

**Untersuchungen molekularer Mechanismen und funktioneller
Konsequenzen der DNA-Schädigung durch oxidativen Stress in
Tumorzellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genemigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biol. Diana Walluscheck

geb. am 03.06.1981 in Stendal

Gutachter: Prof. Dr. med. Albert Roessner
Prof. Dr. rer. nat. Manfred Schwab

eingereicht am: 26.08.2013

verteidigt am: 16.06.2014

Für meine „Felsen in der Brandung“

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
TABELLENVERZEICHNIS	10
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	11
1 EINLEITUNG	15
1.1 KREBS	15
1.1.1 Darmkrebs	15
1.1.2 Lungenkrebs	16
1.1.3 Speiseröhrenkrebs	17
1.1.4 Angewendete Therapien	19
1.2 OXIDATIVER STRESS	20
1.2.1 ROS-generierende Therapieformen	23
1.2.2 Folgen oxidativen Stresses	25
1.2.2.1 DNA-Schäden	27
1.2.2.2 Zellzyklusarrest	28
1.2.2.3 Zelltod	32
1.2.3 Überwindung der Resistenz bei der oxidativen stressinduzierenden Therapie durch Ausschalten von DNA-Schadens-Checkpoint-Proteinen	36
1.3 ZIELSTELLUNG	40
2 MATERIAL UND METHODEN	41
2.1 MATERIALIEN	41
2.1.1 Chemikalien	41
2.1.2 Gebrauchsmaterialien	42
2.1.3 Verwendete Kits	43
2.1.4 Geräte	44

2.1.5	Lösungen und Puffer	45
2.1.6	Marker und Standards	48
2.1.7	Oligonukleotide	48
2.1.8	Zellkulturen	48
2.1.9	Medien und Zusätze	49
2.1.10	Enzyme	49
2.1.11	Inhibitoren	50
2.1.12	Antikörper	50
2.1.13	Reagenzien für die siRNA-Transfektion (Knockdown)	52
2.2	METHODEN	52
2.2.1	Zellbiologische Methoden	52
2.2.1.1	Kultivierung humaner Karzinomzelllinien	52
2.2.1.2	Aufbewahrung und Reaktivierung der Zellen	54
2.2.1.3	Behandlung mit H ₂ O ₂ , PQ, CDBN und SP600125	54
2.2.1.4	Proteinextraktion aus Zellen	55
2.2.1.5	Kolorimetrischer BrdU-Zellproliferations-Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)	55
2.2.1.6	Propidiumiodid-(PI)-Färbung	55
2.2.1.7	Annexin-V-FITC- und PI-Färbung	56
2.2.1.8	siRNA-Transfektion (Knockdown)	57
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	58
2.2.2.1	DNA-Analytik	58
2.2.2.1.1	DNA-Präparation aus Zellen	58
2.2.2.1.2	DNA-Konzentrationsmessung	58
2.2.2.1.3	Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	58
2.2.2.1.4	Native Agarose-Gelelektrophorese	60
2.2.2.1.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Silberfärbung	60
2.2.2.1.6	Comet Assay	61
2.2.2.2	RNA-Analytik	62
2.2.2.2.1	Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen	62

2.2.2.2.2	RNA-Konzentrationsmessung	62
2.2.2.2.3	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	63
2.2.2.2.4	Reverse Transkription	63
2.2.2.2.5	cDNA-Array-Analyse	64
2.2.2.2.6	RT ² -Profiler™-PCR-Array	65
2.2.3	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	66
2.2.3.1	Western Blot	66
2.2.3.1.1	Proteinquantifizierung	66
2.2.3.1.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	67
2.2.3.1.3	Proteintransfer	67
2.2.3.1.4	Ponceau-S-Färbung der Proteine auf Nitrozellulosemembranen	68
2.2.3.1.5	Antikörperinkubation und Chemilumineszenzdetektion	68
2.2.3.1.6	Stripping und Wiederverwendung der Membranen	69
2.2.3.2	Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP)	69
2.2.3.3	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	70
2.2.3.4	Immunzytochemische Analysen durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Zellen	73
2.2.4	<i>Verwendete Programme</i>	74
2.2.5	<i>Verwendete Datenbanken</i>	74
2.2.6	<i>Statistik</i>	74
3	ERGEBNISSE	75
3.1	ERMITTLUNG EINER ZELLTODRESISTENTEN KARZINOMZELLINIE MIT ZELLYKLUSARREST	75
3.1.1	<i>Folgen H₂O₂-induzierten Stresses</i>	75
3.1.1.1	Nachweis von DNA-Schäden	75
3.1.1.2	Nachweis von Zellzyklusarresten	76
3.1.1.3	Nachweis von Zelltod	77
3.1.1.3.1	Morphologie	77
3.1.1.3.2	Gesamtzelltodnachweis	78
3.1.1.3.3	Caspase-3-Spaltung – Nachweis Caspase-3-abhängiger Apoptose	78
3.1.2	<i>p53-Expression in den unbehandelten und H₂O₂-behandelten Karzinomzellen</i>	79

3.2	DETAILIERTE UNTERSUCHUNGEN AN DER ÖSOPHAGEALEN KARZINOMZELLINIE TE-7	81
3.2.1	<i>Molekulare Mechanismen der H₂O₂-induzierten DNA-Schäden, Zellzyklusarreste und des Zelltods</i>	81
3.2.1.1	DNA-Schäden	81
3.2.1.1.1	Nachweis verschiedener DNA-Schäden mittels Comet Assay	81
3.2.1.1.2	Nachweis von γ -H2AX	82
3.2.1.1.3	Nachweis von aktiviertem Chk1	84
3.2.1.2	Zellzyklusarrest	84
3.2.1.2.1	Kinetik der Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen	85
3.2.1.2.2	Expression des Zellzyklusinhibitorproteins p21 ^{WAF1}	85
3.2.1.2.3	Expression des Zellzyklusregulatorproteins Zyklin D1 und Nachweis des Mitosemarkers p-H3 ^{Ser10}	86
3.2.1.3	Proliferationsverhalten und Zelltod	87
3.2.1.3.1	Proliferation	87
3.2.1.3.2	Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen	88
3.2.1.3.3	BAX/Bcl-2-Verhältnis	89
3.2.1.3.4	Caspase-8-, 9- und 3-Spaltung – Apoptoseinduktion	90
3.2.2	<i>Identifizierung eines DNA-Schaden-, Zellzyklus- und Apoptose-regulierenden zentralen Proteins</i>	91
3.2.2.1	Analyse der differentiellen mRNA-Expression	91
3.2.2.1.1	Ermittlung eines transkriptionell aktivierten Gens involviert in DNA-Schadens-, Zellzyklus- und Apoptoseregulation	91
3.2.2.1.2	Ermittlung der transkriptionellen Aktivierung der upstream vom ATF-2 gelegenen Signaltransduktionsgene	94
3.2.2.2	Analyse der Proteinexpression und Aktivierung der MAPKs und des ATF-2	95
3.2.2.2.1	MAPKs	95
3.2.2.2.2	ATF-2	96
3.2.2.2.3	c-Jun und p300/CBP	98
3.2.2.2.4	Interaktionspartner des p-ATF-2 ^{Thr69/71} : p-c-Jun ^{Ser73} und p300/CBP	100
3.2.2.3	Prüfung des ATF-2-Knockdown als Mechanismus zum Umschalten vom Zellzyklusarrest zum Zelltod	100

3.2.2.3.1	Einfluss des ATF-2-Knockdown auf die Zellzyklusarrestinduktion	101
3.2.2.3.2	Einfluss des ATF-2-Knockdown auf die Zelltodinduktion	102
A)	Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen	102
B)	Caspase-3-Spaltung – Caspase-3-abhängige Apoptoseinduktion	103
3.2.2.4	Funktion des ATF-2 in der Expression des Zellzyklusregulators p21 ^{WAF1} und seines Interaktionspartners c-Jun	103
3.2.2.4.1	Expression von p21 ^{WAF1} und c-Jun nach ATF-2-Knockdown	103
3.2.2.4.2	Aktivierung von ATF-2 und c-Jun sowie Expression des p21 ^{WAF1} nach JNK-Inhibierung	105
3.2.2.4.3	Identifizierung potentieller ATF-2-Bindestellen im p21 ^{WAF1} -Promotor	106
3.2.2.4.4	Nachweis der Bindung des p-ATF-2 ^{Thr69/71} im p21 ^{WAF1} -Promotor mittels CHIP	107
3.3	ALLGEMEINGÜLTIGKEITSPRÜFUNG DES ENTDECKTEN MECHANISMUS	109
3.3.1	<i>CDNB-induzierter oxidativer Stress in der Karzinomzelllinie TE-7</i>	109
3.3.1.1	Proliferationsverhalten	109
3.3.1.2	DNA-Schäden, p-ATF-2 ^{Thr69/71} -Level, ATF-2- und p21 ^{WAF1} -Expression	110
3.3.1.3	Einfluss des ATF-2-Knockdown auf die Zellzyklusprogression	111
3.3.1.4	Einfluss des ATF-2-Knockdown auf den Zelltod	112
3.3.1.4.1	Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen	112
3.3.1.4.2	Caspase-3-Spaltung – Caspase-3-abhängige Apoptoseinduktion	113
3.3.2	<i>Ausblick</i>	114
3.3.2.1	Aktivierung und Expression von ATF-2 und p21 ^{WAF1} -Level nach H ₂ O ₂ -Behandlung in den Karzinomzelllinien OE-33, SEG-1 und BIC-1	114
3.3.2.2	Aktivierung und Expression von ATF-2 und p21 ^{WAF1} -Level nach Behandlung mit PQ bzw. CDNB in TE-7 und OE-33	116
4	DISKUSSION	118
4.1	REAKTIONEN DER UNTERSUCHTEN KARZINOMZELLEN UNTERSCHIEDLICHEN GEWEBEURSPRUNGS AUF H ₂ O ₂	118
4.1.1	<i>Zelltodresistenz</i>	118
4.1.2	<i>Induktion von DNA-Schäden</i>	119
4.1.3	<i>TP53-Status und p53-Expression</i>	120
4.1.4	<i>p53-abhängige oder -unabhängige Zellzyklusarreste</i>	121
4.1.5	<i>p53-abhängiger oder -unabhängiger Zelltod</i>	122

Inhaltsverzeichnis

4.2	ERMITTELTEN MOLEKULARER MECHANISMUS DER H ₂ O ₂ -ZELLTODRESISTENZ DER TE-7-ZELLEN	126
4.2.1	<i>DNA-Schäden, Zellzyklusarrest und geringer Zelltod nach H₂O₂-Behandlung</i>	126
4.2.1.1	DNA-Schäden und Zellzyklusarrest	126
4.2.1.2	Zelltod	127
4.2.2	<i>Identifizierung von ATF-2 als potentielles Target zur Erhöhung der Zelltodsensitivität</i>	128
4.2.2.1	Upstream-Signalwege von ATF-2	130
4.2.2.2	Aktivierung von ATF-2	131
4.2.2.3	Targets von ATF-2	132
4.3	ATF-2-KNOCKDOWN-FOLGEN IN DER H ₂ O ₂ -ANTWORT: REDUKTION DES G2-ARRESTS UND ERHÖHTER ZELLTOD	133
4.3.1	<i>Reduzierter G2-Arrest</i>	133
4.3.2	<i>Erhöhter Zelltod</i>	134
4.3.2.1	Apoptose	134
4.3.2.2	Nekrose	135
4.4	AUSBLICK - VORSCHLAG FÜR EINEN ALLGEMEINGÜLTIGEN MECHANISMUS NACH INDUKTION VON OXIDATIVEM STRESS IN KARZINOMZELLEN	139
5	ZUSAMMENFASSUNG	142
6	SUMMARY	143
7	LITERATURVERZEICHNIS	144
8	ANHANG	164
	DANKSAGUNG	176
	LEBENS LAUF	177
	PUBLIKATIONEN	178
	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	179

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Metabolische Wege von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	22
Abb. 2:	Oxidativer Stress: Ungleichgewicht zwischen Pro- (OX) und Antioxidantien (AOX)	23
Abb. 3:	Folgen von oxidativem Stress durch ROS	26
Abb. 4:	Schematische Darstellung der Zellzyklusphasen mit Kontrollpunkten (Checkpoints) und regulierenden Proteinen	29
Abb. 5:	G1- und G2-Checkpoint-Regulation nach ATM/ATR-Aktivierung	30
Abb. 6:	Extrinsischer (A) und intrinsischer (B) Apoptosesignalweg	35
Abb. 7:	Verbesserung der oxidativen stressinduzierenden Therapie durch Inhibierung/Inaktivierung von Checkpoint-Proteinen	39
Abb. 8:	DNA-Scheranalyse nach Ultraschallbehandlung auf einem 1 %igen Agarosegel	71
Abb. 9:	Nachweis des γ -H2AX und H2AX in den Zellen der Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1 24 h nach H ₂ O ₂ -Behandlung	76
Abb. 10:	Prozentuale Verteilung der TE-7-, OE-33-, SEG-1- und BIC-1-Karzinomzellen in den einzelnen Zellzyklusphasen 24 h nach H ₂ O ₂ -Behandlung	77
Abb. 11:	Prozentualer Anteil toter und lebender Zellen der Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1 24 h nach H ₂ O ₂ -Behandlung	78
Abb. 12:	Nachweis der Caspase-3-Spaltung in den Zellen der Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1 24 h nach H ₂ O ₂ -Behandlung	79
Abb. 13:	p53-Expression in unbehandelten Zellen der Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1	80
Abb. 14:	p53-Expression nach H ₂ O ₂ -Behandlung in den Zellen der Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1 (24-h-Kinetik)	80
Abb. 15:	Comet Assay mit den TE-7-Zellen 3 und 24 h nach der H ₂ O ₂ -Behandlung	82
Abb. 16:	Nachweis des γ -H2AX und des p-Chk1 ^{Ser317} sowie der Gesamtproteine H2AX und Chk1 in TE-7-Zellen nach der H ₂ O ₂ -Behandlung (24-h-Kinetik)	83
Abb. 17:	Immunzytochemischer Nachweis des γ -H2AX in den TE-7-Zellen 6 und 24 h nach der H ₂ O ₂ -Behandlung	84
Abb. 18:	Verteilung der TE-7-Zellen in den Zellzyklusphasen 1, 3, 6, 12 und 24 h nach der H ₂ O ₂ -Behandlung (250 μ M)	85
Abb. 19:	p21 ^{WAF1} -Expression in den TE-7-Zellen nach der H ₂ O ₂ -Behandlung (24-h-Kinetik)	86
Abb. 20:	Zyklin-D1-Expression und Nachweis des p-H3 ^{Ser10} nach der H ₂ O ₂ -Behandlung in TE-7-Zellen (24-h-Kinetik)	86
Abb. 21:	Zellproliferationsverhalten der TE-7-Zellen 24 h nach der H ₂ O ₂ -Behandlung	87

Abb. 22:	Lebende, apoptotische und nekrotische Zellpopulationen der Karzinomzelllinie TE-7 24 h nach der Behandlung mit unterschiedlichen H ₂ O ₂ -Konzentrationen	88
Abb. 23:	Lebende, apoptotische und nekrotische Zellpopulationen der Karzinomzelllinie TE-7 48 h nach der Behandlung mit H ₂ O ₂	89
Abb. 24:	BAX- und Bcl-2-Expression in TE-7-Zellen nach der H ₂ O ₂ -Behandlung (24-h-Kinetik)	90
Abb. 25:	Nachweis der Caspase-9-, 8- und 3-Spaltung in den TE-7-Zellen nach der H ₂ O ₂ -Behandlung (24-h-Kinetik)	90
Abb. 26:	Venn-Diagramm – Einordnung der H ₂ O ₂ -induzierten Gene der Karzinomzelllinie TE-7 in DNA-Schadens-, Zellzyklus- und Apoptoseregulationsprozesse	93
Abb. 27:	Expression der MAPKs JNK, p38 und ERK und deren Aktivierung in TE-7-Zellen nach der H ₂ O ₂ -Behandlung (24-h-Kinetik)	96
Abb. 28:	Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ATF-2 an den Thr 69 und 71 ist für dessen Lokalisationsänderung und Aktivierung erforderlich.	97
Abb. 29:	Proteinexpression und Aktivierung des ATF-2 in TE-7-Zellen nach der H ₂ O ₂ -Behandlung (24-h-Kinetik)	97
Abb. 30:	ATF-2-Lokalisation durch immunzytochemische Färbung der TE-7-Zellen 1 h nach der H ₂ O ₂ -Behandlung	98
Abb. 31:	Proteinexpression und Aktivierung von c-Jun und Proteinexpression von p300/CBP in TE-7-Zellen nach der H ₂ O ₂ -Behandlung (24-h-Kinetik)	99
Abb. 32:	Nachweis der Interaktion zwischen p-ATF-2 ^{Thr69/71} und p-c-Jun ^{Ser73} bzw. p300/CBP mittels Ko-IP mit dem Antikörper Anti-p-ATF-2 ^{Thr69/71} in TE-7-Zellen 1, 3 und 6 h nach der H ₂ O ₂ -Behandlung	100
Abb. 33:	Beeinflussung der Zellzahl in den Zellzyklusphasen der Zelllinie TE-7 24 h nach ATF-2-si-RNA-Transfektion und H ₂ O ₂ -Behandlung	101
Abb. 34:	Lebende, apoptotische und nekrotische Zellpopulationen der Karzinomzelllinie TE-7 24 h nach ATF-2-siRNA-Transfektion und H ₂ O ₂ -Behandlung	102
Abb. 35:	Caspase-3-Spaltung in den TE-7-Zellen 12 und 24 h nach ATF-2-siRNA-Transfektion und H ₂ O ₂ -Behandlung	103
Abb. 36:	p-ATF-2 ^{Thr69/71} -Level und Proteinexpression von ATF-2, p21 ^{WAF1} und c-Jun 3, 6, 12 und 24 h nach ATF-2-siRNA-Transfektion und H ₂ O ₂ -Behandlung in den TE-7-Zellen	104
Abb. 37:	Expression von ATF-2, c-Jun und p21 ^{WAF1} sowie Level der aktivierten Formen des ATF-2 und c-Jun 1, 3, 6, 12 und 24 h nach der Inhibierung der JNK-MAPKs und H ₂ O ₂ -Behandlung in den TE-7-Zellen	105
Abb. 38:	Anti-p-ATF-2 ^{Thr69/71} -ChIP mit TE-7-Zellen nach der H ₂ O ₂ -Behandlung	108
Abb. 39:	Zellproliferationsverhalten der TE-7-Zellen 24 h nach der CDNB-Behandlung	110
Abb. 40:	γ-H2AX- und p-ATF-2 ^{Thr69/71} -Level und Expression von H2AX, ATF-2 und p21 ^{WAF1} in TE-7-Zellen nach CDNB-Behandlung (24-h-Kinetik)	111

Abbildungsverzeichnis

Abb. 41: Beeinflussung der Zellzahl in den Zellzyklusphasen der Karzinomzelllinie TE-7 24 h nach ATF-2-si-RNA-Transfektion und CDNB-Behandlung	112
Abb. 42: Lebende, apoptotische und nekrotische Zellpopulationen der Karzinomzelllinie TE-7 24 h nach ATF-2-si-RNA-Transfektion und CDNB-Behandlung	113
Abb. 43: Caspase-3-Spaltung 12 und 24 h nach ATF-2-si-RNA-Transfektion und CDNB-Behandlung in TE-7-Zellen	114
Abb. 44: Aktivierung und Expression von ATF-2 und p21 ^{WAF1} -Level in den Karzinomzelllinien OE-33, SEG-1 und BIC-1 nach H ₂ O ₂ -Behandlung (24-h-Kinetik)	115
Abb. 45: Aktivierung und Expression von ATF-2 sowie p21 ^{WAF1} , γ - und H2AX-Level in den Karzinomzelllinien TE-7 und OE-33 nach PQ- bzw. CDNB-Behandlung (24-h-Kinetik)	117
Abb. 46: Induktion unterschiedlicher Zellzyklusprogressions- und Zelltodantworten der Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1 gegenüber der H ₂ O ₂ -Behandlung (250 μ M) in Abhängigkeit vom TP53-Status	124
Abb. 47: ATF-2-Protein	129
Abb. 48: ATF-2-Bindestellen im p21 ^{WAF1} -Promotor	133
Abb. 49: Ermittelte molekularer Mechanismus der H ₂ O ₂ -Antwort in der Karzinomzelllinie TE-7	136
Abb. 50: Vorschlag für die Verbesserung von oxidativen stressinduzierenden Therapien	138

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	<i>Herkunft der verwendeten Chemikalien</i>	41
Tab. 2:	<i>Herkunft der verwendeten Gebrauchsmaterialien</i>	42
Tab. 3:	<i>Herkunft der verwendeten Kits</i>	43
Tab. 4:	<i>Herkunft der verwendeten Geräte</i>	44
Tab. 5:	<i>Herkunft der verwendeten Lösungen und Puffer</i>	45
Tab. 6:	<i>Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer</i>	46
Tab. 7:	<i>Herkunft der verwendeten Marker und Standards</i>	48
Tab. 8:	<i>Sequenzen der verwendeten Primer</i>	48
Tab. 9:	<i>Gewebsursprung und Herkunft der verwendeten humanen Karzinomzelllinien</i>	48
Tab. 10:	<i>Herkunft der verwendeten Medien und Zusätze</i>	49
Tab. 11:	<i>Herkunft der verwendeten Enzyme</i>	49
Tab. 12:	<i>Herkunft der verwendeten Inhibitoren</i>	50
Tab. 13:	<i>Verwendete Primärantikörper für die Methode des Western Blot</i>	50
Tab. 14:	<i>Verwendete Sekundärantikörper für die Methode des Western Blot</i>	51
Tab. 15:	<i>Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für immunzytochemische Färbungen</i>	51
Tab. 16:	<i>Primär- und Sekundärantikörper in Ihrer Verdünnung für immunzytochemischen Färbungen</i>	52
Tab. 17:	<i>Zusammensetzung der kompletten Nährmedien der verwendeten Karzinomzelllinien</i>	53
Tab. 18:	<i>Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes unter Verwendung des dNTP-Mixes und der Taq-Polymerase des Taq PCR core Kit sowie des 10x PCR-Puffers von Active Motif</i>	59
Tab. 19:	<i>PCR-Programm</i>	59
Tab. 20:	<i>Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele</i>	67
Tab. 21:	<i>Zusammensetzung des Immunpräzipitationsansatzes</i>	72
Tab. 22:	<i>Übersicht der verwendeten Programme</i>	74
Tab. 23:	<i>Übersicht der verwendeten Datenbanken</i>	74
Tab. 24:	<i>Einordnung der differentiell exprimierten Gene H₂O₂-behandelter TE-7-Zellen in KEGG-Signalwege</i>	92
Tab. 25:	<i>Anzahl der Literaturquellen für die 15 in DNA-Schadens-, Zellzyklus- und Apoptoseregulation involvierten H₂O₂-induzierten Gene im Zusammenhang mit Ösophaguskarzinomen aus der Datenbank Pubmed</i>	94

Abkürzungsverzeichnis

↑	Überexpression	Casp/Caspasen	Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen
+ 1	Transkriptionsstart		
A	Adenin	CBP	<i>CREB binding protein</i>
ACTB	β-Aktin	Cdc2	<i>cell division cycle 2</i>
ADP	Adenosindiphosphat	Cdc25A/C	<i>cell division cycle 25A/C</i>
AMV	<i>avian myeloblastosis virus</i>	Cdk	<i>cyclin-dependent kinase</i>
AOX	Antioxidantien	CDKN1A	<i>Cdk inhibitor 1A (p21^{WAF1})</i>
AP-	<i>apurinic bzw. apyrimidinic-</i>	CDKN1C	<i>p57^{KIP2}</i>
AP-1	<i>activator protein 1</i>	CDKN2A	<i>p16^{INK4}</i>
APAF1	<i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>	CDKN2D	<i>p19</i>
		cDNA	<i>complementary DNA</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat	CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
aq.	<i>aqua</i>	CEBPB	<i>CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP), beta</i>
Arg	Arginin		
AS	Aminosäuren	ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
ASK1	<i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>	Chk1/2	<i>Chk1/2 checkpoint homolog (S. pombe)</i>
		Chr.	Chromosom
ATF-2	<i>activating transcription factor 2</i>	c-Jun	<i>Jun proto-oncogene</i>
ATG	Transkriptionsstartcodon	CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>	Co-IP/Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
ATP	Adenosintriphosphat	-COOH	Carboxygruppe
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>	CREB	<i>cAMP-responsive element binding protein</i>
BAK	<i>Bcl-2-antagonist/killer</i>		
Bas	basisches Motiv	C _t	<i>threshold cycle</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>	ΔΔC _t	<i>delta-delta-C_t</i>
Bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	Cu	Kupfer
bcl-xL	<i>Bcl-2-like 1</i>	Cy3	Carbocyanin 3
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>	CypD	Cyclophilin
		Cys	Cystein
bp	<i>base pair(s)</i>	d	Küvettschichtdicke
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin	DAO	D-Aminosäureoxidase
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
bZIP	<i>basic leucine zipper domain</i>	DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
c	Konzentration		
C	Cytosin	DC	<i>detergent compatible</i>
Ca ²⁺	zweiwertiges Kalziumion	ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
CAD	<i>caspase-activated DNase</i>	DDR	<i>DNA damage response</i>
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>	DEPC	Diethylpyrocarbonat

Abkürzungsverzeichnis

dH ₂ O	destilliertes Wasser	G1-	<i>gap 1-</i>
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>	G2-	<i>gap 2-</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	GADD45A	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	GAM	<i>goat anti-mouse</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	GAR	<i>goat anti-rabbit</i>
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>	GERD	<i>gastroesophageal reflux disease</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	Gln	Glutamin
DSB	<i>double-strand breaks</i>	Gly	Glycin
dsDNA	doppelsträngige DNA	GSH	Glutathion
DTT	Dithiothreitol	GSSG	Glutathiondisulfid
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat	H ⁺	Wasserstoffproton
E	relative Expression	H2AX	Histon H2AX
ε	Extinktionskoeffizient	H ₂ O	Wasser
e ⁻	Elektron	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ECL	<i>enhanced chemiluminescence detection</i>	H3	Histon H3
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>	HAT	Histonacetyltransferase
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>	HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
EGR1	<i>early growth response 1</i>	HO-1	Hämoxygenase-1
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinases</i>	hv	Energie der Strahlung
EtOH	Ethanol	IgG	Immunglobulin G
E _x	Genexpressionsänderung	Jak	<i>Janus kinase</i>
F	<i>forward</i>	JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>	JUN	<i>c-Jun</i>
FADD	<i>Fas (TNFRSF6)-associated via death domain</i>	JUNB	<i>jun B proto-oncogene</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>	K	Kontrolle
Fe ²⁺	zweiwertiges Eisenion	KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
Fe ³⁺	dreiwertiges Eisenion	LM-Agarose	<i>low melting agarose</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	LOF	<i>loss of function</i>
FOS	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>	Lys	Lysin
FU	Fluoruracil	LZ	Leuzinzipper
G	Guanin	M-	Mitose-
		MAC	<i>mitochondrial apoptosis-induced channel</i>
		MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
		MAPKK	<i>MAPK kinase</i>
		MAPKKK	<i>MAPKK kinase</i>

Abkürzungsverzeichnis

Mcl1	<i>myeloid cell leukemia sequence 1 (Bcl-2-related)</i>	p21 ^{WAF1}	<i>CDKN1A</i>
		p27	<i>CDKN1B</i>
Mdm2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>	p57	<i>CDKN1C</i>
		p38	<i>p38 MAPKs</i>
MEK	MAPKK	p53	<i>tumor protein 53</i>
Mg ²⁺	zweiwertiges Magnesium	p63	<i>tumor protein 63</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	p73	<i>tumor protein 73</i>
MKK	MAPKK	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure	PARP	<i>poly (ADP-ribose) polymerase</i>
Mre11	<i>Mre11 meiotic recombination 11 homolog (S. cerevisiae)</i>	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
		PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>		
mt	mitochondrial	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
MYC	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>	PDA	p-Phenylendiamin
		PDT	photodynamische Therapie
Myt1	<i>myelin transcription factor 1</i>	PI	Propidiumiodid
NAD ⁺	oxidierte Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid	PIC	<i>protease inhibitor cocktail</i>
		PIKK	<i>phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase</i>
NADH	reduzierte Form des NAD	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
NADP ⁺	oxidierte Form von NAD-Phosphat	Pol δ	DNA-Polymerase <i>delta</i>
		Pos.	Position
NADPH	reduzierte Form von NADP	PQ	1,1'-Dimethyl-4,4'-dipyridiniumdichlorid, Paraquat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	PQ ⁺	Paraquat-Monoradikalkation
ne	neu exprimiert	PQ ²⁺	Paraquat-Dikation
NES	<i>nuclear export signal</i>	Pro	Prolin
NH ₂ -	Aminogruppe	PS	Phosphatidylserine
NLS	<i>nuclear localization signal</i>	PTP	Permeabilitätstransitions-pore
Noxa	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>	pulv.	<i>pulvis</i>
		Puma	<i>p53 up-regulated modulator of apoptosis</i>
NSCLC	<i>non-small-cell lung carcinoma</i>		
¹ O ₂	Singuletsauerstoff	Q	Chinon
O ₂	Sauerstoff	QH•	Semichinonradikal
O ₂ ^{•-}	Superoxidradikalanion	R	<i>reverse</i>
O ₃	Ozon	-R	Seitenkette
OCI ⁻	Hypochloritanion	Raf	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
OD	Optische Dichte		
OH•	Hydroxylradial	Ras	<i>rat sarcoma</i>
OX	Prooxidantien	Rb	<i>retinoblastoma 1</i>
ox	oxidiert	Ref-1	<i>redox factor-1</i>
P-, p-	phospho-	RIP1	<i>receptor-interacting protein 1</i>

Abkürzungsverzeichnis

RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>	TNFR1	<i>TNF receptor 1</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>	TP53	<i>tumor protein 53</i>
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>	TRADD	<i>TNFRSF1A-associated via death domain</i>
RO•	Alkoxyradikal	TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
ROO•	Peroxyradikal	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ROOH	Hydroperoxid	Triton X-100	<i>t</i> -Octylphenoxypolyethoxyethanol
ROS	<i>reactive oxygen species</i>	TRX	Thioredoxin
rpm	<i>revolutions per minute</i>	Tyr	Tyrosin
RT	Raumtemperatur	U	<i>units</i>
S-	Synthese-	UCN-01	<i>7-hydroxystaurosporine</i>
SCLC	<i>small cell lung cancer</i>	UniProtKB	<i>UniProt Knowledgebase</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>	VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i>
SED	<i>standard error of the difference</i>	Wee	<i>Wee1 homolog (S. pombe)</i>
Ser	Serin	WT	Wildtyp
-SH	Thiolgruppe	x	fach
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>	XO	Xanthinoxidase
siRNA	<i>small interfering RNA</i>	Zn	Zinkfinger
SOD	Superoxiddismutasen		
Sp1	<i>Sp1 transcription factor</i>		
SSB	<i>single strand break</i>		
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>		
T	Thymin		
T69/71	Threonin 69/71		
Tab.	Tabelle		
TAD	Transaktivierungsdomäne		
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>		
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer		
tBid	<i>truncated Bid</i>		
TBST	<i>Tris-buffered Saline and Tween 20</i>		
TE	Tris-EDTA		
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin		
TFR	Transfektionsreagenz		
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>		
Thr	Threonin		
T _m	<i>melting temperature</i>		
TNF	<i>tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)</i>		
TNF- α	<i>TNF alpha</i>		

1 Einleitung

1.1 Krebs

Krebs ist nach den Erkrankungen des Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache in Deutschland, die jeden zweiten Mann und 43 % aller Frauen in ihrem Leben betrifft (Kaatsch *et al.*, 2012). Diese Krankheit, die mit einem steigenden Risiko im hohen Alter verbunden ist, nimmt aufgrund der demographischen Entwicklung an Bedeutung zu.

Die neuesten Berechnungen und Schätzungen des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. zeigen, dass in Deutschland im Jahr 2008 rund 470.000 Krebsneuerkrankungen registriert wurden und für das Jahr 2012 rund 490.000 Neuerkrankungen erwartet werden (http://www.rki.de/DE/content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2012/01_2012.html, Stand: 16.06.2013; Kaatsch *et al.*, 2012). Unter den Krebserkrankungen stellen Prostatakrebs bei den Männern mit 25,7 % und bei den Frauen Brustdrüsenkrebs mit 32,1 % den größten Anteil der Neuerkrankungen dar (Kaatsch *et al.*, 2012). Die zweit- und dritthäufigste Krebserkrankung betrifft bei beiden Geschlechtern die Organe Darm und Lunge. Darmkrebs macht hierbei einen prozentualen Anteil von 14,3 % bei den Männern und 13,5 % bei den Frauen aus. Für den Lungenkrebs ist ein Anteil von 13,8 % und 7,0 % beschrieben. Die seltener auftretende Krebserkrankung der Speiseröhre ist mit 1,9 % und unter 1 % vertreten. Insgesamt starben 2008 rund 217.000 Menschen in Deutschland an Krebs (Kaatsch *et al.*, 2012).

Zur Bekämpfung von Krebs sind reaktive Sauerstoffspezies [*reactive oxygen species* (ROS)]-generierende Therapieformen von großem Interesse. Daher fokussiert sich die vorliegende Dissertationsschrift auf Karzinome des Darms, der Lunge und der Speiseröhre, die auf diese Therapieformen ansprechen. Aufgeführt sind Informationen zum Auftreten, zur Entstehung, zu den Risikofaktoren und zur Behandlung dieser Tumor-entitäten.

1.1.1 Darmkrebs

Im Jahre 2008 erkrankten 35.350 Männer und 30.040 Frauen neu an Darmkrebs. Patienten mit dieser Diagnose haben eine mittlere Prognose mit einer relativen Fünf-Jahres-Überlebensrate von 63 % für Männer und 62 % für Frauen (Stand: 2007 bis 2008). Betroffen sind zu fast zwei Drittel der Dickdarm und zu 30 % der Enddarm

(Kaatsch *et al.*, 2012). Von einem Kolonkarzinom wird gesprochen, wenn der obere Abschnitt des Dickdarms betroffen ist, von einem Rektumkarzinom, wenn sich der Tumor im letzten Darmabschnitt bis zum Schließmuskel (weniger als 16 cm vom Darmausgang entfernt) befindet (Wittekind & Meyer, 2010). Tumorentwicklungen im Dünndarm treten eher selten auf und zählen nicht zu dieser Gruppe (Kaatsch *et al.*, 2012). Histologisch wird zwischen Plattenepithel-, neuroendokrinen Karzinomen, Lymphomen, Sarkomen und den hauptsächlich auftretenden Adenokarzinomen unterschieden (<http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/rektumkarzinom>, Stand: 16.06.2013). Die Adenokarzinome gehen hierbei aus Drüsengewebe hervor.

Zu den Risikofaktoren zählen ungesunde, ballaststoffarme und fettreiche Ernährung mit einem hohen Anteil an rotem Fleisch und wenig Gemüse, Vitamin- und Bewegungsmangel, Übergewicht, regelmäßiger Tabak- und Alkoholkonsum, genetische Disposition und Entzündungen des Darms (<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-028323.pdf>, Stand: 14.07.2013; Kaatsch *et al.*, 2012). Krankheitssymptome zeigen sich oft erst spät und äußern sich beispielsweise durch Blut und ungewohnte Schleimbeimengungen im Stuhl, anhaltenden Durchfall, chronische Verstopfung, Schmerzen sowie durch andere Veränderungen bei der Verdauung (<http://www.dkfz.de/de/presse/darmkrebs-zahlen-fakten.html>, Stand: 16.06.2013; <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-028323.pdf>, Stand: 14.07.2013).

1.1.2 Lungenkrebs

An Lungenkrebs erkrankten im Jahre 2008 in Deutschland 33.960 Männer und 15.570 Frauen neu. Patienten mit dieser Tumorentität haben eine schlechte relative Fünf-Jahres-Überlebensrate von 15 % für Männer und 19 % für Frauen (Kaatsch *et al.*, 2012).

Lungenkrebs entsteht meist durch Metastasen (Lungenmetastasen) extrathorakaler Organe (Kumar *et al.*, 2007). Die eigentliche Bezeichnung „Lungenkrebs“ bezieht sich jedoch auf die Karzinome, die aus dem Lungengewebe selbst entstehen (<https://lungenkrebs.de/lungenkrebs/was-ist-lungenkrebs>, Stand: 16.06.2013). Hierbei ist das bronchiale Epithel der Ursprung von 95 % der primären Lungenkarzinome (Kumar *et al.*, 2007). Prinzipiell kann sich Lungenkrebs in allen Abschnitten der Lunge entwickeln, dennoch befinden sich mehr als die Hälfte in den oberen Teilen der Lungenflügel (http://www.krebsgesellschaft.de/pat_ka_lungenkrebs_definition,108136.html, Stand: 16.06.2013).

Histologisch wird diese Tumorentität hauptsächlich in das Plattenepithel-, Adeno-, kleinzellige und großzellige Karzinom unterteilt (Kumar *et al.*, 2007). Das Plattenepithelkarzinom der Lunge geht von Schleimhautdeckzellen, das Adenokarzinom wiederum von drüsenartigen Zellen und das kleinzellige Karzinom von neuroendokrinen Zellen aus (<http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/lungenkrebs/ueberblick.php>, <http://www.bronchialkarzinom-aktuell.de/index.php?id=70>, <http://www.Bronchialkarzinom-aktuell.de/index.php?id=72>, Stand: 16.06.2013). Der Ursprung des großzelligen Karzinoms ist unklar (<https://www.lungenkrebs.de/lungenkrebs/was-ist-lungenkrebs>, Stand: 16.06.2013). Therapeutisch werden diese in kleinzellige [*small cell lung cancer* (SCLC)] und in die mit besserer Prognose verbundene nichtkleinzellige [*non-small-cell lung carcinoma* (NSCLC): Plattenepithel-, Adeno-, großzelliges Karzinom] Lungenkarzinome eingeteilt (Kumar *et al.*, 2007). Plattenepithel- und Adenokarzinome machen zusammen etwa 70 bis 75 % der Lungenkarzinome aus, das großzellige Lungenkarzinom etwa 10 %. Demzufolge stellt die Gruppe der NSCLC den größten Anteil dieser Tumorentität dar. Circa 20 % der Tumore sind SCLC (<http://www.lungenkrebs-aktuell.de/>, Stand: 16.06.2013).

Bei dieser Krebsform ist der Tabakkonsum einer der wichtigsten Risikofaktoren, aber auch radioaktive/ionisierende Strahlung, Schimmelpilze auf Lebensmitteln, Fehlernährung, Virusinfektionen und manche karzinogene Chemikalien führen zu deren Entstehung. Schadstoffbelastungen der Außenluft tragen ebenfalls zur Entstehung bei (<http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/types/lung/riskfactors/>, Stand: 16.06.2013; Kaatsch *et al.*, 2012).

Lungenkrebs verursacht oft keine besonders typischen Beschwerden und eine Vererbbarkeit wird diskutiert. Symptome treten meist erst im metastasierenden Stadium auf. In einigen Fällen kann er sich durch chronischen Husten und Auswurf bemerkbar machen. Im späten Stadium kommen Heiserkeit, Brustschmerz, obere Einflusstauung, perikardiale oder pleurale Blutergüsse, dauernde segmentale Atelektase oder Pneumonitis hinzu (<http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/lungenkrebs/frueherkennung.php>, Stand: 16.06.2013; Kumar *et al.*, 2007).

1.1.3 Speiseröhrenkrebs

Im Jahr 2008 erkrankten in Deutschland 4.800 Männer und 1.380 Frauen an dem hoch malignen und mit schlechter Prognose verbundenen Speiseröhrenkrebs. Männer waren somit vier- bis fünfmal häufiger betroffen als Frauen. Die relative Fünf-Jahres-

Überlebensrate ist aufgrund der häufig späten Entdeckung ungünstig und betrug in den Jahren 2007 und 2008 bei Männern 16 % und bei Frauen 20 % (Kaatsch *et al.*, 2012). Man differenziert Tumore der Speiseröhre (Ösophagus) zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinomen. Adenokarzinome des Ösophagus haben ihren Ursprung in den Drüsenzellen im unteren Teil der Speiseröhre nahe dem Mageneingang. Plattenepithelkarzinome des Ösophagus gehen aus dysplastischen Epithelzellen der mittleren und unteren, selten der oberen, Speiseröhre aus (<http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/weitere-tumorarten/speiseroehrenkrebs.php>, Stand: 16.06.2013). Sie sind mit einem Anteil von 50 bis 60 % die dominierende Form dieser Tumorentität. Adenokarzinome sind mit 25 bis 30 % vertreten (Kaatsch *et al.*, 2012).

Risiken für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms sind Tabak- und Alkoholkonsum. Auch Vorerkrankungen wie die Verätzung der Speiseröhre durch Säuren oder Laugen, Veränderungen der Ösophagusschleimhaut aufgrund von Eisenmangel (Plummer-Vinson-Syndrom) oder die Achalasie fördern die Bildung dieser Karzinome. Weiterhin sind eine ungesunde Ernährung mit zu wenig Obst und Gemüse sowie Infektionen mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* als Risikofaktoren beschrieben (<http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/weitere-tumorarten/speiseroehrenkrebs.php>, Stand: 16.06.2013; Kaatsch *et al.*, 2012).

Der Hauptrisikofaktor für das Adenokarzinom ist die chronische gastroösophageale Refluxkrankheit [*gastroesophageal reflux disease* (GERD)] (<http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/weitere-tumorarten/speiseroehrenkrebs.php>, Stand: 16.06.2013). Sie zeichnet sich durch den vermehrten Rückfluss von Magensäure in die Speiseröhre, einhergehend mit einer Entzündung der ösophagealen Mukosa, aus. Eine mögliche Folge dieser Erkrankung bei etwa 10 % der Patienten ist die abnormale Veränderung (Metaplasie) der ösophagealen Mukosa (Plattenepithel) des distalen Ösophagus zum Barrett-Epithel (Zylinderepithel) (<http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/weitere-tumorarten/speiseroehrenkrebs.php>, Stand: 16.06.2013; Grundmann, 2008). Der so entstehende Barrett-Ösophagus, erstmals durch Dr. Norman Barrett 1950 beschrieben (Barrett, 1950), ist gegenüber Säureexposition widerstandsfähiger (Kumar *et al.*, 2007). Dieser wird jedoch als prämaligne eingestuft und geht mit einem jährlich steigenden Risiko von 0,5 bis 3,0 % für die Entwicklung des ösophagealen Krebs einher (Shaheen *et al.*, 2000). Etwa 10 % der Patienten mit einer Barrett-Schleimhaut erkranken an einem Adenokarzinom (Grundmann, 2008). Übergewicht und unterschiedliche Pharmaka scheinen wiederum Risikofaktoren für die Entstehung der GERD und daher für die Entstehung von Adenokarzinomen des Öso-

phagus zu sein. Auch Rauchen, ungesunde Ernährung und Diabetes vom Typ II werden mit der Entstehung dieser Karzinome assoziiert (<http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/weitere-tumorarten/speiseroehrenkrebs.php>, Stand: 16.06.2013; Kaatsch *et al.*, 2012).

Auftretende Symptome bei dieser Tumorentität sind Schluckstörungen, Schmerzen beim Schlucken, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Fatigue und Schwäche (Kumar *et al.*, 2007; <http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/weitere-tumorarten/speiseroehrenkrebs.php>, Stand: 16.06.2013).

1.1.4 Angewendete Therapien

Therapieart und -plan, die bei Karzinomen des Darms, der Lunge und der Speiseröhre angewendet werden, werden individuell nach so genannten evidenzbasierten Leit- und Richtlinien, nach Art, Lokalisation und Ausdehnung der Erkrankung (Krankheitsstadium), Befinden und Zustand des Patienten sowie bestehenden Vorerkrankungen gewählt. Zu den Standardbehandlungsverfahren zählen die operative Entfernung des Tumorgewebes, Strahlen- und Chemotherapie sowie die Radiochemotherapie. Neue Medikamente, die gezielt in den Stoffwechsel der Tumorzellen eingreifen, oder Immuntherapien ergänzen die Standardbehandlungsverfahren beim Kolonkarzinom (<http://www.dkfz.de/de/presse/darmkrebs-zahlen-fakten.html>, Stand: 16.06.2013). Bei letzterem und dem Lungenkarzinom kommen auch zielgerichtete Therapien zum Einsatz. Nähere Informationen zu den angewendeten Therapien sind der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen, der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, der Deutschen Krebsgesellschaft sowie dem Krebsinformationsdienst zu entnehmen (Schmiegel *et al.*, 2008; Goeckens *et al.*, 2010; Moehler *et al.*, 2011; <http://www.krebsinformationsdienst.de/>, Stand: 16.06.2013).

Die Krebsmortalität hat sich in den letzten drei Dekaden nicht wesentlich verändert (Jemal *et al.*, 2009). Die geringe Abnahme in den letzten Jahren bei einigen Tumorentitäten (Lungen-, Kolorektal-, Brust- und Prostatakrebs) ist jedoch nicht den besseren Therapien, sondern eher der Einführung von Präventions- und frühen Detektionskampagnen (Kushi *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006) zu verdanken. Daher wird der Verbesserung von Therapien viel Bedeutung beigemessen.

Die Grundlage für die Therapieverbesserung sind vor allem Kenntnisse über die molekularen Mechanismen, die in den Karzinomzellen durch die Therapien ablaufen. Dabei spielt die Entschlüsselung von ausgelösten Signalwegen eine zentrale Rolle.

Zahlreiche Tumortherapien wirken über die Induktion von oxidativem Stress (Tandon *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2009; Barrera, 2012; Montero & Jassem, 2011). Was bedeutet nun oxidativer Stress, wie entsteht er und welche Mechanismen löst er in Zellen aus? Wie kann dieses Phänomen für die Therapie von Krebs genutzt werden? Wie lassen sich solche Therapien verbessern? Ein Einblick zu diesen Fragen wird in den folgenden Abschnitten gegeben.

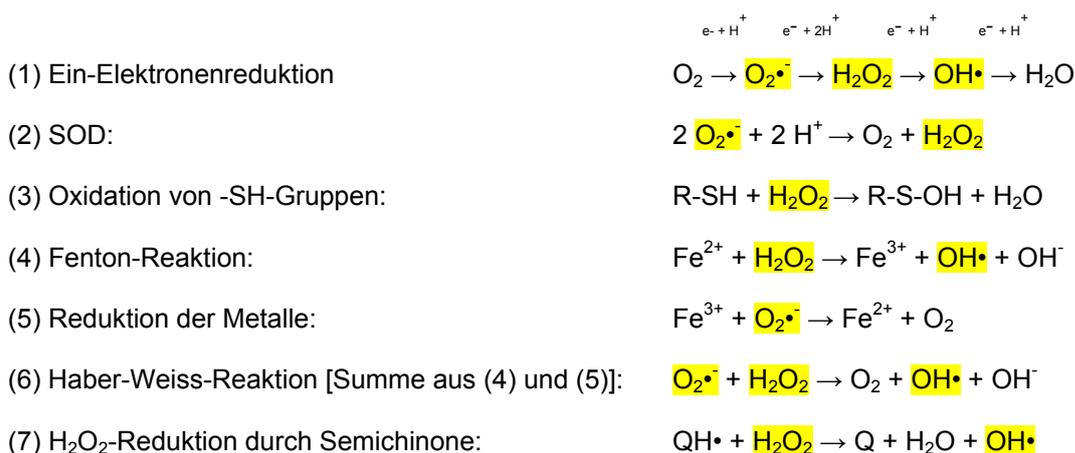
1.2 Oxidativer Stress

Der Begriff „oxidativer Stress“ wurde durch Helmut Sies im Jahre 1985 geprägt (Sies, 1985). Bei diesem Phänomen spielen Pro- (OX) und Antioxidantien (AOX) eine Rolle. Zu den OX, oxidative stressinduzierende Chemikalien, zählen ROS und reaktive Stickstoffspezies [*reactive nitrogen species* (RNS)] sowie deren Intermediate. Diese Spezies treten als Radikale oder Nichtradikale, atomar oder molekular in Erscheinung. Zu den ROS werden z. B. die Radikale Superoxidradikalanion ($O_2^{\bullet-}$), Hydroxyl- (OH^{\bullet}), Peroxyl- (ROO^{\bullet}) und Alkoxyradikal (RO^{\bullet}) sowie die Nichtradikale Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroperoxid ($ROOH$), Ozon (O_3), Hypochloritanion (OCl^-) und Singulett-sauerstoff (1O_2) gezählt (Halliwell & Gutteridge, 2007).

ROS entstehen in gesunden Zellen hauptsächlich als Nebenprodukt des aeroben Metabolismus. Der Hauptbildungsort ist die Atmungskette in den Mitochondrien (Kamata & Hirata, 1999; Boveris & Chance, 1973; Abb. 1), die der Adenosintriphosphat (ATP)-Gewinnung dient. Hierbei werden Elektronen in dem Elektronentransportsystem, welches sich in der inneren mitochondrialen Membran befindet, vom Komplex I [reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) : Ubichinon-Oxidoreduktase] und Komplex II (Succinat : Ubichinon-Oxidoreduktase) auf den Komplex III (Ubichinol : Cytochrom-c-Oxidoreduktase) und davon ausgehend auf den Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) übertragen. Am Ende werden die Elektronen auf Sauerstoff (O_2) transferiert und dadurch wird Wasser (H_2O) gebildet. Die Energie des Elektronentransports wird für die oxidative Phosphorylierung verwendet, die zur ATP-Bildung führt (Löffler, 2005). Obwohl der Elektronentransport sehr effektiv ist, entweichen dennoch 1 bis 2 % der Elektronen aus diesem System (Forman & Boveris, 1982), reagieren mit O_2 und bilden durch die Ein-Elektronenreduktion das extrem instabile $O_2^{\bullet-}$ [Reaktion (1)]. Auch Oxidasen und Oxygenasen wandeln O_2 zum Intermediärmetabolit $O_2^{\bullet-}$ um (Abb. 1). Das $O_2^{\bullet-}$ dismutiert spontan und durch die Aktivität der Superoxiddismutasen (SOD) zu

H₂O₂ [Reaktion (2); Abb. 1; Eberhardt, 2001; Fridovich, 1983]. Auch die divalente Reduktion von O₂ zu H₂O₂ ist möglich (Fridovich, 1970).

Das langlebige und frei diffusionsfähige H₂O₂ ist von allen intrazellulären ROS am häufigsten vertreten. H₂O₂ erhält durch Oxidation von Thiolgruppen (-SH), durch die metallkatalysierte endogen ablaufende Fenton-Reaktion (Haber-Weiss-Reaktion), sowie durch die Reduktion durch Semichinone seine Toxizität [Reaktion (3) bis (7); Abb. 1; Ohlenschläger, 2000; Halliwell & Gutteridge, 2007]. Es stellt durch seine Umwandlung zum OH• daher überall, wo es präsent ist, eine potente Gefahr dar, das reaktivste und schädlichste unter den ROS-Radikalen zu bilden. Dieses ist für die meisten radikalinitiierten Schäden in biologischen Systemen verantwortlich und kann nur nichtenzymatisch durch *Scavenger* wie Mannit, Harnsäure, Vitamin E, Ethanol, Glutathion (GSH), L-Cystein (L-Cys) und Melatonin neutralisiert werden (Jentzsch, 1997). Enzymatische Schutzmechanismen zur Entfernung dieses Radikals existieren nicht.



e ⁻	- Elektron	-OH	- Hydroxygruppe
Fe ²⁺	- zweiwertiges Eisenion	OH ⁻	- Hydroxidion
Fe ³⁺	- dreiwertiges Eisenion	Q	- Chinon
H ⁺	- Wasserstoffproton	QH [•]	- Semichinonradikal
		-R	- Seitenkette

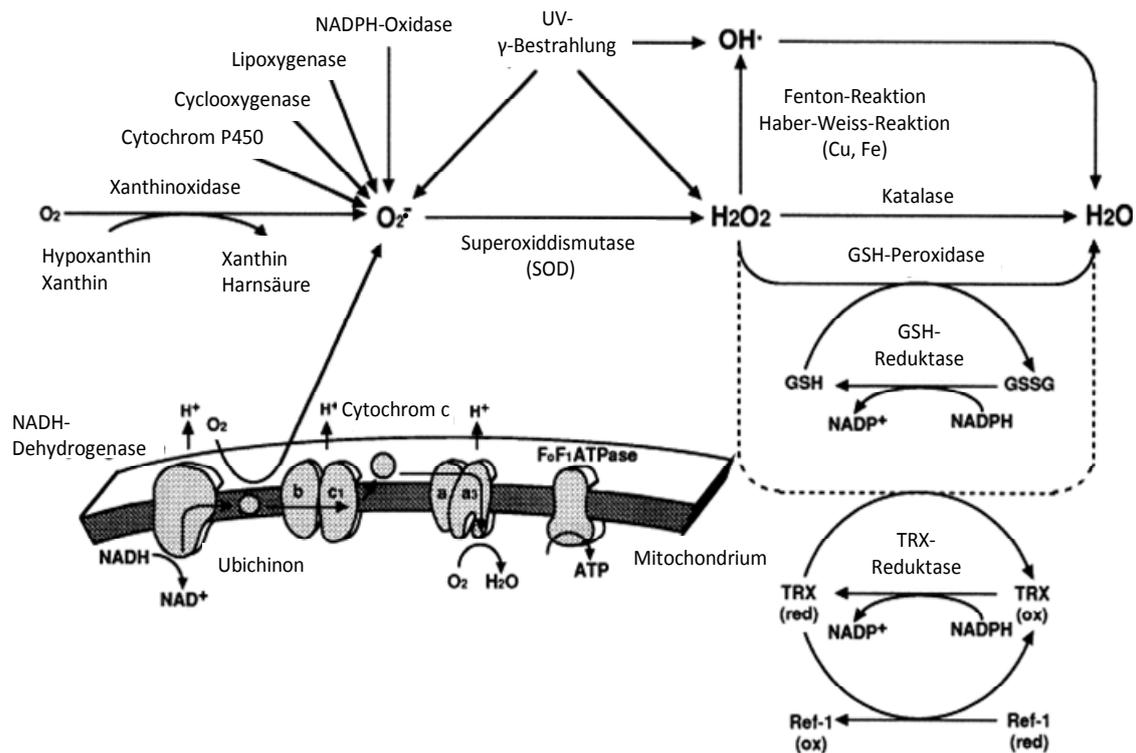


Abb. 1: Metabolische Wege von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)
 Modifiziert nach Kamata und Hirata (1999), ATP - Adenosintriphosphat, Cu - Kupfer, Fe - Eisen, GSH/GSSG - Glutathion/Glutathiondisulfid, H^+ - Wasserstoffproton, H_2O - Wasser, H_2O_2 - Wasserstoffperoxid, $NAD^+/NADH$ - oxidierte/ reduzierte Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, $NADP^+/NADPH$ - oxidierte/reduzierte Form von NAD-Phosphat, O_2 - Sauerstoff, $O_2^{\cdot-}$ - Superoxid-radikal-anion, OH^{\cdot} - Hydroxylradikal, ox - oxidiert, red - reduziert, Ref-1 - *redox factor-1*, TRX - Thioredoxin

Im Körpergleichgewicht sorgen AOX für eine physiologische Konzentration der ROS. AOX können enzymatischer oder nichtenzymatischer Herkunft sein. Enzymatische AOX sind beispielsweise die Katalasen, GSH-Peroxidasen und die SOD (Abb. 1). Als nichtenzymatische AOX seien das GSH, Thioredoxin (TRX) und die Vitamine C (Ascorbinsäure) und E (α -Tocopherol) genannt (Halliwell & Gutteridge, 2007; Ohlenschläger, 2000).

Das Gleichgewicht zwischen OX und AOX ist von fundamentaler Bedeutung für das Überleben und die Funktion einer Zelle. Kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen diesen zugunsten der OX mit pathophysiologischen OX-Mengen, nennt man dieses Phänomen oxidativen Stress (Sies, 1985). Ausgelöst wird dieses Ereignis durch einen Überschuss an OX oder einen Mangel/eine Funktionsstörung an/der AOX (Abb. 2; Scandalios, 2002).

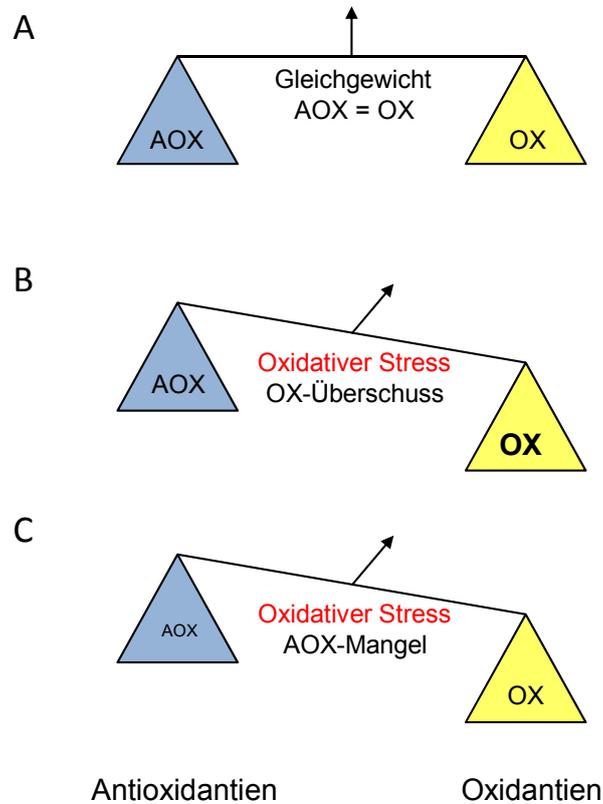


Abb. 2: Oxidativer Stress: Ungleichgewicht zwischen Pro- (OX) und Antioxidantien (AOX) Modifiziert nach Scandalios (2002); (A) Gleichgewicht zwischen dem pro- und anti-oxidativen System unter normalen Bedingungen; Entstehung von oxidativem Stress durch (B) einen Überschuss an OX oder durch (C) einen Mangel/eine Funktionsstörung an/der AOX

1.2.1 ROS-generierende Therapieformen

Über oxidativen Stress wirkende Therapien sind vielfältig. ROS entstehen z. B. durch ionisierende Strahlung [z.B. *Gamma* (γ)-Strahlen] im Zuge der Strahlentherapie (zusammengefasst in Barrera, 2012). Dabei wird durch die Ionisierung von H_2O das $OH\cdot$ gebildet [siehe Gleichung (8)].



aq. - *aqua*
 e^- - Elektron

$H\cdot$ - Wasserstoffradikal
 hv - Energie der Strahlung

Die Erzeugung von ROS ist ebenfalls ein Mechanismus von chemotherapeutischen Agenzien (zusammengefasst in Montero & Jassem, 2011). Zu diesen zählen beispielsweise Bleomycin, Taxane, 5-Fluoruracil (5-FU) und rutheniumbasierende Medikamente (zusammengefasst in Wondrak, 2009; Alexandre *et al.*, 2006; Amin *et al.*, 2012; Vidimar *et al.*, 2012). Über verschiedene Mechanismen wie die metallabhängige ROS-Bildung (Bleomycin) und das *Redoxcycling* (Anthracycline) wird oxidativer Stress induziert.

Weiterhin kann oxidativer Stress in den Tumorzellen induziert werden, indem die antioxidative endogene Abwehr verringert oder inhibiert wird, die zytotoxischen ROS direkt in die Tumorzellen übertragen oder die ROS-Produktion erhöht wird (zusammengefasst in Tandon *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2009; Schumacker, 2006). Auch Kombinationen aus diesen Methoden sind möglich. Die Inhibierung des antioxidativen Enzymstatus kann z. B. mithilfe eines Hämoxxygenase-1 (HO-1)-Inhibitors erfolgen. Genutzte $O_2^{\bullet-}$ - und H_2O_2 -generierende Enzyme sind beispielsweise die Xanthin (XO)- und D-Aminosäureoxidase (DAO) (zusammengefasst in Fang *et al.*, 2009). Ferner kann das intrazelluläre GSH-System Ziel einer Therapie sein (Schumacker, 2006), indem beispielsweise oxidiertes Glutathion im Überschuss in die Zellen eingebracht wird (Townsend *et al.*, 2008). Dadurch wird das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion gestört und somit oxidativer Stress induziert.

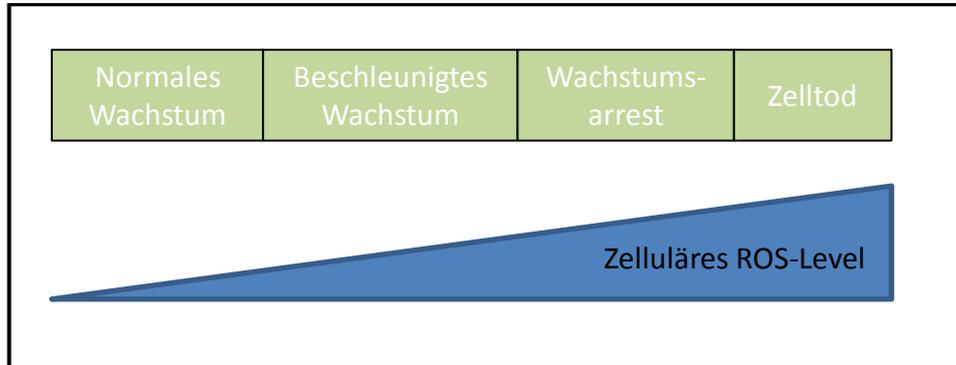
Auch die hyperthermische Therapie führt zu einem Redox-Ungleichgewicht zugunsten der OX (zusammengefasst in Bettaieb *et al.*, 2013). Zudem sei die photodynamische Therapie (PDT) als eine auf oxidativen Stress basierende Tumorthherapie genannt (zusammengefasst in Dolmans *et al.*, 2003). Die Induktion einer durch Immunzellen (Makrophagen, Neutrophile) induzierten Immunantwort, die ebenfalls über ROS wirkt, kann ebenso genutzt werden, um Karzinomzellen zu töten (zusammengefasst in Barrera, 2012). Weitere ROS-produzierende Therapien sind die O_3 -Therapie, Überdrucksauerstofftherapie, intravenöse Vitamin-C-Überdosis, die Howes- 1O_2 - und die H_2O_2 -Krebstherapie (zusammengefasst in Howes, 2010). Dies ist nur eine Auswahl an Therapien, die über oxidativen Stress wirken, und keinesfalls eine vollständige Auflistung.

1.2.2 Folgen oxidativen Stresses

ROS lösen ein breites Spektrum von Zellantworten aus, das von der Konzentration, der Expositionsdauer, der Lokalisation, der Natur der involvierten ROS und dem betroffenen Zelltyp abhängig ist (Storz, 2005).

Als Reaktion auf einen geringen ROS-Anstieg findet in den Zellen die Wiederherstellung der Redox-Homöostase mithilfe von in der Zelle vorhandenen Detoxifikatoren (intrazelluläre redoxregulierende Moleküle, AOX) statt (zusammengefasst in Valko *et al.*, 2007). Ein milder bis moderater Anstieg der ROS-Konzentration kann die Zellproliferation (beschleunigtes Wachstum) oder einen Wachstumsarrest (Zellzyklusarrest) nach oxidativen Schäden auslösen (Abb. 3 A; zusammengefasst in Boonstra & Post, 2004; Halliwell & Gutteridge, 2007). Von oxidativen Schäden betroffene Moleküle sind Kohlenhydrate, Lipide, Nukleinsäuren und Proteine (Abb. 3 B), was folglich zum Verlust deren zellulärer Funktion führen kann. Folgen dieser Schäden sind die Initiation von Signaltransduktionskaskaden mit der Aktivierung der Transkription und dadurch die Ausprägung eines Zellzyklusarrests (Abb. 3 B; zusammengefasst in Boonstra & Post, 2004). Im Falle einer erfolgreichen Reparatur bleibt die Zelle lebensfähig (Abb. 3 B). Die in der Zelle ausgelösten Ereignisse, wenn sie nicht durch das Anschalten der *deoxyribonucleic acid* (DNA)-Schadensreparatur und Ersatz der geschädigten Moleküle erfolgreich zur Wiederherstellung einer intakten Zelle führen, also zu starke Schäden bestehen, entscheiden darüber, ob eine Zelle einen permanenten Zellzyklusarrest (Seneszenz), den Zelltod vollzieht oder mit bleibenden Schäden überlebt (Abb. 3 A, B; zusammengefasst in Boonstra & Post, 2004; Halliwell & Gutteridge, 2007). Exzessive ROS-Mengen dagegen führen zu stark erhöhten oxidativen Schäden, die oft umgehend den Zelltod auslösen.

A



B

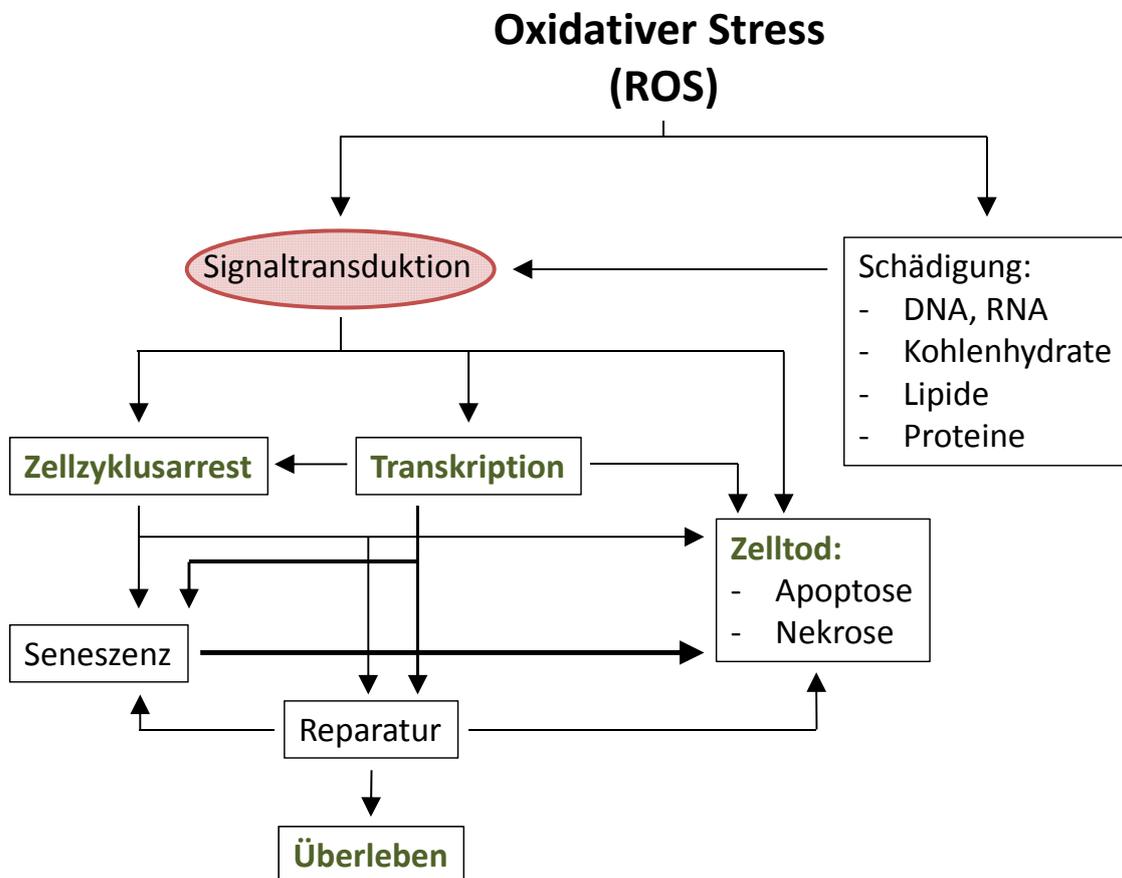


Abb. 3: Folgen von oxidativem Stress durch ROS

(A) Folgen steigender ROS-Level modifiziert nach Benhar *et al.* (2002) und
 (B) Einzelheiten und Kreuzverbindungen der Folgen

DNA - deoxyribonucleic acid, RNA - ribonucleic acid, ROS - reactive oxygen species

1.2.2.1 DNA-Schäden

Die oxidative Schädigung der DNA kann mit Veränderungen und Verlust biologischer Informationen und genetischer Regulationen verbunden sein. Dabei auftretende Schäden sind Einzel- [*single-strand breaks* (SSBs)] und Doppelstrangbrüche [*double-strand breaks* (DSBs)]. Die Basen der DNA können modifiziert und ersetzt werden oder verloren gehen (Verlust: *apurinic* bzw. *apyrimidinic site*, AP-Stellen genannt). Folgen der DNA-Schäden sind Mutationen, Chromosomen- und Chromatidenaberrationen wie Deletionen, Translokationen und Fusionen, die Transversionen oder Replikationsstörungen auslösen. Die erzeugten Mutationen können Veränderungen der Transkription, des *messenger RNA (mRNA) splicing* und der Translation auslösen und damit zu veränderten Proteinen führen (zusammengefasst in Halliwell & Gutteridge, 2007; Berquist & Wilson, 2012; Cooke *et al.*, 2003).

DNA-Schäden werden über ein System von Detektoren erkannt und von diesen auf *Transducer* und Effektoren übertragen (Signaltransduktion) (zusammengefasst in Freeman & Monteiro, 2010). Folglich kann es zur Aktivierung einer entsprechenden Zellantwort kommen (Abb. 3).

Eine der frühesten Signaltransduktionen in der DNA-Schadensantwort [*DNA damage response* (DDR)] nach der Erkennung des DNA-Schadens ist die Aktivierung der Kinasen *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) und *ataxia telangiectasia and Rad3 related* (ATR) (zusammengefasst in Freeman & Monteiro, 2010). Diese können die Histonvariante H2AX am Serin 139 (p-H2AX^{Ser139}) in unmittelbarer Nähe von DNA-Schäden phosphorylieren. So findet eine Markierung der DNA-Schäden statt. Die Phosphorylierung durch ATM erfolgt nach DSBs (Burma *et al.*, 2001), durch ATR nach SSBs und Replikationsstress (Ward *et al.*, 2004; Ward & Chen, 2001). Diese phosphorylierte Form des H2AX, γ -H2AX genannt (Rogakou *et al.*, 1998), spielt eine Schlüsselrolle in der DDR, da sie zur Akkumulation der DNA-Schadensmeldung beiträgt und DNA-Reparaturkomplexe an die geschädigte DNA rekrutiert und somit die DNA-Reparatur einleitet (zusammengefasst in Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003). Das γ -H2AX spielt im Chromatin-*Remodeling* eine Rolle, um die Dissoziation von DNA-Strangbruchenden zu verhindern, und es erhöht die DSB-Prozessierung und die Reparaturreffizienz. Ferner rekrutiert es Cohesin, um die schwesterchromatidabhängige Rekombinationsreparatur zu ermöglichen. Diese Histonmodifikation ist außerdem für die Aktivierung von speziellen DNA-schadenssensitiven Proteinen durch ATM notwendig (zusammengefasst in Podhorecka *et al.*, 2010). Diese wiederum können einen Zellzyklusarrest auslösen, der Zeit für die Reparatur der DNA-Schäden gibt.

1.2.2.2 Zellzyklusarrest

Die Regulation des sich in die Mitose (M)- und Interphase [*gap 1* (G1)-, Synthese (S)-, *gap 2* (G2)-Phase] gliedernden Zellzyklus durch oxidativen Stress ist abhängig von dessen Intensität und Dauer (zusammengefasst in Boonstra & Post, 2004). Geringer oxidativer Stress fördert die Proliferation, treibt also die Zellzyklusprogression voran (Abb. 3 A; Kim *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2006). Hingegen induziert moderater und hoher oxidativer Stress einen Zellzyklusarrest (Abb. 3 A; Habold *et al.*, 2008; Poehlmann *et al.*, 2011; Chua *et al.*, 2009), um die entstandenen Schäden zu reparieren und die Übertragung der korrekten genetischen Information auf die Tochterzellen zu gewährleisten. Der Zellzyklusarrest wird an bestimmten Kontrollpunkten (*Checkpoints*) ausgelöst (Abb. 4). Dies sind Punkte, an denen die Zelle wichtige Prozesse durchführt, z. B. die Replikation initiiert (G1/S-*Checkpoint*, nachfolgend G1-*Checkpoint* genannt) oder in die Mitose eintritt (G2/M-*Checkpoint*, nachfolgend G2-*Checkpoint* genannt). Sind die Bedingungen für diese Prozesse nicht erfüllt oder werden DNA-Schäden durch Detektoren erkannt, so wird an diesen Punkten der Zellzyklus gestoppt. Am G1-*Checkpoint* wird die Replikation geschädigter DNA durch Blockieren des Eintritts in die S-Phase verhindert. Falls DNA-Schäden nach dem G1-*Checkpoint* oder Probleme bei der Replikation der DNA in der S-Phase auftreten, wird der Intra-S-Phase-*Checkpoint* aktiviert. Dieser blockiert die weitere Replikation. Schäden nach dem Intra-S-Phase-*Checkpoint* werden durch die Aktivierung des G2-*Checkpoint* kontrolliert. Dieser verhindert dann den Eintritt in die Mitose. Treten Probleme bei dem Aufbau der mitotischen Spindel auf, wird der M-Phase-*Checkpoint* aktiviert (zusammengefasst in Alberts *et al.*, 2011; Daniel, 2002).

Die Zellzyklusprogression wird durch eine Vielzahl von Proteinen, den Teilungszustand und durch vorhandene DNA-Schäden gesteuert. Wichtige regulatorische Proteine, welche die Progression und das Überschreiten der *Checkpoints* vorantreiben, sind die zyklinabhängigen Kinasen [*cyclin-dependent kinases* (Cdks)] und mit ihnen im Komplex gebundene Zykline. In den verschiedenen Zellzyklusphasen sind unterschiedliche Cdks und Zykline aktiv (Abb. 4). Die Aktivität der Cdks kann positiv über die Bindung der Zykline und negativ über die Bindung von Cdk-Inhibitoren reguliert werden (Abb. 4; zusammengefasst in Alberts *et al.*, 2011; Daniel, 2002). Zu den letzteren zählen beispielsweise die Proteine p21^{WAF1}, p27, p57, p16, p19 und p18 (zusammengefasst in Vogt & Reed, 1998), welche Zellzyklusarreste in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen vermitteln (Abb. 4; zusammengefasst in Daniel, 2002).

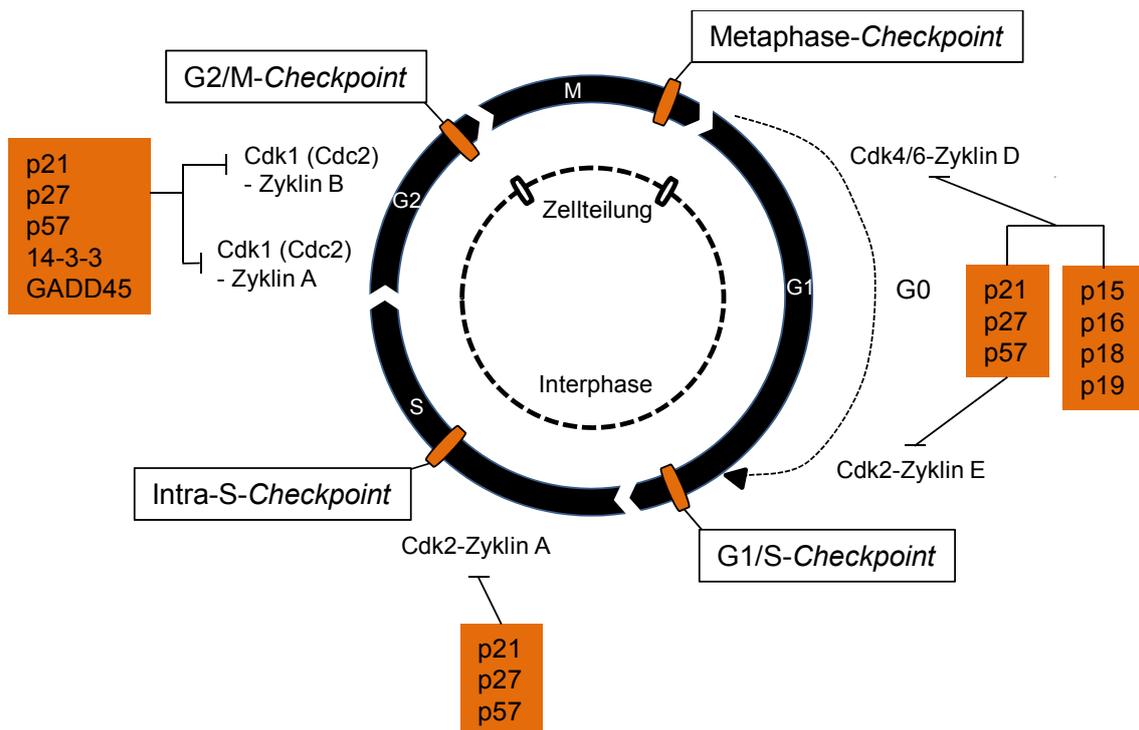


Abb. 4: Schematische Darstellung der Zellzyklusphasen mit Kontrollpunkten (*Checkpoints*) und regulierenden Proteinen [Zykline, *cyclin-dependent kinases* (Cdks) und Cdk-Inhibitoren (orange hinterlegt)]

Modifiziert nach Daniel (2002). G0/1/2 - *gap-0/1/2*-, M - Mitose-, S - Synthesephase

Die Cdk-Inhibitoren können nach DNA-Schäden durch verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert werden, was folglich zum Zellzyklusarrest führt (Sherr & Roberts, 1995). Erwähnt sei an dieser Stelle der ATM/ATR-Chk1/2-Signalweg, der sowohl einen G1- als auch einen G2-Arrest induzieren kann (Abb. 5; zusammengefasst in Poehlmann & Roessner, 2010). Hierbei entscheidet, wie zuvor beschrieben, die Art des DNA-Schadens über die jeweilige Aktivierung der entsprechenden Kinase. ATM und ATR sind Teile eines Multiproteinkomplexes, der im Chromatin mit geschädigter DNA bindet. Einmal gebunden, können sie eine Vielzahl von Proteinen phosphorylieren, die an Zellzyklus-*Checkpoints* (Abb. 5; zusammengefasst in Poehlmann & Roessner, 2010) und der DNA-Reparatur (Summers *et al.*, 2011) teilnehmen.

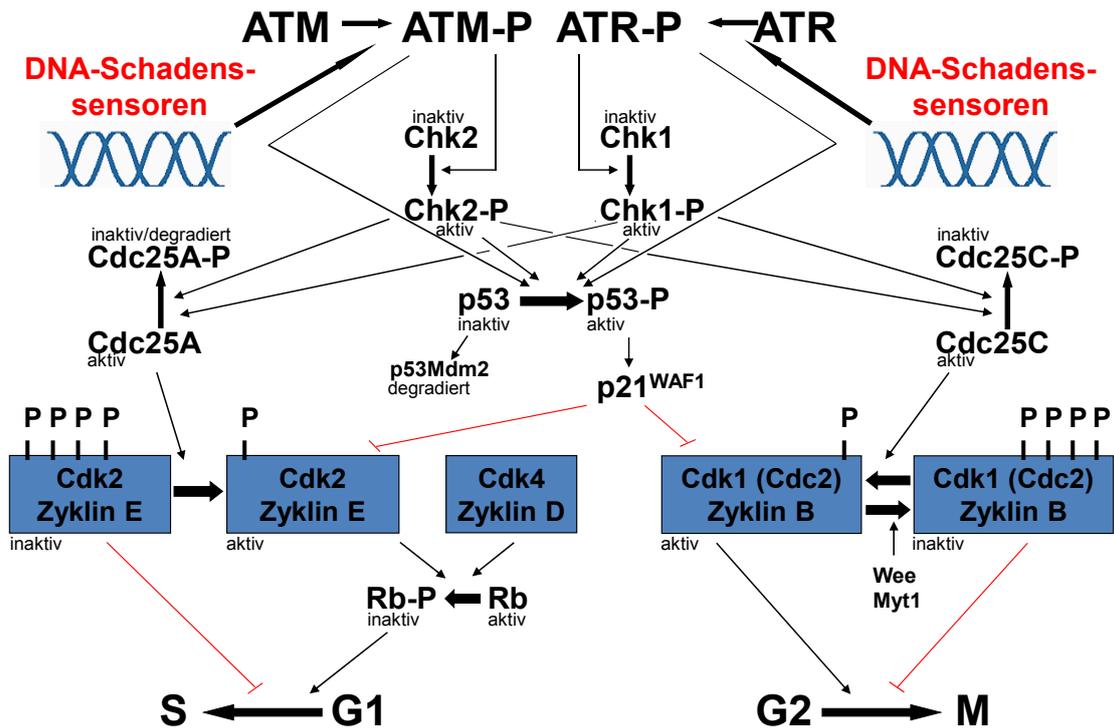


Abb. 5: G1- und G2-Checkpoint-Regulation nach ATM/ATR-Aktivierung
 Modifiziert nach Poehlmann & Roessner (2010), ATM - *ataxia telangiectasia mutated*, ATR - *ataxia telangiectasia and Rad3 related*, Cdc25A/C - *cell division cycle 25A/C*, Cdk - *cyclin-dependent kinase*, Chk1/2 - *Chk1/2 checkpoint homolog* (*S. pombe*), Mdm2 - *mouse double minute 2 homolog*, Myt1 - *myelin transcription factor 1*, p21^{WAF1} - *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*, p53 - *tumor protein 53*, Rb - *retinoblastoma 1*, Wee - *Wee1 homolog* (*S. pombe*); G1/2, M, S - Zellzyklusphasen

ATM vermittelt hauptsächlich durch die Phosphorylierung des *Chk2 checkpoint homolog* (*S. pombe*, Chk2) und des *tumor protein p53* (p53) einen Zellzyklusarrest. ATR mit ähnlichen Aktivitäten verwendet vorzugsweise *Chk1 checkpoint homolog* (*S. pombe*, Chk1) und p53 als Substrate (zusammengefasst in Poehlmann & Roessner, 2010). Dennoch können beide Kinasen sowohl Chk1 als auch Chk2 phosphorylieren (Dai & Grant, 2010). P-Chk1/2 wiederum aktivieren p53 und inaktivieren *cell division cycle 25A/C* (Cdc25A/C) durch Phosphorylierung, wodurch eine Vernetzung der ATM-ATR-Antwort besteht (Smith *et al.*, 2010). Somit kann die Phosphatase Cdc25A den Cdk2-Zyklus-E-Komplex nicht mehr aktivieren und folglich die Progression von der G1- in die S-Phase nicht mehr ermöglichen. Unphosphoryliertes Cdc25C fördert die Progression von der G2- in die M-Phase durch Dephosphorylierung des Cdk1-Zyklus-B-Komplexes.

Die Phosphorylierung von Cdc25C führt dazu, dass diese Phosphatase Cdk1 nicht mehr dephosphorylieren kann, womit die Aktivierung des Cdk1-Zyclin-B-Komplexes und der Übergang von G2 nach M ausbleibt und die Zelle einen G2-Arrest vollzieht. Das p53 nimmt *downstream* von Chk1/2 einen hohen Stellenwert in der DNA-Schadensantwort ein. DNA-Schäden induzieren einen Anstieg der p53-Proteinstabilität durch Phosphorylierung des p53. Phosphoryliertes p53 kann nicht mehr mit *mouse double minute 2 homolog* (Mdm2) interagieren und wird daher nicht mehr Mdm2-vermittelt degradiert. Der durch Phosphorylierung aktivierte Transkriptionsfaktor p53 induziert die Expression des Gens *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A* (*CDKN1A*), welches für den Zellzyklusinhibitor p21^{WAF1} kodiert (letzter Abschnitt zusammengefasst aus Alberts *et al.*, 2011; Poehlmann & Roessner, 2010). Ferner stimuliert p53 die Expression des Gens *14-3-3σ*, dessen Proteinprodukt den Cdk1-Zyclin-B1-Komplex durch den Transport vom Kern ins Zytoplasma inaktiviert und infolgedessen den Übergang von der G2- zur M-Phase blockiert (Hermeking *et al.*, 1997). Außerdem inhibiert p53 die *Cdk1*- und *Zyclin-B1*-Expression und induziert dadurch ebenfalls einen G2-Arrest (Azzam *et al.*, 1997; Innocente *et al.*, 1999). Auch das *growth arrest and DNA-damage-inducible* (GADD45)-Protein, welches mit dem *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) interagiert und folglich den Durchlauf durch die S-Phase inhibiert, wird durch p53 hochreguliert (Kastan *et al.*, 1992). Reprimo, ebenfalls durch p53 induziert, blockiert die G2-Phase (Ohki *et al.*, 2000).

P21^{WAF1}, welches auch p53-unabhängig hochreguliert werden kann (Sheikh *et al.*, 1994), nimmt eine sehr bedeutende Rolle unter den Cdk-Inhibitoren ein, da es nach seiner Akkumulation verschiedene Cdk-Zyclin-Komplexe hemmen kann (Abb. 4; Xiong *et al.*, 1993; zusammengefasst in Cmielová & Rezáčová, 2011). Es inhibiert die aktiven Komplexe Cdk4/6-Zyclin D, Cdk2-Zyclin E, Cdk2-Zyclin A und *cell division cycle 2* (Cdc2)-Zyclin A/B durch Bindung der Cdks und kann infolgedessen einen Zellzyklusarrest in den Phasen G1, S und G2 induzieren. Es ist weiterhin in der Lage das PCNA zu binden und hemmt dadurch dessen Fähigkeit die DNA-Polymerase *delta* (Pol δ) und folglich die DNA-Synthese zu aktivieren (zusammengefasst in Cmielová & Rezáčová, 2011). Es degradiert das *retinoblastoma 1* (Rb) und Zyclin B1 (Broude *et al.*, 2007; Gillis *et al.*, 2009). Außerdem reguliert p21^{WAF1} die DNA-Methyltransferaseaktivität negativ und die Expression von Genen, die im Zellzyklusarrest involviert sind (Chuang *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2000). Die umfassenden Funktionen der Proteine p53 und p21^{WAF1} in der Regulation des Zellzyklus nach DNA-Schädigung zeigen deren zentrale Stellung in diesem Prozess.

Die beschriebenen ATM/ATR-Zellzyklusregulationsmechanismen sind gut untersucht. Ein weiteres System der Zellzyklusregulation nach DNA-Schäden stellt die Aktivierung der *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) p38-*mitogen-activated protein kinases* (p38), *c-Jun amino-terminal kinases* (JNK) und *extracellular signal-regulated kinases* (ERK) dar, die ebenfalls einen G1- und G2-Arrest vermitteln können (zusammengefasst in Poehlmann & Roessner, 2010).

Werden die Schäden durch oxidativen Stress während eines transienten Zellzyklusarrests nicht repariert, so kommt es zum Insult, zur Mutagenese, Karzinogenese oder die Zelle leitet über die *Checkpoints* Seneszenz oder den Zelltod ein (zusammengefasst in Boonstra & Post, 2004), um die DNA-Schäden nicht auf die Tochterzellen zu übertragen.

1.2.2.3 Zelltod

Die Art des Zelltods ist abhängig vom Schweregrad des oxidativen Schadens. Der physiologische Zelltod, die Apoptose, wird bei niedrigem und moderatem oxidativen Stress und der pathologische Zelltod, die Nekrose, bei massivem oxidativen Stress ausgelöst (zusammengefasst in Boonstra & Post, 2004; Pelicano *et al.*, 2004).

Bei der Nekrose kommt es zum schnellen Verlust des zellulären Membranpotentials aufgrund von Energieverarmung und Ionenpumpen-/Ionenkanälenversagen, was zum Ionen- und Wassereinstrom, zum Schwellen der Zellen und Zellorganellen und zum Verlust der Membranintegrität führt. Die Zellen platzen (Zytolyse) und die zellulären Bestandteile werden in den Extrazellularraum freigesetzt. Folglich kommt es zu einer Entzündungsreaktion und Schädigung des umliegenden Gewebes (zusammengefasst in Kroemer *et al.*, 2009; Scaffidi *et al.*, 2002). Die Nekrose wurde lange als passiver und nichtregulierter Prozess betrachtet. Seit der letzten Dekade zeigte sich jedoch, dass dieser Prozess unter physiologischen und pathologischen Bedingungen sehr wohl reguliert ist (zusammengefasst in Kroemer *et al.*, 2009; Proskuryakov & Gabai, 2010). Das Schlüsselprotein der geregelten Nekrose (dann Nekroptosis genannt) ist die Kinase *receptor-interacting protein 1* (RIP1) (zusammengefasst in Kreuzaler & Watson, 2012), welche z. B. durch oxidativen Stress und DNA-Schäden aktiviert wird (zusammengefasst in Proskuryakov & Gabai, 2010). Diese Kinase überträgt das Signal auf die Mitochondrien, auch über JNK, und verursacht deren Kollaps (mitochondriale Apoptose, Mitoptose) (Skulachev, 2006). Dadurch werden zweiwertige Kalziumionen (Ca^{2+}), verschiedene Proteasen und Phospholipasen freigesetzt, was vermutlich zur Membranzerstörung führt (Lemasters *et al.*, 1999; Bernardi *et al.*, 2001). Als weiteres Merk-

mal der Nekrose wurde die zufällige/ungeordnete DNA-Degradierung beschrieben, die vermutlich durch die DNasen I und II vermittelt wird (Tsukada *et al.*, 2001; GaipI *et al.*, 2004). Außerdem wurde dem Protein p53 in der Nekrose eine Funktion zugeschrieben. Durch oxidativen Stress akkumuliert p53 in der mitochondrialen Matrix und löst die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore (PTP) durch physische Interaktion mit der PTP-Komponente Cyclophilin (CypD) aus (Vaseva *et al.*, 2012). Infolgedessen kommt es zur Permeabilitätstransition und Nekrose.

Die energieabhängige Apoptose löst im Vergleich zur Nekrose keinen Entzündungs-herd und Gewebeschäden aus (Shacter *et al.*, 2000). Im frühen Stadium des akkurat geregelten Prozesses der Apoptose werden Caspasen (Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen, Casp) aktiviert (Abb. 6), die viele Proteinsubstrate spalten und so den Prozess der Apoptose vorantreiben. Phosphatidylserine (PS) werden von der inneren in die äußere Zellplasmamembran transloziert. Das Chromatin kondensiert und die DNA wird durch aktivierte Endonukleasen [z. B. *caspase-activated DNase* (CAD)] internukleosomal geordnet fragmentiert. Die Zelle schrumpft samt Zellkern (Kontraktion des Zytoskeletts) und löst sich aus dem Zellverband. Abgeschlossen wird der Prozess durch Bläschenbildung (*blebbing*, Zeiose) an der Kern- und Plasmamembran unter Bildung von apoptotischen Körperchen, die Teile des Zellkerns und die Zellorganellen einschließen (Absatz zusammengefasst aus Alberts *et al.*, 2011; Kroemer *et al.*, 2009). Diese werden *in vivo* schnell durch Phagozyten oder Nachbarzellen phagozytiert und abgebaut, die z. B. die exponierten PS als „eat me“-Signal erkennen (Hochreiter-Hufford & Ravichandran, 2013). Im späten Stadium, wenn die apoptotischen Zellen nicht phagozytiert wurden, kann es zur Plasmamembranpermeabilisierung und folgenden „sekundären Nekrose“ kommen (zusammengefasst in Silva, 2010). Externe Stimuli aktivieren den extrinsischen (todesrezeptorvermittelten), interne Stimuli (z. B. DNA-Schäden) den intrinsischen (mitochondrienvermittelten) Signalweg der Apoptose (Abb. 6). Der extrinsische Weg wird über die Bindung eines Todesliganden wie z. B. des *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) an Transmembrantodesrezeptoren wie dem TNF *rezeptor 1* (TNFR1) eingeleitet. Am Todesrezeptor kommt es zur Interaktion der Adapterproteine *TNFRSF1A-associated via death domain* (TRADD), *Fas (TNFRSF6)-associated via death domain* (FADD) und der Procaspase 8. Dadurch wird der *death inducing signaling complex* (DISC) gebildet und die Caspase 8 durch Oligomerisierung autoproteolytisch gespalten und aktiviert. Diese Initiatorcaspase aktiviert dann durch Spaltung die *downstream*-Effektorcaspase 3. Caspase 3 kontrolliert die Selbstzerstörung der Zelle durch die Spaltung der Caspasen 6 und 7 sowie durch Spaltung von

zytoskeletalen Proteinen und Kernlaminen. Ferner aktiviert sie CAD, welche wiederum die DNA fragmentiert. Der intrinsische Signalweg wird durch proapoptotische Mitglieder der *B-cell CLL/lymphoma 2* (Bcl-2)-Familie wie dem *Bcl-2-associated X protein* (BAX) vermittelt (Abb. 6). Wird dieses nicht ausreichend durch Interaktion mit dem antiapoptotisch wirksamen Bcl-2 inhibiert, so transloziert es vom Zytosol zu der äußeren mitochondrialen Membran und erfährt dort eine Konformationsänderung. Diese Konformationsänderung ermöglicht es dem BAX, in die äußere Mitochondrienmembran als Oligomer zu inserieren und eine Pore zu bilden [*mitochondrial apoptosis-induced channel* (MAC)]. Ferner interagiert es mit den spannungsabhängigen Anionenkanälen [*voltage-dependent anion channel* (VDAC)] und induziert damit deren Öffnung. Diese Kanäle erhöhen die mitochondriale Membranpermeabilität, wodurch es zur Freilassung von proapoptotischen mitochondrialen Proteinen wie dem Cytochrom c kommt. Die Freisetzung dieser Proteine ins Zytosol ist ein Ereignis, das die Zelle irreversibel in die Apoptose führt. Im Zytosol bildet das Cytochrom c mit dem *apoptotic peptidase activating factor 1* (APAF1) und der Procaspase 9 einen Multiproteinkomplex, der „Apoptosom“ genannt wird. Die Bindung der Caspase 9 an diesen Komplex führt zu deren Aktivierung. Die aktivierte Initiatorcaspase 9 wiederum spaltet die Effektorcaspasen 3 und 7. Somit münden sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Signalweg der Apoptose in der Aktivierung der Caspasen 3, 6 und 7 (Absatz zusammengefasst aus Alberts *et al.*, 2011; Kroemer *et al.*, 2009; Botchkareva *et al.*, 2006). Außerdem kann die Caspase 8 über das Molekül *BH3 interacting domain death agonist* (Bid), welches BAX aktiviert, den intrinsischen Weg initiieren (zusammengefasst in Ulukaya *et al.*, 2011; Schug *et al.*, 2011). Dem Protein p53 ist in der Apoptose ebenfalls eine zentrale Funktion zuzuschreiben (zusammengefasst in Sullivan *et al.*, 2012). Es induziert nach Aktivierung bei nicht zu reparierenden DNA-Schäden die Expression von Todesrezeptoren (zusammengefasst in Ryan, 2011), welche die Bildung des DISC induzieren und schließlich die Caspase 8 aktivieren. Ferner induziert p53 die proapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder BAX, *phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1* (Noxa) und *p53 up-regulated modulator of apoptosis* (Puma), die die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran vermitteln (zusammengefasst in Sullivan *et al.*, 2012; Ryan, 2011). Durch die Transaktivierung der Todesrezeptoren und der Bcl-2-Familienmitglieder kommt es zur Auslösung der Apoptose über den extrinsischen und intrinsischen Weg. Im mitochondrialen p53-Programm der Apoptose (zusammengefasst in Vaseva & Moll, 2009) interagiert p53 mit den Bcl-2-Familienproteinen *Bcl-2-like 1* (bcl-xL) und Bcl-2 und

neutralisiert dadurch ihre inhibitorischen Effekte auf BAX und *Bcl-2-antagonist/killer* (BAK). Durch die Interaktion mit bcl-xL wird auch proapoptotisches *truncated Bid* (tBid), welches im Komplex mit bcl-xL vorliegt, freigesetzt. Ferner interagiert p53 in diesem Programm mit BAK und setzt es demzufolge vom inhibitorischen Komplex mit dem antiapoptotischen *myeloid cell leukemia sequence 1* (*Bcl-2-related*, Mcl1) frei. Auch BAX bindet p53. Durch diese Interaktionen werden BAK und BAX durch p53 zur Porenbildung stimuliert und die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran und demzufolge die Apoptose ausgelöst (Mihara *et al.*, 2003).

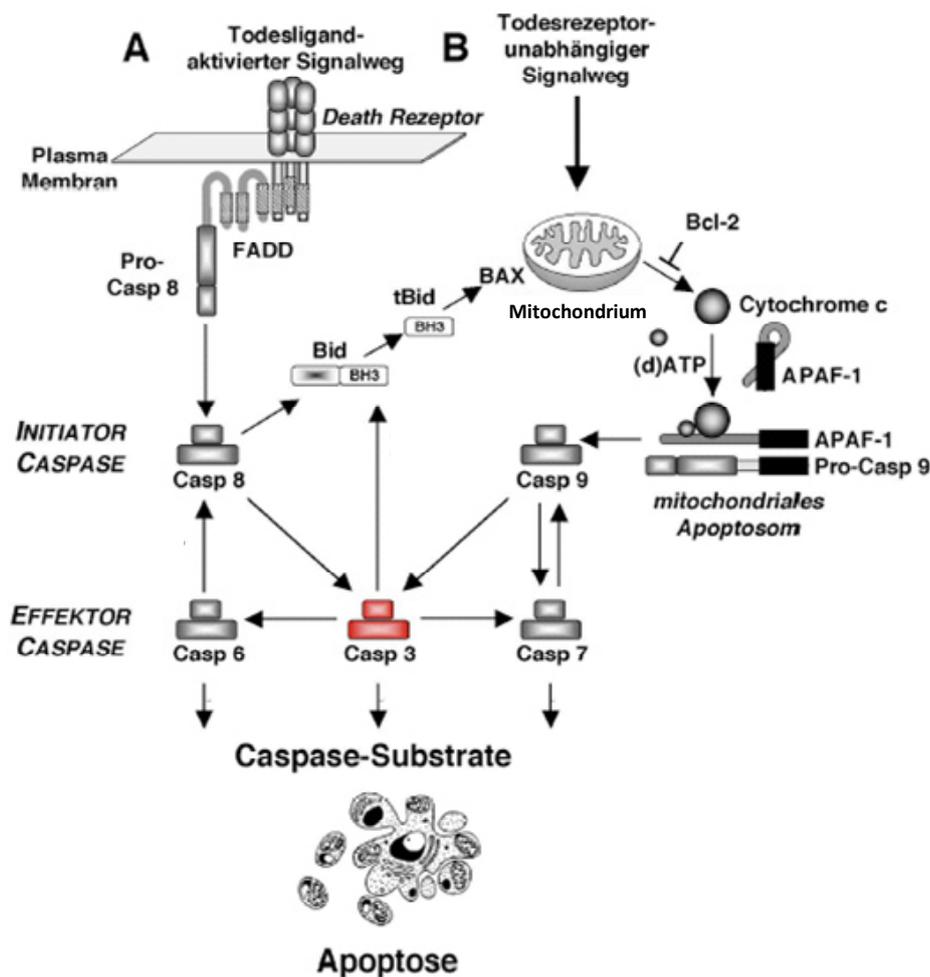


Abb. 6: Extrinsischer (A) und intrinsischer (B) Apoptosesignalweg
 Modifiziert nach <http://edoc.hu-berlin.de/habilitationen/daniel-peter-2002-11-05/HTML/chapter2.html>, APAF1 - *apoptotic peptidase activating factor 1*, ATP - Adenosintriphosphat, BAX - *Bcl-2-associated X protein*, Bcl-2 - *B-cell CLL/lymphoma 2*, BH3 - BH3-Domäne, Bid - *BH3 interacting domain death agonist*, Casp/Caspase - Cystein-Aspartat-spezifische Protease, FADD - *Fas (TNFRSF6)-associated via death domain*, tBid - *truncated Bid*

1.2.3 Überwindung der Resistenz bei der oxidativen stressinduzierenden Therapie durch Ausschalten von DNA-Schadens-Checkpoint-Proteinen

Die zentrale Funktion der oxidativen stressinduzierenden Therapien ist die Induktion eines erhöhten intrazellulären ROS-Levels mit daraus resultierenden DNA-, Zellstruktur- und Zellfunktionsschäden, die schlussendlich zu Zellzyklusarrest und/oder Zelltod führen (zusammengefasst in Ozben, 2007). Vorrangig wird hierbei der Zelltod angestrebt, um die Krebszellen zu eliminieren, da ein temporärer Zellzyklusarrest und erfolgreiche Reparaturprozesse zum Überleben und Proliferation der Zellen führen können.

Die oxidative stressinduzierende Therapie macht sich den veränderten Metabolismus der Krebszellen zu Nutze (zusammengefasst in Trachootham *et al.*, 2009a). Krebszellen nutzen die aerobe Glykolyse (Warburg-Effekt) zur ATP-Gewinnung und weisen z. B. aufgrund von Onkogenaktivierung, erhöhter metabolischer Aktivität, mitochondrialen Mutationen (mtDNA-Mutationen) und Defekten sowie aufgrund von chronischen Entzündungen ein erhöhtes intrinsisches ROS-Level auf (zusammengefasst in Pelicano *et al.*, 2004; Liou & Storz, 2010). Außerdem zeigen sie einen veränderten O_2 -Metabolismus (*Dysoxic Metabolism*), bei dem O_2 nicht über die oxidative Phosphorylierung, sondern durch ROS-Bildung verstoffwechselt wird, wodurch verstärkt endogenen ROS wie $O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 entstehen (zusammengefasst in López-Lázaro, 2010). Das führt zu einem ständigen Redox-Ungleichgewicht zugunsten der ROS. Die hohe ROS-Produktion und die dadurch entstehende Abhängigkeit der Krebszellen von AOX werden in der oxidativen stressinduzierenden Therapie ausgenutzt. Man hebt die ROS-Konzentration soweit an, dass vermutlich die antioxidative Kapazität der Krebszellen erschöpft wird und folglich durch ROS-Stress selektiv nur Krebszellen geschädigt werden (Abb. 7 A; zusammengefasst in López-Lázaro, 2010; Trachootham *et al.*, 2009a; Pelicano *et al.*, 2004). Krebszellen erreichen dabei aufgrund des erhöhten intrazellulären oxidativen Stresses schneller die Schwelle/Grenze der ROS-Toleranz als gesunde Zellen, die ein geringeres Level an ROS aufweisen. Daraus würden in den Krebszellen gravierende DNA-Schäden resultieren, die in der Endkonsequenz den ROS-induzierten Zellzyklusarrest und/oder Zelltod nach sich ziehen. Vorteil dieser Therapieform ist, dass normale Zellen weitestgehend unbeschädigt bleiben.

Des Weiteren werden die Krebszellen auch dadurch stärker geschädigt, da sie häufig eine fehlerbehaftete DNA-Schadensreparatur und zusätzlich eine höhere Zellteilungs-

rate aufweisen. Bei dem Versuch, die durch ROS verursachte geschädigte DNA zu replizieren, werden bei zu hohen Schädigungen apoptotische Mechanismen angeschaltet. Aus diesem Grunde ist die Schädigung hauptsächlich für sich replizierende Zellen toxisch (Kennedy & D'Andrea, 2006).

Ein weiterer Vorteil der oxidativen stressinduzierenden Therapie ist die Beeinflussung mehrerer Signalwege durch die ROS, womit entstehende Therapieresistenzen reduziert werden (Montero & Jassem, 2011).

Dennoch können einige Krebszellen durch verschiedenste Mechanismen dem oxidativen Stress entgehen (Resistenz; <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/tx200539j>, Stand: 19.06.2013; Trachootham *et al.*, 2009b). In ihnen sind beispielsweise Proteine der DNA-Schadensantwort, also der Kontrolle der Zellzyklus-*Checkpoints*, des DNA-Reparatursystems und der Apoptose, durch z. B. Mutationen im entsprechenden Gen, epigenetische Veränderungen und posttranslationale Modifikationen verändert (www.ddresponse.eu/damage_response.html, Stand: 19.06.2013). Dies kann dann zu Deregulationen und zur Funktionsstörung oder -veränderung dieser Proteine führen. Die Folgen sind beispielsweise unkontrollierte Proliferation, defekte Zellzyklus-*Checkpoints*, Apoptoseresistenz sowie veränderte Reaktionen auf Stress im Zuge der Therapie. Als Beispiel sei das Gen *tumor protein p53 (TP53)*, welches für das Tumorsuppressorprotein p53 kodiert, genannt (Varna *et al.*, 2011). Dieses ist in etwa 50 % der Tumore mutiert oder weist eine Proteinderegulation auf (http://p53.free.fr/p53_info/p53_cancer.html, Stand: 19.06.2013; Suzuki & Matsubara, 2011; Dai & Gu, 2010; Sherr & McCormick, 2002). Da dieses sowohl in Zellzyklus- und Zelltodregulation involviert ist, erklärt es seine Bedeutung in der Therapieantwort.

Konventionelle nichtoperative Antikrebstherapien, wie Bestrahlung und Chemotherapie, induzieren häufig wenig Zelltod in Tumorzellen (Izzo *et al.*, 2006). Krebszellen, die eine geringe zelltodauslösende Antwort auf oxidativen stressinduzierten DNA-Schaden zeigen, vollziehen meist einen Zellzyklusarrest, was ihr Überleben sichern kann (Vousden & Prives, 2009). Das aktuelle Ziel der Wissenschaftler ist daher die Aufklärung der molekularen Antworten der Krebszellen auf oxidativen Stress und dadurch eine pathologische Antwort der Krebszellen vorherzusagen sowie die Entwicklung und Verbesserung der Therapien zu erreichen. Damit einhergehend soll eine Erhöhung der Zelltodsensitivität erzielt werden.

Die meisten Krebszellen weisen einen deregulierten G1-*Checkpoint* aufgrund von Mutationen in *TP53*- und *Rb*-Tumorsuppressorgenen oder aufgrund einer Gleichgewichtsstörung der Zykline, Cdks und ihrer Inhibitoren auf (Sherr, 1996; Massagué,

2004). Damit sind diese Krebszellen auf die Aktivierung der Intra-S- und G2-*Checkpoints* angewiesen, um dem Zelltod zu entgehen. Diese sind z. B. von der ATR/Chk1-Signaltransduktion abhängig. Die Inhibierung von ATR oder Chk1 führt zu G2-*Checkpoint*-Defekten nach DNA-Schäden (Smith *et al.*, 2010). Die Aufhebung des G2-*Checkpoint* verhindert die Reparatur der DNA, zwingt die Zellen mit geschädigter DNA in die vorzeitige Mitose und dadurch in den Zelltod (Abb. 7 B, C; zusammengefasst in Chen *et al.*, 2012b). Normale Zellen hingegen aktivieren nach DNA-Schäden die G1-, S- und G2-*Checkpoints*. Daher haben diese Zellen noch die Möglichkeit, den G1-Arrest bei Inhibierung des S- und G2-Arrests zu etablieren und das Überleben zu garantieren. Die Verwendung von DNA-Schadens-*Checkpoint*-Proteinen als Ziel von Therapien beispielsweise durch den Einsatz von *Checkpoint*-Kinaseninhibitoren ist eine innovative Strategie, um zellzyklusarrestinduzierende Therapien zu verbessern (zusammengefasst in Janetka & Ashwell, 2009; Taylor & Stark, 2001). Hierbei kommt ein Umschalten vom Zellzyklusarrest in den Zelltod zum Tragen. Zielproteine schließen z. B. ATM, ATR, Chk1, ERK, p38 und JNK ein (Kikuchi *et al.*, 2013; Foote *et al.*, 2013; Ferrao *et al.*, 2012; Posch *et al.*, 2013; Antoon *et al.*, 2012; Eke *et al.*, 2013; Poehlmann & Roessner, 2010). Gezeigt wurde durch die Inaktivierung von ATR und Chk1 eine Sensitivierung gegenüber Chemo- und Strahlentherapie. Chk1-Inhibitoren befinden sich in präklinischen und anfänglichen klinischen Studien und ATR-Inhibitoren sensitivieren Krebszellen *in vitro* (zusammengefasst in Chen *et al.*, 2012b). Auch die Inhibierung der Kinasen *rat sarcoma* (Ras), *v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1* (Raf) und *mitogen-activated protein kinase kinase* (MEK) ist eine verfolgte Strategie (zusammengefasst in Poehlmann & Roessner, 2010).

Die Kombination von über oxidativen stressinduzierenden Therapien mit der Inhibierung/Inaktivierung von *Checkpoint*-regulierenden Proteinen stellt somit einen attraktiven Therapieansatz dar, um die Krebszellen für DNA-Schäden zu sensitivieren und verstärkt in den Zelltod zu zwingen. Die Identifizierung neuer potentieller Schlüsselproteine und molekularer Mechanismen, die den Zellzyklusarrest nach oxidativen stressinduzierenden Therapien maßgeblich vermitteln und damit eine verminderte Zelltodrate (Zelltodresistenz) auslösen, ist daher von enormer Bedeutung für die Forschung. Aus diesem Grunde war die Ermittlung eines solchen Proteins die zentrale Aufgabe der vorliegenden Arbeit.

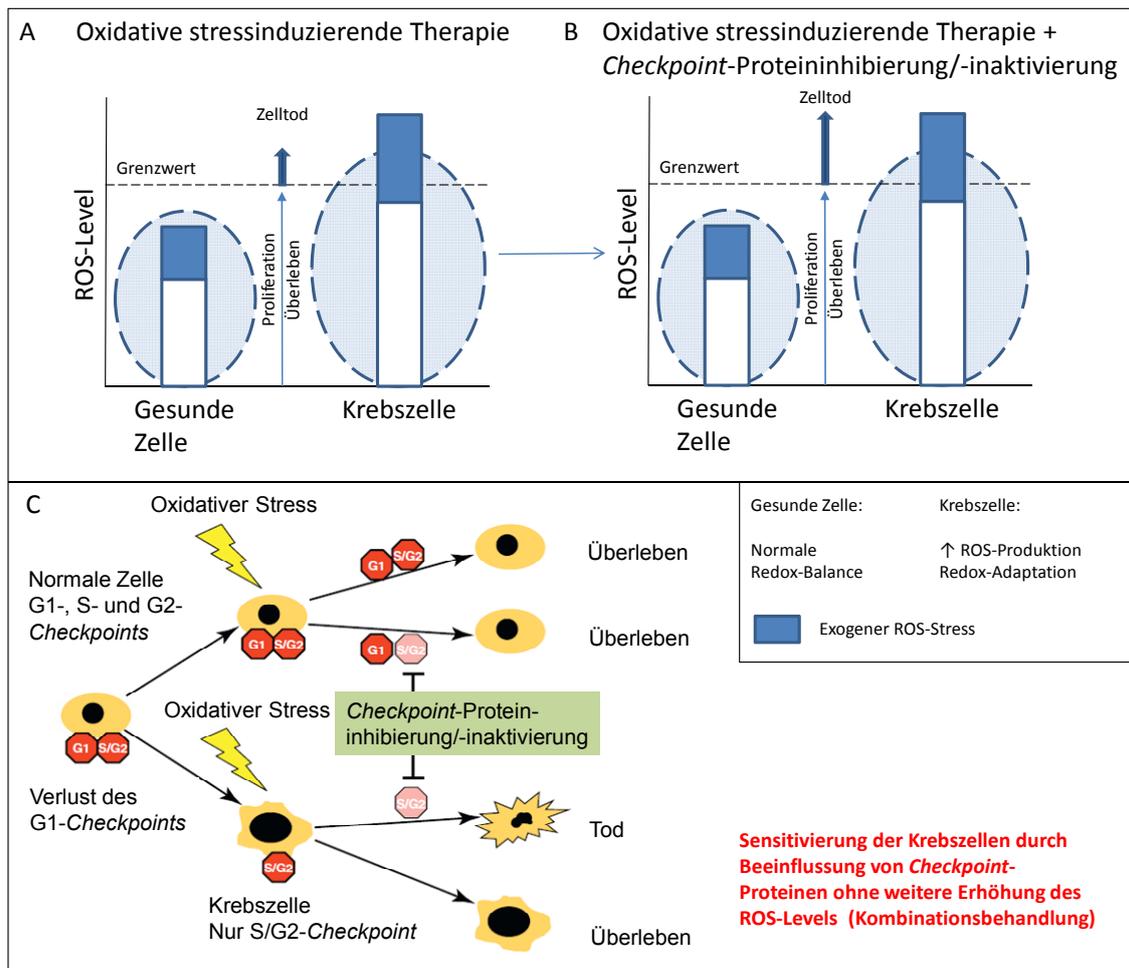


Abb. 7: Verbesserung der oxidativen stressinduzierenden Therapie durch Inhibierung/ Inaktivierung von *Checkpoint*-Proteinen

(A) Wirkung der oxidativen stressinduzierenden Therapie; (B) und (C) Wirkung der oxidativen stressinduzierenden Therapie in Kombination mit *Checkpoint*-Proteininhibierung/-inaktivierung und selektive Sensitivierung von G1-*Checkpoint*-defekten Krebszellen [modifiziert nach Trachootham *et al.* (2009a) und Chen *et al.* (2012b)]: Nach DNA-Schäden aktiviert eine normale Zelle die G1-, S- und G2-*Checkpoints*. Wenn die S/G2-*Checkpoints* durch Inaktivierung von *Checkpoint*-Proteinen inhibiert werden, können diese Zellen über den G1-*Checkpoint* arretieren, der Überleben ermöglicht. Im Gegensatz dazu sind Krebszellen auf ihre S- und G2-*Checkpoints* nach DNA-Schäden angewiesen. Wenn diese inhibiert werden, gehen die Zellen in den Zelltod. ROS - reactive oxygen species, G1/2, M, S – Zellzyklusphasen

1.3 Zielstellung

Für die klinische Praxis ist es notwendig, die oxidativen stressinduzierten DNA-Schadenstherapieantworten von zelltodresistenten Karzinomzellen zu verstehen und bestenfalls zu verbessern. Daher zielen neue Therapieansätze auf das Ausschalten von Proteinen ab, welche direkt oder indirekt in die DNA-Schadens-*Checkpoint*-Kontrolle involviert sind, um verstärkt Zelltod aus einem Zellzyklusarrest heraus auszulösen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, *in vitro* oxidativen Stress in Karzinomzellen unterschiedlichen Gewebeursprungs (Ösophagus, Lunge und Kolon) zu induzieren. Hierfür sollte die Substanz H₂O₂ in einer moderaten Konzentration von 250 µM verwendet werden. Für die Untersuchung molekularer Mechanismen, die zur Aktivierung eines DNA-Schadens-*Checkpoint*-Proteins führen, und zur Ermittlung der funktionellen Konsequenzen der DNA-Schädigung sollte eine zelltodresistente Karzinomzelllinie, die einen Zellzyklusarrest zeigt, aus vier untersuchten ausgewählt werden. Unter Betrachtung des *TP53*-Status und durch Analyse der p53-Expression nach der Behandlung sollte eine Erklärung für die beobachteten Stressantworten erbracht werden. Folgend sollte ein in der DNA-Schadens-, Zellzyklusarrest- und Apoptoseregulation zentral wirkendes Protein identifiziert werden, welches als molekularer Schalter zwischen Zellzyklusarrest und Zelltod fungiert. Die Beeinflussung des Proteins während der H₂O₂-Behandlung z. B. durch Inhibierung der Proteinfunktion sollte zur Verhinderung des Zellzyklusarrests und zum Zelltod führen. Das durch H₂O₂-Stress induzierte Protein sollte für die Tumorentität nicht beforscht sein. Abschließend sollte ein Ausblick gegeben werden, ob der Mechanismus auch für andere oxidative stress-induzierende Systeme und die anderen untersuchten Karzinomzelllinien gilt und dadurch ein allgemeingültiger Mechanismus eruiert werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen (Tabelle Tab. 1).

Tab. 1: Herkunft der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Albumin Fraktion V \geq 98 % pulv. aus Rinderplasma [Rinderserumalbumin, <i>bovine serum albumin</i> (BSA)]	Roth Carl GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ameisensäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth Carl GmbH & Co KG, Karlsruhe
Borsäure	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Roth Carl GmbH & Co KG, Karlsruhe
1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München
Chloroform	Roth Carl GmbH & Co KG, Karlsruhe
1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridiumdichloridhydrat (Paraquat, PQ)	Riedel-de-Haën GmbH, Seelze
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München
Dithiothreitol (DTT)	Roth Carl GmbH & Co KG, Karlsruhe
DMSO für die Zellkultur	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Essigsäure	Roth Carl GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ethanol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Ethidiumbromid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethylendiamintetraessigsäure [<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> (EDTA)]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München
EDTA (Dinatriumsalz)	
Formamid	
Glycerin	Roth Carl GmbH & Co KG, Karlsruhe
Glycin	
Harnstoff	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol	Roth Carl GmbH & Co KG, Karlsruhe
Methanol	
Milchpulver	
Natriumacetat	
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt

Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München
Natriumdodecylsulfat [<i>sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)]	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumhydroxid-Pellets	Merck KGaA, Darmstadt
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München
<i>t</i> -Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100)	
Paraformaldehyd	
p-Phenylendiamin (PDA)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth Carl GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ponceau S	
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
Salpetersäure	Roth Carl GmbH & Co KG, Karlsruhe
Silbernitrat	
Stickstoff (flüssig)	Messer Group GmbH, Bad Soden
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München
Trinatriumcitrat Dihydrat	Roth Carl GmbH & Co KG, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tween 20	
Wasser (bidestilliert, ddH ₂ O, RNase-frei) für die Molekularbiologie	Roth Carl GmbH & Co KG, Karlsruhe
Xylencyanol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

2.1.2 Gebrauchsmaterialien

Die Gebrauchsmaterialien wurden von den folgenden Firmen bezogen (Tab. 2).

Tab. 2: Herkunft der verwendeten Gebrauchsmaterialien

Materialien	Bezugsquelle
Blot-Papier	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Deckgläser	Roth Carl GmbH & Co KG, Karlsruhe
Glasplatten	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
8-Kammernzellkulturobjektträger: BD Falcon CultureSlides, 8-well	BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Kapillarspitzen 200 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Kryoröhrchen	Roth Carl GmbH & Co KG, Karlsruhe
Mehrkanal Pipette Research® Pro 300	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrotiterschüttler MTS 2/4 digital	IKA®-Werke, Staufen

Nitrocellulose Membran Protran BA85	Whatman GmbH, Dassel
Petrischale Falcon® 100 × 15 mm	VWR International GmbH, Darmstadt
Pinzetten	Aesculap AG, Tuttlingen
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard (0,1–10 µl, 0,5–20 µl, 2–200 µl, 50–1.000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
PP-Schraubverschlussröhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PP-Schraubverschlussröhrchen, 50 ml	
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Tubes™ Eppendorf Safe-Lock (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
96-Well-Mikrotiterplatten	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Zellkulturflaschen 75 cm ²	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen 100 × 20 mm	Corning, Inc., Corning, NY, USA
Zellkulturschalen 144 × 21 mm	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Zellkulturtestplatte 6 Kalotten	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturtestplatte 96 Kalotten	
Zellschaber 240 mm	

2.1.3 Verwendete Kits

Die Kits wurden von den folgenden Firmen bezogen (Tab. 3).

Tab. 3: Herkunft der verwendeten Kits

Kit	Bezugsquelle
AmpoLabeling-LRP Kit	SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD, USA (Firma existiert nicht mehr)
Annexin-V-FLUOS Staining Kit	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	
ChIP-IT® Express Magnetic Chromatin Immunoprecipitation Kit (# 53008)	Active Motif, Carlsbad, CA, USA
DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
GEArray Q Series Human Signal Transduction PathwayFinder Gene Array	SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD, USA (Firma existiert nicht mehr)
Human MAP Kinase Signaling Pathway RT ² Profiler™ PCR Array, Format A	
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (HRP - <i>horseradish peroxidase</i>)	Millipore, Billerica, MA, USA
Reverse Transcription System	Promega GmbH, Mannheim

RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
2x SensiMix Plus SYBRgreen plus FITC mix Kit	Bioline GmbH, Luckenwalde
Taq PCR Core Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Trevigen's Comet Assay™	Trevigen Inc., Gaithersburg, MD, USA
Universal Magnetic Co-IP Kit (Version A)	Active Motif, Carlsbad, CA, USA

2.1.4 Geräte

Die Geräte wurden von den folgenden Firmen bezogen (Tab. 4).

Tab. 4: Herkunft der verwendeten Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Analysenwaage MC 210 P	Sartorius AG, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
CO ₂ -Inkubator WTB Binder	Binder GmbH, Tuttlingen
Durchflusszytometer BD FACSCalibur Flow Cytometer	BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Elektrophoresekammern Mini-Protean® 3 Electrophoresis Cell, Mini-Trans Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Geldokumentationssystem Gene Genius Bio Imaging System	Merck KGaA, Darmstadt
Geldokumentationssystem GeneGnome HR Chemiluminescence System	
Heizblock HLC TM 130-6	Ditabis AG, Pforzheim
Homogenisator Sonopuls HD 2070	Bandelin, Berlin
Horizontale Elektrophoreseapparatur Multiphor II	Pharmacia Biotech AG, Dübendorf, Schweiz
Horizontale Elektrophoreseapparatur Life Technologies Gibco BRL Horizon 11-14	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Hybridisierungsöfen Techne Hybridiser HB-1D	Bibby Scientific Limited, Stone, Staffordshire, UK
Inverses Mikroskop Nikon TE 300	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank HERAsafe	Fisher Scientific, Inc., Billerica, MA, USA
Mikroskop Zeiss Axioplan 2 Imaging	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikrotiterplatten Leser MRX TC Revelation	Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA
Mikrotiterschüttler MTS 2/4 digital	IKA®-Werke, Staufen
Netzgerät PowerPac™ Basic 300 V Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
pH-Meter S20 - SevenEasy™ pH	Mettler-Toledo, Inc., Columbus, USA
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Rotator SB2	VWR International GmbH, Darmstadt
Schüttler MS2 Minishaker	IKA®-Werke, Staufen

Stickstoffbehälter MVE CryoSystem 4000	Cryo Solution b.v., BA's Hertogenbosch, Niederlande
Thermozykler MJ Research PTC-200 Thermo Cycler, PTC-100 Programmable Thermal Controller, iCycler Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Tischzentrifuge Sprout [®] Mini-Centrifuge	Heathrow Scientific LLC, Vernon Hills, IL, USA
Wärmeschränke	DJB LabCare Ltd, Newport Pagnell Buckinghamshire, UK; Binder GmbH, Tuttlingen
Wasserbad	Störk-Tronic, Störk GmbH & Co. KG, Stuttgart
Z2 [™] Coulter Counter [®] , Analyzer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifuge Centrifuge 5403	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifugen Heraeus Megafuge 1.0R, Multifuge 3SR	DJB LabCare Ltd, Newport Pagnell Buckinghamshire, UK

2.1.5 Lösungen und Puffer

Die Lösungen und Puffer wurden von den folgenden Firmen bezogen (Tab. 5) oder eigens nach entsprechenden Zusammensetzungen hergestellt (Tab. 6).

Tab. 5: Herkunft der verwendeten Lösungen und Puffer

Lösungen/Puffer	Bezugsquelle
Coulter Isoton II Diluent	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) Mix	Qiagen GmbH, Hilden
Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München
Formaldehyd 16 % (methanolfrei)	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Formaldehydlösung 37 %	Merck KGaA, Darmstadt
H ₂ O ₂ -Lösung 30 %	Zentralapotheke, Universitätsklinikum Magdeburg
Lachssperma-DNA (<i>Salmon Sperm DNA</i>)	SuperArray Bioscience Corporation, Frederick, MD, USA (Firma existiert nicht mehr)
1x Phosphatgepufferte Salzlösung [<i>phosphate buffered saline (PBS)</i>] pH 7,4	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München
10x PBS, Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -frei	Life Technologies GmbH, Darmstadt
10x PCR-Puffer	Active Motif, Carlsbad, CA, USA
Phenol : Chloroform : Isoamyl Alcohol (25 : 24 : 1) saturated with 10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München
Restore [™] Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Rotiphorese [®] Gel 30 (wässrige 30 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37,5 : 1)	Roth Carl GmbH & Co KG, Karlsruhe
SYBR Green I	Trevigen, Inc., Gaithersburg, MD, USA
TRizol [®] Reagent	Life Technologies GmbH, Darmstadt

Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA

Tab. 6: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
Acryl-PDA für VWA-Gele	14,1 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1) 65 mM PDA
Alkalische Lösung (Comet Assay)	300 mM Natriumhydroxid-Pellets 1 mM EDTA
Annexin-V-Färbelösung	20 µl FITC-konjugiertes Annexin-V-Reagenz (20 µg/ml), 20 µl isotonisches PI [50 µg/ml PBS (pH 7.4)] 1000 µl 1 M 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]- ethansulfonsäure (HEPES) Puffer
Blockierungspuffer	5 % Milchpulver in TBST
5x Elektrodenpuffer	0,23 M Tris 1,92 M Glycin 1 % SDS
1x Elektrodenpuffer	Herstellung aus 5x Elektrodenpuffer mit destilliertem Wasser (dH ₂ O)
Entwicklerlösung (Silbergele)	140 mM Natriumcarbonat 0,03 % Formaldehyd
10x Ladepuffer	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 40 % Saccharose
2x Ladepuffer	4 M Harnstoff 2 % SDS 62,4 mM Tris pH 6,8 Bromphenolblau
Lysepuffer pH 6,8	4 M Harnstoff 0,5 % SDS 62,5 mM Tris pH 6,8 Bromphenolblau
10x MOPS-Puffer pH 7,0	0,2 M MOPS 0,05 M Natriumacetat 0,01 M EDTA
1x MOPS-Puffer pH 7,0	Herstellung aus 10x MOPS-Puffer pH 7,0 mit dH ₂ O
1x PBS, Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -frei (Comet Assay)	Herstellung aus 10x PBS, Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -frei mit dH ₂ O

PI-Lösung	50 µg/ml PI 0,1 % Trinatriumcitrat Dihydrat 0,1 % Triton X-100 in 1x PBS
Ponceau S Färbelösung	105 µM Ponceau S 3 % Essigsäure
Probenpuffer (Formamidgele)	50 % Glycerin 0,05 M EDTA 0,25 % Bromphenolblau
5x Probenpuffer	4 M Harnstoff 10 % SDS 62,4 mM Tris pH 6,8 20 % DTT Bromphenolblau
2x Reduzierender Ladepuffer (ChIP, Ko-IP)	130 mM Tris pH 6,8 4 % SDS 0,02 % Bromphenolblau 20 % Glycerin 100 mM DTT
Sammelgelpuffer pH 6,8	2,33 M Tris 0,5 % SDS
SYBR-Green-I-Färbelösung (Comet Assay)	0,1 µl SYBR Green I 1 ml TE-Puffer pH 7,5 (Comet Assay)
10x TBE (Comet Assay)	0,89 M Tris 0,89 M Borsäure 25 mM EDTA (Dinatriumsalz)
5x TBE pH 8,3 (Silbergele)	0,45 M Tris 0,44 M Borsäure 10 mM EDTA
2x TBE Elektrophoresepuffer (Silbergele)	Hergestellt aus 5x TBE pH 8,3, mit Bromphenolblau angefärbt
1x TBE (Comet Assay)	Herstellung aus 10x TBE (Comet Assay) mit dH ₂ O
TBS	10 mM Tris pH 8,0 150 mM Natriumchlorid
TBST	10 mM Tris pH 8,0 150 mM Natriumchlorid 0,05 % Tween 20
TE-Puffer pH 7,5 (Comet Assay)	10 mM Tris pH 7,5 1 mM EDTA (Dinatriumsalz)
Transferpuffer	26,4 mM Tris pH 8,3 192 mM Glycin 15,99 % Methanol

Trenngelpuffer pH 8,8	2,33 M Tris 1 % SDS
Tris-Puffer für VWA-Gele	0,75 M Tris 0,44 % Ameisensäure

2.1.6 Marker und Standards

Die Marker und Standards wurden von den folgenden Firmen bezogen (Tab. 7).

Tab. 7: Herkunft der verwendeten Marker und Standards

Marker/Standards	Bezugsquelle
Biotinylierter Proteinmarker	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
DNA-Längenstandard VIII	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim

2.1.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer, Tab. 8) für die Polymerase-Kettenreaktionen [*polymerase chain reaction* (PCRs)] wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert.

Tab. 8: Sequenzen der verwendeten Primer

Primerbezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Orientierung
DW-p21 neg control F/R	TGT TCC GCC TCT TCT CTG G	Sense (F)
	AAG GGA GAG GAA GTG CTG G	Anti-Sense (R)
DW-p21 prom pp3 F/R	TTA CGC CAC TGT GTC CAC C	Sense (F)
	CGG GGT TCT GAC CTC ATA C	Anti-Sense (R)

A - Adenin, C - Cytosin, F - *forward*, G - Guanin, R - *reverse*, T - Thymin

2.1.8 Zellkulturen

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden die in der Tab. 9 aufgeführten humanen Karzinomzelllinien verwendet.

Tab. 9: Gewebsursprung und Herkunft der verwendeten humanen Karzinomzelllinien

Zelllinie	Gewebsursprung	Bezugsquelle
BIC-1 (Zelllinie SW620, ATCC_CCL-227)	Kolorektales Adenokarzinom (epithelial; Boonstra <i>et al.</i> , 2010)	Freundlicherweise von Wael-EI-Rifa (Vanderbilt University Medical Center, Nashville, NT, USA) zur Verfügung gestellt

OE-33 (ECACC No. 96070808)	Adenokarzinom des unteren Ösophagus (Barrett's Metaplasie; Boonstra <i>et al.</i> , 2010)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München
SEG-1 (Zelllinie H460, ATCC_HTB-177)	Großzelliges Lungenkarzinom der Kategorie nichtkleinzelliger Lungenkarzinome (NSCLC; Boonstra <i>et al.</i> , 2010)	Freundlicherweise von Wael-EI-Rifa (Vanderbilt University Medical Center, Nashville, NT, USA) zur Verfügung gestellt
TE-7	Ösophageales Plattenepithelkarzinom (Boonstra <i>et al.</i> , 2007)	

2.1.9 Medien und Zusätze

Die Medien und Zusätze wurden von den folgenden Firmen bezogen (Tab. 10).

Tab. 10: Herkunft der verwendeten Medien und Zusätze

Medien/Zusätze	Bezugsquelle
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) - reich an Glucose, mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Fötale Kälberserum [<i>fetal calf serum</i> (FCS)]	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
L-Glutamin 200 mM (100x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Penicillin/Streptomycin (100x)	
RPMI 1640 - mit L-Glutamin	

2.1.10 Enzyme

Die Enzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen (Tab. 11).

Tab. 11: Herkunft der verwendeten Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Reverse Transkriptase	Promega GmbH, Mannheim
RNase A Pulver	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim
<i>Termus aquaticus</i> (Taq)-DNA-Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden

2.1.11 Inhibitoren

Die Inhibitoren wurden von den folgenden Firmen bezogen (Tab. 12).

Tab. 12: Herkunft der verwendeten Inhibitoren

Inhibitor	Bezugsquelle
Phosphataseinhibitor	Active Motif, Carlsbad, CA, USA
PMSF	Thermo Fisher Scientific, Inc., Billerica, MA, USA
Protease Inhibitor Cocktail Set III	Merck KGaA, Darmstadt
SP600125	BioSource International, Inc., Camarillo, USA

2.1.12 Antikörper

Immunologische Proteinnachweise wurden mit den Antikörpern der folgend aufgeführten Tabellen (Tab. 13–Tab. 16) durchgeführt. Sofern nichts anderes angegeben ist, wurden die Antikörperverdünnungen in Blockierungspuffer angesetzt.

Tab. 13: Verwendete Primärantikörper für die Methode des *Western Blot*

Primär-antikörper: Anti-	Wirtsorganismus	Bezugsquelle	Verdünnung	Verdünnung sekundärer Antikörper	
ATF-2 (20F1)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	1 : 1.000 in 5 % BSA	1 : 10.000	
β -Aktin	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München	1 : 10.000	1 : 30.000	
BAX	Kaninchen	DakoCytomation, Inc., Carpinteria, CA, USA	1 : 500	1 : 10.000	
Bcl-2			1 : 1.500 in 5 % BSA		
Caspase 3			1 : 1.000		
Caspase 8			1 : 1.000 in 5 % BSA		
Caspase 9	Maus	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	1 : 1.000	1 : 20.000	
Chk1	Kaninchen		1 : 1.000	1 : 10.000	
Chk1	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA	1 : 500	1 : 20.000	
c-Jun	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	1 : 1.000 in 5 % BSA	1 : 10.000	
ERK 1/2					
H2AX			Millipore, Billerica, MA, USA		1 : 5.000
H3			Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA		1 : 1.000 in 5 % BSA
JNK					
p21 ^{WAF1}	Maus	Merck KGaA, Darmstadt	1 : 375	1 : 30.000	
p38	Kaninchen	Cell Signaling Technology,	1 : 1.000 in 5 % BSA	1 : 10.000	

		Inc., Danvers, MA, USA		
p53	Maus	Merck KGaA, Darmstadt	1 : 50	1 : 30.000
p300/CBP		Acris Antibody GmbH, Herford	1 : 200	
p-ATF-2 ^{Thr69/71}	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	1 : 1.000 in 5 % BSA	1 : 10.000
p-Chk1 ^{Ser317}		Novus Biologicals, Inc., Littleton, CO, USA	1 : 500	
p-c-Jun ^{Ser73}		Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	1 : 1.000 in 5 % BSA	
p-ERK 1/2 ^{Thr202/Tyr204}				
p-H2AX ^{Ser139} (γ-H2AX)	Maus	Millipore, Billerica, MA, USA	1 : 2.000	1 : 30.000
p-H3 ^{Ser10}	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	1 : 1.000 in 5 % BSA	1 : 10.000
p-JNK ^{Thr183/Tyr185}				
p-p38 ^{Thr180/Tyr182}				
Zyklin D1	Maus		1 : 2.000	1 : 30.000

Tab. 14: Verwendete Sekundärantikörper für die Methode des *Western Blot*

Sekundärantikörper	Bezugsquelle
Anti-Biotin, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Goat Anti-Mouse IgG (H + L), HRP-conjugated	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Goat Anti-Rabbit IgG (H + L), HRP-conjugated	

Tab. 15: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für immunzytochemische Färbungen

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-ATF-2 (20F)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Anti-p-H2AX ^{Ser139} (γ-H2AX)	Millipore, Billerica, MA, USA
Cy TM 3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG [H + L, Carbocyanin (Cy3) Goat Anti-Mouse (GAM)]	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Suffolk, England
Fluorescein Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) [Fluoresceinisothiocyanat (FITC) Goat Anti-Rabbit (GAR)]	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA

Tab. 16: Primär- und Sekundärantikörper in Ihrer Verdünnung für immunzytochemische Färbungen

Primärantikörper: Anti-	Verdünnung primärer Antikörper	Sekundärantikörper	Verdünnung sekundärer Antikörper
ATF-2 (20F)	1 : 400	FITC Anti-Rabbit	1 : 100
p-H2AX ^{Ser139} (γ -H2AX)	1 : 200	Cy3 GAM	1 : 400

Für die Methoden Ko-Immun- und Chromatin-Immunpräzipitation wurde ferner der Antikörper *Normal Rabbit IgG* (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) verwendet.

2.1.13 Reagenzien für die siRNA-Transfektion (*Knockdown*)

Die Reagenzien für die *small interfering RNA* (siRNA)-Transfektion, die *activating transcription factor 2* (ATF-2)-siRNA (h, sc-29205), das Transfektionsmedium (sc-36868) und Transfektionsreagenz (sc-29528), wurden von der Firma Santa Cruz Biotechnology, Inc. bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung humaner Karzinomzelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden humane Karzinomzelllinien als *in-vitro*-Testsystem verwendet, um die molekularen *in-vivo*-Prozesse von Tumorzellen nachzustellen. Die adhärenenten Karzinomzellen wurden in 75-cm²-Zellkulturflaschen mit 20 ml komplettem Nährmedium bei 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit im CO₂-Inkubator kultiviert. Den zelllinienspezifischen kompletten Nährmedien wurden entsprechend die Komponenten FCS, Penicillin/Streptomycin bzw. L-Glutamin zugesetzt (Tab. 17).

Tab. 17: Zusammensetzung der kompletten Nährmedien der verwendeten Karzinomzelllinien

Karzinomzelllinie	Zusammensetzung des kompletten Nährmediums
BIC-1	DMEM 10 % FCS
OE-33	RPMI 10 % FCS 1 % Penicillin (100 <i>units</i> (U)/ml) 1 % Streptomycin (100 µg/ml) 1 % L-Glutamin (2 mM)
SEG-1	DMEM 10 % FCS 1 % Penicillin (100 U/ml) 1 % Streptomycin (100 µg/ml) 1 % L-Glutamin (2 mM)
TE-7	DMEM 10 % FCS 1 % Penicillin (100 U/ml) 1 % Streptomycin (100 µg/ml)

Um optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen, fand alle drei bis vier Tage ein Wechsel des Nährmediums statt. Für die Karzinomzelllinie OE-33 wurde ein verändertes Protokoll angewandt. Dabei wurde die Hälfte des bereits auf den Zellen befindlichen konditionierten Mediums mit 50 % neuem Mediumanteil versetzt, da diese Zellen die eigens sekretierten Wachstumsfaktoren im konditionierten Medium für ein adäquates Zellwachstum benötigten. Demzufolge wurden die Zellen dieser Karzinomzelllinie im Gegensatz zu den anderen verwendeten Karzinomzelllinien beim Mediumwechsel nicht mit sterilem 1x PBS gewaschen.

Bei einer Konfluenz von ca. 90 % erfolgte die Zellernte mit anschließender Weiterkultivierung. Hierbei wurde zunächst das Nährmedium abgenommen, die Zellen mit sterilem 1x PBS gespült und für 1 min mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach der Entfernung von zwei Drittel dieser Lösung erfolgte eine fünfminütige (zweifminütige bei der Karzinomzelllinie TE-7) Inkubation im CO₂-Inkubator bei den eingangs genannten Bedingungen. Die nun vollständig vom Zellkulturgefäß abgelösten Zellen wurden in 10 ml komplettem Nährmedium aufgenommen und entsprechend der weiteren Verwendung nach einer Zellzahlbestimmung mithilfe des Z2TM Coulter Counter[®] verdünnt in neuen Zellkulturflaschen oder auf entsprechenden Materialien weiterkultiviert.

2.2.1.2 Aufbewahrung und Reaktivierung der Zellen

Zur längeren Lagerung der Zellkulturen wurden 2×10^6 Zellen nach dem Ablösen mit Trypsin-EDTA einmal mit sterilem 1x PBS gewaschen und anschließend für 10 min bei 700 rpm zentrifugiert. Es folgte die Aufnahme der Zellen in 2 ml 10 %iger DMSO-Lösung in komplettem Nährmedium und die langsame Abkühlung in Kryoröhrchen (etwa 1 °C pro Minute) auf eine Lagertemperatur von - 80 °C. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Zellen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff bei - 196 °C überführt. Zur Reaktivierung wurden die gefrorenen Zellen bei 37 °C aufgetaut und mit 20 ml komplettem Nährmedium ausplattiert. Nach 24 h erfolgte ein Wechsel des Mediums. Anschließend wurden die Zellen standardisiert kultiviert.

2.2.1.3 Behandlung mit H₂O₂, PQ, CDNB und SP600125

Um oxidativen Stress in den Karzinomzellen auszulösen, wurden diese mit H₂O₂, PQ bzw. CDNB behandelt. Hierzu wurden die Zellen vorerst zu 50 % Konfluenz ausgesät und für 24 h im CO₂-Inkubator unter den eingangs erwähnten Bedingungen inkubiert. Dann wurde das Nährmedium abgenommen, die Zellen einmal mit sterilem 1x PBS gewaschen und mit frischem substanzversetzten kompletten Nährmedium überschichtet. Eingesetzt wurden 10–500 µM H₂O₂, 100 µM PQ bzw. 150 µM CDNB. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen im CO₂-Inkubator unter den eingangs genannten Bedingungen für die gewünschte Zeit.

Für die Karzinomzelllinie OE-33 fand ein modifiziertes Protokoll Anwendung. Dabei wurde nach der Inkubation im CO₂-Inkubator bei den eingangs genannten Bedingungen auf den Waschschrift mit 1x PBS verzichtet und 50 % frisches komplettes Nährmedium mit darin enthaltener Substanz mit 50 % konditioniertem Medium kombiniert. Es folgte die Überschichtung der Zellen mit dieser Mediummischung und eine Inkubation im CO₂-Inkubator unter den eingangs genannten Bedingungen für die gewünschte Zeit.

Für die JNK-Inhibierung wurden die Zellen mit frischem kompletten Nährmedium und darin enthaltenem SP600125 mit einer Endkonzentration von 10 µM überschichtet und für 1 h inkubiert. Zu dieser Mischung wurde dann H₂O₂ oder komplettes Nährmedium als Kontrolle hinzugegeben, gemischt und für die gewünschte Zeit inkubiert. Es wurde ebenso eine DMSO-Kontrolle mitgeführt.

2.2.1.4 Proteinextraktion aus Zellen

Die Extraktion von Proteinen aus den Karzinomzellen diente der Proteinexpressionsanalyse. Die Karzinomzellen wurden hierfür mittels Zellschaber von den Zellkulturschalen gelöst und zusammen mit dem Überstand gesammelt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4.500 rpm und 4 °C. Anschließend wurde das Zellpellet mit 1x PBS gewaschen. Dann erfolgte eine 60-minütige Zellyse auf Eis mittels des Lysepuffers pH 6,8, dem vor Gebrauch der *Protease Inhibitor Cocktail (Set III)* in einer Verdünnung von 1 : 100 und PMSF mit einer Endkonzentration von 1 mM hinzugegeben wurde. Um den Aufschluss zu beschleunigen, wurden die Proben innerhalb dieser Zeit alle 10 min gevortext. Die Homogenisierung des Lysats erfolgte mit dem *Sonopuls HD 2070 per* Ultraschall und die Lysate wurden schließlich bei - 80 °C aufbewahrt.

2.2.1.5 Kolorimetrischer BrdU-Zellproliferations-Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay (ELISA)

Der Einbau des Pyrimidinanaloges 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) während der DNA-Synthese proliferierender Zellen diente der Proliferationsmessung. Verwendet wurde der kolorimetrische BrdU-Zellproliferations-ELISA von Roche laut Herstellerangaben. Hierbei wurden die zu untersuchenden Zellen für die gewünschte Zeit behandelt und anschließend für 5 h mit BrdU inkubiert. Das Abstoppen der Peroxidasereaktion erfolgte nach 10 min und die Messung der Absorption bei 450 nm im Spektrophotometer (ELISA reader). Der *Blank*-Mittelwert wurde von den Rohdaten abgezogen und diese korrigierten Werte wurden dann für die Erstellung der Diagramme verwendet. Es wurden jeweils drei unabhängige Versuche zur Datenerhebung durchgeführt.

2.2.1.6 Propidiumiodid-(PI)-Färbung

Die PI-Färbung diente der Bestimmung der Zellzyklusphase der Karzinomzellen. Diese lässt sich nach dem Verdau von doppelsträngiger RNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff PI, das stöchiometrisch in Nukleinsäuren interkaliert, nachweisen. Für die Färbung mit PI wurde der Überstand (das Nährmedium) gesammelt. Es folgte eine zweimalige Spülung der Zellen mit eiskaltem 1x PBS und dieses wurde anschließend zu dem Überstand gegeben. Die Zellen wurden dann zur Ablösung vom Gefäßboden mit Trypsin-EDTA [750 µl/Zellkulturschale (100 × 20 mm)] für die entsprechende Zeit im

CO₂-Inkubator unter den eingangs genannten Bedingungen inkubiert. Folgend wurden sie mit 1x PBS aufgenommen und mit dem bereits gesammelten Überstand-PBS-Gemisch kombiniert. Die Zellen wurden nun mit dem *Z2TM Coulter Counter[®]* gezählt, 1×10^6 Zellen/Probe bei 750 rpm 15 min bei 4 °C gesammelt und der Überstand vorsichtig entfernt. Es folgte die Färbung der Zellen mit 200 µl PI-Lösung für mindestens 30 min auf Eis unter Lichtausschluss. Anschließend analysierte Dr. Roland Hartig (Institut für Molekulare und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Magdeburg) die gefärbten Zellen mit dem Durchflusszytometer *BD FACSCalibur Flow Cytometer* unter Verwendung eines Lasers mit einer Exzitation von 488 nm und des entsprechenden Emissionsfilters für 585/42 nm (PI-Detektion, Kanal FL2). Die Analyse und Auswertung der Daten erfolgte mit der Software *CellQuest Pro 4.0.2*. Dargestellt wurde im Ergebnisteil jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

2.2.1.7 Annexin-V-FITC- und PI-Färbung

Die Methode der Färbung der Zellen mit Annexin-V-FITC und PI diente der Bestimmung des Gesamtzelltods und der Messung von apoptotischen und nekrotischen Zellpopulationen. Hierzu fand der *Annexin-V-FLOUS Staining Kit* von Roche Anwendung. Die Zellen wurden unter den entsprechenden Bedingungen für die jeweilige Zeit inkubiert. Das Nährmedium wurde gesammelt und die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit Trypsin-EDTA abgelöst, mit dem gesammelten Nährmedium kombiniert und mit dem *Z2TM Coulter Counter[®]* gezählt. 1×10^6 Zellen/Probe wurden anschließend durch fünfminütige Zentrifugation bei 200 g gesammelt. Es folgte die Färbung des Zellpellets mit 100 µl Annexin-V-Färbelösung für 15 min bei RT unter Lichtausschluss. Die mit 100 µl 1x PBS verdünnten angefärbten Zellen wurden anschließend mit dem Durchflusszytometer *BD FACSCalibur Flow Cytometer* unter Verwendung eines Lasers mit einer Exzitation von 488 nm und den entsprechenden Emissionsfiltern für 530/30 nm für die FITC-Fluoreszenzdetektion (Kanal FL1) und 617 nm (Langpassfilter LP) für die PI-Fluoreszenzdetektion (Kanal FL3) von Dr. Roland Hartig analysiert. Die Analyse und Auswertung der Daten erfolgte mit der Software *CellQuest Pro 4.0.2*. Anschließend wurden die Zellen des unteren und oberen rechten sowie des oberen linken Quadranten zusammengefasst und als Gesamtzelltod der Probe definiert. Als nekrotische Zellen wurden jene im linken und rechten oberen Quadranten betrachtet. Als apoptotische Zellen wurden solche im

rechten unteren Quadranten angesehen. Es wurden mindestens drei unabhängige Versuche zur Datenerhebung durchgeführt.

2.2.1.8 siRNA-Transfektion (*Knockdown*)

Die Methode der siRNA-Transfektion wurde zur transienten Verringerung der ATF-2-Genexpression (*Gen-Knockdown*) genutzt. Für den *Gen-Knockdown* fand das Protokoll „*siRNA mediated inhibition of gene expression*“ einsehbar auf der Internetseite http://www.scbt.com/protocols.html?protocol=sirna_mediated_inhibition_of_gene_expression (Stand: 16.06.2013) der Firma Santa Cruz Biotechnology, Inc. mit den folgenden Veränderungen Anwendung.

Für die Proteinexpressionsanalysen mittels *Western Blot* wurden die Zellen in Zellkulturplatten mit sechs Kalotten à $2,7 \times 10^5$ Zellen/Kalotte in 2 ml FCS-versetztem antibiotikafreien Medium ausgesät und für 24 h im CO₂-Inkubator unter den eingangs genannten Bedingungen inkubiert, sodass eine Konfluenz von 70–80 % erreicht wurde. Es wurde mit RNase- und DNase-freiem Material gearbeitet. Vorexperimente lieferten eine optimale ATF-2-siRNA(h)-Konzentration von 8 µl siRNA (80 nM) mit 6 µl Transfektionsreagenz verdünnt in Transfektionsmedium. Diese Mischung wurde für 45 min unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend für 7 h auf den Zellen im CO₂-Inkubator bei den eingangs genannten Bedingungen belassen. Danach wurde H₂O₂ oder CDNB in 2x komplettem Nährmedium verdünnt und direkt, ohne das Transfektionsgemisch zu entfernen, auf die Zellen gegeben. Es folgte die Inkubation der Zellen im CO₂-Inkubator unter den eingangs genannten Bedingungen und die Ernte zu den entsprechenden Zeitpunkten. Für die sich an diese Methode anschließenden Zellzyklusanalysen mittels „Propidiumiodid-(PI)-Färbung“ (2.2.1.6) und Zelltodmessungen durch „Annexin-V-FITC- und PI-Färbung“ (2.2.1.7) wurden 2×10^6 Zellen auf Zellkulturschalen (100 × 20 mm) ausgesät und das Protokoll gemäß des größeren Mediumvolumens angepasst. Es wurden jeweils drei unabhängige Versuche zur Datenerhebung durchgeführt und eine repräsentative Abbildung dargestellt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 DNA-Analytik

2.2.2.1.1 DNA-Präparation aus Zellen

Die DNA aus den Zellen wurde zur Beurteilung der DNA-Scherung im Rahmen der Methode der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) isoliert. Das entsprechende Protokoll „Section C. DNA Clean Up“ ist dem Handbuch des *ChIP-IT™ Express Magnetic Chromatin Immunoprecipitation Kit* (Version D1) der Firma Active Motif zu entnehmen. Die DNA-Lösung wurde im Anschluss bei - 20 °C gelagert.

2.2.2.1.2 DNA-Konzentrationsmessung

Die Konzentration (c) der DNA wurde anhand der Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) im *BioPhotometer* bestimmt. Hierzu wurde eine 1 : 14-Verdünnung der DNA-Lösung hergestellt und diese in einer Kunststoffküvette gegen dH₂O als Referenz gemessen. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte aus der gemessenen Absorption nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

$$OD = c \times d \times \epsilon$$

c: DNA-Konzentration

ϵ : Extinktionskoeffizient doppelsträngiger DNA (dsDNA) bei 260 nm

d: Küvettschichtdicke (1 cm)

OD: optische Dichte

$$1 \text{ OD}_{260} (\text{dsDNA}) = 50 \text{ } \mu\text{g/ml dsDNA}$$

$$c (\text{dsDNA}) = \text{OD}_{260} (\text{dsDNA}) \times 50 \text{ } \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.2.2.1.3 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der PCR diente der schnellen *in-vitro*-Vermehrung geringer DNA-Ausgangsmengen mithilfe von DNA-Polymerasen und fand im Rahmen der ChIP Anwendung. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist der Tab. 18 zu entnehmen.

Tab. 18: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes unter Verwendung des dNTP-Mixes und der *Taq*-Polymerase des *Taq PCR core Kit* sowie des 10x PCR-Puffers von Active Motif

Komponente	Stoffmenge in pmol, Stoffmengenkonzentration in mM, Konzentration in x-fach, Enzymaktivität in U, Volumen in µl	Volumen in µl
<i>Forward</i> Primer	0,4 pmol	0,1 (von 100 pmol/µl)
<i>Reverse</i> Primer	0,4 pmol	0,1 (von 100 pmol/µl)
dNTP-Mix	0,2 mM	0,5 (von 10 mM)
10x PCR-Puffer	1x	2,5 (von 10x)
<i>Taq</i> -Polymerase	0,4 U	0,2 (von 5 U/µl)
DNA-Probe	-	5,0
DEPC-Wasser	ad 25 µl	16,6
Endvolumen	25 µl	25

Die Reaktionsansätze (inkl. einer Negativkontrolle: Zugabe von DEPC-Wasser anstelle von DNA) wurden in *Tubes* (0,5 ml) gegeben und die DNA mithilfe eines Thermozyklers amplifiziert. Jeder Zyklus beinhaltete die Denaturierung der DNA mit anschließender Primeranlagerung (*Annealing*) und der Primerextension (Synthese) (Tab. 19).

Tab. 19: PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	
Prädenaturierung	94 °C	3 min	
Denaturierung	94 °C	20 s	} 36-mal
<i>Annealing</i>	59 °C	30 s	
Extension	72 °C	30 s	
Kühlung	10 °C	∞	

Die Schmelztemperaturen [*melting temperature* (T_m)] der Primer wurden von der Firma MWG-Biotech vorgegeben und betragen für alle verwendeten Primer (Tab. 8) 59 °C. Die PCR-Produkte wurden *per* Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend durch Silberfärbung sichtbar gemacht (2.2.2.1.5).

2.2.2.1.4 Native Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Fragmentgrößen PCR-amplifizierter DNA sowie zur Überprüfung der DNA-Scherung im Zuge der ChIP wurden diese mithilfe der nativen Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 1 %igen Agarosegelen, hierbei diente der 1x Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer als Gel- und Elektrophoresepuffer. 10 µl DNA-Probe bzw. 10 µl DNA-Marker [DNA-Längenstandard VIII 2 : 125 verdünnt in Tris-EDTA (TE)-Puffer pH 7,5] wurden jeweils vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 2,6 µl 10x Ladepuffer und 0,4 µl des DNA-interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid (Stammlösung: 10 mg/ml) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 50–100 V. Zur Dokumentation wurde die ethidiumbromidgefärbte DNA mit UV-Licht (256 nm) im *Gene Genius Bio Imaging System* angeregt und deren Fluoreszenz mit dem Programm *GeneSnap Version 4.01.00* dokumentiert.

2.2.2.1.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Silberfärbung

Für die Analyse der PCR-Produkte nach der ChIP wurde die Elektrophorese in Polyacrylamidgelen mit anschließender Silberfärbung angewendet. Hierbei wurden 5 µl PCR-Produkt bzw. 5 µl DNA-Marker (DNA-Längenstandard VIII 1 : 25 verdünnt in TE-Puffer pH 7,5) in 8 %igen Polyacrylamidgelen (8 % VWA-Gele: Zusammensetzung siehe Absatzende) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese mit der *Multiphor-II*-Elektrophoreseapparatur erfolgte bei 15 °C unter Verwendung des 2x TBE-Elektrophoresepuffers für Silbergele bei 5 W für 20 min und anschließend bei 15 W für ca. 1 h, bis die Lauffront etwa 7–8 cm fortgeschritten war. Die Gele wurden nach der Elektrophorese mit 3 %iger Salpetersäure für 2–3 min, bis die blaue Lauffront eine Gelbfärbung aufwies, inkubiert. Es folgte ein fünfminütiges Waschen mit dH₂O, wobei das Wasser dreimal gewechselt wurde. Anschließend wurden die Gele für mindestens 20 min in einer 0,2 %igen Silbernitratlösung geschwenkt und dann mit dH₂O für 2–3 min unter dreimaligem Wechsel des Wassers gewaschen. Es schloss sich die Entwicklung der Gele mit stets frisch hergestellter Entwicklerlösung (Silbergele) an. Bei Verbrauch der Entwicklerlösung (Braunfärbung) wurde diese gewechselt, bis die DNA-Fragmente sichtbar wurden. Anschließend wurde die Reaktion mit 10 %iger Essigsäure gestoppt (ca. 30 s Inkubation). Nach der Fixierung wurde das Gel in 5 %iger Glycerinlösung für 20 min inkubiert und bei RT oder bei 60 °C getrocknet.

8 % VWA Gel:

17,1 ml Acryl-PDA für VWA-Gele

12,9 ml Tris-Puffer für VWA-Gele

300 µl 10 %iges APS

30 µl TEMED

2.2.2.1.6 Comet Assay

Der Einzelzell-Gelelektrophorese-Assay „*Trevigen's Comet Assay*TM“ diente der Analyse von DNA-Schäden in den Karzinomzellen. Die Zellen wurden hierzu zu 50 % Konfluenz ausgesät, 24 h im CO₂-Inkubator bei den eingangs genannten Bedingungen inkubiert und dann entsprechend behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA abgelöst, im kompletten Nährmedium aufgenommen und anschließend mit dem *Z2TM Coulter Counter*[®] gezählt. Es folgte eine zehnmünütige Zentrifugation von 4×10^5 Zellen für 10 min bei 800 rpm und 4 °C. Das Zellpellet wurde in 1 ml 1x PBS (Ca²⁺- und Mg²⁺-frei) aufgenommen und nochmals bei 800 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Zellen wurden danach in 0,9 ml 1x PBS (Ca²⁺- und Mg²⁺-frei) resuspendiert. 8,5 µl dieser Zellsuspension wurden mit 85 µl *low melting agarose* (LM-Agarose) in vorgewärmten *Tubes* (1,5 ml) gemischt und gemäß des Protokolls weiterverarbeitet. Es folgte eine Inkubation der auf 38 °C vorgewärmten *CometSlides* mit darauf platzierten Probengemischen für 30 min auf Eis im Dunkeln, um das Aushärten der Agarose zu beschleunigen. Die Zellen in der LM-Agarose wurden für 50 min auf Eis lysiert (Lyselösung ohne DMSO) und ebenfalls 50 min mit der alkalischen Lösung (*Comet Assay*) behandelt. Die anschließende TBE-Elektrophorese (neutrale Elektrophorese) erfolgte ebenfalls unter Lichtausschluss. Schließlich wurden die Proben über Nacht bei RT im Dunkeln getrocknet und danach mit 50 µl verdünntem *SYBR*[®] *Green I* angefärbt. Nach erneutem Lufttrocknen erfolgte unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops *Axioplan2 Imaging* mit der Software *Isis V 3.4.0* und dem entsprechenden Filter für ein Absorptions- und Emissionsmaximum von 494/521 nm die Auswertung. Es wurden jeweils drei unabhängige Versuche zur Datenerhebung durchgeführt und eine repräsentative Abbildung im Ergebnisteil dargestellt.

2.2.2.2 RNA-Analytik

2.2.2.2.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen für die Umschreibung in komplementäre DNA [*complementary DNA* (cDNA), Prozess: reverse Transkription] wurde die *single-step*-Methode von Chomczynski und Sacchi mit dem *TRIzol Reagent*[®] angewandt (Chomczynski & Sacchi, 1987). Es wurde wie folgt vorgegangen: Zu den jeweiligen Zellpellets (in 2-ml-Tubes) wurden 0,5 ml *TRIzol Reagent*[®] gegeben und die Zellen unter Vortexen lysiert. Anschließend wurden nochmals 500 µl *TRIzol Reagent*[®] dazugegeben und gründlich gemischt. Es folgte eine fünfminütige Inkubation der Proben bei RT. Nun wurden zu der Suspension 0,2 ml Chloroform hinzugefügt, für 15–20 s stark geschüttelt und anschließend für 2–3 min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben 25 min bei 15.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die farblos-wässrige Phase wurde in ein neues *Tube* überführt. Die RNA wurde darauf mit 0,6 ml Isopropanol unter fünf- bis sechsmaligem Schwenken und anschließender zehnmütiger Inkubation bei RT gefällt. Die Pelletierung der RNA erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 15.000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig abgenommen und das RNA-Pellet mit 1 ml 75 %igem Ethanol (hergestellt mit DEPC-Wasser) gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 min bei 15.000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde ebenfalls entfernt und das RNA-Pellet 5–10 min bei RT getrocknet. Die RNA wurde schlussendlich in 30–200 µl RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) gelöst, zur vollständigen Lösung bei 60 °C für 10 min inkubiert und bei - 80 °C aufbewahrt.

2.2.2.2.2 RNA-Konzentrationsmessung

Für den Einsatz äquivalenter RNA-Mengen für die cDNA-Synthese wurden die Konzentration der präparierten RNA gemessen. Die RNA-Lösung wurde hierzu 1 : 35 mit DEPC-Wasser verdünnt und spektrophotometrisch mit dem *BioPhotometer* bei einer Extinktion von 260 nm gemessen. Die Konzentration ergab sich nach den folgenden Gleichungen:

$$1 \text{ OD}_{260} (\text{RNA}) = 40 \text{ µg/ml RNA}$$

$$c (\text{RNA}) = \text{OD}_{260} (\text{RNA}) \times 40 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Bei Kontamination der RNA-Lösung mit Proteinen und/oder aromatischen Substanzen wurde die RNA mit dem *RNeasy Mini Kit* nach den Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.2.2.3 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Für die cDNA-Synthese ist intakte RNA erforderlich. Da RNA einzelsträngig ist und unter nativen Bedingungen Sekundärstrukturen durch intramolekulare Basenpaarung ausbilden kann, was zur Verfälschung der Auftrennung nach Molekülgröße im Agarosegel führt, wurde diese unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt, um ihre Intaktheit zu überprüfen. Die Auftrennung der RNA wurde mit 1,5 %igen denaturierenden Formamidgelen (1,5 % Agarose, 1x MOPS, 6,29 % Formaldehyd, 0,0001 % Ethidiumbromid, in DEPC-Wasser) vorgenommen. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden 4 µg RNA mit 6,25 µl Formamid, 1,25 µl MOPS, 2 µl Formaldehyd, 1,25 µl Probenpuffer (Formamidgelen) und 0,5 µl 1 %iger Ethidiumbromidlösung versetzt und für 5 min bei 65 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 75 V für 1–1,5 h mit dem Laufpuffer 1x MOPS. Zur anschließenden Dokumentation wurde die gefärbte RNA mit UV-Licht (256 nm) im *Gene Genius Bio Imaging System* angeregt und die Fluoreszenz mit dem Programm *GeneSnap Version 4.01.00* dokumentiert.

2.2.2.2.4 Reverse Transkription

Die reverse Transkription diente dem Umschreiben von RNA in cDNA für die PCR-Array-Analysen der vorliegenden Studie. Die cDNA-Synthese wurde in einem 20-µl-Ansatz unter Verwendung des *Reverse Transcription Systems* durchgeführt. Dazu wurden 0,5 µg RNA auf ein Volumen von 9,9 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt, zur Denaturierung 10 min bei 70 °C inkubiert und im Anschluss auf Eis abgekühlt. Daraufhin wurde folgender Reaktionsansatz

4 µl 25 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂)

2 µl 10x Reaktionspuffer für Reverse Transkriptase *avian myeloblastosis virus (AMV)*

0,5 µl RNase-Inhibitor

2 µl dNTPs (10 mM Mix)

0,6 µl Reverse Transkriptase *AMV*

1 µl *Random-Primer*

zu der denaturierten RNA hinzugegeben und die Reverse Transkriptase AMV 10 min bei 24 °C aktiviert. Es schloss sich die cDNA-Synthese bei 42 °C für 15 min und eine abschließende fünfminütige Denaturierung bei 99 °C an. Die synthetisierte cDNA wurde danach direkt für die Array-Analysen eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

2.2.2.2.5 cDNA-Array-Analyse

Der *cDNA Microarray GEArray Q Series „Human Signal Transduction PathwayFinder Gene Array“* ermöglichte die parallele Analyse der Expression von 96 Genen. Diese spielen in verschiedenen Signaltransduktionswegen eine Rolle. Zur Expressionsanalyse wurde die Gesamt-RNA wie zuvor beschrieben isoliert (2.2.2.2.1). Anschließend wurde die RNA auf Degradation mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.2.3) getestet und nur intakte RNA für die cDNA-Synthese weiterverwendet. Die reverse Transkription erfolgte mit 3 µg RNA nach dem Protokoll „*B. Probe Synthesis*“ des Handbuchs *cDNA GEArray® Q and S Series Kit* (Version 8.5) der Firma Super-Array Bioscience Corporation unter Verwendung des „*RT-Cocktail for Chemiluminescent Detection*“. Die cDNA wurde mithilfe des *AmpoLabeling LPR Kit* mit Biotin-16-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat (Biotin-16-dUTP) nach Angaben des Herstellers markiert. Die nachfolgenden Schritte: Prähybridisierung mit Lachssperma-DNA, die zuvor für 10 min bei 100 °C denaturiert wurde, Waschschrte, Hybridisierung und Chemilumineszenzdetektion wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die Lumineszenzdetektion erfolgte für 15–40 min im *GeneGnome*. Die Daten wurden dann densitometrisch mithilfe des Programms *GeneTools Version 3.08.03* analysiert. Bei der Datenauswertung wurde eine Korrektur bezüglich des Hintergrundsignals (*Blank*) vorgenommen. Abschließend wurde die relative Expression E eines Gens (Gen/Haushaltsgen) zur Berechnung der x -fachen Expression E_x (Genexpressionsänderung) dieses Gens nach der Behandlung durch Bildung des Verhältnisses $E_{\text{Behandlung}}/E_{\text{Kontrolle}}$ berechnet.

Jeweils für jede Membran (der Kontrolle und H₂O₂-Behandlung) wurden folgende Berechnungen durchgeführt (Normalisierung):

Rohvolumenwert des Gens - Mittelwert der Blanks = a

Mittelwert des Haushaltsgens - Mittelwert der Blanks = b

$a/b \times 100 = E$

Als Haushaltsgen wurde β -Aktin (ACTB, Genbank X00351) verwendet.

Berechnung der E_x eines Gens nach der H_2O_2 -Behandlung:

$$E_{\text{Behandlung}}/E_{\text{Kontrolle}} = E_x$$

Hierbei wurde folgendes festgelegt: Wenn $E_{\text{Kontrolle}} < 1$, dann ist $E_{\text{Kontrolle}} = 0$ (als in den Zellen nicht exprimiert festgelegt) und bei gleichzeitigem $E_x > 0$ wird E_x als neu exprimiert (ne) definiert. Für die Gentabelle des Anhangs 3 dieser Arbeit wurden nur $E_{\text{Kontrolle}} > 20$ bei gleichzeitigem $E_x > 2$ (mehr als zweifach hochregulierte mRNA-Expression) sowie $E_x = ne$, wobei $E_{\text{Kontrolle}} < 20$ und $E_x > 100$ war, einbezogen. Wenn $E_x < 1$ wurde dies als Herunterregulation der mRNA definiert.

2.2.2.2.6 RT^2 -ProfilerTM-PCR-Array

Der in der vorliegenden Studie verwendete *Human MAP Kinase Signaling Pathway RT^2 ProfilerTM PCR Array* ermöglicht über *Real-Time*-PCR die simultane Untersuchung der Expression von 84 Genen des MAPK-Signalwegs. Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den behandelten sowie den unbehandelten Zellen erfolgte wie zuvor beschrieben (2.2.2.2.1). Danach wurde die RNA auf Degradation mittels denaturierende Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.2.3) getestet und nur intakte RNA für die cDNA-Synthese weiterverwendet. Die reverse Transkription erfolgte mit 1 μ g RNA (2.2.2.2.4). Anschließend wurde die *Real-Time*-PCR nach dem Protokoll „C. *Performing Real-Time PCR*“ der Firma Superarray Bioscience Corporation unter Verwendung des Thermozyklers *iCycler Thermal Cyclers* durchgeführt. Anstelle des vom Hersteller des PCR-Array empfohlenen *SuperArray RT^2 Real-TimeTM SYBR Green PCR Master Mix* wurde der *2x SensiMix Plus SYBRgreen plus FITC mix Kit*, der *2x SensiMix*, FITC- und SYBR-Green-I-Lösungen enthält, verwendet. Dafür wurde die cDNA 1 : 3 und die FITC-Lösung 1 : 10 mit Wasser für die Molekularbiologie verdünnt und folgender PCR-Ansatz/Well verwendet:

12,5 μ l 2x *SensiMix*

1,0 μ l cDNA (1 : 3-Verdünnung)

0,25 μ l FITC (1 : 10-Verdünnung)

0,5 μ l *SYBR Green I*

10,75 μ l Wasser für die Molekularbiologie

Die Analyse der erhaltenen Daten erfolgte nach diesem Schema:

Der *cycle-threshold*-(C_t)-Wert jedes Gens wurde durch den *iCycler Thermal Cycler* ermittelt, wobei $C_t > 35$ bedeutete, dass dieses Gen nicht exprimiert wird.

Da ein quantitativer Expressionsunterschied zwischen zwei Proben Gruppen (Kontrolle und Behandlung) ausgemacht werden sollte, wurde das Verhältnis der Gruppen mittels der *delta-delta*- C_t ($\Delta\Delta C_t$)-Methode (Pfaffl, 2001) unter Verwendung des Haushaltsgens β -Aktin (ACTB, GenBank NM_001101) bestimmt:

Berechnung jeweils für den Kontroll- (ΔC_{t1}) und Behandlungs-Array (ΔC_{t2}):

$$1) C_t(\text{Gen}) - C_t(\text{ACTB}) = \Delta C_t$$

Berechnung der Genexpressionsänderung (E_x) nach der Behandlung:

$$2) \Delta C_{t2} - \Delta C_{t1} = \Delta\Delta C_t$$

$$3) 2^{-\Delta\Delta C_t} = E_x$$

Dabei wurde $E_x > 2,0$ als Überexpression und $E_x < 0,5$ als Herunterregulation des jeweiligen Gens definiert.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Western Blot

2.2.3.1.1 Proteinquantifizierung

Basierend auf der Methode nach Lowry (1951) wurde die Proteinkonzentration der Zellextrakte kolorimetrisch unter Verwendung des Bio-Rad *detergent compatible* (DC) *Protein Assay* bestimmt. Es wurden jeweils 25 μl eines Gemischs aus Reagenz A und S (alkalische Kupfertartatlösung) je *Well* einer 96-*Well*-Mikrotiterplatte vorgelegt und anschließend 5 μl Zellextrakt bzw. Standard (BSA) dazugegeben (doppelter Ansatz). Zu dieser Mischung wurden 200 μl Reagenz B (Folinreagenz) gegeben und 15 min unter Schütteln bei RT inkubiert. Darauf folgte die Bestimmung der Extinktion der Proben bei 630 nm (und Verwendung eines Referenzfilters für 450 nm) mithilfe des Mikrotiterplatten Lesers *MRX TC Revelation* und des Programms *MRX Revelation*

Version 4.22. Die Proteinkonzentration wurde durch Verwendung einer Eichkurve ermittelt, die aus der mitgeführten BSA-Standard-Verdünnungsreihe (0, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 mg/ml BSA) erhalten wurde.

2.2.3.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-PAGE diente der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Dabei wurde zur Abschätzung der Proteingröße ein Größenmarker mitgeführt. Jeweils 30 µg Gesamtprotein wurden mithilfe des 5x Probenpuffers (Endkonzentration 1x) reduziert und denaturiert. Um ein einheitliches Volumen in allen Proben zu erhalten, wurden die Proben mit 2x Ladebuffer versetzt. Die Denaturierung erfolgte im Anschluss durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min. Der biotinylierte Proteinmarker (8,5 µl) wurde für 2 min bei 99 °C denaturiert. Die Proteinlösungen bzw. der Proteinmarker wurden in die einzelnen Probenaschen des Sammelgels gegeben. Es folgte die Auftrennung der Proteine bei 30–50 mA in 1x Elektrodenpuffer im SDS-Polyacrylamidgel in der vertikalen Elektrophoresekammer *Mini-Protean® 3 Cell*. Dabei bestanden die SDS-Polyacrylamidgele entsprechend der zu analysierenden Proteine aus einem 10 %- oder 12 %igen Trenngel (Separation von Proteinen der Größe 15–100 kDa oder 10–70 kDa) und einem 4,9 %igen Sammelgel. Die Zusammensetzung der Gele ist der Tab. 20 zu entnehmen.

Tab. 20: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele
(Volumen für die Herstellung von jeweils zwei Gelen)

Lösungen	4,9 %iges Sammelgel	10 %iges Trenngel	12 %iges Trenngel
dH ₂ O	6,33 ml	4,67 ml	3,93 ml
Rotiphorese® Gel 30	1,65 ml	3,33 ml	3,93 ml
Sammelgelpuffer	2 ml	-	-
Trenngelpuffer	-	2 ml	2 ml
TEMED	8 µl	8 µl	8 µl
10 % APS	75 µl	75 µl	75 µl

2.2.3.1.3 Proteintransfer

Um die Proteine mittels Antikörper nachweisen zu können, wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine unter Einsatz der *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* von Bio-Rad Laboratories, Inc. nach Angaben des Herstellers auf die *Protran-BA-85-Nitrocellulosemembran* übertragen.

Die Membran wurde zusammen mit dem Gel im gekühlten Transferpuffer äquibriert. Der anschließende Transfer erfolgte für 2 h bei 120 V oder über Nacht bei 30 V. Die Lagerung der Membranen erfolgte bei 4 °C in *Tris-buffered Saline and Tween 20* (TBST) (kurzfristig) oder in Folie eingeschweißt bei - 20 °C (langfristig).

2.2.3.1.4 Ponceau-S-Färbung der Proteine auf Nitrozellulosemembranen

Das Anfärben der Proteine mit dem roten Azofarbstoff Ponceau S diente dem Nachweis des erfolgreichen elektrophoretischen Transfers der Proteine auf die Nitrocellulosemembran. Dazu wurde die Membran für 5–10 s mit der Ponceau-S-Färbelösung inkubiert. Der Farbstoff wurde dann durch mehrmaliges Waschen mit TBST entfernt.

2.2.3.1.5 Antikörperinkubation und Chemilumineszenzdetektion

Um die Proteine auf der Nitrozellulosemembran nachzuweisen, wurden Antikörper genutzt. Eingangs wurde zur Blockierung aller unspezifischen Bindungen die Nitrocellulosemembran 1 h bei RT in 20 ml Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 5 min bei RT mit TBST gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in den jeweiligen Verdünnungen in Blockierungspuffer oder 5 % BSA in TBST (Tab. 13) über Nacht bei 4 °C. Anti- β -Aktin wurde 2 h bei RT inkubiert und diente als Referenz. Es folgte erneutes dreimaliges Waschen für 5 min bei RT mit TBST und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper in der jeweiligen Verdünnung (Tab. 13, Tab. 14) für 2 h bei RT in Blockierungspuffer. Verwendet wurden *Goat-Anti-Mouse*-Immunglobulin G (IgG) und *Goat Anti-Rabbit* IgG sowie zum Nachweis des Biotin-Markers Anti-Biotin. Anschließend wurde die Membran wieder dreimal für 5 min bei RT mit TBST gewaschen. Die Chemilumineszenzdetektion des Komplexes aus Antigen, primären und sekundären Antikörpern erfolgte mithilfe des *enhanced chemiluminescence detection (ECL) Kit „Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate“*, wobei vor Verwendung gleiche Teile der Lösung A und B kombiniert wurden. Diese Mischung wurde dann auf die Proteinseite der Membran gegeben (0,08 ml/cm²) und die Lumineszenz im *GeneGnome* detektiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte anschließend mithilfe des Programms *GeneTools Version 3.08.03*. Die x-fache Expression eines Proteins wurde durch die Bildung des Verhältnisses aus dem densitometrischen Wert des Proteins und dem des Haushaltsproteins β -Aktin ermittelt. Es sind jeweils, aus mindestens drei unabhängigen Versuchen, repräsentative Bilder dargestellt worden. Ferner wurde nur ein Bild der Lade-

kontrolle β -Aktin pro Abbildung gezeigt. Berechnungen für die Proteinmengen beziehen sich jedoch auf das jeweilig zugehörige β -Aktin der entsprechenden Membran des dargestellten Proteins.

2.2.3.1.6 Stripping und Wiederverwendung der Membranen

Zur mehrfachen Verwendung der Nitrozellulosemembranen für weitere Nachweise von Proteinen wurden die Membranen 10 min bei 42 °C mit 20 ml des *Restore™ Western Blot Stripping Buffer* gestriipt, wodurch die spezifisch gebundenen Antikörper entfernt wurden. Es schloss sich zweimaliges Waschen der Membran mit TBST für 10 min und eine erneute Antikörperinkubation an.

2.2.3.2 Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP)

Die Ko-IP diente dem Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Diese Methode erfolgte unter Verwendung des *Universal Magnetic Co-IP Kit (Version A)*. Dazu wurden die Zellen zu 50 % Konfluenz ($4,1 \times 10^6$ Zellen) auf Zellkulturschalen (144 × 21 mm) ausgesät, 24 h im CO₂-Inkubator bei den eingangs genannten Bedingungen inkubiert und entsprechend behandelt. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Zell-extrakte gemäß des Protokolls „*Protocols – Whole-cell Extraction*“ der Firma Active Motif hergestellt. Dabei wurden folgende Veränderungen am Protokoll vorgenommen: Die Zellyse mit dem *Complete Whole-cell Lysis Buffer* erfolgte für 1 h 30 min bei 4 °C. Dabei wurden die Proben nach jeweils 10 min für 10 s gevortext. Danach wurden die Zellen für den kompletten Aufschluss mithilfe des Homogenisators *Sonopuls HD 2070* mit 30 Ultraschallimpulsen à 1 s bei 25 % *Power (Cycle 30)* behandelt. Die Proteinkonzentrationsbestimmung der Lysate erfolgte anschließend mit der bereits beschriebenen Methode (2.2.3.1.1). Dazu wurde das Lysat zuvor 1 : 10 mit dem *Complete Whole cell Lysis Buffer* verdünnt und die BSA-Standardreihe ebenfalls mit diesem Puffer hergestellt.

Die Ko-Immunpräzipitation wurde gemäß des Protokolls „*Protocols - Co-Immuno-precipitation*“ der Firma Active Motif durchgeführt und wie folgt modifiziert. Die Vorreinigung von 500 μ l Lysat erfolgte mit 25 μ l *Protein G Magnetic Beads* für 1 h bei 4 °C unter Rotation. Der Überstand wurde von den *Beads* getrennt und für die Ko-IP verwendet. Die Antikörperinkubation erfolgte mit 250 μ g Gesamtprotein und Zusatz von 40 ng Anti-p-ATF-2 Threonin 69/71 (Anti-p-ATF-2^{Thr69/71}) bzw. 40 ng *Normal Rabbit IgG* als nichtspezifische IgG-Kontrolle in einem Gesamtvolumen von 500 μ l *Complete Co-*

IP/Wash Buffer über Nacht bei 4 °C und ständiger Durchmischung des Ansatzes. Mit der IgG-Kontrolle wurden die nichtspezifischen Bindungen des Zielproteins aufgrund der Fc-Rezeptor-Bindung oder anderer Protein-Protein-Interaktionen, die auch bei dem primären Antikörper existieren können, gezeigt. Im Anschluss an die Antikörperinkubation wurden die Proben 1 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Bindung der Antikörper an die *Beads* erfolgte innerhalb von 3 h bei 4 °C auf dem Rotator. Im Anschluss wurden die Proben wiederum 1 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Waschen der *Beads* wurde dann sechsmal wiederholt. Es folgte die Denaturierung der Proben und der entsprechenden Lysate (15 µg Gesamtprotein, 10 µl 2x Reduzierender Ladepuffer, *ad* 20 µl mit ddH₂O) durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min. Der Überstand mit den darin präzipitierten Proteinen wurde von den *Beads* getrennt und zusammen mit dem Lysat und dem biotinylierten Proteinmarker nach dem Protokoll „SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)“ (2.2.3.1.2) in einem 10 %igen Trenngel aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran nach dem „Proteintransfer“-Protokoll (2.2.3.1.3) übertragen. Die Membran wurde daraufhin mit den gegen die zu untersuchenden Interaktionspartner gerichteten Antikörpern inkubiert und das Signal des Antikörpers gemäß des Punkts 2.2.3.1.5 detektiert. Es wurden jeweils drei unabhängige Versuche zur Datenerhebung durchgeführt.

2.2.3.3 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die ChIP diente dem Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen. Hierbei wurde sich des *ChIP-ITTM Express Magnetic Chromatin Immunoprecipitation Kit* bedient und entsprechend der Protokollvorlage „Version D1“ gearbeitet. Vor Beginn der Durchführung der ChIP wurde eine Optimierung der DNA-Scherung mit Ultraschall gemäß des Protokolls „A. Optimization of Chromatin Shearing – Sonication“ vorgenommen, um die optimalen Bedingungen für diese Methode zu finden. Die Zellen wurden mit 1 % Formaldehyd (methanolfrei) 10 min fixiert. Anschließend wurde das Chromatin mit dem *ChIP-IT Express Kit* präpariert und ca. 120 µl mit Ultraschall unter Verwendung des Ultraschallgeräts *Bandelin Sonopuls HD70* mit einer 3-mm-Durchmesser-Mikrospitze gesichert. Zwischen den Impulsen wurden die Proben für 30 s auf Eis gestellt. Zur Bildung eines homogenen Fragmentgemischs wurden die Proben regelmäßig zwischen den Ultraschallimpulsen zentrifugiert. Nach dem Scheren des Chromatins wurde die Vernetzung von Proteinen und DNA aufgehoben, die Lösung mit Proteinase K behandelt und einer Phenol/Chloroform-Extraktion und Präzipitation unterzogen (2.2.2.1.1). Die

Analyse der gescherten DNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.1.4) im 1 %igen Agarosegel.

Die optimale Scherung [Fragmente im Mittel 500 *base pairs* (bp)] erfolgte durch acht Impulse à 10 s (*Cycle* 30, 40 % *Power*, Abb. 8). Diese Bedingung wurde für die komplette ChIP-Reaktion verwendet.

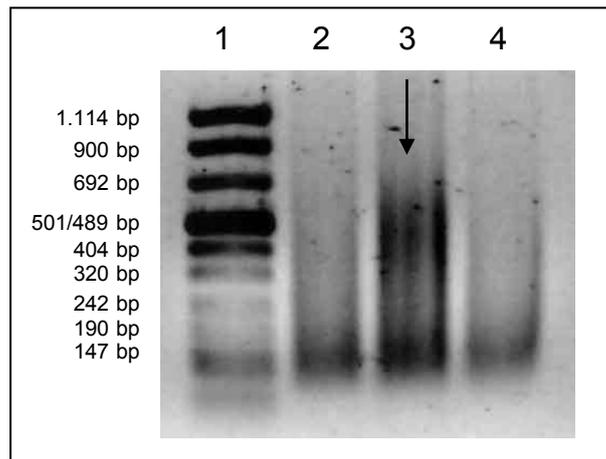


Abb. 8: DNA-Scheranalyse nach Ultraschallbehandlung auf einem 1 %igen Agarosegel
Reihe 1: DNA-Längenstandard VIII, Reihe 2: DNA geschert mit acht Impulsen à 20 s bei 25 % *Power*, Reihe 3: DNA geschert mit acht Impulsen à 10 s bei 40 % *Power*, Reihe 4: DNA geschert mit acht Impulsen à 20 s bei 15 % *Power* (alle *Cycle* 30), bp - *base pair(s)*

Für die gesamte ChIP wurden die Zellen zu 80 % Konfluenz auf Zellkulturschalen (144 × 21 mm) ausgesät, 24 h im CO₂-Inkubator unter den eingangs genannten Bedingungen inkubiert und entsprechend behandelt. Im Anschluss an die Behandlung wurde gemäß des Protokolls „*B. Cell Fixation, Chromatin Isolation and Sonication Shearing*“ gearbeitet und folgende Modifikationen vorgenommen: Die Fixierung der Zellen erfolgte mit methanolfreiem Formaldehyd. Die Zellen, kombiniert aus drei Zellkulturschalen (144 × 21 mm), wurden sofort mit 540 µl *Lysis Buffer* versetzt. Dieser enthielt zusätzlich, um die Phosphorylierung der Proteine zu erhalten, Phosphataseinhibitor in einer 1 : 20-Verdünnung. Die Zellyse fand in einem *Tube* (1,5 ml) für 1 h auf Eis statt. Dabei wurde alle 10 min gevortext. Danach wurden die Zellkerne durch 30-maliges Auf- und Abpipettieren mit einer 1-ml-Pipette aus dem Zytoplasma herausgelöst. Das Kernpellet wurde anschließend in 300 µl *Shearing Buffer* resuspendiert, der ebenfalls mit Phosphataseinhibitor in 1 : 20-facher Verdünnung versetzt war. Jeweils 120 µl wurden auf *Tubes* (1,5 ml) aufgeteilt. Dann wurde die DNA geschert und das

Gemisch für 12 min bei 15000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wurden die Überstände mit darin enthaltenem geschertem Chromatin einer Probe kombiniert und weiterverwendet.

Es folgte die Vorreinigung des gesamten Chromatins (ca. 300 µl) mit 15 µl *Beads* für 1 h bei 4 °C unter ständiger Durchmischung. Dann wurde die Proteinkonzentration des Chromatins mit der bereits beschriebenen Methode (2.2.3.1.1) bestimmt. Zuvor wurde das Chromatin 1 : 10 mit dem *Shearing Buffer* verdünnt und die BSA-Standardreihe ebenfalls mit diesem Puffer hergestellt. Die Bindung des Chromatins an die magnetischen *Beads* erfolgte nach dem Protokoll „C. Capture Chromatin on Magnetic Beads“. Es wurde folgender Immunpräzipitationsansatz verwendet (Tab. 21).

Tab. 21: Zusammensetzung des Immunpräzipitationsansatzes

Reagenz	Volumen in µl, Masse in µg für eine Reaktion
Protein G-magnetische <i>Beads</i>	25 µl
ChIP-Puffer 1	25 µl
Geschertes Chromatin	500 µg Protein
<i>Protease inhibitor cocktail</i> (PIC)	1 µl
Phosphataseinhibitor	15 µl
DEPC-Wasser	ad 250 µl
Antikörper	2 µg
Endvolumen	250 µl

Als Negativkontrollen zur funktionellen Überprüfung der Immunpräzipitation wurden anstelle des Antikörpers der *Normal Rabbit IgG* (2 µg) und DEPC-Wasser verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C unter ständiger Durchmischung. Nach der Antikörperbindung an den *Beads* wurden diese nach dem Protokoll „D. Wash Magnetic Beads“ gewaschen, wobei den ChIP-Puffern 1 und 2 wiederum der Phosphataseinhibitor in einer Verdünnung von 1 : 20 hinzugesetzt wurde. Die Denaturierung des entsprechenden Gesamtzelllysats (15 µg Gesamtprotein, 10 µl 2x reduzierender Ladebuffer, ad 20 µl mit ddH₂O) erfolgte durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min. Der Überstand mit den präzipitierten Proteinen wurde von den *Beads* getrennt und zusammen mit dem Lysat und dem biotinylierten Proteinmarker nach dem Protokoll „SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)“ (2.2.3.1.2) in einem 10 %igen Trenngel aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran nach dem „Proteintransfer“-Protokoll (2.2.3.1.3) übertragen. Die Inkubation der Membran mit dem Antikörper und der Nachweis des Proteins in der ChIP-Probe erfolgten im Anschluss entsprechend

des Abschnitts 2.2.3.1.5. Mit den Ansätzen für die PCR-Analysen wurden die Elution des Chromatins, das Aufheben der Vernetzung von Proteinen und DNA sowie die Proteinase-K-Behandlung nach dem Protokoll „*E. Elute Chromatin, Reverse Cross-links and Treat with Proteinase K*“ durchgeführt. Es folgte die PCR an der extrahierten DNA und den 1 : 10 verdünnten Input-DNA-Proben nach dem Protokoll „Semi quantitative PCR“ (2.2.2.1.3) mit den jeweiligen Primerpaaren. Die PCR-Produkte wurden mittels Silberfärbung nach Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.2.2.1.5) visualisiert. Die Amplifikation der immunpräzipitierten DNA wurde mit der Input-DNA der entsprechenden Probe normalisiert.

2.2.3.4 Immunzytochemische Analysen durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Mittels der Methode der Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation von Proteinen (Antigenen) über Antigen-Antikörper-Reaktionen in Zellkompartimenten nachgewiesen. Dazu wurden $3,5 \times 10^4$ Zellen in 200 μ l Kompletmedium je Kammer von acht-Kammer-Zellkulturobjektträgern ausgesät und nach dem Behandlungsprozedere mit 3 % Paraformaldehyd in 1x PBS für 15 min bei RT fixiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit 1x PBS und die Permeabilisierung der Zellen mit 0,2 % Triton X-100 in 1x PBS für 5 min bei RT. Danach wurden die Zellen dreimal mit 1 x PBS gewaschen, mit 1 % BSA in 1x PBS für 10 min bei RT blockiert und mit dem primären Antikörper (Tab. 16) verdünnt in 1 % BSA in 1x PBS über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es schlossen sich wiederum drei Waschschrte mit 1x PBS an. Nachfolgend wurden die Zellen unter Ausschluss von Licht mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (Tab. 16), verdünnt in 1 % BSA in 1x PBS, für 1 h bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurde die DNA der Zellen mit *Vectashield Mounting Medium with DAPI* gegengefärbt. Die Auswertung der Färbungen erfolgte unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops *Axioplan2 Imaging* mit der Software *Isis V 3.4.0* mit den entsprechenden Filtern. Es wurden jeweils drei unabhängige Versuche zur Datenerhebung durchgeführt und eine repräsentative Abbildung im Ergebnisteil dargestellt.

2.2.4 Verwendete Programme

Folgende Programme wurden verwendet (Tab. 22).

Tab. 22: Übersicht der verwendeten Programme

Programm	Firma/Quelle
CellQuest Pro Version 4.0.2	BD Becton Dickinson, Heidelberg
GeneSnap Version 4.01.00	Syngene, Cambridge, UK
GeneTools Version 3.08.03	
Isis V 3.4.0 Software	Metasystems, Altlussheim
MRX Revelation Version 4.22	Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA
Primo Find 3.4	http://www.changbioscience.com/primo/primof.html
TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites	http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html

2.2.5 Verwendete Datenbanken

Folgende Datenbanken wurden verwendet (Tab. 23).

Tab. 23: Übersicht der verwendeten Datenbanken

Datenbank	Quelle
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
DAVID	http://david.abcc.ncifcrf.gov
ENSEMBL	http://www.ensembl.org
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
OREGANNO	http://www.oreganno.org/oregano/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Transfac Version 2012.1	Verwendung am DKFZ Heidelberg durch Frau Agnes Hotz-Wagenblatt
UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks
UniProt Knowledgebase	http://www.uniprot.org

2.2.6 Statistik

Es wurden in den Graphen der Mittelwert sowie die Standardabweichung vom Mittelwert [*standard error of the difference* (SED)] aus den Einzelversuchen dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Ermittlung einer zelltodresistenten Karzinomzelllinie mit Zellzyklusarrest

3.1.1 Folgen H₂O₂-induzierten Stresses

Ziel war es, eine auf oxidativen Stress zelltodresistente Karzinomzelllinie zu ermitteln, die einen Zellzyklusarrest zeigt. Anschließend sollte ein in der DNA-Schadens-, Zellzyklus- und Zelltodregulation zentral wirkendes Zielprotein zur Verbesserung der Zelltodantwort durch Umschalten vom Zellzyklusarrest auf den Zelltod ermittelt werden.

Zur Nachahmung ROS-induzierender, DNA-schädigender Antikrebstherapien diene in der vorliegenden Arbeit das Oxidans H₂O₂. Diese Substanz stellt *per se* ein ROS dar, welches ungeladen, relativ langlebig, frei beweglich und zellmembranpermeabel ist (Ohno & Gallin, 1985). Daher eignet es sich ideal als Modellsubstanz zur Induktion oxidativen Stresses und zur anschließenden Analyse molekularer Mechanismen und deren Konsequenzen. H₂O₂ wurde mit diesem Hintergrund bereits erfolgreich in unserer Arbeitsgruppe angewandt (Poehlmann *et al.*, 2011; Habold *et al.*, 2008). Ferner ist es ein Schlüsselmolekül in der Wirkung von oxidativen stressinduzierenden Therapien wie z. B. bei einigen Chemotherapeutika (Alexandre *et al.*, 2006; Ubezio & Civoli, 1994).

Gemäß der generellen Wirkungsübereinstimmung mit über oxidativen stressinduzierenden Therapien sollte exogen hinzugefügtes H₂O₂ DNA-Schäden und anschließend einen Zellzyklusarrest und/oder Zelltod *in vitro* induzieren (vergl. Abb. 3). Um dies zu überprüfen und eine Karzinomzelllinie mit Zellzyklusarrest und geringer Zelltodantwort zu ermitteln, wurden Karzinomzelllinien unterschiedlichen Gewebeursprungs, TE-7 (Ösophagus-), OE-33 (Barrett's-Adeno-), SEG-1 (Lungen-) und BIC-1 (Kolon-karzinom) für die Untersuchungen verwendet. Schließlich sollten die H₂O₂-Antworten mithilfe des TP53-Status und der p53-Expression erklärt werden.

3.1.1.1 Nachweis von DNA-Schäden

H₂O₂ induziert DNA-Schäden wie AP-Stellen (Chastain *et al.*, 2010), die zu Replikationsstress und zur darauffolgenden Entstehung von DSBs führen (zusammengefasst in Rybaczek & Kowalewicz-Kulbat, 2013). Es kann auch direkt DSBs auslösen und Basen schädigen oder modifizieren (Driessens *et al.*, 2009; Dizdaroglu *et al.*,

1991). Um DNA-Schäden nachzuweisen, wurde der universelle DNA-Schadensmarker γ -H2AX (Sharma *et al.*, 2012) in den Zelllysaten H_2O_2 -behandelter und unbehandelter Karzinomzellen mittels *Western Blot* untersucht.

Die *Western-Blot*-Analysen zeigten, dass H_2O_2 24 h nach der Behandlung in allen untersuchten Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1 eine Anreicherung der Histonmodifikation γ -H2AX auslöste (Abb. 9), womit die Induktion von DNA-Schäden nachgewiesen wurde. Gleichzeitig konnte auch ein erhöhtes H2AX-Proteinlevel beobachtet werden.

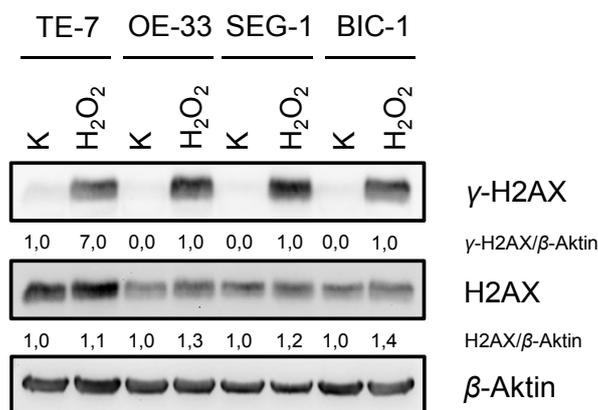


Abb. 9: Nachweis des γ -H2AX und H2AX in den Zellen der Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1 24 h nach H_2O_2 -Behandlung
 H_2O_2 - H_2O_2 -Behandlung (250 μ M), K - Kontrolle

3.1.1.2 Nachweis von Zellzyklusarresten

Eine Reaktion auf DNA-Schäden kann ein Zellzyklusarrest sein. Um einen solchen in den untersuchten Karzinomzellen nachzuweisen, wurden diese zur Bestimmung der Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen 24 h nach der Behandlung mit H_2O_2 mit dem nukleinsäureinterkalierenden Farbstoff PI gefärbt.

Die Ergebnisse belegen, dass sich die Zellen der Karzinomzelllinien TE-7, SEG-1 und BIC-1 vermehrt in der G2/M-Phase des Zellzyklus nach der Behandlung ansammelten (Abb. 10). Es wurde ein Anstieg von entsprechend + 13,28 % (1,44-fach), + 29,46 % (2,62-fach) und + 20,61 % (1,95-fach) Zellen ermittelt. Daraus lässt sich ableiten, dass diese Karzinomzellen nach der Behandlung einen G2/M-Arrest vollziehen. Des Weiteren konnte bei den Karzinomzelllinien TE-7 und BIC-1 zusätzlich ein S-Arrest beobachtet werden. Es wurde hierbei ein Populationsanstieg von entsprechend + 12,12 % (1,49-fach) und + 5,69 % (1,44-fach) Zellen festgestellt. OE-33 hingegen zeigte keinen Zellzyklusarrest. Alle Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1 zeigten außer-

dem eine erhöhte Sub-G1-Zellpopulation um entsprechend + 0,35 % (1,43-fach), + 20,56 % (2,75-fach), + 5,05 % (2,62-fach) und + 0,74 % (1,21-fach) Zellen, was die Induktion von Apoptose indiziert. Der Anstieg der Zellzahl in den genannten Phasen des Zellzyklus‘ ging mit einer Reduktion der G1-Zellpopulation einher. Bei den Karzinomzelllinien SEG-1 und OE-33 war zusätzlich eine Verminderung der S-Phasen-Zellpopulationen zu verzeichnen. Die Karzinomzellen gehen folglich aus diesen Phasen in die anderen über bzw. in die Apoptose.

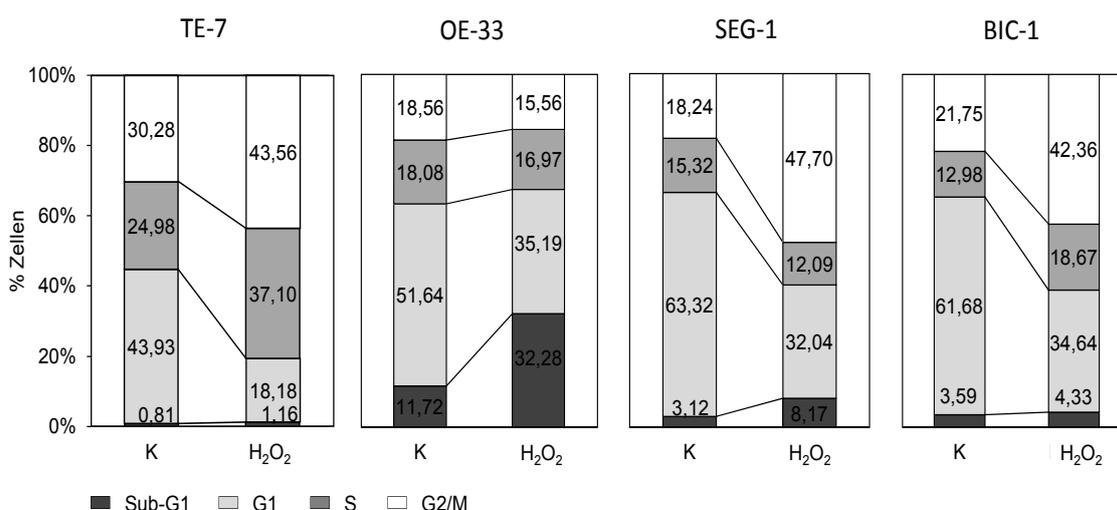


Abb. 10: Prozentuale Verteilung der TE-7-, OE-33-, SEG-1- und BIC-1-Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen 24 h nach H₂O₂-Behandlung
H₂O₂ - H₂O₂-Behandlung (250 µM), K - Kontrolle, G2/M, S, G1 - Zellzyklusphasen, Sub-G1 - Apoptose

3.1.1.3 Nachweis von Zelltod

3.1.1.3.1 Morphologie

Als Folge nicht reparierter DNA-Schäden kann Zelltod ausgelöst werden. Um die Induzierbarkeit von Zelltod durch H₂O₂-Stress in den untersuchten Karzinomzelllinien nachzuweisen, wurden diese vorerst morphologisch untersucht.

Die Behandlung mit H₂O₂ führte in allen untersuchten Karzinomzelllinien zu typischen apoptotischen Zelltodmerkmalen, dem Schrumpfen der Zellen und der Abschnürung von Membranvisikeln (*blebbing*, Zeiose) (Anhang 1). Weiterhin zeigten die behandelten Zellen aller Karzinomzelllinien nach der Behandlung eine geringere Konfluenz, was auf einen Zellzyklusarrest und/oder Zelltod hinweist. Der nekrotische Zelltod konnte anhand der morphologischen Momentaufnahmen nicht dokumentiert werden.

3.1.1.3.2 Gesamtzelltodnachweis

Um den Gesamtzelltod (Apoptose und Nekrose) zu messen, wurde der *Annexin-V-FLOUS Staining Kit* mit anschließender Auswertung durch *fluorescence activated cell sorting* (FACS) verwendet.

Die Färbung der Zellen zeigte 24 h nach der Behandlung mit H_2O_2 bei allen Karzinomzelllinien eine zu der jeweiligen Kontrolle erhöhte Zelltodpopulation an (Abb. 11). Die geringste Zelltdorate konnte bei der Karzinomzelllinie TE-7 nachgewiesen werden. Entsprechend der erhaltenen Daten ließen sich die Karzinomzelllinien wie folgt nach steigendem Zelltod (Differenz zur Kontrolle in % Zellen) ordnen:
TE-7 (10,56 %) < OE-33 (17,55 %) < SEG-1 (30,4 %) < BIC-1 (35,4 %).

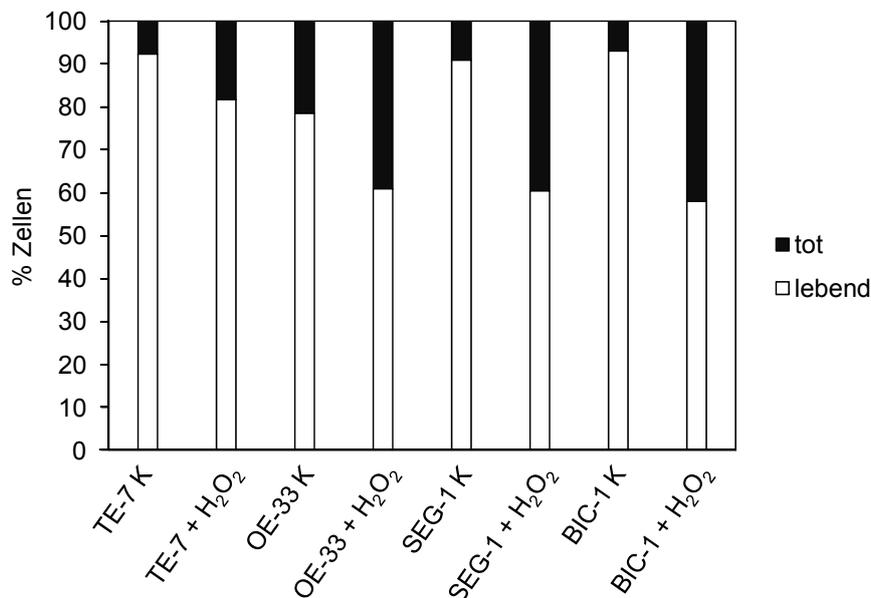


Abb. 11: Prozentualer Anteil toter und lebender Zellen der Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1 24 h nach H_2O_2 -Behandlung
 H_2O_2 - H_2O_2 -Behandlung (250 μ M), K - Kontrolle

3.1.1.3.3 Caspase-3-Spaltung – Nachweis Caspase-3-abhängiger Apoptose

Die Effektorcaspase 3 wird *downstream* des intrinsischen und extrinsischen Wegs der Apoptose aktiviert. Um eine Beteiligung der Caspase-3-abhängigen Apoptose an dem beobachteten Zelltod aller untersuchten Karzinomzelllinien nachzuweisen, wurde die Caspase-3-Aktivierung durch proteolytische Spaltung in den Zelllysaten der vier Kar-

zinomzelllinien 24 h nach der H_2O_2 -Behandlung anhand der Methode des *Western Blot* kontrolliert.

In allen untersuchten Karzinomzelllinien konnten nach der Behandlung die Spaltprodukte der Caspase 3 nachgewiesen werden (Abb. 12). Demzufolge sind in diesen Caspase-3-abhängige apoptotische Mechanismen beteiligt.

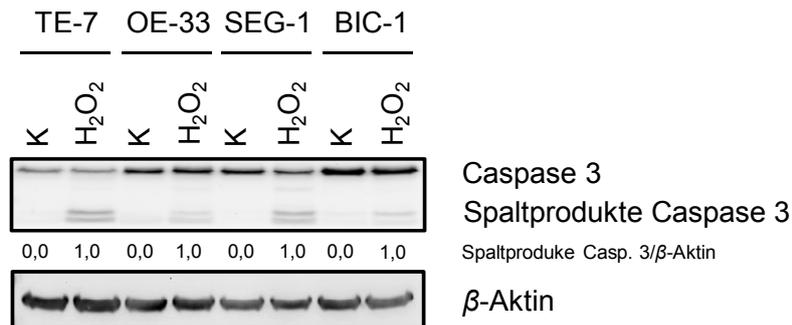


Abb. 12: Nachweis der Caspase-3-Spaltung in den Zellen der Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1 24 h nach H_2O_2 -Behandlung
 H_2O_2 - H_2O_2 -Behandlung (250 μ M), K - Kontrolle

3.1.2 p53-Expression in den unbehandelten und H_2O_2 -behandelten Karzinomzellen

Um eine Erklärung für das unterschiedliche Zellzyklusarrest- und Zelltodverhalten der Karzinomzelllinien gegenüber H_2O_2 -Gabe zu finden, wurde das Augenmerk auf die p53-Proteinexpression gelegt. Dieses Protein spielt aufgrund seiner Funktion als Zellzyklusarrest-, Apoptose- und Nekroseauslöser eine zentrale Rolle in der DNA-Schadensantwort.

Zunächst wurde die p53-Expression in den unbehandelten Zellen der Karzinomzelllinien mithilfe von *Western Blots* analysiert (Abb. 13). Es zeigte sich, dass in den unbehandelten Zellen der Karzinomzelllinie TE-7 kein p53-Protein nachweisbar war. Die Zellen der Karzinomzelllinien OE-33 und BIC-1 wiesen im Vergleich zu den SEG-1-Zellen eine verstärkte p53-Expression auf.

Zur Untersuchung einer H_2O_2 -abhängigen p53-Expression wurden verschiedene Zeitwerte (Kinetik) nach entsprechender Behandlung innerhalb von 24 h durch *Western Blots* betrachtet (Abb. 14). Hierbei wurde deutlich, dass in der Karzinomzelllinie TE-7 auch nach der H_2O_2 -Behandlung kein p53-Protein gebildet wurde. OE-33-Zellen hingegen zeigten nach einer kurzen p53-Induktion bei 15 min eine Abnahme des Proteinlevels. Die Zellen der Karzinomzelllinie SEG-1 wiederum wiesen mit zunehmendem

Zeitverlauf eine deutliche Proteinakkumulation auf, die ihr Plateau bei 6 h erreichte. In BIC-1 dagegen akkumulierte das p53-Protein biphasisch mit Maxima bei 3 und 24 h.

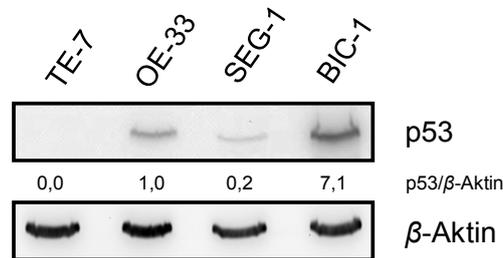


Abb. 13: p53-Expression in unbehandelten Zellen der Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1

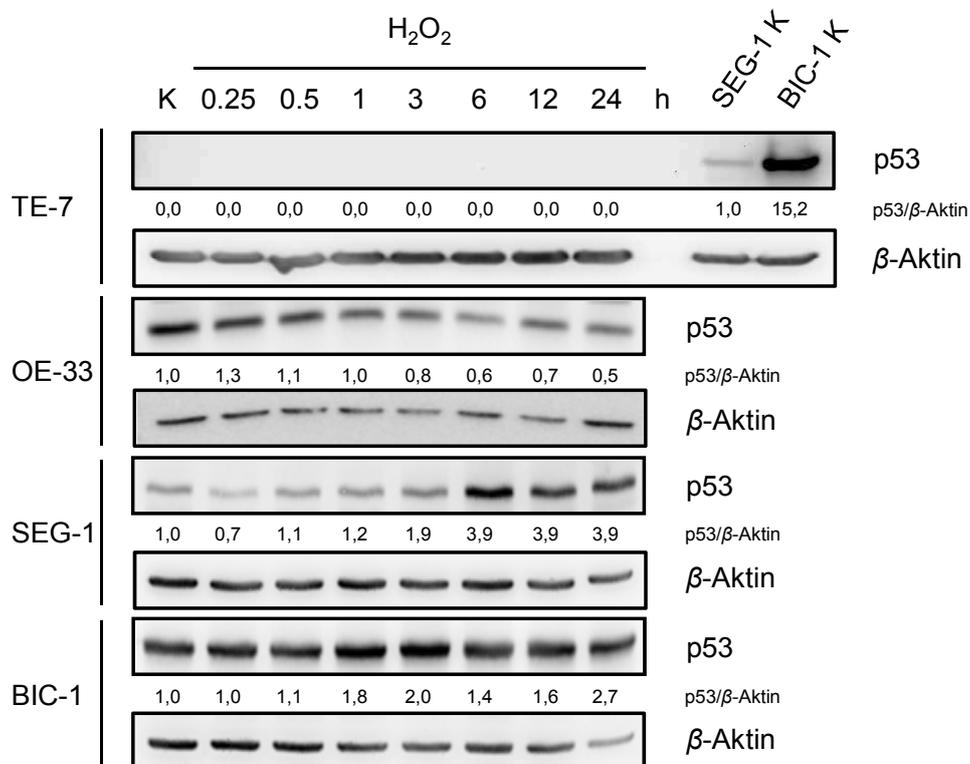


Abb. 14: p53-Expression nach H₂O₂-Behandlung in den Zellen der Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1 (24-h-Kinetik)
H₂O₂ - H₂O₂-Behandlung (250 μM), K - Kontrolle

Die Analysen zum p53 sowie zur Induktion von DNA-Schäden, Zellzyklusarrest und Zelltod (Abschnitte 3.1.1.1 bis 3.1.1.3 und 3.1.2) lassen folgendes Fazit zu: H₂O₂ induzierte 24 h nach der Behandlung (i) unterschiedliche p53-Expressionslevel und -muster, (ii) in allen untersuchten Karzinomzelllinien DNA-Schäden, (iii) in drei von ihnen einen Zellzyklusarrest und (iv) in allen Zelltod. Dabei ist TE-7 die Karzinomzelllinie, welche vergleichsweise die geringste Zelltodrate (zelltodresistent) bei gleich-

zeitigen Zellzyklusarresten zeigte. Daher wurde diese für die Analyse der detaillierten molekularen Mechanismen verwendet, um aus einem Zellzyklusarrest heraus Zelltod zu induzieren.

3.2 Detaillierte Untersuchungen an der ösophagealen Karzinomzelllinie TE-7

3.2.1 Molekulare Mechanismen der H₂O₂-induzierten DNA-Schäden, Zellzyklusarreste und des Zelltods

Um die molekularen Mechanismen der induzierten DNA-Schäden, der Zellzyklusarreste und des Zelltods der zelltodresistenten ösophagealen Karzinomzelllinie TE-7 zu untersuchen, wurden unterschiedliche Zeitpunkte nach der H₂O₂-Behandlung betrachtet.

3.2.1.1 DNA-Schäden

Die Induktion von verschiedenen DNA-Schadensformen wurde nach der H₂O₂-Behandlung der Karzinomzelllinie TE-7 mittels

- (A) *Comet Assay* – Nachweis von SSBs, DSBs sowie AP-Stellen,
- (B) Analyse des γ -H2AX-Proteinlevels *per Western Blots* und Nachweis des γ -H2AX im Zellkern durch immunzytochemische Färbung – Nachweis von verschiedenen DNA-Schäden und der möglichen Beteiligung der *phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases* (PIKKs) ATM, ATR und *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PK) sowie des JNK-Signalwegs,
- (C) Analyse der Aktivierung des DNA-Schadenssensors Chk1 mithilfe von *Western Blots* – Beteiligung des ATM/ATR-Signalwegs

untersucht.

3.2.1.1.1 Nachweis verschiedener DNA-Schäden mittels Comet Assay

Im *Comet Assay* korrelieren das Ausmaß und die Länge der *SYBR-Green-I*-gefärbten Schweife mit dem Schweregrad des DNA-Schadens (Singh *et al.*, 1988).

Die Untersuchungen mit diesem Assay zeigten Schweife (*Comets*) an den H₂O₂-behandelten TE-7-Zellkernen 3 und 24 h nach der Behandlung (Abb. 15), die auf

SSBs, DSBs und AP-Stellen hinweisen. Die Kontrollkarzinomzellen hingegen zeigten das *SYBR-Green-I*-Signal ausschließlich im Kern, was auf kompakte DNA ohne DNA-Schäden hinweist. Ferner konnten Schweifformunterschiede zu beiden Zeitpunkten nach der Behandlung festgestellt werden. Nach 3 h war bei dem Großteil der Kerne und deren Schweife ein starkes *SYBR-Green-I*-Signal zu sehen. Nach 24 h hingegen wurden bei einigen Zellkernen mit schwachem Kopf-Signal eine Schweifverlängerung mit keulenartiger Form sowie eine Ausdünnung des *SYBR-Green-I*-Signals sichtbar. Dies weist im Vergleich zu 3 h auf stärker fragmentierte DNA hin, die sich hauptsächlich im Schweif und kaum noch um den Kern herum befand. Die schnellere Migration der stärker fragmentierten DNA war somit anhand der veränderten Form sowie des schwächeren Signals 24 h nach der Behandlung deutlich sichtbar. Der Großteil der Zellen zeigte jedoch bei 24 h eine Schweifverkürzung, was auf eine Reparatur der DNA-Schäden hinweist.

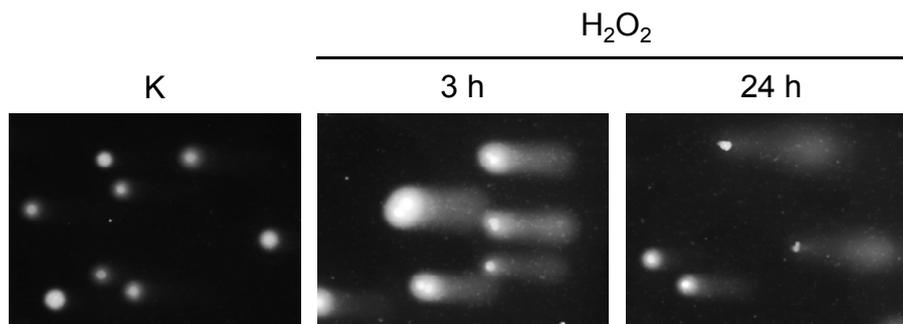


Abb. 15: *Comet Assay* mit den TE-7-Zellen 3 und 24 h nach der H_2O_2 -Behandlung
 H_2O_2 - H_2O_2 -Behandlung (250 μ M), K - Kontrolle

3.2.1.1.2 Nachweis von γ -H2AX

Bei den kinetischen Analysen des γ -H2AX-Levels anhand von *Western Blots* in der Karzinomzelllinie TE-7 konnte eine Anreicherung dieser Proteinmodifikation und des Gesamtproteins nachgewiesen werden (Abb. 16). Die über das γ -H2AX indirekt nachgewiesenen DNA-Schäden wurden bereits nach 15 min sichtbar. Der Nachweis des γ -H2AX zeigt außerdem eine mögliche Beteiligung der *upstream*-gelegenden Kinasen ATM, ATR, DNA-PK oder JNK.

Immunzytochemische Analysen mit dem Anti- γ -H2AX-Antikörper in den TE-7-Zellen nach der H_2O_2 -Behandlung bestätigten die Anreicherung des γ -H2AX und zeigen γ -H2AX-*Foci* (Lichtspots)-Bildung in den Zellkernen nach 6 h (Abb. 17). Hierbei stimmen die bei DNA-Schäden entstehenden *Foci* in den Zellkernen sowohl mit der erwarteten Anzahl als auch mit dem erwarteten Ort von z. B. DSBs überein (zusammen-

gefasst in Staszewski, 2007; Cleaver, 2011). In TE-7 wurde weiterhin deutlich, dass 24 h nach der Behandlung einige Zellen eine für apoptotische Zellen typische pan-nukleäre Färbung aufwiesen. Der größte Anteil der Zellen zeigte jedoch bei diesem Zeitpunkt eine Reduktion der *Foci*-Größe, was in diesen Zellen auf einen Abbau des γ -H2AX im Zuge einer Reparatur hinweist. Insofern ist eine Heterogenität in der Zellantwort der TE-7 Zellen nach 24 h ersichtlich. Es wird sowohl Reparatur als auch in zu stark geschädigten Zellen Apoptose induziert.

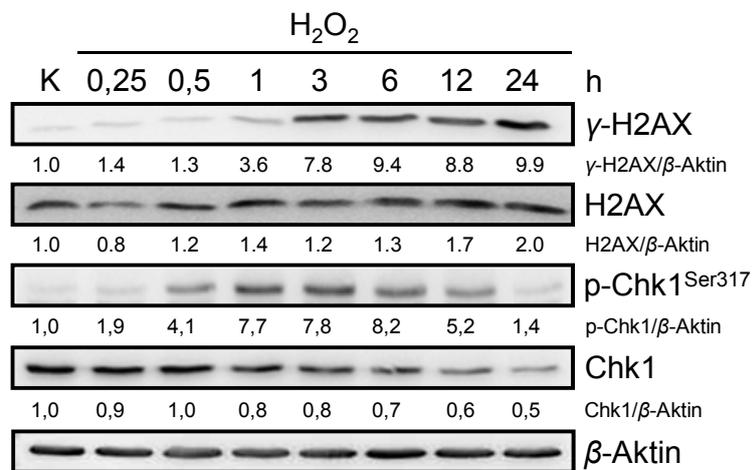


Abb. 16: Nachweis des γ -H2AX und des p-Chk1^{Ser317} sowie der Gesamtproteine H2AX und Chk1 in TE-7-Zellen nach der H₂O₂-Behandlung (24-h-Kinetik)
H₂O₂ - H₂O₂-Behandlung (250 μ M), K - Kontrolle

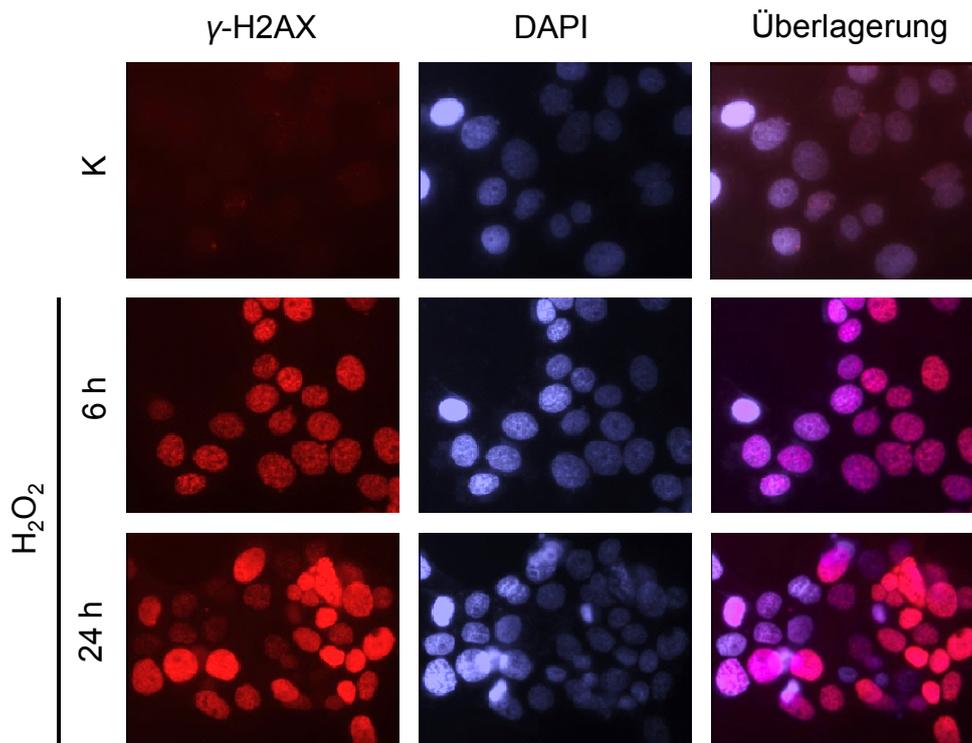


Abb. 17: Immunzytochemischer Nachweis des γ -H2AX in den TE-7-Zellen 6 und 24 h nach der H_2O_2 -Behandlung
 DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol-Färbung, H_2O_2 - H_2O_2 -Behandlung (250 μM),
 K - Kontrolle

3.2.1.1.3 Nachweis von aktiviertem Chk1

Der DNA-Schadenssensor Chk1 wird als Folge von DNA-Schädigung durch Phosphorylierung am Ser 317 hauptsächlich durch die Kinase ATR aktiviert und kann folglich einen S- und G2-Arrest einleiten (Liu *et al.*, 2000).

Die Kinase Chk1 wurde in H_2O_2 -behandelten TE-7-Zellen schon 15 min nach der Behandlung aktiviert und zeigte ein Aktivierungsmaximum bei 6 h (Abb. 16). Die Phosphorylierung ist nach diesem Zeitpunkt rückläufig. Somit wurden über die Aktivierung des Chk1 indirekt DNA-Schäden nach der H_2O_2 -Behandlung nachgewiesen und aktiviertes Chk1 kann die beobachteten Zellzyklusarreste vermitteln.

3.2.1.2 Zellzyklusarrest

Um die beobachteten Zellzyklusarreste der Karzinomzelllinie TE-7 näher zu charakterisieren, wurde die Kinetik der Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen mittels PI-Färbung und anschließendem FACS aufgenommen. Ferner wurden

Untersuchungen zur Proteinexpression des Cdk-Inhibitors p21^{WAF1}, des G1-Zellzyklusregulators Zyklin D1 sowie des späten G2- und Mitosemarkers Phospho-Histons H3 (p-H3^{Ser10}) durch *Western Blots* durchgeführt. Betrachtet wurde auch hier ein Zeitraum von 24 h nach der H₂O₂-Behandlung (Kinetik).

3.2.1.2.1 Kinetik der Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen

Durch die Analysen zur Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen war zu erkennen, dass die Zellen erst bei 24 h nach der H₂O₂-Behandlung mit einem deutlichen S- und G2/M-Arrest und einer leichten Erhöhung der Sub-G1-Population (Apoptose) reagierten (Abb. 18).

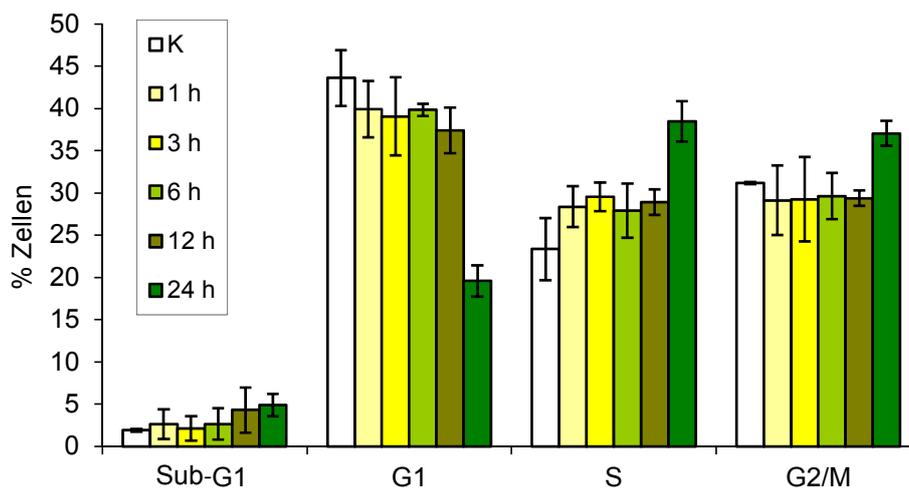


Abb. 18: Verteilung der TE-7-Zellen in den Zellzyklusphasen 1, 3, 6, 12 und 24 h nach der H₂O₂-Behandlung (250 µM)
K - Kontrolle, G2/M, S, G1 - Zellzyklusphasen, Sub-G1 - Apoptose

3.2.1.2.2 Expression des Zellzyklusinhibitorproteins p21^{WAF1}

Der Untersuchungsschwerpunkt wurde auf das für die Zellzyklusregulation zentrale Protein p21^{WAF1} gelegt, da dieses ein potenter Auslöser sowohl des S- als auch des G2-Arrests ist.

Die Ergebnisse zeigten ein verstärktes p21^{WAF1}-Proteinlevel nach der H₂O₂-Behandlung (Abb. 19). Die maximale Expression war nach 12 h zu beobachten. Demzufolge kann dieser Zellzyklusinhibitor die beobachteten Zellzyklusarreste vermitteln.

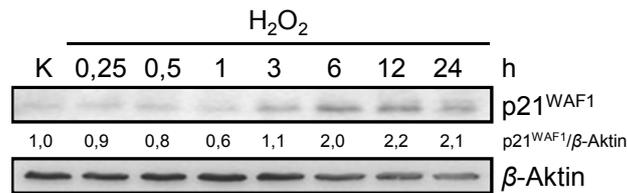


Abb. 19: p21^{WAF1}-Expression in den TE-7-Zellen nach der H₂O₂-Behandlung (24-h-Kinetik)
H₂O₂ - H₂O₂-Behandlung (250 μM), K - Kontrolle

3.2.1.2.3 Expression des Zellzyklusregulatorproteins Zyklin D1 und Nachweis des Mitosemarkers p-H3^{Ser10}

Um die reduzierte Anzahl an Karzinomzellen in der G1-Phase zu untermauern, wurde der Zellzyklusregulator Zyklin D1, der im Komplex mit Cdk4/6 die Progression durch die G1-Phase vermittelt (zusammengefasst in Bernards, 1999), analysiert. Zur Beschreibung der G2/M-Progression, wurde die Histonmodifikation p-H3^{Ser10} untersucht. Diese Modifikation ist für die späte G2-Phase sowie die Mitose typisch und korreliert mit der Chromosomenkondensierung vor der Mitose (Hendzel *et al.*, 1997; Goto *et al.*, 1999). Daher kann er zur Differenzierung zwischen einem frühen G2- und M-Arrest genutzt werden.

Durch die Analysen wurde deutlich, dass das G1-Phaseprotein Zyklin D1 zeitabhängig herunterreguliert wurde (Abb. 20). Da dieses Protein, welches als regulatorische Unter-einheit der Cdk4/6 fungiert, nur noch geringfügig vorhanden war, durchlaufen die Zellen die G1-Phase vermindert.

Die Proteinmodifikation p-H3^{Ser10} war bereits 15 min nach der Behandlung einer Reduktion unterlegen. Beim Zeitpunkt 24 h nach der H₂O₂-Behandlung ist die Phosphorylierung nicht mehr nachweisbar. Dies deutet auf eine nicht mehr stattfindende Mitose und einen frühen G2-Arrest hin.

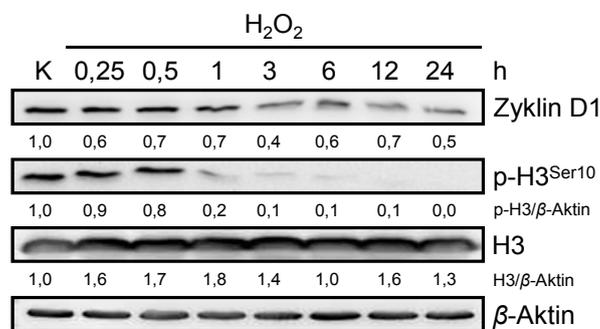


Abb. 20: Zyklin-D1-Expression und Nachweis des p-H3^{Ser10} nach der H₂O₂-Behandlung in TE-7-Zellen (24-h-Kinetik)
H₂O₂ - H₂O₂-Behandlung (250 μM), K - Kontrolle

3.2.1.3 Proliferationsverhalten und Zelltod

Um den Effekt der H_2O_2 -induzierten DNA-Schäden, Zellzyklusarreste und des Zelltods auf das Zellwachstum zu überprüfen, wurde ein Zellproliferations-Assay durchgeführt. Die detaillierten Untersuchungen zum Zelltodverhalten der H_2O_2 -behandelten Karzinomzelllinie TE-7 umfassten die Detektion der Apoptose und Nekrose mithilfe des *Annexin-V-FLOUS Staining Kit* sowie die Analyse der Aktivierung von Apoptosesignalwegen mittels *Western Blots*. Der intrinsische Apoptoseweg wurde durch Analyse des Expressionsverhaltens der Proteine BAX und Bcl-2 und Betrachtung der Aktivierung der Caspase 9 untersucht. Weiterhin wurde die Aktivierung der Caspase 8 analysiert und anschließend die der Effektorcaspase 3.

3.2.1.3.1 Proliferation

Die Ergebnisse des kolorimetrischen BrdU-Zellproliferations-ELISA belegten nach der H_2O_2 -Behandlung der TE-7-Zellen einen reduzierten Einbau von BrdU in die Zellen (Abb. 21). Dieses Ergebnis zeigt, dass die behandelten Zellen in ihrer Proliferationsaktivität gehemmt wurden.

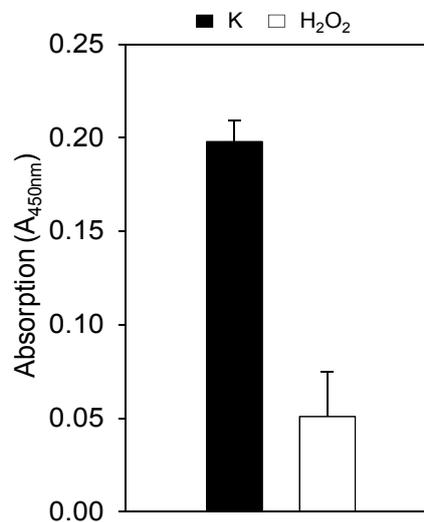


Abb. 21: Zellproliferationsverhalten der TE-7-Zellen 24 h nach der H_2O_2 -Behandlung
 H_2O_2 - H_2O_2 -Behandlung (250 μM), K - Kontrolle

3.2.1.3.2 Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen

Zur Messung der Apoptose und Nekrose in Abhängigkeit von der H_2O_2 -Konzentration wurde der *Annexin-V-FLOUS Staining Kit* nach der Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen H_2O_2 -Konzentrationen zwischen 10 und 500 μM verwendet.

Die Untersuchungen zeigten, dass eine zellzyklusarrestinduzierende Konzentration von 250 μM auch die maximal erreichbare Apoptose bei geringerer Nekrose auslöste (apoptotische Zellen: 11,94 %; nekrotische Zellen: 6,31 %; Abb. 22). Ab 500 μM änderte sich das Verhältnis von Apoptose zu Nekrose, indem mehr Nekrose als Apoptose ausgelöst wurde (apoptotische Zellen: 17,97 %; nekrotische Zellen: 26,65 %).

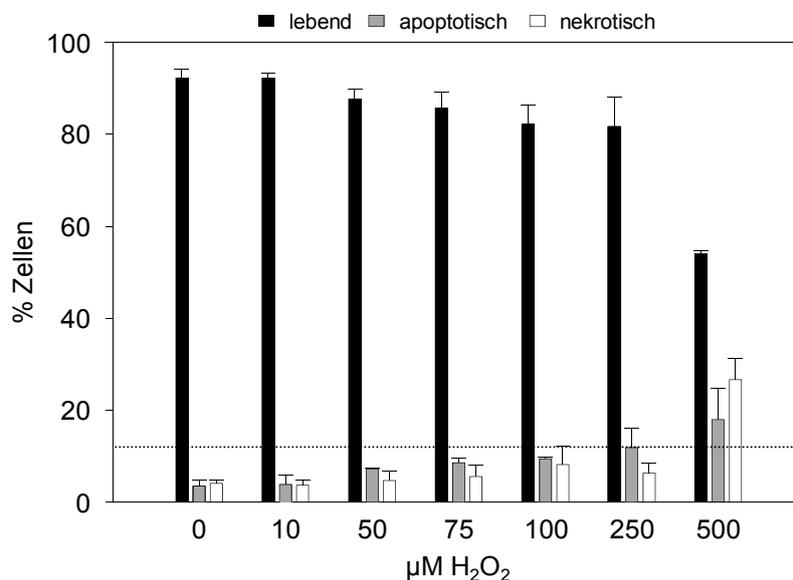


Abb. 22: Lebende, apoptotische und nekrotische Zellpopulationen der Karzinomzelllinie TE-7 24 h nach der Behandlung mit unterschiedlichen H_2O_2 -Konzentrationen

Um eine Aussage über die Zelltodentwicklung über den Zeitwert von 24 h hinaus treffen zu können, wurde ebenfalls der Zelltod nach 48 h ermittelt.

Nach der H_2O_2 -Behandlung zum Zeitpunkt 48 h wurde eine 9,19 %ige Zelltoderhöhung (4,83 % Apoptose und 4,36 % Nekrose) im Vergleich zu der Kontrolle festgestellt (Abb. 23). Im Vergleich zu 24 h fand eine Verringerung der Zelltoderate statt. Der Rückgang der Zelltoderate setzte sich aus einer Verringerung der Apoptoserate [von 8,34 % bei 24 h (Abb. 22) auf 4,83 % bei 48 h (Abb. 23)] und einem Anstieg der Nekroserate [von 2,22 % (Abb. 22) auf 4,36 % (Abb. 23)] zusammen.

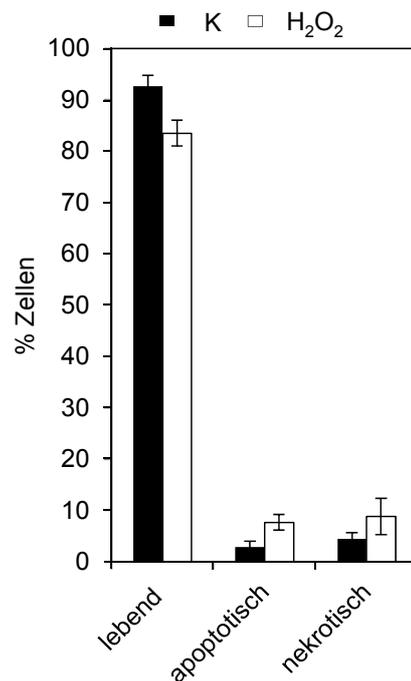


Abb. 23: Lebende, apoptotische und nekrotische Zellpopulationen der Karzinomzelllinie TE-7 48 h nach der Behandlung mit H₂O₂
H₂O₂ - H₂O₂-Behandlung (250 µM), K - Kontrolle

3.2.1.3.3 BAX/Bcl-2-Verhältnis

Das apoptotische Verhalten von Zellen lässt sich molekular durch das BAX/Bcl-2-Proteinexpressionsverhältnis beschreiben (Salakou *et al.*, 2007). BAX fungiert als pro- und Bcl-2 als antiapoptotisches Protein. Stellt man nun das BAX/Bcl-2-Verhältnis dar, so erhält man ein Maß für das apoptotische Potential von Zellen.

Die Expression dieser beiden Proteine in einem Zeitraum von 24 h nach der H₂O₂-Behandlung wurde *per Western Blots* überprüft (Abb. 24). Hierbei wurde deutlich, dass bereits 15 min nach der Behandlung ein erhöhtes BAX/Bcl-2-Verhältnis zu verzeichnen war. Daraus lässt sich ableiten, dass der intrinsische apoptotische Signalweg durch einen Überschuss an BAX-Proteinen bei gleichzeitiger Reduktion der Bcl-2-Proteine angeschaltet wurde.

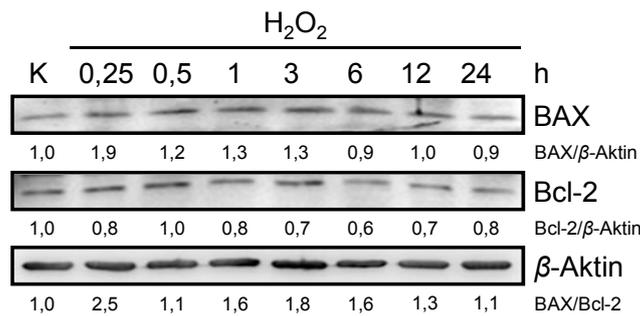


Abb. 24: BAX- und Bcl-2-Expression in TE-7-Zellen nach der H₂O₂-Behandlung (24-h-Kinetik)

Das Verhältnis zwischen BAX und Bcl-2 (BAX/Bcl-2) ist dargestellt. H₂O₂ - H₂O₂-Behandlung (250 μ M), K - Kontrolle

3.2.1.3.4 Caspase-8-, 9- und 3-Spaltung – Apoptoseinduktion

Der Prozess der Apoptose wurde durch den Nachweis der Caspasen-Spaltung untersucht.

Deutlich wurde hierbei, dass die Caspasen 9, 8 und 3 ab 6 bzw. 12 h nach der H₂O₂-Gabe gespalten wurden und eine Verstärkung dieses Effekts bei den späteren Zeitpunkten auftrat (Abb. 25). Sowohl das erhöhte BAX/Bcl-2-Verhältnis als auch die Aktivierung der Caspase 9 zeigen die Beteiligung des intrinsischen Apoptosesignalwegs. Caspase 9 und 8 konnten somit die Caspase 3 aktivieren, die für die beobachtete geringe Apoptose verantwortlich zu sein scheint.

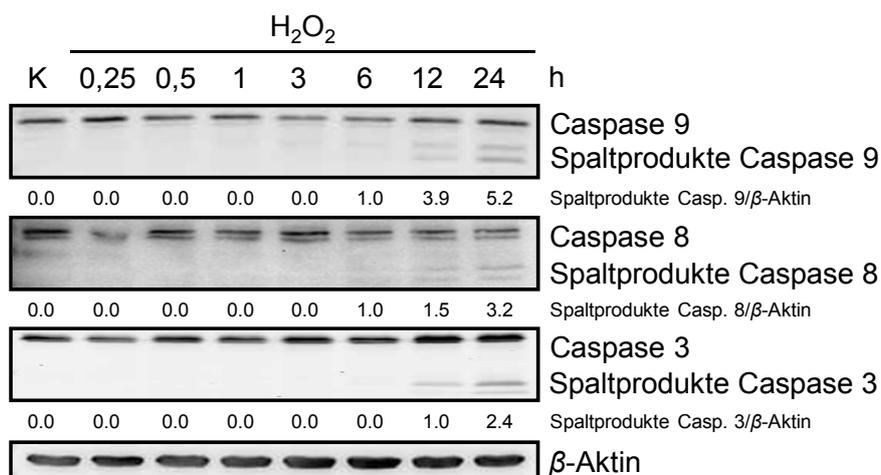


Abb. 25: Nachweis der Caspase-9-, 8- und 3-Spaltung in den TE-7-Zellen nach der H₂O₂-Behandlung (24-h-Kinetik)

H₂O₂ - H₂O₂-Behandlung (250 μ M), K - Kontrolle

3.2.2 Identifizierung eines DNA-Schadens-, Zellzyklus- und Apoptose-regulierenden zentralen Proteins

Um die H₂O₂-induzierte mRNA-Expressionsinduktion eines zentralen Proteins, das in der DNA-Schadens-, Zellzyklus- und Apoptoseregulation involviert ist, zu ermitteln, wurden cDNA-*Microarray*-Analysen mit den TE-7-Zellen durchgeführt. Bei der Selektion des Proteins wurde sich auf die Zelltodform Apoptose beschränkt, da diese einer der Hauptsignalwege in der Tumorantwort auf Behandlungen darstellt (Brown & Attardi, 2005). Nach der Auswahl eines zentralen Proteins wurden PCR-*Array*-Analysen zur differentiellen mRNA-Expressionsanalyse des für dieses Protein erforderlichen *upstream*-Signalwegs durchgeführt. Anschließend fanden Proteinexpressionsstudien zum ermittelten Signalweg statt.

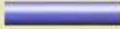
3.2.2.1 Analyse der differentiellen mRNA-Expression

3.2.2.1.1 Ermittlung eines transkriptionell aktivierten Gens involviert in DNA-Schadens-, Zellzyklus- und Apoptoseregulation

In der vorliegenden Studie wurde der cDNA-*Microarray* "GEArray Q Series Human Signal Transduction PathwayFinder Gene Array" verwendet. Dieser lässt den gleichzeitigen Nachweis der mRNA-Expression von 96 Genen, die an unterschiedlichsten Signalwegen beteiligt sind, zu.

Die Ergebnisse des cDNA-*Microarray* zeigten, dass 30 min nach der H₂O₂-Behandlung der TE-7-Zellen 35 Gene, die in mehrere *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)-Signalwege involviert sind, transkriptionell aktiviert wurden (mehr als zweifach überexprimiert und neu exprimiert; Tab. 24, Anhang 2 und 3). Angeschaltet wurden z. B. Gene, die in Zellzyklus-, MAPK-, *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription* (Jak-STAT)- und Apoptose-Signalwege involviert sind. Außerdem konnte ausschließlich eine Überexpression von Genen des *Array* festgestellt werden (Anhang 3).

Tab. 24: Einordnung der differentiell exprimierten Gene H₂O₂-behandelter TE-7-Zellen in KEGG-Signalwege mit der *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID)

Term	RT	Genes	Count
Pathways in cancer	RT		15
Cell cycle	RT		10
p53 signaling pathway	RT		6
Bladder cancer	RT		5
Small cell lung cancer	RT		6
Colorectal cancer	RT		6
Prostate cancer	RT		5
MAPK signaling pathway	RT		7
Glioma	RT		4
Melanoma	RT		4
Chronic myeloid leukemia	RT		4
ErbB signaling pathway	RT		4
T cell receptor signaling pathway	RT		4
Focal adhesion	RT		5
Endometrial cancer	RT		3
Non-small cell lung cancer	RT		3
NOD-like receptor signaling pathway	RT		3
Jak-STAT signaling pathway	RT		4
Pancreatic cancer	RT		3
Hematopoietic cell lineage	RT		3
Apoptosis	RT		3

Um unter den überexprimierten Genen eines mit einer Rolle in der DNA-Schadens-, Zellzyklus- und Apoptoseregulation zu ermitteln, wurde die *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) und die *UniProt Knowledgebase* (UniProtKB) verwendet. Folgend wurde ein Venn-Diagramm erstellt (Abb. 26, Anhang 4). Ziel dieser Zuordnung war es außerdem, ein Gen zu ermitteln, zu dem auf dem Forschungsgebiet der Ösophaguskarzinome noch kein Beitrag existiert. Unter den 15 Genen, die eine Funktion in der DNA-Schadens-, Zellzyklus- und Apoptoseregulation haben (Abb. 26), befanden sich zwei Gene, ATF-2 und das *CCAAT/ enhancer-binding protein (C/EBP), beta* (CEBPB), die in der Datenbank *Pubmed* noch nicht mit

Ösophaguskrebs in Verbindung gebracht wurden (Tab. 25). Beide Genprodukte stellen Transkriptionsfaktoren dar. Für weitere Untersuchungen wurde ATF-2 (Komponente des MAPK-Signalwegs siehe Anhang 3) gewählt, da dieses ein aufgrund der gleichzeitigen Funktion als Histonacetyltransferase (HAT) sehr potenter Transkriptionsfaktor ist (Kawasaki *et al.*, 2000). Des Weiteren zeigen neue Studien, dass ATF-2 eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielen könnte (zusammengefasst in Gozdecka & Breitwieser, 2012), was dieses Protein als Zielprotein für Therapien interessant macht. Außerdem ist bekannt, dass ATF-2 p21^{WAF1} reguliert (Kardassis *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2010a), womit, wenn ATF-2 in TE-7 dieselbe Funktion ausübt, eine ATF-2-Inhibierung einen direkten Einfluss auf die Induktion der beobachteten Zellzyklusarreste haben könnte.

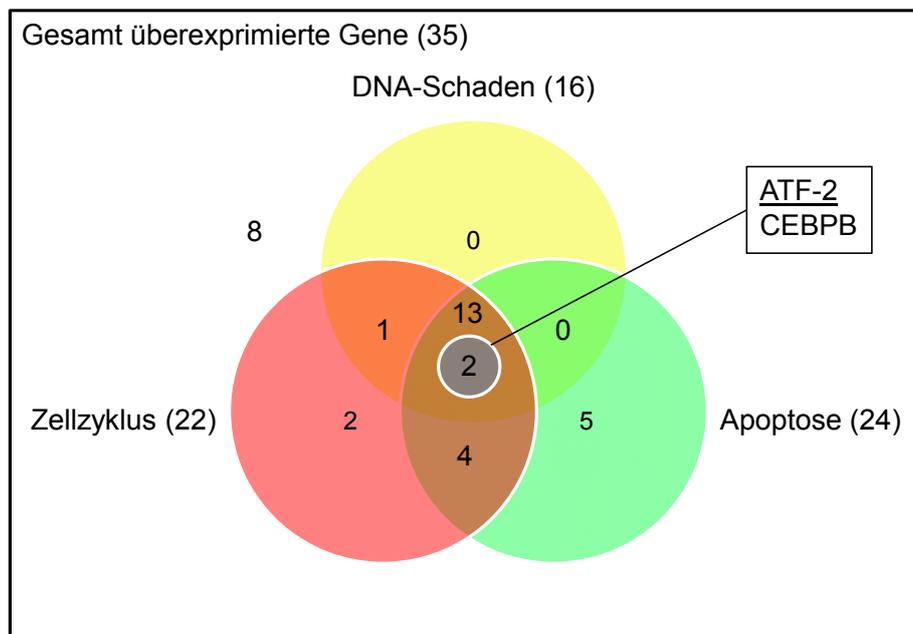


Abb. 26: Venn-Diagramm – Einordnung der H₂O₂-induzierten Gene der Karzinomzelllinie TE-7 in DNA-Schadens-, Zellzyklus- und Apoptoseregulationsprozesse

Tab. 25: Anzahl der Literaturquellen für die 15 in DNA-Schadens-, Zellzyklus- und Apoptoseregulation involvierten H₂O₂-induzierten Gene im Zusammenhang mit Ösophaguskarzinomen aus der Datenbank *Pubmed* – Stand: 30.01.2013

Gen	Anzahl der Literaturquellen aus <i>Pubmed</i>	
	<i>esophagus cancer</i>	<i>esophageal cancer</i>
ATF-2	0	0
BAX	90	96
CDK2	15	15
CDKN1A (p21 ^{WAF1})	167	168
CDKN1C (p57 ^{KIP2})	6	6
CDKN2A (p16 ^{INK4})	246	239
CDKN2D (p19)	1	1
CEBPB	0	0
EGFR	223	237
EGR1	11	11
FOS	18	16
GADD45A	8	8
JUN	38	48
JUNB	2	2
MYC	139	152

3.2.2.1.2 Ermittlung der transkriptionellen Aktivierung der *upstream* vom ATF-2 gelegenen Signaltransduktionsgene

Da ATF-2 eine Komponente des Signalwegs der stressaktivierten MAPKs ist (Davis, 1993; Anhang 3), der durch oxidativen Stress und DNA-Schäden aktiviert wird (Son *et al.*, 2011), war für die vorliegende Arbeit außerdem von Interesse, ob die mRNA-Expression der *upstream* vom ATF-2 gelegenen MAPKs verändert vorlag. Dies wurde mithilfe des *Human MAP Kinase Signaling Pathway“ RT² Profiler™ PCR Array* ebenfalls 30 min nach der H₂O₂-Behandlung untersucht.

Es erwies sich, dass die mRNAs zahlreicher MAPK *kinase kinases* (MAPKKKs), MAPK *kinases* (MAPKKs) und die der Familie der MAPKs überexprimiert waren (Anhang 5). Zu erwähnen sind hier besonders die direkt *upstream* vom ATF-2-gelegenen MAPKs:

- 1) MAPK 1/6 - ERK 2/3,
- 2) MAPK 8/9 - JNK 1/2 und
- 3) MAPK 11/12/14 - p38 $\alpha/\beta/\gamma$.

Weiterhin ist eine verstärkte Expression der mRNA des ATF-2-Ko-Aktivators *CREB binding protein* (CBP) festgestellt worden (Anhang 5). Über die *Array*-Studien wurde auch die mRNA-Überexpression des Gens *CDKN1A* (p21^{WAF1}) ermittelt (Anhang 4 und 5). Folglich kann die eingangs festgestellte Anreicherung des p21^{WAF1}-Proteins (Abb. 19) mit der Überexpression der mRNA (Transkriptionsinduktion) assoziiert werden.

3.2.2.2 Analyse der Proteinexpression und Aktivierung der MAPKs und des ATF-2

Von Interesse war nun, ob die transkriptionelle Aktivierung der JNK, p38 und ERK MAPKs sowie des ATF-2 nach H₂O₂-Behandlung auch zu einer erhöhten Proteinexpression führt und gegebenenfalls auch eine Aktivierung dieser Kinasen und des Transkriptionsfaktors nachgewiesen werden kann.

Um dies zu untersuchen, wurde die Methoden des *Western Blot* und der Ko-Immünpräzipitation genutzt.

3.2.2.2.1 MAPKs

Die Proteinexpressionsanalysen der MAPKs JNK, p38 und ERK (Abb. 27) zeigten eine zeitabhängige Reduktion der Expression der drei MAPK-Proteine nach der H₂O₂-Gabe. Somit führte die im *PCR-Array* festgestellte überexprimierte mRNA nicht zur verstärkten Translation der entsprechenden Proteine. Weiterhin konnte im Zuge der Untersuchungen eine biphasische Aktivierung der MAPKs mittels Phosphorylierung festgestellt werden. Die MAPKs p46 (JNK 1/2) wiesen bei 30 min und 12 h die maximale Aktivierung [Phosphorylierung am Thr 183/Tyrosin (Tyr) 185] auf. Die p54 (JNK 1/2) wurden nach 1 h aktiviert (Phosphorylierung am Thr 183/Tyr 185) und das Maximum ihrer Aktivierung war bei 12 h zu beobachten. Die p38 $\alpha/\beta/\gamma$ MAPKs zeigten ihr Aktivierungsmaximum (Phosphorylierung am Thr 180/Tyr 182) bei 15 min und 12 h, die MAPKs p44/42 (ERK 1/2) wiesen ein solches (Phosphorylierung am Thr 202/Tyr 204) nach 30 min und 12 h auf.

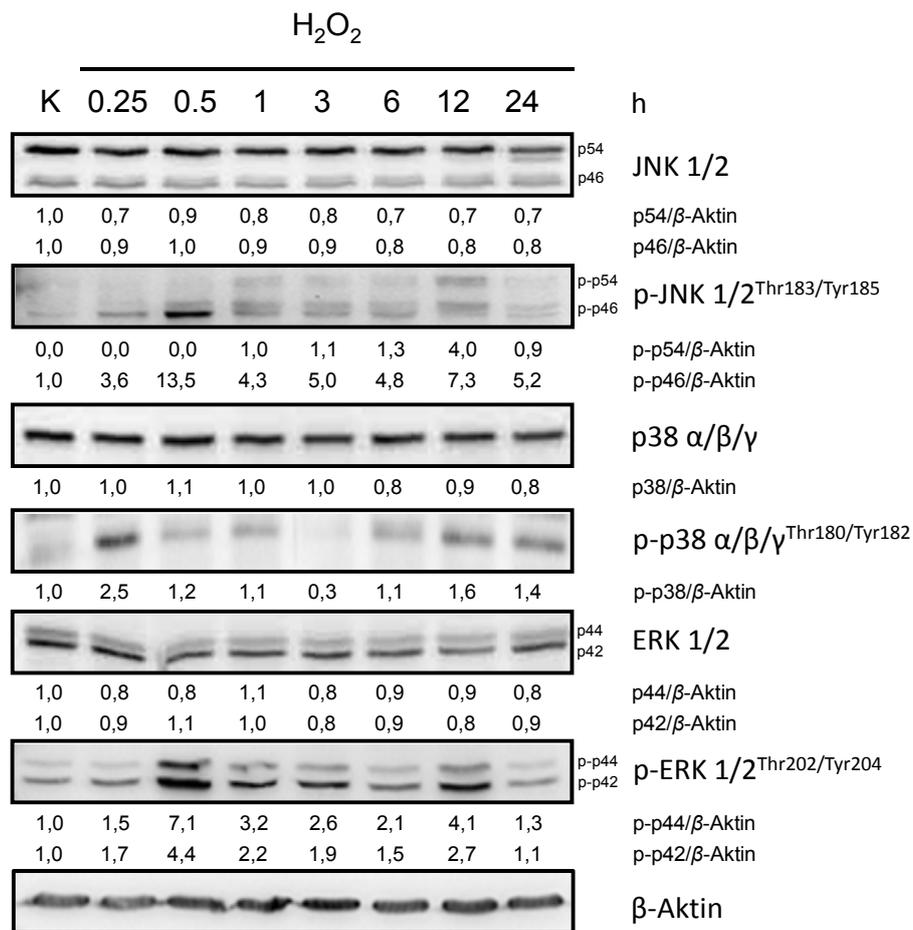


Abb. 27: Expression der MAPKs JNK, p38 und ERK und deren Aktivierung in TE-7-Zellen nach der H_2O_2 -Behandlung (24-h-Kinetik)
 H_2O_2 - H_2O_2 -Behandlung (250 μ M), K - Kontrolle

3.2.2.2.2 ATF-2

Die Phosphorylierung des ATF-2 an den Thr 69 und 71 durch die stressaktivierten MAPKs ist hauptsächlich für dessen transaktivierende Kapazität notwendig (Gupta *et al.*, 1995; van Dam *et al.*, 1995). Unter normalen Bedingungen (stressfrei), weist ATF-2 aufgrund intramolekularer autoinhibitorischer Interaktionen der C-terminalen *basic leucine zipper domain* (bZIP)- und der N-terminalen Aktivierungsdomäne ein geringes Level an Transaktivierung auf. *Inducer* des ATF-2 (z.B. Kinasen) zerstören diese Verbindung und aktivieren die transkriptionelle Aktivität des ATF-2, indem gebildetes p-ATF-2^{Thr69/71} vom Zytoplasma in den Kern wandert und dort an die DNA im Promotorbereich der Zielgene bindet (zusammengefasst in Bhoumik *et al.*, 2007; Abb. 28).

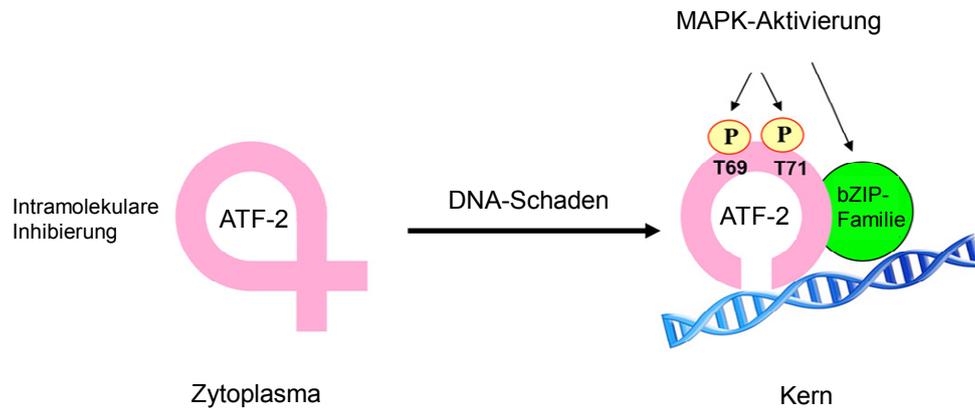


Abb. 28: Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ATF-2 an den Thr 69 und 71 ist für dessen Lokalisationsänderung und Aktivierung erforderlich.

Modifiziert nach Bhoumik *et al.* (2007), bZIP - *basic leucine zipper domain*, P - Phospho-, T69/71 - Threonin 69/71

Analysen zur Proteinexpression und Aktivierung des ATF-2 zeigten, dass entsprechend der erhöhten ATF-2-mRNA-Expression (Anhang 3) 30 min nach der H₂O₂-Behandlung auch ein erhöhtes Proteinlevel nachgewiesen werden konnte (Abb. 29). Im Anschluss daran war ein Rückgang des ATF-2-Proteinlevels zu verzeichnen. Weiterhin konnte etwas zeitversetzt zu der MAPK-Aktivierung, ab 30 min, die Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors durch Phosphorylierung an den Thr 69 und 71 nachgewiesen werden. Diese zeigte die maximale Ausprägung bei 3 h und war bei 24 h vollständig rückläufig.

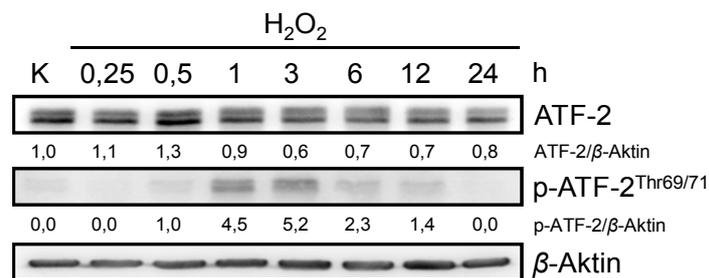


Abb. 29: Proteinexpression und Aktivierung des ATF-2 in TE-7-Zellen nach der H₂O₂-Behandlung (24-h-Kinetik)

H₂O₂ - H₂O₂-Behandlung (250 μ M), K - Kontrolle

Die Lokalisationsänderung des ATF-2, als Hinweis auf die Aktivierung, wurde im Folgenden anhand immunzytochemischer Färbungen unter Verwendung des Antikörpers Anti-ATF-2 (20F1) überprüft.

Die Ergebnisse der Färbungen zeigten 1 h nach der H₂O₂-Behandlung ein verstärktes Signal im Zytoplasma der Karzinomzellen und in einigen Zellen auch im Kern (Abb. 30). Dies deutet auf eine verstärkte Expression und die Aktivierung durch das *Shuttling* des Proteins vom Zytoplasma in den Kern hin.

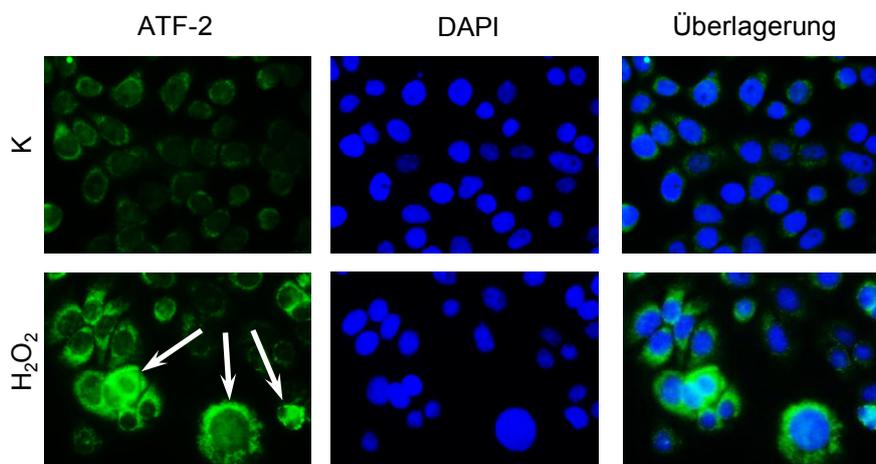


Abb. 30: ATF-2-Lokalisation durch immunzytochemische Färbung der TE-7-Zellen 1 h nach der H₂O₂-Behandlung
 DAPI - 4',6-Diamidin-2-phenylindol-Färbung, H₂O₂ - H₂O₂-Behandlung (250 µM),
 K - Kontrolle

3.2.2.2.3 *c-Jun* und *p300/CBP*

Unphosphoryliert liegt ATF-2 aufgrund der inhibitorischen Struktur als Monomer vor. Die intramolekulare Inhibierung wird durch die Phosphorylierung an den Thr 69 und 71 aufgehoben und gibt die für die Dimerisierung und DNA-Bindung notwendige b-ZIP-Domäne frei. Phosphoryliertes ATF-2 kann folglich Homodimere und Heterodimere mit anderen Mitgliedern der bZIP-Familie bilden (ATF/CREB-, Jun/*FBJ murine osteo-sarcoma viral oncogene homolog* (*fos*)-Familie) (Hai *et al.*, 1989; Abb. 28). Die transkriptionelle Aktivität des Homodimers ATF-2 ist limitiert (<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/ATF2ID718ch2q31.html>, Stand: 19.06.2013). Daher ist dessen Aktivität auch von Heterodimerisierungspartnern, wie z. B. von dem sehr gut charakterisierten Transkriptionsfaktor *Jun proto-oncogene* (*c-Jun*), abhängig (Newman & Keating, 2003; Steinmüller *et al.*, 2001). Dieser bildet mit ATF-2 den *activator protein 1* (AP-1)-Kom-

plex. Ferner ist bekannt, dass die HATs p300 und CBP als transkriptionelle Ko-Aktivatoren des AP-1-Komplexes wirken und damit die transkriptionelle Funktion des ATF-2 unterstützen können (Ugai *et al.*, 1999; Sano *et al.*, 1998). Um auf diese Aspekte einzugehen, wurden zuerst Untersuchungen zur Aktivierung von c-Jun (p-c-Jun^{Ser73}), dessen Gesamtproteinexpression und der Proteinexpression von p300/CBP durchgeführt. Anschließend fand die Methode der Ko-IP Anwendung, um eine mögliche Interaktion des p-ATF-2^{Thr69/71} mit p-c-Jun^{Ser73} sowie mit p300/CBP zu überprüfen.

Die *Western-Blot*-Untersuchungen zeigten, dass c-Jun 15 min und ab 3 h nach dem Stress eine erhöhte Proteinexpression aufwies (Abb. 31), was im Falle des 3-h-Wertes auf die im cDNA-Array gefundene mRNA-Überexpression zurückgeführt werden kann (Anhang 3). Die Phosphorylierung am Ser 73 des Proteins c-Jun durch die JNK-MAPKs dient der Funktionalität, Stabilität und dem transaktivierenden Potential, der Förderung der Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie oder mit Ko-Aktivatoren sowie der Förderung der Dissoziation von transkriptionellen Repressorkomplexen (zusammengefasst in Davis, 2000; Lopez-Bergami *et al.*, 2010). Diese Aktivierung konnte bereits 15 min nach der H₂O₂-Behandlung nachgewiesen werden und zeigte bei 6 h die maximale Ausprägung (Abb. 31). Weiterhin konnte ein erhöhtes Proteinlevel der Ko-Aktivatoren p300/CBP 15 und 30 min sowie 1 h nach der Behandlung beobachtet werden.

Demnach ist eine erhöhte Konzentration der Proteine c-Jun und p300/CBP und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun nach der H₂O₂-Behandlung festgestellt worden.

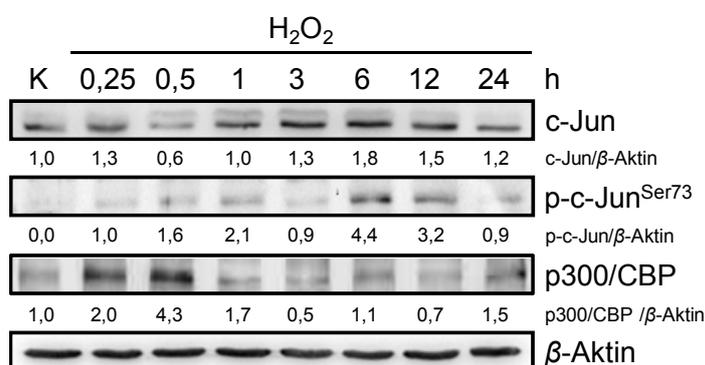


Abb. 31: Proteinexpression und Aktivierung von c-Jun und Proteinexpression von p300/CBP in TE-7-Zellen nach der H₂O₂-Behandlung (24-h-Kinetik)
H₂O₂ - H₂O₂-Behandlung (250 μ M), K - Kontrolle

3.2.2.2.4 Interaktionspartner des p-ATF-2^{Thr69/71}: p-c-Jun^{Ser73} und p300/CBP

Um eine Interaktion der Proteine p-c-Jun^{Ser73} und p300/CBP mit dem aktivierten Transkriptionsfaktor ATF-2 nachzuweisen, wurde die Methode der Ko-IP verwendet.

Die Analysen ließen deutlich erkennen, dass p-ATF-2^{Thr69/71} nach der H₂O₂-Behandlung mit p-c-Jun^{Ser73} den AP-1-Komplex bildet (Abb. 32). Außerdem interagiert p-ATF-2^{Thr69/71} mit p300/CBP. Dabei wurde klar ersichtlich, dass diese Proteine 3 und 6 h nach der Behandlung verstärkt eine Bindung zum p-ATF-2^{Thr69/71} eingehen. Diese Interaktionen können somit die Transaktivierungsfunktion des ATF-2 positiv beeinflussen.

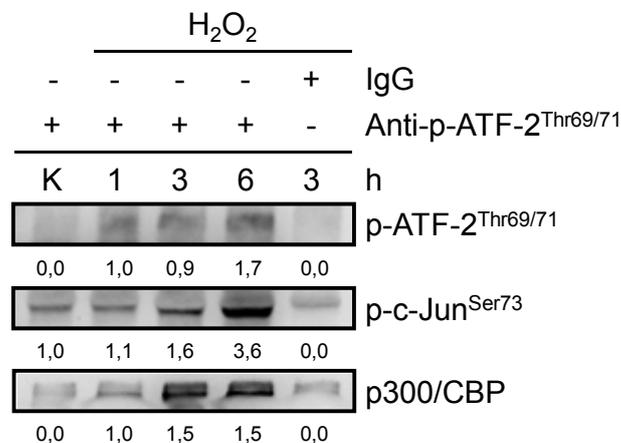


Abb. 32: Nachweis der Interaktion zwischen p-ATF-2^{Thr69/71} und p-c-Jun^{Ser73} bzw. p300/CBP mittels Ko-IP mit dem Antikörper Anti-p-ATF-2^{Thr69/71} in TE-7-Zellen 1, 3 und 6 h nach der H₂O₂-Behandlung

H₂O₂ - H₂O₂-Behandlung (250 µM), IgG - *Rabbit*-Immunglobulin G, K - Kontrolle

3.2.2.3 Prüfung des ATF-2-Knockdown als Mechanismus zum Umschalten vom Zellzyklusarrest zum Zelltod

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass der Transkriptionsfaktor ATF-2 in den TE-7-Zellen nach H₂O₂-Behandlung aktiviert wurde und dadurch Gene der DNA-Schadens-, Zellzyklus- und Apoptoseregulation aktivieren kann. Bekannt ist, dass ATF-2 den Fortbestand einer Zelle (Überleben) und die DNA-Schadensantwort reguliert (zusammengefasst in Bhoumik & Ronai, 2008). Im Falle dieser ausgeübten Funktionen in TE-7 sollte somit eine Beeinflussung dieses Proteins Folgen für das Überleben, die Zellzyklusprogression und die Zelltodregulation der Karzinomzellen haben. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Methode des *Knockdown* angewandt. Im An-

schluss daran wurden die Folgen des ATF-2-Knockdown auf die Zellzyklusarrest- und Zelltodinduktion überprüft.

3.2.2.3.1 Einfluss des ATF-2-Knockdown auf die Zellzyklusarrestinduktion

Der ATF-2-Knockdown [Transfektionsreagenz (TFR) + ATF-2-siRNA + H₂O₂] führte zur teilweisen Reduktion des H₂O₂-induzierten G2-Arrests (- 6,12 % Zellen, entspricht einer 28 %igen Reduktion des G2-Arrests; Abb. 33). Außerdem wurde deutlich, dass die Karzinomzellen sich verstärkt in der S- (+ 2,41 % Zellen) und G1-Phase (+ 3,00 % Zellen) ansammelten und apoptotisch (+ 0,71 % Zellen) wurden. ATF-2 vermittelt demzufolge teilweise den G2-Arrest in der H₂O₂-Antwort der TE-7-Zellen.

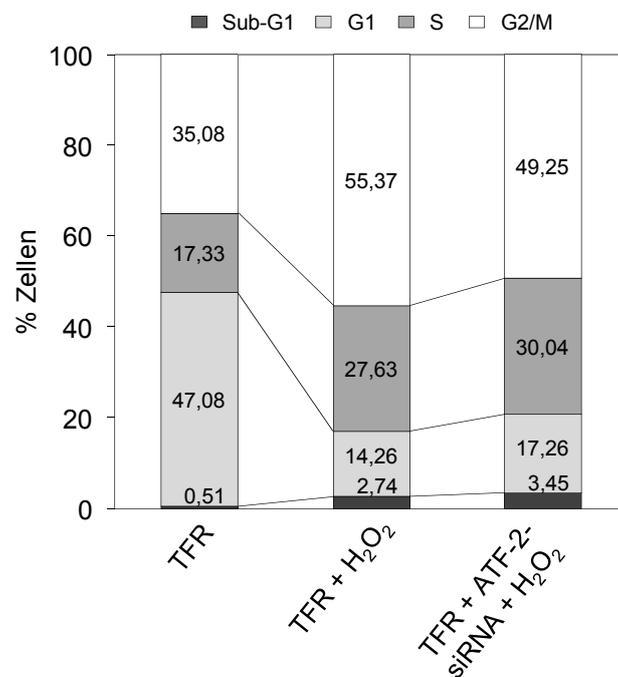


Abb. 33: Beeinflussung der Zellzahl in den Zellzyklusphasen der Zelllinie TE-7 24 h nach ATF-2-siRNA-Transfektion und H₂O₂-Behandlung
 ATF-2-siRNA - ATF-2-siRNA-, H₂O₂ - H₂O₂- (250 µM), TFR - Transfektionsreagenz-Behandlung; G2/M, S, G1 - Zellzyklusphasen, Sub-G1 - Apoptose

3.2.2.3.2 Einfluss des ATF-2-Knockdown auf die Zelltodinduktion

Um die Folgen eines ATF-2-Knockdown auf die Zelltodinduktion zu untersuchen, wurden der *Annexin-V-FLOUS Staining Kit* angewendet und die Caspase-3-Spaltung anhand von *Western Blots* nach ATF-2-siRNA-Transfektion und anschließender H₂O₂-Behandlung analysiert.

A) Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen

Die Annexin-V- und PI-Färbung der Zellen zeigte 24 h nach der ATF-2-siRNA-Transfektion und H₂O₂-Behandlung (TFR + ATF-2-siRNA + H₂O₂) in den TE-7-Zellen eine 1,50-fache Apoptoserate im Vergleich zu den Kontrollzellen (TFR + H₂O₂) (Abb. 34). Ferner konnte eine 1,47-fache Nekroserate beobachtet werden. Das entstandene umgekehrte Verhältnis von Apoptose zu Nekrose ist vermutlich das Ergebnis der Behandlung mit dem Transfektionsmedium.

Die erhöhte Zelltodrate nach dem ATF-2-Knockdown scheint folglich ein Resultat des defekten *G2-Checkpoint* und anschließender Überwindung dieses *Checkpoint* mit DNA-Schäden zu sein. Damit wurde durch den ATF-2-Knockdown ein Umschalten vom Zellzyklusarrest zum Zelltod erreicht.

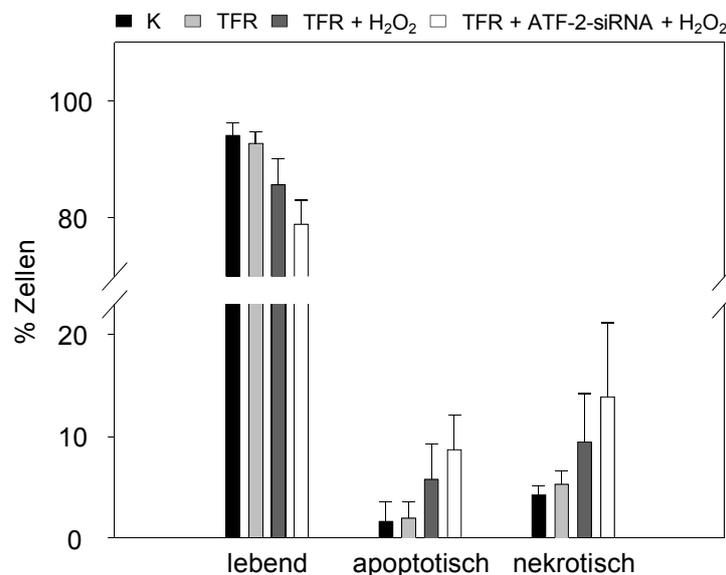


Abb. 34: Lebende, apoptotische und nekrotische Zellpopulationen der Karzinomzelllinie TE-7 24 h nach ATF-2-siRNA-Transfektion und H₂O₂-Behandlung
ATF-2-siRNA - ATF-2-siRNA-, H₂O₂ - H₂O₂- (250 µM), TFR - Transfektionsreagenz-Behandlung

B) Caspase-3-Spaltung – Caspase-3-abhängige Apoptoseinduktion

Die Aktivierung der Caspase 3 war 12 und 24 h nach dem ATF-2-Knockdown und der H₂O₂-Behandlung (TFR + ATF-2-siRNA + H₂O₂) im Vergleich zur Kontrolle (TFR + H₂O₂) verstärkt (Abb. 35). Beobachtet wurde ein 1,50- und 1,40-facher Anstieg der Caspasespaltung. Demzufolge inhibiert ATF-2 die Aktivierung der Caspase 3 in der H₂O₂-Antwort.

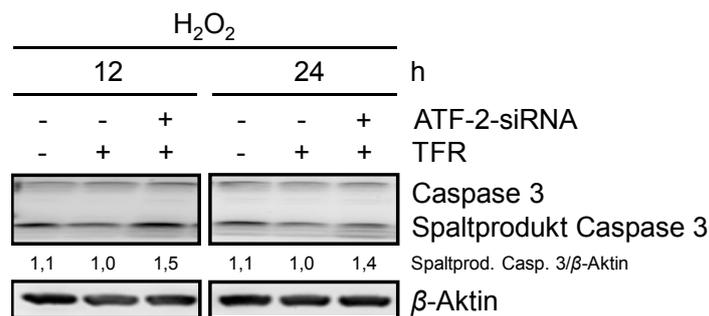


Abb. 35: Caspase-3-Spaltung in den TE-7-Zellen 12 und 24 h nach ATF-2-siRNA-Transfektion und H₂O₂-Behandlung
ATF-2-siRNA - ATF-2-siRNA-, H₂O₂ - H₂O₂- (250 μ M), TFR - Transfektionsreagenz-Behandlung

3.2.2.4 Funktion des ATF-2 in der Expression des Zellzyklusregulators p21^{WAF1} und seines Interaktionspartners c-Jun

3.2.2.4.1 Expression von p21^{WAF1} und c-Jun nach ATF-2-Knockdown

Da ATF-2 in den TE-7-Zellen den G2-Arrest vermittelt, stellte sich die Frage, wie ATF-2 dieses Ereignis regelt. Zu diesem Zwecke wurde der Einfluss des ATF-2 auf die Expression der H₂O₂-induzierten Proteine p21^{WAF1} und c-Jun nach ATF-2-Knockdown mithilfe von *Western Blots* untersucht. Das Protein p21^{WAF1} ist, wie einleitend beschrieben, ein kritisches Zielprotein in der DNA-Schadensantwort und stellt dabei einen potenten Cdk-Inhibitor dar. Das c-Jun, eine Komponente des AP-1-Komplexes, gilt als positiv auf die DNA-Reparatur wirkender Regulator (zusammengefasst in Perez, 1998; Potapova *et al.*, 2001). Damit sind beide Proteine zellzyklusarrestregulatorische Komponenten, die außerdem als ATF-2-Zielgene bekannt sind (van Dam *et al.*, 1995; Kardassis *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2010a).

Die ATF-2-siRNA-Transfektion und sich anschließende H₂O₂-Behandlung (TFR + ATF-2-siRNA + H₂O₂) bewirkte eine deutliche Herunterregulation des phosphorylierten ATF-2 (um 10 % bei 6 h und um 80 % bei 12 h) und des ATF-2-Gesamtproteins (um 20 % bei 6 h und um 60 % bei 12 und 24 h) (Abb. 36). Die Expression des Proteins p21^{WAF1} und des c-Jun war ebenfalls deutlich reduziert, die des p21^{WAF1} um 60 % bei 12 h und um 50 % bei 24 h, die des c-Jun-Proteins um 20 % bei 6 und 24 h und um 50 % bei 12 h.

Somit kann festgehalten werden, dass ATF-2 die Proteinexpression des p21^{WAF1} und des c-Jun induzieren kann. Als Konsequenz daraus kann p21^{WAF1} den G2-Arrest vermitteln und c-Jun die DNA-Reparatur und die ATF-2-transaktivierende Kapazität durch erhöhte ATF-2/c-Jun-Komplexbildung. Diese Ergebnisse erklären das Umschalten von Zellzyklusarrest auf Zelltod nach dem ATF-2-Knockdown.

Der Transfektionsprozess, genauer die Zugabe des TFR, bewirkt zusätzlichen Stress in den Zellen. Dementsprechend ist auch eine Hochregulation des ATF-2 und des p21^{WAF1} als Komponenten der Stressantwort in den Proben „TFR + H₂O₂“ im Vergleich zu den Proben „H₂O₂“ nicht ungewöhnlich.

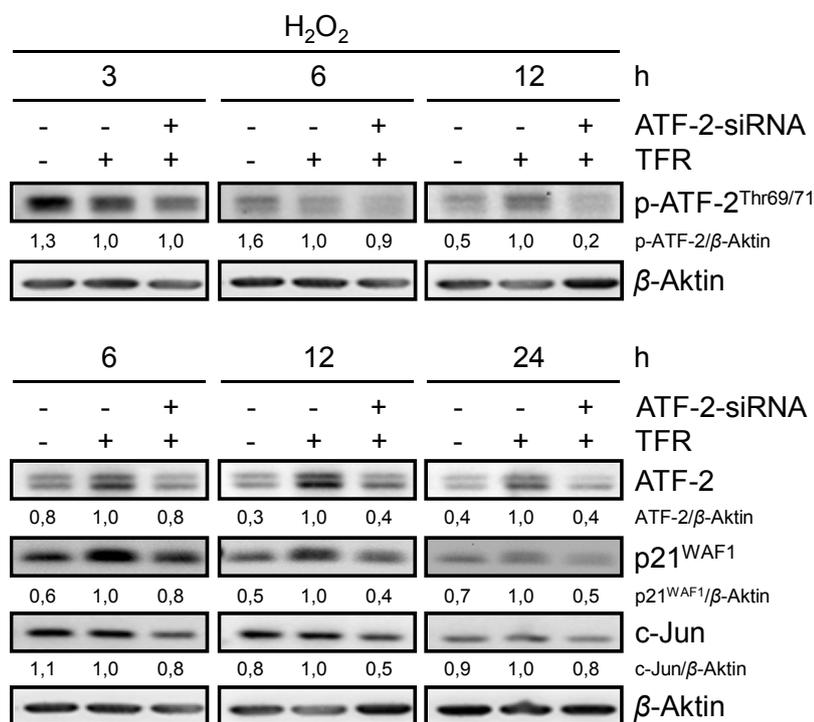


Abb. 36: p-ATF-2^{Thr69/71}-Level und Proteinexpression von ATF-2, p21^{WAF1} und c-Jun 3, 6, 12 und 24 h nach ATF-2-siRNA-Transfektion und H₂O₂-Behandlung in den TE-7-Zellen
 ATF-2-siRNA - ATF-2-siRNA-, H₂O₂ - H₂O₂- (250 μM), TFR - Transfektionsreagenz-Behandlung

3.2.2.4.2 Aktivierung von ATF-2 und c-Jun sowie Expression des p21^{WAF1} nach JNK-Inhibierung

JNK-MAPKs, eine der drei untersuchten MAPKs, spielen nach Stress und DNA-Schäden eine zentrale Rolle in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren ATF-2 und c-Jun (zusammengefasst in Whitmarsh & Davis, 1996). Um zu überprüfen, ob dies und die darauffolgende p21^{WAF1}-Regulation auch in der Karzinomzelllinie TE-7 nach der Behandlung mit H₂O₂ der Fall ist, wurde die Phosphorylierung an den Thr 69 und 71 des ATF-2 und am Ser 73 des c-Jun und die p21^{WAF1}-Proteinexpression nach Inhibierung der JNK-MAPKs durch *Western Blots* kontrolliert.

Die ATP-kompetitive Wirkung des Inhibitors SP600125 auf die JNK-Aktivität (Bennett *et al.*, 2001) führte in TE-7-Zellen zu einer deutlichen Reduzierung der ATF-2-Phosphorylierung und der des c-Jun 1 und 3 h nach der Behandlung mit H₂O₂ (Abb. 37). Es zeigte sich außerdem, dass die Proteinexpression des c-Jun (bei 3 h) und des p21^{WAF1} (bei 6, 12 und 24 h) verringert vorlag.

Damit ist der Beweis erbracht, dass die JNK-MAPKs zumindest teilweise die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren ATF-2 und c-Jun vermitteln und die c-Jun- und p21^{WAF1}-Expression positiv regulieren.

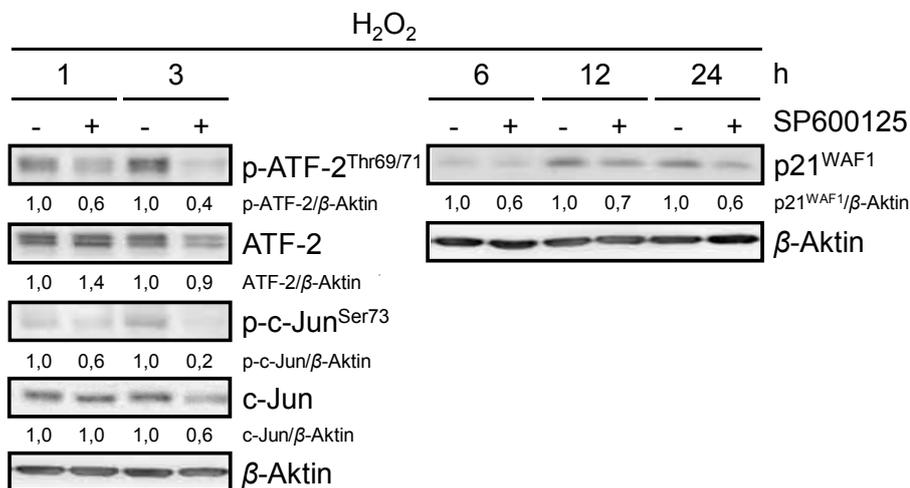


Abb. 37: Expression von ATF-2, c-Jun und p21^{WAF1} sowie Level der aktivierten Formen des ATF-2 und c-Jun 1, 3, 6, 12 und 24 h nach der Inhibierung der JNK-MAPKs und H₂O₂-Behandlung in den TE-7-Zellen
H₂O₂ - H₂O₂- (250 μM), SP600125 - JNK-Inhibitor-Behandlung

3.2.2.4.3 Identifizierung potentieller ATF-2-Bindestellen im p21^{WAF1}-Promotor

Um zu überprüfen, ob eine Regulation des p21^{WAF1} durch die direkte Bindung des p-ATF-2^{Thr69/71} im p21^{WAF1}-Promotor und dies über eine noch nicht notierte ATF-2-Bindestelle erfolgt, wurde die Promotorsequenz des Gens *CDKN1A* (p21^{WAF1}; Genbank NT_007592) dem *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) entnommen und unter Verwendung des Programms *TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding sites* Version 1.3 (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) nach potentiellen ATF-2-Bindestellen durchsucht. Da bekannt ist, dass ATF-2 an CRE-, CRE-BP-, CREB-, AP-1- und CRE-BP/CREB-Sequenzen bindet (Hai *et al.*, 1989; Song *et al.*, 2006; Benbrook & Jones, 1990), wurde nach diesen Sequenzen gesucht. Bereits bekannte Bindestellen wurden mit den folgenden Datenbanken ermittelt:

- 1) UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks>),
- 2) ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>),
- 3) OREGANNO (<http://www.oreganno.org/oreganno/>),
- 4) Transfac[®] (Version 2012.1).

Unter Ausschluss der bekannten Bindestelle, in der Region - 6.877 bis - 5.176 bp vom Transkriptionsstartcodon ATG (Chromosom 6, an der Position 36.651.879) entfernt (Kardassis *et al.*, 1999), wurde ein Sequenzbereich ausgewählt, der eine hohe Anzahl von ATF-2-Bindesequenzen innerhalb eines kurzen Sequenzbereichs enthält, aber als Bindestelle noch nicht bekannt ist. Es wurde eine potentielle Sequenz, - 4.772 bp bis - 4.610 bp vom Transkriptionsstart des *CDKN1A* entfernt, gefunden. Diese enthält zwei CRE-BP/CREB-Bindesequenzen (TGAGGTCA/TGAGGTCA) und eine AP-1-Bindesequenz (GGTGACTCACT). Die Bindekapazität dieses Sequenzbereichs für p-ATF-2^{Thr69/71} wurde mithilfe der CHIP-Methode ermittelt. Hierfür wurden Primer anhand des Programms *Primo Find 3.4* designt, die den Bereich mit der potentiellen ATF-2-Bindestelle eingrenzen. Dieser Bereich konnte folglich am Ende der CHIP mit dem Anti-p-ATF-2^{Thr69/71} *per* semiquantitative PCR unter Verwendung des Primerpaars „DW-p21 prom pp3 F/R“ untersucht werden. Als Negativkontrolle, bei der eine Sequenz außerhalb des p21^{WAF1}-Gens amplifiziert werden sollte, diente das Primerpaar „DW-p21 neg control F/R“.

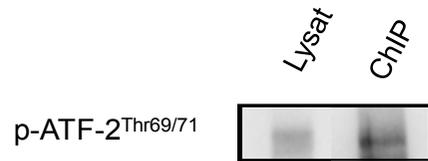
3.2.2.4.4 Nachweis der Bindung des p-ATF-2^{Thr69/71} im p21^{WAF1}-Promotor mittels CHIP

Um die Bindung des ATF-2 an der potentiellen Bindestelle im Promotor des p21^{WAF1}-Gens nachzuweisen, wurde die Methode der CHIP für den Antikörper Anti-p-ATF-2^{Thr69/71} angewandt. Vor den kompletten bis zur PCR durchgeführten CHIP-Experimenten wurde die IP der CHIP-Reaktion anhand von *Western Blots* überprüft. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass p-ATF-2^{Thr69/71} 3 h nach der Behandlung erfolgreich präzipitiert wurde (Abb. 38 A). Während der kompletten CHIP-Reaktion wurde die potentielle ATF-2-Bindestelle im p21^{WAF1}-Promotor mittels semiquantitativer PCR nach der IP untersucht. Als Kontrollen für die IP diente ein Ansatz mit *Rabbit IgG* und einer ohne Antikörper.

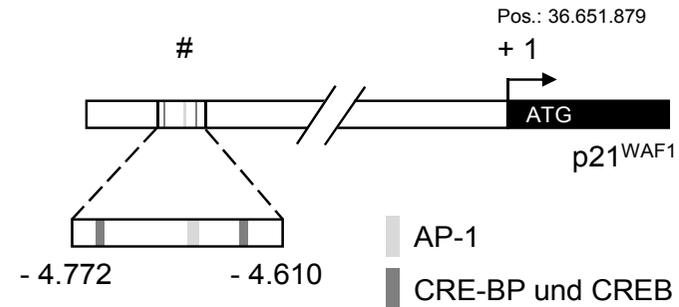
Es konnte für den DNA-Sequenzbereich - 4.772 bp bis - 4.610 bp vom Transkriptionsstart des p21^{WAF1}-Gens entfernt (Abb. 38 B) eine direkte Bindung des p-ATF-2^{Thr69/71} 1 und 3 h nach der H₂O₂-Behandlung festgestellt werden (Abb. 38 C). In der Negativ-Kontrollsequenz außerhalb des p21^{WAF1}-Gens konnte, wie erwartet, keine Bindung des p-ATF-2^{Thr69/71} gefunden werden. Die Funktionalität der PCRs wurde durch PCRs mit der Input-DNA überprüft.

Für das Gen p21^{WAF1} wurde somit eine noch nicht beschriebene ATF-2-Bindestelle entdeckt. Die Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass ATF-2 den Zellzyklus durch Induktion der Expression des p21^{WAF1}-Gens vermutlich durch direkte Bindung in dessen Promotor regulieren kann.

A



B



C

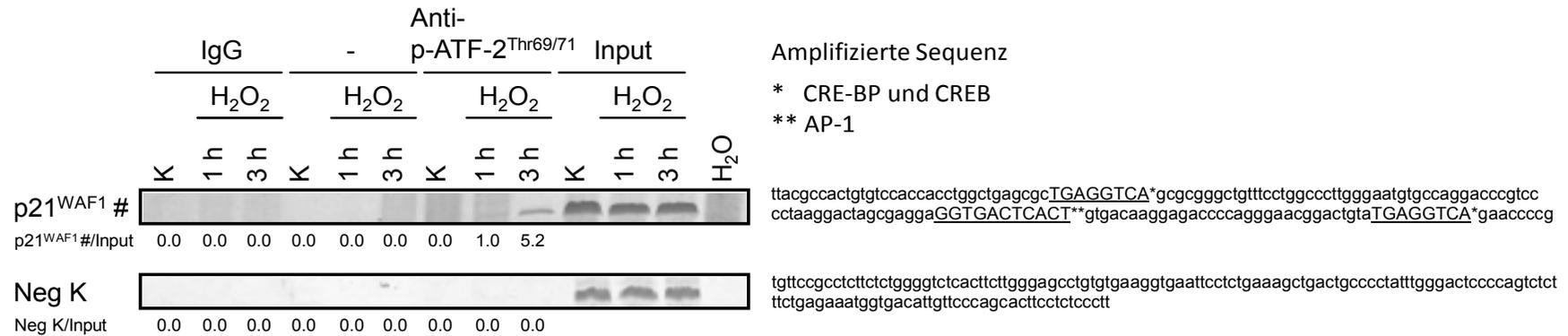


Abb. 38: Anti-p-ATF-2^{Thr69/71}-ChIP mit TE-7-Zellen nach der H₂O₂-Behandlung

(A) Nachweis des p-ATF-2^{Thr69/71} im IP-Lysat im Zuge der ChIP 3 h nach der H₂O₂-Behandlung, (B) Schematische Darstellung des p21^{WAF1}-Promotors mit untersuchter putativer ATF-2-Bindestelle (AP-1-, CRE-BP- und CREB-Sequenzen) relativ zum Transkriptionsstart (+ 1, ATG, auf dem Chromosom 6 an der Position 36.651.879), (C) Bindungsanalyse am p21^{WAF1}-Promotor durch semiquantitative PCR nach der ChIP mit Anti-p-ATF-2^{Thr69/71} 1 und 3 h nach der H₂O₂-Behandlung, H₂O₂ - H₂O₂-Behandlung (250 µM), IgG - *Rabbit IgG*, Input - *Input-DNA*, K - Kontrolle, Neg K - Negativkontrollsequenz-PCR, Pos. - Position

3.3 Allgemeingültigkeitsprüfung des entdeckten Mechanismus

Um zu überprüfen, ob der für H_2O_2 ermittelte Mechanismus ein genereller Mechanismus oxidativen Stresses ist, wurden Untersuchungen mit der oxidativen stressinduzierenden Substanz CDNB an der Karzinomzelllinie TE-7 durchgeführt. Ferner wurde ein Ausblick zu diesem Mechanismus durch Untersuchungen mit H_2O_2 an den eingangs untersuchten Karzinomzelllinien sowie durch Behandlung der Karzinomzelllinien TE-7 mit der ebenfalls oxidativen stressinduzierenden Substanz PQ und OE-33 mit den Substanzen PQ und CDNB gegeben.

3.3.1 CDNB-induzierter oxidativer Stress in der Karzinomzelllinie TE-7

CDNB erhöht das zelluläre ROS-Level durch die Reduktion der antioxidativen Abwehrkapazität und induziert damit oxidativen Stress in den Zellen (Krance *et al.*, 2010). Dabei fungiert es als Substrat für die Glutathion-S-Transferase und führt zur GSH-Verarmung (Plummer *et al.*, 1981), ein potentes System, um H_2O_2 in Wasser umzuwandeln (Reaktion vermittelt durch die Glutathionperoxidase, Chance *et al.*, 1979). Um einen eventuell allgemeingültigen Mechanismus oxidativen Stresses zu ermitteln, wurde das (i) Proliferationsverhalten, (ii) die Induktion von DNA-Schäden, (iii) die Aktivierung und Expression von ATF-2 und die Expression von $\text{p}21^{\text{WAF1}}$, (iv) die Zellzyklusprogression sowie (v) der Einfluss des ATF-2-*Knockdown* auf die Zellzyklusprogression, auf den Zelltod und auf die Caspase-3-Spaltung nach der CDNB-Behandlung untersucht.

3.3.1.1 Proliferationsverhalten

Mit dem kolorimetrischen BrdU-Zellproliferations-ELISA wurde nach der CDNB-Behandlung (150 μM) der TE-7-Zellen ein fast kompletter Verlust des Einbaus von BrdU in die Zellen beobachtet (Abb. 39). Dieses Ergebnis zeigt, dass die behandelten Zellen (CDNB) im Vergleich zur Kontrolle (Ethanol) kaum noch proliferieren.

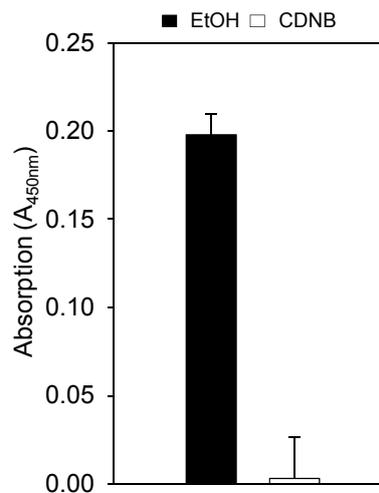


Abb. 39: Zellproliferationsverhalten der TE-7-Zellen 24 h nach der CDNB-Behandlung
CDNB - CDNB- (150 µM), EtOH - Ethanol-Behandlung

3.3.1.2 DNA-Schäden, p-ATF-2^{Thr69/71}-Level, ATF-2- und p21^{WAF1}-Expression

Western-Blot-Analysen zur Expression des DNA-Schadensensors γ -H2AX zeigten, dass die CDNB-Behandlung eine Akkumulation dieser Proteinmodifikation und des Gesamthistons erzeugt (Abb. 40). Die verstärkte γ -H2AX-Bildung weist auf induzierte DNA-Schäden hin. Entsprechend dieser Schadensantwort wurde wie schon bei der H₂O₂-Behandlung auch das ATF-2-Protein angereichert und aktiviert (p-ATF-2^{Thr69/71}). Ebenso konnte eine Akkumulation des p21^{WAF1} beobachtet werden. Damit ist p21^{WAF1} auch nach dieser Behandlung fähig einen Zellzyklusarrest zu vermitteln.

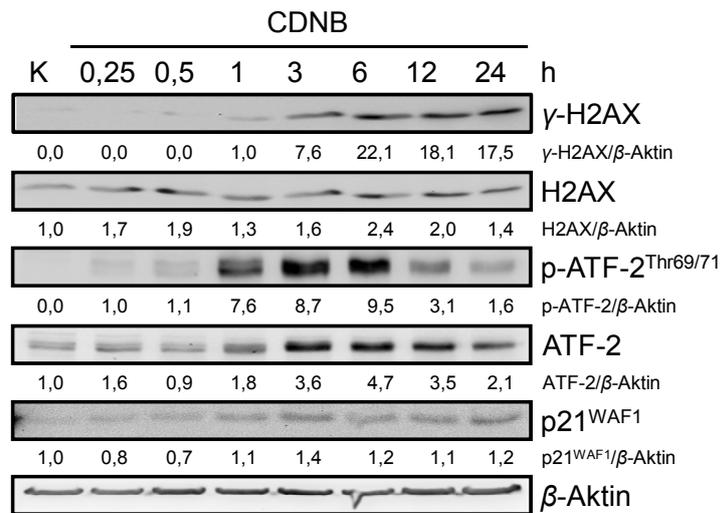


Abb. 40: γ -H2AX- und p-ATF-2^{Thr69/71}-Level und Expression von H2AX, ATF-2 und p21^{WAF1} in TE-7-Zellen nach CDNB-Behandlung (24-h-Kinetik)
CDNB - CDNB-Behandlung (150 μ M), K - Kontrolle (Ethanol)

3.3.1.3 Einfluss des ATF-2-Knockdown auf die Zellzyklusprogression

Mittels PI-Färbung der TE-7-Zellen konnte gezeigt werden, dass CDNB neben der Reduktion der Proliferation und der p21^{WAF1}-Expressionsinduktion einen 1,48-fachen G2/M-Arrest (+ 17,86 % Zellen) bei gleichzeitiger Reduktion der G1- und S-Zellpopulationen sowie einen Anstieg der Sub-G1 (Apoptose)-Zellpopulation (+ 1,5 % Zellen, 4,75-fach) auslöste (TFR + CDNB; Abb. 41). Der ATF-2-Knockdown (TFR + ATF-2-siRNA + CDNB) führte ebenfalls zur teilweisen Reduktion des CDNB-induzierten G2/M-Arrests (- 4,28 % Zellen, entspricht einer 24 %igen Reduktion des G2/M-Arrests; Abb. 41). Ferner wurde nach dem *Knockdown* deutlich, dass sich die Zellen leicht in der S-Phase (+ 1,82 % Zellen) ansammelten und ein Anstieg der Sub-G1-Population (+ 2,14 % Zellen) ausgelöst wurde. ATF-2 vermittelt demzufolge teilweise den G2/M-Arrest in der CDNB-Antwort der TE-7-Zellen.

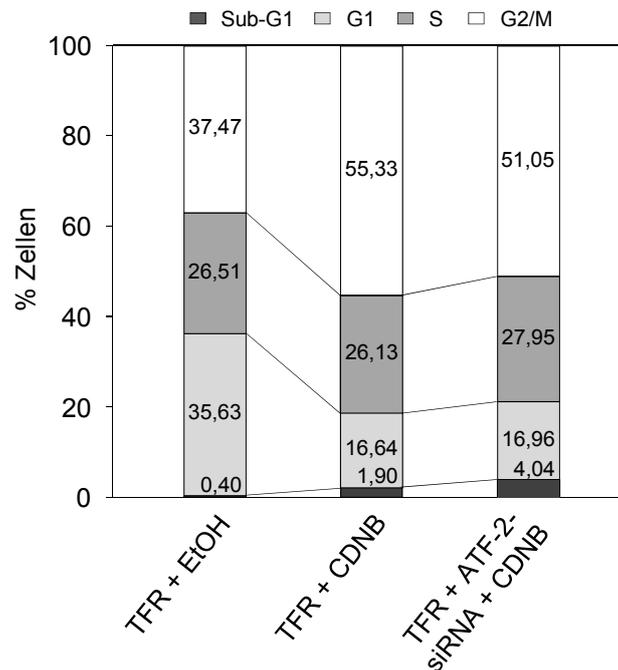


Abb. 41: Beeinflussung der Zellzahl in den Zellzyklusphasen der Karzinomzelllinie TE-7 24 h nach ATF-2-si-RNA-Transfektion und CDNB-Behandlung
ATF-2-siRNA - ATF-2-siRNA-, CDNB - CDNB- (150 μ M), EtOH - Ethanol-, TFR - Transfektionsreagenz-Behandlung; G2/M, S, G1 – Zellzyklusphasen; Sub-G1 - Apoptose

3.3.1.4 Einfluss des ATF-2-Knockdown auf den Zelltod

Um die Folgen eines ATF-2-Knockdown auf den CDNB-induzierten Zelltod zu untersuchen, wurden der *Annexin-V-FLUOS Staining Kit* verwendet und die Caspase-3-Spaltung im *Western Blot* nach der siRNA-Transfektion und anschließender CDNB-Behandlung analysiert.

3.3.1.4.1 Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen

Es konnte in den mit den ATF-2-siRNAs-transfizierten Karzinomzellen (TFR + ATF-2-siRNA + CDNB) eine 1,87-fache Apoptose im Vergleich zu den Kontrollzellen (TFR + CDNB) festgestellt werden (Abb. 42). Ferner konnte eine 1,26-fache Nekrose beobachtet werden. Diese Ergebnisse scheinen ein Resultat des Überschreitens der G2/M-Checkpoints zu sein, womit auch bei dieser Behandlung durch den ATF-2-Knockdown ein Umschalten vom Zellzyklusarrest zum Zelltod erreicht und somit ein genereller

Mechanismus oxidativen Stresses in TE-7 nachgewiesen wurde. Die Behandlung der TE-7-Zellen mit CDNB (TFR + CDNB) im Vergleich zur Ethanolbehandlung (TFR + EtOH) zeigte ebenfalls eine leichte Erhöhung von Apoptose und Nekrose.

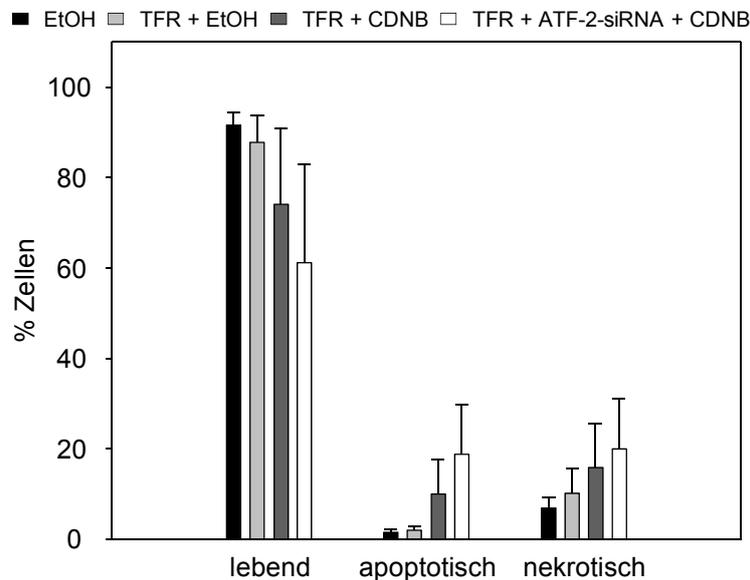


Abb. 42: Lebende, apoptotische und nekrotische Zellpopulationen der Karzinomzelllinie TE-7 24 h nach ATF-2-siRNA-Transfektion und CDNB-Behandlung
ATF-2-siRNA - ATF-2-siRNA-, CDNB - CDNB- (150 μ M), EtOH - Ethanol-, TFR - Transfektionsreagenz-Behandlung

3.3.1.4.2 Caspase-3-Spaltung – Caspase-3-abhängige Apoptoseinduktion

Die Aktivierung der Caspase 3 war 12 und 24 h nach dem *Knockdown* und anschließender CDNB-Behandlung (TFR + ATF-2-siRNA + CDNB) im Vergleich zur Kontrolle (TFR + CDNB) verstärkt (Abb. 43). Festgestellt wurde ein 3,5- und 3,0-facher Anstieg der Caspasespaltung. Folglich inhibiert ATF-2, wie schon in der H₂O₂-Antwort, die Aktivierung der Caspase 3 in der CDNB-Antwort.

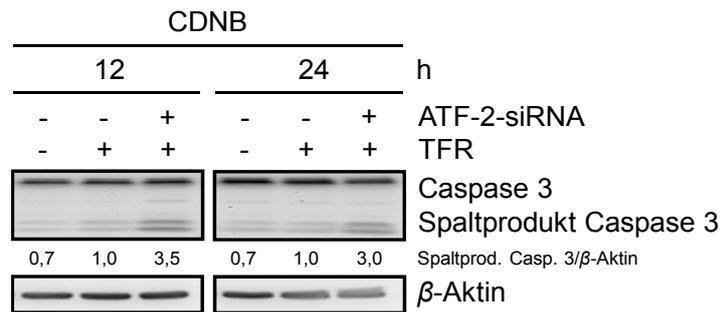


Abb. 43: Caspase-3-Spaltung 12 und 24 h nach ATF-2-si-RNA-Transfektion und CDNB-Behandlung in TE-7-Zellen
ATF-2-siRNA - ATF-2-siRNA-, CDNB - CDNB- (150 μ M), TFR - Transfektionsreagenz-Behandlung

3.3.2 Ausblick

3.3.2.1 Aktivierung und Expression von ATF-2 und p21^{WAF1}-Level nach H₂O₂-Behandlung in den Karzinomzelllinien OE-33, SEG-1 und BIC-1

Zur Klärung, ob die Aktivierung und Expressionsinduktion des ATF-2 und des p21^{WAF1} ein genereller Mechanismus des H₂O₂-induzierten Stresses ist, wurde die Expression und Aktivierung dieser Proteine *per Western Blots* in den eingangs untersuchten Karzinomzelllinien OE-33, SEG-1 und BIC-1 überprüft.

In der Tat wurde sowohl eine verstärkte Expression von ATF-2 als auch dessen Aktivierung durch Phosphorylierung an den Thr 69 und 71 in den Karzinomzelllinien OE-33, SEG-1 und BIC-1 nach der Behandlung nachgewiesen (Abb. 44). Das Protein p21^{WAF1} reicherte sich ebenfalls an. Diese Ergebnisse weisen auf eine allgemeingültige Aktivierung von ATF-2 und Akkumulation von ATF-2 und p21^{WAF1} in der H₂O₂-Antwort hin.

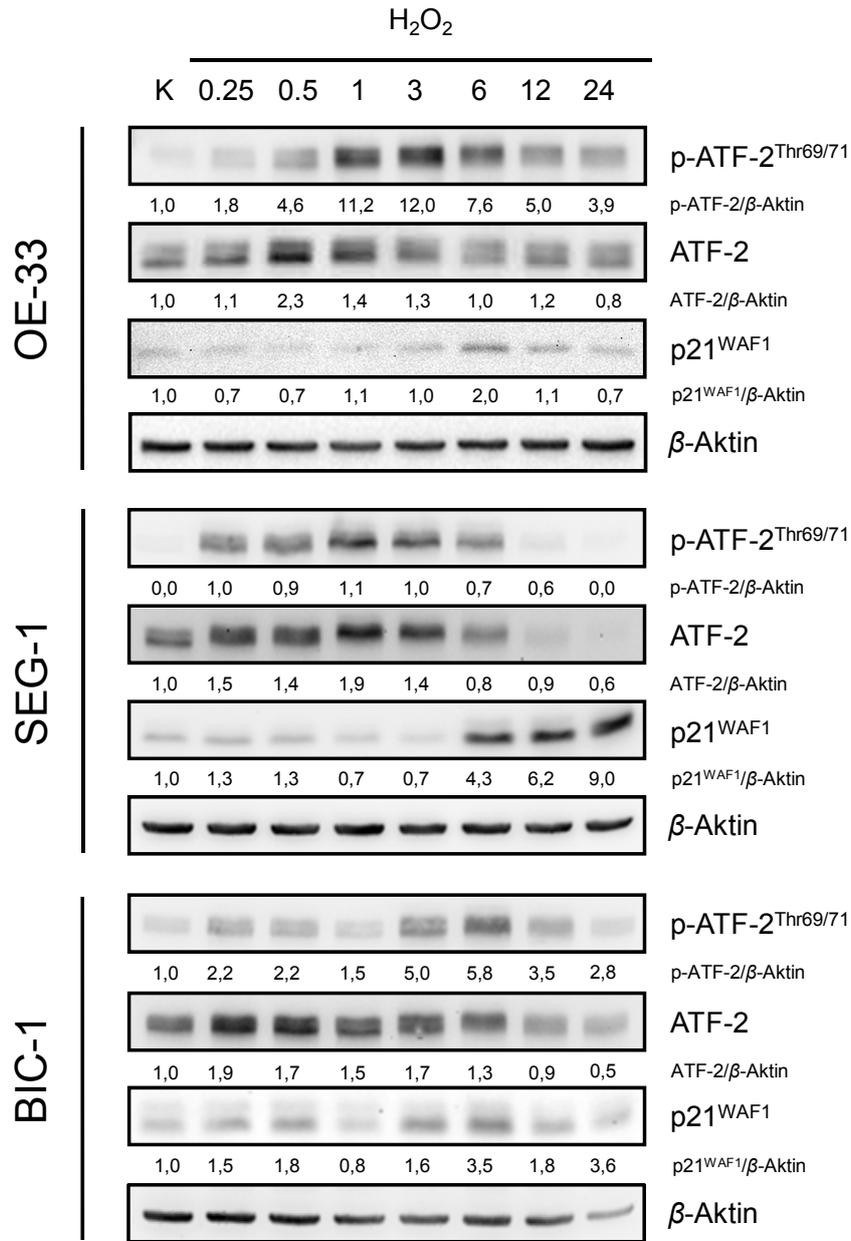


Abb. 44: Aktivierung und Expression von ATF-2 und p21^{WAF1}-Level in den Karzinomzelllinien OE-33, SEG-1 und BIC-1 nach H₂O₂-Behandlung (24-h-Kinetik)
H₂O₂ - H₂O₂-Behandlung (250 μ M), K - Kontrolle

3.3.2.2 Aktivierung und Expression von ATF-2 und p21^{WAF1}-Level nach Behandlung mit PQ bzw. CDNB in TE-7 und OE-33

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem ermittelten Mechanismus der Aktivierung und Expressionsinduktion des ATF-2 und p21^{WAF1} um einen generellen Mechanismus oxidativen Stresses handelt, wurden weiterhin andere oxidative stressinduzierende Substanzen an den Karzinomzelllinien TE-7 und OE-33 getestet und die Expression und Aktivierung von ATF-2 und das p21^{WAF1}-Level durch *Western Blots* überprüft. PQ ist ein lipophiles Dikation (PQ²⁺), welches in der Zelle zum Monoradikalkation PQ⁺• reduziert wird. In dieser Form reagiert es mit O₂ und dabei wird O₂^{•-} gebildet, welches anschließend zu H₂O₂ konvertiert wird (zusammengefasst in Castello *et al.*, 2007; Bus & Gibson, 1984). Über diesen Mechanismus induziert es oxidativen Stress.

PQ induzierte in TE-7 offenbar keine DNA-Schäden, die durch γ -H2AX markiert wurden (Abb. 45). In der Zelllinie OE-33 wurde eine leichte γ -H2AX-Anreicherung und somit die Induktion von DNA-Schäden deutlich. In beiden Karzinomzelllinien konnten nach der Behandlung eine Aktivierung und Akkumulation des ATF-2 und Induktion des p21^{WAF1} festgestellt werden.

Die Behandlung der Zelllinie OE-33 mit CDNB erzeugte eine γ -H2AX-Induktion. Damit wurden nach dieser Behandlung DNA-Schäden nachgewiesen. Außerdem wurde die Aktivierung und Akkumulation des ATF-2 und eine p21^{WAF1}-Anreicherung gefunden.

Zusammenfassend konnte ein genereller Mechanismus der oxidativen Stressantwort bezüglich der Akkumulation von ATF-2 und p21^{WAF1} und der Aktivierung von ATF-2 gezeigt werden.

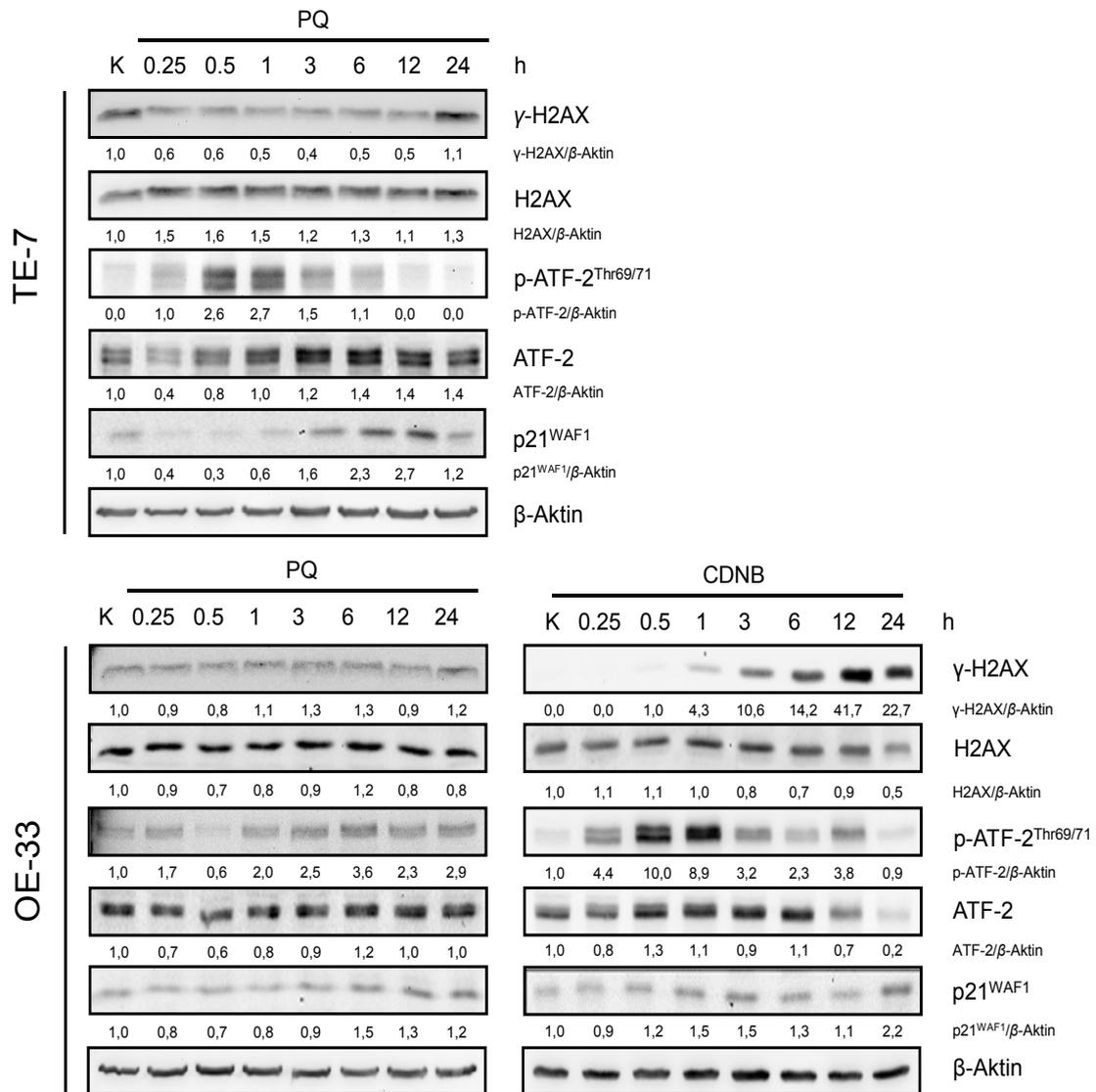


Abb. 45: Aktivierung und Expression von ATF-2 sowie p21^{WAF1}-, γ- und H2AX-Level in den Karzinomzelllinien TE-7 und OE-33 nach PQ- bzw. CDNB-Behandlung (24-h-Kinetik)
 CDNB - CDNB-Behandlung (150 μM), K - Kontrolle (Ethanol für CDNB-Behandlung), PQ - PQ-Behandlung (100 μM)

4 Diskussion

4.1 Reaktionen der untersuchten Karzinomzellen unterschiedlichen Gewebsursprungs auf H₂O₂

4.1.1 Zelltodresistenz

Kenntnisse über molekulare Mechanismen, die zur Zelltodresistenz in Tumorzellen führen, sind von enormer therapeutischer Bedeutung. Mit diesem Wissen ist es möglich neue effektivere Therapieansätze zu entwickeln. Die Zelltodresistenz liegt beispielsweise in defekten Zelltodsignalwegen (Apoptose- oder alternative) begründet. Hierbei spielt das p53-Protein eine bedeutende Rolle (Igney & Krammer, 2002; de Bruin & Medema, 2008; Montero *et al.*, 2013).

Die Fehlregulation und Inaktivierung des p53 wurde mehrfach mit dem Misserfolg von Krebstherapien in Verbindung gebracht (Velculescu & El-Deiry, 1996; Varna *et al.*, 2011). Es ist in etwa der Hälfte der Tumore inaktiviert (zusammengefasst in Suzuki & Matsubara, 2011), was erstmals 1984 entdeckt wurde (zusammengefasst in Vogelstein *et al.*, 2010). Verantwortlich dafür sind p53-Genmutationen, Proteininaktivierung oder die Degeneration von p53-*upstream*- und -*downstream*-Signalwegen in Karzinomzellen mit Wildtyp (WT)-p53-Gen (zusammengefasst in Junttila & Evan, 2009). *TP53*-Mutationen befinden sich meist in der DNA-Bindedomäne, was mit dem Verlust der Transkriptionsfaktoraktivität des p53 einhergehen kann (Kato *et al.*, 2003). Überdies wurde die anormale Expression des p53 in verschiedenen Tumorentitäten beschrieben (zusammengefasst in Khoury & Bourdon, 2011). Folglich kann es zum fehlenden oder mangelnden Auslösen des Zelltods bei nicht reparierten DNA-Schäden kommen. Daher werden Tumorantworten auf zellulären Stress im Zuge einer Therapie oftmals auf den *TP53*-Status und die p53-Expression zurückgeführt (Zhang *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2012a; Kandioler-Eckersberger *et al.*, 2000). Da p53 auch die Zellzyklusprogression reguliert, kann auch das mangelnde Auslösen von Zellzyklusarresten mit dem *TP53*-Status und der p53-Expression in Verbindung gebracht werden (O'Connor *et al.*, 1997; <http://www.med.miami.edu/mnbws/x64.xml>, Stand: 14.07.2013). Mit diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Studie sowohl das differentielle Zellzyklusprogressionsverhalten als auch die unterschiedlichen Zelltodantworten der Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1 auf die Behandlung mit H₂O₂ (Therapienachahmung) mithilfe des *TP53*-Status und der p53-Expression erklärt.

Karzinomzellen, die zelltodresistent sind und einen Zellzyklusarrest zeigen, sind von besonderem Interesse, da ein Umschalten vom Zellzyklusarrest zum Zelltod durch Inhibierung zellzyklusarrestinduzierender Proteine möglich ist (siehe Abb. 7 B, C; Chen *et al.*, 2012b). Daher verfolgte die vorliegende Arbeit das Ziel, eine Karzinomzelllinie aus vier auszuwählen, die nach oxidativem Stress durch H_2O_2 die erwähnten Eigenschaften zeigt, wobei die Erzeugung von DNA-Schäden durch H_2O_2 die Voraussetzung der Induktion von Zellzyklusarresten und Zelltod war.

4.1.2 Induktion von DNA-Schäden

H_2O_2 erzeugte vermutlich durch die Bildung des hochreaktiven Hydroxylradikals über die Fenton-Reaktion (Henle & Linn, 1997) verschiedene DNA-Schäden in den untersuchten Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1 der vorliegenden Studie. Durch den Nachweis der Histonmodifikation γ -H2AX nach der Behandlung kommen SSBs, DSBs, Replikationsstress und DNA-Fragmentierung als mögliche Formen der DNA-Schädigung in Frage. Ferner ist eine potentielle Beteiligung der *upstream*-Kinasen ATM, ATR, DNA-PK wie auch JNK an der γ -H2AX-Phosphorylierung in Betracht zu ziehen. ATM kann H2AX nach DSBs und im Zuge der Apoptoseauslösung (Burma *et al.*, 2001; de Feraudy *et al.*, 2010) und ATR nach SSBs und Replikationsstress phosphorylieren (Ward & Chen, 2001; Ward *et al.*, 2004). DNA-PKs und JNK phosphorylieren H2AX im Zuge der Apoptose (Mukherjee *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006). Das in den hier untersuchten Karzinomzelllinien gebildete γ -H2AX kann folglich einen Beitrag zur DNA-Reparatur leisten, z. B. durch die Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen an die geschädigte DNA sowie durch Vermittlung der ATM-Signalkaskade. Als Konsequenz der ATM-Signalkaskade können Zellzyklus-*Checkpoints* beispielsweise über das Protein p53 angeschaltet werden (zusammengefasst in Poehlmann & Roessner, 2010; Podhorecka *et al.*, 2010). Das p53 nimmt in der DNA-Schadensantwort eine Schlüsselrolle ein, indem es die Genomintegrität wahrt (Albrechtsen *et al.*, 1999). Es kann abhängig vom Ausmaß und der Dauer des Schadens den Zellzyklus stoppen oder den Zelltod auslösen (Li *et al.*, 2010b). Daher steht es am Scheideweg zwischen Überleben und Zelltod und kann, wie auch für die vorliegende Arbeit, der Erklärung von Zellantworten dienen.

4.1.3 *TP53*-Stati und p53-Expression

Die Untersuchungen der vorliegenden Dissertationsschrift zur Expression des p53 in den unbehandelten Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1 zeigten, wie für Karzinomzelllinien unterschiedlichen Gewebeursprungs und *TP53*-Stati erwartet, unterschiedliche p53-Expressionslevel. Dies beruht vermutlich auf den unterschiedlichen Halbwertszeiten des jeweiligen p53-Proteins.

Das geringfügig nachweisbare p53 der Karzinomzelllinie SEG-1 ist auf den WT-Status zurückzuführen, da das WT-Protein eine geringe Halbwertszeit besitzt. Hierbei spielt die E3-Ubiquitinproteinligase Mdm2 eine Rolle, indem sie p53 ubiquitinyliert und dies folglich zur ubiquitin-/proteasomabhängigen Degradation führt (zusammengefasst in Brooks & Gu, 2006). Die Mdm2-Expression wiederum ist von p53 abhängig, womit ein autoregulatorischer *feedback loop* vorliegt und somit das p53-Protein unter normalen Bedingungen in geringem Maße vorhanden ist (zusammengefasst in Moll & Petrenko, 2003).

In TE-7 konnte kein p53-Protein detektiert werden, was die Ergebnisse von Barnas *et al.* bestätigt (Barnas *et al.*, 1997). Sie beschrieben eine *TP53*-mRNA-Repression. Dieser Mechanismus führte dazu, dass das p53-Protein trotz WT-Status nicht exprimiert und detektiert werden konnte.

In den Karzinomzelllinien OE-33 und BIC-1 der vorliegenden Studie wurde typischerweise eine Akkumulation des mutierten p53-Proteins beobachtet. Das mutierte p53-Protein kann Mdm2 nicht mehr induzieren (Wang *et al.*, 2009). Dementsprechend akkumuliert es aufgrund seiner erhöhten Halbwertszeit (Varna *et al.*, 2011).

Die H₂O₂-Behandlung hatte sowohl induzierende als auch reprimierende Effekte auf die Expression des p53 in den hier untersuchten Karzinomzelllinien. Dennoch ist vermutlich nur die Induktion des p53-Proteins in der Karzinomzelllinie SEG-1 von Bedeutung, da hier der *TP53*-WT-Status vorliegt und daher das vorhandene p53 seine Funktion ausüben kann. Die Anreicherung des Proteins in dieser Karzinomzelllinie kann ein Resultat des Anstiegs der Proteininstabilität durch Acetylierung oder Phosphorylierung oder der Induktion der Expression sein (Bruno *et al.*, 2006; Takaoka *et al.*, 2003). Durch Phosphorylierungen und Acetylierungen des p53 nach Stress wird die Mdm2-vermittelte Degradation des p53 blockiert (Shieh *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2002). Dies führt zur p53-Stabilisierung und -Anreicherung und damit zur Funktionsaktivierung dessen (zusammengefasst in Wahl & Carr, 2001; Loughery, 2013). Folglich kann p53 in SEG-1 seine Funktionen in der Zellzyklus- und Zelltodregulation ausüben.

4.1.4 p53-abhängige oder -unabhängige Zellzyklusarreste

Zellzyklusarreste können p53-abhängig vermittelt sein. Daher wurde der *TP53*-Status zur Erklärung der H₂O₂-induzierten differentiellen Zellzyklusprofile der Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1 dieser Arbeit herangezogen.

Alle untersuchten Karzinomzelllinien zeigten nach der Behandlung keinen Anstieg der G1-Population, daher ist davon auszugehen, dass diese, wie die meisten Karzinomzellen, einen defekten G1-*Checkpoint* aufweisen (Sherr, 1996; Massagué, 2004). Sie sind somit auf aktive S- und G2-*Checkpoints* angewiesen, was einen möglichen Angriff von Inhibitoren an diesen indiziert (Grundlage des Modells Abb. 7). Tatsächlich waren die Karzinomzelllinien TE-7, SEG-1 und BIC-1 durch einen S- und/oder G2/M-Arrest gekennzeichnet (Abb. 46). Da in der Karzinomzelllinie SEG-1 WT-p53 vorliegt, kann der G2/M-Arrest p53-abhängig sein. Beim p53-abhängigen Zellzyklusarrest kommt es durch Mechanismen wie der Aktivierung von Zellzyklusinhibitoren (z. B. p21^{WAF1} und GADD45) und der Inhibierung der Expression von Cdk1 und Zyklin B1 zum Zellzyklusarrest (He *et al.*, 2005; Kastan *et al.*, 1992; Azzam *et al.*, 1997; Innocente *et al.*, 1999). In TE-7 und BIC-1 ist p53 nicht exprimiert (TE-7, Barnas *et al.*, 1997) oder durch *loss of function* (LOF)-Mutation inaktiviert (BIC-1, Mahidhara *et al.*, 2005), damit sind die in diesen Karzinomzelllinien beobachteten S- und G2/M-Arreste der vorliegenden Studie p53-unabhängig. Die p53-unabhängigen Zellzyklusarreste können beispielsweise durch die *Checkpoint*-Aktivatoren Chk1/2 oder den Cdk-Inhibitor p21^{WAF1} ausgelöst werden. OE-33 zeigte keine Zellzyklusarreste, was auf den Verlust der Funktion des p53-Proteins (LOF-Mutation, Barnas *et al.*, 1997) zurückzuführen sein kann. Mutiertes p53 ist fähig, mit *Mre11 meiotic recombination 11 homolog* (*S. cerevisiae*, Mre11) zu interagieren, was zur Inaktivierung der Mre11/ATM-abhängigen DNA-Schadensantwort und damit zur fehlenden Induktion von Zellzyklusarresten führt (Liu *et al.*, 2010). Im Falle OE-33 ist zu vermuten, dass andere p53-unabhängige Mechanismen der Zellzyklusarrestinduktion, die in den anderen hier untersuchten p53-defizienten Karzinomzelllinien zum Tragen kamen, ebenfalls nicht wirken.

4.1.5 p53-abhängiger oder -unabhängiger Zelltod

Der Zelltod kann, wie auch der Zellzyklusarrest, p53-abhängig sein. Daher wurde p53 zur Erklärung der unterschiedlichen Zelltodantworten der untersuchten Karzinomzelllinien der vorliegenden Arbeit herangezogen. Aufgrund des *TP53*-Status konnte abgeleitet werden, dass der Zelltod der Karzinomzelllinie SEG-1 p53-abhängig erfolgen kann (Abb. 46). Die p53-abhängige Apoptose wird z. B. über die Transaktivierung von proapoptotischen Molekülen (wie BAX und Puma; Miyashita *et al.*, 1994; Nakano & Vousden, 2001), Herabregulation der Transkription von Bcl-2 (Wu *et al.*, 2001), und die Interaktion mit bcl-xL- und Bcl-2-Proteinen (zusammengefasst in Vaseva & Moll, 2009), um die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran auszulösen, vermittelt. Die Nekrose kann ebenfalls p53-abhängig sein, indem p53 in der mitochondrialen Matrix akkumuliert und die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-pore veranlasst (Vaseva *et al.*, 2012). Die hier untersuchten Karzinomzelllinien TE-7, OE-33 und BIC-1 verfolgten p53-unabhängige Zelltodmechanismen (Abb. 46). P53-unabhängige Apoptosemechanismen können beispielsweise die Aktivierung der Caspasen 2 und 9 sein (Yamakawa *et al.*, 2008; Manzl *et al.*, 2009). Ferner könnten die p53-Familienmitglieder *tumor protein p73* (p73) und *tumor protein p63* (p63) oder das Protein Puma als Mediatoren der Apoptose agieren (zusammengefasst in Ozaki & Nakagawara, 2011a; Yu & Zhang, 2003). P53-unabhängige Nekrose unter Beteiligung von RIP und *poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP) wurden durch Boamah *et al.* und Hur *et al.* beschrieben (Boamah *et al.*, 2007; Hur *et al.*, 2006). Bei allen Karzinomzelllinien der vorliegenden Dissertationsschrift spielte der Zelltod über die Caspase-3-Aktivierung eine Rolle, wobei diese in TE-7, OE-33 und BIC-1 p53-unabhängig und in SEG-1 vermutlich p53-abhängig aktiviert wurde.

Die Karzinomzelllinie TE-7 zeigte mit 10,56 % die geringste Zelltodrate nach der Behandlung (Abb. 46). Diese kann auf das unter normalen und gestressten Bedingungen transkriptionell reprimierte p53 zurückgeführt werden. Die mRNA-Repression stellt einen Mechanismus von Karzinomzellen dar, um das p53 zu inaktivieren. Dies führt dazu, dass das WT-Protein nicht mehr detektiert wird, auch nicht nach DNA-Schäden (Barnas *et al.*, 1997). Aus diesem Grunde kann kein p53-abhängiger Zelltod mehr ausgelöst werden. Für TE-7 wurde eine solche geringe apoptotische Antwort (Apoptoseresistenz) bereits beschrieben (Chang *et al.*, 2010). Weiterhin konnte durch die hier gezeigte sinkende Zelltodrate der TE-7-Zellen bei 48 h nachgewiesen werden, dass die Zellen sich zu erholen scheinen, was aus therapeutischer Sicht ein nicht er-

wünschtes Ergebnis ist und zum Überleben der nicht in den Zelltod geführten Zellen beitragen kann.

Die ebenfalls geringe Sensitivität der Karzinomzelllinie OE-33 (17,55 % Zelltoddifferenz zur Kontrolle, Abb. 46) könnte aufgrund des Funktionsverlusts (LOF, Mutation in der DNA-Bindedomäne) des p53 entstanden sein, da das Protein somit nicht mehr fähig ist, seine zelltodfördernde Funktion auszuüben. Die Inaktivierung des p53 durch LOF-Mutation und mRNA-Repression in den Karzinomzelllinien OE-33 und TE-7 könnte eine Überlebensstrategie dieser Karzinomzelllinien sein, dem ROS-induzierten Zelltod durch Säure- und eventuell Rauchexposition im Ösophagus zu entgehen (Robert *et al.*, 2000). Die geringere Zelltodrate (Resistenz) der beiden ösophagealen Karzinomzelllinien TE-7 und OE-33 im Vergleich zu den Karzinomzelllinien der Lunge (SEG-1) und des Kolons (BIC-1) stützen die Befunde, dass der hochmaligne ösophageale Krebs in verschiedenen Studien apoptoseresistent ist (D'Amico & Harpole, 2000; Hu *et al.*, 2007; Yoshioka *et al.*, 2008; Hamano *et al.*, 2011), womit diese Karzinomzelllinien hervorragende *in-vitro*-Modelle für diese Krankheit darstellen.

Die p53-WT-Karzinomzelllinie SEG-1 reagierte deutlich sensitiver auf die H₂O₂-Zugabe (30,4 % Zelltoddifferenz zur Kontrolle) als TE-7 und OE-33 (Abb. 46), was dem noch funktionellen p53 zugeschrieben werden kann, welches sich durch H₂O₂-Stress anreicherte. Die beobachtete höhere Zelltodrate könnte auch ein Resultat der erhöhten ROS-Produktion infolge der p53-Aktivierung sein, wie von Johnson *et al.* beschrieben (Johnson *et al.*, 1996). Dies bedeutet, wenn p53 nicht verändert vorliegt, reagieren die Zellen mit einer stärkeren Zelltodantwort.

Bemerkenswert ist auch die hier gezeigte Antwort der Karzinomzelllinie BIC-1, die trotz LOF-Mutationen im *TP53* (in der DNA-Bindedomäne und in der Nähe der *nuclear localization signal* (NLS)-Region; Mahidhara *et al.*, 2005) eine beachtliche Zelltodantwort vollzieht. Dies scheint demzufolge ein p53-unabhängiger Mechanismus zu sein (Abb. 46).

TP53-Mutationen können mit einer guten oder schlechten Prognose assoziiert sein oder auch keinen prognostischen Wert haben, was wiederum von der Tumorentität und der Therapieart abhängig ist (zusammengefasst in Bertheau *et al.*, 2008). Es wurde festgestellt, dass das mutierte p53 mit einer Chemoresistenz verbunden ist (Lowe *et al.*, 1994; O'Connor *et al.*, 1997; Blandino *et al.*, 1999; Ozaki & Nakagawara, 2011b).

Diskussion

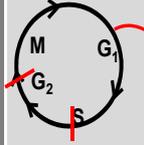
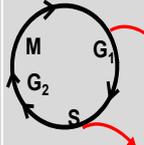
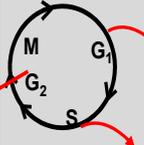
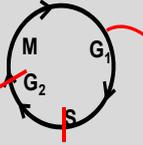
Zellline	TE-7	OE-33	SEG-1	BIC-1
Merkmal				
TP53-Status	WT Repression ^① p53-Inaktivierung	LOF - Mutation ^② p53-Inaktivierung	WT ^③	LOF- Mutationen ^④ p53-Inaktivierung
Zellzyklusprofil	 1,49-fach S 1,44-fach G2 p53-unabhängig	 - S - G2/M p53-unabhängig	 - S 2,64-fach G2/M (p53-abhängig)	 1,44-fach S 1,95-fach G2/M p53-unabhängig
Zelltod				
%-Differenz zur Kontrolle	10,56	17,55	30,4	35,4
	p53-unabhängig	p53-unabhängig	(p53-abhängig)	p53-unabhängig

Abb. 46: Induktion unterschiedlicher Zellzyklusprogressions- und Zelltodantworten der Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1 gegenüber der H₂O₂-Behandlung (250 µM) in Abhängigkeit vom TP53-Status

^① transkriptionelle Repression (Barnas *et al.*, 1997)

^② im Exon 5: Codon 135 (DNA-Bindedomäne): TGC → TAC, Cys → Tyr (Fichter *et al.*, 2011)

^③ (Mahidhara *et al.*, 2005)

^④ im Exon 8: Codon 273 (DNA-Bindedomäne): CGT → AGT, Arg → Ser
Codon 309 (Nähe zur NLS Signalregion): CCC → TCC, Pro → Ser (Mahidhara *et al.*, 2005)

A - Adenin, Arg - Arginin, C - Cytosin, Cys - Cystein, G - Guanin, LOF - *loss of function*, NLS - *nuclear localization signal*, Pro - Prolin, Ser - Serin, T - Thymin, Tyr - Tyrosin, WT – Wildtyp; G2, M, S, G1 - Zellzyklusphasen

Der prognostische Wert der *TP53*-Aberration wurde z. B. für Brustkrebs und Ovarialkarzinome gefunden (zusammengefasst in Bertheau *et al.*, 2008; Buttitta *et al.*, 1997). Weiterhin ist die prognostische Signifikanz der *TP53*-Mutation abhängig von der Lokalisation der Mutation (zusammengefasst in Soussi, 2007; Bertheau *et al.*, 2008). Zum Beispiel zeigte eine Studie, dass Patienten mit *TP53*-Mutationen, welche die zinkbindende Domäne betrafen, eine schlechte Prognose hatten (zusammengefasst in Børresen-Dale, 2003). In der vorliegenden Studie, in der eine einheitliche Behandlung verwendet wurde, könnte der *TP53*-Status in den untersuchten Karzinomzelllinien TE-7, OE-33 und SEG-1 einen Einfluss auf die Zelltodrate haben. Hierbei ist vermutlich ein funktionelles p53 gleichbedeutend mit einer guten Prognose (SEG-1). OE-33 mit einer *TP53*-Mutation in der DNA-Bindedomäne zeigte eine schlechte Zelltodantwort, was dem Bericht von Geisler *et al.* entspricht (Geisler *et al.*, 2001). Hierbei wurde ebenfalls eine schlechte Antwort auf Doxorubicin von Tumoren mit *TP53*-Mutationen in der DNA-Bindedomäne gefunden. Die vorliegenden Ergebnisse aus BIC-1 jedoch sind ein Beleg für die gute Prognose bei nichtfunktionellem p53, was den Studien, in denen Mutationen in der DNA-bindenden Domäne des p53 mit Doxorubicinresistenz assoziiert wurden (Geisler *et al.*, 2001), entgegensteht und die Studien von Bertheau *et al.* und Bataille *et al.* unterstützt (Bertheau *et al.*, 2007; Bertheau *et al.*, 2002; Bataille *et al.*, 2003).

Zu bemerken ist dennoch, dass *TP53*-Status und p53-Expression keine vollständige Erklärung des Zelltodverhaltens sind, sondern eher ein Versuch. Zwei Dekaden intensiver Forschung auf dem Feld der p53-abhängigen Prognose haben keine einfache Erklärung liefern können. Man ist zu dem Schluss gekommen, dass differentielle Zellantworten auf den genetischen Hintergrund, genetische Veränderungen im Tumor, differentielle Proteinregulationen, unterschiedliche intrinsische ROS-Level und antioxidative Kapazität, gewebespezifische und andere unbekannte Faktoren in den verschiedenen Karzinomen zurückzuführen sind.

Die Untersuchungen der vorliegenden Dissertationsschrift an verschiedenen Karzinomzelllinien führten zur Auswahl der zelltodresistenten und zellzyklusarrestaufweisenden Karzinomzelllinie TE-7 für weitere Analysen. In dieser Karzinomzelllinie sollte ein zentrales DNA-Schadens-*Checkpoint*-Protein ermittelt werden, um dieses zu inaktivieren und dadurch die Überwindung der Zelltodresistenz zu bewirken. Dieses Ziel ist eine wesentliche Grundlage der Verbesserung und Weiterentwicklung oxidativ schädigender Antikrebstherapien. Um ein DNA-Schadens-*Checkpoint*-Protein zu ermitteln, war es notwendig, die molekularen Mechanismen der Zelltodresistenz aufzuklären.

4.2 Ermittelter molekularer Mechanismus der H₂O₂-Zelltodresistenz der TE-7-Zellen

Zur Erklärung der *in-vitro*-Zelltodresistenz ist die detaillierte Untersuchung der molekularen Mechanismen nach der Stressinduktion unabdingbar. Das Auslösen von Zellzyklusarresten und Zelltod nach DNA-Schäden stehen hierbei im Fokus, da diese Ziele der oxidativen stressinduzierenden Therapie sind. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit diese Mechanismen an der Zelllinie TE-7 näher untersucht. In diesem Fall waren nach DNA-Schäden Zellzyklusarreste in den S- und G2-Phasen neben geringem Zelltod durch die H₂O₂-Behandlung ausgelöst worden. Dies ermöglicht durch Beeinflussung eines in der Zellzyklusregulation zentralen Schlüsselproteins die Auslösung des Umschaltens vom Zellzyklusarrest zum Zelltod.

Welche molekularen Ereignisse führten nun zu den Zellzyklusarresten und der Zelltodresistenz und welches zentrale DNA-Schadens-*Checkpoint*-Protein spielte hierbei eine Rolle?

4.2.1 DNA-Schäden, Zellzyklusarrest und geringer Zelltod nach H₂O₂-Behandlung

4.2.1.1 DNA-Schäden und Zellzyklusarrest

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsschrift demonstrierten anhand der Bildung von DNA-Schweifen im *Comet Assay* und von γ -H2AX eine frühe DNA-Schädigung durch H₂O₂, vermutlich in Form von DSBs, SSBs und AP-Stellen (Burma *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2004; Ward & Chen, 2001; Zegura & Filipic, 2004). Da die Mehrzahl der Zellen nach 24 h eine Reduktion der γ -H2AX-*Foci*-Größe sowie eine Abnahme der DNA-Fragmentierung im *Comet Assay* aufwies, ist eine erfolgte Reparatur der Schäden zu späten Zeitpunkten wahrscheinlich. Die beobachtete späte H2AX-Phosphorylierung könnte durch JNK erfolgt sein, da diese für die p46- und p54-Varianten bei 12 h ein Aktivierungsmaximum zeigte. Eine mögliche Aktivierung der *upstream* vom γ -H2AX-gelegenen Kinasen ATM, ATR und DNA-PK ist nicht auszuschließen. Weiterhin wurde eine Akkumulation des Gesamtproteins H2AX deutlich, welches vermutlich für die Reparatur der DNA-Schäden bzw. für die Markierung der DNA-Schäden angehäuft wurde.

Als weitere Folge der DNA-Schäden kam es zur Phosphorylierung der Kinase Chk1 (p-Chk1^{Ser317}). Dieses Ergebnis weist auf die Aktivierung der *upstream* von Chk1 gelegenen Kinasen ATM und/oder ATR hin, die auch H2AX phosphoryliert haben könnten. Das aktive Chk1 könnte daher schon sehr früh (1 h nach dem Stress) durch Inaktivierung von Cdc25A/C die beobachteten S- und G2-Arreste 24 h nach der Behandlung induziert haben. Der wichtige Cdk-Inhibitor p21^{WAF1} setzte nach 6 h unterstützend bei der Ausprägung des Zellzyklusarrests ein, wobei dessen verstärkte p53-unabhängige Expression transkriptionell begründet war. Da es zum Verlust des späten G2- und Mitosemarkers p-H3^{Ser10} kam, stellte sich ferner heraus, dass es sich bei dem G2-Arrest um einen frühen G2-Arrest handelt. Weiterhin waren die Zellzyklusarreste von einer Reduktion der Zellen in der G1-Phase begleitet, was molekular durch die Reduktion des G1-Phaseprogressionszyklins D1 erklärt werden konnte. Dieses Zyklin kann somit aufgrund seiner Reduktion als aktivierende Untereinheit der Cdk4/6 die G1-Phase Progression nicht mehr vorantreiben. Die beobachteten Zellzyklusarreste resultierten, wie erwartet, in einer Proliferationshemmung, was anhand des verringerten Einbaus von BrdU in die Zellen gezeigt werden konnte. Diese Zellzyklusarreste ermöglichten es den TE-7-Zellen dem Zelltod zu entgehen.

4.2.1.2 Zelltod

Untersuchungen der vorliegenden Studie zeigten, dass nur wenige TE-7-Zellen in den Zelltod gingen, wobei Apoptose und Nekrose beobachtet wurden. Der geringe apoptotische Zelltod in den TE-7-Zellen wurde durch den intrinsischen Weg ausgelöst. Dieser wurde durch einen Überschuss an BAX und eine Abnahme des Bcl-2 induziert, was zur Freisetzung von proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien geführt haben könnte, die anschließend Caspase 9 aktivierten. Ferner ist H₂O₂ fähig, mitochondriale Membranschäden zu verursachen, was ebenfalls zur Freilassung proapoptotischer Faktoren führt (Mronga *et al.*, 2004). Folglich konnte die hier gezeigte gespaltene Caspase 9 zur Aktivierung der Effektorcaspase 3 beitragen. Des Weiteren wurde eine Beteiligung der Caspase 8 am Zelltod festgestellt. Diese kann ebenfalls Caspase 3 aktivieren und könnte auch über Bid den intrinsischen Weg angeschaltet haben (Zhao *et al.*, 2010). Obwohl die hier gezeigten Ergebnisse eine simultane Aktivierung der Caspasen 8 und 9 demonstrieren, kann man eine späte Aktivierung der Caspase 8 durch die Caspase 9 nicht ausschließen (Viswanath *et al.*, 2001). Auch eine

Aktivierung der Caspase 8 über den extrinsischen Weg ist möglich (zusammengefasst in Kantari & Walczak, 2011).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete geringe Nekroserate könnte durch die aktivierten MAPKs, JNK, p38 und ERK, vermittelt worden sein, denen eine Rolle in der nekrotischen Antwort zugewiesen wurde (Proskuryakov & Gabai, 2010; Festjens *et al.*, 2006). Die überschießende nekrotische Antwort bei 500 μM H_2O_2 ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die antioxidative Abwehr limitiert ist und die starke Oxidation von Schlüsselmolekülen sowie Induktion der mitochondrialen Permeabilitätstransition bei 500 μM zum erhöhten Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials führte (Nekrose). Die ROS-induzierte Nekrose durch Kollaps des mitochondrialen Membranpotentials wurde durch Fiers *et al.*, Kroemer *et al.* und Zhao *et al.* beschrieben (Fiers *et al.*, 1999; Kroemer *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2011). Diese nekrotische Reaktion ist typisch für höhere H_2O_2 -Dosen. Geringere H_2O_2 -Konzentrationen lösen eher Apoptose aus (Hampton & Orrenius, 1997; zusammengefasst in Haddad, 2004). 48 h nach der Behandlung mit 250 μM H_2O_2 war ein Rückgang der Zelltodrate der TE-7-Zellen dieser Arbeit zu beobachten, der vermutlich in der erfolgten Reparatur und dem anschließenden Überleben der Zellen begründet ist.

Die erhöhte Fragmentierung der DNA im *Comet Assay* und die pan-nukleäre $\gamma\text{-H2AX}$ -Färbung in einigen Zellen zu späten Zeitpunkten gaben zusätzlich Hinweise auf die Zelltodantwort, denn eine starke DNA-Fragmentierung ist ein Merkmal von toten Zellen (zusammengefasst in Higuchi, 2003) und die pan-nukleäre $\gamma\text{-H2AX}$ -Färbung kann mit der Induktion von Apoptose korrelieren und wird bei der Initiation der apoptotischen DNA-Fragmentierung beobachtet (Rogakou *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2005).

4.2.2 Identifizierung von ATF-2 als potentielles Target zur Erhöhung der Zelltodsensitivität

Die zur Identifizierung eines Targets, involviert in DNA-Schadens-, Zellzyklusprogressions- und Apoptoseregulation, dienenden *Array*-Analysen der vorliegenden Studie zeigten, dass nach H_2O_2 -Gabe Gene verschiedenster Signalwege aktiviert wurden. Dazu gehörten die Signalwege des Zellzyklus, der MAPKs, des Jak-STAT und der Apoptose, die typisch für die Antwort auf oxidativen Stress sind (Burhans & Heintz, 2009; Son *et al.*, 2011; Simon *et al.*, 1998; Kannan & Jain, 2000). Allein aus dem Repertoire der KEGG-Signalwege wurden 21 Signalwege als transkriptionell aktiviert eingestuft, was die hohe Diversität der Zellantworten nach der hier angewendeten

H₂O₂-Behandlung widerspiegelt. Die Ermittlung eines in den Prozessen der DNA-Schadens-, Zellzyklus- und Apoptoseregulation zentralen Proteins mittels Venn-Diagramm führte zum Transkriptionsfaktor ATF-2. Die Funktion des ATF-2 in diesen Prozessen wurde z. B. in Hauttumoren durch Bhoumik *et al.* und Lau *et al.* beschrieben (zusammengefasst in Bhoumik *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2012). Jedoch wurde ATF-2 in der Datenbank *Pubmed* noch nicht mit Ösophaguskarzinomen in Verbindung gebracht, womit die vorliegende Arbeit neue Informationen zur Funktion des ATF-2 in dieser Tumorentität liefert. ATF-2 ist ein Mitglied der ATF/*cyclic adenosine monophosphate (cAMP)*-responsive element binding protein (CREB)-Leuzinzipper-Transkriptionsfaktoren, welche eine bZIP-Typ DNA-Bindedomäne besitzen (Abb. 47; Maekawa *et al.*, 1989; Hai *et al.*, 1988) und diverse physiologische Rollen ausüben, beispielsweise in der zellulären Stressantwort (Hai *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2008), auch nach Veränderungen in der ROS-Konzentration (van Dam *et al.*, 1995; Yokoyama & Fisher, 2011). Die hier gezeigte Anreicherung des ATF-2-Proteins in TE-7 war auf die erhöhte mRNA-Expression zurückzuführen. Ein weiterer Faktor für die positive Regulation dieses Proteins ist die Phosphorylierung an den Thr 69 und 71, welche die Ubiquitinylierung des Proteins und damit dessen proteasomale Degradation verhindert (Fuchs *et al.*, 2000). Die vorliegende Studie zeigte eine Abnahme dieser Phosphorylierung, die auch mit einer Proteinabnahme assoziiert war. Die Proteinabnahme könnte folglich durch Ubiquitinylierung des Proteins verursacht worden sein.

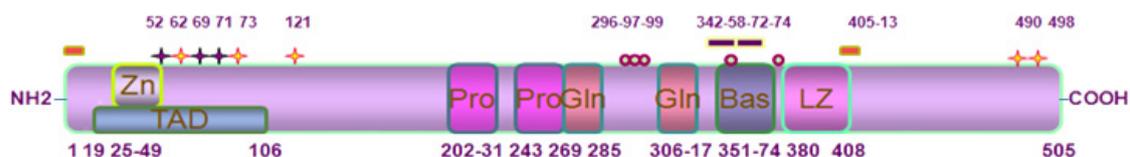


Abb. 47: ATF-2-Protein

Modifiziert nach <http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/ATF2ID718ch2q31.html>. (Stand: 19.06.2013)

Bas - basisches Motiv (Aminosäuren (AS) 351–374), -COOH - Carboxygruppe, Gln - glutaminreich (AS 268–285 und 306–317), Kreise - Lysin (Lys)296, Glycin (Gly)297 und Gly299, Lys357 und Lys374, LZ - Leuzinzipper (AS 380–408), NH₂ - Aminogruppe, Pro - prolinreich (AS 202–231 und 343–269), Rechtecke - Kernimportsignal [*nuclear localization signal* (NLS), AS 342–358 und 356–372], Kernexportsignal [*nuclear export signal* (NES) AS 1–7 und 405–413], Sterne - Thr52, Thr69 und Thr71, Ser62, Ser73, Ser121, Ser490 und Ser498, TAD - Transaktivierungsdomäne (AS 19–106), Zn - Zinkfinger, C₂H₂-Typ (AS 25–49).

4.2.2.1 *Upstream-Signalwege von ATF-2*

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsschrift zu den von ATF-2 *upstream*-gelegenen Signalwegen, namentlich den MAPK-Signalwegen, belegten eine frühe Aktivierung von JNK, p38 und ERK (innerhalb von Minuten). Die Aktivierung dieser MAPKs erfolgte vermutlich jeweils über die *upstream*-agierenden MAPKKs MKK4/7 (selektiv für JNK), MKK3/6 (selektiv für p38) und MEK1/2 /MKK5 (selektiv für ERK), wie durch Zhang und Dong beschrieben (Zhang & Dong, 2007). Die drei MAPKs JNK (p46), p38 und ERK zeigten in der vorliegenden Studie eine biphasische Aktivierung [frühe und späte Phase (15/30 min und 12 h)], wodurch deutlich wird, dass sie zu unterschiedlichen Zeiten nach der Behandlung wahrscheinlich auch verschiedene Funktionen ausüben. Funktionen in der Zellzyklusregulation (zusammengefasst in Poehlmann & Roessner, 2010), Apoptose (zusammengefasst in Wada & Penninger, 2004) und Nekrose (zusammengefasst in Proskuryakov & Gabai, 2010; Festjens *et al.*, 2006) sind anzunehmen. Die Inhibitorexperimente der vorliegenden Studie zeigten, dass der frühen JNK-Aktivierungsphase mit der p46-dominierenden Phosphorylierung die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren ATF-2 und c-Jun zuzuschreiben ist. Die späte JNK-Aktivierungsphase mit der JNK p46/p54-Phosphorylierung könnte, wie bereits erwähnt, die H2AX-Phosphorylierung im Zuge der DNA-Fragmentierung (Rogakou *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2005) vermittelt haben. Demzufolge kann geschlussfolgert werden, dass im vorliegenden Fall JNK früh einen Zellzyklusarrest über die Aktivierung von ATF-2 und spät vermutlich Apoptose induziert. Eine Beteiligung von p38 und ERK an diesen molekularen Ereignissen ist anzunehmen. p38 und JNK können ATF-2 sowohl am Thr 69 als auch 71 phosphorylieren (van Dam *et al.*, 1995; Ouwens *et al.*, 2002), wohingegen ERK nur das Thr 71 phosphoryliert (Ouwens *et al.*, 2002; Baan *et al.*, 2006). Weiterhin wurde ein Modell für die *Feedback*-Regulation zwischen p-ATF-2 und p-p38 MAPK beschrieben, bei dem p-ATF-2 die Expression von MAPK-Phosphatasen aktiviert und somit die Phosphorylierung der p38-MAPK aufhebt (Breitwieser *et al.*, 2007). ATF-2 reguliert über die Blockierung der Raf-Aktivierung auch die Aktivierung von ERK (Liss *et al.*, 2010). Ein ähnlicher Mechanismus wäre für die hier untersuchte Karzinomzelllinie TE-7 denkbar, der zur Reduktion der p38- und ERK-Phosphorylierung nach Beginn der ATF-2-Aktivierung geführt haben könnte. Im Falle der MAPKs hatte der H₂O₂-Stress sogar die Reduktion der Proteine als Folge. Die verstärkt exprimierten mRNAs der MAPKs korrelierten folglich nicht mit der Proteinexpression. Dieser Mecha-

nismus der differentiellen Expression auf transkriptioneller und translationeller Ebene ist bekannt (Guo *et al.*, 2008).

4.2.2.2 Aktivierung von ATF-2

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF-2 durch die Phosphorylierung am Thr 69/71, die zur Aufhebung der autoinhibitorischen Interaktion im ATF-2 führt (zusammengefasst in Lopez-Bergami *et al.*, 2010), nachgewiesen. Die Lokalisationsänderung des Proteins vom Zytoplasma zum Nukleus unterstützte dieses Ergebnis. Diese wird durch das im Protein vorhandene NLS (Abb. 47) realisiert (Liu *et al.*, 2006). Die Aktivierung des Proteins in der hier untersuchten Karzinomzelllinie TE-7 wurde ebenfalls durch die AP-1-Komplexbildung mit dem aktiven Transkriptionsfaktor c-Jun (p-c-Jun^{Ser73}) und der Interaktion mit den AP-1-Ko-Aktivatoren HATs p300/CBP untermauert. Die nach H₂O₂-Behandlung verstärkt exprimierte p300/CBP, eventuell durch mRNA-Überexpression des CBP (*Array-Daten*), können somit, wie auch in anderen Systemen beschrieben, die ATF-2-Transaktivierung durch Acetylierung des ATF-2 begünstigen und mit ihm bei der Aktivierung der Transkription kooperieren (Karanam *et al.*, 2007; Kawasaki *et al.*, 1998; Duyndam *et al.*, 1999). Die Dimerisierung mit dem c-Jun wurde auch als fördernd für den Kernimport beschrieben (Liu *et al.*, 2006). Weiterhin ist bekannt, dass die Heterodimerisierung mit c-Jun dazu führt, dass ATF-2 leichter ubiquitinyliert/proteasomal degradiert werden kann (Fuchs & Ronai, 1999), was die Abnahme des ATF-2-Proteins in TE-7 ab 3 h nach der Behandlung der vorliegenden Studie erklären würde. Unterstützt wird dieses Ergebnis auch durch die Abnahme der degradationsschützenden Phosphorylierung am Thr 69/71 nach 3 h und bestehender Dimerisierung mit c-Jun. Begleitet wurde die verstärkte Interaktion des p-ATF-2 mit dem p-c-Jun durch eine erhöhte Expression des c-Jun, die vermutlich auf die erhöhte mRNA-Expression (*Array-Daten*) zurückzuführen ist. Die *de novo*-Synthese des c-Jun ist mit einem erhöhten Level an AP-1 in Verbindung gebracht worden und der c-Jun-Promotor wird auch durch den AP-1-Komplex positiv reguliert (van Dam *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 2001). Die hier gezeigte AP-1-Bildung aus ATF-2 und c-Jun in TE-7 lässt die c-Jun-Induktion durch diesen Komplex vermuten. Auch die Phosphorylierung des c-Jun führt zur Stabilisierung des c-Jun-Proteins (zusammengefasst in Lopez-Bergami *et al.*, 2010). Die Heterodimerisierung des aktivierten ATF-2 mit dem aktivierten c-Jun geht mit der Erhöhung des Transaktivierungspotentials einher (Karin *et al.*, 1997). Damit ist ATF-2 in der Karzinomzelllinie

TE-7 im AP-1-Komplex fähig, entsprechende Bindesequenzen in Promotoren von Zielgenen nach dem Stress zu binden und bezieht dabei weitere HATs (p300/CBP) mit ein. Der AP-1-Komplex ist dafür bekannt, die Stressantwort, die Zellproliferation, das Überleben, die Differenzierung und die Apoptose zu regulieren (Hess *et al.*, 2004; Czaja, 2003; Shaulian & Karin, 2002) und ist in dem vorliegenden Modell in der H₂O₂-Antwort ein induzierter Faktor.

4.2.2.3 Targets von ATF-2

ATF-2 regelt zellzyklusregulatorische Gene (zusammengefasst in Lau & Ronai, 2012) wie p21^{WAF1} (Kardassis *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2010a) und GADD45 (Maekawa *et al.*, 2008) sowie Zyklin A und D1 (Nakamura *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit induzierte ATF-2 in TE-7 die Expression von c-Jun und p21^{WAF1}, was vermuten lässt, dass ATF-2 seine eigene Transaktivierung mittels AP-1-Komplexbildung durch Induktion von c-Jun begünstigt. Tatsächlich wurde eine solche Regulation für ATF-2 beschrieben (van Dam *et al.*, 1993). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Bhoumik *et al.*, die eine erhöhte c-Jun-Expression nach ATF-2-Inhibierung in Melanomzellen zeigten (Bhoumik *et al.*, 2002; Bhoumik *et al.*, 2004b). Dies könnte ein Hinweis auf eine gewebespezifische Regulation sein. Die vorliegenden Ergebnisse zur Expressionsinduktion des p21^{WAF1} durch ATF-2 ergänzen die Beiträge von Kardassis *et al.* (Kardassis *et al.*, 1999) und Li *et al.* (Li *et al.*, 2010a). Das induzierte Protein p21^{WAF1} kann in TE-7 folglich durch Cdk-Aktivitätsinhibierung den G2-Arrest vermitteln. Die vorliegende Studie liefert demzufolge einen wesentlichen Beitrag zur Regulation des Zellzyklusinhibitors p21^{WAF1} durch ATF-2, welches, neben anderen wie p53, *Sp1 transcription factor* (Sp1), *transforming growth factor beta* (TGF- β) und STAT1, für dessen Expressionsinduktion verantwortlich sein kann (Habold *et al.*, 2008; Gartel & Tyner, 1999; Datto *et al.*, 1995).

In der vorliegenden Studie wurde die direkte Bindung des p-ATF-2^{Thr69/71} im Promotor des Gens p21^{WAF1} nachgewiesen. Dabei wurde eine bisher nicht notierte ATF-2-Bindestelle im p21^{WAF1}-Gen ermittelt, die - 4.772 bp bis - 4.610 bp von Transkriptionsstart (Position 36.651.879; Abb. 48) entfernt liegt und eine Transaktivierung über diese vermuten lässt. Diese Sequenz enthält zwei CRE-BP/CREB-Sequenzen (TGAGGTCA/TGAGGTCA) und eine AP-1-Sequenz (GGTGACTCACT) innerhalb eines kurzen Sequenzbereichs, in der ATF-2 binden konnte. Die Bindung an anderen Stellen des Promotors konnte nicht ausgeschlossen werden. Entsprechend der Datenbankenre-

neues Ergebnis dar. Bisher wurde lediglich in primären murinen embryonalen Fibroblasten einen p-ATF-2^{Ser480/498}-abhängiger G2-Arrest nach genotoxischer Etoposidbehandlung beschrieben (Li *et al.*, 2010a), welche ebenfalls das ROS-Level erhöht (Mäntymaa *et al.*, 2000). Ferner wurde ATF-2 für einen intakten S-Phase-*Checkpoint* nach DNA-Schädigung durch Bestrahlung in Melanomzellen verantwortlich gemacht (Bhounik *et al.*, 2005). In der vorliegenden Studie wurde ein ATF-2-unabhängiger S-Arrest beobachtet. Dieser könnte demzufolge z. B. durch Chk1 und Cdk-Inhibitoren, wie *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B* (p27) und *cyclin-dependent kinase inhibitor 1C* (p57), von denen die mRNA des p57 überexprimiert vorlag (siehe Anhang 3), vermittelt worden sein.

4.3.2 Erhöhter Zelltod

4.3.2.1 Apoptose

Für die ösophageale Karzinomzelllinie TE-7 konnte hier gezeigt werden, dass ATF-2 nach H₂O₂-Behandlung den Zelltod inhibiert. Die Inhibierung des Zelltods wird in den TE-7-Zellen durch Induktion des G2-Arrests realisiert. Dies schafft die Möglichkeit zur Reparatur der induzierten DNA-Schäden vor der Mitose und somit zu verminderter Caspase-3-Spaltung. Möglich wäre im Zuge der Inhibierung des Zelltods auch die ATF-2-abhängige Repression proapoptotischer Gene oder die Expressionsinduktion antiapoptotischer Gene. Als Beispiel seien die Induktion der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 (Ma *et al.*, 2007) und bcl-xL (Salameh *et al.*, 2010) durch ATF-2 genannt. Denkbar wäre auch eine Inhibierung des extrinsischen Signalwegs [TNF-*related apoptosis-inducing ligand receptor 1* (TRAIL-R1-Rezeptor)], wie von Bhounik *et al.* beschrieben (Bhounik *et al.*, 2002). Zudem ist auch bekannt, dass induziertes p21^{WAF1} antiapoptotisch wirkt (zusammengefasst in Gartel & Tyner, 2002). Es interagiert mit der *apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1), inhibiert dadurch MAPKs (Asada *et al.*, 1999), inhibiert die Caspase-3-Spaltung durch Komplexbildung mit der Procaspase 3 (Tang *et al.*, 2006), inhibiert die Aktivierung der Caspase 9 (Sohn *et al.*, 2006) und die Freilassung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Le *et al.*, 2005). Damit lässt sich auch durch die ATF-2-abhängige Expressionsinduktion des p21^{WAF1} die hier gezeigte verminderte Zelltodrate der Karzinomzelllinie TE-7 erklären. Ergebnisse unseres Instituts zeigten ferner, dass die p21^{WAF1}-Herunterregulation mit erhöhter Apoptose-sensitivität kolorektaler Karzinomzellen assoziiert war (Habold *et al.*, 2008), was die p21^{WAF1}-Funktion in der Inhibierung der Apoptose stützt. Schließlich konnte eine

ATF-2-abhängige Inhibierung des Zelltods auch für Neuronen und Melanome beschrieben werden (Kristiansen *et al.*, 2010; Bhoumik *et al.*, 2004a).

Als Resultat des ATF-2-*Knockdown* der vorliegenden Studie wurde in TE-7 eine erhöhte Apoptoserate beobachtet, womit dem Ziel dieser Arbeit Rechnung getragen werden konnte.

4.3.2.2 Nekrose

Die hier beobachtete erhöhte Nekrose nach dem ATF-2-*Knockdown* könnte auf erhöhte DNA-Schädigungen zurückgeführt werden, welche durch den fehlenden Zellzyklusarrest nicht zur Reparatur geführt wurden. Hierbei können massive DNA-Schäden die Aktivierung von PARP auslösen, was dessen Substrat NAD⁺ vermindert und folglich das des ATP, was dann zur Nekrose aufgrund von Energiedefizienz führen könnte (Proskuryakov & Gabai, 2010). Außerdem könnten in diesem Zusammenhang die Nekroseaktivatoren RIP1 und JNK durch erhöhte DNA-Schäden zu Mitochondrienschäden führen (Proskuryakov & Gabai, 2010). Auch diese Antwort wäre im Sinne einer Therapie wünschenswert, um die Zellen zu eliminieren. Folglich kann durch die vorliegende Studie ein bisher noch nicht entdeckter Zusammenhang zwischen ATF-2 und Nekrose hergestellt werden, indem ATF-2 die nekrotische Antwort auf H₂O₂-Stress inhibiert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ATF-2 in TE-7 teilweise den G2-Arrest vermittelt und daraus resultierend den Zelltod hemmt, um das Überleben der Zellen zu ermöglichen. Somit konnte mittels ATF-2-*Knockdown* eine erhöhte Zelltodrate erzielt werden, indem TE-7-Zellen mit geschädigter DNA den G2-*Checkpoint* überschreiten, was Nekrose und Apoptose auslöste. Die Daten lassen folgende Hypothese zu: Geschädigte Zellen gehen in die M-Phase über. In der M-Phase befindliche Zellen mit geschädigter DNA gehen in den Zelltod (Poehlmann *et al.*, 2011; DiPaola, 2002), womit ein Umschalten vom Zellzyklusarrest zum Zelltod erreicht werden konnte, was Ziel dieser Arbeit war. Damit wird die Wichtigkeit des Proteins ATF-2 in der Etablierung des Zellzyklusarrests und Inhibierung des Zelltods deutlich.

Der gesamte ermittelte Mechanismus der H₂O₂-Antwort für die ösophageale Karzinomzelllinie TE-7 einschließlich der Funktion des ATF-2 in der Regulation des Zellzyklusarrests und des Zelltods ist in der Abb. 49 dargestellt.

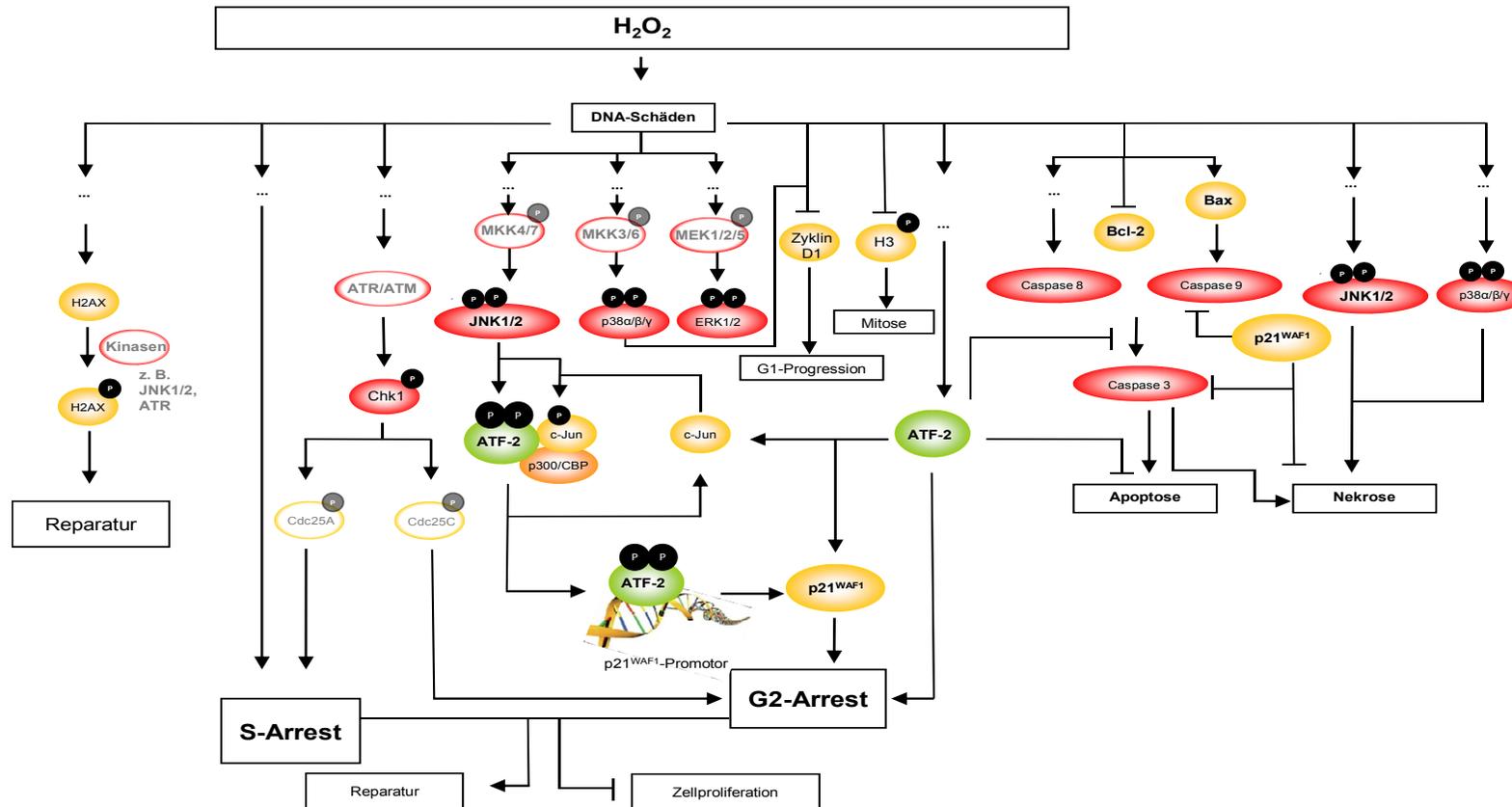


Abb. 49: Ermittelter molekularer Mechanismus der H₂O₂-Antwort in der Karzinomzelllinie TE-7

ATF-2 - *activating transcription factor 2*, ATM - *ataxia telangiectasia mutated*, ATR - *ataxia telangiectasia and Rad3 related*, BAX - *Bcl-2-associated X protein*, Bcl-2 - *B-cell CLL/lymphoma 2*, CBP - *CREB binding protein*, Cdc25A/C - *Cell division cycle 25A/C*, Chk1 - *Chk1 checkpoint homolog (S. pombe)*, c-Jun - *Jun proto-oncogene*, DNA - *deoxyribonucleic acid*, ERK - *extracellular signal-regulated kinases*, H2AX - *Histon H2AX*, H₂O₂ - *Wasserstoffperoxid*, H3 - *Histon H3*, JNK - *c-Jun N-terminal kinases*, MKK/MEK - *mitogen-activated protein kinase kinase*, p21^{WAF1} - *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*, p38 - *p38 mitogen-activated protein kinases*; G2, S - *Zellzyklusphase*

Aufgrund der erhaltenen Daten wird vorgeschlagen ATF-2 als Zielprotein für die kombinierte Therapie mit oxidativem Stress zu verwenden (Vorschlag in Abb. 50). Auch Bhoumik *et al.* zeigten in Melanomzellen, dass eine Kombinationsbehandlung mit dem Chemotherapeutika *7-Hydroxystaurosporine* und ATF-2-Inhibierung die Zellen für die Apoptose sensitiviert (Bhoumik *et al.*, 2004a). Abbas *et al.* lösten in präklinischen Studien mit den chemischen Komponenten *Celastrol* und *Acetyl Isogambogic Acid* die Inhibierung der ATF-2-transkriptionellen Aktivität und dadurch den Zelltod in Melanomen aus (Abbas *et al.*, 2007). Ferner ist p-ATF-2^{Thr69/71} für die Resistenz von Melanomen gegen Chemo- und Bestrahlungstherapie verantwortlich (Ronai *et al.*, 1998). Folglich führte die ATF-2-Inaktivierung während der ebenfalls über oxidativen stresswirkenden Bestrahlung zur Hypersensitivierung gegen diese Behandlung (Ronai *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2010a). Von der Sensitivierung gegenüber genotoxischen Stress und einer Vielzahl von chemischen (chemotherapeutischen) und physikalischen Behandlungen wurde auch nach Zerstörung/Inhibierung der ATF-2-Funktion in Melanomzellen durch Ronai *et al.* und Bhoumik *et al.* berichtet (Ronai *et al.*, 1998; Bhoumik *et al.*, 2004b; Bhoumik *et al.*, 2002; Bhoumik *et al.*, 2001). Auch bestrahlungsresistente Karzinomzellen wurden dadurch sensitiver gegenüber der Zelltodinduktion (Bhoumik *et al.*, 2005). Die Sensitivierung durch ATF-2-Inaktivierung wurde auch für MCF7-Brustkrebszellen beobachtet (Bhoumik *et al.*, 2001). Ergebnisse aus humanen embryonalen Nierenzellen (293T-Zellen) und normalen Melanozyten geben den Hinweis, dass die erhöhte Apoptoserate nach ATF-2-Funktionszerstörung karzinomtypisch ist (Bhoumik *et al.*, 2001). Dennoch muss die Wirkung der Inaktivierung von ATF-2 als Therapie für verschiedene Karzinomentitäten überprüft werden, denn es existieren auch Ergebnisse aus Kopf- und Nackenkarzinomzelllinien, in denen die ATF-2-Inaktivierung über das kurze interferierende ATF-2-Peptid II oder die Verwendung von *small hairpin RNA* (shRNAs) die chemotherapeutikainduzierte Apoptose verhindert (Chemoresistenzzeugung) (Duffey *et al.*, 2011). Patente für Komponenten und Methoden, die die Sensitivität von therapieresistenten Neoplasien gegenüber verschiedenen Therapien durch die Veränderung der Aktivität des Transkriptionsfaktors ATF-2 erhöhen, sind angemeldet worden (Ronai *et al.*, 2011; Bhoumik & Ronai, 2006). Im Nacktmaus-*Xenograft*-Modell zeigte sich nach der Injektion mit LU1205 oder FEMX humanen melanomabstammenden Tumorzelllinien, die das ATF-2⁵¹⁻¹⁰⁰-Peptid konstitutiv exprimieren, die Inhibierung des humanen Melanomwachstum *in vivo* (Bhoumik & Ronai, 2006). Es wurden auch die Überexpression und Aktivierung des ATF-2 in vielen Krebsarten beobachtet (Papassava *et al.*, 2004; zusammengefasst in Lopez-Bergami *et al.*, 2010).

Dies spricht für die Wichtigkeit dieses Proteins in Karzinomen und für eine Behandlung mit ATF-2-Funktionszerstörung, um die Zellen für den Zelltod zu sensibilisieren. Die vorliegende Studie gibt somit Hinweise zur möglichen Anwendbarkeit der Inaktivierung von ATF-2 in Kombination mit oxidativem Stress als Therapie für ösophageale Karzinome.

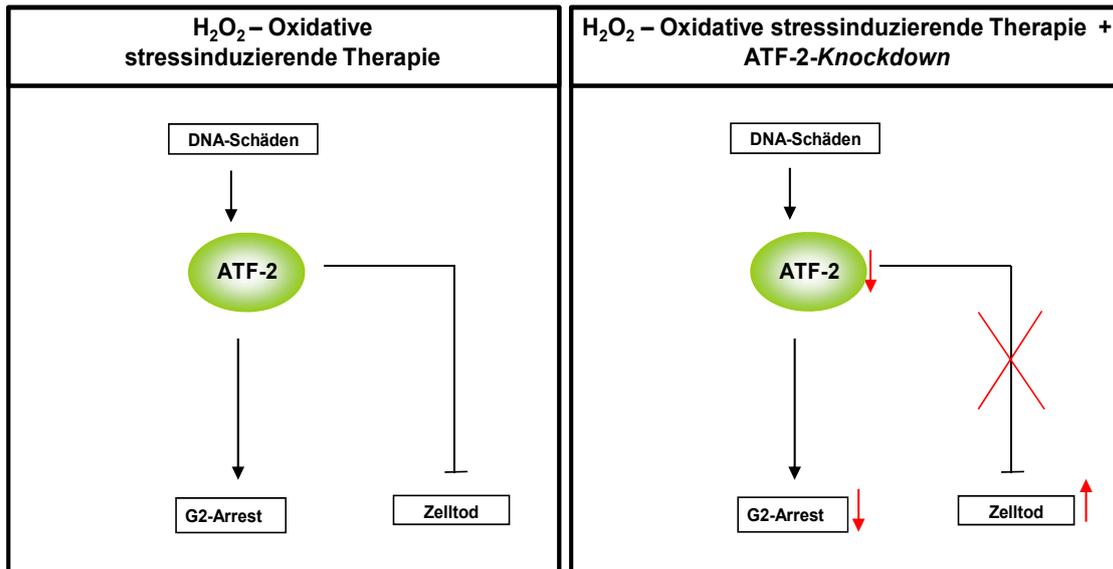


Abb. 50: Vorschlag für die Verbesserung von oxidativen stressinduzierenden Therapien
 Links: zelltodinhibierende Antwort der Karzinomzellen durch ATF-2-vermittelten G2-Arrest nach oxidativen Stress
 Rechts: zelltoderhöhende Antwort der Karzinomzellen durch ATF-2-Knockdown in Kombination mit oxidativem Stress
 ATF-2 - *activating transcription factor 2*, DNA - *deoxyribonucleic acid*, H₂O₂ - Wasserstoffperoxid, G2 - Zellzyklusphase

4.4 Ausblick - Vorschlag für einen allgemeingültigen Mechanismus nach Induktion von oxidativem Stress in Karzinomzellen

Um einen Ausblick für einen allgemeingültigen Mechanismus oxidativen Stresses zu geben, wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit weitere Untersuchungen an den Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1 durchgeführt.

Die Zugabe von CDNB, einem bekannten Substrat der Glutathiontransferasen, führt zur GSH-Verarmung (Plummer *et al.*, 1981; Jocelyn & Cronshaw, 1985). Infolgedessen kommt es zu oxidativem Stress (Krance *et al.*, 2010). Die hier verwendete Behandlung mit CDNB führte in TE-7 zu DNA-Schäden. Ferner wurde eine Proliferationsreduktion mit einem G2/M-Arrest beobachtet, der durch eine Reduktion der G1- und S-Zellpopulationen begleitet war. Die γ -H2AX-Bildung zeigte auch hier eine potentielle Beteiligung der *upstream*-Kinasen ATM, ATR, DNA-PK und JNK. Die erhöhte H2AX-Bildung weist nach dieser Behandlung ebenfalls darauf hin, dass ein erhöhter Bedarf dieses Proteins in der CDNB-Antwort, vermutlich für die Reparatur, nötig ist. ATF-2-vermittelte ebenfalls teilweise den G2/M-Arrest. Es zeigte sich außerdem, dass ATF-2 auch bei dieser Behandlung die Apoptose und Nekrose hemmt. Der Zellzyklusarrest kann in gleicher Weise wie bei der H₂O₂-Behandlung durch ein erhöhtes ATF-2-Level und -Aktivierung sowie durch Induktion des p21^{WAF1} vermittelt worden sein. Die Hemmung der Caspase 3, vermutlich über p21^{WAF1}, könnte ebenfalls eine Rolle spielen. Der ATF-2-Knockdown führte zu einem verringerten G2/M-Arrest, zu einer erhöhten Zelltodrate durch bestehende DNA-Schäden nach den G2/M-Checkpoints im Zellzyklus. Dementsprechend liegt die Vermutung nahe, dass ein ATF-2-abhängiger G2/M-Arrest ein generelles Phänomen oxidativen Stresses ist. Damit ist ATF-2 ein hervorragendes Zielprotein zur Verbesserung der oxidativen stressinduzierenden Therapie durch teilweise Inaktivierung des G2/M-Checkpoint und damit einem Überwinden des Checkpoint mit DNA-Schäden mit dem Zelltod als Folge (Chen *et al.*, 2012b).

Es stellte sich nun die Frage, ob die Induktion von ATF-2 und p21^{WAF1} und die Aktivierung von ATF-2 ein generelles Phänomen der H₂O₂-Antwort in unterschiedlichen Karzinomzellen darstellt. Diese Frage konnte durch die Untersuchungen an den Karzinomzelllinien OE-33, SEG-1 und BIC-1 mit „Ja“ beantwortet werden. In diesem Zusammenhang könnte ATF-2 vermutlich ebenso in diesen p21^{WAF1} induzieren und dadurch den Zelltod hemmen. Diese Ergebnisse zusammen mit den Ergebnissen aus der Behandlung der Karzinomzelllinien TE-7 und OE-33 mit den ebenfalls oxidativen stressinduzierenden Agenzien PQ und CDNB, die auch diese Aktivierung und Induk-

tionen auslösten, weisen auf einen allgemeingültigen Mechanismus des oxidativen Stresses hin. Damit liegt nahe, dass die Kombinationsbehandlung „Oxidativer Stress mit ATF-2-Knockdown“ ein möglicher Ansatz zur Verbesserung der über oxidativen stresswirkenden Therapien ist, um mehr Zellen in den Zelltod zu zwingen.

Das p21^{WAF1} scheint in OE-33 nach H₂O₂-Behandlung eine andere Funktion als die Vermittlung eines Zellzyklusarrests zu haben, denn diese Karzinomzelllinie vollzieht keinen Zellzyklusarrest. Da für p21^{WAF1} neben der Funktion im Zellzyklusarrest ebenfalls solche in der Apoptose (Tsao *et al.*, 1999), Progression (Cheng *et al.*, 1999) und DNA-Methylierung (Chuang *et al.*, 1997) beschrieben wurde, sind Beteiligungen an diesen Prozessen zu erwägen. Die Inhibierung der Apoptose über in Kapitel 4.3. aufgeführte Mechanismen sind möglich. In den hier untersuchten Karzinomzelllinien OE-33 und BIC-1 kann weiterhin eine Beteiligung des p53 an der H₂O₂-induzierten p21^{WAF1}-Expression ausgeschlossen werden, da p53 mutiert (LOF) und somit nicht funktionell bezüglich der Transaktivierungsfunktion ist. Der unterschiedlich induzierte oxidative Stress scheint einen Einfluss auf die Art der entstehenden Schäden zu haben. PQ, ein Modell für die Induktion von oxidativer Toxizität seit 1984 (Bus & Gibson, 1984), beispielsweise induzierte in den hier untersuchten Karzinomzelllinien TE-7 und OE-33 keine bzw. nur kaum über γ -H2AX-detektierbare DNA-Schäden. Dies könnte darauf beruhen, dass das durch PQ von den Mitochondrien gebildete O₂^{•-} erst in H₂O₂ (Castello *et al.*, 2007) und folglich in das OH[•] umgewandelt werden muss, um für die DNA schädigend zu sein, da das O₂^{•-} und H₂O₂ nur wenige Substrate oxidieren. Diese Umwandlung könnte eine verlangsamte Umsetzungsrate haben und im Vergleich zur H₂O₂-Direktzugabe ineffizienter sein und daher nicht zu DNA-Schäden führen. Zudem liegt die Produktionsstätte der ROS während der PQ-Behandlung weit entfernt vom Zellkern und könnte die ausbleibende DNA-Schädigung erklären. Im Gegensatz dazu kann das direkt zugegebene, relativ stabile H₂O₂ sofort in den Zellkern diffundieren und dort die DNA schädigen. Im Falle von PQ könnte auch das antioxidative System der Zellen greifen und das O₂^{•-} (spontane Dismutation, SOD) bzw. das wenige daraus entstehende H₂O₂ (verschiedene, siehe Einleitung) detoxifizieren. Dennoch sind andere, nicht über die γ -H2AX-Phosphorylierung markierte, oxidative Schäden durch das O₂^{•-} denkbar, wie die Lipidperoxidation (Membranschädigung). Dies würde auch die Aktivierung von ATF-2 und p21^{WAF1} erklären (Squadrito *et al.*, 2005). Überdies sind Oxidationsreaktionen mit Proteinen möglich, die dann z. B. MAPKs und folglich ATF-2 aktivieren könnten, wie es für H₂O₂ von Uzdensky vorgeschlagen wurde (<http://www.photobiology.info/Uzdensky.html>, Stand: 14.07.2013).

Aufgrund der Aktivierung von ATF-2 in allen untersuchten Karzinomzelllinien auch nach unterschiedlich induziertem oxidativen Stress schlägt die vorliegende Studie zur Verbesserung von oxidativen Therapien den ATF-2-*Knockdown* vor.

Zukünftige ATF-2-*Knockdown*-Experimente mit den Karzinomzelllinien OE-33, SEG-1 und BIC-1 würden Aufschluss über eine mögliche Sensitivierung dieser unter H₂O₂-Stress geben und die Anwendbarkeit dieser Methode weiter beschreiben. ATF-2-*Knockdown*-Experimente nach der Behandlung mit PQ und CDNB in TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1 würden die Erkenntnisse erweitern. Ferner könnten die Untersuchungen auf andere ösophageale Karzinomzelllinien ausgeweitet werden, um eine globale Aussage für Ösophaguskarzinome machen zu können. Schließlich könnten die untersuchten Karzinomzelllinien, die *in vitro* eine erhöhte Zelltodsensitivität bei oxidativem Stress mit ATF-2-Inaktivierung zeigen, im *Xenograft*-Modell eingesetzt werden. Dies würde eine potentielle Anwendbarkeit der ATF-2-Inaktivierung als therapeutische Maßnahme *in vivo* erkennen lassen.

5 Zusammenfassung

Untersuchungen molekularer Mechanismen und funktioneller Konsequenzen der DNA-Schädigung durch oxidativen Stress in Tumorzellen

Um Karzinomzellen, die mit einer geringen Zelltodrate auf oxidative stressinduzierende Therapien reagieren, von einem Zellzyklusarrest in den Zelltod zu zwingen, stellt die Inaktivierung/Inhibierung von DNA-Schadens-*Checkpoint*-Proteinen eine innovative Strategie dar. TE-7, eine von vier untersuchten Karzinomzelllinien, zeigte sowohl Zellzyklusarreste als auch geringfügigen Zelltod nach Induktion von oxidativem Stress mit der Substanz H₂O₂. In dieser Karzinomzelllinie wurde ATF-2, ein Transkriptionsfaktor mit HAT-Aktivität und Funktionen in Apoptose-, Zellzyklus- und DNA-Schadensregulation, als ein solches Zielmolekül durch cDNA-*Microarray*-Analysen identifiziert. Dieses wurde durch Phosphorylierung an den Thr 69/71 durch die Kinase JNK aktiviert, vermittelte teilweise den G2-Arrest durch Aktivierung des Cdk-Inhibitors p21^{WAF1} und verhinderte somit den Zelltod. Darüber hinaus wurde eine neue ATF-2-Bindestelle im Promotor des p21^{WAF1}-Gens entdeckt. Weiterhin induzierte ATF-2 die c-Jun Expression, was zur verstärkten Transaktivierungsaktivität von ATF-2 beitragen könnte. ATF-2 bildete ferner einen Komplex mit p-c-Jun (AP-1-Komplex) und p300/CBP. Durch ATF-2-*Knockdown* konnte erstmals für eine ösophageale Karzinomzelllinie eine Erhöhung der Zelltodrate und Verringerung des G2-Arrests nach oxidativem Stress erreicht werden. Dabei scheinen die Zellen den G2-*Checkpoint* zu überwinden, was zum erhöhten Zelltod führt. p21^{WAF1} scheint eine zentrale Rolle in der verringerten G2-Arrestinduktion zu spielen, da dieses nach dem ATF-2-*Knockdown* herunterreguliert wurde. Damit stellt ATF-2 einen wichtigen Regulator des Zellzyklus und des Zelltods in TE-7 dar. Der Mechanismus der Aktivierung des G2/M-Arrests durch ATF-2 und folglich die Inhibierung des Zelltods wurde für ein weiteres oxidatives stressinduzierendes System (CDNB) nachgewiesen. Demzufolge ist dies ein Hinweis auf einen allgemeingültigen Mechanismus oxidativen Stresses. Die vorliegende Arbeit zeigt die Wichtigkeit des ATF-2 in der Etablierung der DNA-Schadens-*Checkpoint*-Antwort. Ergebnisse aus den Karzinomzelllinien OE-33 (Barrett's-), SEG-1 (Lunge) und BIC-1 (Kolon) mit H₂O₂-Behandlung und aus TE-7 mit PQ- sowie aus OE-33 mit CDNB- bzw. PQ-Behandlung belegen, dass die Induktion von ATF-2 und p21^{WAF1} und die Aktivierung von ATF-2 ein genereller Mechanismus oxidativen Stresses ist. Folglich stellt ATF-2 ein attraktives Zielmolekül zur Verbesserung von Therapien dar, die über oxidativen Stress wirken.

6 Summary

Analyses of molecular mechanisms and consequences of oxidative stress-induced DNA damage in cancer cells

The inactivation of DNA damage checkpoint proteins is an innovative strategy to switch cancer cells from cell cycle arrest to cell death. This applies especially to cancer cells reacting to oxidative damaging anti-cancer therapies with poor cell death. Out of four cell lines examined, the esophageal cancer cell line TE-7 showed cell cycle arrest and poor cell death after induction of oxidative stress with the chemical hydrogen peroxide. The transcription factor and histone acetyltransferase ATF-2 as a target molecule involved in processes of apoptosis, cell cycle, and DNA damage was discovered in TE-7 by cDNA-Microarray analyses. ATF-2 was activated through phosphorylation by the kinase JNK. Furthermore, ATF-2 partially mediated the H₂O₂-induced G2 arrest by upregulating the Cdk inhibitor p21^{WAF1}, thus inhibiting cell death. In this work, a novel ATF-2 binding site in the promoter of the p21^{WAF1} gene was found. Moreover, ATF-2 induced c-Jun expression, suggesting enhanced ATF-2 transcriptional activity via c-Jun-ATF-2-heterodimerization. ATF-2 built a complex with p-c-Jun (AP-1 complex) and p300/CBP. This study is the first to show that the inhibition of ATF-2 by knockdown in an esophageal cancer cell line caused an increase in cell death rate and a reduction in G2 arrest. Simultaneously, the cells seem to overcome the G2 checkpoint, causing higher rate of cell death. p21^{WAF1} seems to play a central role in the reduction of the G2 cell population because it was reduced after ATF-2 knockdown. Therefore, ATF-2 is an important protein in the establishment of the DNA damage checkpoint response by regulating the cell cycle and cell death in TE-7. The mechanism of ATF-2-induced G2/M arrest and thereby the inhibition of cell death was also confirmed for the oxidative stress-inducing system CDNB in TE-7. Therefore, a general mechanism of oxidative stress was concluded. The results from the carcinoma cell lines OE-33 (Barrett's), SEG-1 (lung), and BIC-1 (colon) treated with H₂O₂, TE-7 treated with PQ and OE-33 treated with CDNB and PQ, showed that the induction of ATF-2 and p21^{WAF1} and the activation of ATF-2 is a general event of oxidative stress. Hence, ATF-2 is an attractive target molecule to improve oxidative stress-inducing therapies.

7 Literaturverzeichnis

- Abbas S, Bhoumik A, Dahl R, Vasile S, Krajewski S, Cosford ND & Ronai ZA (2007) Preclinical studies of celastrol and acetyl isogambogic acid in melanoma. *Clin Cancer Res* **13**: 6769–6778
- Alberts B, Schäfer U, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P (2011) *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH, Weinheim
- Albrechtsen N, Dornreiter I, Grosse F, Kim E, Wiesmüller L & Deppert W (1999) Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene* **18**: 7706–7717
- Alexandre J, Batteux F, Nicco C, Chéreau C, Laurent A, Guillemin L, Weill B & Goldwasser F, Alexandre J, Batteux F, Nicco C, Chéreau C, Laurent A, Guillemin L, Weill B & Goldwasser F (2006) Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. *Int J Cancer* **119**: 41–48
- Amin KA, Mohamed BM, El-Wakil MA & Ibrahim SO (2012) Impact of breast cancer and combination chemotherapy on oxidative stress, hepatic and cardiac markers. *J Breast Cancer* **15**: 306–312
- Antoon JW, Bratton MR, Guillot LM, Wadsworth S, Salvo VA & Burow ME (2012) Inhibition of p38-MAPK alters SRC coactivation and estrogen receptor phosphorylation. *Cancer Biol Ther* **13**: 1026–1033
- Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K & Mizutani S (1999) Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO J* **18**: 1223–1234
- Azzam EI, de Toledo SM, Pykett MJ, Nagasawa H & Little JB (1997) CDC2 is down-regulated by ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Cell Growth Differ* **8**: 1161–1169
- Baan B, van Dam H, van der Zon GC, Maassen JA & Ouwens DM (2006) The role of c-Jun N-terminal kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase in insulin-induced Thr69 and Thr71 phosphorylation of activating transcription factor 2. *Mol Endocrinol* **20**: 1786–1795
- Barnas C, Martel-Planche G, Furukawa Y, Hollstein M, Montesano R & Hainaut P (1997) Inactivation of the p53 protein in cell lines derived from human esophageal cancers. *Int J Cancer* **71**: 79–87
- Barrera G (2012) Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol* **2012**: 137289
- Barrett NR (1950) Chronic peptic ulcer of the oesophagus and 'oesophagitis'. *Br J Surg* **38**: 175–182
- Bataille F, Rümmele P, Dietmaier W, Gaag D, Klebl F, Reichle A, Wild P, Hofstädter F & Hartmann A (2003) Alterations in p53 predict response to preoperative high dose chemotherapy in patients with gastric cancer. *Mol Pathol* **56**: 286–292
- Benbrook DM & Jones NC (1990) Heterodimer formation between CREB and JUN proteins. *Oncogene* **5**: 295–302
- Benhar M, Engelberg D & Levitzki A (2002) ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep* **3**: 420–425

- Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM & Anderson DW (2001) SP600125, an anthracycline inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13681–13686
- Bernardi P, Petronilli V, Di Lisa F & Forte M (2001) A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci* **26**: 112–117
- Bernards R (1999) CDK-independent activities of D type cyclins. *Biochim Biophys Acta* **1424**: M17–M22
- Berquist BR & Wilson DM (2012) Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions. *Cancer Lett* **327**: 61–72
- Bertheau P, Espié M, Turpin E, Lehmann J, Plassa LF, Varna M, Janin A & de Thé H (2008) TP53 status and response to chemotherapy in breast cancer. *Pathobiology* **75**: 132–139
- Bertheau P, Plassa F, Espié M, Turpin E, de Roquancourt A, Marty M, Lerebours F, Beuzard Y, Janin A & de Thé H (2002) Effect of mutated TP53 on response of advanced breast cancers to high-dose chemotherapy. *Lancet* **360**: 852–854
- Bertheau P, Turpin E, Rickman DS, Espié M, de Reyniès A, Feugeas JP, Plassa LF, Soliman H, Varna M, de Roquancourt A, Lehmann-Che J, Beuzard Y, Marty M, Misset JL, Janin A & de Thé H (2007) Exquisite sensitivity of TP53 mutant and basal breast cancers to a dose-dense epirubicin-cyclophosphamide regimen. *PLoS Med* **4**: e90
- Bettaieb A, Wrzal PK & Averill-Bates DA (2013) Hyperthermia: Cancer Treatment and Beyond. In *Cancer Treatment - Conventional and innovative Approaches*, Rangel L (ed) pp. 257–283 New York: InTech
- Bhoumik A & Ronai Z (2006) Inhibition of tumor growth and metastasis by ATF2-derived peptides. *Patent* EP 1 809 315 B1
- Bhoumik A & Ronai Z (2008) ATF2: a transcription factor that elicits oncogenic or tumor suppressor activities. *Cell Cycle* **7**: 2341–2345
- Bhoumik A, Gangi L & Ronai Z (2004a) Inhibition of melanoma growth and metastasis by ATF2-derived peptides. *Cancer Res* **64**: 8222–8230
- Bhoumik A, Huang TG, Ivanov V, Gangi L, Qiao RF, Woo SL, Chen SH & Ronai Z (2002) An ATF2-derived peptide sensitizes melanomas to apoptosis and inhibits their growth and metastasis. *J Clin Invest* **110**: 643–650
- Bhoumik A, Ivanov V & Ronai Z (2001) Activating transcription factor 2-derived peptides alter resistance of human tumor cell lines to ultraviolet irradiation and chemical treatment. *Clin Cancer Res* **7**: 331–342
- Bhoumik A, Jones N & Ronai Z (2004b) Transcriptional switch by activating transcription factor 2-derived peptide sensitizes melanoma cells to apoptosis and inhibits their tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4222–4227
- Bhoumik A, Lopez-Bergami P & Ronai Z (2007) ATF2 on the double - activating transcription factor and DNA damage response protein. *Pigment Cell Research* **20**: 498–506
- Bhoumik A, Takahashi S, Breitweiser W, Shiloh Y, Jones N & Ronai Z (2005) ATM-dependent phosphorylation of ATF2 is required for the DNA damage response. *Mol Cell* **18**: 577–587

- Blandino G, Levine AJ & Oren M (1999) Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Oncogene* **18**: 477–485
- Boamah EK, White DE, Talbott KE, Arva NC, Berman D, Tomasz M & Bargonetti J (2007) Mitomycin-DNA adducts induce p53-dependent and p53-independent cell death pathways. *ACS Chem Biol* **2**: 399–407
- Boonstra J & Post JA (2004) Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* **337**: 1–13
- Boonstra JJ, van der Velden AW, Beerens EC, van Marion R, Morita-Fujimura Y, Matsui Y, Nishihira T, Tselepis C, Hainaut P, Lowe AW, Beverloo BH, van Dekken H, Tilanus HW & Dinjens WN (2007) Mistaken identity of widely used esophageal adenocarcinoma cell line TE-7. *Cancer Res* **67**: 7996–8001
- Boonstra JJ, van Marion R, Beer DG, Lin L, Chaves P, Ribeiro C, Pereira AD, Roque L, Darnton SJ, Altorki NK, Schrupp DS, Klimstra DS, Tang LH, Eshleman JR, Alvarez H, Shimada Y, van Dekken H, Tilanus HW & Dinjens WNM (2010) Verification and unmasking of widely used human esophageal adenocarcinoma cell lines. *J Natl Cancer Inst* **102**: 271–274
- Børresen-Dale AL (2003) TP53 and breast cancer. *Hum Mutat* **21**: 292–300
- Botchkareva NV, Ahluwalia G & Shander D (2006) Apoptosis in the hair follicle. *J Invest Dermatol* **126**: 258–264
- Boveris A & Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* **134**: 707–716
- Breitwieser W, Lyons S, Flenniken AM, Ashton G, Bruder G, Willington M, Lacaud G, Kouskoff V & Jones N (2007) Feedback regulation of p38 activity via ATF2 is essential for survival of embryonic liver cells. *Genes Dev* **21**: 2069–2082
- Brooks CL & Gu W (2006) p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell* **21**: 307–315
- Broude EV, Swift ME, Vivo C, Chang BD, Davis BM, Kalurupalle S, Blagosklonny MV & Roninson IB (2007) p21(Waf1/Cip1/Sdi1) mediates retinoblastoma protein degradation. *Oncogene* **26**: 6954–6958
- Brown JM & Attardi LD (2005) The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* **5**: 231–237
- Bruno T, de Nicola F, Iezzi S, Lecis D, D'Angelo C, Di Padova M, Corbi N, Dimiziani L, Zannini L, Jekimovs C, Scarsella M, Porrello A, Chersi A, Crescenzi M, Leonetti C, Khanna KK, Soddu S, Floridi A, Passananti C, Delia D & Fanciulli M (2006) Chk2 phosphorylation by ATM/ATR and Chk2 kinases activates p53 transcription and the G2/M checkpoint. *Cancer Cell* **10**: 473–486
- Burhans WC & Heintz NH (2009) The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic Biol Med* **47**: 1282–1293
- Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A & Chen DJ (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* **276**: 42462–42467
- Bus JS & Gibson JE (1984) Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environ Health Perspect* **55**: 37–46

- Buttitta F, Marchetti A, Gadducci A, Pellegrini S, Morganti M, Carnicelli V, Cosio S, Gaggioli O, Genazzani AR & Bevilacqua G (1997) p53 alterations are predictive of chemoresistance and aggressiveness in ovarian carcinomas: a molecular and immunohistochemical study. *Br J Cancer* **75**: 230–235
- Castello PR, Drechsel DA & Patel M (2007) Mitochondria are a major source of paraquat-induced reactive oxygen species production in the brain. *J Biol Chem* **282**: 14186–14193
- Chance B, Sies H & Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**: 527–605
- Chang BD, Watanabe K, Broude EV, Fang J, Poole JC, Kalinichenko TV & Roninson IB (2000) Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4291–4296
- Chang E, Donahue J, Smith A, Hornick J, Rao JN, Wang JY & Battafarano RJ (2010) Loss of p53, rather than beta-catenin overexpression, induces survivin-mediated resistance to apoptosis in an esophageal cancer cell line. *J Thorac Cardiovasc Surg* **140**: 225–232
- Chastain PD, Nakamura J, Rao S, Chu H, Ibrahim JG, Swenberg JA & Kaufman DG (2010) Abasic sites preferentially form at regions undergoing DNA replication. *FASEB J* **24**: 3674–3680
- Chen MB, Wu XY, Yu R, Li C, Wang LQ, Shen W & Lu PH (2012a) P53 status as a predictive biomarker for patients receiving neoadjuvant radiation-based treatment: a meta-analysis in rectal cancer. *PLoS One* **7**: e45388
- Chen T, Stephens PA, Middleton FK & Curtin NJ (2012b) Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug Discov Today* **17**: 194–202
- Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM & Sherr CJ (1999) The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J* **18**: 1571–1583
- Chomczynski P & Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156–159
- Chua PJ, Yip GW & Bay BH (2009) Cell cycle arrest induced by hydrogen peroxide is associated with modulation of oxidative stress related genes in breast cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)* **234**: 1086–1094
- Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G & Li BF (1997) Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* **277**: 1996–2000
- Cleaver JE (2011) γ H2Ax: biomarker of damage or functional participant in DNA repair "all that glitters is not gold!". *Photochem Photobiol* **87**: 1230–1239
- Cmielová J & Rezáčová M (2011) p21Cip1/Waf1 protein and its function based on a subcellular localization [corrected]. *J Cell Biochem* **112**: 3502–3506
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M & Lunec J (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* **17**: 1195–1214

- Czaja MJ (2003) The future of GI and liver research: editorial perspectives. III. JNK/AP-1 regulation of hepatocyte death. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**: G875–G879
- Dai C & Gu W (2010) p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med* **16**: 528–536
- Dai Y & Grant S (2010) New insights into checkpoint kinase 1 in the DNA damage response signaling network. *Clin Cancer Res* **16**: 376–383
- D'Amico TA & Harpole DH (2000) Molecular biology of esophageal cancer. *Chest Surg Clin N Am* **10**: 451–469
- Daniel P (2002) Deregulation von Zellzyklus und Apoptose als molekulare Grundlage der Therapieresistenz von Tumoren. *Habilitationsschrift*, Berlin
- Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y & Wang XF (1995) Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 5545–5549
- Davis RJ (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* **268**: 14553–14556
- Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**: 239–252
- De Bruin EC & Medema JP (2008) Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev* **34**: 737–749
- De Feraudy S, Revet I, Bezrookove V, Feeney L & Cleaver JE (2010) A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 6870–6875
- DiPaola RS (2002) To arrest or not to G(2)-M Cell-Cycle arrest. *Clin Cancer Res* **8**: 3311–3314
- Dizdaroglu M, Rao G, Halliwell B & Gajewski E (1991) Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. *Arch Biochem Biophys* **285**: 317–324
- Dolmans DE, Fukumura D & Jain RK (2003) Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* **3**: 380–387
- Driessens N, Versteyhe S, Ghaddhab C, Burniat A, de Deken X, van Sande J, Dumont J, Miot F & Corvilain B (2009) Hydrogen peroxide induces DNA single- and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ. *Endocr Relat Cancer* **16**: 845–856
- Duffey D, Dolgilevich S, Razzouk S, Li L, Green R & Gorti GK (2011) Activating transcription factor-2 in survival mechanisms in head and neck carcinoma cells. *Head Neck* **33**: 1586–1599
- Duyndam MC, van Dam H, Smits PH, Verlaan M, van der Eb AJ & Zantema A (1999) The N-terminal transactivation domain of ATF2 is a target for the co-operative activation of the c-jun promoter by p300 and 12S E1A. *Oncogene* **18**: 2311–2321
- Eberhardt MK (2001) *Reactive oxygen metabolites: Chemistry and medical consequences*. CRC Press, Boca Raton, Florida

- Eke I, Schneider L, Förster C, Zips D, Kunz-Schughart LA & Cordes N (2013) EGFR/JIP-4/JNK2 signaling attenuates cetuximab-mediated radiosensitization of squamous cell carcinoma cells. *Cancer Res* **73**: 297–306
- Fang J, Seki T & Maeda H (2009) Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv Drug Deliv Rev* **61**: 290–302
- Fernandez-Capetillo O, Celeste A & Nussenzweig A (2003) Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell Cycle* **2**: 426–427
- Ferrao PT, Bukczynska EP, Johnstone RW & McArthur GA (2012) Efficacy of CHK inhibitors as single agents in MYC-driven lymphoma cells. *Oncogene* **31**: 1661–1672
- Festjens N, Vanden Berghe T & Vandenabeele P (2006) Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 1371–1387
- Fichter CD, Herz C, Münch C, Opitz OG, Werner M & Lassmann S (2011) Occurrence of multipolar mitoses and association with Aurora-A/-B kinases and p53 mutations in aneuploid esophageal carcinoma cells. *BMC Cell Biol* **12**: 13
- Fiers W, Beyaert R, Declercq W & Vandenabeele P (1999) More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* **18**: 7719–7730
- Foote KM, Blades K, Cronin A, Fillery S, Guichard SS, Hassall L, Hickson I, Jacq X, Jewsbury PJ, McGuire TM, Nissink JW, Odedra R, Page K, Perkins P, Suleman A, Tam K, Thommes P, Broadhurst R & Wood C (2013) Discovery of 4-{4-[(3R)-3-Methylmorpholin-4-yl]-6-[1-(methylsulfonyl)cyclopropyl]pyrimidin-2-yl}-1H-indole (AZ20): a potent and selective inhibitor of ATR protein kinase with monotherapy in vivo antitumor activity. *J Med Chem* **56**: 2125–2138
- Forman HJ & Boveris A (1982) Superoxid radical and hydrogen peroxide in mitochondria. In *Free radicals in biology*, Pryor WA (ed) pp. 65–90. New York: Academic Press
- Freeman AK & Monteiro AN (2010) Phosphatases in the cellular response to DNA damage. *Cell Commun Signal* **8**: 27
- Fridovich I (1970) Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* **245**: 4053–4057
- Fridovich I (1983) Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **23**: 239–257
- Fuchs SY & Ronai Z (1999) Ubiquitination and degradation of ATF2 are dimerization dependent. *Mol Cell Biol* **19**: 3289–3298
- Fuchs SY, Tappin I & Ronai Z (2000) Stability of the ATF2 transcription factor is regulated by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* **275**: 12560–12564
- Gaipl US, Beyer TD, Heyder P, Kuenkele S, Böttcher A, Voll RE, Kalden JR & Herrmann M (2004) Cooperation between C1q and DNase I in the clearance of necrotic cell-derived chromatin. *Arthritis Rheum* **50**: 640–649
- Gartel AL & Tyner AL (1999) Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res* **246**: 280–289
- Gartel AL & Tyner AL (2002) The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* **1**: 639–649

- Geisler S, Lønning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge O, Haugen DF, Lillehaug JR, Akslen LA & Børresen-Dale AL (2001) Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res* **61**: 2505–2512
- Gillis LD, Leidal AM, Hill R & Lee PW (2009) p21Cip1/WAF1 mediates cyclin B1 degradation in response to DNA damage. *Cell Cycle* **8**: 253–256
- Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, Griesinger F, Niederle N, Stuschke M, Blum T, Deppermann KM, Ficker JH, Freitag L, Lübke AS, Reinhold T, Späth-Schwalbe E, Ukena D, Wickert M, Wolf M, Andreas S, Auberger T, Baum RP, Baysal B, Beuth J, Bickeböller H, Böcking A, Bohle RM, Brüske I, Burghuber O, Dickgreber N, Diederich S, Dienemann H, Eberhardt W, Eggeling S, Fink T, Fischer B, Franke M, Friedel G, Gauler T, Gütz S, Hautmann H, Hellmann A, Hellwig D, Herth F, Heußel CP, Hilbe W, Hoffmeyer F, Horneber M, Huber RM, Hübner J, Kauczor HU, Kirchbacher K, Kirsten D, Kraus T, Lang SM, Martens U, Mohn-Staudner A, Müller KM, Müller-Nordhorn J, Nowak D, Ochmann U, Passlick B, Petersen I, Pirker R, Pokrajac B, Reck M, Riha S, Rübe C, Schmittel A, Schönfeld N, Schütte W, Serke M, Stamatis G, Steingraber M, Steins M, Stoelben E, Swoboda L, Teschler H, Tessen TW, Weber M, Werner A, Wichmann HE, Wimmer EI, Witt C & Worth H (2010) Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms: Kurzfassung der Interdisziplinären S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft. *Pneumologie* **64**: e1–e164
- Goto H, Tomono Y, Ajiro K, Kosako H, Fujita M, Sakurai M, Okawa K, Iwamatsu A, Okigaki T, Takahashi T & Inagaki M (1999) Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem* **274**: 25543–25549
- Gozdecka M & Breitwieser W (2012) The roles of ATF2 (activating transcription factor 2) in tumorigenesis. *Biochem Soc Trans* **40**: 230–234
- Grundmann E (2008) *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie*. Elsevier Urban & Fischer, München/Jena
- Guo Y, Xiao P, Lei S, Deng F, Xiao GG, Liu Y, Chen X, Li L, Wu S, Chen Y, Jiang H, Tan L, Xie J, Zhu X, Liang S & Deng H (2008) How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **40**: 426–436
- Gupta S, Campbell D, Dérijard B & Davis RJ (1995) Transcription Factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* **267**: 389–393
- Habold C, Poehlmann A, Bajbouj K, Hartig R, Korkmaz KS, Roessner A & Schneider-Stock R (2008) Trichostatin A causes p53 to switch oxidative-damaged colorectal cancer cells from cell cycle arrest into apoptosis. *J Cell Mol Med* **12**: 607–621
- Haddad JJ (2004) Redox and oxidant-mediated regulation of apoptosis signaling pathways: immuno-pharmaco-redox conception of oxidative siege versus cell death commitment. *Int Immunopharmacol* **4**: 475–493
- Hai T, Wolfgang CD, Marsee DK, Allen AE & Sivaprasad U (1999) ATF3 and stress responses. *Gene Expr* **7**: 321–335

- Hai TW, Liu F, Allegretto EA, Karin M & Green MR (1988) A family of immunologically related transcription factors that includes multiple forms of ATF and AP-1. *Genes Dev* **2**: 1216–1226
- Hai TW, Liu F, Coukos WJ & Green MR (1989) Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes Dev* **3**: 2083–2090
- Halliwell B & Gutteridge JM (2007) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford
- Hamano R, Miyata H, Yamasaki M, Kurokawa Y, Hara J, Moon JH, Nakajima K, Takiguchi S, Fujiwara Y, Mori M & Doki Y (2011) Overexpression of miR-200c induces chemoresistance in esophageal cancers mediated through activation of the Akt signaling pathway. *Clin Cancer Res* **17**: 3029–3038
- Hampton MB & Orrenius S (1997) Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett* **414**: 552–556
- He G, Siddik ZH, Huang Z, Wang R, Koomen J, Kobayashi R, Khokhar AR & Kuang J (2005) Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene* **24**: 2929–2943
- Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP & Allis CD (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* **106**: 348–360
- Henle ES & Linn S (1997) Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem* **272**: 19095–19098
- Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW & Vogelstein B (1997) 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* **1**: 3–11
- Hess J, Angel P & Schorpp-Kistner M (2004) AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* **117**: 5965–5973
- Higuchi Y (2003) Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharmacol* **66**: 1527–1535
- Hochreiter-Hufford A & Ravichandran KS (2013) Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**: a008748
- Howes RM (2010) Hydrogen Peroxide: A review of a scientifically verifiable omnipresent ubiquitous essentiality of obligate, aerobic, carbon-based life forms. *IJPS* **7**: 1
- Hu H, Luo M, Du XL, Feng YB, Zhang Y, Shen XM, Xu X, Cai Y, Han Y & Wang MR (2007) Up-regulated manganese superoxide dismutase expression increases apoptosis resistance in human esophageal squamous cell carcinomas. *Chin Med J (Engl)* **120**: 2092–2098
- Huang X, Halicka HD, Traganos F, Tanaka T, Kurose A & Darzynkiewicz Z (2005) Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell Prolif* **38**: 223–243

- Hur GM, Kim YS, Won M, Choksi S & Liu ZG (2006) The death domain kinase RIP has an important role in DNA damage-induced, p53-independent cell death. *J Biol Chem* **281**: 25011–25017
- Igney FH & Krammer PH (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2**: 277–288
- Innocente SA, Abrahamson JL, Cogswell JP & Lee JM (1999) p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2147–2152
- Izzo JG, Malhotra U, Wu TT, Ensor J, Luthra R, Lee JH, Swisher SG, Liao Z, Chao KS, Hittelman WN, Aggarwal BB & Ajani JA (2006) Association of activated transcription factor nuclear factor kappaB with chemoradiation resistance and poor outcome in esophageal carcinoma. *J Clin Oncol* **24**: 748–754
- Janetka JW & Ashwell S (2009) Checkpoint kinase inhibitors: a review of the patent literature. *Expert Opin Ther Pat* **19**: 165–197
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J & Thun MJ (2009) Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* **59**: 225–249
- Jentzsch AM (1997) *Untersuchungen zu Rolle und Bedeutung reaktiver Sauerstoff-metaboliten im Ischämie/Reperfusionssyndrom*. Köster, Berlin
- Jocelyn PC & Cronshaw A (1985) Properties of mitochondria treated with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene. *Biochem Pharmacol* **34**: 1588–1590
- Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA & Finkel T (1996) Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 11848–11852
- Junttila MR & Evan GI (2009) p53—a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer* **9**: 821–829
- Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Baras N, Barnes B, Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Laudi A, Wolf U & Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Krebsinformationsdienstes, Deutsches Krebsforschungszentrum (2012) *Krebs in Deutschland 2007/2008*. Robert Koch-Institut, Berlin; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Lübeck
- Kamata H & Hirata H (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* **11**: 1–14
- Kandioler-Eckersberger D, Ludwig C, Rudas M, Kappel S, Janschek E, Wenzel C, Schlagbauer-Wadl H, Mittlböck M, Gnant M, Steger G & Jakesz R (2000) TP53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **6**: 50–56
- Kannan K & Jain SK (2000) Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* **7**: 153–163
- Kantari C & Walczak H (2011) Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1813**: 558–563
- Karanam B, Wang L, Wang D, Liu X, Marmorstein R, Cotter R & Cole PA (2007) Multiple roles for acetylation in the interaction of p300 HAT with ATF-2. *Biochemistry* **46**: 8207–8216
- Kardassis D, Papakosta P, Pardali K & Moustakas A (1999) c-Jun transactivates the promoter of the human p21(WAF1/Cip1) gene by acting as a superactivator of the ubiquitous transcription factor Sp1. *J Biol Chem* **274**: 29572–29581

- Karin M, Liu Zg & Zandi E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 240–246
- Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B & Fornace AJ (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* **71**: 587–597
- Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R & Ishioka C (2003) Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8424–8429
- Kawasaki H, Schiltz L, Chiu R, Itakura K, Taira K, Nakatani Y & Yokoyama KK (2000) ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation. *Nature* **405**: 195–200
- Kawasaki H, Song J, Eckner R, Ugai H, Chiu R, Taira K, Shi Y, Jones N & Yokoyama KK (1998) p300 and ATF-2 are components of the DRF complex, which regulates retinoic acid- and E1A-mediated transcription of the c-jun gene in F9 cells. *Genes Dev* **12**: 233–245
- Kennedy RD & D'Andrea AD (2006) DNA repair pathways in clinical practice: lessons from pediatric cancer susceptibility syndromes. *J Clin Oncol* **24**: 3799–3808
- Khoury MP & Bourdon JC (2011) p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor? *Genes Cancer* **2**: 453–465
- Kikuchi K, Soundararajan A, Zarzabal LA, Weems CR, Nelson LD, Hampton ST, Michalek JE, Rubin BP, Fields AP & Keller C (2013) Protein kinase C iota as a therapeutic target in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene* **32**: 286–295
- Kim I, Xu W & Reed JC (2008) Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **7**: 1013–1030
- Kim SH, Kim KH, Yoo BC & Ku JL (2012) Induction of LGR5 by H₂O₂ treatment is associated with cell proliferation via the JNK signaling pathway in colon cancer cells. *Int J Oncol* **41**: 1744–1750
- Krance SM, Keng PC, Palis J & Ballatori N (2010) Transient glutathione depletion determines terminal differentiation in HL-60 cells. *Oxid Med Cell Longev* **3**: 53–60
- Kreuzaler P & Watson CJ (2012) Killing a cancer: what are the alternatives? *Nat Rev Cancer* **12**: 411–424
- Kristiansen M, Hughes R, Patel P, Jacques TS, Clark AR & Ham J (2010) Mkp1 is a c-Jun target gene that antagonizes JNK-dependent apoptosis in sympathetic neurons. *J Neurosci* **30**: 10820–10832
- Kroemer G, Dallaporta B & Resche-Rigon M (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* **60**: 619–642
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B & Melino G (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**: 3–11

- Kumar V, Abbas AK, Fausto N & Mitchel RN (2007) *Robbins basic pathology*. Saunders/Elsevier, Philadelphia PA
- Kushi LH, Byers T, Doyle C, Bandera EV, McCullough M, McTiernan A, Gansler T, Andrews KS, Thun MJ & American Cancer Society 2006 Nutrition and Physical Activity Guidelines Advisory Committee (2006) American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J Clin* **56**: 254–281
- Lau E & Ronai ZA (2012) ATF2 - at the crossroad of nuclear and cytosolic functions. *J Cell Sci* **125**: 2815–2824
- Lau E, Kluger H, Varsano T, Lee K, Scheffler I, Rimm DL, Ideker T & Ronai ZA (2012) PKC ϵ promotes oncogenic functions of ATF2 in the nucleus while blocking its apoptotic function at mitochondria. *Cell* **148**: 543–555
- Le HV, Minn AJ & Massagué J (2005) Cyclin-dependent kinase inhibitors uncouple cell cycle progression from mitochondrial apoptotic functions in DNA-damaged cancer cells. *J Biol Chem* **280**: 32018–32025
- Lemasters JJ, Qian T, Bradham CA, Brenner DA, Cascio WE, Trost LC, Nishimura Y, Nieminen AL & Herman B (1999) Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr* **31**: 305–319
- Lewis JS, Vijayanathan V, Thomas TJ, Pestell RG, Albanese C, Gallo MA & Thomas T (2005) Activation of cyclin D1 by estradiol and spermine in MCF-7 breast cancer cells: a mechanism involving the p38 MAP kinase and phosphorylation of ATF-2. *Oncol Res* **15**: 113–128
- Li M, Luo J, Brooks CL & Gu W (2002) Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem* **277**: 50607–50611
- Li S, Ezhevsky S, Dewing A, Cato MH, Scortegagna M, Bhoumik A, Breitwieser W, Braddock D, Eroshkin A, Qi J, Chen M, Kim JY, Jones S, Jones N, Rickert R & Ronai ZA (2010a) Radiation Sensitivity and Tumor Susceptibility in ATM Phospho-Mutant ATF2 Mice. *Genes Cancer* **1**: 316–330
- Li Z, Ni M, Li J, Zhang Y, Ouyang Q & Tang C (2010b) Decision making of the p53 network: Death by integration. *J Theor Biol* **[Epub ahead of print]**
- Liou G & Storz P (2010) Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* **44**: 479–496
- Liss AS, Tiwari R, Kralova J & Bose HR (2010) Cell transformation by v-Rel reveals distinct roles of AP-1 family members in Rel/NF-kappaB oncogenesis. *Oncogene* **29**: 4925–4937
- Liu DP, Song H & Xu Y (2010) A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. *Oncogene* **29**: 949–956
- Liu H, Deng X, Shyu YJ, Li JJ, Taparowsky EJ & Hu CD (2006) Mutual regulation of c-Jun and ATF2 by transcriptional activation and subcellular localization. *EMBO J* **25**: 1058–1069
- Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA & Elledge SJ (2000) Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* **14**: 1448–1459

- Löffler G (2005) *Basiswissen Biochemie: Mit Pathobiochemie*. Springer, Heidelberg
- Lopez-Bergami P, Lau E & Ronai Z (2010) Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nat Rev Cancer* **10**: 65–76
- López-Lázaro M (2010) A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. *Mol Med* **16**: 144–153
- Loughery J, Meek D (2013) Switching on p53: an essential role for protein phosphorylation? *BioDiscovery* **8**: 1
- Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, Housman DE & Jacks T (1994) p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* **266**: 807–810
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265–275
- Lu C, Zhu F, Cho YY, Tang F, Zykova T, Ma WY, Bode AM & Dong Z (2006) Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3. *Mol Cell* **23**: 121–132
- Ma Q, Li X, Vale-Cruz D, Brown ML, Beier F & LuValle P (2007) Activating transcription factor 2 controls Bcl-2 promoter activity in growth plate chondrocytes. *J Cell Biochem* **101**: 477–487
- Maekawa T, Sakura H, Kanei-Ishii C, Sudo T, Yoshimura T, Fujisawa J, Yoshida M & Ishii S (1989) Leucine zipper structure of the protein CRE-BP1 binding to the cyclic AMP response element in brain. *EMBO J* **8**: 2023–2028
- Maekawa T, Sano Y, Shinagawa T, Rahman Z, Sakuma T, Nomura S, Licht JD & Ishii S (2008) ATF-2 controls transcription of Maspin and GADD45 alpha genes independently from p53 to suppress mammary tumors. *Oncogene* **27**: 1045–1054
- Mahidhara RS, Queiroz De Oliveira PE, Kohout J, Beer DG, Lin J, Watkins SC, Robbins PD & Hughes SJ (2005) Altered trafficking of Fas and subsequent resistance to Fas-mediated apoptosis occurs by a wild-type p53 independent mechanism in esophageal adenocarcinoma. *J Surg Res* **123**: 302–311
- Mäntymaa P, Siitonen T, Guttorm T, Säily M, Kinnula V, Savolainen ER & Koistinen P (2000) Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase confers resistance to apoptosis in acute myeloblastic leukaemia cells exposed to etoposide. *Br J Haematol* **108**: 574–581
- Manzl C, Krumschnabel G, Bock F, Sohm B, Labi V, Baumgartner F, Logette E, Tschopp J & Villunger A (2009) Caspase-2 activation in the absence of PIDDosome formation. *J Cell Biol* **185**: 291–303
- Massagué J (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **432**: 298–306
- Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P & Moll UM (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* **11**: 577–590
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B & Reed JC (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* **9**: 1799–1805

- Moehler M, Al-Batran SE, Andus T, Anthuber M, Arends J, Arnold D, Aust D, Baier P, Baretton G, Bernhardt J, Boeing H, Böhle E, Bokemeyer C, Bornschein J, Budach W, Burmester E, Caca K, Diemer WA, Dietrich CF, Ebert M, Eickhoff A, Ell C, Fahlke J, Feussner H, Fietkau R, Fischbach W, Fleig W, Flentje M, Gabbert HE, Galle PR, Geissler M, Gockel I, Graeven U, Grenacher L, Gross S, Hartmann JT, Heike M, Heinemann V, Herbst B, Herrmann T, Höcht S, Hofheinz RD, Höfler H, Höhler T, Hölscher AH, Horneber M, Hübner J, Izbicki JR, Jakobs R, Jenssen C, Kanzler S, Keller M, Kiesslich R, Klautke G, Körber J, Krause BJ, Kuhn C, Kullmann F, Lang H, Link H, Lordick F, Ludwig K, Lutz M, Mahlberg R, Malfertheiner P, Merkel S, Messmann H, Meyer HJ, Mönig S, Piso P, Pistorius S, Porschen R, Rabenstein T, Reichardt P, Ridwelski K, Röcken C, Roetzer I, Rohr P, Schepp W, Schlag PM, Schmid RM, Schmidberger H, Schmiegel WH, Schmoll HJ, Schuch G, Schuhmacher C, Schütte K, Schwenk W, Selgrad M, Sendler A, Seraphin J, Seufferlein T, Stahl M, Stein H, Stoll C, Stuschke M, Tannapfel A, Tholen R, Thuss-Patience P, Treml K, Vanhoefer U, Vieth M, Vogelsang H, Wagner D, Wedding U, Weimann A, Wilke H, Wittekind C; AWMF; AWMF. (2011) German S3-guideline "Diagnosis and treatment of esophagogastric cancer". *Z Gastroenterol* **49**: 461–531
- Moll UM & Petrenko O (2003) The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res* **1**: 1001–1008
- Montero AJ & Jassem J (2011) Cellular redox pathways as a therapeutic target in the treatment of cancer. *Drugs* **71**: 1385–1396
- Montero J, Dutta C, van Bodegom D, Weinstock D & Letai A (2013) p53 regulates a non-apoptotic death induced by ROS. *Cell Death Differ* doi: 10.1038/cdd.2013.52.
- Mronga T, Stahnke T, Goldbaum O & Richter-Landsberg C (2004) Mitochondrial pathway is involved in hydrogen-peroxide-induced apoptotic cell death of oligodendrocytes. *Glia* **46**: 446–455
- Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi J, Chen BP, Chen DJ, Chatterjee A & Burma S (2006) DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst.)* **5**: 575–590
- Nakamura T, Okuyama S, Okamoto S, Nakajima T, Sekiya S & Oda K (1995) Down-regulation of the cyclin-A promoter in differentiating human embryonal carcinoma-cells is mediated by depletion of ATF-1 and ATF-2 in the complex at the ATF/CRE site. *Exp Cell Res* **216**: 422–430
- Nakano K & Vousden KH (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**: 683–694
- Newman JR & Keating AE (2003) Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays. *Science* **300**: 2097–2101
- O'Connor PM, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M, Scudiero DA, Monks A, Sausville EA, Weinstein JN, Friend S, Fornace AJ & Kohn KW (1997) Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* **57**: 4285–4300
- Ohki R, Nemoto J, Murasawa H, Oda E, Inazawa J, Tanaka N & Taniguchi T (2000) Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J Biol Chem* **275**: 22627–22630

- Ohlenschläger G (2000) *Freie Radikale, Oxidativer Stress und Antioxidantien: Krankheitsverursachende, präventive und reparative Prinzipien in lebenden Systemen*. Reglin, Köln
- Ohno Y & Gallin JI (1985) Diffusion of extracellular hydrogen peroxide into intracellular compartments of human neutrophils. Studies utilizing the inactivation of myeloperoxidase by hydrogen peroxide and azide. *J Biol Chem* **260**: 8438–8446
- Ouwens DM, de Ruiter ND, van der Zon GC, Carter AP, Schouten J, van der Burgt C, Kooistra K, Bos JL, Maassen JA & van Dam H (2002) Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38. *EMBO J* **21**: 3782–3793
- Ozaki T & Nakagawara A (2011a) p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. *J Biomed Biotechnol* **2011**: 603925
- Ozaki T & Nakagawara A (2011b) Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers* **3**: 994–1013
- Ozben T (2007) Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci* **96**: 2181–2196
- Papassava P, Gorgoulis VG, Papaevangelidou D, Vlahopoulos S, van Dam H & Zoumpourlis V (2004) Overexpression of activating transcription factor-2 is required for tumor growth and progression in mouse skin tumors. *Cancer Res* **64**: 8573–8584
- Park I, Hwang JT, Kim YM, Ha J & Park OJ (2006) Differential modulation of AMPK signaling pathways by low or high levels of exogenous reactive oxygen species in colon cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* **1091**: 102–109
- Pelicano H, Carney D & Huang P (2004) ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* **7**: 97–110
- Perez RP (1998) Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer* **34**: 1535–1542
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45
- Plummer JL, Smith BR, Sies H & Bend JR (1981) Chemical depletion of glutathione in vivo. *Methods Enzymol* **77**: 50–59
- Podhorecka M, Skladanowski A & Bozko P (2010) H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J Nucleic Acids* **2010**. pii: 920161
- Poehlmann A & Roessner A (2010) Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. *Pathol Res Pract* **206**: 591–601
- Poehlmann A, Hahold C, Walluscheck D, Reissig K, Bajbouj K, Ullrich O, Hartig R, Gali-Muhtasib H, Diestel A, Roessner A & Schneider-Stock R (2011) Cutting edge: Chk1 directs senescence and mitotic catastrophe in recovery from G₂ checkpoint arrest. *J Cell Mol Med* **15**: 1528–1541

- Posch C, Moslehi H, Feeney L, Green GA, Ebaee A, Feichtenschlager V, Chong K, Peng L, Dimon MT, Phillips T, Daud AI, McCalmont TH, LeBoit PE & Ortiz-Urda S (2013) Combined targeting of MEK and PI3K/mTOR effector pathways is necessary to effectively inhibit NRAS mutant melanoma in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 4015–4020
- Potapova O, Basu S, Mercola D & Holbrook NJ (2001) Protective role for c-Jun in the cellular response to DNA damage. *J Biol Chem* **276**: 28546–28553
- Proskuryakov SY & Gabai VL (2010) Mechanisms of tumor cell necrosis. *Curr Pharm Des* **16**: 56–68
- Robert V, Michel P, Flaman JM, Chiron A, Martin C, Charbonnier F, Paillot B & Frebourg T (2000) High frequency in esophageal cancers of p53 alterations inactivating the regulation of genes involved in cell cycle and apoptosis. *Carcinogenesis* **21**: 563–565
- Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y & Bonner WM (2000) Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem* **275**: 9390–9395
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS & Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**: 5858–5868
- Ronai Z, Yang YM, Fuchs SY, Adler V, Sardana M & Herlyn M (1998) ATF2 confers radiation resistance to human melanoma cells. *Oncogene* **16**: 523–531
- Ronai ZA, Bhoumik A, Cosford NDP & Dahl R (2011) Compositions and methods for inhibiting growth and metastasis of melanoma. *Patent* US 2011/0166216 A1
- Ryan KM (2011) p53 and autophagy in cancer: guardian of the genome meets guardian of the proteome. *Eur. J. Cancer* **47**: 44–50
- Rybaczek D & Kowalewicz-Kulbat M (2013) Relation of the types of DNA Damage to Replication Stress and the Induction of Premature Chromosome Condensation. In *New Research Directions in DNA Repair*, Chen C (ed) pp 231–248, New York: InTech
- Salakou S, Kardamakis D, Tsamandas AC, Zolota V, Apostolakis E, Tzelepi V, Papathanasopoulos P, Bonikos DS, Papapetropoulos T, Petsas T & Dougenis D (2007) Increased Bax/Bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis. *In Vivo* **21**: 123–132
- Salameh A, Galvagni F, Anselmi F, De Clemente C, Orlandini M & Oliviero S (2010) Growth factor stimulation induces cell survival by c-Jun. ATF2-dependent activation of Bcl-XL. *J Biol Chem* **285**: 23096–23104
- Sano Y, Tokitou F, Dai P, Maekawa T, Yamamoto T & Ishii S (1998) CBP alleviates the intramolecular inhibition of ATF-2 function. *J Biol Chem* **273**: 29098–29105
- Scaffidi P, Misteli T & Bianchi ME (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**: 191–195
- Scandalios JG (2002) Oxidative stress responses--what have genome-scale studies taught us? *Genome Biol* **3**: REVIEWS1019.

- Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Graeven U, Heinemann V, Porschen R, Riemann J, Rödel C, Sauer R, Wieser M, Schmitt W, Schmoll HJ, Seufferlein T, Kopp I & Pox C (2008) Update S3-guideline „colorectal cancer“ 2008 *Z Gastroenterol* **46**: 799–840
- Schug ZT, Gonzalez F, Houtkooper RH, Vaz FM & Gottlieb E (2011) BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. *Cell Death Differ* **18**: 538–548
- Schumacker PT (2006) Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell* **10**: 175–176
- Shacter E, Williams JA, Hinson RM, Sentürker S & Lee YJ (2000) Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy: inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis. *Blood* **96**: 307–313
- Shaheen NJ, Crosby MA, Bozyski EM & Sandler RS (2000) Is there publication bias in the reporting of cancer risk in Barrett's esophagus? *Gastroenterology* **119**: 333–338
- Sharma A, Singh K & Almasan A (2012) Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods Mol Biol* **920**: 613–626
- Shaulian E & Karin M (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* **4**: E131-E136
- Sheikh MS, Li XS, Chen JC, Shao ZM, Ordonez JV & Fontana JA (1994) Mechanisms of regulation of WAF1/Cip1 gene expression in human breast carcinoma: role of p53-dependent and independent signal transduction pathways. *Oncogene* **9**: 3407–3415
- Sherr CJ (1996) Cancer cell cycles. *Science* **274**: 1672–1677
- Sherr CJ & McCormick F (2002) The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**: 103–112
- Sherr CJ & Roberts JM (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **9**: 1149–1163
- Shieh SY, Ikeda M, Taya Y & Prives C (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **91**: 325–334
- Sies H (1985) *Oxidative stress*. Academic Press, London
- Silva MT (2010) Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett* **584**: 4491–4499
- Simon AR, Rai U, Fanburg BL & Cochran BH (1998) Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am J Physiol* **275**: C1640-C1652
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR & Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* **175**: 184–191
- Skulachev VP (2006) Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis* **11**: 473–485
- Smith J, Tho LM, Xu N & Gillespie DA (2010) The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* **108**: 73–112
- Smith RA, Cokkinides V & Eyre HJ (2006) American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer, 2006. *CA Cancer J Clin* **56**: 11–25

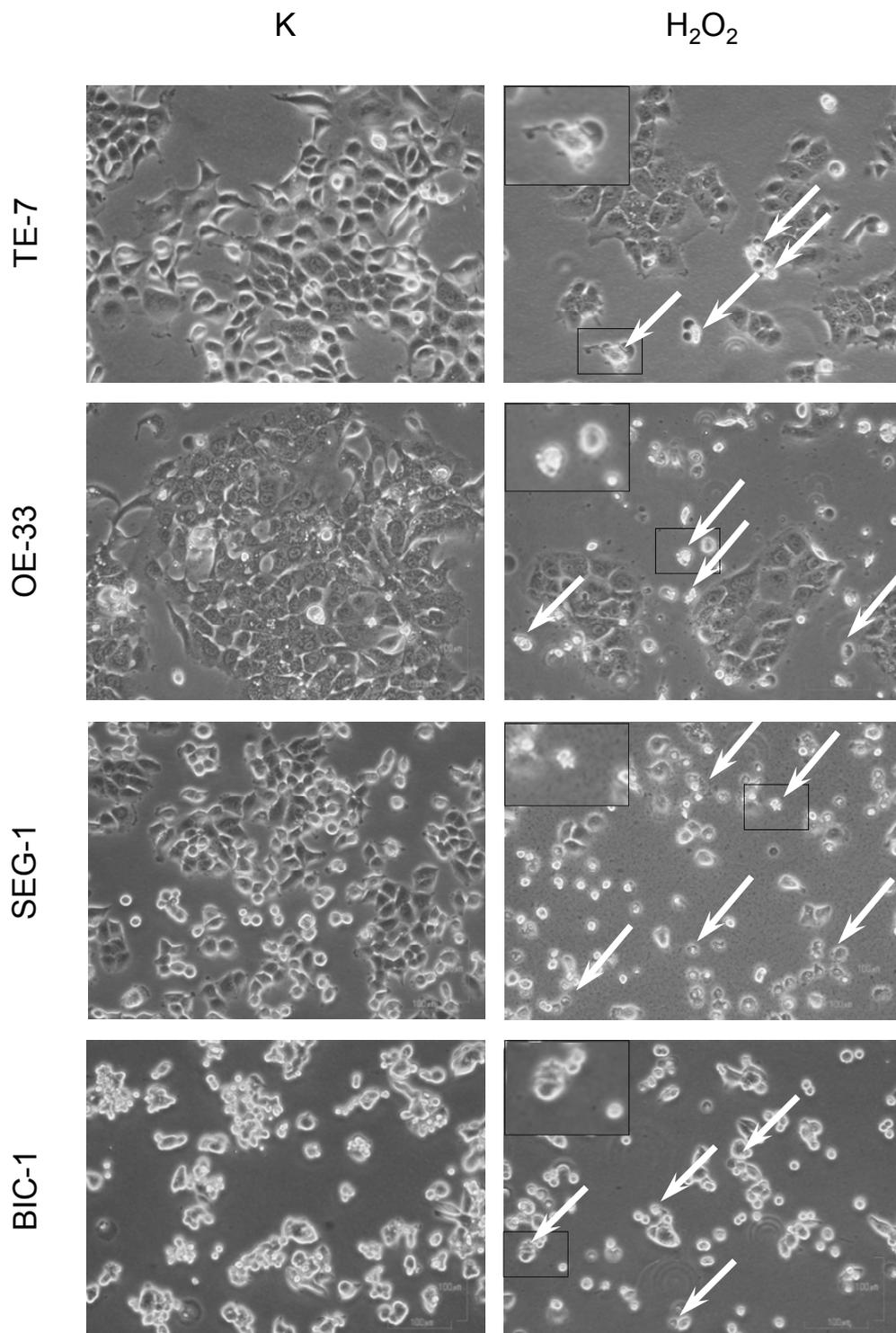
- Sohn D, Essmann F, Schulze-Osthoff K & Jänicke RU (2006) p21 blocks irradiation-induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase-mediated caspase-9 activation. *Cancer Res* **66**: 11254–11262
- Son Y, Cheong YK, Kim NH, Chung HT, Kang DG & Pae HO (2011) Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J Signal Transduct* **2011**: 792639
- Song H, Ki SH, Kim SG & Moon A (2006) Activating transcription factor 2 mediates matrix metalloproteinase-2 transcriptional activation induced by p38 in breast epithelial cells. *Cancer Res* **66**: 10487–10496
- Soussi T (2007) p53 alterations in human cancer: more questions than answers. *Oncogene* **26**: 2145–2156
- Squadrito F, Minutoli L, Esposito M, Bitto A, Marini H, Seminara P, Crisafulli A, Passaniti M, Adamo EB, Marini R, Guarini S & Altavilla D (2005) Lipid peroxidation triggers both c-Jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular-regulated kinase (ERK) activation and neointimal hyperplasia induced by cessation of blood flow in the mouse carotid artery. *Atherosclerosis* **178**: 295–302
- Steinmüller L, Cibelli G, Moll JR, Vinson C & Thiel G (2001) Regulation and composition of activator protein 1 (AP-1) transcription factors controlling collagenase and c-Jun promoter activities. *Biochem J* **360**: 599–607
- Storz P (2005) Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci* **10**: 1881–1896
- Staszewski O (2007) Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen über γ -H2AX Immunhistochemie nach Einwirkung genotoxischer Agenzien auf Säugerkellen. *Dissertation* <http://ubm.opus.hbz-nrw.de/volltexte/2007/1269/pdf/diss.pdf>
- Sullivan KD, Gallant-Behm CL, Henry RE, Fraikin JL & Espinosa JM (2012) The p53 circuit board. *Biochim Biophys Acta* **1825**: 229–244
- Summers KC, Shen F, Sierra Potchanant EA, Phipps EA, Hickey RJ & Malkas LH (2011) Phosphorylation: the molecular switch of double-strand break repair. *Int J Proteomics* **2011**: 373816
- Suzuki K & Matsubara H (2011) Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J Biomed Biotechnol* **2011**: 978312
- Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, Sasaki S, Imai K, Shibue T, Honda K & Taniguchi T (2003) Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* **424**: 516–523
- Tandon VR, Sharma S, Mahajan A & Bardi GH (2005) Oxidative Stress: a novel strategy in cancer treatment. *New Horizons* **7**: 1–3
- Tang JJ, Shen C & Lu YJ (2006) Requirement for pre-existing of p21 to prevent doxorubicin-induced apoptosis through inhibition of caspase-3 activation. *Mol Cell Biochem* **291**: 139–144
- Taylor WR & Stark GR (2001) Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* **20**: 1803–1815
- Townsend DM, Pazoles CJ & Tew KD (2008) NOV-002, a mimetic of glutathione disulfide. *Expert Opin Investig Drugs* **17**: 1075–1083

- Trachootham D, Alexandre J & Huang P (2009a) Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* **8**: 579–591
- Trachootham D, Zhang W & Huang P (2009b) Oxidative stress and drug resistance in cancer. In *Drug Resistance in Cancer Cells*, Siddik ZH & Mehta K (eds) pp. 137–175 New York: Springer-Verlag
- Tsao YP, Huang SJ, Chang JL, Hsieh JT, Pong RC & Chen SL (1999) Adenovirus-mediated p21((WAF1/SDII/CIP1)) gene transfer induces apoptosis of human cervical cancer cell lines. *J Virol* **73**: 4983–4990
- Tsukada T, Watanabe M & Yamashima T (2001) Implications of CAD and DNase II in ischemic neuronal necrosis specific for the primate hippocampus. *J Neurochem* **79**: 1196–1206
- Ubezio P & Civoli F (1994) Flow cytometric detection of hydrogen peroxide production induced by doxorubicin in cancer cells. *Free Radic Biol Med* **16**: 509–516
- Ugai H, Uchida K, Kawasaki H & Yokoyama KK (1999) The coactivators p300 and CBP have different functions during the differentiation of F9 cells. *J Mol Med* **77**: 481–494
- Ulukaya E, Acilan C & Yilmaz Y (2011) Apoptosis: why and how does it occur in biology? *Cell Biochem Funct* **29**: 468–480
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M & Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 44–84
- van Dam H, Duyndam M, Rottier R, Bosch A, de Vries-Smits L, Herrlich P, Zantema A, Angel P & van der Eb AJ (1993) Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J* **12**: 479–487
- van Dam H, Wilhelm D, Herr I, Steffen A, Herrlich P & Angel P (1995) ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J* **14**: 1798–1811
- Varna M, Bousquet G, Plassa LF, Bertheau P & Janin A (2011) TP53 status and response to treatment in breast cancers. *J Biomed Biotechnol* **2011**: 284584
- Vaseva AV & Moll UM (2009) The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta* **1787**: 414–420
- Vaseva AV, Marchenko ND, Ji K, Tsirka SE, Holzmann S & Moll UM (2012) p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell* **149**: 1536–1548
- Velculescu VE & El-Deiry WS (1996) Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin Chem* **42**: 858–868
- Vidimar V, Meng X, Klajner M, Licon C, Fetzer L, Harlepp S, Hébraud P, Sidhoum M, Sirlin C, Loeffler JP, Mellitzer G, Sava G, Pfeffer M & Gaiddon C (2012) Induction of caspase 8 and reactive oxygen species by ruthenium-derived anticancer compounds with improved water solubility and cytotoxicity. *Biochem Pharmacol* **84**: 1428–1436

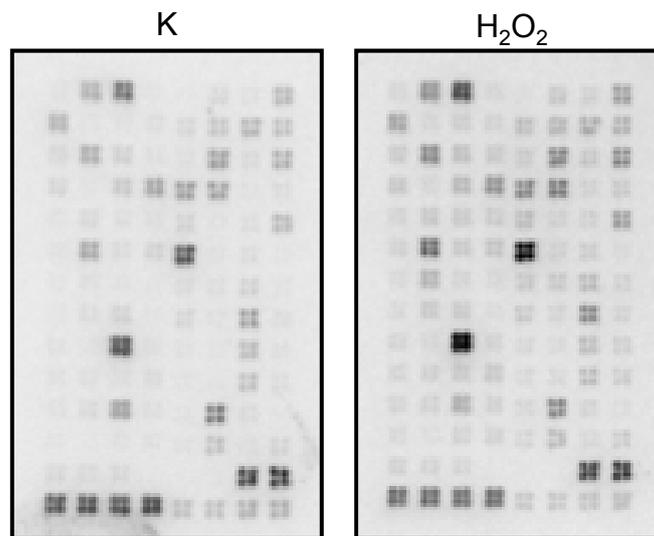
- Viswanath V, Wu Y, Boonplueang R, Chen S, Stevenson FF, Yantiri F, Yang L, Beal MF & Andersen JK (2001) Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease. *J Neurosci* **21**: 9519–9528
- Vogelstein B, Sur S & Prives C (2010) p53 : The Most Frequently Altered Gene in Human Cancers. *Nature Education* **3**: 6
- Vogt PK & Reed SI (1998) *Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitors*. Springer-Verlag, Secaucus
- Vousden KH & Prives C (2009) Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* **137**: 413–431
- Wada T & Penninger JM (2004) Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* **23**: 2838–2849
- Wahl GM & Carr AM (2001) The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat Cell Biol* **3**: E277-E286
- Wang SP, Wang WL, Chang YL, Wu CT, Chao YC, Kao SH, Yuan A, Lin CW, Yang SC, Chan WK, Li KC, Hong TM & Yang PC (2009) p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nat Cell Biol* **11**: 694–704
- Ward IM & Chen J (2001) Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* **276**: 47759–47762
- Ward IM, Minn K & Chen J (2004) UV-induced ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) activation requires replication stress. *J Biol Chem* **279**: 9677–9680
- Whitmarsh AJ & Davis RJ (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* **74**: 589–607
- Wittekind C & Meyer HJ (2010) *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- Wondrak GT (2009) Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. *Antioxid Redox Signal* **11**: 3013–3069
- Wu Y, Mehew JW, Heckman CA, Arcinas M & Boxer LM (2001) Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* **20**: 240–251
- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R & Beach D (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**: 701–704
- Yamakawa N, Takahashi A, Mori E, Imai Y, Furusawa Y, Ohnishi K, Kirita T & Ohnishi T (2008) High LET radiation enhances apoptosis in mutated p53 cancer cells through Caspase-9 activation. *Cancer Sci* **99**: 1455–1460
- Yokoyama S & Fisher DE (2011) Transcriptional regulation in melanoma. In *Melanoma Development: Molecular Biology, Genetics and Clinical Application*, Bosserhoff A (ed) pp. 79–103. Wien: Springer-Verlag
- Yoshioka A, Miyata H, Doki Y, Yasuda T, Yamasaki M, Motoori M, Okada K, Matsuyama J, Makari Y, Sohma I, Takiguchi S, Fujiwara Y & Monden M (2008) The activation of Akt during preoperative chemotherapy for esophageal cancer correlates with poor prognosis. *Oncol Rep* **19**: 1099–1107

- Yu J & Zhang L (2003) No PUMA, no death: implications for p53-dependent apoptosis. *Cancer Cell* **4**: 248–249
- Zegura B & Filipic M (2004) Application of In Vitro Comet Assay for Genotoxicity Testing. In *Optimization in Drug Discovery*, Yan Z & Caldwell GW (eds) pp. 301–313. Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- Zhang SS, Huang QY, Yang H, Xie X, Luo KJ, Wen J, Cai XL, Yang F, Hu Y & Fu JH (2013) Correlation of p53 Status with the Response to Chemotherapy-Based Treatment in Esophageal Cancer: A Meta-Analysis. *Ann Surg Oncol* **20**: 2419–2427
- Zhang Y & Dong C (2007) Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling. *Cell Mol Life Sci* **64**: 2771–2789
- Zhao R, Fang SH, Lin KN, Huang XQ, Lu YB, Zhang WP & Wei EQ (2011) Pranlukast attenuates hydrogen peroxide-induced necrosis in endothelial cells by inhibiting oxygen reactive species-mediated collapse of mitochondrial membrane potential. *J Cardiovasc Pharmacol* **57**: 479–488
- Zhao Y, Li R, Xia W, Neuzil J, Lu Y, Zhang H, Zhao X, Zhang X, Sun C & Wu K (2010) Bid integrates intrinsic and extrinsic signaling in apoptosis induced by alpha-tocopheryl succinate in human gastric carcinoma cells. *Cancer Lett* **288**: 42–49
- Zhou X, Li D, Resnick MB, Behar J, Wands J & Cao W (2011) Signaling in H₂O₂-induced increase in cell proliferation in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* **339**: 218–227
- Zhu Y, Liao H, Wang N, Ma KS, Verna LK, Shyy JY, Chien S & Stemerman MB (2001) LDL-activated p38 in endothelial cells is mediated by Ras. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**: 1159–1164

8 Anhang



Anhang 1: Morphologie der Zellen der Karzinomzelllinien TE-7, OE-33, SEG-1 und BIC-1 un-
behandelt (K) und 24 h nach der H₂O₂-Behandlung (H₂O₂)
Die Pfeile kennzeichnen apoptotische Zellen.



Anhang 2: cDNA-*Microarray*-Analyse – Differentielle mRNA-Expression verschiedener Gene der TE-7-Karzinomzellen 30 min nach der H₂O₂-Behandlung
H₂O₂ - H₂O₂-Behandlung, K - unbehandelt

Anhang

Anhang 3: Differentielles Genexpressionsprofil von H₂O₂-behandelten TE-7-Zellen erhalten durch den cDNA *Microarray* „*Signal transduction pathway finder*“ (SuperArray) - Analysen 30 min nach der Behandlung – Einordnung der differentiell exprimierten Gene in KEGG-Signalwege

	Gen	x-fache Expressions-änderung	Genbank
Pathway in cancer (15)			
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>	2,23 ↑	L22474
BIRC2 (c-IAP2)	<i>Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 2</i>	3,85 ↑	U45879
BIRC3 (c-IAP1)	<i>Inhibitor of apoptosis protein 1</i>	2,27 ↑	U37546
CCND1 (cyclin D1)	<i>Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)</i>	ne	M64349
CDK2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>	2,47 ↑	X61622
CDKN1A (p21 ^{WAF1} /p21 ^{CIP1})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21^{WAF1})</i>	3,76 ↑	L47233
CDKN2A (p16 ^{INK4})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits Cdk4)</i>	5,16 ↑	U26727
CDKN2B (p15 ^{INK2b})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits Cdk4)</i>	ne	L36844
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	2,33 ↑	X00588
HSPCA (hsp90)	<i>Hsp90 (Human mRNA for 90-kDa heat-shock protein)</i>	2,39 ↑	X15183
HIP	<i>Hedgehog-interacting protein</i>	ne	AY009317
JUN (c-jun)	<i>Jun proto-oncogen</i>	ne	J04111
PTCH2 (patched 2)	<i>Patched (Drosophila) homolog 2</i>	4,86 ↑	AF091501
FOS (c-fos)	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>	ne	V01512
MYC (c-myc)	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>	2,41 ↑	X00364
Cell cycle (10)			
CCND1 (cyclin D1)	<i>Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)</i>	ne	M64349
CDK2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>	2,47 ↑	X61622
CDKN1A (p21 ^{WAF1} /p21 ^{CIP1})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21^{WAF1})</i>	3,76 ↑	L47233
CDKN1C (p57 ^{KIP2})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57^{KIP2})</i>	2,77 ↑	U22398

Anhang

CDKN2A (p16 ^{INK4})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits Cdk4)</i>	5,16 ↑	U26727
CDKN2B (p15 ^{INK2b})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits Cdk4)</i>	ne	L36844
CDKN2C (p18, Cdk4 inhibition)	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits Cdk4)</i>	22,72 ↑	U17074
CDKN2D (p19)	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits Cdk4)</i>	2,24 ↑	U40343
GADD45A (gadd45)	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>	ne	M60974
MYC (c-myc)	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>	2,41 ↑	X00364

P53 signaling pathway (6)

BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>	2,23 ↑	L22474
CCND1 (cyclin D1)	<i>Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)</i>	ne	M64349
CDK2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>	2,47 ↑	X61622
CDKN1A (p21 ^{WAF1} /p21 ^{CIP1})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21^{WAF1})</i>	3,76 ↑	L47233
CDKN2A (p16 ^{INK4})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits Cdk4)</i>	5,16 ↑	U26727
GADD45A (gadd45)	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>	ne	M60974

Bladder cancer (5)

CCND1 (cyclin D1)	<i>Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)</i>	ne	M64349
CDKN1A (p21 ^{WAF1} /p21 ^{CIP1})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21^{WAF1})</i>	3,76 ↑	L47233
CDKN2A (p16 ^{INK4})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits Cdk4)</i>	5,16 ↑	U26727
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	2,33 ↑	X00588
MYC (c-myc)	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>	2,41 ↑	X00364

Small cell lung cancer (6)

BIRC2 (c-IAP2)	<i>Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 2</i>	3,85 ↑	U45879
BIRC3 (c-IAP1)	<i>Inhibitor of apoptosis protein 1</i>	2,27 ↑	U37546
CCND1 (cyclin D1)	<i>Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)</i>	ne	M64349
CDK2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>	2,47 ↑	X61622

Anhang

CDKN2B (p15 ^{INK2b})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits Cdk4)</i>	ne	L36844
MYC (c-myc)	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>	2,41 ↑	X00364

Colorectal cancer (6)

BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>	2,23 ↑	L22474
CCND1 (cyclin D1)	<i>Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)</i>	ne	M64349
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	2,33 ↑	X00588
JUN (c-jun)	<i>Jun proto-oncogen</i>	ne	J04111
FOS (c-fos)	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>	ne	V01512
MYC (c-myc)	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>	2,41 ↑	X00364

Prostate cancer (5)

CCND1 (cyclin D1)	<i>Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)</i>	ne	M64349
CDK2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>	2,47 ↑	X61622
CDKN1A (p21 ^{WAF1} /p21 ^{CIP1})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21^{WAF1})</i>	3,76 ↑	L47233
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	2,33 ↑	X00588
HSPCA (hsp90)	<i>Hsp90 (Human mRNA for 90-kDa heat-shock protein)</i>	2,39 ↑	X15183

MAPK signaling pathway (7)

ATF-2 (Creb-2)	<i>cAMP responsive element binding protein 2</i>	2,68 ↑	X15875
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	2,33 ↑	X00588
GADD45A (gadd45)	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>	ne	M60974
HSPB1 (hsp27)	<i>Heat shock 27 KD protein</i>	3,65 ↑	Z23090
JUN (c-jun)	<i>Jun proto-oncogen</i>	ne	J04111
FOS (c-fos)	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>	ne	V01512
MYC (c-myc)	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>	2,41 ↑	X00364

Glioma (4)

CCND1 (cyclin D1)	<i>Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)</i>	ne	M64349
-------------------	--	----	--------

Anhang

CDKN1A (p21 ^{WAF1} /p21 ^{CIP1})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21^{WAF1})</i>	3,76 ↑	L47233
CDKN2A (p16 ^{INK4})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits Cdk4)</i>	5,16 ↑	U26727
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	2,33 ↑	X00588

Melanoma (4)

CCND1 (cyclin D1)	<i>Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)</i>	ne	M64349
CDKN1A (p21 ^{WAF1} /p21 ^{CIP1})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21^{WAF1})</i>	3,76 ↑	L47233
CDKN2A (p16 ^{INK4})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits Cdk4)</i>	5,16 ↑	U26727
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	2,33 ↑	X00588

Chronic myeloid leukemia (4)

CCND1 (cyclin D1)	<i>Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)</i>	ne	M64349
CDKN1A (p21 ^{WAF1} /p21 ^{CIP1})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21^{WAF1})</i>	3,76 ↑	L47233
CDKN2A (p16 ^{INK4})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits Cdk4)</i>	5,16 ↑	U26727
MYC (c-myc)	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>	2,41 ↑	X00364

ErbB signaling pathway (4)

CDKN1A (p21 ^{WAF1} /p21 ^{CIP1})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21^{WAF1})</i>	3,76 ↑	L47233
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	2,33 ↑	X00588
JUN (c-jun)	<i>Jun proto-oncogen</i>	ne	J04111
MYC (c-myc)	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>	2,41 ↑	X00364

Focal adhesion (5)

BIRC2 (c-IAP2)	<i>Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 2</i>	3,85 ↑	U45879
BIRC3 (c-IAP1)	<i>Inhibitor of apoptosis protein 1</i>	2,27 ↑	U37546
CCND1 (cyclin D1)	<i>Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)</i>	ne	M64349
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	2,33 ↑	X00588
JUN (c-jun)	<i>Jun proto-oncogen</i>	ne	J04111

Endometrial cancer (3)

CCND1 (cyclin D1)	<i>Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)</i>	ne	M64349
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	2,33 ↑	X00588
MYC (c-myc)	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>	2,41 ↑	X00364

Non-small cell lung cancer (3)

CCND1 (cyclin D1)	<i>Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)</i>	ne	M64349
CDKN2A (p16 ^{INK4})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits Cdk4)</i>	5,16 ↑	U26727
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	2,33 ↑	X00588

NOD-like receptor signaling pathway (3)

BIRC2 (c-IAP2)	<i>Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 2</i>	3,85 ↑	U45879
BIRC3 (c-IAP1)	<i>Inhibitor of apoptosis protein 1</i>	2,27 ↑	U37546
HSPCA (hsp90)	<i>Hsp90 (Human mRNA for 90-kDa heat-shock protein)</i>	2,39 ↑	X15183

Pancreatic cancer (3)

CCND1 (cyclin D1)	<i>Cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)</i>	ne	M64349
CDKN2A (p16 ^{INK4})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits Cdk4)</i>	5,16 ↑	U26727
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	2,33 ↑	X00588

Apoptosis (3)

BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>	2,23 ↑	L22474
BIRC2 (c-IAP2)	<i>Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 2</i>	3,85 ↑	U45879
BIRC3 (c-IAP1)	<i>Inhibitor of apoptosis protein 1</i>	2,27 ↑	U37546

Not in the output (14)

CEBPB (C/EBP-beta)	<i>Homo sapiens CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta</i>	3,24 ↑	NM_005194
CD5	<i>T-cell surface glycoprotein CD5</i>	3,00 ↑	X04391
CTSD (cathepsin D)	<i>Cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)</i>	3,49 ↑	M11233

Anhang

CDX1	<i>Homo sapiens caudal type homeo box transcription factor 1</i>	ne	NM_001804
CYP19 (aromatase p450)	<i>Cytochrome P450, subfamily XIX (aromatization of androgens)</i>	2,17 ↑	Y07508
EGR1 (egr-1)	<i>Early growth response 1</i>	2,96 ↑	X52541
HNF3B (forkhead box A2)	<i>Hepatocyte nuclear factor 3, beta</i>	3,22 ↑	AB028021
GYS1 (GS, glycogensynthase)	<i>Homo sapiens glycogen synthase 1 (muscle)</i>	4,73 ↑	NM_002103
HOXB1	<i>Homo sapiens homeo box B1</i>	3,34 ↑	NM_002144
ICAM1	<i>Intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor</i>	ne	NM_000201
IL4	<i>Interleukin 4</i>	ne	M13982
JUNB (jun-B)	<i>Jun B proto-oncogene</i>	ne	X51345
KLK2 (hGK2)	<i>Prostrate kallikrein 2</i>	ne	NM_005551
ODC1 (ornithine decarboxylase)	<i>Human ornithine decarboxylase gene</i>	2,23 ↑	M16650

↑ zeigt eine Überexpression des jeweiligen Gens an.

() zeigt die Anzahl der regulierten Gene im entsprechenden Signalweg an.

^{ne} steht für neu exprimierte Gene nach H₂O₂-Behandlung mit einer geringen basalen Hintergrundexpression unter normalen Wachstumsbedingungen.

Anhang 4: In Prozesse der DNA-Schadens-, Zellzyklus- und Apoptoseregulation eingeordnete überexprimierte Gene des cDNA-Microarray „Signal transduction pathway finder“ (SuperArray) der H₂O₂-behandelten Zelllinie TE-7

Gen	Gen-Zugriffscod	DNA-Schaden	Zellzyklus	Apoptose
EGR1	X52541	x	x	x
FOS	V01512	x	x	x
JUN	J04111	x	x	x
CCND1	M64349	x	x	-
MYC	X00364	x	x	x
HIP	AY009317	-	-	-
HNF3B	AB028021	-	-	-
PTCH2	AF091501	-	-	-
CDKN1A (p21 ^{WAF1})	L47233	x	x	x
CDKN1C (p57 ^{KIP2})	U22398	x	x	x
CDKN2A (p16 ^{INK4})	U26727	x	x	x
CDKN2B (p15 ^{INK2b})	L36844	-	x	-
CDKN2C (p18)	U17074	-	x	x
CDKN2D (p19)	U40343	x	x	x
BIRC2	U45879	-	-	x
BIRC3	U37546	-	-	x
BAX	L22474	x	x	x
GADD45A	M60974	x	x	x
ATF2	X15875	x	x	x
HSPB1	Z23090	-	-	x
HSPCA	X15183	-	x	-
ICAM1	NM_000201	-	-	-
CD5	X04391	-	-	x
CYP19	Y07508	-	-	-
IL4	M13982	-	-	x
CTSD	M11734	-	x	x
EGFR	X00588	x	x	x
CDK2	X61622	x	x	x
KLK2	NM_005551	-	-	-
ODC1	M16650	-	-	-
JUNB	X51345	x	x	x
CEBPB	NM_005194	x	x	x
GYS1	NM_002103	-	-	-
CDX1	NM_001804	-	x	x
HOXB1	NM_002144	-	x	x

x - Teilnahme an diesem Prozess

Anhang 5: "Human MAP Kinase Signaling Pathway" RT²-Profiler-PCR-Array-(SuperArray)-Analysen mit der Karzinomzelllinie TE-7 - Analysen 30 min nach der Behandlung – Einordnung der durch H₂O₂-Stress differentiell exprimierten Gene in MAPK-Signalwege

Gen		x-fache Expres- sions- änderung	Genbank
MAPKKK (7)			
ARAF	<i>V-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog</i>	2,14 ↑	NM_001654
BRAF	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>	2,14 ↑	NM_004333
MAP3K1 (MEKK1)	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>	2,14 ↑	XM_042066
MAP3K2 (MEKK2)	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2</i>	2,14 ↑	NM_006609
MAP3K3 (MEKK3)	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3</i>	2,00 ↑	NM_002401
MST1	<i>Macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)</i>	2,14 ↑	NM_020998
PAK1	<i>P21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1 (STE20 homolog, yeast)</i>	2,00 ↑	NM_002576
MAPKK (4)			
MAP2K1 (MEK1)	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>	2,46 ↑	NM_002755
MAP2K2 (MEK2)	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 2</i>	2,00 ↑	NM_030662
MAP2K5 (MEK5)	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 5</i>	2,64 ↑	NM_002757
MAP2K7 (JNKK2)	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 7</i>	2,00 ↑	NM_145185
MAPK (8)			
MAPK1 (ERK2, MAPK1)	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>	2,14 ↑	NM_002745
MAPK6 (ERK3)	<i>Mitogen-activated protein kinase 6</i>	2,00 ↑	NM_002748
MAPK8 (JNK1)	<i>Mitogen-activated protein kinase 8</i>	2,64 ↑	NM_002750
MAPK9 (JNK2)	<i>Mitogen-activated protein kinase 9</i>	2,00 ↑	NM_002752
MAPK11 (p38bMAPK)	<i>Mitogen-activated protein kinase 11</i>	2,83 ↑	NM_002751

Anhang

MAPK12 (p38gMAPK)	<i>Mitogen-activated protein kinase 12</i>	2,14 ↑	NM_002969
MAPK13	<i>Mitogen-activated protein kinase 13</i>	2,30 ↑	NM_002754
MAPK14 (p38 MAPK)	<i>Mitogen-activated protein kinase 14</i>	2,46 ↑	NM_001315

Activated transcription factors (12)

CREB1	<i>cAMP responsive element binding protein 1</i>	2,14 ↑	NM_004379
CREBBP (CBP)	<i>CREB binding protein (Rubinstein-Taybi syndrome)</i>	2,00 ↑	NM_004380
ELK1	<i>ELK1, member of ETS oncogene family</i>	2,46 ↑	NM_005229
ETS1	<i>V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)</i>	2,64 ↑	NM_005238
ETS2	<i>V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)</i>	2,00 ↑	NM_005239
MAPKAPK2	<i>Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2</i>	2,64 ↑	NM_004759
MAPKAPK3	<i>Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3</i>	2,30 ↑	NM_004635
MEF2C	<i>MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C (myocyte enhancer factor 2 C)</i>	2,14 ↑	NM_002397
MYC (c-myc)	<i>V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>	2,14 ↑	NM_002467
PRDX6 (AOP2)	<i>Peroxiredoxin 6</i>	2,00 ↑	NM_004905
SMAD4 (MADH4/DPC4)	<i>SMAD, mothers against DPP homolog 4 (Drosophila)</i>	2,30 ↑	NM_005359
TP53 (p53)	<i>Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)</i>	2,00 ↑	NM_000546

Genes with induced expression (4)

EGR1 (egr-1)	<i>Early growth response 1</i>	2,14 ↑	NM_001964
HSPA5 (Grp78)	<i>Heat shock 70 kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78 kDa)</i>	3,73 ↑	NM_005347
MYC (c-myc)	<i>V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>	2,14 ↑	NM_002467
TP53 (p53)	<i>Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)</i>	2,00 ↑	NM_000546

Raf regulating Proteins (3)

MAP2K1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>	2,46 ↑	NM_002755
MAP2K2	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 2</i>	2,30 ↑	NM_030662

Anhang

NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>	2,14 ↑	NM_002524
------	---	--------	-----------

MEKK1 interacting proteins (6)

CHUK (IKK-a)	<i>Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase</i>	2,00 ↑	NM_001278
MAP2K1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>	2,46 ↑	NM_002755
MAP2K2	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 2</i>	2,30 ↑	NM_030662
MAP2K7	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 7</i>	2,00 ↑	NM_145185
MST1	<i>Macrophage stimulation 1 (hepatocyte growth factor-like)</i>	2,14 ↑	NM_020998
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>	2,14 ↑	NM_002524

Scaffolding / Anchoring (3)

MAP2K1P1 (MP1)	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1 interacting protein 1</i>	2,30 ↑	NM_021970
MAP3K1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>	2,14 ↑	XM_042066
MAPK8IP2 (JIP-1)	<i>Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2</i>	3,25 ↑	NM_012324

Cell cycle proteins regulated by ERK1/2 pathway (5)

CCNA1 (CyclinA1)	<i>Cyclin A1</i>	17,15 ↑	NM_003914
CCND2 (CyclinD2)	<i>Cyclin D2</i>	2,30 ↑	NM_001759
CCND3 (CyclinD3)	<i>Cyclin D3</i>	2,30 ↑	NM_001760
CDKN1A (p21 ^{WAF1} /p21 ^{CIP1})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21^{WAF1})</i>	5,28 ↑	NM_000389
CDKN1C (p57 ^{KIP2})	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57^{KIP2})</i>	2,30 ↑	NM_000076

↑ zeigt eine Überexpression des jeweiligen Gens an.

() zeigt die Anzahl der regulierten Gene der entsprechenden Gruppe an.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die mich im Laufe meiner Doktorarbeit betreut, begleitet und unterstützt haben, einen großen Dank aussprechen.

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Albert Roessner und meiner Doktormutter Prof. Dr. Regine Schneider-Stock für die Vergabe des sehr interessanten Themas und die vielfältige Unterstützung während der Arbeit bedanken.

Dr. Angela Pöhlmann möchte ich für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen, Ratschläge und ihre tatkräftige Unterstützung danken.

Ich danke Kathrin Reißig, Anne Teller, Jelena Ivanovska, Saritha Chakilam, Svantje Tauber, Hannes Schrader, Andrea Just und Steffen Jansing für das angenehme Arbeitsumfeld und die moralische Unterstützung.

Simone Staeck, Uta Schönborn, Antje Schinlauer und Hiltraud Scharfenort danke ich ebenfalls für ihre Unterstützung und Zuarbeit.

Weiterhin möchte ich Dr. Roland Hartig, Prof. Dr. Peter Schönfeld, Prof. Dr. Uwe Lendeckel, Thomas Jonczyk-Weber und Petra Mewes für ihre vielseitige Hilfe danken.

Meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung und Liebe.

Publikationen

- [1] Walluscheck D, Poehlmann A, Hartig R, Lendeckel U, Schoenfeld P, Hotz-Wagenblatt A, Reissig K, Bajbouj K, Roessner A & Schneider-Stock R (2013) ATF2 knockdown reinforces oxidative stress-induced apoptosis in TE7 cancer cells. *J Cell Mol Med* doi: 10.1111/jcmm.12071
- [2] Poehlmann A, Reissig K, Just A, Walluscheck D, Hartig R, Schinlauer A, Lessel W, Guenther T, Silver A, Steinberg P & Roessner A (2013) Non-apoptotic function of caspases in a cellular model of hydrogen peroxide-associated colitis. *J Cell Mol Med* doi: 10.1111/jcmm.12079
- [3] Poehlmann A, Habold C, Walluscheck D, Reissig K, Bajbouj K, Ullrich O, Hartig R, Gali-Muhtasib H, Diestel A, Roessner A & Schneider-Stock R (2011) Cutting edge: Chk1 directs senescence and mitotic catastrophe in recovery from G₂ checkpoint arrest. *J Cell Mol Med* **15**: 1528–41
- [4] Bajbouj K, Poehlmann A, Kuester D, Drewes T, Haase K, Hartig R, Teller A, Kliche S, Walluscheck D, Ivanovska J, Chakilam S, Ulitzsch A, Bommhardt U, Leverkus M, Roessner A & Schneider-Stock R (2009) Identification of phosphorylated p38 as a novel DAPK-interacting partner during TNF α -induced apoptosis in colorectal tumor cells. *Am J Pathol* **175**: 557–70
- [5] Phalke S, Nickel O, Walluscheck D, Hortig F, Onorati MC & Reuter G (2009) Retrotransposon silencing and telomere integrity in somatic cells of *Drosophila* depends on the cytosine-5 methyltransferase DNMT2. *Nat Genet* **41**: 696–702
- [6] Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, Walluscheck D, Schoenfeld P, Roessner A, Schneider-Stock R & Gali-Muhtasib H (2007) Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer Biol Ther* **6**: 160–9

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der naturwissenschaftlichen Fakultät eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Untersuchungen molekularer Mechanismen und funktioneller Konsequenzen der DNA-Schädigung durch oxidativen Stress in Tumorzellen“

in dem Institut für Pathologie selbständig und ohne sonstige Hilfe angefertigt habe. Bei der Abfassung wurden keine anderen Hilfsmittel als die genannten benutzt.

Ich habe weder diese noch eine andere Dissertationsschrift an einer anderen in- oder ausländischen Hochschule/Universität zur Promotion eingereicht.

Diese Arbeit wurde durch die Leistungsorientierte Mittelvergabe (LOM) der Medizinischen Fakultät Magdeburg unterstützt.

Magdeburg, den 26.08.2013

.....
Dipl.-Biol. Diana Walluscheck