Zur Rolle von p53 und zum Einfluss von Cadmiumchlorid auf DNA-Reparaturprozesse und Zellzykluskontrolle

vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemiker
Gunnar Jahnke
aus Karlsruhe

von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Rotard

Berichter: Prof. Dr. A Hartwig

Berichter: Prof. Dr. L. W. Kroh

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 10. Oktober 2007

Berlin 2007
D 83

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung 1
2 Einleitung 4
2.1 Thematische Einführung 4
2.2 Cadmium 5
2.2.1 Vorkommen und Verwendung 5
2.2.2 Exposition des Menschen 5
2.2.3 Genotoxizität und Kanzerogenität 7
2.3 RNA-Interferenz 9
2.4 DNA-Schäden und ihre Reparatur 12
2.4.1 UV-induzierte DNA-Schäden 12
2.4.2 BPDE-induzierte DNA-Schäden 13
2.4.3 DNA-Reparaturprozesse 15
2.4.3.1 Nukleotidexzisionsreparatur 16
2.5 Das Tumorsuppressorprotein p53 18
2.5.1 Struktur und Funktion 18
2.5.2 Bedeutung von p53 in der NER 20
2.5.3 Bedeutung von p53 in der Zellzykluskontrolle 21
3 Fragestellung 24
4 Material und Methoden 25
4.1 Material 25
4.2 Methoden 25
4.2.1 Zellkultur und Behandlung der Zellen 25
4.2.1.1 Zellkultur 25
4.2.1.2 Inkubationslösungen 26
4.2.1.3 Bestrahlung mit UVC 26
4.2.2 Koloniebildungsfähigkeit 26
4.2.3 Zellzyklusuntersuchung 27
4.2.4 Transfektionsexperimente 28
4.2.4.1 Bestimmung der Geneticin-Toleranzdosis 28
4.2.4.2 Transfektion von HeLa S3, MCF7 und A549 Zellen 28
4.2.4.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz 29
4.2.4.4 Selektion und Isolierung von stabil transfizierten Zellklonen 29
4.2.5 Bestimmung der relativen Genexpression 30

4.2.5.1 RNA-Isolierung ... 30
4.2.5.2 RNA-Quantifizierung ... 31
4.2.5.3 RNA-Elektrophorese ... 31
4.2.5.4 cDNA-Synthese ... 31
4.2.5.5 Real-Time RT-PCR ... 32
4.2.5.6 Auswertung ... 34
4.2.6 Immunologischer Nachweis zellulärer Proteine ... 36
4.2.6.1 Zelllyse ... 36
4.2.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford ... 36
4.2.6.3 Elektrophorese und Westernblot ... 36
4.2.6.4 Chemilumineszenz-Detektion ... 37
4.2.7 Nachweis UVC-induzierter DNA-Schäden ... 37
4.2.7.1 Nachweisprinzip ... 37
4.2.7.2 Versuchsdurchführung ... 38
4.2.8 Nachweis BPDE-induzierter DNA-Addukte ... 39
4.2.8.1 Nachweisprinzip ... 39
4.2.8.2 Versuchsansatz ... 40
4.2.8.3 DNA-Isolierung und -Quantifizierung ... 40
4.2.8.4 DNA-Hydrolyse ... 41
4.2.8.5 HPLC-Analyse ... 42
5 Ergebnisse und Diskussion ... 43
5.1 Transfektionsexperimente ... 43
5.1.1 Methodenetablierung ... 43
5.1.2 Charakterisierung der Zellen ... 44
5.2 Zytotoxizität ... 48
5.2.1 Cadmiumchlorid ... 48
5.2.2 UVC-Strahlung ... 51
5.2.3 Benzo[*a*]pyrendiolepoxid ... 53
5.3 Zellzyklusuntersuchungen ... 55
5.3.1 Einfluss von Cadmiumchlorid auf die Zellzykluskontrolle nach UVC-Bestrahlung ... 55
5.3.2 Einfluss von Actinomycin D auf die Zellzyklusverteilung ... 59
5.3.3 Einfluss von Benzo[*a*]pyrendiolepoxid auf den Zellzyklus ... 62
5.4 Untersuchung der Protein- und Genexpression nach BPDE-Inkubation ... 66

5.4.1 Einfluss von BPDE auf p53 und XPC auf Proteinebene 66
5.4.2 Einfluss von BPDE auf die Genexpression von *p53*, *p48*, *p21* und *XPC* 76
5.5 Einfluss von p53 auf Bildung und Reparatur BPDE-induzierter DNA-Addukte 82
5.5.1 Untersuchungen in A549 Zellen 82
5.5.2 Untersuchungen in HCT116 Zellen 84
5.5.3 Bewertung der Ergebnisse 86
5.6 Einfluss von p53 und Cadmiumchlorid auf die Reparatur UVC-induzierter DNA-Schäden 89
5.6.1 Untersuchungen in A549 Zellen 89
5.6.2 Untersuchungen in HCT116 Zellen 90
5.6.3 Bewertung der Ergebnisse 91
6 Zusammenfassende Diskussion 94
7 Literaturverzeichnis 99
8 Anhang 111
8.1 Abkürzungsverzeichnis 111
8.2 Chemikalien 116
8.3 Lösungen und Puffer 120
8.4 Geräte 125
8.5 Verbrauchsmaterial 127
8.6 Transfektionsexperimente 128
8.6.1 Geneticin-Toleranzdosis 128
8.6.2 Verwendete Plasmide 129
8.6.3 Transfektionseffizienz 130
8.7 Bestimmung der relativen Genexpression 130
8.7.1 RNA-Integrität 130
8.7.2 PCR-Analysenprogramm 131
8.7.3 PCR-Primersequenzen 132
8.7.4 cDNA-Verdünnungsreihen 132
8.8 HPLC-Analyse 134
8.8.1 Analysenprogramm 134
8.8.2 Chromatogramme 135
8.8.3 Kalibrierung 136

9 Publikationsliste 137
10 Danksagung 140

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von p53 in der DNA-Reparatur und in der Zellzykluskontrolle untersucht, zum Teil unter dem zusätzlichen Einfluss von Cadmiumchlorid. Das Tumorsuppressorprotein p53 spielt eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität. Als Transkriptionsfaktor ist es an der Regulation wichtiger zellulärer Mechanismen wie Apoptose, Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur beteiligt. Mutationen von *p53* sind eng verknüpft mit der Entstehung von Krebserkrankungen. In mehr als 50 % der menschlichen Primärtumoren ist *p53* mutiert und dadurch in seiner Funktion gestört. Strukturelle und funktionelle Veränderungen des Proteins können auch durch Metallverbindungen induziert werden. Für Cadmiumverbindungen konnte dies bereits gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Wechselwirkung mit der Zink-bindenden Struktur des Tumorsuppressorproteins.

Zunächst wurden umfangreiche Vorarbeiten durchgeführt, um mittels RNA-Interferenz (RNAi) Zellen mit reduzierter Expression des Tumorsuppressorgens *p53* zu generieren. Diese Methode wurde in HeLa S3, MCF7 und A549 Zellen erfolgreich eingesetzt. In A549 Zellen wurde eine Reduktion der relativen *p53*-Genexpression um ca. 80 % erreicht, die sich auch in einem deutlich verringerten p53-Proteingehalt der Zellen widerspiegelte.

Untersuchungen zum Einfluss von Cadmium auf die Zellzyklusverteilung in A549 Zellen wurden durchgeführt. Sie ergaben einen leichten G1-Arrest unabhängig vom p53-Status der Zellen. Nach Bestrahlung mit 5 J/m^2 UVC war ein S-Phasen Arrest zu beobachten, der nach Vorinkubation mit Cadmium unabhängig von p53 deutlich abgeschwächt wurde. Zum Vergleich wurden weitere Versuche mit HCT116 Zellen durchgeführt, von denen auch eine isogene, p53-defiziente Zelllinie zur Verfügung stand. Auch bei diesen Zelllinien führte die Bestrahlung mit UVC zu einem p53-unabhängigen Arrest in der S-Phase des Zellzyklus. Weitere Untersuchungen zur Rolle von p53 in der Zellzykluskontrolle wurden nach Behandlung der Zellen mit Actinomycin D durchgeführt. In den A549 und in den HCT116 Zellen konnte dabei eine Abhängigkeit der Zellzyklusregulation von p53 am G1/S- und am G2/M-Übergang festgestellt werden. Dadurch konnte auch ein Beweis für die funktionellen Konsequenzen des p53 *knock-down* in den A549 Zellen erbracht werden.

Als weiteres DNA-schädigendes Agens wurde Benzo[a]pyrendiolepoxid (BPDE) eingesetzt. Die Behandlung der Zellen mit BPDE führte zu einem konzentrationsabhängigen S-Phasen Arrest, der unabhängig vom p53-Status war. In weiteren Versuchen wurde die Expression von p53 und XPC nach Inkubation mit BPDE zunächst auf Proteinebene in den A549 und HCT116 Zelllinien betrachtet. In allen A549 Zelllinien und in den p53-profizienten HCT116 Zellen war nach Ende der BPDE-Inkubation eine konzentrationsabhängige Zunahme des p53-Proteins mit einem Maximum nach 8 h erkennbar. Das XPC-Protein blieb in allen Zelllinien unabhängig von der Behandlung konstant. Die relative Genexpression zeigte in allen A549 Zelllinien und in den p53-profizienten HCT116 Zellen nach Ende der BPDE-Inkubation insbesondere für *p21* eine starke Induktion und folgte im zeitlichen Verlauf der beginnenden Akkumulation des p53-Proteins.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss von p53 auf die Bildung und Reparatur von DNA-Addukten nach Inkubation mit BPDE in A549 und HCT116 Zellen untersucht. Die Induktion der Addukte war konzentrationsabhängig aber unabhängig vom p53-Status der Zellen. Bezüglich der Reparatur BPDE-induzierter DNA-Schäden konnte weder in den A549 noch in den HCT116 Zellen ein Einfluss von p53 festgestellt werden.

Die Reparatur UVC-induzierter CPD wurde untersucht, um die Rolle von p53 in der Reparatur verschiedener DNA-schädigender Agenzien vergleichen zu können. Bei den p53-defizienten HCT116 Zellen war die Reparatur nach 24 h um etwa 25 % vermindert. In den A549 Zellen hingegen konnte kein Einfluss des p53-Status auf die Reparatur festgestellt werden. Möglicherweise ist dies auf im Gegensatz zu den HCT116 p53 *knock-out* Zellen in den *knock-down* Zellen noch vorhandenes p53-Protein zurückzuführen. Dadurch könnte in den *knock-down* Zellen eine p53-abhängige Induktion von p48 und XPC nach UVC-Bestrahlung noch möglich sein. Die zusätzliche Inkubation mit Cd(II) ergab weder in den HCT116 Zellen noch in den A549 Zellen eine Reparaturhemmung. Ob dafür möglicherweise methodische oder mechanistische Gründe eine Rolle spielen, sollte in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

Für den unterschiedlichen Einfluss von p53 auf die Reparatur UVC- und BPDE-induzierter DNA-Schäden könnte einerseits die Schadenserkennung verantwortlich sein. Es ist bekannt, dass die p53-abhängige Expression von *p48* für eine effiziente Reparatur von CPD notwendig ist. Für die Reparatur BPDE-induzierter DNA-Addukte

ist dies bislang nicht beschrieben worden. Zum anderen könnte die Anzahl der induzierten DNA-Schäden Einfluss auf die Abhängigkeit des Reparaturprozesses von p53 nehmen. Möglicherweise ist der p53-unabhängige Grundspiegel an XPC-Protein für die Reparatur einer mäßigen Anzahl von DNA-Schäden ausreichend, während es bei Auftreten einer großen Zahl an Läsionen der p53-abhängigen Induktion von XPC bedarf. Weitere Untersuchungen könnten dazu beitragen, ein tieferes Verständnis für die Rolle von p53 in der NER zu erlangen.

2 Einleitung

2.1 Thematische Einführung

In der Zelle entstehen DNA-Schäden zum einen permanent durch endogene Stoffwechselprozesse, sie können zum anderen aber auch durch die Einwirkung DNA-schädigender Agenzien aus der Umwelt hervorgerufen werden. Zu den Umweltschadstoffen zählen auch Metallverbindungen, die zum Teil sowohl direkt als auch über indirekte Mechanismen die Stabilität des Genoms beeinflussen. So konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Metallverbindungen in der Lage sind, DNA-Reparaturprozesse zu hemmen (zusammengefasst in Hartwig und Schwerdtle, 2002). Die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen sind bislang nur unzureichend verstanden, jedoch deutet vieles darauf hin, dass Zink-bindende Strukturen mögliche Angriffspunkte darstellen (zusammengefasst in Hartwig et al., 2002a). Einige DNA-Reparaturproteine enthalten so genannte Zinkfingerstrukturen. Dabei handelt es sich um ein Strukturmotiv, das u. a. für Protein/DNA- und für Protein/Protein-Wechselwirkungen verantwortlich ist (zusammengefasst in Berg, 1990). Darüber hinaus gibt es noch weitere Proteine, die zwar keine Zinkfingerstrukturen besitzen, für die aber dennoch die Bindung von Zink essentiell für die Aufrechterhaltung von Struktur und Funktion ist. Ein Beispiel dafür ist das Tumorsuppressorprotein p53, dem eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität zukommt. Es ist an zentralen zellulären Mechanismen beteiligt, deren Aufgabe es unter anderem ist, DNA-Schäden zu reparieren, die Replikation geschädigter DNA zu verhindern oder den programmierten Zelltod (Apoptose) auszulösen (zusammengefasst in Hainaut und Hollstein, 2000). Untersuchungen zur Wechselwirkung mit Metallverbindungen sind daher von großem Interesse. Veränderungen in der Struktur und Funktion von p53 durch Cadmiumverbindungen konnten bereits nachgewiesen werden (Meplan et al., 1999; Thuy, 2006).

2.2 Cadmium

2.2.1 Vorkommen und Verwendung

Cadmium (Cd) ist ein Element der II. Nebengruppe des Periodensystems. Es ist ein silberweißes, relativ weiches Schwermetall, das in seinen Verbindungen praktisch nur die Oxidationsstufe +2 besitzt. Cadmium kommt in der Natur nur gebunden, meist vergesellschaftet mit Zink, aber auch mit Blei und Phosphaten, als Cadmiumblende (Greenockit, CdS) und als Cadmiumcarbonat (Otavit, $CdCO_3$) vor. Zu den wasserlöslichen Cadmiumverbindungen zählen Cadmiumchlorid ($CdCl_2$) und Cadmiumsulfat ($CdSO_4$), während Cadmiumoxid (CdO), Cadmiumsulfid (CdS) und Cadmiumcarbonat ($CdCO_3$) in Wasser nur schwer löslich sind (Holleman, 1995).
Industriell wird Cadmium vor allem bei der Herstellung von Nickel-Cadmium-Batterien, für Legierungen, in Pigmenten sowie in Stabilisatoren für Kunststoffe verwendet (zusammengefasst in Pinot et al., 2000).
Durch natürliche Freisetzung und die Verfeuerung fossiler Brennstoffe sowie durch Eisen-, Blei- und Zinkverhüttung und durch Müllverbrennung wird Cadmium in die Atmosphäre freigesetzt und gelangt mit den Niederschlägen in Böden und Gewässer (zusammengefasst in Benemann et al., 2004). Weiterhin gelten die landwirtschaftliche Nutzung von cadmiumhaltigen Phosphatmineralien und Klärschlämmen als Dünger sowie die industrielle Nutzung als Hauptursachen der weitläufigen Verteilung von Cadmium in der Umwelt und in Lebensmitteln (Satarug et al., 2003).

2.2.2 Exposition des Menschen

Für den Menschen ist Cadmium ein biologisch nicht essentielles, aber toxisches Schwermetall, das sich vor allem in Nieren und Leber anreichert. Toxische Wirkungen betreffen in Abhängigkeit vom Aufnahmeweg vor allem die Nieren, die Lunge und die Knochen (Jin et al., 1998). Eine mögliche Exposition am Arbeitsplatz, zum Beispiel in Batteriefabriken, Zinkschmelzen, Pigmentfabriken und bei Lötarbeiten geschieht vor allem über die Atemwege (Jarup, 2002). Beruflich nicht exponierte Nichtraucher nehmen Cadmium vor allem über die Nahrung auf, wobei insbesondere pflanzliche Lebensmittel den größten Anteil besitzen. Übliche Gehalte liegen für pflanzliche Lebensmittel meist unter 0,1 mg/kg Frischgewicht, für tierische Lebensmittel wie Milch und Fleisch meist um 0,01 mg/kg, wobei Leber und Nieren

von Schlachttieren deutlich höhere Gehalte von etwa 1 mg/kg erreichen können. Die Aufnahme über das Trinkwasser spielt im Allgemeinen nur eine untergeordnete Rolle. Die mittlere tägliche Cadmiumaufnahme durch die Nahrung in Europa und den USA wird mit 6-30 µg/Tag angegeben, in Deutschland liegt sie nach Warenkorbanalysen bei 10-14 µg/Tag für Erwachsene (zusammengefasst in: Satarug et al., 2003; Benemann et al., 2004). Der von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) vorgeschlagene PTWI (*provisional tolerable weekly intake*) liegt bei 7 µg/kg Körpergewicht pro Woche (WHO, 2006). Eine Untersuchung der tatsächlich mit der Nahrung von Kindern und Erwachsenen in Deutschland aufgenommenen Cadmiummenge zeigt allerdings insbesondere bei Kindern zum Teil eine Überschreitung dieses Wertes (Wilhelm et al., 2002). Das Zigarettenrauchen stellt einen wesentlichen Beitrag zur Cadmiumbelastung für Raucher dar, der die Aufnahme über die Nahrung übersteigen kann. So führt das Rauchen einer Zigarette zur Inhalation von 0,1-0,2 µg Cadmium. Die Absorptionsquote bei inhalativer Aufnahme liegt mit 40-60 % im Vergleich zur gastrointestinalen Aufnahme von ca. 5-15 % deutlich höher (zusammengefasst in Benemann et al., 2004). So haben Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern eine etwa 4- bis 5-fach höhere Cadmiumkonzentration im Blut (Hoffmann et al., 2000). Die Cadmiumgehalte der Außenluft haben meist nur geringen Einfluss auf die Gesamtbelastung des Menschen. In einer Untersuchung in Nordrhein-Westfalen wurde in ländlicher Gegend ein Cadmiumgehalt von 0,5 ng/m³, und in industriellem Umfeld Gehalte von 1,5-31 ng/m³ gemessen (Wilhelm et al., 2005). Die geschätzte tägliche Inhalation über die Atemluft in Europa beträgt in ländlichen Gebieten 0,01 µg, in industriellem Umfeld bis zu 0,4 µg (WHO, 2000). Cadmium wird nach der Aufnahme in den Körper zunächst im Blutplasma an Albumin gebunden, dann zur Leber und anderen Organen transportiert. In der Leber bindet es an Methallothionein (MT), dessen Genexpression u. a. durch Cadmium induziert wird. An MT gebunden gelangt es dann wieder in das Blut, um in der Nierenrinde globulär filtriert und von den Tubuluszellen reabsorbiert und gespeichert zu werden. Durch Abbau von MT in den Lysosomen wird Cd freigesetzt, welches die MT-Synthese in den Tubuluszellen induziert und dadurch wieder gebunden wird. Seine Nephrotoxizität wird mit dem Verhältnis von freiem zu MT-gebundenem Cd in Verbindung gebracht (Jin et al., 1998). Nur geringe Mengen werden mit dem Urin ausgeschieden (1-2 µg pro Tag). Die Niere ist daher neben der Leber das wichtigste Speicherorgan für Cadmium. Die

biologische Halbwertszeit der Ausscheidung aus der Niere wird mit 10-30 Jahren angegeben (zusammengefasst in: Pinot et al., 2000; Benemann et al., 2004).

2.2.3 Genotoxizität und Kanzerogenität

Cadmium und Cadmiumverbindungen wurden von der IARC (*International Agency for Research on Cancer*) als kanzerogen für den Menschen eingestuft (IARC, 1993). Mehrere epidemiologische Studien zeigen eine deutliche Korrelation zwischen einer Cadmiumexposition und dem vermehrten Auftreten von Lungenkrebs. Weiterhin werden Krebserkrankungen der Prostata, der Nieren, der Leber, der Harnblase, des Magens und des blutbildenden Systems mit einer Cadmiumexposition in Verbindung gebracht. Auch im Tierversuch haben sich die untersuchten Cadmiumverbindungen als kanzerogen erwiesen (zusammengefasst in Waalkes, 2003).

Die zugrunde liegenden Mechanismen der Cadmium-induzierten Kanzerogenese sind allerdings noch weitgehend unbekannt. Als mögliche Ursachen werden neben einer direkten genotoxischen Wirkung insbesondere indirekte Mechanismen diskutiert. So ist Cadmium zwar kein redoxaktives Metall, verursacht jedoch oxidativen Stress durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Dies konnte bereits in verschiedenen Zelllinien gezeigt werden. Als Ursache dafür werden die Störung antioxidativer Schutzsysteme der Zelle, wie die Absenkung des Glutathiongehaltes oder die Hemmung von Enzymen wie Katalase oder Superoxiddismutase (SOD) sowie die Freisetzung redoxaktiver Metalle wie Kupfer und Eisen aus Proteinen diskutiert (zusammengefasst in Waalkes, 2003; Valko et al., 2005; Filipic et al., 2006). In zellulären Testsystemen konnten DNA-Einzelstrangbrüche und chromosomale Abberationen nachgewiesen werden, meist allerdings erst in hohen Konzentrationen des Metalls (Ochi und Ohsawa, 1985; Dally und Hartwig, 1997). Daher werden diese Mechanismen nicht als die wichtigsten angesehen, zumal Cd(II) in bakteriellen Testsystemen als nicht mutagen und in Säugerzellen im Allgemeinen erst in hohen Konzentrationen als schwach mutagen gilt. Demnach scheinen indirekte Mechanismen wie veränderte Genexpression, verstärkte Zellproliferation, unterdrückte Apoptose und die Hemmung von DNA-Reparaturprozessen eher eine Schlüsselrolle in der Cadmium-induzierten Kanzerogenese zu spielen (zusammengefasst in Waalkes, 2003).

So erhöht Cadmium die UVC-induzierte Mutationsrate in V79 Zellen (Hartwig und Beyersmann, 1989) und hemmt verschiedene DNA-Reparaturmechanismen. Dabei

ist die Reparaturhemmung meist bereits bei niedrigen, nicht zytotoxischen Konzentrationen feststellbar. Es konnte gezeigt werden, dass Cadmium in der Lage ist, die *Mismatch*-Reparatur (MMR) sowohl in Hefezellen als auch in Extrakten menschlicher Zellen in Konzentrationen ab 5 µM zu hemmen (Jin et al., 2003). Weitere Untersuchungen in verschiedenen menschlichen Zellen geben ebenfalls Hinweise auf eine Beeinflussung der MMR durch Cadmium (Lutzen et al., 2004; Slebos et al., 2006).

Für die Basenexzisionsreparatur (BER) existieren mehrere Untersuchungen, die eine Reparaturhemmung beschreiben. So konnten Dally und Hartwig (1997) eine konzentrationsabhängige Hemmung der Reparatur oxidativer DNA-Schäden ab 0,5 µM Cadmium in HeLa Zellen feststellen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Cadmium die Reparatur MMS- und MNU-induzierter DNA-Schäden in verschiedenen menschlichen sowie in Hamsterzellen bereits ab niedrigen mikromolaren Konzentrationen hemmt (Hartmann und Speit, 1996; Fatur et al., 2003). Für mehrere an der BER beteiligte Enzyme liegen Ergebnisse vor, die einen direkten hemmenden Einfluss des Metalls auf die Aktivität beschreiben. Für die bakterielle Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg) wird eine Hemmung ab 50 µM Cd(II) beobachtet (Asmuss et al., 2000b). Das in Säugerzellen vorkommende homologe Protein 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase-1 (OGG1) wird von Konzentrationen größer als 100 µM Cd(II) gehemmt (Zharkov und Rosenquist, 2002). Darüber hinaus wird die Expression der OGG1 in menschlichen Fibroblasten und in HeLa S3 Zellen bereits von 10 µM Cd(II) durch Hemmung des Transkriptionsfaktors Sp1 reduziert (Youn et al., 2005). Ein weiteres Ziel einer Cd-vermittelten Hemmung ist die AP-Endonuklease-1 (Ape1), die in Extrakten menschlicher Zellen ab 10 µM gehemmt wird (McNeill et al., 2004). Ein weiteres, an der BER beteiligtes Protein ist die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1). In HeLa S3 Zellen konnte die Hemmung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch Cadmium nachgewiesen werden (zusammengefasst in Hartwig et al., 2002b).

Andere Arbeiten befassen sich mit dem Einfluss von Cadmium auf die Nukleotidexzisionsreparatur (NER). Dabei konnte eine Reparaturhemmung sowohl UV-induzierter DNA-Schäden in menschlichen Fibroblasten und in Hamsterzellen (Nocentini, 1987; Fatur et al., 2003) als auch BPDE-induzierter DNA-Schäden in A549 Zellen sowie in Zellextrakten von HeLa Zellen gezeigt werden (Schwerdtle, 2002; Mukherjee et al., 2004). Bereits 0,5 µM Cd(II) beeinträchtigt in Zellextrakten

von HeLa Zellen die DNA-Protein-Wechselwirkung von an der Schadenserkennung beteiligten Proteinen (Hartmann und Hartwig, 1998). Asmuss et al. (2000a) konnten eine Hemmung der Bindung des XPA-Proteins an UV-geschädigte Oligonukleotide ab 100 µM Cd(II) feststellen, die durch Zugabe von Zn(II) größtenteils wieder aufgehoben wurde. In Untersuchungen an einem synthetisierten Peptid, das die Zinkfingerdomäne des XPA-Proteins repräsentiert, konnte der Austausch von Zn(II) durch Cd(II) gezeigt werden (Kopera et al., 2004). Somit stellen Zink-bindende Proteinstrukturen wie zum Beispiel Zinkfingermotive ein mögliches Ziel für die Interaktion mit Cadmium auf molekularer Ebene dar.

2.3 RNA-Interferenz

Bei der RNA-Interferenz (RNAi) handelt es sich um eine Methode zur gezielten Hemmung der Genexpression, die erstmals von Fire et al. (1998) beschrieben wurde. RNA-Interferenz beruht auf einem evolutionär konservierten Mechanismus, der mit gewissen Unterschieden bei allen eukaryotischen Organismen vorhanden ist (Hannon, 2002). Den Mechanismus der RNAi kann man sich wie folgt vorstellen (Abbildung 1): doppelsträngige RNA (dsRNA) wird im Zytoplasma durch ein *Dicer* genanntes Enzym, eine Nuklease aus der RNase III Familie, in kleine, etwa 21-23 Nukleotide (nt) große Fragmente mit jeweils 2 nt Überhängen an den 3'-Enden gespalten (Bernstein et al., 2001). Diese doppelsträngigen RNA-Fragmente werden als „*short interfering RNA*“ (siRNA) bezeichnet. Sie werden durch einen Proteinkomplex, den so genannten „*RNA-induced silencing complex*“ (RISC) gebunden. Anschließend wird der so genannte *sense*- oder Begleit-Strang der siRNA durch eine Untereinheit des RISC, die Endonuklease *Argonaute* 2 (AGO2), gespalten (Matranga et al., 2005; Rand et al., 2005). So entsteht ein aktiver RISC-Komplex, der den so genannten *antisense*- oder Leit-Strang der siRNA enthält und dadurch in der Lage ist, an komplementäre mRNA zu binden und diese mit Hilfe von AGO2 zu spalten. Diese Spaltung der Ziel-mRNA erfolgt zwischen Base 10 und 11 relativ zum 5'-Ende des siRNA Leit-Strangs und führt im weiteren Verlauf zum Abbau der gespaltenen mRNA durch zelluläre Exonukleasen (Elbashir et al., 2001; Orban und Izaurralde, 2005). Somit steht die Ziel-mRNA für die Proteinsynthese nicht mehr zur Verfügung. Der aktive RISC-Komplex kann noch mehrfach weitere mRNA spalten, dadurch ist eine deutliche Reduktion des Transkripts zu erreichen. Dieser Effekt der

verringerten Genexpression auf post-transkriptioneller Ebene wird auch als *knock-down* bezeichnet. Die Anwendung dieser Methode zum gezielten Ausschalten von Genen bei Säugerzellen scheiterte zunächst daran, dass durch das Einbringen von langer, doppelsträngiger RNA in die Zellen unspezifische Reaktionen ausgelöst werden, die zur Ausschüttung von Interferonen, der Blockade der Proteinsynthese und dem unspezifischen Abbau von RNA führen können (Kumar und Carmichael, 1998; Gil und Esteban, 2000). Erst die Entdeckung, dass der direkte Einsatz von siRNA zu einer Inaktivierung von Genen unter Umgehung einer Interferon-Ausschüttung führt, ermöglichte die Anwendung der RNAi in Säugerzellen (Elbashir et al. 2001).

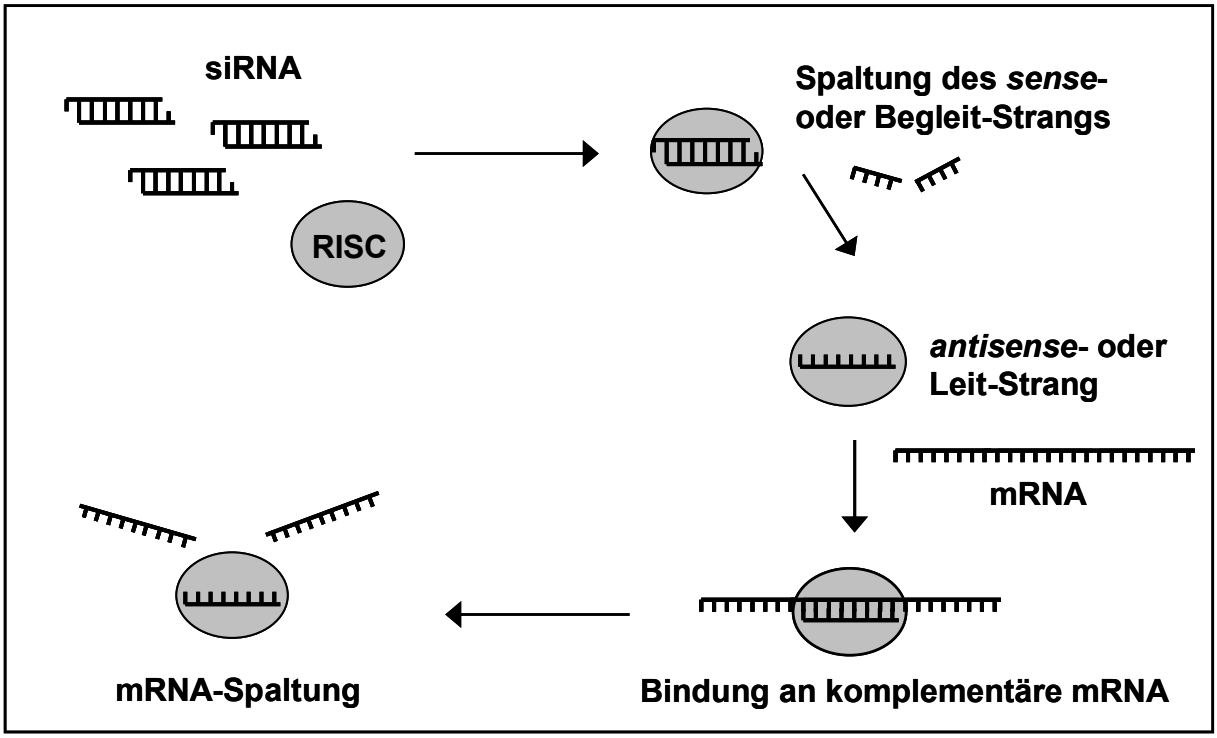

Abbildung 1: Vereinfachtes Schema der RNA-Interferenz.

Neben der Anwendung von siRNA zur gezielten vorübergehenden (transienten) Herunterregulierung von Genen hat die Verwendung von DNA-Konstrukten, die für siRNA kodieren zur Schaffung von Zelllinien mit stabil inaktivierten Genen mittlerweile breite Anwendung gefunden. Für diesen Zweck werden neben viralen Vektoren oft auch Plasmide eingesetzt (zusammengefasst in McManus und Sharp, 2002). Dabei werden die DNA-Konstrukte häufig so gewählt, dass als primäres Transkript zunächst eine haarnadelförmige, so genannte *short hairpin RNA* (shRNA)

entsteht. Diese wird durch *Dicer* zu typischen siRNA mit jeweils 2 nt Überhängen an den 3'-Enden prozessiert (Abbildung 2).

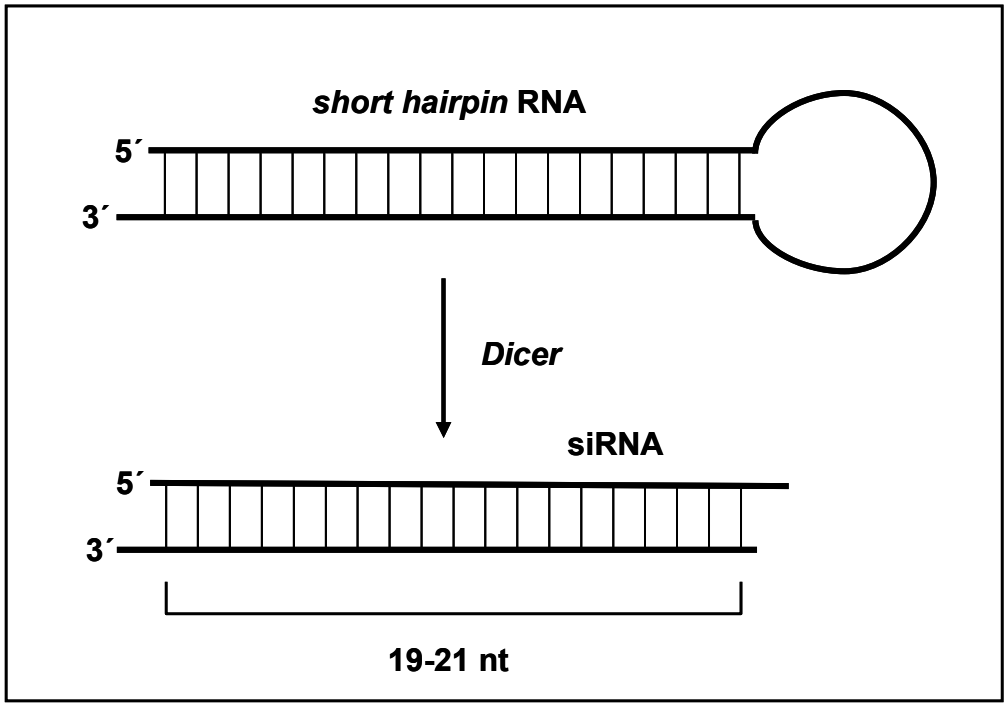

Abbildung 2: Prozessierung von *short hairpin* RNA zu siRNA durch Dicer.

Neben dem geschilderten Mechanismus der RNAi existieren noch weitere, eng verwandte zelluläre Regulationsmechanismen. Während sich die siRNA durch perfekte Komplementarität zur Ziel-mRNA und durch deren Spaltung auszeichnen, führen die so genannten *microRNA* (miRNA) durch partielle Komplementarität mit der Ziel-RNA zur Hemmung der Translation und dem nachfolgenden Abbau der RNA (zusammengefasst in Kim und Rossi, 2007). In Säugerzellen wurden bereits über 200 endogene miRNA identifiziert, die regulatorische Funktionen in der Differenzierung und Entwicklung sowie in physiologischen Prozessen besitzen sollen (Ambros, 2004; Bartel, 2004). Darüber hinaus wird die Beteiligung von RNAi-Prozessen an epigenetischen Regulationsmechanismen wie DNA- und Histon-Methylierung diskutiert (Matzke und Birchler, 2005).

Neben der RNA-Interferenz existieren noch weitere Methoden der gezielten Hemmung der Genexpression. Dies ist zum einen die Gen-Inaktivierung durch homologe Rekombination, bei der durch gezieltes Unterbrechen eines Exons meist durch einen Selektionsmarker die weitere Expression des Gens verhindert wird. Es wird kein funktionelles Protein mehr gebildet und man spricht von so genannten

knock-out Zellen bzw. Organismen (Mülhardt, 2003). Zum anderen gibt es weitere Inhibitoren auf Nukleinsäure-Basis, die als *Antisense*-Oligonukleotide durch sterische Hinderung die Translation hemmen oder über RNAse H die Ziel-mRNA spalten, und als Ribozyme oder DNAzyme enzymatische Aktivität besitzen und spezifisch ihre Ziel-RNA spalten (zusammengefasst in Scherer und Rossi, 2003).

Mehrere Arbeiten haben sich mit dem Methodenvergleich zwischen RNAi und *Antisense*-Techniken beschäftigt. Dabei stellten sich die verwendeten siRNA in Zellkulturversuchen als die effizientesten der untersuchten Agenzien dar (Bertrand et al., 2002; Grunweller et al., 2003).

Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich mit der Anwendung der RNAi zur Herunterregulierung des Tumorsuppressorproteins p53 beschäftigt. Dabei sind sowohl siRNA zum transienten *knock-down* als auch Vektorsysteme zur stabilen Hemmung der *p53*-Genexpression in Säugerzellen zum Einsatz gekommen (Barton und Medzhitov, 2002; Brummelkamp et al., 2002; Liu et al., 2004; He et al., 2005; Menendez und Lupu, 2005; Troester et al., 2006).

2.4 DNA-Schäden und ihre Reparatur

Die in dieser Arbeit angewendete Schädigung der DNA erfolgte zum einen mit UVC-Strahlung und zum anderen mit dem reaktiven Benzo[a]pyren-Metaboliten (+)-*anti*-Benzo[a]pyrendiolepoxid (BPDE). Im Folgenden wird daher zunächst auf UVC- und BPDE-induzierte DNA-Schäden näher eingegangen, um dann auf den für ihre Reparatur wichtigsten Mechanismus, die Nukleotidexzisionsreparatur überzuleiten.

2.4.1 UV-induzierte DNA-Schäden

Die Sonne ist die Hauptquelle für die menschliche Exposition gegen UV-Strahlung. UV-Strahlung kann in drei Wellenlängenbereiche eingeteilt werden. UVA umfasst die Wellenlängen von 400 bis 315 nm, UVB die von 315 bis 280 nm und UVC schließt den Bereich zwischen 280 und 100 nm ein. Umweltrelevant sind nur UVA und UVB mit einem Anteil von 95 bzw. 5 % der auf der Erde ankommenden solaren UV-Strahlung, da UVC praktisch vollständig von der Ozonschicht absorbiert wird. Das Spektrum der durch UV-Strahlung induzierten DNA-Schäden variiert mit der Wellenlänge. Dabei handelt es sich bei den durch UVA-Strahlung induzierten

Schäden hauptsächlich um oxidative Basenschäden, während UVB überwiegend und UVC fast ausschließlich DNA-Photoprodukte induziert. Da das Absorptionsmaximum der DNA bei 260 nm liegt und somit durch Bestrahlung mit UVC eine effiziente photochemische Reaktion stattfindet, wird in vielen Studien UVC-Strahlung angewendet. UVC-Strahlung (254 nm) führt hauptsächlich durch [2+2]-Cycloaddition benachbarter Pyrimidine zur Bildung von zwei Produkten, zum einen von Cyclobutanpyrimidindimeren (CPD), die mit ca. 75 % den Hauptteil der Photoprodukte ausmachen und zum anderen von (6-4)-Photoprodukten (6-4-PP) mit einem Anteil von 24 % (Abbildung 3). Beide Läsionen sind zytotoxisch und können zu Mutationen führen (zusammengefasst in: IARC, 1992; Ravanat et al., 2001; Brendler-Schwaab et al., 2004).

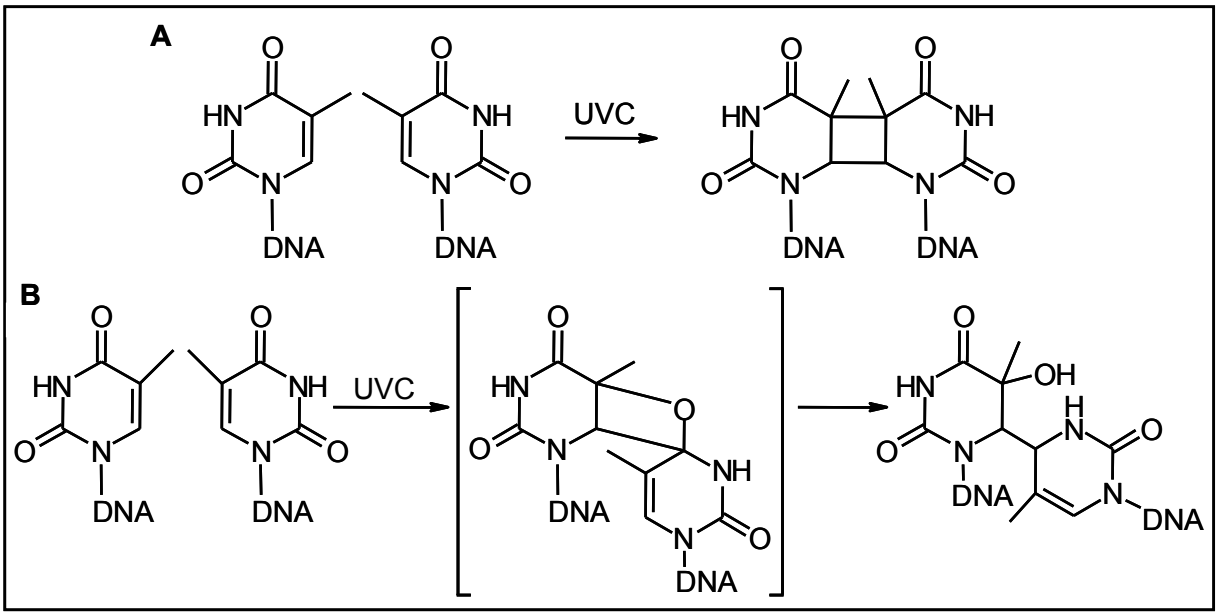

Abbildung 3: Bildung von (A) Cyclobutanpyrimidindimeren und (B) 6-4-Photoprodukten (Ravanat et al., 2001).

2.4.2 BPDE-induzierte DNA-Schäden

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) gehören zu den bedeutendsten Umweltschadstoffen, denen der Mensch tagtäglich ausgesetzt ist. Sie sind ubiquitär in der Umwelt verbreitet und entstehen überwiegend durch unvollständige Verbrennung organischer Substanzen. Im Körper werden sie zu elektrophilen Derivaten metabolisiert, die mit Purinbasen der DNA kovalente Addukte bilden können. Die Kanzerogenität vieler zu den PAK gehörender Verbindungen ist

bekannt, wobei Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P) in der Gruppe der PAK zu den stärksten Kanzerogenen zählt. Die wichtigsten Expositionsquellen sind, abgesehen von einer beruflichen Exposition, Tabakrauch und Lebensmittel. 70 % der täglichen B[*a*]P-Aufnahme erfolgen für einen beruflich nicht exponierten Nichtraucher über die Nahrung, insbesondere durch Gemüse, Fisch und Fleisch (zusammengefasst in Phillips, 1999).

B[*a*]P ist gut resorbierbar und wird im menschlichen Metabolismus zu einer Vielzahl reaktiver Verbindungen umgewandelt (Abbildung 4). Für die kanzerogene Wirkung von B[*a*]P ist vermutlich der relevanteste Reaktionsweg die Bildung des Metaboliten (+)-*anti*-BPDE ((+)-r-7,t-8-dihydroxy-t-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyren), der mit der DNA vor allem kovalente N^2-Guaninaddukte bildet. Diese inhibieren durch die partielle Verzerrung der DNA die Replikation und Transkription und können zu Mutationen führen (zusammengefasst in Conney et al., 1994; Melendez-Colon et al., 1999). B[*a*]P wirkt durch weitere Abbauwege in der Zelle, bei denen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen, zusätzlich zytotoxisch. Gebildete Dihydrodiole werden durch eine Dehydrogenase in Katechole umgewandelt, welche schnell zu Semichinonradikalen und o-Chinonen autoxidieren können. An der Autoxidation ist das Superoxidradikalanion beteiligt. Durch nichtenzymatische Reduktion über NADPH oder enzymatische Ein-Elektronen-Reduktion werden immer wieder Katechole gebildet, die dann wieder oxidiert werden (zusammengefasst in Bolton et al., 2000). Ein weiterer Weg führt über die Bildung eines Radikal-Kations an der C6-Position des B[*a*]P. Diese Radikale können an der N7- oder C8-Position von Purinbasen instabile DNA-Addukte bilden, die in AP-Stellen resultieren, welche ebenfalls mutagenes Potential besitzen können (zusammengefasst in Cavalieri und Rogan, 1995). Die Radikale können auch zu 6-Hydroxy-B[*a*]P hydrolysiert werden, welches zu erweiterten Chinonen autoxidieren kann, die wiederum zu Semichinonen reduziert werden. Nach erneuter Autoxidation können wieder ROS gebildet werden (Joseph und Jaiswal, 1994).

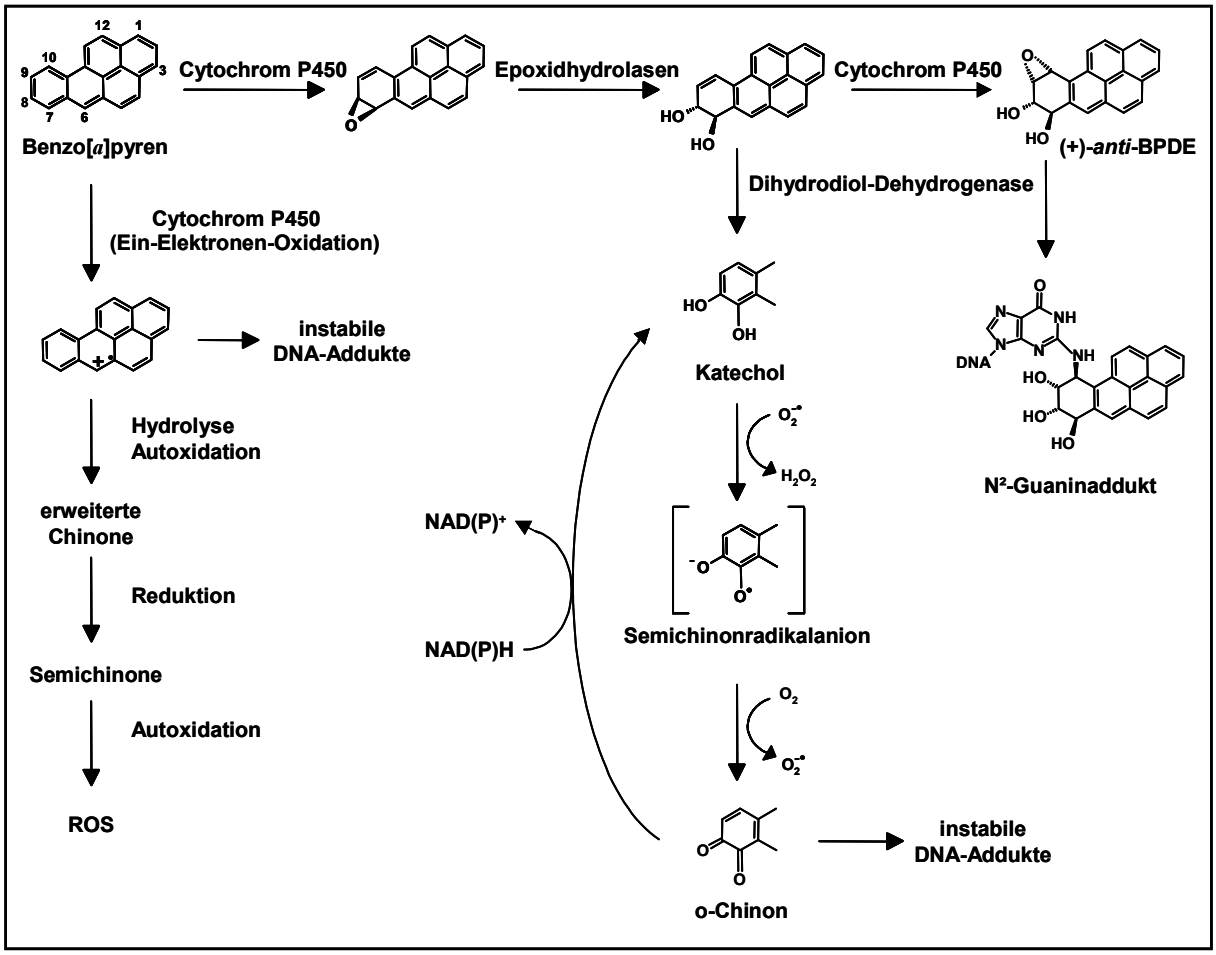

Abbildung 4: Schema des B[*a*]P-Metabolismus (erstellt nach: Conney et al., 1994; Cavalieri und Rogan, 1995; Bolton et al., 2000).

2.4.3 DNA-Reparaturprozesse

Die DNA ist fortlaufend den Einwirkungen von endogenen und exogenen schädigenden Agenzien ausgesetzt, die die Integrität des Genoms gefährden können. DNA-Reparaturprozesse gehören zu den wichtigsten zellulären Mechanismen zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität. In Säugerzellen existieren mehrere wichtige Wege zur Reparatur verschiedener Arten von DNA-Schäden. Dies sind zum einen die Mechanismen zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen, das nichthomologe *End-Joining* (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR), sowie zum anderen die Basenexzisionsreparatur (BER), die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) sowie die *Mismatch*- oder Basenfehlpaarungsreparatur (MMR).

Doppelstrangbrüche gehören zu den für die Zelle besonders schwerwiegenden DNA-Läsionen. Sie entstehen u. a. durch ionisierende Strahlung. Die BER ist der

wichtigste Mechanismus zur Reparatur von Basenschäden, wie sie durch Alkylierungsmittel, aber auch durch endogen gebildete reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen können. Darüber hinaus werden auch AP-Stellen durch die BER repariert. Zur Reparatur UV-induzierter Pyrimidin-Photoaddukte sowie durch mutagene Umweltschadstoffe verursachte großräumige DNA-Addukte ist die NER der entscheidende Weg. Die MMR ist verantwortlich für die Reparatur von Basenfehlpaarungen sowie von Polymerasen eingefügte Nukleotid-Insertionen und -Deletionen wie sie bei der Replikation entstehen können (zusammengefasst in Schärer, 2003). Im Folgenden soll näher auf die NER eingegangen werden, da sie im Mittelpunkt der Untersuchungen in dieser Arbeit steht.

2.4.3.1 Nukleotidexzisionsreparatur

Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) gilt als der wichtigste Reparaturweg für großräumige DNA-Schäden, wie sie durch Umweltmutagene wie zum Beispiel durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) oder durch UV-Strahlung entstehen können. Dabei unterscheidet man zwischen der globalen genomischen Reparatur (GGR), die im gesamten Genom aktiv ist, und der transkriptionsgekoppelten NER (TCR), die sich nur auf den transkribierten DNA-Strang aktiver Gene bezieht. Beide Pfade unterscheiden sich vor allem in der Schadenserkennung. Insgesamt sind an der NER etwa 30 Proteine beteiligt, wobei noch nicht alle Einzelheiten dieses komplexen Mechanismus aufgeklärt sind. Eine grobe Gliederung kann in die Schritte der Schadenserkennung, DNA-Entwindung, Inzision und Entfernung der Läsion, Reparatursynthese und Ligation vorgenommen werden.

Defekte in den NER-Genen können beim Menschen zu schwerwiegenden Krankheitsbildern führen. So führt die autosomal-rezessive Erkrankung Xeroderma Pigmentosum (XP), die sich je nach betroffenem Gen in die Komplementationsgruppen XPA bis XPG sowie XPV unterteilen lässt, zu extremer Sonnenlichtempfindlichkeit und einer Prädisposition für Hautkrebs.

Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen nach lokaler UV-Bestrahlung menschlicher Fibroblasten führten zu folgendem Modell (Abbildung 5) für die Bildung des NER-Inzisionskomplexes (Volker et al., 2001).

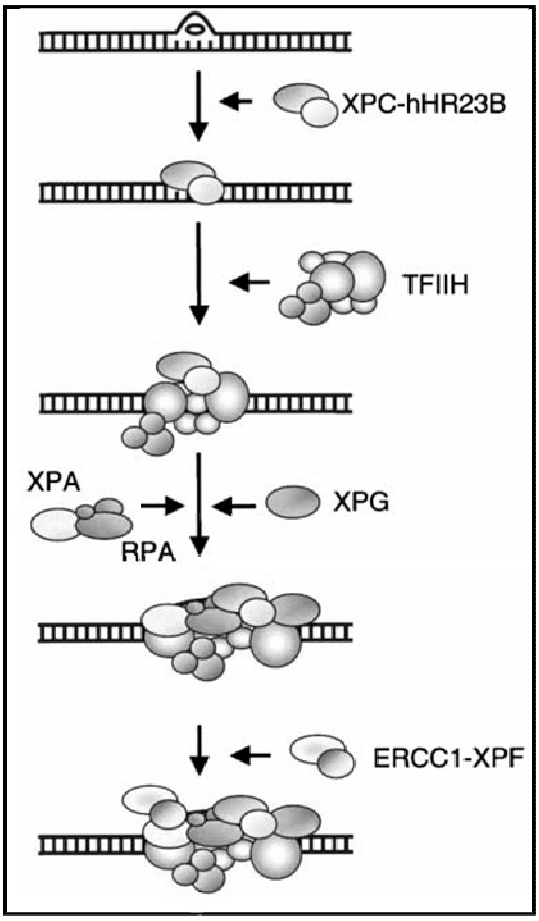

Abbildung 5: Bildung des Inzisionskomplexes in der NER (GGR) (Volker et al., 2001).

Die Schadenserkennung bei der GGR erfolgt zunächst durch einen Proteinkomplex aus XPC und hHR23B. Dieser erkennt die durch eine DNA-Läsion hervorgerufene helikale Verzerrung und rekrutiert weitere Proteine zum Schaden. Dies ist zunächst der Transkriptionsfaktor TFIIH, der aus mehreren Untereinheiten, darunter die Helikasen XPB und XPD, besteht. Nach der lokalen Entwindung der DNA lokalisieren die 3'-Endonuklease XPG, der Proteinkomplex XPA-RPA und schließlich die 5'-Endonuklease ERCC1-XPF an die Schadensstelle. Dabei ist zwar die Anlagerung von XPG im Gegensatz zu ERCC1-XPF unabhängig von XPA, allerdings gilt XPA zur Aktivierung der Endonukleaseaktivität von XPG als essentiell. XPA-RPA wird eine besondere Rolle in der Schadensverifizierung und in der Positionierung der Endonukleasen zugesprochen. Anschließend erfolgt die Doppelinzision und ein Oligonukleotid von 25-32 nt wird freigesetzt, die entstandene Lücke durch Reparatursynthese der Polymerasen δ und ε sowie PCNA und RFC aufgefüllt und mittels DNA-Ligase I verschlossen (zusammengefasst in: Friedberg, 2001; Schärer, 2003).

Im Zusammenhang mit UV-induzierten DNA-Schäden konnte gezeigt werden, dass weitere Faktoren an der Schadenserkennung beteiligt sind. Das *damaged DNA binding protein* (DDB) mit seinen Untereinheiten DDB1 (p127) und DDB2 (p48) ist für die Bindung von XPC an CPD notwendig (Fitch et al., 2003b). 6-4-PP führen im Vergleich zu CPD zu einer stärkeren DNA-Helixverzerrung und können von XPC vermutlich direkt erkannt werden (Sugasawa et al., 2002). In einer weiteren Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass in menschlichen Fibroblasten durch DDB auch die Reparatur von 6-4-PP deutlich beschleunigt wird (Moser et al., 2005). Im Anschluss an die Assoziation an den DNA-Schaden wird p48 ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut, möglicherweise um den Zugang für XPC und die anderen Faktoren an die DNA zu ermöglichen (Rapic-Otrin et al., 2002).

Für die TCR verläuft die Schadenserkennung unabhängig von XPC durch eine Transkriptionshemmung der RNA-Polymerase II (RNA-Pol II) am DNA-Schaden, die dann zur Assoziation weiterer Reparaturproteine führt. Somit ist es wahrscheinlich, dass RNA-Pol II die Rolle von XPC/hHR23B in der Schadenserkennung der TCR übernimmt. Weitere Proteine wie CSA, CSB und XAB2 sind im Gegensatz zur GGR direkt an der TCR beteiligt. Generell gilt die TCR als der schnellere und effizientere Reparaturpfad im Vergleich zur GGR (zusammengefasst in Mellon, 2005).

2.5 Das Tumorsuppressorprotein p53

2.5.1 Struktur und Funktion

Das Tumorsuppressorprotein p53 spielt eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität. Es ist an wichtigen zellulären Prozessen wie der Apoptose, der Zellzyklusregulation und der DNA-Reparatur beteiligt und wird auch als „Hüter des Genoms“ bezeichnet (Lane, 1992). Diese besondere Funktion wird auch dadurch verdeutlicht, dass etwa 50 % aller menschlichen Primärtumoren Mutationen im p53-Gen aufweisen, die zu einem funktionell inaktiven Protein führen (Hollstein et al., 1991).

Das Protein p53 besitzt ein Molekulargewicht von 53 kDa, besteht aus 393 Aminosäuren und gehört zu einer Proteinfamilie, der mit p63 und p73 zwei strukturell und funktionell verwandte Proteine angehören (D'Erchia et al., 2003). Das p53-Protein lässt sich in mehrere strukturelle und funktionelle Domänen unterteilen (Abbildung 6).

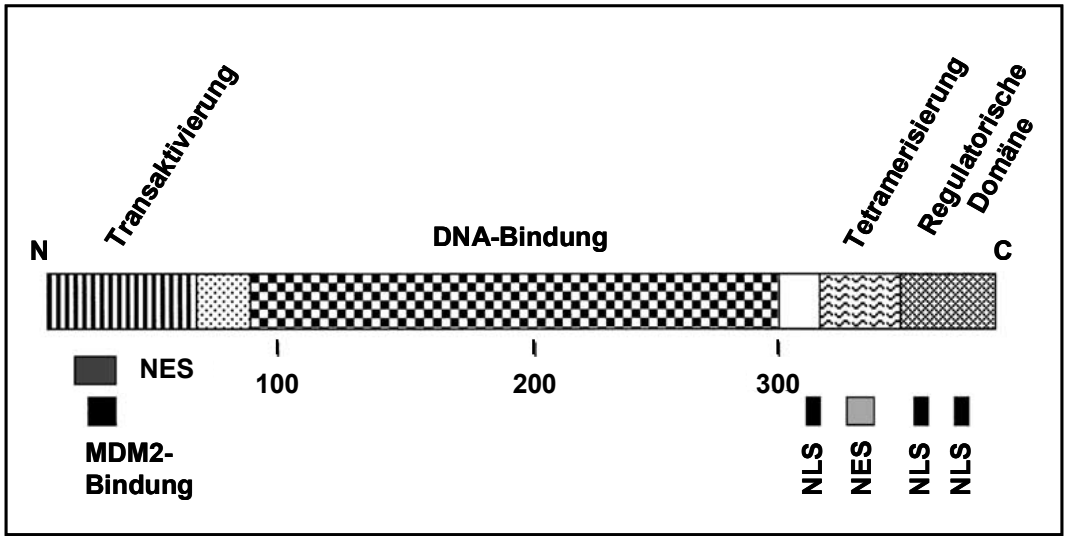

Abbildung 6: Struktur des p53-Proteins. NES: Kernexportsignal, NLS: Kernlokalisierungssignal (modifiziert nach Michael und Oren, 2003).

An die N-terminale Transaktivierungs-Domäne binden Proteine, die die Fähigkeit von p53 als Transkriptionsfaktor zu wirken, regulieren. Das wichtigste Regulationsprotein ist MDM2, das als E3-Ubiquitin-Ligase am Abbau von p53 beteiligt ist. Ubiquitin (Ub) ist ein 8 kDa Protein, das über einen mehrstufigen enzymatischen Prozess an Lysinreste von Proteinen kovalent gebunden wird. In Form von poly-Ub-Ketten stellt es ein Signal für den proteasomalen Abbau des modifizierten Proteins dar. Das 26S-Proteasom ist ein Proteinkomplex, der für den Abbau von polyubiquitinierten Proteinen verantwortlich ist (zusammengefasst in Haglund und Dikic, 2005). Dieser Regulationsmechanismus führt in normalen, ungestressten Zellen zu einer p53-Halbwertszeit von etwa 20 min. In Folge von verschiedenen Stressfaktoren kommt es jedoch zu Phosphorylierungen am N-Terminus die eine Bindung von MDM2 behindern und so zur Stabilisierung von p53 führen. Die DNA-Bindungsdomäne von p53 ist verantwortlich für die sequenzspezifische Bindung an DNA, wodurch das Protein seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben kann. Die Mehrzahl der bekannten Mutationen im p53-Gen ereignet sich in der zentralen DNA-bindenden Domäne und führt zu einem Verlust der DNA-Bindungsfähigkeit. Die C-terminale Region enthält weitere Funktionsbereiche: ein Kernexportsignal und drei Kernlokalisierungssignale regulieren die subzelluläre Lokalisierung des Tumorsuppressorproteins und die Tetramerisierungsdomäne, die für die Bildung der transkriptionell aktiven tetrameren Form von p53 verantwortlich ist. Durch Tetramerisierung wird das Kernexportsignal maskiert und p53 akkumuliert im

Zellkern. Acetylierung im C-terminalen Bereich verstärkt die sequenzspezifische DNA-Bindungsfähigkeit. Das durch Phosphorylierung und Acetylierung aktivierte Protein ist als Transkriptionsfaktor in die Regulation einer Reihe wichtiger zellulärer Prozesse wie Apoptose, Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur involviert, wodurch sich seine Funktion als Tumorsuppressorprotein erklären lässt. Dabei bindet p53 als Tetramer an so genannte p53-responsive Elemente in der Promotorregion seiner Zielgene und führt zu deren Transkription. Zu den Genprodukten die p53-abhängig transkribiert werden gehört auch MDM2, so dass sich eine Selbstregulation ergibt. Es gibt allerdings auch Beispiele p53-vermittelter Transkriptionshemmung, deren Mechanismus allerdings noch wenig verstanden wird (zusammengefasst in: Hainaut und Hollstein, 2000; Stewart und Pietenpol, 2001; Collot-Teixeira et al., 2004).
Von zentraler struktureller Bedeutung für das p53-Protein ist seine Zink-bindende Region als Teil der DNA-bindenden Domäne. Dabei wird ein Zinkion von drei Cystein- und einem Histidinrest komplexiert. Dieses Strukturmotiv stellt dabei keinen klassischen Zinkfinger, wie er in anderen Transkriptionsfaktoren vorliegt, dar. Vielmehr stabilisiert die Zinkbindung die Tertiärstruktur von p53 und ermöglicht dadurch die Bindung an die kleine Furche der DNA. Die Koordination von Zink ist essentiell für die korrekte Faltung und die sequenzspezifische DNA-Bindungsfähigkeit. Wird Zink aus der Proteinstruktur entfernt, resultiert eine so genannte „mutante“ Konformation des p53, mit teilweise entfalteter DNA-bindender Domäne die ihre DNA-Bindungsfähigkeit verloren hat (zusammengefasst in Hainaut und Mann, 2001).

2.5.2 Bedeutung von p53 in der NER

In Folge von DNA-Schäden kommt es zu einer Aktivierung von p53 als Transkriptionsfaktor. Zu den durch p53 transkriptionell regulierten Genprodukten zählen auch die an der NER-Schadenserkennung beteiligten Proteine XPC und p48 (DDB2) (Hwang et al., 1999; Adimoolam und Ford, 2002). Mehrere Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien belegen einen Zusammenhang zwischen der Reparatur UV-induzierter DNA-Photoprodukte und dem p53-Status der Zellen. Dabei stellte sich heraus, dass der Verlust von funktionell aktivem p53 selektiv die globale Genomreparatur (GGR) hemmt, während die transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR) unbeeinflusst bleibt (zusammengefasst in Adimoolam und Ford, 2003). Weitergehende Untersuchungen führten zu der Erkenntnis, dass vor allem die

Reparatur von CPD und weniger die Reparatur von 6-4-PP von der Hemmung betroffen ist (Adimoolam et al., 2001). Aus diesen Beobachtungen entwickelte sich ein Modell, wonach die Funktion von p53 in der NER in erster Linie auf seine Funktion als Transkriptionsfaktor für die an der Schadenserkennung in der GGR verantwortlichen Proteine XPC und p48 zurückzuführen ist (zusammengefasst in Ford, 2005). Da die Schadenserkennung in der TCR über RNA-Pol II vermittelt wird, ist hier auch kein Einfluss von p53 feststellbar. Darüber hinaus wird eine direkte Beteiligung von p53 am so genannten Chromatin-*Remodelling* diskutiert. Zur effizienten Schadenserkennung muss die Zugänglichkeit der DNA für die NER-Proteine gegeben sein. Dazu müssen reversible Strukturveränderungen des Chromatins erfolgen, an denen p53 möglicherweise direkt beteiligt ist (Rubbi und Milner, 2003; Allison und Milner, 2004).

Ein ähnlicher Einfluss auf die Reparatur konnte auch nach Induktion von DNA-Addukten durch Benzo[*a*]pyrendiolepoxid (BPDE) und Benzo[*g*]chrysendiolepoxid (B[*g*]CDE) festgestellt werden. Mehrere Untersuchungen im Zellkulturmodell zeigten die Abhängigkeit der GGR dieser Addukte von funktionell aktivem p53, wohingegen die TCR BPDE-induzierter DNA-Addukte nahezu unbeeinflusst blieb (Lloyd und Hanawalt, 2000; Wani et al., 2000; Lloyd und Hanawalt, 2002; Wani et al., 2002).

2.5.3 Bedeutung von p53 in der Zellzykluskontrolle

Der Zellzyklus ist der strikt regulierte Ablauf zellulärer Vorgänge von einer Zellteilung bis zur nächsten. Er gliedert sich in Interphase und Mitose (M)-Phase. Zur Interphase zählen die Ruhephase G0, die G1- und die G2-Phase in der die Synthese von mRNA und Proteinen für die jeweils nächste Phase stattfindet sowie die dazwischen liegende S-Phase, in der die DNA repliziert wird.

Der Ablauf des Zellzyklus wird durch Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen (Cdk) und Cdk-Inhibitoren (CDKI) reguliert. Bisher sind 8 verschiedene Cycline (Cyclin A-H) bekannt, die in den Ablauf des Zellzyklus involviert sind. Die meisten Cycline zeigen im Verlauf des Zellzyklus starke Veränderungen in ihrer mRNA- und Proteinexpression. Cdk werden durch Bindung an verschiedene Cycline aktiviert und haben auch eine Funktion in der Regulation der Transkription. Bislang sind mindestens 11 verschiedene Cdk identifiziert (Cdk 1-11). Cyclin-Cdk-Komplexe sind heterodimere Serin/Threonin-Proteinkinasen, die ihrerseits durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung in ihrer Aktivität reguliert werden. Aktive Cyclin-Cdk-

Komplexe phosphorylieren eine ganze Reihe von Substraten, wodurch der Ablauf des Zellzyklus gesteuert wird. Zu den CDKI gehören zum einen die Proteine der INK4-Familie (*inhibitor of Cdk4*) und zum anderen die Proteine der CIP/KIP-Familie (*Cdk interacting protein/kinase inhibitor protein*) (zusammengefasst in: Harper und Brooks, 2005; Malumbres und Barbacid, 2005).

In Folge von DNA-Schäden kann der Zellzyklus an so genannten DNA-Schaden- bzw. Zellzyklus-Kontrollpunkten verzögert oder angehalten werden. Solche Kontrollpunkte (*Checkpoints*) existieren am G1-S-Übergang, in der S-Phase und am G2-M-Übergang. Die Kontrollpunkte erhalten die Integrität des Genoms indem sie die Replikation geschädigter DNA und Mitosestörungen verhindern (Iliakis et al., 2003).

Die Rolle von p53 im Zellzyklusarrest am G1-S-Übergang ist recht gut verstanden. In Folge von DNA-Schäden kommt es über Signalkaskakaden zur Aktivierung von p53 als Effektor-Protein. Diese komplexen Signalkaskaden, die über Sensoren, Mediatoren und Transduktoren zu den Effektoren verlaufen, sind bislang nur zum Teil aufgeklärt. Als Sensor wird zum Beispiel ein Proteinkomplex aus Rad9, Rad1 und Hus1 (9-1-1-Komplex) diskutiert, der ähnlich wie PCNA als ringförmiger Komplex an der DNA entlang gleiten soll. Dabei wird er von einem Rad17-RFC-Komplex unterstützt. Als Mediatoren fungieren u. a. Proteine mit einer BRCT-Domäne, wie sie in BRCA1 vorkommt. Als Transduktoren spielen die Proteine ATM (*ataxia teleangiectasia mutated*) und ATR (*ATM and Rad3-related*) eine entscheidende Rolle, die als Protein-Kinasen direkt oder indirekt über die Aktivierung der *Checkpoint*-Kinasen Chk1 und Chk2 eine Vielzahl von Substraten phosphorylieren. Zu diesen Effektoren gehört auch das Tumorsuppressorprotein p53 (zusammengefasst in: Abraham, 2001; Niida und Nakanishi, 2006). Aktiviertes p53 führt als Transkriptionsfaktor zur verstärkten Expression von p21, das als CDKI der CIP/KIP-Familie an Cyclin D-Cdk4-Komplexe bindet und diese inhibiert. Dadurch wird die Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins pRb verhindert, es bleibt an Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie gebunden und hemmt die Expression von Genen, die für den Übergang in die S-Phase notwendig sind (Harper und Brooks, 2005). Darüber hinaus kann p21 durch Bindung an PCNA auch die Replikation hemmen (Waga et al., 1994).

Im Gegensatz dazu wird der Kontrollpunkt in der S-Phase als unabhängig von p53 oder p21 beschrieben (Iliakis et al., 2003). Abhängig von der Schadensinduktion werden verschiedene Signalwege diskutiert, die zum einen über ATM und Chk2 und

zum anderen über ATR und Chk1 zum Ubiquitin-vermittelten Abbau der Phosphatase Cdc25A und dadurch zur Hemmung der Cyclin E/A-Cdk2-Aktivierung, die für ein Fortschreiten der Replikation notwendig ist, führen (Heffernan et al., 2002). Zudem wird über die Beteiligung weiterer Faktoren wie BRCA1, SMC1 und des NRM-Komplexes (Nbs1, Rad50, Mre11) berichtet (zusammengefasst in Qin und Li, 2003).
Der G2-M-Übergang wird vor allem durch den Cyclin B-Cdk1-Komplex reguliert, der durch die Phosphatase Cdc25C dephosphoryliert und dadurch aktiviert wird. Die Signalkaskade am G2-M-Kontrollpunkt verläuft über ATM und Chk2 bzw. ATR und Chk1, die durch Phosphorylierung von Cdc25C dessen Phosphataseaktivität hemmen. Zusätzlich kann das 14-3-3-Protein an phosphoryliertes Cdc25C binden und es im Zytoplasma festhalten. Außerdem führt 14-3-3 zur Inaktivierung von Cdk1. Weiterhin ist p21 an diesem Kontrollpunkt beteiligt, indem es durch Hemmung der CAK (Cdk-aktivierende Kinase) die Aktivierung von Cyclin B-Cdk1 verhindert. Zudem soll GADD45 durch Bindung an Cdk1 die Aktivität des Cyclin B-Cdk1-Komplexes hemmen. Der Einfluss von p53 auf den G2-M-Kontrollpunkt besteht in seiner Form als transkriptioneller Aktivator für p21, 14-3-3σ und GADD45. Darüber hinaus soll p53 die Transkription von Cdk1 und Cyclin B hemmen (zusammengefasst in: Iliakis et al., 2003; Collot-Teixeira et al., 2004; Harper und Brooks, 2005).

3 Fragestellung

Das Tumorsuppressorprotein p53 spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität. Als Transkriptionsfaktor ist p53 an der Regulation zentraler zellulärer Mechanismen beteiligt, darunter sind Apoptose, Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur. Mutationen von p53 sind eng verknüpft mit der Entstehung von Krebserkrankungen. In mehr als 50 % der menschlichen Primärtumoren ist p53 mutiert und dadurch in seiner Funktion gestört. Strukturelle und funktionelle Veränderungen des Proteins können auch durch Metallverbindungen induziert werden, wie es zum Beispiel für Cadmiumverbindungen bereits gezeigt wurde. Cadmiumverbindungen gelten als kanzerogen für den Menschen, die genauen Ursachen dafür sind allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine mögliche Erklärung ist die Wechselwirkung mit Zink-bindenden Strukturen, wie sie im p53-Protein oder auch in einigen DNA-Reparaturproteinen in Form von Zinkfinger-Motiven vorkommen.

Zunächst soll die Beteiligung des Tumorsuppressorproteins p53 an wichtigen zellulären Schutzmechanismen in den verwendeten Zelllinien aufgeklärt werden, um in weiteren Versuchen den Einfluss von Cadmiumchlorid auf einzelne Prozesse zu betrachten. Dabei steht zunächst die Bildung von p53 *knock-down* Zellen mittels RNAi-Technik im Vordergrund. Für die dafür eingesetzten A549 Zellen existieren bereits umfangreiche Ergebnisse zum Einfluss von Cadmiumverbindungen auf zelluläre Prozesse. Zusätzlich werden HCT116 Zellen, von denen eine isogene, p53-defiziente Zelllinie zur Verfügung steht, für die weiteren Versuche verwendet. Neben Untersuchungen zur Rolle von p53 in der Zellzykluskontrolle nach Behandlung mit UVC, Actinomycin D oder BPDE soll der Einfluss von Cd(II) auf den UVC-induzierten S-Phasen Arrest im Zellzyklus in Abhängigkeit vom p53-Status der Zellen betrachtet werden. Weiterhin wird die Induktion von p53 und die Beteiligung von p53 an der Expression einzelner DNA-Reparatur- und Zellzyklusgene nach Inkubation mit BPDE beobachtet. Die Beteiligung von p53 an der NER soll anhand der Reparatur BPDE-induzierter DNA-Addukte und UVC-induzierter Photoläsionen untersucht werden, letztere auch unter dem Einfluss von Cadmiumchlorid.

4 Material und Methoden

4.1 Material

Eine Zusammenstellung aller verwendeten Chemikalien, Lösungen und Puffer sowie der benutzten Geräte und Verbrauchsmaterialien befindet sich im Anhang.

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur und Behandlung der Zellen

4.2.1.1 Zellkultur

Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Zelllinien handelt es sich um die humane Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa S3, die humane Brustkrebszelllinie MCF7, humane Lungenadenokarzinomzellen der Linie A549 und um humane Kolonkarzinomzellen der Linie HCT116 sowie deren p53-defizientes Pendant (HCT116 $p53^{-/-}$). Die Zellen wachsen als Monolayer in Zellkulturschalen bei 37 °C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit. Als Kulturmedium wird F12 (HeLa S3) bzw. DMEM mit einem Zusatz von 10 % FKS, Penizillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) verwendet. Die Zellen werden regelmäßig mittels PCR auf Mykoplasmenkontamination untersucht. Die Lagerung der Zellen erfolgt in flüssigem Stickstoff bei –196 °C in einem Einfriermedium aus 90 % FKS und 10 % DMSO.

Sämtliche Zellkulturarbeiten werden unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Flaschen werden nach dem Erwärmen im Wasserbad auf 37 °C mit 70%igem Ethanol abgewischt und nach dem Öffnen unter der Sterilbank noch zusätzlich abgeflammt. Die verwendeten Glaspipetten werden bei 180 °C für 4 Stunden heißsterilisiert. Verbrauchsmaterial wie zum Beispiel Kunststoffpipettenspitzen wird bei 120 °C für 20 Minuten bei 3 atm autoklaviert.

Alle 3 bis 4 Tage werden die Zellen in eine neue Zellkulturschale mit frischem Medium überführt (Passagieren). Dazu wird das Kulturmedium abgesaugt und die Schale zunächst mit Trypsin gewaschen. Nach erneutem Absaugen wird Trypsin hinzupipettiert, 30 Sekunden geschwenkt, das Trypsin abgesaugt und die Schale für 2-3 Minuten in den Brutschrank gestellt. Nach Zugabe von frischem Medium werden die Zellen mit einer Pipette vereinzelt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mit dem

automatischen Zellzählgerät (Casy). Eine entsprechende Menge der Zellsuspension wird in eine neue Zellkulturschale mit frischem Medium gegeben, die Schale zur Verteilung der Zellen hin und her bewegt und im Brutschrank aufbewahrt.

4.2.1.2 Inkubationslösungen

Zur Inkubation der Zellen mit Cadmiumchlorid wird aus einer sterilfiltrierten Stammlösung (100 mM) durch Verdünnen mit sterilem Wasser eine 10 mM Arbeitslösung hergestellt und diese in entsprechender Menge in das Kulturmedium pipettiert.

Zur Behandlung der Zellen mit dem reaktiven Metaboliten (+)-*anti*-BPDE wird die bei -80 °C gelagerte Stammlösung (1 mg/ml in THF/5 % Triethylamin) unmittelbar vor der Verwendung in THF/0,5 % Triethylamin verdünnt und im Verhältnis 1:1000 in das Medium pipettiert, so dass die Lösungsmittelkonzentration immer 0,1 % beträgt. Nach 1 h wird die Inkubation durch Waschen mit Medium beendet.

Die Inkubation der Zellen mit 5 nM Actinomycin D erfolgt durch 1:1000 Verdünnung einer sterilen 5 µM Stammlösung direkt in das Zellkulturmedium. Die Stammlösung wird durch Verdünnen einer wässrigen, sterilfiltrierten Stocklösung (0,5 mM) hergestellt, die bei -20 °C mehrere Monate stabil ist.

4.2.1.3 Bestrahlung mit UVC

Für die Bestrahlung mit UVC wird zunächst das Kulturmedium abgenommen, die Schalen einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit der gewünschten Dosis bestrahlt. Anschließend wird das zuvor abgenommene Medium wieder hinzugefügt und die Schalen entsprechend der Nachinkubationszeit in den Brutschrank zurückgestellt. Die Bestrahlung erfolgt bei 254 nm im Abstand von 30 cm zur UV-Lampe, so dass eine Strahlungsintensität von 1 J/m² pro Sekunde erreicht wird. Die korrekte Einstellung der Bestrahlungsapparatur wird regelmäßig mittels UV-Radiometer überprüft.

4.2.2 Koloniebildungsfähigkeit

Zur Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen nach Inkubation mit Cadmiumchlorid wird pro Konzentrationsstufe in eine 100 mm Zellkulturschale je eine

Million Zellen ausgesät. Nach 24 h erfolgt die Inkubation mit Cadmiumchlorid. Nach weiteren 24 h werden die Zellen abtrypsiniert und nach dem Vereinzeln entsprechend einer 1:20 Verdünnung in ein Eppendorfgefäß mit Medium pipettiert. Nach der Bestimmung der Zellzahl am automatischen Zellzählgerät (Casy) werden aus der 1:20 verdünnten Zellsuspension jeweils 300 Zellen in 3 Zellkulturschalen (60 mm) mit je 5 ml Medium pipettiert. Die Schalen werden schließlich für weitere 7 Tage im Brutschrank aufbewahrt. In dieser Zeit wachsen aus den einzelnen Zellen Kolonien heran, die mit dem bloßen Auge zu erkennen sind. Zum Auswerten müssen die entstandenen Kolonien gefärbt werden. Dazu wird aus den Zellkulturschalen das Medium abgesaugt und die Schalen werden mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen werden mit eiskaltem Ethanol (96 %) fixiert und mit Giemsa (5 % in Wasser) gefärbt. Schließlich werden die Zellkulturschalen mit Wasser gewaschen, um anhaftende Farbstoffreste zu entfernen. Nach dem Trocknen wird die Anzahl der Kolonien in jeder Schale ausgezählt. Durch Vergleich der Koloniezahlen der verschiedenen Konzentrationsstufen mit denen der unbehandelten Kontrolle werden die durch die entsprechende Substanz verursachten und auch längerfristig auftretenden zytotoxischen Effekte sichtbar.

Die Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit nach einstündiger Inkubation mit BPDE oder nach Bestrahlung mit UVC erfolgt nach einer modifizierten Vorgehensweise. Dazu werden je Konzentrationsstufe in 3 Zellkulturschalen (60 mm) je 300 Zellen ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen, wobei unbehandelte Kontrollen sowohl zu Beginn als auch am Ende angesetzt werden. Nach der Inkubation bzw. Bestrahlung werden die Schalen für ca. 7 Tage im Brutschrank aufbewahrt und die dann vorhandenen Kolonien wie zuvor beschrieben angefärbt und ausgezählt.

4.2.3 Zellzyklusuntersuchung

Zur Untersuchung der Zellzyklusverteilung werden je $3x10^5$ Zellen in 60 mm Schalen ausgesät. Je nach Versuch erfolgt nach 24 h eine Inkubation mit $CdCl_2$ und/oder nach weiteren 24 h mit BPDE oder eine Bestrahlung mit UVC mit 8- bzw. 9-stündiger Nachinkubationszeit. Die Inkubation mit Actinomycin D dauert 21 h. Anschließend werden die Zellen abtrypsiniert und in PBS/FKS aufgenommen, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 3 min bei 340 g zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wird das Zellpellet mit 1 ml PBS resuspendiert und auf dem

Vibrationsmischer mit 3 ml eiskaltem Ethanol zur Fixierung versetzt und mindestens 24 h bei -20 °C aufbewahrt. Zur Färbung mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI wird nach einem weiteren Zentrifugationsschritt der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit 1 ml DAPI-Färbelösung pro 1 Mio. Zellen resuspendiert. Bis zur Messung am Durchflusszytometer werden die Proben über Nacht bei 4 °C oder ca. 4 h bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Schließlich werden die Proben in Messröhrchen überführt und nach Anregung mittels UV-Lampe die Fluoreszenz (435-475 nm) auf Einzelzellebene gemessen. Mit Hilfe der Auswertesoftware FlowMax können aus den Messdaten Histogramme generiert und Zellzyklusverteilungen ermittelt werden.

4.2.4 Transfektionsexperimente

4.2.4.1 Bestimmung der Geneticin-Toleranzdosis

Zur Selektion stabil transfizierter Zellen wird das *neo*-Resistenzgen und das Selektionsantibiotikum Geneticin (G418) verwendet. In Vorversuchen muss zunächst für jede Zelllinie ermittelt werden, welche Konzentration an G418 zum Absterben aller Zellen ohne Resistenzgen innerhalb von etwa 14 Tagen führt. Zur Ermittlung der Toleranzdosis wird zuerst ein Vorversuch mit je 400 Zellen in 24-Loch Mikrotiterplatten durchgeführt, wobei 12 verschiedene Konzentrationen im Bereich von 0 bis 1,1 mg/ml eingesetzt werden. Nach 12-16 Tagen wird die Platte nach dem Waschen mit PBS und fünfminütigem Fixieren der Zellen mit eiskaltem Ethanol mit Giemsa (5 % in Wasser) gefärbt und visuell ausgewertet. Zur Dokumentation werden die Platten am Dokumentationsgerät (Fuji LAS3000) abfotografiert. In einem weiteren Versuch werden 2000 Zellen in 60 mm Schalen ausgesät und nach 24 h mit G418 im Konzentrationsbereich bis 0,8 mg/ml inkubiert. Nach 12-14 Tagen wird die Lebendzellzahl am Zellzählgerät (Casy) bestimmt und gegen die G418-Konzentration aufgetragen.

4.2.4.2 Transfektion von HeLa S3, MCF7 und A549 Zellen

Zur Transfektion in einer 24-Loch Mikrotiterplatte werden je Kavität $2x10^5$, $0,5x10^5$ bzw. $1,5x10^5$ HeLa S3, MCF7 bzw. A549 Zellen ausgesät und 24 h in Medium mit 10 % FKS ohne Antibiotika inkubiert. Die Transfektion wird mit dem Reagenz

Lipofectamine in Kombination mit dem Plus-Reagenz (Invitrogen) durchgeführt. Dazu wird für jede Kavität serumfreies Medium in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß vorgelegt, 0,4 µg Plasmid-DNA zugegeben, gemischt, 4 µl Plus-Reagenz zugegeben und nach erneutem Mischen 15 min bei Raumtemperatur inkubiert (je 25 µl Gesamtvolumen). Für jede Kavität werden 24 µl serumfreies Medium mit 1 µl Lipofectamine versetzt und gemischt. Je 25 µl Lipofectamine/Medium-Mischung werden zur Plasmid-DNA/Plus-Reagenz-Mischung gegeben, gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In den Kavitäten der 24-Loch Mikrotiterplatte wird das Medium abgesaugt, jeweils einmal mit 200 µl serumfreiem Medium gewaschen, erneut je 200 µl serumfreies Medium und 50 µl Plasmid-DNA/Lipofectamine/Plus-Reagenz-Mischung zugegeben und nach dem Mischen bei 37 °C inkubiert. Nach 4 h wird je Kavität 1 ml Medium mit 13 % FKS zugegeben. Informationen zu den verwendeten Plasmiden befinden sich im Anhang.

4.2.4.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Die Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels β-Galaktosidase-Aktivität wird zur Optimierung der Transfektionsmethode und zum Vergleich der Transfizierbarkeit verschiedener Zelllinien angewendet. Hierzu wird ein Plasmid (pSV-β-Gal) verwendet, das für β-Galaktosidase kodiert. Durch die Enzymaktivität der β-Galaktosidase wird das Substrat X-Gal in einen Farbstoff überführt, der die Zellen unter dem Mikroskop blau erscheinen lässt (Schrimpf, 2002).

Etwa 24 h nach der Transfektion in einer 24-Loch Mikrotiterplatte werden die Zellen zweimal mit je 500 µl PBS gewaschen, mit 250 µl Glutaraldehyd (0,25 %) für 5 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen, wobei der Puffer beim 2. Waschschritt für 10 min auf den Zellen verbleibt. Schließlich werden 250 µl X-Gal-Lösung zugegeben und bei 37 °C bis zu 24 h inkubiert. Die Auswertung erfolgt durch Auszählen am Mikroskop, wobei zur Dokumentation Fotos angefertigt werden.

4.2.4.4 Selektion und Isolierung von stabil transfizierten Zellklonen

24 h nach der Transfektion werden die Zellen passagiert und 1:20 verdünnt in 100 mm Schalen in Medium ohne Antibiotika ausgesät. Nach weiteren 24 h wird das Medium mit G418 versetzt. Während der folgenden 10- bis 14-tägigen

Selektionsphase wird alle 3-4 Tage ein Mediumwechsel mit Selektionsmedium durchgeführt, bis in einer mitgeführten Kontrollschale ohne Resistenzgen keine lebenden Zellen mehr vorhanden und in den übrigen Schalen Kolonien mit dem bloßen Auge sichtbar sind. Am Mikroskop werden Kolonien ausgewählt und an der Unterseite der Schale mit schwarzem Stift markiert, das Medium abgesaugt und ca. 1-2 ml frisches Medium zugegeben, so dass die Zellen nicht austrocknen können. Mit einer sterilen Pinzette wird ein Klonierungsring aus der Vorratsschale entnommen und vorsichtig um eine markierte Kolonie positioniert und angedrückt. Mit einer sterilen Pasteurpipette werden Mediumreste aus dem Ring abgesaugt, 60 µl Trypsin in den Ring pipettiert, das Trypsin abgesaugt, erneut 60 µl Trypsin in den Ring pipettiert und die Schale für 3 min in den Brutschrank gestellt. Dann werden die Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert, mit einer Eppendorf-Pipette im Ring vereinzelt und in vorbereitete 60 mm Schalen mit 5 ml Medium überführt. Um die Zellen weiterhin unter Selektionsdruck zu halten, werden sie kontinuierlich in G418-haltigem Medium kultiviert.

4.2.5 Bestimmung der relativen Genexpression

4.2.5.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der Gesamt-RNA werden ca. $2x10^6$ Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, bei 340 g (4 °C) abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wird in 1 ml PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei 850 g abzentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wird das Pellet mit 350 µl Lysepuffer (R1-Puffer) und 3,5 µl Mercaptoethanol versetzt und durch fünfmaliges Aufziehen durch eine Kanüle (Ø 0,4 mm) geschert. Im Anschluss wird das gleiche Volumen Ethanol (70 %) zugegeben, gemischt, die gesamte Lösung in ein Reaktionsgefäß mit Filtereinsatz überführt und bei 7700 g für 30 s abzentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und die Säule mit 350 µl MDB-Puffer (*membrane desalting buffer*) versetzt. Nach Abzentrifugieren bei 11500 g für 1 min wird der Durchlauf erneut verworfen und ein DNase-Verdau auf der Säule durchgeführt. Hierzu werden 95 µl DNase Reaktionsgemisch (10 µl DNase + 90 µl DNase Reaktionspuffer) für 15 min bei Raumtemperatur auf die Säule gegeben. Daraufhin werden zum Abstoppen 200 µl RA2-Puffer auf den Filter gegeben und 30 s bei 7700 g zentrifugiert. Die Säule wird

im Anschluss auf ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl RA3-Puffer gewaschen. Nach dem Zentrifugieren für 30 s bei 7700 g wird der Durchlauf verworfen und die Säule ein zweites Mal mit RA3-Puffer (250 µl) gewaschen. Nach Zentrifugation für 2 min bei 16000 g wird die RNA durch Zentrifugieren mit 100 µl RNase-freiem Wasser bei 16000 g von der Säule eluiert. Die Lagerung der Proben erfolgt bei -80 °C.

4.2.5.2 RNA-Quantifizierung

Zur Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA wird zunächst eine 1:50 Verdünnung hergestellt. Hierfür werden 98 µl Wasser mit 2 µl der RNA-Lösung versetzt und im Anschluss die Extinktion der verdünnten Lösung bei 260 nm am Biophotometer bestimmt. Alternativ kann die Extinktion der unverdünnten Probe am Nanodrop Spektralphotometer gemessen werden. Für die Auswertung wird folgende Beziehung zu Grunde gelegt: 1 OD_{260nm} = 40 µg RNA (Sambrook und Russell, 2001).

4.2.5.3 RNA-Elektrophorese

Zur Überprüfung der Integrität der isolierten RNA wird eine denaturierende RNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wird ein 1,2%iges formaldehydhaltiges Agarosegel hergestellt. Es werden 1,2 g Agarose mit 83 ml Wasser und 5 ml 20x MOPS-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 65 °C mit 12 ml Formaldehydlösung (37 %) versetzt. 1 µg der isolierten Gesamt-RNA wird mit Formamid-Denaturierungspuffer auf 15 µl Gesamtvolumen gebracht und 10 min bei 65 °C auf dem Heizblock denaturiert, so dass die RNA einzelsträngig vorliegt. Nach Zugabe von ca. 1,5 µl Lämmli-Ladepuffer erfolgt die Elektrophorese mit MOPS (1x) bei 60 V für ca. 2 h. Zur Detektion wird das Gel bei 520 nm am Geldokumentationssystem (Herolab) abfotografiert (siehe Anhang).

4.2.5.4 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgt im Allgemeinen nach folgender Vorgehensweise, wobei ein Ansatz mit 20 µl Gesamtvolumen für 1 µg Gesamt-RNA wie folgt pipettiert wird:
x µl (entsprechend 1 µg) RNA
10 – x µl RNase freies Wasser

1 µl Oligo $(dT)_{15}$ (0,5 µg/µL)
1 µl 10 mM dNTP (je 10 mM)
werden auf 65 °C für 5 min erhitzt und anschließend auf Eis gestellt.

Ein Mastermix aus:
4 µl 5x *First-Strand* Puffer
2 µl 0,1 M DTT
1 µl RNase *out*
wird bei 42 °C für 2 min inkubiert und dann mit 1 µl SuperScript II reverse Transkriptase versetzt. Es folgen 50 min Inkubation bei 42 °C und die Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzen auf 70 °C für 15 min.

Die Synthese der cDNA für die Bestimmung der Genexpression nach Inkubation mit BPDE erfolgt mittels cDNA-Synthesekit von Bio-Rad, welches auf einer modifizierten MMLV reversen Transkriptase mit RNAse H+-Aktivität sowie einem Gemisch aus Oligo(dT)- und *random hexamer* Primern basiert. Der Reaktionsansatz wird bei 4 °C im Eisblock nach folgendem Schema pipettiert:

15 – x µl RNase freies Wasser
x µl (entsprechend 1 µg) RNA-Probe
4 µl 5x iScript Reaktionsgemisch
1 µl iScript reverse Transkriptase.

Dieser Ansatz wird bei 25 °C für 5 min inkubiert, damit sich die Primer an die einzelsträngige RNA anlagern. Im Anschluss erfolgt bei 42 °C die reverse Transkription für 30 min. Durch Erhitzen auf 85 °C für 5 min wird die Reaktion beendet und die synthetisierte cDNA kann für die PCR eingesetzt werden.

4.2.5.5 Real-Time RT-PCR

Die Real-Time RT-PCR-Analysen werden am iCycler (Bio-Rad) durchgeführt. Dabei wird die DNA-Amplifikation durch den Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green in Echtzeit verfolgt. Hierbei handelt es sich um einen Farbstoff, der unspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert, dadurch fluoreszenzaktiv wird und somit mit fortschreitender Zyklenzahl zu einem Fluoreszenzanstieg führt. Die Fluoreszenzmessung erfolgt bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm.

Für den Probenansatz werden pro Reaktionsgefäß 25 µl eingesetzt, bestehend aus:
12,5 µl SYBR Green Supermix
10,5 µl Wasser
0,5 µl *forward* Primer
0,5 µl *reverse* Primer
1 µl cDNA.
Zur Vermeidung von Pipettierfehlern wird für jede zu untersuchende cDNA-Probe ein Mastermix angesetzt, der Supermix, cDNA und Wasser enthält. Dieser wird auf die verschiedenen Ansätze verteilt und im Anschluss werden die Primerpaare zugegeben. Eine Liste mit den verwendeten Primersequenzen befindet sich ebenso wie das verwendete Temperaturprogramm im Anhang. In Abbildung 7 ist das Ergebnis einer Real-Time PCR beispielhaft dargestellt.

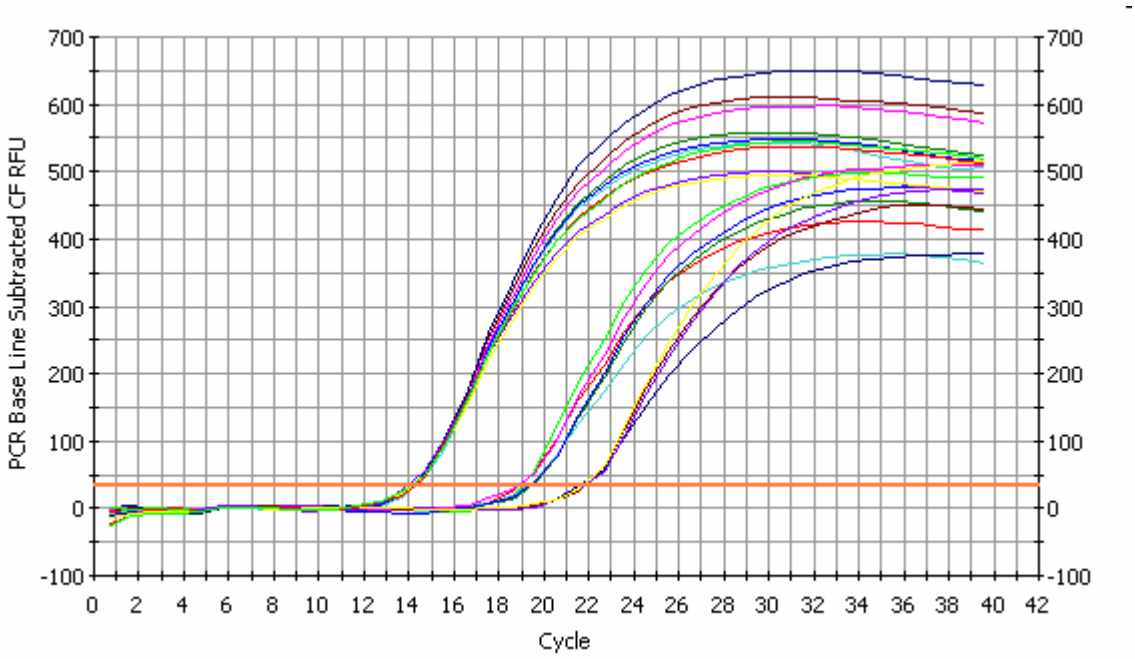

Abbildung 7: Beispielhaftes Ergebnis einer Real-Time PCR.

Da es sich bei SYBR Green um eine unspezifische Interkalation handelt, wird bei dem Fluoreszenzanstieg auch die Amplifikation unspezifischer Produkte wie z.B. die Bildung von Primer-Dimeren oder die Bildung unspezifischer PCR-Produkte aufgrund unspezifischer Primer-Bindung an die DNA erfasst. Daher wird nach abgeschlossener PCR stets eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Abwesenheit unspezifischer Produkte zu bestätigen. Hierbei werden die PCR-Produkte nach abgeschlossener PCR kontinuierlich über einen bestimmten

Temperaturbereich erhitzt. Währenddessen kommt es zu einer Denaturierung der Doppelstränge, wobei die Denaturierungstemperatur u. a. von der Länge des PCR-Produktes abhängt. Am Schmelzpunkt des Amplifikats kommt es zu einer schlagartigen Abnahme des Fluoreszenzsignals. Dies lässt sich in der Ableitungsfunktion der Fluoreszenz nach der Temperatur als Maximum detektieren (Abbildung 8).

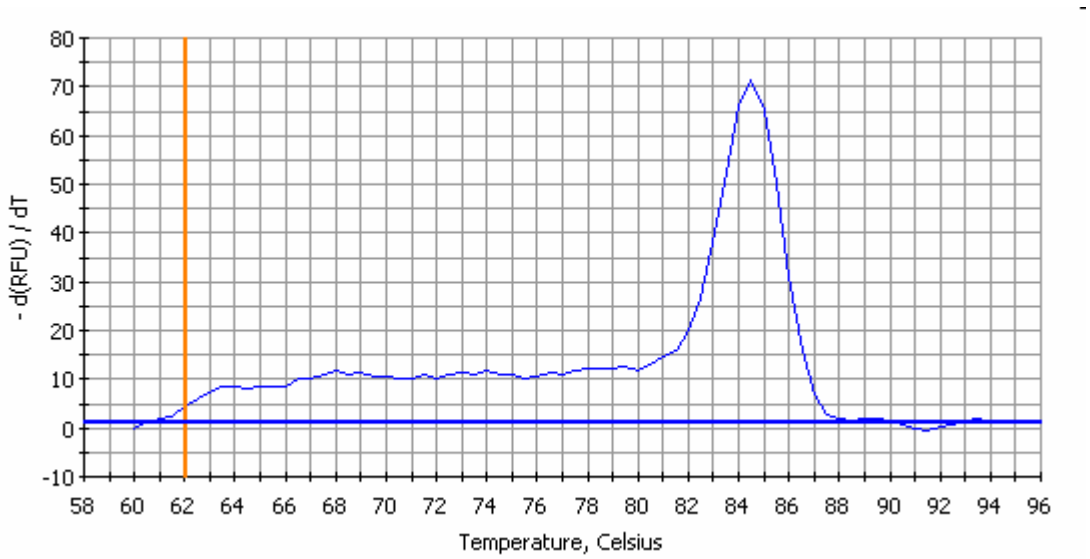

Abbildung 8: Schmelzkurvenanalyse nach Abschluss der PCR.

4.2.5.6 Auswertung

Als Maß für die Quantifizierung werden die so genannten *threshold cycle* (Ct)-Werte herangezogen. Die Ct-Werte entsprechen der Anzahl der Zyklen die nötig sind, um ein konstant festgelegtes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Bei diesem Wert befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Daher ist die Zahl der Zyklen, die für die amplifikationsbedingte Fluoreszenzzunahme zum Erreichen des Ct-Wertes erforderlich sind, invers proportional zu der Menge an ursprünglich eingesetzter DNA. Im Falle einer 100%igen Effizienz der Reaktion verdoppelt sich die Anzahl der DNA-Stränge während der exponentiellen Phase der PCR mit jedem Zyklus. Eine Probe, die zu Reaktionsbeginn doppelt so viele DNA-Moleküle wie die Vergleichsprobe enthält, benötigt somit einen Zyklus weniger, um den gleichen Ct-Wert zu erreichen. Anhand der unterschiedlichen Ct-Werte der beiden Proben lässt sich demnach der relative Unterschied des Nukleinsäure-Gehaltes zwischen den Proben berechnen (Pfaffl, 2004). Aufgrund von

Schwankungen während der cDNA-Synthese und um Pipettierfehler beim Einsatz der RNA-Menge für die cDNA-Synthese zu berücksichtigen, wird zusätzlich zu dem zu untersuchenden Gen ein weiteres, so genanntes *Housekeeping*-Gen untersucht. Hierbei handelt es sich um ein Gen, bei dem davon ausgegangen wird, dass es unabhängig von äußeren Einflüssen, d.h. unabhängig von der Behandlung der Zellen, exprimiert wird. In dieser Arbeit wurde als *Housekeeping*-Gen *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase), einem Enzym, das an der Glykolyse beteiligt ist, verwendet. Die für das zu untersuchende Gen erhaltenen Ct-Werte werden somit im Endeffekt auf die für das *Housekeeping*-Gen erhaltenen Ct-Werte normiert. Mit der folgenden Gleichung lässt sich die relative Genexpression (R) der behandelten Probe in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle darstellen (Livak und Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001):

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

Die Effizienz (E) der Reaktion hängt u. a. von der Länge der Amplifikate, von evtl. im Amplikon enthaltenen Sekundärstrukturen und vom G/C-Gehalt des Amplikons ab. Geringere Effizienzen weisen auf eine nicht optimale PCR-Reaktion hin. Auch Effizienzen größer 2, also größer 100 % sind bei der Verwendung von SYBR Green möglich. Dies weist darauf hin, dass zusätzlich zu dem spezifischen zu untersuchenden Gen ein weiteres unspezifisches Produkt gebildet wird. Daher ist es notwendig, zunächst die Effizienzen zu bestimmen und anschließend evtl. die PCR-Bedingungen (Annealingtemperatur, Annealingzeit, eingesetzte Primer) zu optimieren.

Hier wird die Effizienz anhand von Verdünnungsreihen bestimmt. Zunächst wird aus den zu untersuchenden cDNA-Proben eine Mischprobe hergestellt, indem die verschiedenen Proben zu gleichen Teilen miteinander versetzt werden. Nach Herstellung einer Verdünnungsreihe wird nach abgeschlossener PCR die eingesetzte cDNA-Menge in einer logarithmischen Funktion gegen den Ct-Wert aufgetragen. Die Effizienz (E) errechnet sich aus der Steigung (m) der erhaltenen Geraden nach folgender Gleichung:

$E = 10^{-1/m}$ (Pfaffl, 2001).

Die Verdünnungsreihen und die daraus ermittelten Effizienzen sind in Abbildung 58 und Abbildung 59 sowie in Tabelle 2 im Anhang aufgeführt.

4.2.6 Immunologischer Nachweis zellulärer Proteine

4.2.6.1 Zelllyse

Zur Zelllyse werden ca. 3-5 Millionen Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 340 g 3 min abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 100 µl RIPA-Puffer versetzt, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer (16000 g, 20 min) kann der Proteingehalt im Überstand bestimmt werden.

4.2.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Proteinbestimmung nach Bradford (1976) werden jeweils 5 µl Proteinextrakt mit 495 µl Wasser vermischt und 20 µl der Probenverdünnung (Dreifachbestimmung) in eine Mikrotiterplatte (96-Loch) pipettiert. Dazu werden 180 µl Bradfordlösung (Bio-Rad Reagenz) gegeben und fünf Minuten nach Reagenzzugabe wird die Absorption bei 595 nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät (TECAN SpektraFluor) bestimmt. Durch die Bindung des in der Bradfordlösung enthaltenen Farbstoffs Coomasie Brillantblau G 250 an Proteine verschiebt sich in saurer Lösung die Absorption von 465 nm nach 595 nm. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wird auf jeder Lochplatte eine Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin (BSA) im Bereich von 0-200 µg/ml mitgeführt.

4.2.6.3 Elektrophorese und Westernblot

40 µg Gesamtprotein werden mit 5 µl Lämmli-Ladepuffer (4x) versetzt, mit H_2O auf 20 µl ergänzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Im Anschluss werden die Proben auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel (5%iges Sammelgel, 12%iges Trenngel) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 80 V im Sammelgel und zur Trennung der Proteine im Trenngel bei 100 V. Auf jedem Gel wird ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt. Zur Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran werden die Proteine nach erfolgter Trennung in einer Semidry-Blot-Apparatur bei 0,8 A/cm^2 Membran für 1 h auf eine PVDF-Membran geblottet.

4.2.6.4 Chemilumineszenz-Detektion

Zur Blockierung aktiver Bindungsstellen wird die Membran nach dem Westernblot zunächst für 3 min in PBS gewaschen und für 30 min in Blockierlösung (5 % Magermilchpulver in PBS-T) geschwenkt. Anschließend wird die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht mit einem primären Antikörper (gegen p53, XPC oder Aktin gerichtet) inkubiert. Hierzu wird die Membran mit einer Verdünnung des Antikörpers in Blockierlösung in Kunststofffolie luftblasenfrei eingeschweißt. Im Anschluss erfolgt nach jeweils zehnminütigem, dreimaligem Waschen der Membran in PBS-T (0,05 % Tween 20) die Inkubation mit dem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper. Dazu wird ebenfalls eine Verdünnung des jeweiligen Antikörpers in Blockierlösung zusammen mit der Membran luftblasenfrei eingeschweißt. Nach Ablauf von mindestens einer Stunde erfolgt nach drei Waschschritten mit PBS-T für jeweils 10 min und einem abschließenden Waschschritt in PBS für 3 min die Detektion am Geldokumentationsgerät (Fuji LAS3000). Hierzu wird die Membran für 1 min mit etwa 1 ml des ECL-Detektionsreagenz (GE Healthcare) inkubiert und im Anschluss das Chemilumineszenzsignal der Reaktion der Peroxidase mit dem Substrat detektiert. Zur Detektion weiterer Proteine auf derselben Membran werden nach einem einstündigen Waschschritt in PBS die Inkubation und alle nachfolgenden Schritte mit einem weiteren primären und dem dazugehörigen sekundären Antikörper wiederholt.

4.2.7 Nachweis UVC-induzierter DNA-Schäden

4.2.7.1 Nachweisprinzip

Der Nachweis UVC-induzierter DNA-Schäden erfolgt mittels Immunfluoreszenz-mikroskopie. Hierzu werden auf Deckgläschen wachsende Zellen nach der Bestrahlung und einer eventuellen Nachinkubationszeit zunächst fixiert und nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit spezifischen Antikörpern gegen Cyclobutanpyrimidindimere (CPD) inkubiert. Dann erfolgen die Inkubation mit einem sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörper und die Färbung der DNA im Zellkern mit 4´,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI). Am Fluoreszenzmikroskop werden die Präparate schließlich abfotografiert und die Fluoreszenzsignalintensität wird als Maß für die CPD auf Einzelzellebene quantifiziert.

4.2.7.2 Versuchsdurchführung

In die Kavitäten einer 6-Loch-Platte werden 2,5x10^5 A549 bzw. 5x10^5 HCT116 Zellen auf Deckgläschen in 3 ml Medium ausgesät. Hierzu werden die Deckgläschen zunächst 5 min in Diethylether entfettet, nach dem Trocknen 10 min in Alcian Blue (1 mg/ml in Ethanol) gefärbt, mit 70%igem Ethanol und anschließend mit Wasser gespült und nach dem Polieren mit Zellstoff-Tüchern autoklaviert.

Nach 24 h erfolgt dann eine Inkubation mit Cadmiumchlorid, an die sich nach weiteren 24 h eine UVC-Bestrahlung (der Proben mit 24 h Nachinkubationszeit) anschließt. Zur Bestrahlung werden die Deckgläschen aus der Platte entnommen, mit PBS gespült und auf einen mit Parafilm bespannten Deckel einer Zellkulturschale gelegt. Nach der Bestrahlung werden die Deckgläschen wieder in die Kavitäten der Platte überführt. Nach Ablauf von 24 h Nachinkubationszeit erfolgt die Bestrahlung der Proben ohne Nachinkubationszeit und die sofortige Aufarbeitung aller Proben. Hierfür wird die Platte auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und einmal mit eiskaltem PBS gespült. Im Anschluss werden 2 ml Fixierlösung zugegeben und die Platte für 30 min im Dunkeln aufbewahrt. Nach zweimaligem Spülen mit eiskaltem PBS werden die Deckgläschen herausgenommen und auf einem mit Parafilm bespannten Schalendeckel platziert. Im folgenden Denaturierungsschritt werden je 100 µl HCl (0,1 M) zugegeben und 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgt ein doppelter Waschschritt mit eiskaltem PBS, auf den die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit je 100 µl Blockierlösung für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln folgt. 100 µl des primären Antikörpers (Maus-anti-CPD, 1:1500 in Waschpuffer) werden für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Spezifität dieses Antikörpers gegen CPD ist in der Literatur beschrieben (Mori et al., 1991). Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer folgt die Inkubation mit 100 µl sekundärem Antikörper (AlexaFluor488-anti-Maus, 1:1000 in Waschpuffer) für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach erneutem fünfmaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgt eine Nachfixierung mit Postfix-Lösung für ca. 10 min und das Einbetten der Präparate in Vectashield mit DAPI auf Objektträger, wodurch die DNA im Zellkern angefärbt wird. Abschließend findet die Bildaufnahme am Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager, Carl Zeiss) und die computergestützte Bildauswertung mittels Axio Vision Software (Carl Zeiss) statt. Abbildung 9 zeigt beispielhaft fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.

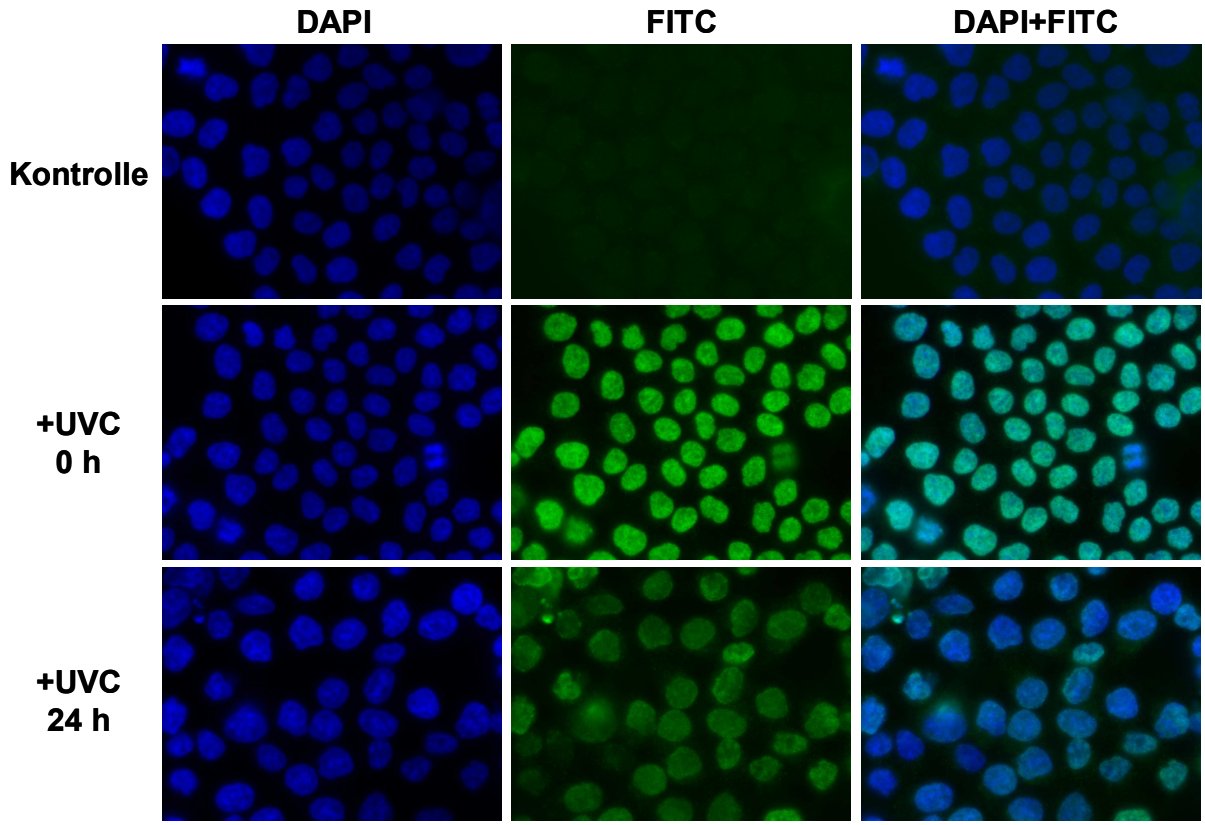

Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HCT116 Zellen 0 h bzw. 24 h nach Bestrahlung mit 10 J/m^2 UVC. Kontrolle: unbestrahlte Zellen. Dargestellt sind die Fluoreszenzkanäle für DAPI (DNA-Färbung) und FITC (Cyclobutanpyrimidindimere) in 63-facher Vergrößerung.

4.2.8 Nachweis BPDE-induzierter DNA-Addukte

4.2.8.1 Nachweisprinzip

Der Einfluss von p53 auf die NER wird anhand der Bildung und Reparatur von BPDE-induzierten DNA-Addukten untersucht. Als Nachweissystem dient ein empfindliches und reproduzierbares HPLC/Fluoreszenz-Testsystem (Schwerdtle et al., 2002). Dafür werden die Zellen mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert, die DNA isoliert und gereinigt. Durch die anschließende saure Hydrolyse werden die DNA-Addukte freigesetzt. Bei der Rückneutralisation entsteht das Isomer Tetrol I-1, welches über die HPLC/Fuoreszenz-Detektion quantifiziert wird (Abbildung 10). Durch die Quantifizierung der Addukte zu verschiedenen Zeiten nach der BPDE-Inkubation können Rückschlüsse auf die Funktionalität der Reparaturmechanismen in den Zellen gezogen werden.

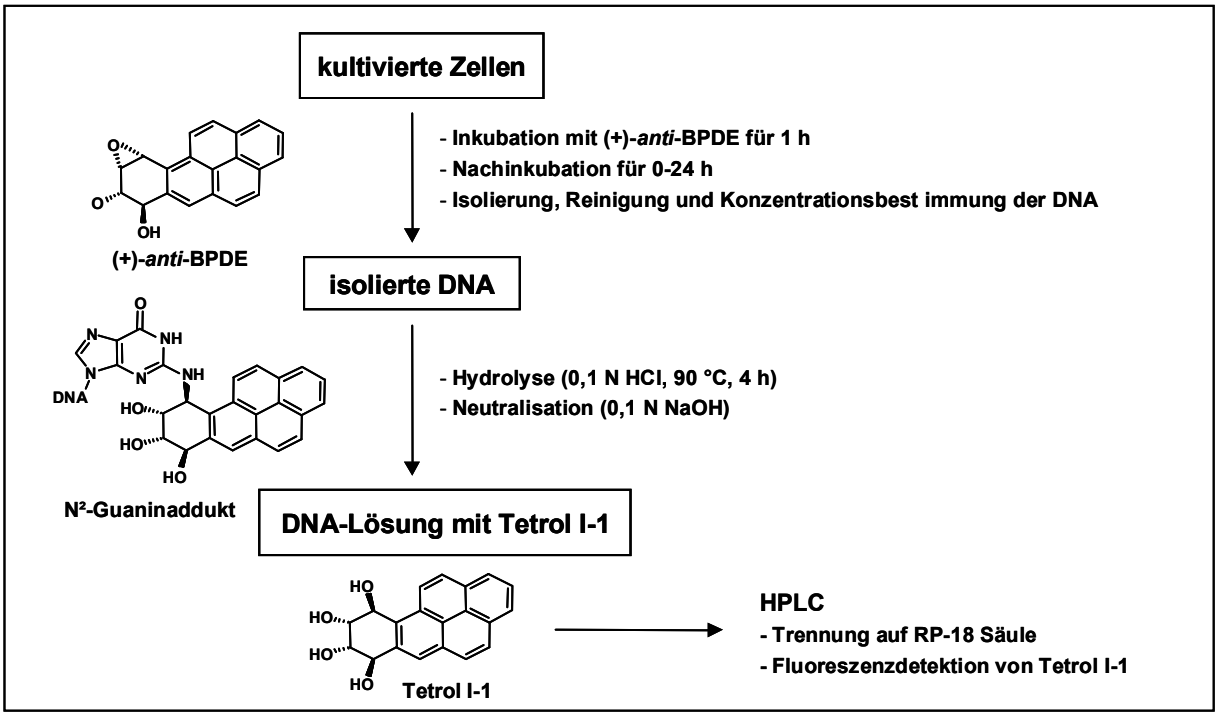

Abbildung 10: Prinzip des Nachweises von BPDE-induzierten DNA-Addukten.

4.2.8.2 Versuchsansatz

$3x10^5$ Zellen werden in 60 mm Schalen oder $1x10^6$ Zellen in 100 mm Schalen ausgesät und nach 48 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert. Nach einer Stunde wird die Inkubation durch zweimaliges Waschen mit Medium beendet und die Schalen werden zur Nachinkubation für 4, 8 oder 24 h in den Brutschrank zurückgestellt.

4.2.8.3 DNA-Isolierung und -Quantifizierung

Zur Isolierung der DNA werden die Zellen von der Kulturschale abtrypsiniert, in kalter TBS-Lösung (pH 7,4) aufgenommen, gezählt und für 5 min bei 650 g (4 °C) zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 100 µl TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert und die Zellsuspension nach Zugabe von 900 µl Extraktionspuffer (pH 8,0) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgt eine dreistündige Inkubation bei 50 °C mit Proteinase K (Endkonzentration 100 µg/ml). Zur Abtrennung der DNA von den Proteinen wird die Lösung mit 1 ml einer Mischung aus Tris-gepuffertem Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, geschüttelt und zur Phasentrennung für 10 min bei 13700 g zentrifugiert. Hierbei denaturiert Phenol die Proteine, die sich zum großen Teil in der Interphase zwischen der wässrigen DNA-Lösung und der Phenolphase

anreichern. Mit der oberen wässrigen Phase wird die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion wiederholt bis sich keine Interphase mehr bildet. Zur Entfernung des Phenols aus der wässrigen Phase schließt sich eine Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) an. Danach wird die DNA durch Zugabe von 10 µl einer 10 M Ammoniumacetatlösung und ca. 1,5 ml Ethanol (absolut) ausgefällt. Um eine möglichst vollständige Fällung zu erzielen, werden die Proben über Nacht bei -18 °C aufbewahrt.

Am folgenden Tag wird die DNA bei 8600 g für 10 min zentrifugiert. Darauf folgen mehrere Waschschritte mit 70%igem Ethanol, um mitgefällte Salze zu entfernen. Zuletzt wird das gereinigte DNA-Pellet in einem definierten Volumen Reinstwasser aufgenommen und die DNA-Konzentration photometrisch anhand der Absorption bei 260 nm (A_{260}) bestimmt. Die Quotienten A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} geben Aufschluss über die Verunreinigung der DNA mit Proteinen und Salzen. Bei gut aufgereinigter DNA sollten die Quotienten $A_{260}/A_{280} > 1{,}75$ und $A_{260}/A_{230} \approx 2{,}3$ sein (Schrimpf, 2002).

4.2.8.4 DNA-Hydrolyse

Für die Hydrolyse wird ein Aliquot der isolierten und gereinigten DNA mit 4 N HCl (Endkonzentration 0,1 mol/l) versetzt und im Trockenschrank für 4 h bei 90 °C erhitzt. Durch die saure Hydrolyse der isolierten DNA wird die Bindung zwischen dem C_{10}-Atom des B[*a*]P-Metaboliten und der N^2-Position des Guanin gespalten und es entstehen zwei isomere Tetrole, die sich lediglich in der Stellung der Hydroxygruppe am C_{10}-Atom unterscheiden. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Hydrolysat mit 4 N NaOH auf pH 7 rückneutralisiert. Die neutralisierte Lösung wird zur HPLC-Analyse eingesetzt.

Es ist bekannt, dass bei der Rückneutralisation Tetrol I-2 (r-7,t-8,t-9,t-10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyren) nahezu vollständig in Tetrol I-1 (r-7,t-8,t-9,c-10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyren) übergeht, so dass die Quantifizierung von Tetrol I-1 den induzierten Addukten in der DNA entspricht (Islam et al., 1999).

4.2.8.5 HPLC-Analyse

Die HPLC-Analyse erfolgt isokratisch (55 % Methanol in Wasser) an RP-18 Säulen. Bei den Säulen handelt es sich um eine Vorsäule (Luna RP 18, 5µm, 4,6 x 30 mm) und eine Trennsäule (Luna RP 18, 5 µm, 4,6 x 250 mm), die über ein Motorsäulenschaltventil gesteuert werden. Die Vorsäule wird zunächst mit dem Fließmittel A (Wasser) für 10 min vorkonditioniert. Danach folgt die Injektion von 1000 µl Probe mit dem Autosampler und ein Waschen der Vorsäule mit dem Fließmittel B (20 % Methanol in Wasser). Automatisch schaltet das Motorsäulenschaltventil von der Ladestellung auf die Injektionsstellung um und die auf der Vorsäule aufkonzentrierte Probe wird mit dem Fließmittel C (55 % Methanol in Wasser) auf die Hauptsäule übertragen. Die Quantifizierung erfolgt über einen Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 344 nm und einer Emissionswellenlänge von 398 nm. Die resultierenden Peaks werden über die Fläche ausgewertet. Im Anhang befinden sich weitere Angaben zum HPLC-Analysenprogramm und beispielhafte HPLC-Chromatogramme der Versuche mit 10 und 200 nM (+)-*anti*-BPDE in HCT116-Zellen bei 0 h und 8 h Nachinkubationszeit (Abbildung 60) sowie die zur Auswertung verwendete Kalibriergerade von Tetrol I-1-Standardlösungen (Abbildung 61).

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Transfektionsexperimente

5.1.1 Methodenetablierung

Für die RNA-Interferenz mussten *siRNA*-Expressionsplasmide in kultivierte Zellen eingebracht werden. Dafür existieren verschiedene Transfektionsmethoden. Mit der Lipofektion wurde ein weit verbreitetes Verfahren gewählt, dessen Vorteile vor allem durch die breite Anwendbarkeit für viele verschiedene Zelllinien, geringe Zytotoxizität, vergleichsweise hohe Effizienz und geringen apparativen Aufwand gegeben sind (Mülhardt, 2003). In mehreren Versuchsreihen wurden A549, HeLa S3 und MCF7 Zellen hinsichtlich ihrer Transfizierbarkeit verglichen. Verschiedene Parameter wie DNA-Menge, Menge an Transfektionsreagenz und Konfluenz der Zellen wurden variiert, um die bestmögliche Transfektionseffizienz zu erreichen. Dabei ergaben sich für die untersuchten Zelllinien unter den gewählten Bedingungen sehr unterschiedliche Effizienzen. Während für HeLa S3 Zellen die maximale Transfektionseffizienz bei ca. 5 % lag, wurden für A549 und MCF7 Zellen Effizienzen von bis zu 20 bzw. 40 % erreicht (siehe Abbildung 56 im Anhang).

Zur Selektion von stabil transfizierten Zellen wurde als Selektionsmarker das *neo*-Gen in Kombination mit dem Aminoglykosid-Antibiotikum Geneticin (G418) eingesetzt. Das Antibiotikum blockiert in eukaryotischen Zellen die Proteinsynthese durch Wechselwirkung mit den 80S Ribosomen und führt so zu deren absterben (Davies und Jimenez, 1980). *Neo* kodiert für eine bakterielle Phosphotransferase, die G418 inaktivieren kann (Colbere-Garapin et al., 1981). Durch Kultivieren in Selektionsmedium können somit nur die Zellen überleben, die das *neo*-Resistenzgen exprimieren (Southern und Berg, 1982). Daher wurde zunächst in Vorversuchen die G418-Toleranzdosis der Zelllinien bestimmt. Sie lag für HeLa S3 Zellen bei 0,6 mg/ml und sowohl für A549 als auch für MCF7 Zellen bei 0,5 mg/ml (siehe Abbildung 54 im Anhang). Test-Transfektionen mit dem Plasmidvektor pCI-*neo* führten bei den Zelllinien im Vergleich zum Wildtyp zu einer G418-Resistenz und zur Bildung von Kolonien nach einer Selektionsphase von ca. 14 Tagen unter den genannten Bedingungen. Die optimierte Transfektionsmethode und die ermittelten G418-Konzentrationen wurden bei allen folgenden Transfektionsexperimenten eingesetzt.

5.1.2 Charakterisierung der Zellen

Zunächst wurden Transfektionsexperimente mit HeLa S3, A549 und MCF7 Zellen durchgeführt. Dabei wurde das Plasmid p53-pRNA eingesetzt, das zur Expression von gegen *p53* gerichteten siRNA führt. Zur Untersuchung des *knock-down* Effekts wurden Westernblot-Analysen mit spezifischen, gegen p53 gerichteten monoklonalen Antikörpern durchgeführt (Abbildung 11). Dabei wurde auf Proteinebene eine deutliche Verringerung der p53-Expression bei einzelnen Klonen sichtbar. Diese in Abbildung 11 jeweils mit Nummer 1 bezeichneten Klone wurden dann mittels Real-Time RT-PCR auf ihre relative *p53*-Genexpression untersucht. Dabei ergab sich ein bei allen drei Zelllinien vergleichbarer *knock-down* Effekt auf ca. 20 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Abbildung 12).

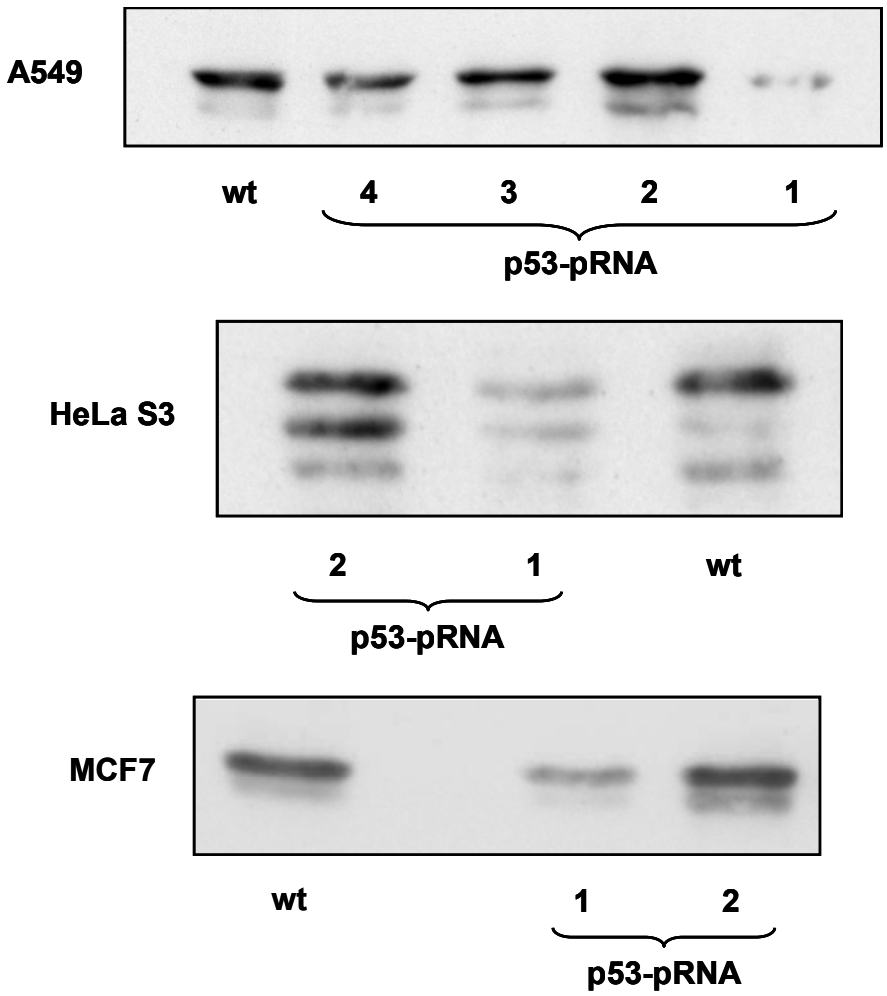

Abbildung 11: Westernblot-Analyse von p53 in A549, HeLa S3 und MCF7 Zellen. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot. wt: Wildtypzellen, p53-pRNA (1-4): mit p53-siRNA-Plasmid transfizierte Zellen mit unterschiedlich ausgeprägtem *knock-down* Effekt.

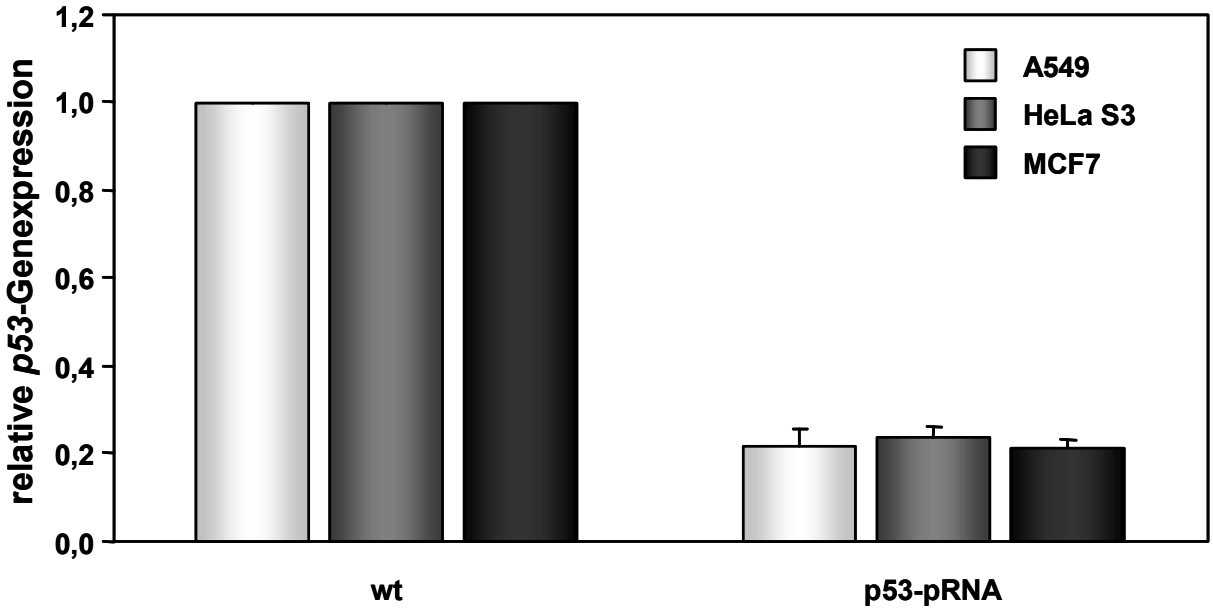

Abbildung 12: Relative *p53*-Genexpression in A549, HeLa S3 und MCF7 Zellen. Logarithmisch wachsende Zellen wurden mittels Real-Time RT-PCR untersucht. wt: Wildtypzellen, p53-pRNA: mit p53-siRNA-Plasmid transfizierte Zellen. Alle Werte wurden normiert auf das *housekeeping*-Gen *GAPDH*. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 Bestimmungen + SD.

Für den weiteren Verlauf der Arbeit wurde entschieden, mit den A549 Zellen weiterzuarbeiten. Da sich herausstellte, dass eine Einlagerung transfizierter Zellen in flüssigem Stickstoff nicht ohne große Verluste des *knock-down* Effekts möglich ist, wurden regelmäßig neue Transfektionsversuche durchgeführt. Dabei wurden zusätzlich auch A549 Zellen mit dem Plasmidvektor ohne siRNA-Konstrukt transfiziert. Die entsprechenden Klone (pRNA) wurden als Kontrollen in den weiterführenden Versuchen verwendet. Zur Auswahl geeigneter Klone nach den Transfektionen und zur Überprüfung ihres p53-Status wurden regelmäßig Westernblot- und Real-Time RT-PCR-Analysen durchgeführt. In Abbildung 13 ist ein repräsentativer Westernblot gezeigt, bei dem zusätzlich die in den späteren Versuchen verwendeten HCT116 Zelllinien mit dargestellt sind. Während bei den HCT116 $p53^{-/-}$ im Gegensatz zu den HCT116 $p53^{+/+}$ Zellen kein p53-Protein detektierbar war, konnte bei den A549 p53-pRNA eine deutliche Reduktion des Proteins im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden.

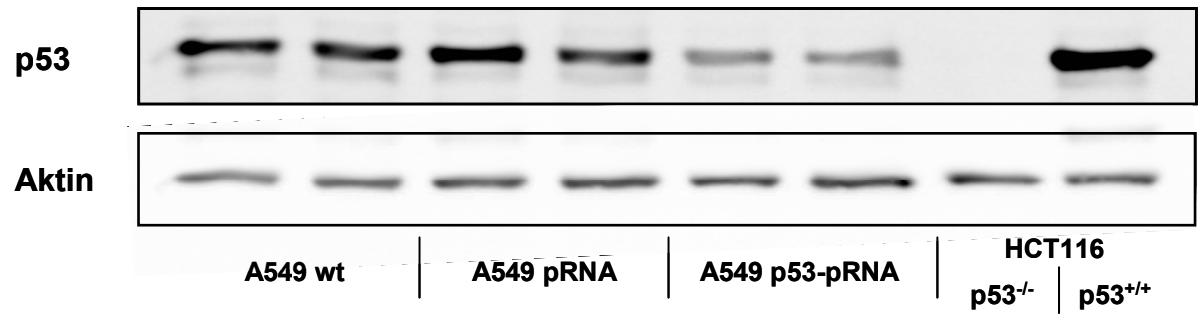

Abbildung 13: Westernblot-Analyse von p53 in A549 und HCT116 Zellen. Aktin wurde als Ladekontrolle detektiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot. wt: Wildtypzellen, pRNA: mit leerem Plasmid transfizierte Zellen, p53-pRNA: mit p53-siRNA-Plasmid transfizierte Zellen, $p53^{+/+}$: p53-profiziente Zellen, $p53^{-/-}$: p53-defiziente Zellen.

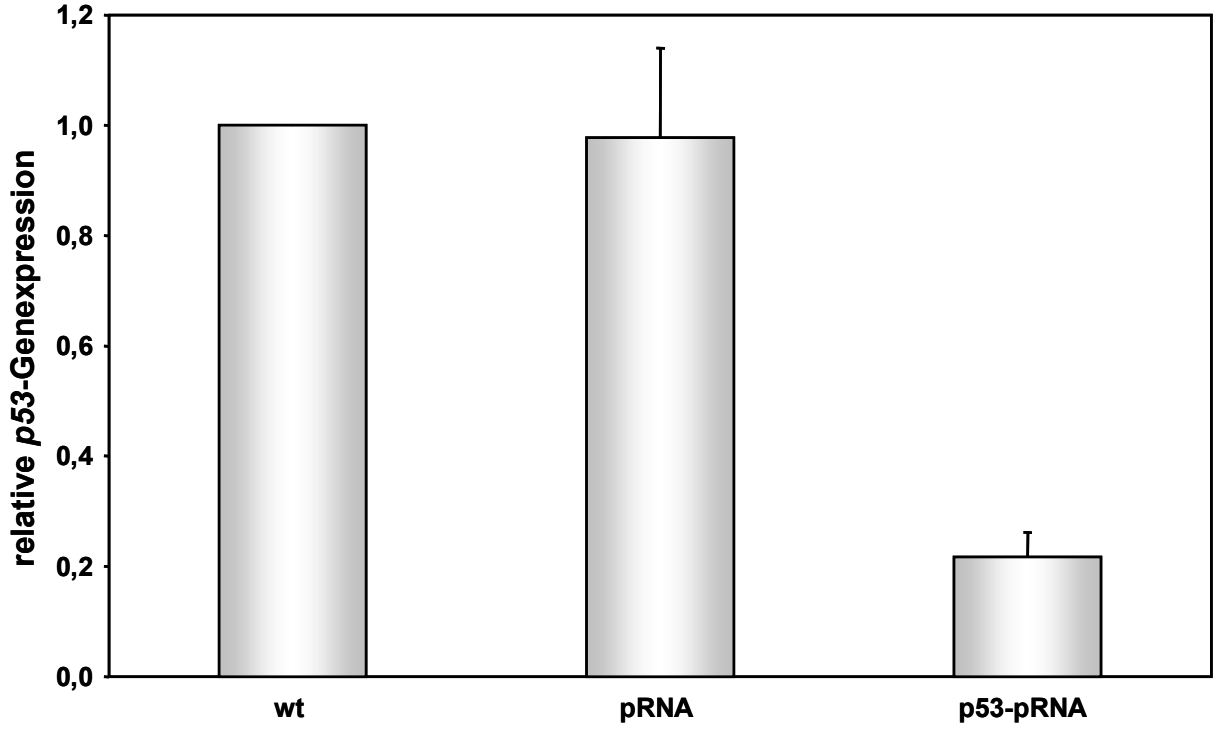

Abbildung 14: Relative *p53*-Genexpression in A549 Zellen. Logarithmisch wachsende Zellen wurden mittels Real-Time RT-PCR untersucht. wt: Wildtypzellen, pRNA: mit leerem Plasmid transfizierte Zellen, p53-pRNA: mit p53-siRNA-Plasmid transfizierte Zellen. Alle Werte wurden normiert auf das *housekeeping*-Gen *GAPDH*. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 6 unabhängigen Bestimmungen + SD.

Die Untersuchung der relativen *p53*-Genexpression zeigte, dass die mit dem p53-siRNA-Plasmid transfizierten A549 Zellen (p53-pRNA) einen stabilen *knock-down* Effekt von ca. 80% aufwiesen (Abbildung 14). Die zur Kontrolle mit dem leeren

Plasmid transfizierten Zellen (pRNA) hatten eine mit den unbehandelten A549 Wildtypzellen (wt) vergleichbare *p53*-Genexpression. Dies verdeutlicht, dass es sich bei dem erreichten Effekt nicht um unspezifische Folgen der Transfektion mit dem Plasmid handelte, sondern um eine gezielte Verringerung der *p53*-Genexpression durch RNAi.

Mehrere Arbeiten in der Literatur beschäftigen sich mit dem *knock-down* von *p53* durch RNAi. Brummelkamp et al. (2002) beobachteten in MCF7 Zellen 60 h nach Transfektion eines Expressionsvektors zur Bildung von p53-siRNA eine Verminderung der p53-mRNA um ca. 90 % sowie eine deutliche Reduzierung des p53-Proteins sowohl in unbestrahlten als auch in mit ionisierender Strahlung (IR) behandelten Zellen. Darüber hinaus wurden nach Co-Transfektion mit einem Selektionsmarker stabil transfizierte Klone isoliert, die auch nach 2 Monaten noch einen deutlich veminderten p53-Spiegel aufwiesen. He et al. (2005) verwendeten die von Brummelkamp et al. (2002) beschriebene Methode in embryonalen Stammzellen und fanden ebenfalls eine Reduktion, aber keinen kompletten Verlust des p53-Proteins in stabil transfizierten Zellen. In weiteren Arbeiten wurden die von Brummelkamp et al. (2002) beschriebenen siRNA-Sequenzen benutzt, um mit viralen Vektoren einen stabilen *p53 knock-down* in menschlichen Zellen zu generieren. Dies führte in primären menschlichen Fibroblasten zu einer funktionellen p53-Defizienz und das Protein war mittels Westernblot nicht mehr nachweisbar (Barton und Medzhitov, 2002). In transfizierten MCF7 Zellen hingegen war p53 noch nachweisbar und auch induzierbar, allerdings auf geringerem Niveau als bei den nicht-transfizierten Kontrollen (Troester et al., 2006).

Die eigenen Ergebnisse, für die ebenfalls die von Brummelkamp et al. (2002) beschriebenen siRNA-Sequenzen verwendet wurden, zeigen eine recht gute Übereinstimmung mit den Werten aus der Literatur. Dass die Vergleichbarkeit dabei auch von den verwendeten Zelllinien mitbestimmt wird, verdeutlichen die zitierten Arbeiten.

5.2 Zytotoxizität

Zur Erfassung zytotoxischer Wirkungen wurde die Koloniebildungsfähigkeit sowie zum Teil auch die Zellzahl nach entsprechender Behandlung der Zellen untersucht. Während ein Rückgang der Zellzahl eher ein Maß für akute zytotoxische Effekte ist, werden mit der Koloniebildungsfähigkeit vor allem solche Folgen verdeutlicht, die sich auf die Wachstums- und Teilungsfähigkeit der Zellen nach mehreren Teilungszyklen auswirken.

5.2.1 Cadmiumchlorid

Zur Bestimmung der Zytotoxizität von Cadmiumchlorid wurden sowohl die Zellzahl als auch die Koloniebildungsfähigkeit nach 24-stündiger Inkubation im Konzentrationsbereich von 0-100 µM Cd(II) untersucht. Die Zellzahl wurde in wildtyp sowie in p53-pRNA A549 Zellen im Konzentrationsbereich bis 100 µM Cd(II) mit einem konzentrationsabhängigen Rückgang auf ca. 60 % der Kontrolle nur mäßig beeinflusst (Abbildung 15).

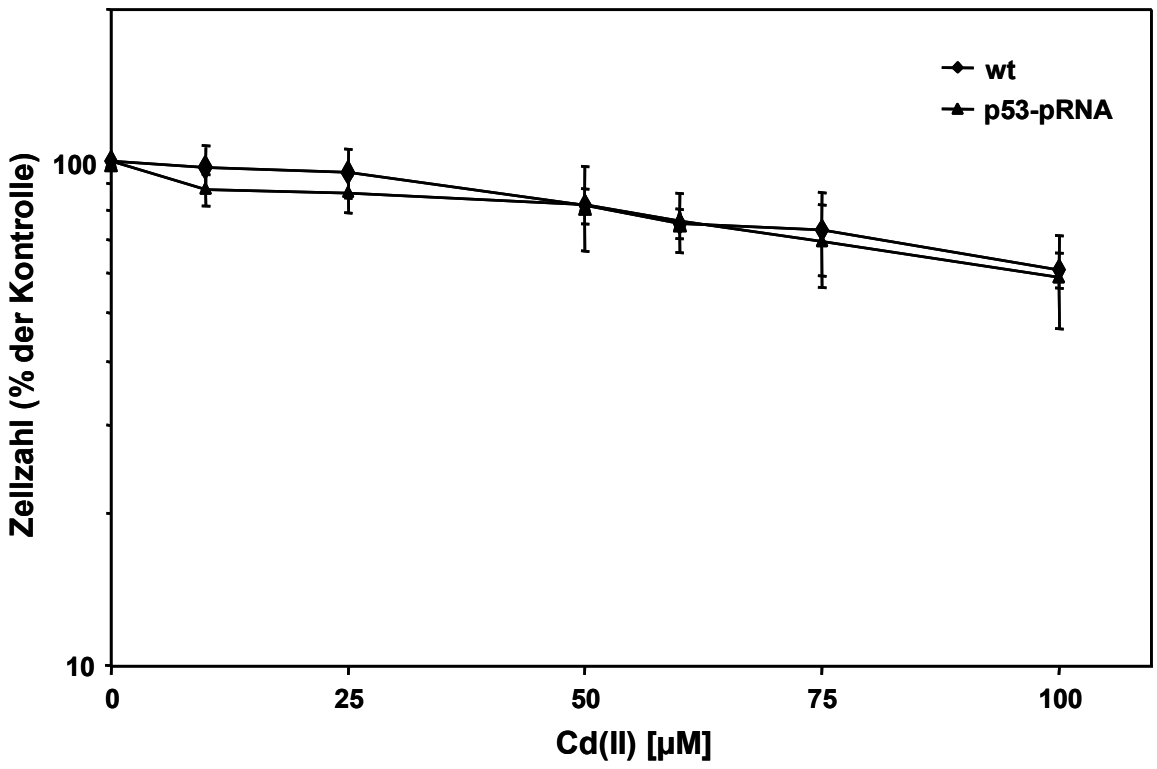

Abbildung 15: Zellzahl nach 24 h Inkubation von A549 Zellen mit $CdCl_2$. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Bestimmungen ± SD. wt: Wildtypzellen, p53-pRNA: mit p53-siRNA-Plasmid transfizierte Zellen.

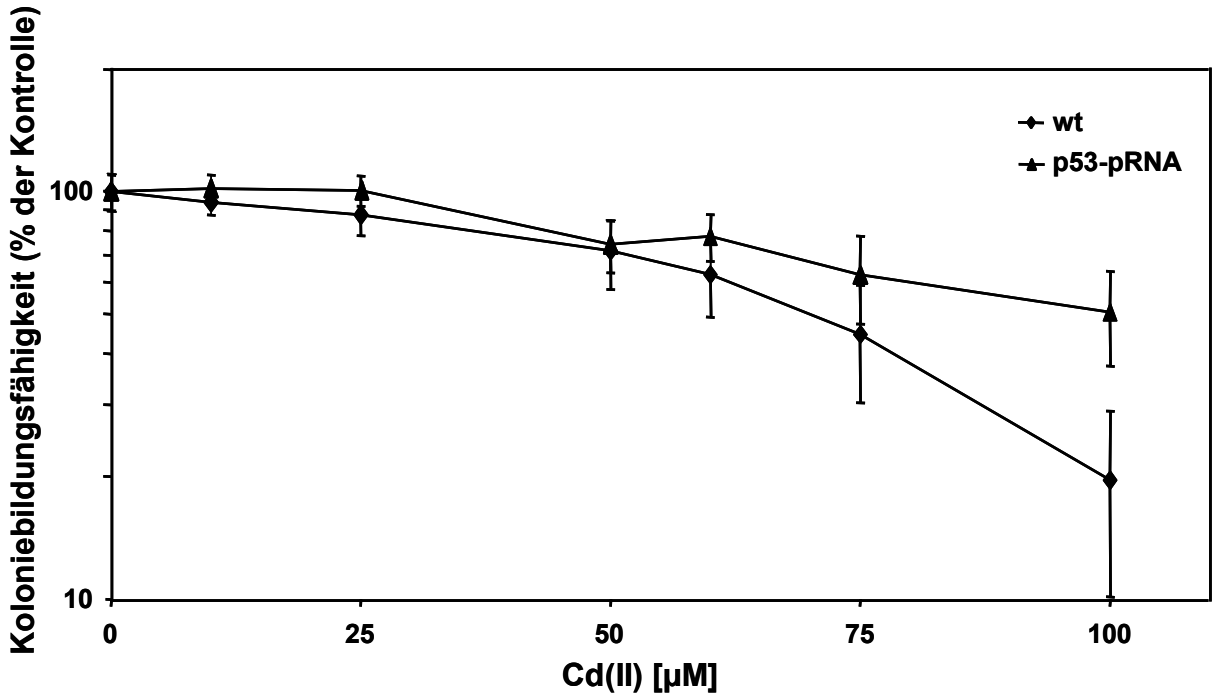

Abbildung 16: Koloniebildungsfähigkeit von A549 Zellen nach 24 h Inkubation mit $CdCl_2$. Dargestellt sind Mittelwerte aus 12 Bestimmungen ± SD. wt: Wildtypzellen, p53-pRNA: mit p53-siRNA-Plasmid transfizierte Zellen.

Bezüglich der Koloniebildungsfähigkeit zeigten wt und p53-pRNA Zellen bis 50 µM Cd(II) keinen Unterschied; sie verringerte sich konzentrationsabhängig auf ca. 75 % der Kontrolle (Abbildung 16). Im oberen Konzentrationsbereich ab 60 µM Cd(II) entwickelte sie sich jedoch unterschiedlich. Während bei den wt A549 Zellen ein deutlicher Rückgang auf etwa 20 % zu verzeichnen war, verringerte sich die Koloniebildungsfähigkeit bei den p53-pRNA Zellen nur auf ca. 50 % der Kontrolle bei 100 µM Cd(II).

Bei den HCT116 Zellen konnten schon bei der Zellzahl nach 24 h Inkubation mit Cadmiumchlorid Unterschiede zwischen den p53-profizienten ($p53^{+/+}$) und den p53-defizienten ($p53^{-/-}$) Zellen festgestellt werden (Abbildung 17). Beide zeigten einen konzentrationsabhängigen Rückgang der Zellzahl bis auf etwa 40 bzw. 60 % der Kontrolle bei 100 µM Cd(II). Der Effekt fiel bei den $p53^{+/+}$ Zellen über den ganzen Konzentrationsbereich jeweils ca. 10-20 % stärker aus. Auch bei der Koloniebildungsfähigkeit wurden diese Unterschiede deutlich (Abbildung 18). Sie lag bei den $p53^{-/-}$ Zellen bei 50 µM Cd(II) noch bei 86 % und verringerte sich bis 100 µM Cd(II) auf 54 %, während bei den $p53^{+/+}$ Zellen eine Koloniebildungsfähigkeit von nur rund 70 % bzw. 25 % bei den genannten Konzentrationen erreicht wurde.

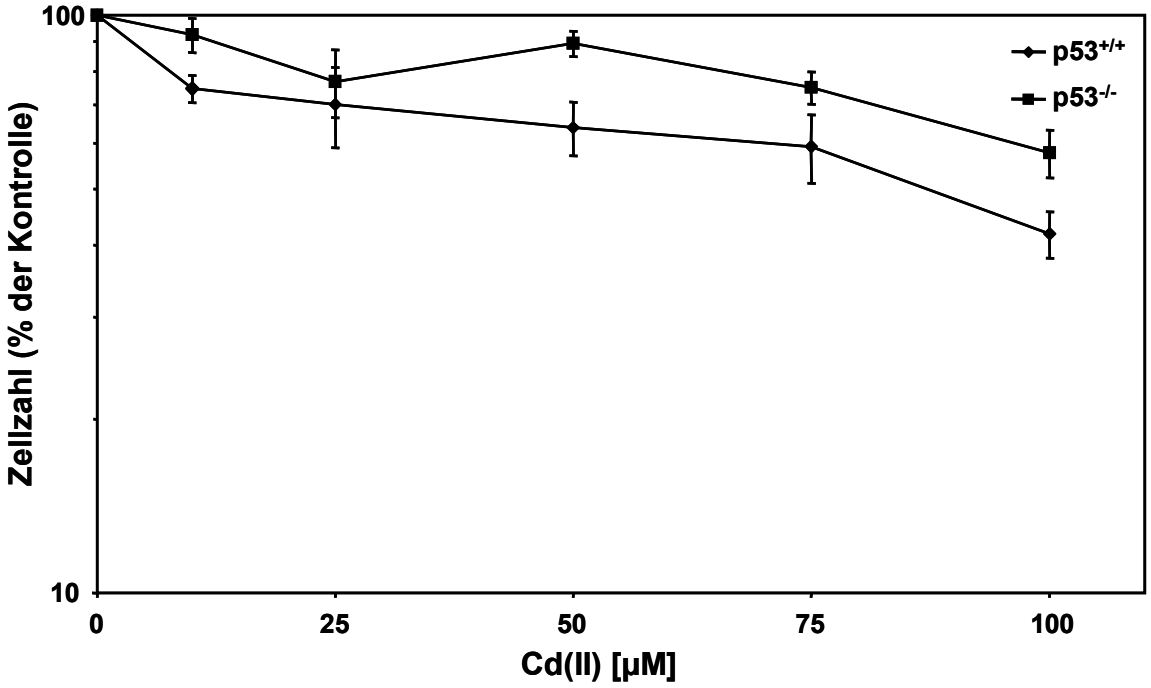

Abbildung 17: Zellzahl nach 24 h Inkubation von HCT116 Zellen mit $CdCl_2$. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Bestimmungen ± SD. $p53^{+/+}$: p53-profiziente Zellen, $p53^{-/-}$: p53-defiziente Zellen.

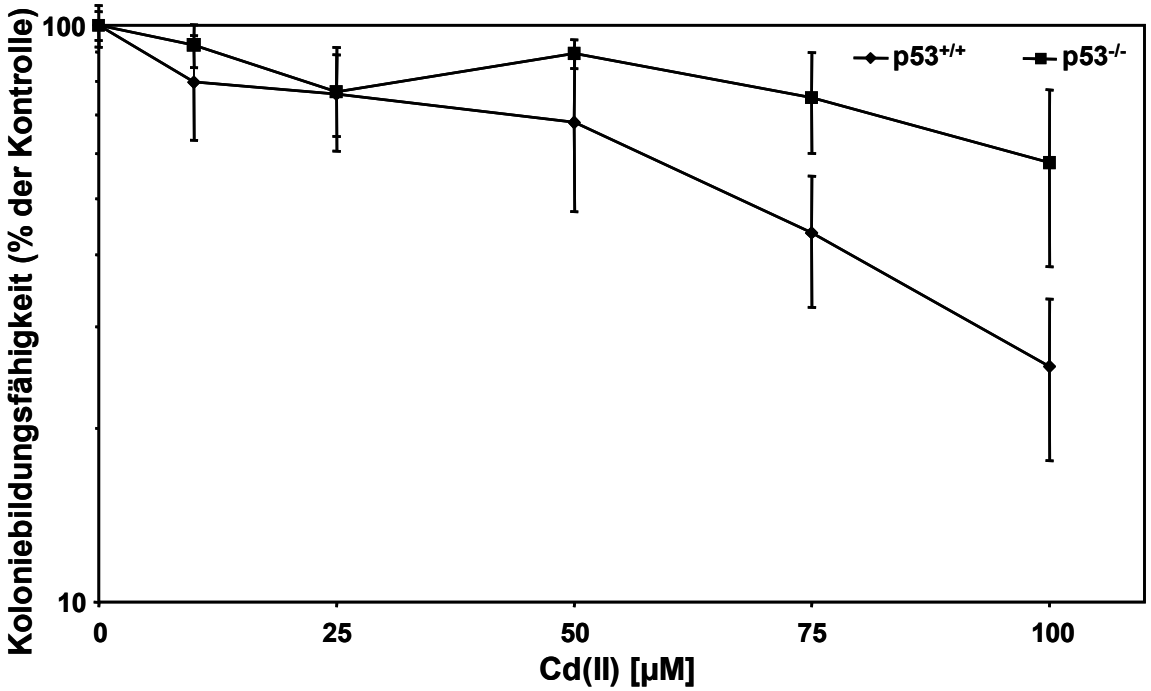

Abbildung 18: Koloniebildungsfähigkeit von HCT116 Zellen nach 24 h Inkubation mit $CdCl_2$. Dargestellt sind Mittelwerte aus 9 Bestimmungen ± SD. $p53^{+/+}$: p53-profiziente Zellen, $p53^{-/-}$: p53-defiziente Zellen.

Sowohl A549 wildtyp als auch HCT116 $p53^{+/+}$ Zellen zeigen im Vergleich zu den p53-defizienten Zellen eine Beeinträchtigung der Koloniebildungsfähigkeit nach 24 h Inkubation mit Cadmiumchlorid insbesondere bei höheren Konzentrationen. Eine mögliche Ursache für die beobachtete verstärkte Resistenz der A549 p53-pRNA und der HCT116 $p53^{-/-}$ Zellen gegen Cd(II) könnte in einer Hemmung der p53-abhängigen Apoptose in diesen Zellen liegen.

5.2.2 UVC-Strahlung

Bestrahlung mit UVC führte sowohl in den A549 (Abbildung 19) als auch in den HCT116 Zelllinien (Abbildung 20) zu einem drastischen Rückgang der Koloniebildungsfähigkeit im Dosisbereich von 5 bis 20 J/m^2. Der p53-Status der Zelllinien hatte keine wesentliche Auswirkung auf die Koloniebildungsfähigkeit. Sie lag bei 5 J/m^2 für die Zelllinien im Bereich von 83-105 % und verringerte sich bei 10 J/m^2 auf Werte zwischen 32-56 % der Kontrolle. Bei der höchsten Dosis von 20 J/m^2 lag die Koloniebildungsfähigkeit in allen Fällen deutlich unter 10 %.

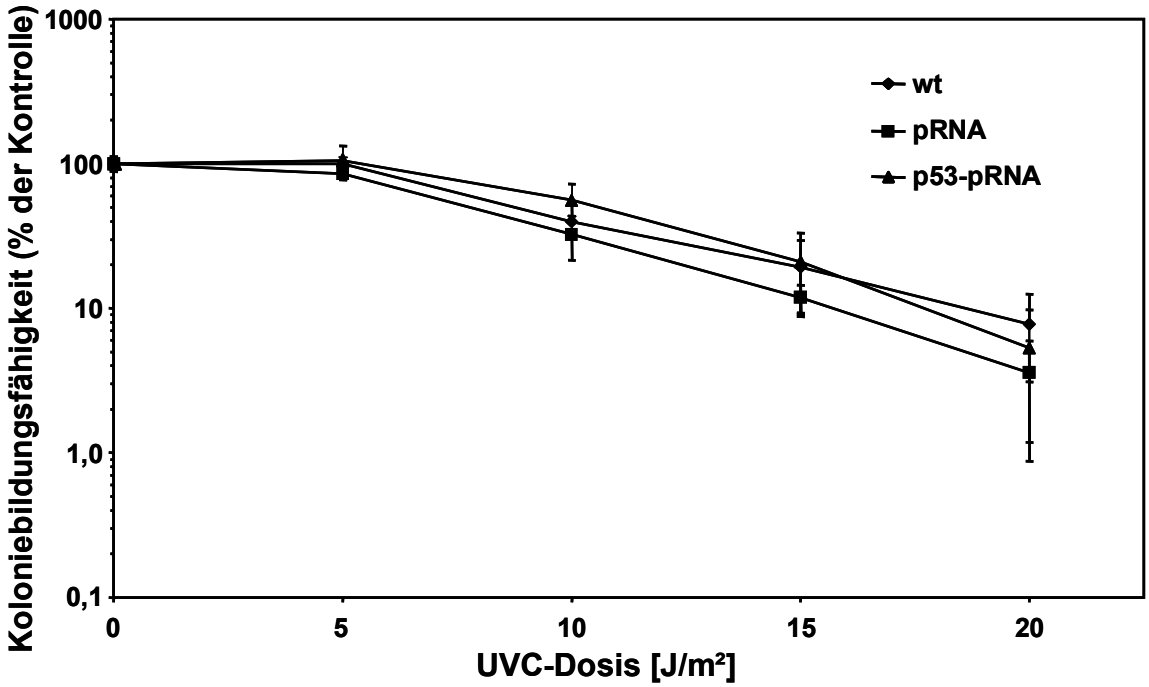

Abbildung 19: Koloniebildungsfähigkeit von A549 Zellen nach UVC-Bestrahlung. Dargestellt sind Mittelwerte aus 6 Bestimmungen ± SD. wt: Wildtypzellen, pRNA: mit leerem Plasmid transfizierte Zellen, p53-pRNA: mit p53-siRNA-Plasmid transfizierte Zellen.

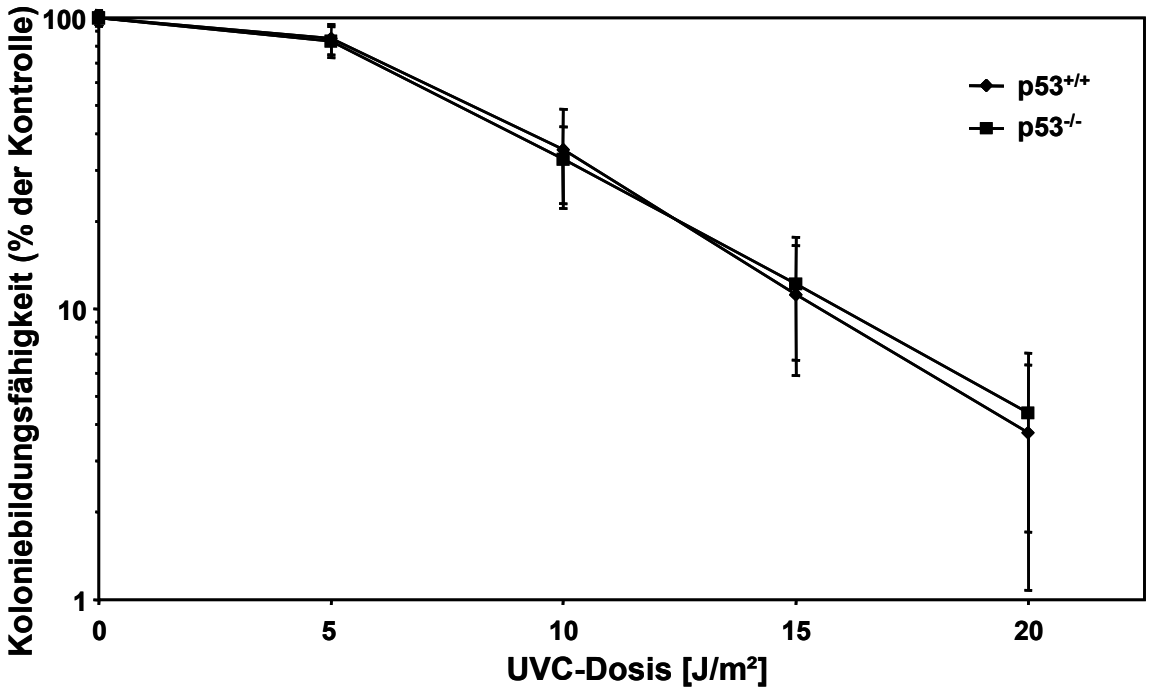

Abbildung 20: Koloniebildungsfähigkeit von HCT116 Zellen nach UVC-Bestrahlung. Dargestellt sind Mittelwerte aus 9 Bestimmungen ± SD. $p53^{+/+}$: p53-profiziente Zellen, $p53^{-/-}$: p53-defiziente Zellen.

Der Einfluss von p53 auf die Überlebensfähigkeit kultivierter Zellen nach UVC-Bestrahlung wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während Wani et al.(1999) von einer gesteigerten Sensitivität menschlicher, p53-defizienter Fibroblasten gegenüber einer Bestrahlung mit UVC berichten, stellen Ford und Hanawalt (1995) eine erhöhte Resistenz p53-defizienter Fibroblasten im Vergleich zu p53-profizienten Zellen nach UVC-Bestrahlung fest. In einer weiteren Arbeit wird wiederum von einer erhöhten Empfindlichkeit von Fibroblasten mit vermindertem p53-Gehalt nach UVC-Bestrahlung berichtet (Ford et al., 1998).

5.2.3 Benzo[*a*]pyrendiolepoxid

Die Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit erfolgte nach einstündiger Inkubation mit dem reaktiven Benzo[*a*]pyren-Metaboliten (+)-*anti*-Benzo[*a*]pyrendiolepoxid (BPDE) im Konzentrationsbereich von 0-200 nM. Ein Einfluss auf die Zellzahl war im mikroskopischen Bild am Ende der Inkubation nicht feststellbar. Bis zu einer Konzentration von 50 nM lag die Koloniebildungsfähigkeit der A549 Zelllinien im Bereich von 75-104 % (Abbildung 21). Bei 200 nM BPDE wurde deutlich, dass die p53-pRNA Zellen etwas weniger empfindlich hinsichtlich der Verringerung der Koloniebildungsfähigkeit waren. Bei den beiden HCT116 Zelllinien verringerte sich die Koloniebildungsfähigkeit bis 50 nM BPDE nur auf ca. 90 %, um dann bei 200 nM für die p53-profizienten Zellen auf ca. 13% und für die p53-defizienten Zellen auf ca. 34 % zurückzugehen (Abbildung 22).

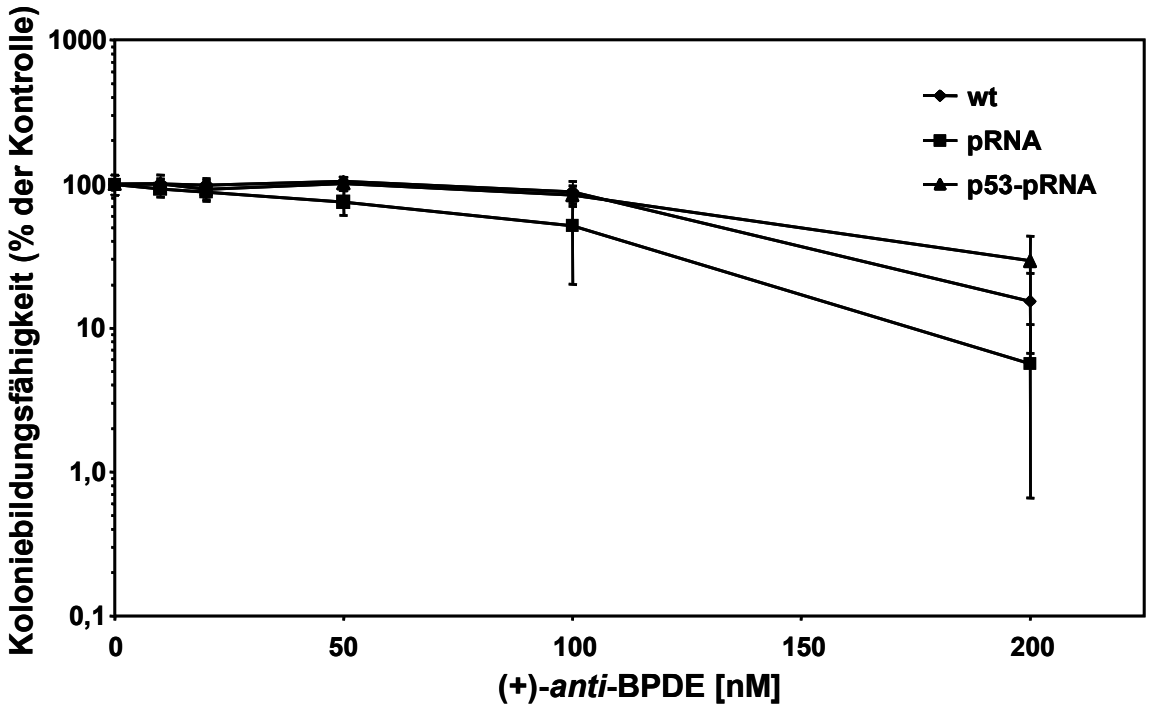

Abbildung 21: Koloniebildungsfähigkeit von A549 Zellen nach 1 h Inkubation mit (+)-*anti*-BPDE. 100 % beziehen sich auf die Kontrolle mit 0,1 % Lösungsmittel (THF/0,5 % Triethylamin). Die Lösungsmittelkontrolle selbst resultierte in einer Koloniebildungsfähigkeit von > 95 %. Dargestellt sind Mittelwerte aus 9 Bestimmungen ± SD. wt: Wildtypzellen, pRNA: mit leerem Plasmid transfizierte Zellen, p53-pRNA: mit p53-siRNA-Plasmid transfizierte Zellen.

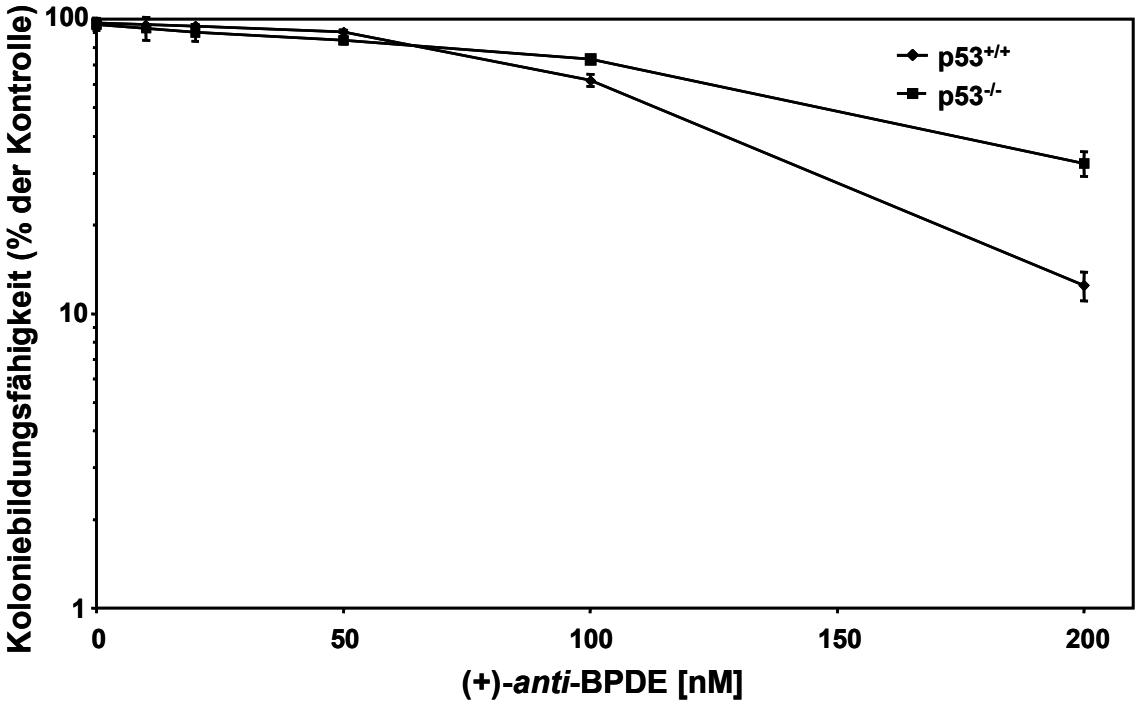

Abbildung 22: Koloniebildungsfähigkeit von HCT116 Zellen nach 1 h Inkubation mit (+)-*anti*-BPDE. 100 % beziehen sich auf die Kontrolle mit 0,1 % Lösungsmittel (THF/0,5 % Triethylamin). Die Lösungsmittelkontrolle selbst resultierte in einer Koloniebildungsfähigkeit von > 95 %. Dargestellt sind Mittelwerte aus 6 Bestimmungen ± SD. $p53^{+/+}$: p53-profiziente Zellen, $p53^{-/-}$: p53-defiziente Zellen.

Die bei höheren BPDE-Konzentrationen insbesondere bei den HCT116 Zellen beobachtete verringerte Sensitivität der p53-defizienten Zellen gegenüber BPDE beruht möglicherweise auf einer Hemmung p53-abhängiger apoptotischer Prozesse. Kho et al. (2004) berichten zum Beispiel von verringerter Apoptose nach Behandlung mit 5-Fluorouracil in HCT116 $p53^{-/-}$ Zellen im Vergleich zu p53-profizienten Kontrollen. Von einer verringerten Koloniebildungsfähigkeit in p53-defizienten menschlichen Fibroblasten im Vergleich zu Wildtyp-Fibroblasten nach Inkubation mit (±)-*anti*-BPDE berichten Wani et al. (2000). Sie konnten in p53-defizienten Fibroblasten einen erhöhten Apoptose-Index nach Inkubation mit 1,2 µM (±)-*anti*-BPDE feststellen. Allerdings sind apoptotische Prozesse auch abhängig vom Zelltyp und menschliche Fibroblasten sind bekannt für eine gewisse Apoptoseresistenz (Wani et al., 2000).

5.3 Zellzyklusuntersuchungen

Die Bestimmung der Zellzyklusverteilung erfolgte am Durchflusszytometer. Dazu wurden die Zellen fixiert und die DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4´,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. DAPI bindet bevorzugt in AT-reichen Regionen an die kleine Furche der DNA, wodurch sich seine Fluoreszenzaktivität etwa 20-fach verstärkt (Kubista et al., 1987; Karlsson et al., 2003). Die durch Fluoreszenzmessung auf Einzelzellebene erhaltenen Daten wurden mittels FlowMax-Software ausgewertet.

5.3.1 Einfluss von Cadmiumchlorid auf die Zellzykluskontrolle nach UVC-Bestrahlung

In A549 Zellen wurden die Auswirkungen einer Inkubation mit Cadmiumchlorid auf die Zellzykluskontrolle nach UVC-Bestrahlung und die Rolle von p53 untersucht. Dazu wurden die Zellen nach 24 h Inkubation mit Cd(II) mit 5 J/m^2 UVC bestrahlt und anschließend 9 h nachinkubiert. Aus Vorversuchen in der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass eine UVC-Bestrahlung zu einem S-Phasen Arrest führt, dessen Maximum nach etwa 9 h erreicht wird.

In A549 Wildtypzellen führte die Inkubation mit Cd(II) zu einem geringfügigen Anstieg der Zellen in der G1-Phase und einem entsprechenden Rückgang in der S-Phase (Abbildung 23). Der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase blieb unverändert. UVC-Bestrahlung führte nach 9 h zu einem deutlichen S-Phasen Arrest, der sich in den mit Cd(II) vorbehandelten Zellen konzentrationsabhängig verringerte. Der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase blieb nahezu konstant. Ein qualitativ vergleichbares Bild ergab sich sowohl bei A549 pRNA Zellen (Abbildung 24) als auch bei der Untersuchung von A549 p53-pRNA Zellen (Abbildung 25). Der veränderte p53-Status führte somit weder zu einer Beeinflussung der Zellzyklusverteilung nach Cd(II)-Inkubation noch änderten sich die Auswirkungen einer Kombinationsbehandlung aus Cd(II)-Inkubation und UVC-Bestrahlung. Zudem blieb der S-Phasen Arrest nach UVC-Bestrahlung unabhängig vom p53-Status bestehen. Dies deutet darauf hin, dass die teilweise Aufhebung des S-Arrests duch Cd(II) nicht durch eine Wechselwirkung des Metalls mit p53 verursacht wird.

Bislang sind nur wenige Arbeiten zum Einfluss von Cd(II) auf den Zellzyklus veröffentlicht. Die Inkubation von MCF7 Zellen mit bis zu 30 µM $CdCl_2$ für 4 h hatte keine Auswirkung auf die Zellzyklusverteilung (Meplan et al., 1999). Allerdings ist der Zeitraum von 4 h sehr kurz gewählt und lässt daher kaum Effekte erwarten. Eine weitere Arbeit beschreibt einen S-Phasen Arrest in MCF7 Zellen nach 12 h Inkubation mit $CdCl_2$ (Lee et al., 2005). Yang et al. (2004) berichten von einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Zellen in der G2/M-Phase nach 24 h Inkubation mit 1 µM $CdCl_2$ in CHO Zellen. Ein spezifischer Einfluss von Cd(II) auf die Zellzyklusverteilung ist somit nicht erkennbar und lässt vermuten, dass die Auswirkungen eher Zelltyp-abhängig sind.

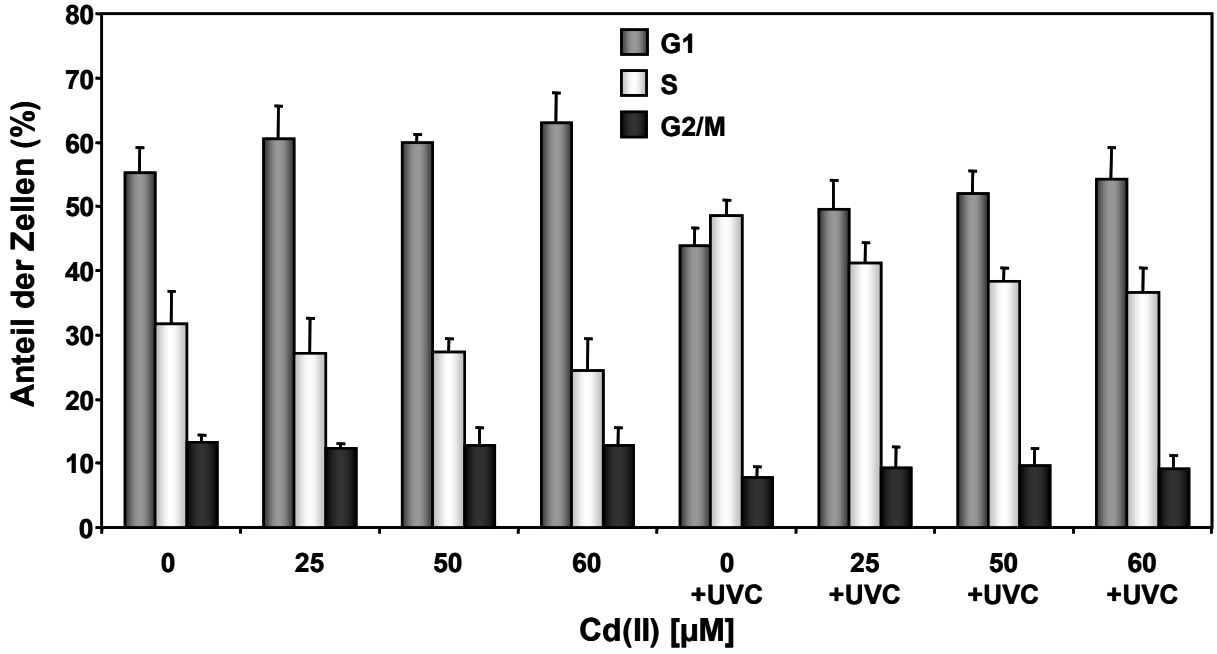

Abbildung 23: Zellzyklusverteilung von A549 Wildtypzellen nach Inkubation mit $CdCl_2$ und UVC-Bestrahlung. Die Zellen wurden 24 h mit Cd(II) vorinkubiert, mit 5 J/m^2 UVC bestrahlt und 9 h nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD.

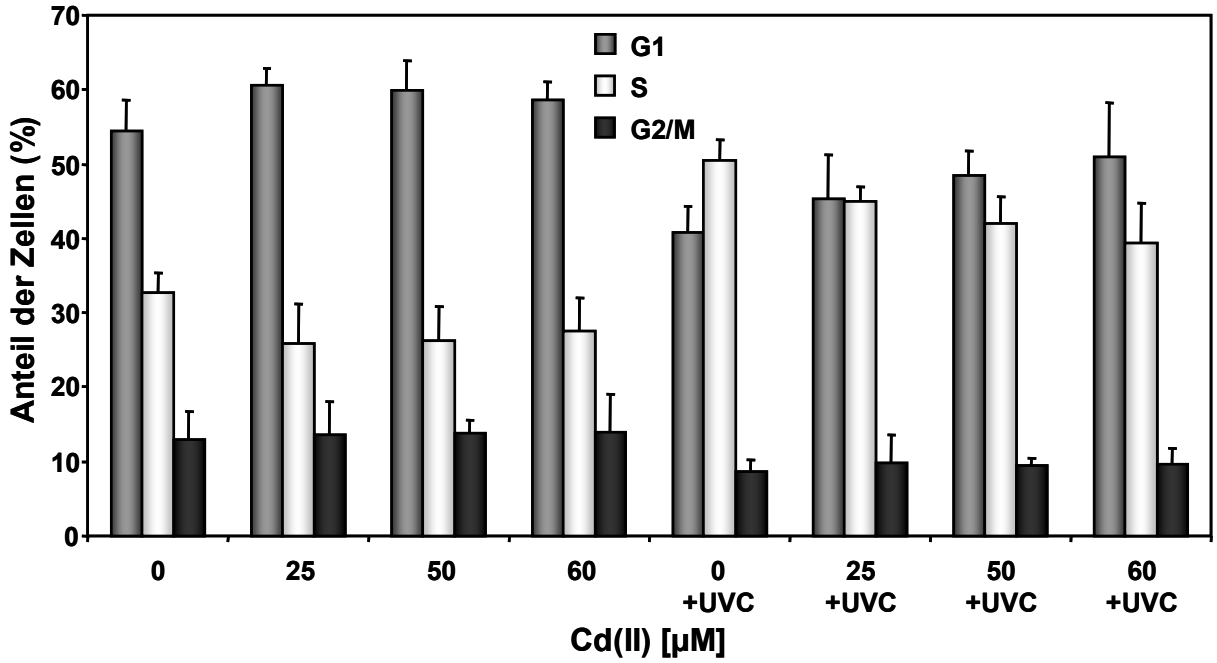

Abbildung 24: Zellzyklusverteilung von A549 pRNA Zellen nach Inkubation mit $CdCl_2$ und UVC-Bestrahlung. Die Zellen wurden 24 h mit Cd(II) vorinkubiert, mit 5 J/m^2 UVC bestrahlt und 9 h nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD.

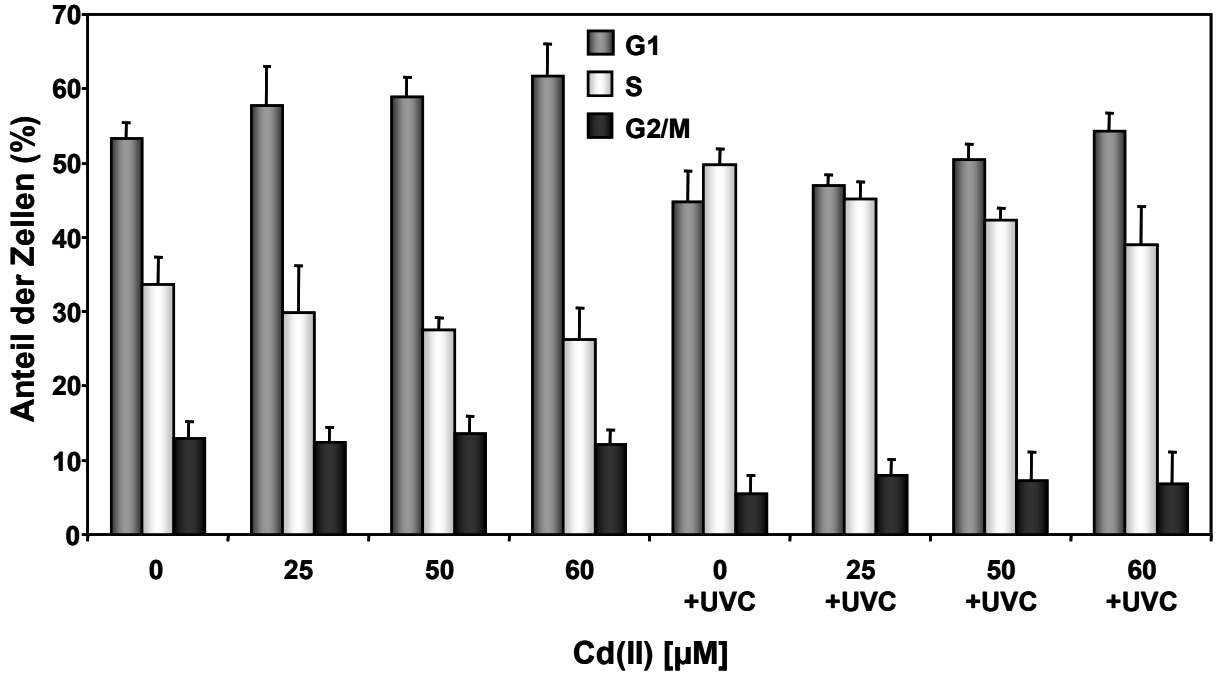

Abbildung 25: Zellzyklusverteilung von A549 p53-pRNA Zellen nach Inkubation mit $CdCl_2$ und UVC-Bestrahlung. Die Zellen wurden 24 h mit Cd(II) vorinkubiert, mit 5 J/m^2 UVC bestrahlt und 9 h nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD.

Zur Überprüfung der mit den *knock-down* Zellen erhaltenen Ergebnisse wurden Untersuchungen mit den HCT116 Zelllinien durchgeführt. Unbehandelte p53-profiziente HCT116 Zellen unterschieden sich in ihrer Zellzyklusverteilung kaum von p53-defizienten HCT116 Zellen (Abbildung 26). Nach Bestrahlung mit 5 J/m^2 UVC und 9 h Nachinkubationszeit zeigten beide Zelllinien einen gleich stark ausgeprägten S-Phasen Arrest. Somit konnte in Übereinstimmung mit der Literatur keine Beteiligung von p53 am S-Phasen Arrest festgestellt werden (Iliakis et al., 2003).

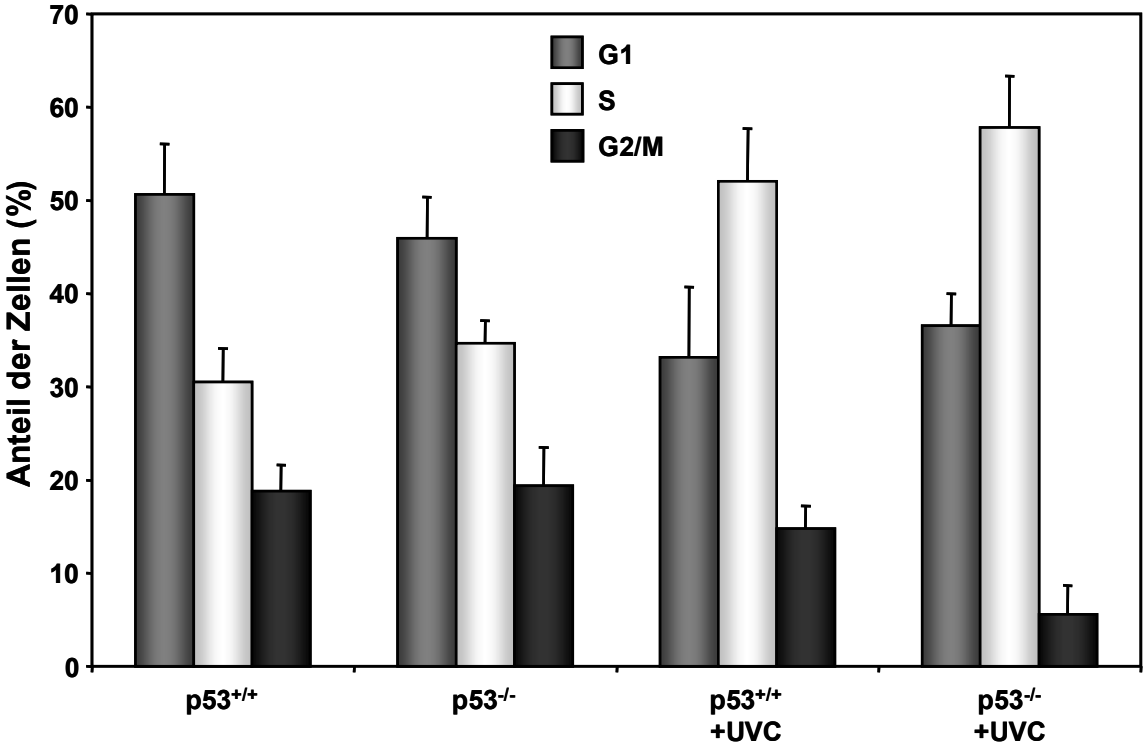

Abbildung 26: Zellzyklusverteilung von HCT116 Zellen nach UVC-Bestrahlung. Die Zellen wurden mit 5 J/m^2 UVC bestrahlt und 9 h nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. p53$^{+/+}$: p53-profiziente Zellen, p53$^{-/-}$: p53-defiziente Zellen.

In Folge einer UVC-Bestrahlung kommt es zur Hemmung der DNA-Replikation. Die DNA-Replikation startet in eukaryotischen Zellen an vielen Replikationsursprüngen sowohl zu Beginn als auch gegen Ende der S-Phase. UV-induzierte DNA-Schäden behindern das Vorankommen der Replikationsgabeln durch Blockierung der replikativen Polymerasen. Dadurch wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zur Hemmung der Replikon-Initiation führt. Daran beteiligt sind unter anderem der so genannte 9-1-1-Komplex sowie ATR und Chk1. Die Aktivierung des S-Phasen-

Kontrollpunktes führt neben der Hemmung der Replikon-Initiation auch zur Stabilisierung blockierter Replikationsgabeln. DNA-Reparaturprozesse und die TLS (*translesion synthesis*) können dann zur Aufhebung des S-Phasen Arrests beitragen (Heffernan et al., 2002; Lambert und Carr, 2005). Bei der TLS werden die blockierten replikativen Polymerasen durch TLS-Polymerasen, die in der Lage sind, replikationshemmende DNA-Läsionen zu überwinden, ersetzt. So wird zum Beispiel durch die Polymerase η eine im Fall von Thymin-Dimeren fehlerfreie Replikation ermöglicht (Kannouche und Stary, 2003).

5.3.2 Einfluss von Actinomycin D auf die Zellzyklusverteilung

Actinomycin D (ActD) ist ein Polypeptid-Antibiotikum, das auf Grund seiner zytotoxischen Eigenschaften in der Tumortherapie eingesetzt wird. Es interkaliert in die DNA und führt zur Hemmung der Transkription. Durch Wechselwirkungen mit DNA-Topoisomerase I und II kann Actinomycin D zur Bildung von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen beitragen. Topoisomerasen spielen eine wichtige Rolle bei der Transkription und Replikation der DNA, indem sie zur Überwindung topologischer Probleme die kontrollierte Einführung und Rückbildung von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen ermöglichen (Wassermann et al., 1990; Li und Liu, 2001).
A549 Zellen wurden 21 h mit 5 nM ActD behandelt und auf ihre Zellzyklusverteilung untersucht (Abbildung 27). Die Inkubationsbedingungen wurden der Literatur entnommen (Khan und Anderson, 2001) und in Vorversuchen getestet. In der Literatur wird für A549 Zellen nach Inkubation mit 5 nM ActD ein starker G1-Arrest und ein leichter G2/M-Arrest beschrieben (Khan und Anderson, 2001). In den eigenen Untersuchungen zeigten A549 wt und pRNA Zellen einen ausgeprägten G1- und G2/M- Arrest sowie einen starken Rückgang von Zellen in der S-Phase auf unter ein Prozent. Im Gegensatz dazu konnte in A549 p53-pRNA Zellen kein G2/M-Arrest beobachtet werden. Zusätzlich war der G1-Phasen Arrest in den p53 *knock-down* Zellen verringert. Dies lässt sich am Anteil von etwa 15 % Zellen in der S-Phase deutlich erkennen.

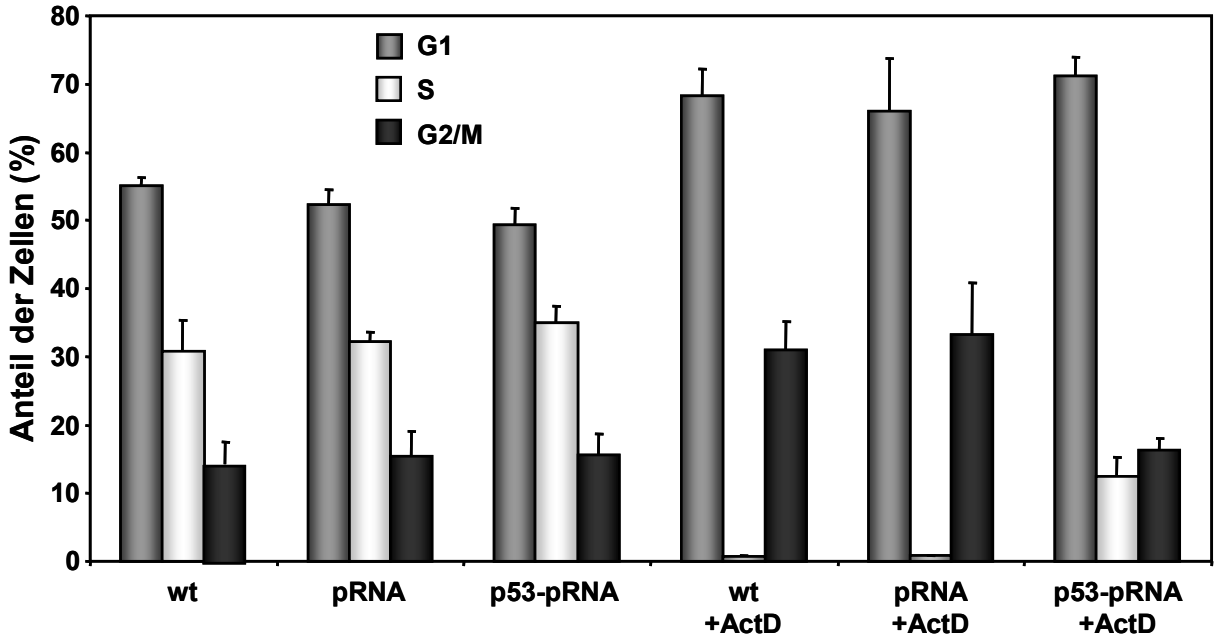

Abbildung 27: Zellzyklusverteilung von A549 Zellen nach Behandlung mit Actinomycin D. Die Zellen wurden 21 h mit 5 nM ActD inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. wt: Wildtypzellen, pRNA: mit leerem Plasmid transfizierte Zellen, p53-pRNA: mit p53-siRNA-Plasmid transfizierte Zellen.

In HCT116 $p53^{+/+}$ Zellen führte die Behandlung mit ActD ebenfalls zu einem ausgeprägten Arrest in den G1- und G2/M-Phasen des Zellzyklus, wobei hier der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase deutlich überwog (Abbildung 28). Zudem war auch hier wieder ein drastischer Rückgang der Zellen in der S-Phase festzustellen. In $p53^{-/-}$ Zellen war hingegen der Anteil der Zellen in der S-Phase im Vergleich zu unbehandelten Zellen praktisch unverändert. Ein G1-Arrest konnte nicht festgestellt werden. Der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase war hingegen erhöht.

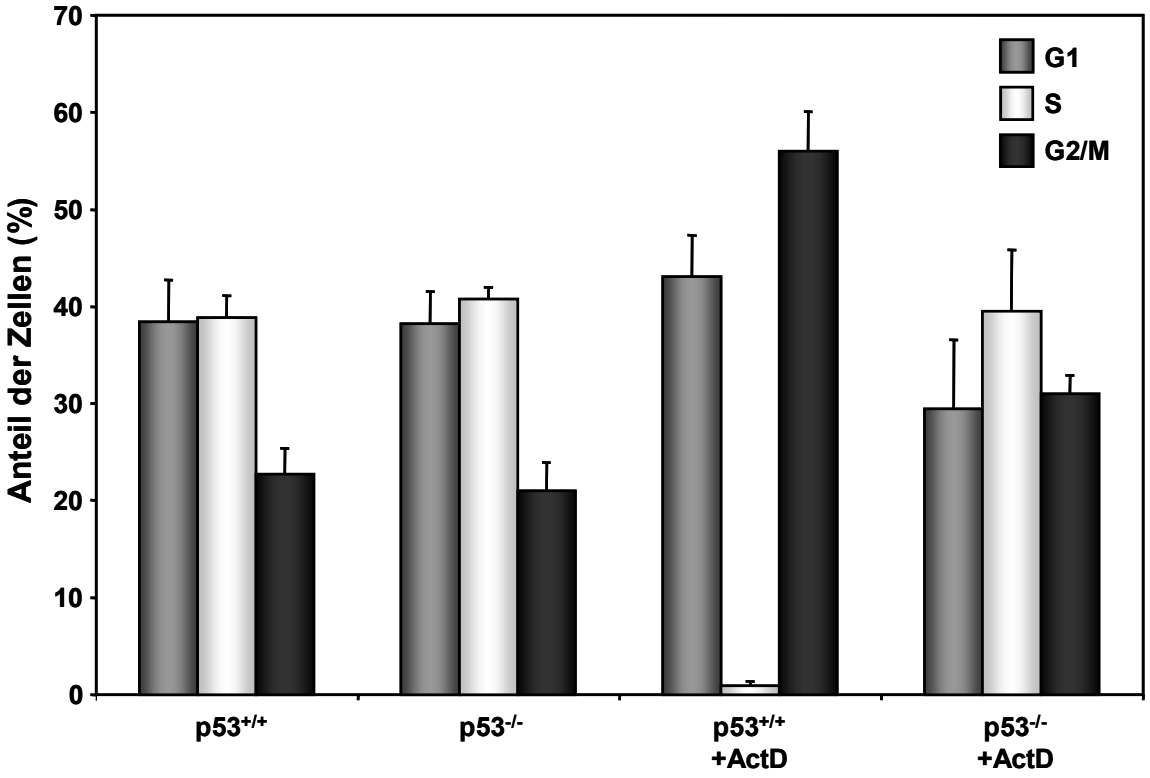

Abbildung 28: Zellzyklusverteilung von HCT116 Zellen nach Behandlung mit Actinomycin D. Die Zellen wurden 21 h mit 5 nM ActD inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. $p53^{+/+}$: p53-profiziente Zellen, $p53^{-/-}$: p53-defiziente Zellen.

Die beobachtete Beeinflussung des G1- und G2/M-Arrests in den p53-defizienten Zellen lässt sich möglicherweise auf die Rolle von p53 in der Zellzykluskontrolle zurückführen. Als Transkriptionsfaktor ist p53 unter anderem an der Regulation von p21, 14-3-3σ und GADD45 beteiligt. Während p21 sowohl beim G1/S- als auch beim G2/M-Übergang involviert ist, werden 14-3-3σ und GADD45 vor allem mit dem G2/M-Arrest in Verbindung gebracht (Stewart und Pietenpol, 2001). In HCT116 Zellen identifizierten Waldman et al. (1995) p21 als den zentralen Faktor im p53-abhängigen G1-Arrest. Ebenfalls in HCT116 Zellen konnte die Abhängigkeit von p53 und p21 für die Aufrechterhaltung des G2-Arrests nach DNA-Schädigung festgestellt werden (Bunz et al., 1998).

5.3.3 Einfluss von Benzo[*a*]pyrendiolepoxid auf den Zellzyklus

Als weiteres schädigendes Agens wurde (+)-*anti*-Benzo[*a*]pyrendiolepoxid (BPDE) eingesetzt, um den Einfluss auf den Zellzyklus zu untersuchen. Aus Vorversuchen in der Arbeitsgruppe war bekannt, dass maximale Effekte auf den Zellzyklus in A549 Zellen nach 8 h Nachinkubationszeit festzustellen sind. In A549 Wildtypzellen (Abbildung 29) trat nach Inkubation mit 10-200 nM BPDE ein konzentrationsabhängiger S-Phasen Arrest auf, der sich im qualitativ gleichen Bild auch in den A549 pRNA und p53-pRNA Zellen darstellte (Abbildung 30 und Abbildung 31). Diese Untersuchungen wurden auch in den HCT116 Zelllinien durchgeführt. Dabei zeigte sich ebenfalls ein ausgeprägter konzentrationsabhängiger S-Phasen Arrest, der wiederum unabhängig vom p53-Status war (Abbildung 32 und Abbildung 33).

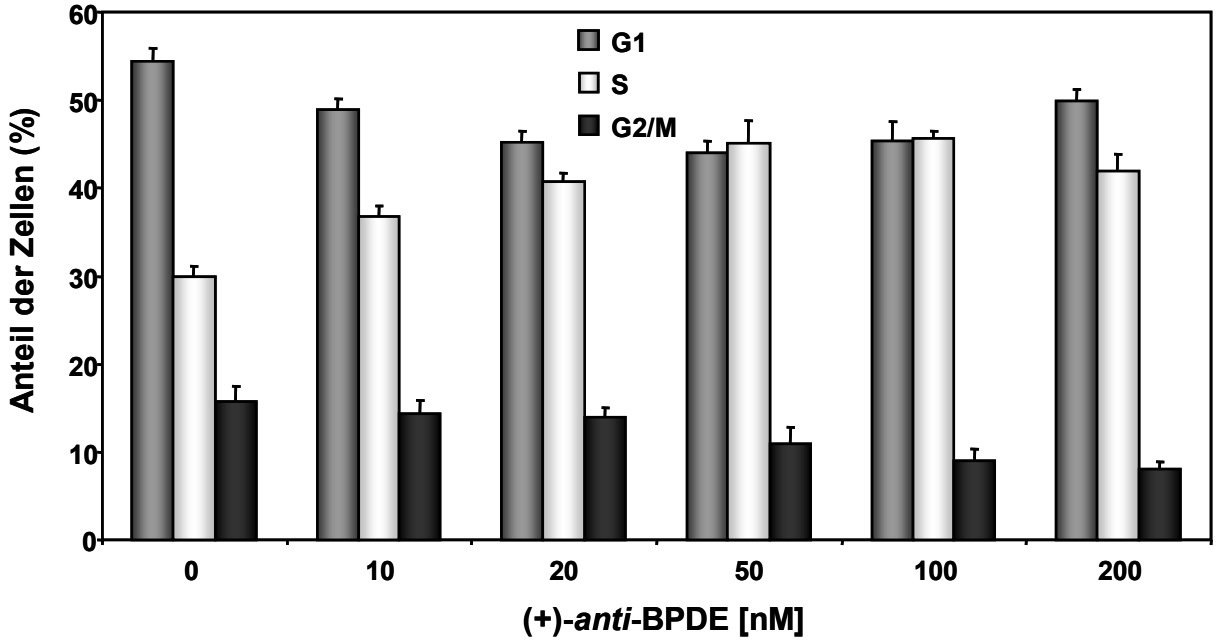

Abbildung 29: Zellzyklusverteilung von A549 Wildtypzellen nach Inkubation mit BPDE. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE behandelt und 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD.

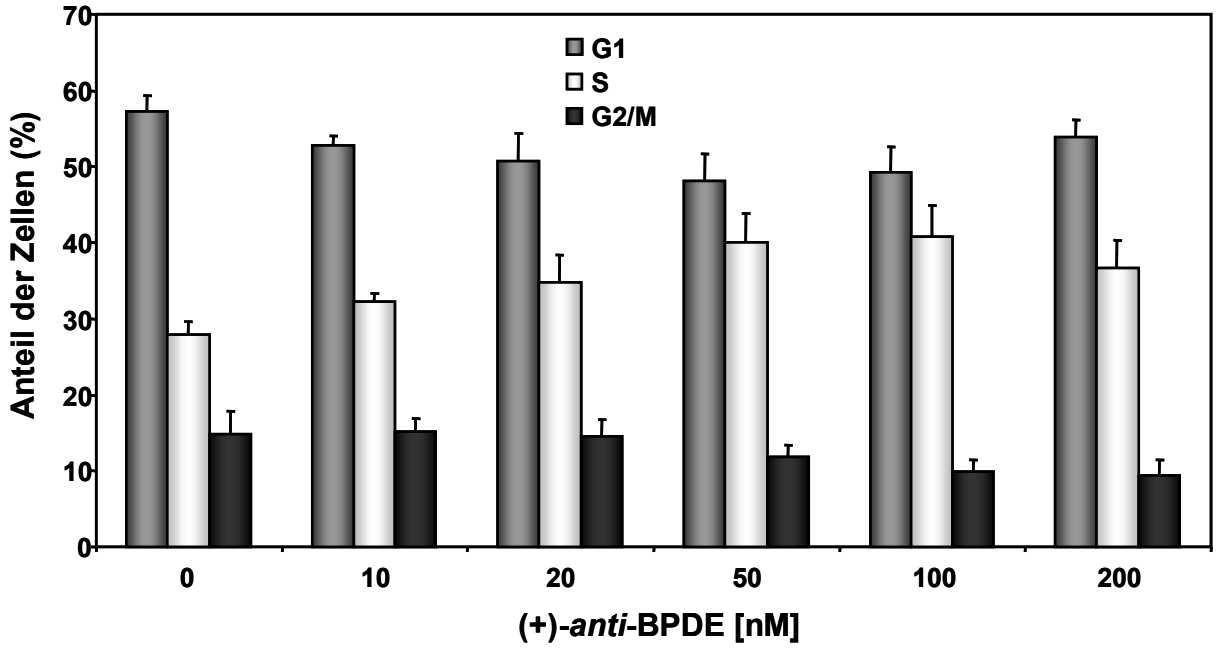

Abbildung 30: Zellzyklusverteilung von A549 pRNA Zellen nach Inkubation mit BPDE. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE behandelt und 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD.

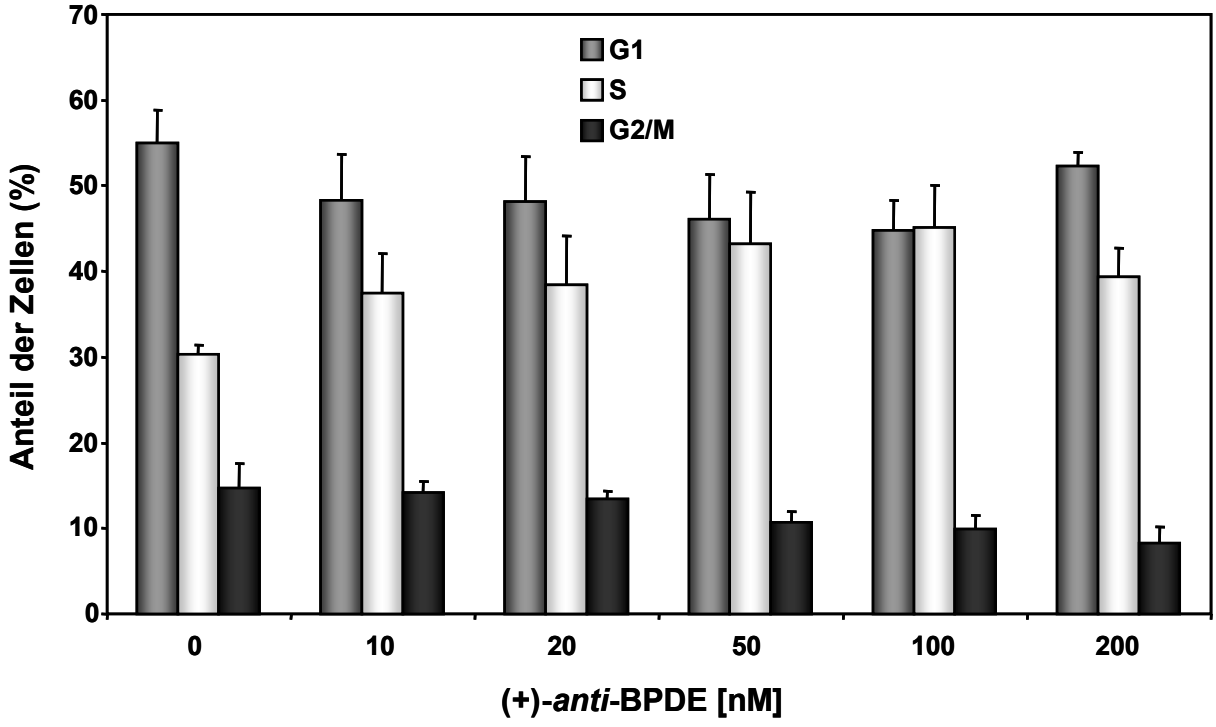

Abbildung 31: Zellzyklusverteilung von A549 p53-pRNA Zellen nach Inkubation mit BPDE. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE behandelt und 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD.

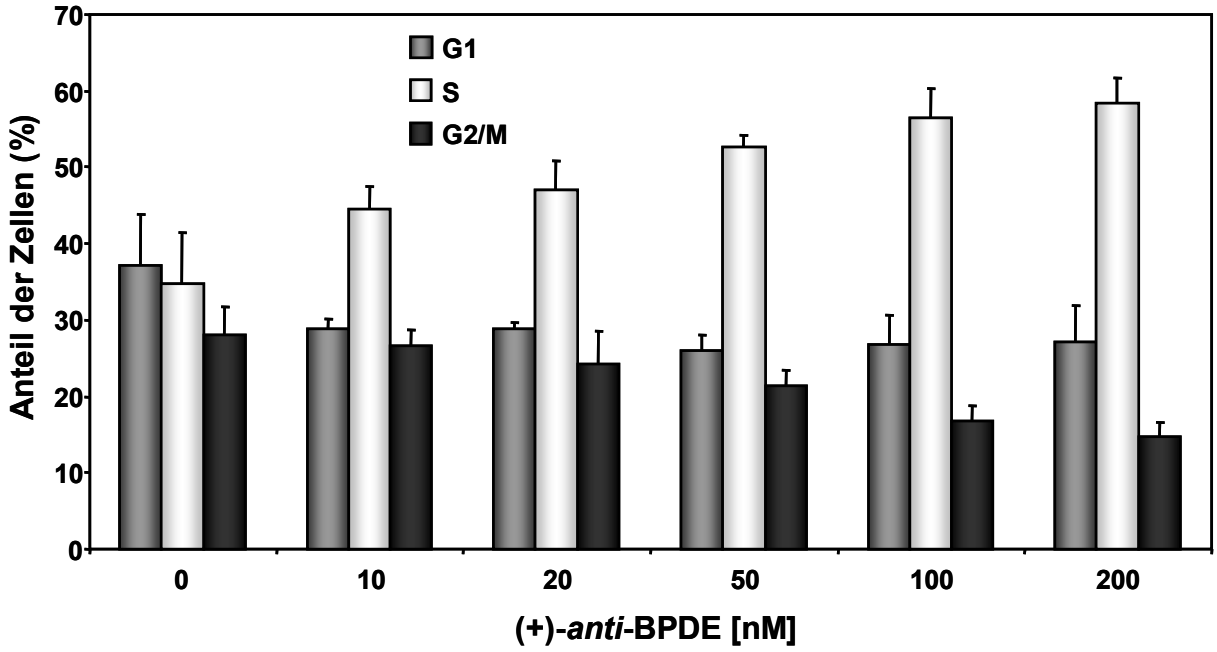

Abbildung 32: Zellzyklusverteilung von HCT116 p53$^{+/+}$ Zellen nach Inkubation mit BPDE. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE behandelt und 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD.

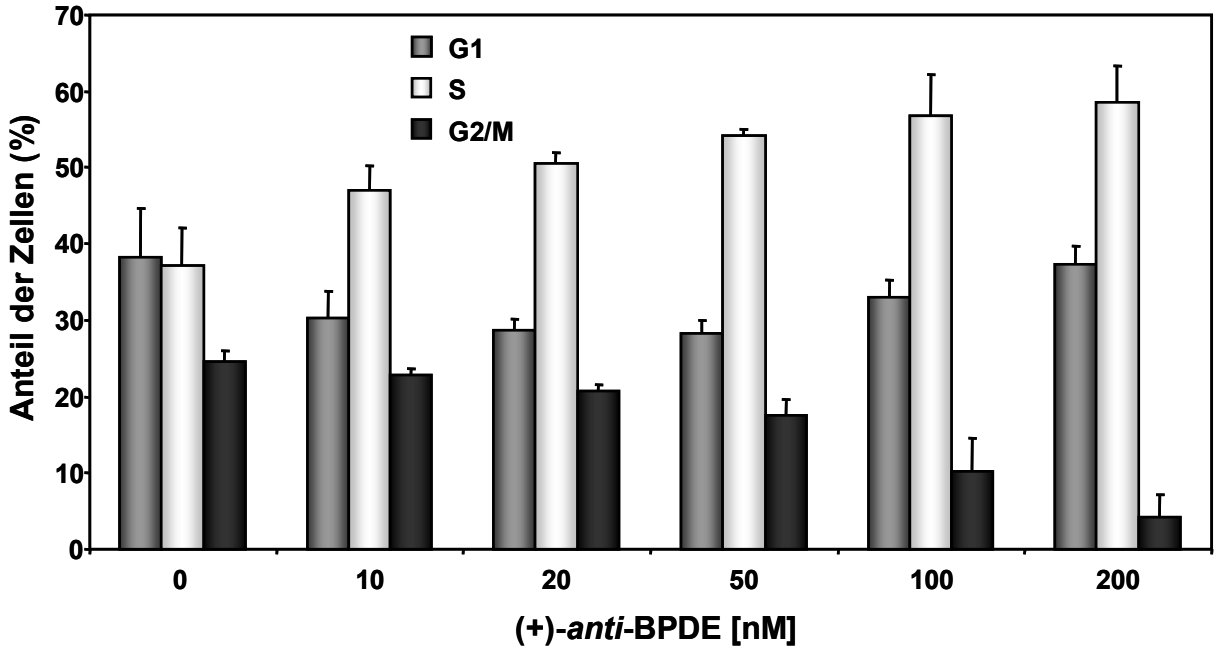

Abbildung 33: Zellzyklusverteilung von HCT116 p53$^{-/-}$ Zellen nach Inkubation mit BPDE. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE behandelt und 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD.

Das Auftreten eines S-Phasen Arrests nach Behandlung mit BPDE ist aus der Literatur bekannt. Sowohl in MCF7 als auch in A549 Zellen wurde 21 h nach BPDE-Inkubation eine deutliche Zunahme von Zellen in der S-Phase beschrieben (Khan und Dipple, 2000; Khan und Anderson, 2001). Im Gegensatz zur Behandlung mit anderen DNA-schädigenden Agenzien wurde auch in den eigenen Untersuchungen kein G1-Arrest beobachtet. Eine weitere Arbeit mit menschlichen Epithelzellen aus Brustgewebe zeigte 10 h nach Behandlung mit BPDE ebenfalls einen Arrest in der S-Phase sowie in der G2/M-Phase (Wang et al., 2003). Ein G1-Arrest wurde abermals nicht beobachtet. Mechanistische Betrachtungen von Guo et al. (2002) deuten auf eine Beteiligung von ATR und Chk1 am S-Phasen Kontrollpunkt nach BPDE-Inkubation hin, der als p53-unabhängig beschrieben wird. Wie schon beim UVC-induzierten S-Phasen Arrest erläutert, wird auch hier der TLS eine wichtige Rolle bei der Aufhebung des S-Arrests zugeschrieben. Polymerase κ ist in der Lage, die entstandenen Guaninaddukte zu umgehen und ein Cytosin gegenüber der Läsion einzubauen (Bi et al., 2005).

5.4 Untersuchung der Protein- und Genexpression nach BPDE-Inkubation

5.4.1 Einfluss von BPDE auf p53 und XPC auf Proteinebene

Zur Untersuchung der Folgen einer BPDE-Inkubation auf p53 und XPC auf Proteinebene wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden zum einen Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach BPDE-Inkubation und zum anderen die Konzentrationsabhängigkeit nach einer bestimmten Nachinkubationszeit untersucht. In A549 Zellen wurde die zeitabhängige Reaktion auf eine Inkubation mit 50 nM BPDE betrachtet (Abbildung 34). In wt, pRNA und p53-pRNA Zellen konnte eine zeitabhängige Zunahme an p53-Protein festgestellt werden, die ihr Maximum bei einer Nachinkubationszeit von 8 h erreichte und nach 24 h wieder auf das Ausgangsniveau zurückging. In den unbehandelten Proben wurde über den untersuchten Zeitraum keine Veränderung im p53-Proteingehalt detektiert. Die Betrachtung des XPC-Proteins zeigte unabhängig von der BPDE-Behandlung zu keinem Zeitpunkt eine wesentliche Veränderung.

Zusammenfassend ist in Abbildung 35 die Auswertung der p53-Westernblot-Analysen der drei verschiedenen A549 Zelllinien zu den verschiedenen Zeitpunkten nach BPDE-Inkubation dargestellt. Da die Westerblot-Analysen für die drei A549 Zelllinien aus technischen Gründen getrennt voneinander durchgeführt wurden, ist der Bezug auf eine gemeinsame Kontrolle nicht möglich. Daher wurden die Proteingehalte auch in den folgenden Abbildungen auf die jeweilige unbehandete Kontrolle nach 0 h Nachinkubation bezogen. Dabei lässt sich übereinstimmend erkennen, dass nach 8 h Nachinkubation ein Maximum in der p53-Proteinmenge auftrat. Die unbehandelten Kontrollen veränderten sich über den untersuchten Zeitraum nur wenig.

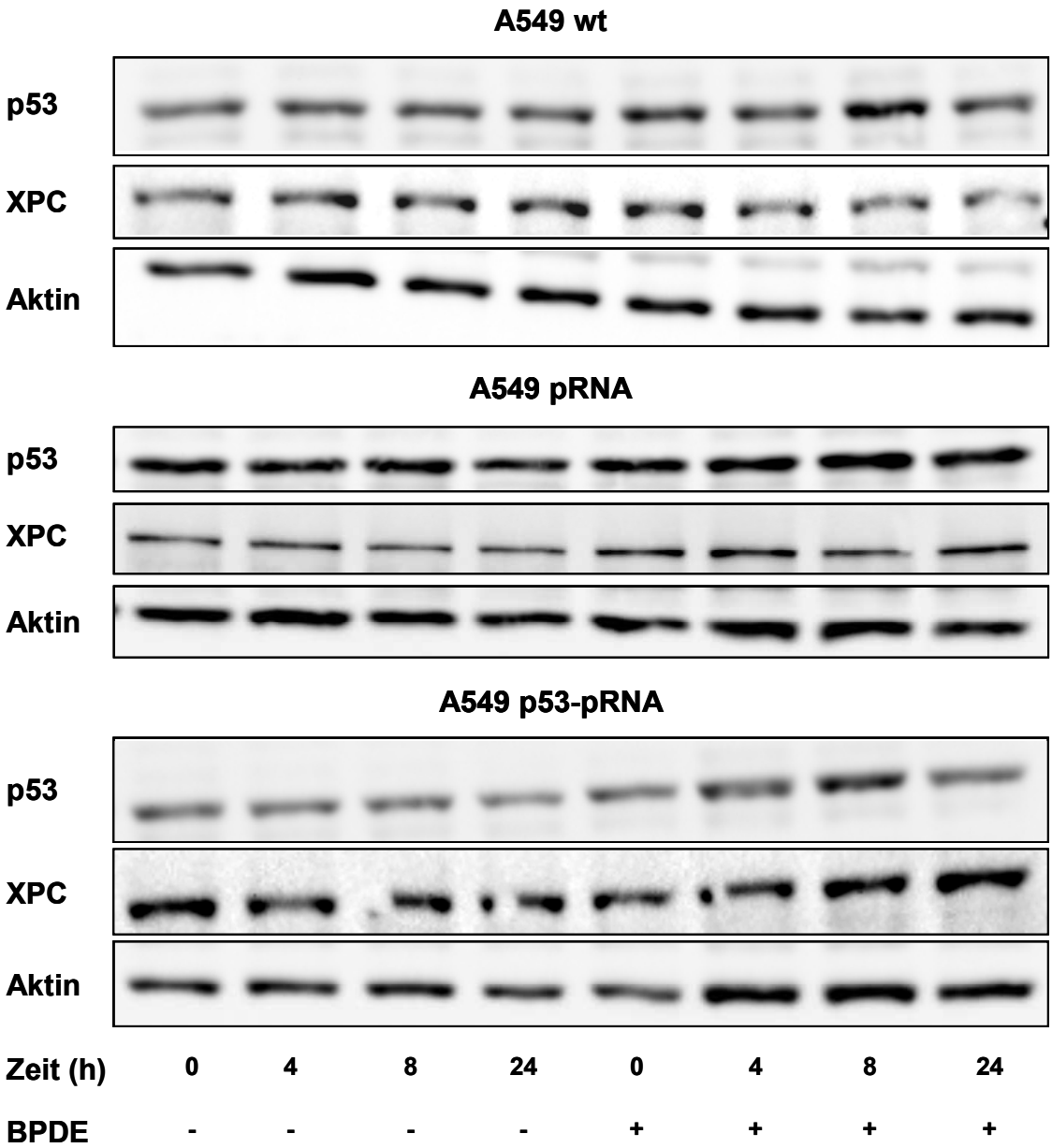

Abbildung 34: Westernblot-Analyse von p53 und XPC in A549 Zellen nach Inkubation mit 50 nM BPDE. Aktin wurde als Ladekontrolle detektiert. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert und 0-24 h nachinkubiert. Dargestellt sind repräsentative Blots von 2 unabhängigen Versuchen. wt: Wildtypzellen, pRNA: mit leerem Plasmid transfizierte Zellen, p53-pRNA: mit p53-siRNA-Plasmid transfizierte Zellen.

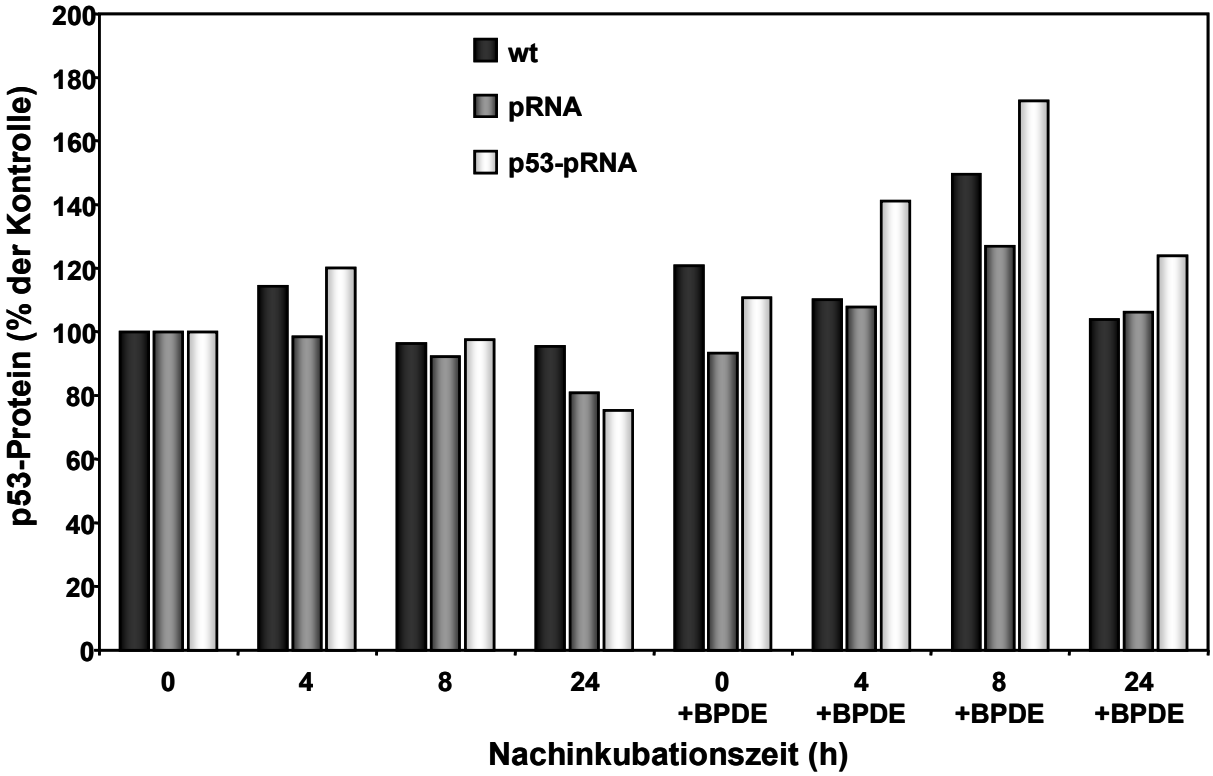

Abbildung 35: p53-Proteingehalt in A549 Zellen nach Inkubation mit 50 nM BPDE. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert und 0-24 h nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen, jeweils bezogen auf die unbehandelte Kontrolle nach 0 h. wt: Wildtypzellen, pRNA: mit leerem Plasmid transfizierte Zellen, p53-pRNA: mit p53-siRNA-Plasmid transfizierte Zellen.

Weiterhin wurde die konzentrationsabhängige Veränderung der p53- und XPC-Proteinmenge betrachtet. Die A549 Zellen wurden mit Konzentrationen von 0-200 nM BPDE behandelt und nach 8 h Nachinkubationszeit mittels Westernblot-Analyse untersucht. Unabhängig vom p53-Status der Zellen führte die Inkubation im unteren Konzentrationsbereich von 0-50 nM BPDE nach 8 h Nachinkubationszeit nur zu einer mäßigen, konzentrationsabhängigen Zunahme im p53-Proteingehalt (Abbildung 36). Erst die Inkubation mit 100 nM und vor allem 200 nM BPDE führte zu einem starken Anstieg der p53-Proteinmenge auf das 4- bis 5,5-Fache der Kontrolle (Abbildung 37). Im gesamten Konzentrationsbereich konnte praktisch keine Veränderung im XPC-Proteingehalt der Zellen festgestellt werden.

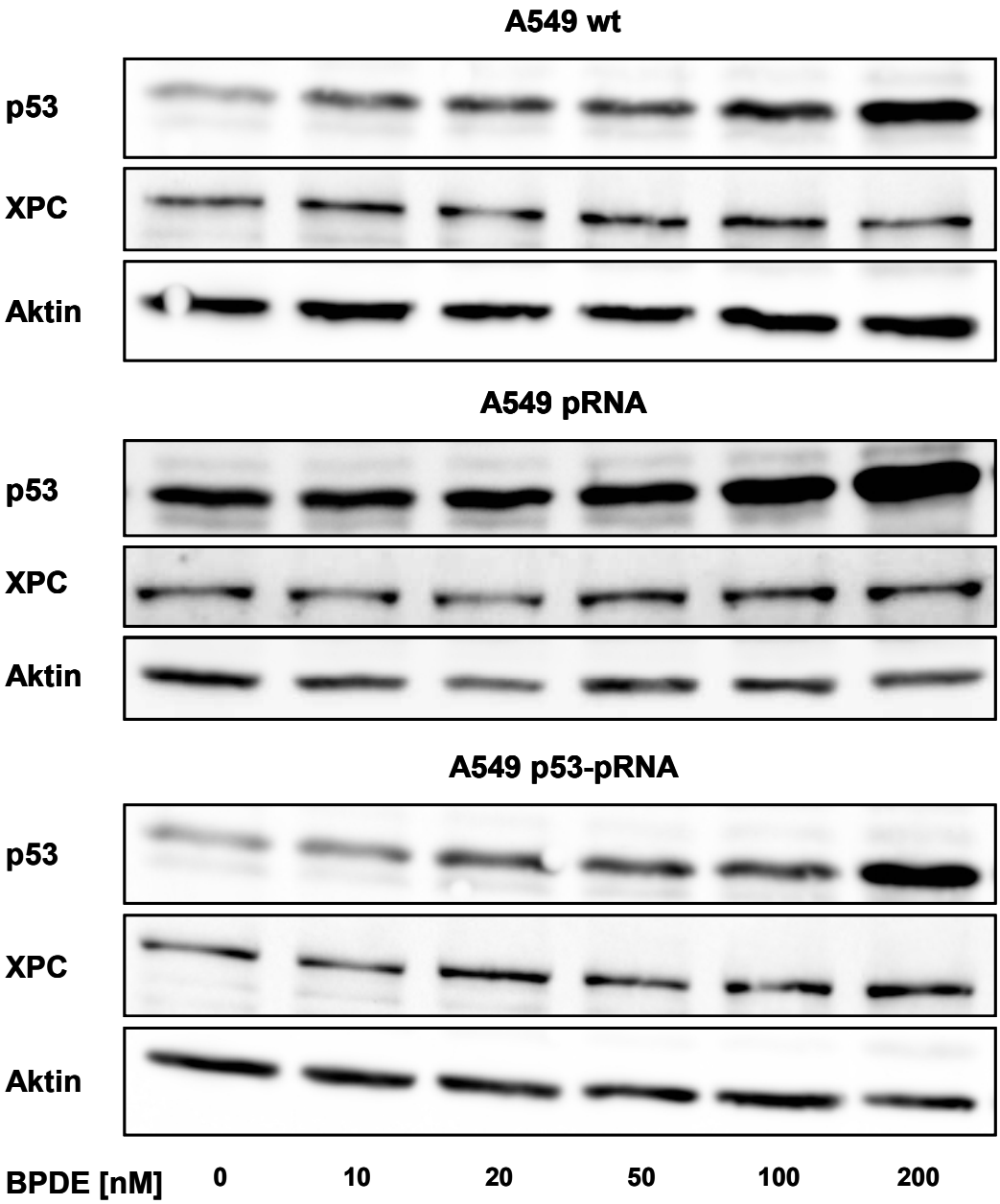

Abbildung 36: Westernblot-Analyse von p53 und XPC in A549 Zellen nach Inkubation mit 0-200 nM BPDE. Aktin wurde als Ladekontrolle detektiert. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert und 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind repräsentative Blots von 2 unabhängigen Versuchen. wt: Wildtypzellen, pRNA: mit leerem Plasmid transfizierte Zellen, p53-pRNA: mit p53-siRNA-Plasmid transfizierte Zellen.

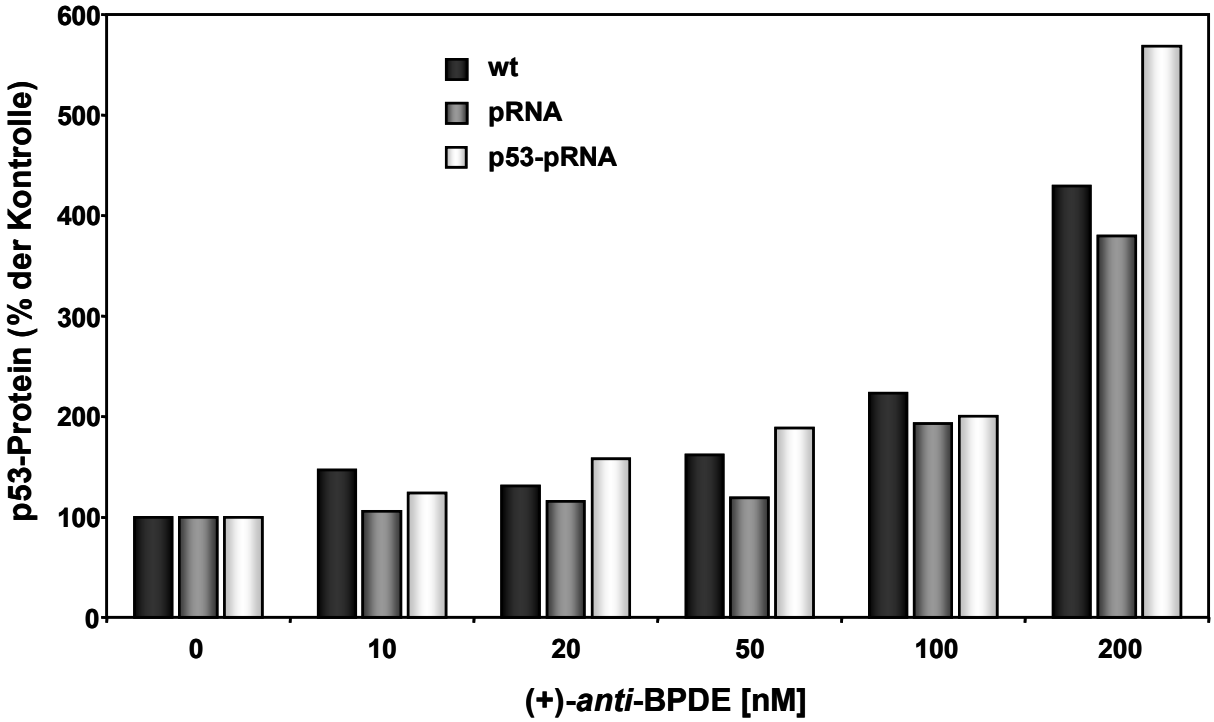

Abbildung 37: p53-Proteingehalt in A549 Zellen nach Inkubation mit 0-200 nM BPDE. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert und 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen, jeweils bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. wt: Wildtypzellen, pRNA: mit leerem Plasmid transfizierte Zellen, p53-pRNA: mit p53-siRNA-Plasmid transfizierte Zellen.

Mit den HCT116 Zelllinien wurden ebenfalls Versuche zur zeitabhängigen Veränderung der p53- und XPC-Proteinmenge nach Inkubation mit BPDE durchgeführt. Vorversuche mit 50 nM führten zu keiner detektierbaren Veränderung, so dass in den weiteren Versuchen mit einer Konzentration von 200 nM BPDE gearbeitet wurde. Diese Konzentration führte in den p53-profizienten Zellen nach 4 h Nachinkubationszeit zu einem Anstieg der p53-Proteinmenge, die bei 8 h ein Maximum erreichte und auch nach 24 h noch nicht wieder auf das Ausgangsniveau zurückgegangen war (Abbildung 38 und Abbildung 39). Bei den p53-defizienten Zellen konnte erwartungsgemäß in keinem Fall p53-Protein nachgewiesen werden. In beiden Zelllinien blieb die XPC-Proteinmenge bei allen Proben relativ konstant.

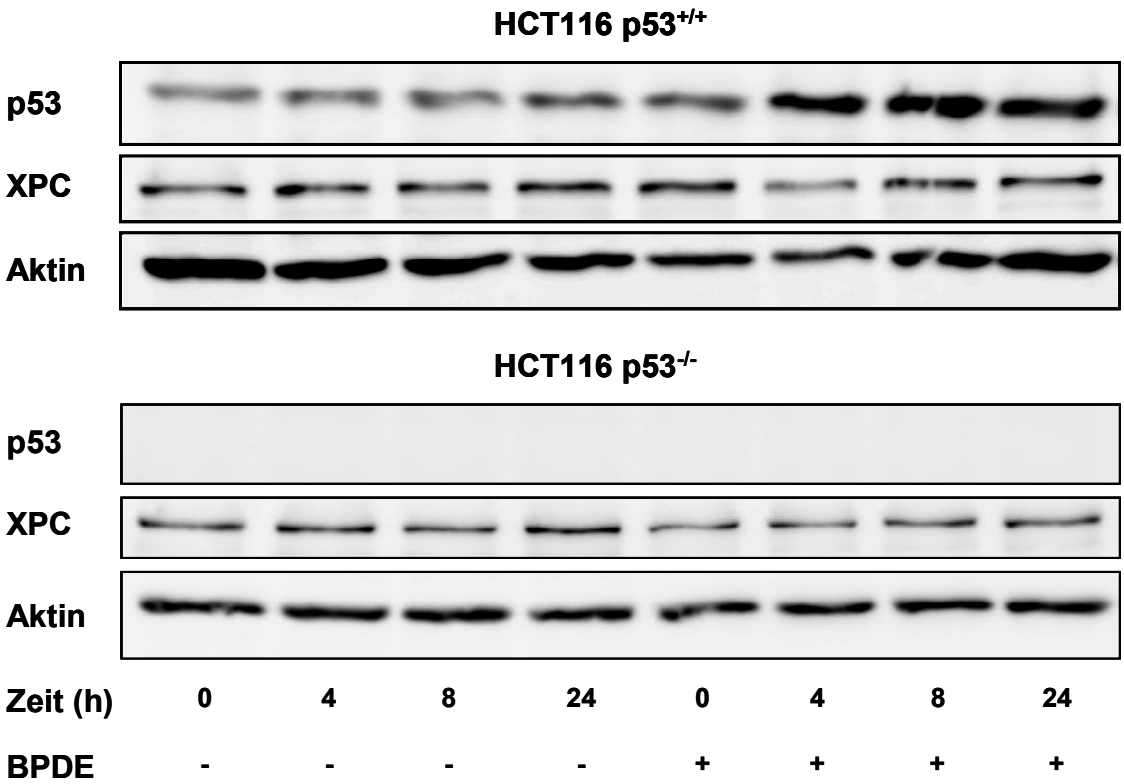

Abbildung 38: Westernblot-Analyse von p53 und XPC in HCT116 Zellen nach Inkubation mit 200 nM BPDE. Aktin wurde als Ladekontrolle detektiert. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert und 0-24 h nachinkubiert. Dargestellt sind repräsentative Blots von 2 unabhängigen Versuchen. $p53^{+/+}$: p53-profiziente Zellen, $p53^{-/-}$: p53-defiziente Zellen.

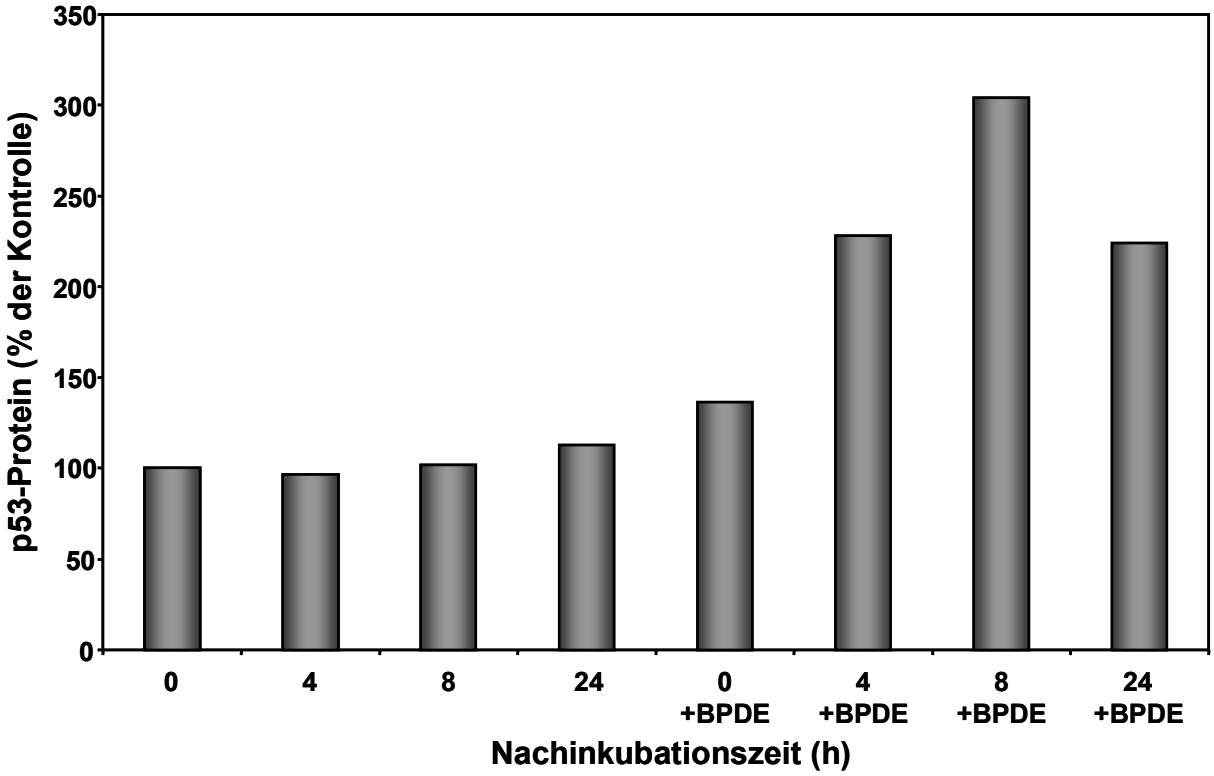

Abbildung 39: p53-Proteingehalt in HCT116 p53$^{+/+}$ Zellen nach Inkubation mit 200 nM BPDE. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert und 0-24 h nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen.

Die folgende Untersuchung der konzentrationsabhängigen Veränderung der p53- und XPC-Proteinmenge in den HCT116 Zelllinien wurde ebenfalls im Bereich von 0-200 nM BPDE nach 8 h Nachinkubationszeit durchgeführt. Im unteren Konzentrationsbereich von 0-50 nM BPDE erfolgte nur eine geringe Zunahme der p53-Proteinmenge (Abbildung 40). Eine deutliche Zunahme wurde in den p53-profizienten Zellen erst ab 100 nM BPDE festgestellt, um bei 200 nM BPDE auf mehr als das 4-Fache der Kontrolle anzusteigen (Abbildung 41). Auch hier konnte wie erwartet bei den p53 *knock-out* Zellen in keinem Fall p53-Protein nachgewiesen werden. Bei beiden Zelllinien konnte keine konzentrationsabhängige Veränderung der XPC-Proteinmenge festgestellt werden.

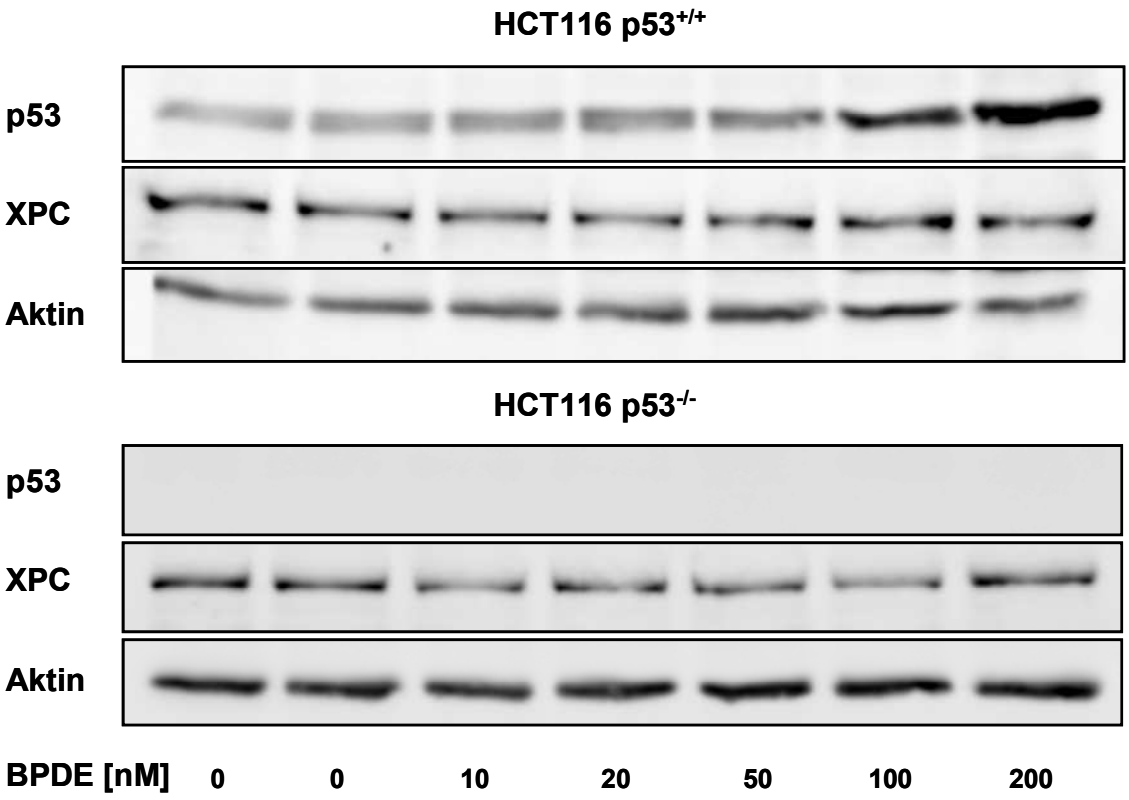

Abbildung 40: Westernblot-Analyse von p53 und XPC in HCT116 Zellen nach Inkubation mit 0-200 nM BPDE. Aktin wurde als Ladekontrolle detektiert. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert und 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind repräsentative Blots von 2 unabhängigen Versuchen. $p53^{+/+}$: p53-profiziente Zellen, $p53^{-/-}$: p53-defiziente Zellen.

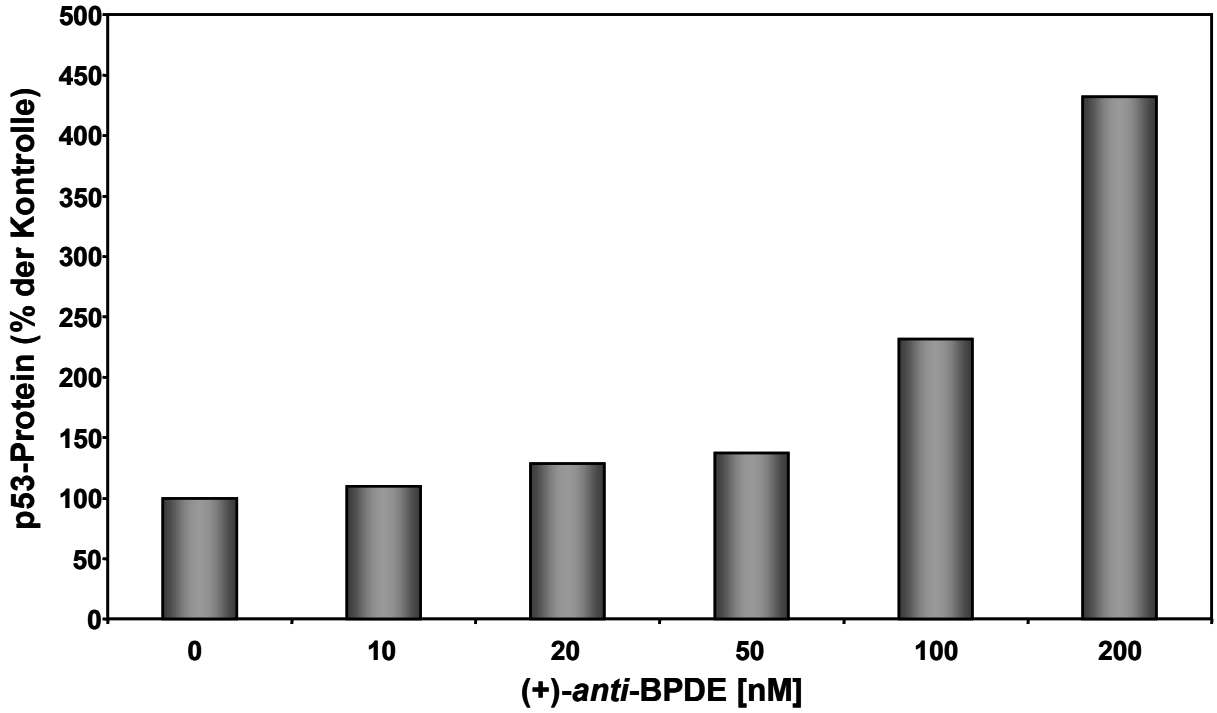

Abbildung 41: p53-Proteingehalt in HCT116 p53$^{+/+}$ Zellen nach Inkubation mit 0-200 nM BPDE. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert und 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen.

Pääjärvi et al. (2004) beobachteten in A549 Zellen 3 h nach Exposition mit 0,01-1 µM BPDE eine konzentrationsabhängige Zunahme des p53-Proteins. In HCT116 Zellen wurde die zeitabhängige Zunahme von p53 nach Inkubation mit 1 µM BPDE untersucht (Wani et al., 2002). Dabei war nach 8 h eine deutliche Zunahme erkennbar, die nach 24 h ein Maximum erreichte. Diese zeitliche Verschiebung der maximalen Induktion von p53 ist möglicherweise auf die 5-fach höhere Konzentration an BPDE im Vergleich zu den eigenen Ergebnissen zurückzuführen. In menschlichen Brustepithelzellen wurde 2 h nach Behandlung mit 1 µM BPDE ein Anstieg der p53-Menge beobachtet, der nach 10 h ein Maximum erreichte und nach 24 h noch über dem Anfangsniveau lag (Wang et al., 2003). Weitere Arbeiten untersuchten die Induktion von p53 in menschlichen Fibroblasten. Dabei wurde ebenfalls eine konzentrationsabhängige Zunahme der p53-Menge 8 h nach Behandlung mit 0,3-1,2 µM BPDE (Wani et al., 2000) sowie eine Zeitabhängigkeit mit einem Maximum bei 24 h nach Inkubation mit 1,2 µM BPDE festgestellt (Lloyd und Hanawalt, 2000). Die in der Literatur beschriebene Konzentrations- und Zeitabhängigkeit spiegelt sich überwiegend in den eigenen Ergebnissen wider.

Allerdings wurden in der Literatur meist wesentlich höhere BPDE-Konzentrationen eingesetzt, die zum Teil deutlich im zytotoxischen Bereich lagen.

Für den XPC-Proteingehalt konnte weder eine Zeit- noch eine Konzentrationsabhängigkeit nach Inkubation mit BPDE in den untersuchten Zelllinien festgestellt werden. XPC wird als essentiell für die Schadenserkennung in der globalen NER angesehen und unterliegt der transkriptionellen Regulation durch p53 (Adimoolam und Ford, 2002). Die p53-vermittelte, zeit- und dosisabhängige Induktion nach UVC-Bestrahlung wurde in der Literatur auch in HCT116 Zellen beschrieben (Adimoolam und Ford, 2002). Eine vergleichbare Abhängigkeit wurde nach BPDE-Inkubation ebenfalls vermutet, konnte in den eigenen Versuchen aber nicht bestätigt werden. Andererseits konnte gezeigt werden, dass selbst in den p53 *knock-out* Zellen XPC nachweisbar ist. Dies deutet darauf hin, dass zumindest ein gewisser Grundspiegel an XPC unabhängig von p53 in den Zellen vorliegt. Möglicherweise würden höhere BPDE-Konzentrationen zur Induktion von XPC in den p53-profizienten Zellen führen oder die in der Literatur gezeigte Induktion ist eine spezifische Folge der UVC-Bestrahlung.

5.4.2 Einfluss von BPDE auf die Genexpression von *p53*, *p48*, *p21* und *XPC*

Zur Untersuchung der Genexpression wurde aus den Zellen nach Inkubation mit BPDE und verschiedenen Nachinkubationszeiten von 0-24 h die RNA isoliert, eine cDNA-Synthese aus der mRNA und schließlich eine Real-Time PCR-Analyse durchgeführt. Daraus wurde die relative Genexpression der Proben, normiert auf das *housekeeping*-Gen GAPDH, bestimmt.

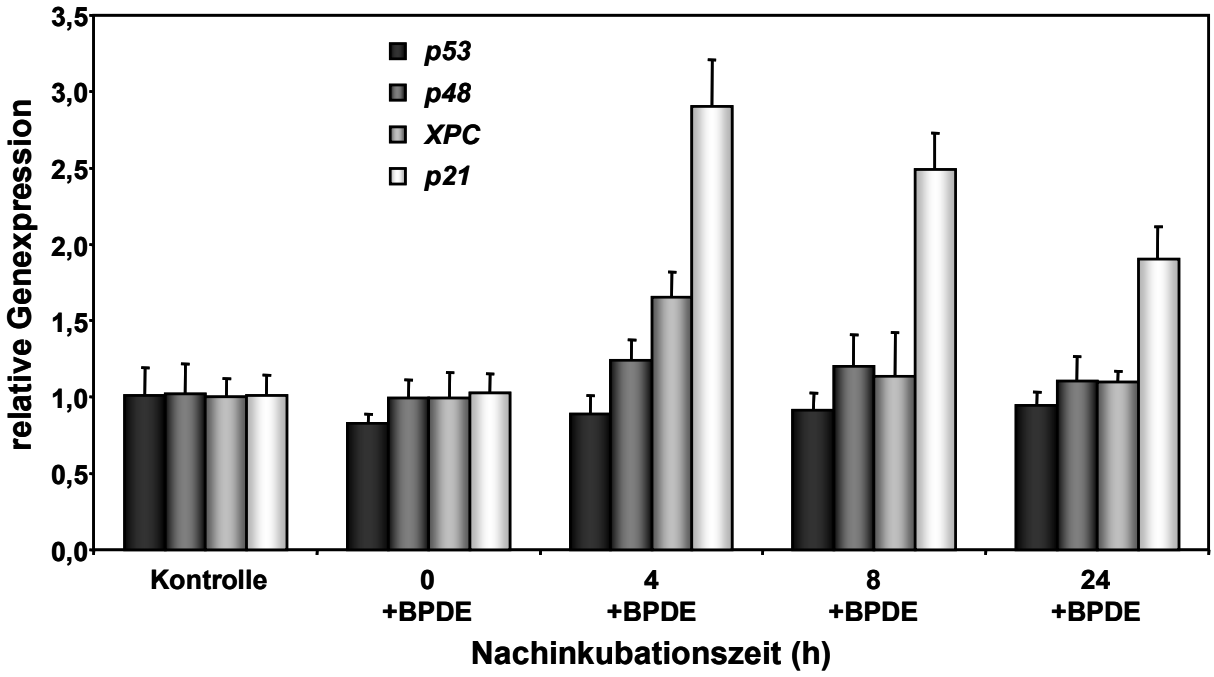

Abbildung 42: Relative Genexpression von *p53*, *p48*, *XPC* und *p21* in A549 Wildtypzellen nach Inkubation mit 50 nM BPDE. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert und 0-24 h nachinkubiert. Kontrolle: ohne BPDE-Inkubation. Dargestellt sind Mittelwerte aus 6 Bestimmungen + SD.

In A549 wt und pRNA Zellen ergab sich dabei ein vergleichbares Bild (Abbildung 42 und Abbildung 43). Bei beiden Zelltypen blieb die relative *p53*-Genexpression über den gesamten Zeitraum nach Inkubation mit 50 nM BPDE nahezu konstant. Die relative Genexpression von *XPC* zeigte nach 4 h eine leichte Steigerung auf das ca. 1,6-Fache im Vergleich zur Kontrolle, um sich nach 24 h Nachinkubationszeit wieder nahezu den Ausgangswerten anzugleichen. Die Genexpression von *p48* zeigte zwar einen ganz ähnlichen Verlauf, die knapp 1,3-fache Steigerung bei 4 h war jedoch sehr gering. Die relative Genexpression von *p21* zeigte nach 4 h eine kräftige

Steigerung um das 3-Fache im Vergleich zur Kontrolle und ging nach 8 bzw. 24 h Nachinkubationszeit wieder auf das 2,5- bzw. 2-Fache der Kontrolle zurück.

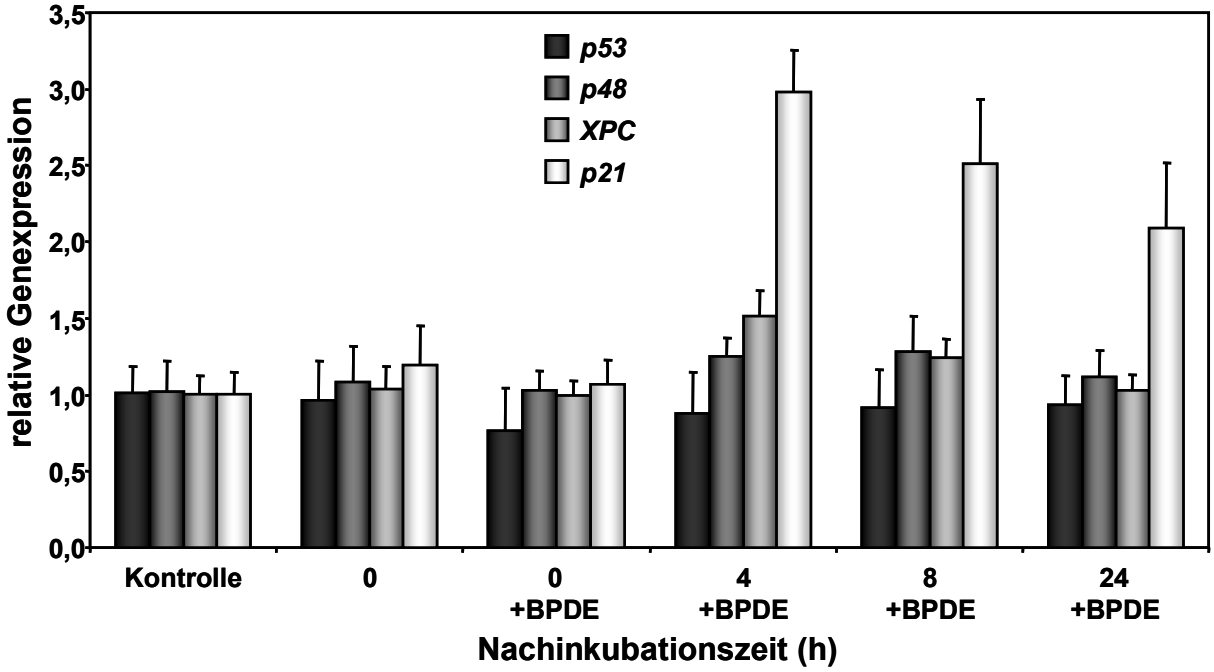

Abbildung 43: Relative Genexpression von *p53*, *p48*, *XPC* und *p21* in A549 pRNA Zellen nach Inkubation mit 50 nM BPDE. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert und 0-24 h nachinkubiert. Kontrolle: A549 Wildtypzellen ohne BPDE-Inkubation. Dargestellt sind Mittelwerte aus 6 Bestimmungen + SD.

Die relative Genexpression von *p53* war in den A549 p53-pRNA Zellen im Vergleich zu unbehandelten A549 Wildtypzellen als Kontrolle erwartungsgemäß verringert und blieb über den betrachteten Zeitraum unabhängig von der BPDE-Behandlung relativ konstant (Abbildung 44). Bezüglich der relativen Genexpression von *p48* und *XPC* ergaben sich auch bei den unbehandelten p53 *knock-down* Zellen keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu den A549 wt oder pRNA Zellen. Nach Inkubation mit 50 nM BPDE war hier ebenfalls ein leichter Anstieg nach 4 h Nachinkubationszeit und nach 24 h ein Rückgang auf das Ausgangsniveau zu verzeichnen. Die relative Genexpression von *p21* war nach 4 h ebenfalls erhöht, allerdings nur knapp um den Faktor 2 und damit weniger als bei den wt oder pRNA Zellen und ging nach 8 bzw. 24 h Nachinkubationszeit etwa auf das 1,3-Fache der Kontrolle zurück.

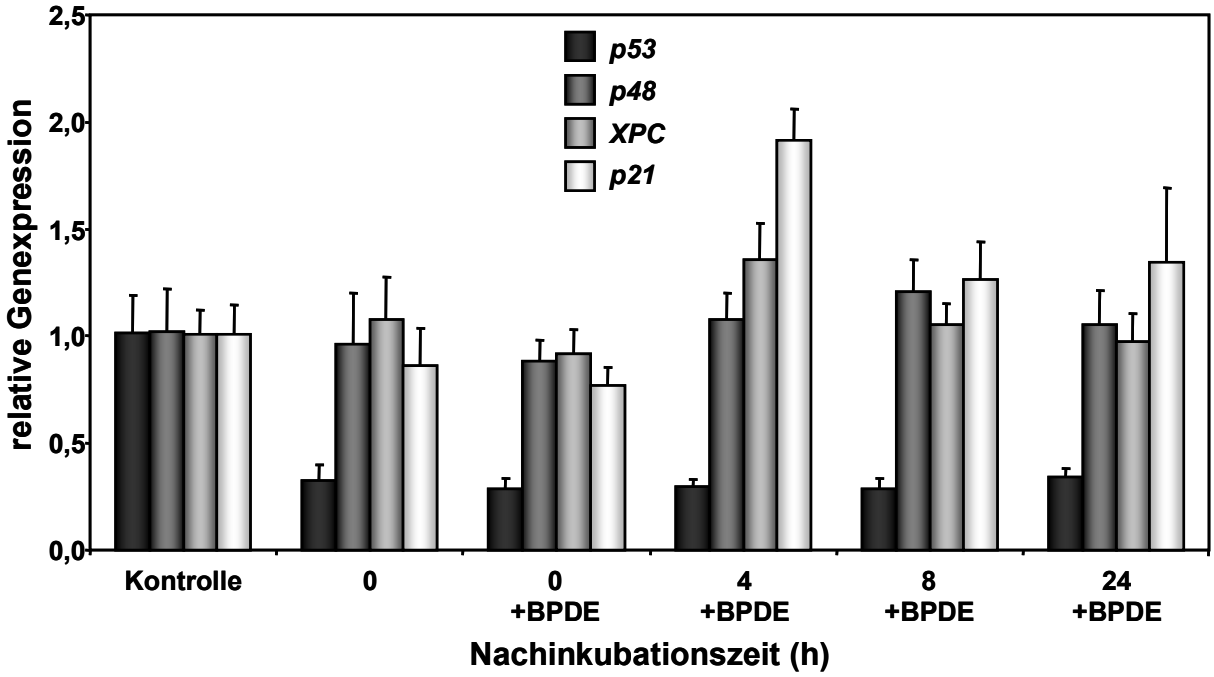

Abbildung 44: Relative Genexpression von *p53*, *p48*, *XPC* und *p21* in A549 p53-pRNA Zellen nach Inkubation mit 50 nM BPDE. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert und 0-24 h nachinkubiert. Kontrolle: A549 Wildtypzellen ohne BPDE-Inkubation. Dargestellt sind Mittelwerte aus 6 Bestimmungen + SD.

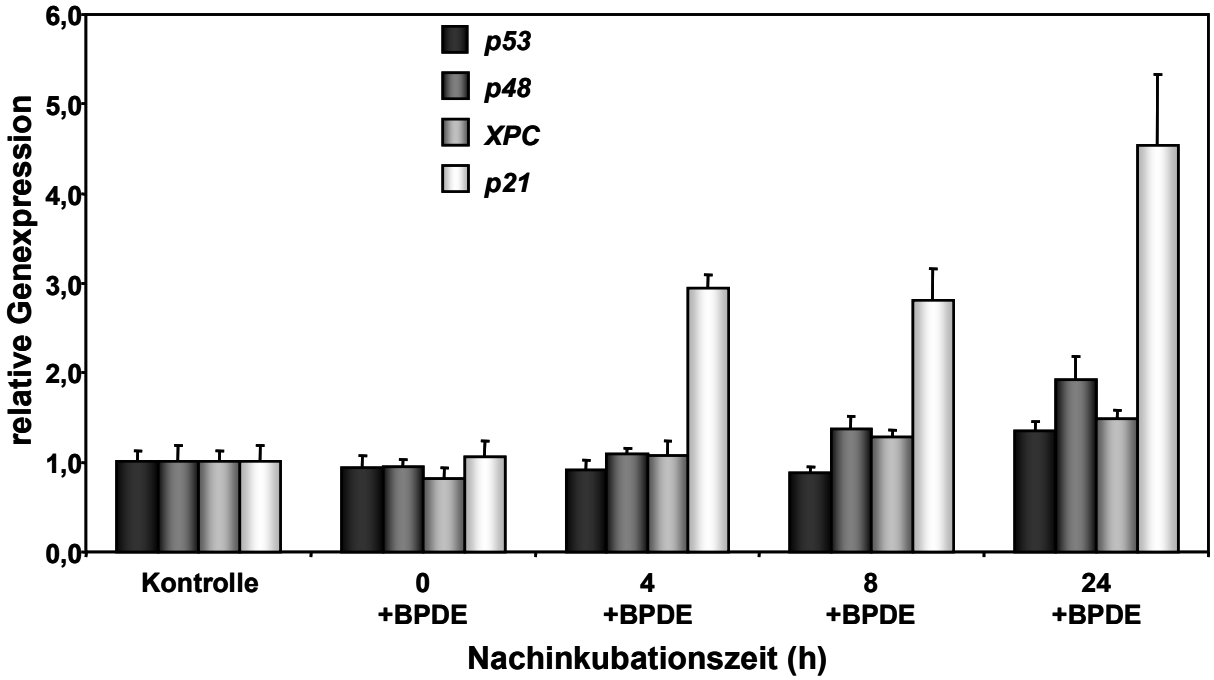

Abbildung 45: Relative Genexpression von *p53*, *p48*, *XPC* und *p21* in HCT116 p53$^{+/+}$ Zellen nach Inkubation mit 200 nM BPDE. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert und 0-24 h nachinkubiert. Kontrolle: ohne BPDE-Inkubation. Dargestellt sind Mittelwerte aus 6 Bestimmungen + SD.

Die Untersuchungen an den HCT116 Zelllinien erfolgten nach Inkubation mit 200 nM BPDE. Dabei veränderte sich in HCT116 $p53^{+/+}$ Zellen vor allem die relative Genexpression von *p21*, die sich nach 4 h Nachinkubationszeit etwa auf das 3-Fache der Kontrolle erhöhte und nach 24 h auf das 4,5-Fache anstieg (Abbildung 45). Die relative Genexpression von *p48* erhöhte sich zeitabhängig auf das 1,9-Fache der Kontrolle nach 24 h Nachinkubationszeit. Ebenso steigerte sich die relative Genexpression von *XPC* auf das 1,5-Fache in diesem Zeitraum. Die relative Genexpression von *p53* war relativ konstant über den untersuchten Zeitraum und zeigte lediglich nach 24 h eine leichte Erhöhung auf das 1,3-Fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

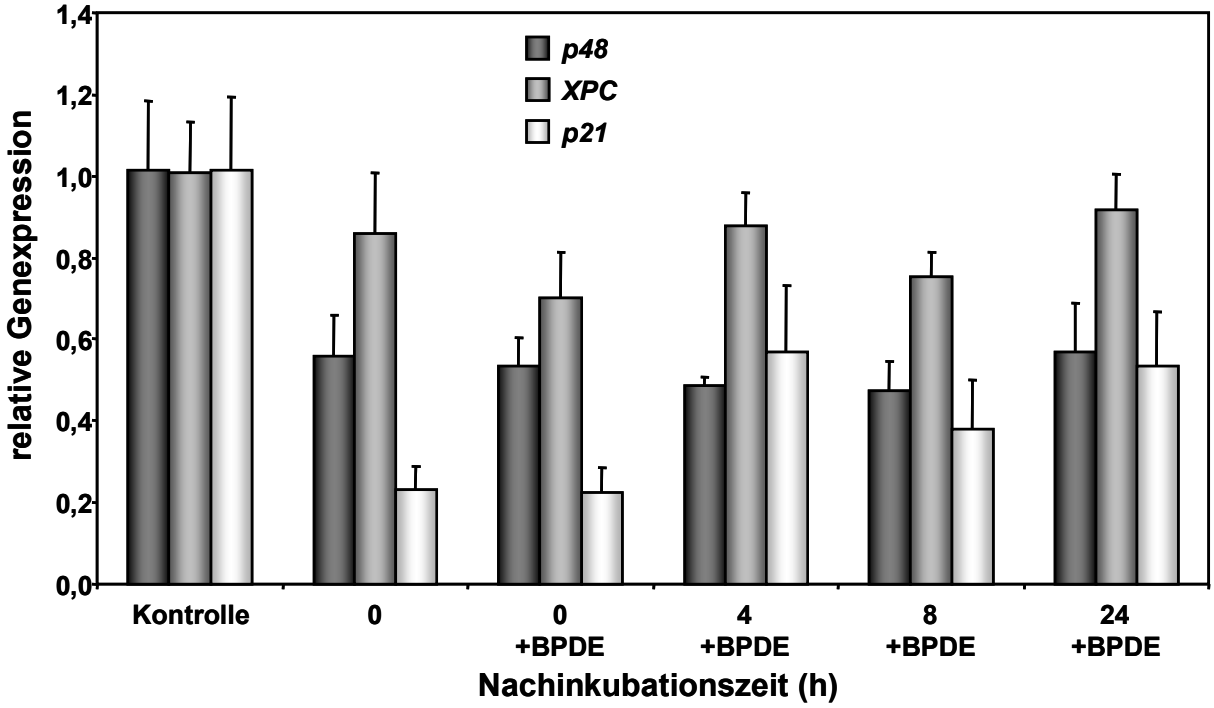

Abbildung 46: Relative Genexpression von *p53*, *p48*, *XPC* und *p21* in HCT116 $p53^{-/-}$ Zellen nach Inkubation mit 200 nM BPDE. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert und 0-24 h nachinkubiert. Kontrolle: HCT116 $p53^{+/+}$ Zellen ohne BPDE-Inkubation. Dargestellt sind Mittelwerte aus 6 Bestimmungen + SD.

In den HCT116 $p53^{-/-}$ Zellen lag das Niveau der relativen Genexpression von *p48* bei rund 50 % der unbehandelten p53-profizienten Zellen und veränderte sich auch zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der BPDE-Inkubation nur unwesentlich (Abbildung 46). Ähnlich verhielt sich die relative Genexpression von *XPC*, die bei rund 80 % der Kontrolle lag und zu keinem Zeitpunkt eine wesentliche Veränderung

aufwies. Die relative Genexpression von *p21* lag in den unbehandelten p53-defizienten Zellen bei etwa 20 % im Vergleich zur p53-profizienten Kontrolle. Bei 4 h Nachinkubationszeit war sie wie bei den $p53^{+/+}$ Zellen auf das 3-Fache ihres Ausgangswertes erhöht, was einem Wert von knapp 60 % der Kontrolle entspricht. Im Gegensatz zu den p53-profizienten Zellen war jedoch nach 24 h Nachinkubationszeit keine weitere Erhöhung der relativen *p21*-Genexpression in den p53 *knock-out* Zellen zu beobachten.

Mit dem Einfluss von BPDE auf die Genexpression in menschlichen Zellen haben sich erst wenige Arbeiten beschäftigt. Mittels Genchip-Analysen wurde der Einfluss einer BPDE-Inkubation auf die Genexpression in A549 Zellen untersucht (Dreij et al., 2004). 12 h nach Inkubation mit 1 µM BPDE war unter anderem die Expression von *p21*, *XPC* und *p48* auf mRNA-Ebene erhöht, eine genauere Quantifizierung der Ergebnisse wurde leider nicht angegeben. In menschlichen Brustepithelzellen wurde mit einer speziellen PCR-Technik die Expression einer Vielzahl von Genen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubation mit 1 µM BPDE untersucht (Wang et al., 2003). Dabei war die Genexpression von *p21* nach 4 und nach 10 h zunächst unverändert und zeigte eine Verdoppelung nach 24 h. Mehrere untersuchte Gene mit Bezug zur DNA-Reparatur zeigten im Zeitraum bis 24 h keine wesentliche Änderung ihrer Expression, darunter *ATM*, *BRCA1*, *p48*, *XPG* und *Polymerase η*. Als einziges Gen in dieser Gruppe konnte für *XPC* eine signifikante Steigerung der Expression auf das 1,9-fache bereits nach 4 h nachgewiesen werden, die nach 24 h wieder nahezu auf das Ausgangsniveau zurückgegangen war. Ob diese Expressionssteigerung auch Auswirkungen auf Proteinebene hatte, wurde jedoch nicht untersucht (Wang et al., 2003). Im Vergleich zu den Literaturwerten zeigen die eigenen Ergebnisse insbesondere die Induktion von *p21* nach BPDE-Inkubation. Die relative Genexpression von *p48* änderte sich in den eigenen Untersuchungen in den A549 Zellen nur geringfügig und in den HCT116 Zellen maximal auf das 1,9-Fache der Kontrolle. Die in der Literatur beschriebene Expressionssteigerung in A549 Zellen (Dreij et al., 2004) wurde allerdings bei 20-fach höheren und damit stark zytotoxischen Konzentrationen festgestellt und ist daher nur begrenzt vergleichbar. Bezüglich der Expression von *XPC* wurden in den A549 und den HCT116 Zelllinien Steigerungen um etwa das 1,5-Fache ermittelt. Ob dies allerdings als relevante Erhöhung angesehen werden kann ist fraglich, da auf Protein-Ebene keine entsprechenden Veränderungen zu beobachten waren. Die hingegen in der Literatur

festgestellten Expressionssteigerungen von *XPC* wurden ebenfalls nach Inkubation mit einer deutlich höheren und bereits zytotoxischen Konzentration von 1 µM BPDE festgestellt.

Der Vergleich der HCT116 Zelllinien verdeutlicht den bereits aus der Literatur bekannten Einfluss von p53 auf die Expression von *XPC*, *p48* und *p21* (Macleod et al., 1995; Hwang et al., 1999; Adimoolam und Ford, 2002). So waren *XPC*, *p48* und *p21* in den HCT116 $p53^{-/-}$ Zellen durch die Behandlung mit BPDE nicht oder nur gering induzierbar und das Expressionsniveau unbehandelter Zellen lag insbesondere bei *p48* und *p21* deutlich unter dem der p53-profizienten Kontrolle. Die Ergebnisse machen aber auch deutlich, dass es für die drei Gene noch p53-unabhängige Expressionsmechanismen gibt, die für den vorhandenen Grundspiegel in p53-defizienten Zellen verantwortlich sind.

5.5 Einfluss von p53 auf Bildung und Reparatur BPDE-induzierter DNA-Addukte

Die Untersuchung der Rolle des Tumorsuppressorproteins p53 bei der Bildung und Reparatur von DNA-Addukten nach Inkubation mit (+)-*anti*-Benzo[*a*]pyrendiolepoxid (BPDE) wurde sowohl in den A549 als auch in den HCT116 Zelllinien durchgeführt. Nach einstündiger Inkubation mit BPDE und dem Ablauf unterschiedlicher Nachinkubationszeiten wurde die DNA aus den Zellen isoliert und aufgereinigt. Durch Hydrolyse wurden die BPDE-induzierten DNA-Addukte als fluoreszierende Tetrole freigesetzt und mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion quantifiziert.

5.5.1 Untersuchungen in A549 Zellen

Der Einfluss von p53 auf die Induktion von DNA-Addukten wurde in A549 wt, pRNA und p53-pRNA Zellen nach Inkubation mit 50 nM BPDE untersucht. In diesen Zellen konnten unabhängig vom p53-Status nach einstündiger Inkubation etwa 350 Addukte/10^8 Basenpaare nachgewiesen werden (Abbildung 47). Ein Einfluss von p53 auf die Adduktbildung wurde in den A549 Zellen nicht festgestellt.

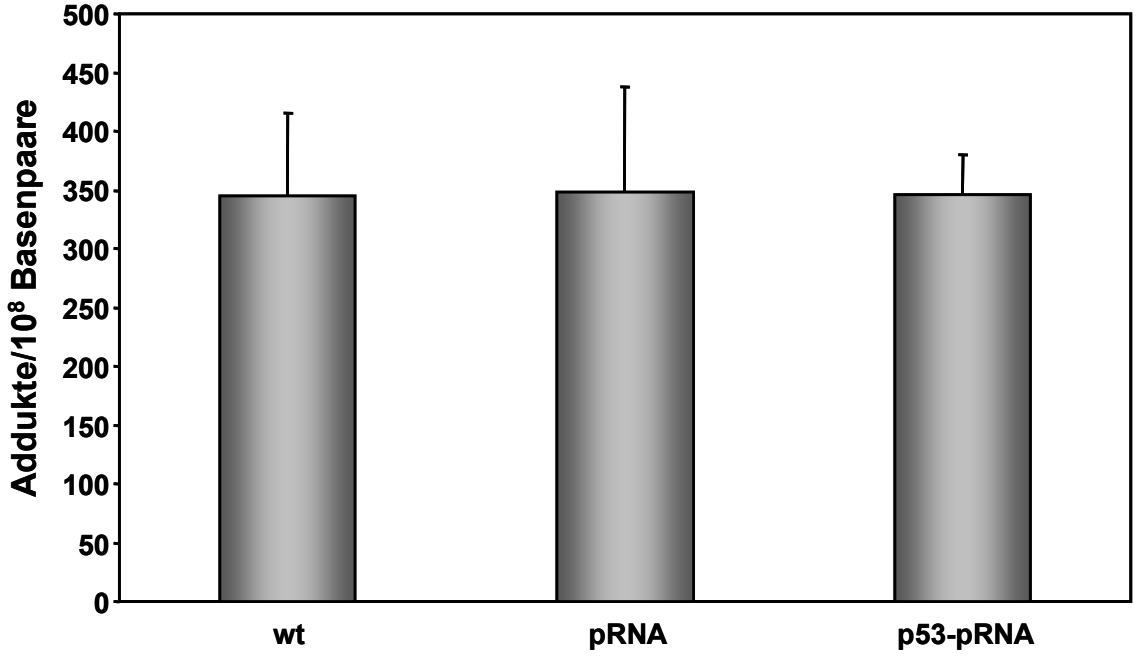

Abbildung 47: Bildung von DNA-Addukten in A549 Zellen nach Inkubation mit 50 nM BPDE. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus 9 Bestimmungen + SD. wt: Wildtypzellen, pRNA: mit leerem Plasmid transfizierte Zellen, p53-pRNA: mit p53-siRNA-Plasmid transfizierte Zellen.

Zur Untersuchung der Rolle von p53 in der Reparatur BPDE-induzierter DNA-Addukte in den A549 Zelllinien wurden nach einstündiger Inkubation mit 50 nM BPDE die DNA-Addukte nach 0 und 8 h Nachinkubationszeit bestimmt (Abbildung 48). Dabei ergab sich zwischen den A549 wt und pRNA Zellen auf der einen und den A549 p53-pRNA Zellen auf der anderen Seite kein Unterschied hinsichtlich der Reparatur der DNA-Addukte. So waren nach 8 h Nachinkubationszeit noch 55-59 % der DNA-Addukte vorhanden.

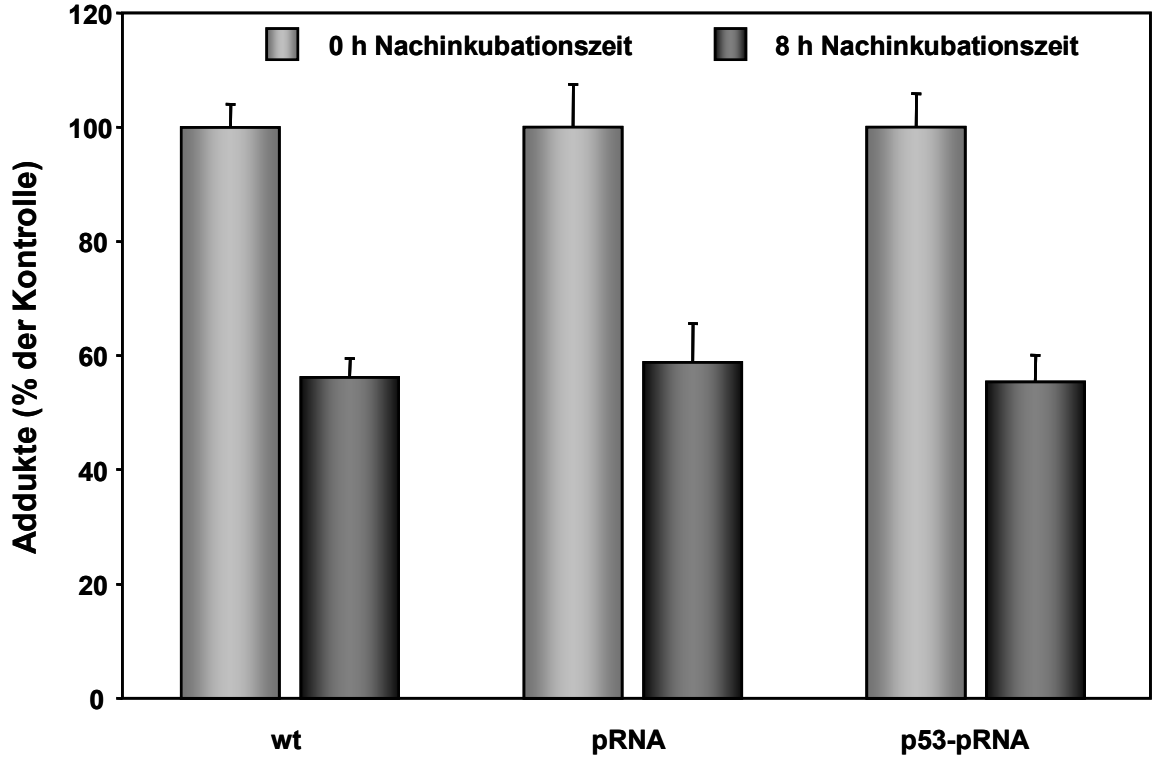

Abbildung 48: BPDE-induzierte DNA-Addukte in A549 Zellen nach Inkubation mit 50 nM BPDE. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert und 0 h oder 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 8 Bestimmungen + SD. wt: Wildtypzellen, pRNA: mit leerem Plasmid transfizierte Zellen, p53-pRNA: mit p53-siRNA-Plasmid transfizierte Zellen.

5.5.2 Untersuchungen in HCT116 Zellen

Auch in den beiden HCT116 Zelllinien wurde untersucht, welche Rolle das Tumorsuppressorprotein bei der Bildung von BPDE-induzierten DNA-Addukten spielt. Nach einstündiger Inkubation der Zellen mit 10-200 nM BPDE wurde eine konzentrationsabhängige Zunahme der Addukte/10^8 Basenpaare festgestellt (Abbildung 49). Während die Inkubation mit 10 und 20 nM BPDE rund 90 Addukte/10^8 Basenpaare induzierte, waren es bei 50 nM BPDE bereits etwa 400 und bei 200 nM BPDE rund 1500 Addukte/10^8 Basenpaare. Dabei war die Adduktbildung bei allen Konzentrationen zwischen den p53-profizienten und p53-defizienten Zellen vergleichbar. Ein Einfluss von p53 auf die Bildung BPDE-induzierter DNA-Addukte konnte somit nicht nachgewiesen werden.

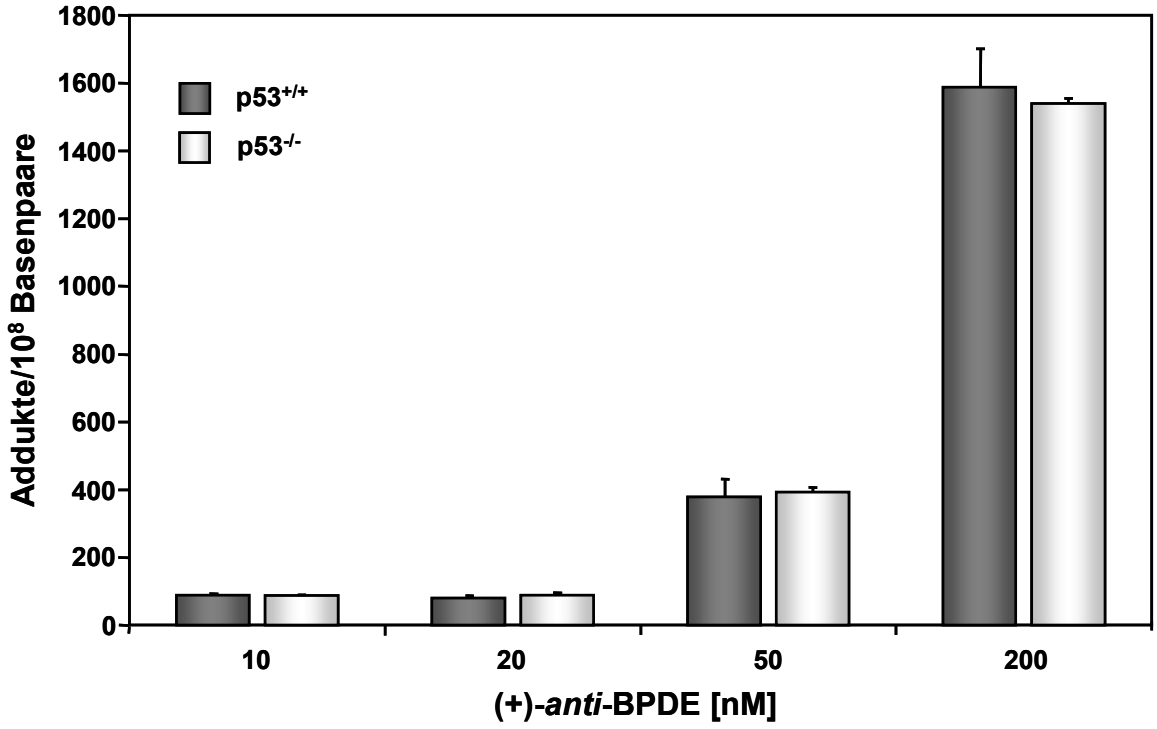

Abbildung 49: Bildung von DNA-Addukten in HCT116 Zellen nach Inkubation mit 10, 20, 50 oder 200 nM BPDE. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen + SD. $p53^{+/+}$: p53-profiziente Zellen, $p53^{-/-}$: p53-defiziente Zellen.

Analog zu den Untersuchungen in den A549 Zellen wurde auch in den HCT116 Zellen die Reparatur BPDE-induzierter DNA-Addukte in Abhängigkeit vom p53-Status untersucht und zwischen den p53-profizienten und -defizienten Zelllinien nach

Inkubation mit 50 nM BPDE und 0, 8 und 24 h Nachinkubationszeit verglichen (Abbildung 50). Auch bezüglich der Reparatur der induzierten DNA-Addukte war weder nach 8 h noch nach 24 h Nachinkubationszeit ein Einfluss von p53 erkennbar. Es waren nach 8 h noch ca. 65 % und nach 24 h noch ca. 50 % der Addukte im Vergleich zu den Kontrollen vorhanden.

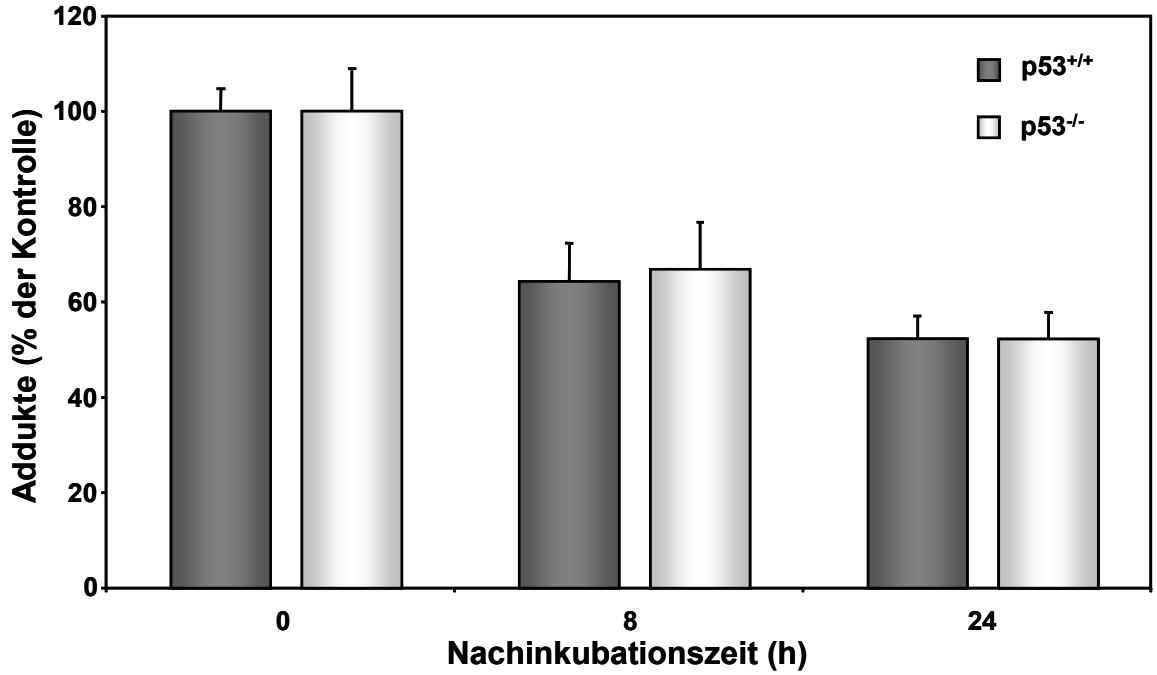

Abbildung 50: BPDE-induzierte DNA-Addukte in HCT116 Zellen nach Inkubation mit 50 nM BPDE. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert und 0, 8 oder 24 h nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus 6 unabhängigen Bestimmungen + SD. $p53^{+/+}$: p53-profiziente Zellen, $p53^{-/-}$: p53-defiziente Zellen.

In weiteren Versuchen wurden Konzentrationen von 10, 20 und 200 nM BPDE bei Nachinkubationszeiten von 4 und 8 h untersucht, um zu erkennen, ob der unterschiedliche p53-Status hier zu Veränderungen in der Reparaturleistung führen würde. Es bestätigte sich allerdings das schon zuvor nach Inkubation mit 50 nM BPDE erhaltene Ergebnis. Der p53-Status der Zellen nahm keinen Einfluss auf die Reparatur der BPDE-induzierten Addukte (Abbildung 51). Nach Inkubation mit 10, 20 oder 200 nM BPDE führte eine Nachinkubationszeit von 4 h zu einem Rückgang der DNA-Addukte auf etwa 80 %, nach weiteren 4 h lag der Adduktspiegel bei 10 und 20 nM unter 75 % der Kontrolle, bei 200 nM etwas darüber.

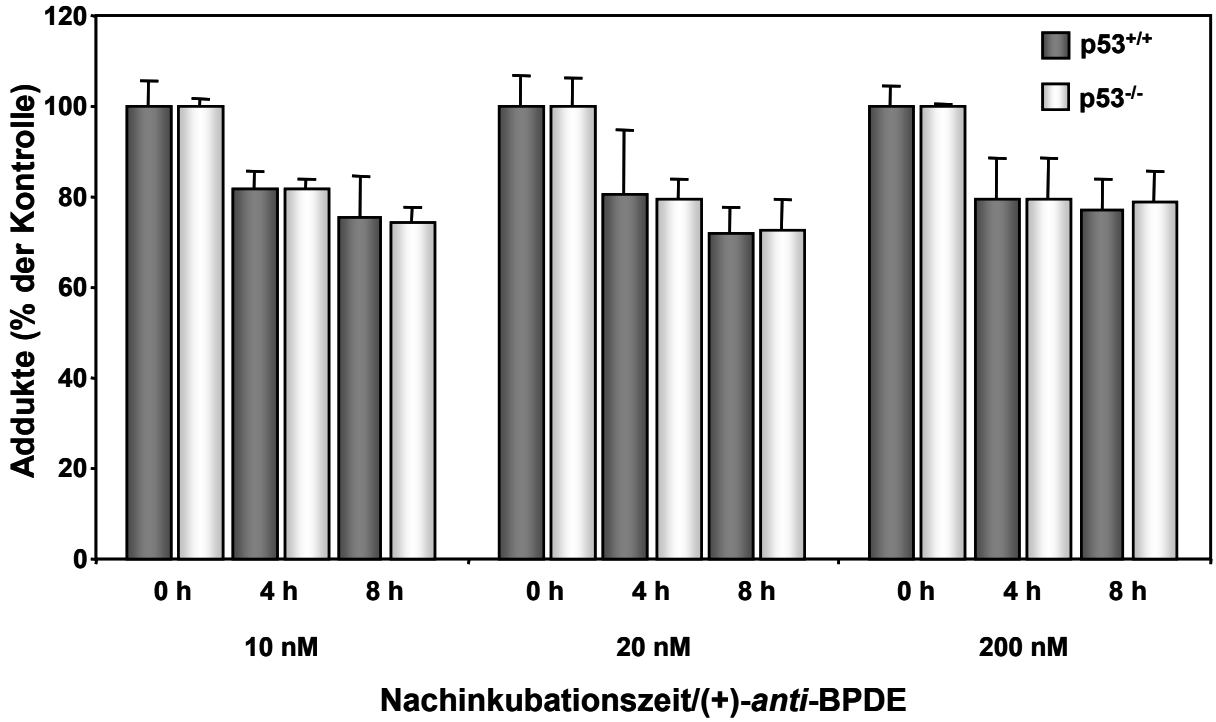

Abbildung 51: BPDE-induzierte DNA-Addukte in HCT116 Zellen nach Inkubation mit 10, 20 oder 200 nM BPDE. Die Zellen wurden 1 h mit (+)-*anti*-BPDE inkubiert und 0, 4 oder 8 h nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus 6 unabhängigen Bestimmungen + SD. $p53^{+/+}$: p53-profiziente Zellen, $p53^{-/-}$: p53-defiziente Zellen.

5.5.3 Bewertung der Ergebnisse

Zusammenfassend betrachtet zeigen die Ergebnisse, dass weder bei den A549 Zellen noch bei den HCT116 Zellen p53-abhängige Unterschiede in der Bildung und Reparatur BPDE-induzierter DNA-Schäden festzustellen waren. Im Gegensatz dazu wurde in der Literatur eine Beeinflussung der Reparatur BPDE-induzierter DNA-Addukte durch den p53-Status beschrieben. In menschlichen Fibroblasten untersuchten Wani et al. (2000) die Bildung und Reparatur von DNA-Addukten nach Inkubation mit (±)-*anti*-BPDE. Dabei wurden sowohl p53-profiziente Zellen (p53-wt), als auch Zellen, die durch eine Punktmutation im p53-Gen funktionell inaktives p53 bilden (p53-mut) sowie Zellen, die durch eine Deletion kein p53-Protein bilden (p53-null), verwendet. Die Induktion von DNA-Addukten war nach 30 min Inkubation mit 0,3-1,2 µM BPDE in allen 3 Zelllinien vergleichbar. Die Untersuchung der Reparatur erfolgte nach Inkubation mit 1,2 µM BPDE zu unterschiedlichen Nachinkubationszeiten bis zu 24 h. Nach 24 h hatten die p53-wt Zellen 70 % der Addukte entfernt, während die p53-mut und p53-null Zellen erst 50 bzw. 35 % der

Addukte beseitigt hatten. Ähnliche Unterschiede waren bereits nach 4 und nach 8 h Nachinkubationszeit aufgetreten. Weitere Untersuchungen von Wani et al. (2000) zur Funktion von p53 in der transkriptionsgekoppelten Reparatur erbrachten ein ähnliches Bild bezüglich der Reparatur im nicht-transkribierten Strang, wohingegen die Reparatur im transkribierten Strang bei allen 3 Zelllinien mit vergleichbarer Effizienz verlief. Lloyd und Hanawalt (2000) untersuchten ebenfalls die Induktion und Reparatur von DNA-Schäden nach Inkubation mit (±)-*anti*-BPDE. Sie verwendeten p53-defiziente Fibroblasten, die mit einem regulierbaren Expressionssystem für Wildtyp p53 transfiziert wurden. Inkubation mit 0,1, 0,5 und 1,2 µM BPDE führte unabhängig vom p53-Status jeweils zu vergleichbarer Adduktbildung, während die Reparatur dieser Addukte bei 0,1 und 0,5 µM BPDE bei den p53-defizienten Zellen über einen Zeitraum von 72 h deutlich vermindert war. Bei 1,2 µM BPDE konnte allerdings kein Unterschied mehr in der Reparatur zwischen den beiden Zelllinien festgestellt werden. Dieses Ergebnis steht damit im Widerspruch zu den zuvor beschriebenen Resultaten von Wani et al. (2000), die in den gleichen Zellen bei dieser Konzentration eine p53-Abhängigkeit der Reparatur festgestellt hatten. In einer weiteren Arbeit wurde die Bildung und Reparatur BPDE-induzierter DNA-Addukte in menschlichen Brustepithelzellen betrachtet (Wani et al., 2002). Dabei wurden neben p53-profizienten auch Zellen verwendet, die das HPV16-E6 Protein exprimieren. Die von humanen Papillomaviren (HPV) gebildeten Onkoproteine E6 und E6-assoziiertes Protein verursachen als E3-Ubiquitin-Ligase den beschleunigten Abbau von p53 durch das Proteasom, so dass kein p53-Protein in den Zellen mehr nachweisbar ist (Ciechanover, 1998). Die Induktion der DNA-Schäden war nach 30 min Inkubation mit 0,25-1 µM (±)-*anti*-BPDE bei beiden Zelllinien praktisch identisch. Die Reparaturleistung war jedoch zu allen Zeitpunkten nach Inkubation mit 1 µM BPDE deutlich verschieden. Nach 24 h lag die Reparatur in den p53-profizienten Zellen bei etwa 60 %, in den p53-defizienten Zellen bei nur 32 %. Bei Untersuchungen zur transkriptionsgekoppelten Reparatur zeigte sich erneut, dass der p53-Status keinen Einfluss auf die Reparatur im transkribierten Strang hatte, während im nicht-transkribierten Strang die Reparatur bei den p53-defizienten Zellen deutlich beeinträchtigt war (Wani et al., 2002).

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist als Transkriptionsfaktor für die Expression der an der Schadenserkennung in der globalen NER beteiligten Proteine p48 und XPC mitverantwortlich (zusammengefasst in Ford, 2005). Dadurch lässt sich ein Einfluss

von p53 auf die Reparatur BPDE-induzierter DNA-Addukte erklären. Eine mögliche Ursache für die mit den eigenen Versuchen erzielten und im Vergleich zur Literatur widersprüchlichen Ergebnisse könnte in den unterschiedlichen Zelllinien begründet sein. Darüber hinaus könnten methodische Unterschiede zu den differierenden Ergebnissen beitragen. Vorallem aber sind die in der Literatur durchgeführten Studien überwiegend bei wesentlich höheren BPDE-Konzentrationen (0,1-1,2 µM) durchgeführt worden als die eigenen Untersuchungen (10-200 nM). Angaben zur Zytotoxizität der eingesetzten Konzentrationen sind dabei entweder überhaupt nicht vorhanden oder es wurde mit stark zytotoxischen Konzentrationen (Koloniebildungsfähigkeit < 10 %) gearbeitet (Wani et al., 2000). Im Rahmen einer Kooperation konnten die eigenen Ergebnisse bezüglich der Reparatur BPDE-induzierter DNA-Addukte sowohl in den HCT116 Zelllinien als auch in den A549 Zelllinien weitgehend bestätigt werden (Hockley et al., zur Veröffentlichung eingereicht).

5.6 Einfluss von p53 und Cadmiumchlorid auf die Reparatur UVC-induzierter DNA-Schäden

Die Untersuchung der Reparatur UVC-induzierter DNA-Schäden erfolgte mit einer immunfluoreszenzmikroskopischen Methode. Hierzu wurden die auf Deckgläschen wachsenden Zellen mit Cadmiumchlorid vorinkubiert, mit UVC bestrahlt und nach unterschiedlichen Nachinkubationszeiten fixiert. Durch den anschließenden Einsatz spezifischer Antikörper wurden die entstandenen Cyclobutanpyrimidindimere (CPD) fluoreszenzmarkiert und nach mikroskopischer Auswertung quantifiziert.

5.6.1 Untersuchungen in A549 Zellen

Die Untersuchungen zur Rolle von p53 in der Reparatur UVC-induzierter CPD wurden nach 24 h Reparaturzeit durchgeführt. Dabei wurde auch der Einfluss einer 24-stündigen Vorinkubation mit Cadmiumchlorid untersucht. Die Versuche in den A549 wurden mit einer UVC-Dosis von 10 J/m^2 durchgeführt. Nach Inkubation mit 50 µM Cd(II) waren nach 0 h Reparatur Unterschiede zwischen A549 wt, pRNA und p53-pRNA Zellen festzustellen (Abbildung 52). Die Menge an CPD variierte von 91 bis 116 % der jeweiligen Kontrolle. Diese Streuung liegt jedoch, wie die Fehlerbalken verdeutlichen, im Schwankungsbereich der Methode. In allen A549 Zellen ohne Cd(II)-Inkubation waren nach 24 h Reparatur noch 43 bis 49 % der CPD vorhanden, ein p53-abhängiger Unterschied konnte somit nicht beobachtet werden. Die mit 50 µM Cd(II) inkubierten A549 Wildtypzellen wiesen nach 24 h mit 48 % einen vergleichbaren Wert auf. Die entsprechend behandelten A549 pRNA und p53-pRNA Zellen führten mit ca. 55 bzw. 61 % zu höheren Werten nach 24 h Reparatur im Vergleich zu den jeweiligen Zellen ohne Cd(II)-Inkubation. Da allerdings diese mögliche Reparaturhemmung sowohl bei den p53 *knock-down* als auch bei den als Kontrolle mitgeführten pRNA Zellen aufgetreten war, handelt es sich möglicherweise um eine Folge der Transfektionsprozedur. Ein eindeutiger, im p53-Status der Zellen begründeter Effekt auf die Reparatur von CPD nach Vorinkubation mit 50 µM Cd(II) ließ sich nicht feststellen.

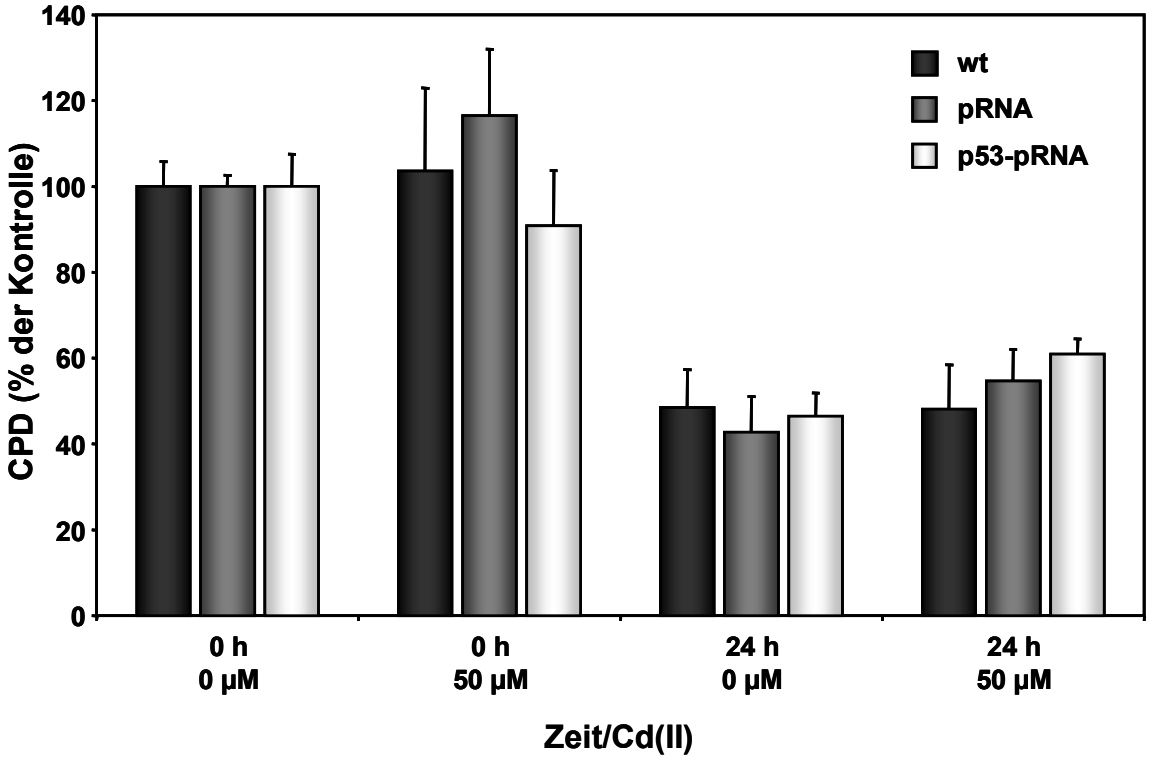

Abbildung 52: UVC-induzierte Cyclobutanpyrimidindimere in A549 Zellen nach Inkubation mit Cd(II). Die Zellen wurden 24 h mit 50 µM $CdCl_2$ inkubiert, mit 10 J/m^2 UVC bestrahlt und 0 h oder 24 h nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. wt: Wildtypzellen, pRNA: mit leerem Plasmid transfizierte Zellen, p53-pRNA: mit p53-siRNA-Plasmid transfizierte Zellen.

5.6.2 Untersuchungen in HCT116 Zellen

Entsprechend der Versuche in den A549 Zellen wurden auch in beiden HCT116 Zelllinien Untersuchungen zur Rolle von p53 in der Reparatur UV-induzierter CPD durchgeführt. Dabei wurde ebenfalls eine UVC-Dosis von 10 J/m^2 angewandt und die Reparatur nach 24 h auch in Kombination mit Cd(II) betrachtet. Bezüglich der Induktion von CPD ergaben sich bei 0 und 25 µM Cd(II) keine Differenzen zwischen den Zelllinien (Abbildung 53). Lediglich die Inkubation mit 50 µM Cd(II) führte zu einer leichten Erhöhung der CPD auf 109 % in p53-profizienten Zellen, allerdings liegt dieser geringe Anstieg durchaus im Schwankungsbereich der Methode. Die Reparaturzeit von 24 h führte unabhängig von der Cd(II)-Inkubation zu einer Verringerung der CPD auf ca. 45 % in den p53-profizienten und auf ca. 58 % in den p53-defizienten Zellen. In den p53 *knock-out* Zellen konnte somit im Vergleich zu den

p53-profizienten Zellen eine um ca. 25 % verringerte Reparatur festgestellt werden. Ein Einfluss von Cd(II) auf die Reparatur der CPD war jedoch nicht nachweisbar.

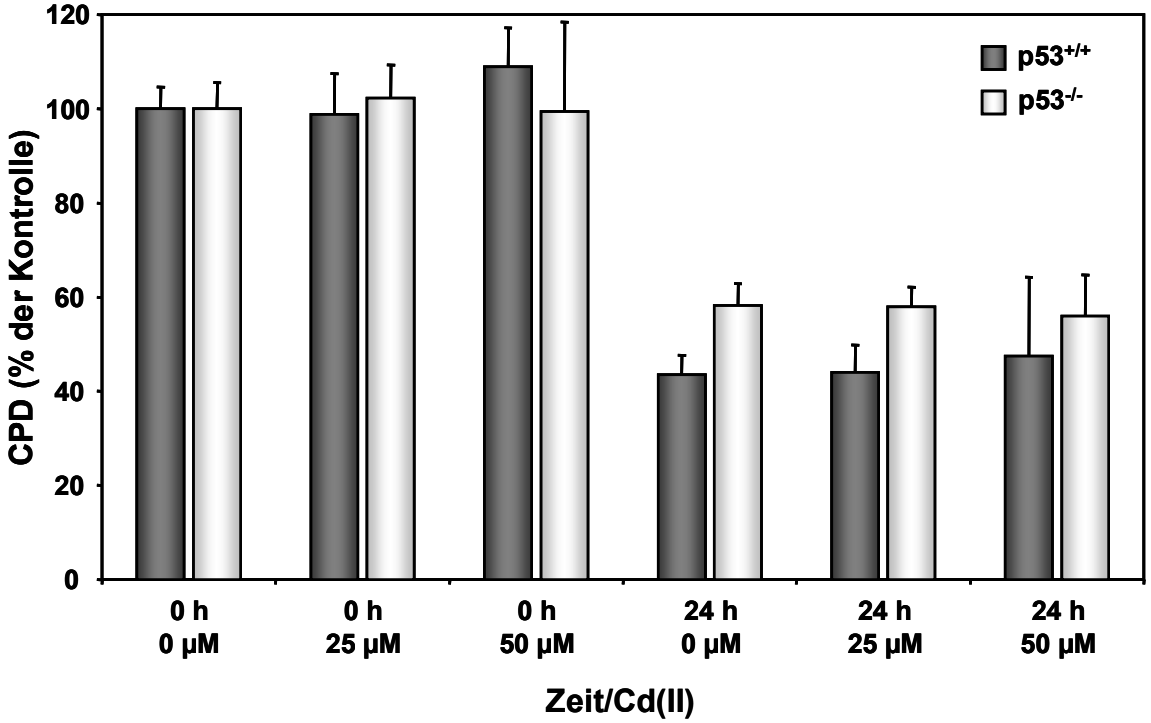

Abbildung 53: UVC-induzierte Cyclobutanpyrimidindimere in HCT116 Zellen nach Inkubation mit Cd(II). Die Zellen wurden 24 h mit 25 oder 50 µM $CdCl_2$ inkubiert, mit 10 J/m^2 UVC bestrahlt und 0 h oder 24 h nachinkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen + SD. $p53^{+/+}$: p53-profiziente Zellen, $p53^{-/-}$: p53-defiziente Zellen.

5.6.3 Bewertung der Ergebnisse

Bei den Untersuchungen zur Rolle von p53 in der Reparatur UVC-induzierter Cyclobutanpyrimidindimere (CPD) konnte in den A549 Zelllinien kein Einfluss von p53 festgestellt werden. In den HCT116 Zelllinien ergab sich eine Reparaturhemmung bei den p53 *knock-out* Zellen von ca. 25 %. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen könnten die Untersuchungen zur Genexpression von *p48* liefern, das von p53 transkriptionell reguliert wird. Als Bestandteil des DDB-Proteinkomplexes wird p48 eine wichtige Rolle in der Schadenserkennung, insbesondere in der Erkennung von CPD, zugesprochen (Tang und Chu, 2002). Während in den A549 Zelllinien die Expression von p48 auf dem gleichen Niveau lag, war sie bei den p53-defizienten HCT116 Zellen deutlich vermindert. Möglicherweise

spiegelt sich dieser Unterschied auch auf Proteinebene wider und erklärt so die verringerte Reparatur von CPD in den HCT116 $p53^{-/-}$ Zellen.

In der Literatur wurde 24 h nach Bestrahlung mit 10 J/m^2 UVC in p53-profizienten HCT116 Zellen eine Reparatur von ca. 60 % und in p53-defizienten HCT116 Zellen von ca. 30 % ermittelt (Adimoolam et al., 2001). Diese Werte zeigen somit eine Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen, obwohl hier die Differenz in der Reparaturleistung mit nur 25 % geringer ausfiel. Dies hängt möglicherweise mit den unterschiedlichen Nachweismethoden zusammen, die bei den Untersuchungen angewandt wurden. Die Reparatur von 6-4-Photoprodukten (6-4-PP) war hingegen p53-unabhängig (Adimoolam et al., 2001). Weitere Untersuchungen zur transkriptionsgekoppelten Reparatur (TCR) von CPD ergaben nur geringe Unterschiede im transkribierten Strang und eine verringerte Reparatur im nicht-transkribierten Strang bei den p53-defizienten Zellen (Adimoolam et al., 2001). Mehrere weitere Arbeiten an menschlichen Fibroblasten mit unterschiedlichem p53-Status bestätigen diese Erkenntnisse (Ford und Hanawalt, 1995; 1997; Ford et al., 1998; Wani et al., 1999). p53-defiziente Zellen zeigten eine reduzierte Reparatur vor allem von CPD, aber auch von 6-4-PP im gesamten Genom, ebenso wie im nicht-transkribierten Strang aktiver Gene. Im transkribierten Strang aktiver Gene war die Reparatur von CPD unabhängig vom p53-Status.

Die Untersuchungen zur Reparatur UVC-induzierter CPD wurden in den A549 und den HCT116 Zelllinien auch nach Inkubation mit Cd(II) durchgeführt. In keinem Fall konnte eine eindeutige Reparaturhemmung durch Cd(II) nachgewiesen werden. Möglicherweise tritt eine Reparaturhemmung in diesen Zellen erst bei höheren als den verwendeten Konzentrationen auf oder die Effekte waren zu gering, um sie im Rahmen der Schwankungsbreite der Methode eindeutig erfassen zu können. Eine weitere plausible Möglichkeit besteht in der Tatsache, dass mit der angewendeten Methode zwar die Entfernung von CPD aus der DNA nachgewiesen werden kann, jedoch nicht der komplette und fehlerfreie Abschluss des gesamten NER-Mechanismus. Daher lässt sich nicht ausschließen, dass Cd(II) spätere Schritte der NER in den untersuchten Zellen beeinträchtigt. In der Literatur wurde der Einfluss von Cd(II) auf die NER UV-induzierter DNA-Schäden im Zellkulturmodell beschrieben. Dabei konnte auch eine Hemmung der Polymerisation und Ligation in menschlichen Fibroblasten und in Hamsterzellen beobachtet werden (Nocentini, 1987; Fatur et al., 2003). Allerdings deuten andere Arbeiten darauf hin, dass Cd(II)

an einer Hemmung der Schadenserkennung beteiligt ist. Hartmann und Hartwig (1998) konnten zeigen, dass bereits 0,5 µM Cd(II) in Zellextrakten von HeLa Zellen die DNA-Protein-Wechselwirkung von an der Schadenserkennung beteiligten Proteinen beeinträchtigt. Asmuss et al. (2000a) konnten eine Hemmung der Bindung des XPA-Proteins an UV-geschädigte Oligonukleotide ab 100 µM Cd(II) feststellen. Daher sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um den Einfluss von Cd(II) auf die Reparatur von CPD aufzuklären.

6 Zusammenfassende Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von p53 in der DNA-Reparatur und in der Zellzykluskontrolle untersucht, zum Teil unter dem zusätzlichen Einfluss von Cadmiumchlorid. Zur Generierung von Zellen mit reduzierter Expression des Tumorsuppressorgens *p53* wurde die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) genutzt. Sie konnte in HeLa S3, MCF7 und A549 Zellen erfolgreich eingesetzt werden. In A549 Zellen wurde eine Reduktion der relativen *p53*-Genexpression um ca. 80 % erreicht, die sich auch in einem deutlich verringerten p53-Proteingehalt der Zellen widerspiegelte.

Untersuchungen zum Einfluss von Cadmium auf die Zellzyklusverteilung in A549 Zellen ergaben einen leichten G1-Arrest unabhängig vom p53-Status der Zellen. Nach Bestrahlung mit 5 J/m^2 UVC war ein S-Phasen Arrest zu beobachten, der nach Vorinkubation mit Cadmium konzentrationsabhängig deutlich abgeschwächt wurde. Diese Vorgänge waren in den A549 Zellen ebenfalls unabhängig von p53. Zum Vergleich wurden weitere Versuche mit HCT116 Zellen durchgeführt, von denen auch eine isogene, p53-defiziente Zelllinie zur Verfügung stand (Bunz et al., 1998). Auch bei diesen Zelllinien führte die Bestrahlung mit UVC zu einem p53-unabhängigen Arrest in der S-Phase des Zellzyklus. In Übereinstimmung mit der Literatur konnte damit gezeigt werden, dass p53 an der Regulation des S-Phasen Kontrollpunktes wahrscheinlich nicht beteiligt ist (Iliakis et al., 2003). Dagegen gilt eine Beteiligung von p53 an den Kontrollpunkten am G1/S- und G2/M-Übergang als gesichert. Daher wurden weitere Untersuchungen zur Rolle von p53 nach Behandlung der Zellen mit Actinomycin D durchgeführt, das in verschiedenen Arbeiten bereits zur Induktion des G1-Arrests verwendet wurde. In den A549 und in den HCT116 Zellen konnte dabei eine Abhängigkeit der Zellzyklusregulation von p53 festgestellt werden. A549 p53 *knock-down* Zellen zeigten einen verringerten G1-Arrest und keinen G2/M-Arrest. Die HCT116 p53 *knock-out* Zellen wiesen keinen G1-Arrest mehr und einen verringerten G2/M-Arrest auf. Dieser eindeutig p53-abhängige Effekt ist ein Beweis für die funktionellen Konsequenzen des p53 *knock-down* in den A549 Zellen.

Als weiteres DNA-schädigendes Agens wurde Benzo[a]pyrendiolepoxid (BPDE) für Untersuchungen zur Rolle von p53 in der Zellzykluskontrolle eingesetzt. Die Behandlung der Zellen mit BPDE führte zu einem konzentrationsabhängigen S-

Phasen Arrest, wie er auch in der Literatur beschrieben wird (Khan und Anderson, 2001). Wie nach UVC-Bestrahlung war auch der BPDE-induzierte S-Arrest in den untersuchten Zelllinien unabhängig vom p53-Status.

In weiteren Versuchen wurde die Expression von *p53* und *XPC* nach Inkubation mit BPDE zunächst auf Proteinebene in den A549 und HCT116 Zelllinien betrachtet. In allen A549 Zelllinien und in den p53-profizienten HCT116 Zellen war nach Ende der BPDE-Inkubation eine konzentrationsabhängige Zunahme des p53-Proteins beginnend ab 4 h mit einem Maximum nach 8 h erkennbar. Das XPC-Protein blieb in allen Zelllinien unabhängig von der Behandlung relativ konstant.

Die relative Genexpression zeigte in allen A549 Zelllinien und in den p53-profizienten HCT116 Zellen insbesondere für *p21* eine starke Induktion ab 4 h nach Ende der BPDE-Inkubation und folgte damit im zeitlichen Verlauf der beginnenden Akkumulation des p53-Proteins. Als Transkriptionsfaktor ist p53 ein wichtiger Regulator für *p21*, das u. a. entscheidend für den G1/S-Zellzykluskontrollpunkt ist. Während viele genotoxische Agenzien im Allgemeinen einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase verursachen, führt u. a. die Behandlung mit BPDE in verschiedenen Zelllinien zu einem Arrest in der S-Phase (Khan und Dipple, 2000). Dies konnte auch in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Obwohl bereits ab 4 h nach Ende der BPDE-Inkubation eine starke Induktion der relativen Genexpression von *p21* auftrat, war kein G1-Arrest feststellbar. Nakanishi et al. (2000) untersuchten in A549 Zellen die Induktion von p53 und p21 nach Inkubation mit B[a]P. Sie konnten eine zeitabhängige Akkumulation des p53-Proteins und eine entsprechende Induktion der p21 mRNA feststellen. Auf Proteinebene war jedoch keine entsprechende p21-Zunahme detektierbar, da es in den Zellen zu verstärkter Ubiquitinierung von p21 und nachfolgendem proteasomalem Abbau des Proteins kam. Diese Beobachtungen liefern auch für die eigenen Untersuchungen eine plausible Erklärung, warum trotz Induktion von p21 kein G1-Arrest nach BPDE-Inkubation auftrat.

Im nächsten Teil dieser Arbeit wurde die Bildung und Reparatur von DNA-Addukten nach Inkubation mit BPDE untersucht. Die Induktion der Addukte war konzentrationsabhängig aber unabhängig vom p53-Status der Zellen. Bezüglich der Reparatur BPDE-induzierter DNA-Schäden konnte weder in den A549 noch in den HCT116 Zellen ein Einfluss von p53 festgestellt werden. Aus der Literatur ist hingegen aus Untersuchungen mit menschlichen Fibroblasten und Brustepithelzellen ein Einfluss von p53 auf die Reparatur dieser DNA-Schäden bekannt

(zusammengefasst in Ford, 2005). Allerdings konnten die eigenen Ergebnisse in Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe in den gleichen Zelllinien weitgehend bestätigt werden (Hockley et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Möglicherweise ist die p53-unabhängige Reparatur BPDE-induzierter DNA-Addukte spezifisch für die verwendeten Zellen oder es sind in den p53-defizienten Zellen andere Mechanismen als die NER zusätzlich an der Reparatur dieser Addukte beteiligt. Ein anderer Erklärungsansatz könnte sein, dass das XPC-Protein bei hohen BPDE-Konzentrationen in p53-defizienten Zellen limitierend für den Reparaturprozess wird. Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass auch in den p53-defizienten Zellen XPC nachweisbar war und die Genexpression von *XPC* nur wenig verringert war. Im betrachteten Konzentrationsbereich ergab sich aber auch in den p53-profizienten Zellen trotz Induktion von p53 keine Zunahme im XPC-Proteingehalt. Möglicherweise wirkt sich die Abwesenheit von p53 erst bei noch höheren BPDE-Konzentrationen durch eine fehlende Induzierbarkeit von XPC auf die Reparatur aus, weil zuvor der p53-unabhängige Proteingehalt ausreicht. Tatsächlich wurde die in der Literatur beschriebene Induktion von XPC und der Einfluss des p53-Status auf die Reparatur der DNA-Addukte im Vergleich zu den eigenen Untersuchungen bei 5- bis 20-fach höheren Konzentrationen ermittelt (Wani et al., 2002; Wang et al., 2003). Die Relevanz solcher Untersuchungen ist jedoch fraglich, da sich diese Konzentrationen im stark zytotoxischen Bereich befinden.

Die Reparatur UVC-induzierter CPD wurde untersucht, um die Rolle von p53 in der Reparatur verschiedener DNA-schädigender Agenzien vergleichen zu können. Bei den HCT116 Zellen ergab sich dabei ein klarer Einfluss von p53 auf die Reparatur, die in den defizienten Zellen nach 24 h um etwa 25 % vermindert war. In der Literatur wurde in mehreren Arbeiten mit verschiedenen Zelllinien ebenfalls eine Hemmung der Reparatur UVC-induzierter CPD in p53-defizienten Zellen beschrieben (zusammengefasst in Adimoolam und Ford, 2003). In den A549 Zellen hingegen konnte kein Einfluss des p53-Status auf die Reparatur festgestellt werden. Möglicherweise ist dies auf im Gegensatz zu den HCT116 p53 *knock-out* Zellen in den *knock-down* Zellen noch vorhandenes p53-Protein zurückzuführen. Dadurch könnte in den *knock-down* Zellen eine p53-abhängige Induktion von p48 und XPC nach UVC-Bestrahlung noch möglich sein. Wie die Untersuchungen zur Genexpression zeigen, waren die Expressionsniveaus von *p48* und *XPC* in den A549 Zellen weitgehend unabhängig vom p53-Status, während die HCT116 Zellen

insbesondere für *p48* eine deutliche Reduktion in den p53-defizienten Zellen aufwiesen. Möglicherweise ist die verringerte Expression von *p48* ursächlich für die Reparaturhemmung in den p53-defizienten Zellen. So konnten Fitch et al. (2003a) in p53-defizienten Fibroblasten durch Überexpression von *p48* die Hemmung der Reparatur von CPD fast vollständig wieder aufheben. Einen weiteren Beitrag zur Reparaturhemmung könnte die in den p53-defizienten HCT116 Zellen stark verringerte Induzierbarkeit von XPC durch UVC-Bestrahlung liefern (Adimoolam und Ford, 2002). Untersuchungen zur UVC-induzierten Expression von *p48* und *XPC* in den A549 Zelllinien könnten zur weiteren Aufklärung beitragen.

Die zusätzliche Inkubation mit Cd(II) ergab weder in den HCT116 Zellen noch in den A549 Zellen eine Reparaturhemmung. In der Literatur wurde die Hemmung der NER in kultivierten Zellen nach UVC-Bestrahlung durch Cd(II) beschrieben (Nocentini, 1987; Snyder et al., 1989; Fatur et al., 2003). Ob für die unterschiedlichen Ergebnisse möglicherweise methodische oder mechanistische Gründe eine Rolle spielen, sollte in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

Der Vergleich der Reparatur BPDE- und UVC-induzierter DNA-Schäden ergab einen unterschiedlichen Einfluss von p53. Während die Reparatur BPDE-induzierter DNA-Addukte in den untersuchten Zelllinien unabhängig von p53 war, war die Reparatur der CPD in den HCT116 Zellen p53-abhängig. Für diesen Unterschied ist möglicherweise die Funktion von p48 in der Schadenserkennung verantwortlich, wie sie für die Reparatur von CPD beschrieben wurde (Fitch et al., 2003c; Wittschieben et al., 2005). Eine ähnliche Funktion von p48 in der Erkennung von BPDE-induzierten DNA-Addukten ist bislang nicht bekannt und könnte somit eine Erklärung darstellen, warum deren Reparatur in den untersuchten Zellen unabhängig vom p53-Status war. Zudem bestehen deutliche Unterschiede im Ausmaß der induzierten DNA-Schäden nach UVC- bzw. BPDE-Behandlung. Die Bestrahlung mit 1 J/m^2 UVC führt zur Bildung von etwa 2-10 Läsionen/10^6 Basen (Ravanat et al., 2001). Dies entspricht einer maximalen Schadensinduktion von 10000 Läsionen/10^8 Basen bei der verwendeten Dosis von 10 J/m^2 UVC im Vergleich zu rund 750 Addukten/10^8 Basen bei Inkubation mit 200 nM BPDE, der höchsten in dieser Arbeit verwendeten Konzentration, in den HCT116 Zellen. Daher ist es durchaus denkbar, dass die Anzahl der induzierten DNA-Schäden Einfluss auf die Abhängigkeit des Reparaturprozesses von p53 nimmt. Wie schon zuvor erwähnt, könnte der p53-unabhängige Grundspiegel an XPC-Protein für die Reparatur einer mäßigen Anzahl

von DNA-Schäden ausreichend sein, während es bei Auftreten einer großen Zahl an Läsionen möglicherweise der p53-abhängigen Induktion von XPC bedarf.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen zum einen, dass p53 eine wichtige Rolle in der Zellzykluskontrolle am G1/S- sowie am G2/M-Übergang zukommt. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass p53 zumindest an der Reparatur von Cyclobutanpyrimidindimeren in HCT116 Zellen beteiligt ist, während es für die Entfernung von BPDE-induzierten DNA-Addukten in den untersuchten Zelllinien entbehrlich war. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um eine umfassende Aufklärung der Rolle von p53 in der NER zu erreichen.

7 Literaturverzeichnis

Abraham, R. T. (2001). "Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases." Genes Dev 15(17): 2177-2196.

Adimoolam, S., Lin, C. X. and Ford, J. M. (2001). "The p53-regulated cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 (cip1, waf1, sdi1), is not required for global genomic and transcription-coupled nucleotide excision repair of UV-induced DNA photoproducts." J Biol Chem 276(28): 25813-25822.

Adimoolam, S. and Ford, J. M. (2002). "p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(20): 12985-12990.

Adimoolam, S. and Ford, J. M. (2003). "p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair." DNA Repair (Amst) 2(9): 947-954.

Allison, S. J. and Milner, J. (2004). "Remodelling chromatin on a global scale: a novel protective function of p53." Carcinogenesis 25(9): 1551-1557.

Ambros, V. (2004). "The functions of animal microRNAs." Nature 431(7006): 350-355.

Asmuss, M., Mullenders, L. H., Eker, A. and Hartwig, A. (2000a). "Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair." Carcinogenesis 21(11): 2097-2104.

Asmuss, M., Mullenders, L. H. and Hartwig, A. (2000b). "Interference by toxic metal compounds with isolated zinc finger DNA repair proteins." Toxicol Lett 112-113: 227-231.

Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell 116(2): 281-297.

Barton, G. M. and Medzhitov, R. (2002). "Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells." Proc Natl Acad Sci U S A 99(23): 14943-14945.

Benemann, J., Bromen, K., Lehmann, N., Marr, A. and Joeckel, K. H. (2004). "Environmental survey 1998, volume VII: Arsenic, heavy and precious metals in the blood and urine of the German population. Exposure sources and pathways." WaBoLu-Hefte(3): i-viii,1-221.

Berg, J. M. (1990). "Zinc fingers and other metal-binding domains. Elements for interactions between macromolecules." J Biol Chem 265(12): 6513-6516.

Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. and Hannon, G. J. (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." Nature 409(6818): 363-366.

Bertrand, J.-R., Pottier, M., Vekris, A., Opolon, P., Maksimenko, A. and Malvy, C. (2002). "Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo." Biochemical and Biophysical Research Communications 296(4): 1000-1004.

Bi, X., Slater, D. M., Ohmori, H. and Vaziri, C. (2005). "DNA polymerase kappa is specifically required for recovery from the benzo[a]pyrene-dihydrodiol epoxide (BPDE)-induced S-phase checkpoint." J Biol Chem 280(23): 22343-22355.

Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G. and Monks, T. J. (2000). "Role of quinones in toxicology." Chem Res Toxicol 13(3): 135-160.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-254.

Brendler-Schwaab, S., Czich, A., Epe, B., Gocke, E., Kaina, B., Muller, L., Pollet, D. and Utesch, D. (2004). "Photochemical genotoxicity: principles and test methods. Report of a GUM task force." Mutat Res 566(1): 65-91.

Brummelkamp, T. R., Bernards, R. and Agami, R. (2002). "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells." Science 296(5567): 550-553.

Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1998). "Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage." Science 282(5393): 1497-1501.

Cavalieri, E. L. and Rogan, E. G. (1995). "Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons." Xenobiotica 25(7): 677-688.

Ciechanover, A. (1998). "The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life." Embo J 17(24): 7151-7160.

Colbere-Garapin, F., Horodniceanu, F., Kourilsky, P. and Garapin, A. C. (1981). "A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells." J Mol Biol 150(1): 1-14.

Collot-Teixeira, S., Bass, J., Denis, F. and Ranger-Rogez, S. (2004). "Human tumor suppressor p53 and DNA viruses." Rev Med Virol 14(5): 301-319.

Conney, A. H., Chang, R. L., Jerina, D. M. and Wei, S. J. (1994). "Studies on the metabolism of benzo[a]pyrene and dose-dependent differences in the mutagenic profile of its ultimate carcinogenic metabolite." Drug Metab Rev 26(1-2): 125-163.

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

Davies, J. and Jimenez, A. (1980). "A new selective agent for eukaryotic cloning vectors." Am J Trop Med Hyg 29(5 Suppl): 1089-1092.

D'Erchia, A. M., Tullo, A., Pesole, G., Saccone, C. and Sbisa, E. (2003). "p53 gene family: structural, functional and evolutionary features." Current Genomics 4(1): 13-26.

Dreij, K., Bajak, E., Sundberg, K., Cotgreave, I., Jernstroem, B., Seidel, A. and Gusnanto, A. (2004). "DNA adducts of benzo[a]pyrene- and dibenzo[a,l]pyrene-diol epoxides in human lung epithelial cells: kinetics of adduct removal, effects on cell cycle checkpoints, and gene expression." Polycyclic Aromatic Compounds 24(4-5): 549-566.

Elbashir, S. M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." Genes Dev 15(2): 188-200.

Fatur, T., Lah, T. T. and Filipic, M. (2003). "Cadmium inhibits repair of UV-, methyl methanesulfonate- and N-methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells." Mutat Res 529(1-2): 109-116.

Filipic, M., Fatur, T. and Vudrag, M. (2006). "Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity." Hum Exp Toxicol 25(2): 67-77.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans." Nature 391(6669): 806-811.

Fitch, M. E., Cross, I. V., Turner, S. J., Adimoolam, S., Lin, C. X., Williams, K. G. and Ford, J. M. (2003a). "The DDB2 nucleotide excision repair gene product p48 enhances global genomic repair in p53 deficient human fibroblasts." DNA Repair (Amst) 2(7): 819-826.

Fitch, M. E., Nakajima, S., Yasui, A. and Ford, J. M. (2003b). "In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product." J Biol Chem 278(47): 46906-46910.

Fitch, M. E., Cross, I. V. and Ford, J. M. (2003c). "p53 responsive nucleotide excision repair gene products p48 and XPC, but not p53, localize to sites of UV-irradiation-induced DNA damage, in vivo." Carcinogenesis 24(5): 843-850.

Ford, J. M. and Hanawalt, P. C. (1995). "Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance." Proc Natl Acad Sci U S A 92(19): 8876-8880.

Ford, J. M. and Hanawalt, P. C. (1997). "Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts." J Biol Chem 272(44): 28073-28080.

Ford, J. M., Baron, E. L. and Hanawalt, P. C. (1998). "Human fibroblasts expressing the human papillomavirus E6 gene are deficient in global genomic nucleotide

excision repair and sensitive to ultraviolet irradiation." Cancer Res 58(4): 599-603.

Ford, J. M. (2005). "Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for p53." Mutat Res 577(1-2): 195-202.

Friedberg, E. C. (2001). "How nucleotide excision repair protects against cancer." Nat Rev Cancer 1(1): 22-33.

Gil, J. and Esteban, M. (2000). "Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action." Apoptosis 5(2): 107-114.

Grunweller, A., Wyszko, E., Bieber, B., Jahnel, R., Erdmann, V. A. and Kurreck, J. (2003). "Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA." Nucleic Acids Res 31(12): 3185-3193.

Guo, N., Faller, D. V. and Vaziri, C. (2002). "Carcinogen-induced S-phase arrest is Chk1 mediated and caffeine sensitive." Cell Growth Differ 13(2): 77-86.

Haglund, K. and Dikic, I. (2005). "Ubiquitylation and cell signaling." Embo J 24(19): 3353-3359.

Hainaut, P. and Hollstein, M. (2000). "p53 and human cancer: the first ten thousand mutations." Adv Cancer Res 77: 81-137.

Hainaut, P. and Mann, K. (2001). "Zinc binding and redox control of p53 structure and function." Antioxid Redox Signal 3(4): 611-623.

Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." Nature 418(6894): 244-251.

Harper, J. V. and Brooks, G. (2005). "The mammalian cell cycle: an overview." Methods Mol Biol 296: 113-153.

Hartmann, A. and Speit, G. (1996). "Effect of arsenic and cadmium on the persistence of mutagen-induced DNA lesions in human cells." Environ Mol Mutagen 27(2): 98-104.

Hartmann, M. and Hartwig, A. (1998). "Disturbance of DNA damage recognition after UV-irradiation by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells." Carcinogenesis 19(4): 617-621.

Hartwig, A. and Beyersmann, D. (1989). "Comutagenicity and inhibition of DNA repair by metal ions in mammalian cells." Biol Trace Elem Res 21: 359-365.

Hartwig, A. and Schwerdtle, T. (2002). "Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications." Toxicol Lett 127(1-3): 47-54.

Hartwig, A., Asmuss, M., Ehleben, I., Herzer, U., Kostelac, D., Pelzer, A., Schwerdtle, T. and Burkle, A. (2002a). "Interference by toxic metal ions with DNA repair

processes and cell cycle control: molecular mechanisms." Environ Health Perspect 110 Suppl 5: 797-799.

Hartwig, A., Asmuss, M., Blessing, H., Hoffmann, S., Jahnke, G., Khandelwal, S., Pelzer, A. and Burkle, A. (2002b). "Interference by toxic metal ions with zinc-dependent proteins involved in maintaining genomic stability." Food Chem Toxicol 40(8): 1179-1184.

He, Z., Li, J., Zhen, C., Feng, L. and Ding, X. (2005). "Knockdown of p53 by RNAi in ES cells facilitates RA-induced differentiation into muscle cells." Biochem Biophys Res Commun 335(3): 676-683.

Heffernan, T. P., Simpson, D. A., Frank, A. R., Heinloth, A. N., Paules, R. S., Cordeiro-Stone, M. and Kaufmann, W. K. (2002). "An ATR- and Chk1-dependent S checkpoint inhibits replicon initiation following UVC-induced DNA damage." Mol Cell Biol 22(24): 8552-8561.

Hockley, S. L., Arlt, V. M., Jahnke, G., Hartwig, A., Giddings, I. and Phillips, D. H. (2007). "Identification through microarray gene expression analysis of cellular responses to benzo(a)pyrene and its diol-epoxide that are dependent or independent of p53." zur Veröffentlichung eingereicht.

Hoffmann, K., Becker, K., Friedrich, C., Helm, D., Krause, C. and Seifert, B. (2000). "The German Environmental Survey 1990/1992 (GerES II): cadmium in blood, urine and hair of adults and children." J Expo Anal Environ Epidemiol 10(2): 126-135.

Holleman, A. F., Wiberg, E., Wiberg, N. (1995). Lehrbuch der anorganischen Chemie. Berlin, New York, de Gruyter.

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C. C. (1991). "p53 mutations in human cancers." Science 253(5015): 49-53.

Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C. and Chu, G. (1999). "Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair." Proc Natl Acad Sci U S A 96(2): 424-428.

IARC (1992). "IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Solar and ultraviolet radiation." IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer 55: 1-316.

IARC (1993). "IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry." IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer 58: 1-415.

Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J. and Wang, H. (2003). "DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation." Oncogene 22(37): 5834-5847.

Islam, G. A., Greibrokk, T., Rise, F. and Ovrebo, S. (1999). "Epimerization of benzo[a]pyrene-tetrols after acid hydrolysis, implications for determination of benzo[a]pyrene adducts in protein and DNA." Mutat Res 423(1-2): 47-54.

Jarup, L. (2002). "Cadmium overload and toxicity." Nephrol Dial Transplant 17 Suppl 2: 35-39.

Jin, T., Lu, J. and Nordberg, M. (1998). "Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein." Neurotoxicology 19(4-5): 529-535.

Jin, Y. H., Clark, A. B., Slebos, R. J., Al-Refai, H., Taylor, J. A., Kunkel, T. A., Resnick, M. A. and Gordenin, D. A. (2003). "Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair." Nat Genet 34(3): 326-329.

Joseph, P. and Jaiswal, A. K. (1994). "NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT diaphorase) specifically prevents the formation of benzo[a]pyrene quinone-DNA adducts generated by cytochrome P4501A1 and P450 reductase." Proc Natl Acad Sci U S A 91(18): 8413-8417.

Kannouche, P. and Stary, A. (2003). "Xeroderma pigmentosum variant and error-prone DNA polymerases." Biochimie 85(11): 1123-1132.

Karlsson, H. J., Eriksson, M., Perzon, E., Akerman, B., Lincoln, P. and Westman, G. (2003). "Groove-binding unsymmetrical cyanine dyes for staining of DNA: syntheses and characterization of the DNA-binding." Nucleic Acids Res 31(21): 6227-6234.

Khan, Q. A. and Dipple, A. (2000). "Diverse chemical carcinogens fail to induce G(1) arrest in MCF-7 cells." Carcinogenesis 21(8): 1611-1618.

Khan, Q. A. and Anderson, L. M. (2001). "Hydrocarbon carcinogens evade cellular defense mechanism of G1 arrest in nontransformed and malignant lung cell lines." Toxicol Appl Pharmacol 173(2): 105-113.

Kho, P. S., Wang, Z., Zhuang, L., Li, Y., Chew, J. L., Ng, H. H., Liu, E. T. and Yu, Q. (2004). "p53-regulated transcriptional program associated with genotoxic stress-induced apoptosis." J Biol Chem 279(20): 21183-21192.

Kim, D. H. and Rossi, J. J. (2007). "Strategies for silencing human disease using RNA interference." Nat Rev Genet 8(3): 173-184.

Kopera, E., Schwerdtle, T., Hartwig, A. and Bal, W. (2004). "Co(II) and Cd(II) substitute for Zn(II) in the zinc finger derived from the DNA repair protein XPA, demonstrating a variety of potential mechanisms of toxicity." Chem Res Toxicol 17(11): 1452-1458.

Korz, C., Pscherer, A., Benner, A., Mertens, D., Schaffner, C., Leupolt, E., Dohner, H., Stilgenbauer, S. and Lichter, P. (2002). "Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell

lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes." Blood 99(12): 4554-4561.

Kubista, M., Akerman, B. and Norden, B. (1987). "Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy." Biochemistry 26(14): 4545-4553.

Kumar, M. and Carmichael, G. G. (1998). "Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes." Microbiol Mol Biol Rev 62(4): 1415-1434.

Lambert, S. and Carr, A. M. (2005). "Checkpoint responses to replication fork barriers." Biochimie 87(7): 591-602.

Lane, D. P. (1992). "Cancer. p53, guardian of the genome." Nature 358(6381): 15-16.

Lee, Y. J., Kang, T. S., Kim, T. S., Moon, H. J., Kang, I. H., Oh, J. Y., Kwon, H. and Han, S. Y. (2005). "Cadmium induces cell cycle arrest and change in expression of cell cycle related proteins in breast cancer cell lines." Journal of Toxicology and Public Health 21(1): 77-85.

Li, T. K. and Liu, L. F. (2001). "Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs." Annu Rev Pharmacol Toxicol 41: 53-77.

Liu, X. D., Ma, S. M., Liu, Y., Liu, S. Z. and Sehon, A. (2004). "Short hairpin RNA and retroviral vector-mediated silencing of p53 in mammalian cells." Biochem Biophys Res Commun 324(4): 1173-1178.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods 25(4): 402-408.

Lloyd, D. R. and Hanawalt, P. C. (2000). "p53-dependent global genomic repair of benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide adducts in human cells." Cancer Res 60(3): 517-521.

Lloyd, D. R. and Hanawalt, P. C. (2002). "p53 controls global nucleotide excision repair of low levels of structurally diverse benzo(g)chrysene-DNA adducts in human fibroblasts." Cancer Res 62(18): 5288-5294.

Lutzen, A., Liberti, S. E. and Rasmussen, L. J. (2004). "Cadmium inhibits human DNA mismatch repair in vivo." Biochem Biophys Res Commun 321(1): 21-25.

Macleod, K. F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B. and Jacks, T. (1995). "p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage." Genes Dev 9(8): 935-944.

Malumbres, M. and Barbacid, M. (2005). "Mammalian cyclin-dependent kinases." Trends Biochem Sci 30(11): 630-641.

Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P. and Zamore, P. D. (2005). "Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes." Cell 123(4): 607-620.

Matzke, M. A. and Birchler, J. A. (2005). "RNAi-mediated pathways in the nucleus." Nat Rev Genet 6(1): 24-35.

McManus, M. T. and Sharp, P. A. (2002). "Gene silencing in mammals by small interfering RNAs." Nat Rev Genet 3(10): 737-747.

McNeill, D. R., Narayana, A., Wong, H. K. and Wilson, D. M., 3rd (2004). "Inhibition of Ape1 nuclease activity by lead, iron, and cadmium." Environ Health Perspect 112(7): 799-804.

Melendez-Colon, V. J., Luch, A., Seidel, A. and Baird, W. M. (1999). "Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites." Carcinogenesis 20(10): 1885-1891.

Mellon, I. (2005). "Transcription-coupled repair: a complex affair." Mutat Res 577(1-2): 155-161.

Menendez, J. A. and Lupu, R. (2005). "RNA interference-mediated silencing of the p53 tumor-suppressor protein drastically increases apoptosis after inhibition of endogenous fatty acid metabolism in breast cancer cells." Int J Mol Med 15(1): 33-40.

Meplan, 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." J Biol Chem 274(44): 31663-31670.

Michael, D. and Oren, M. (2003). "The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system." Semin Cancer Biol 13(1): 49-58.

Mori, T., Nakane, M., Hattori, T., Matsunaga, T., Ihara, M. and Nikaido, O. (1991). "Simultaneous establishment of monoclonal antibodies specific for either cyclobutane pyrimidine dimer or (6-4)photoproduct from the same mouse immunized with ultraviolet-irradiated DNA." Photochem Photobiol 54(2): 225-232.

Moser, J., Volker, M., Kool, H., Alekseev, S., Vrieling, H., Yasui, A., van Zeeland, A. A. and Mullenders, L. H. (2005). "The UV-damaged DNA binding protein mediates efficient targeting of the nucleotide excision repair complex to UV-induced photo lesions." DNA Repair (Amst) 4(5): 571-582.

Mukherjee, J. J., Gupta, S. K., Kumar, S. and Sikka, H. C. (2004). "Effects of cadmium(II) on (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-induced DNA damage response in human fibroblasts and DNA repair: a possible mechanism of cadmium's cogenotoxicity." Chem Res Toxicol 17(3): 287-293.

Mülhardt, C. (2003). Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. München, Elsevier GmbH.

Nakanishi, Y., Pei, X. H., Takayama, K., Bai, F., Izumi, M., Kimotsuki, K., Inoue, K., Minami, T., Wataya, H. and Hara, N. (2000). "Polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens increase ubiquitination of p21 protein after the stabilization of p53 and the expression of p21." Am J Respir Cell Mol Biol 22(6): 747-754.

Niida, H. and Nakanishi, M. (2006). "DNA damage checkpoints in mammals." Mutagenesis 21(1): 3-9.

Nocentini, S. (1987). "Inhibition of DNA replication and repair by cadmium in mammalian cells. Protective interaction of zinc." Nucleic Acids Res 15(10): 4211-4225.

Ochi, T. and Ohsawa, M. (1985). "Participation of active oxygen species in the induction of chromosomal aberrations by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells." Mutat Res 143(3): 137-142.

Orban, T. I. and Izaurralde, E. (2005). "Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome." Rna 11(4): 459-469.

Paeaejaervi, G., Jernstroem, B., Stenius, U. and Seidel, A. (2004). "Exposure of mammalian cells to diol epoxides from benzo[a]pyrene and dibenzol[a,l]pyrene and effects on mdm2 and p53." Polycyclic Aromatic Compounds 24(4-5): 537-548.

Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res 29(9): e45.

Pfaffl, M. W. (2004). "Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung." BIOspektrum 1(10): 92-95.

Phillips, D. H. (1999). "Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet." Mutat Res 443(1-2): 139-147.

Pinot, F., Kreps, S. E., Bachelet, M., Hainaut, P., Bakonyi, M. and Polla, B. S. (2000). "Cadmium in the environment: sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers." Rev Environ Health 15(3): 299-323.

Qin, J. and Li, L. (2003). "Molecular anatomy of the DNA damage and replication checkpoints." Radiat Res 159(2): 139-148.

Rand, T. A., Petersen, S., Du, F. and Wang, X. (2005). "Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation." Cell 123(4): 621-629.

Rapic-Otrin, V., McLenigan, M. P., Bisi, D. C., Gonzalez, M. and Levine, A. S. (2002). "Sequential binding of UV DNA damage binding factor and degradation of the p48 subunit as early events after UV irradiation." Nucleic Acids Res 30(11): 2588-2598.

Ravanat, J. L., Douki, T. and Cadet, J. (2001). "Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components." J Photochem Photobiol B 63(1-3): 88-102.

Rubbi, C. P. and Milner, J. (2003). "p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage." Embo J 22(4): 975-986.

Sambrook, J. and Russell, D. W., Eds. (2001). Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Satarug, S., Baker, J. R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, P. E., Williams, D. J. and Moore, M. R. (2003). "A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population." Toxicol Lett 137(1-2): 65-83.

Schärer, O. D. (2003). "Chemie und Biologie der DNA-Reparatur." Angewandte Chemie 115: 3052-3082.

Scherer, L. J. and Rossi, J. J. (2003). "Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA." Nat Biotechnol 21(12): 1457-1465.

Schrimpf, G., Ed. (2002). Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.

Schwerdtle, T., Seidel, A. and Hartwig, A. (2002). "Effect of soluble and particulate nickel compounds on the formation and repair of stable benzo[a]pyrene DNA adducts in human lung cells." Carcinogenesis 23(1): 47-53.

Schwerdtle, T. 2002. "Induktion oxidativer DNA-Schäden und Beeinflussung der Nukleotidexzisionsreparatur durch Arsen-, Cadmium- und Nickelverbindungen." Dissertation. Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Karlsruhe (TH).

Slebos, R. J., Li, M., Evjen, A. N., Coffa, J., Shyr, Y. and Yarbrough, W. G. (2006). "Mutagenic effect of cadmium on tetranucleotide repeats in human cells." Mutat Res 602(1-2): 92-99.

Snyder, R. D., Davis, G. F. and Lachmann, P. J. (1989). "Inhibition by metals of X-ray and ultraviolet-induced DNA repair in human cells." Biol Trace Elem Res 21: 389-398.

Southern, P. J. and Berg, P. (1982). "Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter." J Mol Appl Genet 1(4): 327-341.

Stewart, Z. A. and Pietenpol, J. A. (2001). "p53 Signaling and cell cycle checkpoints." Chem Res Toxicol 14(3): 243-263.

Sugasawa, K., Shimizu, Y., Iwai, S. and Hanaoka, F. (2002). "A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex." DNA Repair (Amst) 1(1): 95-107.

Tang, J. and Chu, G. (2002). "Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein." DNA Repair (Amst) 1(8): 601-616.

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

Troester, M. A., Herschkowitz, J. I., Oh, D. S., He, X., Hoadley, K. A., Barbier, C. S. and Perou, C. M. (2006). "Gene expression patterns associated with p53 status in breast cancer." BMC Cancer 6: 276.

Valko, M., Morris, H. and Cronin, M. T. (2005). "Metals, toxicity and oxidative stress." Curr Med Chem 12(10): 1161-1208.

Volker, M., Mone, M. J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H., van Driel, R., van Zeeland, A. A. and Mullenders, L. H. (2001). "Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo." Mol Cell 8(1): 213-224.

Waalkes, M. P. (2003). "Cadmium carcinogenesis." Mutat Res 533(1-2): 107-120.

Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D. and Stillman, B. (1994). "The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA." Nature 369(6481): 574-578.

Waldman, T., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1995). "p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells." Cancer Res 55(22): 5187-5190.

Wang, A., Gu, J., Judson-Kremer, K., Powell, K. L., Mistry, H., Simhambhatla, P., Aldaz, C. M., Gaddis, S. and MacLeod, M. C. (2003). "Response of human mammary epithelial cells to DNA damage induced by BPDE: involvement of novel regulatory pathways." Carcinogenesis 24(2): 225-234.

Wani, M. A., Zhu, Q. Z., El-Mahdy, M. and Wani, A. A. (1999). "Influence of p53 tumor suppressor protein on bias of DNA repair and apoptotic response in human cells." Carcinogenesis 20(5): 765-772.

Wani, M. A., Zhu, Q., El-Mahdy, M., Venkatachalam, S. and Wani, A. A. (2000). "Enhanced sensitivity to anti-benzo(a)pyrene-diol-epoxide DNA damage correlates with decreased global genomic repair attributable to abrogated p53 function in human cells." Cancer Res 60(8): 2273-2280.

Wani, M. A., El-Mahdy, M. A., Hamada, F. M., Wani, G., Zhu, Q., Wang, Q. E. and Wani, A. A. (2002). "Efficient repair of bulky anti-BPDE DNA adducts from non-transcribed DNA strand requires functional p53 but not p21(waf1/cip1) and pRb." Mutat Res 505(1-2): 13-25.

Wassermann, K., Markovits, J., Jaxel, C., Capranico, G., Kohn, K. W. and Pommier, Y. (1990). "Effects of morpholinyl doxorubicins, doxorubicin, and actinomycin D on mammalian DNA topoisomerases I and II." Mol Pharmacol 38(1): 38-45.

WHO (2000). "Air quality guidelines for Europe." WHO regional publications. European series 91: 1-273.

WHO (2006). "Evaluation of certain food contaminants." World Health Organ Tech Rep Ser 930: 1-100.

Wilhelm, M., Wittsiepe, J., Schrey, P., Budde, U. and Idel, H. (2002). "Dietary intake of cadmium by children and adults from Germany using duplicate portion sampling." Sci Total Environ 285(1-3): 11-19.

Wilhelm, M., Eberwein, G., Holzer, J., Begerow, J., Sugiri, D., Gladtke, D. and Ranft, U. (2005). "Human biomonitoring of cadmium and lead exposure of child-mother pairs from Germany living in the vicinity of industrial sources (hot spot study NRW)." J Trace Elem Med Biol 19(1): 83-90.

Wittschieben, B. O., Iwai, S. and Wood, R. D. (2005). "DDB1-DDB2 (xeroderma pigmentosum group E) protein complex recognizes a cyclobutane pyrimidine dimer, mismatches, apurinic/apyrimidinic sites, and compound lesions in DNA." J Biol Chem 280(48): 39982-39989.

Yang, P. M., Chiu, S. J., Lin, K. A. and Lin, L. Y. (2004). "Effect of cadmium on cell cycle progression in Chinese hamster ovary cells." Chem Biol Interact 149(2-3): 125-136.

Youn, C. K., Kim, S. H., Lee do, Y., Song, S. H., Chang, I. Y., Hyun, J. W., Chung, M. H. and You, H. J. (2005). "Cadmium down-regulates human OGG1 through suppression of Sp1 activity." J Biol Chem 280(26): 25185-25195.

Zharkov, D. O. and Rosenquist, T. A. (2002). "Inactivation of mammalian 8-oxoguanine-DNA glycosylase by cadmium(II): implications for cadmium genotoxicity." DNA Repair (Amst) 1(8): 661-670.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

(+)-*anti*-BPDE	(+)-*anti*-Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid
(±)-*anti*-BPDE	Racemat aus (+)- und (-)-*anti*-BPDE
6-4-PP	6-4-Photoprodukt
8-oxo-Guanin	7,8-dihydro-8-oxo-Guanin
A	Adenin
A549	menschliche Lungenadenokarzinomzelllinie
ActD	Actinomycin D
AGO2	*Argonaute2*
Ape1	AP-Endonuklease 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AP-Stelle	Apurin-/Apyrimidin-Stelle
ATM	*Ataxia telangiectasia mutated*
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	*ATM and Rad3 related*
B[a]P	Benzo[a]pyren
B[g]CDE	Benzo[g]chrysendiolepoxid
BER	Basenexzisionsreparatur
BPDE	Benzo[a]pyrendiolepoxid
BRCA-1	*breast cancer protein 1*
BRCT	C-terminale Domäne von BRCA-1
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CAK	Cdk aktivierende Kinase
Cd(II)	Cadmium (II)
Cdc25A/Cdc25C	*cell division cycle 25 phosphatase A/C*
Cdk	*Cyclin dependent kinase*
CDKI	Cdk Inhibitor
cDNA	*copy* DNA

Chk1/Chk2	*checkpoint kinase 1/2*
CIP	*Cdk-interacting protein*
CPD	Cyclobutanpyrimidindimere
CSA/CSB	Cockayne Syndrom Protein A/B
Ct	*threshold cycle*
DAPI	4´,6-Diamidino-2-phenylindol
DDB1/DDB2	*damaged DNA binding protein 1/2*
DMEM	Dulbecos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERCC1	*excision repair cross-complementing factor 1*
F 12	F 12 Kulturmedium
FDP	Formamid-Denaturierungspuffer
FITC	Fluorescein-5-isothicyanat
FKS	fötales Kälberserum
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
G418	Geneticin
GADD45	*growth arrest DNA damage induced gene 45*
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase
GGR	globale genomische Reparatur
HCT116	menschliche Kolonkarzinomzelllinie
HeLa S3	menschliche Zervixkarzinomzelllinie
hHR23B	*human homologue of Rad23 B*
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie

HPV	humane Papillomaviren
HR	Homologe Rekombination
Hus1	*hydroxyurea-sensitive 1*
IARC	*International Agency for Research on Cancer*
INK4	Inhibitor von Cdk4
IR	ionisierende Strahlung
J	Joule
kDa	Kilodalton
KIP	Kinaseinhibitor-Protein
M	molar
MCF7	humane Brustkrebszelllinie
MDB	*membrane desalting buffer*
MDM2	*murine double minute 2*
miRNA	*microRNA*
MMLV	*Moloney Murine Leukemia Virus*
MMR	*Mismatch*-Reparatur
MMS	Methylmethoxysulfonat
MNU	N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
Mre11	*meiotic recombination protein 11*
mRNA	*messenger RNA*
MT	Metallothionein
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
Nbs1	*Nijmegen breakage syndrome protein 1*
neo	Neomycin
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NES	*nuclear export signal*
NHEJ	*non-homologous end joining*
NLS	*nuclear localization signal*
NRM-Komplex	Nbs1/Rad50/Mre11-Komplex
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte

OGG1	8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase-1
Oligo(dT)	Oligodesoxythymidin
p53-pRNA	pRNA mit Konstrukt zur Expression von siRNA gegen p53
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-T	PBS mit Tween 20
PCNA	*proliferating cell nuclear antigen*
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRb	Retinoblastom Protein
pRNA	pRNA-H1.1/neo-Plasmid
PTWI	*provisional tolerable weekly intake*
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	relative Genexpression
Rad (1,9,17,50)	bei IR-sensitiven Hefezellen fehlende Proteine (*radiation)*
RFC	Replikationsfaktor C
RFU	relative Fluoreszenzeinheit
RIPA	*radioimmunoprecipitation assay*
RISC	*RNA induced silencing complex*
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNA-Pol II	RNA-Polymerase II
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP	*reversed phase*
RPA	Replikationsprotein A
rRNA	ribosomale RNA
Rt	Retentionszeit
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	*short hairpin RNA*
siRNA	*short interfering RNA*
SMC1	*structural maintainance of chromosomes protein 1*
SOD	Superoxiddismutase
Sp1	*specificity protein 1*
T	Thymin
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCR	transkriptionsgekoppelte Reparatur
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tetrol I-1	r-7,t-8,t-9,c-10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyren
Tetrol I-2	r-7,t-8,t-9,t-10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyren
TFIIH	Transkriptionsfaktor II H
THF	Tetrahydrofuran
TLS	*translesion synthesis*
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	*Unit*
Ub	Ubiquitin
UV	ultraviolett
V79	Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wt	Wildtyp
XAB2	*XPA binding protein 2*
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
XPA bis XPG, XPV	Xeroderma Pigmentosum Protein A bis G und V

8.2 Chemikalien

Bezeichnung:	**Lieferant:**
(+)-*anti*-BPDE (> 99,8 %)	A. Seidel (Grimmer-Stiftung, Großharnsdorf)
2-Mercaptoethanol	Serva (Heidelberg)
2-Propanol	Roth (Karlsruhe)
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1; 40 %)	Roth (Karlsruhe)
Actinomycin D	Invitrogen (Karlsruhe)
Agarose	Roth (Karlsruhe)
Alcian Blue 8GX	Fluka Biochemika (Buchs, Schweiz)
AlexaFluor488-anti-Maus-Antikörper (Ziege)	Invitrogen (Karlsruhe)
Ammoniumacetat	Merck (Darmstadt)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
Anti-Aktin-Antikörper (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Anti-Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer-Antikörper (Maus)	MBL (Naka-ku Nagoya, Japan)
Anti-Kaninchen-IgG-HRP-Antikörper (Ziege)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Anti-Maus-HRP-Antikörper (Ziege)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Anti-p53-Antikörper DO7 (Maus)	Dako (Glostrup, Dänemark)
Anti-XPC-Antikörper H300 (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Aprotinin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bio-Rad-Protein-Assay-Reagenz	Bio-Rad (München)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Cadmiumchlorid (99,9 %), $CdCl_2$	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Casyton, isotone Salzlösung	Schärfe System (Reutlingen)
DAPI-Färbelösung (CyStainDNA)	Partec (Münster)
dATP, dGTP, dCTP, dTTP (je 100mM)	Invitrogen (Karlsruhe)
Dikaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4 * 3 H_2O	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Dinatriumhydrogenphosphat, Na_2HPO_4	Merck (Darmstadt)
DMEM	Sigma-Aldrich (Steinheim)
ECL Western Blot Detektionsreagenzien	GE Healthcare (Freiburg)
Ethanol (Rotisol)	Roth (Karlsruhe)
Ethanol, p. a., 96 %, vergällt	Bundesmonopolverwaltung für Branntwein (Offenbach)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz-2-hydrat (EDTA)	Riedel-de Haen (Seelze)
First Strand cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad (München)
Formaldehyd, 37 %	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Formamid	Fluka Biochemika (Buchs, Schweiz)
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Geneticin (G418)	Invitrogen (Karlsruhe)
Giemsa, Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Roth (Karlsruhe)
Glutardialdehyd	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Immersionsöl	Zeiss (Oberkochen)
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad (München)
Isoamylalkohol	Merck (Darmstadt)
Kalbsthymus-DNA (research grade)	Serva (Heidelberg)
Kaliumchlorid, KCl	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	Merck (Darmstadt)
Kaliumhexacyanoferrat(II), $K_4Fe(CN)_6 * 3\ H_2O$	Merck (Darmstadt)
Kaliumhexacyanoferrat(III), $K_3Fe(CN)_6$	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydroxid, KOH	Merck (Darmstadt)
Leupeptin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Lipofectamine	Invitrogen (Karlsruhe)
Magermilchpulver	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid, $MgCl_2$	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Methanol Chromasolv	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
Molekulargewichtsmarker peqGOLD IV	Peqlab (Erlangen)
Molekulargewichtsmarker RPN 800	GE Healthcare (Freiburg)
MOPS	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid, NaCl	Roth (Karlsruhe)
Natriumdesoxycholat	Fluka (Buchs, Schweiz)
Natriumhydrogencarbonat, $NaHCO_3$	Roth (Karlsruhe)
Natronlauge, NaOH	Roth (Karlsruhe)
Nutrient Mixture F12 (HAM)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
pCI-neo	Promega (Mannheim)
PCR-Primer	MWG Biotech (Ebersberg)
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pepstatin A	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth (Karlsruhe)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva (Heidelberg)
Plus Reagent	Invitrogen (Karlsruhe)
Primer $p(DT)_{15}$	Roche (Mannheim)
pRNA-H1.1/neo	GenScript Corp. (Piscataway, USA)
Proteinase K	Merck (Darmstadt)
pSV-β-Gal	Promega (Mannheim)
Rinderserumalbumin (BSA)	Fluka Biochemika (Buchs)
RNase A	Roche (Mannheim)
RNase Out Ribonuklease Inhibitor	Invitrogen (Karlsruhe)
Salzsäure, HCl	Kraft (Duisburg)
SDS	Roth (Karlsruhe)
SDS-Lösung (10 %)	Merck (Darmstadt)
Silikonfett	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Sterilium	Bode Chemie (Hamburg)
Super Script II Reverse Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
0,1 M DTT	
5x First Strand Buffer	
TEMED	Roth (Karlsruhe)

Tetrahydrofuran (THF)	Merck (Darmstadt)
Tetrol I-1 (HPLC grade)	NCI (USA)
Trichlormethan	Roth (Karlsruhe)
Triethylamin	VWR (Darmstadt)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Fluka (Buchs, Schweiz)
Trypsin, 10x	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)
Tween-20 SigmaUltra	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Vectashield Mounting Medium mit DAPI	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
VenorGeM Mykoplasmen-Nachweis	Minerva Biolabs (Berlin)
X-Gal	Promega (Mannheim)

8.3 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen werden mit doppelt destilliertem Wasser bzw. mit Reinstwasser angesetzt. Die Medien, Lösungen und Puffer für die Zellkultur werden zusätzlich sterilfiltriert.

Zellkultur:

Kulturmedium für HeLa S3 Zellen	Nutrient Mixture F12 (HAM), 10 % FKS 100 U Penicillin/ml 100 µg Streptomycin/ml
Kulturmedium für A549, MCF7 und HCT116 Zellen	DMEM, 10 % FKS 100 U Penicillin/ml 100 µg Streptomycin/ml
PBS (pH 7,4)	100 mM NaCl 4,5 mM KCl 7 mM Na_2HPO_4 3 mM KH_2PO_4
PBS mit EDTA	0,5 mM EDTA in PBS
PBS mit FKS	5 % FKS in PBS
Trypsin-Lösung	0,25 % Trypsin in PBS mit EDTA

β-Galaktosidase-Aktivität:

PBS	siehe oben (Zellkultur)
Glutaraldehyd-Lösung	0,25 % in PBS

Reaktionspuffer	2 mM $MgCl_2$ 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ * 3 H_2O 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ in PBS
X-Gal-Lösung	1 mg/mL X-Gal in Reaktionspuffer

RNA-Elektrophorese:

MOPS pH 7,0 (20x)	400 mM MOPS 100 mM Na-Acetat 10 mM EDTA
Formamid-Denaturierungspuffer (FDP)	54 µl Wasser 35 µl Formaldehyd (37 %) 10 µl MOPS (20x) 100 µl Formamid (rekristallisiert) 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)

Zellextrakt:

RIPA-Puffer	10 mM Tris pH 7,6 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % Triton X-100 1 % Na-Desoxycholat 0,1 % SDS 1 mM PMSF je 1 µg/ml Leupeptin, Aprotinin, Pepstatin A

Proteinbestimmung nach Bradford:

Bradford-Färbelösung	Bio-Rad-Protein-Assay-Reagenz 1:4,5 verdünnt in Wasser

Protein-Elektrophorese:

Lämmli-Ladepuffer (1x)	80 mM Tris pH 6,8 2 % SDS 10 % Glycerin 2 % Mercaptoethanol 0,01 % Bromphenolblau
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

Western Blot:

Transferpuffer	20 mM Tris 0,01 % SDS 192 mM Glycin 10 % Methanol
Blockierlösung	5 % Magermilchpulver 0,05 % Tween 20 in PBS
PBS	siehe oben (Zellkultur)

PBS-T	PBS mit 0,05 % Tween 20

Immunfluoreszenz:

Alcian Blue	1 mg/ml in Ethanol
PBS (pH 7,4)	1,18 mM KH_2PO_4 0,1368 M NaCl 2,15 mM KCl 8,45 mM Na_2HPO_4
Blockierlösung	3 % BSA in PBS
Waschpuffer	99,5 % PBS 0,5 % BSA 0,05 % Tween 20
Postfix-Lösung	93 % PBS 7 % Formaldehyd
Fixierlösung	95 % PBS 3 % Formaldehyd 2 % Triton X-100

DNA-Isolierung:

TBS (pH 7,4)	0,0027 M KCl 0,137 M NaCl 0,025 M Tris
TE-Puffer (pH 8,0)	0,01 M Tris-HCl pH 8,0 0,001 M EDTA
Proteinase K-Lösung	20 mg/ml in H_2O bidest. (Aliquots gelagert bei -20 °C)

RNase A-Lösung (DNase-frei)	10 mg/ml in H_2O bidest. 1 h bei 90 °C erhitzt (Aliquots gelagert bei -20 °C)
Extraktionspuffer (pH 8,0)	0,01 M Tris-HCl pH 8,0 0,1 M EDTA 20 µg/ml RNase A 0,5 % SDS
Fällungsreagenz	1 Vol Ethanol 0,2 Vol 10 M NH_4Acetat

HPLC-Analyse:

Tetrol I-1 Stammlösung	1 mg in 10 ml THF/5 % Triethylamin, gelagert bei -80 °C
Tetrol I-1 Standardlösungen	Verdünnung der Stammlösung mit H_2O bidest., jeweils frisch zubereitet
Kalbsthymus-DNA-Lösung	1 mM in H_2O bidest., jeweils frisch zubereitet

8.4 Geräte

Bezeichnung:	Modell/Hersteller:
Auflichtmikroskop	Axiovert 25, Carl Zeiss (Oberkochen)
Auswertesoftware (Mikroskop)	Axio Vision 4.5, Carl Zeiss (Oberkochen)
Autoklav	Varioklav 75 S, H+P (Oberschleißheim)
Bildauswertesoftware	Aida, Raytest (Straubenhardt)
Biophotometer	Eppendorf (Hamburg)
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 (Agarose)	Modell B2, Peqlab (Erlangen)
Elektrophoresekammer (PAGE)	Hoefer SE260, Amersham Scientific (Freiburg)
Feinwaage	Micro MC 5, Sartorius (Göttingen)
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager.M1, Carl Zeiss (Oberkochen)
Geldokumentationsgerät	LAS 3000, Fuji (Tokio, Japan)
Geldokumentationsgerät	Easy Win, Herolab (Wiesloch)
Heißlufttrockenschrank	SUT 6200, Kendro (Langenselbold)
HPLC-Autosampler	Gina 50, Gynkotek (Germering)
HPLC-Datenauswertung	Gynkosoft, Gynkotek (Germering)
HPLC-Degaser	degasys DG 1310, Dionex (Germering)
HPLC-Fluoreszenzdetektor	RF 2000, Gynkotek (Germering)
HPLC-Motorsäulenschaltventil	MSV 6, Gynkotek (Germering)
HPLC-Pumpe	M480, Gynkotek (Germering)
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)

Netzgerät	Power Pac 200, Bio-Rad (München)
PCR-Thermocycler	iCycler, BioRad (München)
pH-Meter	pH320, WTW (Weilheim)
Pipettierhilfe	pipetus akku, Hirschmann (Eberstadt)
Rotator	Neolab (Heidelberg)
Schüttelinkubator	CAT SH26, CAT Ingenieurbüro (Staufen)
Semi-Dry-Blotting-Apparatur	TE 77, Amersham Scientific (Freiburg)
Spektralphotometer	Nanodrop ND 1000, NanoDrop Technologies (Wilmington, USA)
Sterilbank	Hera Safe KS 18, Heraeus (Hanau)
Stickstoffbehälter	MVE (Burnsville, USA)
Taumler	3012, GFL (Burgwedel)
Tiefkühllagergerät	HFU 686 Top, Kendro (Langenselbold)
Trockenschrank	T5042EK, Heraeus (Hanau)
Ultraschallgerät	Sonifier 250, Branson (Danbury, USA)
UV-Lampe	VL-6C, Bioblock Scientific (Illkirch Cedex, Frankreich)
UV-Radiometer	PRC Krochmann (Berlin)
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)
Zellzyklusauswertesoftware	FloMax, Partec (Münster)
Zentrifuge	Biofuge Pico, Kendro (Langenselbold)

8.5 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung:	**Lieferant:**
HPLC-Trennsäule	Luna 5µm C18 (2), 250 x 4,6 mm Phenomenex (Aschaffenburg)
HPLC-Vorsäule	Luna 5µm C18 (2), 30 x 4,6 mm Phenomenex (Aschaffenburg)
RNA-Isolierungs-Kit	NucleoSpin RNA II, Macherey-Nagel (Düren)
Chromatographiepapier	Whatman (Maidstone, UK)
Klonierungsringe	Sigma-Aldrich (Steinheim)
6-Loch-Platten	Biochrom (Berlin)
24-Loch-Platten	Sarstedt (Nümbrecht)
96-Loch-Platten	Sarstedt (Nümbrecht)
Casycups	Schärfe System (Reutlingen)
Deckgläschen, 18 mm	VWR (Darmstadt)
Dichtscheiben Sil/PTFE 1,5 mm	Trott (Kriftel)
Einfrierröhrchen	Greiner (Frickenhausen)
Gewindeglasfläschchen 1,5 ml, braun	Trott (Kriftel)
Biophotometer-Küvetten	Eppendorf (Hamburg)
Messröhrchen (3,5 ml)	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	VWR (Darmstadt)
PVDF-Membran	GE Healthcare (Freiburg)
Reaktionsgefäß (1,5 ml und 2,0 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäß (2,2 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Schraubkappen Phenolharz weiß	Trott (Kriftel)
Zellkulturschalen	Biochrom (Berlin)
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)

8.6 Transfektionsexperimente

8.6.1 Geneticin-Toleranzdosis

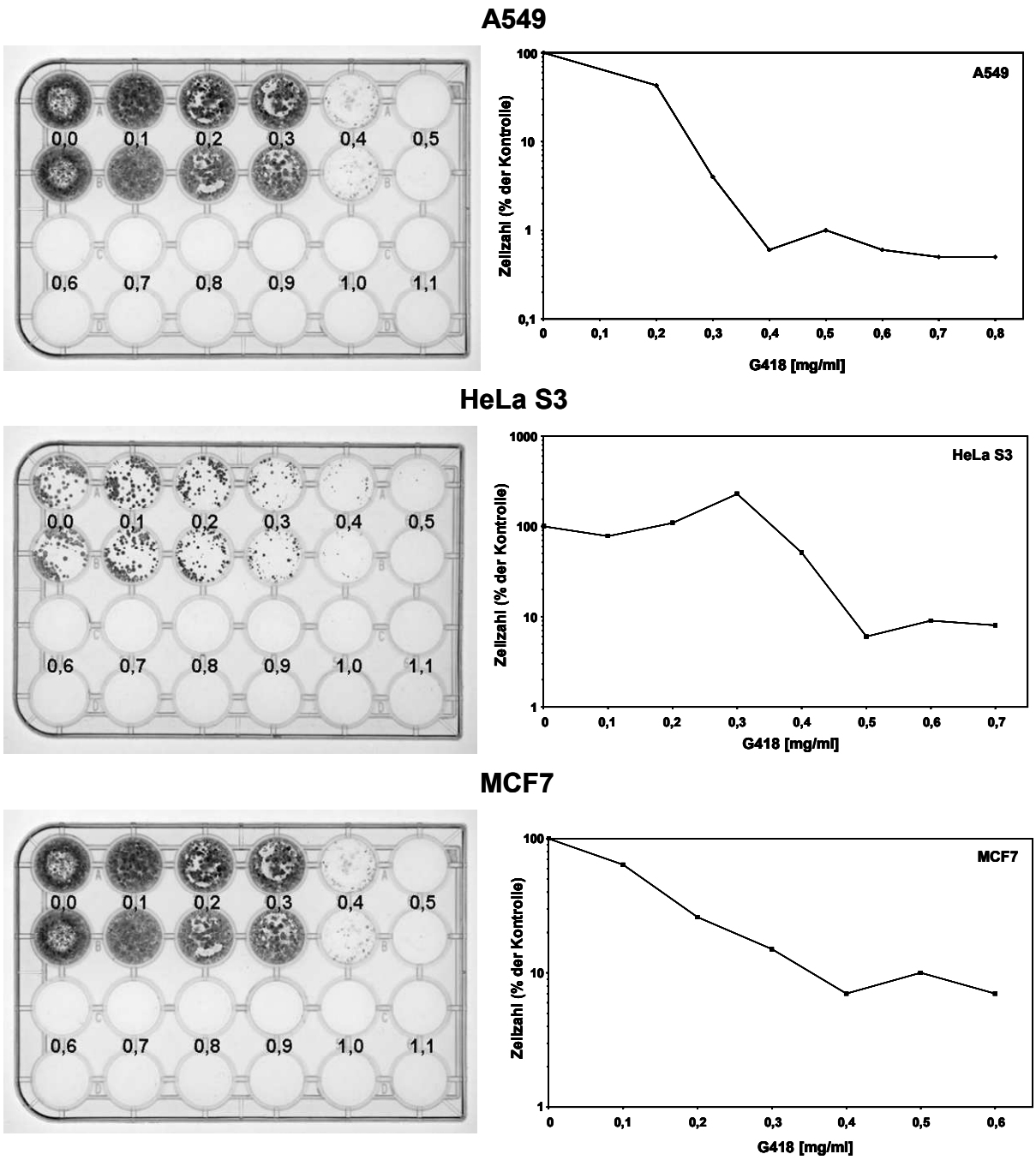

Abbildung 54: Bestimmung der G418-Toleranzdosis in A549, HeLa S3 und MCF7 Zellen. Auf der linken Seite sind die Vorversuche in 24-Loch Mikrotiterplatten dokumentiert. Auf der rechten Seite sind die Ergebnisse der Versuche in 60 mm Schalen dargestellt. Weitere Erläuterungen unter „Material und Methoden“.

8.6.2 Verwendete Plasmide

Für die Etablierung der Transfektionsmethode wurden die Plasmide pSV-β-Gal und pCI-neo (Promega) verwendet. Für die RNAi-Versuche wurde das Plasmid pRNA-H1.1/neo (GenScript) mit einem DNA-Konstrukt das für shRNA kodiert, die gegen p53 gerichtet sind, verwendet (Abbildung 55). Die Sequenz des Konstrukts wurde der Literatur entnommen (Brummelkamp et al., 2002). Die Kontrollzellen wurden mit dem leeren Plasmid pRNA-H1.1/neo transfiziert.

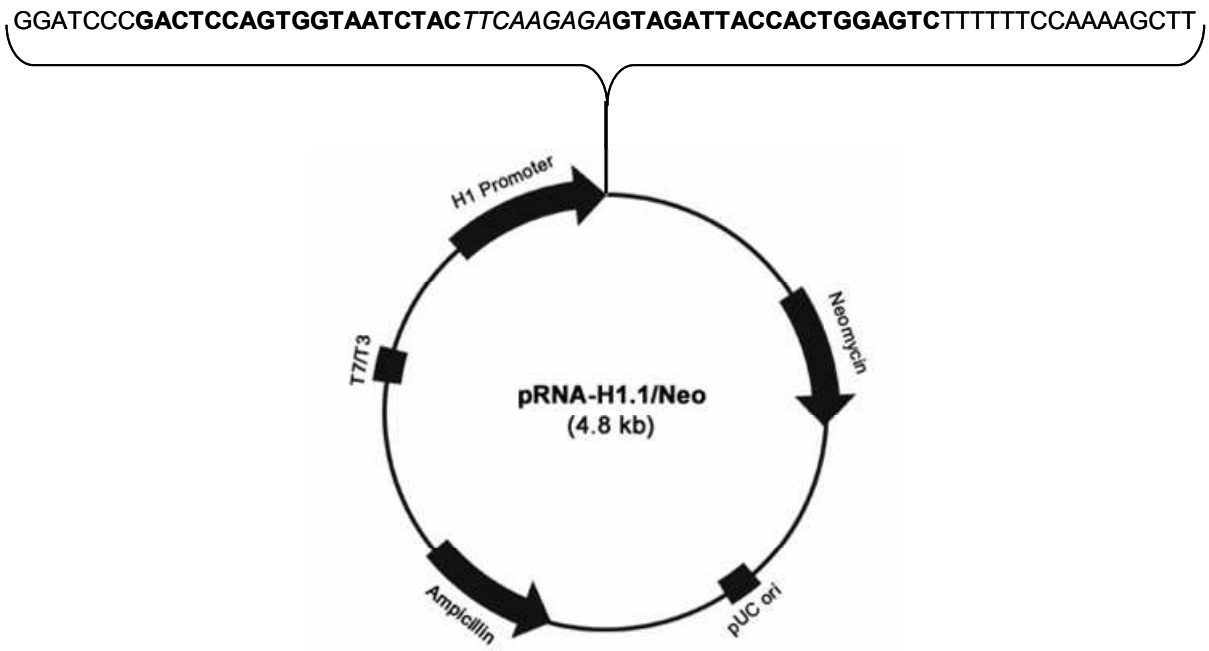

Abbildung 55: pRNA-H1.1/Neo-Plasmid mit Sequenz des DNA-Konstrukts (fett: siRNA-Sequenz, kursiv: Haarnadelschleife).

8.6.3 Transfektionseffizienz

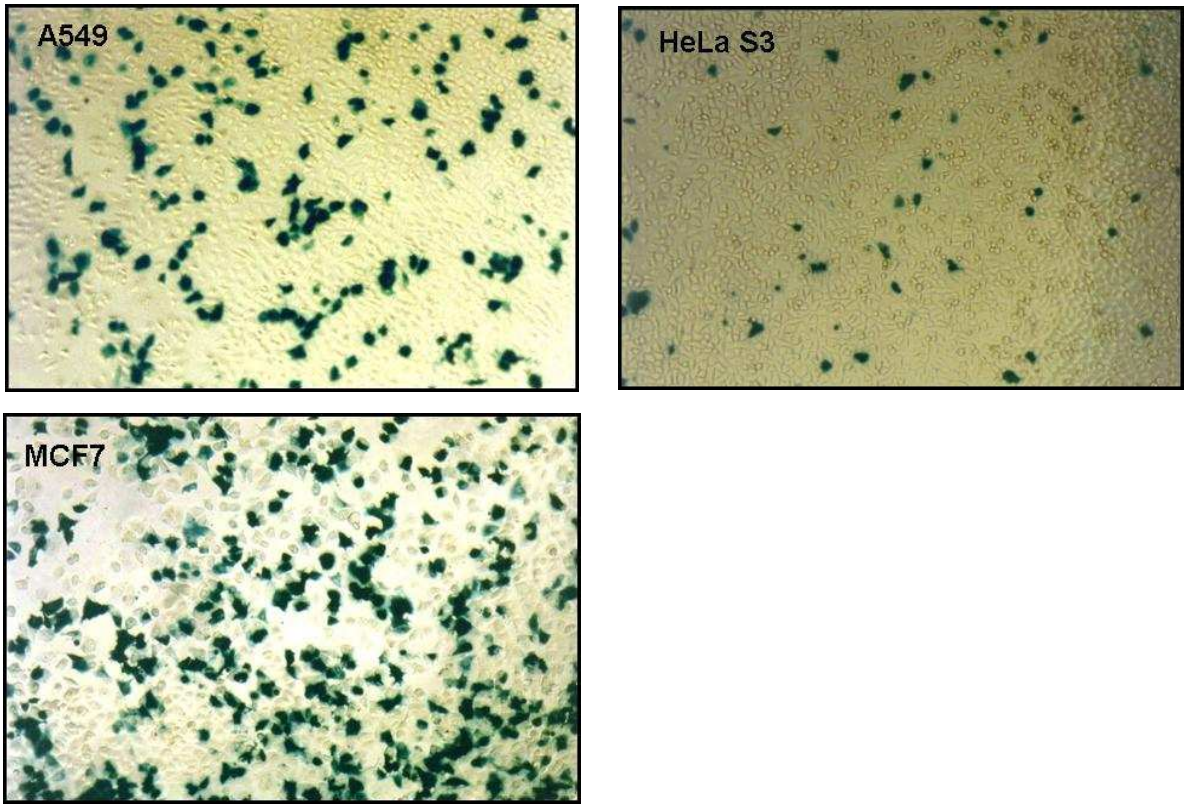

Abbildung 56: Mikroskopische Aufnahmen zur Dokumentation der Transfektionseffizienz. Weitere Erläuterungen unter „Material und Methoden“.

8.7 Bestimmung der relativen Genexpression

8.7.1 RNA-Integrität

Die qualitative Kontrolle der RNA-Isolierung erfolgt über eine denaturierende RNA-Gelelektrophorese. Da die ribosomale RNA (rRNA) den größten Anteil an der Gesamt-RNA ausmacht und eine definierte Größe besitzt, weisen die zwei scharfen Banden der 28 S rRNA und der 18 S rRNA auf eine gute Integrität und geringe Denaturierung der Proben hin. In Abbildung 57 ist das Beispiel einer denaturierenden RNA-Gelelektrophorese dargestellt.

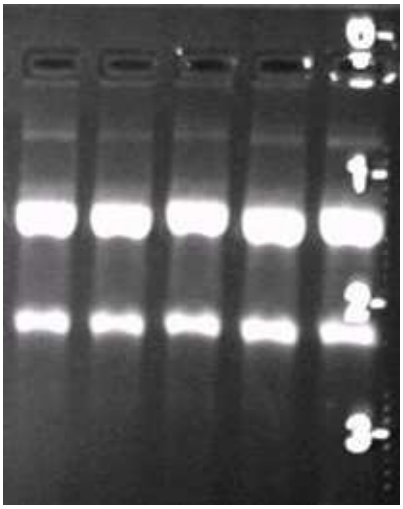

Abbildung 57: Denaturierende RNA-Gelelektrophorese.

Weitere Erläuterungen unter „Material und Methoden“.

8.7.2 PCR-Analysenprogramm

Tabelle 1: Analysenprogramm der Real-Time PCR.

Zyklus (Anzahl)	Schritt	Prozess	Temperatur (°C)	Zeit (min:s)
1 (1x)	1	Aktivierung der Polymerase	95,0	1:30
2 (40x)	1 2 3	Denaturierung Primer-Anlagerung Elongation Datengewinnung und Echtzeitanalyse	95,0 60,0 72,0	0:30 1:00 0:15
3 (1x)	1	Denaturierung	95,0	1:00
4 (1x)	1	Zusammenlagerung	60,0	1:00
5 (70x)	1	Schmelzkurvenanalyse und Datengewinnung	60,0 Steigerung um 0,5 °C je Schritt	0:10
6 (1x)	1	Ende	4,0	∞

8.7.3 PCR-Primersequenzen

GAPDH reverse: 5'- GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG -3'

GAPDH forward: 5'- CTG CAC CAC CAA CTG CTT AG -3'

p48 reverse: 5'- GCT GGC TTT CCC TCT AAC CTG -3'

p48 forward: 5'- CCT GAA CCC ATG CTG TGA TTG -3'

XPC reverse: 5'- GGC CAC GCG GTG TAG AT -3'

XPC forward: 5'- CGT GGA CGG GAA GGT GC -3'

p21 reverse: 5'- GTA CCA CCC AGC GGA CAA GT -3'

p21 forward: 5'- CCT CAT CCC GTG TTC TCC TTT -3'

p53 reverse: 5'- TGA GTT CCA AGG CCT CAT TCA -3'

p53 forward: 5'- CCC TTC AGA TCC GTG GGC -3' (Korz et al., 2002)

8.7.4 cDNA-Verdünnungsreihen

In Abbildung 58 sind die cDNA-Verdünnnungsreihen mit den Primern für GAPDH, p21, p48 und XPC in 1:2 Verdünnungsschritten und in Abbildung 59 am Beispiel von p53 die resultierende Auftragung zur Ermittlung der PCR-Effizienz sowie in Tabelle 2 die ermittelten Effizienzen dargestellt.

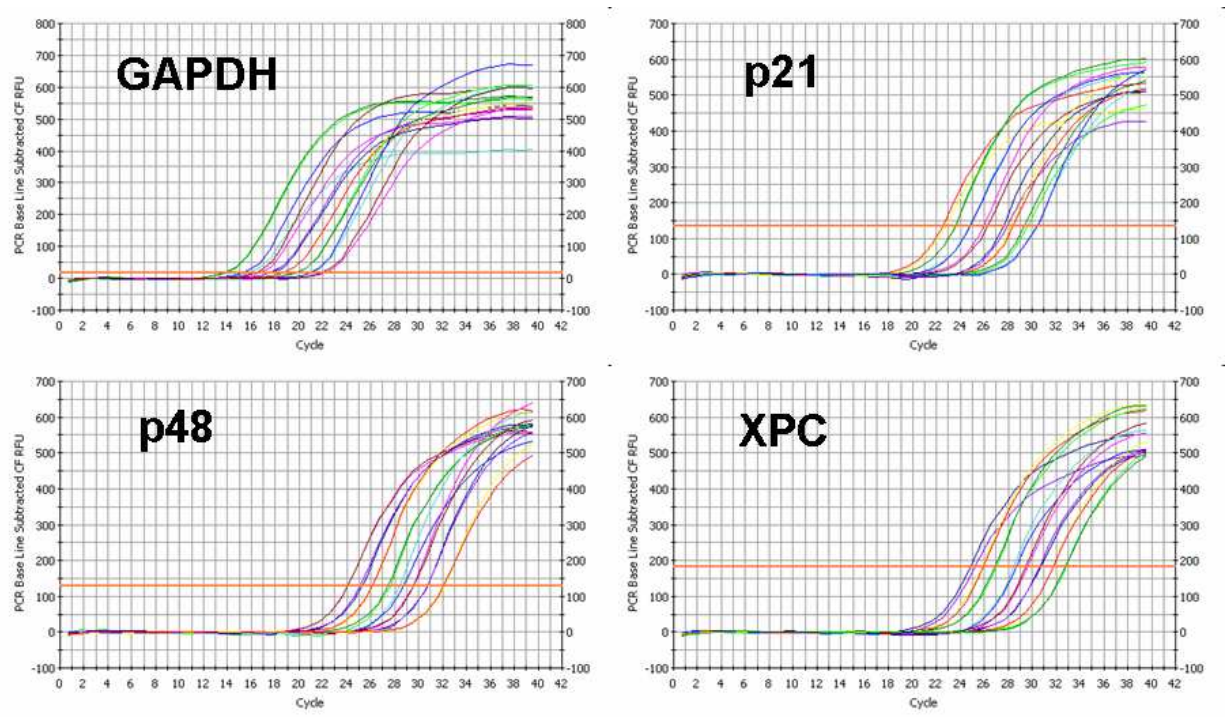

Abbildung 58: cDNA-Verdünnungsreihen für GAPDH, p21, p48 und XPC.

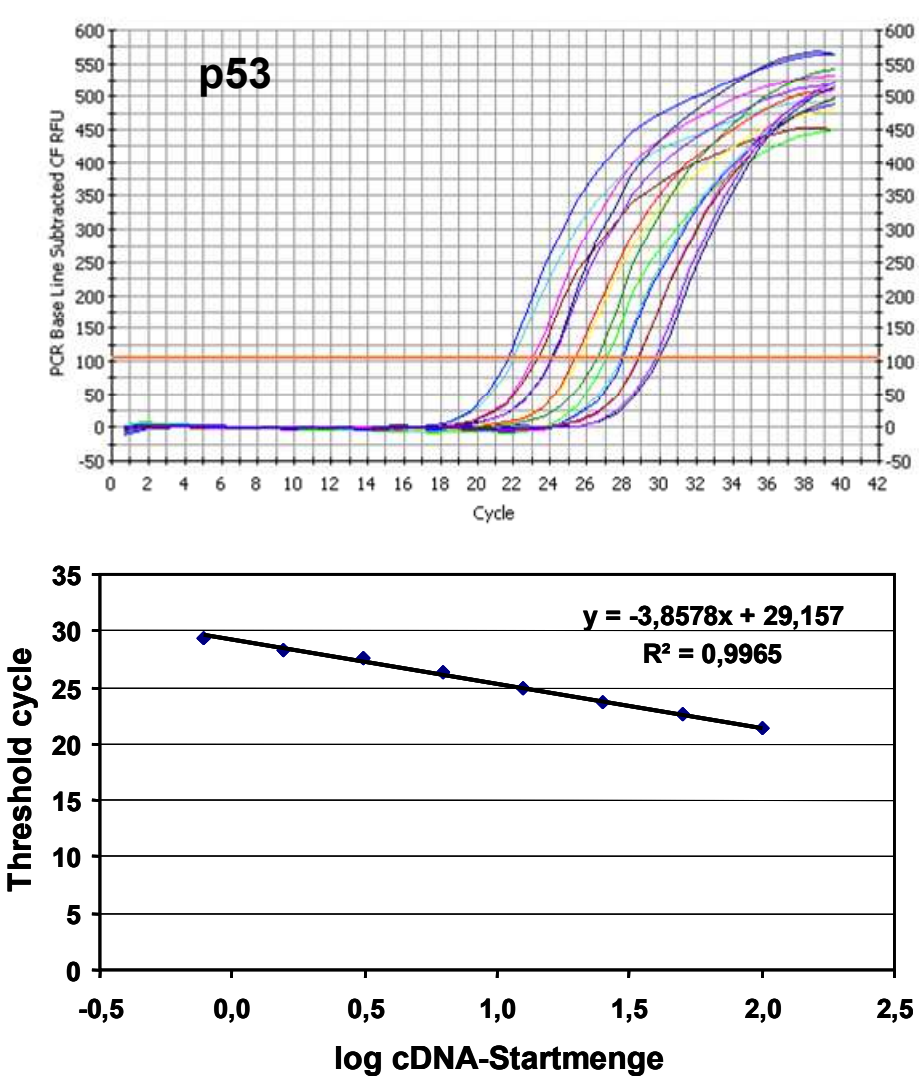

Abbildung 59: cDNA-Verdünnungsreihe und Auswertung am Beispiel von p53.

Tabelle 2: PCR-Effizienzen der verwendeten Primerpaare.

Primerpaar	GAPDH	p21	p48	XPC	p53
Effizienz	1,843	1,823	1,840	1,843	1,816

8.8 HPLC-Analyse

8.8.1 Analysenprogramm

Tabelle 3: HPLC-Analysenprogramm.

Schritt	Zeit (min)	Anweisung
1	-10,0	Motorsäulenschaltventil aus
2	-10,0	Fluss 1,0 ml/min 100 % Fließmittel A (Wasser)
3	0,0	Fluoreszenzdetektor Nullabgleich Ex. 344 nm, Em. 398 nm, Empfindlichkeit: hoch
4	0,0	Injektion von 1,0 ml Probe
5	0,0	Beginn der Datenaufnahme
6	5,0	Fluss 0,5 ml/min 100 % Fließmittel A (Wasser)
7	6,0	Fluss 0,5 ml/min 100 % Fließmittel B (20 % Methanol in Wasser)
8	16,0	Fluss 0,5 ml/min 100 % Fließmittel B (20 % Methanol in Wasser)
9	16,0	Motorsäulenschaltventil ein (d.h. Kopplung der Vorsäule mit der Trennsäule)
10	16,0	Fluss 1,0 ml/min 100 % Fließmittel C (55 % Methanol in Wasser)
11	40,0	Fluss 1,0 ml/min 100 % Fließmittel C (55 % Methanol in Wasser)
12	40,0	Ende der Datenaufnahme
13	40,0	Ende des Programms

8.8.2 Chromatogramme

In Abbildung 60 sind beispielhaft die HPLC-Chromatogramme der Versuche mit 10 und 200 nM (+)-*anti*-BPDE bei 0 h und 8 h Nachinkubationszeit in HCT116 Zellen dargestellt.

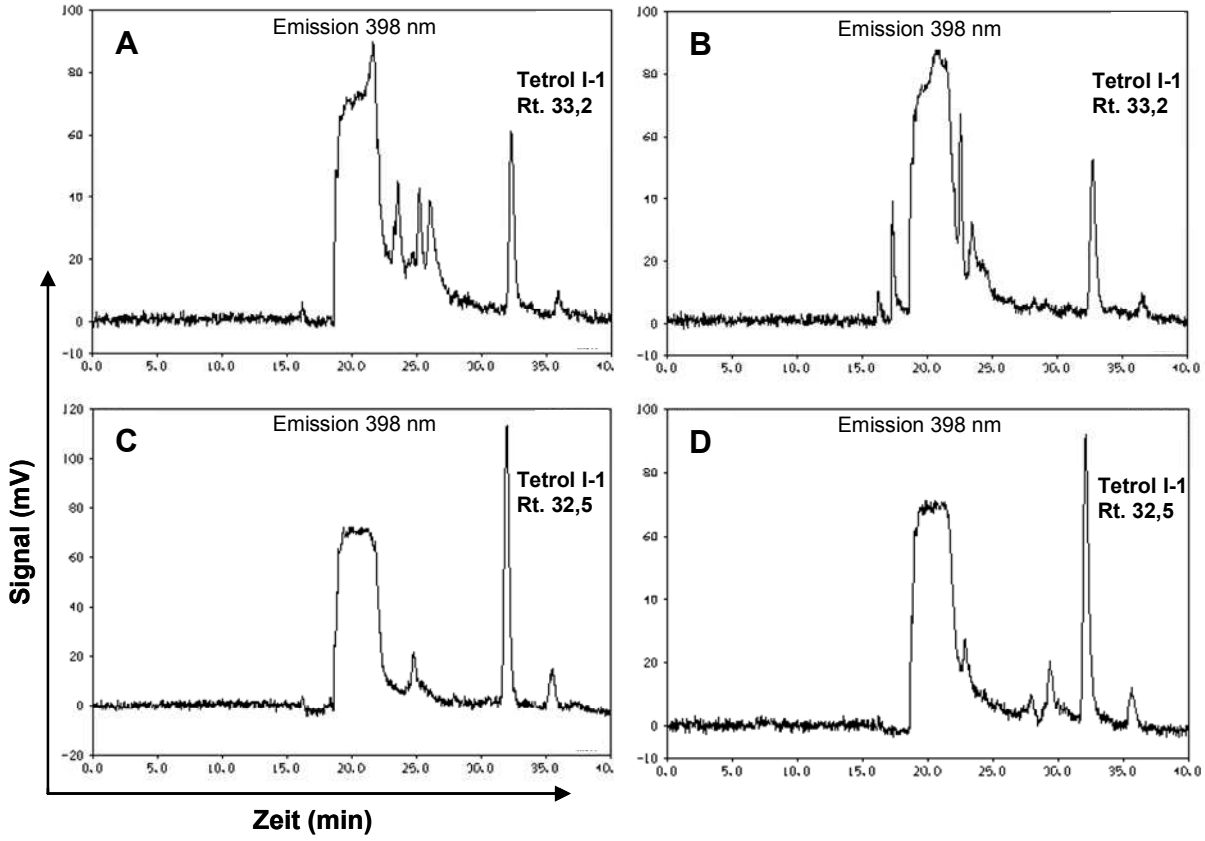

Abbildung 60: HPLC-Chromatogramme der Analyse BPDE-induzierter DNA-Addukte in HCT116 p53$^{+/+}$ Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 1 h Inkubation mit 10 nM (+)-*anti*-BPDE und (A) 0 h und (B) 8 h Nachinkubationszeit sowie mit 200 nM (+)-*anti*-BPDE und (C) 0 h und (D) 8 h Nachinkubationszeit. Rt: Retentionszeit.

8.8.3 Kalibrierung

Die Kalibrierung der HPLC-Analyse erfolgte jeweils im Bereich von 4-100 pg/ml Tetrol I-1. Hierzu wurden die frisch hergestellten Tetrol I-1–Standardlösungen mit 100 µg/ml Kalbsthymus-DNA versetzt, bei 90 °C mit HCl (Endkonzentration 0,1 M) 4 h hydrolysiert und anschließend bei Raumtemperatur neutralisiert. Die Quantifizierung erfolgte über die Peakfläche. In Abbildung 61 ist die zur Auswertung verwendete Kalibriergerade dargestellt.

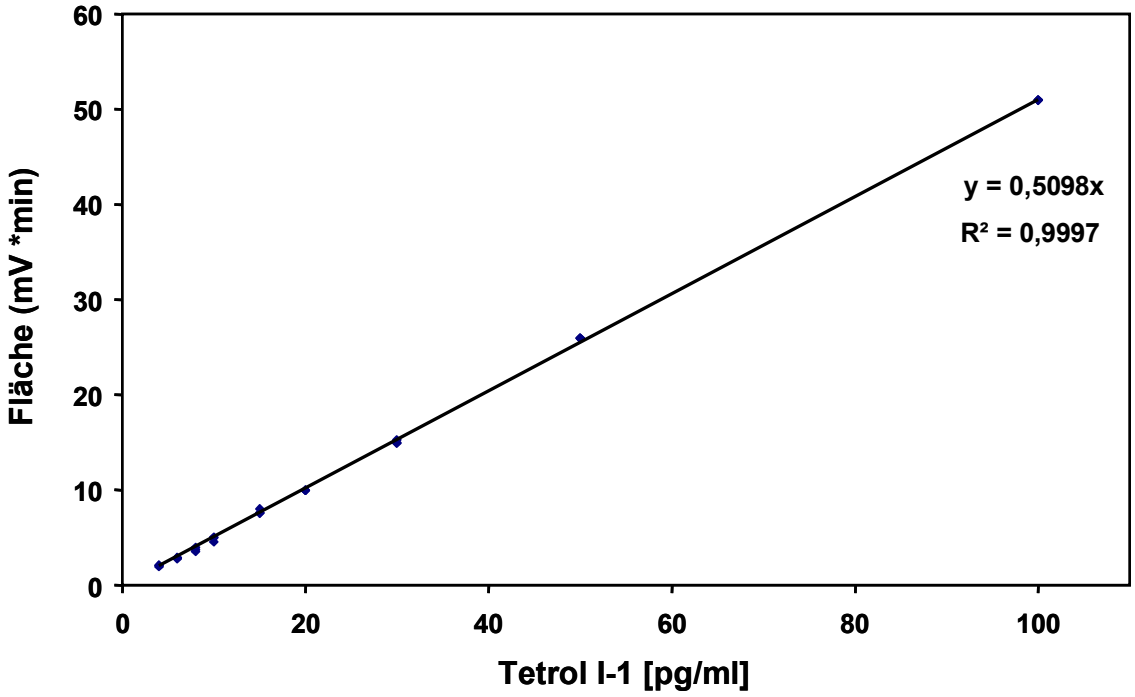

Abbildung 61: Tetrol I-1 Kalibriergerade. 100 µg Kalbsthymus DNA wurden mit 4-100 pg Tetrol I-1 versetzt, hydrolysiert, neutralisiert und über HPLC/Fluoreszenzdetektion wie in „Material und Methoden“ beschrieben analysiert.

9 Publikationsliste

Publikationen in Fachzeitschriften

Interference by toxic metal ions with zinc-dependent proteins involved in maintaining genomic stability. Hartwig, A., Asmuss, M., Blessing, H., Hoffmann, S., Jahnke, G., Khandelwal, S., Pelzer, A., Burkle, A., Food and Chemical Toxicology (2002), 40(8), 1179-1184.

Impact of copper on the induction and repair of oxidative DNA damage, poly(ADP-ribosyl)ation and PARP-1 activity. Schwerdtle, T,. Hamann, I., Jahnke, G., Walter, I., Richter, C., Parsons, J. L., Dianov, G. L., Hartwig, A., Molecular Nutrition and Food Research (2007), 51, 201-210.

Identification through microarray gene expression analysis of cellular responses to benzo(a)pyrene and its diol-epoxide that are dependent or independent of p53. Hockley, S. L., Arlt, V. M., Jahnke, G., Hartwig, A., Giddings, I., Phillips, D. H., zur Veröffentlichung eingereicht.

Veröffentlichte Abstracts

Genotoxizität von Cu(II) in kultivierten menschlichen Zellen. Schwerdtle, T,. Lohter, I., Jahnke, G., Walter, I., Hartwig, A., Lebensmittelchemie (2004), 58(6), 148-149.

Anwendung der RNA-Interferenz zur Aufklärung des Einflusses kanzerogener Metallverbindungen auf DNA-Reparaturprozesse und Zellzykluskontrolle in Säugerzellen. Jahnke, G., Hartwig, A., Lebensmittelchemie (2004), 58(6), 149-150.

Können Spurenelemente toxisch wirken? Lohter, I., Jahnke, G., Schwerdtle, T., Blessing, H., Hartwig, A., Lebensmittelchemie (2005), 59(5), 135-136.

Toxische Metalle und essentielle Spurenelemente: Molekulare Funktionen, Wechselwirkungen und aktuelle Fragestellungen in der Lebensmittelchemie. Hartwig, A., Schwerdtle, T,. Blessing, H., Jahnke, G., Thuy, C., Walter, I., Lebensmittelchemie (2006), 60(1), 10.

Untersuchungen zur Rolle von p53 in der Cadmium-vermittelten Toxizität mittels RNAi-Technik in menschlichen Zellen. Jahnke, G., Hartwig, A., Lebensmittelchemie (2006), 60(6), 160-161.

Beeinträchtigung der genomischen Stabilität nach erhöhter Kupferzufuhr. Schwerdtle, T,. Hamann, I., Jahnke, G., Richter, C., Dianov, G. L., Hartwig, A., Lebensmittelchemie (2006), 60(6), 171.

Vorträge auf Fachtagungen

Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Lebensmittelchemische Gesellschaft, Gemeinsame Regionalverbandstagung Nord-Ost und Süd-Ost, Berlin, 23.-24. März 2006, **Untersuchungen zur Rolle von p53 in der Cadmium-vermittelten Toxizität mittels RNAi-Technik in menschlichen Zellen.** Jahnke, G., Hartwig, A.

Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Jahrestagung der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie, Halle (Saale), 4.-6. Oktober 2006, **Untersuchungen zur Gentoxizität löslicher und partikulärer Cadmiumverbindungen.** Jahnke, G., Thuy, C., Schwerdtle,T., Hartwig, A.

Posterbeiträge auf Fachtagungen

33. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn, 13.-15. September 2004, Jahnke, G., Hartwig, A., **Anwendung der RNA-Interferenz zur Aufklärung des Einflusses kanzerogener Metallverbindungen auf DNA-Reparaturprozesse und Zellzykluskontrolle in Säugerzellen.**

33. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn, 13.-15. September 2004, Schwerdtle, T,. Lohter, I., Jahnke, G., Walter, I., Hartwig, A., **Genotoxizität von Cu(II) in kultivierten menschlichen Zellen.**

8. Tagung des DNA Reparatur Netzwerks, Ulm, 28. September – 1. Oktober 2004, Jahnke, G., Hartwig, A., **RNA interference: a method to investigate the influence of carcinogenic metal compounds on DNA repair processes and cell cycle control in cultured human cells.**

21. GUM Tagung, Würzburg, 5.-8. Oktober 2004, Jahnke, G., Hartwig, A., **RNA-Interferenz: eine Methode zur Aufklärung des Einflusses kanzerogener Metallverbindungen auf DNA-Reparaturprozesse und Zellzykluskontrolle in Säugerzellen.**

Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Lebensmittelchemische Gesellschaft, Gemeinsame Regionalverbandstagung Nord und Nord-Ost, Hamburg, 8. März 2005, Lohter, I., Jahnke, G., Schwerdtle, T., Blessing, H., Hartwig, A., **Können Spurenelemente toxisch wirken?**

Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Lebensmittelchemische Gesellschaft, Gemeinsame Regionalverbandstagung Nord-Ost und Süd-Ost, Berlin, 23.-24. März 2006, Schwerdtle, T., Hamann, I., Jahnke, G., Richter, C., Dianov, G. L., Hartwig, A., **Beeinträchtigung der genomischen Stabilität nach erhöhter Kupferzufuhr.**

9. Tagung der Deutschen Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung (DGDR), Hamburg 2006, 12.-15. September 2006, Jahnke, G., Dacke, A., Schwerdtle T., Hartwig, A., **Role of p53 on the formation and repair of BPDE-induced DNA adducts in HCT116 p53+/+, HCT116 p53-/-, A549 and A549 p53-knockdown cells.**

Buchbeitrag

Zinkfinger-Proteine als empfindliche Angriffspunkte für toxische Metallionen und essentielle Spurenelemente. Hartwig, A., Schwerdtle, T,. Blessing, H., Hamann, I., Jahnke, G., Thuy, C., Walter, I., in: Experimentelle Modelle der Spurenelementforschung, Windisch, W., Plitzner, C. (Hrsg.), Herbert Utz Verlag, München (2006).

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Andrea Hartwig für die Betreuung und stete Unterstützung meiner Arbeit.
Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Tanja Schwerdtle, die mir oft mit Rat und Tat zur Seite stand.
Weiterhin gilt mein Dank allen jetzigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen unseres Arbeitskreises, insbesondere Frau Dr. Christina Thuy und Herrn Dr. Ingo Walter, mit denen mich insbesondere durch den Umzug von Karlsruhe nach Berlin vieles verbindet sowie Frau Caroline Hall für den freundschaftlichen Zusammenhalt innerhalb und außerhalb unseres Büros.
Danken möchte ich auch meiner Diplomandin Angela Dacke, die mit großem Fleiß die Ergebnisse zur Reparatur BPDE-induzierter DNA-Addukte in HCT116 Zellen erarbeitet hat.
Schließlich danke ich allen Kolleginnen und Kollegen aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Metzler aus der Zeit in Karlsruhe sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Kroh in Berlin für die stets gute Arbeitsatmosphäre.
Bedanken möchte ich mich bei Prof. Vogelstein (Johns Hopkins University, Baltimore, USA) und Prof. Schönfelder (Charité-Universitätsmedizin, Berlin) für die freundliche Überlassung der HCT116 Zelllinien.
Mein Dank gilt der Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.
Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Großeltern, die immer für mich da waren und mich in vielfältiger Weise auf meinem Weg unterstützt haben.
Meiner Frau Ines danke ich für ihre Liebe und für unsere wunderbare Tochter Lotta.