

# **Bedeutung von Rho-GTPasen bei der Regulation zellulärer Antworten auf genotoxischen Stress**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Julia Damrot**

geb. am 09.11.1977 in Cuxhaven

Mainz, 2008





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>1.1</b>	<b>Mitogen-aktivierte-Protein Kinasen (MAPK).....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1.1	SAPK/JNK.....	- 2 -
1.1.2	p38 MAP-Kinase .....	- 4 -
<b>1.2</b>	<b>Kleine GTP-bindende Proteine.....</b>	<b>- 4 -</b>
1.2.1	Rho-GTPasen .....	- 7 -
<b>1.3</b>	<b>HMG-CoA Reduktase Hemmer .....</b>	<b>- 7 -</b>
1.3.1	Clostridiale glukosylierende Toxine .....	- 8 -
<b>1.4</b>	<b>DNA-Reparatur.....</b>	<b>- 9 -</b>
1.4.1	Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER).....	- 9 -
1.4.1.1	Xeroderma Pigmentosum (XP) .....	- 11 -
1.4.1.2	Cockayne Syndrom (CS).....	- 12 -
1.4.2	DNA-Doppelstrangbruch Reparatur .....	- 12 -
1.4.3	Mechanismen der DNA-Schadenserkennung.....	- 14 -
<b>1.5</b>	<b>DNA-Crosslinking-Agenzien .....</b>	<b>- 15 -</b>
1.5.1	UV-Strahlung .....	- 15 -
1.5.2	Cisplatin.....	- 16 -
1.5.3	Transplatin.....	- 17 -
<b>1.6</b>	<b>Aufgabenstellung .....</b>	<b>- 19 -</b>
1.6.1	Teil A: DNA-schadensabhängige Aktivierbarkeit von Stress-Kinasen.....	- 19 -
1.6.2	Teil B: Lovastatin vermittelte Protektion von HUVECs vor der zytotoxischen Wirkung von ionisierender Strahlung und Doxorubicin .....	- 20 -
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>21</b>
2.1.1	Geräte/Hilfsmittel.....	21
2.1.2	Verwendete Software .....	21
2.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	22
2.1.4	Chemikalien .....	22
2.1.5	Zytostatika .....	23
2.1.6	Kits .....	23
2.1.7	Antikörper.....	23
2.1.8	Primer.....	24

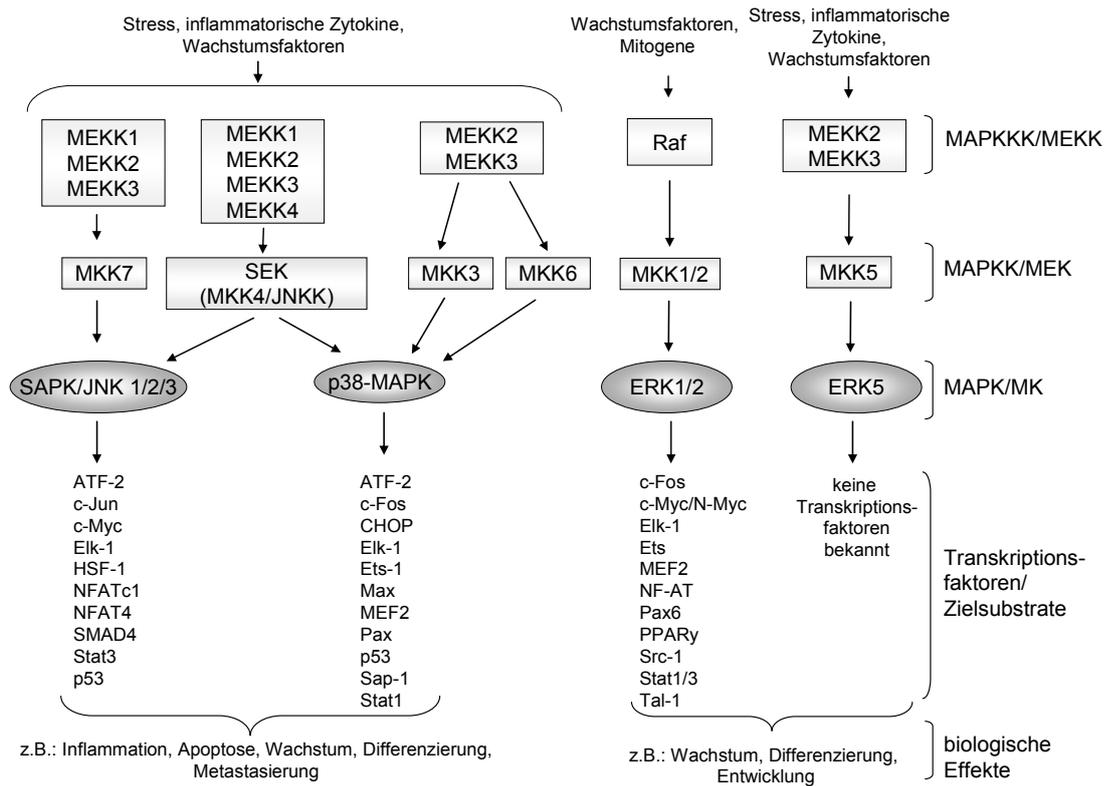
2.1.9	siRNA .....	24
2.1.10	Zelllinien.....	24
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>25</b>
2.2.1	Zellkultur.....	25
2.2.2	Behandlung von Zellen .....	25
2.2.3	Zytotoxizitätstests.....	26
2.2.4	FACS Analysen .....	26
2.2.4.1	Apoptosemessung.....	26
2.2.4.2	Zellzyklusmessung/subG1 .....	26
2.2.5	siRNA Techniken .....	27
2.2.6	Herstellung von Gesamtproteinextrakten.....	27
2.2.7	Western Blot Analyse .....	27
2.2.8	DNA-Isolation aus Zellen .....	28
2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR, modifiziert nach Mullis et al., 1986) .....	28
2.2.10	Auftrennung von Nukleinsäuren in DNA-Agarosegelen durch Gelelektrophorese.....	29
2.2.11	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren .....	29
2.2.12	South Western Analyse (Slot Blot).....	29
2.2.13	RNA-Isolation und Reverse Transkriptase Reaktion .....	30
2.2.14	Immunfluoreszenzfärbungen .....	30
2.2.14.1	FITC-Phalloidin .....	30
2.2.14.2	$\gamma$ -H2AX-Foci.....	31
2.2.15	Alkalische Comet Analyse .....	31
2.2.16	Induktiv-gekoppelte Massenspektrometrie (ICP-MS).....	32
2.2.17	ROS Messung.....	32
2.2.18	Alkalische Elution.....	33
2.2.19	Statistische Auswertungen.....	33
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>DNA-schadensabhängige Aktivierung von Stress-Kinasen .....</b>	<b>34</b>
3.1.1	Einfluss von DNA-Schadenserkennungsmechanismen auf die Aktivierbarkeit der SAPK/JNK durch Crosslink-induzierende Agenzien .....	34
3.1.2	Einfluss von NER Faktoren auf UV-C-, Cisplatin- und Transplatin- induzierte Stress-Antworten .....	41
3.1.3	Fortführende Untersuchungen an DNA-PK, CSB und XPA defekten Zellen .....	50
3.1.3.1	Untersuchungen der XPA Zellen .....	51
3.1.3.2	Stress-Antworten und DNA-Schäden in CSB Zellen nach UV-C-Bestrahlung.....	56
3.1.3.3	Cisplatin-induzierte DNA-Schäden und Stress-Antworten in CSB Zellen.....	58
3.1.3.3.1	Transplatin-induzierte DNA-Schäden .....	62
3.1.3.4	Cisplatin-induzierte DNA-Schäden in SCID Zellen (DNA-PKcs defizient) .....	64
3.1.3.5	Transplatin-induzierte DNA-Schäden in SCID Zellen.....	66

3.1.3.6	Cisplatin-induzierter ER-Stress in CSB und DNA-PKcs Zellen.....	68
3.1.4	Läsionsspezifität der Cisplatin- und Transplatin-DNA-Addukte bei der Aktivierung der SAPK/JNK.....	69
3.1.5	Einfluss einer Hemmung von Rho-GTPasen auf die SAPK/JNK Aktivierung nach Cisplatin-Exposition.....	71
3.1.6	Einfluss der Replikation auf die Aktivierung der SAPK/JNK nach Cisplatin-Behandlung....	76
<b>3.2</b>	<b>Lovastatin-vermittelte Protektion von HUVECs vor der zytotoxischen Wirkung von IR-Strahlung und Doxorubicin .....</b>	<b>77</b>
3.2.1	Pleiotroper Effekt von Lovastatin auf Faktoren des Stress-Signallings und der Apoptose nach IR-Strahlung und Doxorubicin-Behandlung.....	77
3.2.2	Einfluss von Lovastatin auf die Induktion von DNA-Schäden nach IR-Strahlung und Doxorubicin-Behandlung.....	78
3.2.3	Einfluss von Lovastatin auf Doxorubicin-induzierten oxidativen Stress und Transport des Doxorubicins.....	87
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>90</b>
<b>4.1</b>	<b>DNA-schadensabhängige Aktivierung der SAPK/JNK .....</b>	<b>90</b>
4.1.1	UV-C-induzierte Aktivierung von Stress-Kinasen in DNA-Reparatur-defizienten Zellen.....	90
4.1.2	Cisplatin- und Transplatin induzierte Aktivierung von Stress-Kinasen .....	95
4.1.3	Einfluss der DNA-Replikation auf die Cisplatin-induzierte SAPK/JNK Aktivierung.....	100
4.1.4	Läsionsspezifische Aktivierung von Stress-Kinasen .....	101
4.1.5	Einfluss von Rho-GTPasen bei der DNA-schadensabhängigen und unabhängigen Aktivierung von SAPK/JNK .....	103
<b>4.2</b>	<b>Lovastatin-vermittelte Protektion von HUVECs vor der zytotoxischen Wirkung von IR-Strahlung und Doxorubicin .....</b>	<b>104</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>121</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>122</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Mitogen-aktivierte-Protein Kinasen (MAPK)

Die Superfamilie der Mitogen-aktivierten-Protein Kinasen (MAPK) besteht aus drei Gruppen: den extrazellulär regulierten Kinasen (ERK), ERK-1; ERK-2; ERK-3/4 und 5, der Gruppe der c-Jun-N-terminalen Kinasen (SAPK/JNK 1,2 und 3) und der Gruppe der p38 MAP-Kinasen mit den Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . Sie sind Bestandteil eines komplexen intrazellulären Signalnetzwerkes und regulieren als Antwort auf externe Stimuli eine Vielzahl biologischer Prozesse (Roux & Blenis, 2004), (Abb.1). Mitogene und Wachstumsfaktoren führen dabei überwiegend zu einer Aktivierung der „extra cellular regulated kinases“ (ERK) der MAPK Familie; während zellulärer Stress, wie z.B. Hitzeschock, osmotischer Stress, reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) oder inflammatorische Zytokine, eine Aktivierung der SAPK/JNK bewirken (Minden et al., 1994; Seger & Krebs, 1995; Zanke et al., 1996). Rezeptoraktivierung ist hierbei das zentrale Starterereignis, welches zur Folge hat, dass Adaptermoleküle rekrutiert und kleine GTP-bindende Proteine aktiviert werden. Es folgt eine Reihe von sequentiellen Phosphorylierungen, die als Protein-Kinase-Kaskade bezeichnet werden. Angefangen mit den MAPKK Kinasen (MAPKKKs/MEKKs), die die MAPK Kinasen (MAPKKs/MEKs) aktivieren. Diese MAPK Kinasen phosphorylieren wiederum MAPKs (Hagemann & Blank, 2001). MAPK phosphorylieren daraufhin ihre spezifischen Zielsubstrate, die z.B. Phospholipasen, Proteine des Zytoskeletts und Transkriptionsfaktoren sind. MAPK nehmen direkten Einfluss auf zahlreiche zelluläre Prozesse, indem sie die Expression verschiedener Gene kontrollieren, die für die Inflammation, Apoptose, Wachstum und Differenzierung notwendig sind (Abb. 1).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des MAP-Kinase Signalweges mit ihren Hauptsubstraten.**

Modifiziert nach Brozovic (2007).

### 1.1.1 SAPK/JNK

Stress-aktivierte Protein-Kinasen/c-Jun-N-terminalen Kinasen (SAPK/JNK) sind Serin/Threonin Kinasen, die ihrem Namen nach durch zellulären Stress aktiviert werden und die amino-terminale Domäne des Transkriptionsfaktors c-Jun phosphorylieren. Die biologische Bedeutung der SAPK/JNK Aktivierung ist enorm groß und reicht von der Organogenese während der Mausentwicklung, über die Regulation von Immunantworten durch Einflussnahme auf die Zytokin Genexpression, Regulation der mRNA Stabilität, Zellmigration und Zytoskelett Integrität bis hin zur Entscheidung über Leben oder Tod der Zelle.

Es sind drei Gene bekannt, die für verschiedene JNK-Isoformen kodieren; jnk1, jnk2 und jnk3. jnk1 und jnk2 werden ubiquitär exprimiert, wohingegen die jnk3 Expression vorwiegend im Gehirn und in den Testis erfolgt (Yang et al., 1997). Weiterhin existieren mindestens zehn Spleissvarianten der JNK-Isoformen, welche sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden (Gupta et al., 1996; Widmann et al., 1999). Nach Aktivierung translozieren SAPK/JNK in den Zellkern und treffen dort auf ihre Substrate: c-Jun, JunB, JunD und die Transkriptionsfaktoren ATF-2, p53, NFAT4, NF-

ATc1, HSF-1, STAT3 und Elk-1 (Roux & Blenis, 2004; Vasilevskaya & O'Dwyer, 2003). Bei allen zehn SAPK/JNK-Isoformen ist das Aminosäuresequenzmotiv Thr-Pro-Tyr (T-P-Y) konserviert. Die Phosphorylierung am Threonin 183 und am Tyrosin 185 ist für die Aktivierung der SAPK/JNK notwendig und wird von zwei verschiedenen MAPKKs, der MKK4/SEK1 (Derijard et al., 1995; Sanchez et al., 1994) und der MKK7 (Holland et al., 1997; Kyriakis et al., 1991; Moriguchi et al., 1997; Tournier et al., 1997; Wu et al., 1997; Yao et al., 1997) katalysiert. Die Aktivierung der SAPK/JNK durch SEK1 und MKK7 erfolgt synergistisch; SEK1 bevorzugt Tyrosinreste und MKK7 Threoninreste als Substrat (Fleming et al., 2000; Lawler et al., 1998; Lisnock et al., 2000). Die im Kern lokalisierte MAP-Kinase Phosphatase (MKP-1) wird ebenfalls nach DNA-Schädigung durch z.B. Methanmethylnsulfonat (MMS), UV-C aktiviert und ist in der Lage die SAPK/JNK zu dephosphorylieren. Sie reguliert dadurch die Aktivität dieser Kinasen (Liu et al., 1995).

Kleine GTP-bindende Proteine der Ras- und Rho-Familie (Rho=Ras homolog) sind an der Aktivierung der SAPK/JNK beteiligt. Insbesondere für die Rho-GTPasen Cdc42 und Rac konnte eine Beteiligung an der Aktivierung der SAPK/JNK nachgewiesen werden (Coso et al., 1995; Minden et al., 1995). Rac1 und Cdc42 binden dabei in ihrer GTP-gebundenen, aktiven, Form an die p21-aktivierte Serin/Threonin Kinase (PAK). Dies löst die Autophosphorylierung der PAK aus, welche ein Bindeglied zwischen den GTPasen und den MAPKK SEK1 und MKK7 darstellt (Bagrodia et al., 1995a; Bagrodia et al., 1995b; Leung et al., 1995; Lian & Badwey, 1997; Manser et al., 1995).

Die Beobachtung, dass Behandlung von Zellen mit alkylierenden Agenzien wie MNNG und MMS (Wilhelm et al., 1997) zu einem Anstieg der SAPK/JNK Phosphorylierung führt, waren Grundlage für die Überlegungen eines DNA-schadensabhängigen Weges bei der Aktivierung von Stress-Kinasen. Ebenfalls die DNA-schädigenden Chemotherapeutika Doxorubicin, Mitomycin C, sowie Cisplatin konnten die Aktivität der SAPK/JNK induzieren (Kharbanda et al., 1995b; Levresse et al., 2000; Persons et al., 1999; Potapova et al., 1997; Sanchez-Perez et al., 2000; Sanchez-Perez, Murguia & Perona, 1998; Yoshida, 2000; Zanke et al., 1996). Auch UV-C- und ionisierende-Strahlung (IR) sind potente Aktivatoren der SAPK/JNK (Adler et al., 1995; Chen, Meyer & Tan, 1996; Liu et al., 1995; Shangary et al., 2003), wobei hierbei eine Beteiligung der Rho-GTPasen nachgewiesen werden konnte (Gnad et

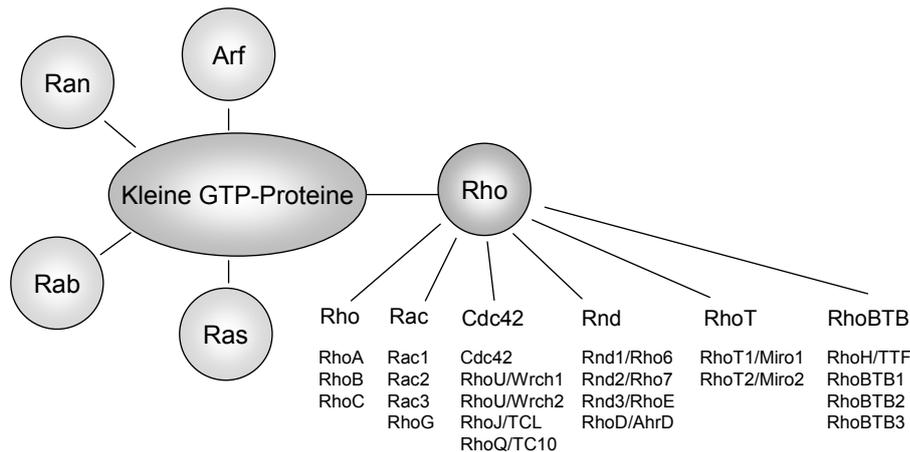
al., 2000). Durch Untersuchungen an Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) -defekten Zellen konnte die Einflussnahme von DNA-Schäden auf die SAPK/JNK Aktivierung gezeigt werden, da reparaturdefiziente Zellen eine höhere SAPK/JNK Phosphorylierung als WT-Zellen aufwiesen (Bulmer, Zacal & Rainbow, 2005). Zudem verläuft die MMS-induzierte Aktivierung der SAPK/JNK in Abhängigkeit der DNA-Schadenserkennungsproteine CSB und DNA-PKcs (Fritz & Kaina, 2006). Die exakten Mechanismen die der Genotoxin-induzierten Aktivierung der SAPK/JNK zu Grunde liegen sind immer noch unklar, aber unerlässlich für das Verständnis vieler zellulärer Stress-Reaktionen auf DNA-Schädigung.

### 1.1.2 p38 MAP-Kinase

Die p38 MAP-Kinase wird wie die SAPK/JNK durch Stress und inflammatorische Zytokine aktiviert, aber im Gegensatz zur SAPK/JNK weniger durch Mitogen-Stimuli. Die Phosphorylierung erfolgt ebenfalls durch SEK1/MKK7, sowie zusätzlich mittels MKK3 und MKK6. Die Substrate der p38 MAP-Kinase sind die zytosolische Phospholipase A2, das mitkotubuli-assoziierte Protein Tau, die Transkriptionsfaktoren ATF-1-2, MEF2A, Sap-1, Elk-1, NF- $\kappa$ B, Ets-1, p53, sowie zahlreiche MAPK-aktivierte Protein Kinasen (MKs), wie MK2-3, PRAK und MSK1/2 (Roux & Blenis, 2004). Auch die p38 MAP-Kinase ist bedeutsam bei der Regulation von Vorgängen, die mit Inflammation, osmotischem Stress, Zellzyklus-Regulation, sowie der Differenzierung in Verbindung stehen (Kyriakis & Avruch, 2001; Nebreda & Porras, 2000).

## 1.2 Kleine GTP-bindende Proteine

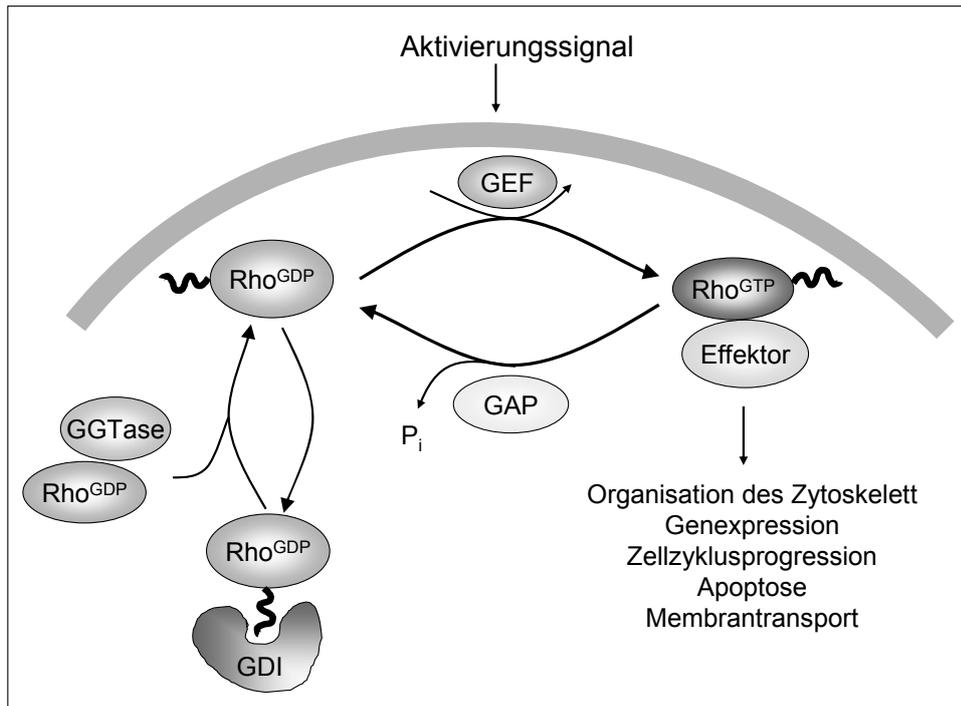
Kleine GTP-bindende Proteine sind monomere Proteine mit einer molekularen Masse von 20-40 kDa. Die Ras-Superfamilie (Ras=Rat Sarcoma) der kleinen GTP-bindenden Proteine wird in fünf Familien unterteilt: die Ras-, Rho-, Rab-, Sar1/Arf („ADP-ribosylation factor“) und die Ran-Familie (Abb. 2) (Bourne, Sanders & McCormick, 1990; Bustelo, Sauzeau & Berenjano, 2007; Garcia-Ranea & Valencia, 1998; Hall, 1990; Lazar, Gotte & Gallwitz, 1997; Takai et al., 1993; Takai, Sasaki & Matozaki, 2001).



**Abbildung 2: Die Ras-Superfamilie der kleinen GTP-bindenden Proteine.**

Modifiziert nach Bustelo et al. (2007).

Kleine GTP-bindende Proteine sind Nukleotid-gesteuerte Schalter, die zwischen einem inaktiven, GDP-gebundenen und einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand wechseln. Ein Austausch von GDP gegen GTP hat eine Konformationsänderung zur Folge, welche den Proteinen erlaubt mit Effektorproteinen zu interagieren. Dies ermöglicht die Signaltransduktion. Mitogene und Zytokine können kleine GTP-bindende Proteine über Tyrosinkinaserzeptoren, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Zytokinrezeptoren aktivieren, indem sie die Dissoziation des GDPs veranlassen und die Bindung von GTP ermöglichen. Der Aktivitätszustand der GTP-bindenden Proteine wird von zwei regulatorischen Proteinklassen kontrolliert: I) „guanine nucleotide exchange factors“ (GEFs), die den Austausch von GDP gegen GTP fördern und somit aktivierend wirken und die II) „GTPase activating proteins“ (GAPs), die die intrinsische GTPase-Aktivität stimulieren und somit inaktivierend wirken. (Bernards & Settleman, 2004; Schmidt & Hall, 2002). Eine dritte Gruppe regulatorischer Proteine, die „guanine nucleotide dissociation inhibitors“ (GDI), interagiert mit der prenylierten, GDP-gebundenen Form der Rho-GTPasen. Dadurch wird diese inaktive Form im Zytosol sequestriert (Fukumoto et al., 1990) (Abb. 3). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Aktivierung der kleinen GTPasen ist die Aktivierung der GEFs. Es gibt dabei spezifische GEFs für die einzelnen Familien der kleinen GTPasen, die einem strengen Regulationsmechanismus unterliegen (Schmidt & Hall, 2002).



**Abbildung 3: Die Regulation der Aktivität kleiner GTPasen am Beispiel der Rho-GTPasen.**

GEF=Guanine nucleotid exchange factor, GAP=GTPase activating protein, GDI=Guanine nucleotide dissociation inhibitor, GGTase=Geranylgeranyltransferase. Modifiziert nach Schmidt and Hall (2002).

Essentiell für die Funktion der Proteine der Ras-Superfamilie ist ihre posttranslationale Modifikation durch Prenylierung. Diese Modifikation ist für die Membranlokalisation der kleinen GTPasen notwendig, da sie die hydrophobe Interaktion mit dem Membrankompartiment ermöglicht. Die Membranlokalisation der kleinen GTPasen ist für ihre biologische Funktion erforderlich (Glomset, Gelb & Farnsworth, 1990). Die meisten Proteine der Ras-Superfamilie enthalten ein C-terminales CAAX-Motiv (C: Cystein, A: aliphatische Aminosäure, X: beliebige Aminosäure). Dieses Motiv dient als Erkennungssequenz für Isoprentransferasen, wie die Farnesyltransferase und Geranylgeranyltransferase-I, die eine kovalente Bindung von Isoprenresten an das Cystein katalysieren (Casey & Seabra, 1996; Glomset et al., 1990; Hancock, Paterson & Marshall, 1990; Marshall, 1993). Die Isoprenylierung der Proteine erfolgt durch Transfer von C15-Farnesyl- oder C20-Geranylgeranyleinheiten am Cystein (Bourne et al., 1990; Takai et al., 1993). Tritt Leucin als beliebige Aminosäure auf, werden die Proteine durch den Isoprenrest C-20 geranylgeranyliert, z.B. bei den Proteinen der Rho-Familie. Bei den Ras-Proteinen ist die beliebige Aminosäure X Serin oder Methionin. Dadurch werden diese Proteine C-15 farnesyliert. Eine Ausnahme stellt das dem RhoA homologe RhoB-Protein dar,

da es sowohl farnesyliert als auch geranylgeranyliert vorliegen kann (Adamson et al., 1992; Lebowitz, Davide & Prendergast, 1995).

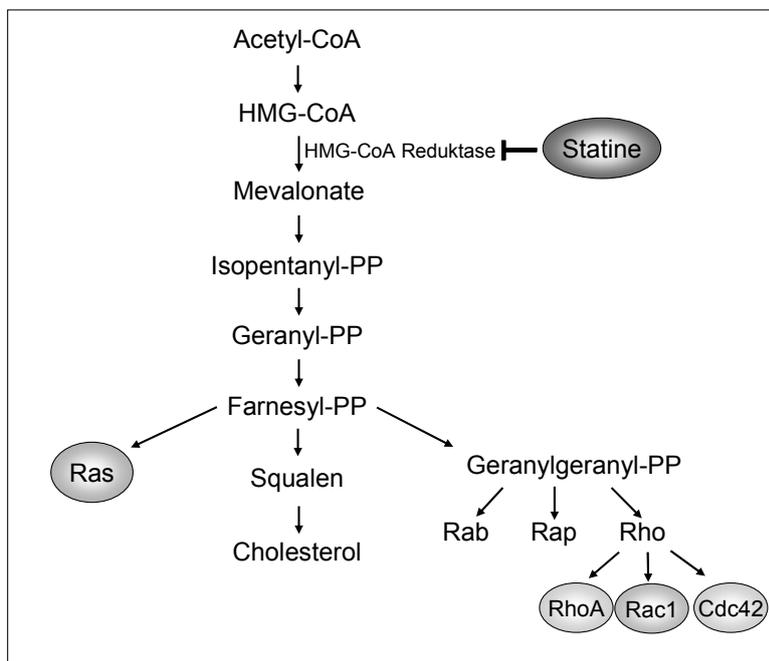
### 1.2.1 Rho-GTPasen

Die Familie der Rho-Proteine ist an einer Vielzahl biologischer Vorgänge beteiligt. Sie ist insbesondere an der Organisation des Aktinzytoskeletts, an der Kontrolle des Zellzyklus, sowie bei der Differenzierung und Apoptose beteiligt (Esteve et al., 1998; Fritz et al., 1994; Fritz & Kaina, 2000). RhoA reguliert die Integrin-Komplexe, die Formation von Stress-Fasern und die Kontraktion der glatten Muskulatur (Hirata 1992; Morii 1992). Des Weiteren führt die Inhibition von RhoA in 3T3 Zellen zu einem Block der Zellen in der G1-Phase (Yamamoto 1993). RhoB ist ebenfalls an der Organisation der Aktin-Stressfasern beteiligt und wird im Gegensatz zu RhoA nicht konstitutiv exprimiert. Rac reguliert die Aktinpolymerisation für die Ausbildung von Lamellipodien an der Zellperipherie und Cdc42 fördert die Bildung von Filopodien (Kozma et al., 1995; Ridley & Hall, 1992; Ridley et al., 1992). Alle drei GTPasen regulieren die Verankerung der Zellmatrix an die extrazelluläre Matrix (Nobes & Hall, 1995). Die Aktivierung von Rho-GTPasen kann weiterhin zu einer Stimulation von MAP Kinasen führen.

## 1.3 HMG-CoA Reduktase Hemmer

HMG-CoA Reduktase Hemmer (Statine) sind weitverbreitete Pharmazeutika, die bei der Behandlung der Hypercholesterinämie eingesetzt werden. Ursprünglich wurden sie aus den Pilzen *Penicillium citrinum* und *Aspergillus terreus* isoliert (Alberts et al., 1980; Endo, 1988; Endo, Kuroda & Tsujita, 1976). Sie verringern das Risiko des myocardialen Infarktes und Schlaganfalls (Blauw, Lagaay & Westendorp, 1998; Endres & Laufs, 2004; Endres et al., 1998; Farnier & Davignon, 1998). HMG-CoA Reduktase Hemmer reduzieren die Syntheserate von Mevalonat, der Vorstufe des Cholesterols und die des Farnesylpyrophosphats (C15), sowie Geranylgeranylpyrophosphats (C20) (Abb. 4) (Goldstein & Brown, 1990). Eine Vielzahl von Proteinen unterliegt einer posttranslationalen Modifikation durch diese Isopreneinheiten. Statine hemmen die Isoprenylierung der GTPasen und führen somit zu einer Inhibierung der Funktion dieser Signalmoleküle. Dadurch üben Statine pleiotrope Wirkungen auf eine Vielzahl verschiedener Zellen aus. Vorklinische Studien zeigten, dass Statine das Tumorwachstum und die Metastasierung hemmen

können (Kusama et al., 2002; Sebti, Tkalcovic & Jani, 1991). Sie verstärken in verschiedensten Tumorzellen die Wirkung von Chemotherapeutika, indem sie die Apoptose induzieren (Cafforio et al., 2005; Dimitroulakos et al., 2001; Wong et al., 2001). Es konnte des Weiteren für Lovastatin gezeigt werden, dass es durch Hemmung von Ras- und RhoB-vermittelten Signalwegen Einfluss auf die zelluläre Sensitivität gegenüber IR-Strahlung nimmt (Fritz, Brachetti & Kaina, 2003; Miller et al., 1993) und Endothelzellen vor strahleninduzierter Apoptose schützt (Nubel et al., 2006). Lovastatin zeigte ebenfalls inhibitorische Eigenschaften bezüglich der UV-induzierten Aktivierung von SAPK/JNK und UV-vermitteltem apoptotischem Zelltod (Bardeleben, Kaina & Fritz, 2003; Gnad et al., 2000).



**Abbildung 4: Wirkung von Statinen auf den Mevalonate-Weg und Prenylierung regulatorischer Proteine.**

Modifiziert nach Rikitake (2005).

### 1.3.1 Clostridiale glukosylierende Toxine

Toxin B ist ein Virulenzfaktor des Bakteriums *Clostridium difficile*. *Clostridium difficile* verursacht Antibiotika-assoziierte Diarrhöe und pseudomembranöse Colitis. Nach einer Therapie mit Breitspektrum-Antibiotika überwächst *Clostridium difficile* die Darmflora und beginnt mit der Sekretion der pathogenen Faktoren Toxin A und B. Diese einkettigen Proteine gehören zu der Gruppe der „Clostridialen glucosylierenden Toxine“, da sie eine inhärente Glucosyltransferase Aktivität besitzen (Aktories & Just, 2005). Die Glukosylierung erfolgt durch Übertragung eines

Glukoserestes von dem Co-Substrat UDP-Glucose auf das Proteinsubstrat, wobei RhoA, B, C, Rac1-3, RhoG, Cdc42 Substrate des Toxins sind. Die Rho-Proteine werden durch die Toxine an einem hoch konservierten Aminosäurerest modifiziert, bei RhoA und B ist es Threonin37 und bei Rac und Cdc42 Threonin35 (Just et al., 1995a; Just et al., 1995b). Dieser Aminosäurerest befindet sich in der Effektorregion der GTPasen. Die Glukosylierung führt dazu, dass die GTPase-Effektor Interaktion blockiert ist (Abb. 5). Da Rho-GTPasen wichtige Regulatoren des Aktin-Zytoskelettes sind, führt ihre Inaktivierung zu einer Aktin-Reorganisation, welche zu einer Abrundung der behandelten Zellen führt.

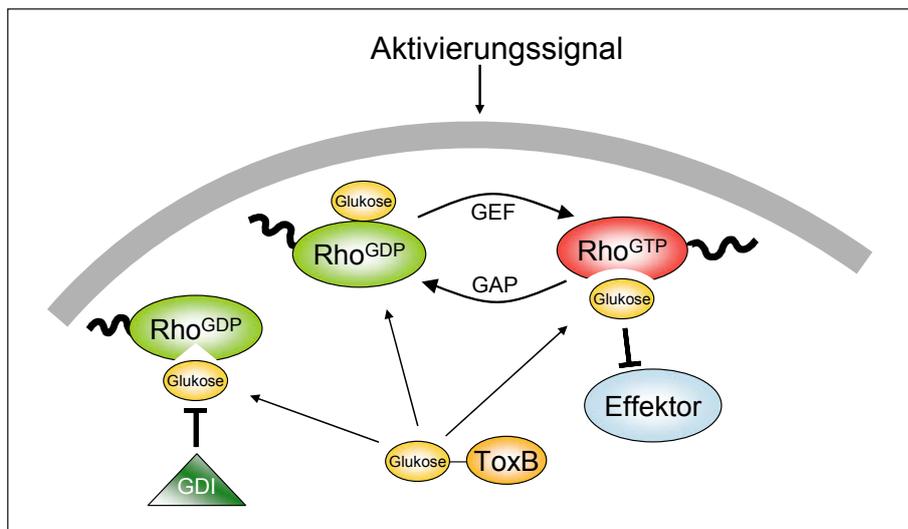


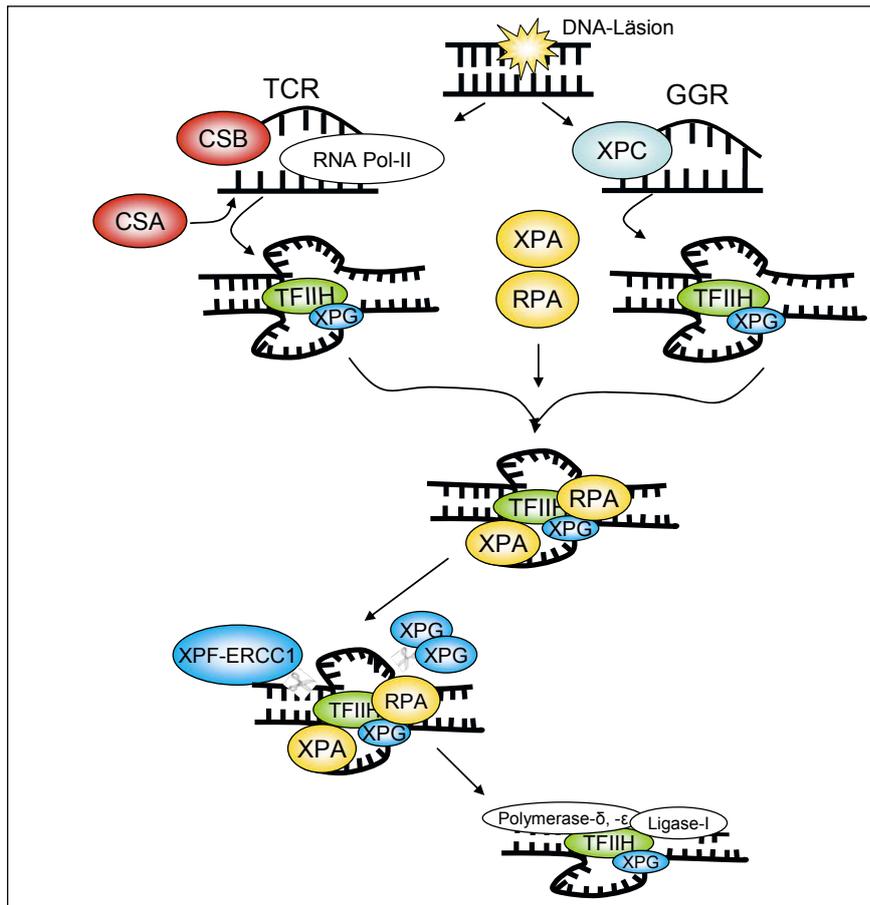
Abbildung 5: Inaktivierung von Rho-GTPasen durch Toxin B-Glukosylierung.

## 1.4 DNA-Reparatur

### 1.4.1 Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER)

Die Nukleotid-Exzisionsreparatur ist der Hauptabwehrmechanismus von Zellen gegen DNA-schädigende Läsionen, die durch gentoxische Noxen wie UV-C-Strahlung und Cisplatin ausgelöst werden (Friedberg et al., 1995). Es sind 20-30 Proteine an der Reparatur von DNA-Läsionen durch die NER beteiligt. Die NER wird in zwei Wege untergliedert: I) DNA-Schäden, die in transkriptionell aktiven Genbereichen der DNA liegen, werden durch die „transcription coupled repair“ (TCR) entfernt, demgegenüber werden II) DNA-Läsionen aus transkriptionell inaktiven Bereichen des Genoms durch die „global genome repair“ (GGR) entfernt. Es gibt sechs Kernfaktoren der NER: XPA, RPA, XPC-hHR23B Komplex, TFIIH Komplex und die beiden Endonukleasen, XPG und ERCC1-XPF Heterodimer (Aboussekhra &

Wood, 1995; Guzder et al., 1995). Die DNA-Schadenserkennung erfolgt bei der GGR durch den XPC-HR23B- und RPA-XPA-Komplex. Es ist allerdings noch unklar welcher dieser Komplexe als erster aktiviert wird (Evans et al., 1997; Naegeli, 1995; Sugasawa et al., 1998; Wood, 1999). Weiterhin ist das „damaged DNA binding protein“ (DDB), ein Heterodimer aus zwei Polypeptiden (DDB1 und DDB2), bei der UV-Schadenserkennung von großer Bedeutung. Diese Polypeptide gehören zu der XPE-Komplementationsgruppe (Tang & Chu, 2002). Nach Erkennung der Läsion erfolgt die Rekrutierung des Transkriptionsfaktors TFIIH zu dem DNA-Schaden. TFIIH besteht aus sieben Proteinen (XPB, XPD, GTF2H1, GTF2H2, GTF2H3, GTF2H4, CDK-7, CCNH und MNAT1) und besitzt eine DNA-Helikase Aktivität, die durch die Untereinheiten XPB und XPD ausgeführt wird. Die DNA wird um die Läsion herum entwunden (Schaeffer et al., 1994; Schaeffer et al., 1993) und die Läsion durch einen dualen Einschnitt an definierten Positionen der DNA entfernt (Evans et al., 1997). Der 3'-Einschnitt wird durch XPG und der 5'-Einschnitt durch den XPF-ERCC1 Komplex durchgeführt (Sijbers et al., 1996). Die entstandene Lücke wird durch die Polymerase- $\delta$ , sowie  $\epsilon$  gefüllt und durch DNA Ligase-I versiegelt (Aboussekhra et al., 1995; Araujo et al., 2000; Mu et al., 1995). Da DNA-Schäden oftmals zu einem Block der Transkription führen, stellt die TCR ein wichtiges Backup-System für die Entfernung von DNA-Schäden dar. Sie erkennt und entfernt DNA-Schäden, wie z.B. UV-C Schäden auf dem transkribierten Strang, wofür die GGR zu langsam ist. Defekte in der TCR sind Ursache für das Cockayne Syndrom (CS), wobei diese Erbkrankheit auf Störungen in den CS-Genen, CSA und CSB zurückzuführen ist. Die genaue Rolle der CS-Proteine ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Es wird spekuliert, dass der durch die TCR hervorgerufene Block der RNA-Polymerase-II das CSA und CSB Protein aktiviert und zur DNA-Läsion rekrutiert. In einem noch unklaren Mechanismus entfernen CSA und CSB die gestoppte RNA-Polymerase-II, so dass Reparaturproteine den DNA-Schaden besser erreichen können. Wie genau CSA und CSB mit der RNA Polymerase-II interagieren ist noch nicht bekannt. Es wird angenommen, dass CSB seine DNA-Translokase Aktivität nutzt, um den RNA-Polymerase-II Komplex von der Läsion zu entfernen (Svejstrup, 2003). Die Exonukleasen XPF-ERCC1 und XPG schneiden daraufhin den läsionstragenden DNA-Strang aus. Die Resynthese erfolgt wie bei der GGR durch die Polymerase- $\delta$ , sowie  $\epsilon$  und die DNA-Ligase-I ligiert die DNA-Enden (Abb. 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER).**

TCR= transcription coupled repair, GGR= global genome repair.

#### 1.4.1.1 Xeroderma Pigmentosum (XP)

Defekte in der NER führen beim Menschen zur rezessiven Erbkrankheit Xeroderma Pigmentosum (XP) (Cleaver & Hultner, 1995; Kraemer, Lee & Scotto, 1987). Es gibt sieben XP-Komplementationsgruppen, XP-A bis XP-G. Dabei gibt es große Unterschiede im Verlauf des Krankheitsbildes innerhalb der verschiedenen Komplementations-gruppen. XP-Patienten leiden unter starker Photosensitivität, einem 2000-fach erhöhten Risiko an Hautkrebs zu erkranken und in ca. 20% der Fälle an neurologischen Störungen, die in einer neurologischen Degradation enden können (Kraemer et al., 1987; Kraemer et al., 1994; Mimaki et al., 1986). Bei einem partiellen defekt der NER, durch Defekte in XP-F und XP-C wurden keine neurologischen Störungen festgestellt. Mutationen des XP-F Gens führen zu einer abgeschwächten Form der Photosensitivität, da XPF und ERCC1 einen dualen Heterodimer-Komplex bilden. Der komplette Verlust des XP-D oder XP-B Gens ist nicht mit dem Leben vereinbar, da XP-D und XP-B dem TFIID-Komplex angehören, der für die basale Transkription erforderlich ist. XP-C wird dagegen nur bei der GGR

und nicht bei der TCR benötigt. Daher sind XP-C Patienten für UV-Schäden nicht anfälliger als gesunde Menschen. Bei diesen Patienten wird die transkriptionsblockierende Läsion durch die TCR entfernt. Besonders schwer verlaufen die Krankheitssymptome bei Defekten in den Komplementationsgruppen XP-A, XP-B, und XP-G. Die Patienten leiden unter neurologischen Problemen und entwickeln in frühen Jahren schwere UV-Schäden in allen dem Sonnenlicht zugänglichen Bereichen. Infolgedessen entstehen unterschiedliche Tumore in verschiedenen Geweben (Kraemer et al., 1994).

#### 1.4.1.2 Cockayne Syndrom (CS)

Das Cockayne Syndrom ist eine seltene autosomal-rezessive Erbkrankheit. Patienten leiden wie bei Xeroderma Pigmentosum unter starker UV-Sensitivität, haben aber im Gegensatz zu XP-Patienten kein erhöhtes Risiko an Hautkrebs zu erkranken (Colella et al., 1999; Nance & Berry, 1992; Rapin et al., 2000). Eine Erklärung für diese Beobachtung ist die Tatsache, dass Defekte in der TCR zu einer persistierenden Blockade der Reparatur führen. Die ist möglicherweise ausreichend, um Signale auszulösen, die den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten. Auf diese Weise werden potentielle Onkogene entfernt (Ljungman & Zhang, 1996). Die typischen Symptome von CS-Patienten sind ferner neurologische und psychomotorische Beeinträchtigungen, mentale Retardation, Abnormalitäten des Skeletts und später auftretende progressive neurologische Retardation, sowie Hör- und Sehverlust (Dollfus et al., 2003; Nance & Berry, 1992). Da XP-Patienten nicht unter den beobachteten Symptomen leiden, lassen sich die Befunde nicht ausschließlich durch Defekte in der NER-Reparatur erklären. Nach heutigem Stand der Forschung gibt es noch keine genaue mechanistische Erklärung für diese Befunde.

#### 1.4.2 DNA-Doppelstrangbruch Reparatur

DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) sind stark letal wirkende DNA-Läsionen. Sie führen zum Bruch und Austausch der Chromosomen und können den Zelltod durch Apoptose auslösen (Dikomey et al., 1998; Lips & Kaina, 2001; Pfeiffer, Goedecke & Obe, 2000). Dabei reicht ein einziger nicht reparierter Doppelstrangbruch in einem essentiellen Gen als letales Ereignis aus (Rich, Allen & Wyllie, 2000). Die Zelle hat zwei Möglichkeiten Doppelstrangbrüche zu reparieren: zum einen die homologe

Rekombination (HR) und zum anderen das nicht-homologe End-Joining (NHEJ) (Jeggo, 1998). Welcher Weg der Reparatur eingeschlagen wird, hängt von dem Status des Zellzyklus der Zellen ab. NHEJ findet hauptsächlich in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> statt, wohingegen HR in der späten S- und G<sub>2</sub>-Phase überwiegt (Johnson & Jasin, 2000; Takata et al., 1998).

Die NHEJ ligiert zwei Enden eines DSB ohne Berücksichtigung der Sequenzhomologien. Der erste Schritt der NHEJ ist die Bindung eines Heterodimers bestehend aus Ku70 (Reeves & Sthoeger, 1989) und Ku80 (Jeggo et al., 1992) an die geschädigte DNA. Dieser Vorgang schützt die DNA vor dem Abbau durch Exonukleasen. Die katalytische Untereinheit der DNA-PK (DNA-PKcs) assoziiert daraufhin mit dem Ku-Heterodimer (Hartley et al., 1995; Siple et al., 1995). Dieser Komplex wird auch als aktives DNA-PK Holoenzym bezeichnet (Gottlieb & Jackson, 1993; Smith & Jackson, 1999). Die DNA-PK wird durch Interaktion mit einzelsträngiger DNA an den Seiten des DSB aktiviert. Dazu bindet die DNA-PK simultan an beide einzelsträngigen-DNA Enden des DSBs. Die Bindung an DNA-Einzelstrangbrüche erfolgt deutlich schwächer, die DNA-PK unterscheidet offensichtlich zwischen Einzel- und Doppelstrangbrüchen (Hammarsten, DeFazio & Chu, 2000; Martensson & Hammarsten, 2002). Die DNA-PK ist eine Serin/Threonin Kinase (Kim et al., 1999), die XRCC4 als ein Zielsubstrat hat (Leber et al., 1998). XRCC4 bildet einen stabilen Komplex mit der DNA Ligase IV. Dieser Komplex bindet an die Enden der DNA-Stränge und verbindet den DSB. In den meisten Fällen müssen die DNA-Enden vorher prozessiert werden. Dies erfolgt durch den MRE11-Rad50-NBS1 Komplex (Maser et al., 1997; Nelms et al., 1998). Artemis ist ein weiteres Protein welches an der Prozessierung der DNA-Enden beteiligt ist. Es arbeitet zusammen mit der DNA-PK und wird von dieser phosphoryliert (Moshous et al., 2001).

Bei der HR kommt das geschädigte DNA-Molekül in Kontakt mit einem ungeschädigten DNA-Molekül, welches Sequenzhomologien aufweist. Es dient der HR dadurch als Matrize. Der erste Schritt der HR ist die nukleolytische Spaltung der DNA durch den MRE11-Rad50-NBS1-Komplex (MRN) (Sonoda et al., 2001). Es entsteht ein 3'-Einzelstrang DNA-Fragment an welches Rad52 bindet (Stasiak et al., 2000). Rad52 interagiert mit Rad51 (Kagawa et al., 2001; Reddy, Golub & Radding, 1997; Shen et al., 1996). Diese Interaktion induziert einen DNA-Strangaustausch mit dem ungeschädigten, homologen DNA Molekül. Bei der Interaktion mit Rad51 spielt

das RPA Protein (Replication Protein A) ebenfalls eine wichtige Rolle (Golub et al., 1998; Park et al., 1996). Nach DNA Synthese, Ligation und Formierung von Holliday Junctions sind die endgültigen Strukturen erreicht und die Reparatur abgeschlossen (Holliday, 1964).

#### 1.4.3 Mechanismen der DNA-Schadenserkennung

DNA-Schäden initiieren eine Vielzahl von Reparaturmechanismen die spezifische DNA-Schäden erkennen und prozessieren. Neben der DNA-Reparatur gibt es ein aus zahlreichen Prozessen bestehendes, komplexes Signalnetzwerk (Abb.7).

Eine Gruppe von Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) ist bei der DNA-Schadenserkennung involviert. Diese Kinasen sind ATM (Ataxia telangiectasia mutated), ATR (ATM und Rad3-related) und die katalytische Untereinheit der DNA-PK (DNA-PKcs) (Savitsky et al., 1995; Smith et al., 1999; Smith & Jackson, 1999). ATM und DNA-PKcs reagieren vornehmlich auf DNA-Doppelstrangbrüche, dagegen wird ATR hauptsächlich durch UV-C Schäden, sowie durch eine geblockte Replikationsgabel aktiviert. Dem MRN-Komplex kommt bei der Erkennung von DSBs eine bedeutende Rolle zu. Er fungiert als DSB-Sensor für ATM, welche daraufhin an geschädigte DNA binden kann. Nachdem ATM an den DSB gebunden hat, dissoziiert das inaktive Dimer in ein Monomer, welches an verschiedenen Aminosäureresten autophosphoryliert und dadurch aktiv wird (Bakkenist & Kastan, 2003). Die Blockierung der DNA-Replikation kann ebenfalls zu Strangbrüchen in der DNA führen. Meistens sind diese Strangbrüche einzelsträngig (ssDNA). Der Proteinkomplex RPA erkennt ssDNA und rekrutiert ATR (Zou & Elledge, 2003). Schlussendlich phosphoryliert ATR Rad17 und 911 (Yang & Zou, 2006). Dieser Schritt ist für das weitere „downstream“ Signalling sehr bedeutsam. Durch die Aktivierung der ATM und ATR-Kinase kommt es zu einer Reihe von Phosphorylierungen spezifischer Substrate. Dabei können diese Substrate Proteine sein, die an der Regulation des Zellzyklus, der DNA-Reparatur, Genregulation oder der Apoptose beteiligt sind (Shiloh, 2003; Shiloh, 2006). Die Phosphorylierung der Checkpoint Kinasen (Chk1/2) durch ATM/ATR ist dabei ein essentieller Bestandteil der Zellzykluskontrolle (Falck et al., 2001; Xiao et al., 2003). Aktivierte Chk1/2 hemmen die Phosphatase Aktivität der Zellzyklus-regulierenden Phosphatase Cdc25. Cdc25 nimmt dabei Einfluss auf die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), diese CDKs kontrollieren die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus. Die Hemmung von

Cdc25A durch Chk1/2 bewirkt einen G1/S-Phase-Arrest der Zellen. Eine Verlangsamung der S-Phase und Arretierung des Zellzyklus in G2/M wird hingegen erreicht, wenn durch Chk1/2 alle drei Phosphatasen Cdc25A/B/C inhibiert werden (Abb. 7) (Shiloh, 2001). Weiterhin löst die Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 durch ATM und ATR eine verstärkte Stabilisierung des Proteins aus (Banin et al., 1998). Dieser Vorgang führt zur Induktion von p21. p21 inhibiert den Cdk2-Cyclin E-PCNA Komplex, was einen Block in G1/S zur Folge hat (Abb. 7) (Mailand et al., 2000).

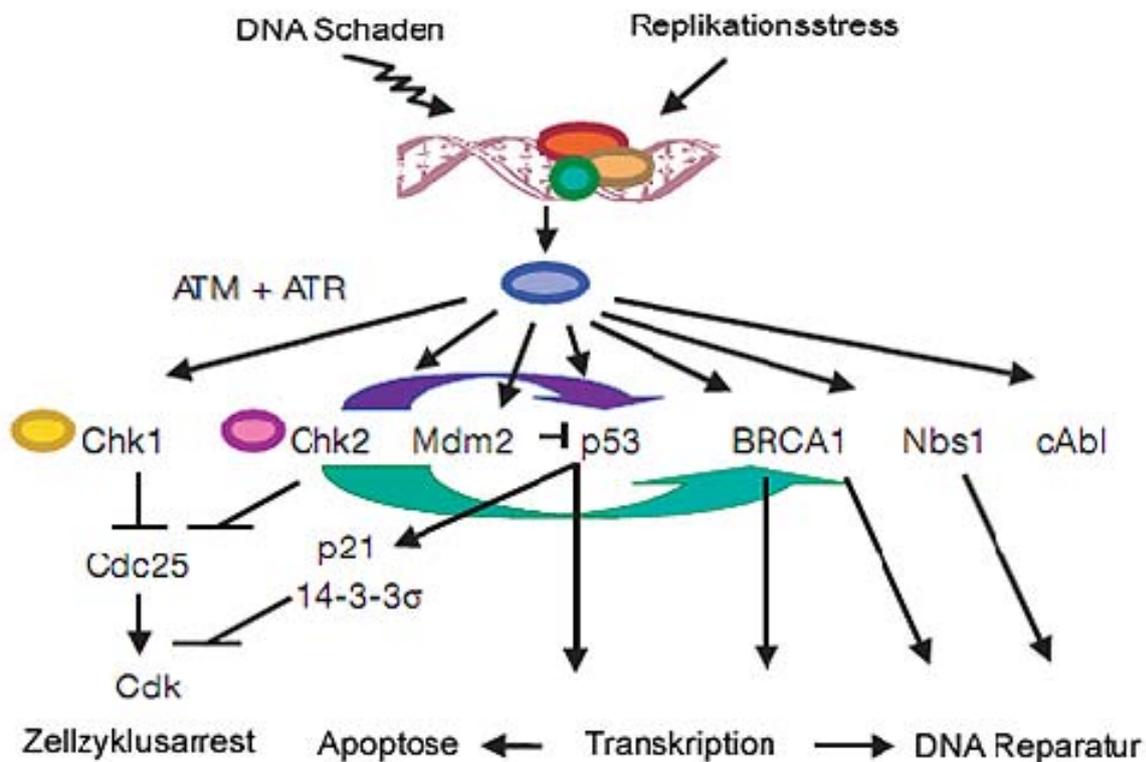


Abbildung 7: Schematische Übersicht über den Verlauf des DNA-Schadensignalling.

Modifiziert nach Zhou et. al (2000).

## 1.5 DNA-Crosslinking-Agenzien

### 1.5.1 UV-Strahlung

Die meisten Untersuchungen von DNA-Photoläsionen erfolgen mit UV-C- (254nm) oder UV-B-(280-320nm) Strahlung. Wellenlängen die niedriger als 290nm sind erreichen die Erdoberfläche nicht, weil sie durch die Stratosphäre absorbiert werden. Die menschliche Bevölkerung ist demnach hauptsächlich Strahlung mit längerer Wellenlänge ausgesetzt, wie UV-B und UV-A (320-400nm). UV-B Strahlung macht

95% und UV-A 5% der solaren Strahlung aus. Die durch UV-C-induzierten Photoläsionen, Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD) und Pyrimidin (6-4) Pyrimidon Photoprodukte ((6-4)PP), sind mit denen der UV-B Strahlung vergleichbar. CPDs und 6-4Photoprodukte sind für die prämutagene Wirkung von UV-Strahlung hauptverantwortlich (Mitchell et al., 1993). Ein weiteres Photoprodukt ist das bisher wenig erforschte Dewar-Photoprodukt (DewarPP) (Taylor, Lu & Kotyk, 1990). Die UV-induzierten Läsionen werden durch die NER entfernt (Friedberg et al., 1995).

### 1.5.2 Cisplatin

*Cis*-diammindichlorplatin-II (Cisplatin, cDDP) ist ein weit verbreitetes Zytostatikum und wird als Chemotherapeutikum sehr erfolgreich bei der Behandlung einer Vielzahl von Krebserkrankungen eingesetzt. Die biologische Aktivität des Cisplatins wurde bereits in der 60iger Jahren entdeckt und seine Zulassung für die klinische Behandlung maligner Tumore erfolgte 1978 (Rosenberg, Vancamp & Krigas, 1965). Ursprünglich wurde Cisplatin bei der Therapie von Hodenkrebs eingesetzt, da die Heilungsrate bei frühzeitiger Diagnose bei mehr als 90% liegt. Mittlerweile wird es auch bei der Behandlung von anderen Krebserkrankungen verwendet, wie z.B. Ovarial-, Bronchial-, Harnblasen- und Zervixkarzinomen (Loehrer & Einhorn, 1984). Cisplatin ist ein anorganischer Komplex, der nach Eindringen in die Zelle durch Hydrolyse aktiviert wird ( $t_{1/2} \sim 2h$ ) (Bancroft, Lepre & Lippard, 1990). Dabei werden die *Cis*-Chlor Liganden durch Wassermoleküle ausgetauscht. Die wassergelöste Form Cisplatins ist chemisch hochreaktiv und bindet an DNA, RNA und Protein (Bancroft et al., 1990). Die Bindung des Cisplatins an die DNA ist vermutlich Hauptursache für seine Antitumor-Wirkung. Die entstandenen Cisplatin-Produkte sind: I) Monoaddukte, die bereits innerhalb von  $t_{1/2} \sim 10$  min. gebildet werden, II) bifunktionelle Addukte, die mit einer Halbwertszeit von 2-3h entstehen, sowie III) Protein-cDDP-DNA Crosslinks (Bancroft 1990, Barnham 1995). Bifunktionelle Addukte bestehen aus 1,2-Intrastrand-Crosslinks, *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(d(GpG))] (*cis*-GG). Sie machen 47-50% der Läsionen aus. Zu 23-28% entstehen *cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(d(ApG))] (*cis*-AG) und 1,3-Intrastrand-Crosslinks *cis*-GNG, welche 8-10% der Läsionen ausmachen. Ferner entstehen Interstrand-Crosslinks und Monoaddukte die einen Anteil an den Läsionen von 1-2% haben. In allen Fällen bindet Cisplatin an das N7-Atom der Purinbasen, Guanin und Adenin (Fichtinger-Schepman et al., 1985). Die Cisplatin-DNA-Crosslinks verändern die Struktur der DNA und behindern den DNA-Replikations und Transkriptions-

Mechanismus. Der durch Cisplatin-induzierte Replikationsblock konnte an verschiedenen Zellsystemen nachgewiesen werden. Es zeigte sich dabei, dass GG-Addukte die DNA-Replikation am stärksten inhibieren (Harder, Smith & Leroy, 1976). Zusätzlich können durch den Replikationsblock Strangbrüche in der DNA ausgelöst werden, die eine sekundäre Läsion darstellen. Die Inhibierung der Transkription durch Cisplatin-Addukte erfolgt durch Blockierung der Initiation und Elongation der RNA-Polymerase-II (Cullinane et al., 1999). Es kommt zu einem G2-Block der Zellen, da die für den Übertritt in die Mitose notwendigen Gene nicht mehr transkribiert werden können. In reparaturdefekten Zellen hielt der G2-Arrest an, wohingegen reparaturprofiziente Zellen die Cisplatin-Addukte entfernen können und dadurch der Arrest wieder aufgehoben wird (Sorenson & Eastman, 1988). Cisplatin führt zu einer Induktion von zahlreichen Stress-Signalwegen in der Zelle. Dazu gehört die Aktivierung der MAP-Kinasen, insbesondere die der SAPK/JNK (Persons et al., 1999). In malignen und nicht-transformierten Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass Cisplatin die Expression des Fas-Liganden erhöht und dass über das Fas-System die Cisplatin-induzierte Apoptose vermittelt wird (Brozovic & Osmak, 2007). Die Reparatur der Cisplatin-Addukte erfolgt durch die NER und teilweise durch Mismatch Reparatur (MMR) (Nehme et al., 1997; Nehme et al., 1999). Zusätzlich konnte eine Beteiligung von nukleären HMG-Proteine an der DNA-Schadenserkennung nachgewiesen werden (He, Liang & Lippard, 2000; Huang et al., 1994).

### 1.5.3 Transplatin

*Trans*-diamindichlorplatin-II (Transplatin, *Trans*-DDP) ist das Stereoisomer von Cisplatin, welches aufgrund seiner geringen Zytotoxizität bei der Behandlung von Krebserkrankungen klinisch ineffektiv ist. Transplatin bindet wie Cisplatin an die DNA der Zelle. Diese Bindung verläuft in zwei Schritten: I.) Austausch der Chlorid-Ionen durch Wasser Moleküle, II.) Bildung von Monoaddukten ( $t_{1/2}>4h$ ) und Umwandlung dieser in Interstrand-Crosslinks ( $t_{1/2}>17h$ ). Im Gegensatz zu Cisplatin findet bei der Behandlung von Zellen mit Transplatin keine Bildung von Intrastrand-Crosslinks statt. Lediglich an einzelsträngiger DNA ist es möglich durch Transplatin Intrastrand-Crosslinks zu induzieren. Aus sterischen Gründen bindet Transplatin bei der Formierung von Interstrand-Crosslinks nicht an benachbarte Nukleotidreste, sondern verbindet Nukleotidreste die durch ein oder mehrere Nukleotide voneinander getrennt

sind (Lepre, Strothkamp & Lippard, 1987). Die Hauptläsionen des Transplatins sind *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(d(GMP))-(d(CMP))], welches zu 50% gebildet werden, *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(d(GMP))<sub>2</sub>] wird zu 40% gebildet und zu 10% erfolgen *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(d(GMP))(d(AMP))] Interstrand-Croslinks (Eastman, Jennerwein & Nagel, 1988).

## 1.6 Aufgabenstellung

### 1.6.1 Teil A: DNA-schadensabhängige Aktivierbarkeit von Stress-Kinasen

Die Phosphorylierung von SAPK/JNK ist ein essentieller Bestandteil der zellulären Stress-Antwort auf genotoxische Noxen, da Stress-Kinasen über Tod und Überleben der Zelle entscheiden (Hayakawa et al., 2003; Mansouri et al., 2003; Sanchez-Perez et al., 1998). Bislang werden zwei verschiedene Wege die zur Aktivierung von SAPK/JNK führen diskutiert: I) die vielfach beschriebene frühe (<2h) DNA-schadensunabhängige, rezeptorvermittelte (Canman & Kastan, 1996) und II) die weniger untersuchte und charakterisierte späte (>16h) DNA-schadensabhängige Aktivierung (Brozovic et al., 2004; Mansouri et al., 2003). Aufgrund der enormen Bedeutung, die den SAPK/JNK bei der Regulation von zellulären Vorgängen nach DNA-Schädigung zukommt, ist es unerlässlich die Mechanismen der Genotoxin-induzierten Aktivierung der SAPK/JNK aufzuklären.

In der vorliegenden Arbeit stand daher die Frage einer späten DNA-schadensabhängigen Aktivierbarkeit der SAPK/JNK nach Exposition mit DNA-Crosslinking-Agenzien im Mittelpunkt der Untersuchungen. Folgende Aspekte wurden bei den Analysen berücksichtigt:

- Nachweis einer DNA-schadensabhängigen dualen Phosphorylierung von SAPK/JNK mit Hilfe von humanen und murinen Zelllinien mit Defekten in der DNA-Schadensprozessierung bzw. der Nukleotid-Exzisionsreparatur
- Vergleichende Untersuchungen unterschiedlicher DNA-Crosslinks, Intrastrand- und Interstrand-Crosslinks, hinsichtlich ihres Potentials bei der Phosphorylierung von SAPK/JNK
- Analyse von DNA-Schäden und Stress-assoziierten Proteinen in DNA-reparaturdefizienten Zelllinien und ihren korrespondierenden Wildtyp Zellen nach Exposition mit DNA-Crosslinking-Agenzien
- Untersuchungen des Einflusses von Rho-GTPasen bei der DNA-schadensabhängigen Aktivierung von SAPK/JNK durch Crosslinking-Agenzien mittels Inhibition von Rho-GTPasen durch HMG-CoA Reduktase Hemmern (Statine) und clostridialen Toxinen

### 1.6.2 Teil B: Lovastatin vermittelte Protektion von HUVECs vor der zytotoxischen Wirkung von ionisierender Strahlung und Doxorubicin

Eine Beteiligung von Ras/Rho-regulierten DNA-schadensunabhängigen Mechanismen auf zelluläre Stress-Antworten nach Genotoxin-Behandlung wurde unter Verwendung von HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren (Statinen) an primären humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) untersucht. Vorversuche zeigten, dass Statine HUVECs vor der zytotoxischen Wirkung ionisierender Strahlung (IR) schützen (Nubel et al., 2006). Aufgrund der apoptotischen Wirkung von Statinen auf Tumorzellen (Graaf et al., 2004; Macaulay et al., 1999; Wong et al., 2001) und ihrer protektiven Eigenschaften auf die IR-induzierte Zytotoxizität in endothelialen Zellen könnten Statine möglicherweise die unerwünschten Nebenwirkungen einer Strahlentherapie günstig beeinflussen. Die Frage, welche Signalwege bei der Protektion vor IR-Strahlung durch die Statine moduliert werden und inwieweit Statine die Endothelzellen ebenfalls vor dem Chemotherapeutikum Doxorubicin schützen können, sollten dabei aufgeklärt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte/Hilfsmittel

Geräte/Hilfsmittel	Typbezeichnung	Firma
60Co- $\gamma$ -Strahlungsquelle		Atomic Energy of Canada Ltd
Blot-Kammer	Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München
Brutschrank	B5060 EK/CO <sub>2</sub>	Heraeus, München
Elektrophoreseapparaturen	Mini-PROTEAN	Bio-Rad, München
ELISA-Reader	MagellanTM	Tecan, Salzburg
FACS	FACScalibur	BectonDickinson, Heidelberg
Feinwaage	TE313S-DS	Satorius, Göttingen
Filterpapier	Whatman 3 MM	Schleicher & Schuell, Dassel
Mikroskop	BX 50	Olympus, Hamburg
Mikroskop	Axiovert 35	Carl Zeiss AG, Göttingen
Röntgenfilme	Hyperfilm MP	Kodak, Stuttgart
Schüttler	RT	Unitwist
Spannungsquelle	Power PAC 3000	Bio-Rad, München
Sterilbank	Lamin Air, HB2472	Heraeus, München
Thermocycler	MyCycler	Bio-Rad, München
Thermomixer	comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	5402	Eppendorf, Hamburg
Überkopfschüttler	REAX2	Heidolph, Schwabach
Ultra Turrax	T25 basic	IKA®-Werke, Staufen
Ultraschallstab	Sonifier 250	Branson
Zählkammer	Neubauer	Roth, Karlsruhe
Zentrifuge	5417 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Labofuge 400 R	Heraeus, München
Mikroskop	WilovertA	Hund, Wetzlar

#### 2.1.2 Verwendete Software

Software	Hersteller
Cell Quest Pro	BD
Cell A	Olympus, Hamburg
Gene Snap, Gene Tools	Syngene, Cambridge UK
Kinetic Imaging Komet 4.0.2	BFI Optilas, Puchheim
WinMDI 6.8	Internet

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
96-well Microtiter-Platten	Nunc, Wiesbaden
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
PP-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflaschen Easy Flask 25 V/C	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen TC Flask 80CM2 VE	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschalen (Ø 9 cm, Ø 5 cm, Ø 2,5 cm)	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.4 Chemikalien

Chemikalien	Firma
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	GibcoLifeTechnologies, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Annexin-V-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
Bovine serum albumin	Roth, Karlsruhe
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
Clostridium difficile Toxin B (ToxB)	Hannover, MHH
Comassie Blue G-250	Sigma-Aldrich, München
DMSO	Fluka, Neu Ulm
Glycerin	Sigma-Aldrich, München
H2DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)	Invitrogen, Karlsruhe
Hiperfect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Lambda DNA/EcoRI/HindIII Marker 3	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Latrunculin B	Sigma-Aldrich, München
LMP-Agarose	Appligene, Heidelberg
Lovastatin	Calbiochem, Darmstadt
Magermilchpulver	Reformhaus, Mainz
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Nonidet P40	Roth, Karlsruhe
pBR322 DNA/AluI Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
FITC-Phalloidin	Sigma-Aldrich, München
Pifithrin-alpha	Alexis Biochemicals,
Ponceau S	Sigma-Aldrich, München
Prestained Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Propidiumjodid	Serva, Heidelberg
Proteinmarker High Molecular Weight	Sigma-Aldrich, München

Ready Red Taq-Polymerase	Amplicon
Serva Brillant Blue	Serva, Heidelberg
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Sigma-Aldrich, München
Z-VAD-FMK	Calbiochem, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München

Hier nicht erwähnte Chemikalien stammten von den Firmen Roth (Karlsruhe), Roche Diagnostics (Mannheim), Bio-Rad (München), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (München).

### 2.1.5 Zytostatika

Zytostatika	Hersteller
Cisplatin (cis-diamindichloroplatin)	Apotheke, Uniklinikum Mainz
Doxorubicin	Sigma-Aldrich, München
Etoposid	Sigma-Aldrich, München
Transplatin (trans-diamindichloroplatin)	Sigma-Aldrich, München

### 2.1.6 Kits

Kits	Hersteller
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche Diagnostics, Mannheim
DNeasy® Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden
ECL™-/ ECL-Plus™-Western blotting detection reagent	Amersham, Freiburg
Effektene™ Transfection Reagent Kit	Qiagen, Hilden
Enhanced Avian RT First Strand Synthesis Kit	Sigma-Aldrich, München
Nucleospin RNA II	Machery-Nagel, Düren
WST-1 Cell Proliferation Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim

### 2.1.7 Antikörper

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Anti-1,2-GG-Intrastrand-Crosslink	Ratte	1: 200	Thomale et al., Essen
Anti-Caspase 2	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-Caspase 8	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Caspase 9	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-Cleaved-Caspase 3	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-CHOP	Maus	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-GRP78	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-CSB	Kaninchen	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-ERK-2	Kaninchen	1:500	Cell Signaling, Beverly, MA

Anti-IgG-Kaninchen-Antikörper (HRP-konjugiert)	Esel	1:5000	Amersham, Braunschweig
Anti-IgG-Maus-Antikörper (HRP-konjugiert)	Schaf	1:5000	Amersham, Braunschweig
Anti-IgG-Ratte-Antikörper (HRP-konjugiert)	Kaninchen	1:3000	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-MKP1	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-p21	Kaninchen	1:1000	Calbiochem, Darmstadt
Anti-p53	Maus	1:1000	Oncogene, San Diego, CA
Anti-p-Akt (Ser473)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-p-Chk1 (Ser345)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-p-Chk2 (Thr68)	Kaninchen	1:500	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-p-H2AX (Ser139)	Maus	1:1000	Upstate, Lake Placid,
Anti-p-p38 (Thr180/Tyr182)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-p-SEK-1/MKK4 (Thr261)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Beverly, MA
Anti-XPA	Kaninchen	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
Alexa-Fluor 488 anti-Maus IgG	Ziege	1:500	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.8 Primer

Primer	Sequenz
CD95-Ligand 3'Primer	5'-CTTGTGGCTCAGGGGCAGGTTGT-3'
CD95-Ligand 5'Primer	5'-CCCCTCCAGGCACAGTTCTTCC-3'
CD95-Rezeptor 3'Primer	5'-GTGGAATTGGCAAAGAAGAAGAC-3';
CD95-Rezeptor 5'Primer	5'-AAGGGATTGGAATTGAGGAAGACTG-3'
GAPDH 3'Primer	5'-CATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCA-3'
GAPDH 5'Primer	5'-GTCTTCACCACCATGGAGAAGGCT-3'
Mdr-1 3'Primer	5'-GAAGCACTGGGATGTCCGGT-3'
Mdr-1 5'Primer	5'-ATATCAGCAGCCCACACAT-3'
Mrp-1 3'Primer	5'-CTTCTGCACATTCATGGTC-3'.
Mrp-1 5'Primer	5'-GTCTTACTCATTGCAGG-3'

### 2.1.9 siRNA

siRNA	Zielsequenz	Hersteller
CSB oligo 2	5'-ATG GAT GGT ACC ACT ACA ACA ATA-3'	Qiagen, Hilden
CSB oligo 4	5'-CGG ACT TAT AGC CCT AAG AAA-3'	Qiagen, Hilden

### 2.1.10 Zelllinien

Name	Beschreibung	Spezies	Herkunft
------	--------------	---------	----------

3T3	Mausfibroblasten	Maus	ATCC
ATM <sup>+/+</sup>	Mouse embryonic fibroblasts (MEFs), ATM Wildtyp, p53 knockout	Maus	Elson et al., 1996
ATM <sup>-/-</sup>	Maus embryonic fibroblasts (MEFs), doppel Knockout für ATM und p53	Maus	Elson et al., 1996
BALB/c	Mausfibroblasten, p53 wildtypisch	Maus	ATCC
BK4	p53-profiziente fibroblastoide Zellen der Maus (MEFs)	Maus	Institut für Toxikologie, Mainz
CSB	SV-40 immortalisierte humane Fibroblasten von CS-B Patienten (CS1AN.S3.G2)	Human	T Stevnsner et al. 2002
GM637	SV-40 immortalisierte humane Fibroblasten	Human	ATCC
HFIB-D	Primäre humane Hautfibroblasten	Human	Provitro, Berlin
HUVEC	Primäre humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen	Human	Cambrex, Verviers
NHDF	Primäre humane Fibroblasten	Human	Cambrex, Verviers
p53 <sup>-/-</sup>	Mausfibroblasten aus Embryonen von p53-Knockout Mäusen	Maus	Donehower et al., 1992
SCID	DNA-PKcs defekte Zellen, p53 Wildtyp	Maus	Dikomey et al. 1998
XP12RO Klon 3 (XPA Klon 3)	SV-40 transformierte humane Fibroblasten von XP-A Patienten (XP12RO), homozygot für eine nonsense Mutation an dem Codon für Arg207	Human	Köberle et al. 2006
XP12RO Klon 4 (XPA Klon 4)	XPA-Expression korrigierte Zellen, XPA cDNA von dem Plasmid: pET15b/XPA	Human	Köberle et al. 2006
XPC	Primäre humane Fibroblasten von XP-Patienten der Komplementgruppe C	Human	Mullenders, Leiden, Niederlande

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die Zelllinien wurden in ihrem entsprechenden Medium bei 37 °C in CO<sub>2</sub>-Inkubatoren unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 7 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Je nach Teilungsrate wurden die Zellen alle 3-4 Tage passagiert. Hierzu wurden die mit PBS gewaschenen Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA für 5 min. inkubiert, anschließend 1:5 - 1:10 mit Medium verdünnt und in eine neue Kulturflasche überführt.

### 2.2.2 Behandlung von Zellen

Die Behandlung der Zellen mit den Zytostatika Cisplatin und Transplatin erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in Form einer Dauerbehandlung. Doxorubicin und Etoposid wurde für 1h auf die Zellen gegeben und anschließend das Medium durch frisches Medium ersetzt. Die UV-C Bestrahlung der Zellen erfolgte in

Zellkulturschalen, indem das Medium entnommen und der Zellrasen mit PBS gespült wurde. Nach Bestrahlung wurde das Medium den Zellen wieder zugesetzt.

### 2.2.3 Zytotoxizitätstests

Die Analyse der metabolischen Aktivität der Zellen erfolgte mittels des WST-1 Assays, der die Vitalität der Zellen misst. Das den Zellen hinzugefügte Tetrazoliumsalz WST-1 wird von zellulären Enzymen, je nach metabolischer Aktivität (Vitalität) der Zellen, zu dunkelrotem Formazan umgesetzt. Dieses kann photometrisch bestimmt werden. Zu bestimmten Zeiten (24h-72h) nach Behandlung wurde den Zellen WST-1/Medium-Mix (1:10) zugegeben und nach 30-120-minütiger Inkubation bei 37 °C die Formazanbildung durch Messung der Absorption bei 420 nm bestimmt. Die Vitalität der unbehandelten Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt und zu den behandelten Proben in Relation gesetzt.

### 2.2.4 FACS Analysen

#### 2.2.4.1 Apoptosemessung

Lösung	Zusammensetzung
FACS-Bindepuffer	10 mM Hepes, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> , 1 % BSA

Diese Methode (Vermees et al., 1995) basiert auf der Bindung von Annexin-V-FITC an Phosphatidylserin-Reste, die während der frühen Apoptose von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite gelangen. Behandelte bzw. unbehandelte Zellen wurden geerntet, in kaltem PBS gewaschen (1000 U/min, 4 min, 4 °C) und auf Eis in 50 µl FACS-Bindepuffer aufgenommen. Es wurden 2,5 µl Annexin-V-FITC zugegeben und die Zellen 15 min auf Eis im Dunklen inkubiert. Danach wurden pro Ansatz nochmals 440 µl Bindepuffer, sowie 10 µl Propidiumiodid (PI) zugegeben. Innerhalb einer Stunde wurden die Proben durchflusszytometrisch vermessen und der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen mittels CellQuest Software (Becton Dickinson, Heidelberg) quantifiziert.

#### 2.2.4.2 Zellzyklusmessung/subG1

Die Messung der sub-G1-Zellfraktion basiert auf der Tatsache, dass der DNA-Gehalt apoptotischer Zellen unterhalb des DNA-Gehalts einer Zelle in der G1-Phase liegt (Nicoletti et al., 1991; Fraker et al., 1995). Die Zellzyklusmessung erfolgt unter ähnlichen Gesichtspunkten. Da sich bei der Zellteilung der DNA-Gehalt verändert,

können die verschiedenen Zellzyklus-Phasen anhand des unterschiedlichen DNA-Gehaltes bestimmt werden. Behandelte oder unbehandelte Zellen wurden durch Trypsin/EDTA abgelöst, mit den nicht adhärenen Zellen im Zellkulturüberstand vereinigt und abzentrifugiert (1000 U/min; 10 min, 4 °C). Nach Waschen mit PBS (1000 U/min; 4 min; RT) erfolgte die Fixierung der Zellen in 70 %-igem Ethanol bei -20 °C für 30 min. Nach erneuter Zentrifugation (1500 U/min; 6 min; 4°C) wurde das Zellsediment an der Luft getrocknet und in 150 µl RNase A (0,1 mg/ml in PBS) und 0,5 ml Propidiumjodid (PI; 20 µg/ml in PBS) aufgenommen. Nach Inkubation für ca. 10 min bei Zimmertemperatur wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software WinMDI 6.8.

#### 2.2.5 siRNA Techniken

Die Transfektion der Zellen mit siRNA Oligos wurde nach Herstellerangaben (Qiagen, HiPerfect Transfection Reagent Handbuch) durchgeführt. Die lyophilisierte siRNA wurde mit siRNA-Lagerungspuffer gelöst (20 µM) und 1 min bei 90°C aufgeköcht. Einer Inkubation von 60 min bei 37 °C folgte die Lagerung der siRNA bei -20 °C. Die Zellen wurden 24h vor Transfektion mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen in einer 6 cm Schale ausgesät. Die Transfektion erfolgte unter RNase-freien Bedingungen mittels 12 µl HiPerfect-Transfektionsreagenz. Die Inkubation der Zellen nach Transfektion erfolgte für 6h-72h ohne Mediumwechsel.

#### 2.2.6 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Der Zellrasen wurde zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen durch Zugabe von 100-200 µl auf 95 °C erhitztem 2x-Roti-Load-Ladepuffer© in den Zellkulturschalen lysiert. Die Zellen wurden abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Um die DNA zu scheren und so die Viskosität des Lysats zu reduzieren, erfolgte zusätzlich eine Ultraschallbehandlung (Duty cycle: 40 %, Output control: 4) für 10-15 Sekunden. Die Proteinextrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.7 Western Blot Analyse

Lösung	Zusammensetzung
Blotting-Puffer	25 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM Glycin, 25 % Methanol
Laemmli-Puffer	57,6 g Glycin, 12 g Tris, 10 ml 20 % SDS, ad 2l mit A. bidest
TBS/Tween	50 mM Tris, pH7,4, 150 mM NaCl, 0,2 % (w/v) Tween 20

Blockierungslösung

5 % Magermilchpulver in TBS/Tween

Die Proteine wurden bei 95 °C für 5 Minuten aufgekocht und gelelektrophoretisch über Polyacrylamidgele (SDS-Page) aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit einem Tank-Blot auf eine Nitrocellulosemembran überführt (1h, 300 mA). Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde die Membran mit PonceauS angefärbt. Die Membran wurde 1h in Blockierungslösung geblockt, um unspezifischen Bindungen abzusättigen. Nach dreimaligen waschen mit TBS/Tween 0,2 % erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C. Die Inkubation des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers verlief über 2h bei RT. Für die Chemilumineszenz-Reaktion wurde ECL und für die Visualisierung der Signale Röntgenfilme verwendet.

#### 2.2.8 DNA-Isolation aus Zellen

Die Isolation der DNA aus Zellen erfolgte säulenchromatographisch mit dem DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Maximal  $5 \times 10^6$  Zellen wurden für die Isolation verwendet und für 5 min bei 300x g zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde in 200 µl PBS und 20 µl Proteinase K resuspendiert und zusätzlich mit 4 µl RNaseA (100 mg/ml) für 2 min bei RT inkubiert. Nach Lyse und Zugabe von 100%-igem Ethanol wurde die DNA auf QIAamp-Säulen aufgetragen und nach Bindung der DNA mit 200 µl Elutionspuffer eluiert.

#### 2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, modifiziert nach Mullis et al., 1986)

Die Identifikation von DNA-Bereichen erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Zur Genotypisierung der Mäuse wurden Primer der Firma Simga-Genosys (München) verwendet. Es wurden 0,5 µl der DNA-Probe mit je 0,5 µl 3' und 5' Primer, 12,5 µl Ready Red Taq Mix und 6,5 µl H<sub>2</sub>O gemischt und die PCR-Reaktion mit folgenden Temperaturen und Zyklen durchgeführt:

5 min. 95 °C	} 35 Zyklen
1 min. 95 °C	
2 min. 60 °C	
2 min. 72 °C	
10 min. 72 °C	
∞ 4 °C	

### 2.2.10 Auftrennung von Nukleinsäuren in DNA-Agarosegelen durch Gelelektrophorese

Lösung	Zusammensetzung
10 x TBE	900 mM Tris, 900 mM Borsäure, 12,5 mM EDTA, (pH 8,2)

Die Größenauftrennung der PCR-Amplifikate erfolgte in horizontal laufenden 2 %-igen Agarosegelen (2 % Agarose [w/v] in TBE-Puffer). Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde der Agarose-Lösung der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (1:10000) zugesetzt. Die Proben, die bereits durch den Ready Red Taq Master Mix<sup>®</sup> Probenpuffer angefärbt waren, wurden in die Geltaschen pipettiert. Zur Größenidentifizierung der Fragmente wurde zusätzlich ein 100 bp Marker mit aufgetragen. Die Gele waren für ca. 45 min einer Spannung von 80mV/cm ausgesetzt: Die Visualisierung der Fragmente erfolgte auf einem UV-Transilluminator.

### 2.2.11 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde die Absorption bei 260 nm, 280 nm und 320 nm bestimmt. Eine optische Dichte ( $OD_{260}$ ) von 1 entspricht ca. 50  $\mu\text{g}$  doppelsträngiger DNA/ml, 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNA bzw. 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Oligonukleotide. Das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  gibt Aufschluss über Reinheit der DNA-Lösung. Sie beträgt bei reiner DNA 1,8 und bei RNA  $\geq 2,0$ . Verunreinigung durch Proteine können bei einer Wellenlänge von 320 nm detektiert.

### 2.2.12 South Western Analyse (Slot Blot)

Lösung	Zusammensetzung
10x SSC	1,5 M NaCl, 150 mM Natriumcitrat, pH: 7,0
Blockierungspuffer	5% Milchpulver in TBS/Tween 20

Von entsprechend behandelten Zellen wurde die genomische DNA isoliert wie unter 3.2.8 beschrieben und 2  $\mu\text{g}$  DNA mit TE-Puffer zu einem Endvolumen von 100  $\mu\text{l}$  verdünnt. Die DNA wurde durch 10-minütiges Erhitzen auf 95 °C denaturiert und kurz auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  eiskaltes Ammoniumacetat (2 M) zugegeben. Eine Hybond-N+-Membran wurde mit 1M Ammoniumacetat getränkt und in die Slot-Blot Apparatur eingebracht. Die komplette Probe wurde in die Aussparungen der Slot-Blot Apparatur pipettiert und durch Erzeugung eines Unterdruckes mit einer Vakuumpumpe erfolgte der Transfer der DNA-Proben auf die Membran. Es folgten einmalige Waschungen der Membran mit 1 M Ammoniumacetat

und H<sub>2</sub>O und eine 5-minütige Inkubation in 5xSSC. Durch Erhitzen der Membran bei 80 °C für 2h wurde die DNA auf der Membran fixiert. Um unspezifische Antikörper-Bindungen zu verhindern, wurden die Membranen in Blockierungspuffer bei 4 °C ü.N. geblockt. Nach 1h Inkubation mit dem primären Antikörper bei RT und einer weiteren Inkubation von 2h bei RT mit dem Sekundär-Antikörper erfolgte die Detektion der AK-Bindung mittels ECL-Reaktion und Autoradiographie.

### 2.2.13 RNA-Isolation und Reverse Transkriptase Reaktion

Die Isolation der RNA erfolgte mit dem Nucleospin RNAII Kit (Macherey & Nagel) nach Protokoll des Herstellers. Die RNA wurde isoliert, indem die Zellen lysiert und mit Ethanol gewaschen wurden. Die RNA wurde anschließend an eine Silicamembran gebunden und mögliche DNA-Kontaminationen wurden durch einen DNase Verdau eliminiert. Nach Elution der RNA mit RNase freiem Wasser wurde die Konzentration der RNA photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Die Reverse Transkriptase wurde mit dem Enhanced Avian RT First Strand Synthesis Kit von Sigma-Aldrich (München) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Reaktion wurden 0,5 µg RNA eingesetzt. Die folgend durchgeführte PCR-Reaktion wird unter Punkt 3.2.9 beschrieben.

### 2.2.14 Immunfluoreszenzfärbungen

#### 2.2.14.1 FITC-Phalloidin

Lösung	Zusammensetzung
Fixierungslösung	0,1 M Phosphatpuffer pH 7,3, 4% Formaldehyd, 0,2% Triton X-100
Phosphatpuffer	1,7 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,78 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , mit H <sub>2</sub> O zu 1 kg auffüllen

Die Zellen wurden auf sterilen Deckgläschen ausgesät und 24h später behandelt. Nach drei Waschschrinen in Phosphatpuffer (P.P) wurden die Zellen 1h bei RT fixiert. Die Färbung der Zellen mit FITC-Phalloidin erfolgte für 1,5h im Dunkeln bei RT in P.P.. Anschließend wurde mehrfach mit P.P. gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit den Zellen nach unten auf den Objekträger aufgebracht, auf den zuvor Mounting Medium zur Konservierung der Fluoreszenz aufgebracht wurde. Durch das Auftragen von Nagellack wurde das Deckgläschen luftdicht versiegelt. Die Analyse erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung an einem Fluoreszenzmikroskop.

2.2.14.2  $\gamma$ -H2AX-Foci

Lösung	Zusammensetzung
DAPI	100 ng/ml in PBS/0,1% Tween 20
Blockierungspuffer	5% BSA in PBS/ 0,3 Triton X-100

Zuerst wurden Deckgläschen beschichtet, indem diese mit Diethylether für 15 min inkubiert, mit 100 %- und 70 %-Ethanol gewaschen und 20 min in 1 M HCl inkubiert wurden. Anschließend wurden die Deckgläschen in 70 %-igen Ethanol überführt und hierin bis zur Verwendung gelagert. Die auf den Deckgläschen ausgesäten Zellen wurden entsprechend behandelt und nach Entfernung des Mediums der Zellrasen mit PBS gewaschen. Um die Zellmembran zu permeabilisieren erfolgte eine Inkubation der Zellen in 4 % Formaldehyd in PBS für 15 min. Nach dreimaligen waschen mit PBS wurden die Zellen durch Inkubation mit eiskaltem Methanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert. Die Zellen wurden anschließend 1h in Blockierungspuffer geblockt und mit dem primären Antikörper ( $\gamma$ -H2AX 1:1000) über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS und mit PBS/0,4 M NaCl gespült, um Hintergrundsignale zu reduzieren. Bevor der sekundär Antikörper (Alexa Fluor 488, goat-anti-mouse 1:500) für 2h zugegeben wurde, erfolgte ein dreimaliges waschen mit PBS/0,3 % Triton. Nach weiteren Waschschritten (3x PBS, im Dunkeln), erfolgte die 15-minütige Färbung der Zellkerne mittels DAPI. Auf einem Objektträger wurden 15  $\mu\text{l}$  Mounting Medium (Vectashield, Axxora) gegeben und die Deckgläschen mit den Zellen nach unten aufgebracht. Die luftdichte Versiegelung erfolgte durch Nagellack. Die Visualisierung der Immunfluoreszenz erfolgte im Fluoreszenzmikroskop bei einer 1000-fachen Vergrößerung.

## 2.2.15 Alkalische Comet Analyse

Lösung	Zusammensetzung
Lysispuffer	2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS/HCL, 1% Na-Laurylsarcosinat, pH 10,0 vor Gebrauch werden zu 100 ml dieses Puffers 10 ml DMSO und 1 ml Triton X-100 zugegeben
Elektrophoresepuffer	300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH $\geq 13$
Neutralisierungspuffer	0,4 M TRIS/HCl pH 7,5

Es wurden 10  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) in 120  $\mu\text{l}$  LMP-Agarose (0,5% in  $\text{dH}_2\text{O}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ ) aufgenommen und auf einen mit Agarose beschichteten Objektträger gegeben, mit einem Deckglas versiegelt und für 5 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  geliert. Nach Abziehen des Deckglases wurde der Objektträger in eiskalten Lysispuffer gestellt und 1h bei

4°C inkubiert. Das Präparat wurde aus dem Lysispuffer genommen, kurz abgetropft und in die Elektrophoresekammer in den auf 4°C vorgekühlten Elektrophoresepuffer gelegt. Nach einer Denaturierungszeit von 25 min erfolgte die Elektrophorese bei 4°C, 25 V, 300 mA für 15 min. Der Objektträger wurde anschließend 3x für 5 min mit Neutralisierungspuffer gewaschen, dann kurz abgetropft und 5 min in 100 %-Ethanol getaucht. Das Präparat wurde einige Stunden bei RT getrocknet und kann mehrere Monate aufbewahrt werden. Zur Auswertung wurde die DNA auf dem Objektträger mit 50 µl Ethidiumbromid (20 µg/ml) gefärbt und bei 20-facher Vergrößerung im Mikroskop unter Zuhilfenahme der Software Kinetic Imaging Komet 4.0.2 (BFI Optilas, Puchheim) das Olive Tail Moment (OTM) bestimmt.

#### 2.2.16 Induktiv-gekoppelte Massenspektrometrie (ICP-MS)

Aus  $2 \times 10^6$  der entsprechend behandelten Zellen wurden die DNA isoliert. Für die Messung der Platinierung muß das vorhandene organische Material mit  $\text{HNO}_3$  hydrolisiert und oxidiert werden. Dafür wurden 40 µl der DNA mit 3 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (Millipore) und mit 160 µl rauchender Salpetersäure versetzt. Die Messung des Platingehaltes erfolgte an einem HR-ICP-MS, Element 2 (Thermo Finigen, Bremen). Für die Eichung wurden Platinstandards 1 g/l (Fluka-Riedel-de Häen, Seelze) verwendet und die Berechnung der Platinaddukte der DNA (rB-Wert) erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{rB-Wert} = \frac{\frac{\text{Platinmassenkonz. (g/l)}}{M (\text{Pt}) \text{ g/mol}}}{\frac{\text{DNA-Massenkonz. (g/l)}}{\varnothing M (\text{Bp}) \text{ g/mol}}}$$

Die Platinkonzentration der DNA-Basenpaare berechnet sich aus dem Quotienten der Massenkonzentration und der Molmasse von Platin (195,08 g/mol). Analog ergibt sich die Konzentration der Basenpaare aus dem Quotienten der DNA-Massenkonzentration und der durchschnittliche Molmasse eines Basenpaares (650 g/mol). Das Verhältnis der Konzentration entspricht dem molaren Verhältnis und ist somit der rB-Wert.

#### 2.2.17 ROS Messung

Die Zellen wurden in 96-well Platten ausgesät und entsprechend behandelt. Die Inkubation mit 2', 7'-dichlorofluorescein (DCFDA) (10 mM in DMSO) erfolgte für 1h in PBS (Li et al., 2002a). Dabei macht man sich das Prinzip zu nutzte, dass dem nicht

fluoreszierenden DCF durch intrazelluläre Esterasen und Oxidation in der Zelle die Acetatgruppe entfernt wird, wodurch die fluoreszierende, geladene Form des DCFs entsteht. Diese Form des DCFs ist nicht mehr membrangängig. Anschließend wurde die Intensität der Fluoreszenz bei einer Excitation von 492-495 nm und einer Emission von 517-527 nm Wellenlänge in einem 96 well-Fluorometer gemessen.

#### 2.2.18 Alkalische Elution

Die Messung oxidativer DNA-Schäden wurden durch die Analyse der Formamid-Pyrimidin sensitiven Stellen (FPG-Sites) durchgeführt (Osterode et al., 2002).

#### 2.2.19 Statistische Auswertungen

Zur statistischen Analyse wurde der ungepaarte, zweiseitige Student's T-Test für unverbundene Stichproben angewendet. Die Berechnung erfolgte mit Microsoft Excel®. Ein p-Wert von  $< 0,05$  wurde als signifikant betrachtet. Die Daten in den Graphen wurden als Mittelwerte aufgeführt, die mit den Standardabweichungen versehen wurden.

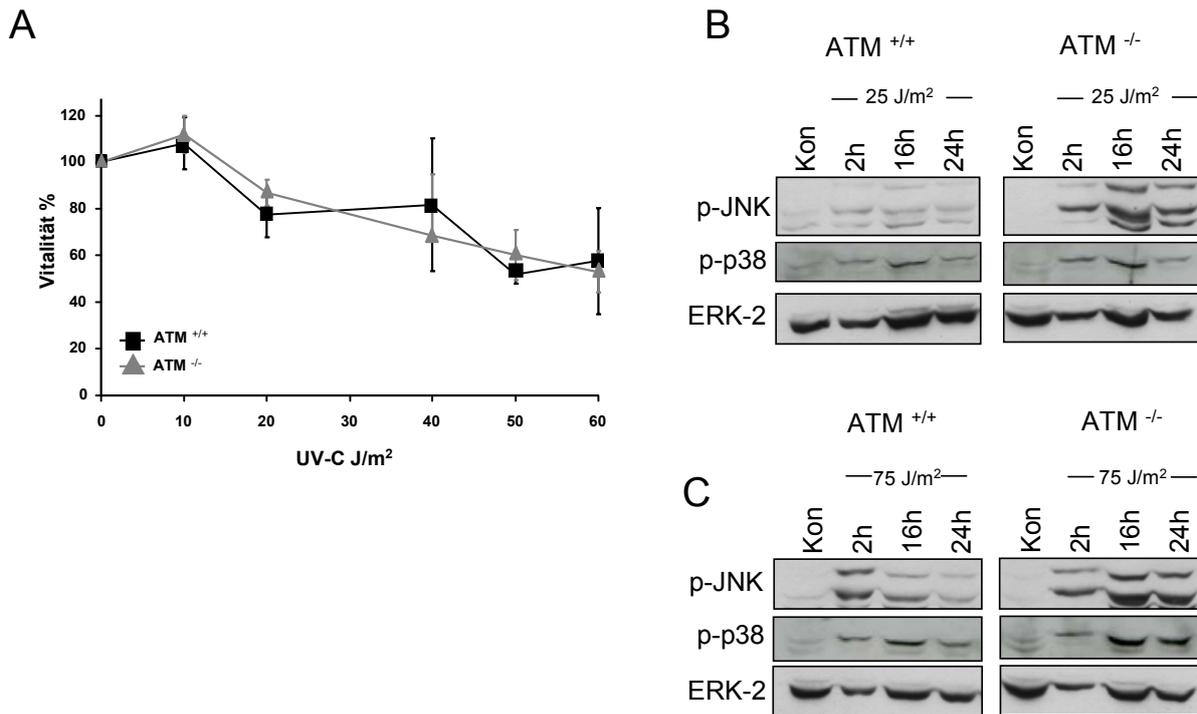
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 DNA-schadensabhängige Aktivierung von Stress-Kinasen

##### 3.1.1 Einfluss von DNA-Schadenserkennungsmechanismen auf die Aktivierbarkeit der SAPK/JNK durch Crosslink-induzierende Agenzien

Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) ist eine Serin-Threonin Kinase, die durch DNA Doppelstrangbrüche aktiviert wird (Hawley & Friend, 1996; Shiloh, 2006; Zhang et al., 1997). Um einen möglichen Einfluss der ATM-Kinase auf die Aktivierung der SAPK/JNK nach UV-C-, Cisplatin- und Transplatin-Behandlung zu untersuchen, wurden Mausfibroblasten aus ATM-Knock-Out Mäusen ( $ATM^{-/-}$ ) mit ihrem korrespondierenden Wildtyp ( $ATM^{+/+}$ ) verglichen.  $ATM^{-/-}$  und Wildtyp Zellen zeigten 24h nach UV-C-Behandlung eine dosisabhängige Reduktion der Vitalität, die durch einen WST-1 Assay gemessen wurde. Unter diesen Bedingungen konnten keine Unterschiede in der Sensitivität von  $ATM^{+/+}$  und  $ATM^{-/-}$  Zellen festgestellt werden (Abb. 8A). Nach Bestrahlung der Zelllinien mit  $25 \text{ J/m}^2$  zeigten ATM-defiziente Zellen nach 2h eine bis 24h an Stärke zunehmende SAPK/JNK Phosphorylierung. In ATM-profizienten Zellen konnte hingegen lediglich eine schwache, an Stärke gleichbleibende Aktivierung der Stress-Kinasen beobachtet werden (Abb. 8B). Die 2h nach UV-C-Strahlung beginnende Induktion der p38 MAP-Kinase nahm in beiden Zelllinien nach 16h ab (Abb. 8B). Die Verwendung von höheren Dosen UV-C ( $75 \text{ J/m}^2$ ) verstärkte die beobachteten Unterschiede in den Zellen (Abb. 8C).

Folglich kommt es in  $ATM^{-/-}$  Zellen, nicht jedoch in  $ATM^{+/+}$  Zellen durch UV-C Bestrahlung zu einer dosisabhängigen späten SAPK/JNK Phosphorylierung. Eine späte Induktion der p38 MAP-Kinasen konnte jedoch sowohl in ATM-profizienten als auch in ATM-defizienten Zellen beobachtet werden. Dabei war der Aktivierungsstatus der p38 MAP-Kinase in  $ATM^{-/-}$  allerdings im Vergleich zu  $ATM^{+/+}$  Zellen leicht erhöht.

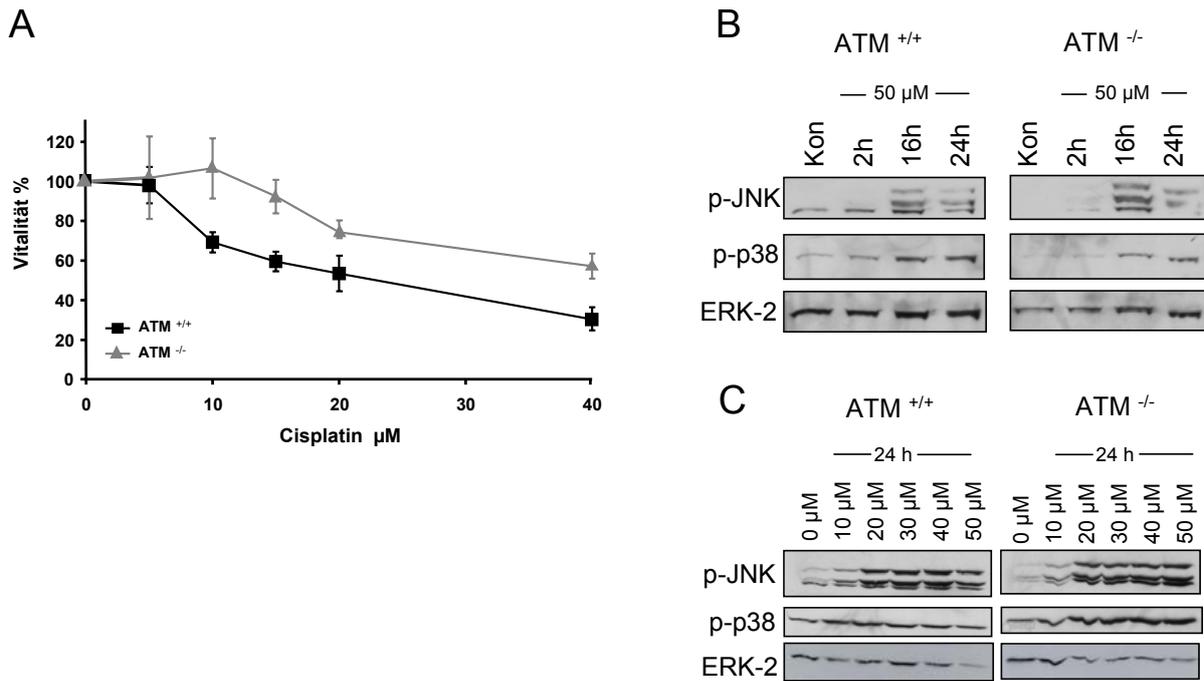


**Abbildung 8: Vitalitätsmessung und Untersuchungen der UV-C-induzierten Aktivierung der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinasen in ATM<sup>+/+</sup> und ATM<sup>-/-</sup> Zellen.**

A: Logarithmisch wachsende ATM<sup>+/+</sup> und ATM<sup>-/-</sup> Zellen wurden mit steigenden Dosen UV-C bestrahlt und 24h später wurde ein WST-1 Assay durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n=3).

B, C: Mit Proteinextrakten aus ATM<sup>+/+</sup> und ATM<sup>-/-</sup> Zellen, die mit 25 J/m<sup>2</sup> (B) bzw. 75 J/m<sup>2</sup> (C) UV-C bestrahlt wurden, erfolgten Western Blot Analysen mit p-JNK und p-p38 Antikörpern. Der Nachweis der ERK-2 Expression diene als Beladungskontrolle.

Eine Behandlung von ATM<sup>+/+</sup> und ATM<sup>-/-</sup> Zellen mit ansteigenden Dosen Cisplatin für 24h führte ebenfalls zu einer dosisabhängigen Abnahme der Vitalität, wobei die ATM<sup>-/-</sup> Zellen im Vergleich zu WT Zellen resistenter gegenüber der Cisplatin-Behandlung waren (Abb. 9A). Nach Exposition der Zellen mit 50  $\mu$ M Cisplatin konnte nach 16h und 24h eine vergleichbare Phosphorylierung der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase in beiden Zelllinien beobachtet werden (Abb. 9B). Behandlung der Zellen mit ansteigenden Konzentrationen Cisplatin diene einer näheren Charakterisierung der SAPK/JNK Aktivierung und bestätigte, dass beide Zelllinien eine vergleichbare dosisabhängige Phosphorylierung der SAPK/JNK und der p38 MAP-Kinase aufwiesen (Abb. 9C). Das Fehlen der ATM-Kinase wirkte sich nicht auf die Cisplatin-induzierte Aktivierung der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase aus.



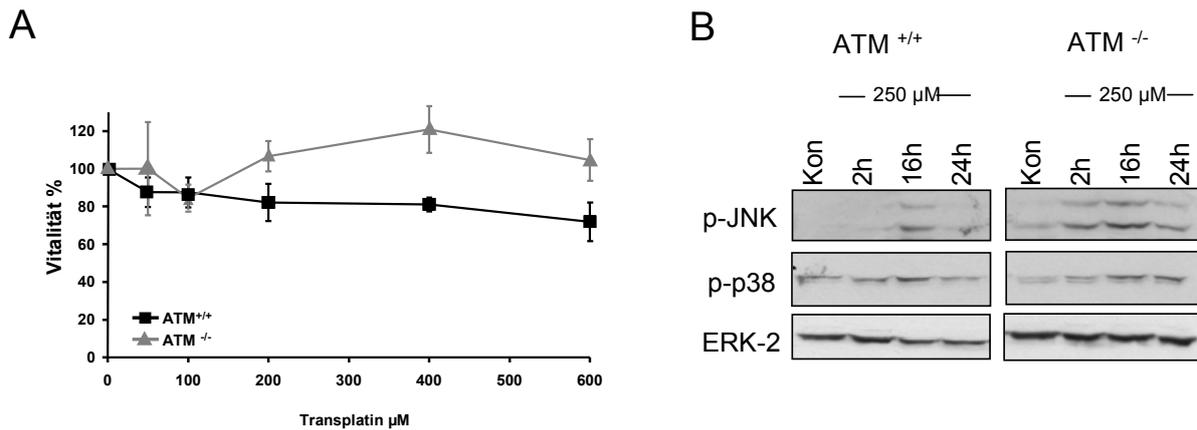
**Abbildung 9: Vitalitätsmessung und Untersuchungen der Cisplatin-induzierten SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase in ATM<sup>+/+</sup> und ATM<sup>-/-</sup> Zellen.**

A: Nach Exposition von ATM<sup>+/+</sup> und ATM<sup>-/-</sup> Zellen mit ansteigenden Dosen Cisplatin erfolgte nach 24h die Durchführung eines WST-1 Assays. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n=3).

B: Mit Extrakten aus Cisplatin-behandelten (50  $\mu\text{M}$ ) ATM<sup>+/+</sup> und ATM<sup>-/-</sup> Zellen wurden Western Blot Analysen mit p-JNK und p-p38 Antikörpern durchgeführt.

C: In ATM<sup>+/+</sup> und ATM<sup>-/-</sup> Zellen wurde 24h nach Cisplatin-Exposition der Aktivierungsstatus der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase in Proteinextrakten mittels Western Blot Analysen ermittelt. Der Nachweis der ERK-2 Expression diene als Beladungskontrolle.

Nach Behandlung mit Cisplatin nahm die Vitalität der ATM<sup>+/+</sup> Zellen nach 24h leicht ab, die der ATM<sup>-/-</sup> Zellen wurde durch das Crosslinking Agens nicht beeinflusst (Abb. 10A). Untersuchungen hinsichtlich einer Cisplatin-induzierten Aktivierung der Stress-Kinasen machten deutlich, dass in ATM<sup>-/-</sup> Zellen eine früh auftretende und anhaltende Aktivierung der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase ausgelöst wird. In WT-Zellen war hingegen lediglich nach 16h eine Phosphorylierung der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase detektierbar (Abb. 10B). Demnach verursacht die Abwesenheit der ATM-Kinase eine Cisplatin-induzierte anhaltende Phosphorylierung der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase ohne die Vitalität der reperaturdefizienten Zellen nach 24h zu beeinträchtigen.



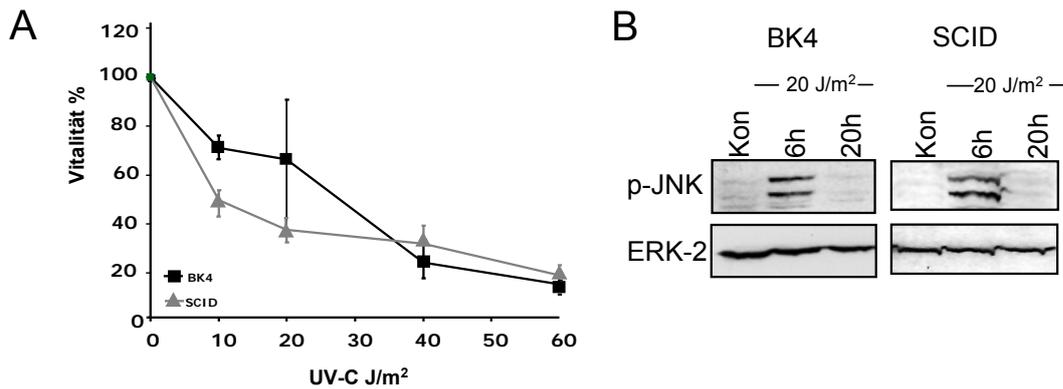
**Abbildung 10: Vitalitätsmessung und SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase Aktivierung in ATM<sup>+/+</sup> und ATM<sup>-/-</sup> Zellen nach Transplatin-Exposition.**

A: Nach Exposition von ATM<sup>+/+</sup> und ATM<sup>-/-</sup> Zellen mit ansteigenden Konzentrationen Transplatin wurde nach 24h ein WST-1 Assay durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n=3).

B: Mit Proteinextrakten aus Transplatin-behandelten (250  $\mu\text{M}$ ) ATM<sup>+/+</sup> und ATM<sup>-/-</sup> Zellen wurden Western Blot Analysen mit p-JNK und p-p38 Antikörpern durchgeführt. Der Nachweis der ERK-2 Expression diene als Beladungskontrolle.

Die DNA-PKcs ist neben der ATM-Kinase eine weitere DNA-Schadenserkennungskinese die DNA-Doppelstrangbrüche detektiert. Mit Hilfe von MEF Zellen (mouse embryonic fibroblasts) aus SCID-Mäusen (severe combined-immunodeficiency) ließ sich der Einfluss der DNA-PKcs auf die Aktivierung der Stress-Kinasen nach Exposition mit DNA-Crosslinking Agenzien untersuchen. Durch einen Defekt der katalytischen Untereinheit der DNA-PK (DNA-PKcs) ist in SCID-Mäusen die Kinase funktionell inaktiv.

Die Behandlung mit steigenden Dosen UV-C führte nach 24h in SCID- und Kontrollfibroblasten (BK4) zu einer dosisabhängigen Abnahme der Vitalität, wobei keine eindeutigen Unterschiede hinsichtlich ihrer Sensitivität detektiert werden konnten (Abb. 11A). Des Weiteren war der Aktivierungsstatus der SAPK/JNK 6h und 20h nach UV-Exposition in beiden Zelllinien vergleichbar (Abb. 11B). Folglich verläuft die UV-C-induzierte SAPK/JNK Phosphorylierung unabhängig von der DNA-PKcs.

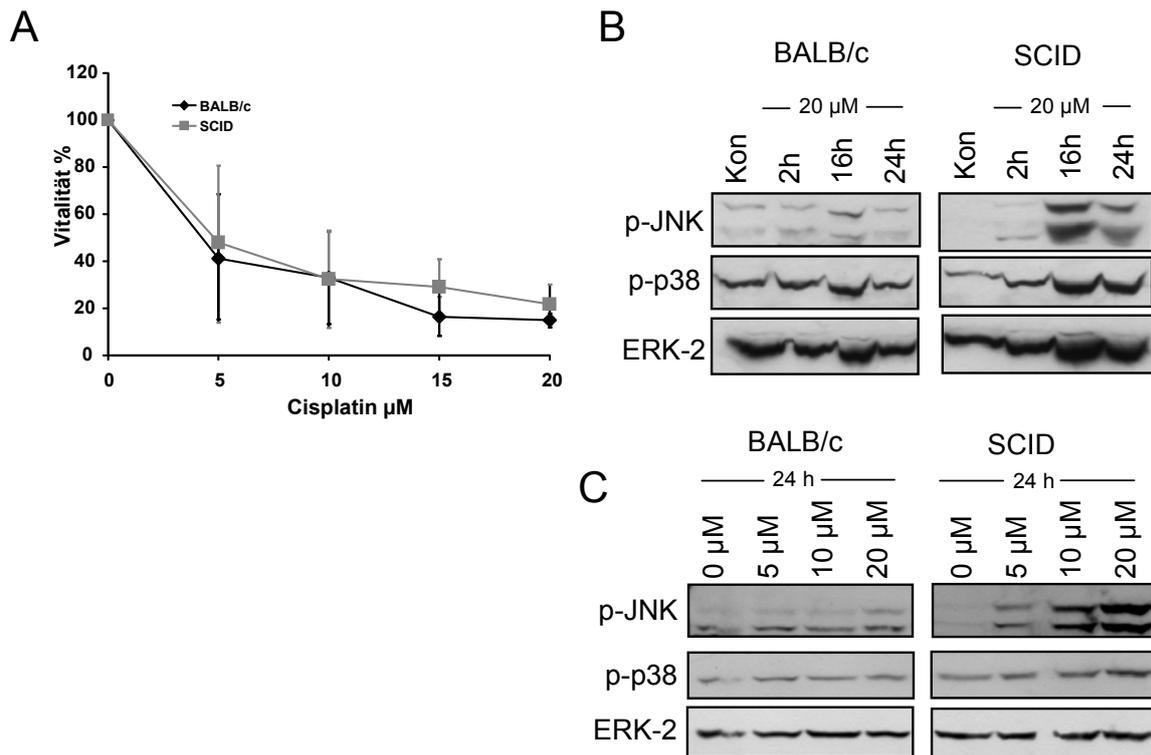


**Abbildung 11: Vitalitätsmessung und Untersuchungen der SAPK/JNK Aktivierung in BK4 und DNA-PKcs defekten Zellen nach UV-C-Strahlung.**

A: 24h nach UV-C Bestrahlung mit ansteigenden Dosen wurde mit BK4 und SCID Zellen ein WST-1 Assay durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n=3).

B: BK4 und SCID Zellen wurden mit 20 J/m<sup>2</sup> UV-C bestrahlt. 6h und 20h später wurden Western Blot Analysen mit Proteinextrakten zum Nachweis der SAPK/JNK Aktivierung durchgeführt. Der Nachweis der ERK-2 Expression diente als Beladungskontrolle.

Die Behandlung von SCID Zellen und ihrem korrespondierenden Wildtyp (BALB/c) mit ansteigenden Konzentrationen Cisplatin führte ebenfalls zu einer vergleichbaren Abnahme der Vitalität beider Zelllinien nach 24h (Abb. 12A). Cisplatin-Exposition der Zellen löste in SCID Zellen eine deutliche und zu späten Zeiten anhaltende Phosphorylierung der Stress-Kinasen aus, wohingegen in WT Zellen diese Aktivierung weit schwächer war (Abb. 12B). Zum Nachweis einer dosisabhängigen Phosphorylierung der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase wurden die Zelllinien für 24h mit ansteigenden Konzentrationen Cisplatin behandelt. Die Induktion der Stress-Kinasen verlief dabei in SCID Zellen dosisabhängig und war bereits ab Konzentrationen von 5  $\mu$ M detektierbar. In WT Zellen war im Gegensatz hierzu lediglich eine schwache Phosphorylierung der SAPK/JNK bei hohen Cisplatin Dosen (20  $\mu$ M) nachweisbar (Abb. 12C). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Cisplatin-Behandlung in SCID Zellen, nicht jedoch in BALB/c Zellen, eine dosisabhängige späte Phosphorylierung der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase bewirkt.



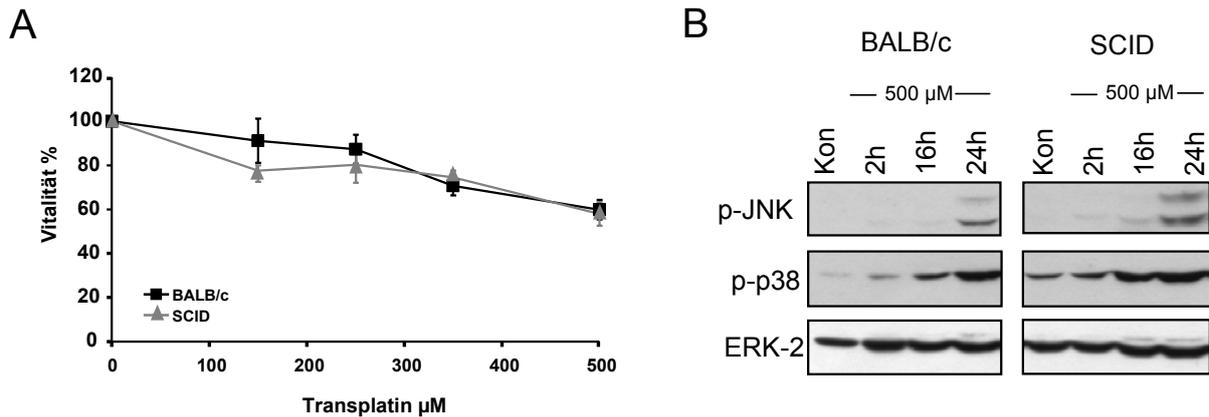
**Abbildung 12: Vitalitätsmessung und Untersuchungen der Cisplatin-induzierten SAPK/JNK Phosphorylierung in BALB/c und SCID Zellen.**

A: Nach 24h Cisplatin-Exposition mit ansteigenden Dosen wurde mit BALB/c und SCID Zellen ein WST-1 Assay durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n=3$ ).

B: Nach 20  $\mu\text{M}$  Cisplatin-Behandlung der BALB/c und SCID Zellen wurden Western Blot Analysen mit Proteinextrakten hinsichtlich der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase Phosphorylierung durchgeführt.

C: Mit Proteinextrakten aus Cisplatin-behandelten (24h) BALB/c und SCID Zellen wurden Western Blot Analysen mit p-JNK und p-p38 Antikörpern durchgeführt. Der Nachweis der ERK-2 Expression diente als Beladungskontrolle.

Wie bereits nach UV-C und Cisplatin-Exposition der WT und SCID Zellen beobachtet werden konnte, nimmt die Vitalität der BALB/c und SCID Zellen auch nach Behandlung mit Transplatin gleichermaßen ab (Abb. 13A). Des Weiteren kam es in BALB/c und SCID Zellen durch Exposition mit Transplatin zu einer späten SAPK/JNK Phosphorylierung (Abb. 13B). Im Vergleich zu BALB/c Zellen war diese Aktivierung in SCID Zellen geringfügig erhöht. Allerdings unterschieden sich die Zelllinien nicht hinsichtlich ihres p38 MAP-Kinase Aktivierungsstatus (Abb. 13B). Demzufolge führt die Abwesenheit der DNA-PKcs nach Transplatin-Exposition zu einer leicht verstärkten, späten Phosphorylierung der SAPK/JNK. Für die Untersuchungen der SCID Zellen lässt sich zusammenfassen, dass die Anwesenheit der DNA-PKcs sich hemmend auf die späte, durch Cisplatin-, sowie mit Einschränkung auf die Transplatin-induzierte SAPK/JNK Aktivierung ausübte.

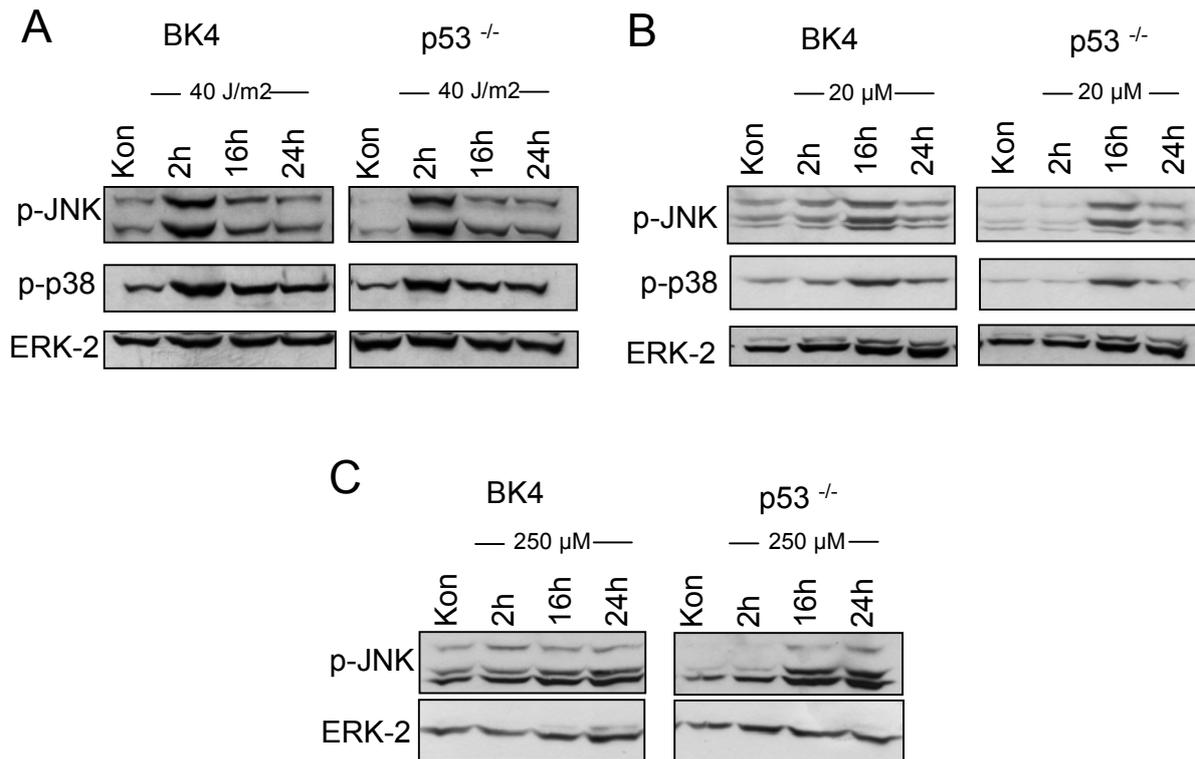


**Abbildung 13: Vitalitätsmessung und Untersuchungen der Transplatin-induzierten SAPK/JNK Phosphorylierung in BALB/c und SCID Zellen.**

A: Mit BALB/c und SCID Zellen wurde nach 24h Transplatin-Behandlung mit ansteigenden Dosen ein WST-1 Assay durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n=3$ ).

B: Mit Proteinextrakten aus Transplatin-behandelten (500  $\mu\text{M}$ ) BALB/c und SCID Zellen wurden Western Blot Analysen mit phosphospezifischen Antikörpern gegen die SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase durchgeführt.

Der Transkriptionsfaktor p53 reguliert nach Zellstress die Expression einer Vielzahl von Zielgenen die den Zellzyklusarrest und die DNA-Reparatur regulieren. Des Weiteren kontrolliert p53 Proteine die an der Apoptose beteiligt sind (Caelles, Helmberg & Karin, 1994; Fields & Jang, 1990; Lee & Bernstein, 1993). Anhand von Fibroblasten aus p53 Knock-Out Mäusen ( $p53^{-/-}$ ) wurde ein Einfluss von p53 auf die Aktivierung von Stress-Kinasen durch DNA-Crosslinking Agenzien untersucht. Wildtypische Mausfibroblasten (BK4) und  $p53^{-/-}$  Zellen zeigten 2h nach UV-C-Exposition einen vergleichbaren Anstieg der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase (Abb. 14A). Nach Gabe von Cisplatin (Abb. 14B) bzw. Transplatin (Abb. 14C) konnte nach 16h in BK4 und  $p53^{-/-}$  Zellen ein vergleichbarer, durch Transplatin allerdings lediglich ein schwacher Anstieg an p-JNK und p-p38 Kinase beobachtet werden. Diese Befunde machen deutlich, dass p53 die späte Phosphorylierung der SAPK/JNK weder nach UV-C-Strahlung, Cisplatin-, noch nach Transplatin-Behandlung maßgeblich beeinflusst.



**Abbildung 14: p53 hat keinen Einfluss auf die Aktivierung der SAPK/JNK nach UV-C-, Cisplatin- und Transplatin-Behandlung.**

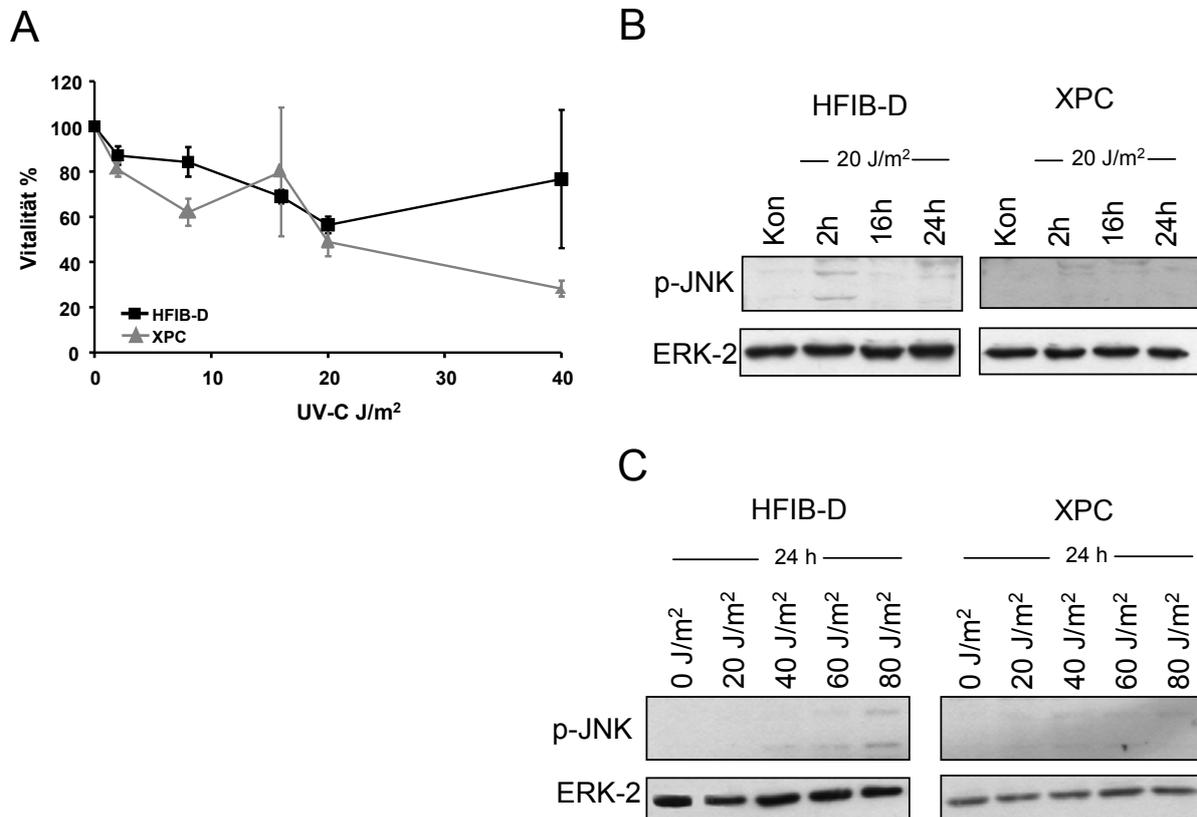
Unterschiedliche Zeiten nach 40 J/m<sup>2</sup> UV-C Bestrahlung (A), 20 μM Cisplatin-Behandlung (B) bzw. 250 μM Transplatin-Behandlung (C) von BK4 und p53<sup>-/-</sup> Zellen wurden Western Blot Analysen zum Nachweis phosphorylierter SAPK/JNK (p-JNK) bzw. phosphorylierter p38 MAP-Kinase (p-p38) durchgeführt. Der Nachweis der ERK-2 Expression diente als Beladungskontrolle

### 3.1.2 Einfluss von NER Faktoren auf UV-C-, Cisplatin- und Transplatin-induzierte Stress-Antworten

Das Xeroderma Pigmentosum Protein C (XPC) ist ein Reparaturprotein der GGR (global genome repair) und dient der DNA-Schadenserkennung (Sugasawa et al., 1998; Venema et al., 1991). Ein möglicher Einfluss des XPC-Proteins auf die Aktivierung der SAPK/JNK nach DNA-Schädigung durch UV-C, Cisplatin und Transplatin wurde an primären menschlichen Kontrollfibroblasten von XP-Patienten der Komplementgruppe C untersucht. Diese Fibroblasten haben kein funktionelles XPC-Protein und sind demzufolge GGR-defizient. Die Behandlung mit ansteigenden Dosen UV-C führte in primären menschlichen Fibroblasten (HFIB-D) und XPC Zellen nach 72h zu einer vergleichbaren Reduktion der Vitalität (Abb. 15A).

Nach Exposition der Zelllinien mit 20 J/m<sup>2</sup> wiesen ausschließlich HFIB-D Zellen nach 2h eine UV-C-induzierte Phosphorylierung der SAPK/JNK auf (Abb. 15B). In XPC Zellen konnte auch nach 24h-stündiger Postinkubation nach Bestrahlung mit ansteigenden Dosen UV-C keine SAPK/JNK Phosphorylierung detektiert werden. In

WT Zellen hingegen führte Bestrahlung mit  $80 \text{ J/m}^2$  zu einer schwachen Phosphorylierung der Stress-Kinasen nach 24h (Abb. 15C). Insgesamt zeigten HFIB-D Zellen nach UV-C-Exposition im Gegensatz zu XPC Zellen eine frühe und späte Aktivierung der SAPK/JNK. Offensichtlich ist XPC für die frühe und späte SAPK/JNK Aktivierung notwendig.



**Abbildung 15: Vitalitätsmessung und Bestimmung des SAPK/JNK Aktivitätsstatus in HFIB-D und XPC Zellen nach UV-C-Exposition.**

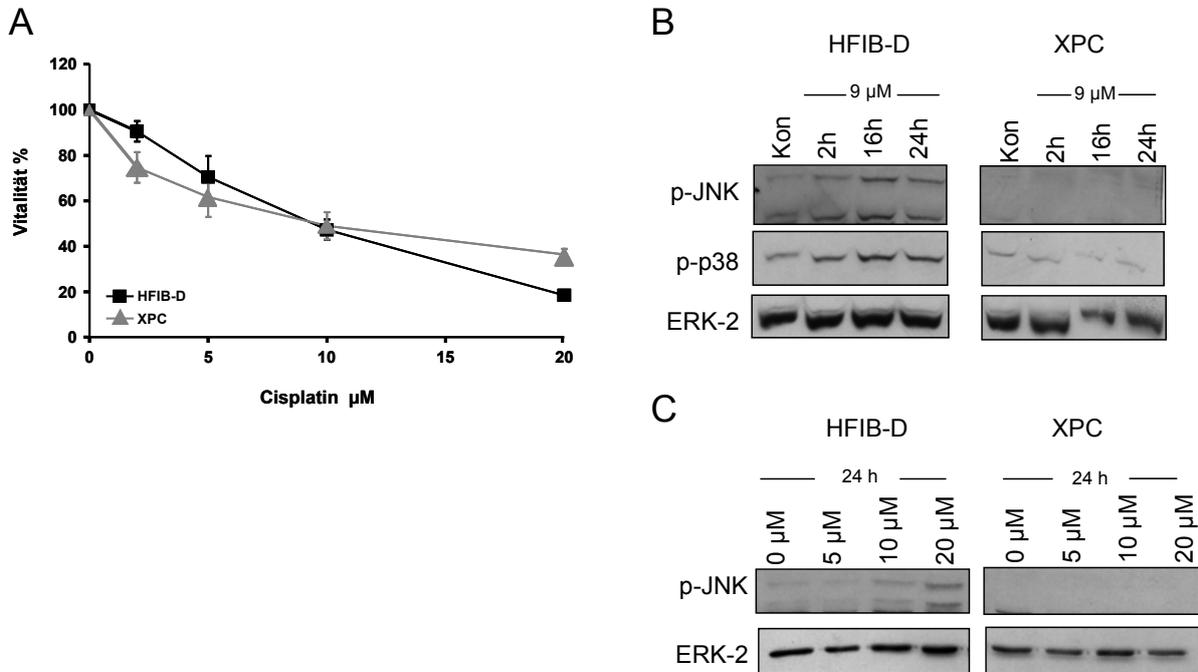
A: 72h nach UV-C Bestrahlung mit aufsteigenden Dosen wurde mit HFIB-D und XPC Zellen ein WST-1 Assay durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n=3$ ).

B: Nach UV-C-Bestrahlung mit  $20 \text{ J/m}^2$  wurden mit Extrakten aus HFIB-D und XPC Zellen Western Blot Analysen zum Nachweis phosphorylierter SAPK/JNK (p-JNK).

C: Mit Proteinextrakten aus UV-C-bestrahlten HFIB-D und XPC Zellen erfolgten Western Blot Analysen gegen die phosphospezifische Form der SAPK/JNK (p-JNK) der. Der Nachweis der ERK-2 Expression diente als Beladungskontrolle.

Behandlung der HFIB-D und XPC Zellen mit steigenden Konzentrationen Cisplatin bewirkte 72h nach Exposition ebenfalls eine vergleichbare Abnahme der Vitalität beider Zelllinien (Abb. 16A). HFIB-D und XPC Zellen wurden daraufhin mit  $9 \mu\text{M}$  Cisplatin behandelt. In XPC Zellen entspricht diese Konzentration dem  $\text{EC}_{50}$ . Cisplatin-Behandlung induzierte in WT Zellen ab 2h bis 24h die beiden Stress-Kinasen, SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase. In XPC Zellen konnte weder zu einem der

untersuchten Zeitpunkte (Abb. 16B), noch nach 24-stündiger Cisplatin-Behandlung mit steigenden Konzentrationen eine Aktivierung der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase beobachtet werden (Abb. 16C). Diese Befunde zeigten, dass das XPC Protein sowohl für die Cisplatin-, als auch für die UV-C-induzierte Aktivierung der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase benötigt wird.



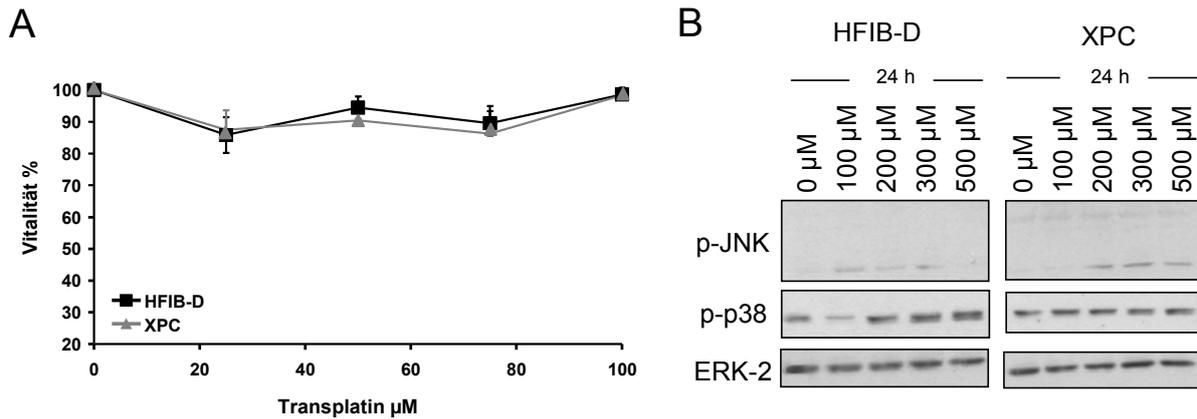
**Abbildung 16: Vitalitätsmessung und Analyse des SAPK/JNK Aktivierungsstatus in HFIB-D und XPC Zellen nach Cisplatin-Exposition.**

A: Nach 72h Behandlung mit ansteigenden Dosen Cisplatin wurde die Vitalität der HFIB-D- und XPC Zellen mittels des WST-1 Assay bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n=3$ ).

B: Nach 9  $\mu\text{M}$  Cisplatin-Behandlung erfolgte in HFIB-D und XPC Zellen der Nachweis der SAPK/JNK Phosphorylierung mit Hilfe von Western Blot Analysen.

C: Die HFIB-D und XPC Zellen wurden nach 24h Cisplatin Exposition mit ansteigenden Dosen hinsichtlich der p-JNK Expression mittels Western Blot Analysen untersucht. Der Nachweis der ERK-2 Expression diente als Beladungskontrolle.

Die Behandlung der Zelllinien mit dem Crosslinking-Agenz Transplatin für 72h beeinflusste die Vitalität der primären HFIB-D und XPC Zellen nicht (Abb. 17A). Die 24-stündige Exposition der Zellen mit unterschiedlichen Konzentration Transplatin konnte keine deutliche Aktivierung der Stress-Kinasen, SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase auslösen (Abb. 17B).



**Abbildung 17: Vitalitätsmessung und Nachweis der SAPK/JNK Aktivierung in HFIB-D und XPC Zellen nach Transplatin-Behandlung.**

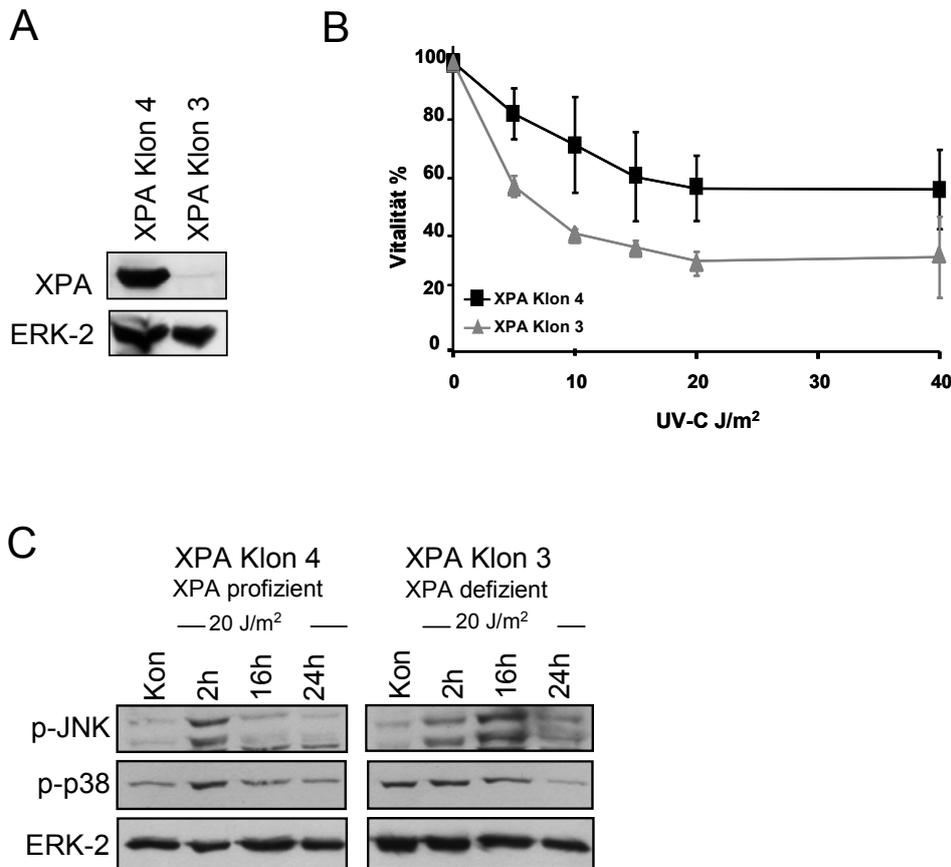
A: Nach 72 h Transplatin-Behandlung mit ansteigenden Dosen erfolgte mit HFIB-D und XPC Zellen ein WST-1 Assay. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n=3$ ).

B: Mit HFIB-D und XPC Zellen wurde nach Behandlung mit ansteigenden Dosen Transplatin nach 24h Western Blot Analysen hinsichtlich der Aktivierung der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase Kinase durchgeführt. Der Nachweis der ERK-2 Expression diente als Beladungskontrolle.

Neben XPC ist Xeroderma Pigmentosum Protein A (XP-A) ein weiteres zentrales Reparaturprotein der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER), über welche UV-C-, Cisplatin und Transplatin Läsionen repariert werden (Tanaka et al., 1990). Aus diesem Grund wurden SV-40 transformierte humane Fibroblasten von XP-Patienten der Komplementgruppe A (XPA-Klon 3, im folgenden: XPA-defizient) nach Behandlung mit DNA-Crosslinking Agenzien hinsichtlich der Aktivierung von Stress-Kinasen mit Zellen verglichen, die durch Transfektion mit XPA exprimierender cDNA für die XPA-Expression korrigiert wurden (XPA-Klon 4, im folgenden: XPA-profizient) (Abb. 18A) (Koberle, Roginskaya & Wood, 2006).

Die Behandlung XPA-profizienter und -defizienter Zellen mit ansteigenden Dosen UV-C führte in beiden Zelllinien nach 24h zu einer Abnahme der Vitalität. Allerdings reagierten XPA-defiziente Zellen deutlich sensibler gegenüber der UV-C-Strahlung als XPA-profizienten Zellen (Abb. 18B), wie bereits Arbeiten von Satokata (1993) bestätigten (Satokata et al., 1993). UV-C Bestrahlung beider Zelllinien mit  $20 \text{ J/m}^2$  führte ausschließlich in XPA-/- Zellen zu einer Zunahme der späten (16h) SAPK/JNK Phosphorylierung, welche allerdings nach 24h wieder auf Basalniveau abnahm. In WT Zellen war lediglich eine frühe (2h) transiente UV-C-induzierte Phosphorylierung dieser Stress-Kinase sowie der p38 MAP-Kinase nachweisbar. Aufgrund der hohen basalen p38 MAP-Kinase Phosphorylierung in XPA-defizienten Zellen ist die Aktivierung dieser Kinase nicht detektierbar (Abb. 18C). UV-C-Strahlung führte

folglich in XPA-defizienten Zellen, jedoch nicht in XPA-profizienten Zellen zu einer anhaltenden späten SAPK/JNK Phosphorylierung.



**Abbildung 18: Bestimmung der Vitalität nach UV-C-Strahlung und Einfluss des XPA-Proteins auf die UV-induzierte SAPK/JNK Phosphorylierung.**

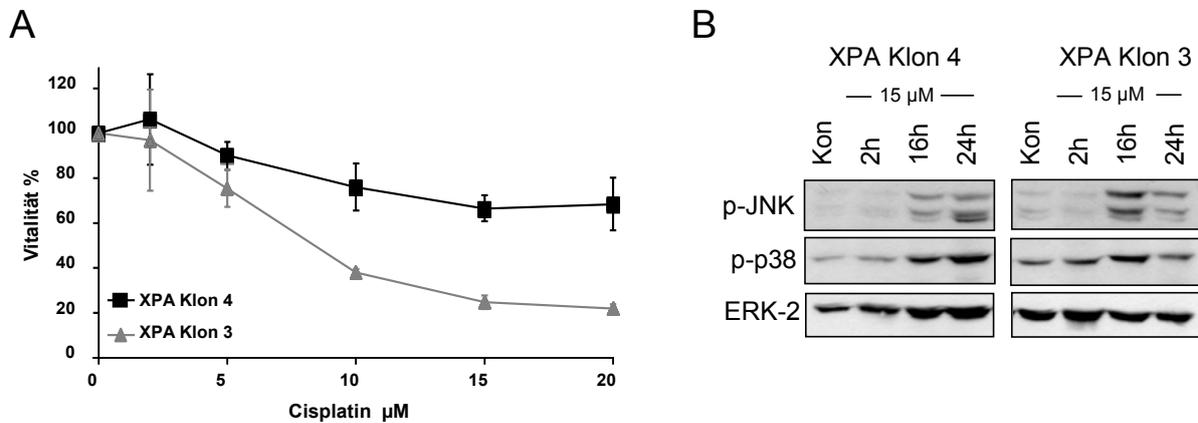
A: In den Zellklonen XPA Klon 4 (XPA profizient) und XPA Klon 3 (XPA defizient) wurde die basale Expression des XPA-Proteins nachgewiesen.

B: Nach Behandlung der XPA-profizienten bzw. -defizienten Zellen mit ansteigenden Dosen UV-C erfolgte nach 24h die Messung der Vitalität mittels WST-1 Assay. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n=3).

C: Nach UV-C-Behandlung mit 20 J/m<sup>2</sup> wurde der SAPK/JNK Aktivitätsstatus in XPA-profizienten und defizienten-Zellen durch Western Blot Analysen ermittelt. Der Nachweis der ERK-2 Expression diente als Beladungskontrolle.

In XPA-profizienten und-defizienten Zellen verursachte die Behandlung mit Cisplatin eine dosisabhängige Reduktion der Vitalität beider Zelllinien, wobei die NER-defizienten Zellen allerdings sensibler als NER-reparaturprofiziente Zellen waren (Abb. 12B). Dieser Befund geht mit Ergebnissen von Furuta (2002) einher (Furuta et al., 2002). Eine verstärkte, spät (16h) auftretende Phosphorylierung der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase wurde in XPA-defizienten Zellen nach Behandlung mit 15  $\mu$ M Cisplatin beobachtet, dagegen verlief die Aktivierung der SAPK/JNK in den NER-profizienten Zellen deutlich schwächer und die der p38 MAP-Kinase war vergleichbar

zu den defizienten Zellen. Nach 24h nahm allerdings die Aktivität der beiden Stress-Kinasen in XPA-defizienten Zellen wieder leicht ab (Abb. 19B). Folglich kommt es in XPA-defizienten, im Vergleich zu reperaturprofizienten Zellen 16h nach Cisplatin-Exposition zu einer verstärkten SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase Phosphorylierung.

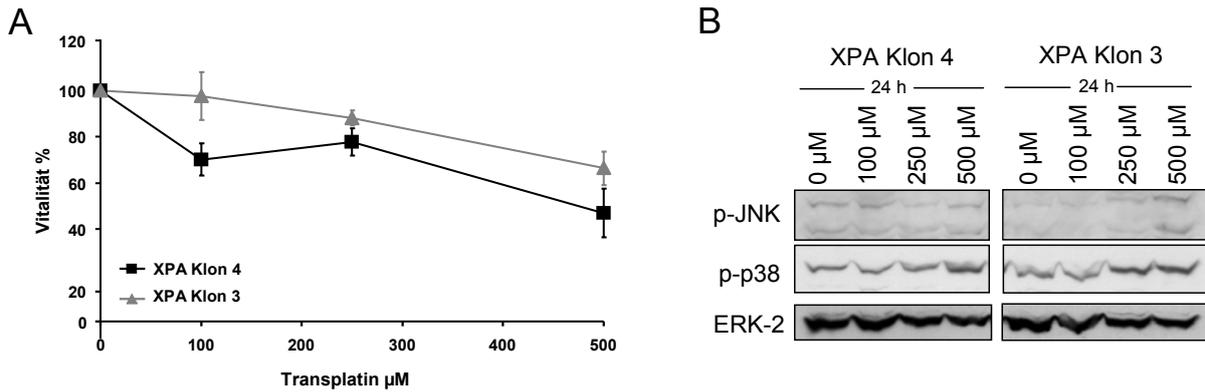


**Abbildung 19: Einfluss des XPA-Proteins auf die Vitalität und SAPK und p38 MAP-Kinase Aktivierung nach Cisplatin-Behandlung.**

A: Nach 24h Cisplatin-Behandlung mit aufsteigenden Dosen erfolgte die Messung der Vitalität der XPA-profizienten bzw. -defizienten Zellen mittels des WST-1 Assays. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n=3).

B: XPA-profizienten und defizienten Zellen wurden mit 15  $\mu\text{M}$  Cisplatin behandelt und Western Blot Analysen mit p-JNK und p-p38 Antikörpern durchgeführt. Der Nachweis der ERK-2 Expression diente als Beladungskontrolle.

XPA-profiziente und -defiziente Zellen zeigten nach einer 24-stündigen Inkubation mit steigenden Konzentrationen Transplatin eine identische Abnahme der Vitalität (Abb. 20A). Untersuchungen hinsichtlich einer Transplatin-induzierten Phosphorylierung von Stress-Kinasen, zeigten in XPA-/- Zellen eine dosisabhängige Zunahme der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase Phosphorylierung. In reperaturprofizienten Zellen führte die Transplatin-Behandlung lediglich zu einer schwachen p38 MAP-Kinase Phosphorylierung, nicht aber zu einer Aktivierung der SAPK/JNK (Abb. 20B). Die Daten belegen, dass UV-C-, Cisplatin- und Transplatin-Behandlung in Abwesenheit des XPA-Proteins zu einer verstärkten späten Phosphorylierung der Stress-Kinasen SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase führen.

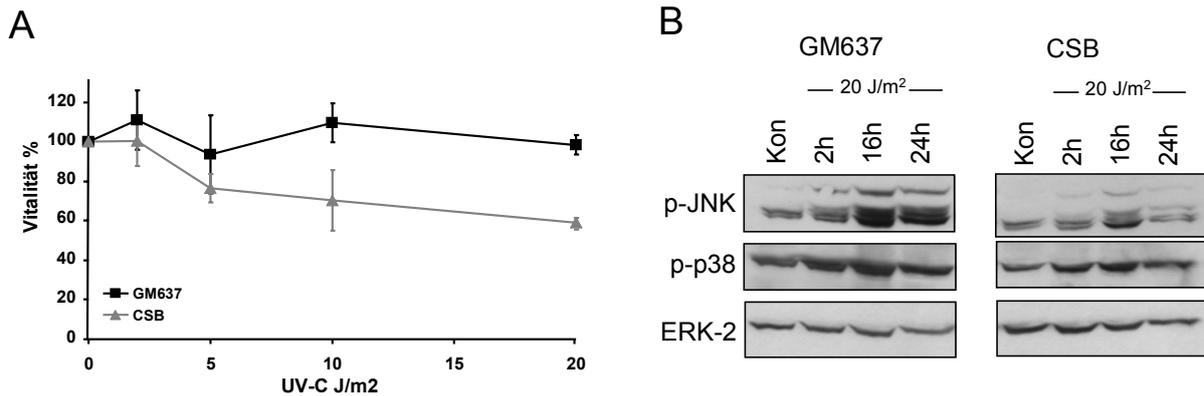


**Abbildung 20: Einfluss des XPA-Proteins auf die Vitalität und die SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase Aktivierung nach Transplatin-Behandlung.**

A: Nach 24h Transplatin-Behandlung mit aufsteigenden Dosen der XPA-profizienten und defizienten Zellen wurde ein WST-1 Assay zur Bestimmung der Vitalität durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n=3).

B: Die XPA-profizienten und -defizienten Zellen wurden 24h mit aufsteigenden Dosen Transplatin behandelt und Western Blot Analysen hinsichtlich der p-JNK und p-p38 Expression durchgeführt. Der Nachweis der ERK-2 Expression diene als Beladungskontrolle.

Das Cockayne Syndrome B Protein (CSB) ist ein spezifisches DNA-Schadenserkennungsprotein der TCR (Troelstra et al., 1992). Daher wurden an der humanen Fibroblasten Zelllinie CS1AN.S3.G2, die der CS-Komplementgruppe B angehört (CSB Zellen), und einer CSB-profizienten humanen Fibroblastenlinie (GM637) der Einfluss des CSB-Proteins auf die Aktivierung der SAPK/JNK nach Behandlung mit Crosslinking-Agenzien untersucht. Die Behandlung mit ansteigenden Dosen UV-C führte nach 24h in CSB Zellen zu einer Abnahme ihrer Vitalität. GM637 Zellen wurden unter den gewählten Bedingungen in ihrer Vitalität dagegen nicht beeinflusst (Abb.21A). Nach Bestrahlung mit  $20 \text{ J/m}^2$  UV-C zeigten GM637 Zellen eine bis 24h anhaltende Phosphorylierung der SAPK/JNK, die CSB Zellen hingegen wiesen nur nach 16h eine schwache Phosphorylierung dieser Kinase auf (Abb. 21 B). Bezüglich der p38 MAP-Kinase führte UV-C-Strahlung jedoch in beiden Zelllinien nach 2h zu einer andauernden Phosphorylierung dieser Kinase (Abb. 21B). Demnach ist die späte UV-C induzierte Aktivierung der SAPK/JNK von dem NER-Protein CSB abhängig, welches allerdings keinen Einfluss auf die p38 MAP-Kinase Phosphorylierung hat.



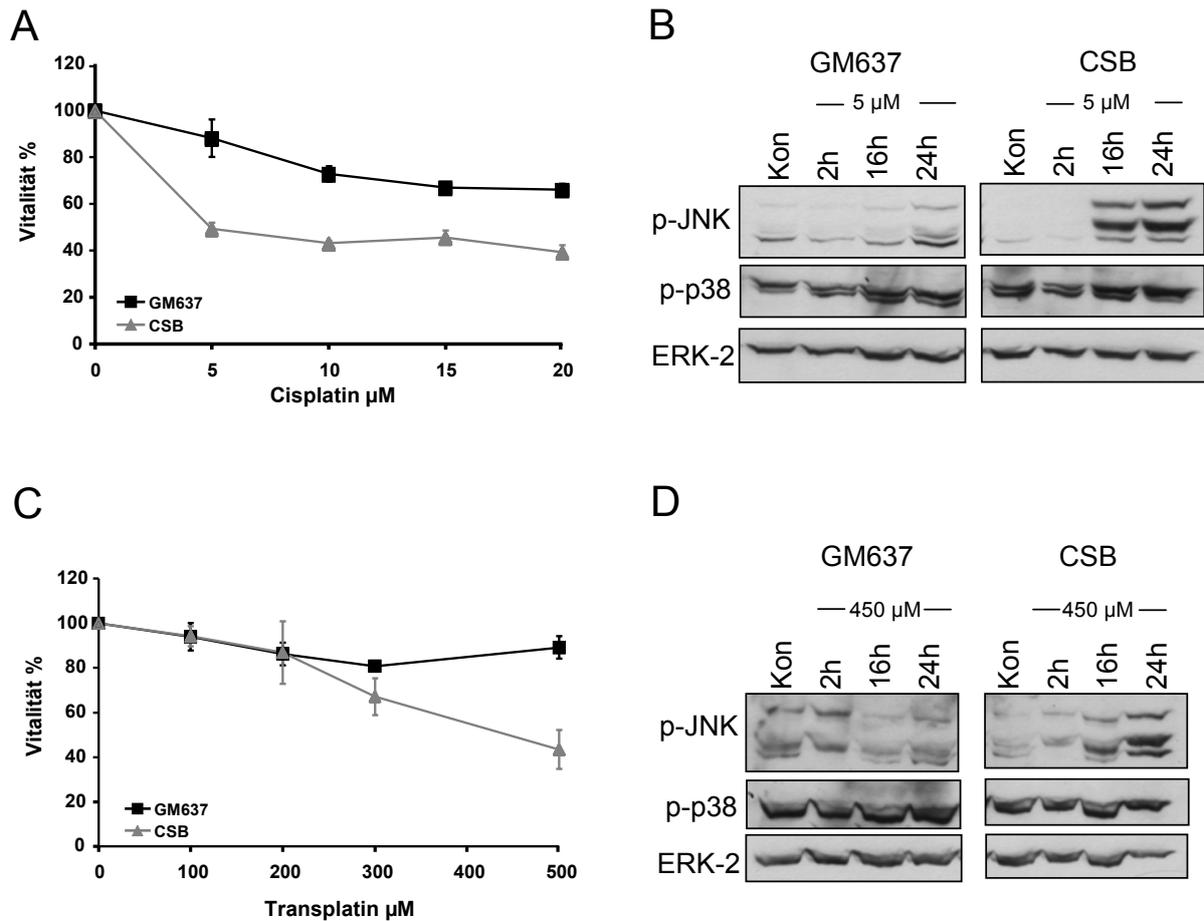
**Abbildung 21: Einfluss des CSB Proteins auf die Vitalität und UV-C induzierte Aktivierung der SAPK/JNK und p-p38 Kinase.**

A: Die Vitalitätsmessung der GM637 und CSB Zellen erfolgte nach 24h Cisplatin- Behandlung mittels des WST-1 Assays. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n=3).

B: Nach Bestrahlung mit 20 J/m<sup>2</sup> UV-C wurden mit Proteinextrakten aus GM637 und CSB Zellen Western Blot Analysen mit phosphospezifischen Antikörpern gegen die SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase durchgeführt. Der Nachweis der ERK-2 Expression diente als Beladungskontrolle.

GM637 und CSB Zellen wurden 24h mit steigenden Konzentrationen Cisplatin behandelt und dabei eine Abnahme der Vitalität beobachtet, die in CSB Zellen deutlich ausgeprägter verlief als in WT Zellen (Abb. 22A). Bereits die Behandlung mit 5  $\mu$ M Cisplatin verursachte in CSB Zellen nach 16h eine deutliche auch nach 24h zu beobachtende Phosphorylierung der SAPK/JNK. Im Vergleich zu den NER-defizienten Zellen konnte in den reparaturprofizienten Fibroblasten lediglich eine schwache SAPK/JNK Aktivierung nach 24h detektiert werden. Eine Cisplatin-induzierte Phosphorylierung der p-38 Kinase konnte in den Zellen nicht eindeutig festgestellt werden (Abb. 22B).

Transplatin-Behandlung der GM637 und CSB Zellen führte mit zunehmenden Konzentrationen in GM637 Zellen zu einer leichten, in CSB Zellen zu einer starken Abnahme der Vitalität (Abb. 22C). Zudem induzierten Transplatin Dosen von 450  $\mu$ M in NER-defizienten Fibroblasten eine deutliche SAPK/JNK Aktivierung nach 16h die nach 24h an Stärke zunahm. Im Gegensatz hierzu wiesen reparaturprofiziente Zellen nur eine schwache SAPK/JNK Phosphorylierung nach 2h auf. Auch nach Transplatin-Behandlung lassen sich keine eindeutigen Aussagen über eine induzierbare p-p38 MAP-Kinase Aktivität treffen (Abb. 22D). Die Befunde machen deutlich, dass Cisplatin- und Transplatin-Exposition der CSB-defizienten Fibroblasten zu einer verstärkten, späten SAPK/JNK Aktivierung führen.



**Abbildung 22: Einfluss des CSB Proteins auf die Vitalität und SAPK/JNK Aktivierung nach Cisplatin bzw. Transplatin-Exposition.**

24h nach Cisplatin (A) bzw. Transplatin-Behandlung (C) von GM637 und CSB Zellen mit ansteigenden Platindosen wurden WST-1 Analysen durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n=3$ ). Nach Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  Cisplatin (B) bzw. nach Behandlung mit 250  $\mu\text{M}$  Transplatin (D) wurden mit GM637 und CSB Zellextrakten Western Blot Analysen nach unterschiedlichen Zeitpunkten mit p-JNK und p-p38 Antikörpern durchgeführt. Der Nachweis der ERK-2 Expression diene als Beladungskontrolle.

Wie in der Übersichtstabelle zu erkennen, lassen sich folgende Befunde zusammenfassen (Tab. 1):  $\text{ATM}^{-/-}$  Zellen zeigten nach UV-C- und Transplatin-Behandlung eine verstärkte SAPK/JNK Phosphorylierung im Vergleich zu ATM-profizienten Zellen. In DNA-PKcs-defizienten Zellen ist nach Cisplatin- und Transplatin-Behandlung die SAPK/JNK stärker phosphoryliert als in wildtypischen BALB/c-Zellen. Die Behandlung mit UV-C führte hingegen nicht zu einer unterschiedlichen SAPK/JNK Aktivierung in den Zellen. Weiterhin hat die Abwesenheit des p53-Proteins keinen Einfluss auf den Aktivierungsstatus der SAPK/JNK nach Behandlung mit den DNA-Crosslinking Agenzien. Untersuchungen mit humanen NER-defizienten Zellen nach UV-C-Bestrahlung zeigten, dass CSB und XPC Zellen in der SAPK/JNK Aktivierung im Vergleich zu ihren WT Zellen gehemmt

waren. In XPA-defizienten Zellen war nach UV-C Bestrahlung die SAPK/JNK Phosphorylierung ausgeprägter als in XPA-profizienten Fibroblasten. In XPC Zellen hingegen konnte keine SAPK/JNK Phosphorylierung nach UV-C detektiert werden. Weiterhin war die Cisplatin-induzierte Aktivierung der Stress-Kinasen in CSB und XPA Zellen, im Gegensatz zu ihren WT Zellen verstärkt.

Mauszellen defekt in	<b>UV-C</b>	<b>Cisplatin</b>	<b>Transplatin</b>
<b>ATM</b>	<b>+</b>	∅	<b>+</b>
<b>DNA-PKcs</b>	∅	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>p53</b>	∅	∅	∅
Humane Zellen defekt in			
<b>XPA</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>XPC</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	∅
<b>CSB</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>

**Tabelle 1: Status der SAPK/JNK Aktivierung in den untersuchten reparaturdefizienten-Zellen 24h nach Behandlung mit UV-C, Cisplatin und Transplatin.**

Zusammenfassung der mittels Western Blot Analysen erhaltenen Ergebnisse an reparaturdefizienten-Zelllinien und korrespondierenden WT Fibroblasten. Erklärung der verwendeten Zeichen: +: mehr SAPK/JNK Aktivierung in der Reparaturmutante, -: weniger SAPK/JNK Aktivierung in der Reparaturmutante, ∅: kein Unterschied des SAPK/JNK Aktivierungsstatus.

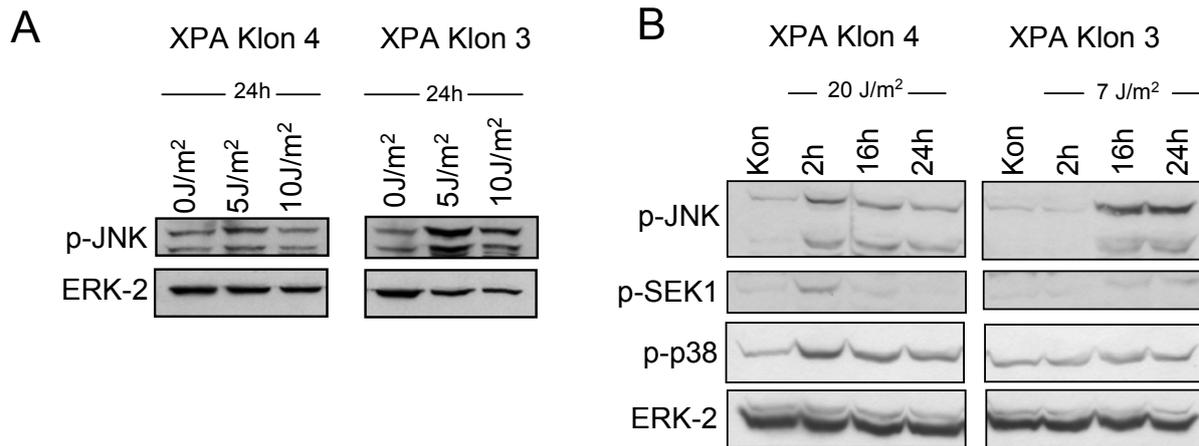
### 3.1.3 Fortführende Untersuchungen an DNA-PK, CSB und XPA defekten Zellen

SCID, CSB und XPA Zellen wurden für weitere Untersuchungen der DNA-schadensabhängigen Aktivierung von Stress-Kinasen ausgewählt, da sie sich hinsichtlich des Stress-Signallings nach Behandlung mit DNA-Crosslinking-Agenzien am deutlichsten von ihrem Wildtyp unterschieden und besonders die NER Proteine CSB und XPA für die Reparatur von DNA-Crosslinks von zentraler Bedeutung sind. Da SCID Zellen die während der Prozessierung entstandenen Doppelstrangbrüche nicht reparieren können, ließen sich in diesen Zellen durch weiterführende Analysen Einflüsse von persistierenden DNA-Strangbrüchen auf die Aktivierung der SAPK/JNK ermitteln. Des Weiteren lagen bereits Befunde vor die zeigten, dass für die MMS-

induzierte SAPK/JNK Aktivierung die DNA-PKcs und das CSB-Protein notwendig sind (Fritz & Kaina, 2006).

### *3.1.3.1 Untersuchungen der XPA Zellen*

Da in XPA-defizienten Zellen eine Abnahme der SAPK/JNK Phosphorylierung 24h nach UV-C-Strahlung beobachtet wurde, die Signalstärke aber immer noch stärker als in profizienten Zellen war, wurde eine mögliche Dosisabhängigkeit der SAPK/JNK Aktivierung untersucht. Bestrahlung der Zellen mit 5 und 10 J/m<sup>2</sup> UV-C machte deutlich, dass in XPA-defizienten Zellen bereits 5 J/m<sup>2</sup> ausreichend sind, um eine stärkere SAPK/JNK Phosphorylierung als in XPA-profizienten Zellen auszulösen (Abb. 23A). Für die Aktivierung der SAPK/JNK liegt demnach ein Schwellenwert vor, der in XPA-defizienten Zellen bei deutlich niedrigeren Dosen erreicht wird. Die Verwendung von höheren Dosen (10 J/m<sup>2</sup>) führte darüber hinaus in XPA-defizienten Zellen nach 24h zu einer Abnahme der SAPK/JNK Phosphorylierung (Abb. 23A). Es wurden daraufhin Untersuchungen mit UV-C-Dosen durchgeführt, die jeweils äquidosisch (EC50) für die Zelllinien waren. Die Ermittlung dieser Dosen erfolgte durch den eingangs beschriebenen Vitalitätsassay (siehe auch Abb. 18B). In XPA-profizienten Zellen, die mit 20 J/m<sup>2</sup> bestrahlt wurden, zeigte sich ein leichter Anstieg der SAPK/JNK Phosphorylierung nach 2h, der nach 16h und 24h abnahm. Die mit 7 J/m<sup>2</sup> bestrahlten XPA-defizienten Zellen aktivierten die SAPK/JNK dagegen deutlich ausgeprägter und ausschließlich zu späten Zeiten (Abb. 23B). Weitere Untersuchungen erfolgten hinsichtlich der Aktivierung der SEK1. Diese der SAPK/JNK übergeordnete MAPK Kinase (MEK) aktiviert die Stress-Kinasen über Phosphorylierung an Tyrosin 185 und Threonin 183. Da es in XPA-profizienten Zellen zu einem transienten Anstieg der SEK1-Phosphorylierung und in XPA-defizienten Zellen zu einer schwachen Phosphorylierung nach 16h und 24h kam, entsprach der Phosphorylierungsverlauf der SEK1 dem der SAPK/JNK (Abb. 23B). Die Bestrahlung von XPA-defizienten und profizienten Fibroblasten mit äquidosischen Dosen UV-C führte ausschließlich in den defizienten Zellen zu einer späten und verstärkten SEK1-vermittelten SAPK/JNK Phosphorylierung.

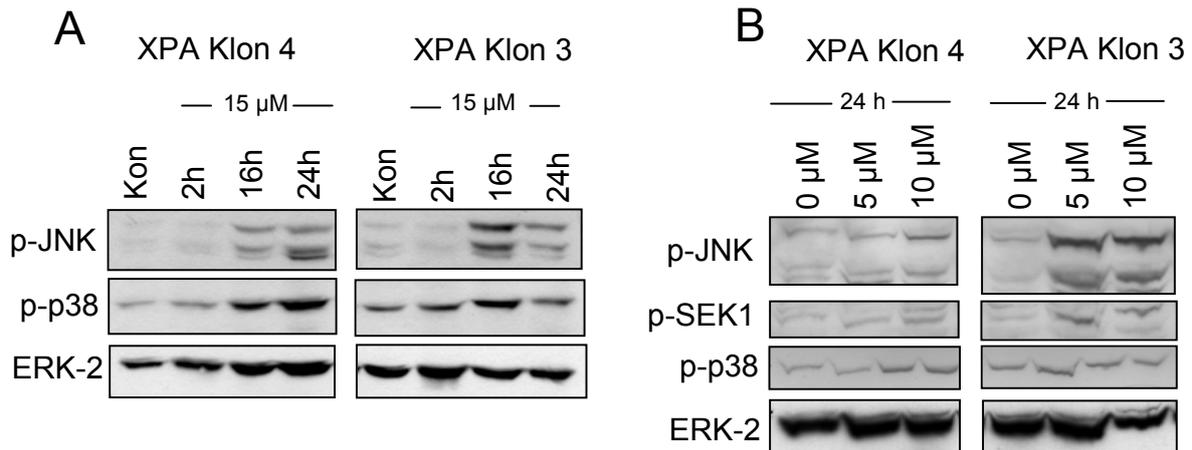


**Abbildung 23: SAPK/JNK und SEK1 Aktivierung nach UV-C-Behandlung in XPA-profizienten und -defizienten Zellen.**

A: Nach 5 und 10 J/m<sup>2</sup> erfolgten mit Proteinextrakten aus XPA-profizienten (XPA-Klon4) bzw. -defizienten Zellen (XPA-Klon3) nach 24h Western Blot Analysen zum Nachweis der SAPK/JNK-Aktivierung.

B: Nach Behandlung mit äquitoxischen Dosen UV, d.h. XPA profiziente Zellen 20 J/m<sup>2</sup> und XPA-defiziente Zellen 7 J/m<sup>2</sup> wurden Western Blot Analysen mit p-JNK, p-SEK1 und p-p38 Antikörpern durchgeführt. Der Nachweis der ERK-2 Expression diente als Beladungskontrolle

Aufgrund der Tatsache, dass die Cisplatin-induzierte SAPK/JNK Phosphorylierung in XPA-defizienten Fibroblasten nach 16h an Stärke abnahm (Abb. 24A), wurde wie auch schon nach UV-C-Behandlung der Zellen, ein möglicher Schwellenwert bei der Stress-Kinasen Aktivierung in Erwägung gezogen. XPA-profiziente und -defiziente Zellen wurden hierfür mit ansteigenden Konzentrationen Cisplatin über einen Zeitraum von 24h behandelt. Dabei wurde deutlich, dass in XPA-defizienten Zellen bereits Konzentrationen von 5 µM ausreichen, um eine stärkere SAPK/JNK Phosphorylierung als in den WT Zellen auszulösen. Zwar zeigten reparaturprofiziente Fibroblasten ebenfalls eine sehr schwache Aktivierung der SAPK/JNK bei steigenden Konzentrationen, doch induzierte keine der gewählten Dosen diese Stress-Kinase so effektiv wie in NER-defizienten Zellen (Abb. 24B). Zudem verlief die Aktivierung der SEK1 in beiden Zelllinien parallel zu der der SAPK/JNK (Abb. 24B). In XPA-defizienten Zellen kann somit eine späte Cisplatin-induzierte SAPK/JNK beobachtet werden, die dosisabhängig und SEK1-vermittelt verläuft. Des Weiteren zeigte sich, dass ein Schwellenwert bei der UV-C- und Cisplatin-induzierten SAPK/JNK Aktivierung existiert und zu hohe Dosen der Agenzien in XPA-defizienten Zellen zu einer Dephosphorylierung der SAPK/JNK führen.

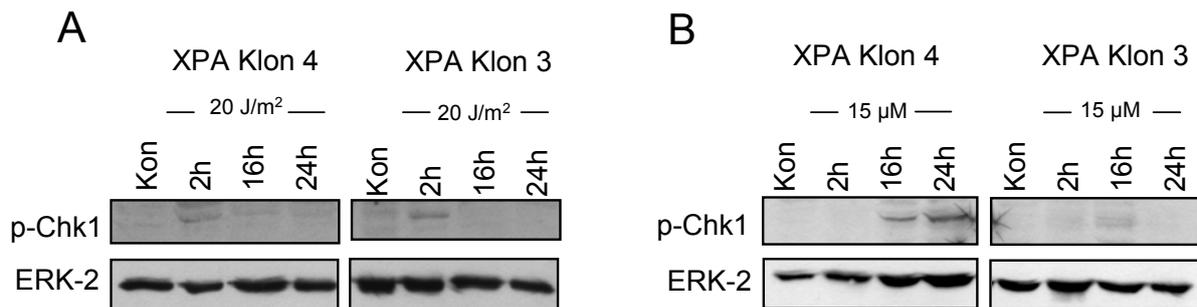


**Abbildung 24: Die Cisplatin-induzierte SAPK/JNK Aktivierung hat in XPA-profizienten und defizienten Zellen unterschiedliche Schwellenwerte.**

A: Nach Behandlung der XPA-profizienten und defizienten Zellen mit 15  $\mu$ M Cisplatin (A) bzw. nach Behandlung mit steigenden Konzentrationen Cisplatins (B) wurden Western Blot Analysen hinsichtlich des Aktivitätsstatus der SAPK/JNK (p-JNK) und p38 MAP-Kinase (p-p38) bzw. p-SEK1 (B) durchgeführt. Der Nachweis der ERK-2 Expression diene als Beladungskontrolle.

Weiterhin wurden Untersuchungen des Phosphorylierungstatus der Checkpoint-Kinase 1 (Chk1) nach UV-C-Exposition und Cisplatin-Behandlung in XPA-profizienten und -defizienten Zellen durchgeführt, da die Chk1 durch die ATM/ATR-Kinasen nach DNA-Schädigung phosphoryliert (Ser345) wird und Einfluss auf den weiteren Verlauf des Stress-Signallings, sowie der Zellzyklusprogression nimmt. Zielsubstrate der Chk1 sind unter anderem der Transkriptionsfaktor p53, welcher durch Phosphorylierung aktiviert wird und die Cdc25A-Kinase Phosphorylierung allerdings eine Inhibierung ihrer Kinase-Aktivität bewirkt (Martinho et al., 1998). Die Inhibition von Cdc25A führt zu einem G1/S-Phase-Arrest der Zelle. Durch die Analyse der Chk1-Aktivität sollte festgestellt werden, ob sich XPA-profiziente und -defiziente Zellen hinsichtlich ihres DNA-Schadenssignallings unterscheiden. Das dies nicht der Fall ist, zumindest was den Status der Chk1 betrifft, zeigten Western Blot Analysen mit 20 J/m<sup>2</sup> UV-C bestrahlten XPA-profizienten und -defizienten Fibroblasten. In beiden Zelllinien wurde ein Anstieg der Chk1-Phosphorylierung nach 2h detektiert (Abb. 25A). Die UV-C-Strahlung führte demnach in reparaturdefizienten und profizienten Zellen nicht zu einer unterschiedlichen Aktivierung der Chk1. 15  $\mu$ M Cisplatin-Behandlung verursachte hingegen in XPA-profizienten Zellen eine verstärkte, von 16h bis 24h andauernde Phosphorylierung der Chk1. Im Gegensatz hierzu konnte man in reparaturdefizienten Fibroblasten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine Phosphorylierung der Kinase detektieren (Abb. 25B). Die Ergebnisse

machen deutlich, dass Cisplatin-Behandlung in XPA-profizienten Zellen, gemessen an dem Level der phosphorylierten Chk1, zu einem erhöhten DNA-Schadenssignalling führt. Nach UV-C-Strahlung weisen jedoch beide Zelllinien einen vergleichbaren Status dieses Signallings auf. Die UV-C-, Cisplatin- und Transplatin-induzierte Phosphorylierung der Stress-Kinasen, SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase, geht demnach in XPA-defizienten Zellen nicht mit einem ATM/ATR vermittelten Signalweg einher.

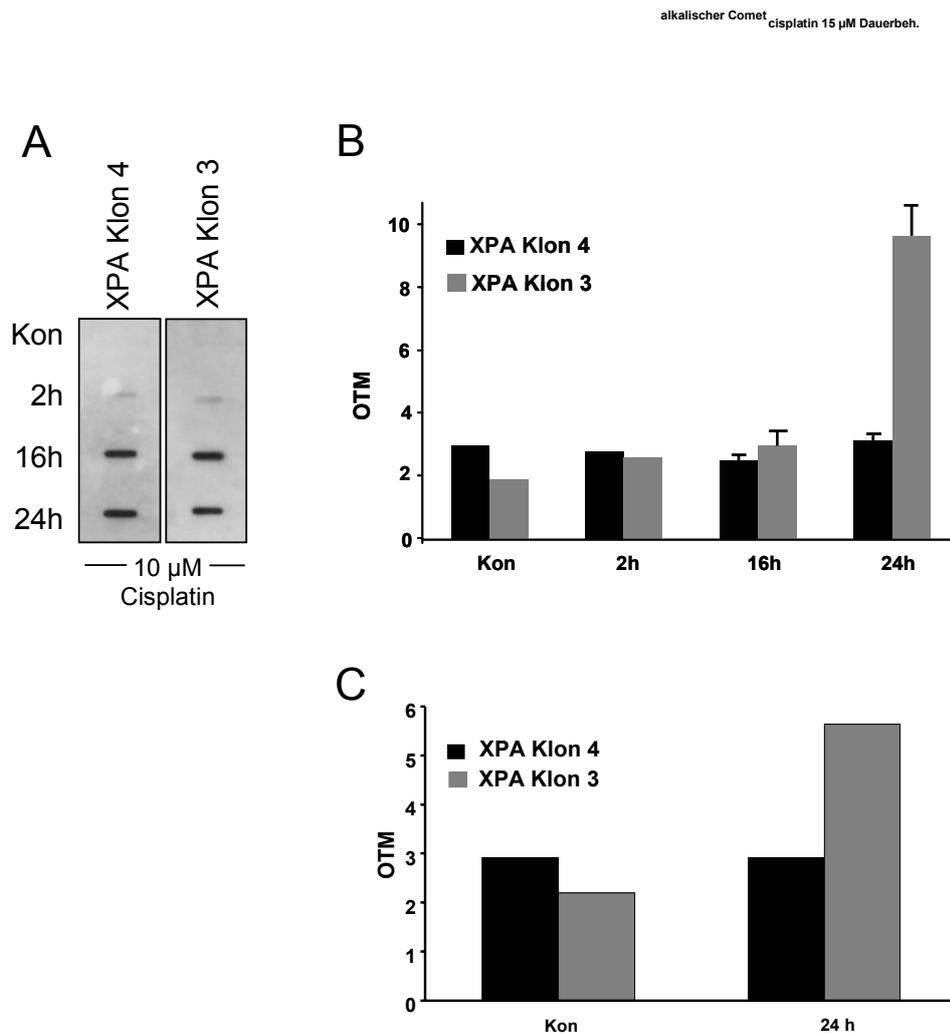


**Abbildung 25: Aktivierungsstatus der Chk1 nach UV-C- und Cisplatin-Behandlung in XPA-profizienten (XPA Klon 4) und -defizienten Zellen (XPA Klon 3).**

Nach Behandlung der XPA-profizienten und -defizienten Zellen mit 20 J/m<sup>2</sup> UV-C (A) bzw. mit 15 μM Cisplatin (B) erfolgten Western Blot Analysen hinsichtlich der Chk1 Phosphorylierung (p-Chk1) zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Der Nachweis der ERK-2 Expression diente als Beladungskontrolle.

In XPA-defizienten Zellen kommt es durch die fehlerhafte NER zu Problemen in der Erkennung und Prozessierung der Cisplatin-Schäden, da die NER ein Hauptreparaturweg dieser Läsionen ist. Aufgrund der Tatsache, dass der Aktivitätsstatus der Chk1 in XPA-defizienten Fibroblasten reduziert war und nicht mit der Phosphorylierung der Stress-Kinasen einherging, wurde zur weiteren Analyse der DNA-Schäden die Menge an Cisplatin-Läsionen in der DNA der Zellen bestimmt. Mittels South Western Analysen konnte in XPA-profizienten und -defizienten Zellen nach Behandlung mit 10 μM die durch Cisplatin verursachten 1,2-GG-Intrastrand-Crosslinks ermittelt werden. Dabei spiegelt die Signalstärke der Banden, welche man durch Inkubation der DNA mit den Addukt-spezifischen Antikörpern erhält, die Menge an DNA-Schäden in den Zellen wider. Es zeigte sich, dass die Menge an gebildeten Intrastrand-Crosslinks ab 16h in beiden Zelllinien vergleichbar war (Abb. 26A). Somit unterschieden sich beide Fibroblasten Zelllinien nicht hinsichtlich ihrer initialen Cisplatin-induzierten DNA-Crosslinks, die demnach auch nicht ursächlich für die Unterschiede im Stress-Signalling sein können. Daher erfolgten als nächstes Untersuchungen hinsichtlich eventuell entstandener sekundärer Läsionen, wie DNA-

Strangbrüche. Diese Analysen boten, im Gegensatz zur South Western Methode, die Möglichkeit die Folgen der sowohl durch Cisplatin-, als auch der durch Transplatin-entstandenen Läsionen zu vergleichen, da uns bei der South Western Analyse keine Antikörper für die Transplatin-induzierten Interstrand-Crosslinks zur Verfügung standen. Aufgrund der erhaltenen Befunde, dass Cisplatin- sowie Transplatin-Läsionen in XPA-defizienten Zellen im Gegensatz zu XPA-profizienten Zellen zu einer verstärkten SAPK/JNK Aktivierung führen, sind Untersuchungen der DNA-Läsionen von großer Bedeutung. Unterschiede in der Menge an DNA-Läsionen von WT und reparaturdefizienten Zellen können Einfluss auf die Stress-Antwort der Zellen nehmen. Die Messung der DNA-Strangbrüche erfolgte mit Hilfe des alkalischen Comet Assays. Die erhaltenen Ergebnisse machten deutlich, dass 24-stündige Exposition XPA-defizienter Zellen mit Cisplatin zu einem dreifachen Anstieg (Abb. 26B), mit Transplatin zu einem zweifachen Anstieg (Abb. 26C), im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, der DNA-Strangbrüchen führte. Im Gegensatz dazu lassen sich in XPA-profizienten Zellen weder Cisplatin- (Abb. 26B), noch Transplatin-induzierte (Abb. 26C) Strangbrüche nachweisen. Obwohl die Menge an Intrastrand-Crosslinks in beiden Zelllinien identisch war, entstanden in XPA-defizienten Zellen sowohl durch Cisplatin- als auch durch Transplatin-Behandlung deutlich mehr sekundäre Läsionen, in Form von DNA-Strangbrüchen. Es ist daher möglich, dass in diesen NER-defizienten Zellen die erhöhte Menge der Cisplatin- bzw. Transplatin-induzierten DNA-Strangbrüchen in Zusammenhang mit der verstärkten SAPK/JNK Aktivität steht.



**Abbildung 26: Messung der Cisplatin- und Transplatin-induzierten DNA-Schäden in XPA-profizienten und -defizienten Zellen.**

A: Nach Behandlung von XPA-profizienten (XPA Klon4) und -defizienten Zellen (XPA Klon3) mit 10  $\mu$ M Cisplatin wurden nach 2h, 16h, und 24h South-Western Analysen mit 1,2-GG Intrastrand-Crosslink Antikörpern durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot von drei unabhängigen Versuchen (n=3).

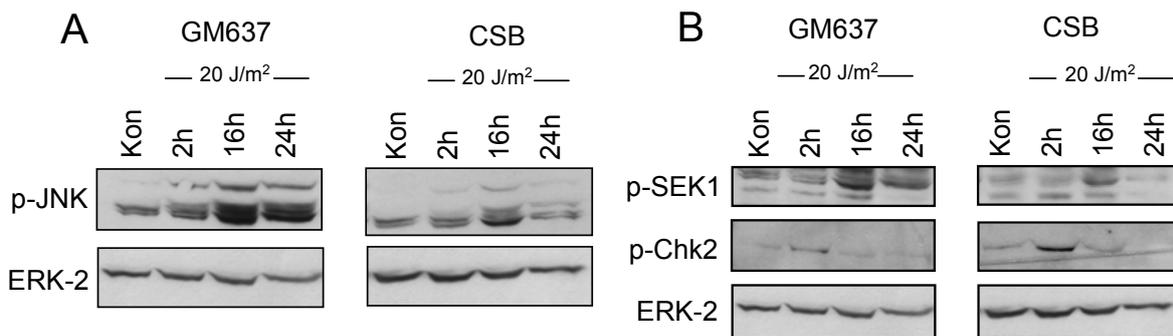
B: In XPA-profizienten und -defizienten Zellen wurde nach Behandlung mit 15  $\mu$ M Cisplatin die Menge an DNA-Schäden mittels des alkalischen Comet Assays durch das Olive Tail Moment (OTM) ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n=3).

C: XPA-profiziente und -defiziente Zellen wurden 24h mit 500  $\mu$ M Transplatin behandelt und die Menge an DNA-Strangbrüchen wurde mittels des alkalischen Comet Assays durch das Olive Tail Moments (OTM) bestimmt.

### 3.1.3.2 Stress-Antworten und DNA-Schäden in CSB Zellen nach UV-C-Bestrahlung

In WT und CSB Zellen erfolgten Untersuchungen weiterer Stress-assoziiierter Proteine, um den Verlauf der Aktivierung der SAPK/JNK nach UV-C-Exposition näher zu charakterisieren. Insbesondere wurden die SEK1 und die Checkpoint-Kinase-2 (Chk2) untersucht. Da die Chk2, wie auch die Chk1, durch ATM/ATR nach DNA-Schädigung phosphoryliert wird und durch Phosphorylierung verschiedener

Zielsubstrate, wie Cdc25A/B/C oder p53, Einfluss auf die Zellzykluskontrolle nimmt, konnte durch Untersuchungen ihrer Aktivität der Status des DNA-Schadenssignallings in WT und CSB Zellen verglichen werden. Hierzu wurden GM637 und CSB Zellen einer Strahlung von  $20 \text{ J/m}^2$  ausgesetzt. Western Blot Analysen mit phosphospezifischen Antikörpern gegen SEK1 bzw. Chk2 zeigten, dass in GM637 und CSB Zellen die SEK1-Phosphorylierung mit der der SAPK/JNK korrelierte (Abb. 27). In WT Zellen trat dabei nach 16h eine anhaltende SEK1 Phosphorylierung auf und in CSB Zellen nahm die Induktion dieser Kinase nach 16h wieder ab (Abb. 28B). Eine Phosphorylierung der Chk2 war lediglich 2h nach UV-C-Behandlung deutlich erkennbar und in CSB Zellen im Vergleich zu WT Zellen erhöht (Abb. 27). Demnach scheint das ATM/ATR-vermittelte Signalling der Chk2, wie vorangehend in XPA Zellen gezeigt, auch in CSB-profizienten, sowie -defizienten Zellen nicht mit der SAPK/JNK Aktivierung übereinzustimmen.

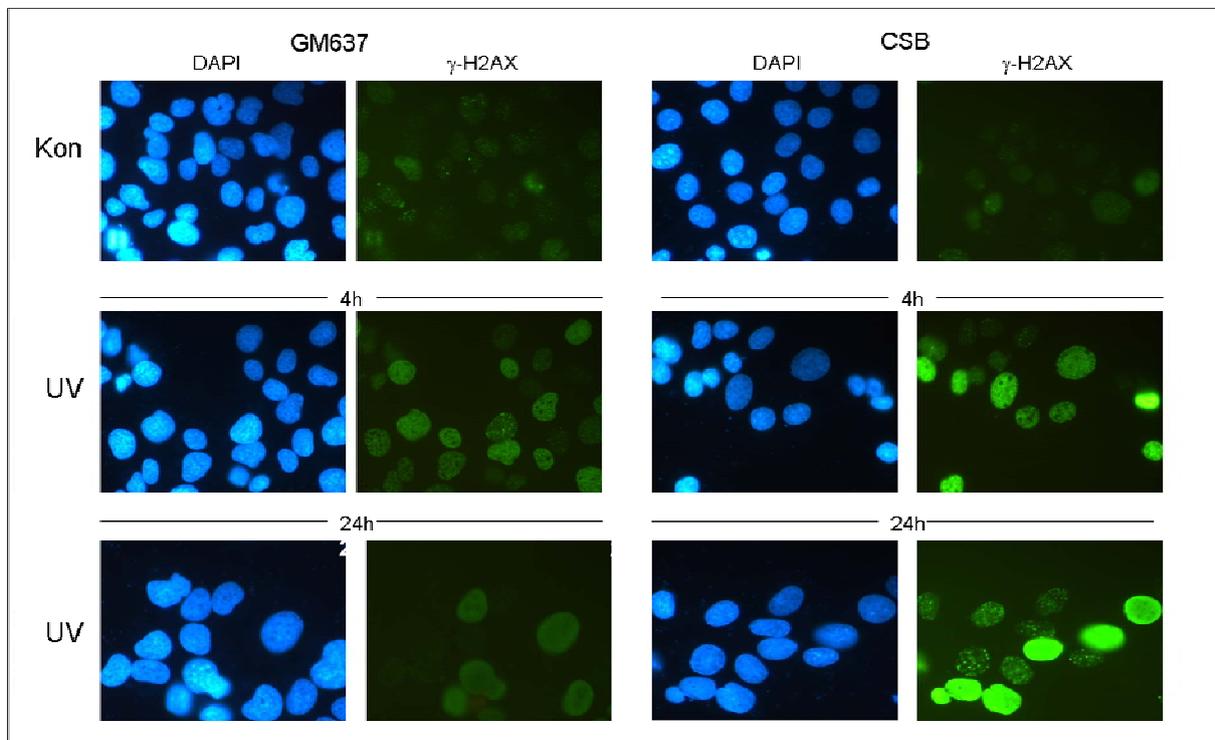


**Abbildung 27: Status der SAPK/JNK, SEK1 und Chk2 Phosphorylierung nach UV-C-Exposition von GM637 und CSB Zellen.**

Nach  $20 \text{ J/m}^2$  UV-C-Behandlung erfolgten Western Blot Analysen mit GM637 und CSB Zellen unter Verwendung von phosphospezifischen Antikörper gegen SAPK/JNK (p-JNK) (A), bzw. SEK1 (p-SEK1) und Chk2 (p-chk2) (B). Der Nachweis der ERK-2 Expression diente als Beladungskontrolle.

Da die erhöhte Chk2 Phosphorylierung ein Hinweis auf verstärkte DNA-Schadenssignale in den CSB Zellen ist und WT und CSB Zellen sich hierbei unterschieden, wurde die Menge der DNA-Schäden analysiert. Dazu wurde der Phosphorylierungsstatus des H2AX-Proteins untersucht. Phosphoryliertes H2AX ( $\gamma$ -H2AX) wird als DNA-Schadensmarker verwendet und bildet nach DNA-Schädigung sogenannte  $\gamma$ -H2AX-Foci (Celeste et al., 2003; Chen et al., 2000; Fernandez-Capetillo, Celeste & Nussenzweig, 2003). GM637 und CSB Zellen wurden nach Strahlenexposition mit  $20 \text{ J/m}^2$  4h bzw. 24h inkubiert und die  $\gamma$ -H2AX Bildung immunhistochemisch nachgewiesen. Dabei zeigte es sich, dass nach 4h und 24h in CSB Zellen, im Vergleich zu ihren korrespondierenden WT Zellen, die UV-C-

induzierten  $\gamma$ -H2AX-Foci in Menge und Intensität deutlich erhöht waren (Abb. 28). Insgesamt führte demnach UV-C-Strahlung in CSB Zellen zu einer erhöhten Menge an DSBs und Chk2 Phosphorylierung zu frühen Zeiten, aber nicht zu einer verstärkten SAPK/JNK Phosphorylierung (Abb. 28).



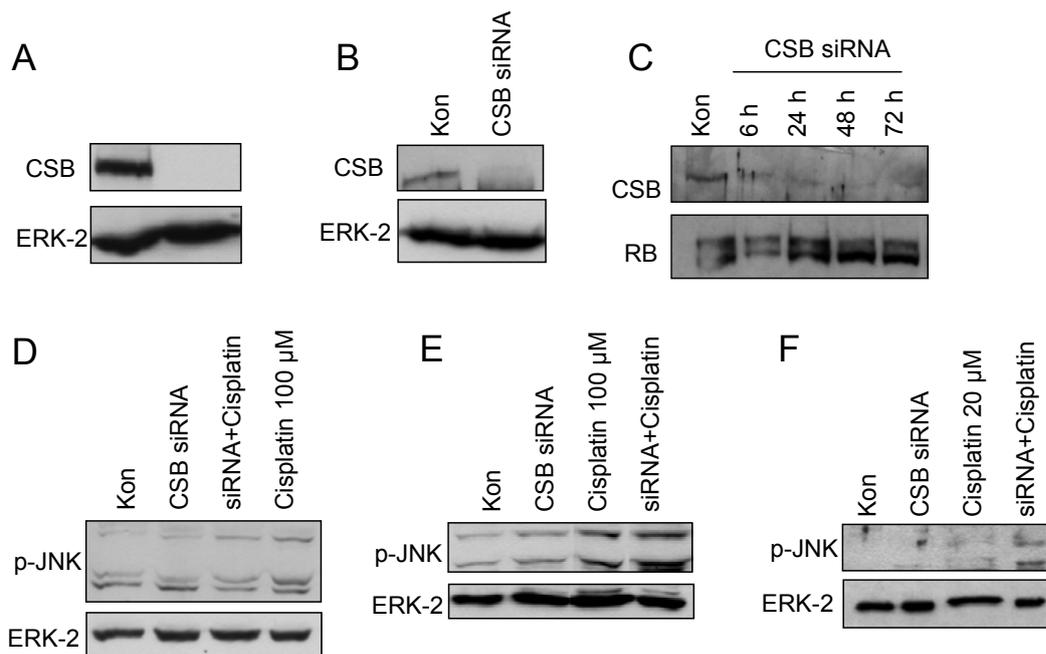
**Abbildung 28: Bildung von  $\gamma$ -H2AX-Foci nach UV-C Bestrahlung von GM637 und CSB Zellen.**

GM637 und CSB Zellen wurden mit  $20 \text{ Jm}^{-2}$  UV-C bestrahlt und nach einer Inkubationszeit von 4h bzw. nach 24h  $\gamma$ -H2AX Foci immunhistochemisch nachgewiesen. Die DAPI-Färbung erfolgte zum Nachweis der Zellkerne. Vergrößerung: 1000-fach.

### 3.1.3.3 Cisplatin-induzierte DNA-Schäden und Stress-Antworten in CSB Zellen

Die mit den CSB Zellen hinsichtlich der späten Cisplatin-induzierten Aktivierung der SAPK/JNK erhaltenen Ergebnisse, sollten durch siRNA-Experimente bestätigt werden. Primäre humane Fibroblasten (HFIB-D) wurden mit 5 nMol CSB-siRNA transient transfiziert und nach weiterer 24-stündiger Inkubation wurden Western Blot Analysen mit CSB-Antikörpern durchgeführt. Der Nachweis der Spezifität des Antikörpers konnte unter Verwendung von Zellextrakten aus wildtypischen GM637 und CSB-defizienten Zellen erbracht werden (Abb. 30A). Abb. 30B zeigt den erfolgreichen Knock-down des CSB-Proteins durch Transfektion mit siRNA. Um die Dauer des Protein-Knock-downs zu ermitteln, wurden HFIB-D Zellen mit 5 nMol siRNA transient transfiziert und über einen Zeitraum von 6h bis 72h inkubiert, wobei mittels Western Blot Analyse gezeigt werden konnte, dass die Expression des CSB-Proteins über die gesamte Zeit herunterreguliert war (Abb. 30C). Um den Einfluss der

siRNA-Behandlung auf die Cisplatin-induzierte SAPK/JNK zu untersuchen, wurden HFIB-D-Zellen mit 5 nMol siRNA transfiziert, für 24h inkubiert und anschließend 4h mit 100  $\mu$ M Cisplatin behandelt. Die Cisplatin-induzierte Aktivierung der SAPK/JNK wurde durch siRNA-Transfektion nicht verändert (Abb. 30D). Diese Beobachtung geht mit den Befunden einher, dass zu frühen Zeitpunkten in CSB Zellen keine Aktivierung der SAPK/JNK zu beobachten war (siehe Abb. 23B). Der Einfluss der siRNA auf die späte Cisplatin-induzierte SAPK/JNK wurde untersucht, indem die siRNA transfizierten Zellen für 24h mit 100  $\mu$ M Cisplatin behandelt wurden. In Anwesenheit der siRNA wurde die Cisplatin-induzierte Phosphorylierung der SAPK/JNK verstärkt (Abb. 30E). Behandlung mit geringeren Dosen Cisplatin (20  $\mu$ M) belegt die Wirksamkeit der siRNA auf die Phosphorylierung der SAPK/JNK nach Cisplatin-Exposition deutlich (Abb. 29F). Die siRNA-Experimente bestätigten somit die in den Zelllinien erhaltenen Ergebnisse, nämlich dass das Fehlen des CSB-Proteins eine erhöhte SAPK/JNK Phosphorylierung bewirkt.



**Abbildung 29: siRNA Kock-down des CSB Proteins verstärkt nach 24h die Cisplatin-induzierte SAPK/JNK Aktivierung.**

A: Western Blot Analysen mit Proteinextrakten von GM637 (CSB-profizient) und CSB-defizienten Zellen mit CSB-Antikörper.

B: Nach transienter Transfektion der HFIB-D Zellen mit 5 nMol CSB-siRNA, konnte nach 24h Inkubation der Zellen die Reduktion der CSB-Protein Expression im Western Blot gezeigt werden.

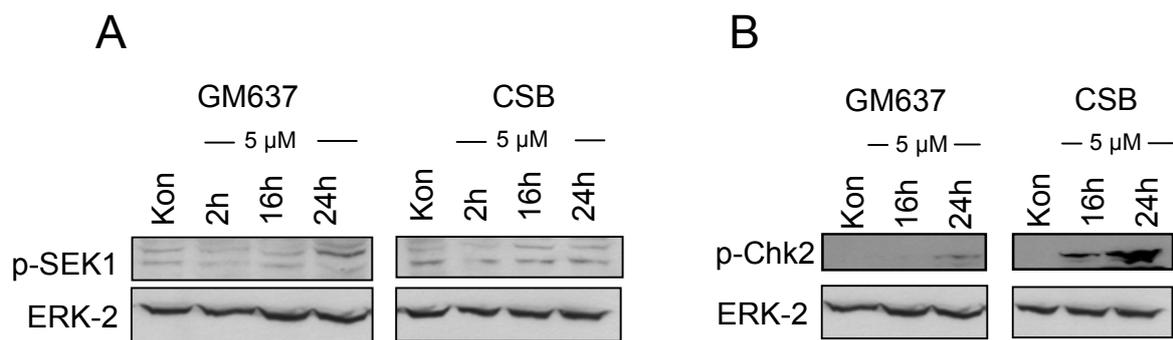
C: Nach Transfektion mit 5 nMol CSB-siRNA, wurden mit HFIB-D Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten Western Blot Analysen durchgeführt.

D: HFIB-D Zellen wurden mit 5 nMol CSB-siRNA transfiziert und 24h inkubiert und anschließend mit 100  $\mu$ M Cisplatin für 4h behandelt. Western Blot Analysen zeigen die p-JNK Aktivität.

E: Nach Transfektion mit 5 nMol der CSB-siRNA wurden nach einer Inkubationszeit von 24h, HFIB-D Zellen mit 100  $\mu$ M Cisplatin (E) bzw. mit 20  $\mu$ M (F) für 24h behandelt. Western Blot Analysen zeigten die p-JNK Aktivierung. Der Nachweis der ERK-2 Expression diente als Beladungskontrolle.

Aufgrund der Unterschiede in der Cisplatin-induzierten SAPK/JNK Phosphorylierung der beiden Zelllinien, wurde auch nach Behandlung mit diesem Agens die Expression weiterer Stress-assoziiierter Proteine, wie Chk2 und SEK1 untersucht, um weitere Hinweise auf den Verlauf des DNA-Stressignallings der Zellen zu erhalten. Ausschließlich in WT Zellen konnte nach 24h eine SEK1 Phosphorylierung nachgewiesen werden. In CSB Zellen war zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine Aktivierung dieser Kinase detektierbar (Abb. 30A). Die Cisplatin-induzierte SAPK/JNK Aktivierung erfolgte somit in CSB Zellen nicht zeitgleich mit der der SEK1 und scheint demnach unabhängig von der SEK1 zu verlaufen.

Untersuchungen der Chk2 zeigten hingegen eine nach 16h auftretende und bis zu 24h an Stärke zunehmende Phosphorylierung in CSB Zellen und lediglich eine schwache Aktivierung nach 24h in GM637 Zellen (Abb. 30B). Die Cisplatin-induzierte Chk2 Aktivierung in WT und CSB Zellen verläuft offensichtlich mit dem Verlauf der SAPK/JNK Phosphorylierung konform (siehe auch Abb. 23).

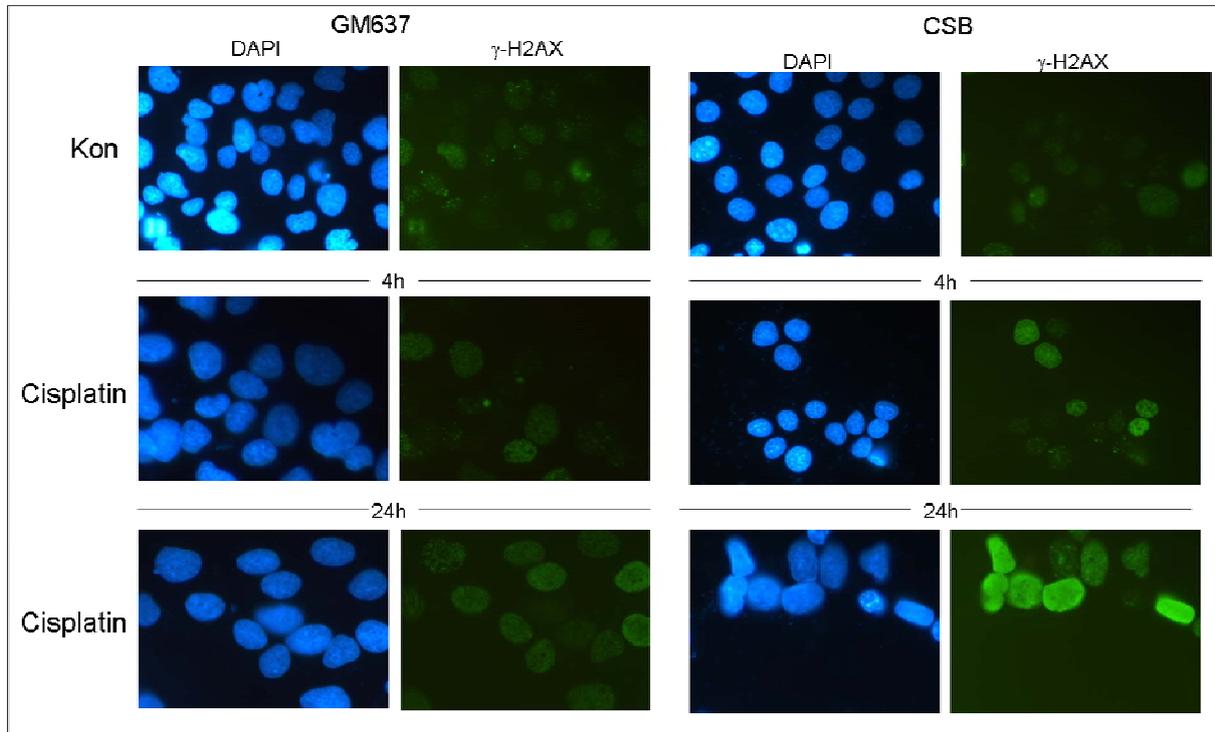


**Abbildung 30: Status der SEK1 und Chk2 Phosphorylierung nach Cisplatin-Behandlung in GM637 und CSB Zellen.**

Nach 5 μM Cisplatin-Behandlung der GM637 und CSB Zellen erfolgten nach unterschiedlichen Zeitpunkten Western Blot Analysen mit p-SEK1 (A) und p-Chk2 Antikörpern (B). Der Nachweis der ERK-2 Expression diente als Beladungskontrolle.

Da die in CSB Zellen verstärkte Chk2-Aktivierung auf vermehrte späte Cisplatin-induzierte DNA-Schäden hindeutete, wurden, wie auch nach UV-C-Behandlung, Untersuchungen des DNA-Schadenmarkers  $\gamma$ -H2AX in diesen Zellen durchgeführt. GM637 und CSB Zellen wurden mit 5 μM Cisplatin behandelt und die  $\gamma$ -H2AX-Foci nach 4h bzw. 24h bestimmt. Cisplatin-Exposition führte in CSB-Zellen sowohl nach 4h, als auch nach 24h zu einer Verstärkung der Menge und Intensität von  $\gamma$ -H2AX-Foci, im Vergleich zu WT Zellen (Abb. 31). Die Befunde machen deutlich, dass die späte SAPK/JNK Phosphorylierung der CSB Zellen mit dem Auftreten einer erhöhten

Chk2 Phosphorylierung korreliert und weiterhin mit vermehrten DNA-Schäden in Form von DNA-Strangbrüchen einhergeht.

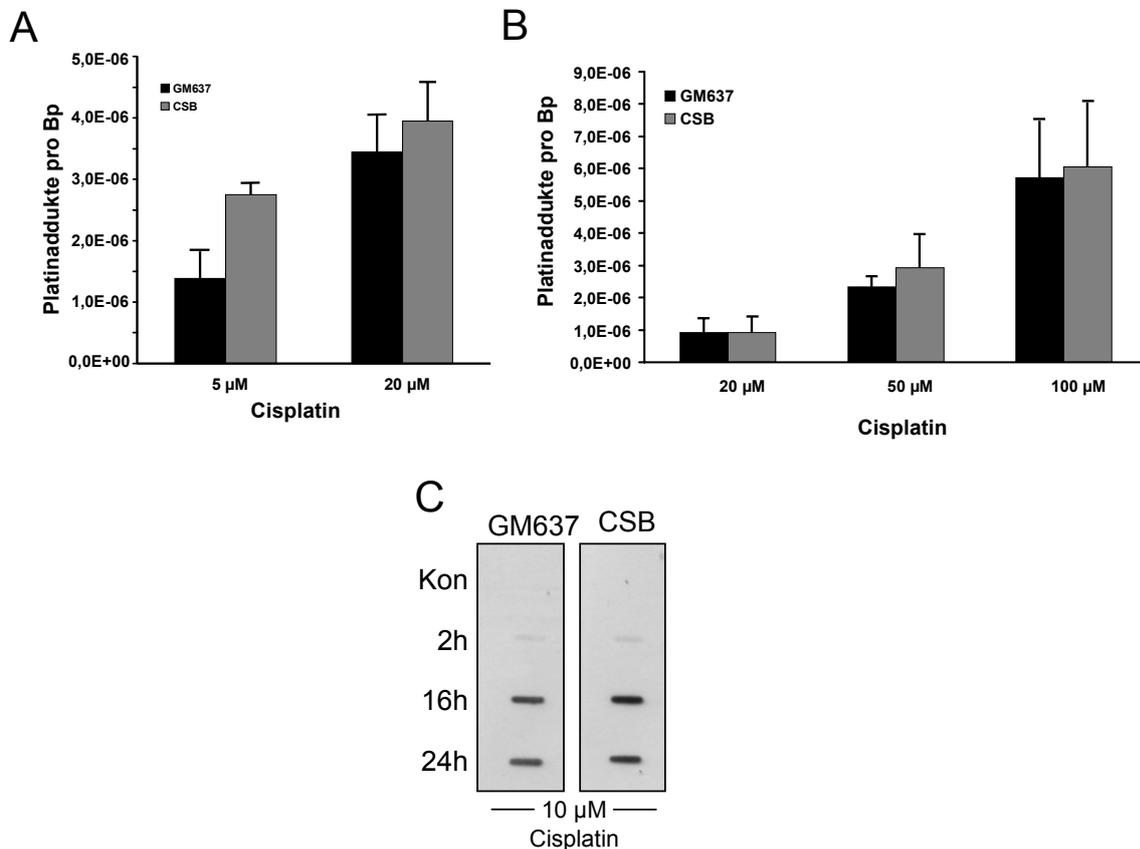


**Abbildung 31: Messung der  $\gamma$ -H2AX-Foci nach Cisplatin-Behandlung in GM637 und CSB Zellen.**

GM637 und CSB Zellen wurden mit 5  $\mu$ M Cisplatin für 4h bzw. für 24h behandelt und mit  $\gamma$ -H2AX Antikörpern gefärbt. Die DAPI-Färbung erfolgte zum Nachweis der Zellkerne. Vergrößerung: 1000-fach.

Aufgrund der bisher in XPA und CSB Zellen erhaltenen Hinweise bezüglich einer DNA-schadensabhängigen späten Aktivierung der SAPK/JNK nach Cisplatin wurden weitere Methoden zur quantitativen Bestimmung der DNA-Schäden herangezogen. Es erfolgte dabei zum einen die Bestimmung der DNA-Platinierung mittels ICP-MS (induktiv gekoppelter Massenspektrometrie) nach 24-stündiger Behandlung der GM637 und CSB Zellen. Durch diese Messung wurde deutlich, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den DNA-Addukt Mengen dieser Zelllinien gibt (Abb. 32A). Ob bereits Unterschiede in der initialen DNA-Platinierung ursächlich für die späte SAPK/JNK Phosphorylierung in CSB Zellen waren, konnte durch Bestimmung der DNA-Platinaddukte nach 4h ausgeschlossen werden. Auch zu diesem Zeitpunkt unterschied sich die DNA-Platinkonzentration der WT und CSB Zellen nicht (Abb. 32B). Zum anderen wurde zur Ermittlung der DNA-Schäden, wie auch bei XPA Zellen, die 1,2-GG-Intrastrand-Crosslinks bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass Cisplatin nach 16h und 24h in WT und CSB Zellen vergleichbare

Mengen an Intrastrand-Crosslinks verursachte (Abb. 32C). Folglich besteht zwischen der späten Cisplatin-induzierten SAPK/JNK Phosphorylierung und den gemessenen späten DNA-Schäden in Form von Doppelstrangbrüchen in CSB Zellen, sowie dem ATM/ATR vermittelten Chk2-Signalling ein Zusammenhang.



**Abbildung 32: Cisplatin-induzierte DNA-Addukte in GM637 und CSB Zellen.**

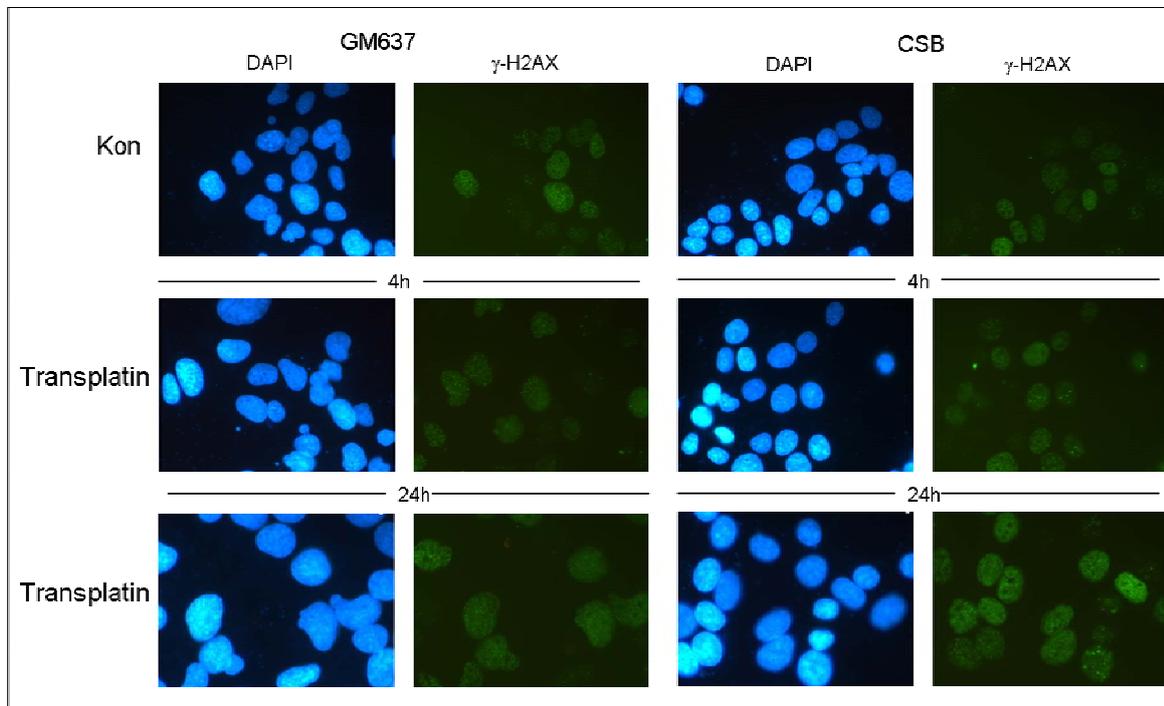
Nach 24h (A) bzw. 4h (B) Cisplatin-Behandlung mit den oben angegebenen Konzentrationen erfolgte mittels induktiv gekoppelter Massenspektrometrie (ICP-MS) die Bestimmung des Platingehalts der DNA von GM637 und CSB Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n=3$ ). ( $p>0,05$ ).

C: Die Detektion der 1,2-GG-Intrastrand-Crosslinks in der DNA der GM637 und CSB Zellen erfolgte nach Behandlung mit 10 µM Cisplatin durch South Western Analysen.

### 3.1.3.3.1 Transplatin-induzierte DNA-Schäden

Da in CSB-defizienten Zellen, neben Cisplatin, auch die späte Transplatin-induzierte SAPK/JNK Phosphorylierung erhöht war, wurden in CSB Zellen die durch Transplatin hervorgerufenen DNA-Schäden analysiert. Diese Analyse erfolgte durch den Nachweis von  $\gamma$ -H2AX-Foci. Die Behandlung mit 250 µM Transplatin für 4h führte lediglich zu einer schwachen  $\gamma$ -H2AX-Foci Bildung, die in GM637 und CSB Zellen vergleichbar war (Abb. 33). 24h nach Behandlung konnten in CSB Zellen hingegen deutlich mehr  $\gamma$ -H2AX Foci detektiert werden als in Wildtyp Zellen (Abb. 33). Die Befunde in WT und CSB Zellen offenbarten, dass Transplatin-Behandlung in CSB

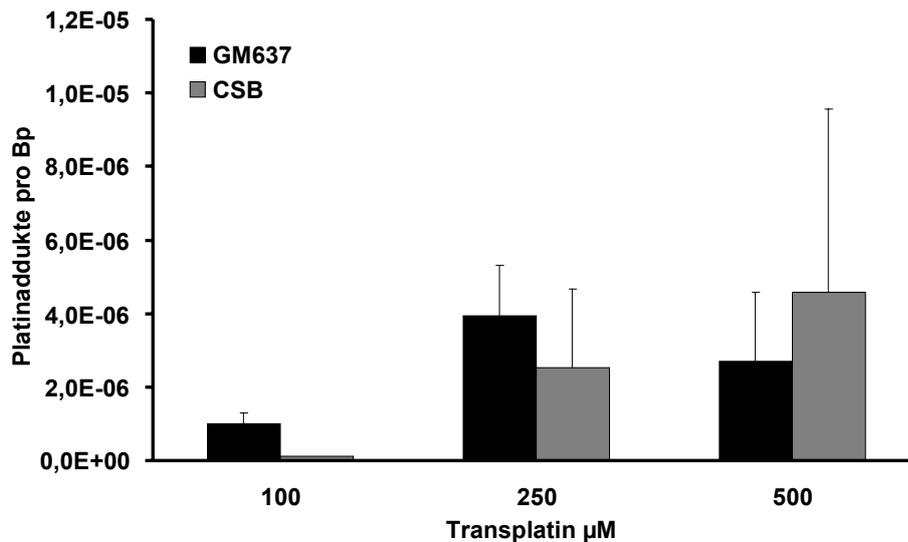
Zellen zu späten Zeitpunkten ebenfalls vermehrte DNA-Schäden in Form von DNA-Doppelstrangbrüchen induziert, die von einer verstärkten SAPK/JNK Phosphorylierung begleitet werden (Abb. 24).



**Abbildung 33: Bildung von  $\gamma$ -H2AX-Foci nach Transplatin-Behandlung in GM637 und CSB Zellen.**

GM637 und CSB Zellen wurden mit 250  $\mu$ M Transplatin 4h zw. 24h behandelt und  $\gamma$ -H2AX-Foci immunhistochemisch nachgewiesen. Die DAPI-Färbung erfolgte zum Nachweis der Zellkerne. Vergrößerung: 1000-fach.

Um die initialen DNA-Platinaddukte nach Transplatin-Exposition zu bestimmen, wurden GM637 und CSB Zellen mit ansteigenden Konzentrationen Transplatin für 4h behandelt und Konzentration der platinieren DNA mittels ICP-MS bestimmt. Die Zellen unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich der Menge ihrer initialen DNA-Platinaddukte (Abb. 34). Demnach ist die verstärkte Transplatin-induzierte SAPK/JNK Phosphorylierung in CSB Zellen nicht durch Unterschiede in den initialen DNA-Schäden begründet. Demnach führen Transplatin-Läsionen, vergleichbar zu Cisplatin-Läsionen, nach 24h in CSB Zellen zu einer vermehrten SAPK/JNK Phosphorylierung, die mit einer erhöhten Menge an  $\gamma$ -H2AX Foci einhergeht.

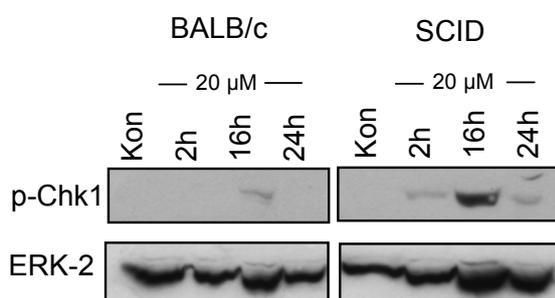


**Abbildung 34: DNA-Platinierung in GM637 und CSB Zellen nach Transplatin-Behandlung.**

Nach 4h Transplatin-Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen wurde der DNA-Platingehalt mittels ICP-MS in GM637 und CSB Zellen bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n=3$ ).  $p$ -Wert  $>0,05$

### 3.1.3.4 Cisplatin-induzierte DNA-Schäden in SCID Zellen (DNA-PKcs defizient)

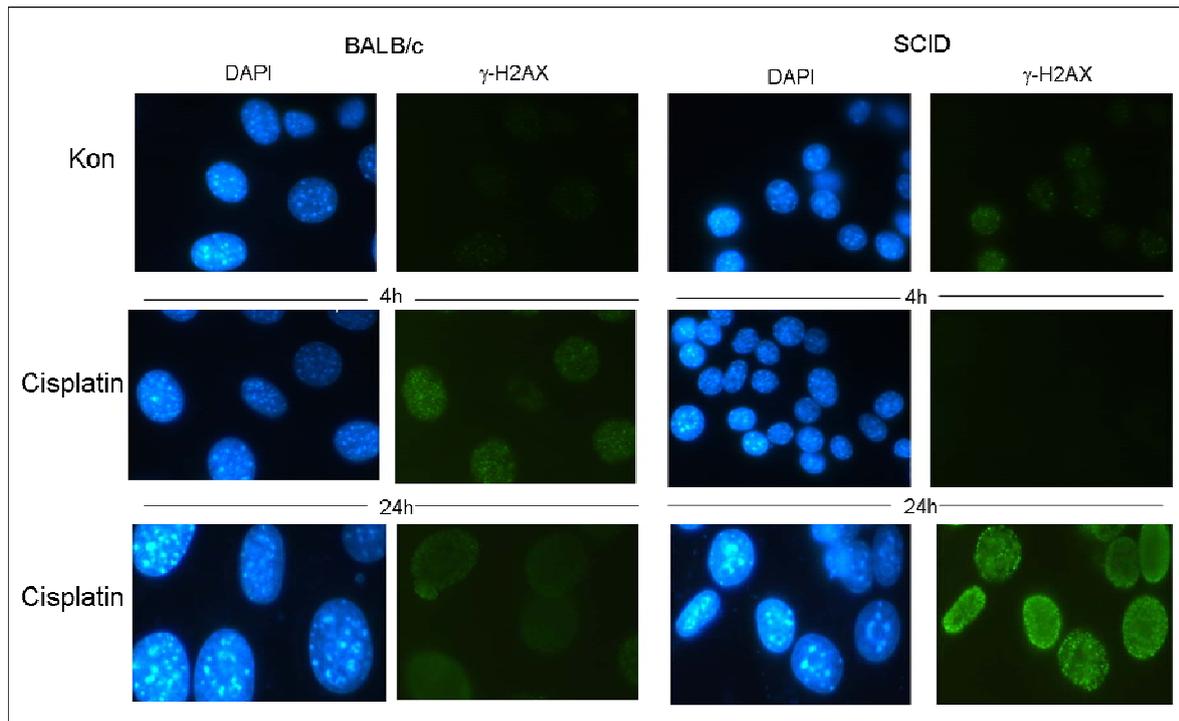
Aufgrund der Tatsache, dass Cisplatin in SCID Zellen eine späte Aktivierung der SAPK/JNK verursachte, sollten Untersuchungen der Chk1 Aktivität weiteren Aufschluss über das DNA-Schadenssignalling geben. BALB/c und SCID Zellen wurden hierfür mit 20  $\mu\text{M}$  Cisplatin behandelt, wodurch es in SCID Zellen nach 16h zu einer erhöhten Chk1 Phosphorylierung kam (Abb. 35). In WT Zellen konnte hingegen nur eine schwache Induktion der Kinase-Aktivität detektiert werden (Abb. 35). Demnach geht in SCID Zellen die verstärkte SAPK/JNK Phosphorylierung mit einer erhöhten Chk1 Phosphorylierung einher.



**Abbildung 35: Chk1 Phosphorylierung in BALB/c und SCID Zellen nach Cisplatin-Behandlung.**

Nach 20  $\mu\text{M}$  Cisplatin-Behandlung wurde mittels Western Blot Analysen die Chk1 Phosphorylierung in BALB/c und SCID Zellen zu unterschiedlichen Zeiten bestimmt. Der Nachweis der ERK-2 Expression diente als Beladungskontrolle.

Da demzufolge in SCID Zellen ein erhöhtes DNA-Schadenssignalling mit der SAPK/JNK Aktivierung korrelierte, wurde die Menge an DNA-Doppelstrangbrüchen durch Messung von  $\gamma$ -H2AX-Foci in beiden Zelllinien bestimmt. 4h Cisplatin-Behandlung verursachte in WT und SCID Zellen vergleichbare Menge an  $\gamma$ -H2AX-Foci. Allerdings konnten 24h nach Exposition mit Cisplatin substantiell stärkere  $\gamma$ -H2AX-Foci in SCID Zellen im Vergleich zu WT Zellen detektiert werden (Abb. 36).

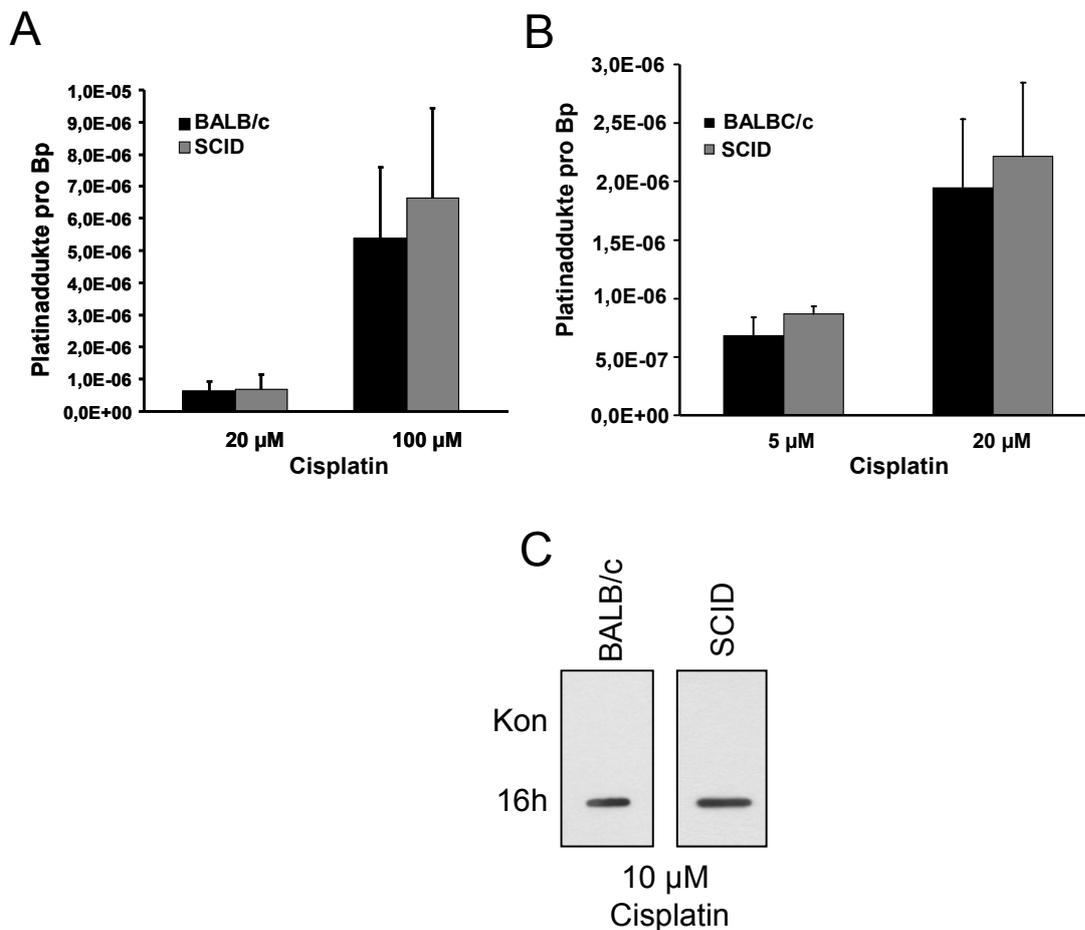


**Abbildung 36:  $\gamma$ -H2AX-Foci Bildung in BALB/c und SCID Zellen nach Cisplatin-Behandlung.**

BALB/c und SCID Zellen wurden mit 5  $\mu$ M Cisplatin für 4h bzw. für 24h behandelt und  $\gamma$ -H2AX-Foci immunhistochemisch nachgewiesen. Die DAPI-Färbung erfolgte zum Nachweis der Zellkerne. Vergrößerung: 1000-fach.

Die massenspektroskopische Analyse der DNA-Platinierung und die Bestimmung der 1,2-GG-Intrastrand-Crosslinks sollten weiteren Aufschluss über den Cisplatin-induzierten DNA-Schaden in WT und SCID Zellen geben. Nach Cisplatin-Behandlung zeigten BALB/c und SCID Zellen nach 4h (Abb. 37A) und 24h (Abb. 37B) einen dosisabhängigen Anstieg der Platinierung, unterschieden sich aber nicht in der Menge der Platinaddukte. Dieser Befund wurde durch South Western Analysen der Cisplatin-induzierten 1,2-GG-Intrastrand Crosslinks bestätigt. Beide Zelllinien wiesen nach 16h Cisplatin-Behandlung vergleichbare Mengen an DNA-Crosslinks auf (Abb. 37C). Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die Cisplatin-induzierte  $\gamma$ -H2AX Foci-Bildung, also das Auftreten von mehr DNA-Doppelstrangbrüchen, sowie die

Chk1 Phosphorylierung mit der späten SAPK/JNK Phosphorylierung in SCID Zellen einhergeht.



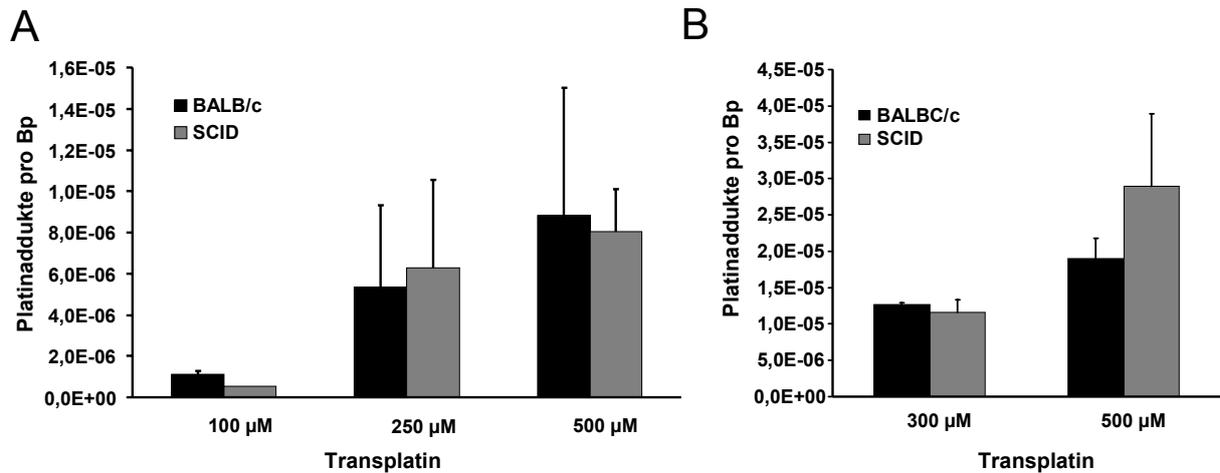
**Abbildung 37: Cisplatin-induzierte DNA-Addukte in BALB/c und SCID Zellen.**

Nach 4h (A) bzw. 24h (B) Cisplatin-Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen wurde der DNA-Platingehalt der BALB/c und SCID Zellen mittels ICP-MS bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n=3). p-Wert>0,05.

C: BALB/c und SCID Zellen wurden mit 10  $\mu$ M Cisplatin für 16h behandelt und anschließend South Western Analysen mit 1,2-GG-Intrastrand-Crosslink Antikörpern durchgeführt. Gezeigt wurde ein repräsentativer Blot von drei unabhängigen Versuchen (n=3).

### 3.1.3.5 Transplatin-induzierte DNA-Schäden in SCID Zellen

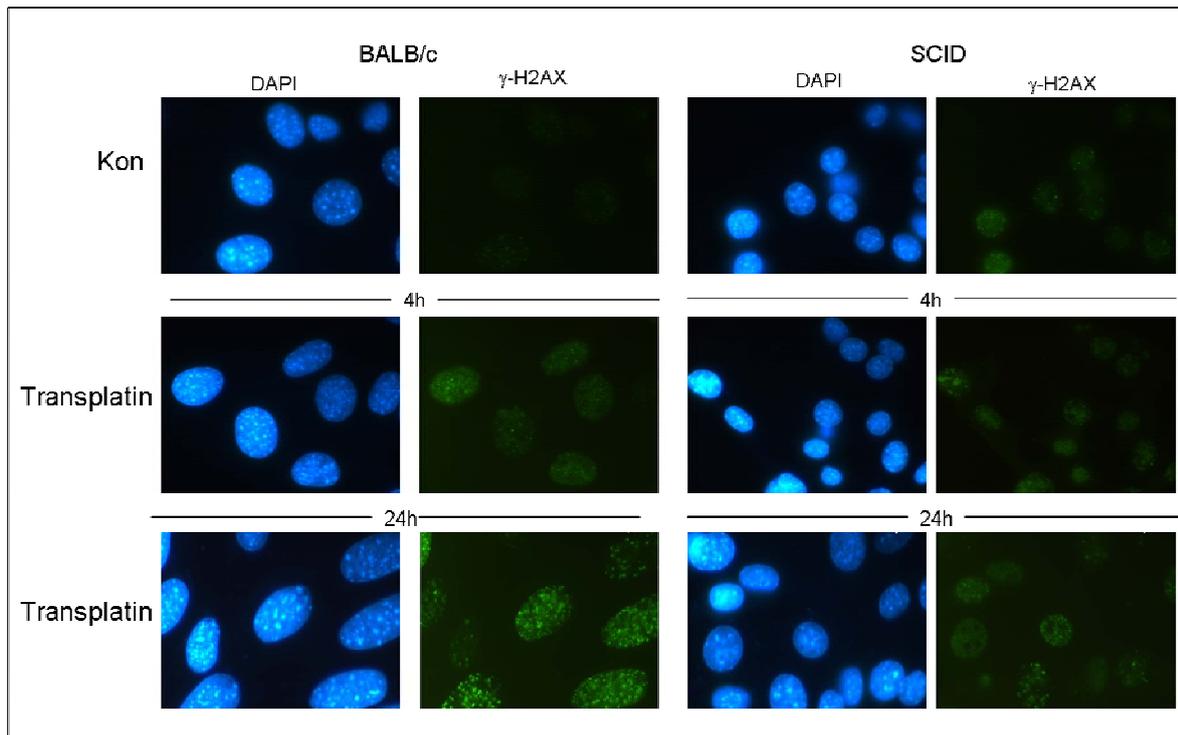
Da auch Transplatin-Läsionen in SCID Zellen zu einer leicht erhöhten SAPK/JNK Aktivierung führten (siehe Abb. 14B), wurde in den Zelllinien ebenfalls der DNA-Schaden bzw. der DNA-Platingehalt ermittelt. Die ICP-MS Messung nach 4h (Abb. 38A) und 24h (Abb. 38B) ergab, dass die DNA-Addukt mengen der WT und SCID Zellen sich nicht signifikant unterschieden. Die stärkere SAPK/JNK Phosphorylierung in SCID Zellen (Abb. 14) geht demnach nicht auf erhöhte DNA-Platinmengen zurück.



**Abbildung 38: DNA-Platinaddukte nach 4h und 24h Transplatin-Behandlung in BALB/c und SCID Zellen.**

Nach 4h (A) bzw. 24h (B) Transplatin-Behandlung mit ansteigenden Dosen der BALB/c und SCID Zellen wurde der Platingehalt der DNA mittels ICP-MS bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ( $n=3$ ).  $p$ -Wert  $> 0,05$ .

Obwohl die DNA-Platinierung sich in den Zelllinien nicht unterschied, offenbarten die Untersuchungen der  $\gamma$ -H2AX-Phosphorylierung, dass SCID Zellen nach 24h Transplatin-Behandlung weniger Doppelstrangbrüche aufwiesen als ihre wildtypischen Fibroblasten (Abb. 39). Erstaunlicherweise bewirkt das Fehlen der DNA-PKcs eine Reduktion der Transplatin-induzierten Strangbrüche.



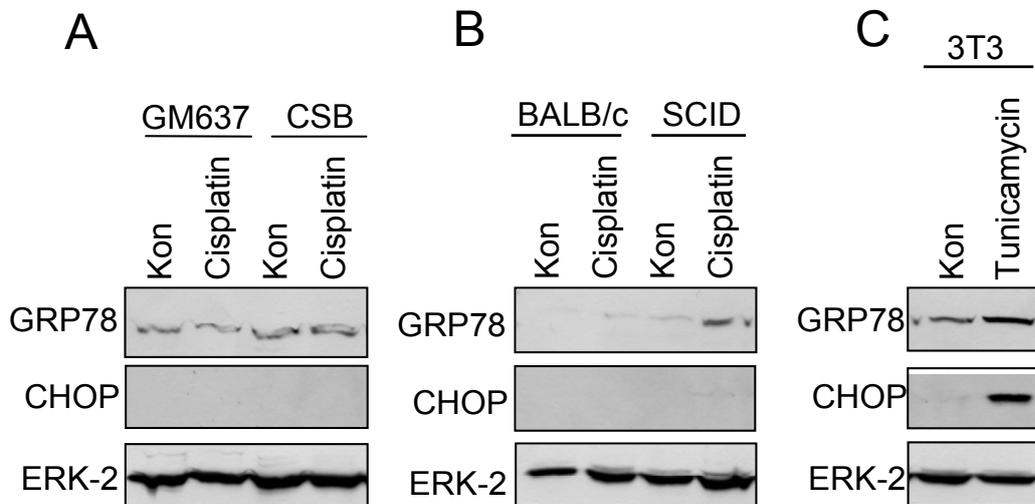
**Abbildung 39: Transplatin-induzierte  $\gamma$ -H2AX Phosphorylierung in BALB/c und SCID Zellen.**

BALB/c und SCID Zellen wurden mit 500  $\mu$ M Transplatin für 4h bzw. für 24h behandelt und  $\gamma$ -H2AX-Foci immunhistochemisch nachgewiesen. Die DAPI-Färbung erfolgte zum Nachweis der Zellkerne. Vergrößerung: 1000-fach.

### 3.1.3.6 Cisplatin-induzierter ER-Stress in CSB und DNA-PKcs Zellen

Die Beobachtung, dass Cisplatin-Behandlung zu ER-Stress führen kann (Mandic et al., 2003) und dieser auch eine SAPK/JNK Aktivierung bewirkt, führte zu der Frage, ob ER-Stress Ursache für die verstärkte Phosphorylierung der SAPK/JNK in CSB und DNA-PKcs Zellen sein könnte. Die Proteine CHOP und GRP78 dienen dabei als Indikator für ER-Stress (Xu et al., 2005). Nach Behandlung der beiden Zellpaare, GM637 und CSB, sowie BALB/c und SCID, mit Cisplatin wurden die Proteinexpression von CHOP und GRP78 untersucht. In WT und CSB Zellen konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Proteinexpression des CHOP sowie des GRP78 Proteins detektiert werden (Abb. 40A). In SCID Zellen, nicht jedoch in WT Zellen kam es hingegen in Cisplatin-behandelten Zellen zu einer Induktion von GRP78 (Abb. 40B). Als Positivkontrolle wurden Mausfibroblasten (3T3) mit Tunicamycin für 6h behandelt, wodurch ein Anstieg des CHOP- und GRP78-Proteins in den behandelten Zellen zu beobachten war (Abb. 40C). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ER-Stress unter unseren gewählten Bedingungen in GM637 oder CSB Zellen nicht hervorgerufen wird. Dahingegen könnte der Anstieg an GRP78 in

SCID Zellen bedeuten, dass in diesem Zellsystem der ER-Stress möglicherweise zur Phosphorylierung der SAPK/JNK beiträgt.



**Abbildung 40: Untersuchungen des Cisplatin-induzierten ER-Stress in BALB/c und SCID Zellen.**

GM637 und CSB Zellen wurden 24h mit 5  $\mu$ M Cisplatin (A) bzw. BALB/c und SCID Zellen mit 20  $\mu$ M Cisplatin (B) behandelt und anschließend erfolgte der Nachweis der CHOP und GRP78 Proteinexpression mittels Western Blot Analysen.

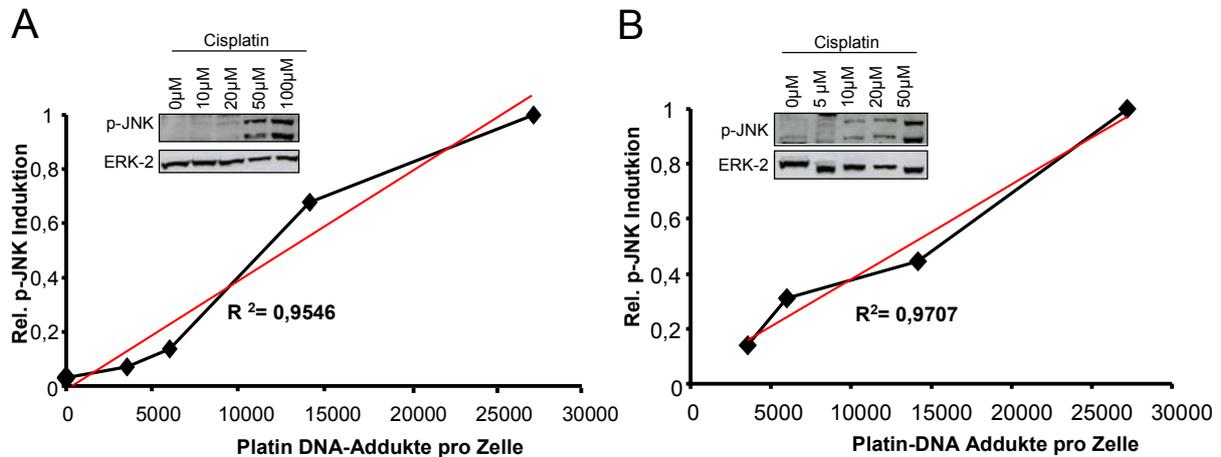
C: Die Behandlung der Mausfibroblasten (3T3) mit Tunicamycin (2  $\mu$ g/ml, 6h) diente als Positivkontrolle, der Nachweis der ERK-2 Expression als Beladungskontrolle.

### 3.1.4 Läsionsspezifität der Cisplatin- und Transplatin-DNA-Addukte bei der Aktivierung der SAPK/JNK

Obwohl sich Kinetik und Art der Läsion zwischen Cisplatin und Transplatin stark unterscheiden, Cisplatin induziert Intra- und Interstrand-Crosslinks, während Transplatin DNA-Basen ausschließlich durch Interstrand-Crosslinks verbindet, führten beide Agenzien zur Induktion der SAPK/JNK. Daher sollte untersucht werden, inwieweit die DNA-Addukte beider Agenzien das gleiche Potential bei der SAPK/JNK Aktivierung haben und ob ein linearer Zusammenhang zwischen Cisplatin-induzierten DNA-Addukten und der SAPK/JNK Phosphorylierung besteht.

Dazu wurden wildtypische Mausfibroblasten mit ansteigenden Konzentrationen Cisplatin behandelt und Western Bot Analysen mit p-JNK Antikörpern durchgeführt. Die SAPK/JNK Induktion wurde durch Quantifizierung der Signalstärke ermittelt, indem das stärkste Signal gleich 1 gesetzt wurde. Von parallel behandelten Zellen wurden die Platinaddukte der DNA mittels ICP-MS bestimmt und die Induktion der SAPK/JNK gegen die DNA-Adduktmenge aufgetragen. Das ermittelte Bestimmtheitsmaß, welches 0,95 bzw. 0,97 betrug, machte deutlich das die DNA-

Addukt Mengen und die SAPK/JNK Phosphorylierung korrelierten und daher in linearem Zusammenhang stehen (Abb. 41).



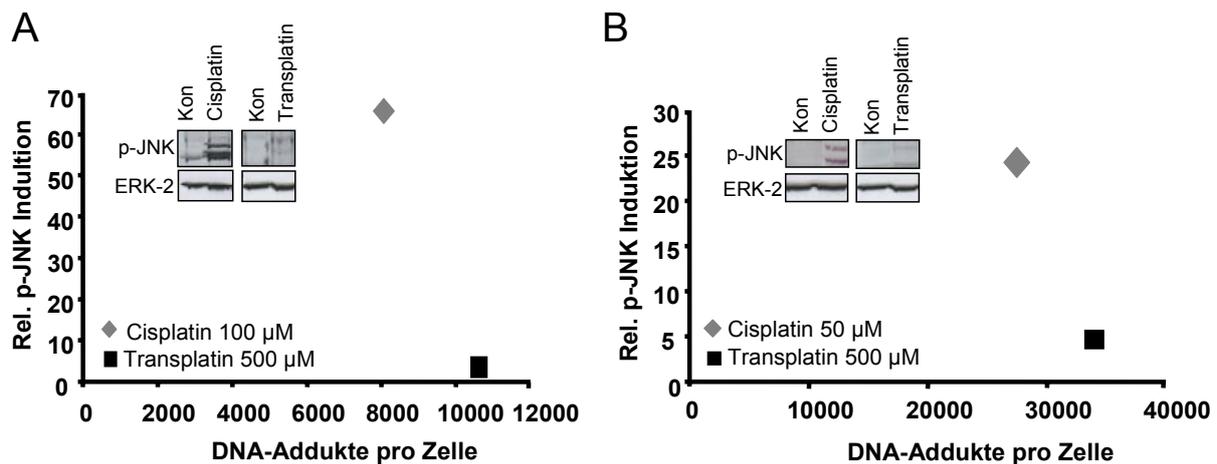
**Abbildung 41: Korrelation zwischen der SAPK/JNK Induktion und der Bildung von Cisplatin DNA-Addukten nach 4h und 24h.**

Nach 4h (A) und 24h (B) Cisplatin-Behandlung mit ansteigenden Dosen der wildtypischen Mausfibroblasten (BALB/c) wurden Western Blot Analysen mit phosphospezifischen SAPK/JNK Antikörpern (p-JNK) durchgeführt. Mittels ICP-MS wurde die Menge an DNA-Platinaddukten bestimmt. Die p-JNK Induktion wurde quantifiziert, indem das stärkste Signal gleich 1 gesetzt und für die restlichen Proben die relative Induktion errechnet wurde. Das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) wurde mit einem Tabellenkalkulationsprogramm ermittelt.

Um die DNA-Addukt Mengen von Cisplatin und Transplatin hinsichtlich der Aktivierbarkeit der SAPK/JNK zu vergleichen, wurden die BALB/c Zellen 4h bzw. 24h mit den Genotoxinen behandelt und der Platingehalt gemessen. Mit Zellen die parallel zu der DNA-Platinierungsmessung behandelt wurden, konnte anhand von Western Blot Analysen mit p-JNK Antikörpern die Induktion der SAPK/JNK quantifiziert werden. Es zeigte sich, dass die 4-stündige Cisplatin-Behandlung mit 5-fach geringeren Dosen als Transplatin annähernd gleich viele DNA-Addukte verursachte. Zudem kam es bei dieser Cisplatin-Konzentration zu einer 22-fachen Anstieg der Induktion von der SAPK/JNK (Abb. 42A). Transplatin verursachte hingegen bei den gewählten Bedingungen durch gleiche DNA-Addukt Mengen wie Cisplatin keine detektierbare Induktion der SAPK/JNK (Abb. 42A). Behandlung von BALB/c Zellen mit den Genotoxinen für 24h führte bei einer 10-fach geringeren Cisplatin-Dosis zu DNA-Addukt Mengen die vergleichbar zu denen des Transplatins sind und zu einer 5,3-fach höheren SAPK/JNK Phosphorylierung als Transplatin (Abb. 42B).

Folglich induziert Cisplatin bei geringeren Konzentration als Transplatin vergleichbare DNA-Addukt Mengen, welche die SAPK/JNK deutlich stärker phosphorylieren. Um

zum Cisplatin vergleichbare DNA-Addukt Mengen mit der Transplatin-Behandlung zu erreichen, müssen 5-fach bzw. 10-fach höhere Konzentrationen Transplatins verwendet werden, dennoch führten diese Addukt Mengen nur nach 24h zu einer schwachen Induktion der SAPK/JNK. Trotz gleicher DNA-Addukt Mengen ist Transplatin in wildtypischen Mausfibroblasten ein schlechterer Aktivator der SAPK/JNK als Cisplatin.



**Abbildung 42: Cisplatin- und Transplatin-DNA-Addukte führen nach 4h und 24h zu einer unterschiedlichen SAPK/JNK Aktivierung.**

Nach 4h (A) bzw. 24h (B) Cisplatin bzw. Transplatin-Behandlung der wildtypischen Mausfibroblasten (BALB/c) wurden Western Blot Analysen mit phosphospezifischen SAPK/JNK Antikörpern durchgeführt. Mittels ICP-MS wurde die Menge an DNA-Platinaddukten bestimmt. Die p-JNK Induktion wurde quantifiziert, indem die unbehandelte Probe gleich 1 gesetzt und für die restlichen Proben die relative Induktion errechnet wurde.

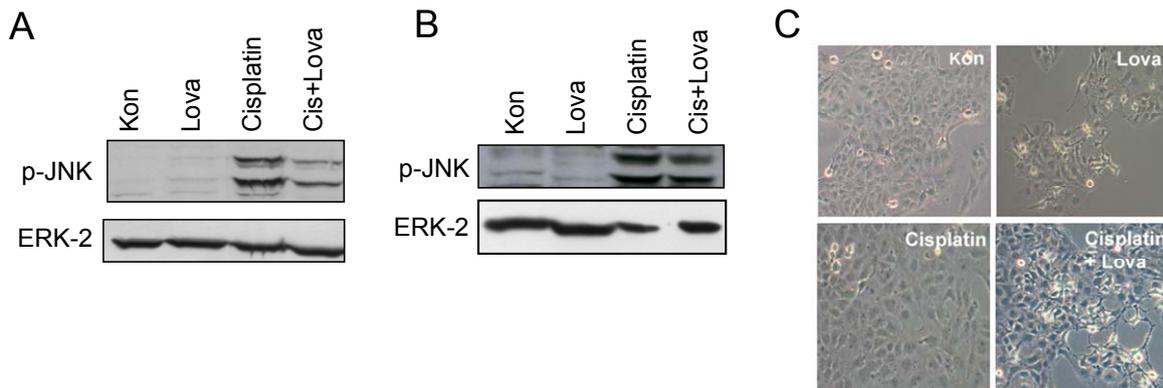
### 3.1.5 Einfluss einer Hemmung von Rho-GTPasen auf die SAPK/JNK

#### Aktivierung nach Cisplatin-Exposition

Rho-GTPasen sind für die frühe DNA-schadensunabhängige Aktivierung der Stress-Kinasen essentiell (Coso et al., 1995; Minden et al., 1994). Es stellte sich die Frage, ob diese GTPasen ebenfalls an der späten, DNA-schadensabhängigen, Cisplatin-induzierten SAPK/JNK Phosphorylierung beteiligt sind. Rho-GTPasen können durch den HMG-CoA Reduktase Inhibitor Lovastatin gehemmt werden, indem dieser die C-terminale Isoprenylierung von Rho-GTPasen verhindert (Gnad et al., 2000; Laufs et al., 1998; Rikitake & Liao, 2005).

Humane Fibroblasten (GM637) wurden für diese Untersuchungen mit 10  $\mu$ M Lovastatin für 16h vorbehandelt und in Anwesenheit des Statins für weitere 4h mit 100  $\mu$ M Cisplatin behandelt. Die Western Blot Analysen zeigten, dass die Statin-Vorbehandlung die Cisplatin-induzierte SAPK/JNK um die Hälfte reduzierte

(Abb. 43A). Um einen Einfluss des Statins auf die späte Cisplatin-induzierte Aktivierung der SAPK/JNK zu untersuchen, wurden die humanen Fibroblasten nach Vorinkubation für 16h mit Lovastatin, anschließend 24h mit Cisplatin in Abwesenheit des Statins behandelt. Unter diesen Versuchsbedingungen konnte keine Reduktion der Cisplatin-induzierten SAPK/JNK durch die Statin-Vorbehandlung erreicht werden (Abb. 43B). Mikroskopische Überprüfung der Wirksamkeit des Statins ergab die zu erwartenden Zell-Abrundungen (Abb. 43C).

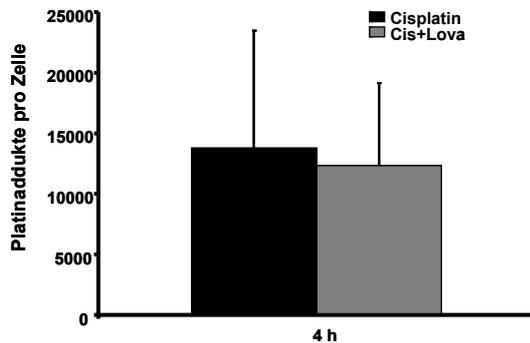


**Abbildung 43: Einfluss von Lovastatin auf die Cisplatin-induzierte SAPK/JNK Aktivierung in GM637 Zellen.**

Nach 16h Vorbehandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Lovastatin wurden GM637 Zellen 4h mit 100  $\mu\text{M}$  (A) bzw. 24h mit 20  $\mu\text{M}$  Cisplatin (B) behandelt. Anschließend wurden Western Blot Analysen mit phosphospezifischen Antikörpern gegen die SAPK/JNK (p-JNK) durchgeführt. Der Nachweis der ERK-2 Expression diente als Beladungskontrolle. C: Mikroskopische Aufnahmen der Lovastatin vorbehandelten und 4h Cisplatin behandelten GM637 Zellen zeigen die durch das Statin verursachten morphologischen Veränderungen. Vergrößerung: 320-fach.

Statine könnten durch Veränderungen der intrazellulären Cisplatin-Konzentration Einfluss auf das Cisplatin-induzierte Stress-Signalling nehmen, da berichtet wurde, dass sie sich auf Drug-Transporter, wie das P-Glycoprotein auswirken können (Wang et al., 2001). Diese Multidrug-resistenten Transporter (MDR) sind für den Export von Zytostatika aus der Zelle verantwortlich und gelten weiterhin als Mediatoren der Resistenz von Chemotherapeutika (Gottesman, Pastan & Ambudkar, 1996; Takara, Sakaeda & Okumura, 2006). Die durch das Statin hervorgerufene Reduktion der Cisplatin-induzierten SAPK/JNK (siehe Abb. 43B) könnte demnach durch Hemmung der Expression des Multidrug-Transporters verursacht werden. Aus diesem Grund wurde mit 10  $\mu\text{M}$  Statin vorbehandelten, sowie unbehandelten Fibroblasten (GM637) nach 4-stündiger Cisplatin-Exposition eine ICP-Messung zur Bestimmung des Platingehaltes durchgeführt. Die Statin-vorbehandelten Zellen unterschieden sich hinsichtlich des Platingehaltes nicht von den unbehandelten Zellen (Abb. 44).

Lovastatin wirkte sich unter unseren Versuchsbedingungen demzufolge nicht auf die intrazelluläre Konzentration des Cisplatin aus.

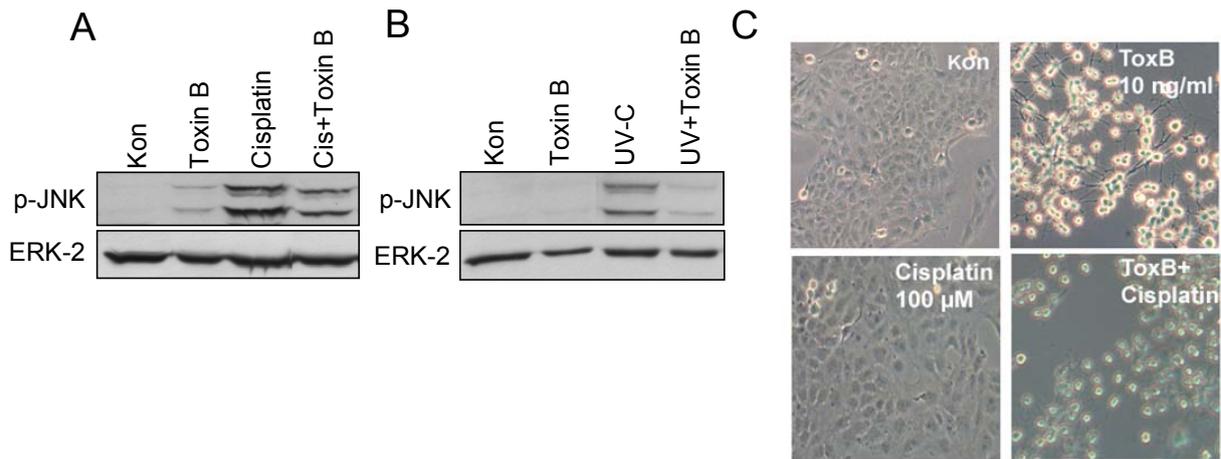


**Abbildung 44: Einfluss von Lovastatin auf den zellulären Cisplatin-Transport.**

Nach 16h Vorbehandlung mit 10  $\mu$ M Lovastatin und anschließender Behandlung von GM637 Zellen mit 100  $\mu$ M Cisplatin für 4h wurde der Platingehalt in der DNA mittels ICP-MS bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Eine weitere Möglichkeit den Einfluss der Rho-GTPasen auf die DNA-schadensabhängige Aktivierung der SAPK/JNK zu untersuchen, bot die Behandlung der Zellen mit Toxin B. Toxin B wird aus dem Bakterium *Clostridium difficile* gewonnen und hemmt durch Glucosylierung die Funktion der Rho-GTPasen (Aktories, Schmidt & Just, 2000; Just et al., 1995a).

Nach einer 3-stündigen Vorbehandlung humaner Fibroblasten (GM637) mit Toxin B (10 ng/ml) und anschließender Exposition mit 100  $\mu$ M Cisplatin für 4h wurde die Phosphorylierung der SAPK/JNK analysiert. Toxin B-Behandlung führte zu einer Reduktion der Cisplatin-induzierten SAPK/JNK Phosphorylierung (Abb. 45A). Mikroskopische Analyse der Zellen zeigte deutlich eine durch Toxin B verursachte Abrundung der Zellen und bestätigte somit die Wirksamkeit des Toxins (Abb. 45C). Als Positivkontrolle wurden GM637 mit Toxin B für 3h vorbehandelt und mit 40 J/m<sup>2</sup> UV-C bestrahlt. Der bereits publizierte Einfluss des Toxins auf die Hemmung der UV-C-induzierten SAPK/JNK Phosphorylierung (Bardeleben et al., 2003) konnte 30 Minuten nach Strahlung mit Western Blot Analysen bestätigt werden (Abb. 45B).



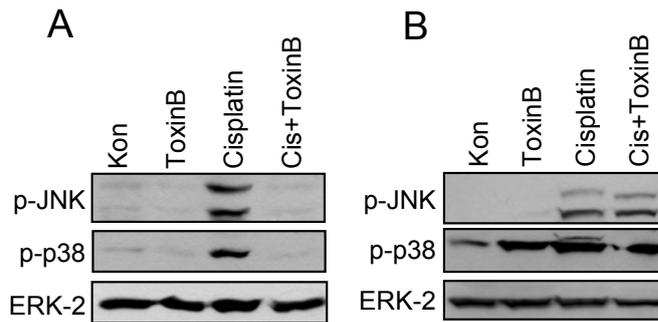
**Abbildung 45: Einfluss von Toxin B auf die Cisplatin-induzierte SAPK/JNK Aktivierung nach 4h.**

A: GM637 Zellen wurden mit Toxin B (10 ng/ml) für 3h behandelt und anschließend in Anwesenheit des Toxins mit 100  $\mu$ M Cisplatin für weitere 4h inkubiert. Es folgten Western Blot Analysen mit p-JNK Antikörpern.

B: GM637 Zellen wurden mit Toxin B (10 ng/ml) 3h behandelt und anschließend 40 J/m<sup>2</sup> UV-C ausgesetzt. Nach 30 min Inkubationszeit erfolgten Western Blot Analysen mit phosphospezifischen Antikörpern gegen die SAPK/JNK (p-JNK). Der Nachweis der ERK-2 Expression diente als Beladungskontrolle.

C: Mikroskopische Aufnahmen verdeutlichen die Wirkung des Toxins. Vergrößerung: 320-fach.

Um einen Einfluss des Toxins auf die späte Cisplatin-induzierte SAPK/JNK Phosphorylierung zu untersuchen, wurden GM637 Zellen mit Toxin B für 3h vorbehandelt und anschließend für 16h Cisplatin ausgesetzt. Toxin B reduzierte in der Tat die späte Cisplatin-induzierte Phosphorylierung der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase (Abb. 46A). Eine durch 3h Vorbehandlung mit 100  $\mu$ M Cisplatin induzierte-SAPK/JNK Aktivierung konnte durch eine nachfolgende 3h Behandlung mit Toxin B (20 ng/ml) nicht revertiert werden (Abb. 46B).

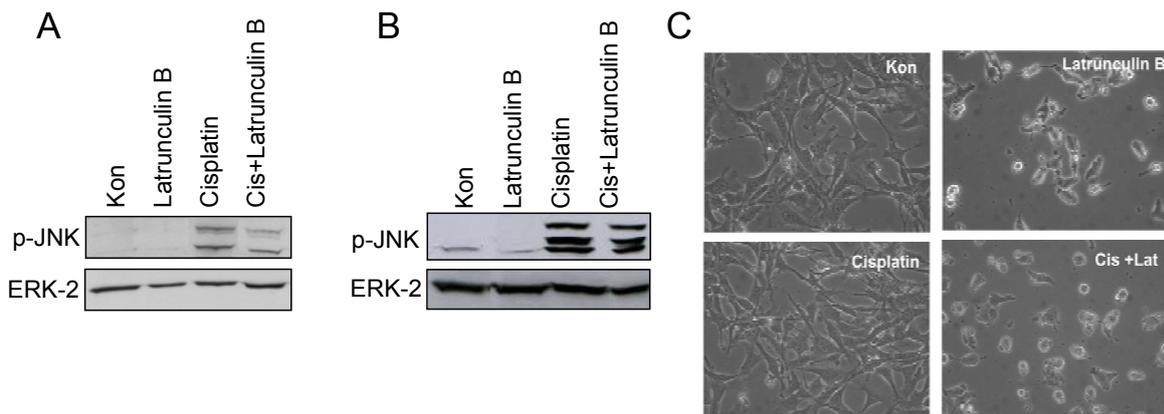


**Abbildung 46: Einfluss von Toxin B auf die späte SAPK/JNK Aktivierung nach Cisplatin-Exposition.**

A: GM637 Zellen wurden mit 1 ng/ml Toxin B für 3h behandelt und anschließend erfolgte die Behandlung mit Cisplatin 20 µM in Anwesenheit des Toxins für weitere 16h. Es folgten Western Blot Analysen mit p-JNK und p-p38 Antikörpern.

B: GM637 Zellen wurden 3h mit 100 µM Cisplatin behandelt und in Anwesenheit von Cisplatin wurden die Zellen mit Toxin B (10 ng/ml) für weitere 3h inkubiert. Es wurden Western Blot Analysen hinsichtlich der p-JNK und p-p38 Kinase durchgeführt. Der Nachweis der ERK-2 Expression diene als Beladungskontrolle.

Durch Verwendung von Latrunculin B, einem natürlich vorkommenden Hemmstoff des Aktin-Zytoskeletts, konnte ausgeschlossen werden, dass die durch Toxin B und Lovastatin verminderte Phosphorylierung der SAPK/JNK nach Cisplatin-Behandlung, auf Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts beruht. Western Blot Analysen mit Latrunculin B vorbehandelten und Cisplatin-behandelten humanen Fibroblasten (GM637) zeigten, dass Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts die SAPK/JNK Aktivierung nicht beeinflussten (Abb. 47).



**Abbildung 47: Morphologische Veränderungen der GM637 Zellen führten nicht zu einer Reduktion der SAPK/JNK Phosphorylierung.**

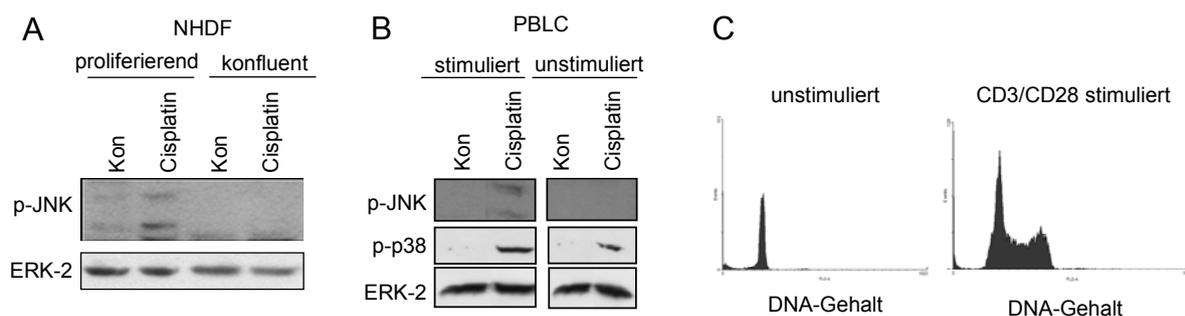
A: GM637 Zellen wurden 2h mit Latrunculin B (1 µM) behandelt und anschließend in Anwesenheit des Latrunculins mit 100 µM Cisplatin für 4h behandelt. Western Blot Analysen erfolgten mit p-JNK Antikörpern. Die ERK-2 Expression diene als Beladungskontrolle.

B: GM637 Zellen wurden 2h mit 10 µM Latrunculin B behandelt und mit 20 µM Cisplatin für 16h in Anwesenheit Latrunculins behandelt. Es folgten Western Blot Analysen mit p-JNK Antikörpern.

C: Mikroskopische Aufnahme der behandelten und unbehandelten Zellen zeigten die Wirkung des Latrunculin B. Vergrößerung: 320-fach.

### 3.1.6 Einfluss der Replikation auf die Aktivierung der SAPK/JNK nach Cisplatin-Behandlung

Da Cisplatin-induzierte DNA-Schäden während der Prozessierung zu einem Block der DNA-Replikation führen, sollte ein Einfluss der Replikation auf die Aktivierung der Stress-Kinasen nach Cisplatin untersucht werden. Hierzu wurden proliferierende primäre humane Fibroblasten (NHDF) mit konfluenten, arretierten Zellen verglichen. Nach Behandlung der Zellen mit 40  $\mu\text{M}$  Cisplatin für 24h wurden Western Blot Analysen mit p-JNK Antikörpern durchgeführt. Tatsächlich zeigten proliferierende Fibroblasten im Gegensatz zu konfluenten, nicht proliferierenden Zellen eine Cisplatin-induzierte Aktivierung der SAPK/JNK (Abb. 48A). Eine weitere Möglichkeit den Einfluss der Replikation auf die SAPK/JNK Aktivierung zu untersuchen, boten humane periphere Blutlymphozyten (PBLC) die mit Hilfe von Wachstumszytokingen, CD3 und CD28, zur Proliferation stimuliert werden können. Vergleiche zwischen CD3/CD28 stimulierten und unstimulierten PBLCs bestätigten die Ergebnisse der primären Fibroblasten. Ausschließlich die stimulierten PBLCs zeigten nach 6h Cisplatin-Behandlung eine SAPK/JNK Phosphorylierung (Abb. 48B). Eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase erfolgte allerdings sowohl in stimulierten, als auch in unstimulierten PBLCs (Abb. 48B). Durch Zellzyklusanalysen mittels FACS (fluorescence activated cell sorting) wurde der Proliferationsstatus der stimulierten PBLC im Vergleich zu den unstimulierten nachgewiesen (Abb. 48C).



**Abbildung 48: Einfluss der Proliferation auf die SAPK/JNK Aktivierung durch Cisplatin.**

A: Nach 24h Cisplatin-Behandlung (40  $\mu\text{M}$ ) wurden mit logarithmisch wachsenden NHDF bzw. mit konfluenten NHDF Zellen Western Blot Analysen mit phosphospezifischen Antikörpern gegen die SAPK/JNK (p-JNK) durchgeführt.

B: Humane periphere Blut Lymphozyten (PBLC) wurden für 48h mit CD3 und CD28 stimuliert und anschließend 6h mit 100  $\mu\text{M}$  Cisplatin behandelt. Die stimulierten und unstimulierten Zellen wurden hinsichtlich der Aktivierbarkeit der SAPK/JNK und der p38 MAP-Kinase im Western Blot verglichen.

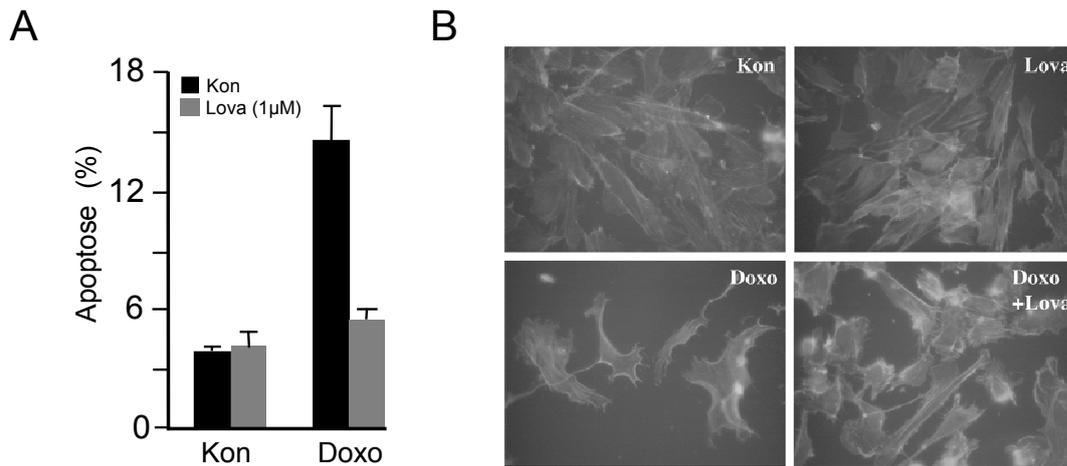
C: Mittels FACS Analysen wurde die Zellzyklusverteilung der stimulierten bzw. unstimulierten PBLCs bestimmt.

### **3.2 Lovastatin-vermittelte Protektion von HUVECs vor der zytotoxischen Wirkung von IR-Strahlung und Doxorubicin**

Eine Beteiligung von Ras/Rho-regulierten-DNA-schadensunabhängigen Mechanismen auf zelluläre Stressantworten nach Genotoxin-Behandlung wurde unter Verwendung von HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren, Statinen, an primären humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) untersucht. Statine inhibieren die Aktivität kleiner GTPasen, wie z.B. Ras und Rho, durch Hemmung ihrer C-terminalen Isoprenylierung, indem sie den zellulären Pool an Isoprenvorstufen depletieren (Goldstein & Brown, 1990). Die Membranlokalisation der GTPasen wird dadurch verhindert und Ras/Rho-vermittelte Signalwege werden durch das Statin blockiert.

#### **3.2.1 Pleiotroper Effekt von Lovastatin auf Faktoren des Stress-Signallings und der Apoptose nach IR-Strahlung und Doxorubicin-Behandlung**

Statin-Vorbehandlung reduzierte die IR-induzierte Apoptosefrequenz in HUVECs (Nubel et al., 2006). Daher sollte ein möglicher Einfluss von Lovastatin auf die Doxorubicin-induzierte Apoptose untersucht werden. HUVECs wurden dafür 16h mit dem Statin inkubiert und anschließend 1h mit Doxorubicin (5 µg/ml) behandelt und nach 72h erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mit FITC-AnnexinV/PI gefärbten Zellen am FACS (fluorescence activated cell sorting). Die mit Lovastatin vorinkubierten Zellen zeigten in der Tat eine 2,5-fache Reduktion der Doxorubicin-induzierten Apoptose (Abb. 49A). Ein zusätzlicher Nachweis für die Lovastatin-vermittelte Protektion der HUVECs vor der zytotoxischen Wirkung von Doxorubicin bot die FITC-Phalloidin Färbung der Zellen. Phalloidin bindet an das F-Aktin der Zellen und kann durch Kopplung mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC das Aktin-Zytoskelett unter dem Mikroskop sichtbar machen. Die mikroskopischen Aufnahmen der mit Lovastatin vorbehandelten und Doxorubicin behandelten HUVECs im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Zellen bestätigten eindrucksvoll, dass Lovastatin vor der zytotoxischen Wirkungen des Doxorubicins schützt (Abb. 49B). Des Weiteren konnte ein berichteter Zusammenbruch des Aktin-Zytoskeletts durch Lovastatin bei unseren gewählten Dosen (1 µM) nicht beobachtet werden (Abb. 49B) (Koch et al., 1997).



**Abbildung 49: Lovastatin schützt vor Doxorubicin-induzierter Apoptose.**

A: Logarithmisch wachsende HUVECs wurden nach 16h Lovastatin (1 µM) Vorbehandlung 1h mit Doxorubicin (5 µg/ml) behandelt. Nach 72h wurde die Apoptoserate der Zellen durch FITC Annexin/PI Doppelfärbung am FACS bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n=3).

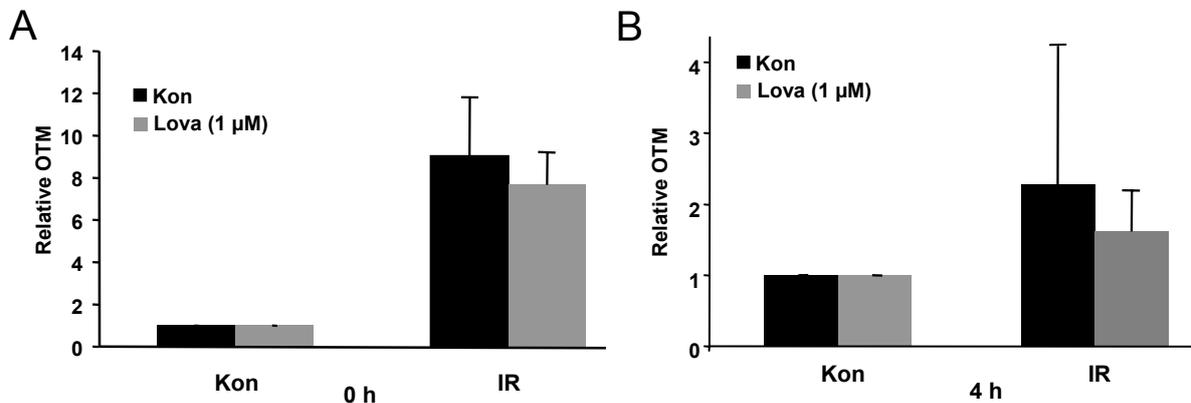
B: HUVECs wurden 16h mit Lovastatin (1 µM) vorbehandelt und anschließend 1h mit Doxorubicin (5 µg/ml) behandelt. Nach 48h wurde das Aktin-Zytoskelett mit FITC-Phalloidin gefärbt und unter dem Mikroskop dokumentiert. Vergrößerung 1:640.

### 3.2.2 Einfluss von Lovastatin auf die Induktion von DNA-Schäden nach IR-Strahlung und Doxorubicin-Behandlung

IR-Strahlung erzeugt DNA-Strangbrüche die zu genomischer Instabilität und Apoptose führen können (Friedberg et al. 1995). Doxorubicin und Etoposid sind Zytostatika und führen über eine Hemmung der Topoisomerase-II- $\alpha$  ebenfalls zu DNA-Doppelstrangbrüchen (Muller, Niethammer & Bruchelt, 1998; Zunino & Capranico, 1990). Die Beantwortung der Frage, ob Lovastatin die Zahl der initialen Strangbrüche in der DNA oder die Reparaturrate der DNA-Strangbrüche beeinflussen kann, und somit zu dem Resistenzverhalten der HUVECs führt, wurde mit Hilfe des Comet Assays untersucht. Unter alkalischen Bedingungen durchgeführt, misst der Comet Assay Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA als Olive Tail Moment (OTM) (Anderson, Yu & McGregor, 1998; Wagner et al., 1998).

HUVECs wurden 16h mit Lovastatin (1 µM) vorbehandelt und IR-Strahlung (20 Gy) ausgesetzt. Der unmittelbar nach Bestrahlung durchgeführte Comet Assay zeigte keine Reduktion der DNA-Strangbruchrate bei den Statin-vorinkubierten Zellen (Abb. 50A). Um einen möglichen Einfluss von Lovastatin auf die Reparatur der Doppelstrangbrüche zu untersuchen, wurden die mit und ohne Lovastatin vorbehandelten Zellen nach Strahlenexposition 4h inkubiert und Comet Analysen

durchgeführt. Es konnte kein Unterschied in der Reparatur der Strangbrüche in den mit dem Statin vorbehandelten, im Vergleich zu den nicht vorbehandelten HUVECs nach IR-Strahlung detektiert werden (Abb. 50B). Folglich beeinflusst das Statin nach IR-Strahlung weder die Frequenz initialer Strangbrüche, noch deren nach 4h gemessenen residualen Strangbrüche.



**Abbildung 50: Lovastatin hat keinen Einfluss auf die IR-induzierte DNA-Strangbruchrate und Reparatur.**

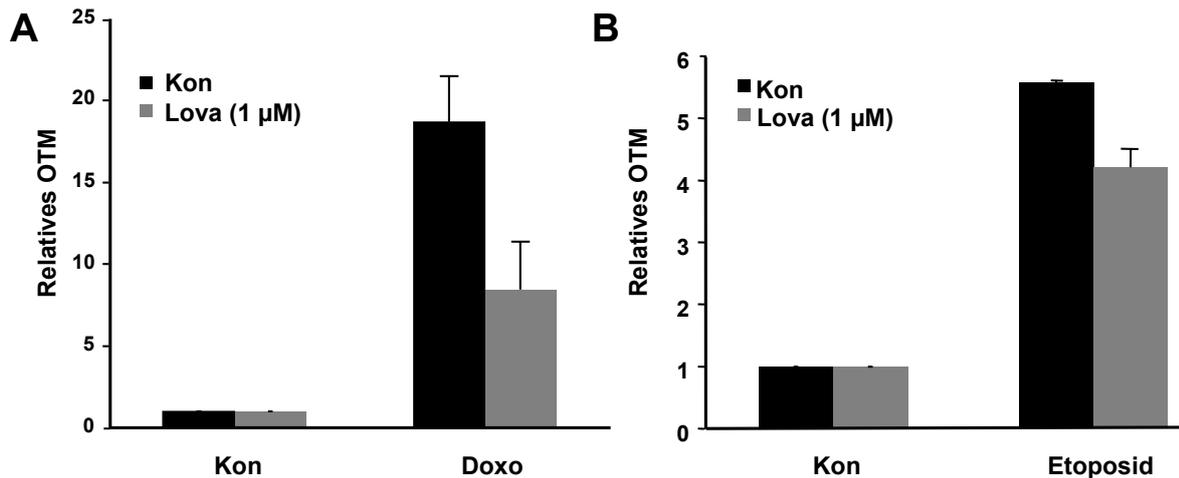
Logarithmisch wachsende HUVECs wurden 16h mit Lovastatin (1 µM) vorbehandelt.

A: Nach Strahlenexposition von 20 Gy wurde der Comet Assay durchgeführt.

B: Nach IR-Strahlung mit 20 Gy wurden die Zellen 4h inkubiert und der Comet Assay durchgeführt. Die OTM der unbehandelten Kontrolle wurden als Bezug gleich 1 gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n=3). p-Wert > 0,05.

Der Einfluss von Lovastatin auf die Doxorubicin- und Etoposid-induzierten Strangbrüche wurde nach 16h Vorbehandlung der HUVECs mit Lovastatin (1 µM) und anschließender Behandlung mit Doxorubicin (5 µg/ml) für 1h bzw. Etoposid (12 µM) für 1h mittels Comet Assay untersucht.

Im Gegensatz zur IR-Strahlung, konnten die initialen DNA-Strangbrüche nach Doxorubicin- und Etoposid-Behandlung durch die Vorinkubation mit Lovastatin reduziert werden (Abb. 51). Die Statin-vermittelte Protektion der HUVECs vor Doxorubicin und Etoposid könnte infolgedessen durch Reduktion der initialen Strangbrüche bewirkt werden.



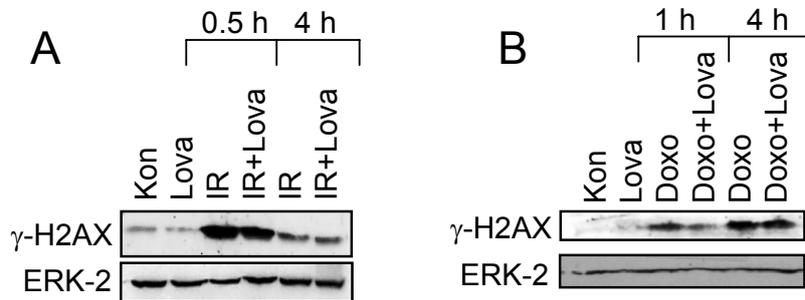
**Abbildung 51: Lovastatin reduziert Doxorubicin- und Etoposid-induzierte DNA-Strangbrüche.**

Logarithmisch wachsende HUVECs wurden 16h mit Lovastatin (1 µM) vorbehandelt. Nach 1h Doxorubicin (5 µg/ml) (A) bzw. nach 1h Etoposid (12 µM) Behandlung (B) wurde der Comet Assay durchgeführt. Die in unbehandelten Zellen gemessenen OTMs wurden gleich 1 gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n=3). p-Wert <0,05.

Um die Ergebnisse des Comet Assays zu bekräftigen, wurde der Einfluss von Lovastatin auf die Phosphorylierung des Histons H2AX ( $\gamma$ -H2AX) untersucht. Das H2AX Protein ist ein Marker für Doppelstrangbrüche in der DNA. Es wird nach DNA-Schädigung von der ATM- und ATR-Kinase phosphoryliert und dient der Rekrutierung von Reparaturfaktoren (Rogakou et al., 1998). HUVECs wurden nach 16-stündiger Vorinkubation mit Lovastatin (1 µM) IR-Strahlung (20 Gy) ausgesetzt und nach 0,5h und 4h Proteinextrakte hergestellt. Western Blot Analysen mit phosphospezifischen Antikörpern gegen das  $\gamma$ -H2AX-Protein zeigten, dass die Vorbehandlung mit dem Statin die Phosphorylierung des  $\gamma$ -H2AX Proteins nach IR-Exposition nicht beeinflusste (Abb. 52A). Die Ergebnisse des Comet Assays und die Untersuchungen der  $\gamma$ -H2AX Phosphorylierung zeigten somit übereinstimmend, dass die durch Lovastatin-vermittelte Protektion der Zellen vor IR-Strahlung (Nubel et al., 2006) offensichtlich unabhängig von einer Reduktion der induzierten Strangbrüche ist.

Dahingegen konnte die initiale Doxorubicin-induzierte Phosphorylierung des H2AX Proteins, nicht jedoch die Phosphorylierung nach 4h, durch die Statin-Vorbehandlung reduziert werden. Die HUVECs wurden hierbei 1h mit Doxorubicin (5 µg/ml) behandelt und Proteinextrakte nach 1h und 4h Inkubationszeit hergestellt. Anschließend wurden Western Blot Analysen mit phosphospezifischen  $\gamma$ -H2AX Antikörpern durchgeführt (Abb. 52B). Diese Befunde bestätigten die im Comet Assay beobachtete Reduktion der Doxorubicin-induzierten Strangbrüche durch Lovastatin

und lassen den Schluss zu, dass die Statin-vermittelte Protektion der HUVECs vor Doxorubicin und Etoposid möglicherweise über eine Reduktion der initialen Strangbrüche vermittelt wird.



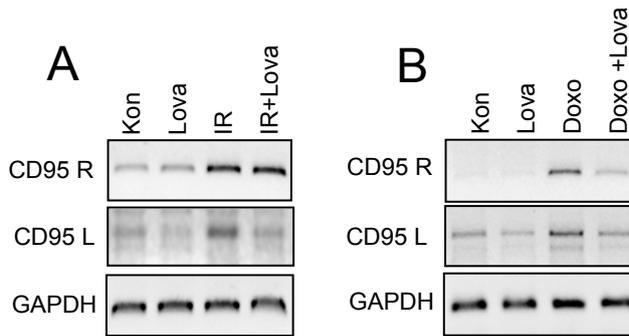
**Abbildung 52: Einfluss von Lovastatin auf die IR- und Doxorubicin-induzierte H2AX Phosphorylierung.**

Logarithmisch wachsende HUVECs wurden 16h mit Lovastatin (1  $\mu$ M) vorbehandelt.

A: Nach Strahlenexposition von 20 Gy erfolgten 0,5h und 4h später Western Blot Analysen.

B: HUVECs wurden 1h mit Doxorubicin (5  $\mu$ g/ml) behandelt und nach 1h und 4h Western Blot Analysen durchgeführt. Als Beladungskontrolle diente der Nachweis des ERK-2 Proteins.

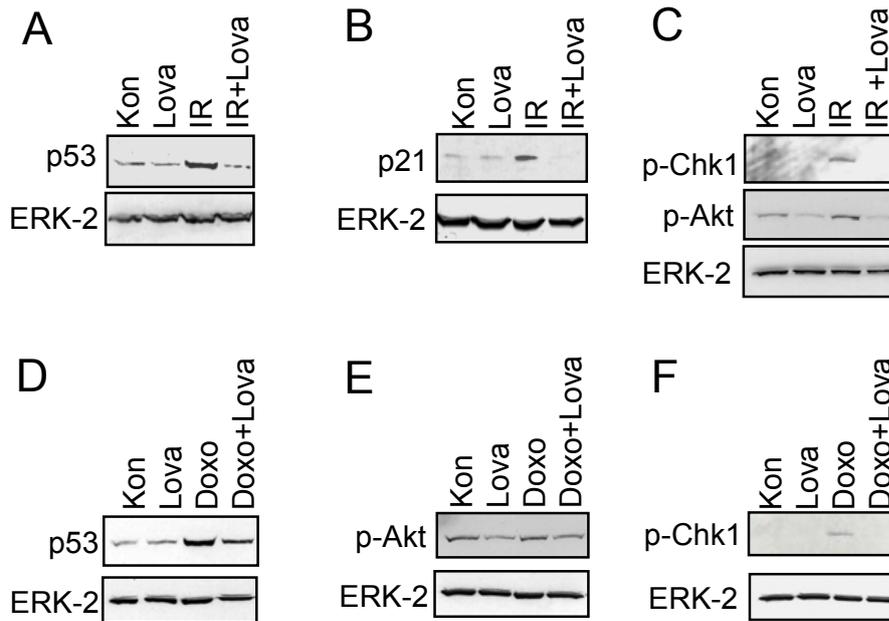
Lovastatin verringert die Doxorubicin- und IR-induzierte Apoptose (Nubel et al., 2006). Daher wurde die Expression der mRNA des CD95 Rezeptors (Fas-Rezeptor) und des Liganden im Hinblick auf einen möglichen Einfluss von Lovastatin untersucht. CD95 ist ein Oberflächenprotein, welches zu der TNF-Rezeptorsuperfamilie gehört. Es wird durch Bindung seines Liganden „Fas“ aktiviert (Smith et al., 1994). Über CD95 Rezeptor und CD95 Liganden wird der Caspase 8-vermittelte mitochondriale Apoptose-Weg initiiert (Pinkoski & Green, 1999). Die Statin-Vorbehandlung der Zelle bewirkte eine Reduktion der IR-induzierten mRNA Expression des CD95 Liganden nach 12h. Die mRNA Expression des CD95 Rezeptors blieb hingegen unbeeinflusst (Abb. 53A). Im Gegensatz hierzu wurde die Doxorubicin-induzierte mRNA Expression des CD95 Liganden und des Rezeptors durch Vorbehandlung mit Lovastatin gehemmt (Abb. 53B). Demnach verläuft die Lovastatin-vermittelte Protektion der HUVECs vor IR-Strahlung unabhängig von der Beeinflussung des CD95 Rezeptors. Die Doxorubicin-induzierte Apoptose erfolgt dagegen vermutlich über die Induktion des CD95 Rezeptor und Liganden und wird durch Hemmung der mRNA Expression durch Lovastatin verringert.



**Abbildung 53: Einfluss von Lovastatin auf die mRNA Expression CD95 Rezeptor und Liganden nach IR- und Doxorubicin-Behandlung.**

Logarithmisch wachsende HUVECs wurden 16h mit Lovastatin (1  $\mu$ M) vorbehandelt. Nach Strahlenexposition (20 Gy) der Zellen (A) bzw. Doxorubicin Behandlung (5  $\mu$ g/ml, 1h) (B) erfolgte 12h später die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) zur Bestimmung der mRNA Expression des CD95 Rezeptor und Liganden, wobei GAPDH als interner Standard verwendet wurde.

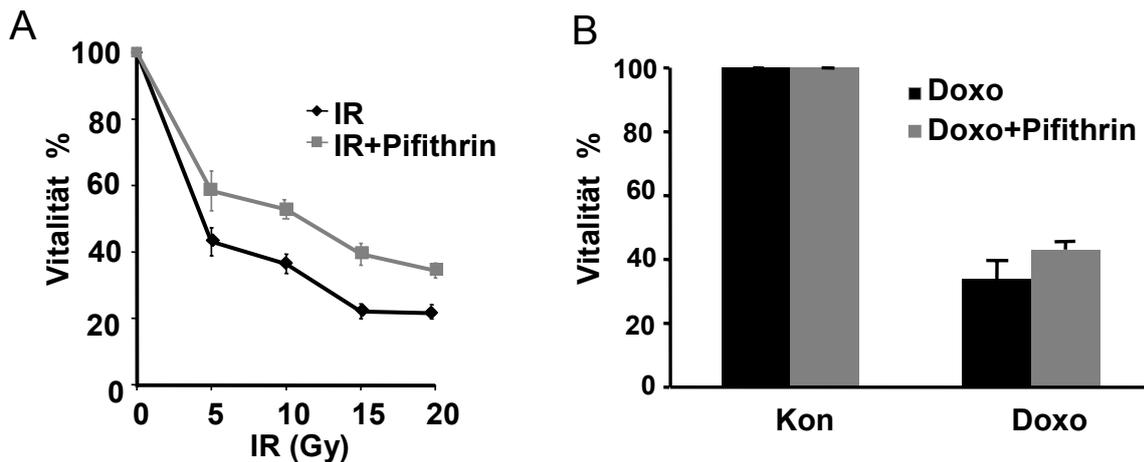
Wichtige Faktoren bei der IR- und Doxorubicin-vermittelten Stressantwort und Regulation der Apoptose sind die Transkriptionsfaktoren p53 und p21 (Lakin et al. 1999). Um deren Einfluss zu untersuchen wurden Endothelzellen nach einer Vorbehandlung mit Lovastatin strahlenexponiert (20 Gy) und nach 2-stündiger Inkubation der Zellen Western Blot Analysen durchgeführt (Abb. 54A). Nach einer Impulsbehandlung von 1h mit 2  $\mu$ g/ml Doxorubicin wurden die Statin-vorbehandelten HUVECs nach 8h Inkubationszeit hinsichtlich der Stabilisierung des p53 Proteins mit Hilfe von Western Blot Analysen untersucht (Abb. 54D). Die IR- und Doxorubicin-induzierte Stabilisierung des p53 Proteins wurde durch die Vorbehandlung mit Lovastatin gehemmt. Des Weiteren führte IR-Strahlung nach 24h zu einer verstärkten p21-Expression, die wiederum durch Lovastatin vermindert wurde (Abb. 53B). Die Frage, ob Lovastatin die DNA-schadensabhängige Stressantwort der HUVECs beeinflussen kann, konnte durch Untersuchungen der Checkpoint-Kinase (Chk-1) geklärt werden. Die ATM/ATR vermittelte Phosphorylierung der Chk-1 zählt zu den allgemein akzeptierten DNA-schadensabhängigen Stressantworten einer Zelle und reguliert nach Schädigung der DNA den Verlauf des Zellzyklus. IR- und Doxorubicin-Behandlung führten zu einer Phosphorylierung des Chk-1 Proteins, welche durch die Statin-Vorbehandlung reduziert wurde (Abb. 54C, 54F). Ferner konnte gezeigt werden, dass Lovastatin die IR-induzierte Aktivierung der Akt-Kinase inhibiert, welche durch DNA-Schäden in Abhängigkeit von den ATM/ATR-Kinasen durch Phosphorylierung aktiviert werden kann (Abb. 54E).



**Abbildung 54: Lovastatin vermindert die Aktivität von IR- und Doxorubicin-induzierten DNA-schadensabhängigen Stressproteinen.**

Logarithmisch wachsende HUVECs wurden 16h mit Lovastatin (1  $\mu$ M) vorbehandelt. Nach Strahlenexposition (10 Gy) bzw. einstündiger Impulsbehandlung mit Doxorubicin (2  $\mu$ g/ml) der Zellen wurde die Expression verschiedener Stress-assoziiierter Proteine untersucht. 2h nach IR-Exposition erfolgte der Nachweis des Expressionsstatus des p53 Proteins (A), nach 24h die des p21 Proteins (B) und nach 6h wurde die Phosphorylierung der Chk1 (p-Chk1), sowie der Akt-Kinase (p-Akt) mittels Western Blot Analysen bestimmt. 8h nach der Doxorubicin-Exposition wurde die Expression von p53 (D), p-Akt (E) und p-Chk1 (F) mittels Western Blot Analyse bestimmt. Die Messung der Expression des ERK-2 Proteins diente als Beladungskontrolle.

Um zu bekräftigen, dass die Lovastatin-vermittelte Protektion der HUVECs vor IR und Doxorubicin über die Inhibierung der p53-vermittelten Stressantwort verläuft, wurde das p53 Protein durch Pifithrin- $\alpha$  inaktiviert (Komarov et al., 1999). Die Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von Pifithrin- $\alpha$  verschiedenen Dosen IR ausgesetzt und die Vitalität mit dem WST-1 Assay nach 72h bestimmt. Es konnte nach Strahlenexposition eine signifikante Protektion der mit Pifithrin- $\alpha$  behandelten HUVECs beobachtet werden (Abb. 55A). Pifithrin- $\alpha$  Behandlung schützte HUVECs ebenfalls signifikant vor der Doxorubicin-induzierten Zytotoxizität (Abb. 55B). Durch Inhibierung des p53 Proteins konnte gezeigt werden, dass die Protektion der HUVECs durch Lovastatin vor ionisierender Strahlung und Doxorubicin möglicherweise über die Beeinflussung von p53-vermittelten pro-apoptischen Stressantworten verläuft.

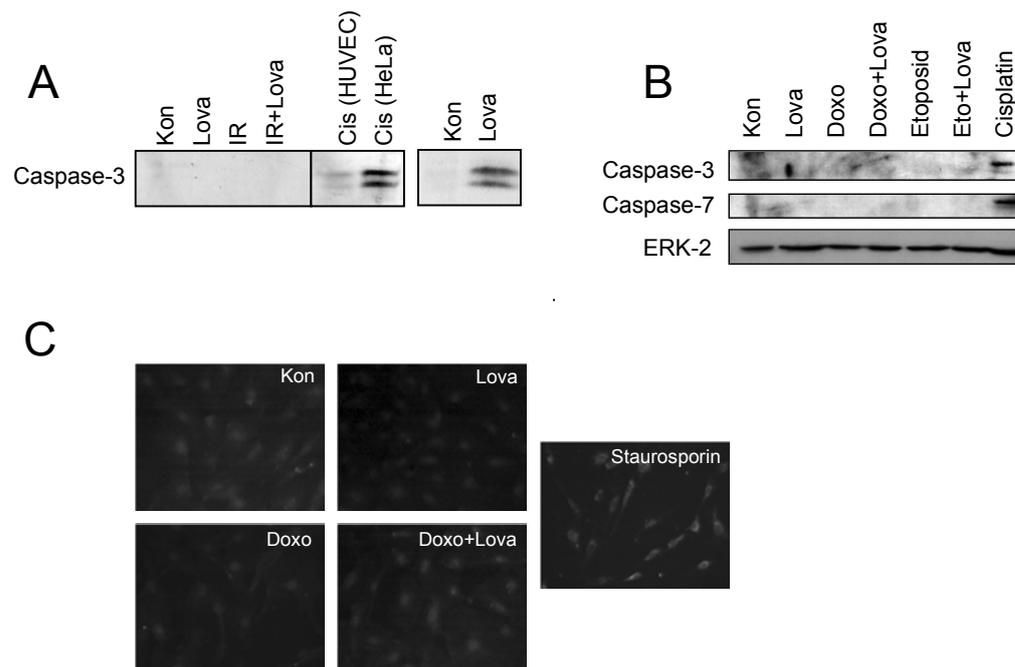


**Abbildung 55: Die Inhibierung des p53 Proteins schützt HUVECS vor der zytotoxischen Wirkung von IR-Strahlung und Doxorubicin-Behandlung.**

A: Logarithmisch wachsende HUVECS wurden in An- oder Abwesenheit von Pifithrin- $\alpha$  (30  $\mu$ M) verschiedenen Dosen IR-Strahlung ausgesetzt. Nach 72h wurde ein WST-1 Assay durchgeführt, um die Vitalität der Zellen zu bestimmen.

B: Die 16h mit Lovastatin vorbehandelten HUVECs wurden 1h mit Doxorubicin (5  $\mu$ g/ml) behandelt. Nach 72h wurde ein WST-1 Assay zur Bestimmung der Vitalität durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n=3). p-Wert < 0,05.

Da die enzymatische Spaltung der Effektor-Caspasen-3 und -7 ein zentrales Ereignis der Apoptose ist (Earnshaw, Martins & Kaufmann, 1999; Friesen et al., 1996), wurde ein möglicher Einfluss von Lovastatin auf die Aktivierung dieser Caspasen untersucht. HUVECs wurden hierfür 16h mit Lovastatin vorbehandelt und IR-Strahlung (10 Gy) ausgesetzt bzw. 1h mit Doxorubicin (5  $\mu$ g/ml) oder 1h mit Etoposid (12  $\mu$ M) behandelt. Die nach 72h durchgeführten Western Blot Analysen zeigten, dass die ausführenden Caspasen-3 und -7 weder durch IR-Strahlung (Abb. 56A), noch durch Doxorubicin oder Etoposid (Abb 56B) in HUVECs induziert wurden. Die Behandlung der HUVECs mit Cisplatin (Abb. 56B) und hohen Dosen Lovastatin (20  $\mu$ M) (Abb. 56A) zeigte andererseits, dass die Zellen grundsätzlich in der Lage sind Caspase-3 und -7 zu aktivieren. Eine Aktivierung der Caspase-3 konnte in HUVECs zusätzlich durch Staurosporin-Behandlung und anschließender Immunfluoreszenzfärbung mit einem Caspase-3 Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 56C).



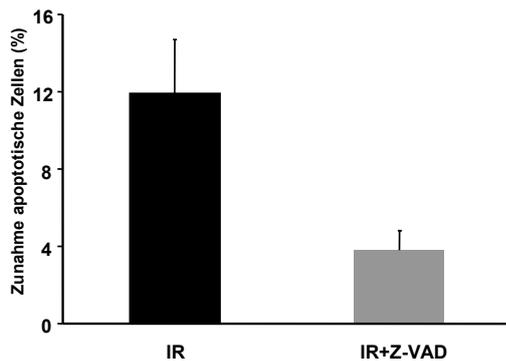
**Abbildung 56: Die Effektor-Caspasen-3 und-7 werden nach IR, Doxorubicin- und Etoposid-Behandlung in HUVECs nicht aktiviert.**

A: HUVECs wurden 16h mit Lovastatin (1  $\mu$ M) vorbehandelt und IR-Strahlung (10 Gy) ausgesetzt. Nach 72h erfolgten Western Blot Analysen mit Caspase-3 Antikörpern. Die Behandlung der HUVECs und HeLa Zellen mit Cisplatin (50  $\mu$ M, 3h) und mit hohen Dosen Lovastatin (20  $\mu$ M) dienten als Positivkontrollen.

B: Nach 16h Vorbehandlung mit Lovastatin (1  $\mu$ M) wurden HUVECs für 1h mit Doxorubicin (5  $\mu$ g/ml) bzw. 1h mit Etoposid (12  $\mu$ M) behandelt und Western Blot Analysen 72h später mit Caspase-3 und -7 Antikörpern durchgeführt. Die Behandlung der HUVECs mit Cisplatin (50  $\mu$ M, 3h) diente als Positivkontrolle.

C: Logarithmisch wachsende HUVECs wurden 16h mit Lovastatin (1  $\mu$ M) vorbehandelt und im Anschluss 1h mit Doxorubicin (5  $\mu$ g/ml) behandelt. Die Staurosporin-Behandlung (1  $\mu$ M) der HUVECs für 6h diente als Positivkontrolle. Die Immunfluoreszenzfärbung der Zellen erfolgte nach 72h mit einem Caspase-3 Antikörper. Vergrößerung: 640-fach.

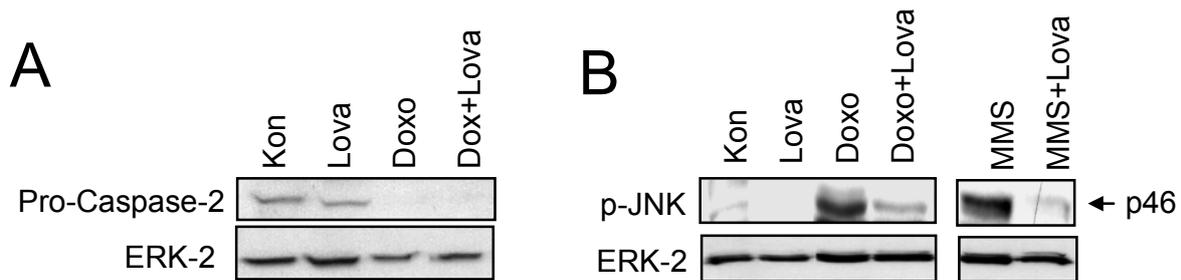
Um die Möglichkeit einer Caspase-unabhängigen Aktivierung der Apoptose nach IR-Strahlung zu untersuchen, wurden HUVECs mit einem pan-Caspase Inhibitor behandelt. Die FACS Analyse der bestrahlten HUVECs in An- oder Abwesenheit des Inhibitors, zeigte eine Reduzierung der IR-induzierten Apoptose in Anwesenheit des Inhibitors (Abb. 57). Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass die IR-induzierte Apoptose der HUVECs nicht generell Caspase-unabhängig verläuft.



**Abbildung 57: Die Inhibierung von Caspasen reduziert die IR-induzierte Apoptose in HUVECs.**

Logarithmisch wachsende HUVECs wurden in An- oder Abwesenheit des pan-Caspase Inhibitors Z-VAD (50  $\mu$ M) IR-Strahlung (10 Gy) ausgesetzt. Nach 48h erfolgte die Messung der Apoptose durch Doppelfärbung mit FITC-Annexin V/PI mittels FACS Analyse. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n=3). p-Wert < 0,05.

Panaretakis et al. (2005) berichteten, dass die Doxorubicin-vermittelte Apoptose über Caspase-2 und über eine Aktivierung der SAPK/JNK verläuft. Pro-Caspase-2 wird konstitutiv im Zellkern exprimiert und nach DNA-Schädigung aktiviert. Im Hinblick auf diese Befunde wurde untersucht, ob die Vorbehandlung mit dem Statin einen möglichen Einfluss auf die Aktivierung der Pro-Caspase-2 und die Aktivierung der SAPK/JNK nach Doxorubicin-Behandlung hat (Panaretakis et al., 2005). Die Aktivierung der Caspase-2 nach Doxorubicin-Behandlung konnte in der Tat durch Abnahme des Pro-Caspase-2 Proteins gezeigt werden (Abb. 58A). Es konnte aber kein Einfluss von Lovastatin auf die Menge an Pro-Caspase-2 beobachtet werden (Abb. 58A). Dahingegen konnte die Doxorubicin-induzierte Phosphorylierung der SAPK/JNK durch Vorbehandlung mit Lovastatin reduziert werden (Abb. 58B). Dies geht mit früheren Befunden einher, bei denen gezeigt wurde, dass eine Vorbehandlung mit Lovastatin die Aktivierung der SAPK/JNK nach verschiedenen Genotoxin-Behandlungen reduziert (Bardeleben et al., 2003; Bardeleben et al., 2002)

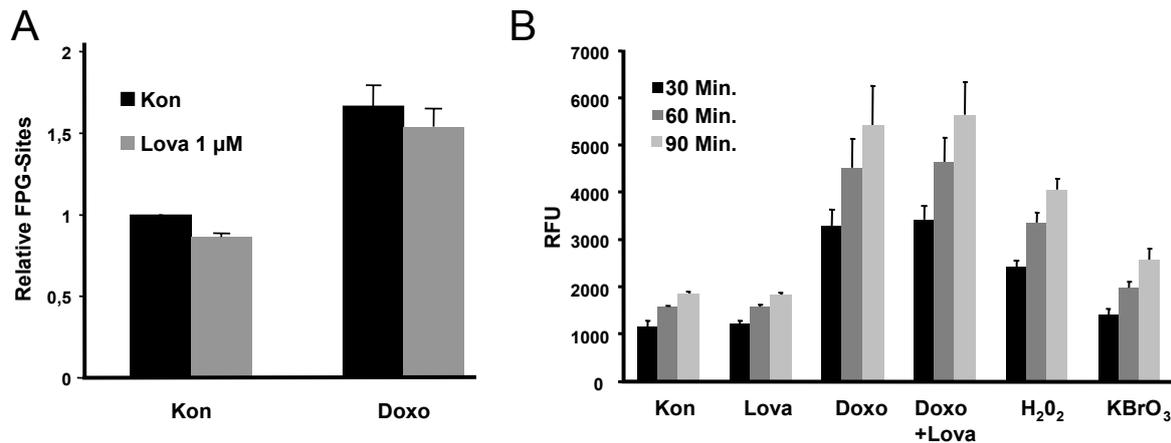


**Abbildung 58: Lovastatin hat keinen Einfluss auf die Doxorubicin-induzierte Abnahme der Pro-Caspase-2 und die Phosphorylierung der SAPK/JNK.**

Logarithmisch wachsende HUVECs wurden mit Lovastatin (1  $\mu$ M, 16h) inkubiert und anschließend Doxorubicin (5  $\mu$ g/ml, 1h) ausgesetzt. Nach 72h erfolgte die Herstellung von Proteinextrakten und Western Blot Analysen mit Pro-Caspase2 Antikörpern (A). Nach Vorbehandlung mit Lovastatin (1  $\mu$ M, 16h) und anschließender Doxorubicin (2,5  $\mu$ g/ml, 6h) Behandlung der HUVECs wurden Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen die phosphorylierte Form der SAPK/JNK (p-JNK) durchgeführt. Die Behandlung mit MMS (1 mM, 2h) diente dem positiven Nachweis der SAPK/JNK Phosphorylierung.

### 3.2.3 Einfluss von Lovastatin auf Doxorubicin-induzierten oxidativen Stress und Transport des Doxorubicins

Doxorubicin schädigt die Zelle nicht nur durch Inhibition der Topoisomerase-II- $\alpha$ , sondern auch durch Generierung von oxidativem Stress (Muller et al., 1998). Die Messung des oxidativen Stresses kann zum einen über eine direkte ELISA-basierende fluorometrische Bestimmung der entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) erfolgen oder durch indirekte Messung der DNA-Läsion 8-Oxoguanin. 8-Oxoguanin entsteht durch Oxidation, wobei Guanin mit einem zusätzlichen Sauerstoffmolekül am C8-Atom versehen wird. Die Menge an 8-Oxoguanin in der DNA wird über Bestimmung der Formamidopyrimidin Glycosylase (FPG) labilen Stellen mittels alkalischer Elution quantifiziert. Der Einfluss von Lovastatin auf die Bildung von 8-Oxoguanin und die Produktion von ROS wurde 16h nach Statin-Vorbehandlung (1  $\mu$ M) und anschließender Doxorubicin-Behandlung für 1h untersucht. Die Vorinkubation mit Lovastatin hatte weder einen Einfluss auf die Bildung von 8-Oxoguanin (Abb. 59A), noch auf die ROS-Produktion nach Doxorubicin-Exposition (Abb. 59B).

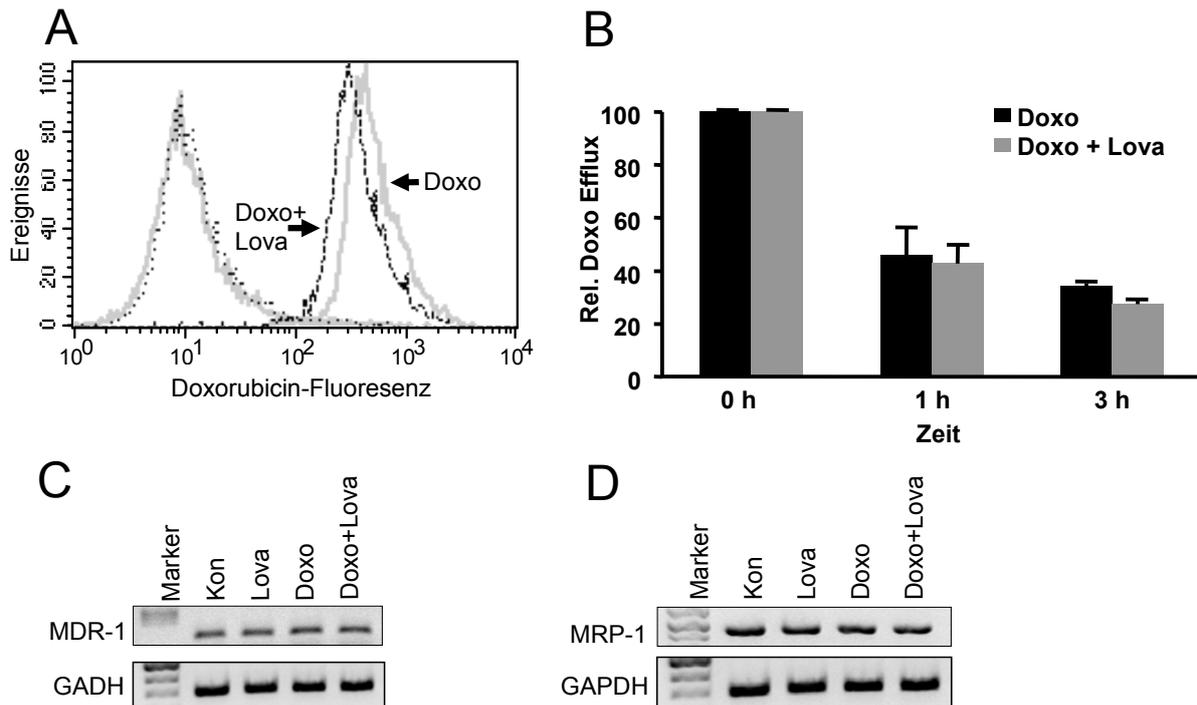


**Abbildung 59: Lovastatin hat keinen Einfluss auf den Doxorubicin-induzierten oxidativen Stress in HUVECs.**

A: Logarithmisch wachsende HUVECs wurden mit Lovastatin (1  $\mu$ M, 16h) vorbehandelt. Nach Behandlung mit Doxorubicin (10  $\mu$ g/ml) für 1h erfolgte die Messung der Formamidopyrimidin Glycosylase (FPG-Sites) labilen Stellen der DNA mittels alkalischer Elution. Die Menge an FPG-Sites in unbehandelten Zellen wurden gleich 1 gesetzt.

B: Nach Vorbehandlung mit Lovastatin (1  $\mu$ M, 16h) und anschließender Behandlung mit Doxorubicin (5  $\mu$ g/ml, 1h) wurde die Menge an ROS in den HUVECs in einem 30 Minuten Intervall gemessen. Die Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 %, 1h) und KBrO<sub>3</sub> (20 mM, 1h) dienten als positive Kontrollen. Die ROS-Aktivität der unbehandelten Zellen wurde gleich 1 gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n=3). p-Wert>0,05.

Die Membrantransporter MDR-1 (Multiple Drug Resistance) und MRP-1 (Multidrug Resistance-associated Protein) verringern die intrazelluläre Konzentration von Zytostatika durch aktiven Efflux (Gottesman et al., 1996). Statine können die Expression von Multidrug-Transportern beeinflussen (Wang et al., 2001). Der Lovastatin-vermittelte Schutz vor Doxorubicin könnte dementsprechend auf eine verringerte intrazelluläre Konzentration des Zytostatikums zurückgeführt werden. Um diese Überlegung näher zu untersuchen, wurde der Influx und der Efflux von Doxorubicin in die Zelle mittels FACS Analyse gemessen. Die erhaltenen Befunde zeigten, dass das Statin keine klaren Veränderungen des Transports von Doxorubicin bewirkte (Abb. 60). Durch Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) Analyse der *mdr-1* und *mrp-1* mRNA Expression von Lovastatin-vorbehandelten und Doxorubicin-behandelten HUVECs konnte festgestellt werden, dass Lovastatin deren mRNA Expression nicht beeinflusst (Abb. 60C,D). Weiterhin bestätigten diese Befunde die Ergebnisse der FACS Analysen hinsichtlich des durch Lovastatin unbeeinflussten Doxorubicin Influxes (Abb. 60A) bzw. Effluxes (Abb. 60B).



**Abbildung 60: Lovastatin verändert den Transport und die mRNA Expression der Multidrug Transporter MDR-1 und MRP-1 nach Doxorubicin-Behandlung nicht.**

Logarithmisch wachsende HUVECs wurden 16h mit Lovastatin (1  $\mu$ M) vorbehandelt und anschließend mit Doxorubicin (5  $\mu$ g/ml) für 1h behandelt.

A: Nach Doxorubicin-Behandlung wurde die Menge an Doxorubicin in den HUVECs mittels FACS Analyse gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus drei Versuchen (n=3).

B: Die Messung des Efflux von Doxorubicin aus der Zelle erfolgte mittels FACS Analyse nach 1h und nach 3h Doxorubicin-Behandlung. Die Fluoreszenz der unbehandelten Zellen wurde gleich 1 gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (n=3).

C,D: Es wurde mRNA von HUVECs nach 16h Lovastatin (1  $\mu$ M) Vorbehandlung und 1h Doxorubicin-Behandlung (5  $\mu$ g/ml) isoliert und eine Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) mit *mdr-1* (C) und *mrp-1* spezifische (D) Primern durchgeführt. Die Expression der GAPDH mRNA diente als Kontrolle.

## 4 Diskussion

### 4.1 DNA-schadensabhängige Aktivierung der SAPK/JNK

Stress-aktivierte Protein-Kinasen/c-Jun-N-terminale Kinasen (SAPK/JNK) regulieren nach genotoxischem Stress eine Vielzahl von Zielsubstraten die bedeutsam für Reparatur und Überleben der Zelle sind, somit nehmen sie Einfluss auf das zelluläre Schicksal der Zelle. Die Auswirkungen einer SAPK/JNK Aktivierung sind für die Zelle vielfältig. Die Aktivierung der SAPK/JNK kann sowohl zu pro-apoptotischen Signalen (Brozovic et al., 2004; Mansouri et al., 2003; Sanchez-Perez et al., 2000; Sanchez-Perez et al., 1998) als auch zu anti-apoptotischen führen (Hayakawa et al., 2003; Levrresse et al., 2002). Das zelluläre System sowie Signalstärke und Dauer der SAPK/JNK Aktivierung entscheiden offensichtlich über Tod oder Überleben der Zelle. Bei der Induktion von Stress-Kinasen durch Genotoxine können vermutlich zwei Wege unterschieden werden: I) der rezeptorvermittelte Weg und II) ein DNA-schadensabhängiger Weg. Die rezeptorvermittelte Aktivierung verläuft über kleine GTPasen und MEK-Kinasen. Dieser vielfach beschriebene Weg ist ein frühes Ereignis der zellulären Stress-Antwort (Canman & Kastan, 1996; Davis, 1994; Gnad et al., 2000). Dahingegen ist eine DNA-schadensabhängige Aktivierung der SAPK/JNK weniger gut charakterisiert und stellt vermutlich eine späte Reaktion der Zelle auf genotoxischen Stress dar (Brozovic et al., 2004; Bulmer et al., 2005; Fritz & Kaina, 2006; Mansouri et al., 2003).

#### 4.1.1 UV-C-induzierte Aktivierung von Stress-Kinasen in DNA-Reparatur-defizienten Zellen

Die ATM-Kinase ist an der Erkennung von Doppelstrangbrüchen beteiligt und reguliert durch Aktivierung der Checkpoint Kinasen und p53 den Zellzyklusarrest (Shiloh, 2003). UV-C induzierte DNA-Läsionen, vor allem die Hauptläsion CPD, führen über die Stabilisierung von p53 zu Störungen der Zellzyklusprogression. Die Replikation der läsionstragenden-DNA führt zur Entstehung von DNA-Strangbrüchen in der Zelle (Dunkern, Fritz & Kaina, 2001; Dunkern & Kaina, 2002; Kaina, 1985; Kaina, 1989). ATM<sup>-/-</sup> Zellen zeigten eine im Vergleich zu ihren WT Zellen verstärkte späte (16h-24h) UV-induzierte Aktivierung der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase. Demnach sind zum einen DNA-Schäden an der UV-C-induzierten SAPK/JNK Phosphorylierung beteiligt und zum anderen möglicherweise DNA-

Doppelstrangbrüche oder ein Replikationsblock ursächlich für die Phosphorylierung dieser Kinasen zu späten Zeitpunkten nach Exposition (Abb. 61). Weiterhin könnte die Tyrosinkinase c-Abl bei der späten, anhaltenden SAPK/JNK Phosphorylierung in ATM<sup>-/-</sup> Zellen involviert sein. c-Abl ist eine Tyrosinkinase die nach DNA-Schädigung durch ATM und DNA-PKcs aktiviert wird (Baskaran et al., 1997; Kharbanda et al., 1997; Yuan et al., 1996). Sie entscheidet nach DNA-Schädigung, insbesondere nach DNA-Strangbrüchen, über Überleben oder Tod der Zelle durch Einflussnahme auf die Stabilisierung von p53 (Kharbanda et al., 1998). Nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien konnte in unterschiedlichen Zellen eine Beteiligung von c-Abl an der Phosphorylierung der SAPK/JNK nachgewiesen werden (Kharbanda et al., 1995a; Kharbanda et al., 2000; Kharbanda et al., 1995b; Nehme et al., 1997; Nehme et al., 1999; Pandey et al., 1996). Es ist anzunehmen, dass in ATM<sup>-/-</sup> Zellen die Aktivierung von c-Abl ausschließlich durch die DNA-PKcs erfolgt. Die in ATM<sup>-/-</sup> Zellen nach UV-Exposition vermehrt aufgetretenen DNA-Strangbrüche fördern möglicherweise eine DNA-PKcs-induzierte Aktivierung der c-Abl Kinase, wodurch es nachfolgend zu einer anhaltenden SAPK/JNK Phosphorylierung kommt.

Ein weiteres Protein, welches in ATM<sup>-/-</sup> Zellen die Aktivität der SAPK/JNK kontrollieren könnte, ist die Mitogen-aktivierte-Phosphatase-5 (MKP-5). MKP-5 dephosphoryliert nach verschiedenen genotoxischen Stimuli ATM-abhängig die SAPK/JNK (Bar-Shira et al., 2002). In ATM<sup>-/-</sup> Zellen ist möglicherweise die Dephosphorylierung der Stress-Kinasen gestört, was zu der beobachteten andauernden SAPK/JNK Induktion führen könnte. Ähnliche Befunde erhielt man für die Mitogen-aktivierte-Phosphatase-1 (MKP-1). Die durch UV-C-Strahlung entstandenen CPDs erhöhen die SAPK/JNK Phosphorylierung, indem sie die Expression der MKP-1 hemmen (Hamdi et al., 2005). MKP-1 wird ähnlich wie MKP-5 nach genotoxischem Stress aktiviert und dephosphoryliert durch seine duale Spezifität die SAPK/JNK, sowie die p38 MAP-Kinase (Gupta et al., 1996). Unsere Untersuchungen hinsichtlich der MKP-1 Expression in ATM-defizienten und profizienten Zellen 24h nach UV-C-Strahlung konnten allerdings keine klare Beteiligung der MKP-1 an der Dephosphorylierung der SAPK/JNK nachweisen (nicht gezeigte Daten).

Ein weiteres wichtiges Substrat der ATM-Kinase ist der Transkriptionsfaktor p53. p53 wird durch zellulären Stress stabilisiert und spielt eine entscheidende Rolle bei der Stressantwort der Zelle. Eine p53-abhängige Aktivierung der SAPK/JNK konnten wir

durch Versuche mit p53<sup>-/-</sup> Zellen ausschließen, da diese Zellen nach UV-C-Bestrahlung im Vergleich zu ihren Wildtyp-Zellen keine unterschiedliche Phosphorylierung der SAPK/JNK aufwiesen. Unsere Beobachtung wurden darüberhinaus durch vergleichende Untersuchungen von SV-40 immortalisierten humanen Fibroblasten, was den funktionellen Verlust von p53 zur Folge hat und p53 wildtypischen hinsichtlich der UV-C-induzierten SAPK/JNK Aktivierung bestätigt (Hamdi et al., 2005).

Die Untersuchungen der NER-defizienten Zelllinie XPA, in der es aufgrund von Defekten in der Reparatur von UV-C Läsionen zu persistierenden DNA-Schäden kommt (Furuta et al., 2002), machten deutlich, dass verbleibenden CPDs in den XPA-defizienten Zellen bereits nach 24h zytotoxisch für die Zellen sind. Dies konnte anhand einer verminderten Vitalität der XPA-defizienten Zellen nach UV-C-Exposition gezeigt werden. Weiterhin induzierte UV-C-Strahlung in XPA-defizienten Zellen im Vergleich zu XPA-profizienten Zellen eine späte SAPK/JNK Aktivierung. Dieser Befund ist ein weiterer Beleg für eine späte DNA-schadensabhängige Aktivierung der SAPK/JNK. In XPA-defizienten Zellen wird die Phosphorylierung der SAPK/JNK möglicherweise durch einen auftretenden Replikationsblock oder DNA-Strangbrüche, die durch nicht reparierten persistierenden CPDs ausgelöst werden, verstärkt (Abb. 61). Aufgrund von Berichten, dass geringe Dosen UV-C-Strahlung in XPA-defizienten Zellen eine andauernde SAPK/JNK Phosphorylierung auslösen, die mit einer reduzierten MKP-1 Expression einhergeht (Hamdi et al., 2005), untersuchten wir in XPA-defizienten und profizienten Zellen die MKP-1 Expression. Unter unseren Versuchsbedingungen waren keine Veränderungen in der MKP-1 Expression detektierbar (nicht gezeigte Daten). In XPA-defizienten Zellen könnte die beobachtete Abnahme der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase Phosphorylierung nach UV-C-Exposition durch Verwendung von Dosen ab 20 J/m<sup>2</sup> zu einer Dephosphorylierung dieser Kinasen führen, wohingegen geringere Konzentrationen (bis 10 J/m<sup>2</sup>) eine anhaltende Phosphorylierung der SAPK/JNK bewirkten. Die zeitliche Korrelation der SAPK/JNK Phosphorylierung mit derjenigen von der SEK1 in XPA-profizienten und defizienten Zellen deutete daraufhin, dass die späte offensichtlich DNA-schadensabhängige SAPK/JNK Induktion, ebenso wie die frühe rezeptorvermittelte SAPK/JNK ebenfalls über SEK1 verläuft (Abb. 62) (Moriguchi et al., 1997).

Es wurde gezeigt, dass UV-C-Strahlung zu einer ATR-vermittelten SAPK/JNK Aktivierung führt (Zhang et al., 2002). In ATM<sup>-/-</sup> Zellen könnte dies ein möglicher

Faktor bei der SAPK/JNK Phosphorylierung sein. Es wäre denkbar, dass eine ATR- ausgelöste Checkpoint-Aktivierung (Paulsen & Cimprich, 2007) in den reparaturdefizienten Zellen einen verstärkten Zellzyklusarrest verursacht, welcher wiederum zu weiteren Schadenssignalen in den Zellen führt und Einfluss auf die Phosphorylierung der Stress-Kinasen nehmen kann. Eine ATR-abhängige Aktivierung der SAPK/JNK ist in XPA-defizienten Zellen unwahrscheinlich, da gezeigt werden konnte, dass UV-C-induziertes ATR-Signalling in diesen Zellen beeinträchtigt ist (Bomgarden et al., 2006). Demnach scheinen in XPA-defizienten Zellen andere Mechanismen Einfluss auf die späte Phosphorylierung der Stress-Kinasen zu nehmen.

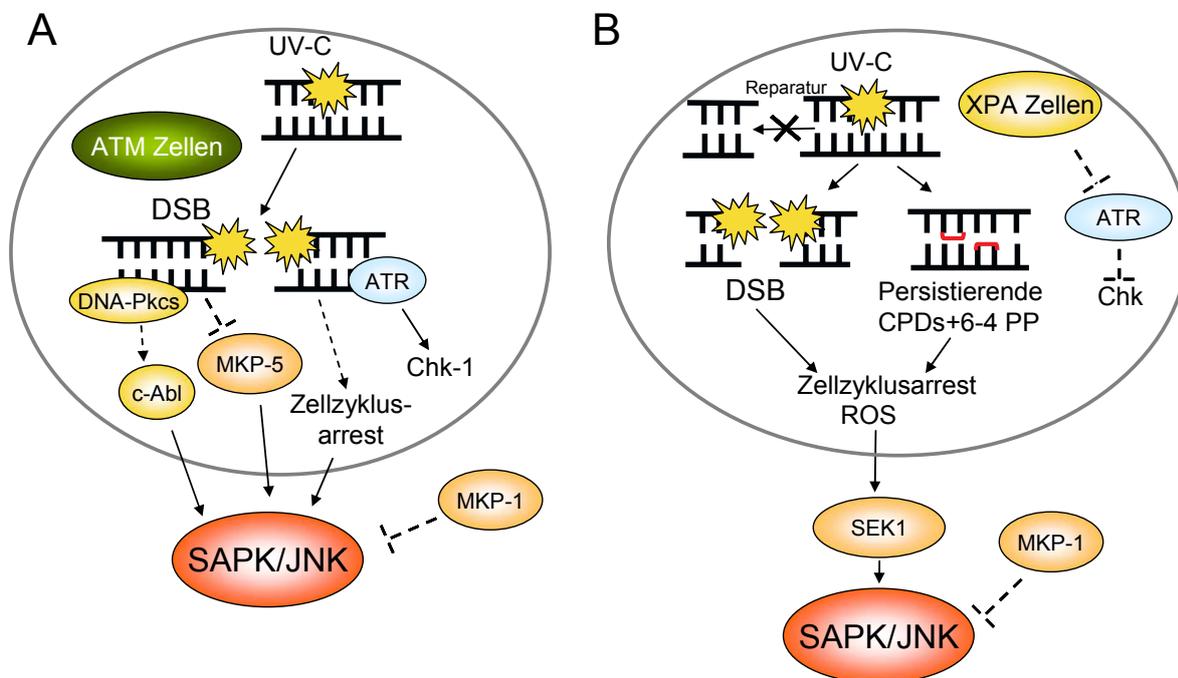
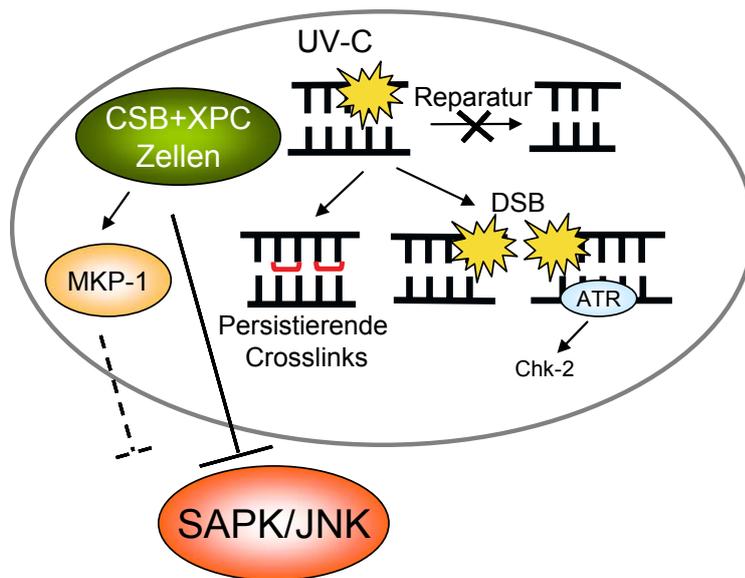


Abbildung 61: UV-C-induzierte SAPK/JNK Aktivierung in  $ATM^{-/-}$  und XPA-defizienten Zellen.

Die Untersuchungen der NER-defizienten Zelllinien CSB und XPC zeigten eine reduzierte UV-C-induzierte SAPK/JNK Aktivierung zu frühen und späten Zeiten. In Übereinstimmung mit unseren Befunden konnten Dhar und Kollegen in CSB Zellen ebenfalls eine verminderte SAPK/JNK Phosphorylierung nach UV-C-Strahlung beobachten (Dhar et al., 1996). Offensichtlich ist in Abwesenheit des CSB bzw. XPC Proteins die Weiterleitung von DNA-Schäden-induzierten Signalen zu den Stress-Kinasen gestört (Abb. 63). Diese Proteine scheinen in den wildtypischen Zellen an der SAPK/JNK Phosphorylierung direkt oder indirekt beteiligt zu sein.

Obwohl der Aktivierungsstatus der SAPK/JNK in CSB Zellen im Vergleich zu WT Zellen erniedrigt war, wies die DNA der reparaturdefizienten Zellen mehr Doppelstrangbrüche und die Zellen dementsprechend eine erhöhte Chk2-Phosphorylierung auf (Abb. 62). Es ist möglicherweise die Qualität des DNA-Schadens welche für die Aktivierung der SAPK/JNK ausschlaggebend ist und nicht ausschließlich die Menge an DNA-Schäden. Diese Annahme geht mit Berichten einher, bei denen gezeigt werden konnte, dass die Art der DNA-Läsion entscheidend für die Aktivierung von Stress-induzierten Signalen ist (Strozyk et al., 2006).



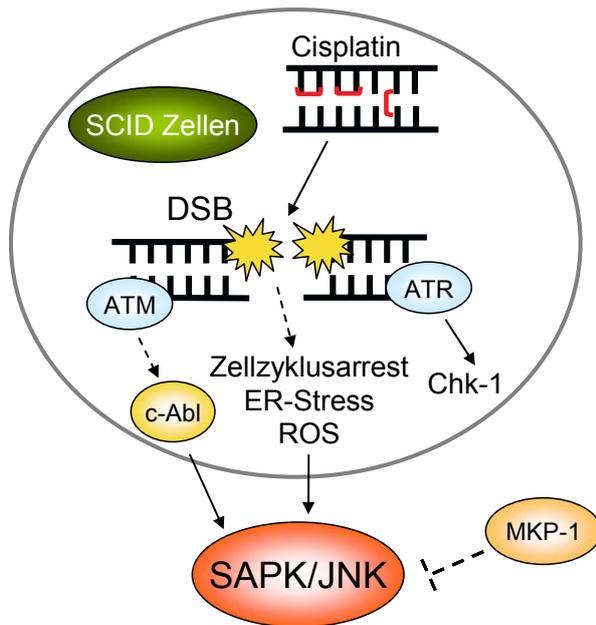
**Abbildung 62: Modell der UV-C-induzierten SAPK/JNK Aktivierung in CSB und XPC Zellen.**

Es gibt Hinweise auf weitere UV-C-induzierte Proteine, welche an der Aktivierung der SAPK/JNK nach DNA-Schädigung beteiligt zu sein scheinen. Die nukleäre Komponenten Daxx und RASSF1C (Ras-assoziierte Domänen Familie 1C) die aneinander gebunden vorliegen, dissoziieren nach DNA-Schädigung. Es kommt zu einer Degradation von Daxx, was RASSF1C zu einer Translokation in das Cytoplasma veranlasst. Dadurch wird eine Beteiligung von RASSF1C an der Aktivierung der SAPK/JNK ermöglicht (Khelifi, D'Alcontres & Salomoni, 2005; Kitagawa et al., 2006). si-RNA Experimente konnten weiterhin zeigen, dass „silencing“ von Daxx zu einer reduzierten MMS-induzierten SAPK/JNK Aktivierung führt (Kitagawa et al., 2006).

#### 4.1.2 Cisplatin-und Transplatin induzierte Aktivierung von Stress-Kinasen

Cisplatin-Läsionen führen in DNA-PKcs-defizienten Zellen zu einer frühen und späten Aktivierung der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase. Diese Läsionen können durch Hemmung der Replikation und Transkription sekundäre DNA-Schäden in Form von DNA-Doppelstrangbrüchen verursachen (Roos, 2006). Da DNA-PKcs an der Erkennung und Prozessierung von Doppelstrangbrüchen beteiligt ist, können diese Läsionen in SCID Zellen nicht korrekt repariert werden. Das Auftreten von erhöhten Mengen an Cisplatin-induzierten DNA-Strangbrüchen, gemessen anhand der H2AX-Phosphorylierung ( $\gamma$ -H2AX), welches mit einer verstärkten SAPK/JNK Aktivierung einhergeht, steht im Einklang mit dieser Annahme. Die H2AX-Phosphorylierung ist eine anerkannte Nachweismethode für DNA-Strangbrüche (Rogakou et al., 1998). Die spät auftretenden DNA-Strangbrüche und die späte Cisplatin-induzierte SAPK/JNK Phosphorylierung deuten demnach stark auf eine Beteiligung von DNA-Schäden an der Aktivierung von Stress-Kinasen hin (Abb. 63). Allerdings ist die Cisplatin-induzierte DNA-Platinierung, sowie die Menge an gebildeten Intrastrand-Crosslinks in SCID Zellen im Vergleich zu WT Zellen nicht erhöht. Die Formierung von DNA-Strangbrüchen in SCID Zellen ist demnach nicht durch verstärkte initiale DNA-Schäden zu begründen, sondern vermutlich durch die Folgen der DNA-Reparaturdefizienz dieser Zellen verursacht. Obwohl die DNA-PKcs p53 stabilisiert und dies zu seiner Aktivierung führt, hat die eingeschränkte Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors in SCID Zellen anscheinend keinen Einfluss auf die erhöhte SAPK/JNK Phosphorylierung. Diese Annahme beruht auf unseren Beobachtungen, dass es in p53<sup>-/-</sup> Zellen zu einer mit den WT Zellen vergleichbaren späten Cisplatin-induzierten SAPK/JNK Phosphorylierung kommt.

ER-Stress kann ein weiterer Faktor bei der Aktivierung der SAPK/JNK sein. Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) ist eine Mitogen-aktivierte-Protein Kinase (MAPK) die auch in Folge von ER-Stress aktiviert wird und die SAPK/JNK und die p38 MAP-Kinase phosphorylieren kann (Nagai et al., 2007). Diese Stress-Kinasen bewirken nach Kerntranslokation eine Induktion des Transkriptionsfaktors CHOP (Xu et al., 2005), welcher somit als Indikator für ER-Stress dienen kann. Wir konnten eine erhöhte Cisplatin-induzierte CHOP Expression in SCID Zellen beobachten. Somit kann für DNA-PKcs-defiziente Zellen eine Beteiligung von ER-Stress an der späten SAPK/JNK Aktivierung nicht ausgeschlossen werden.



**Abbildung 63: Cisplatin-induzierte Aktivierung von SAPK/JNK in DNA-PKcs-defizienten Zellen.**

NER-defiziente Zellen, wie CSB und XPA Zellen, können Cisplatin-Läsionen nicht erkennen und prozessieren. Es kommt daher zu einer Akkumulation des initialen DNA-Schadens, sowie von daraus resultierenden sekundären Läsion. Die Untersuchungen der CSB und XPA Zellen ergaben, dass diese Zellen eine im Vergleich zu WT Zellen erhöhte späte Cisplatin-induzierte SAPK/JNK Phosphorylierung aufzeigen.

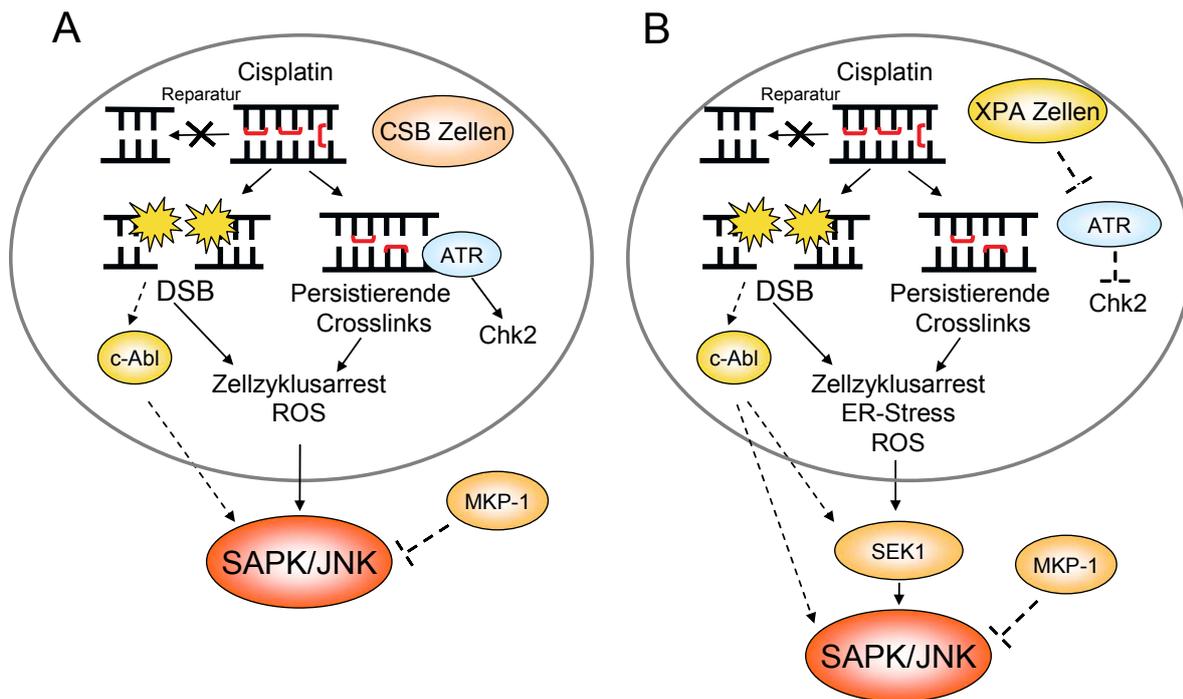
Die in den CSB Zellen erhaltenen Ergebnisse ließen sich durch siRNA Experimente bestätigen. Der „Knock-down“ des CSB Proteins in primären humanen Fibroblasten verursachte ebenfalls eine Verstärkung der Cisplatin-induzierten SAPK/JNK Phosphorylierung. Durch siRNA Analysen konnten mögliche klonale Effekte bei den verwendeten Zelllinien ausgeschlossen werden und unsere Ergebnisse in einem der *in vivo* Situation weitaus näheren primären Zellsystem bestätigt werden.

Die Annahme, dass durch Cisplatin verursachte sekundäre Läsionen in CSB und XPA Zellen zu persistierenden Strangbrüchen führen, die maßgeblich an der Phosphorylierung der SAPK/JNK involviert sein können, wurde durch den Nachweis von DNA-Strangbrüchen bestätigt. Cisplatin-Behandlung führte in CSB und XPA Zellen nach 24h zu einer erhöhten Menge an  $\gamma$ -H2AX-Foci, bzw. in XPA Zellen zu Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen, die mittels Comet Analyse bestimmt wurden. Demnach besteht in beiden NER-defizienten Zellen ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von späten DNA-Läsionen und der späten SAPK/JNK

Phosphorylierung (Abb. 64). Unsere Beobachtungen werden durch Befunde von Bulmer et al. unterstützt. Diese Arbeitsgruppe konnte ebenfalls eine anhaltende Aktivierung der SAPK/JNK in CSB und XPA-defizienten Zellen nach Cisplatin-Exposition beobachten (Bulmer et al., 2005).

Die erhöhte Menge an DNA-Strangbrüchen in XPA und CSB Zellen ist nicht auf vermehrte initiale DNA-Schäden zurückzuführen, keine Unterschiede zwischen Reparaturmutante und WT Zellen hinsichtlich der Menge an gebildeten Intrastrand-Crosslinks bzw. der initialen DNA-Platinierung beobachtet wurden. Allerdings konnte in CSB Zellen im Gegensatz zu ihren WT Zellen eine späte Cisplatin-induzierte Phosphorylierung der Checkpoint Kinase 2 (Chk2) nachgewiesen werden. Chks sind Teil des DNA-schadensabhängigen Signalweges und regulieren den Zellzyklusarrest (Martinho et al., 1998; Pabla et al., 2008). Die in CSB Zellen beobachtete erhöhte Chk2 Phosphorylierung macht deutlich, dass in diesen Zellen ein Zellzyklusarrest initiiert wurde und dies möglicherweise weiteren Einfluss auf Stress-Signale in der Zelle nimmt. XPA-defiziente Zellen zeigten eine reduzierte Chk1-Aktivität, obwohl erhöhte Strangbrüche und eine verstärkte SAPK/JNK Phosphorylierung in diesen Zellen nachgewiesen wurden (Abb. 64). Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnten die Beobachtung sein, dass Rad14, ein Hefe-homolog zu dem humanen XPA Protein, an der Aktivierung der Checkpoint Kinasen nachweislich beteiligt ist (Giannattasio et al., 2004). In XPA-defizienten Zellen könnte somit eine verminderte Chk-Phosphorylierung erwartet werden, wodurch unser Befund bestätigt wird. Zudem korrelierte in XPA-defizienten Zellen die SAPK/JNK Phosphorylierung mit derjenigen der SEK1. Demnach scheint die Cisplatin-induzierte DNA-schadensabhängige SAPK/JNK Aktivierung SEK1-vermittelt zu verlaufen.

Die Beobachtungen, dass Cisplatin die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) auslöst und dies ebenfalls zu einer Aktivierung der SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase führen kann (Adler et al., 1999), bringt einen weiteren möglichen Einflussfaktor bei der Stimulation von Stress-Kinasen ins Spiel. In Übereinstimmung hiermit, wurde weiterhin berichtet, dass Vorbehandlung von Zellen mit Antioxidantien die Cisplatin-induzierte SAPK/JNK und p38 MAP-Kinase Phosphorylierung hemmen kann (Benhar et al., 2001). Es ist daher denkbar, dass auch in unserem zellulären System eine zu späten Zeiten nach Exposition erfolgte Generierung von ROS an der SAPK/JNK Aktivierung beteiligt ist.



**Abbildung 64: Cisplatin-induzierte Aktivierung der SAPK/JNK in CSB- und XPA-defizienten Zellen.**

In ATR-defizienten Zellen kommt es nach Cisplatin-Behandlung zu einer reduzierten p53-Aktivierung und folglich zu einer reduzierten Chk1 und Chk2 Phosphorylierung (Pabla et al., 2008). Dieser Befund lässt vermuten, dass eine SAPK/JNK Aktivierung nach Cisplatin-Exposition ebenfalls durch ATR-vermittelte Signalwege induziert werden könnte. Weiterhin zeigen unsere Untersuchungen, dass ATM bei der Cisplatin-induzierten SAPK/JNK Aktivierung nicht beteiligt ist.  $ATM^{-/-}$  Zellen weisen nach Cisplatin-Behandlung im Vergleich zu WT Zellen keinen veränderten Aktivierungsstatus der SAPK/JNK auf.

Nach Transplatin-Behandlung konnte in den NER-defizienten Zelllinien XPA und CSB, sowie in  $ATM^{-/-}$  und DNA-PKcs-defizienten Zellen ebenfalls eine späte SAPK/JNK Aktivierung beobachtet werden (Abb. 65). Untersuchungen der durch Transplatin-verursachten sekundären DNA-Schäden, d.h. DSBs, machen deutlich, dass eine erhöhte DSB Rate nicht notwendigerweise mit einer späten SAPK/JNK Aktivierung einhergeht. XPA- und CSB-defiziente Zellen wiesen mehr Doppelstrangbrüche als ihre WT Zellen auf. Demgegenüber verursachte Transplatin-Behandlung in DNA-PKcs-defizienten Zellen im Vergleich zu WT Zellen nach 24h eine geringere Anzahl an DSBs. Offenbar führt die Abwesenheit der DNA-PKcs trotz einer Reduktion der Transplatin-induzierten DSBs zu einer leicht verstärkten

SAPK/JNK Phosphorylierung. Die molekularen Mechanismen sind hierfür noch unklar.

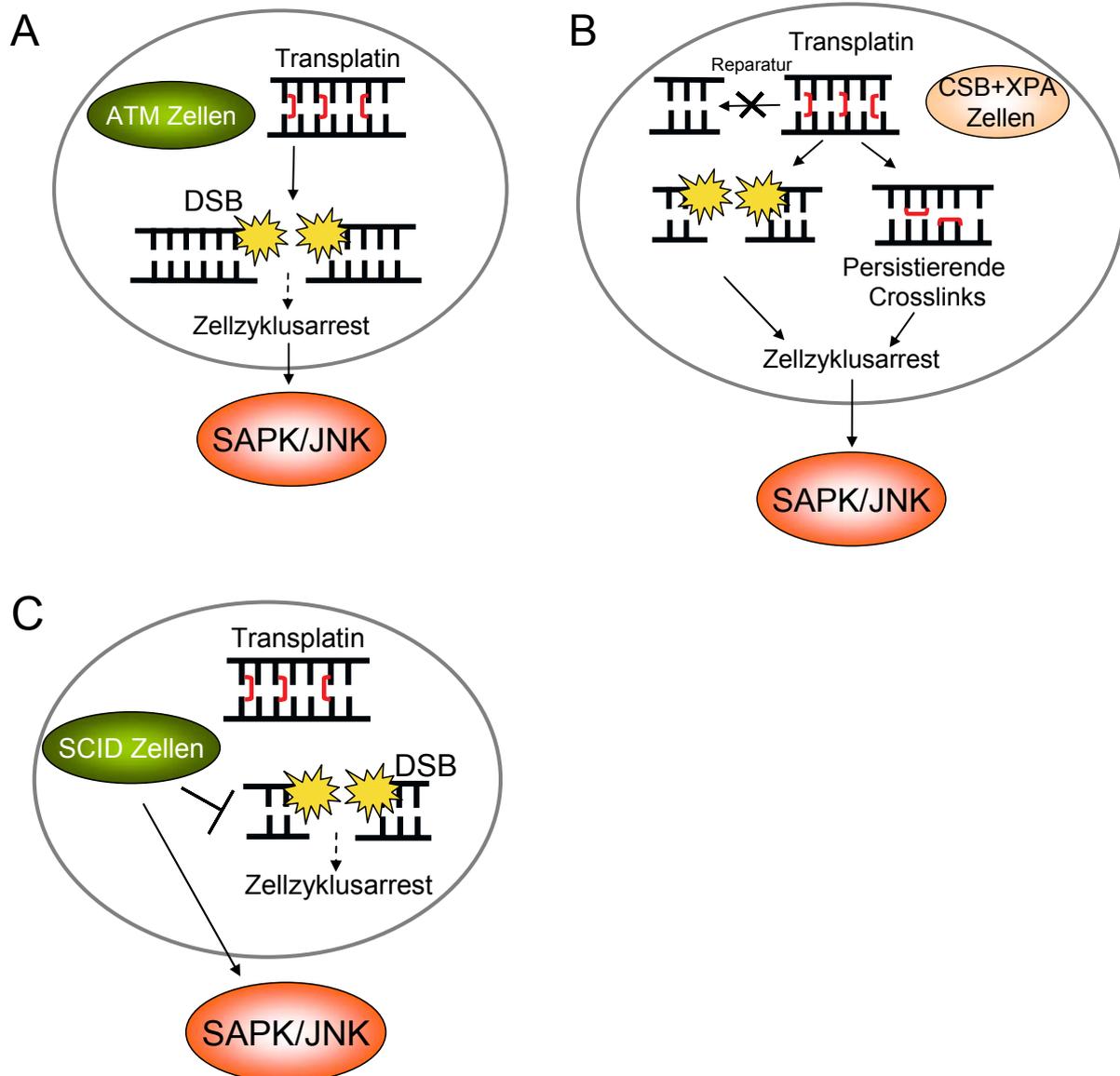


Abbildung 65: Transplatin-induzierte SAPK/JNK Aktivierung in  $ATM^{-/-}$  (A), CSB bzw. XPA Zellen (B) und DNA-PKcs-defizienten Zellen (C).

Unsere Befunde stehen im scheinbaren Widerspruch zu Berichten, dass Transplatin im Vergleich zu Cisplatin lediglich ein schwacher Aktivator von Stress-Kinasen sei (Hayakawa et al., 2003; Losa et al., 2003; Persons et al., 1999; Potapova et al., 1997; Sanchez-Perez et al., 2000). Wir konnten zeigen, dass in DNA-reparaturdefizienten Zellen bei Verwendung von äquitoxischen Konzentrationen mit Cisplatin, Transplatin eine vergleichbare Aktivierung der SAPK/JNK verursacht. In wildtypischen Mausfibroblasten hingegen sind Transplatin-Addukte bei der Aktivierung von SAPK/JNK weitaus weniger potent als Cisplatin. In der Mehrzahl der

Publikationen zu Transplatin wurden jedoch äquimolare Konzentrationen von Cisplatin und Transplatin verwendet. Aufgrund der erwähnten Unterschiede in der zytotoxischen Wirksamkeit beider Platinverbindungen sind zur äquitoxischen Behandlung von Zellen allerdings sehr viel höhere Konzentrationen Transplatins notwendig.

Die Verwendung von Transplatin sollte Hinweise auf den für die SAPK/JNK Aktivierung bedeutsameren Crosslink liefern. Während Cisplatin sowohl Intra-, als auch Interstrand-Crosslinks bildet, führt Transplatin ausschließlich zur Ausbildung von Interstrand-Crosslinks. Eine Aktivierung von Stress-Kinasen in reparaturdefizienten Zellen lediglich durch Cisplatin und nicht durch Transplatin wäre somit wahrscheinlich auf DNA-Intrastrand-Crosslinks zurückzuführen. Im Gegensatz dazu würde eine Aktivierung der SAPK/JNK sowohl durch Cisplatin als auch Transplatin bedeuten, dass der Interstrand-Crosslink hauptverantwortlich für das DNA-Schadenserkennungs-Signal zu den Stress-Kinasen ist. Unsere Untersuchungen ergaben, dass sowohl Cisplatin als auch Transplatin in CSB, XPA und SCID Zellen zu einer späten SAPK/JNK Aktivierung führen. Demnach könnte der Interstrand-Crosslink als hauptverantwortliche Läsion bei der Phosphorylierung der Stress-Kinasen angesehen werden.  $ATM^{-/-}$  Zellen jedoch zeigten im Vergleich zu WT Zellen keinerlei Unterschiede in der Cisplatin-induzierten Aktivierung der SAPK/JNK, aber Unterschiede in der Transplatin-induzierten Aktivierung. Da CSB, XPA und DNA-PKcs Zellen jeweils eine Induktion der SAPK/JNK sowohl durch Cisplatin-, als auch durch Transplatin-Behandlung zeigten, scheinen sich nur  $ATM^{-/-}$  Zellen hierbei abweichend zu verhalten. Möglicherweise führen in  $ATM^{-/-}$  Zellen Transplatin-Läsionen nicht ausschließlich durch Interstrand-Crosslinks zu einer SAPK/JNK Phosphorylierung, sondern beeinflussen diese auch über andere Mechanismen.

Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungen der reparaturdefizienten Zelllinien, dass die Aktivierung der Stress-Kinasen stark agenzspezifisch und von verschiedenen Reparaturfaktoren abhängig ist.

#### 4.1.3 Einfluss der DNA-Replikation auf die Cisplatin-induzierte SAPK/JNK Aktivierung

Ein durch eine DNA-Läsionen ausgelöster Replikationsblock kann möglicherweise Einfluss auf die Phosphorylierung der Stress-Kinasen nehmen (Fritz & Kaina, 2006)(unpublizierte Daten). Diese Hypothese wurde durch Untersuchungen an

proliferierenden und arretierten Zellen bestätigt. Konfluente primäre humane Fibroblasten waren nach Cisplatin-Exposition in ihrer SAPK/JNK Aktivierung beeinträchtigt, während proliferierende Zellen eine deutliche Phosphorylierung der Stress-Kinasen zeigten. Auch unstimulierte periphere Blutlymphozyten (PBLCs) wiesen nach Cisplatin-Behandlung keinerlei SAPK/JNK Phosphorylierung auf. Durch Zytokingabe stimulierte, d.h. proliferierende PBLCs hingegen zeigten eine klare Aktivierung dieser Kinasen. Im Gegensatz zur SAPK/JNK wurde die p38 MAP-Kinase jedoch sowohl in proliferierenden als auch in arretierten PBLCs aktiviert. Demnach scheint die Aktivierung der p38 MAP-Kinase sich von der der SAPK/JNK zu unterscheiden. Aufgrund von Berichten, dass ATR für den Genotoxin-induzierten S-Phase-Checkpoint notwendig ist, kann eine Beteiligung der ATR an der Aktivierung der SAPK/JNK in Betracht gezogen werden (Heffernan et al., 2002; Petermann & Caldecott, 2006). Es ist denkbar, dass in nicht replizierenden Zellen eine Aktivierung der ATR nicht erfolgen kann und somit keine SAPK/JNK Phosphorylierung nach Cisplatin-Exposition stattfindet. ATR könnte dabei ein an der Genotoxin-induzierten SAPK/JNK Aktivierung beteiligter Faktor sein. Der in den reparaturdefizienten Zellen aufgetretene Replikationsblock könnte ATR-abhängig einen Einfluss auf die SAPK/JNK Aktivierung nehmen.

#### 4.1.4 Läsionspezifische Aktivierung von Stress-Kinasen

Die Behandlung von Zellen mit den unterschiedlichen DNA-Crosslinkern Cisplatin und Transplatin ermöglichte es, Intrastrand- und Interstrand-Crosslinks hinsichtlich ihres Potentials zur SAPK/JNK Aktivierung zu unterscheiden.

Die Analyse von Cisplatin und Transplatin behandelten BALB/c Mausfibroblasten zeigten, dass eine Korrelation zwischen der durch Cisplatin-induzierten DNA-Adduktmenge und der SAPK/JNK Phosphorylierung besteht. Cisplatin-Addukte waren in wildtypischen Mausfibroblasten nach 24h wesentlich potentere Aktivatoren der SAPK/JNK als Transplatin-Addukte. Diese Befunde können durch eine unterschiedliche Umwandlung der primären Addukte von Cisplatin und Transplatin und der daraus resultierenden geringeren Zytotoxizität, erklärt werden. Cisplatin schädigt die DNA hauptsächlich durch nukleophile Bindung an zwei Pyrimidinbasen desselben DNA-Stranges (Intrastrand-Crosslinks) oder mit einem weit geringeren Anteil durch Bindung von zwei Basen auf gegenüberliegenden DNA-Strängen (Interstrand-Crosslinks) (Jamieson & Lippard, 1999). Das Isomer Transplatin löst

ausschließlich Interstrand-Crosslinks in der DNA aus und weist dabei wesentlich geringere toxische Eigenschaften auf als Cisplatin (Jamieson & Lippard, 1999; Wozniak, 2002). Es wird daher angenommen, dass der Intrastrand-Crosslink des Cisplatins die haupttoxische Läsion für die Zelle ist. Die Toxizität des Intrastrand-Crosslinks wird auf Hemmung der Replikation- bzw. Transkription zurückgeführt (Cepeda et al., 2007; Fuertesa et al., 2003). Die Monoaddukte von Cisplatin und Transplatin reagieren mit Glutathion und schwefelhaltigen-Nukleophilen (Eastman & Barry, 1987). Durch die längere Präsenz des Transplatin-Monoadduktes ( $t_{1/2} > 17\text{h}$ ) könnte eine Ausbildung von Interstrand-Crosslinks durch Glutathion somit effektiver gehemmt werden (Fichtinger-Schepman et al., 1985; Hoffmann, Johnson & Villani, 1989; Jamieson & Lippard, 1999). Monoaddukte des Cisplatins sind weniger reaktiv mit Glutathion. Untersuchungen an grünen Affen CV-1 Zellen zeigten, dass auch Transplatin die Replikation der DNA inhibieren kann. Allerdings sind vierzehnfach höhere Dosen des Transplatins notwendig, um die DNA in gleichem Maß zu inhibieren, wie Cisplatin (Cicarelli et al., 1985). In NER-defizienten Zelllinien müssen vierfach höhere Dosen Transplatin verwendet werden, um die RNA-Synthese vergleichbar zu Cisplatin zu hemmen (Mymryk, Zaniewski & Archer, 1995). Mittels Transplatin-modifizierter Plasmide wurde gezeigt, dass Transplatin-DNA-Addukte in HeLa und 293 Zellextrakten schneller entfernt werden als Cisplatin-DNA-Addukte (Heiger-Bernays, Essigmann & Lippard, 1990). Untersuchungen in reparaturprofizienten und NER-defizienten E.coli Stämmen ergaben, dass Transplatin-Addukte über einen anderen Mechanismus als Cisplatin-Addukte entfernt und repariert werden (Popoff, Beck & Rupp, 1987). Es wird daher angenommen, dass die Reparatur von Transplatin-induzierten DNA-Schäden nicht ausschließlich über die NER erfolgt, sondern dass zusätzlich Crosslink-Reparaturmechanismen involviert sind. Schließlich konnten unsere Untersuchungen mit Cisplatin und Transplatin zeigen, dass Transplatin in wildtypischen Mausfibroblasten bei gleichen DNA-Addukt Mengen wie Cisplatin die SAPK/JNK schwächer phosphoryliert. Demgegenüber zeigten reparaturdefiziente Zellen, dass Transplatin bei zu Cisplatin äquivalenten Dosen die SAPK/JNK vergleichbar induzieren kann. Transplatin führt vermutlich in reparaturdefizienten Zellen vergleichbar zu Cisplatin über DNA-schadensabhängige Mechanismen zur Aktivierung der SAPK/JNK.

#### 4.1.5 Einfluss von Rho-GTPasen bei der DNA-schadensabhängigen und unabhängigen Aktivierung von SAPK/JNK

Um die rezeptorvermittelte Aktivierung der SAPK/JNK zu hemmen, wurden Lovastatin und Toxin B aus *Clostridium difficile* benutzt. Beide Substanzen hemmen die Aktivierung von Rho-GTPasen. Da eine Statin-Vorbehandlung die Cisplatin-induzierte SAPK/JNK Phosphorylierung reduzierte, liegt die Vermutung nahe, dass die frühe Aktivierung der Stress-Kinasen über Rho-GTPasen vermittelt wird. Die späte Phosphorylierung der SAPK/JNK wurde durch das Statin nicht beeinflusst. Dies ist vermutlich durch einen Wirkungsverlust des Statins zu begründen, da die der Statin-Vorbehandlung folgende 24-stündige Behandlung mit Cisplatin in Abwesenheit des HMG-CoA Reduktase Hemmers erfolgte. Berichten zu Folge können Multidrug-Transporter, wie Mdr-1, durch Statine beeinflusst werden (Wang et al., 2001). Multidrug-Transporter sind für die Verringerung der intrazellulären Konzentration von Chemotherapeutika durch Steigerung des Effluxes verantwortlich (Gottesman et al., 1996; Takara et al., 2006). Ein maßgeblicher Einfluss von Lovastatin auf die intrazelluläre Cisplatin-Konzentration konnte in unserem Zellsystem jedoch nicht nachgewiesen werden.

Toxin B hingegen hemmte die frühe wie auch die späte Cisplatin-induzierte SAPK/JNK Phosphorylierung. Diese Befunde bestätigen die nach Statin-Vorbehandlung beobachtete Hemmung der frühen Cisplatin-induzierten SAPK/JNK Phosphorylierung und zeigen, dass Rho-GTPasen auch an der späten Aktivierung der Stress-Kinasen beteiligt sind. Sie bekräftigen zudem die Vermutung, dass ein Wirkungsverlust des Statins Ursache für die unbeeinflusste späte SAPK/JNK Phosphorylierung sein könnte. Toxin B wie auch Lovastatin lösen in der Zelle morphologische Veränderungen (Zellabrundung) aus, die auf eine Störung der Rho-regulierten Organisation des Aktin-Zytoskelettes zurückzuführen ist. Um einen Einfluss der veränderten Zellmorphologie auf die SAPK/JNK Phosphorylierung auszuschließen, wurde Latrunculin B verwendet. Diese Substanz hemmt die Polymerisation von Aktinfilamenten ohne die Aktivität von Rho-GTPasen zu beeinflussen (Schatten et al., 1986; Spector et al., 1989; Spector et al., 1983). Behandlung der Zellen mit Latrunculin B hatte keinen Einfluss auf die Cisplatin-induzierte SAPK/JNK Aktivierung. Morphologische Veränderungen der Zellen, die durch Lovastatin sowie Toxin B verursacht wurden, führten somit nicht zur Reduktion der SAPK/JNK nach Cisplatin-Behandlung. Die Wirksamkeit von Statinen und

Toxin B ist auf Hemmung von Rho-Funktionen zurückzuführen die nicht mit der Regulation des Aktin-Zytoskeletts in Verbindung stehen. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass Rho-GTPasen die DNA-schadensunabhängige und die DNA-schadensabhängige Aktivierung der Stress-Kinasen modulieren können (Abb. 66). Möglich wäre eine Aktivierung von Rho-GTPasen durch DNA-Schäden oder ein Feedback Mechanismus, bei dem eine durch Stress-Kinasen induzierte Genexpression zu einer Aktivierung der GTPasen führt, welche die SAPK/JNK Phosphorylierung wiederum verstärkten (Abb. 66).

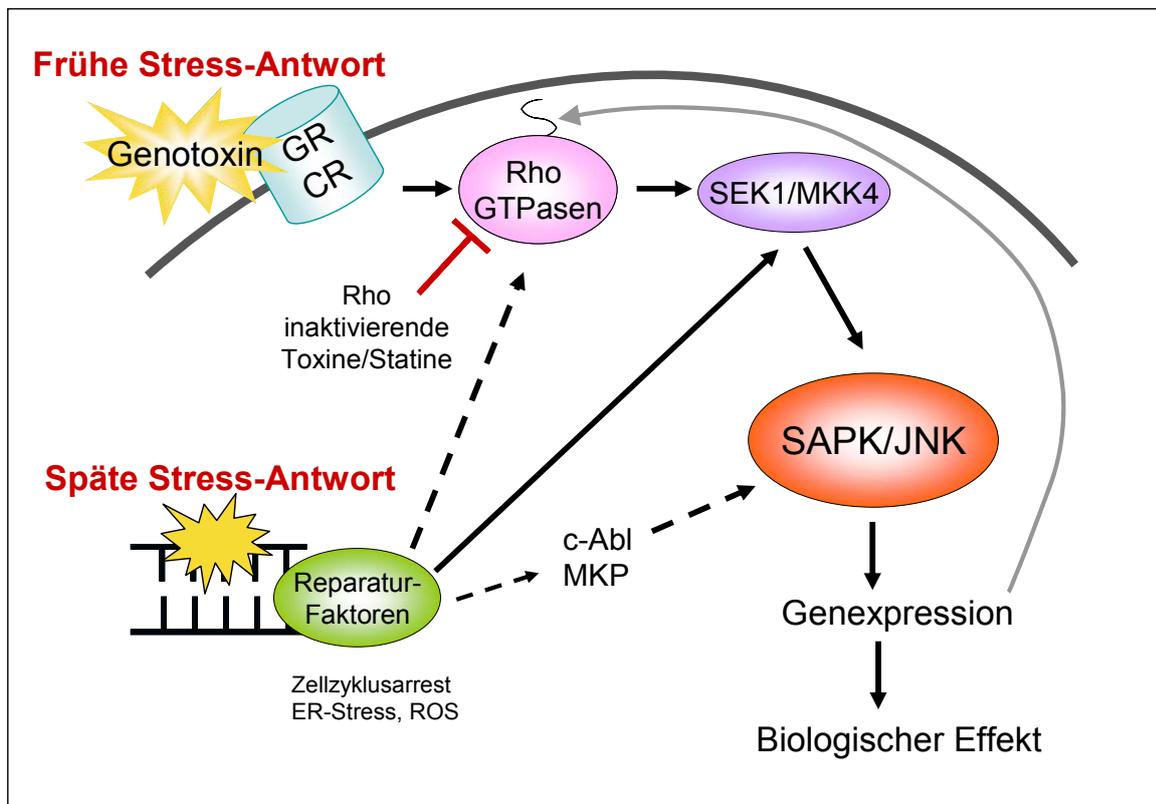


Abbildung 66: Modell der frühen und späten Aktivierung von Stress-Kinasen (SAPK/JNK) durch unterschiedliche Mechanismen.

#### 4.2 Lovastatin-vermittelte Protektion von HUVECs vor der zytotoxischen Wirkung von IR-Strahlung und Doxorubicin

Die Vorbehandlung mit Lovastatin schützte HUVECs vor der zytotoxischen Wirkung IR-Strahlung und Doxorubicin. Dies konnte anhand von Messungen der Zellvitalität und Apoptosefrequenz gezeigt werden. Statine werden aufgrund ihrer proapoptischen Wirkung auf Tumorzellen als Antitumor-Medikamente in Betracht gezogen (Cafforio et al., 2005; Dimitroulakos et al., 2001; Wong et al., 2001). Die Erforschung ihrer Auswirkungen auf verschiedene Zellsysteme ist daher von großer

Bedeutung (Graaf et al., 2004). Eine pro-apoptotische Wirkung von Statinen auf Endothelzellen wurde bei Gabe von hohen Dosen des Statins ( $>20 \mu\text{M}$ ) und bei einer Dauerbehandlung der Zellen beobachtet (Li et al., 2002b). In den von uns durchgeführten Versuchen wurden HUVECs ausschließlich mit physiologisch relevanten Dosen ( $1 \mu\text{M}$ ) für lediglich 16h vorbehandelt. Unter diesen Bedingungen wurde eine protektive Wirkung der Statine erzielt. Die Mechanismen die dieser Protektion zu Grunde liegen sind vermutlich auf pleiotrope Wirkungen der Statine auf eine Vielzahl Genotoxin-induzierbarer zellulärer Stress-Antworten zurückzuführen und unterscheiden sich zudem zwischen IR-Strahlung und Doxorubicin.

Für die Protektion der HUVECs vor IR-Strahlung und Doxorubicin scheint vor allem eine Reduktion der p53-Stabilisierung nach Exposition verantwortlich zu sein. p53 ist Teil des pro-apoptotischen Stress-Signallings (Caelles et al., 1994; Fields & Jang, 1990; Lee & Bernstein, 1993). Dieser Transkriptionsfaktor aktiviert zahlreiche an der Apoptose-Induktion beteiligten Proteine und fördert dadurch den programmierten Zelltod (Caelles et al., 1994; Fields & Jang, 1990; Lee & Bernstein, 1993). Die Beobachtung, dass Pifithrin- $\alpha$ , ein Inhibitor des p53-Proteins (Komarov et al., 1999), zu Erhöhung der Vitalität von IR-bestrahlten HUVECs führte, unterstützte diese Annahme. Die Statin-vermittelte Reduktion der durch IR- und Doxorubicin-induzierten Chk1-Kinase zeigt, dass Statine das Stress-Signaling in den Zellen hemmen. Chk1 reguliert den Zellzyklusarrest durch Stabilisierung von p53 und Aktivierung von Cdc25A/B/C, wodurch es zu einem G2/M-Arrest kommt (Martinho et al., 1998). Der Zellzyklusarrest dient dem Schutz der Zelle vor der Fehlerfortpflanzung eines DNA-Schadens und bietet der Zelle die Möglichkeit der Schadensreparatur. Die Aufhebung des Zellzyklusarrest würde demnach die Zellen gegenüber den genotoxischen Agenzien sensibilisieren. Da die Statin-Vorbehandlung HUVECs allerdings vor der Zytotoxizität von IR-Strahlung und Doxorubicin schützt, scheinen diese Vorgänge bei der Statin-vermittelten Protektion nicht relevant zu sein. Eine negative Beeinflussung der Apoptose durch Lovastatin könnte durch die beobachtete Reduktion der Genotoxin-induzierten Expression des CD95 Liganden erfolgen. CD95 Rezeptor Aktivierung durch den CD95 Liganden induziert den mitochondrialen Weg der Apoptose (Pinkoski & Green, 1999).

IR-induzierte DSBs und eine Phosphorylierung des DNA-Doppelstrangbruchmarkers  $\gamma\text{-H2AX}$  konnten durch die Statin-Vorbehandlung nicht vermindert werden. Im Gegensatz dazu reduzierte der HMG-CoA-Reduktase Hemmer die Menge der durch

Doxorubicin und Etoposid entstandenen initialen DSBs, gemessen an der DSB-Induktion und  $\gamma$ -H2AX-Phosphorylierung. Etoposid ist wie Doxorubicin ein Chemotherapeutikum, welches die Topoisomerase-II- $\alpha$  inhibiert (Hande, 1992; Hande, 1998; Zunino & Capranico, 1990). Es ist anzunehmen, dass die Reduktion der initialen Doxorubicin-induzierten Strangbrüche durch Lovastatin zu einer verminderten ATM-Aktivierung und folglich auch zur Reduktion von p53-vermittelten Stress-Signalen in HUVECs führt.

Die Statin-vermittelte Reduktion der Apoptosefrequenz in den Endothelzellen nach IR-Strahlung sowie Doxorubicin-Behandlung verlief unabhängig von einer Beeinflussung der Effektor-Caspasen-3 und -7. Erstaunlicherweise führten unter unseren Versuchsbedingungen weder IR-Strahlung noch Doxorubicin-Behandlung zu einer Caspase-3, bzw. -7 Aktivierung. Die durch Cisplatin- bzw. Staurosporin-Behandlung induzierte Aktivierung dieser pro-apoptotischen Proteine, zeigten dass HUVECs grundsätzlich keinen Defekt in der Aktivierung von Effektor-Caspasen aufweisen. Weiterhin wurde durch die Inhibierung von Effektor-Caspasen mit einem pan-Caspase Inhibitor deutlich, dass Caspasen an der IR-induzierten Apoptose beteiligt sind. In Anwesenheit des Inhibitors nahm die Apoptoserate nach IR-Strahlung um ca. 50 % ab. Eine Beteiligung von Caspase-2 an der Doxorubicin-induzierten Apoptose konnte durch eine Abnahme der Pro-Caspase-2 Expression nachgewiesen werden. Die Caspase-2 Aktivität blieb allerdings von der Statin-Vorbehandlung unbeeinflusst. Demgegenüber konnte durch Lovastatin eine Reduktion der Doxorubicin-induzierten Phosphorylierung der Stress-Kinasen beobachtet werden. Dies steht im Einklang mit Berichten wonach eine durch Doxorubicin-induzierte Apoptose von einer Aktivierung der Caspase-2 und der SAPK/JNK begleitet wird (Panaretakis et al., 2005) und dass Statine die SAPK/JNK Aktivierung nach Genotoxin-Exposition in verschiedenen Zellsystemen blockieren (Bardeleben et al., 2003; Bardeleben et al., 2002). Aktivierte SAPK/JNK führt vornehmlich zu pro-apoptotischen Vorgängen in der Zelle (Mansouri et al., 2003). Reduktion dieser Stress-Kinasen kann somit einen weiteren möglichen Mechanismus bei der beobachteten Protektion der HUVECs vor der letalen Wirkung von Doxorubicin darstellen. Doxorubicin kann zusätzlich zur Hemmung der Topoisomerasell- $\alpha$  über Freisetzung von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) seine toxische Wirkung ausüben (Kim et al., 2006). Unter unseren Versuchsbedingungen

konnte allerdings keine Reduktion der ROS-Menge durch das Statin beobachtet werden.

Durch Multidrug-Transporter, wie Mdr-1 und Mrp-1, wird Doxorubicin aus der Zelle geschleust. Wirkungen des Statins auf die Multidrug-Transporter und somit auf den Efflux des Chemotherapeutikums konnten nicht nachgewiesen werden. Auch die Aufnahme des Doxorubicins wurde durch das Statin nicht beeinträchtigt. Demnach ist die Protektion der HUVECs vor Doxorubicin unabhängig von Veränderungen der intrazellulären Doxorubicin-Konzentration. Insgesamt inhibiert Lovastatin bei physiologisch relevanten Dosen IR- und Doxorubicin verursachte Stress-Antworten, wie Stabilisierung von p53, p21 und Phosphorylierung der Chk1, in HUVECs. Der radioprotektive Effekt Lovostatins scheint unabhängig von einer Beeinflussung der IR-induzierten Strangbrüche zu verlaufen. Bei Doxorubicin wird jedoch das Ausmaß der initialen DNA-Schäden durch den HMG-CoA-Reduktase Hemmer vermindert. Da DNA-Strangbrüche nach Doxorubicin-Gabe durch Inhibierung der Topoisomerase II- $\alpha$  entstehen, wäre es denkbar, dass Statine die Funktion und/oder Konformation der Topoisomerase II- $\alpha$  beeinflussen. Aufgrund der apoptotischen Wirkung von Statinen auf Tumorzellen und ihrer protektiven Eigenschaften bei der Genotoxin-induzierten Zytotoxizität in endothelialen Zellen könnten Statine möglicherweise die unerwünschten Nebenwirkungen von Zytostatika und der Strahlentherapie günstig beeinflussen.

## 5 Zusammenfassung

SAPK/JNK regulieren nach genotoxischem Stress eine Vielzahl von Zielsubstraten, die bedeutsam für Reparatur und Überleben der Zelle sind, somit nehmen sie Einfluss auf das zelluläre Schicksal der Zelle. Ob DNA-Schäden eine Phosphorylierung von Stress-Kinasen nach sich ziehen ist bisher noch wenig untersucht. Mit reparaturdefizienten Zellen wurde der Einfluss von DNA-Schäden, durch Cisplatin/Transplatin/UV-C, auf die SAPK/JNK Aktivierung untersucht. Die Aktivierung der Stress-Kinasen erfolgte agenzspezifisch und abhängig von verschiedenen Reparaturfaktoren. Die Aktivierung korrelierte in reparaturdefizienten Zellen teilweise mit dem späten Auftreten von DNA-Strangbrüchen, war jedoch unabhängig von erhöhten initialen DNA-Schäden. Diese Befunde zeigten, dass die späte Aktivierung der SAPK/JNK DNA-schadensabhängig verläuft und das Cisplatin und Transplatin bei Verwendung von äquitoxischen Dosen zu einer vergleichbaren Aktivierung von SAPK/JNK führten. Die Hemmung der Rho-GTPasen sowohl durch Statine als auch mittels *Clostridium difficile* Toxin B zeigte weiterhin, dass Rho-GTPasen möglicherweise die späte DNA-schadensabhängige Aktivierung der Stress-Kinasen vermitteln.

Die Hemmung von Rho-GTPasen durch physiologisch relevante Konzentrationen von Statinen führte in primären humanen Endothelzellen (HUVECs) zu einer Protektion vor IR-Strahlung und Doxorubicin. In beiden Fällen konnte eine Hemmung des pro-apoptotischen Transkriptionsfaktors p53 sowie der Chk1, welche einen Zellzyklusarrest reguliert, mit der Statin-Behandlung erreicht werden. Effektor-Caspasen wurden dabei durch den HMG-CoA-Reduktase Hemmer nicht beeinflusst. Ausschließlich bei dem Statin-vermittelten Schutz vor Doxorubicin kam es zu einer Reduktion von initialen DNA-Schäden, in Form von DNA-Strangbrüchen. Die IR-induzierten Strangbrüche in der DNA blieben von der Statin-Inkubation hingegen unbeeinflusst. Aufgrund ihrer protektiven Eigenschaften gegenüber IR- und Doxorubicin-induzierter Zytotoxizität in Endothelzellen und ihrer pro-apoptotischen Wirkung auf Tumorzellen könnten Statine möglicherweise die unerwünschten Nebenwirkungen von Zytostatika und einer Strahlentherapie günstig beeinflussen.

## 6 Literaturverzeichnis

- ABOUSSEKHRA, A., BIGGERSTAFF, M., SHIVJI, M. K., VILPO, J. A., MONCOLLIN, V., PODUST, V. N., PROTIC, M., HUBSCHER, U., EGLY, J. M. & WOOD, R. D. (1995). Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* **80**, 859-68.
- ABOUSSEKHRA, A. & WOOD, R. D. (1995). Detection of nucleotide excision repair incisions in human fibroblasts by immunostaining for PCNA. *Exp Cell Res* **221**, 326-32.
- ADAMSON, P., MARSHALL, C. J., HALL, A. & TILBROOK, P. A. (1992). Post-translational modifications of p21<sup>ras</sup> proteins. *J Biol Chem* **267**, 20033-8.
- ADLER, V., FUCHS, S. Y., KIM, J., KRAFT, A., KING, M. P., PELLING, J. & RONAI, Z. (1995). jun-NH2-terminal kinase activation mediated by UV-induced DNA lesions in melanoma and fibroblast cells. *Cell Growth Differ* **6**, 1437-46.
- ADLER, V., YIN, Z., FUCHS, S. Y., BENEZRA, M., ROSARIO, L., TEW, K. D., PINCUS, M. R., SARDANA, M., HENDERSON, C. J., WOLF, C. R., DAVIS, R. J. & RONAI, Z. (1999). Regulation of JNK signaling by GSTp. *Embo J* **18**, 1321-34.
- AKTORIES, K. & JUST, I. (2005). Clostridial Rho-inhibiting protein toxins. *Curr Top Microbiol Immunol* **291**, 113-45.
- AKTORIES, K., SCHMIDT, G. & JUST, I. (2000). Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol Chem* **381**, 421-6.
- ALBERTS, A. W., CHEN, J., KURON, G., HUNT, V., HUFF, J., HOFFMAN, C., ROTHROCK, J., LOPEZ, M., JOSHUA, H., HARRIS, E., PATCHETT, A., MONAGHAN, R., CURRIE, S., STAPLEY, E., ALBERS-SCHONBERG, G., HENSENS, O., HIRSHFIELD, J., HOOGSTEEN, K., LIESCH, J. & SPRINGER, J. (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 3957-61.
- ANDERSON, D., YU, T. W. & MCGREGOR, D. B. (1998). Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis* **13**, 539-55.
- ARAUJO, S. J., TIRODE, F., COIN, F., POSPIECH, H., SYVAOJA, J. E., STUCKI, M., HUBSCHER, U., EGLY, J. M. & WOOD, R. D. (2000). Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK. *Genes Dev* **14**, 349-59.
- BAGRODIA, S., DERIJARD, B., DAVIS, R. J. & CERIONE, R. A. (1995a). Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* **270**, 27995-8.
- BAGRODIA, S., TAYLOR, S. J., CREASY, C. L., CHERNOFF, J. & CERIONE, R. A. (1995b). Identification of a mouse p21<sup>Cdc42/Rac</sup> activated kinase. *J Biol Chem* **270**, 22731-7.
- BAKKENIST, C. J. & KASTAN, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499-506.
- BANCROFT, D. P., LEPRE, C. A. & LIPPARD, S. J. (1990). 195Pt NMR Kinetic and Mechanistic Studies of cis- and trans-Diamminedichloroplatinum(II) Binding to DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 6860-6871.
- BANIN, S., MOYAL, L., SHIEH, S., TAYA, Y., ANDERSON, C. W., CHESSA, L., SMORODINSKY, N. I., PRIVES, C., REISS, Y., SHILOH, Y. & ZIV, Y. (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* **281**, 1674-7.
- BAR-SHIRA, A., RASHI-ELKELES, S., ZLOCHOVER, L., MOYAL, L., SMORODINSKY, N. I., SEGER, R. & SHILOH, Y. (2002). ATM-dependent activation of the gene encoding MAP kinase phosphatase 5 by radiomimetic DNA damage. *Oncogene* **21**, 849-55.
- BARDELEBEN, R., KAINA, B. & FRITZ, G. (2003). Ultraviolet light-induced apoptotic death is impaired by the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin. *Biochem Biophys Res Commun* **307**, 401-7.
- BARDELEBEN, R. V., DUNKERN, T., KAINA, B. & FRITZ, G. (2002). The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin protects cells from the antineoplastic drugs doxorubicin and etoposide. *Int J Mol Med* **10**, 473-9.
- BASKARAN, R., WOOD, L. D., WHITAKER, L. L., CANMAN, C. E., MORGAN, S. E., XU, Y., BARLOW, C., BALTIMORE, D., WYNSHAW-BORIS, A., KASTAN, M. B. & WANG, J. Y. (1997). Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. *Nature* **387**, 516-9.

- BENHAR, M., DALYOT, I., ENGELBERG, D. & LEVITZKI, A. (2001). Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* **21**, 6913-26.
- BERNARDS, A. & SETTLEMAN, J. (2004). GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol* **14**, 377-85.
- BLAUW, G. J., LAGAAY, A. M. & WESTENDORP, R. G. (1998). Statins for prevention of stroke. *Lancet* **352**, 144.
- BOMGARDEN, R. D., LUPARDUS, P. J., SONI, D. V., YEE, M. C., FORD, J. M. & CIMPRICH, K. A. (2006). Opposing effects of the UV lesion repair protein XPA and UV bypass polymerase eta on ATR checkpoint signaling. *Embo J* **25**, 2605-14.
- BOURNE, H. R., SANDERS, D. A. & MCCORMICK, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**, 125-32.
- BROZOVIC, A., FRITZ, G., CHRISTMANN, M., ZISOWSKY, J., JAEHDE, U., OSMAK, M. & KAINA, B. (2004). Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance. *Int J Cancer* **112**, 974-85.
- BROZOVIC, A. & OSMAK, M. (2007). Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. *Cancer Lett* **251**, 1-16.
- BULMER, J. T., ZACAL, N. J. & RAINBOW, A. J. (2005). Human cells deficient in transcription-coupled repair show prolonged activation of the Jun N-terminal kinase and increased sensitivity following cisplatin treatment. *Cancer Chemother Pharmacol* **56**, 189-98.
- BUSTELO, X. R., SAUZEAU, V. & BERENJENO, I. M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* **29**, 356-70.
- CAELLES, C., HELMBERG, A. & KARIN, M. (1994). p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* **370**, 220-3.
- CAFFORIO, P., DAMMACCO, F., GERNONE, A. & SILVESTRIS, F. (2005). Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis* **26**, 883-91.
- CANMAN, C. E. & KASTAN, M. B. (1996). Signal transduction. Three paths to stress relief. *Nature* **384**, 213-4.
- CASEY, P. J. & SEABRA, M. C. (1996). Protein prenyltransferases. *J Biol Chem* **271**, 5289-92.
- CELESTE, A., FERNANDEZ-CAPETILLO, O., KRULAK, M. J., PILCH, D. R., STAUDT, D. W., LEE, A., BONNER, R. F., BONNER, W. M. & NUSSENZWEIG, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* **5**, 675-9.
- CEPEDA, V., FUERTES, M. A., CASTILLA, J., ALONSO, C., QUEVEDO, C. & PEREZ, J. M. (2007). Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* **7**, 3-18.
- CHEN, H. T., BHANDoola, A., DIFILIPPANTONIO, M. J., ZHU, J., BROWN, M. J., TAI, X., ROGAKOU, E. P., BROTZ, T. M., BONNER, W. M., RIED, T. & NUSSENZWEIG, A. (2000). Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX. *Science* **290**, 1962-5.
- CHEN, Y. R., MEYER, C. F. & TAN, T. H. (1996). Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* **271**, 631-4.
- CICCARELLI, R. B., SOLOMON, M. J., VARSHAVSKY, A. & LIPPARD, S. J. (1985). In vivo effects of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) on SV40 chromosomes: differential repair, DNA-protein cross-linking, and inhibition of replication. *Biochemistry* **24**, 7533-40.
- CLEAVER, J. E. & HULTNER, M. L. (1995). Transcription-related human disorders. *Am J Hum Genet* **56**, 1257-61.
- COLELLA, S., NARDO, T., MALLERY, D., BORRONE, C., RICCI, R., RUFFA, G., LEHMANN, A. R. & STEFANINI, M. (1999). Alterations in the CSB gene in three Italian patients with the severe form of Cockayne syndrome (CS) but without clinical photosensitivity. *Hum Mol Genet* **8**, 935-41.
- COSO, O. A., CHIARIELLO, M., YU, J. C., TERAMOTO, H., CRESPO, P., XU, N., MIKI, T. & GUTKIND, J. S. (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**, 1137-46.
- CULLINANE, C., MAZUR, S. J., ESSIGMANN, J. M., PHILLIPS, D. R. & BOHR, V. A. (1999). Inhibition of RNA Polymerase II Transcription in Human Cell Extracts by Cisplatin DNA Damage. *Biochemistry* **38**, 6204-6212.
- DAVIS, R. J. (1994). MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci* **19**, 470-3.

- DERIJARD, B., RAINGEAUD, J., BARRETT, T., WU, I. H., HAN, J., ULEVITCH, R. J. & DAVIS, R. J. (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* **267**, 682-5.
- DHAR, V., ADLER, V., LEHMANN, A. & RONAI, Z. (1996). Impaired jun-NH2-terminal kinase activation by ultraviolet irradiation in fibroblasts of patients with Cockayne syndrome complementation group B. *Cell Growth Differ* **7**, 841-6.
- DIKOMEY, E., DAHM-DAPHI, J., BRAMMER, I., MARTENSEN, R. & KAINA, B. (1998). Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *Int J Radiat Biol* **73**, 269-78.
- DIMITROULAKOS, J., YE, L. Y., BENZAQUEN, M., MOORE, M. J., KAMEL-REID, S., FREEDMAN, M. H., YEGER, H. & PENN, L. Z. (2001). Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cell carcinomas to lovastatin-induced apoptosis: therapeutic implications. *Clin Cancer Res* **7**, 158-67.
- DOLLFUS, H., PORTO, F., CAUSSADE, P., SPEEG-SCHATZ, C., SAHEL, J., GROSSHANS, E., FLAMENT, J. & SARASIN, A. (2003). Ocular manifestations in the inherited DNA repair disorders. *Surv Ophthalmol* **48**, 107-22.
- DUNKERN, T. R., FRITZ, G. & KAINA, B. (2001). Ultraviolet light-induced DNA damage triggers apoptosis in nucleotide excision repair-deficient cells via Bcl-2 decline and caspase-3/8 activation. *Oncogene* **20**, 6026-38.
- DUNKERN, T. R. & KAINA, B. (2002). Cell proliferation and DNA breaks are involved in ultraviolet light-induced apoptosis in nucleotide excision repair-deficient Chinese hamster cells. *Mol Biol Cell* **13**, 348-61.
- EARNSHAW, W. C., MARTINS, L. M. & KAUFMANN, S. H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 383-424.
- EASTMAN, A. & BARRY, M. A. (1987). Interaction of trans-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation of monofunctional adducts and their reaction with glutathione. *Biochemistry* **26**, 3303-7.
- EASTMAN, A., JENNERWEIN, M. M. & NAGEL, D. L. (1988). Characterization of bifunctional adducts produced in DNA by trans-diamminedichloroplatinum(II). *Chem Biol Interact* **67**, 71-80.
- ENDO, A. (1988). Chemistry, biochemistry, and pharmacology of HMG-CoA reductase inhibitors. *Klin Wochenschr* **66**, 421-7.
- ENDO, A., KURODA, M. & TSUJITA, Y. (1976). ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot (Tokyo)* **29**, 1346-8.
- ENDRES, M. & LAUFS, U. (2004). Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke* **35**, 2708-11.
- ENDRES, M., LAUFS, U., HUANG, Z., NAKAMURA, T., HUANG, P., MOSKOWITZ, M. A. & LIAO, J. K. (1998). Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8880-5.
- ESTEVE, P., EMBADE, N., PERONA, R., JIMENEZ, B., DEL PESO, L., LEON, J., ARENDS, M., MIKI, T. & LACAL, J. C. (1998). Rho-regulated signals induce apoptosis in vitro and in vivo by a p53-independent, but Bcl2 dependent pathway. *Oncogene* **17**, 1855-69.
- EVANS, E., MOGGS, J. G., HWANG, J. R., EGLY, J. M. & WOOD, R. D. (1997). Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *Embo J* **16**, 6559-73.
- FALCK, J., MAILAND, N., SYLJUASEN, R. G., BARTEK, J. & LUKAS, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* **410**, 842-7.
- FARNIER, M. & DAVIGNON, J. (1998). Current and future treatment of hyperlipidemia: the role of statins. *Am J Cardiol* **82**, 3J-10J.
- FERNANDEZ-CAPETILLO, O., CELESTE, A. & NUSSENZWEIG, A. (2003). Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell Cycle* **2**, 426-7.
- FICHTINGER-SCHEPMAN, A. M., VAN DER VEER, J. L., DEN HARTOG, J. H., LOHMAN, P. H. & REEDIJK, J. (1985). Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* **24**, 707-13.
- FIELDS, S. & JANG, S. K. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* **249**, 1046-9.
- FLEMING, Y., ARMSTRONG, C. G., MORRICE, N., PATERSON, A., GOEDERT, M. & COHEN, P. (2000). Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase

- (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7. *Biochem J* **352 Pt 1**, 145-54.
- FRIEDBERG, E. C., BARDWELL, A. J., BARDWELL, L., FEAVER, W. J., KORNBERG, R. D., SVEJSTRUP, J. Q., TOMKINSON, A. E. & WANG, Z. (1995). Nucleotide excision repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: its relationship to specialized mitotic recombination and RNA polymerase II basal transcription. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **347**, 63-8.
- FRIESEN, C., HERR, I., KRAMMER, P. H. & DEBATIN, K. M. (1996). Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med* **2**, 574-7.
- FRITZ, G., BRACHETTI, C. & KAINA, B. (2003). Lovastatin causes sensitization of HeLa cells to ionizing radiation-induced apoptosis by the abrogation of G2 blockage. *Int J Radiat Biol* **79**, 601-10.
- FRITZ, G., JUST, I., WOLLENBERG, P. & AKTORIES, K. (1994). Differentiation-induced increase in *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme-catalyzed ADP-ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *Eur J Biochem* **223**, 909-16.
- FRITZ, G. & KAINA, B. (2000). Ras-related GTPase RhoB forces alkylation-induced apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **268**, 784-9.
- FRITZ, G. & KAINA, B. (2006). Late activation of stress kinases (SAPK/JNK) by genotoxins requires the DNA repair proteins DNA-PKcs and CSB. *Mol Biol Cell* **17**, 851-61.
- FUERTESSA, M. A., CASTILLAB, J., ALONSOA, C. & PEREZ, J. M. (2003). Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr Med Chem* **10**, 257-66.
- FUKUMOTO, Y., KAIBUCHI, K., HORI, Y., FUJIOKA, H., ARAKI, S., UEDA, T., KIKUCHI, A. & TAKAI, Y. (1990). Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene* **5**, 1321-8.
- FURUTA, T., UEDA, T., AUNE, G., SARASIN, A., KRAEMER, K. H. & POMMIER, Y. (2002). Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res* **62**, 4899-902.
- GARCIA-RANEA, J. A. & VALENCIA, A. (1998). Distribution and functional diversification of the ras superfamily in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **434**, 219-25.
- GIANNATTASIO, M., LAZZARO, F., LONGHESE, M. P., PLEVANI, P. & MUZI-FALCONI, M. (2004). Physical and functional interactions between nucleotide excision repair and DNA damage checkpoint. *Embo J* **23**, 429-38.
- GLOMSET, J. A., GELB, M. H. & FARNSWORTH, C. C. (1990). Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor. *Trends Biochem Sci* **15**, 139-42.
- GNAD, R., AKTORIES, K., KAINA, B. & FRITZ, G. (2000). Inhibition of protein isoprenylation impairs rho-regulated early cellular response to genotoxic stress. *Mol Pharmacol* **58**, 1389-97.
- GOLDSTEIN, J. L. & BROWN, M. S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**, 425-30.
- GOLUB, E. I., GUPTA, R. C., HAAF, T., WOLD, M. S. & RADDING, C. M. (1998). Interaction of human rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic Acids Res* **26**, 5388-93.
- GOTTESMAN, M. M., PASTAN, I. & AMBUDKAR, S. V. (1996). P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 610-7.
- GOTTLIEB, T. M. & JACKSON, S. P. (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**, 131-42.
- GRAAF, M. R., RICHEL, D. J., VAN NOORDEN, C. J. & GUCHELAAR, H. J. (2004). Effects of statins and farnesyltransferase inhibitors on the development and progression of cancer. *Cancer Treat Rev* **30**, 609-41.
- GUPTA, S., BARRETT, T., WHITMARSH, A. J., CAVANAGH, J., SLUSS, H. K., DERIJARD, B. & DAVIS, R. J. (1996). Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo J* **15**, 2760-70.
- GUZDER, S. N., HABRAKEN, Y., SUNG, P., PRAKASH, L. & PRAKASH, S. (1995). Reconstitution of yeast nucleotide excision repair with purified Rad proteins, replication protein A, and transcription factor TFIIH. *J Biol Chem* **270**, 12973-6.
- HAGEMANN, C. & BLANK, J. L. (2001). The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal* **13**, 863-75.
- HALL, A. (1990). The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* **249**, 635-40.

- HAMDI, M., KOOL, J., CORNELISSEN-STEIJGER, P., CARLOTTI, F., POPEIJUS, H. E., VAN DER BURGT, C., JANSSEN, J. M., YASUI, A., HOEBEN, R. C., TERLETH, C., MULLENDERS, L. H. & VAN DAM, H. (2005). DNA damage in transcribed genes induces apoptosis via the JNK pathway and the JNK-phosphatase MKP-1. *Oncogene* **24**, 7135-44.
- HAMMARSTEN, O., DEFAZIO, L. G. & CHU, G. (2000). Activation of DNA-dependent protein kinase by single-stranded DNA ends. *J Biol Chem* **275**, 1541-50.
- HANCOCK, J. F., PATERSON, H. & MARSHALL, C. J. (1990). A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* **63**, 133-9.
- HANDE, K. R. (1992). Etoposide pharmacology. *Semin Oncol* **19**, 3-9.
- HANDE, K. R. (1998). Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* **34**, 1514-21.
- HARDER, H. C., SMITH, R. G. & LEROY, A. F. (1976). Template primer inactivation by cis- and trans-dichlorodiammine platinum for human DNA polymerase alpha, beta, and Rauscher murine leukemia virus reverse transcriptase, as a mechanism of cytotoxicity. *Cancer Res* **36**, 3821-9.
- HARTLEY, K. O., GELL, D., SMITH, G. C., ZHANG, H., DIVECHA, N., CONNELLY, M. A., ADMON, A., LEES-MILLER, S. P., ANDERSON, C. W. & JACKSON, S. P. (1995). DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. *Cell* **82**, 849-56.
- HAWLEY, R. S. & FRIEND, S. H. (1996). Strange bedfellows in even stranger places: the role of ATM in meiotic cells, lymphocytes, tumors, and its functional links to p53. *Genes Dev* **10**, 2383-8.
- HAYAKAWA, J., DEPATIE, C., OHMACHI, M. & MERCOLA, D. (2003). The activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) by DNA-damaging agents serves to promote drug resistance via activating transcription factor 2 (ATF2)-dependent enhanced DNA repair. *J Biol Chem* **278**, 20582-92.
- HE, Q., LIANG, C. H. & LIPPARD, S. J. (2000). Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5768-72.
- HEFFERNAN, T. P., SIMPSON, D. A., FRANK, A. R., HEINLOTH, A. N., PAULES, R. S., CORDEIRO-STONE, M. & KAUFMANN, W. K. (2002). An ATR- and Chk1-dependent S checkpoint inhibits replicon initiation following UVC-induced DNA damage. *Mol Cell Biol* **22**, 8552-61.
- HEIGER-BERNAYS, W. J., ESSIGMANN, J. M. & LIPPARD, S. J. (1990). Effect of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) and related platinum complexes on eukaryotic DNA replication. *Biochemistry* **29**, 8461-6.
- HOFFMANN, J. S., JOHNSON, N. P. & VILLANI, G. (1989). Conversion of monofunctional DNA adducts of cis-diamminedichloroplatinum (II) to bifunctional lesions. Effect on the in vitro replication of single-stranded DNA by Escherichia coli DNA polymerase I and eukaryotic DNA polymerases alpha. *J Biol Chem* **264**, 15130-5.
- HOLLAND, P. M., SUZANNE, M., CAMPBELL, J. S., NOSELLI, S. & COOPER, J. A. (1997). MKK7 is a stress-activated mitogen-activated protein kinase kinase functionally related to hemipterous. *J Biol Chem* **272**, 24994-8.
- HOLLIDAY. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetical Research* **5**, 282-304.
- HUANG, J. C., ZAMBLE, D. B., REARDON, J. T., LIPPARD, S. J. & SANCAR, A. (1994). HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10394-8.
- JAMIESON, E. R. & LIPPARD, S. J. (1999). Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev* **99**, 2467-98.
- JEGGO, P. A. (1998). Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat Res* **150**, S80-91.
- JEGGO, P. A., HAFEZPARAST, M., THOMPSON, A. F., BROUGHTON, B. C., KAUR, G. P., ZDZIENICKA, M. Z. & ATHWAL, R. S. (1992). Localization of a DNA repair gene (XRCC5) involved in double-strand-break rejoining to human chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6423-7.
- JOHNSON, R. D. & JASIN, M. (2000). Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Embo J* **19**, 3398-407.
- JUST, I., SELZER, J., WILM, M., VON EICHEL-STREIBER, C., MANN, M. & AKTORIES, K. (1995a). Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B. *Nature* **375**, 500-3.

- JUST, I., WILM, M., SELZER, J., REX, G., VON EICHEL-STREIBER, C., MANN, M. & AKTORIES, K. (1995b). The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *J Biol Chem* **270**, 13932-6.
- KAGAWA, W., KURUMIZAKA, H., IKAWA, S., YOKOYAMA, S. & SHIBATA, T. (2001). Homologous pairing promoted by the human Rad52 protein. *J Biol Chem* **276**, 35201-8.
- KAINA, B. (1985). The interrelationship between SCE induction, cell survival, mutagenesis, aberration formation and DNA synthesis inhibition in V79 cells treated with N-methyl-N-nitrosourea or N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Mutat Res* **142**, 49-54.
- KAINA, B. (1989). Chromosomal aberrations as a contributing factor for tumor promotion in the mouse skin. *Teratog Carcinog Mutagen* **9**, 331-48.
- KHARBANDA, S., PANDEY, P., JIN, S., INOUE, S., BHARTI, A., YUAN, Z. M., WEICHELBAUM, R., WEAVER, D. & KUFE, D. (1997). Functional interaction between DNA-PK and c-Abl in response to DNA damage. *Nature* **386**, 732-5.
- KHARBANDA, S., PANDEY, P., REN, R., MAYER, B., ZON, L. & KUFE, D. (1995a). c-Abl activation regulates induction of the SEK1/stress-activated protein kinase pathway in the cellular response to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *J Biol Chem* **270**, 30278-81.
- KHARBANDA, S., PANDEY, P., YAMAUCHI, T., KUMAR, S., KANEKI, M., KUMAR, V., BHARTI, A., YUAN, Z. M., GHANEM, L., RANA, A., WEICHELBAUM, R., JOHNSON, G. & KUFE, D. (2000). Activation of MEK kinase 1 by the c-Abl protein tyrosine kinase in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **20**, 4979-89.
- KHARBANDA, S., REN, R., PANDEY, P., SHAFMAN, T. D., FELLER, S. M., WEICHELBAUM, R. R. & KUFE, D. W. (1995b). Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature* **376**, 785-8.
- KHARBANDA, S., YUAN, Z. M., WEICHELBAUM, R. & KUFE, D. (1998). Determination of cell fate by c-Abl activation in the response to DNA damage. *Oncogene* **17**, 3309-18.
- KHELIFI, A. F., D'ALCONTRES, M. S. & SALOMONI, P. (2005). Daxx is required for stress-induced cell death and JNK activation. *Cell Death Differ* **12**, 724-33.
- KIM, S. T., LIM, D. S., CANMAN, C. E. & KASTAN, M. B. (1999). Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem* **274**, 37538-43.
- KIM, S. Y., KIM, S. J., KIM, B. J., RAH, S. Y., CHUNG, S. M., IM, M. J. & KIM, U. H. (2006). Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca<sup>2+</sup> increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes. *Exp Mol Med* **38**, 535-45.
- KITAGAWA, D., KAJIHO, H., NEGISHI, T., URA, S., WATANABE, T., WADA, T., ICHIJO, H., KATADA, T. & NISHINA, H. (2006). Release of RASSF1C from the nucleus by Daxx degradation links DNA damage and SAPK/JNK activation. *Embo J* **25**, 3286-97.
- KOBERLE, B., ROGINSKAYA, V. & WOOD, R. D. (2006). XPA protein as a limiting factor for nucleotide excision repair and UV sensitivity in human cells. *DNA Repair (Amst)* **5**, 641-8.
- KOCH, G., BENZ, C., SCHMIDT, G., OLENIK, C. & AKTORIES, K. (1997). Role of Rho protein in lovastatin-induced breakdown of actin cytoskeleton. *J Pharmacol Exp Ther* **283**, 901-9.
- KOMAROV, P. G., KOMAROVA, E. A., KONDRATOV, R. V., CHRISTOV-TSELKOV, K., COON, J. S., CHERNOV, M. V. & GUDKOV, A. V. (1999). A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* **285**, 1733-7.
- KOZMA, R., AHMED, S., BEST, A. & LIM, L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* **15**, 1942-52.
- KRAEMER, K. H., LEE, M. M. & SCOTTO, J. (1987). Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch Dermatol* **123**, 241-50.
- KRAEMER, K. H., LEVY, D. D., PARRIS, C. N., GOZUKARA, E. M., MORIWAKI, S., ADELBERG, S. & SEIDMAN, M. M. (1994). Xeroderma pigmentosum and related disorders: examining the linkage between defective DNA repair and cancer. *J Invest Dermatol* **103**, 96S-101S.
- KUSAMA, T., MUKAI, M., IWASAKI, T., TATSUTA, M., MATSUMOTO, Y., AKEDO, H., INOUE, M. & NAKAMURA, H. (2002). 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors reduce human pancreatic cancer cell invasion and metastasis. *Gastroenterology* **122**, 308-17.
- KYRIAKIS, J. M. & AVRUCH, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**, 807-69.

- KYRIAKIS, J. M., BRAUTIGAN, D. L., INGBRITSEN, T. S. & AVRUCH, J. (1991). pp54 microtubule-associated protein-2 kinase requires both tyrosine and serine/threonine phosphorylation for activity. *J Biol Chem* **266**, 10043-6.
- LAUFS, U., LA FATA, V., PLUTZKY, J. & LIAO, J. K. (1998). Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* **97**, 1129-35.
- LAWLER, S., FLEMING, Y., GOEDERT, M. & COHEN, P. (1998). Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro. *Curr Biol* **8**, 1387-90.
- LAZAR, T., GOTTE, M. & GALLWITZ, D. (1997). Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell? *Trends Biochem Sci* **22**, 468-72.
- LEBER, R., WISE, T. W., MIZUTA, R. & MEEK, K. (1998). The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **273**, 1794-801.
- LEBOWITZ, P. F., DAVIDE, J. P. & PRENDERGAST, G. C. (1995). Evidence that farnesyltransferase inhibitors suppress Ras transformation by interfering with Rho activity. *Mol Cell Biol* **15**, 6613-22.
- LEE, J. M. & BERNSTEIN, A. (1993). p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5742-6.
- LEPRE, C. A., STROTHKAMP, K. G. & LIPPARD, S. J. (1987). Synthesis and <sup>1</sup>H NMR spectroscopic characterization of trans-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>[d(ApGpGpCpCpT)-N7-A(1),N7-G(3)]]. *Biochemistry* **26**, 5651-7.
- LEUNG, T., MANSER, E., TAN, L. & LIM, L. (1995). A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem* **270**, 29051-4.
- LEVRESSE, V., BUTTERFIELD, L., ZENTRICH, E. & HEASLEY, L. E. (2000). Akt negatively regulates the cJun N-terminal kinase pathway in PC12 cells. *J Neurosci Res* **62**, 799-808.
- LEVRESSE, V., MAREK, L., BLUMBERG, D. & HEASLEY, L. E. (2002). Regulation of platinum-compound cytotoxicity by the c-Jun N-terminal kinase and c-Jun signaling pathway in small-cell lung cancer cells. *Mol Pharmacol* **62**, 689-97.
- LI, H., JUNK, P., HUWILER, A., BURKHARDT, C., WALLERATH, T., PFEILSCHIFTER, J. & FORSTERMANN, U. (2002a). Dual effect of ceramide on human endothelial cells: induction of oxidative stress and transcriptional upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **106**, 2250-6.
- LI, X., LIU, L., TUPPER, J. C., BANNERMAN, D. D., WINN, R. K., SEBTI, S. M., HAMILTON, A. D. & HARLAN, J. M. (2002b). Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem* **277**, 15309-16.
- LIAN, J. P. & BADWEY, J. A. (1997). Activation of the p21-activated protein kinases from neutrophils with an antibody that reacts with the N-terminal region of Pak 1. *FEBS Lett* **404**, 211-5.
- LIPS, J. & KAINA, B. (2001). DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. *Carcinogenesis* **22**, 579-85.
- LISNOCK, J., GRIFFIN, P., CALAYCAY, J., FRANTZ, B., PARSONS, J., O'KEEFE, S. J. & LOGRASSO, P. (2000). Activation of JNK3 alpha 1 requires both MKK4 and MKK7: kinetic characterization of in vitro phosphorylated JNK3 alpha 1. *Biochemistry* **39**, 3141-8.
- LIU, Y., GOROSPE, M., YANG, C. & HOLBROOK, N. J. (1995). Role of mitogen-activated protein kinase phosphatase during the cellular response to genotoxic stress. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase activity and AP-1-dependent gene activation. *J Biol Chem* **270**, 8377-80.
- LJUNGMAN, M. & ZHANG, F. (1996). Blockage of RNA polymerase as a possible trigger for u.v. light-induced apoptosis. *Oncogene* **13**, 823-31.
- LOEHRER, P. J. & EINHORN, L. H. (1984). Drugs five years later. Cisplatin. *Ann Intern Med* **100**, 704-13.
- LOSA, J. H., PARADA COBO, C., VINIEGRA, J. G., SANCHEZ-AREVALO LOBO, V. J., RAMON Y CAJAL, S. & SANCHEZ-PRIETO, R. (2003). Role of the p38 MAPK pathway in cisplatin-based therapy. *Oncogene* **22**, 3998-4006.
- MACAULAY, R. J., WANG, W., DIMITROULAKOS, J., BECKER, L. E. & YEGER, H. (1999). Lovastatin-induced apoptosis of human medulloblastoma cell lines in vitro. *J Neurooncol* **42**, 1-11.
- MAILAND, N., FALCK, J., LUKAS, C., SYLJUASEN, R. G., WELCKER, M., BARTEK, J. & LUKAS, J. (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* **288**, 1425-9.
- MANDIC, A., HANSSON, J., LINDER, S. & SHOSHAN, M. C. (2003). Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J Biol Chem* **278**, 9100-6.

- MANSER, E., CHONG, C., ZHAO, Z. S., LEUNG, T., MICHAEL, G., HALL, C. & LIM, L. (1995). Molecular cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family. *J Biol Chem* **270**, 25070-8.
- MANSOURI, A., RIDGWAY, L. D., KORAPATI, A. L., ZHANG, Q., TIAN, L., WANG, Y., SIDDIK, Z. H., MILLS, G. B. & CLARET, F. X. (2003). Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* **278**, 19245-56.
- MARSHALL, C. J. (1993). Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions. *Science* **259**, 1865-6.
- MARTENSSON, S. & HAMMARSTEN, O. (2002). DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. Structural requirements for kinase activation by DNA ends. *J Biol Chem* **277**, 3020-9.
- MARTINHO, R. G., LINDSAY, H. D., FLAGGS, G., DEMAGGIO, A. J., HOEKSTRA, M. F., CARR, A. M. & BENTLEY, N. J. (1998). Analysis of Rad3 and Chk1 protein kinases defines different checkpoint responses. *Embo J* **17**, 7239-49.
- MASER, R. S., MONSEN, K. J., NELMS, B. E. & PETRINI, J. H. (1997). hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **17**, 6087-96.
- MILLER, A. C., KARIKO, K., MYERS, C. E., CLARK, E. P. & SAMID, D. (1993). Increased radioresistance of EJras-transformed human osteosarcoma cells and its modulation by lovastatin, an inhibitor of p21ras isoprenylation. *Int J Cancer* **53**, 302-7.
- MIMAKI, T., ITOH, N., ABE, J., TAGAWA, T., SATO, K., YABUCHI, H. & TAKEBE, H. (1986). Neurological manifestations in xeroderma pigmentosum. *Ann Neurol* **20**, 70-5.
- MINDEN, A., LIN, A., CLARET, F. X., ABO, A. & KARIN, M. (1995). Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**, 1147-57.
- MINDEN, A., LIN, A., MCMAHON, M., LANGE-CARTER, C., DERIJARD, B., DAVIS, R. J., JOHNSON, G. L. & KARIN, M. (1994). Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* **266**, 1719-23.
- MITCHELL, D. L., PFEIFER, G. P., TAYLOR, J. S., ZDZIENICKA, M. Z. & NIKIAIDO, O. (1993). Biological role of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers. *Frontier of Photobiology*, 337-344.
- MORIGUCHI, T., TOYOSHIMA, F., MASUYAMA, N., HANAFUSA, H., GOTOH, Y. & NISHIDA, E. (1997). A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNFalpha and cellular stresses. *Embo J* **16**, 7045-53.
- MOSHOU, D., CALLEBAUT, I., DE CHASSEVAL, R., CORNEO, B., CAVAZZANA-CALVO, M., LE DEIST, F., TEZCAN, I., SANAL, O., BERTRAND, Y., PHILIPPE, N., FISCHER, A. & DE VILLARTAY, J. P. (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* **105**, 177-86.
- MU, D., PARK, C. H., MATSUNAGA, T., HSU, D. S., REARDON, J. T. & SANCAR, A. (1995). Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system. *J Biol Chem* **270**, 2415-8.
- MULLER, I., NIETHAMMER, D. & BRUCHELT, G. (1998). Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity (Review). *Int J Mol Med* **1**, 491-4.
- MYMRYK, J. S., ZANIEWSKI, E. & ARCHER, T. K. (1995). Cisplatin inhibits chromatin remodeling, transcription factor binding, and transcription from the mouse mammary tumor virus promoter in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2076-80.
- NAEGELI, H. (1995). Mechanisms of DNA damage recognition in mammalian nucleotide excision repair. *Faseb J* **9**, 1043-50.
- NAGAI, H., NOGUCHI, T., TAKEDA, K. & ICHIJO, H. (2007). Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J Biochem Mol Biol* **40**, 1-6.
- NANCE, M. A. & BERRY, S. A. (1992). Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am J Med Genet* **42**, 68-84.
- NEBRED, A. R. & PORRAS, A. (2000). p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* **25**, 257-60.
- NEHME, A., BASKARAN, R., AEBI, S., FINK, D., NEBEL, S., CENNI, B., WANG, J. Y., HOWELL, S. B. & CHRISTEN, R. D. (1997). Differential induction of c-Jun NH2-terminal kinase and c-Abl kinase in DNA mismatch repair-proficient and -deficient cells exposed to cisplatin. *Cancer Res* **57**, 3253-7.

- NEHME, A., BASKARAN, R., NEBEL, S., FINK, D., HOWELL, S. B., WANG, J. Y. & CHRISTEN, R. D. (1999). Induction of JNK and c-Abl signalling by cisplatin and oxaliplatin in mismatch repair-proficient and -deficient cells. *Br J Cancer* **79**, 1104-10.
- NELMS, B. E., MASER, R. S., MACKAY, J. F., LAGALLY, M. G. & PETRINI, J. H. (1998). In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science* **280**, 590-2.
- NOBES, C. D. & HALL, A. (1995). Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* **23**, 456-9.
- NUBEL, T., DAMROT, J., ROOS, W. P., KAINA, B. & FRITZ, G. (2006). Lovastatin protects human endothelial cells from killing by ionizing radiation without impairing induction and repair of DNA double-strand breaks. *Clin Cancer Res* **12**, 933-9.
- OSTERODE, W., ZETTINIG, G., POTZI, C. & MANNER, G. (2002). Increased lead excretion in hypothyroid patients after levothyroxine medication. *J Toxicol Environ Health A* **65**, 649-54.
- PABLA, N., HUANG, S., MI, Q. S., DANIEL, R. & DONG, Z. (2008). ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* **283**, 6572-83.
- PANARETAKIS, T., LAANE, E., POKROVSKAJA, K., BJORKLUND, A. C., MOUSTAKAS, A., ZHIVOTOVSKY, B., HEYMAN, M., SHOSHAN, M. C. & GRANDER, D. (2005). Doxorubicin requires the sequential activation of caspase-2, protein kinase Cdelta, and c-Jun NH2-terminal kinase to induce apoptosis. *Mol Biol Cell* **16**, 3821-31.
- PANDEY, P., RAINGEAUD, J., KANEKI, M., WEICHELBAUM, R., DAVIS, R. J., KUFU, D. & KHARBANDA, S. (1996). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by c-Abl-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* **271**, 23775-9.
- PARK, M. S., LUDWIG, D. L., STIGGER, E. & LEE, S. H. (1996). Physical interaction between human RAD52 and RPA is required for homologous recombination in mammalian cells. *J Biol Chem* **271**, 18996-9000.
- PAULSEN, R. D. & CIMPRICH, K. A. (2007). The ATR pathway: fine-tuning the fork. *DNA Repair (Amst)* **6**, 953-66.
- PERSONS, D. L., YAZLOVITSKAYA, E. M., CUI, W. & PELLING, J. C. (1999). Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clin Cancer Res* **5**, 1007-14.
- PETERMANN, E. & CALDECOTT, K. W. (2006). Evidence that the ATR/Chk1 pathway maintains normal replication fork progression during unperturbed S phase. *Cell Cycle* **5**, 2203-9.
- PFEIFFER, P., GOEDECKE, W. & OBE, G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* **15**, 289-302.
- PINKOSKI, M. J. & GREEN, D. R. (1999). Fas ligand, death gene. *Cell Death Differ* **6**, 1174-81.
- POPOFF, S. C., BECK, D. J. & RUPP, W. D. (1987). Repair of plasmid DNA damaged in vitro with cis- or trans-diamminedichloroplatinum(II) in Escherichia coli. *Mutat Res* **183**, 129-37.
- POTAPOVA, O., HAGHIGHI, A., BOST, F., LIU, C., BIRRER, M. J., GJERSET, R. & MERCOLA, D. (1997). The Jun kinase/stress-activated protein kinase pathway functions to regulate DNA repair and inhibition of the pathway sensitizes tumor cells to cisplatin. *J Biol Chem* **272**, 14041-4.
- RAPIN, I., LINDENBAUM, Y., DICKSON, D. W., KRAEMER, K. H. & ROBBINS, J. H. (2000). Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum. *Neurology* **55**, 1442-9.
- REDDY, G., GOLUB, E. I. & RADDING, C. M. (1997). Human Rad52 protein promotes single-strand DNA annealing followed by branch migration. *Mutat Res* **377**, 53-9.
- REEVES, W. H. & STHOEGER, Z. M. (1989). Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) lupus autoantigen. *J Biol Chem* **264**, 5047-52.
- RICH, T., ALLEN, R. L. & WYLLIE, A. H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* **407**, 777-83.
- RIDLEY, A. J. & HALL, A. (1992). Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **57**, 661-71.
- RIDLEY, A. J., PATERSON, H. F., JOHNSTON, C. L., DIEKMANN, D. & HALL, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-10.
- RIKITAKE, Y. & LIAO, J. K. (2005). Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ Res* **97**, 1232-5.
- ROGAKOU, E. P., PILCH, D. R., ORR, A. H., IVANOVA, V. S. & BONNER, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**, 5858-68.
- ROOS, W. P., KAINA, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. In *TRENDS in Molecular Medicine*, vol. 12.

- ROSENBERG, B., VANCAMP, L. & KRIGAS, T. (1965). Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* **205**, 698-9.
- ROUX, P. P. & BLENIS, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 320-44.
- SANCHEZ-PEREZ, I., MARTINEZ-GOMARIZ, M., WILLIAMS, D., KEYSE, S. M. & PERONA, R. (2000). CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene* **19**, 5142-52.
- SANCHEZ-PEREZ, I., MURGUIA, J. R. & PERONA, R. (1998). Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene* **16**, 533-40.
- SANCHEZ, I., HUGHES, R. T., MAYER, B. J., YEE, K., WOODGETT, J. R., AVRUCH, J., KYRIAKIS, J. M. & ZON, L. I. (1994). Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature* **372**, 794-8.
- SATOKATA, I., IWAI, K., MATSUDA, T., OKADA, Y. & TANAKA, K. (1993). Genomic characterization of the human DNA excision repair-controlling gene XPAC. *Gene* **136**, 345-8.
- SAVITSKY, K., BAR-SHIRA, A., GILAD, S., ROTMAN, G., ZIV, Y., VANAGAITE, L., TAGLE, D. A., SMITH, S., UZIEL, T., SFEZ, S., ASHKENAZI, M., PECKER, I., FRYDMAN, M., HARNIK, R., PATANJALI, S. R., SIMMONS, A., CLINES, G. A., SARTIEL, A., GATTI, R. A., CHESSA, L., SANAL, O., LAVIN, M. F., JASPERS, N. G., TAYLOR, A. M., ARLETT, C. F., MIKI, T., WEISSMAN, S. M., LOVETT, M., COLLINS, F. S. & SHILOH, Y. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* **268**, 1749-53.
- SCHAEFFER, L., MONCOLLIN, V., ROY, R., STAUB, A., MEZZINA, M., SARASIN, A., WEEDA, G., HOEIJMAKERS, J. H. & EGLY, J. M. (1994). The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *Embo J* **13**, 2388-92.
- SCHAEFFER, L., ROY, R., HUMBERT, S., MONCOLLIN, V., VERMEULEN, W., HOEIJMAKERS, J. H., CHAMBON, P. & EGLY, J. M. (1993). DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science* **260**, 58-63.
- SCHATTEN, G., SCHATTEN, H., SPECTOR, I., CLINE, C., PAWELETZ, N., SIMERLY, C. & PETZELT, C. (1986). Latrunculin inhibits the microfilament-mediated processes during fertilization, cleavage and early development in sea urchins and mice. *Exp Cell Res* **166**, 191-208.
- SCHMIDT, A. & HALL, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **16**, 1587-609.
- SEBTI, S. M., TKALCEVIC, G. T. & JANI, J. P. (1991). Lovastatin, a cholesterol biosynthesis inhibitor, inhibits the growth of human H-ras oncogene transformed cells in nude mice. *Cancer Commun* **3**, 141-7.
- SEGER, R. & KREBS, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *Faseb J* **9**, 726-35.
- SHANGARY, S., LERNER, E. C., ZHAN, Q., COREY, S. J., SMITHGALL, T. E. & BASKARAN, R. (2003). Lyn regulates the cell death response to ultraviolet radiation through c-Jun N terminal kinase-dependent Fas ligand activation. *Exp Cell Res* **289**, 67-76.
- SHEN, Z., CLOUD, K. G., CHEN, D. J. & PARK, M. S. (1996). Specific interactions between the human RAD51 and RAD52 proteins. *J Biol Chem* **271**, 148-52.
- SHILOH, Y. (2001). ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 71-7.
- SHILOH, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**, 155-68.
- SHILOH, Y. (2006). The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci* **31**, 402-10.
- SIJBERS, A. M., VAN DER SPEK, P. J., ODIJK, H., VAN DEN BERG, J., VAN DUIN, M., WESTERVELD, A., JASPERS, N. G., BOOTSMA, D. & HOEIJMAKERS, J. H. (1996). Mutational analysis of the human nucleotide excision repair gene ERCC1. *Nucleic Acids Res* **24**, 3370-80.
- SIPLEY, J. D., MENNINGER, J. C., HARTLEY, K. O., WARD, D. C., JACKSON, S. P. & ANDERSON, C. W. (1995). Gene for the catalytic subunit of the human DNA-activated protein kinase maps to the site of the XRCC7 gene on chromosome 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7515-9.
- SMITH, G. C., CARY, R. B., LAKIN, N. D., HANN, B. C., TEO, S. H., CHEN, D. J. & JACKSON, S. P. (1999). Purification and DNA binding properties of the ataxia-telangiectasia gene product ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11134-9.
- SMITH, G. C. & JACKSON, S. P. (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* **13**, 916-34.

- SONODA, E., TAKATA, M., YAMASHITA, Y. M., MORRISON, C. & TAKEDA, S. (2001). Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8388-94.
- SORENSEN, C. M. & EASTMAN, A. (1988). Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* **48**, 6703-7.
- SPECTOR, I., SHOCHET, N. R., BLASBERGER, D. & KASHMAN, Y. (1989). Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton* **13**, 127-44.
- SPECTOR, I., SHOCHET, N. R., KASHMAN, Y. & GROWEISS, A. (1983). Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* **219**, 493-5.
- STASIAK, A. Z., LARQUET, E., STASIAK, A., MULLER, S., ENGEL, A., VAN DYCK, E., WEST, S. C. & EGELMAN, E. H. (2000). The human Rad52 protein exists as a heptameric ring. *Curr Biol* **10**, 337-40.
- STROZYK, E., POPPELMANN, B., SCHWARZ, T. & KULMS, D. (2006). Differential effects of NF-kappaB on apoptosis induced by DNA-damaging agents: the type of DNA damage determines the final outcome. *Oncogene* **25**, 6239-51.
- SUGASAWA, K., NG, J. M., MASUTANI, C., IWAI, S., VAN DER SPEK, P. J., EKER, A. P., HANAOKA, F., BOOTSMA, D. & HOEIJMAKERS, J. H. (1998). Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell* **2**, 223-32.
- SVEJSTRUP, J. Q. (2003). Rescue of arrested RNA polymerase II complexes. *J Cell Sci* **116**, 447-51.
- TAKAI, Y., KAIBUCHI, K., KIKUCHI, A., SASAKI, T. & SHIRATAKI, H. (1993). Regulators of small GTPases. *Ciba Found Symp* **176**, 128-38; discussion 138-46.
- TAKAI, Y., SASAKI, T. & MATOZAKI, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208.
- TAKARA, K., SAKAEDA, T. & OKUMURA, K. (2006). An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Curr Pharm Des* **12**, 273-86.
- TAKATA, M., SASAKI, M. S., SONODA, E., MORRISON, C., HASHIMOTO, M., UTSUMI, H., YAMAGUCHI-IWAI, Y., SHINOHARA, A. & TAKEDA, S. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo J* **17**, 5497-508.
- TANAKA, K., MIURA, N., SATOKATA, I., MIYAMOTO, I., YOSHIDA, M. C., SATOH, Y., KONDO, S., YASUI, A., OKAYAMA, H. & OKADA, Y. (1990). Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain. *Nature* **348**, 73-6.
- TANG, J. & CHU, G. (2002). Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein. *DNA Repair (Amst)* **1**, 601-16.
- TAYLOR, J. S., LU, H. F. & KOTYK, J. J. (1990). Quantitative conversion of the (6-4) photoproduct of TpdC to its Dewar valence isomer upon exposure to simulated sunlight. *Photochem Photobiol* **51**, 161-7.
- TOURNIER, C., WHITMARSH, A. J., CAVANAGH, J., BARRETT, T. & DAVIS, R. J. (1997). Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7337-42.
- TROELSTRA, C., VAN GOOL, A., DE WIT, J., VERMEULEN, W., BOOTSMA, D. & HOEIJMAKERS, J. H. (1992). ERCC6, a member of a subfamily of putative helicases, is involved in Cockayne's syndrome and preferential repair of active genes. *Cell* **71**, 939-53.
- VASILEVSKAYA, I. & O'DWYER, P. J. (2003). Role of Jun and Jun kinase in resistance of cancer cells to therapy. *Drug Resist Updat* **6**, 147-56.
- VENEMA, J., VAN HOFFEN, A., KARCAGI, V., NATARAJAN, A. T., VAN ZEELAND, A. A. & MULLENDERS, L. H. (1991). Xeroderma pigmentosum complementation group C cells remove pyrimidine dimers selectively from the transcribed strand of active genes. *Mol Cell Biol* **11**, 4128-34.
- VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H. & REUTELINGSPERGER, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **184**, 39-51.
- WAGNER, E. D., RAYBURN, A. L., ANDERSON, D. & PLEWA, M. J. (1998). Calibration of the single cell gel electrophoresis assay, flow cytometry analysis and forward mutation in Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis* **13**, 81-4.
- WANG, E., CASCIANO, C. N., CLEMENT, R. P. & JOHNSON, W. W. (2001). HMG-CoA reductase inhibitors (statins) characterized as direct inhibitors of P-glycoprotein. *Pharm Res* **18**, 800-6.

- WIDMANN, C., GIBSON, S., JARPE, M. B. & JOHNSON, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**, 143-80.
- WILHELM, D., BENDER, K., KNEBEL, A. & ANGEL, P. (1997). The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including Jun N-terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents. *Mol Cell Biol* **17**, 4792-800.
- WONG, W. W., TAN, M. M., XIA, Z., DIMITROULAKOS, J., MINDEN, M. D. & PENN, L. Z. (2001). Cerivastatin triggers tumor-specific apoptosis with higher efficacy than lovastatin. *Clin Cancer Res* **7**, 2067-75.
- WOOD, R. D. (1999). DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochimie* **81**, 39-44.
- WOZNIAK, K., BLASIAK, J. (2002). Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts. In *Acta Biochimica Polonica*, vol. 49, pp. 583-596.
- WU, Z., WU, J., JACINTO, E. & KARIN, M. (1997). Molecular cloning and characterization of human JNKK2, a novel Jun NH2-terminal kinase-specific kinase. *Mol Cell Biol* **17**, 7407-16.
- XIAO, Z., CHEN, Z., GUNASEKERA, A. H., SOWIN, T. J., ROSENBERG, S. H., FESIK, S. & ZHANG, H. (2003). Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem* **278**, 21767-73.
- XU, W., CHU, Y., ZHANG, R., XU, H., WANG, Y. & XIONG, S. (2005). Endoplasmic reticulum targeting sequence enhances HBV-specific cytotoxic T lymphocytes induced by a CTL epitope-based DNA vaccine. *Virology* **334**, 255-63.
- YANG, D. D., KUAN, C. Y., WHITMARSH, A. J., RINCON, M., ZHENG, T. S., DAVIS, R. J., RAKIC, P. & FLAVELL, R. A. (1997). Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* **389**, 865-70.
- YANG, X. H. & ZOU, L. (2006). Recruitment of ATR-ATRIP, Rad17, and 9-1-1 complexes to DNA damage. *Methods Enzymol* **409**, 118-31.
- YAO, Z., DIENER, K., WANG, X. S., ZUKOWSKI, M., MATSUMOTO, G., ZHOU, G., MO, R., SASAKI, T., NISHINA, H., HUI, C. C., TAN, T. H., WOODGETT, J. P. & PENNINGER, J. M. (1997). Activation of stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal protein kinases (SAPKs/JNKs) by a novel mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* **272**, 32378-83.
- YOSHIDA, K., WEICHELBAUM, R., KHARBANDA, S., KUFE, D. (2000). Role for Lyn Tyrosine Kinase as a Regulator of Stress-Activated Protein Kinase Activity in response to DNA Damage. In *Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, pp. 5370-5380.
- YUAN, Z. M., HUANG, Y., WHANG, Y., SAWYERS, C., WEICHELBAUM, R., KHARBANDA, S. & KUFE, D. (1996). Role for c-Abl tyrosine kinase in growth arrest response to DNA damage. *Nature* **382**, 272-4.
- ZANKE, B. W., BOUDREAU, K., RUBIE, E., WINNETT, E., TIBBLES, L. A., ZON, L., KYRIAKIS, J., LIU, F. F. & WOODGETT, J. R. (1996). The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr Biol* **6**, 606-13.
- ZHANG, N., CHEN, P., KHANNA, K. K., SCOTT, S., GATEI, M., KOZLOV, S., WATTERS, D., SPRING, K., YEN, T. & LAVIN, M. F. (1997). Isolation of full-length ATM cDNA and correction of the ataxia-telangiectasia cellular phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8021-6.
- ZHANG, Y., MA, W. Y., KAJI, A., BODE, A. M. & DONG, Z. (2002). Requirement of ATM in UVA-induced signaling and apoptosis. *J Biol Chem* **277**, 3124-31.
- ZOU, L. & ELLEDGE, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**, 1542-8.
- ZUNINO, F. & CAPRANICO, G. (1990). DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines. *Anticancer Drug Des* **5**, 307-17.

## 7 Veröffentlichungen

### Publikationen

**Damrot, J., Nuebel, T., Epe, B., Roos, W.P., Kaina, B., Fritz, G.** (2006) Lovastatin protects human endothelial cells from the genotoxic and cytotoxic effects of the anticancer drugs doxorubicin and etoposide. *Br J Pharmacol*, 149, 988-97

Nuebel, T., **Damrot, J.**, Roos, W.P., Kaina, B., Fritz, G. (2006) Lovastatin protects human endothelial cells from killing by ionizing radiation without impairing induction and repair of DNA double-strand breaks. *Clin Cancer Res*, 12, 933-9

### Vorträge

**Damrot, J., Kaina, B., Fritz, G.:**

DNA damage-dependent late activation of Stress-Kinases (SAPK/JNK) by DNA Crosslinking Agents.

DGPT Tagung (Deutsche Gesellschaft Pharmakologen und Toxikologen) 2008, Mainz

**Damrot, J., Kaina, B., Fritz, G.:**

DNA-damage induced activation of stress-kinases (SAPK/JNK) is agent specific and regulated by different repair factors.

DGPT Tagung (Deutsche Gesellschaft Pharmakologen und Toxikologen) 2006, Mainz

### Poster Präsentationen

**Damrot, J., Fritz, G.:**

Activation of Stress-Kinases by Genotoxins.

FEBS Kongress 2007, Wien, Österreich

**Damrot, J., Kaina, B., Fritz, G.:**

Multiple DNA repair factors are involved in genotoxin-induced signaling to stress kinases (SAPK/JNK).

DNA Repair Network 2006, Hamburg, Germany

**Fritz, G., Damrot, J., Nübel, T., Kaina, B.:**

The HMG-CoA-reductase inhibitor lovastatin reduces the susceptibility of human endothelial cells (HUVEC) to the anticancer drug doxorubicin.

DNA Repair Network 2006, Hamburg, Germany

**Damrot, J., Nübel, T., Kaina, B., Fritz, G.:**

Statins protect human endothelial cells (HUVEC) from doxorubicin-induced cytotoxicity.

DGPT Tagung (Deutsche Gesellschaft Pharmakologen und Toxikologen) 2006, Mainz

**Damrot, J., Nübel, T., Kaina, B., Fritz, G.:**

Statins interfere with ionizing radiation-induced stress-response and apoptosis of human endothelial cells.

DGPT Tagung (Deutsche Gesellschaft Pharmakologen und Toxikologen) 2005, Mainz

**Damrot, J., Nübel, T., Kaina, B., Fritz, G. :**

Pleiotropic effects of statins on ionizing radiation-inducible cellular stress responses and apoptosis.

DNA Repair Network 2004, Ulm, Germany

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celcius
ca.	zirka
Caspase	Cystein - abhängiges, Aspartat - spezifisches Enzym
CD 95	Cluster of differentiation 95
cDNA	"copy" - Desoxyribonukleinsäure
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Doxo	Doxorubicin
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK-2	extracellular signal regulated kinase 2
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	fluorescence activated cell sorter
FBS/ FCS	fetal bovine / calf serum (fötales Rinder- / Kälberserum)
FITC	Fluorescein - Isothiocyanat
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd - 3 - Phosphat - Dehydrogenase
GTP	Guanosin - 5' - Triphosphat
Gy	Gray
h	Stunde(n)
HEPES	N - 2 - Hydroxyethylpiperazin - N - 2 - Ethansulfonsäure
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl - CoenzymA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IgG	Immunoglobulin G
IR	ionizing radiation (ionisierende Strahlung)
J	Joule
k	Kilo
kB	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
Kon	Kontrolle
Lova	Lovastatin
M	molar
LMP	Agarose low melting point Agarose (Agarose mit niederem Schmelzpunkt)
m	milli / Meter
MAPK	mitogen - activated protein kinase
MEK	mitogen - activated ERK activating kinase

min	Minute(n)
µl	Mikroliter
mRNA	messenger RNA
n	nano
ml	Milliliter
OD	optische Dichte
p	phospho
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaction
PI	Propidiumiodid
Rac	Ras - related C3 - botulinum toxin substrate
Rho	Ras homolog
RLU	relative light units
RNase	Ribonuklease
RT	Zimmertemperatur/ Reverse Transkriptase
RNA	Ribonukleinsäure
SAPK/JNK	stress - activated protein kinase, c-Jun-N-terminale Kinase
SDS	Natrium(Sodium)dodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris - Borat - EDTA - Puffer
TE	Tris - EDTA - Puffer
Tris	Tris - (Hydroxymethyl) - Aminoethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
ü.N./üN	über Nacht
UV-C	Ultraviolette Strahlung, Wellenlänge= 200 - 280 nm
V	Volt
(v/v)	volume per volume
Vol.	Volumen
WST	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzendisulfonat
wt / WT	Wildtyp
(w/v)	weight per volume