenit auf die Induktion der Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur und Apoptose in p53-profizienten und p53-defizienten HCT116 Darmkrebszellen untersucht. Während sich im subzellulären System eine Inaktivierung von p53 durch Natriumselenit andeutete, schien dieser Mechanismus im zellulären System nicht relevant zu sein. Vielmehr war die zelluläre Antwort nach Inkubation mit Natriumselenit stark abhängig vom p53-Status der Zellen (Tabelle 4). Hierbei reagierten die p53-profizienten Zellen sensitiver auf eine Inkubation mit Natriumselenit als die p53-defizienten Zellen. Bereits bei einer Inkubation mit 3 µM Natriumselenit sank in den p53-profizienten Zellen die Koloniebildungsfähigkeit. Studien zur zellulären Aufnahme zeigten, dass es mit beginnender Zytotoxizität zu einem sprunghaften Anstieg in der Aufnahme an Natriumselenit kam, d. h. ab einer Inkubationskonzentration von 5 µM im Medium waren die intrazellulär gemessenen Selenkonzentrationen mehr als äquimolar. Mit der Zytotoxizität einhergehend wurde zwischen 3 µM und 5 µM die Zellzykluskontrolle eingeleitet. Dies zeigte sich anhand der Induktion von p21 und GADD45 sowie der Einleitung von Zellzyklusarresten.

Zudem wurde in diesem Konzentrationsbereich die Apoptose eingeleitet, wie die Kernlokalisation von AIF, die Induktion von *Bax* und die Messung des SubG1-Peaks zeigten. Hingegen wurde während der Einleitung der Apoptose keine Steigerung der Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 detektiert. Die Sensitivität der p53-profizienten Zellen gegenüber

Natriumselenit setzt sich somit aus der Arretierung des Zellzykluses und der Induktion von Apoptose zusammen.

Erstaunlicherweise führte die Inkubation mit Natriumselenit bis in vergleichsweise hohe Konzentrationen in den p53-profizienten Zellen nicht zur Akkumulation von DNA-Schäden. Erst ab 8 µM Natriumselenit wurden oxidative DNA-Schäden detektiert. Analysen zum Expressionsmuster von BER-Genen zeigten, dass unter den BER-Genen nur *Polß* durch Natriumselenit (ab 3 µM) induziert wurde. Dies spiegelte sich jedoch nicht auf der translationalen Ebene wieder. Eine starke Induktion wurde jedoch bei den p53-abhängigen NER-Genen *p48* und *XPC* detektiert. Zum anderen wurde *XPA*, für das p53 nicht als Transkriptionsfaktor fungiert, durch Natriumselenit vielmehr reprimiert.

Tabelle 4: Effekte nach Inkubation mit Natriumselenit in Abhängigkeit des p53-Status der Zellen

NATRIUMSELENIT		
Endpunkte	**HCT116 p53+/+**	**HCT116 p53-/-**
Zytotoxizität (24 h)	≥ 3 µM	≥ 8 µM
Starke intrazelluläre Akkumulation (24 h)	≥ 5 µM	≥ 7 µM
DNA-Strangbrüche (45 h)	≥ 8 µM	≥ 1 µM
Stabilisierung von p53 (24 h / 45 h)	≥ 5 µM / ≥ 1 µM	---
Steigende Genexpression *Polß* (45 h)	≥ 3 µM	---
Steigender Polß-Proteingehalt (24 h und 45 h)	Repression	Repression
Steigende Genexpression von *XPC* und *p48* (24 h und 45 h)	≥ 5 µM	---
Induktion von XPA (Gen- und Proteinebene) (24 h und 45 h)	Repression	Repression
Zellzyklusarreste (24 h)	≥ 3 µM	≥ 8 µM
Induktion von p21 (Gen- und Proteinebene) (24 h und 45 h)	≥ 3 – 5 µM	marginal
Steigende Genexpression von *GADD45* (24 h / 45 h)	≥ 3 µM	≥ 5 µM / ≥ 3 µM
Kernlokalisation von AIF (24 h)	≥ 3 µM	---
Steigende Genexpression von *Bax* (24 h / 45 h)	≥ 5 µM / ≥ 3 µM	Repression
Steigende Aktivität der Effektor-Caspasen 3/7 (4,5 h)	---	marginale Repression
SubG1-Peak (24 h)	≥ 5 µM	≥ 8 µM

In Abwesenheit von p53 zeigte sich nach Natriumselenit-Exposition ein deutlich anderes Bild. Bereits bei niedrigen Konzentrationen an Natriumselenit akkumulierten die p53-defizienten Zellen hohe Gehalte an DNA-Strangbrüchen. Weder BER- noch NER-Gene wurden begleitend dazu induziert. Zudem setzte erst bei viel höheren Konzentrationen eine zelluläre Schadensantwort ein. So wurde die Koloniebildungsfähigkeit erst durch 8 µM Natriumselenit gesenkt. Ähnlich wie in den p53-profizienten Zellen begann eine starke Akkumulation von Selen in der Zelle mit Beginn der Zytotoxizität. Einhergehend mit der sinkenden Koloniebildungsfähigkeit wurden Zellzyklusarreste erst bei vergleichsweise hohen Konzentrationen induziert. Während diese spät einsetzende p53-unabhängige Zellzyklus-kontrolle wahrscheinlich nicht p21-vermittelt ablief, könnte GADD45 eine Rolle gespielt haben. Der Zelltod, der durch die Messung des SubG1-Peaks detektiert wurde, setzte ebenso erst im oberen Konzentrationsbereich an Natriumselenit ein und wurde nicht von einer Kernlokalisation von AIF, der Induktion von *Bax* oder einer gesteigerten Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 begleitet. Demnach wurden in den p53-defizienten Zellen trotz DNA-Schädigung keine tumorsuppressiven Reaktionen eingeleitet. Daraus resultiert eine Gefährdung der genomischen Integrität und unterstreicht die Bedeutung von p53 als Tumorsuppressor.

Im Fall von Selenomethionin war die zelluläre Antwort weitestgehend unabhängig vom p53-Status der Zellen (Tabelle 5). So setzte die Zytotoxizität in p53-profizienten und p53-defizienten Zellen gleichermaßen bei vergleichsweise hohen Konzentrationen ein. Studien zur intrazellulären Aufnahme zeigten, dass die Inkubation mit Selenomethionin bereits in sehr niedrigen, nicht-zytotoxischen Konzentrationen zur Akkumulation von Selen in beiden Zelllinien führt.

Mit beginnender Zytotoxizität wurde die Zellzykluskontrolle eingeleitet, jedoch war die Prävalenz des jeweiligen Zellzyklusarrests vom p53-Status der Zellen abhängig. P21 könnte in der p53-profizienten Zelllinie die stärkere Ausprägung des G1-Phase-Arrests bewirkt haben. *GADD45* wurde in beiden Zelllinien vergleichsweise gering induziert, sodass eine Rolle in der p53-unabhängigen Zellzykluskontrolle nach Inkubation mit Selenomethionin fraglich ist.

Mit der Zytotoxizität einhergehend wurde nach Inkubation mit Selenomethionin in den p53-profizienten und in den p53-defizienten Zellen eine Zunahme des SubG1-Peaks detektiert. Der Zelltod war jedoch jeweils nicht von einer Kernlokalisation von AIF oder einer Induktion von *Bax* begleitet. Ein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien konnte nur in der Aktivität der Effektor-Caspasen gefunden werden. Hier zeigten die p53-profizienten Zellen eine marginale Aktivitätssteigerung, während es in den p53-defizienten Zelllinie zu einer leichten Senkung kam. Wie die Bestimmung des SubG1-Peaks gezeigt hatte, schien sich dieser Unterschied jedoch nicht auf die Einleitung des Zelltods auszuwirken.

Die DNA-schädigende Wirkung korrelierte ebenfalls mit der Zytotoxizität des Selenomethionins. Die p53-profizienten Zellen stabilisierten bei einsetzender DNA-Schädigung p53. Dies schien jedoch kaum einen Einfluss auf die zelluläre Reaktion zu haben, da der Gehalt an DNA-Strangbrüchen sowie die Induktion von Polß in beiden Zellen gleiche gleichermaßen auftraten.
Selenomethionin führte bereits in sehr niedrigen, nicht-zytotoxischen Konzentrationen zur Akkumulation von intrazellulärem Selen unabhängig vom p53-Status der Zellen.

Tabelle 5: Effekte nach Inkubation mit Selenomethionin in Abhängigkeit des p53-Status der Zellen

SELENOMETHIONIN		
Endpunkte	**HCT116 p53+/+**	**HCT116 p53-/-**
Zytotoxizität (24 h)	≥ 250 µM	≥ 250 µM
Starke intrazelluläre Akkumulation (24 h)	≥ 50 nM	≥ 50 nM
DNA-Strangbrüche (45 h)	≥ 500 µM	≥ 500 µM
Stabilisierung von p53 (45 h)	≥ 100 µM	---
Steigender Polß-Proteingehalt (24 h und 45 h)	≥ 100 µM	≥ 100 µM
Steigende Genexpression von *XPC* und *p48* (24 h und 45 h)	---	---
Induktion von XPA (Gen- und Proteinebene) (24 h und 45 h)	---	---
Zellzyklusarreste (24 h)	≥ 250 µM	≥ 250 µM
Induktion von p21-Protein (45 h)	≥ 10 µM	marginal
Steigende Genexpression von *GADD45* (24 h)	marginal	marginal
Kernlokalisation von AIF (24 h)	---	---
Steigende Genexpression von *Bax* (24 h)	---	---
Steigende Aktivität der Effektor-Caspasen 3/7 (4,5 h)	marginal	marginale Repression
SubG1-Peak (24 h)	≥ 250 µM	≥ 250 µM

Abschließend zeigte der Vergleich von Natriumselenit und Selenomethionin, dass Natriumselenit die höhere Zytotoxizität aufwies, Selenomethionin bei geringerer Zytotoxizität durch unspezifischen Einbau in Proteine jedoch stärker in der Zelle akkumulierte. Selenomethionin führte erst in vergleichsweise hohen, zytotoxischen Konzentrationen zur Akkumulation von DNA-Schäden. Dabei war die zelluläre Schadensantwort weitestgehend p53-unabhängig. Natriumselenit hingegen rief nach DNA-

Schädigung p53-abhängige Reaktionen hervor. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Verbindungen können nicht allein auf die verschiedenen Oxidationsstufen des Selens zurückgeführt werden, da Phenylseleninsäure, ebenfalls reduzierend, ähnlich wie Selenomethionin weitestgehend p53-unabhängige Effekte induzierte. Insgesamt wird aus dieser Arbeit im Zellkulturmodell deutlich, wie stark sich verschiedene Selenverbindungen in ihren Eigenschaften unterscheiden. Daher sollte in der Nahrungsergänzung nicht allgemein von Selen, sondern konkret von der jeweiligen Selenverbindung gesprochen werden. Welche der Selenverbindung vorzuziehen ist, muss weiterhin diskutiert werden. Natriumselenit ist aufgrund seiner prooxidativen und zytotoxischen Wirkung kritisch zu betrachten. Auf der anderen Seite sollte eine mögliche chronische Toxizität durch starke Akkumulation von Selenomethionin nicht unterschätzt werden. Aus diesem Grund rät auch das Bundesinstitut für Risikobewertung von einer Supplementation mit Selenomethionin ab (BfR, 2004 b). Während Natriumselenit im Organismus eine Halbwertszeit von 65-115 Tagen aufweist, liegt diese bei Selenomethionin mit 200-300 Tagen mehr als doppelt so hoch (RKI, 2006).

In Bezug auf den Menschen sind die in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen durchaus relevant. Berechnet man die empfohlene Tagesdosis in Nahrungsergänzungsmitteln, die bei 30 µg Selen liegt (BfR, 2004 b), auf einen Mageninhalt von 1,5 l, ergib sich eine Selenkonzentration von etwa 0,25 µM. Diese Konzentration ist zwar geringer als die Inkubationskonzentrationen in den Zellkulturversuchen, jedoch ist von einer intrazellulären Akkumulation auszugehen. Dies zeigt zum einen der Vergleich mit realem Darmgewebe, in dem Gehalte von 2,8 µM gefunden werden (ATSDR, 2003; vgl. Abschnitt 5.2.1), und zum anderen die Bestimmung der Aufnahme mittels AAS.

In Bezug auf den Menschen sind die in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen durchaus relevant. Berechnet man die empfohlene Tagesdosis in Nahrungsergänzungsmitteln, die bei 30 µg Selen liegt (BfR, 2004 b), auf einen Mageninhalt von 1,5 l, ergib sich eine Selenkonzentration von etwa 0,25 µM. Diese Konzentration ist geringer als die Inkubationskonzentrationen in den Zellkulturversuchen, jedoch ist von einer intrazellulären Akkumulation auszugehen. Dies zeigt zum einen der Vergleich mit realem Darmgewebe, in dem Gehalte von 2,8 µM gefunden werden (ATSDR, 2003), und zum anderen die Bestimmung der zellulären Aufnahme mittels AAS (siehe Abschnitt 5.2.1).

Ausblickend wären weitere Untersuchungen sinnvoll, welche die höhere BER-Kapazität in den p53-profizienten Zellen nach Natriumselenit-Exposition ergründen. Um direkte Interaktionen zwischen p53 und den BER-Proteinen zu betrachten, könnten

Aktivitätsmessungen der jeweiligen Proteine durchgeführt werden. Versuche in z. B. XPC-defizienten Zellen könnten hingegen die Rolle der NER-Gene abklären. Zudem könnten die Entstehung und Akkumulation der oxidativen DNA-Schäden durch kinetische Untersuchungen weitergehend verfolgt werden. Weiterhin könnten Vergleiche mit Schwefelanaloga erfolgen, um die Selen-Spezifität der Effekte zu belegen. Ähnliches wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits gemacht (Blessing et al., 2004a). Außerdem könnten weitere Zink-bindende Proteine als oxidationsempfindliche Angriffspunkte untersucht werden, selbst wenn keine inaktivierende Wirkung des Natriumselenits auf p53 im zellulären System gefunden wurde. Ein Zielprotein wäre der Androgen-Rezeptor, der das Wachstum von Prostatakrebszellen steuert und dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor von zwei Zinkfingern in der DNA-Bindungsdomäne abhängt. Die Aktivität dieses Rezeptors kann z. B. über ein Reporter-Gen-Assay bestimmt werden (Crounauer et al., 2007). Es wurde jedoch bereits gezeigt, dass Natriumselenit die Genexpression des Rezeptors repressiert (Husbeck et al., 2006). Im Reporter-Gen-Assay kann bei einer reduzierten Aktivität aber nicht zwischen einer Inaktivierung durch Zink-Freisetzung bzw. einer gesenkten Genexpression unterschieden werden. Deshalb müsste zur Bestimmung eines Einflusses auf die Zinkfinger-Domäne eine Zink-Freisetzung direkt mittels Metall-Chelatoren in der Zelle detektiert werden (Berendji et al., 1997).

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Inaktivierung von p53, die im subzellulären System auftrat, im zellulären System nicht zum Tragen kam. Die Ergebnisse in p53-profizienten und p53-defizienten HCT116 Zellen machen vielmehr deutlich, dass p53 eine entscheidende Rolle bei der Schadensantwort der Zelle auf Natriumselenit spielt (Abbildung 53 A).
Als Reaktion auf die DNA-schädigende Wirkung des Natriumselenits wurde p53 durch Phosphorylierung stabilisiert. Als aktiver Transkriptionsfaktor induzierte p53 Gene der DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und Apoptose. Über die Induktion von *p21* wurden Zellzyklusarreste eingeleitet. Durch eine verstärkte Expression von *Bax* und die Kernlokalisation von AIF wurde die Apoptose eingeleitet. Daneben induzierte p53 die DNA-Reparatur, da oxidative DNA-Schäden in Anwesenheit von p53 erst bei einer stark zytotoxischen Konzentration von 8 µM Natriumselenit akkumulierten. Dabei könnten p53, z. B. durch direkte Interaktionen mit BER-Proteinen, oder p53-abhängige Gene der NER in einem „Back up“-Mechanismus eine Rolle gespielt haben (vgl. Abschnitt 5.5.5). In Abwesenheit von p53 akkumulierten DNA-Strangbrüche bereits in niedrigen, nicht-zytotoxischen Konzentrationen von Natriumselenit, ohne dass tumorsuppressive Reaktionen

eingeleitet wurden. Vielmehr war das Wachstum der p53-defizienten Zellen trotz DNA-Schädigung unbeeinflusst.

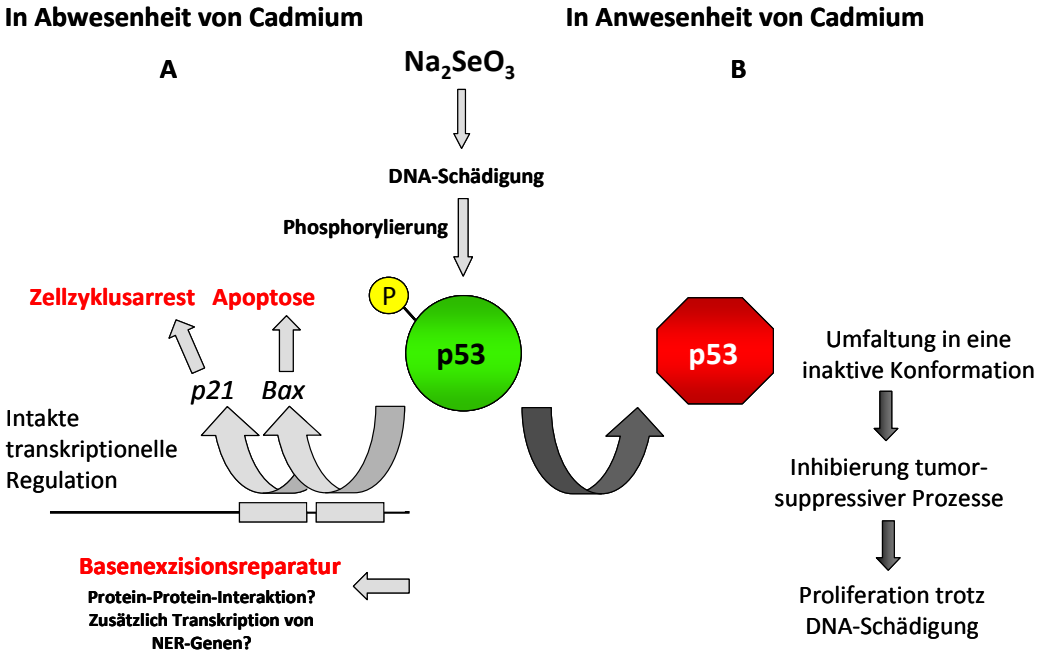


Abbildung 53: Einfluss von Natriumselenit und Cadmiumchlorid auf p53-abhängige Prozesse.

Die tumorsuppressiven Reaktionen in den p53-profizienten Zellen konnten durch Cadmiumchlorid inhibiert werden, da Cadmiumionen p53 entfalten und in eine inaktive Konformation überführen (Abbildung 53 B). Es konnte gezeigt werden, dass Cadmiumchlorid die Zytotoxizität von Natriumselenit reduziert. Weitergehende Kotoxizitätsstudien werden die Inhibierung anderer p53-abhängiger Prozesse, wie z. B. der Apoptose, untersuchen.

Die Akkumulation von DNA-Einzelstrangbrüchen in p53-defizienten Zellen nach Natriumselenit-Exposition bei gleichzeitiger Proliferation der Zellen ist bedenklich. Aus DNA-Einzelstrangbrüchen können in proliferierenden Zellen DNA-Doppelstrangbrüche generiert werden (zusammengefasst in Caldecott, 2008), welche umso mehr die Integrität des Genoms gefährden können. Solch ein Mechanismus könnte vor allem in premalignen und malignen Strukturen mit inaktivem p53 zur weiteren Entartung führen. Dies ist in sofern alarmierend, als dass p53 ein sehr häufig mutiertes Gen in Tumoren darstellt.

7 Literatur

Achanta, G. and Huang, P. (2004) Role of p53 in sensing oxidative DNA damage in response to reactive oxygen species-generating agents. *Cancer Research*, 64: 6233-6239

ATSDR (2003) Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile of Selenium, S. 137 ff.

Avantaggiati, M. L., Ogryzko, V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A. S. and Kelly, K. (1997) Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* (89): 1175-1184

Becchinelli, B., Lavra, L., Rinaldo, C., Lacovelli, S., Gurtner, A., Gasbarri, A., Ulivieri, A., Del Prete, F., Trovato, M., Piaggio, G., Bartolazzi, A., Soddu, S. and Sciacchitano, S. (2006) Repression of the antiapoptotic molecule galectin-3 by homeodomain-interaction protein kinase 2-activated p53 is required for p53-induced apoptosis. Molecular and Cellular Biology, 26 (12): 4746-4757

Berendji, D., Kolb-Bachofen, V., Meyer, K., Grapenthin, O., Weber, H., Wahn, V. and Kröncke, K. (1997) Nitric oxide mediates intracytoplasmic and intranuclear zinc release. *FEBS Letters*, 405: 37-41

BfR (2004) Bundesinstitut für Risikobewertung, herausgegeben von Domke, A., Großklaus, R., Niemann, B., Przyrembel, H., Richter, K., Schmidt, E., Weißenborn, A., Wörner, B. und Ziegenhagen. Verwendung von Mineralstoffen in Lebensmitteln, Toxikologische und ernährungsphysiologische Aspekte, Teil II, S. 261 ff., a

BfR (2004) Bundesinstitut für Risikobewertung, Selenverbindungen in Nahrungsergänzungsmitteln, Stellungnahme Nr. 015/2005 des BfR vom 17.12.2004

Blessing, H., Kraus, S., Heindl, P., Bal, W. and Hartwig, A. (2004) Interactions of selenium compounds with zinc finger proteins involved in DNA repair. *European Journal of Biochemistry*, 271: 3190-3199; a

Blessing, H. (2004) Einfluss von Selenverbindungen auf DNA-Reparaturproteine mit Zinkfingerstrukturen. Dissertation, Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Universität Karlruhe; b

Bleys, J., Navas-Acien, A. and Guallar, E. (2007) Serum selenium and diabetes in U.S. adults. Diabetes Care, 30 (4): 829-834

Brigelius-Flohé, R. (2008) Selenium compounds and selenoproteins in cancer. *Chemistry & Biodiversity*, 5: 389-395

Bundesanzeiger, 06.02.2006, Nr. 25: Bekanntmachung der Stoffe nach § 7 Abs. 2 Satz 1 Nr. 2 der Nahrungsergänzungsmittelverordnung

Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. P., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, 282: 1497-1501

Buschmann, T., Potapova, O., Bar-Shira, A., Ivanov, V. N., Fuchs, S. Y., Henerson, S., Fried, V. A., Minamoto, T., Alarcon-Vargas, D., Pincus, M., Gaarde, W. A., Holbrook, N. J., Shiloh, Y. and Ronai, Z. (2001) *Molecular and Cellular Biology*, 21 (8): 2743-2754

Butler, J. and Loh, S. (2003) Structure, function, and aggregation of the zinc-free form of the p53 DNA binding domain. *Biochemistry*, 42: 2396-2403

Cabelof, D. C., Raffoul, J. J., Yanamadala, S., Guo, Z. and Heydari, A. (2002) Induction of DNA polymerase ß-dependent base excision repair in response to oxidative stress in vivo. *Carcinogenesis*, 23 (9): 1419-1425

Caldecott, K. (2008) Single-strand break repair and genetic disease. *Nature Reviews Genetics*, 9: 619-631

Candé, C., Cecconi, F., Dessen, P and Kroemer, G. (2002) Apoptosis-inducing factor (AIF): key to conserved caspase-independent pathways of cell death? *Journal of Cell Science*, 115: 4727-4734

Candé, C., Vahsen, N., Métivier, D., Tourrière, Chebli, K., Garrido, C., Tazi, J. and Kroemer, G. (2004) Regulation of cytoplasmic stress granules by apoptosis-inducing factor. *Journal of Cell Science*, 117: 4461-4468

Chattererjee, A., Mambo, E., Osada, M., Upadhyay, S. and Sidransky, D. (2005) The effect of p53-RNAi and p53 knockout on human 8-oxoguanine DNA glycosylase (hOGG1) activity. *The FASEB Journal*, 20 (1): 112-114

Chehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M. and Halazonetis, T. D. (2000) Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G1 by stabilizing p53. *Genes & Development*, 14: 278-288

Chen, Y. and Maret, W. (2001) Catalytic selenols couple the redox cycles of metallothionein. European Journal of Biochemistry, 268: 3346-3353

Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D. and Pavletich, N. P. (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: Understanding tumorigenic mutations. *Science*, 265: 346-355

Clark, L. C., Graham, G. F., Crounse, R. G., Grimson, R., Hulka, B. and Shy, C. M. (1984) Plasma selenium and skin neoplasms: a case-control study. *Nutrition and Cancer*, 6 (1): 13-21

Clark, L. C., Combs, G. F., Turnbull, B. W., Slate, E. H., Chalker, D. K., Chow, J., Davis, L. S., Glover, R. A., Graham, G. F., Gross, E. G., Krongrad, A., Lesher, J. L., Park, H. K., Sanders, B. B., Smith, C. L. and Taylor, J. R. (1996) Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. *Journal of the American Medical Association*, 276 (24): 1957-1963

Cowgill, U. M. (1997) The distribution of selenium and mortality owing to acquired immune deficiency syndrome in the continental United States. *Biological Trace Element Research*, 56: 43-61

Cregan, S. P., Fortin, A., MacLaurin, J. G., Callaghan, S. M., Cecconi, F., Yu, S., Dawson, T. M., Dawson, V. L., Park, D. S., Kroemer, G. and Slack, R S. (2002) Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *The Journal of Cell Biology*, 158 (3): 507-517

Cregan, S. P., Dawson, V. L. and Slack R. S. (2004) Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene*, 23: 2785-2796

Crounauer, M., Ince, Y., Engers, R., Rinnab, L., Weidemann, W., Suschek, C., Burchardt, M., Kleinert, H., Wiedenmann, J., Sies, H., Ackermann, R. and Kröncke, K. (2007) Nitric oxide-mediated inhibition of androgen receptor activity. *Oncogene*, 26: 1875-1884

Czernichow, S., Counthouis, A., Bertrais, S., Vergnaud, A., Dauchet, L., Galan, P. and Hercberg, S. (2006) Antioxidant supplementation does not affect fasting plasma glucose in the supplementation with antioxidant vitamins and minerals (SU.VI.MAX) study in France: association with dietary intake and plasma concentrations. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84: 395-399

D'Errico, M., Parlanti, E., Teson, M., Bernardes de Jesus, B. M., Degan, P., Calcagnile, A., Jaruga, P., Bjørås, M., Crescenzi, M., Pedrini, A. M., Egly, J., Zambruno, G., Stefanini, Mi., Dizdaroglu, M. And Dogliotti, E. (2006) New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *The EMBO Journal*, 25: 4305-4315

Dally, H. and Hartwig, A. (1997) Induction and repair of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. Carcinogenesis, 18 (5): 1021-1026

Delphin, C., Cahen, P., Lawrence, J. J. and Baudier, J. (1994) Characterization of baculovirus recombinant wild-type p53. Dimerization of p53 is required for high-affinity DNA binding and cysteine oxidation inhibits p53 DNA binding. *European Journal of Biochemistry*, 223: 683-692

DFG (2010) Deutsche Forschungsgemeinschaft. Selen und seine anorganischen Verbindungen. In Hartwig, A. (Hrsg.) Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten, Wiley, Weinheim

DGE (2000) Deutsche Gesellschaft für Ernährung. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 1. Auflage. Umschau Braus Verlag, Frankfurt/Main

Duffield-Lillico, A. J., Reid, M. E., Turnball, B. W., Combs, G. F., Slate, E. H., Fischbach, L. A., Marshall, J. R. and Clark, L. C. (2002) Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the nutritional prevention of cancer trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 11: 630-639

Duffield-Lillico, A. J., Dalkin, B. L., Reid, M. E., Turnball, B. W., Slate, E. H., Jacobs, E. T., Marshall, J. R. and Clark, L. C. (2003) Selenium supplementation, baseline plasma selenium status and incidence of prostate cancer: an analysis of the complete treatment period of the nutritional prevention of cancer trial. *British Journal of Urology*, 91: 608-612

Dušinská, M., Džupinková, Z., Wsólová, L., Harrington, V. and Collins, A R. (2006) Possible involvement of *XPA* in repair of oxidative DNA damage deduced from analysis of damage, repair and genotype in a human population study. *Mutagenesis*, 21 (3): 205-211

El-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1992) Definition of a consensus binding site for p53. *Nature genetics*, 1: 45-49

Erhart, L. M., Lankat-Buttgereit, B., Schmidt, H., Wenzel, U., Daniel, H. and Göke, R. (2005) Flavone initiates a hierarchical activation of the caspase-cascade in colon cancer cells. *Apoptosis*, 10: 611-617

Fan, T., Han, L., Cong, R. and Liang, J. (2005) Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica*, 37 (11): 719-727

Faraonio, R., Vergara, P., Di Marzo, D., Pierantoni, M., Napolitano, M., Russo, T. and Cimino, F. (2006) P53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant responses genes. *The journal of Biological Chemistry*, 281 (52): 39776-39784

Ford, J. M. (2005) Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: Another role for p53. *Mutation research*, 577: 195-202

Fortini, P. and Dogliotti, E. (2007) Base damage and single-strand break repair: Mechanisms and functional significance of short- and long-patch subpathways. *DNA Repair*, 6: 398-409

Frederich, M., Bentires-Ali, Tits, M., Angenot, L., Heinen, E. and De Pauw-Gillet, M. (2003) Apoptosis induction in human cancer cells by sungucine from Strychnos icaja root. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 367: 260-265

Gannon, J. V., Greaves, R., Iggo, R. and Lane, D. P. (1990) Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *The EMBO Journal*, 9 (5): 1595-1602

Ganyc, D. and Self, W. (2008) High affinity selenium uptake in a keratinocyte model. *FEBS Letters*, 582 (2): 299-304

Garland, M., Morris, J. S., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Spate, V. L., Baskett, C. K., Rosner, B., Speizer, F. E., Willett, W. C. and Hunter, D. J. (1995) Prospective study of toenail selenium levels and cancer among women. *Journal of National Cancer Institute*, 87 (7): 497-505

Giaccia, A. and Kastan, M. B. (1998) The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes and Development*, 12: 2973-2983 (a)

Giono, L. E. and Manfredi, J. J. (2006) The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *Journal of Cellular Physiology*, 209: 13-20

Goel, A., Fuerst, F., Hotchkiss, E. and Boland, C. (2006) Selenomethionine induces p53 mediated cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*, 5 (5): 529-535

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

Graupner, A. (2009) Nachweis von Apoptose durch Selenverbindungen, Diplomarbeit, Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie, Technische Universität Berlin

Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M. and Harris, C. C. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research*, 54: 4855-4878

Hainaut, P. and Milner, J. (1993) A structural role for metal ions in the "wild-type" conformation of the tumor suppressor protein p53. *Cancer Research*, 53: 1739-1742 (a)

Hainaut, P. and Milner, J. (1993) Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific DNA binding in vitro. *Cancer Research*, 53: 4469-4473 (b)

Hall, C. (2008) Untersuchungen zur direkten und indirekten Genotoxizität von Natriumselenit und Selenomethionin. Dissertation, Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie, Technische Universität Berlin

Hamann, Ingrit (2009) Etablierung eines nicht-radioaktiven Inzisionstests zur Messung der DNA-Reparaturkapazität gegenüber oxidativen DNA-Schäden und der Einfluss von Kupfer und Cadmium. Dissertation, Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie, Technische Universität Berlin

Hartwig, A., Klyszcz-Nasko, Schlepegrell, R. and Beyersmann, D. (1993) Cellular damage by ferric nitrotriacetate and ferric citrate in V79 cells: interrelationship between lipid peroxidation, DNA strand breaks and sister chromatid exchanges. *Carcinogenesis*, 14 (1): 107-112

Hartwig, A., Dally, H. and Schlepegrell, R. (1996) Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicology Letters*, 88: 85-90

Hartwig, A. (1998) Assessment of oxidative DNA damage by the frequency of formamidopyrimidine glycosylase (FPG) sensitive DNA lesions; in: Aruoma, O. I. and

Halliwell, B. (1998) DNA and Free Radicals: Techniques, Mechanisms & Applications, OICA International; ISBN 976-8056-16-9, S. 215-222

Hegde, M. L., Hazra, T. and Mitra, S. (2008) Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Research*, 18: 27-47

Ho, J. and Benchimol, S. (2003) Transcriptional repression mediated by the p53 tumour suppressor. *Cell Death and Differentiation*, 10: 404-408

Honda, R. and Yasuda, H. (1999) Association of p19ARF with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *The EMBO Journal*, 18 (1): 22-27

Hu, H., Jiang, C., Schuster, T., Li, G., Daniel, P. and Lü, J. (2006) Inorganic selenium sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through superoxide/p53/Bax-mediated activation of mitochondrial pathway. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5 (7): 1873-1882

Huerta, S., Goulet, E., Huerta-Yepez, S., Livingston, E. (2007) Screening and detection of apoptosis. *Journal of Surgical Research*, 139 (1): 143-156

Hupp, T. R., Meekl, D. W., Midgley, C. A. and Lane, D. P. (1993) Activation of the cryptic DNA binding function of mutant forms of p53. *Nucleic Acids Research*, 21 (14): 3167-3174

Hupp, T. R. (1999) Regulation of p53 protein function through alterations in protein-folding pathways. *Cellular and Molecular Life Science*, 55: 88-95

Husbeck, B., Bhattacharyya, R., Feldmann, D. and Knox, S. (2006) Inhibition of androgen receptor signalling by selenite and methylseleninic acid in prostate cancer cells: two distinct mechanisms of action. Molecular Cancer Research Therapeutics, 5: 2078-2085

Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J. and Wang, H. (2003) DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene*, 22: 5834-5847

Imai, M., Hoshi, T. and Ogawa, K. (1994) K-ras codon 12 mutations in biliary tract tumors detected by polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis. *Cancer*, 73: 2727-2733

Ip, C. (1998) Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *Journal of Nutrition*, 128: 1845-1854

Izumi, T., Hazra, T. K., Boldogh, I., Tomkinson, A. E., Park, M. S., Ikeda, S. and Mitra, S. (2000) Requirement for human AP endonuclease 1 for repair of 3'-blocking damage at DNA single-strand breaks induced by reactive oxygen species. *Carcinogenesis*, 21 (7): 1329-1334

Jackson, M. I. and Combs, G. F. (2008) Selenium and anticarcinogenesis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 11: 718-726

Jacob, C., Maret, W. and Vallee, B. (1999) Selenium redox biochemistry of zinc-sulfur coordination sites in proteins and enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 1910-1914

Jeffrey, P. D., Gorina, S. and Pavletich, N. P. (1995) Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science*, 267: 1498-1502

Jiang, C., Wang, Z., Ganther, H. and Lü, J. (2002) Distinct effects of methylseleninic acid versus selenite on apoptosis, cell cycle, and protein kinase pathways in DU145 human prostate cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1: 1059-1066

Jiang, C., Hu, H., Malewicz, B., Wang, Z. and Lü, J. (2004) Selenite-induced p53 Ser-15 phosphorylation and caspase-mediated apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3 (7): 877-884 a

Jiang, C., Kim, K., Wang, Z. and Lü, J. (2004) Methyl selenium-induced vascular endothelial apoptosis is executed by caspases and principally mediated by P38 MAPK pathway. *Nutrition and Cancer*, 49 (2): 174-183 b

Jung, H., Kim, E., Mun, J., Park, S., Smith, M., Han, S. and Seo, Y. (2007) Base excision DNA repair defect in Gadd45a-deficient cells. *Oncogene*, 26: 7517-7525

Kang, Y., Yi, M., Kim, M., Park, M., Bae, S., Kang, C., Cho, C., Park, I., Park, C., Rhee, C., Hong, S., Chung, H., Lee, Y. and Lee, S. (2004) Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: Reactive oxygen species-mediated poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation signals apoptosis-inducing factor release from mitochondria. *Cancer Research*, 64: 8960-8967

Kim, T., Jung, U., Cho, D. and Chung, A. (2001) Se-methylselenocysteine induces apoptosis through caspase activation in HL-60 cells. *Carcinogenesis*, 22 (4): 559-465

Komissarova, E., Saha, S. and Rossman, T. (2005) Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202 (1): 99-107

König, Charlotte (2010) Einfluss von Kupfer und Cadmium auf die Aktivität der hOGG1 in Abhängigkeit des p53-Status. Diplomarbeit, Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie, Technische Universität Berlin, in Vorbereitung

Kook, S., Son, Y., Chung, S., Lee, S., Kim, J., Jeon, Y. and Lee, J. (2007) Caspase-independent death of human osteosarcoma cells by flavonoids is driven by p53-mediated mitochondrial stress and nuclear transactivation of AIF and endonuclease G. *Apoptosis*, 12: 1289-1298

Králová, V., Brigulová, K., Červinka, M. and Rudolf E. (2009) Antiproliferative and cytotoxic effects of sodium selenite in human colon cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 23 (8): 1497-1503

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B. and Melino, G. (2009) Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell death and Differentiation*, 16: 3-11

Kuehnelt, D., Kienzl, N., Traar, P., Le, N. H., Francesconi, K. A. and Ochi, T. (2005) Selenium metabolites in human urine after ingestion of selenite, L-selenomethionine, or DL-selenomethionine: a quantitative case study by HPLC/ICPMS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383: 235-246

Kurihara, A., Nagoshi, H., Yabuki, M., Okuyama, R., Obinata, M. and Ikawa, S. (2007) Ser^{46} phosphorylation of p53 is not always sufficient to induce apoptosis: multiple mechanisms of regulation of p53-dependent apoptosis. *Genes to Cells*, 12: 853-861

Kussie, P. H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A. and Pavletich, N. P. (1996) Structure of the Mdm2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*, 274: 948-953

Laclaustra, M., Navas-Acien, A., Stranges, S., Ordovas, J. And Guallar, E. (2009) Serum selenium concentrations and diabetes in U.S. adults: National health and nutrition examination survey (NHANES) 2003-2004. *Environmental Health Perspectives*, 117 (9): 1409-1413

Lane, D. P. and Crawford, L. V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 278: 261-263

Langie, S. A. S., Knaapen, A. M., Houben, J. M. J., van Kempen, F. C., de Hoon, J. P. J., Gottschalk, R. W. H., Godschalk, R. W. L. and van Schooten, F. J. (2007) The role of glutathione in the regulation of nucleotide excision repair during oxidative stress. *Toxicology Letters*, 168: 302-309

Letavayová, L., Vlčková, V. and Brozmanová, J. (2006) Selenium: From cancer prevention to DNA damage. *Toxicology*, 227: 1-14

Li, G., Hu, H., Jiang, C., Schuster, T. and Lü, J. (2007) Differential involvement of reactive oxygen species in apoptosis induced by two classes of selenium compounds in human prostate cancer cells. *International Journal of Cancer*, 120: 2034-2043

Linzer, D. I. H. and Levine, A. J. (1979) Characterization of a 54k Da cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 17:43-52

Lippman, S. M., Klein, E. A., Goodman, P. J. Lucia, M. S., Thompson, I. M., Ford, L. G., Parnes, H. L., Minasian, L. M., Gaziano, J. M., Hartline, J. A., Parsons, J. K., Bearden III, J. D., Crawford, E. D., Goodman, G. E., Claudio, J., Winquist, E., Cook, E. D., Karp, D. D., Walther, P., Lieber, M. M., Kristal, A. R., Darke, A. R., Arnold, K. B., Ganz, P. A., Santella,

R. M., Albanes, D., Taylor, P. R., Probstfield, J. L., Jagpal, T. J., Crowley, J. J., Meyskens, F. L., Baker, L. H. and Coltman, C. A. (2009) Effects of selenium and Vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers. J*ournal of the American Medical Association*, 301 (1): 39-51

Lu, J., Jiang, C., Kaeck, M., Ganther, H., Vadhanavikit, S., IP, C. and Thompson, H. (1995) Dissociation of the genotoxic and growth inhibitory effects of selenium. *Biochemical Pharmacology*, 50 (2): 213-219

Malumbres, M. and Barbacid, M. (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 30 (11): 630-641

McClung, J. P., Roeneker, C. A., Mu, W., Lisk, D. J., Langlais, P., Liu, F. and Lei, X. G. (2004) Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (24): 8852-8857

Meek, D. W. (1998) Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53. *Cellular Signalling*, 10 (3): 159-166

Méplan, C., Mann, K. and Hainaut, P. (1999) Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (44): 31663-31670

Meyer, F., Galan, P., Douville, P, Bairati, I., Kegle, P., Bertrais, S., Estaquio, C and Hercberg, S. (2005) Antioxidant vitamin and mineral supplementation and prostate cancer prevention in the SU.VI.MAX trial. *International Journal of Cancer*, 116: 182-186

Mihara, M., Erster, S., Zaiko, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P. and Moll, U. M. (2003) P53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular Cell*, 11: 577-590

Moll, U. M. and Zaika, A. (2001) Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Letters*, 493: 65-69

Moubarak, R., Yuste, V., Artus, C., Bouharrour, A., Greer, P., Menissier-de Murcia, J. and Susin, S. (2007) Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, Calpains, and bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Molecular and Cellular Biology*, 27 (3): 4844-4862

Müller, A. (2008) Specific physiological features of inorganic selenium compounds regarding metabolism – in vivo and in vitro investigations with type II diabetic dbdb mice and healthy rats. Habilitationsschrift, Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2008/6340/ (Entnahmedatum: 18.09.2009)

Nelson, W. and Kastan, M. (1994) DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Molecular and Cellular Biology*, 14 (3): 1815-1823

NemV (Nahrungsergänzungsmittelverordnung vom 24. Mai 2004 (BGBl. I S. 1011), Stand: Geändert durch Art. 1 V v. 17.1.2007 I 46

Nicholls, C., McLurs, K., Shields, M. and Lee, P. (2002) Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 12937-12945

Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y. and Taya, Y. (2000) p53 AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*, 102: 849-862

Ohta, Y. and Suzuki, K. T. (2008) Methylation and demethylation of intermediates selenide and methylselenol in the metabolism of selenium. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 226: 169-177

Olm, E., Fernandes, A., Hebert, C., Rundlöf, E., Danielsson, O. and Björnstedt, M. (2009) Extracellular thiol-assisted selenium uptake dependent on the xc- cystine transporter explains the cancer-specific cytotoxicity of selenite. *Proceedings of the National Academy of Science*, 106 (7): 11400-11405

Otterson, G. A., Kratzke, R. A., Coxon, A., Kim, Y. W. and Kaye, F. J. (1994) Absence of p16INK4 protein is restrikted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB. *Oncogene*, 9: 3375-3378

Park, Y. and Whanger, P. D. (1995) Toxicity, metabolism and absorption of selenite by isolated rat hepatocytes. *Toxicology*, 100: 151-162

Parsons, R., Matthew, G. L., Longley, M. J., Fang, W., Papadopouslos, N., Jen, J., de la Chapelle, A., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. and Modrich, P. (1993) Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER^{+} tumor cells. *Cell*, 75: 1227-1236

Pise-Masison, C., Radonovich, M., Sakaguchi, K., Appella and E., Brady, J. N. (1998) Phosphorylation of p53: a novel pathway for p53 inactivation in human T-cell lymphotropic virus type 1-transformed cells. *Journal of Virology*, 72 (8): 6348-6355

Redman, C., Xu, M., Peng, Y., Scott, J., Payne, C., Clark, L and Nelson, M. (1997) Involvement of polyamines in selenomethionine induced apoptosis and mitotic alterations in human tumor cells. *Carcinogenesis*, 18 (6): 1195-1202

Reeves, M. A. and Hoffmann, P. R. (2009) The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66: 2457-2478

RKI (2006) Empfehlung des Robert Koch-Institut, Selen in der Umweltmedizin, Mitteilung der Kommission "Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin". *Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz*, 49: 88-102

RKI (2007) Robert Koch-Institut/Statistisches Bundesamt, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Prostatakrebserkrankungen, Heft 36, ISBN 978-3-89606-177-5, ISSN 1437-5478

Rodriguez, M. S., Desterro, J. M. P., Lain, S., Midgley, C. A., Lane, D. P. and Hay, R. T. (1999) SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *The EMBO Journal*, 18 (22): 6455-6461

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

Rosen, B. and Liu, Z. (2009) Transport pathways for arsenic and selenium: A minireview. *Environmental International*, 35: 512-515

Rudolf, E., Radocha, J., Červinka, M. and Cerman, J. (2004) Combined effect of sodium selenite and campthotecin on cervical carcinoma cells. *Neoplasma*, 51 (2): 127-135

Rudolf, E., Rudolf, K. and Červinka, M. (2008) Selenium activates p53 and p38 pathways and induces caspase-independent cell death in cervical cancer cells. *Cell Biology and Toxicology*, 24: 123-141

Saito, S., Yamaguchi, H., Higashimoto, Y., Chao, C., Xu, Y., Fornace, A., Appella, E. and Anderson, C. (2003) Phosphorylation site interdependence of human p53 post-translational modifications in response to stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (39): 37536-37544

Sakaguchi, K., Sakamoto, H., Lewis, M. S., Anderson, C. W., Erickson, J. W., Appella, E. and Xie, D. (1997) Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry*, 36: 10117-10124

Sakaguchi, K., Herrera, J. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W. and Appella, E. (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes & Development*, 12: 2831-2841

Sakaguchi, K., Saito, S., Higashimoto, Y., Roy, S., Anderson, C. W. and Appella, E. (2000) Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by casein 1-like kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (13): 9278-9283

Schneider, J. (2009) Untersuchungen zur Selenaufnahme in menschliche Zellen mittels Grafitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie. Diplomarbeit, Institut für Lebensmittel-technologie und Lebensmittelchemie, Technische Universität Berlin

Schomburg, L. and Köhrle, J. (2007) Selen; in: Dunkelberg, H., Gebel, T. and Hartwig, A. (2007) *Handbuch der Lebensmitteltoxikologie*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Band 5, 1. Auflage, ISBN: 978-3-527-31166-8, S. 2403-2446

Schröterová, L., Králová, V., Voráčová, A., Hašková, P., Rudolf, E and Červinka, M. (2009) Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: Comparison of different cytotoxicity assays. *Toxicology in Vitro*, 23: 1406-1411

Schuler, M. and Green, D. R. (2001) Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions*, 29 (6): 684-687

Schwertle, T., Ebert, F., Thuy, C., Richter, C., Mullenders, L. and Hartwig, A. (2010) Genotoxicity of soluble and particulate cadmium compounds: impact on oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. Chemical Research in Toxicology, 23: 432-442

Seo, Y. R., Fishel, M. L., Amundson, S., Kelley, M. R. and Smith, M. L. (2002) Implication of p53 in base excision DNA repair: *in vivo* evidence. *Oncogene*, 21: 731-737 (a)

Seo, Y. R., Sweeney, C. and Smith, M. L. (2002) Selenomethionine induction of DNA repair response in human fibroblasts. *Oncogene*, 21: 3663-3669 (b)

Seo, Y. and Jung, H. (2004) The potential roles of p53 tumor suppressor in nucleotide excision repair (NER) and base excision repair (BER). *Experimental and Molecular Medicine*, 36 (6): 505-509

Sheik, M., Hollander, M. and Fornace, A. (2000) Role of Gadd45 in apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, 59: 43-45

Shieh, S., Ikeda, M., Taya, Y. and Prives, C. (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by Mdm2. *Cell*, 91: 325-334

Siliciano, J., Canman, C., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E. and Kastan, M. (1997) DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes & Development*, 11: 3471-3481

Smith, M., Chen, I., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C., Gilmer, T., Kastan, M., O' Connor, P. and Fornace Jr., A. (1994) Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. Science, 266: 1376-1380

Smith, M., Lancia, J., Mercer, T. and Ip, C. (2004) Selenium compounds regulate p53 by common and distinctive mechanisms. *Anticancer Research*, 24: 1401-1408

Soucci, T. (2000) The p53 tumor suppressor gene: From molecular biology to clinical investigations. *Annals New York Academy of Sciences*, 910: 121-137

Stambolsky, P., Weisz, L., Shats, I., Klein, Y., Goldfinger, N., Oren, M. and Rotter, V. (2006) Regulation of AIF expression by p53. *Cell Death and Differentiation*, 13: 2140-2149

Stapleton, S. R. (2000) Selenium: an insulin-mimetic. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57: 1874-1879

Stewart, M., Spallholz, J., Neldner, K. and Pence, B. (1999) Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 42-48

Stranges, S., Marshall, J. R., Natarajan, R., Donahue, R. P., Trevisan, M., Combs, G. F., Cappuccio, F. P., Ceriello, A. and Red, M. E. (2007) Effects of long-term selenium supplementation on the incidence of type 2 diabetes. *Annals of Internal Medicine*, 147: 217-223

Taylor, W. R. and Stark, G. R. (2001) Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 20: 1803-1815

Thompson, T., Tovar, C., Yang, H., Carvajal, D., Vu, B., Xu, Q., Wahl, G., Heimbrook, D. and Vassilev, L. (2004) Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 51: 53015-53022

Thut, C. J., Chen, J., Klemm, R. and Tjian, R. (1995) P53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science*, 267: 100-104

Thuy, C. (2006) Einfluss von Cadmiumverbindungen auf die Struktur und die Funktion des Tumorsuppressorproteins p53. Dissertation, Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie, Technische Universität Berlin

Venkateswaran, V., Klotz, L. and Fleshner, N. (2002) Selenium modulation of cell proliferation and cell cycle biomarkers in human prostate carcinoma cell lines. *Cancer Research*, 62: 2540-2545

Voß, Rebecca (2010) Kotoxizität von Selenverbindungen und Cadmiumchlorid in Abhängigkeit vom p53-Status der Zelle. Diplomarbeit, Institut für Lebensmittel-technologie und Lebensmittelchemie, Technische Universität Berlin, in Vorbereitung

Wang, H., Yu, S., Koh, D., Lew, J., Coombs, C., Bowers, W., Federoff, H., Poirier, G., Dawson , T. and Dawson, V. (2004) Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death. *The Journal of Neuroscience*, 24 (48) 10963-10973

Waterman, M. J. F., Stavridil, E. S., Waterman, J. L. F. and Halazonetis, T. D. (1998) ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nature Genetics*, 19: 175-178

Whanger, P. D. (1998) Metabolism of selenium in humans. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 11: 227-240

Wu, P., Tai, M., Hu, D., Lai, C., Chen, C., Wu, Y., Tsai, C., Shin, S. and Kuo, H. (2008) Cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine induces cell cycle arrest and apoptosis in rabbit retinal pigment epithelial cells. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 24 (1): 25-33

Xiao, R., Qiao, J., Zhao, H., Liang, J., Yu, H., Liu, J., Guo, A. And Wang, W. (2006) Sodium selenite induces apoptosis in cultured cortical neurons with special concomitant changes in expression of the apoptosis-related genes. *NeuroToxicology*, 27: 478-484

Yoshizawa, K., Willett, W. C., Morris, S. J., Stampfer, M. J., Spiegelmann, D., Rimm, E B. and Giovannucci, E. (1998) Study of prediagnostic selenium level in toenails and the rish of advanced prostate cancer. *Journal of National Cancer Institute*, 90 (16): 1219-1224

Zaky, A., Busso, C., Izumi, T., Chattopadhyay, R., Bassiouny, A., Mitra, S. and Bhakat, K. (2008) Regulation of the human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) expression by the tumor suppressor p53 in response to DNA damage. *Nucleic Acids Research*, 36 (5): 1555-1566

Zanna, C., Ghelli, A., Porcelli, A., Martinuzzi, A., Carelli, V. and Rugolo, M. (2005) Caspase-independent death of Leber's hereditary optic neuropathy cybrids is driven by energetic failure and mediated by AIF and Endonuclease G. *Apoptosis*, 10: 997-1007

Zeng, H. and Davis, C. (2003) Down-regulation of proliferating cell nuclear antigen gene expression occurs during cell cycle arrest induced by human fecal water in colonic HT-29 cells. *American Society for Nutritional Sciences*, 133: 2682-2687

Zhan, Q. (2005) Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutation Research*, 569: 133-143

Zhao, R., Xiang, N., Domann, F. and Zhong, W. (2009) Effects of selenite and genistein on G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 61 (3): 397-407

Zhou, J., Ahn, J., Wilson, S. H. and Prives, C. (2001) A role for p53 in base excision repair. *The EMBO Journal*, 20 (4): 914-923

Zhu, J., Zhou, W., Jiang, J. and Chen, X. (1998) Identification of a novel functional domain that is necessary for mediating apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (21): 13030-13036

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
AIF	apoptosis inducing factor
APE1	Apurin/Apyrimidin-Endonuklease 1
ARE	antioxidant response element
AS	Aminosäure
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM and Rad3 related
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
Bax	Bcl-2-associated X protein
BER	Basenexzisionsreparatur
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
Bp	Basenpaare
Caspase	cysteinyl-aspartate specific protease
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DMEM	Dulbecos Modified Eagle Medium
FKS	Fötales Kälberserum
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
GADD45	growth arrest DNA damage induced gene 45
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GPx	plasmatische Glutathion-Peroxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
hOGG1	humane 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase 1
LigIII	Ligase III
MAK-Wert	Maximale Arbeitsplatzkonzentrationswerte gesundheitsgefährdender Stoffe

MDM2	murine double minute 2
MRPs	multidrug resistance proteins
MTT	[3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid]
NemV	Nahrungsergänzungsmittelverordnung
NER	Nukleotiexzisionsreparatur
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
Polß	Polymerase ß
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
SECIS-Element	Selenocystein-Insertions-Sequenz-Element
SELECT	Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial
SU.VI.MAX	supplémentation en vitamines et minéraux antioxydants
WST-1	water soluble tetrazolium
XPA	Xeroderma Pigmentosum Protein A
XPC	Xeroderma Pigmentosum Protein C
XRCC1	X-ray cross complementing protein 1

8.2 Chemikalien

Bezeichnung	**Lieferant**
2-Mercaptoethanol	Serva (Heidelberg)
2-Propanol	Roth (Karlsruhe)
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1; 40 %)	Roth (Karlsruhe)
Alcian Blue 8GX	Fluka BioChemika (Buchs, Schweiz)
Ammoniumacetat	Merck (Darmstadt)
Aprotinin (aus der Rinderlunge, 3-7 TIU/mg)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bio-Rad-Protein-Assay-Reagenz	Bio-Rad (München)
B-R SYBR® Green SuperMix for iQ™	Quanta Bioscinces über VWR International (Dresden)
Casyton (isotone Salzlösung)	Schärfe System (Reutlingen)
DAPI-Färbelösung (CyStainDNA)	Partec (Münster)
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth (Karlsruhe)
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
ECL Advance Western blotting Detektionskit	GE Healthcare (Freiburg)
ECL Western blotting Detektionsreagenzien	GE Healthcare (Freiburg)
Ethanol, 96 %, vergällt	Bundesmonopolverwaltung für Branntwein (Offenbach)
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Riedel-de Haen (Seelze)
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich (Steinheim) (bis Ende 2006) Gibco, Invitrogen (Karlsruhe) (ab Ende 2006)
Giemsa (Azur-Eosin-Methylenblaulösung)	Merck (Darmstadt)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Hydroxylapatit (high resolution)	Calbiochem (ca Jolle, Kanada)
Igepal Ca 630 (NP-40)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Immersionsöl	Zeiss (Oberkochen)

Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth (Karlsruhe)
Leupeptin (Hydrochlorid, 90 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Magermilchpulver	Roth (Karlsruhe)
Magnesium-Matrixmodifier	Merck (Darmstadt)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem (Darmstadt)
Natriumfluorid (NaF, 99 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck (Darmstadt)
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4, 99,98 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumselenit (Na_2SeO_3, 99 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natronlauge (NaOH, 4 N)	Kraft (Duisburg)
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel (Düren)
Palladium-Modifier	Merck (Darmstadt)
PCR-Primer	MWG Biotech (Ebersberg)
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pepstatin A (aus mikrobieller Quelle)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phenylmethansulfonylfluorid (99,0 %)	Fluka BioChemika (Buchs, Schweiz)
qScript™ cDNA Synthesis Kit	Quanta Bioscinces über VWR International (Dresden)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Salpetersäure (HNO_3, 65 %)	Kraft (Duisburg)
Salzsäure (HCl, 37 %)	Kraft (Duisburg)
Salzsäure (HCl, 1 N)	Kraft (Duisburg)
SDS-Lösung (10 %)	Merck (Darmstadt)
Selen-Atomspektroskop-Standardlösung	Fluka (Buchs, Schweiz)
L(+)-Selenomethionin (99 %)	Acros Organics (Geel, Belgien)
Staurosporin (aus Streptomyces sp.)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Sterilium	Bode Chemie (Hamburg)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
TE-Puffer	Gibco, Life Technologies (New York, USA)

Tris-Base	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Fluka (Buchs, Schweiz)
Trypsin (10x)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)
Tween 20 Sigma Ultra	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Vectashield Mounting Medium mit DAPI	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Wasserstoffperoxid (H_2O_2, suprapur, 30 %)	Merck (Darmstadt)

8.3 Antikörper

Tabelle 6: Primäre Antikörper

Antikörper	Applikation	Verdünnung	Herkunft / Spezifität	Lieferant
Aktin (I-19)	WB	1:1000	rabbit polycl.	Santa Cruz Biotechnology
AIF (H300)	IF	1:50	rabbit polycl.	Santa Cruz Biotechnology
DNA Pol ß (18s)	WB	1:1000	mouse monocl.	Thermo Scientific
normal mouse IgG	IP	1 µg/Probe	(control IgG)	Santa Cruz Biotechnology
p21	WB	1:1000	mouse monocl.	Acris Antibodies
p53 (DO-7)	WB	1:1000-5000	mouse monocl.	DakoCytomation
p53 (CM1)	WB (nach IP)	1:1000	rabbit polycl.	Novo Castra
P53 (PAb1620)	IP	1 µg/Probe	mouse monocl.	Calbiochem
P53 (PAb240)	IP	1 µg/Probe	mouse monocl.	Calbiochem
Phospho-p53, Ser15	WB	1:1000	rabbit polycl.	Cell Signaling Technology
Phospho-p53, Ser20	WB	1:1000	rabbit polycl.	Cell Signaling Technology
Phospho-p53, Ser37	WB	1:1000	rabbit polycl.	Cell Signaling Technology
Phospho-p53, Ser46	WB	1:1000	rabbit polycl.	Cell Signaling Technology
Phospho-p53, Ser392	WB	1:1000	rabbit polycl.	Cell Signaling Technology
XPA (FL-273)	WB	1:1000	rabbit polycl.	Santa Cruz Biotechnology
XPC	WB	1:500	rabbit polycl.	Santa Cruz Biotechnology

Tabelle 7: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Applikation	Markierung	Verdünnung	Lieferant
Anti-Kaninchen (goat)	IF	Cy3	1:400	Jackson Immuno Research Labories
Anti-Kaninchen (goat)	WB	HRP	1:2500	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Maus (goat)	WB	HRP	1:2500	Santa Cruz Biotechnology

8.4 Puffer und Lösungen

Zellkultur

PBS (pH7,4)	100 mM	NaCl
	4,5 mM	KCl
	7 mM	Na_2HPO_4
	3 mM	KH_2PO_4
gebrauchsfertige Trypsin-Lösung	0,25 %	Trypsin in PBS mit 0,5 mM EDTA

Western Blot

RIPA-Puffer	10 mM	Tris pH 7,6
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 %	Triton X-100
	1 %	Natriumdesoxycholat
	0,1 %	SDS
	1 mM	PMSF (in 2-Propanol)
	1 µg/ml	Aprotinin (in 50 mM Tris, pH7)
	1 µg/ml	Leupeptin (in bidest. H_2O)
	1 µg/ml	Pepstatin A (in DMSO)
	50 mM	Natriumfluorid
	1 mM	Natriumorthovanadat

Lämmli-Laufpuffer	25 mM	Tris
	0,1 %	SDS
	192 mM	Glycin
Trenngel (12 %)	0,375 M	Tris (pH 8,8)
	0,1 %	SDS
	12 %	Acrylamid
	0,08 %	TEMED
	0,1 %	APS
Sammelgel (4 %)	0,0125 M	Tris, pH 6,8
	0,1 %	SDS
	4 %	Acrylamid
	0,064 %	TEMED
	0,1 %	APS
Transfer-Puffer	0,048 M	Tris
	0,039 M	Glycin
	0,001 M	SDS
	20 Vol%	Methanol
TBS, pH 7,6	0,200 M	Tris
	0,137 M	NaCl

Immunopräzipitation

IP-Puffer	10 mM	Tris (pH 7,6)
	0,14 M	NaCl
	0,5 %	Igepal, NP40
	0,5 mM	PMSF (in 2-Propanol)
	0,5 µg/ml	Leupeptin (in bidest. H2O)
	2 µg/ml	Aprotinin (in 50 mM Tris, pH 7)
	0,7 µg/ml	Pepstatin A (in DMSO)

Alkalische Entwindung

Lysepuffer. pH 7,5	0,137 M	NaCl
	0,003 M	KCl
	0,001 M	KH_2PO_4
	0,006 M	Na_2HPO_4
	0,1 %	Triton X-100
Salzlösung, pH 8,0	2 M	NaCl
	0,1 M	EDTA
	0,002 M	Tris

Fpg-Puffer, pH 8,0	0,008 M	NaH_2PO_4
	0,042 M	Na_2HPO_4
	0,01 M	EDTA
Alkalische Lösung	0,1075 M	NaOH
	0,02 M	EDTA
	0,69	NaCl
Natriumphosphatpuffer, 0,01 M, pH 6,9	0,0051 M	NaH_2PO_4
	0,0049 M	Na_2HPO_4
Kaliumphosphatpuffer, 0,15 M, pH 6,9	0,0765 M	KH_2PO_4
	0,0735 M	K_2HPO_4
Kaliumphosphatpuffer, 0,35 M, pH 6,9	0,1785 M	KH_2PO_4
	0,1715 M	K_2HPO_4
Kaliumphosphatpuffer, 0,5 M, pH 6,9	0,255 M	KH_2PO_4
	0,245 M	K_2HPO_4

<u>Immunofluoreszenz</u>

PBS II (pH7,4)	1,18 mM	KH_2PO_4
	0,1368 M	NaCl
	2,15 mM	KCl
	8,45 mM	Na_2HPO_4

8.5 Geräte

Bezeichnung	**Modell/Hersteller**
AAS-Autosampler	AS 800Perkin Elmer (Rodgau-Jügesheim)
Atomabsorptionsspektrometer	AAnalyst 800, Perkin Elmer (Rodgau-Jügesheim)
Auflichtmikroskop	Axiovert 25, Carl Zeiss (Oberkochen)
Autoklav	Varioklav 75 S, H+P (Oberschleißheim)
Brutschrank	B6, Heraeus (Hanau)
CO_2-Inkubator	Hera Cell 150, Kendro (Langenselbold)
Digitalwaage	PL300, Mettler (Giessen)
Digitalwaage	BP61S, Sartorius (Göttingen)
Durchflusszytometer	PAS, Partec (Münster)
Elektrophoresekammer	Hoefer SE260, Amersham Scientific (Freiburg)
Feinwaage	Micro MC, Sartorius (Göttingen)
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager.M1, Carl Zeiss (Oberkochen)
Geldokumentationsgerät	LAS 3000, Fuji (Tokio, Japan)
Heißlufttrockenschrank	SUT 6200, Kendro (Langenselbold)
Kolbenhubpipetten	Reference, Eppendorf (Hamburg)
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr (Ochsenhausen)
Kühlzentrifuge	Biofuge Pico freeze, Kendro (Langenselbold)
Kühlzentrifuge	5810 R, Eppendorf (Hamburg)
Laborspülmaschine	G7883, Miele (Bielefeld)
Mikrotiterplattenlesegerät	SpectraFluor, Tecan (Crailsheim)
Mikrotiterplattenlesegerät	infinite M200, Tecan (Crailsheim)
Netzgerät	EPS 601, Amersham Biosciences (Freiburg)
Netzgerät	EPS 2A200, Amersham Biosciences (Freiburg)

pH-Meter	pH320, WTW (Weilsheim)
Pipettierhilfe	pipetus akku, Hirschmann (Eberstadt)
Rotator	Neolab (Heidelberg)
Schüttelinkubator	CAT SH26, CAT Ingenieurbüro (Staufen)
Semi-Dry-Blotting-Apparatur	Perfect Blue, peqlab (Erlangen)
Spektralphotometer	Nanodrop ND 1000, NanoDrop Technologies (Wilmington, USA)
Sterilbank	Hera Safe KS 18, Hereus (Hanau)
Stickstoffbehälter	MVE (Burnsville, USA)
Taumler	3012, GFL (Burgwedel)
Thermocycler	iCycler, BioRad (München)
Tiefkühlgerät	HFU 686 Top, Kendro (Langenselbold)
Trockenschrank	T5042EK, Hereus (Hanau)
Ultraschallgerät	Sonifier 250, Branson (Danbury, USA)
Vortex	Genie2, Scientific Industries (Bohemia, USA)
Wasseraufbereitungssystem	Ultra Clear UV-TM, SG (Barsbüttel)
Wasserbad	Typ WB14, Memmert (Schwabach)
Zellzählgerät	Casy 1 Modell TT, Schärfe System (Reutlingen)
Zentrifuge	Biofuge Pico, Kendro (Langenselbold)

8.6 Verbrauchsmaterialien

Casycups	Schärfe System (Reutlingen)
Chromatographiepapier	Whatman (Maidstone, UK)
Deckgläschen (12 mm)	Roth (Karlsruhe)
Glasfilter	(Whatman, UK)
Graphitrohröfen mit Endkappen	Perkin Elmer (Rodgau-Jügrsheim)
Hybond-P PVDF Membran	GE Healthcare (Freiburg)
Kryoröhrchen	Greiner (Frickenhausen)
6-Loch-Platten	Biochrom (Berlin)
24-Lochplatten	Sarstedt (Nümbrecht)
96-Lochplatten	Sarstedt (Nümbrecht)
96-Lochplatten (PS, weiß/schwarz, Zellkultur)	Brand (Wertheim)
Messröhrchen (3,5 ml für PAS, Partec)	Sarstedt (Nümbrecht)
Objektträger (75x25 mm)	VWR (Darmstadt)
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen (0,1-10 µl)	VWR (Darmstadt)
Pipettenspitzen (0,5-20 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen (100-1000 µl)	VWR (Darmstadt)
Pipettenspitzen (10-200 µl)	Roth (Karlsruhe)
Pipettenspitzen (500-5000 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Probengefäße (AAS-Autosampler)	Perkin Elmer (Rodgau-Jügrsheim)
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße (2,2 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Sterilfilter (0,2 µM)	Sartorius (Göttingen)
Zellkulturschalen	Biochrom (Berlin)
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)

8.7 PCR-Primer-Systeme

Tabelle 8: Primer-Systeme für die real time RT-PCR

Gen	reverse/ forward	Sequenz 5' 3'	Konzentration [µM]	Effizienz
APE-1	for	GCT GCC TGG ACT CTC TCA TC	0,6	1,990
	rev	AAA CTT TGA GTG GGC ACT GG		
Bax	for	CAG TTG AAG TTG CCG TCA GA	0,5	1,919
	rev	GGA GCT GCA GAG GAT GAT TG		
GADD45	for	GAG CTC CTG CTC TTG GAG	0,2	1,886
	rev	GAA TGT GGA TTC GTC ACC AGC		
GAPDH	for	CTG CAC CAC CAA CTG CTT AG	0,2	1,873
	rev	GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG		
LigIII	for	GAT CAC GTG CCA CCT ACC TT	0,6	2,034
	rev	GTC CAC ACA GAA CCG TTG C		
hOGG1	for	CGA TGT TGT TGT TGG AGG AAC	0,4	1,908
	rev	ACT TCC AAG AGG TGG CTC AG		
p21	for	CCT CAT CCC GTG TTC TCC TTT	0,2	1,830
	rev	GTA CCA CCC AGC GGA CAA GT		
p48	for	CCT GAA CCC ATG CTG TGA TTG	0,2	1,930
	rev	GCT GGC TTT CCC TCT AAC CTG		
Polß	for	TGG CAG TTT CAG AAG AGG TG	0,2	2,011
	rev	CAG TTT TGG CTG TTT GGT TG		
XPA	for	CCG ACA GGA AAA CCG AGA AA	0,2	1,990
	rev	TTC CAC ACG CTG CTT CTT ACT		
XPC	for	CGT GGA CGG GAA GGT GC	0,2	1,887
	rev	GGC CAC GCG GTG TAG AT		
XRCC1	for	CGG ATG AGA ACA CGG ACA GT	0,2	1,958
	rev	CCC CGT AAA GAA AGA AGT GC		

8.8 Sequenz des *Bax*-Gens und Lage der Primer

```
    1 TCACGTGACCCGGGCGCGCTGCGGCCGCCCGCGCGGACCCGGCGAGAGGCGGCGGCGGGA

   61 GCGGCGGTGATGGACGGGTCCGGGGAGCAGCCCAGAGGCGGGGGGCCCACCAGCTCTGAG

  121 CAGATCATGAAGACAGGGGCCCTTTTGCTTCAGGGTTTCATCCAGGATCGAGCAGGGCGA

  181 ATGGGGGGGGAGGCACCCGAGCTGGCCCTGGACCCGGTGCCTCAGGATGCGTCCACCAAG

  241 AAGCTGAGCGAGTGTCTCAAGCGCATCGGGGACGAACTGGACAGTAACATGGAGCTGCAG
                                                        >>>>>>>>>>

  301 AGGATGATTGCCGCCGTGGACACAGACTCCCCCCGAGAGGTCTTTTTCCGAGTGGCAGCT
      >>>>>>>>>>

  361 GACATGTTTTCTGACGGCAACTTCAACTGGGGCCGGGTTGTCGCCCTTTTCTACTTTGCC
                <<<<<<<<<<<<<<<<<<<

  421 AGCAAACTGGTGCTCAAGGCTGGCGTGAAATGGCGTGATCTGGGCTCACTGCAACCTCTG

  481 CCTCCTGGGTTCAAGCGATTCACCTGCCTCAGCATCCCAAGGAGCTGGGATTACAGGCCC

  541 TGTGCACCAAGGTGCCGGAACTGATCAGAACCATCATGGGCTGGACATTGGACTTCCTCC

  601 GGGAGCGGCTGTTGGGCTGGATCCAAGACCAGGGTGGTTGGGACGGCCTCCTCTCCTACT

  661 TTGGGACGCCCACGTGGCAGACCGTGACCATCTTTGTGGCGGGAGTGCTCACCGCCTCGC

  721 TCACCATCTGGAAGAAGATGGGCTGAGGCCCCCAGCTGCCTTGGACTGTGTTTTTCCTCC

  781 ATAAATTATGGCATTTTTCTGGGAGGGGTGGGGATTGGGGGACATGGGCATTTTTCTTAC

  841 TTTTGTAATTATTGGGGGGTGTGGGGAAGAGTGGTCTTGAGGGGGTAA
```

```
KEYS (in order of precedence):
>>>>>> left primer
<<<<<< right primer
```

8.9 Gelelektrophoretische Überprüfung des Amplifikat

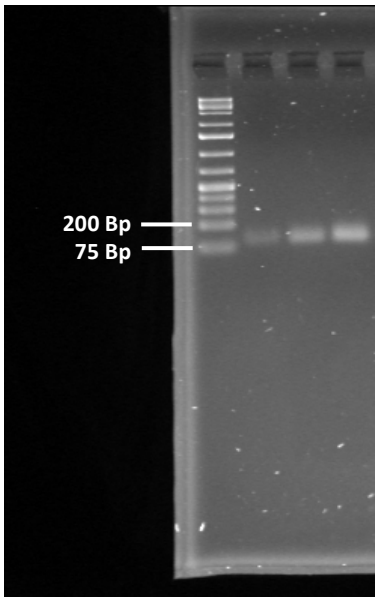


Abbildung 54: Gelelektrophoretische Überprüfung des Amplifikats. Es wurden Aliquots des Amplifikats nach der Polymerase-Kettenreaktion aufgetragen, um die Größe von 99 Basenpaaren (Bp) zu überprüfen. Es wurden zudem keine Nebenprodukte detektiert.

9 Publikationsliste

Publikationen in Fachzeitschriften

1,4-Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCaT human keratinocytes. Klaus, V., Hartmann, T., Gambini, J., Graf, P., Stahl, W., Hartwig, A., Klotz, L.-O. (2010) Archives of Biochemistry and Biophysics, 496 (2), pp. 93-100

Kurzbeiträge

Impact of selenium compounds on the cell cycle control. Klaus, V., Blessing, H., Hartwig, A. (2007) Proceedings of the European Conference on Metallobiolomics, Herbert Utz Verlag, ISBN 978-3-8316-0827-0, pp. 139-143

Einfluss von Selenverbindungen auf die Zellzykluskontrolle. Klaus, V., Blessing, H., Hartwig, A. (2009) Anwendung und Bedeutung ausgewählter Spurenelemente und Mineralstoffe in der Medizin, Herbert Utz Verlag, ISBN 978-3-8316-0894-2, pp. 58-62

Einfluss von Selen auf die Integrität des Genoms. Klaus, V., Hall, C., Schneider, J., Hartwig, A., Schriftreihen der Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente e.V., *in press*

Veröffentlichte Abstracts

Einfluss des Spurenelements Selen auf die genomische Stabilität. Klaus, V., Hall, C., Blessing, H., Hartwig, A. (2007) Lebensmittelchemie, 60 (6): 173

Einfluss von Selen auf zelluläre Schutzmechanismen. Klaus, V., Hartwig, A. (2009) Lebensmittelchemie, 63: 44

Selen und die genomische Stabilität. Klaus, V., Graupner, A., Schneider, J., Hartwig, A. (2010) Lebensmittelchemie, 64: 23

Vorträge auf Fachtagungen

24th GMS Annual Meeting, Society for Minerals and Trace Elements (GMS), Berlin, 13.-15.11.2008, **Impact of selenium on the integrity of the genome.** Klaus, V., Hall, C., Graupner, A., Hartwig, A.

Gemeinsame Arbeitstagung 2009 der Regionalverbände Nord/Nord-Ost/Süd-Ost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Gesellschaft Deutscher Chemiker (GdCh), Berlin, 02.-03.04.2009, **Selen – Maßlos gut?** Klaus, V., Graupner, A., Schneider, J., Hartwig, A.

38. Deutscher Lebensmittelchemikertag 14.-16.09.2009, Gesellschaft Deutscher Chemiker (GdCh), **Selen und die genomische Stabilität.** Klaus, V., Graupner, A., Schneider, J., Hartwig, A.

Poster auf Fachtagungen

22. Tagung der Gesellschaft für Umwelt -Mutationsforschung (GUM), Darmstadt, 21.-24.02.2006, **Einfluss ausgewählter Selenverbindungen auf das Tumorsuppressorprotein p53.** Klaus, V., Blessing, H., Hartwig, A.

Regionaltagung der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Berlin, 23.-24.03.2006, **Einfluss von Selenverbindungen auf den Gehalt und die Struktur des Tumorsuppressorproteins p53.** Klaus, V., Blessing, H., Hartwig, A.

57. Mosbacher Kolloquium, Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM), Mosbach, 06.-08.04.2006, **Impact of selenium compounds on the tumor suppressor protein p53.** Klaus, V., Blessing, H., Hartwig, A.

9. DNA-Reparatur Tagung der Deutschen Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung (DGDR), Hamburg, 12.-15.09.2006, **Differential effects of selenium compounds on the tumor suppressor protein p53.** Klaus, V., Blessing, H., Hartwig, A.

35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Gesellschaft Deutscher Chemiker (GdCh), Dresden, 18.-20.09.2006, **Einfluss des Spurenelements Selen auf die genomische Stabilität.** Klaus, V., Hall, C., Blessing, H., Hartwig, A.

22. Jahrestagung der Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente (GMS), Berlin, 09.-11.11.2006, **Reducible selenium compounds affect the stability, the phosphorylation pattern and the conformation of p53.** Klaus, V., Blessing, H., Hartwig, A.

23. Jahrestagung der Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente (GMS), Stuttgart, 28.-29. September 2007, **Einfluss von Selen auf die Zellzykluskontrolle.** Klaus, V., Hartwig, A.

5th European Conference on Metallobiolomics, Berlin, 29.-30. November 2007, **Impact of selenium on the cell cycle control.** Klaus, V., Hartwig, A.

37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Gesellschaft Deutscher Chemiker (GdCh), Kaiserslautern, 08.-10.09.2008, **Einfluss von Selen auf zelluläre Schutzmechanismen.** Klaus, V, Hartwig, A.

DNA Repair 2008, 10th Biennial Meeting of the DGDR (Deutsche Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung), Berlin, 02.-05.-09.2008. **The impact of selenium compounds on cell cycle control and DNA damage in p53-proficient and p53-deficient cells.** Klaus, V., Hartwig, A.

38th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS), Cavtat, 21.-25.09.2008, **The impact of different selenium compounds on the p53-dependent stress response.** Klaus, V., Hartwig, A.

24. Tagung der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung (GUM), Wien, 17.-20.02.2009, **P53-Abhängigkeit der Aufnahme verschiedener Selenverbindungen und der zellulären Schadensantwort.** Klaus, V., Schneider, J., Richter, C., Hartwig, A.

Preise und Stipendien

35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Gesellschaft Deutscher Chemiker (GdCh), Dresden, 18.-20.09.2006, **Reisestipendium** der GdCh

23. Jahrestagung der Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente (GMS), Stuttgart, 28.-29. September 2007, **Posterpreis**

38th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS), Cavtat, 21.-25.09.2008, **Reisestipendium** der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung (GUM)

10 Danksagung

Zuallererst danke ich Frau Professor Dr. Andrea Hartwig für die motivierende Begleitung und die freundliche Unterstützung während meiner Promotion.

Zudem gilt mein Dank Frau Professor Dr. Tanja Schwerdtle, die jederzeit ein offenes Ohr für Fragen hatte.

Dem gesamten Arbeitskreis, auch ehemaligen Mitarbeitern, danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Ganz besonders danke ich Frau Dr. Claudia Großkopf und Frau Dr. Caroline Hall für die freundschaftliche Begleitung im und außerhalb des Labors. Genauso danke ich Frau Dr. Claudia Keil für ihre große Hilfsbereitschaft. Daneben danke ich den Mitarbeitern des Arbeitskreises von Herrn Professor Dr. Kroh für den freundlichen Zusammenhalt im Institut.

Zudem gilt mein Dank meinen Diplomandinnen: Frau Janina Schneider war sehr engagiert bei den AAS-Messungen, Frau Anne Graupner hat mich bei der Etablierung des AIF-Testsystems sowie der Messung der Caspase-Aktivität unterstützt und Frau Rebecca Voß machte weiterführende Versuche zur Kotoxizität von Selen- und Cadmiumverbindungen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während des gesamten Studiums unterstützt und motiviert haben. Und meiner Schwester danke ich dafür, dass sie immer für mich da ist. Zum Ende meiner Arbeit hat mir der Antrieb durch meinen Freund sehr geholfen. Dir dafür vielen Dank!