

**Untersuchungen zur Aktivierung des P53-Signalweges durch  
genotoxische Substanzen mit unterschiedlichen  
Wirkmechanismen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Florian Engel**

aus

Henstedt-Ulzburg

Bonn 2015

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Tag der Promotion: 27.11.2015

Erstgutachter: PD Dr. E. Röhrdanz

Zweitgutachter: Prof. Dr. U. Jaehde

Erscheinungsjahr: 2015

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Die vorliegende Dissertation wurde am Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte unter Leitung von Frau PD Dr. E. Röhrdanz und Herrn Prof. Dr. U. Jaehde angefertigt.

## Danksagung

Herrn Dr. Frötschl und Frau PD Dr. Elke Röhrdanz danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und der stetigen wissenschaftlichen Unterstützung sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Bei Herrn Prof. Dr. Jaehde möchte ich mich für das Erstellen des Zweitgutachtens sowie die fortwährende Unterstützung und die konstruktive Zusammenarbeit bedanken.

Für die Unterstützung bei der Auswertung der Microarray-Daten bedanke ich mich bei Prof. Dr. Borlak und insbesondere bei Prashant Singh für die Einarbeitung in die Auswertesoftware.

Des Weiteren gilt mein Dank Sandra Weickhardt, Gabriele Kaufmann, Solveigh Langer und Elfi Schütz für die tatkräftige Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Allen Mitgliedern der Forschungsabteilung möchte ich für die schöne gemeinsame Zeit danken.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich während meines gesamten Promotionsvorhabens in allen Belangen unterstützt hat.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Kanzerogenese .....	1
1.2 Mechanismen chemischer Kanzerogene.....	2
1.2.1 Nicht-genotoxische Kanzerogene.....	2
1.2.2 Genotoxische Kanzerogene.....	4
1.3 Mutagenese.....	5
1.4 Zelluläre Stressantwort .....	5
1.4.1 Struktur des P53 .....	6
1.4.2 P53 Modifikationen .....	6
1.4.3 DNA-Reparatur .....	9
1.4.4 Apoptose .....	12
1.5 <i>In vitro</i> Genotoxizitäts-Testung .....	12
1.6 Microarrays als Methode in der Genotoxizitäts-Testung.....	14
1.7 Substanzen .....	15
1.7.1 N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff.....	15
1.7.2 7-12-Dimethylbenz(a)anthracen .....	15
1.7.3 Benzo(a)pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid .....	15
1.7.4 Etoposid.....	16
1.7.5 Streptonigrin.....	16
1.7.6 Lamivudin .....	17
1.7.7 Paclitaxel.....	17
1.7.8 Phenobarbital .....	18
1.7.9 Phorbol-12-Myristat-13-Acetat .....	18
1.7.10 Chloroquin .....	19
1.7.11 Nikotin .....	19
1.8 Fragestellung .....	20

---

<b>2</b>	<b>Material &amp; Methoden</b> .....	<b>21</b>
2.1	Verwendete Chemikalien & Materialien .....	21
2.2	Zellkultur.....	21
2.2.1	Zell-Linien .....	21
2.2.2	Medien .....	21
2.2.3	Kultivierung und Subkultivierung .....	21
2.2.4	Zellzahlbestimmung und Aussaat.....	22
2.3	Behandlung der Zellen.....	22
2.4	Einzelzellelektrophorese .....	23
2.5	Mikrokern-Test .....	24
2.6	Zytotoxizitätstest.....	25
2.7	RNA-Isolation und cDNA-Synthese.....	26
2.8	Microarray .....	28
2.9	qRT-PCR .....	29
2.10	Proteinbiochemische Methoden.....	30
2.10.1	Protein-Isolierung .....	31
2.10.2	Protein-Quantifizierung .....	31
2.10.3	Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamidgelelektrophorese .....	32
2.10.4	Western Blot.....	33
2.10.5	Markierung der Proteine und Detektion .....	33
2.10.6	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i> .....	35
2.11	Durchflusszytometrie (Zellzyklus) .....	37
2.12	Statistik.....	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>39</b>
3.1	Charakterisierung der verwendeten Zellsysteme .....	39
3.1.1	COMET-Assay und Mikrokerntest .....	39
3.1.2	XTT-Assay.....	41
3.2	Genexpressionsanalyse .....	42
3.2.1	Differentiell exprimierte Gene .....	42
3.2.2	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i> .....	46
3.2.3	<i>Master Regulators</i> .....	49
3.2.4	Auswahl eigener Diskriminatoren .....	55
3.2.5	Biomarker .....	62

---

3.3	Veränderungen auf Protein-Ebene .....	64
3.3.1	P53 Signalweg.....	64
3.3.2	P53 Modifikationen .....	68
3.4	Endpunktanalysen .....	70
3.4.1	Zellzyklusuntersuchungen .....	70
3.4.2	Apoptose .....	75
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>76</b>
4.1	Charakterisierung der Zellsysteme.....	76
4.2	Genexpressionsanalyse .....	78
4.2.1	Differentiell exprimierte Gene .....	78
4.2.2	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i> .....	79
4.2.3	<i>Master Regulators</i> .....	80
4.2.4	Eigene Diskriminatoren .....	81
4.2.5	Biomarker .....	83
4.3	TP53INP1 und XPC als potentielle Biomarker für Genotoxine.....	86
4.4	P53.....	87
4.5	P53 Modifikation, pATM und CDK5.....	88
4.6	P21, Zellzyklusveränderungen und Apoptose .....	91
4.7	Abschließende Bemerkungen und Klassifizierungsmodell.....	93
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>116</b>

## Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	µmol/l
ADP	Adenosindiphosphat
AhR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
AKR1C2	<i>Aldo-Keto Reductase Family 1, Member C2</i>
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AP	apurinische/apyrimidinische
AS	Aminosäure
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
ATRX	<i>alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BBC3	<i>BCL2 binding component 3</i>
BCA	Bicinchoninic acid
BCL-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BER	Basenexzisionsreparatur
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BIU	<i>Biochemical Institute for Environmental Carcinogens</i>
BPDE	Benzo(a)pyren-diolepoxid
BRCA	<i>breast cancer, early onset</i>
BSA	bovines Serum Albumin
CAR	<i>constitutive androstane receptor</i>
CASP	Caspase
CBP	<i>CREB-Binding-Protein</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CDKN1A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CHEK	<i>Checkpoint kinase</i>
Cp	<i>Crossing Point</i>
CPB	<i>CREB-binding protein</i>
cRNA	<i>copy RNA</i>
CSA	<i>Cockayne syndrome Typ A</i>
CSB	<i>Cockayne syndrome Typ B</i>
Ct	cycle threshold
Cu	Kupfer
CYP	Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenase
DDB2	<i>damage-specific DNA binding protein 2</i>
DEG	Differentiell exprimierte Gene
DEHP	Diethylhexylphthalat
DMBA	7-12-Dimethylbenz(a)anthracen
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DSB	Doppelstrangbruch/brüche
DSBR	<i>double-strand break repair</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
ERCC	<i>excision repair cross-complementation</i>
FC	<i>fold change</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>



FDR	<i>false discovery rate</i>
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers
FSC	<i>foward scatter</i>
FZR1	<i>fizzy/cell division cycle 20 related 1</i>
g	Gramm
GABA <sub>A</sub>	$\gamma$ -Aminobuttersäure-Rezeptor A
GADD45A	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>
GGR	<i>global genome repair</i>
GO	<i>gene onthology</i>
GOI	<i>gene of interest</i>
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
GTG	<i>Genetic Technology Grade™</i>
GTX	Genotoxin
h	Stunde
HBV	Hepatitis B Virus
hCAR	humanisierter CAR
HGT	<i>high gelling temperature</i>
HIPK2	<i>homeodomain-interacting protein kinase-2</i>
HIV	Humanen Immundefizienz Virus
HR	homologe Rekombination
HRP	<i>horse raddisch peroxidase</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IWGT	<i>Workshop on Genotoxicity Testing</i>
JDP2	<i>Jun dimerization protein 2</i>
L	Liter
LIMMA	<i>linear model for micrarray data</i>
Lys, K	Lysin
M	Mol/l
M	Mol/l
mA	Milli-Ampere
MDM2	Murine double minute 2 homolog
Met	Meteonin
ml	Milliliter
MMR	Mismatch Reparatur
M-MuLV	Moloney-Murine-Leukemia-Virus
MNU	N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MR	<i>Master Regulator</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Mut	<i>methyl-directed mismatch repair protein</i>
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NGTX	nicht genotoxische Substanzen
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
nm	Nanometer
NRTI	Nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
NTP	Nukleotidtriphosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	<i>Prediction Analysis for Microarrays</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PKC	Protein Kinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMS	Phenazinmethosulfat
PPARalpha	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>

PRD	<i>Proline Rich Domain</i>
PUMA	<i>P53 upregulated modulator of apoptosis</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PYCARD	<i>PYD and CARD domain containing</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RAD51	RAD51 Rekombinase
Rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RFC	<i>replication factor C</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPA	<i>replication protein A</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SCGE	<i>Single cell gelelectrophoresis</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDSA	<i>synthesis dependant strand annealing</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
Ser	Serin
SSC	<i>side scatter</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TCR	<i>transcription coupled repair</i>
Thr	Threonin
Tip60	Histon-Acetyltransferase KAT5
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid
UV	Ultraviolett
XLF	<i>XRCC4-like factor</i>
XPB	<i>xeroderma pigmentosum Typ B</i>
XPC	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group C</i>
XPD	<i>xeroderma pigmentosum Typ D</i>
XPF	<i>xeroderma pigmentosum Typ F</i>
XPG	<i>xeroderma pigmentosum Typ G</i>
XRCC4	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4</i>
XTT	(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)

## 1 Einleitung

Krebs ist eine der häufigsten krankheitsbedingten Todesursachen weltweit. Das karzinogene Potential ist deshalb bei der Risikobeurteilung von Arzneimitteln von besonderer Bedeutung. Einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Krebsentstehung ist die Mutagenese. Das mutagene Potential von Arzneimitteln kann jedoch aus ethischen Gründen nicht in klinischen Studien am Menschen untersucht werden. Neue Arzneimittelwirkstoffe müssen bereits vor der ersten Verabreichung ausreichend getestet sein. Dies kann nur mit präklinischen Tests *in vitro* und *in vivo* erfolgen. *In vitro* Tests in Säugerzellen spielen hier eine wichtige Rolle. Da es fatal wäre eine Substanz mit einem für den Menschen relevanten mutagenen Potential zu übersehen, sind diese Testsysteme hochsensitiv aber dadurch auch relativ unspezifisch. Es kommt aus diesem Grund zu einer hohen Rate an irrelevant positiven Testbefunden. Positive Ergebnisse dieser Tests führen häufig zu langwierigen und teuren *in vivo* Folgestudien oder dem Ausschluss des potentiellen Wirkstoffkandidates aus der weiteren Entwicklung. Um dies im Falle von irrelevanten Effekten zu vermeiden, sind tiefere Einblicke in den Wirkmechanismus notwendig. Untersuchungen zu Wirkmechanismen von genotoxischen und nicht-genotoxischen Kanzerogenen sind unerlässlich, um biologische Signaturen zu identifizieren, welche es ermöglichen den Wirkmechanismus neuer Substanzen vorherzusagen. Dies ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Ziel ist es, Strategien zu entwickeln, welche die Prädiktion von Wirkmechanismen ermöglichen und somit die Risikobewertung verbessern.

### 1.1 Kanzerogenese

Die Kanzerogenese wird in drei Phasen unterteilt. Die erste Phase wird als Initiation bezeichnet. Definiert ist diese als stabile Veränderung des Erbguts. Diese Veränderungen können durch physikalische, chemische und biologische Einflüsse hervorgerufen werden. Charakterisiert werden kann diese Phase durch die Modifikation der DNA und die Manifestierung des DNA-Schadens als Mutation durch Replikation mit einer fehlerhaften Schadensreparatur in der Zellteilung. Erst durch die Mutation kann Krebs verursacht werden, die DNA-Modifikation allein reicht hierfür nicht aus. Dieser Prozess ist irreversibel und kann bereits durch eine einmalige Schädigung mit einem Genotoxin verursacht werden. Die zweite Stufe ist die Promotion. Hier werden selektiv die initiierten Zellen durch endogene oder exogene Stimuli zum Wachsen angeregt und/oder die Apoptoserate herabgesetzt. In dieser Phase ist keine weitere DNA-Modifikation oder Mutation durch exogene chemische Initiatoren notwendig. Hierdurch ist sie reversibel und eine mehrfache Behandlung der Zellen ist notwendig um diesen Effekt hervorzurufen. Stimuli, welche eine Tumor-promovierende Wirkung aufweisen, unterliegen aus diesem Grund einem Schwellenwert, welcher theoretisch bei der Tumor-Initiation nicht festgelegt werden kann. Schwellenwerte für Tumor-Initiatoren werden derzeit

jedoch intensiv diskutiert, da durch zelluläre Abwehrmechanismen wie DNA-Reparatur und Apoptose DNA-Schäden zum Teil sehr effizient repariert und mutierte Zellen eliminiert werden [62, 119, 120]. Im Allgemeinen rufen Tumor-Promotoren organspezifische Effekte hervor. Die dritte Phase wird als Progression bezeichnet. Die während der Promotion entstandenen benignen präneoplastischen Läsionen werden hier zu benignen oder malignen Neoplasien. Verursacht wird dieser Prozess in der Regel durch die weiteren, während der Proliferation und DNA-Synthese in der präneoplastischen, klonalen Zell-Population zusätzlich entstehenden Mutationen. Zu den Mutationen zählen auch chromosomale Aberrationen und Translokationen. Dieses Stadium der Kanzerogenese ist irreversibel und wird durch genotoxische Substanzen zusätzlich vorangetrieben. Charakteristisch sind die Akkumulation von nicht zufälligen Chromosomen-Aberrationen und die karyotypische Instabilität. [87]

### 1.2 Mechanismen chemischer Kanzerogene

Für die Entwicklung von Neoplasien sind Initiation und Promotion entscheidende Schritte. Beide werden durch chemische Kanzerogene vermittelt. Die Klassifizierung der Genotoxine erfolgt hierbei in die Kategorien nicht-genotoxische (oder epigenetische) und genotoxische (oder DNA-reaktive) Kanzerogene. [87]

#### 1.2.1 Nicht-genotoxische Kanzerogene

Die Wirkung der nicht-genotoxischen Kanzerogene basiert auf Mechanismen, welche nicht die direkte Bindung, den DNA-Schaden oder die Interaktion der Substanz oder dessen Metaboliten mit der DNA beinhalten [214]. Hierbei ist theoretisch davon auszugehen, dass ohne relevante zelluläre Effekte Tumore nicht auftreten und somit ein Schwellenwert für diese Substanzen existiert. Im Gegensatz zu den DNA-reaktiven Substanzen können die Effekte verursacht durch epigenetische Kanzerogene, abhängig vom Wirkmechanismus, Spezies-spezifisch sein. Die biochemischen Mechanismen sind hierbei vielfältig. Eine Ursache ist hier die Zytotoxizität einer Substanz einhergehend mit einer regenerativen Hyperplasie [42]. Durch ein fortwährendes Absterben der Zellen wird das regenerative Wachstum gefördert. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von spontanen Mutationen und der Akkumulation von mutierten Zellen bis hin zur Bildung von präneoplastischen Läsionen und der nachfolgenden Tumor-Entstehung. Ein Beispiel für die Spezies-, Geschlechts- und Gewebe-Spezifität der Effekte von epigenetischen Kanzerogenen ist die Klasse der  $\alpha_{2u}$ -Globulin-bindenden Chemikalien. Diese binden an das Protein  $\alpha_{2u}$ -Globulin, welches in der Pubertät von männlichen Ratten gebildet wird. Normalerweise werden ca. 50 % des Proteins in den Glomeruli reabsorbiert und es kommt zur Hydrolyse zu Aminosäuren im proximalen Tubulus [129]. Chemikalien, die in der Lage sind das  $\alpha_{2u}$ -Globulin zu binden, führen zur Akkumulation

in den Lysosomen. Dies hat den Funktionsverlust der Lysosomen und die anschließende Ausschüttung von Verdauungsenzymen zur Folge, was wiederum zur Nekrose führt. Das verstärkte Absterben der Zellen des Tubulus wird durch eine erhöhte Proliferation kompensiert und es kommt zur Hyperplasie und bei dauerhaftem Stimulus zur Tumorentwicklung sowie malignen Transformation [42]. Ein weiterer, nicht-genotoxischer Kanzerogen zugrunde liegender Mechanismus ist die rezeptorvermittelte Kanzerogenese. Angriffspunkte sind hier der *constitutive androstane receptor* (CAR), der *peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$*  (PPAR $\alpha$ ), der *aryl hydrocarbon receptor* (AhR) und Hormon-Rezeptoren. *Phenobarbital-like* Kanzerogene sind in der Lage indirekt den CAR zu aktivieren. Dies führt zu einer gesteigerten Transkription von Zielgenen dieses Rezeptors und letztendlich zu einer gesteigerten Proliferation, der Inhibition von Apoptose, Hypertrophie und der Bildung von präneoplastischen Läsionen [90, 212]. Agonisten des PPAR $\alpha$  induzieren die Transkription von Zielgenen des Rezeptors und haben so eine gesteigerte Proliferation und eine verminderte Apoptoserate zur Folge [124]. Durch die Aktivierung von CAR und des PPAR $\alpha$  kommt es weiterhin zur Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) und oxidativem Stress [82, 88, 154]. ROS, welche nicht durch Antioxidantien abgefangen werden, können die DNA schädigen und Einzel- und Doppelstrangbrüche, Modifikationen an Purin, Pyrimidin oder an der Desoxyribose sowie DNA-*crosslinks* verursachen [39, 44, 207]. Auch die Zellproliferation und Apoptose kann durch ROS induziert werden [22, 29, 178]. Des Weiteren sind Agonisten des AhR potentielle Tumor-Promotoren. Hier wird die Transkription der Zielgene durch die Liganden vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass *AhR-knockout* Mäuse eine verminderte Tumor-Induktion durch Liganden des AhR aufweisen [137]. Hormonrezeptoren und Hormon-Gleichgewichte stellen einen weiteren Angriffspunkt dar. Hier werden gewebespezifische Effekte hervorgerufen. [87]

## 1.2.2 Genotoxische Kanzerogene

Die genotoxischen Kanzerogene werden in zwei Gruppen unterteilt. Die Vertreter der ersten Gruppe werden als direkte oder aktivierungs-unabhängige Kanzerogene bezeichnet. Für die Schädigung der DNA ist hier keine metabolische Aktivierung notwendig. Gebildet wird diese Gruppe von hoch reaktiven Elektrophilen, welche in der Lage sind mit Nucleophilen zu interagieren. Die Potenz dieser Substanzen ist hierbei abhängig von verschiedenen Faktoren, wie Detoxifizierung, Konkurrenzreaktionen, der chemischen Stabilität, dem Transport innerhalb der Zelle und der Membran-Permeabilität. Typischerweise ist die Kanzerogenität dieser Substanzen unabhängig von der Spezies und es werden Tumore im exponierten Gewebe verursacht. Die zweite Gruppe der genotoxischen Kanzerogene bilden die indirekt-wirkenden. Das ultimative Kanzerogen wird hier erst durch metabolische Aktivierung der Substanz gebildet. Aus diesem Grund werden sie auch als Prä-Kanzerogene bezeichnet. Im Gegensatz zu direkten Kanzerogenen sind die neoplastischen Effekte von indirekten Kanzerogenen erst am Ort der metabolischen Aktivierung zu finden und nicht in den der Substanz exponierten Organen. Der verursachte DNA-Schaden basiert sowohl bei den indirekten als auch bei den direkten Kanzerogenen auf der Ausbildung kovalenter Bindungen der Elektrophile mit den nucleophilen Gruppen der DNA, wie freie Elektronenpaare von Schwefel, Sauerstoff und Stickstoff. Hierbei ist das Ausmaß der gebildeten Addukte abhängig

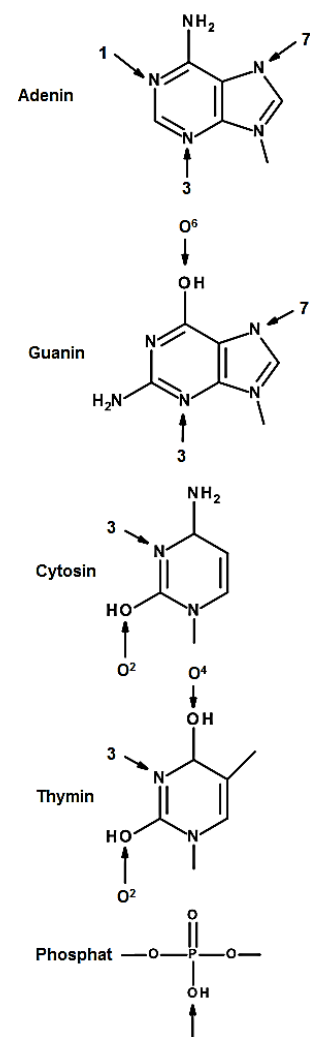


Abb. 1: Beispiele für zelluläre nucleophile Angriffsstellen; modifiziert nach [87]

von der Größe des ultimativen Kanzerogens und der Struktur der DNA. Hierbei gilt, je stärker das Elektrophil ist, umso mehr nucleophile Stellen der DNA können angegriffen werden. Schwache Elektrophile sind hier nur in der Lage starke Nucleophile anzugreifen. Neben den DNA-Basen ist auch das Phosphodiester-Rückgrat der DNA ein Angriffspunkt für Elektrophile. Die am weitesten verbreiteten Angriffspunkte der DNA sind N7, N3 und O6 des Guanins sowie N3 und N1 des Adenins. In Abbildung 1 sind Beispiele für zelluläre nucleophile Angriffsstellen gezeigt. [87]

### 1.3 Mutagenese

Grundsätzlich wird in der Mutagenese zwischen Basenaustausch-Mutationen und *frame-shift* Mutationen unterschieden. Basenaustausch-Mutationen können sowohl den Austausch zweier Pyrimidin-Basen oder zweier Purin-Basen untereinander (Transition) als auch den Austausch von Pyrimidin-Base gegen Purin-Base und umgekehrt bedeuten (Transversion). Hervorgerufen wird diese Art von Mutationen durch DNA-Addukte oder Leerstellen in der DNA, welche im Zuge der DNA-Reparatur auftreten. Während der DNA-Replikation können diese Stellen zu Fehlern führen. Durch die DNA-Polymerase wird hier bevorzugt Adenin eingebaut. Somit kommt es auf dem Tochter-Strang anstelle von Cytosin-, Guanin- oder Thymin-Addukten zum Einbau von Adenin, was in einer dauerhaften, irreparablen Veränderung der Basenfolge resultiert. Die zweite Form der Mutationen, die *frame-shift* Mutationen, kann ebenfalls durch DNA-Addukte hervorgerufen werden. Hier werden Basen eingefügt (Insertion) oder Basen entfernt (Deletion) und so die Basen-Triplets, welche für die Aminosäuren codieren, verschoben. Einen Großteil dieser Mutationen stellen Deletionen dar. Neben DNA-Strangbrüchen, die durch unvollständige Basen-Exzisions-Reparatur (BER) während der Replikation verursacht werden, führt auch die direkte Alkylierung des Phosphat-Rückgrates zu Doppelstrangbrüchen. [87]

### 1.4 Zelluläre Stressantwort

Das zentrale Protein der zellulären Stressantwort stellt der Tumor-Suppressor P53 dar. Aufgrund der hohen Bedeutung in Bezug auf die Integrität des Genoms wird dieses Protein auch als der „Beschützer des Genoms“ [99] bezeichnet. In nahezu 50 % aller Tumore ist eine P53 Mutation, verbunden mit dem Funktionsverlust, zu finden. Dieser Funktionsverlust spielt eine zentrale Rolle in der Entwicklung von Krebs [72, 182, 205]. P53 als Transkriptionsfaktor ist in der Lage die Expression von über 1000 Proteinen, direkt oder indirekt, zu beeinflussen [156]. Zu den Prozessen, die durch P53 beeinflusst werden, zählen Zellzyklus-Kontrollpunkte, Zellzyklus-Arrest, Apoptose, DNA-Reparatur und Seneszenz. Die Vielzahl der Prozesse sowie die Zell- und Stress-Typ Abhängigkeit dieser Prozesse legt nahe, dass posttranslationale Modifikationen des P53 das Schicksal der Zelle bestimmen. Dies wiederum bedeutet, dass spezifische Modifikationen, die Aktivierung bestimmter Signalwege zur Folge haben.

## 1.4.1 Struktur des P53

Das Genprodukt des P53-Gens umfasst 393 Aminosäuren (AS), welche sich in 3 Domänen unterteilen lassen. Die N-terminale Domäne umfasst die AS Met1-Lys101 und interagiert mit regulatorischen Proteinen und der Transkriptions-Maschinerie. Dieser Bereich lässt sich in zwei unabhängige Domänen unterteilen, die Transaktivierungsdomänen (TAD) 1 und 2 [25]. Die TAD1 ist hierbei notwendig für die Transaktivierungs-Aktivität und interagiert mit einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, Transaktivierungs-Faktoren und dem *Murine Double Minute 2 homolog* (MDM2), welches essentiell für die P53 Regulation ist. Die TAD2 überlappt zum größten Teil mit der *Proline Rich Domain* (PRD), welche wichtig für die P53 Stabilität, die Transaktivierungsfähigkeit und die Induktion der transkriptionsunabhängigen Apoptose ist. Die PRD beinhaltet eine Vielzahl von Bindungsstellen für verschiedene Proteine. Die zentrale Domäne von Thr102-Lys292 stellt die DNA-Bindungsdomäne dar. P53 bildet ein Tetramer aus und bindet in dieser Form an die DNA. Die Ausbildung des Tetramers wird durch die C-terminale Domäne des P53 vermittelt. Des Weiteren sind in diesem Bereich auch nukleäre Leit- und Export-Signal-Sequenzen zu finden. Das humane Genom weist über 10.000 vorhergesagte Bindungsstellen für P53 mit hoher Affinität und über 200.000 mit schwächerer Affinität auf [203]. [6]

## 1.4.2 P53 Modifikationen

P53 wird in der Zelle konstitutiv exprimiert. Liegt kein Stress-Stimulus vor, so erfolgt die Ubiquitylierung und der Abbau durch das Proteasom. Wird die Zelle Stress ausgesetzt, so kommt es zur posttranslationalen Modifikation des P53. Dies hat die Stabilisierung und die Akkumulation von P53 im Zellkern zur Folge. Modifikationen beinhalten Phosphorylierungen, Methylierungen, Acetylierungen, Ubiquitylierungen, Neddylierungen, Sumoylierung, Poly-ADP-Ribosylierung, Nitrierung und Addition von N-Acetylglukosamin vornehmlich an Ser-, Thr- und Lys-Resten [6, 128, 219]. In Abbildung 2 sind die bekannten Modifikationsstellen des humanen P53 sowie interagierende Proteine der jeweiligen Domänen und Kinasen dargestellt. Die Art des Stresses bestimmt hierbei welche Kinasen die Modifikation durchführen und welche Modifikationsstellen angegriffen werden [36, 196]. Das Modifikationsmuster bestimmt letztendlich die Promotor-Affinität des P53 gegenüber den Ziel-Gen-Promotoren [187].



## Human p53 Posttranslational Modifications

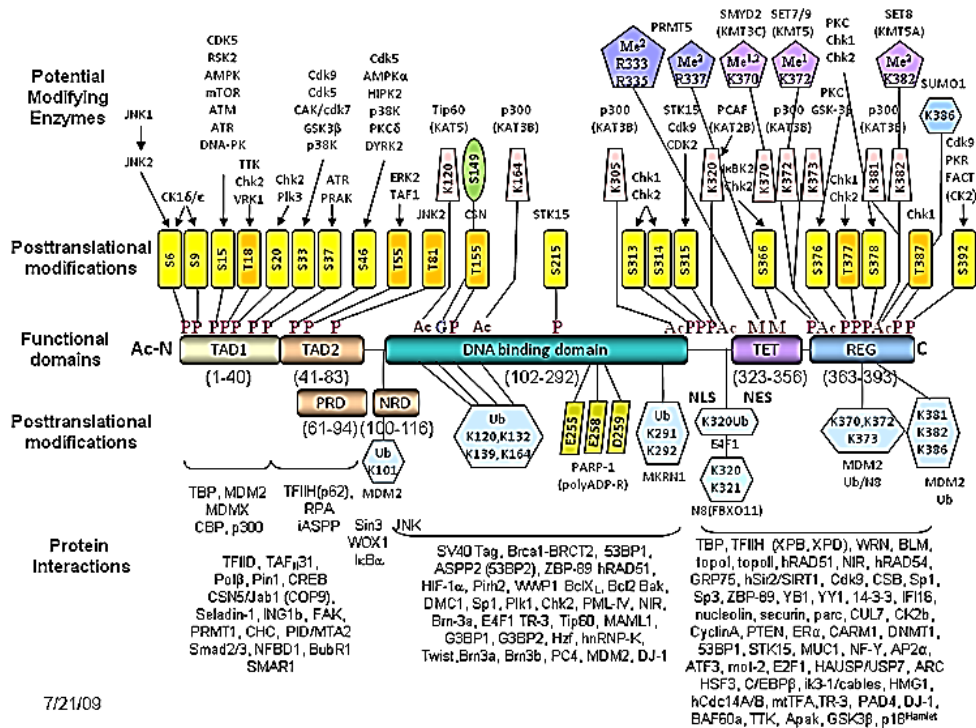


Abb. 2: posttranslationale Modifikationsstellen des humanen P53, Kinasen und interagierende Proteine; modifiziert nach [6]

Im Folgenden werden die Modifikationsstellen detaillierter betrachtet, welche in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Hierzu zählen die Phosphorylierungen an Ser 15, 33, 46, 392 und Thr 18 und 55 sowie die Acetylierung an Lys 382. Mit Ausnahme von Ser 392 und Lys 382 liegen alle Modifikationsstellen in der N-terminalen Domäne des P53. Die Phosphorylierung an Ser 15 ist eine der initialen Modifikationen des P53 im Zuge der Stressantwort. Durch die Phosphorylierung wird die Interaktion des P53 mit MDM2 und somit der Abbau durch das Proteasom unterbunden [172]. Die Phosphorylierung an dieser Stelle kann hierbei durch eine Vielzahl von Kinasen erfolgen und sowohl nach genotoxischem Stress als auch nicht-genotoxischem Stress auftreten. Zu diesen Kinasen zählen beispielsweise ATM, ATR und die CDK5. Nach Induktion von DSBs durch ionisierende Strahlung, Hydroxyharnstoff, Genistein und Wasserstoffperoxid erfolgt eine ATM-abhängige Phosphorylierung an Ser 15 [7, 60]. Eine ATM unabhängige Phosphorylierung wurde für eine Vielzahl anderer Stressoren, wie Hypoxie [92], Onkogen induzierte Seneszenz [50], replikative Seneszenz [211], Stickstoffmonoxid [69] und UV-Strahlung [7] gezeigt. Auch die CDK5 ist in der Lage P53 an Ser 15 zu phosphorylieren. Nach genotoxischem und oxidativem Stress führt die Phosphorylierung zu Apoptose in neuronalen Zellen [104]. Die Phosphorylierung an Ser 33 führt ebenfalls zu einer Stabilisierung des P53 und unterstützt die transkriptionelle Aktivität in Bezug auf Zellzyklus-Arrest und Apoptose. Die Stabilisierung erfolgt hierbei wie im Falle von Ser 15 durch die verminderte Interaktion mit MDM2 [16]. Auch hier kann die Modifikation durch verschiedene Kinasen

vorgenommen werden. Nach UV-Bestrahlung erfolgt die Phosphorylierung beispielsweise durch p38K [21]. Auch nach einer Vielzahl von anderen Stressoren ist eine Phosphorylierung an Ser 33 gezeigt worden. Sakaguchi et al. zeigten eine Phosphorylierung *in vivo* nach ionisierender- und UV-Strahlung [162]. Eine weitere Modifikationsstelle in der N-terminalen Domäne stellt Ser 46 dar. Diese Phosphorylierung beeinflusst die Bindungsaffinität von P53 am Promotor für pro-apoptotische Zielgene [142]. Die Apoptose-induzierende Wirkung dieser Modifikation erklärt die für eine Vielzahl von Stressoren gefundene Phosphorylierung. Saito et al. zeigten beispielsweise eine ATM abhängige Phosphorylierung nach Schädigung durch ionisierende Strahlung [161]. ATM unabhängig induziert beispielsweise Quercetin die Ser 46 Phosphorylierung [223]. Auch nach Schädigung durch Etoposid, UV-Strahlung und Hypoxie findet eine Phosphorylierung an Ser 46 statt [30]. Neben Serin-Resten werden auch Threonine modifiziert. Thr 18 dient hierbei wie auch Ser 15 und 33 der Stabilisierung des P53 durch Inhibition der P53-MDM2 Interaktion [103, 163]. Thr 55 ist in nicht gestressten Zellen konstitutiv phosphoryliert und wird nach DNA-Schaden durch die regulatorische Untereinheit B56 $\gamma$  des PP2A nach vorrausgegangener Phosphorylierung an Ser 15 dephosphoryliert [176]. Diese konstitutive Phosphorylierung ist eine Signal für die Lokalisation des P53 im Zytoplasma [23]. Andererseits wurde im Zuge der Stressantwort gezeigt, dass eine Phosphorylierung an Thr 55 nach Doxorubicin-Behandlung für die Transaktivierung von P53 notwendig ist [224]. In der C-terminalen Domäne des P53 sind weitere Modifikationsstellen zu finden. Ser 392 liegt in der Tetramerisierungsdomäne des P53 und ist sowohl verantwortlich für die Regulation der Oligomerisation [164] als auch für die Fähigkeit des P53 Sequenzspezifisch zu binden [64, 210]. Wasserstoffperoxid und UV-Strahlung führen über einen ATM unabhängigen Weg zur Ser 392 Phosphorylierung [36]. Eine Schädigung durch ionisierende Strahlung hingegen hat keine Phosphorylierung zur Folge [7]. Auch Etoposid und Genistein führen nicht zu einer Phosphorylierung [43]. Acetylierungen des P53 können abhängig von der Position durch Tip60 [189] oder p300/CBP [113] vermittelt werden. An Lys 382 können unter anderem Acetylierung und Methylierung erfolgen. Eine Mono-Methylierung führt hier zur Vermeidung der transkriptionellen Aktivierung des p21 und PUMA Promotors [171]. Nach einem DNA-Schaden sinkt die Methylierung und die Acetylierung steigt an. Dadurch wird die sequenzspezifische DNA-Bindung gesteigert [109, 117]. Die Deacetylierung ist hierbei für den MDM2 vermittelten Abbau von P53 notwendig [75]. [71]

## 1.4.3 DNA-Reparatur

Um DNA-Schäden zu beheben, können Zellen auf verschiedene Reparatur-Mechanismen zurückgreifen. Diese sind in der Lage eine Vielzahl von Schäden zu reparieren, jedoch sind auch diese Systeme nicht vollständig fehlerfrei. Die verbleibenden DNA-Schäden können deshalb zu Mutationen führen. Für die unterschiedlichen Arten an DNA-Schäden stehen hierbei spezialisierte Reparatur-Mechanismen zur Verfügung.

### 1.4.3.1 Exzisions-Reparatur

Oxidierete, alkylierte oder deaminierte Basen werden durch die Basenexzisionsreparatur (BER) ausgetauscht. Hierbei können einzelne Basen (*short patch*) oder Basenabfolgen bis zu 20 Basen (*long patch*) ausgetauscht werden. Spezifische DNA-Glykosylasen erkennen die geschädigten Basen und schneiden diese heraus. An dieser Stelle wird im Folgenden ein Einzelstrangbruch durch eine apurinische/apyrimidinische- (AP)-Endonuklease hervorgerufen. Komplementär zur Base auf dem intakten Strang fügt dann eine DNA-Polymerase die fehlenden Basen ein. Abschließend verknüpft eine Ligase die DNA-Stränge. [94] Um größere DNA-Addukte zu entfernen kommt die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) zum Einsatz. Hier werden im Gegensatz zur BER 24-32 Nukleotide entfernt. Die NER lässt sich aufgrund unterschiedlicher Schadenserkenkung in zwei Subtypen unterteilen: *Global Genome Repair* (GGR) und *Transcription Coupled Repair* (TCR). Die TCR greift bei Schäden, die während der Transkription von aktiven Genen auftreten. Die durch den DNA-Schaden blockierte RNA-Polymerase wird durch *Cockayne syndrome* (CS) Typ A und TYP B entfernt, um die DNA-Läsion für die Reparatur angreifbar zu machen. Im Falle der GGR werden Schäden behoben, welche in transkriptionsinaktiven Bereichen zu finden sind. Die Schadenserkenkung erfolgt hier durch *xeroderma pigmentosum*, *complementation group C* (XPC). Die Reparatur des Schadens erfolgt in beiden Fällen gleich. Zunächst wird der Bereich des DNA-Schadens durch die Helikasen *xeroderma pigmentosum* Typ B (XPB) und *xeroderma pigmentosum* Typ D (XPD) flankiert und die DNA-Stränge voneinander separiert. Im nächsten Schritt erfolgt das Schneiden der DNA, zunächst am 3' Ende durch *xeroderma pigmentosum* Typ G (XPG) und dann am 5' Ende durch einen Komplex aus *xeroderma pigmentosum* Typ F (XPF) und *excision repair cross complementation group 1* (ERCC1). Die Endonuklease-Aktivität wird hierbei durch das *replication protein A* (RPA) zum DNA-Schaden gerichtet. Nach Entfernen der Nukleotidsequenz setzt die DNA-Synthese durch die Polymerase  $\delta$  oder  $\epsilon$  ein. Aktiviert wird dieser Prozess durch den *replication factor C* (RFC) und dem *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA). Im letzten Schritt wird die DNA durch die Ligase I verbunden. [10] Insgesamt sind 20-30 Proteine in diesen Prozess involviert [37].

## 1.4.3.2 Mismatch-Reparatur

Basenfehlpaarungen entstehen hauptsächlich im Zuge der DNA-Replikation. Hier kommt es zu Fehlern durch die DNA-Polymerase. Die integrierte Kontrollfunktion der Polymerase reicht hierbei nicht aus, um alle Fehler zu korrigieren. Um spontane Mutationen durch diese Fehler zu reduzieren, kommt die *Mismatch*-Reparatur (MMR) zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um ein hoch-konserviert DNA-Reparatursystem. Die Schadenserkennung wird über die PCNA vermittelt. Diese ermöglicht in Anwesenheit von MutL $\alpha$  die Schadenserkennung durch MutS $\alpha$  oder MutS $\beta$  [149]. MutL $\alpha$  schneidet im Folgenden den DNA-Strang in 3'- und 5'- Richtung ausgehend von der Basenfehlpaarung. Die Exonuklease Exo1 schneidet diesen Teil der DNA in Anwesenheit von RPA aus und die DNA Polymerase  $\delta$  synthetisiert den neuen Strang. Die Ligation erfolgt durch die Ligase I. [53]

## 1.4.3.3 Homologe Rekombination

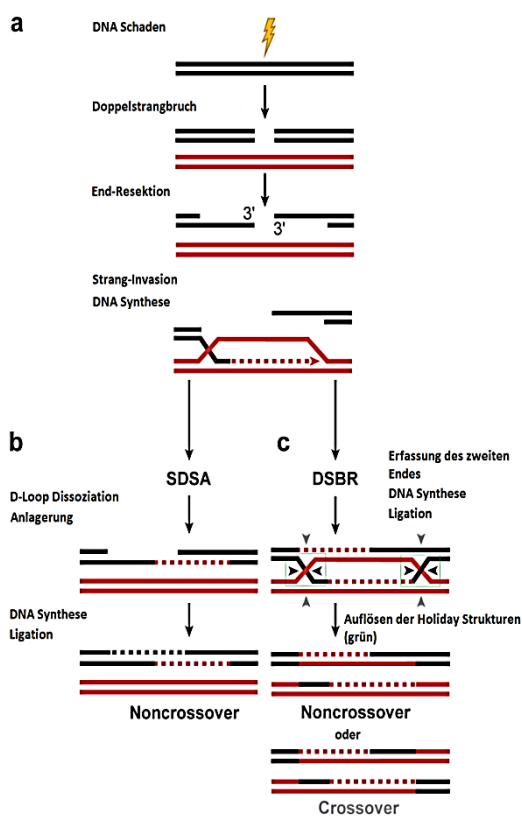


Abb. 3: Schematische Darstellung der HR; modifiziert nach [165]

Wird der SDSA-Weg eingeschlagen, so wird der ssDNA-Strang mit dem komplementären ssDNA-Strang zusammengefügt und die Lücke durch DNA-Synthese und Ligation geschlossen (Abb. 3, b). Alternativ kann der in Abb. 3, c dargestellte DSBR-Weg verfolgt werden. Hierbei werden zwei Holliday-Strukturen ausgebildet, welche den Austausch der DNA-Stränge der beiden Chromosomen ermöglichen. Die Ausbildung dieser Struktur wird begleitet durch die DNA-Synthese der fehlenden Nucleotide und der Ligation. [165]

Im Falle von Doppelstrangbrüchen (DSB) der DNA stehen verschiedene Möglichkeiten der Reparatur zur Verfügung. Eine Möglichkeit stellt die homologe Rekombination (HR) dar. Diese ist aktiv während der S- und G2-Phase des Zellzyklus [108] und ermöglicht die Reparatur eines gebrochenen Chromatids durch die Information auf dem intakten Schwester-Chromatid. Grundsätzlich stehen hier das *synthesis dependant strand annealing* (SDSA) und der *double-strand break repair* (DSBR) zur Verfügung. Nach der Schadenserkennung durch ATM wird in beiden Fällen die DNA nach dem DSB beschnitten um 3'-Einzelstrang-Überhänge zu erhalten (Abb. 3, a). Diese werden für eine Homologie-Suche auf dem intakten, homologen Chromosom verwendet. Ist der homologe Abschnitt gefunden, werden die DNA-Stränge überlagert und es erfolgt die DNA-Synthese durch DNA-Polymerasen.

### 1.4.3.4 *Non-homologous end joining*

Die zweite Variante für die Reparatur von DSBs ist das *Non-homologous end joining* (NHEJ). Diese ist notwendig, wenn keine Informationen vom Schwester-Chromatid nutzbar sind, wie z.B. in der G1- und G0-Phase des Zellzyklus [181]. Durch die fehlende Information ist diese Methode im Vergleich zur HR fehleranfälliger. Dieses System weist, bedingt durch eine Vielzahl an unterschiedlichen Substraten, eine breite mechanistische Flexibilität auf. Ungeachtet des Verlustes oder des Hinzufügens von Nukleotiden werden DNA-Strang-Enden zusammengefügt. Um den Verlust von einer großen Anzahl von Genen durch einen Chromosomenbruch zu verhindern, werden die durch die NHEJ erzeugten Mutationen in Kauf genommen. Die Schadenserkennung erfolgt auch hier durch ATM und die Ku Proteine Ku70 und Ku80. [108] Durch diese wird im Folgenden ein Protein Komplex aus DNA-abhängiger Protein-Kinase (PKcs) und Artemis rekrutiert, welcher in der Zelle vorliegt [118] und an den Ku-DNA-Komplex bindet [108]. Die Kinase Aktivität der DNA-PKcs wird durch die Bindung aktiviert und es kommt zur Autophosphorylierung und zur Phosphorylierung von Artemis. Durch die dadurch verursachte Konformationsänderung wird die Endonukleaseaktivität von Artemis ermöglicht und ein Teil der Überhänge des Doppelstrangbruchs herausgeschnitten. Die nun entstandenen Enden werden mit Hilfe der Polymerasen  $\mu$  und  $\lambda$  aufgefüllt [139] und durch einen Ligations-Komplex aus *XRCC4-like factor* (XLF), *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4* (XRCC4) und der DNA Ligase IV miteinander verbunden [3, 19].

## 1.4.4 Apoptose

Ein Schutzmechanismus um den Folgen von DNA-Schäden oder anderweitigem Stress der Zelle zu entgehen, stellt die Apoptose dar. Nach Schädigung ist die Zelle, endogen oder von außen durch Zytokine stimuliert, in der Lage den programmierten Zelltod einzuleiten. Im Zuge dieses Prozesses kommt es zur sukzessiven Degradierung des Zellinhalts ohne dabei benachbarte Zellen zu schädigen. Die Initiation der Apoptose kann hierbei auf unterschiedliche Weise erfolgen. Man unterscheidet den extrinsischen, den intrinsischen und den über das endoplasmatische Retikulum stressinduzierten Weg. Im Falle des extrinsischen Wegs erfolgt die Initiation mittels Aktivierung von Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie über spezifische Liganden. Es kommt zur Rezeptor-Trimerisierung und anschließender Assoziation verschiedener Adapterproteine, die letzten Endes die Aktivierung von proteolytischen Enzymen, in diesem Fall der Initiator-Caspase 8, bewirken. Durch die aktive Form der Caspase 8 wird die nachgeschaltete Caspase-Kaskade aktiviert, der Zellinhalt degradiert, in Vesikel verpackt und abgebaut. Die Initiation des intrinsischen Wegs wird über die Mitochondrien der Zelle vermittelt. Hier kommt es durch die Integration von Porenproteinen der BCL-2 Familie in die Mitochondrienmembran zur Freisetzung von Cytochrom c und weiteren proapoptischen Signalmolekülen. Über die Ausbildung eines Proteinkomplexes wird die Initiator-Caspase 9 aktiviert und analog zur Caspase 8 die Caspase-Kaskade aktiviert. Der extrinsische Weg ist über einen Rückkopplungsmechanismus mit dem intrinsischen verbunden und kann diesen initiieren. Der über das endoplasmatische Retikulum induzierte Weg kann durch verschiedene Stressfaktoren induziert werden, wie z. B. Glukosemangel oder Hypoxie. Hierbei werden der caspaseabhängige Weg und der transkriptionelle Weg unterschieden. [68, 107, 185]

## 1.5 *In vitro* Genotoxizitäts-Testung

Die Test-Strategien für die Genotoxizitätstestung von Pharmazeutika sind in der Leitlinie der *International Conference on Harmonisation (ICH) S2 (R1)* vorgegeben. Die Testbatterie besteht aus einer Kombination aus *in vitro* und *in vivo* Tests. Diese stellt eine sensitive Detektion des erbgutverändernden Potentials neuer Substanzen sicher. Die Test-Systeme sind deshalb sehr sensitiv aber teilweise sehr unspezifisch. Die Kombination von *in vitro* Tests in bakteriellen und Säugetier-Zell-Modellen sind positiv für ungefähr neun von zehn Kanzerogene aber auch für neun von zehn nicht-Kanzerogene [86]. Bedingt durch den Fokus auf eine hohe Sensitivität in der Entwicklung von Genotoxizitäts-Tests sind viele der Substanzen, welche positive Ergebnisse in den Test-Systemen aufweisen, entweder keine Kanzerogene oder Kanzerogene mit einem nicht-genotoxischen Wirkmechanismus [208]. Die Leistungsfähigkeit der verwendeten Testsysteme variiert hierbei sehr stark. Der Ames-Test zeigt beispielsweise eine annehmbare Spezifität von 77 %, jedoch eine schlechte Sensitivität von nur 60 % [86]. *In vitro* Testsysteme basierend auf Säuger-Zellen weisen eine

höhere Sensitivität auf, haben jedoch eine schlechtere Spezifität (wie z. B. der Mikrokerntest mit 81 % Sensitivität aber nur 54 % Spezifität [86]). Eine retrospektive Studie zu 838 auf dem Markt befindlichen Pharmazeutika von Brambilla und Martelli (2009) zeigte, dass von 166 nicht-Kanzerogenen bei 50 positive Ergebnisse in mindestens einem Genotoxizitäts-Test vorliegen [17]. Für solche Substanzen muss entweder ein hoher Aufwand betrieben werden, um das potentielle, relevante Risiko zu verifizieren oder aber diese potentiellen Wirkstoffe müssen völlig zu Unrecht von der weiteren Entwicklung ausgeschlossen werden. Die Entwicklung neuer, spezifischerer Test-Systeme und deren Implementierung in bestehende Test-Strategien ist somit notwendig.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Beurteilung der Relevanz von positiven Ergebnissen ist, dass die Test-Systeme wenig Aufschluss über den, der Schädigung zugrunde liegenden, Wirkmechanismus geben. Die Aufklärung des genotoxischen Wirkmechanismus ist jedoch für die Bewertung der Relevanz dieser Befunde für die Anwendung am Menschen notwendig. Des Weiteren werden nicht-genotoxische Kanzerogene in diesen Test-Systemen nicht adressiert. Positive oder unklare Befunde in den *in vitro* Tests führen deshalb häufig zu zusätzlichen, langwierigen und teuren *in vivo* Studien. Erst auf der Basis der Ergebnisse aus diesen zusätzlichen Studien kann dann in den meisten Fällen eine Abschätzung der für den Menschen relevanten Risiken erfolgen.

Die für die *in vitro* Tests verwendeten Zellsysteme stellen hierbei ebenfalls eine Herausforderung dar. Eine klare Angabe, welche Zellsysteme für die Testung eingesetzt werden sollen, ist in den Richtlinien nicht enthalten. Somit sind die eingesetzten Zellsysteme stark unterschiedlich was Ursprung und genetische Ausstattung betrifft. Einzig die Empfehlung des *International Workshop on Genotoxicity Testing* (IWGT), P53 kompetente Zellen zu verwenden, liefert eine Orientierung. Unterschiedliche Reaktionen der Zellsysteme und die Abhängigkeit der genotoxischen Potenz vom Zielorgan werden in den Test-Strategien nicht berücksichtigt.

Verbesserte *in vitro* Methoden zur Aufklärung des Wirkmechanismus würden somit zur Optimierung der Risikobewertung und Sicherheit von Substanzen beitragen. Der Ausschluss von potentiellen Wirkstoffen in der Entwicklungsphase durch irreführende Ergebnisse aus *in vitro* Tests könnte reduziert werden. Zusätzlich würden diese Verfahren das 3 R Prinzip, *reduction, replacement and refinement of animal testing* unterstützen und unnötige *in vivo* Tests einsparen. Eine vielversprechende Methode mit der versucht wird, die Erhebung mechanistischer Daten zur Wirkung von Substanzen bei der *in vitro* Testung auf Genotoxizität zu adressieren, stellt die Analyse mittels Microarrays dar.

### 1.6 Microarrays als Methode in der Genotoxizitäts-Testung

Die Technologie der *Toxicogenomics* stellt heute eine immer leistungsfähiger werdende Methode zur Erhebung toxikologischer Daten dar. Auch im Bereich der Identifizierung von kanzerogenen Substanzen spielt diese Methode eine immer größer werdende Rolle. Mit dieser Methode ist es möglich eine sehr große Menge an Daten in kurzer Zeit zu generieren und so Informationen bezüglich des Wirkmechanismus zu erhalten. Somit könnte diese Methode im Rahmen der Risikobewertung als Teil eines *weight of evidence approaches* eine sinnvolle Ergänzung sein [194]. Um die umfangreichen Datenmengen zu nutzen, ist es hierbei unabdingbar, geeignete bioinformatische Methoden für die Auswertung zur Verfügung zu haben. Studien haben bisher gezeigt, dass es für ein bestimmtes Set an Substanzen möglich ist, genotoxische und nicht-genotoxische Substanzen durch geeignete Cluster-Methoden in HepG2 Zellen voneinander zu diskriminieren [200, 201]. Studien in TK6 Zellen haben gezeigt, dass auf Basis von Signalweg- und *GO*-Analysen keine Diskriminierung zwischen genotoxischen Wirkmechanismen unter den verwendeten Bedingungen möglich ist [47, 57]. Es wird empfohlen, die Differenzierung mit einem ausgewählten Gen-Set durchzuführen, um Wirkmechanismen zuordnen zu können [47]. Die Auswahl solcher Klassifizierungsgene wurde erfolgreich in einigen Studien gezeigt. In HepG2 Zellen, unter Verwendung von S9 Mix, war es möglich ein Prokanzerogen anhand von 91 zuvor definierten Klassifizierungsgenen korrekt einzuordnen [13]. Le Fevre et al. identifizierten 28 Gene, welche zur Diskriminierung zwischen direkt und indirekt DNA-schädigenden Substanzen herangezogen werden können [101]. Dieser Ansatz findet ebenfalls Anwendung in einer weiteren Studie mit TK6 Zellen. Hier wurden 65 Klassifizierungsgene identifiziert, welche die Trennung von genotoxischen und nicht-genotoxischen Substanzen sowie eine Einordnung von Substanzen aus einem Trainings-Set ermöglichten [106]. Dass die Anwendung dieses Gen-Sets für Substanzen, die eine metabolische Aktivierung erfordern durch Verwendung des S9-Mix ebenfalls möglich ist und eine korrekte Einstufung der verwendeten Substanzen erfolgt, wurde in einer weiteren Studie gezeigt [20]. Magkoufopoulou et al. haben bei der Diskriminierung von *in vivo* genotoxischen und *in vivo* nicht genotoxischen Substanzen mittels Microarray-Studien eine Spezifität und Sensitivität von 91 % erreicht [122]. In einer weiteren Studie wurde die korrekte Einstufung von *in vitro* falsch positiven Substanzen [121] gezeigt. Doktorova et al. erzielten in einem ähnlichen Ansatz, mit Ausnahme von Prä-Kanzerogenen, eine gute Korrelation zwischen *in vitro* und *in vivo* Gen-Expression [45].



## 1.7 Substanzen

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden 10 verschiedene Testsubstanzen verwendet. Sechs stellen Vertreter der genotoxischen Kanzerogene dar, zwei gehören der Gruppe der nicht-genotoxischen Kanzerogene an und zwei wirken nicht kanzerogen.

### 1.7.1 N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff

N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff (MNU) zählt zu den direkten Kanzerogenen. Ohne vorherige Aktivierung erfolgt eine Methylierung der DNA vorrangig am O6 des Guanin. Dies wurde sowohl *in vitro* [100] als auch *in vivo* [89] gezeigt. Die Kanzerogenität *in vivo* ist auf die durch die Methylierung entstehenden Transitions-Mutationen zurückzuführen. Vornehmlich sind hier G:C->A:T Transitions-Mutationen zu finden [138].

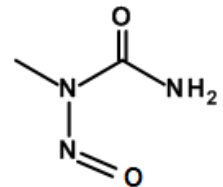


Abb. 4: N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff

### 1.7.2 7,12-Dimethylbenz(a)anthracen

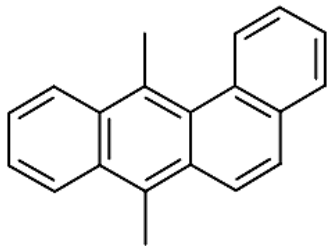


Abb. 5: 7,12-Dimethylbenz(a)anthracen

7,12-Dimethylbenz(a)anthracen (DMBA) ist ein synthetischer, polyzyklischer-aromatischer-Kohlenwasserstoff (PAK) und zählt zu den potentesten bekannten Kanzerogenen. Initial bindet DMBA an den Arylhydrokarbon-Rezeptor, welcher als Transkriptionsfaktor die Induktion der metabolisierenden Enzyme vermittelt [173]. Nach metabolischer Aktivierung an der Bay-Region durch die Cytochrom-P450 Monooxygenasen 1A1 und 1B1 (CYP1A1, 1B1) sowie die Epoxidhydrolase zum 7,12-Dimethylbenz(a)anthracen-3,4-dihydrodiol-1,2-epoxid bindet dieses kovalent an Purin-Basen der DNA [188]. Größtenteils werden hier N7 Desoxy-Adenin und Desoxy-Guanin Addukte ausgebildet [151]. Diese DNA-Addukte sind im Folgenden für Mutationen während der Replikation verantwortlich. Aufgrund der hohen Potenz wird DMBA häufig verwendet, um Tumore in Testsystemen zu induzieren [51]. Neben der genotoxischen Wirkung weist DMBA auch eine immunsuppressive Wirkung auf [54].

### 1.7.3 Benzo(a)pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid

Aufgrund der eingeschränkten metabolischen Kompetenz der TK6 Zellen wurde hier der aktive Metabolit ( $\pm$ ) anti-Benzo(a)pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE) und nicht die Muttersubstanz Benzo(a)pyren verwendet. Wie auch die Aktivierung des DMBA wird die Umsetzung zu BPDE durch CYP1A1, CYP1B1 und die Epoxidhydrolase katalysiert. Dieses bindet an die DNA und bildet

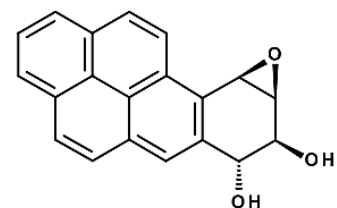


Abb. 6: (+) anti-Benzo(a)pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid

vorrangig N2 Desoxy-Guanin Addukte [5], die hauptsächlich über die Nukleotid-Exzisions-Reparatur entfernt werden [115]. Nicht reparierte Addukte führen in erster Linie zu G:C -> T:A Transversions-Mutationen [222].

#### 1.7.4 Etoposid

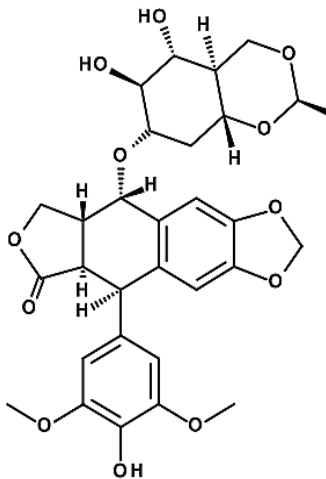


Abb. 7: Etoposid

Etoposid ist ein halb synthetisches Glykosid-Derivat des, aus den Wurzeln des amerikanischen Maiapfels (*Podophyllum peltatum*) gewonnenen, Podophyllotoxins [132]. Es stellt einen Vertreter der Topoisomerase II Inhibitoren dar und zählt zu den wichtigsten Zytostatika. Eingesetzt wird es gegen ein breites Spektrum an Tumoren [202]. Die zytostatische Wirkung beruht auf der Wechselwirkung mit der Topoisomerase II. Diese spielt eine wichtige Rolle in Bezug auf die DNA Topologie bei Replikation, Transkription, Rekombination sowie Chromosomen Kondensation und Segregation [209]. Während dieser Prozesse werden durch das Enzym transiente DNA-Doppelstrangbrüche erzeugt. Etoposid bildet einen Komplex

mit der Topoisomerase II aus. Dieser verhindert die Re-Ligation der DNA-Doppelstrangbrüche [216]. Neben der klastogenen Wirkung zeigte Etoposid auch aneugene Effekte im *in vivo* Mikrokerntest in Knochenmarkszellen der Maus [9].

#### 1.7.5 Streptonigrin

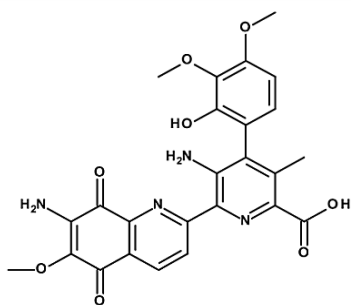


Abb. 8: Streptonigrin

Streptonigrin ist ein Amino-Chinon und zählt zur Gruppe der antibiotischen Zytostatika. Isoliert aus *Streptomyces flocculus* stellte es aufgrund des breiten zytostatischen Spektrums eine interessante Substanz für medizinische Anwendungen dar [206]. Die genotoxische Wirkung von Streptonigrin ist nicht auf einen einzelnen Mechanismus begründet, sondern ist auf die Kombination von mehreren Mechanismen zurückzuführen [14].

Streptonigrin weist eine Vielzahl von Komplexbindungsstellen auf und bindet in Anwesenheit von bestimmten Metall-Ionen, wie beispielsweise Kupfer, Zink und Cadmium irreversibel an die DNA [213]. Voraussetzung hierfür ist die Autooxidation zum Semichinon-Radikal bzw. Hydrochinon in Anwesenheit von NADH. Diese wiederum reagieren mit molekularem Sauerstoff zu reaktiven Sauerstoff-Spezies unter Regeneration des Chinons. Anwesende Metall-Ionen katalysieren diese Reaktion und Hydroxyl-Radikale werden als ultimative Quelle der durch Streptonigrin verursachten DNA-Strangbrüche gebildet [38]. Diese Streptonigrin-Metall-DNA-Komplexe führen zu Einzel- und

Doppelstrangbrüchen der DNA. Ein zweiter Mechanismus ist die wie in Abschnitt 1.5.3 für Etoposid beschriebene Inhibition der Topoisomerase II [221]. Neben diesen Effekten ist Streptonigrin in der Lage direkt DNA-Addukte zu bilden [26]. Von Testoni et al. (1995) wurde in diesem Zusammenhang postuliert, dass es durch diese stabilen Addukte zu Chromatid-Aberrationen und gesteigerten Schwesterchromatidaustauschen durch die Beeinträchtigung der Replikation in der S-Phase kommt. Der persistierende Redox-Zyklus sorgt hierbei für die stetige Neubildung von ROS [192].

### 1.7.6 Lamivudin

Lamivudin stellt einen Vertreter der Antimetabolite dar. Als nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor (NRTI) wird es im Rahmen der Behandlung des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) und des Hepatitis B Virus (HBV) verwendet. Strukturell ist Lamivudin ein chemisches Analogon des Nucleosids Cytidin, welches intrazellulär in ein 5'-Triphosphat umgesetzt wird [157]. Dieses verdrängt kompetitiv Cytidin und wird durch die Reverse Transkriptase in die, aus RNA erstellte, DNA eingebaut. Aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe an der Ribose kann, nach Einbau des Analogons in die DNA, der Strang durch die Reverse Transkriptase nicht mehr verlängert werden und es kommt zum Abbruch der

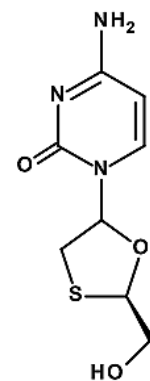


Abb. 9: Lamivudin

Synthese. Die genotoxische Wirkung in humanen Zellen basiert ebenfalls auf dem Einbau des Analogons in die DNA. Die DNA-Synthese während der Replikation wird durch den Einbau des Analogons in die DNA durch verschiedene DNA-Polymerasen gehemmt [65]. Dies kann zu klastogenen Effekten [116] und einer Erhöhung der Mutationsrate [27] führen.

### 1.7.7 Paclitaxel

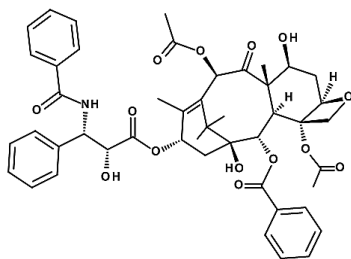


Abb. 10: Paclitaxel

Paclitaxel ist ein Taxan der Gruppe der Mitosespindel-Inhibitoren. Ursprünglich wurde dieses aus der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) gewonnen. Aufgrund der begrenzten Bestände und aufwändigen Gewinnung sowie der schwierigen Vollsynthese ist heute die Teil-Bio-Synthese aus genetisch veränderten *Escherichia Coli* [4] und Hefen [114] in den Vordergrund gerückt. Die genotoxische Wirkung des Paclitaxels beruht auf der Interaktion mit dem Zytoskelett. Es bindet an die  $\beta$ -Untereinheit des Tubulins [152] und hat so eine Stabilisierung der Mikrotubuli zur Folge [170]. Dies bewirkt eine Inhibition des Mikrotubuli-Abbaus und hemmt die Chromosomenverteilung, was die Progression der Zellteilung verhindert und genomische Instabilität zur Folge hat.

## 1.7.8 Phenobarbital

Phenobarbital zählt zur Gruppe der Barbiturate und wirkt antikonvulsiv, hypnotisch sowie sedierend. Die Wirkung basiert auf der Bindung am  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Rezeptor A ( $GABA_A$ ), einem ligandenaktivierten Ionenkanal, welcher einer der wichtigsten inhibitorischen Rezeptoren in Gehirn und Rückenmark darstellt. Die inhibitorische Wirkung wird gleichzeitig durch die Hemmung aktivierender AMPA-Rezeptoren (*engl.  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) verstärkt [81]. In Nager-Studien zeigte sich eine Tumor-promovierende Wirkung in der Leber [93, 193]. Die Relevanz diese Effekte für den Menschen bleibt jedoch ungeklärt [15]. Epidemiologische Studien konnten bisher aufgrund begrenzter Datensätze nicht zur Lösung der Fragestellung beitragen. Ein Risiko für den Menschen konnte auf Basis der vorhandenen Daten bislang nicht nachgewiesen werden [96]. Dennoch bleiben aufgrund der indirekten Aktivierung des *constitutive androstane receptor* (CAR), welcher einen Einfluss auf Zell-Wachstum und Metabolismus in der Leber aufweist, Bedenken bestehen [136]. Die Tumor-promovierende Wirkung wird in diesem Zusammenhang kontrovers diskutiert. Einerseits traten am humanisierten hCAR Maus-Modell Hepatomegalien und Lebertumore auf [73] andererseits konnten nur die Hypertrophien aber nicht die Hyperplasien durch weitere Studien bestätigt werden [159]. Auch die Suppression der Apoptose in Nagern [66] ist im Hinblick auf die Tumor-promovierende Wirkung zu beachten. Des Weiteren werden durch Phenobarbital indirekt reaktive Sauerstoffspezies über einen CYP-Enzym anhängigen Mechanismus erzeugt [88, 155]

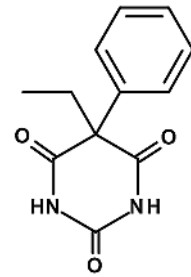


Abb. 11:  
Phenobarbital

## 1.7.9 Phorbol-12-Myristat-13-Acetat

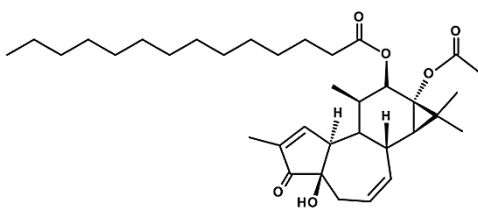


Abb. 12: Phorbol-12-Myristat-13-Acetat

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) zählt zur Gruppe der Phorbol-ester und ist bekannt für seine Tumor-promovierende Wirkung. Diese wird vermittelt durch die Aktivierung der Protein Kinase C (PKC), da PMA ein Struktur-analogon des endogenen Aktivators Diacylglycerins darstellt [28]. Eine Aktivierung der PKC hat

unter anderem eine gesteigerte Zellproliferation zur Folge [58].

## 1.7.10 Chloroquin

Chloroquin ist ein synthetisches Enantiomeren-Gemisch, welches unter anderem zur Prophylaxe und Therapie von Malaria eingesetzt wird. Durch die Behandlung können unter Anderem Retinopathie, Schlafstörungen und neuropsychiatrische Symptome auftreten. Eine genotoxische Wirkung ist im Hochdosis-Bereich durch die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies beschrieben [49].

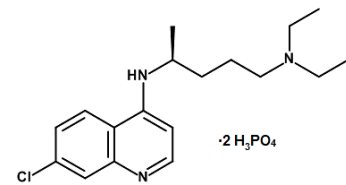


Abb. 13: (S)-Chloroquin

## 1.7.11 Nikotin

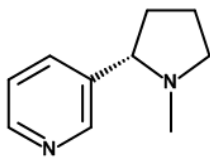


Abb. 14: (-)-Nikotin

Nikotin zählt zur Gruppe der Alkaloide, welche in Nachtschattengewächsen vorkommen. Es ist in der Lage an den nikotinergen Acetylcholin Rezeptor zu binden und diesen zu aktivieren [123]. Hierdurch kommt es zur Ausprägung einer Vielzahl von psychoaktiven und adversen Effekten. Bedingt durch die Freisetzung von Acetylcholin, Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin, Vasopressin und Serotonin [150] führt Nikotin unter Anderem zu einer gesteigerten Konzentrationsfähigkeit [160] und erhöht die Sensitivität des Belohnungszentrums [84].

## 1.8 Fragestellung

Die im Abschnitt 1.5 beschriebenen Probleme, welche häufig bei positiven Befunden in *in vitro* Genotoxizitätstests in Säugerzellen für die Risikobewertung von Substanzen auftreten, werden in dieser Arbeit adressiert. Mit den durchgeführten Untersuchungen sollen mechanistische Daten für die Unterschiede in den Wirkmechanismen der Substanzklassen erhoben werden und Unterschiede identifiziert werden, die eine Vorhersage der Klassenzuordnung neuer Substanzen ermöglicht. Weiter sollen die potentiellen Unterschiede in den verwendeten Zellsystemen identifiziert und die Frage geklärt werden, ob eine positive oder negative Genotoxizitätstestung auch vom Zellsystem und eventuell der Organherkunft der Zellkulturen abhängig sein könnte. Das Ziel ist es, Biomarker zu identifizieren, die zur Verbesserung der Bewertung der Relevanz von positiven *in vitro* Säugerzelltests beitragen können. Dabei sollten sie eine höhere Spezifität bei gleicher oder höherer Sensitivität aufweisen und damit dazu beitragen unnötige zusätzliche Tierversuche zu vermeiden. Damit würden zusätzlich wertvolle Daten für den *weight of evidence approach* bei der Sicherheitsbewertung von Arzneimitteln zur Verfügung gestellt.

Im Einzelnen sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Sind die Zellsysteme in gleicher Weise für die Testung auf Genotoxizität geeignet?
2. Welche Unterschiede bestehen zwischen den Zellsystemen?
3. Welche Unterschiede bestehen zwischen den Substanzen und Substanzklassen?
4. Bestehen Unterschiede entsprechend der verschiedenen Mechanismen?
5. Ist es möglich, den Wirkmechanismus auf Basis einer Kombination aus den verschiedenen verwendeten *in vitro* Test-Systeme für unbekannte Substanzen vorherzusagen?

Diese Fragestellungen wurden wie folgt adressiert:

Untersucht wurden die durch die 10 Test-Substanzen verursachten DNA-Schäden (COMET-Assay, Mikrokern-Test), die genomweite Genexpression (Microarray-Analysen, qRT-PCR), die P53-Phosphorylierung (ELISA), zentrale Proteine der Stressantwort (SDS-PAGE und Western Blot), sowie die Endpunkte Apoptose und Zell-Zyklus-Veränderungen (Durchflusszytometrie) in drei Zellsystemen aus Blut (TK6), Leber (HepG2) und ZNS (SH-SY5Y).

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Verwendete Chemikalien & Materialien

Die für die Durchführung der Versuche verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sowie die Pufferzusammensetzungen sind im Anhang aufgelistet.

### 2.2 Zellkultur

#### 2.2.1 Zell-Linien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgten Untersuchungen an drei humanen Zell-Linien. Als Modelle für die Leber, Blut und das zentrale Nervensystem (ZNS) wurden die Versuche an HepG2, TK6 und SH-SY5Y Zellen vorgenommen. Die HepG2 und SH-SY5Y Zellen bilden adhärente Monolayer aus, während TK6 Zellen als Suspensionskultur vorliegen.

#### 2.2.2 Medien

- HepG2/TK6: RPMI 1640 Medium (Biowest, FR), 10 % (v/v) FCS (Biowest, FR), 100 U/ml (v/v) Penicillin/Streptomycin (Biowest, FR), 2 mM Glutamin (Biowest, FR)
- SH-SY5Y: DMEM *high glucose* Medium (Biowest, FR), 10 % (v/v) FCS, 100 U/ml (v/v) Penicillin/Streptomycin, 2 mM Glutamin

#### 2.2.3 Kultivierung und Subkultivierung

Die unter Stickstoff kryokonservierten Zellsuspensionen wurden im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und zunächst in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche (TPP, SUI) kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte nachdem die Zellen am Flaschenboden angewachsen waren (ca. 12 h). Die nachfolgende Kultivierung der drei Zell-Linien erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 25 ml Vollmedium unter Standardkulturbedingungen im Inkubator (Hera cell 240, Thermo Scientific, USA) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Um eine optimale Nährstoffversorgung zu gewährleisten, wurde nach zwei bis drei Tagen ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach Erreichen einer Konfluenz von etwa 80 %, wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit einer Phosphat gepufferten Salzlösung (PBS, engl. *Phosphate Bufferd Saline*) gewaschen. Durch Zugabe von 2 ml Trypsin/Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA) und anschließender Inkubation im Inkubator wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Durch 8 ml Vollmedium wurde dieser Vorgang gestoppt, die Zellen mit einer 10 ml Vollpipette vom Boden abgespült und vereinzelt. 0,5 bis 3 ml der resultierenden Zellsuspension wurden zur Subkultivierung in eine neue Zellkulturflasche gegeben und erneut auf 25 ml mit entsprechendem Vollmedium aufgefüllt.

### 2.2.4 Zellzahlbestimmung und Aussaat

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe des *Z2 Coulter® Cell and Size Analyzer* (Beckman Coulter, US) nach Angaben des Herstellers. In Tabelle 1 sind die Aussaaten und Versuchsformate dargestellt. Die adhärenenten Zellen HepG2 und SH-SY5Y wurden für die Versuche am Vortag ausgesät um ein Anwachsen über Nacht zu ermöglichen.

Tab. 1: Versuchsformate und Zellausaaten für die durchgeführten Versuche

<b>XTT</b>				<b>COMET-Assay</b>	
Zellen	Format	Zellzahl 4 h	Zellzahl 24 h	Format	Zellzahl 1 h
TK6	96-Well	50.000	50.000	T25	$4 \cdot 10^5$
HepG2	96-Well	25.000	25.000	6-Well	$4 \cdot 10^5$
SH-SY5Y	96-Well	70.000	70.000	6-Well	$5 \cdot 10^5$

<b>RNA</b>				<b>Mikrokerntest</b>	
Zellen	Format	Zellzahl 4 h	Zellzahl 24 h	Format	Zellzahl 1 h
TK6	6 cm Schale	80 % Konfluenz		T25	$2,5 \cdot 10^6$
HepG2	6 cm Schale	80 % Konfluenz		T25	$1 \cdot 10^6$
SH-SY5Y	6 cm Schale	80 % Konfluenz		T25	-

<b>Proteine</b>				<b>Zellzyklus</b>		
Zellen	Format	Zellzahl 4 h	Zellzahl 24 h	Format	Zellzahl 4 h	Zellzahl 24 h
TK6	T75	80 % Konfluenz		T25	$1,6 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^5$
HepG2	T75	80 % Konfluenz		2x6-Well	$9 \cdot 10^5$	$5,1 \cdot 10^5$
SH-SY5Y	T75	80 % Konfluenz		2x6-Well	$9 \cdot 10^5$	$5,1 \cdot 10^5$

### 2.3 Behandlung der Zellen

Die Behandlung der Zellen erfolgte durch Zugabe der Substanzen zum Medium für 4 h und 24 h bzw. 1 h für den COMET-Assay sowie den Mikrokern-Test. Als Lösungsmittelkontrolle diente Dimethylsulfoxid (DMSO) bzw. im Falle von Nikotin und Chloroquin Wasser.



## 2.4 Einzelzelelektrophorese

Die Einzelzelelektrophorese (SCGE; engl. *Single cell gelelektrophoresis*; auch COMET-Assay) stellt ein Verfahren zur Detektion von DNA Schäden dar. Erstmals beschrieben durch Östling und Johansson [147] und nach weiterer Modifizierung durch Singh et al. [177] werden heute die neutrale und die alkalische Variante unterschieden. Bei diesem Verfahren werden Zellen in eine *low-melting-point* Agarose eingebettet, die Zellen lysiert und die DNA durch ein elektrisches Feld aufgetrennt. Je stärker

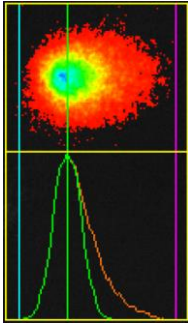


Abb. 15: Fluoreszenzoptisches Bild einer mit einer DNA-Fragmentierenden Substanz behandelten Zelle nach Einzelzelelektrophorese [148]

die DNA fragmentiert ist, desto weiter wandern die DNA-Fragmente im elektrischen Feld. Die hier durchgeführte alkalische Variante ist durch die Denaturierung der DNA-Stränge in der Lage sowohl Einzel- als auch Doppelstrang-Brüche der DNA zu detektieren. Die Abbildung 15 [148] zeigt beispielhaft eine geschädigte Zelle. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software *COMET IV* (Perceptive Instruments, UK). Für die Quantifizierung des DNA-Schadens wurde in dieser Arbeit das *Olive Tail Moment* verwendet. Dieses setzt sich aus dem Produkt der Schweiflänge und der Schweifintensität zusammen und bezieht somit die kleinsten Fragmente, sowie Anzahl der DNA Fragmente mit ein.

Die Zellen wurden hierfür nach der Substanz-Behandlung mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Die Reaktion wurde mit Voll-Medium abgestoppt und die Zellen bei 1000 rpm für 5 Min. abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 100-200  $\mu$ l Medium (abhängig von der Zellzahl) resuspendiert und 60  $\mu$ l mit 140  $\mu$ l zuvor erwärmter, 0,8 %iger GTG-Agarose (FMC Bioproducts, USA) vermischt. 50  $\mu$ l dieser Suspension wurden im Folgenden auf eine mit 1,5 %iger HGT-Agarose (FMC Bioproducts, USA) beschichteten Objektträger gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Nach Abkühlen wurde das Deckglas entfernt und in einer Küvette für 1 h im Dunkeln bei 4 °C im Lyse-Puffer inkubiert. Das Rack wurde mit Alkali-Puffer abgespült, die Objektträger in eine mit Alkali-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt und für 20 Min. equilibriert. Die folgende Elektrophorese wurde mit einer Stromstärke von 300 mA für 30 Min. durchgeführt. Im Anschluss wurden die Objektträger in eine mit auf 4 °C gekühltem Neutral-Puffer gefüllte Küvette überführt und für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Objektträger wurden zum Schluss in absoluten Ethanol getaucht und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am Folgetag wurden 25  $\mu$ l Ethidiumbromid-Lösung (20  $\mu$ g/ml in PBS) auf den Objektträger gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Proben wurden anschließend am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, GER) ausgewertet. Einbezogen wurden hier jeweils 50 Einzelzellen.

### 2.5 Mikrokern-Test

Der Mikrokern-Test dient der Erfassung von DNA-Schäden, verursacht durch aneugene und klastogene Substanzen. Im Zuge der Zellteilung werden Chromosomen oder Chromosomenbruchstücke mit einer eigenen Kernmembran umhüllt und liegen neben dem Zellkern in der Tochterzelle nach Zellteilung vor. In der vorliegenden Arbeit wurden die Mikrokerne mittels Durchflusszytometrie erfasst (2.1.9). Verwendet wurde das *in vitro micronucleus MicroFlow® Kit* (Litron Laboratories, UK). Die Durchführung der Versuche erfolgte nach Angaben des Herstellers.

1. Zellen in 15 ml Falcons überführen
2. 5 Min bei 1000 rpm zentrifugieren
3. Überstand abnehmen (3 ml PBS zugeben und erneut zentrifugieren)
4. Proben 20 Min auf Eis
5. 300 µl *Nucleic Acid Dye A working solution* zugeben
6. Proben auf Eis unter Lampe stellen (5 cm Abstand zwischen Tube und Lampe)
7. 30 Min bestrahlen (nach Bestrahlung mit möglichst wenig Lichtexposition fortfahren!)
8. 3 ml kalte 1 x *Buffer Solution* zugeben, vorsichtig resuspendieren
9. 5 Min bei 1000 rpm zentrifugieren, Überstand abnehmen
10. 500 µl *Complete Lysis Solution 1* zugeben und sofort nach Zugabe vorsichtig 5 s vortexen
11. Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur im dunkeln
12. 500 µl *Complete Lysis Solution 2* zugeben und sofort nach Zugabe vorsichtig 5 s vortexen
13. Inkubation für 30 Min bei Raumtemperatur im dunkeln
14. Proben bis zur Messung lichtgeschützt aufbewahren (Proben bei Raumtemperatur 24 h, bei -20 °C bis zu 72 h lagerfähig)

Abbildung 16 [111] zeigt das Funktionsprinzip des Testsystems. Nach Behandlung für 1 h und anschließender Kultivierung (TK6 24 h, HepG2 47 h) lagen im Versuch intakte Zellen, mit und ohne Mikrokerne, apoptotische und nekrotische Zellen vor. Durch die Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes wurden ausschließlich nekrotische und apoptotische Zellen angefärbt, da dieser die intakte Zellmembran nicht passieren kann. Im Anschluss wurde die Membran lysiert, so dass nur noch Zellkerne, Mikrokerne und apoptotische Körperchen verblieben. In einem zweiten Schritt wird ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff zugesetzt. Neben den intakten Zellkernen und Mikrokernen wurden auch apoptotische und nekrotische Körperchen durch diesen Farbstoff angefärbt. Diese lagen dann doppelt markiert vor. Durch die getrennte Detektion dieser Farbstoffe im Durchflusszytometer wurde eine Diskriminierung zwischen Mikrokernen/Zellkernen und apoptotischen/nekrotischen Zellen möglich. Über die Größe wurde eine Unterscheidung zwischen Zellkern und Mikrokern getroffen.

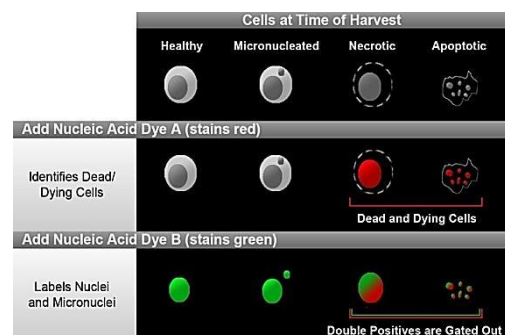


Abb. 16: Funktionsprinzip des *in vitro micronucleus MicroFlow® Kit* (Litron Laboratories, UK). [111]

## 2.6 Zytotoxizitätstest

Um die Zytotoxizität einer Substanz zu ermitteln steht eine Vielzahl von Testsystemen zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurde der XTT (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid) Assay (ATCC, UK) verwendet. Mit Hilfe dieser Methode lässt sich die Viabilität der Zellen über die Umsetzung des Tetrazolium Salzes XTT zu einem Formazan-Farbstoff bestimmen. Der orange-gelbe Farbstoff wird nach der Umsetzung photometrisch vermessen und ist proportional zur Zellzahl [168]. Das Funktionsprinzip ist in Abbildung 17 dargestellt. Katalysiert durch die mitochondriale Dehydrogenase bilden lebende, metabolisch aktive Zellen im Zitratzyklus NADH, welches in der Atmungskette zu  $\text{NAD}^+$  reduziert wird. Bei dieser Reaktion werden Elektronen frei, welche über transmembranen Elektronentransport mittels Oxidoreduktasen auf Phenazinmethosulfat (PMS) übertragen werden. Dieses wiederum reduziert das XTT zum Formazan-Farbstoff. Die Methode spiegelt somit den NADH-Status der Zelle wieder, welcher größtenteils aus dem Zitratzyklus in den Mitochondrien stammt [12]. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers mit einer vorausgegangenen Optimierung der Inkubationszeit. Diese ergab eine optimale Inkubationsdauer im Falle der HepG2 Zellen von 4 h und für die TK6 und SH-SY5Y Zellen von 5 h. Die eingesetzten Zellzahlen sind in Abschnitt 2.1.1.3 aufgeführt.

1. Nach Behandlung der Zellen Platte 5 Min. bei 1000 rpm zentrifugieren
2. Medium vorsichtig absaugen und 100  $\mu\text{l}$  frisches Medium zugeben
3. 50  $\mu\text{l}$ /Well XTT Reagenz zugeben (100  $\mu\text{l}$  *Activation Reagent* auf 5 ml *XTT Reagent*)
4. Im Inkubator für 4 h (HepG2) bzw. 5 h (TK6) inkubieren
5. Im *Microplate Reader* (Dynex MRXe, Dynex Technologies, USA) bei 450 – 500 nm messen

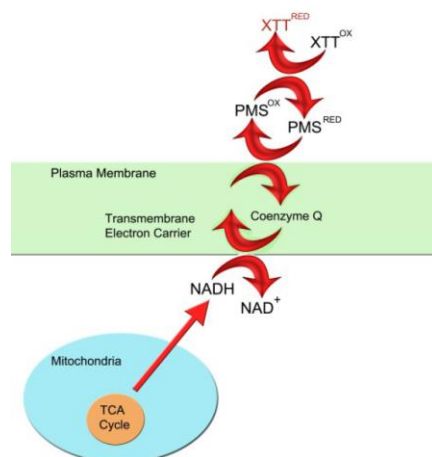


Abb. 17: Funktionsprinzip des XTT-Assay Kits (ATCC, UK), [8]

### 2.7 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Um eine qRT-PCR auf RNA-Ebene durchzuführen, ist es notwendig, die isolierte Gesamt-RNA zunächst in copy DNA (cDNA) umzuschreiben. Dies wird über eine virale Reverse Transkriptase bewerkstelligt. Hierbei wird zunächst über die RNA abhängige DNA-Polymerase ein RNA-DNA-Hybridstrang synthetisiert. Im Zuge der nachfolgenden Polymerase Ketten Reaktion (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*, 2.1.7) wird der RNA-Strang über eine RNase abgebaut und der DNA Doppelstrang über eine DNA-abhängige DNA-Polymerase vervollständigt. Die Synthese erfolgte mit Hilfe der Moloney-Murine-Leukemia-Virus (M-MuLV) Reversen Transkriptase (Applied Biosystems, USA) nach Vogel et. al [204]. Die M-MuLV weist hierbei nur eine geringe RNase Aktivität auf, so dass im Vergleich zu anderen häufig verwendeten Enzymen, nur wenig RNA hydrolysiert wird [167].

Die Isolierung sowie die Aufreinigung der Gesamt-RNA erfolgten mit Hilfe des RNeasy<sup>®</sup> Kit (Qiagen, NLD) über eine Säulenaffinitätschromatographie nach Anleitung des Herstellers. Zusätzlich wurde ein DNase I-Verdau (Qiagen, NLD) durchgeführt, um mögliche DNA Kontaminationen auszuschließen.

1. Medium absaugen und Zellen mit PBS waschen
2. 600 µl RLT Buffer zugeben und Zellen lysieren
3. Lysat auf eine QIAshredder Säule geben und 2 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
4. 600 µl 70 % Ethanol zum Durchfluss geben und mit Pipette mischen
5. Durchfluss auf RNeasy Säule geben, 15 s bei 10.000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
6. 700 µl RW1 Puffer auf die Säule geben, 15 s bei 10.000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
7. 500 µl RPE Puffer auf die Säule geben, 15 s bei 10.000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
8. 500 µl RPE Puffer auf die Säule geben, 15 s bei 10.000 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
9. 1 Min. bei 13.000 rpm trocken zentrifugieren
10. 50 µl RNase freies Wasser direkt auf die Säulen-Membran geben
11. 1 Min. bei 10.000 rpm zentrifugieren

Die Quantifizierung erfolgte photometrisch mit einem NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Die aufgereinigte RNA wurde im Folgenden für die Microarray-Hybridisierung und die qRT-PCR verwendet. Die für die qRT-PCR notwendige cDNA- Synthese erfolgte im Thermocycler (T gradient, Biometra, GER) für 60 Min. bei 42 °C. In Tabelle 2 sind die Probenansätze für die Synthese aufgeführt.

Tab. 2: Zusammensetzung der Proben für die cDNA-Synthese im Thermocycler für eine Stunde bei 42 °C

<b>Komponente</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Volumen [<math>\mu</math>l]</b>
Wasser	Qiagen	2
10 x Puffer	Applied Biosystems	1,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	Applied Biosystems	1,1
DTT (100 mM)	Life Technologies	1,5
dNTP's (2,5 mM)	Applied Biosystems	1,5
Rnasin (20 u/ $\mu$ l)	Applied Biosystems	0,6
Oligo-dT-Primer	Applied Biosystems	0,3
MuLV (50 u/ $\mu$ l)	Applied Biosystems	1,5

## 2.8 Microarray

Die Microarray Technologie ist ein Verfahren zur parallelen Analyse einer Vielzahl von Einzelnachweisen mit dem Einsatz geringer Probenmengen. Grundsätzlich stehen im Falle der Genexpressions-Analyse zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen kann der Expressionsstatus von Einzelproben betrachtet werden oder aber die Zustandsänderung, zum Beispiel vor und nach Behandlung, von zwei Proben parallel (*dual color System*) untersucht werden. Des Weiteren können sowohl ausgewählte Gene detektiert als auch genomweite Analysen durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren verwendet um genomweite Genexpressions-Analysen von Einzelproben durchzuführen. Verglichen wurden die Expression ohne Behandlung mit der Expression nach Behandlung. Hierzu wird die gesamte mRNA aus den Zellen isoliert (Abschnitt 2.1.5) und auf den Microarray-Chips hybridisiert und analysiert.

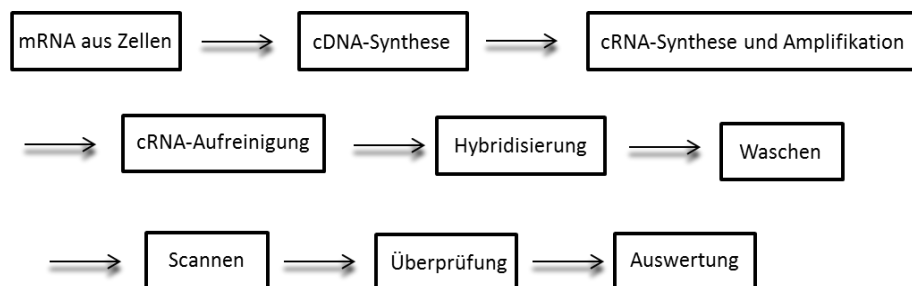


Abb. 18: Arbeitsablauf einer Microarray-Analyse

In Abbildung 18 ist der prinzipielle Arbeitsablauf dargestellt. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Nach der Isolierung und Aufreinigung der mRNA wurde diese zunächst durch eine reverse Transkriptase (*AffinityScript*) mit Hilfe eines Oligo-dT Primers in cDNA umgeschrieben. Diese wiederum wurde mit Hilfe einer RNA Polymerase (T7) in cRNA umgeschrieben. Hierbei wurden neben Nukleotid-triphosphaten (NTP's) ein mit Cyanin-Farbstoff (Cy5) markiertes Cytosintriphosphat zugegeben und in die cRNA eingebaut. Der doppelsträngige Hybridstrang aus cRNA und cDNA wurde denaturiert und der cRNA Strang aufgereinigt (Abb. 19). Dieser ist komplementär zu den auf dem Microarray immobilisierten Oligonukleotiden des Genoms und bindet bei der folgenden Hybridisierung an diese. Nach Quantifizierung der cRNA mittels NanoDrop (Thermo Fischer Scientific, USA) wurden 40 µl der Cy5 markierten cRNA in *10 x Blocking Agent* und *25 x Fragmentation Buffer*, verdünnt mit *2 x GEx HI-RPM Hybridization Buffer* auf den Array geladen und für 17 h bei 65 °C mit 10 rpm im Hybridisierungssofen (Agilent Technologies, USA) hybridisiert. Im Anschluss wurde der Microarray gewaschen und mit dem

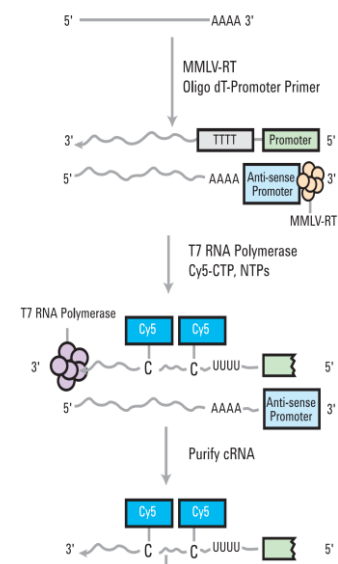


Abb. 19: Probenaufbereitung von mRNA zu antisense cRNA, modifiziert nach [2]

*SureScan Microarray Scanner System* (Agilent Technologies, USA) eingelesen, die Qualität (Feature Extraction V 10, Agilent Technologies, USA) überprüft und ausgewertet (GeneXplain, GER). In der vorliegenden Arbeit wurden die *whole genome Arrays SurePrint G3 Human GE V2 8x60K* und zugehörige Reagenzien von Agilent Technologies (USA) verwendet.

### 2.9 qRT-PCR

Die PCR stellt ein Verfahren zur Amplifikation von DNA-Sequenzen dar. Durch den Einsatz von entgegen gerichteten Oligonukleotiden (Primer) wird die Zielsequenz eingefasst. Eine zugesetzte DNA-Polymerase (Taq, *Thermus aquaticus*) vervollständigt im nächsten Schritt die gewünschte Sequenz. Durch Wiederholung des Vorgangs wird die gewünschte Nukleotidsequenz vervielfältigt. Unterteilt ist das Verfahren in 3 Schritte: Zunächst wird der DNA-Doppelstrang bei 95 °C Hitze-denaturiert. In einem zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung und Bindung der Primer. Die Temperatur für diesen Schritt ist abhängig vom verwendeten Primerpaar. Der dritte Schritt ist die Elongation der Primernukleotide, komplementär zum Ausgangsstrang der DNA-Sequenz, bei einer Temperatur von 72 °C. Diese drei Schritte werden als Zyklus bezeichnet und 30- bis 40-mal wiederholt. Unter der Annahme von optimalen Bedingungen erfolgt eine exponentielle Amplifikation bis ein Plateau erreicht wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine spezielle Variante, die so genannte quantitative Real-Time (qRT) PCR, verwendet. Über den Einsatz verschiedenster Nachweismethoden ermöglicht dieses Verfahren eine Quantifizierung der Amplifikatmenge nach jedem Zyklus. Verwendet wurden Hybridisierungs-Sonden (TIB MOLBIOL, GER), welche auf dem Prinzip des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET) basieren. Ein Donor-Fluorophor wird durch eine LED-Lichtquelle angeregt und überträgt die Energie auf ein Akzeptor-Fluorophor, sofern sich dieses in unmittelbarer Nähe befindet. Der Akzeptor-Farbstoff kann nicht durch die Lichtquelle angeregt werden und emittiert nach Anregung durch den Donor Licht einer längeren Wellenlänge. Die Fluorophore sind gekoppelt an zwei Oligonukleotide, die benachbart auf der Sequenz des Amplikons binden. Das 3'-Ende des einen Oligonukleotides trägt ein Fluorescein (Donor), das 5'-Ende des anderen ist mit einem LC Red 640 (Akzeptor) modifiziert. Die Emission des Farbstoffs ist hierbei proportional zur Amplifikatmenge. Dieses Verfahren wurde zur technischen Validierung der Microarrays verwendet. Untersucht wurden CDKN1A, P53, MDM2, GADD45A, XPC und TP53INP1, sowie das *Housekeeping* Gen  $\beta$ -Actin. Die Auswertung erfolgte mittels effizienzkorrigierter  $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Formel 1, 2).

$$\text{Formel 1: } \Delta C_p = C_p (\text{GOI}) - C_p (\beta - \text{Actin})$$

$$\text{Formel 2: } FC = E^{(\Delta C_p \text{ GOI unbehandelt} - \Delta C_p \text{ GOI behandelt})}$$

Die Probenar Formel 1, 2: Effizienzkorrigierte  $\Delta\Delta C_t$ -Methode; FC: fold change, GOI: gene of interest; E: Effizienz

Tab. 3: Zusammensetzung der Proben für die qRT-PCR im Light Cycler 480®

Komponente	Volumen [µl]
Probes Master	10
Primer I	1
Primer II	1
Sonde I	1
Sonde II	1
Probe	5
Wasser	1

Für die Durchführung der qRT-PCR wurde der Light Cycler 480 (Hoffmann La Roche, SUI) mit dem Light Cycler 480® Probes Master (Hoffmann La Roche, SUI) verwendet. Die *annealing* Temperaturen sowie die Primer- und Sonden-Sequenzen sind in Tab. 4 aufgeführt. Die Ermittlung der Effizienz für die anschließende Auswertung wurde mittels der Erstellung einer Konzentrationsreihe (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000) des Templates vorgenommen. Durchgeführt wurden 45 Zyklen, 95 °C für 10 s, *annealing* Temperatur für 20 s und Elongation bei 72 °C für 9 s.

Tab. 4: Annealing Temperaturen, sowie Primer- und Sonden-Sequenzen für die qRT-PCR im Light Cycler 480®

Gen	P53	TP53INP1
Foward-Primer	gCTGCTCAGATAgCgATggTCT	CggTACCATTgggCCAATA
Reverse-Primer	gTACAgTCAGAgCCAACCTCAG	gCTgAgAAACCAgTgCAAATATCTA
LC-Sonde	LC640-TCTgTCATCCAATACTCCACAgC--PH	LC640-CCACAAACATTTTATTTCAGCCTCTgg--PH
FL-Sonde	gCACCACCACACTATgTCgAAAAGT--FL	TggTTggAggAAgAACTgACTTCA--FL
Annealing-Temp. [°C]	57	57

Gen	Actin	GADD45A
Foward-Primer	AgCCTCgCCTTTgCCgA	AAGCTgCTCAACgTCgACC
Reverse-Primer	CTggTgCCTggggCg	CgTACCAgCACgCgAgT
LC-Sonde	LC640-CgACgACgAgCgCggCgATATC--PH	LC640-AgCCACATCTCTgTCgTCgTCCTCgT--PH
FL-Sonde	TTgCACATgCCggAgCCgTTg--FL	CTggATCAGggTgAAgTggATCTgCA--FL
Annealing-Temp. [°C]	61	58

Gen	XPC	p21
Foward-Primer	CgATggggATgACCTCagg	gAggCCgggATgAgTTg
Reverse-Primer	TTTCTTCTCTTCTTCTTgCTg	gAgTggTAGAAATCTgTCATgCTg
LC-Sonde	LC640-TgTgCCTTCTTgAggTCACTTgg--PH	LC640-gTCTTgTACCCTTgTgCCTCgCTC--PH
FL-Sonde	CATggTAGCCCTCTCTTCAgATg--FL	gAggAAgACCATgTggACCTgTCAC--FL
Annealing-Temp. [°C]	57	58

Gen	MDM2
Foward-Primer	CAGATgAATTATCTggTgAACgA
Reverse-Primer	AAACTgAATCCTgATCCAACC
LC-Sonde	LC640-TgTTgTgAAgAAgCAGTAgCAGTgA--PH
FL-Sonde	CTggCTCTgTgTgTAATAAgggAgAT--FL
Annealing-Temp. [°C]	53

### 2.10 Proteinbiochemische Methoden



### 2.10.1 Protein-Isolierung

Die für die nachfolgenden Versuche benötigten Proteine wurden mittels zweier Verfahren isoliert. Das für bestimmte Protein-Nachweise benötigte Kern-Protein wurde mit Hilfe des *Nuclear Extract Kit* (Active Motif, USA) extrahiert. Die Gesamt-Protein-Isolierung erfolgte mittels *Denaturing Cell Extraction Buffer* (Life Technologies, USA) mit Protease Inhibitor (Thermo Scientific, USA). In beiden Fällen wurde das Protokoll des Herstellers verwendet.

Gesamt-Protein:

1. Zellen 2 x mit PBS waschen und mit 1000 rpm für 5 Min. pelletieren
2. Zellpellet in 1 ml *Denaturing Cell Extraction Buffer* (Life Technologies, USA) mit Protease Inhibitor (Thermo Scientific, USA) resuspendieren und 30 Min. auf Eis inkubieren, alle 10 Min. vortexen
3. 15 Min. bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugieren
4. Überstand abnehmen und in Aliquots bei -80 °C lagern

Kern-Protein:

1. Medium abnehmen und mit 5 ml kaltem PBS/Phosphatase Inhibitor waschen
2. Überstand absaugen und 3 ml kalten PBS/Phosphatase Inhibitor zugeben
3. 5 Min. bei 200 x g bei 4 °C zentrifugieren
4. Überstand verwerfen und Zellpellet in 500 µl 1 x Hypotonischem Puffer resuspendieren
5. 15 Min. auf Eis inkubieren
6. 25 µl Detergenz zugeben und 10 s auf höchster Stufe vortexen
7. Suspension für 30 s 14000 x g bei 4 °C zentrifugieren (Überstand ist Cytoplasma Fraktion)
8. Kern-Pellet in 50 µl Complete Lysis Buffer resuspendieren
9. Für 30 Min. bei 4 °C und 150 rpm auf einem Schüttler inkubieren
10. 30 s vortexen und 10 Min. bei 14000 x g bei 4 °C zentrifugieren
11. Überstand aliquotieren und bei -80 °C lagern

### 2.10.2 Protein-Quantifizierung

Die Quantifizierung der Proteinextrakte erfolgte mittels Bicinchoninsäure (BCA) Assay nach Smith et al. [180]. Diese Methode basiert auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$  durch die Komplexbildung mit zwei Peptidbindungen und dem einwertigen Kupfer in alkalischer Umgebung. In einem zweiten Schritt reagieren die entstandenen Kupfer-Ionen mit der BCA zu einem dunkel-violetten, wasserlöslichen Komplex. Die Bildung dieses Komplexes ist hierbei proportional zur Proteinmenge. Vermessen wurde der Komplex photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm. Mittels einer

Standardreihe aus bovinem Serum-Albumin (BSA) wurde die eingesetzte Proteinmenge quantifiziert. Verwendet wurde das *Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit* (Life Technologies, USA). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Je 10 µl einer Serum-Albumin Standard-Reihe und den zu quantifizierenden Proben werden in Duplikaten in eine 96-Well *Clear Microplate* (R&D Systems, USA) gegeben. 200 µl Reagenz A und B (im Verhältnis 50:1) in jedes Well geben, mit einer Folie abdecken und 30 Min. bei 37 °C inkubieren. Platte auf Raumtemperatur abkühlen lassen und im *Microplate Reader* (Dynex MRXe, Dynex Technologies, USA) bei 560 nm vermessen.

### 2.10.3 Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, engl. Sodium dodecyl sulfate gelelectrophoresis) stellt ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld dar. Die Auftrennung erfolgt hierbei nach dem Molekulargewicht der Proteine in einem Polyacrylamidgel. Die Porengröße des Gels kann je nach Größe des gesuchten Proteins mit Hilfe des Acrylamid-Anteils angepasst werden. Um Effekte aufgrund der Struktur der Proteine zu vermeiden, werden die Proteine im Anschluss an die Isolation einer Hitzebehandlung bei 95 °C unterzogen. Durch Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen werden hierbei die Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine zerstört. Zusätzlich werden Disulfidbrücken durch die Zugabe reduzierender Thiolverbindungen, wie z. B. β-Mercaptoethanol gespalten und die Proteine somit vollständig gestreckt. Um die Eigenladung der Proteine zu überlagern, erfolgt die Zugabe von Natriumdodecylsulfat. Hierdurch haben alle Proteine ein annähernd gleiches Verhältnis zwischen Ladung und Größe, bilden Elipsoide aus und eine Auftrennung erfolgt ausschließlich aufgrund des Molekulargewichts der Proteine. Um eine höhere Auflösung zu erreichen, wurde in der vorliegenden Arbeit die diskontinuierliche Elektrophorese nach Laemmli [97] durchgeführt. Unter Verwendung eines Tris-HCl/Tris-Glycin Puffersystems werden die Proteine zunächst in einem weitporigen Sammelgel bei pH 6,8 gesammelt, damit eine einheitliche Startposition für die Auftrennung erreicht wird. Die Chloridionen bilden hierbei aufgrund der hohen Mobilität im Gel die Lauffront, während die Glycin-Ionen mit einer niedrigen Mobilität als Folge-Ionen fungieren. Im nachfolgenden, engporigen Trenngel wird durch einen pH-Wert von 8,8 erreicht, dass die Glycin-Ionen nun auch in die Lauffront wandern. Die Proteine trennen sich aufgrund der durch ihre Größe bedingten unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit auf. Zur Größenbestimmung wird ein Gemisch aus Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht verwendet. Durchgeführt wurde dieses Verfahren wie folgt:

Für die SDS-PAGE wurden 4-12 % Bis-Tris Gele (Bio-Rad, GER) verwendet. Aufgetragen wurden 30 µg Total-Protein bzw. 15 µg Kernprotein für den Nachweis von pATM. Als Laufpuffer kam 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS, Life Technologies, USA) zum Einsatz.

1. 1,5  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol (Merck Millipore, USA) und 7  $\mu\text{l}$  *4x LDS Sample Buffer* (Life Technologies, USA) zu jeder Probe geben
2. Proben mit Lysispuffer auf 30  $\mu\text{l}$  auffüllen
3. Proben 5 Min. bei 95 °C erhitzen, 1 Min auf Eis abkühlen
4. Proben abzentrifugieren
5. Elektrophoresekammer (Bio-Rad, GER) inkl. Kühlakku mit MOPS Puffer befüllen, Gel einsetzen, Kamm ziehen
6. Proben und Standard auftragen
7. 15 Min bei 100 V und 1 h bei 200 V auftrennen

### 2.10.4 Western Blot

Der Western-Blot bezeichnet den Vorgang der Übertragung und Immobilisierung der Proteine aus dem Gel auf eine Membran mittels eines elektrischen Feldes. Apparativ unterscheidet man hierbei das *Semidry-* und das *Tank-Blotting*. In beiden Varianten wird die Membran, sowie das Gel zwischen Filterpapieren angeordnet. Ein zur Membran senkrechtes, elektrisches Feld wird angelegt und so die Proteine, ohne Verlust der lokalen Auflösung im Gel, auf die Membran übertragen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membranen (Bio-Rad, GER) im *Tank-Blot* für den Nachweis eingesetzt. Der Blotvorgang wurde mit einem Methanol-haltigen Transferpuffer und mit einer Stromstärke von 300 mA für 45 Min. durchgeführt.

### 2.10.5 Markierung der Proteine und Detektion

Für das Anfärben und die Detektion der Proteine stehen eine Reihe von Methoden zur Verfügung, welche eine quantitative Auswertung mittels densitometrischer Verfahren ermöglichen. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Verfahren basiert auf der immunochemischen Markierung der gesuchten Proteine mittels spezifischer Antikörper, nachdem die Proteine aus dem Gel auf eine Membran übertragen wurden. Im Anschluss an den *Blot* wurden zunächst die freien Bindungsstellen der Membran mit Hilfe von 5 % (w/v) Magermilchpulver (Bio-Rad, GER), gelöst in einer Tris gepufferten Salzlösung (engl. tris buffered saline, TBS; Bio-Rad, GER) mit 0,1 % (v/v) Tween 20 (Bio-Rad, GER), abgesättigt. Die auf der Membran immobilisierten Proteine konnten nun mittels spezifischer Antikörper über Nacht bei 4 °C unter Schütteln markiert werden. Die mit dem Antikörper markierten Proteine wurden mit einer zweiten, mit Meerrettich-Peroxidase (HRP, engl. *horseradish peroxidase*) gekoppelter Antikörper, welcher gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, erkannt und die HRP ermöglichte im Folgenden die Umsetzung von Luminol. Die so entstehende Chemilumineszenz wurde im Anschluss mit Hilfe des Detektionssystems Stella 3200 (Raytest, SUI) detektiert. Der zuvor bei der SDS-PAGE eingesetzte Größenmarker ermöglichte hierbei die

größenmäßige Einordnung der detektierten Fragmente. Als Beladungskontrolle wurde ein Abgleich mit  $\alpha$ -Actin als konstitutiv exprimierte Protein vorgenommen. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software AIDA (Raytest, SUI). In Tabelle 5 sind die eingesetzten Antikörper und die eingesetzten Konzentrationen aufgeführt.

Tab. 5: Antikörper und zugehörige Verdünnung für den Western-Blot

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
$\alpha$ -Aktin	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
P53-HRP	Santa Cruz Biotechnology	1:200
P21	Santa Cruz Biotechnology	1:200
pATM	Santa Cruz Biotechnology	1:200
XPC	Abcam	1:1000
TP53INP1	Santa Cruz Biotechnology	1:200
anti-mouse HRP	Santa Cruz Biotechnology	1:2000
anti-rabbit HRP	Santa Cruz Biotechnology	1:2000
anti-mouse poly-HRP	Thermo Fisher Scientific	1:5000
anti-rabbit poly-HRP	Thermo Fisher Scientific	1:5000

### 2.10.6 *Enzyme linked immuno sorbent assay*

Der *Enzyme linked immuno sorbent assay* (ELISA) stellt eine Methode dar um Antigene quantitativ oder qualitativ nachzuweisen. Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Variante, dem *Sandwich-ELISA* wird zunächst ein Antikörper gegen das Substrat auf dem Boden einer Mikrotiter-Platte immobilisiert. In einem zweiten Schritt wird das Antigen zugegeben und bindet an den immobilisierten Antikörper. Ein zweiter, gegen das Antigen gerichteter Antikörper wird zugegeben und bindet an dieses. Im Anschluss wird ein dritter Antikörper, gerichtet gegen den zweiten Antikörper zugegeben. Durch die direkte Kopplung eines Substrat umsetzenden Enzyms an diesen Antikörper wird das Antigen indirekt nachgewiesen. Wie auch in dieser Arbeit wird als Enzym häufig die HRP und als Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet. TMB wird durch die Peroxidase oxidiert und erscheint zunächst blau. Die Reaktion wird durch die Zugabe von Schwefelsäure gestoppt und das Reaktionsprodukt stabilisiert. Dieses kann nun photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm vermessen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der *Sandwich-ELISA* für den Nachweis von an Ser 15, 33, 46, 392 sowie Thr 18 und 55 und Lys 382 phosphoryliertem P53 verwendet. Die Untersuchungen der Phosphorylierung an Serin 15 wurden mit dem *DuoSet<sup>®</sup> IC Human Phospho-P53 (S15) Kit* (R&D Systems, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Untersuchung der anderen Modifikationsstellen erfolgte nach folgendem Protokoll. Die verwendeten Antikörper und zugehörige Konzentrationen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

1. Den Coating Antikörper in PBS verdünnen und 50 µl/Well zugeben; Platte mit Klebefolie abdecken; über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren
2. Waschen: Lösung abschütten und 3 x mit der Spritzflasche mit Wasch-Puffer waschen, auf Papier ausklopfen
3. Blockieren: 300 µl Block-Puffer (R&D Systems, USA) /Well zugeben, 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
4. Waschen: Lösung abschütten und 3 x mit der Spritzflasche mit Wasch-Puffer waschen, auf Papier ausklopfen
5. Proben-Zugabe (100 µl/Well); 2 h bei Raumtemperatur im dunkeln inkubieren
6. Waschen: Lösung abschütten und 3 x mit der Spritzflasche mit Wasch-Puffer waschen und auf Papier ausklopfen
7. Detektion: Den Detektions-Antikörper in Block-Puffer verdünnen und 100 µl/Well zugeben, Platte abdecken; 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
8. Waschen: Lösung abschütten und 4 x mit der Spritzflasche mit Wasch-Puffer waschen und auf Papier ausklopfen

9. Sekundären Antikörper in Block-Puffer verdünnen und 100 µl/Well zugeben; 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln
10. Waschen: Lösung abschütten und 4 x mit der Spritzflasche mit Wasch-Puffer waschen und auf Papier ausklopfen
11. HRP Substrate A und B (R&D Systems, USA) 1:1 mindestens 15 Min vor Gebrauch aus dem Kühlschrank nehmen, kurz vor Gebrauch mischen und 100 µl/Well zugeben; 20 Min bei Raumtemperatur im dunkeln inkubieren
12. 50 µl/Well *Stop Solution* (R&D Systems, USA) zugeben; im *Microplate Reader* (Dynex MRXe, Dynex Technologies, USA) bei 450 nm (Referenz 570 nm) messen

Tab. 6: Antikörper und zugehörige Verdünnung für den phospho-P53-ELISA

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
P53 <i>mouse monoclonal</i>	Sigma-Aldrich	2 µg/ml
Threonin 18	Antikörper-online	1:20000
Serin 33	Antikörper-online	1:5000
Serin 46	Antikörper-online	1:5000
Threonin 55	Antikörper-online	1:1000
Lysin 382	Antikörper-online	1:2500
Serin 392	Antikörper-online	1:2000
<i>anti-rabbit</i> poly-HRP	Thermo Fisher Scientific	1:5000

### 2.11 Durchflusszytometrie (Zellzyklus)

Die Durchflusszytometrie stellt eine Methode zur Quantifizierung kleiner Partikel wie zum Beispiel Zellen oder Zellkernen dar. Die Proben-Bestandteile werden in einem Flüssigkeitsstrom vereinzelt und passieren einen Laser. Der Laserstrahl wird abgelenkt und als Seitwärtsstreulicht (SSC, engl. Side Scatter) und Vorwärtsstreulicht (FSC, engl. Forward Scatter) detektiert. Der SSC gibt Auskunft über die Granularität, der FSC über die Größe der Bestandteile. Zusätzlich können über Fluoreszenzfarbstoffe bestimmte Zellbestandteile angefärbt und nach Anregung durch den Laser die emittierte Fluoreszenz der angeregten Farbstoffe detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet um die Zellen nach Behandlung auf die Zellzyklusphasen hin zu untersuchen. Hierfür wird die DNA der Zellen über einen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff markiert. Durch die unterschiedliche Menge an DNA in den Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen können diese unterschieden werden. Die Durchführung erfolgte nach unten stehendem Protokoll:

1. Überstand in ein 15 ml Falcon überführen (Bei TK6 Zellen Zellsuspension überführen, Schritte 2-6 entfallen)
2. Well mit 1 ml PBS spülen und zum Überstand geben
3. 0,5 ml 0,05 %ige (w/v) EDTA Lösung in PBS zugeben und 5 Min. inkubieren
4. 500 µl AccuMax (PAA, AUT)/Well zugeben und im Inkubator bei 37 °C inkubieren bis Zellen abgelöst sind
5. Mit 3 ml PBS abstoppen und zum Überstand geben
6. Well mit 1 ml PBS waschen und in Falcon überführen
7. 5 Min bei 1000 rpm zentrifugieren
8. Überstand absaugen
9. Zellen in 5 ml PBS resuspendieren und erneut 5 min bei 100 rpm zentrifugieren
10. Überstand absaugen und 1 ml 70 %igen Ethanol zugeben, Zellen über Nacht bei 4 °C fixieren
11. 5 Min. bei 5000 rpm zentrifugieren und Überstand absaugen
12. Zellen in 500 µl PBS resuspendieren und erneut bei 3000 rpm für 5 Min zentrifugieren
13. Überstand absaugen
14. 500 µl PureLink™ Rnase A (Life Technologies, US) zugeben und für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubieren
15. Direkt vor der Messung 500 µl Propidium-Iodid Lösung (0,1 mg/ml in PBS) zugeben und im Durchflusszytometer messen

### 2.12 Statistik

Die statistischen Berechnungen für alle Experimente, mit Ausnahme der Microarray Analysen, wurden mit Hilfe der Software Prism® 6 (GraphPad Software, USA) durchgeführt. Die Signifikanz-Berechnungen wurden hier mittels Varianzanalyse (ANOVA, engl. Analysis Of Variance) durchgeführt. Die Annotation der statistischen Signifikanz in den Diagrammen wurde entsprechend der p-Werte vorgenommen ( $p < 0,05 = *$ ;  $p < 0,01 = **$ ;  $p < 0,001 = ***$ ).

Die Analyse der Microarray Daten erfolgte mit Hilfe der Software GeneXplain (geneXplain GmbH, GER). Die für die weitergehenden Analysen erforderliche Normalisierung der Daten wurde innerhalb dieser Software mit dem *linear model for micrarray data* (LIMMA) durchgeführt. Verwendet wurde eine Quantil-Normalisierung, um systematische Unterschiede, die Intensität der Spots betreffend, zwischen den einzelnen Arrays herauszurechnen. Für die Kalkulation der statistisch signifikant differentiell exprimierten Gene (DEG) wurde der Student's t-Test verwendet. Als Kriterien dienten hier ein p-Wert  $< 0,05$  und ein *fold change* (FC)  $> 1,5$ . Für die Ermittlung der *Master Regulators* (MR) wurden die DEG's nach FC und p-Wert soweit gefiltert, dass maximal 200 DEG's in die Analyse mit einbezogen wurden. Die Identifizierung der statistisch signifikanten MR (*false discovery rate* (FDR)  $< 0,05$ ) erfolgte anhand von *GeneWays*, einer Datenbank, welche Gene und ihre funktionellen Interaktionen auf Basis von Literaturdaten beinhaltet. Die *Gene Set Enrichment Analyse* (GSEA), eine rechenbasierte Methode, welche ermittelt ob ein *a priori* definiertes, funktionell zusammenhängendes Set an Genen (eine sog. *Gene Ontology* (GO)), statistisch signifikant verändert vorliegt, erfolgte mittels der in GeneXplain implementierten Methode des *Broad Institute*. Diese basiert auf dem Kolmogorow-Smirnov-Test, der überprüft ob eine Zufallsvariable einer zuvor angenommenen Wahrscheinlichkeitsverteilung folgt. Als statistische Kenngrößen resultieren aus der GSEA die FDR und der nominale p-Wert. Verwendet wurden GOs mit einer FDR  $< 0,05$  und einem nominalen p-Wert  $< 0,05$ . Als weiteres Filterkriterium wurde das Level der GOs verwendet. Innerhalb der GSEA sind den GOs hierarchisch Level zugeordnet. Hierbei gilt je höher das Level desto spezieller der Prozess, welcher durch diese GO beschrieben wird. Verwendet wurden resultierende GOs mit einem Level  $> 3$ .



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der verwendeten Zellsysteme

Für die Charakterisierung der eingesetzten Zellsysteme TK6, HepG2 und SH-SY5Y wurde zunächst der genotoxische Effekt der verwendeten Substanzen mittels COMET-Assay und Mikrokerntest untersucht. Die Messung der Zytotoxizität erfolgte mit Hilfe des XTT-Assays.

##### 3.1.1 COMET-Assay und Mikrokerntest

In den Untersuchungen im COMET-Assay und Mikrokerntest wurde der Großteil der Substanzen in den drei Zellsystemen als genotoxisch respektive nicht genotoxisch erkannt. Auf Basis des COMET-Assays zeigen in TK6 Zellen DMBA, Lamivudin und Paclitaxel falsch negative sowie PMA falsch positive Ergebnisse. Da DMBA erst durch metabolische Aktivierung toxifiziert wird und dies in den TK6 Zellen nicht der Fall ist, wurde im Folgenden BPDE verwendet. Exemplarisch sind in Abbildung 20 die Ergebnisse für einen Teil der Substanzen dargestellt. Abbildung 20, A zeigt die dosisabhängige Induktion des *Tail Moments* nach Behandlung mit BPDE. Nach Behandlung mit Chloroquin (Abb 20, B) ist eine solche Induktion nicht zu sehen. Dies ist auch nach Behandlung mit Paclitaxel (Abb 20, C) der Fall, während PMA (Abb 20, D) einen reproduzierbaren, dosisabhängigen Anstieg des *Tail Moments* zur Folge hat. Die Daten der HepG2 Zellen resultieren aus einem vorausgegangenem Projekt.

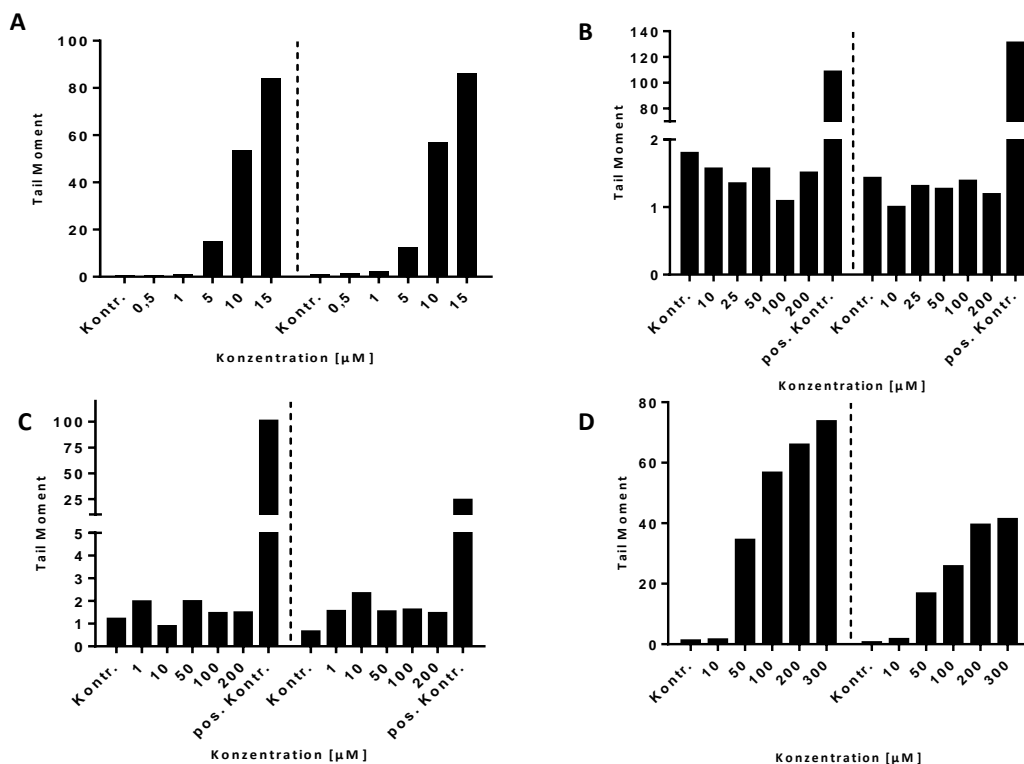


Abb. 20: COMET-Assay Ergebnisse in TK6 Zellen nach Behandlung für eine Stunde mit BPDE (A), Chloroquin (B), Paclitaxel (C) und PMA (D) dargestellt als konzentrationsabhängige Änderung des *Tail Moments*; (n=2; biologische Replikate; Betrachtung von je 50 Einzelzellen)

Aufgrund von mangelnden Kapazitäten wurde in den SH-SY5Y Zellen nur ein reduziertes Substanz-Set bestehend aus Etoposid, Paclitaxel und Chloroquin verwendet. Hier zeigen Chloroquin und Paclitaxel keine Erhöhung des *Tail Moments*. Etoposid weist, wie auch in den anderen beiden Zellsystemen, einen dosisabhängigen Anstieg des *Tail Moments* auf (Daten nicht gezeigt). Im Folgenden wurden alle Substanzen auf Mikrokern-Induktion in den Zellsystemen untersucht. Auch hier sind die Daten der HepG2 Zellen im Vorläuferprojekt entstanden. Diese zeigen, eine korrekte Einstufung der Substanzen als genotoxisch respektive nicht-genotoxisch (Daten nicht gezeigt). In den TK6 Zellen werden mit Ausnahme von DMBA ebenfalls alle Substanzen korrekt eingestuft. Die Abbildung 21 zeigt die Mikrokern-Induktion sowie die relative Überlebensrate von TK6 Zellen nach Behandlung mit BPDE (A), Chloroquin (B), Paclitaxel (C) und PMA (D). PMA zeigt im Gegensatz zum COMET-Assay hier kein genotoxisches Potential. Auch bei einer bereits reduzierten relativen Überlebensrate werden, wie auch nach Behandlung mit Chloroquin, keine Mikrokerne gebildet. Paclitaxel induziert konzentrationsabhängig Mikrokerne bei abfallender relativer Überlebensrate. Dies trifft auch für die Behandlung mit BPDE zu.

Die Mikrokerninduktion in den SH-SY5Y Zellen konnte aufgrund der sehr hohen Verdopplungszeit mittels FACS-Analyse nicht bestimmt werden.

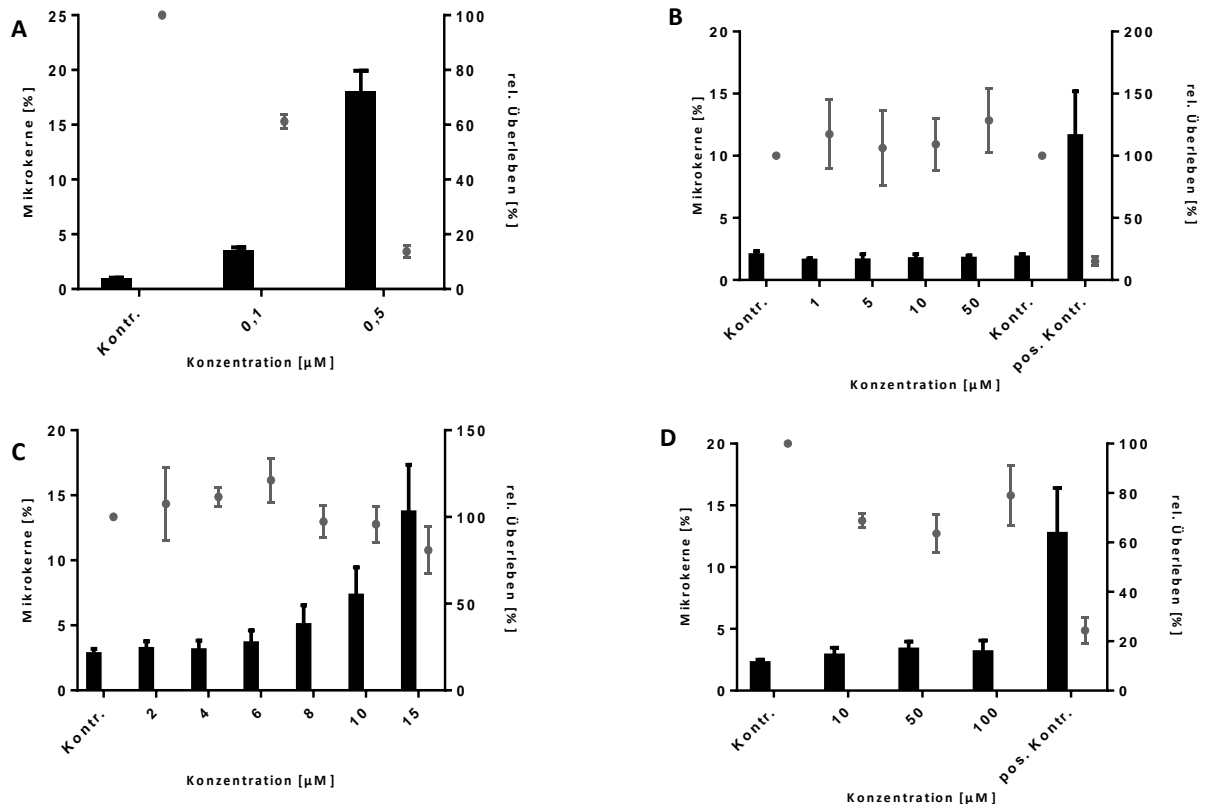


Abb. 21: Mikrokern-Test Ergebnisse in TK6 Zellen nach 1 h Behandlung und 23 h Erholungsphase mit BPDE (A), Chloroquin (B), Paclitaxel (C) und PMA (D); (n=3; biologische Replikate; Betrachtung von je 10000 Einzelzellen mittels FACS)

## 3.1.2 XTT-Assay

Mit Hilfe des XTT-Assays wurde die Zytotoxizität der eingesetzten Substanzen in den Zellsystemen ermittelt und das *no observed adverse effect level* (NOAEL) sowie die Dosis bei welcher 20 % der Zellen sterben ( $LD_{20}$ ) bestimmt. Im Falle der HepG2 Zellen wurden Zytotoxizitätsmessungen aus einem vorausgegangen Projekt verwendet. In den Abbildungen 23 und 24 sind exemplarisch die Dosis-Wirkungskurven von BPDE und Etoposid in TK6 Zellen dargestellt.

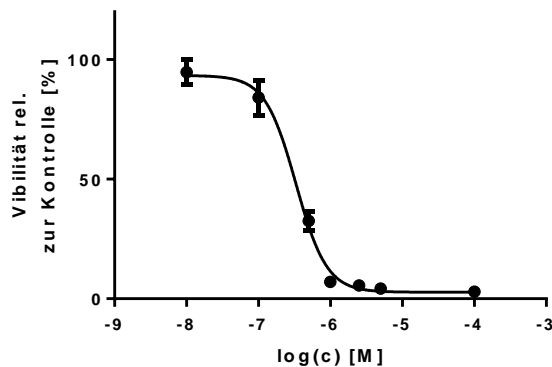


Abb. 23: Dosis-Wirkungs-Kurve von BPDE in TK6 Zellen nach 24 h Behandlung. (n=3; biologische Replikate)

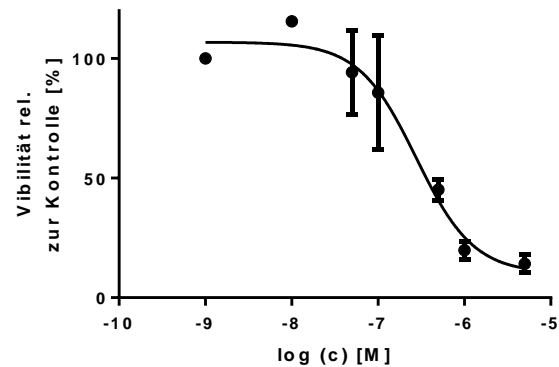


Abb. 24: Dosis-Wirkungs-Kurve von Etoposid in TK6 Zellen nach 24 h Behandlung. (n=3; biologische Replikate)

In Tabelle 7 sind die resultierenden Konzentrationen für alle Substanzen in den verwendeten Zell-Linien aufgeführt. Die  $LD_{20}$  Konzentrationen unterscheiden sich zwischen den Zellsystemen um einen Faktor von bis zu 250.

Tab. 7: Aus den Zytotoxizitätsmessungen resultierende Behandlungskonzentrationen der Zell-Linien

Substanz	HepG2		TK6		SH-SY5Y	
	$LD_{20}$ [ $\mu$ M]	NOAEL [ $\mu$ M]	$LD_{20}$ [ $\mu$ M]	NOAEL [ $\mu$ M]	$LD_{20}$ [ $\mu$ M]	NOAEL [ $\mu$ M]
MNU	1750	500	50	5	-	-
BPDE	-	-	0,15	0,01	-	-
DMBA	30	3	-	-	-	-
Streptonigrin	0,02	0,002	0,0002	0,00005	-	-
Etoposid	50	7,5	0,2	0,02	0,2	0,05
Paclitaxel	0,03	0,006	0,006	0,001	0,01	0,001
Lamivudin	2000	200	1000	100	-	-
PMA	1,6	0,4	10	1	-	-
Phenobarbital	1000	50	1500	150	-	-
Nikotin	50	10	7,5	1	-	-
Chloroquin	3000	1000	5000	1000	34	10

### 3.2 Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse wurde verwendet, um sowohl Wirkmechanismus-spezifische Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten in der Genregulation zwischen den eingesetzten Substanzen sowie zwischen den Zellsystemen zu identifizieren. Die technische Validierung der Expressionsmessungen mit *whole genome Microarrays* erfolgte mittels qRT-PCR anhand der Gene P53, CDKN1A, MDM2 und GADD45A.

#### 3.2.1 Differentiell exprimierte Gene

Auf Ebene der differentiell exprimierten Gene (DEG) sind deutliche Unterschiede in der Expressionsregulierung sowohl zwischen den Substanzen als auch zwischen den gleichen Substanzen in den verschiedenen Zell-Linien zu sehen. Die Anzahl der durch die Behandlung statistisch signifikant regulierten Gene ist in Tabelle 8 beispielhaft für die LD<sub>20</sub> nach 24 h Behandlung zusammengefasst. Die hier sichtbaren Unterschiede zeigen sich ebenfalls für die Konzentration des NOAEL sowie für die Zeitpunkte 4 und 24 h (Daten nicht gezeigt). Es besteht eine konzentrations- und zeitabhängige Veränderung des Genexpressionsprofils.

Tab. 8: Differentiell exprimierte Gene nach 24 h Behandlung mit in Tab. 7 aufgeführten LD<sub>20</sub> in HepG2 und TK6 Zellen. Zahlen in Klammern stehen für die in TK6 und HepG2 Zellen gemeinsam regulierten Gene.

	LD <sub>20</sub> 24 h					
	↑ HepG2	↑ TK6	↑ SY5Y	↓ HepG2	↓ TK6	↓ SY5Y
<b>BPDE/DMBA</b>	805 (59)	510 (59)	-	1015 (57)	322 (57)	-
<b>Etoposid</b>	3663 (561)	1072 (561)	27	2853 (328)	690 (328)	0
<b>Lamivudin</b>	836 (169)	792 (169)	-	480 (127)	265 (127)	-
<b>MNU</b>	790 (11)	43 (11)	-	1200 (7)	16 (7)	-
<b>Paclitaxel</b>	486 (179)	1401 (179)	18	464 (196)	1084 (196)	0
<b>Streptonigrin</b>	2171	n.D.	-	2172	n.D.	-
<b>Chloroquine</b>	1610 (2)	26 (2)	943	1556 (1)	11 (1)	618
<b>Nikotin</b>	578 (109)	746 (109)	-	217 (31)	512 (31)	-
<b>Phenobarbital</b>	33 (3)	51 (3)	-	22 (1)	79 (1)	-
<b>PMA</b>	781 (162)	1173 (162)	-	1713 (322)	1097 (322)	-

3.2.1.1 Filterung der DEG nach *fold change*

Die Abbildungen 25 und 26 zeigen hierarchische Cluster Analysen der statistisch signifikant regulierten Gene mit einem *fold change* (FC) größer als 2 nach Behandlung mit der LD<sub>20</sub> für 24 h. Im Falle der HepG2 Zellen lassen sich zwei Gruppen bilden. Streptonigrin und Etoposid in der einen und alle anderen Substanzen in der zweiten mit weiteren Untergruppen. In den TK6 Zellen ergeben sich nach der Analyse ebenfalls zwei Gruppen, die beide weitere Untergruppen bilden. Die genotoxischen Substanzen BPDE, MNU, Etoposid, Lamivudin und Paclitaxel, wobei BPDE, MNU, Etoposid und Lamivudin eine größere Ähnlichkeit zueinander aufweisen als zu Paclitaxel und eine Untergruppe bilden. Die nicht-genotoxischen Substanzen sind in zwei weiteren Untergruppen zu finden. Streptonigrin ist hier als einzige genotoxische Substanz in der Untergruppe mit den nicht-genotoxischen Substanzen zu finden. Dies liegt hauptsächlich an der, im Vergleich zu den anderen genotoxischen Substanzen, geringen Anzahl an signifikant regulierten Genen im Expressionsprofil. Die Cluster-Analysen mit der Konzentration am NOAEL, respektive nach 4 h Behandlung, ergeben für beide Zellsysteme weitestgehend heterogene Gruppen und Untergruppen, welche keine Trennung in genotoxisch und nicht-genotoxisch erlauben (Daten nicht gezeigt).

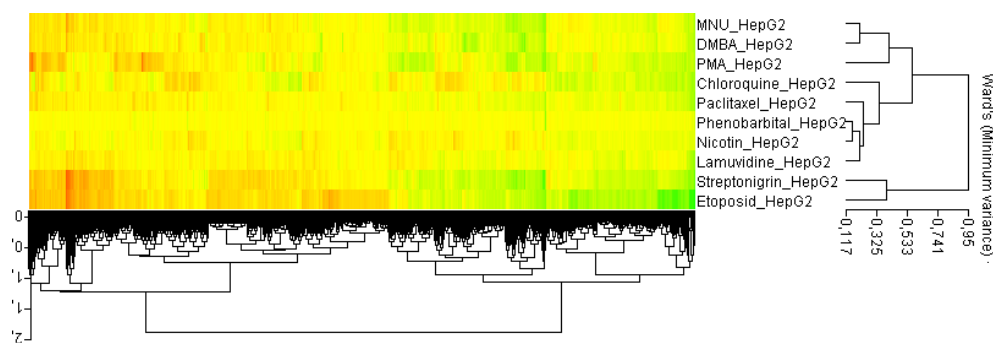


Abb. 25:HCA von in mindestens einem Fall mit einem FC > 2 statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) regulierten Genen in HepG2 Zellen erstellt mit ArrayTrack™ mittels *Wards minimum variance method*

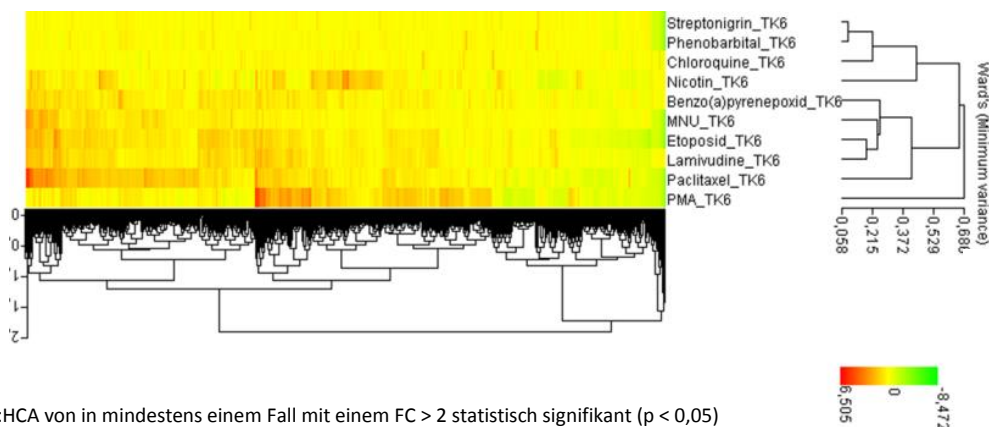


Abb. 26:HCA von in mindestens einem Fall mit einem FC > 2 statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) regulierten Genen in TK6 Zellen erstellt mit ArrayTrack™ mittels *Wards minimum variance method*

## 3.2.1.2 Filterung der DEG nach Klassifizierungsgenen aus der Literatur

Um eine Diskriminierung der Substanzen in genotoxische und nicht-genotoxische zu erzielen, wurden im Folgenden Analysen mit publizierten Klassifizierungsgenen [106] durchgeführt. In Abbildung 27 sind die *Heatmaps* der Cluster-Analysen nach 24 h (A) und 4 h (B) Behandlung mit der LD<sub>20</sub> sowie nach 24 h mit der NOAEL-Konzentration (C) für HepG2 und TK6 Zellen dargestellt.

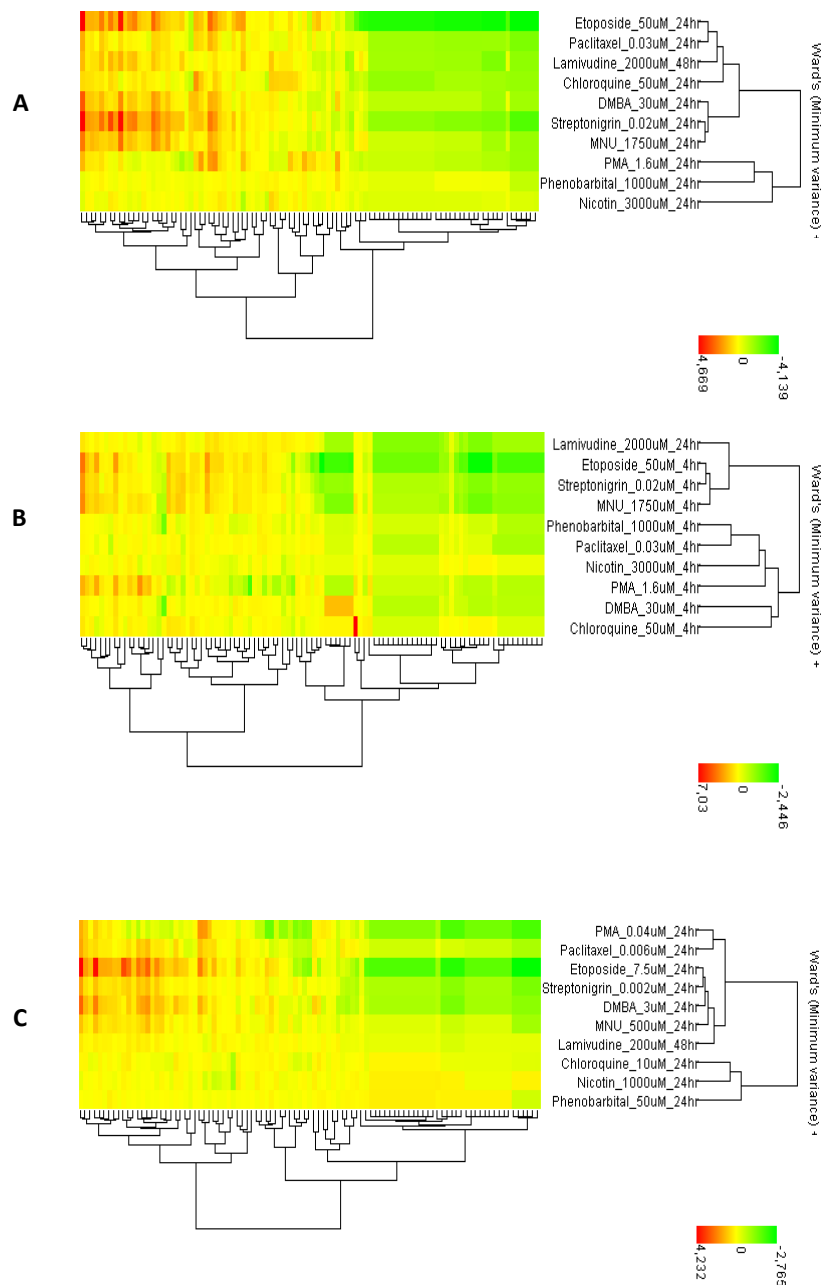


Abb. 27:HCA mit Klassifizierungs-Genen in HepG2 Zellen; A: 24 h Behandlung LD<sub>20</sub>, B: 4 h Behandlung LD<sub>20</sub>, C: 24 h NOAEL. Erstellt mit ArrayTrack™ mittels Wards minimum variance method.

In den HepG2 Zellen zeigt sich nach 24 h Behandlung mit der LD<sub>20</sub> (Abb. 27, A) eine Aufspaltung in zwei Gruppen. Die nicht-genotoxischen Substanzen Phenobarbital, PMA und Nikotin bilden eine Gruppe, alle genotoxischen und Chloroquin stellen die zweite Gruppe dar, wobei MNU, DMBA und Streptonigrin eine eigenständige Untergruppe darstellen. 4 h nach Behandlung stellt sich das Bild wie folgt dar (Abb 27, B). Wieder sind zwei Gruppen zu sehen, Lamivudin, Etoposid, Streptonigrin und MNU in der einen und die restlichen genotoxischen zusammen mit den nicht-genotoxischen Substanzen in der zweiten Gruppe. Nach Behandlung mit der NOAEL-Konzentration nach 24 h (Abb. 27, C) ergeben sich zwei Gruppen, Chloroquin, Nikotin und Phenobarbital in der einen, die anderen Substanzen in der zweiten mit zwei Untergruppen. Die eine Untergruppe bilden die genotoxischen Substanzen Etoposid, Streptonigrin, DMBA, MNU und Lamivudin. Die andere Untergruppe bilden Paclitaxel und PMA.

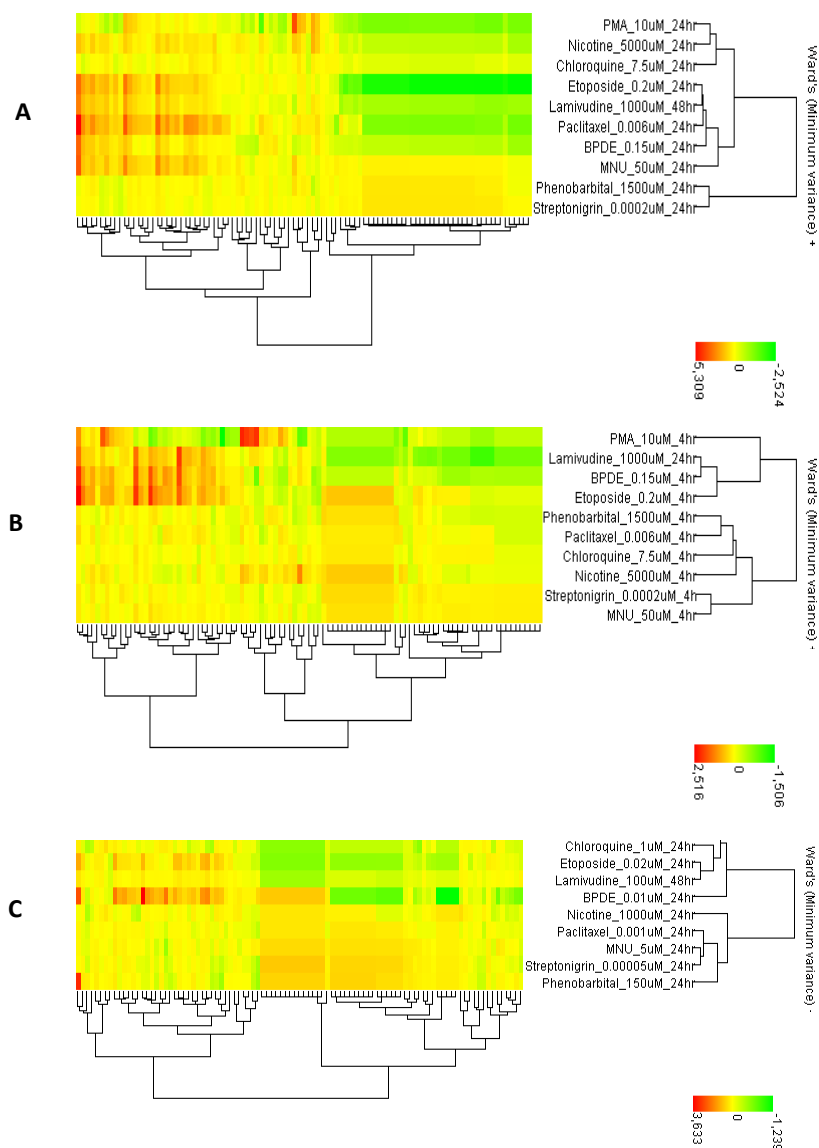


Abb. 28:HCA mit Klassifizierungs-Genen in TK6 Zellen; A: 24 h Behandlung LD<sub>20</sub>, B: 4 h Behandlung LD<sub>20</sub>, C: 24 h NOAEL. Erstellt mit ArrayTrack™ mittels *Wards minimum variance method*.

In den TK6 Zellen nach 24 h Behandlung mit der LD<sub>20</sub> (Abb. 28, A) bilden PMA, Nikotin und Chloroquin eine Gruppe aus. Die zweite Gruppe wird von den Genotoxinen mit Ausnahme von Streptonigrin gestellt, welches mit Phenobarbital eine eigene Gruppe bildet. 4 h nach Behandlung ergibt sich eine andere Unterteilung (Abb. 28, B). Lamivudin, BPDE und Etoposid sind in einer Untergruppe und bilden zusammen mit PMA eine Gruppe. Alle weiteren Substanzen sind in der zweiten Gruppe enthalten. Bei 24 h Behandlung mit der NOAEL-Konzentration (Abb. 28, C) bilden sich zwei Gruppen, in denen nicht-genotoxische und genotoxische Substanzen ohne erkennbare Unterscheidung vorliegen.

### 3.2.2 Gene Set Enrichment Analysis

Um zu ermitteln in wie weit *a priori* definierte, funktionell zusammenhängende Gen-Sets durch die Behandlung statistisch signifikant reguliert sind, wurde die *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) des *Broad Institute* durchgeführt. Tabelle 9 zeigt am Beispiel der 24 h Behandlung von HepG2 Zellen mit der LD<sub>20</sub> von Etoposid Wirkmechanismus-assoziierte *GO terms*. Aus einer Liste mit insgesamt 901 *GO terms* hängen 106 mit der DNA-Schadensantwort zusammen. Diese sind den Kategorien DNA Reparatur, Stressantwort, Apoptose und Zell-Zyklus zuzuordnen. Abhängig von Konzentration und Behandlungsdauer variiert die Anzahl der im Vergleich zur Kontrolle veränderten Signalwege. Unterschiede sind auch zwischen den verschiedenen Substanzen und den Zell-Linien erkennbar (Daten nicht gezeigt). Wirkmechanismus-assoziierte Unterschiede werden jedoch anhand der *GO terms* nicht deutlich.

Tab. 9: Wirkmechanismus-assoziierte *GO terms* nach 24 h Behandlung von HepG2 Zellen mit der LD<sub>20</sub> von Etoposid. Jedem *GO term* ist hierbei eine eindeutige Annotation zugeordnet und gehört einem bestimmten Level an. Das Level gibt die jeweilige Einordnung in die Hierarchie der *GO terms* an. Je höher das Level desto spezifischer ist der *GO term*.

DNA Reparatur		
GO term	Level	Name
GO:0006281	6	DNA repair
GO:0006297	6	nucleotide-excision repair, DNA gap filling
GO:0006302	7	double-strand break repair
GO:0000725	7	recombinational repair
GO:0006284	7	base-excision repair
GO:0019985	7	translesion synthesis
GO:0051103	7	DNA ligation involved in DNA repair
GO:0006289	7	nucleotide-excision repair
GO:0000724	8	double-strand break repair via homologous recombination
GO:0010569	8	regulation of double-strand break repair via homologous recombination
GO:0006303	8	double-strand break repair via nonhomologous end joining
GO:2000779	8	regulation of double-strand break repair
GO:0000729	8	DNA double-strand break processing



---

<b>Stressantwort</b>		
<b>GO term</b>	<b>Level</b>	<b>Name</b>
GO:0006950	3	response to stress
GO:0006979	4	response to oxidative stress
GO:0033554	4	cellular response to stress
GO:0006974	5	response to DNA damage stimulus
GO:0034976	5	response to endoplasmic reticulum stress
GO:0034599	5	cellular response to oxidative stress
GO:0034976	5	response to endoplasmic reticulum stress
GO:0034614	6	cellular response to reactive oxygen species
GO:0042772	7	DNA damage response, signal transduction resulting in transcription

---

<b>Apoptose</b>		
<b>GO term</b>	<b>Level</b>	<b>Name</b>
GO:0097190	5	apoptotic signaling pathway
GO:0012501	5	programmed cell death
GO:0010941	5	regulation of cell death
GO:0008630	6	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage
GO:0097193	6	intrinsic apoptotic signaling pathway
GO:0006915	6	apoptotic process
GO:0010942	6	positive regulation of cell death
GO:0043067	6	regulation of programmed cell death
GO:0008637	6	apoptotic mitochondrial changes
GO:0043068	7	positive regulation of programmed cell death
GO:0072332	7	intrinsic apoptotic signaling pathway by P53 class mediator
GO:0042981	7	regulation of apoptotic process
GO:0042771	7	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by P53 class mediator
GO:0000726	7	non-recombinational repair
GO:0033209	7	tumor necrosis factor-mediated signaling pathway
GO:0012502	8	induction of programmed cell death
GO:0006917	9	induction of apoptosis

---

Zell-Zyklus			Zell-Zyklus		
GO term	Level	Name	GO term	Level	Name
GO:0007049	4	cell cycle	GO:0000090	7	mitotic anaphase
GO:0022402	4	cell cycle process	GO:0000089	7	mitotic metaphase
GO:0051301	4	cell division	GO:1901988	7	negative regulation of cell cycle phase
GO:0070314	4	G1 to G0 transition	GO:0045839	7	negative regulation of mitosis
GO:0007050	5	cell cycle arrest	GO:0045931	7	positive regulation of mitotic cell cycle
GO:0022403	5	cell cycle phase	GO:1901987	7	regulation of cell cycle phase transition
GO:0044770	5	cell cycle phase transition	GO:0006275	7	regulation of DNA replication
GO:0007067	5	mitosis	GO:0007088	7	regulation of mitosis
GO:0000278	5	mitotic cell cycle	GO:1901990	7	regulation of mitotic cell cycle phase
GO:0007094	5	mitotic spindle assembly	GO:0060236	7	regulation of mitotic spindle organization
GO:0051726	5	regulation of cell cycle	GO:0051783	7	regulation of nuclear division
GO:0042127	5	regulation of cell proliferation	GO:0033261	7	regulation of S phase
GO:0007051	5	spindle organization	GO:0000084	7	S phase of mitotic cell cycle
GO:0051322	6	anaphase	GO:0000075	8	cell cycle checkpoint
GO:0008637	6	apoptotic mitochondrial changes	GO:0008156	8	negative regulation of DNA replication
GO:0006915	6	apoptotic process	GO:1902100	8	negative regulation of metaphase/anaphase
GO:0034614	6	cellular response to reactive	GO:1901991	8	negative regulation of mitotic cell cycle phase
GO:0000077	6	DNA damage checkpoint	GO:0045841	8	negative regulation of mitotic metaphase/anaphase transition
GO:0051319	6	G2 phase	GO:0043065	8	positive regulation of apoptotic process
GO:0097193	6	intrinsic apoptotic signaling	GO:0007096	8	regulation of exit from mitosis
GO:0000279	6	M phase	GO:1902099	8	regulation of metaphase/anaphase transition
GO:0044772	6	mitotic cell cycle phase transition	GO:0030071	8	regulation of mitotic metaphase/anaphase
GO:0007052	6	mitotic spindle organization	GO:0031570	9	DNA integrity checkpoint
GO:0045786	6	negative regulation of cell cycle	GO:0007093	9	mitotic cell cycle checkpoint
GO:0010948	6	negative regulation of cell cycle	GO:0031577	9	spindle checkpoint
GO:0051782	6	negative regulation of cell division	GO:0000076	10	DNA replication checkpoint
GO:0051784	6	negative regulation of nuclear	GO:0044774	10	mitotic DNA integrity checkpoint
GO:0000280	6	nuclear division	GO:0071174	10	mitotic spindle checkpoint
GO:0045787	6	positive regulation of cell cycle	GO:0071173	10	spindle assembly checkpoint
GO:0010564	6	regulation of cell cycle process	GO:0033314	11	mitotic DNA replication checkpoint
GO:0051320	6	S phase			
GO:0000080	7	G1 phase of mitotic cell cycle			
GO:0000082	7	G1/S transition of mitotic cell cycle			
GO:0031572	7	G2 DNA damage checkpoint			
GO:0000085	7	G2 phase of mitotic cell cycle			
GO:0000086	7	G2/M transition of mitotic cell cycle			
GO:0000087	7	M phase of mitotic cell cycle			

3.2.3 *Master Regulators*

Um eine Erklärung für das veränderte Expressionsprofil nach Behandlung zu finden, ist es notwendig übergeordnete Gene zu identifizieren, welche als regulatorische Schlüsselproteine das veränderte Expressionsmuster maßgeblich mitbestimmen. Diese Schlüsselproteine werden als *Master Regulators (MR)* bezeichnet und können Aufschluss über Mechanismus-spezifische Reaktionen der Zellen liefern. Somit können sie zur Diskriminierung von Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen beitragen. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen biologisch relevante *MR* zu erhalten, wurden nur *MR* verwendet, welche auch nach Behandlung differentiell exprimiert waren. Der anschließende Vergleich der identifizierten *MR*-Kandidaten zwischen den Zell-Linien und Substanzen (Tab. 10) zeigt, dass die identifizierten *MR* konzentrations- und zeitabhängige Expressionsunterschiede aufweisen. Auch wird deutlich, dass für gleiche Substanzen eine unterschiedliche Anzahl von *MR* in den Zellsystemen ermittelt wurde.

Tab. 10: Anzahl der Identifizierten *MR* in den Zell-Systemen abhängig von Behandlungsdauer und Konzentration

Substanz	Chloroquin				
	Dosis/Zeit	50 µM 24 h	50 µM 4 h	10 µM 24 h	10 µM 4 h
HepG2		45	20	0	13
TK6		4	2	6	6

Substanz	DMBA/BPDE				
	Dosis/Zeit	30 µM 24 h	30 µM 4 h	3 µM 24 h	3 µM 4 h
HepG2		29	24	10	21
TK6		20	7	11	4

Substanz	Etoposid				
	Dosis/Zeit	50 µM 24 h	50 µM 4 h	7.5 µM 24 h	7.5 µM 4 h
HepG2		167	48	30	44
TK6		17	13	14	14

Substanz	Lamivudin				
	Dosis/Zeit	2000 µM 48 h	2000 µM 24 h	200 µM 48 h	200 µM 24 h
HepG2		7	11	0	0
TK6		15	18	n.D.	3

Substanz	MNU				
	Dosis/Zeit	1750 µM 24 h	1750 µM 4 h	500 µM 24 h	500 µM 4 h
HepG2		25	27	9	11
TK6		8	5	7	5

Substanz	Nikotin				
	Dosis/Zeit	3000 µM 24 h	3000 µM 4 h	1000 µM 24 h	1000 µM 4 h
HepG2		37	15	21	3
TK6		22	20	5	9

Substanz	Paclitaxel				
	Dosis/Zeit	0.03 µM 24 h	0.03 µM 4 h	0.006 µM 24 h	0.006 µM 4 h
HepG2		28	8	27	2
TK6		26	8	4	11

Substanz	Phenobarbital				
	Dosis/Zeit	1000 µM 24 h	1000 µM 4 h	50 µM 24 h	50 µM 4 h
HepG2		17	13	0	19
TK6		19	12	10	9

Substanz	PMA				
	Dosis/Zeit	1.6 µM 24 h	1.6 µM 4 h	0.04 µM 24 h	0.04 µM 4 h
HepG2		49	20	50	40
TK6		42	35	43	46

Substanz	Streptonigrin				
	Dosis/Zeit	0.02 µM 24 h	0.02 µM 4 h	0.002 µM 24 h	0.002 µM 4 h
HepG2		28	24	11	12
TK6		4	11	5	14

Des Weiteren ist ersichtlich, dass unterschiedliche *MR*-Kandidaten für genotoxische Substanzen (GTX) und für nicht-genotoxischen Substanzen (NGTX) reguliert werden, sowie auch hier Unterschiede zwischen den Zellsystemen bestehen (Tab. 11). In den HepG2 Zellen konnten 331 *MR*-Kandidaten für die GTX identifiziert werden. In den TK6 lediglich 167. Die Schnittmenge liegt hier bei 49 *MR*. Im Falle der NGTX sind in den HepG2 263 *MR*-Kandidaten reguliert während in den TK6 181 ermittelt wurden. Die Zahl der in beiden Zell-Linien regulierten *MR* beläuft sich auf 36. Zwischen GTX und NGTX liegt die Anzahl der im gleichen Zell-System identifizierten *MR*-Kandidaten zwischen 23 und 29 % (Tab. 11).

Tab. 11: Identifizierten *MR* in HepG2 und TK6 Zellen für GTX und NGTX; die Schnittmengen sind farblich in Klammern prozentual dargestellt

	HepG2	TK6
GTX	331 (22,7 %) (14,8 %)	167 (25,1 %) (29,3 %)
NGTX	263 (28,5 %) (13,7 %)	181 (23,2 %) (19,9 %)

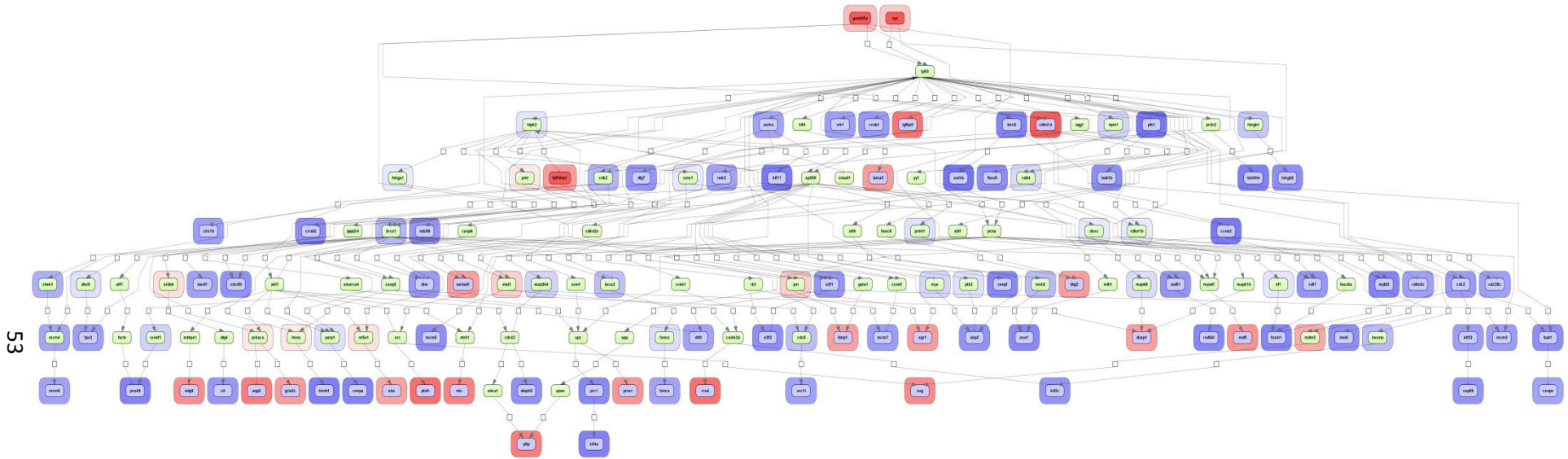
Tabelle 12 zeigt eine Auswahl an identifizierten *MR*-Kandidaten in HepG2 und TK6 Zellen, welche eine biologische Relevanz in Bezug auf den Wirkmechanismus aufweisen. Im Falle der GTX Substanzen konnten hier hauptsächlich Proteine identifiziert werden, welche mit der DNA-Schadensantwort zusammenhängen während bei den NGTX eher die allgemeine Stressantwort im Vordergrund steht. Für die DNA-Schadensantwort identifizierte *MR*-Kandidaten sind unter anderen TP53INP1, XPC, DDB2, GADD45A, GADD45B und CDKN1A. Für die allgemeine Stressantwort sind dies zum Beispiel BBC3, JDP2 und AKR1C2.

### 3 Ergebnisse

Tab. 12: Auswahl biologisch relevanter *MR* in HepG2 und TK6 Zellen

Substanz	Chloroquin				DMBA/BPDE			
<b>Dosis/Zeit</b>	50 µM 24 h	50 µM 4 h	10 µM 24 h	10 µM 4 h	30 µM 24 h	30 µM 4 h	3 µM 24 h	3 µM 4 h
<b>HepG2</b>	e2f8	tP53inp1	n.s.d.	gnas	cyp1a1	cyp1a1	cyp1b1	n.s.d.
	gadd45b				tP53inp1	ilrap18	cdkn1a	
	tP53inp1				prkca		akr1c1	
					akr1c1		GADD45A	
<b>Dosis/Zeit</b>	7.5µM 24 h	7.5 µM 4 h	1 µM 24 h	1 µM 4 h	0.15 µM 24 h	0.15 µM 4 h	0.01 µM 24 h	0.01 µM 4 h
<b>TK6</b>	cxcl9	gfra1	pnpt1	efna2	exo1	ddb2	tP53inp1	ttk
						mad11l	sult1a3	
Substanz	Etoposid				Lamivudin			
<b>Dosis/Zeit</b>	50 µM 24 h	50 µM 4 h	7.5 µM 24 h	7.5 µM 4 h	2000 µM 48 h	2000 µM 24 h	200 µM 48 h	200 µM 24 h
<b>HepG2</b>	tP53inp1	tP53inp1	tP53inp1	tP53inp1	zak (down)	tP53inp1	n.s.d.	n.s.d.
	GADD45A	xpc	GADD45A	xpc	mapk11	bccip		
	gadd45b		cdkn1a	ddb2				
				GADD45A				
<b>Dosis/Zeit</b>	0.2 µM 24 h	0.2 µM 4 h	0.02 µM 24 h	0.02 µM 4 h	1000 µM 48 h	1000 µM 24 h	100 µM 48 h	100 µM 24 h
<b>TK6</b>	atf3	tP53inp1	tP53inp1	nlrc4	tnfs10	casp4	n.s.d.	pcif1
		xpc						
		GADD45A						
Substanz	MNU				Nicotin			
<b>Dosis/Zeit</b>	1750 µM 24 h	1750 µM 4 h	500 µM 24 h	500 µM 4 h	3000 µM 24 h	3000 µM 4 h	1000 µM 24 h	1000 µM 4 h
<b>HepG2</b>	tP53inp1	tP53inp1	tP53inp1	tP53inp1	akr1c2	map3k8	cyp3a5	cyp1a1
	mapk11	GADD45A	bbc3	xpc		cyp1a1		
		xpc						
<b>Dosis/Zeit</b>	50 µM 24 h	50 µM 4 h	5 µM 24 h	5 µM 4 h	5000 µM 24 h	5000 µM 4 h	1000 µM 24 h	1000 µM 4 h
<b>TK6</b>	tnfrsf10b	n.s.d.	twist2	n.s.d.	bbc3	bbc3	n.s.d.	n.s.d.
Substanz	Paclitaxel				Phenobarbital			
<b>Dosis/Zeit</b>	0.03 µM 24 h	0.03 µM 4 h	0.006 µM 24 h	0.006 µM 4 h	1000 µM 24 h	1000 µM 4 h	50 µM 24 h	50 µM 4 h
<b>HepG2</b>	e2f8	n.s.d.	gadd45b	n.s.d.	jdp2	epah7	n.s.d.	rab3d
	gadd45b					med12		
<b>Dosis/Zeit</b>	0.006 µM 24 h	0.006 µM 4 h	0.001 µM 24 h	0.001 µM 4 h	1500 µM 24 h	1500 µM 4 h	150 µM 24 h	150 µM 4 h
<b>TK6</b>	tP53inp1	n.s.d.	n.s.d.	fosl2	hic1	arnt2	hist4h4	fosl2
	xpc							
	bbc3							
Substanz	PMA				Streptonigrin			
<b>Dosis/Zeit</b>	1.6 µM 24 h	1.6 µM 4 h	0.04 µM 24 h	0.04 µM 4 h	0.02 µM 24 h	0.02 µM 4 h	0.002 µM 24 h	0.002 µM 4 h
<b>HepG2</b>	mmp3	mmp3	e2f7	cdkn1a	tP53inp1	tP53inp1	tP53inp1	histh4h
		fosl1	cdkn2c	fosl1	fosl2	ddb2	ddb2	sirt2
					ddb2	xpc		
					pidd, irdd	GADD45A		
						cdkn1a		
<b>Dosis/Zeit</b>	10 µM 24 h	10 µM 4 h	1 µM 24 h	1 µM 4 h	0.0002 µM 24 h	0.0002 µM 4 h	0.00005 µM 24 h	0.00005 µM 4 h
<b>TK6</b>	egr3	egr3	egr3	egr3	n.s.d.	n.s.d.	n.s.d.	n.s.d.

Um die Zusammenhänge der *MR* mit den DEG zu verdeutlichen, sowie auch identifizierte *MR* zu verknüpfen wurden Netzwerke generiert. In Abb. 29 ist beispielhaft eines der generierten Netzwerke zu sehen. Hier sind die drei *MR* XPC, TP53INP1 und GADD45A, welche nach Behandlung mit der LD<sub>20</sub> von Etoposid für 24 h in HepG2 Zellen differentiell exprimiert sind, zu sehen. Das Netzwerk lässt erkennen, dass ein Großteil der Proteine innerhalb des Netzwerks nach Behandlung differentiell oder zumindest konstitutiv exprimiert sind. Dies trifft auf alle generierten Netzwerke für die mit der LD<sub>20</sub> für 24 h behandelten Zellen zu (Daten nicht gezeigt). Auffällig hierbei ist, dass, wie auch im gezeigten Netzwerk, P53 eines der Schlüsselproteine sowohl für die DNA-Schadensantwort, als auch für die generelle Stressantwort darstellt.



53

Abb. 29: Integriertes MR Netzwerk für XPC, TP53INP1 und GADD45A nach Behandlung von HepG2 Zellen mit Etoposid für 24 h mit der LD<sub>20</sub>. Eine Hoch-Regulation wird mittels roter Umrandung verdeutlicht, eine Herunter-Regulation mit blauen Rahmen. Weiße Rahmen stehen für exprimierte aber nicht differenziell zur Kontrolle exprimierte Gene.

Betrachtet man das Interaktionsnetzwerk der Proteine (Abb. 30) so wird die starke, funktionelle Interaktion zwischen den Proteinen noch deutlicher als im MR Netzwerk. 98 % der im *MR* Netzwerk befindlichen Proteine weisen direkte Interaktionen auf. Innerhalb des Netzwerks befinden sich zahlreiche Proteine der DNA-Schadensantwort wie P53, TP53INP1, MDM2, XPC, GADD45A, BRCA1, BRCA2, EXO1, RAD51, CASP3, CASP6, CHEK1, CDKN1A, CDK2, CDK4 und viele weitere. Dies ist auch für die anderen Substanzen in beiden Zellsystemen vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Dennoch sind in den jeweiligen Netzwerken faktisch andere Proteine zu finden.

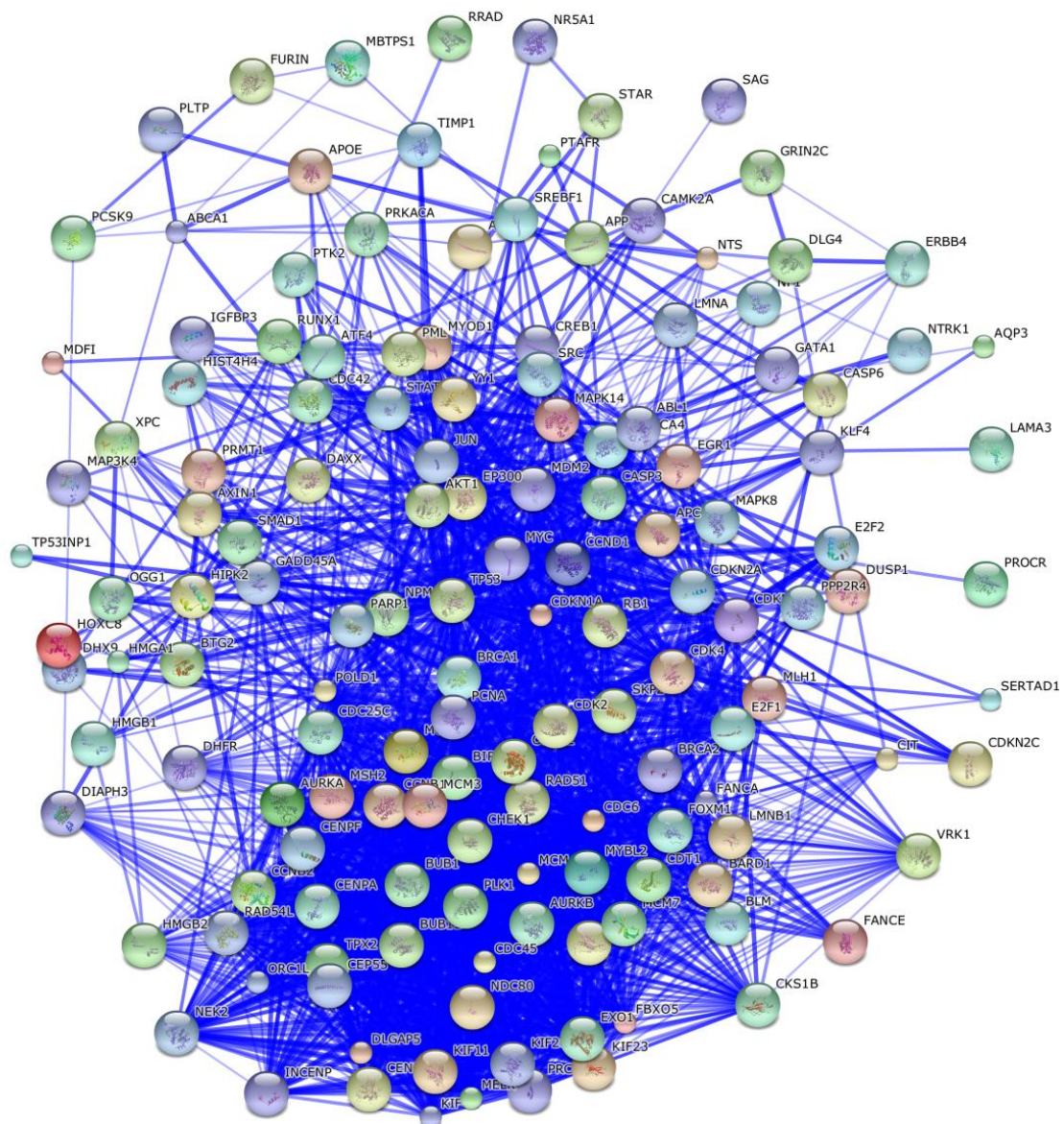


Abb. 30: *STRING* Interaktionsnetzwerk des *MR* Netzwerks nach 24 h Behandlung von HepG2 Zellen mit der  $LD_{20}$  von Etoposid, generiert mittels [186]



## 3.2.4 Auswahl eigener Diskriminatoren

Um Gene zur Diskriminierung von genotoxischen und nicht-genotoxischen Substanzen aus den ermittelten Daten zu extrahieren, sowie Informationen bezüglich des Wirkmechanismus zu erhalten, wurden zunächst die statistisch regulierten Gene genotoxischer Substanzen mit denen der nicht-genotoxischen Substanzen verglichen. Hierbei fand die Betrachtung getrennt nach erhöhter und erniedrigter Expression im Vergleich zur Kontrolle statt. Die Abbildung 31 zeigt die resultierenden Venndiagramme für HepG2 (Abb. 31, A) und TK6 (Abb. 31, B) Zellen.

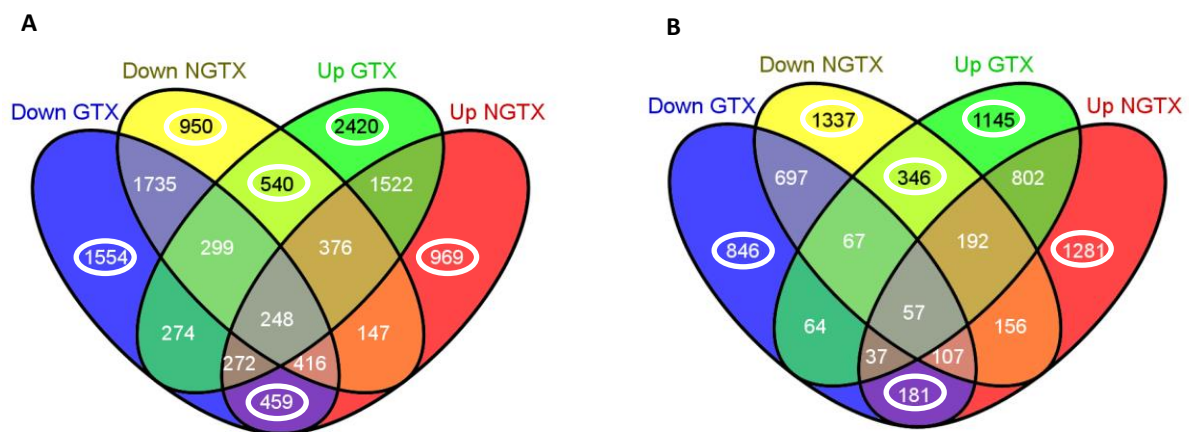


Abb. 31: Schnittmengen der in HepG2 (A) und TK6 (B) Zellen statistisch signifikant regulierten Gene; Down: erniedrigte Expression, Up: erhöhte Expression, GTX: Genotoxine, NGTX: nicht-genotoxische Substanzen, generiert mittels [146]

Für die weiteren Analysen wurden alle Gene ausgewählt, die ausschließlich bei genotoxischen Substanzen hoch- bzw. herunter-reguliert waren. Zusätzlich wurden die Gene verwendet die nur durch die Behandlung mit den nicht-genotoxischen Substanzen statistisch signifikant verändert vorlagen. Des Weiteren wurden die durch genotoxische und nicht-genotoxische Substanzen gegensätzlich regulierte Gene einbezogen. Die Auswahl der Gene ist in den Abbildungen 31,A und 31,B kenntlich gemacht. Die resultierenden zwei Genlisten enthalten 6892 Gene für die HepG2 und 5136 Gene für die TK6 Zellen. Um allgemeingültigere und nicht zellspezifische Gene zu erhalten, wurde die Schnittmenge aus beiden Zell-Linien ermittelt (Abb. 32). Es resultiert eine Genliste mit 2114 Genen.

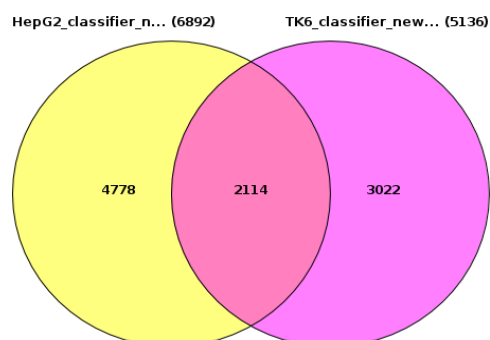


Abb. 32: Schnittmengen der in HepG2 und TK6 Zellen ermittelten Klassifizierungs-Gene

Um diese Liste weiter zu reduzieren, wurden ausgehend von einer *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) die signifikanten *Gene Ontology terms* (GO terms) für alle Substanzen für beide verwendeten Konzentrationen und Zeitpunkte näher betrachtet. Hierbei wurde erkennbar, dass die Wirkmechanismus-assoziierten Gene wahrscheinlich ganz bestimmten GO terms zugeordnet sind. In Tabelle 13 sind die ausgewählten GO terms für die weitere Filterung der DEG dargestellt.

Tab. 13: GO terms zur Eingrenzung der Diskriminatoren und Gewinnung von Wirkmechanismus-assoziierten Informationen

GO term	Name
GO:0006281	DNA repair
GO:0008630	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage
GO:0000077	DNA damage checkpoint
GO:0042770	signal transduction in response to DNA damage

Zugehörig zu diesen GO terms sind 500 Gene, welche im Folgenden mit den aus den Datensätzen ermittelten 2114 Genen verglichen wurden (Abb. 33).

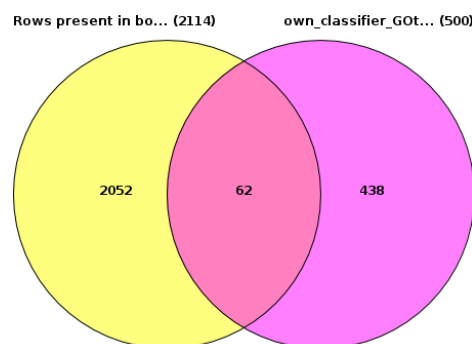


Abb. 33: Schnittmengen der Klassifizierungs-Gene mit den Genen aus der GSEA

Die Schnittmenge lieferte eine Genliste mit 62 Genen, die in Proteine translatiert 61 individuelle Proteine ergaben. Diese sind in Tab. 14 aufgeführt. Um eine biologische Verbindung dieser Proteine zu ermitteln wurde eine Interaktionsanalyse durchgeführt. Abbildung 34 zeigt das Interaktionsnetzwerk der 29 Proteine, die in direkter Interaktion zueinander stehen.



Im Folgenden wurden die 61 identifizierten Klassifizierungsgene verwendet, um eine weitere HCA durchzuführen. Abb. 35 zeigt die Ergebnisse der in HepG2 Zellen durchgeführten Untersuchungen. Die Behandlung für 24 h mit der LD<sub>20</sub> (A) zeigt eine Aufspaltung in zwei Gruppen. Die erste Gruppe spaltet sich in zwei Untergruppen auf. Chloroquin und Nikotin in der einen und PMA, Phenobarbital und Paclitaxel in der anderen. Die genotoxischen Substanzen sind, mit Ausnahme von Paclitaxel, in der zweiten Gruppe zu finden. Nach 4 h Behandlung mit der LD<sub>20</sub> (B) erhält man eine Gruppe mit Lamivudin, Etoposid, Streptonigrin und MNU sowie eine zweite Gruppe mit PMA, Chloroquin, Nikotin, Phenobarbital, Paclitaxel und DMBA. Nach Behandlung mit der Konzentration des NOAEL für 24 h (C) erhält man eine Gruppe mit Chloroquin, Nikotin, PMA und Phenobarbital, sowie eine mit allen genotoxischen Substanzen (Paclitaxel, DMBA, Lamivudin, MNU, Streptonigrin und Etoposid). Die Behandlung mit der Konzentration des NOAEL für 4 h für zur Bildung von zwei gemischten Gruppen der genotoxischen und nicht-genotoxischen Substanzen (Abb. 35, D).

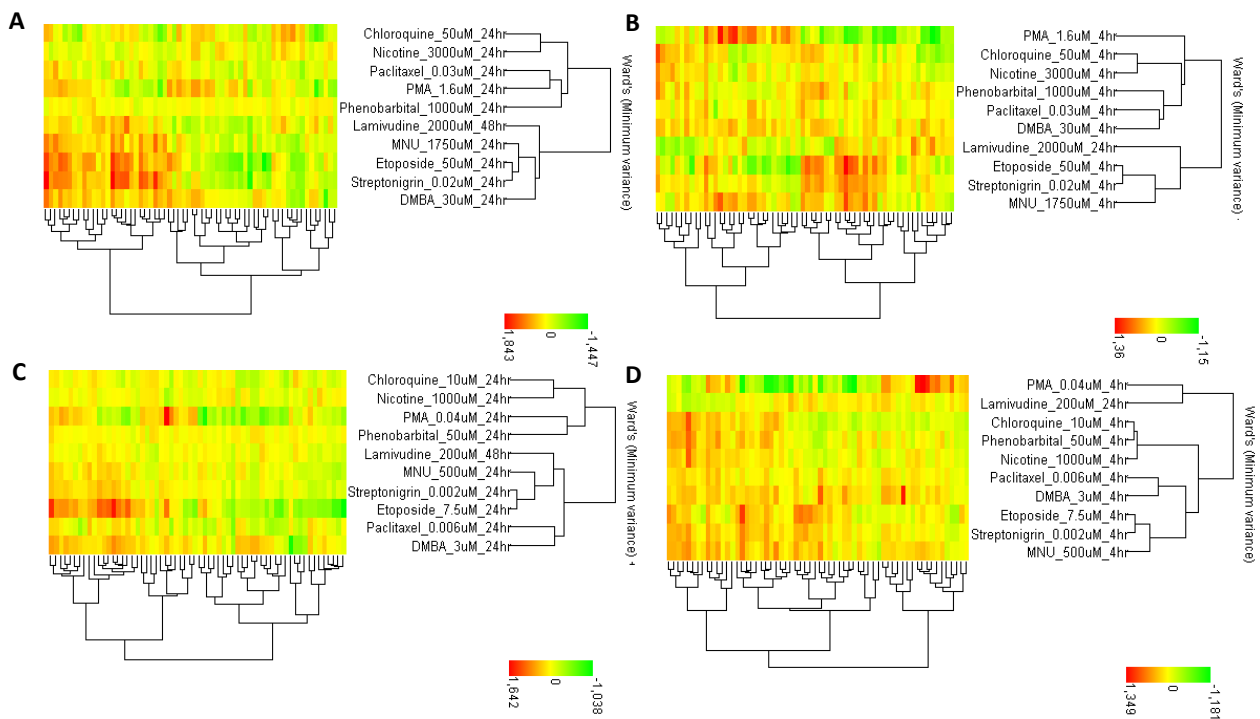


Abb. 35:HCA in HepG2 Zellen mit den identifizierten 61 Klassifizierungs-Genen; A: LD<sub>20</sub> 24 h; B: LD<sub>20</sub> 4 h; C: NOAEL 24 h; D: NOAEL 4 h

In den TK6 Zellen bilden nach Behandlung für 24 h mit der LD<sub>20</sub> (Abb. 36, A) Lamivudin, Etoposid, MNU und Paclitaxel eine Gruppe aus. Eine zweite Gruppe stellen PMA, Nikotin, BPDE, Chloroquin, Phenobarbital und Streptonigrin dar. Hierbei sind Phenobarbital und Streptonigrin aufgrund der geringen Anzahl an regulierten Genen in einer eigenständigen Untergruppe zu finden. Nach 4 h Behandlung mit der LD<sub>20</sub> (Abb. 36, C) wird eine Gruppe von Lamivudin, BPDE und Etoposid gestellt. Chloroquin, Paclitaxel, MNU, Streptonigrin, Phenobarbital, PMA und Nikotin stellen die zweite Gruppe dar. Hierbei weisen PMA und Nikotin, MNU, Streptonigrin und Phenobarbital sowie Chloroquin und Paclitaxel stärkere Ähnlichkeiten auf und bilden je eine Untergruppe. Werden die

Zellen mit der Konzentration am NOAEL für 24 h behandelt (Abb. 36, C), so erhält man eine Gruppe, bestehend aus Chloroquin, Nikotin, BPDE und Lamivudin, sowie eine mit den restlichen Substanzen. Untergruppen werden hier gebildet von Chloroquin zusammen mit Nikotin, sowie BPDE zusammen mit Lamivudin. Wird die Behandlungsdauer auf 4 h reduziert (Abb. 36, D), so ergeben sich gemischte Untergruppen zwischen genotoxischen und nicht-genotoxischen sowie nicht-karzinogenen Substanzen.

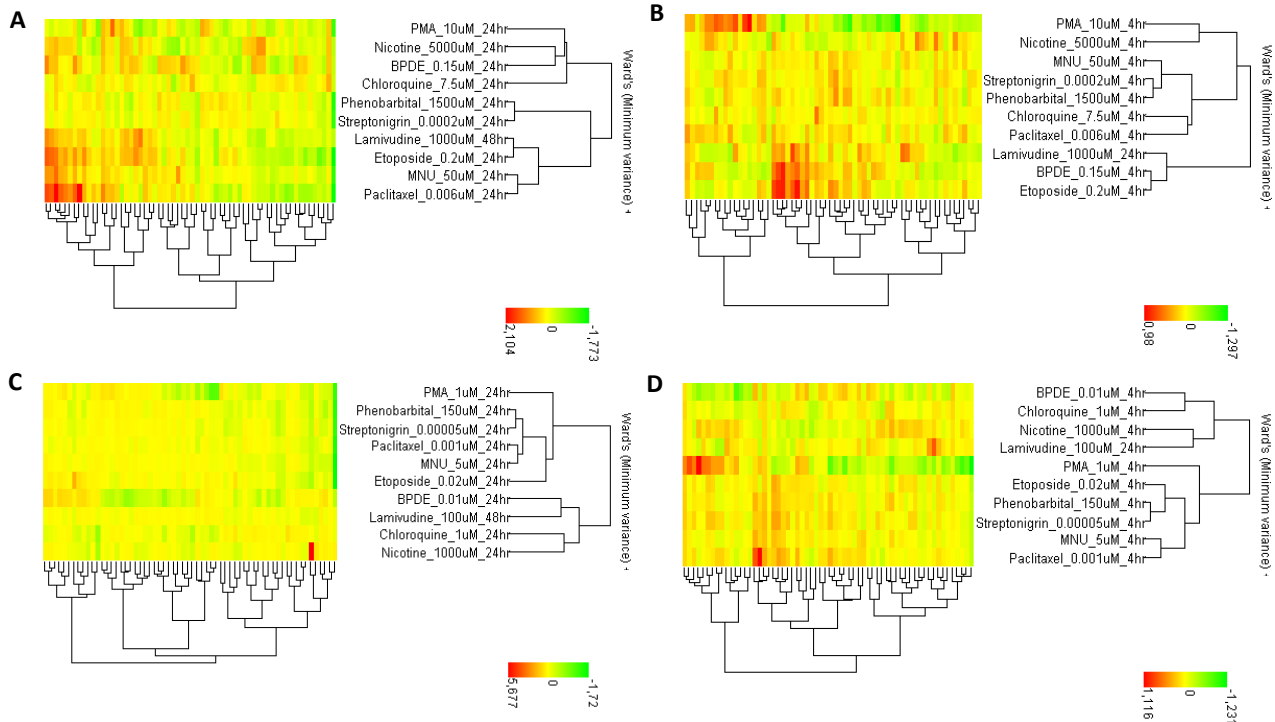


Abb. 36: HCA in TK6 Zellen mit den identifizierten 61 Klassifizierungs-Genen; A: LD<sub>20</sub> 24 h; B: LD<sub>20</sub> 4 h; C: NOAEL 24 h; D: NOAEL 4 h

Betrachtet man die Regulation der 61 Klassifizierungsgene nach Behandlung in jeden Einzelfall und gleicht diese mit den in den einzelnen *MR*-Netzwerken befindlichen Genen ab, so wird deutlich, dass in keinem Fall Überschneidungen von mehr als drei Genen auftreten. Die dazu erstellten Interaktions-Netzwerke für die 61 Klassifizierungsgene zusammen mit den Genen der integrierten *MR*-Netzwerke zeigen, dass im Falle der genotoxischen Substanzen lediglich ein Cluster ausgebildet wird, während sich bei den nicht-genotoxischen Substanzen meist 2 getrennte Cluster ergeben. Dies ist in den beiden Abbildungen 37 und 38 beispielhaft für Nikotin (Abb. 37) und Streptonigrin (Abb. 38) für die Behandlung mit der LD<sub>20</sub> für 24 h in den HepG2 Zellen gezeigt. Im Falle von Nikotin stellt der rot-umrandete Bereich den Cluster dar, in welchem vermehrt die 61 Klassifizierungsgene zu finden sind.

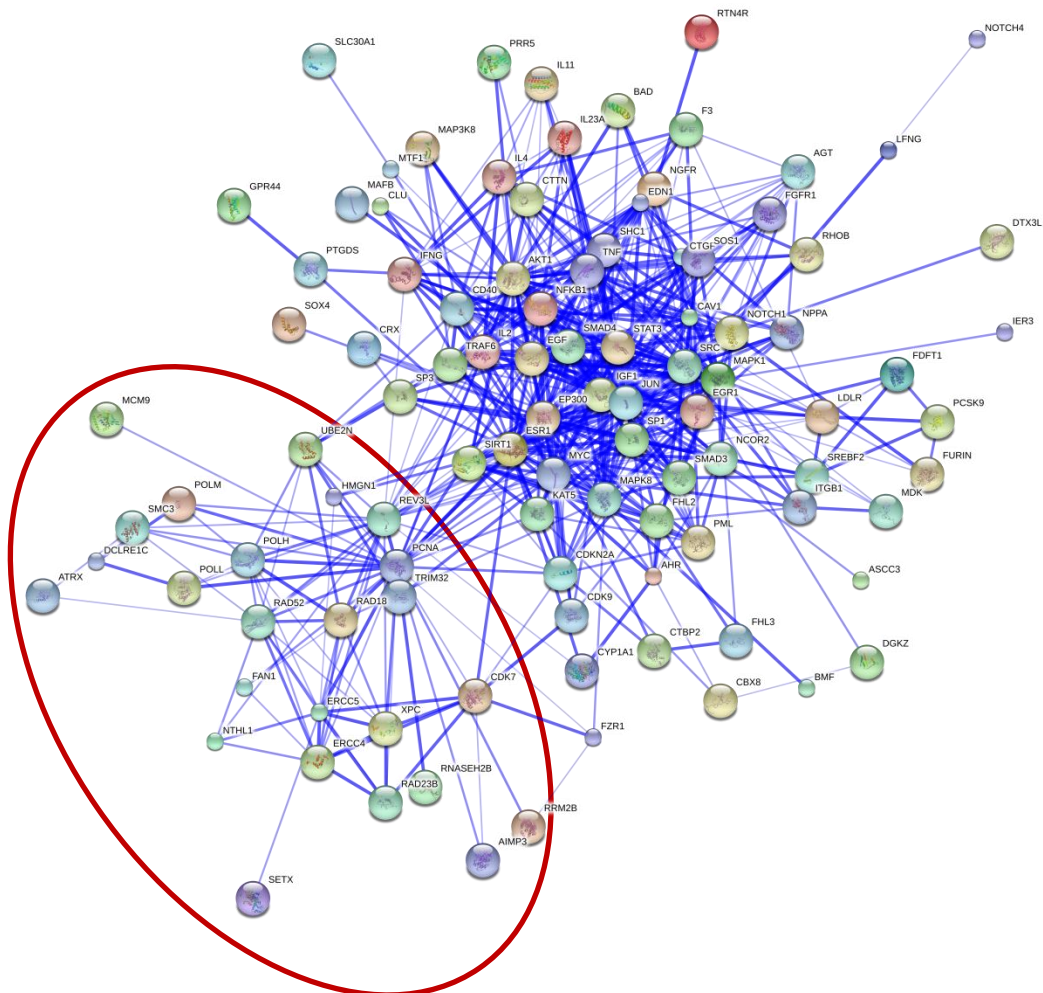


Abb. 37: *STRING* Netzwerk von HepG2 Zellen mit Nikotin für 24 h mit der LD<sub>20</sub> behandelt. Rot markiert ist der Bereich in dem vermehrt Gene der 61 Klassifizierungs-Gene zu finden sind, generiert mittels [186]



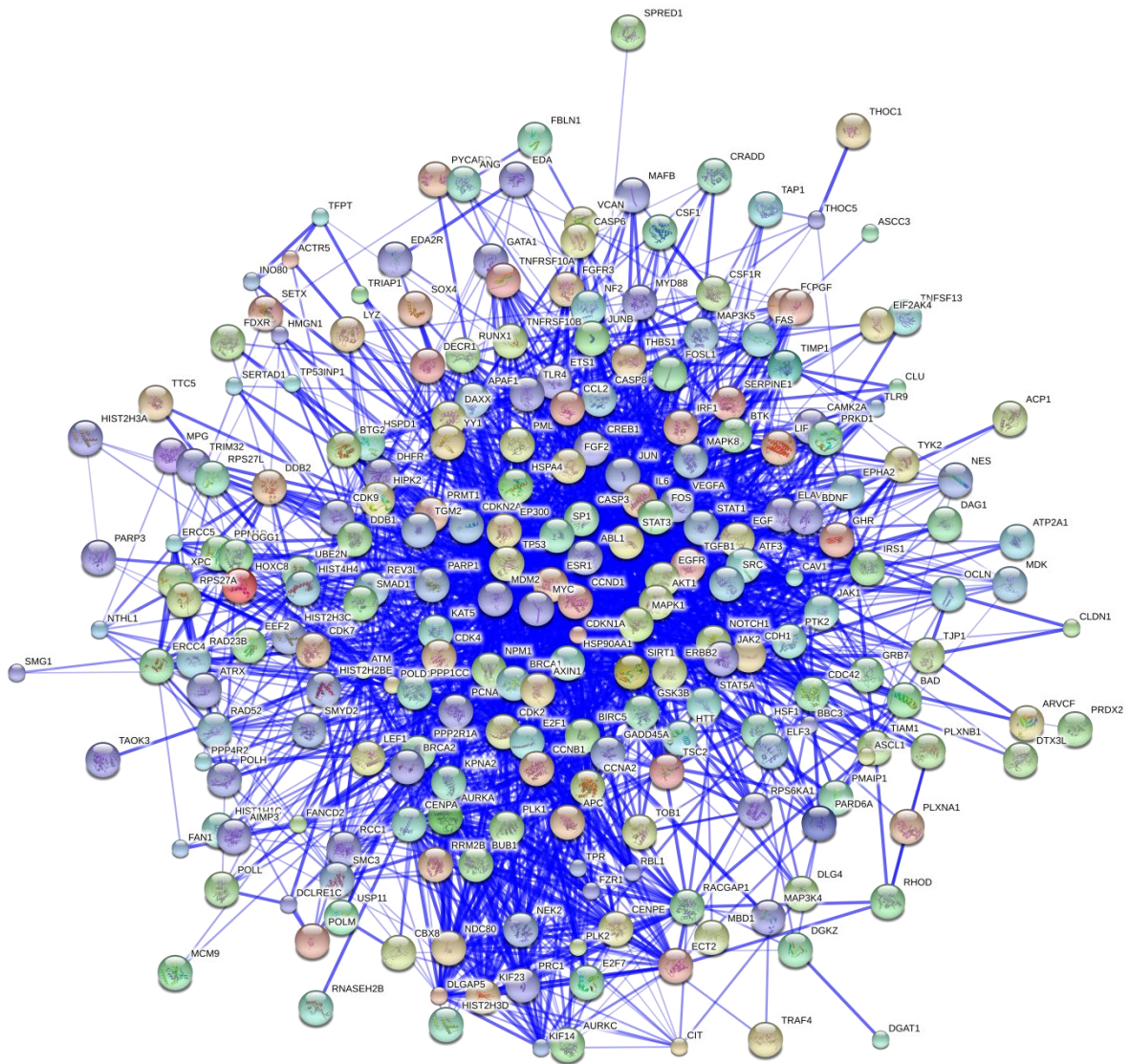


Abb. 38: *STRING* Netzwerk von HepG2 Zellen mit Streptonigrin für 24 h mit der LD<sub>20</sub> behandelt, generiert mittels

## 3.2.5 Biomarker

Um einzelne Proteine zu identifizieren, welche Wirkmechanismus-spezifisch sind und somit als Biomarker für Substanzklassen fungieren können, wurden im Folgenden die identifizierten *MR* der genotoxischen (HepG2 331, TK6 167) mit denen der nicht-genotoxischen Substanzen (HepG2 263, TK6 181), sowie den 61 Klassifizierungsgenen verglichen (Abb. 39). In den HepG2 Zellen (Abb. 39; A) sind 75 dieser *MR* sowohl durch GTX als auch durch NGTX reguliert, während 256 nur im Falle der GTX und 188 ausschließlich durch NGTX reguliert sind. Erfolgt nun der Abgleich mit den 61 Klassifizierungsgenen, so verbleiben fünf *MR* im Falle der GTX und einer für die NGTX. Hierbei handelt es sich um CDK9, ERCC5, PCNA, FZR1, ATRX und XPC. Führt man diese Betrachtung in den TK6 Zellen (Abb. 39; B) durch, so erhält man 42 *MR* die in GTX und NGTX gemeinsam reguliert sind, 125, welche nur in GTX vorkommen und 139, welche ausschließlich im Falle der NGTX identifiziert werden konnten. Der nachfolgende Abgleich mit den 61 Klassifizierungsgenen ergibt, wie im Falle der HepG2 Zellen, fünf *MR* für die GTX und einen für die NGTX. Hierbei handelt es sich um PYCARD, CDK9, KAT5, ATRX, RAD32B und XPC. Die biologische Relevanz dieser *MR* wird dadurch unterstützt, dass diese, mit Ausnahme von PYCARD, auch im Protein-Interaktions-Netzwerk (Abb. 34) vorhanden sind. Hier bestehen sowohl direkte als auch indirekte Wechselwirkungen untereinander. Die Überlappung der *MR* in den HepG2 und TK6 Zellen ermöglicht zusätzlich eine Generalisierung der potentiellen Biomarker.

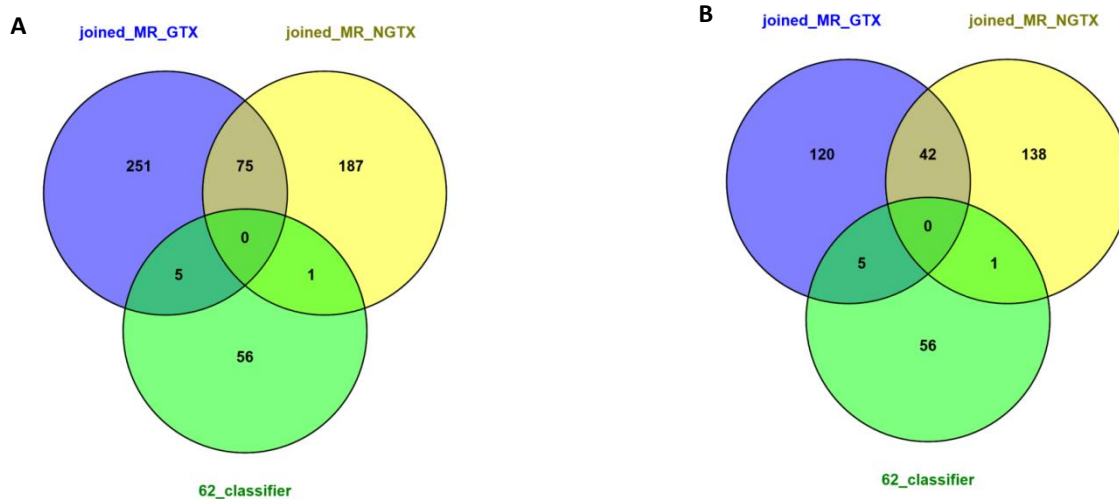


Abb. 39: Vergleich der für genotoxische und nicht-genotoxische Substanzen identifizierten *MR* mit den 62 Klassifizierungs-Genen (Ausprägung in 61 Proteinen) A: HepG2, B: TK6, generiert mittels [146]

Betrachtet man nun die Regulation der einzelnen Gene für alle Substanzen und Zell-Linien getrennt (Tab. 15), so ist vor allem bei XPC auffällig, dass dieses nach Behandlung mit allen GTX hochreguliert ist (Ausnahme Paclitaxel in HepG2) und für NGTX herunterreguliert, respektive nicht differentiell exprimiert ist. Nach DMBA/BPDE Behandlung ist neben XPC nur ATRX differentiell exprimiert, dies



jedoch in HepG2 und TK6 gegensätzlich. Streptonigrin führt in HepG2 Zellen zu einem Anstieg an CDK9 und PCNA. Nach MNU Behandlung steigt in den HepG2 Zellen die PCNA Expression ebenfalls an während die Gene CDK9 und ATRX herunterreguliert werden. Die Behandlung mit Etoposid führt in den HepG2 Zellen zu der verstärkten Expression von PYCARD, CDK9 und FZR1, sowie zu einer verminderten Expression von ATRX und RAD23B. In TK6 Zellen ist hier zusätzlich zum XPC nur KAT5 differentiell exprimiert. Die Lamivudin-Behandlung führt in beiden Zell-Linien zu einer Erhöhung der mRNA Menge von PYCARD und in HepG2 Zellen zusätzlich zu einer niedrigeren Menge an KAT5. Paclitaxel führt nur zu einer Reaktion in den TK6 Zellen. Hier wird RAD23B nach Behandlung herunter reguliert. Nach Behandlung mit Chloroquin zeigen lediglich die HepG2 Zellen eine veränderte Expression der ausgewählten MR. CDK9, PCNA und XPC sind herunter reguliert, während ERCC5 und ATRX hochreguliert sind. Nikotin und PMA führen in keinem der beiden Zellsysteme zu einer Reaktion in Form einer veränderten Expression der ausgewählten MR, während PMA eine geringere Expression von ERCC5, PCNA, FZR1 (nur in TK6), ATRX (nur in TK6) und PYCARD (nur in HepG2) zur Folge hat. Neben den in Tabelle 15 aufgeführten MR wurde TP53INP1 in vielen Fällen als MR nach Behandlung mit genotoxischen Substanzen identifiziert. Zu einem Ausschluss aus der MR-Liste führte hier eine erhöhte Expression nach Behandlung der HepG2 Zellen mit Chloroquin mit der LD<sub>20</sub> für 24 h. Für alle anderen NGTX ist TP53INP1 nicht hochreguliert während es für alle GTX hochreguliert wurde. Somit kommen für eine biologische Validierung auf Proteinebene XPC und TP53INP1 in Frage.

Tab. 15: Regulation der MR innerhalb der 61 Klassifizierungsgene; -: nicht differentiell exprimiert, ↑ hoch reguliert nach Behandlung, ↓ herunterreguliert nach Behandlung, (↑ oder ↓) Gene mit FC > 1,5 und p > 0,05

		DMBA/BPDE	Strepto- nigrin	MNU	Eto- posid	Lami- vudin	Pacli- taxel	Chloro- quin	Nikotin	PMA	Pheno- barbital
HepG2	CDK9	-	↑	(↓)	↑	-	-	↓	-	-	-
TK6		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HepG2	ERCC5	-	-	-	-	-	-	(↑)	-	↓	-
TK6		-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-
HepG2	PCNA	-	↑	↑	-	-	-	↓	-	↓	-
TK6		-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-
HepG2	FZR1	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-
TK6		-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-
HepG2	ATRX	↓	-	(↓)	↓	-	-	↑	-	-	-
TK6		↑	-	-	-	-	-	-	-	(↓)	-
HepG2	XPC	↑	↑	↑	↑	↑	-	↓	-	↓	-
TK6		(↑)	↑	(↑)	↑	↑	↑	-	-	↓	-
HepG2	PYCARD	-	-	-	↑	↑	-	-	-	↓	-
TK6		-	-	-	↑	↑	-	-	-	-	-
HepG2	KAT5	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-
TK6		-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-
HepG2	RAD23B	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-
TK6		-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-

### 3.3 Veränderungen auf Protein-Ebene

Für die Stressantwort spielt P53 eine zentrale Rolle und ist entscheidend für das Schicksal der Zelle. Prozesse wie DNA-Reparatur, Apoptose, Zellzyklus-Arrest und andere werden maßgeblich durch P53 reguliert. Innerhalb dieses Signalweges kann es abhängig von Substanz und Zell-System zu unterschiedlichen Reaktionen kommen und somit in andersartigen Folgen resultieren. Um diese potentiellen Unterschiede zu untersuchen wurden vor- und nachgeschaltet von P53 verschiedene Proteine betrachtet. Hierzu zählen pATM, CDK5, P53 und P21 sowie die beiden identifizierten Biomarker XPC und TP53INP1. Des Weiteren ist der P53 Phosphorylierungs- und Acetylierungs-Status entscheidend für die transkriptionelle Aktivität des P53. Betrachtet wurden die Modifikationen an den Aminosäuren Threonin 18 und 55, Serin 33, 46 und 392 sowie Lysin 382.

#### 3.3.1 P53 Signalweg

Als zentrales Protein in der Stressantwort wurde zunächst P53 untersucht. Als Beispiel sind in Abbildung 40 (A-C) die Ergebnisse nach Behandlung mit Etoposid gezeigt. P53 ist hier in allen drei Zellsystemen durch die Behandlung konzentrations- und zeitabhängig induziert. Dies gilt auch für die Stressantwort nach Behandlung durch Paclitaxel (Abb. 40, D-F).

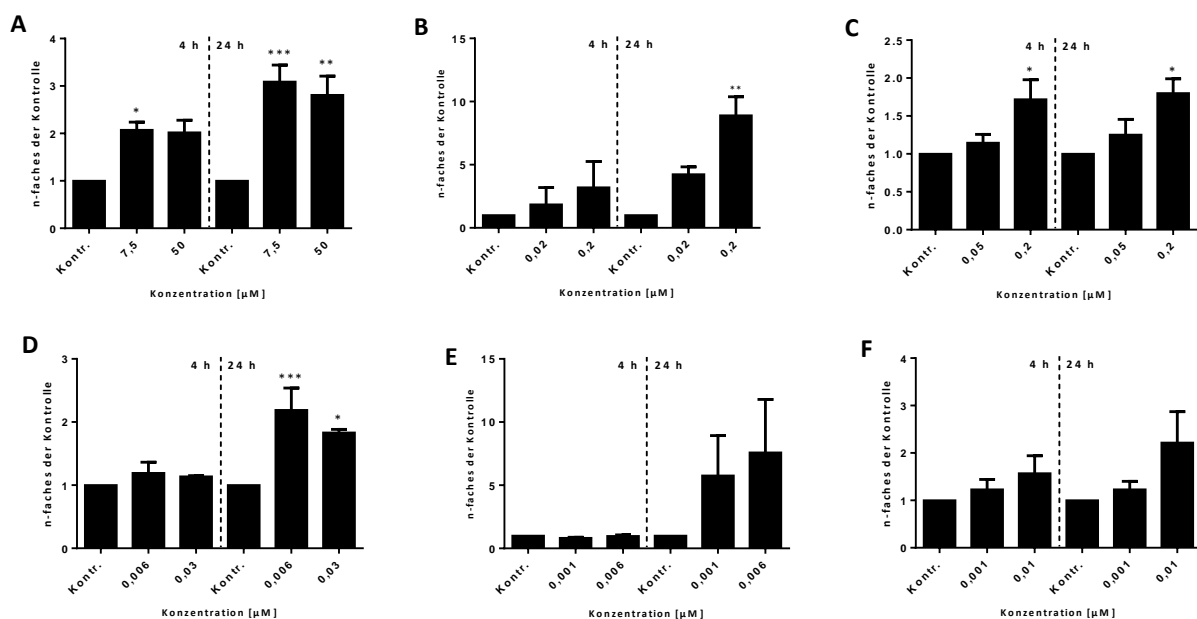


Abb. 40: P53 Proteinlevel nach Behandlung mit der Konzentration am NOAEL und der  $\text{LD}_{20}$  für 4 und 24 h mit Etoposid (A-C) und Paclitaxel (D-F) in den Zellsystemen HepG2 (A, D), TK6 (B, E) und SH-SY5Y (C, F),  $n=3$  biologische Replikate; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ , Western Blot mit  $30 \mu\text{g}$  Gesamtprotein

Im Falle der nicht-genotoxischen Substanz Chloroquin (Abb. 41, A-C) ist P53 nach Behandlung in den HepG2 und TK6 Zellen nicht reguliert. In den SH-SY5Y Zellen hingegen ist nach 24 h Behandlung mit der LD<sub>20</sub> ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen.

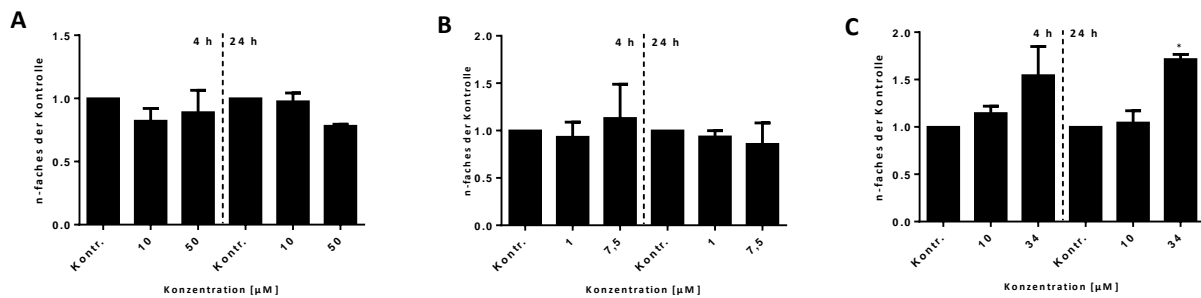


Abb. 41: P53 Proteinlevel nach Behandlung mit der Konzentration am NOAEL und der LD<sub>20</sub> für 4 und 24 h mit Chloroquin (A-C) in den Zell-Systemen HepG2 (A), TK6 (B) und SH-SY5Y (C); n=3 biologische Replikate; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001, Western Blot mit 30 μg Gesamtprotein

Die Tabelle 16 zeigt zusammenfassend die Expression der Proteine P53, P21 und CDK5 in den drei Zellsystemen. P53 ist in allen Fällen nach Behandlung mit den genotoxischen Substanzen im Vergleich zur Kontrolle stärker exprimiert. Nach Behandlung mit PMA ist eine verringerte Expression in HepG2 und TK6 Zellen zu verzeichnen. Nikotin, Phenobarbital und Chloroquin führen zu uneinheitlichen Reaktionen in den Zellsystemen. Die P53-Proteinmenge ist in den HepG2 Zellen nach Behandlung mit Nikotin und Phenobarbital nicht beeinflusst, während in den TK6 Zellen das P53-Level im Vergleich zur Kontrolle ansteigt. Chloroquin führt in den SH-SY5Y Zellen zu einer Erhöhung von P53, in TK6 und HepG2 Zellen ist dies jedoch nicht der Fall. Auch die p21 Proteinmenge ist durch die Behandlung der Zellsysteme mit den genotoxischen Substanzen in fast allen Fällen hoch reguliert. Ausnahmen sind Paclitaxel in den HepG2 Zellen und Lamivudin in den TK6 Zellen. Hier ist keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle durch die Behandlung erkennbar. In den SH-SY5Y Zellen ist P21 zu den untersuchten Zeitpunkten mit den eingesetzten Konzentrationen nicht nachweisbar. Die CDK5 wird durch Behandlung in den SH-SY5Y Zellen sowohl durch die nicht-genotoxische Substanz Chloroquin als auch durch Etoposid und Paclitaxel stärker exprimiert. Die Reaktion in HepG2 und TK6 Zellen fällt unterschiedlich aus. Auffällig ist, dass nach Behandlung mit den genotoxischen Substanzen in den HepG2 Zellen nur im Falle von Lamivudin eine Veränderung des CDK5 Levels im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen ist. Chloroquin, Nikotin und Phenobarbital führen hier zu erhöhten Proteinmengen während dies bei PMA nicht der Fall ist. Die TK6 Zellen reagieren auf die Behandlung mit genotoxischen Substanzen mit Ausnahme von MNU mit einer gesteigerten Expression der CDK5. Dies ist auch nach Behandlung mit Nikotin und Phenobarbital zu beobachten während Chloroquin und PMA zu niedrigeren Protein-Level führen.

Tab. 16: Protein-Expression von P53, P21 und CDK5 in HepG2, TK6 und SH-SY5Y Zellen, ↑ hoch reguliert nach Behandlung, ↓ runterreguliert nach Behandlung, O nicht verändert im Vergleich zur Kontrolle, n=3 biologische Replikate

<b>Etoposid</b>				<b>DMBA/BPDE</b>			<b>MNU</b>		
	HepG2	TK6	SH-SY5Y		HepG2	TK6		HepG2	TK6
P53	↑	↑	↑	P53	↑	↑	P53	↑	↑
p21	↑	↑	O	p21	↑	↑	p21	↑	↑
CDK5	O	↑	↑	CDK5	O	↑	CDK5	O	↓

<b>Paclitaxel</b>				<b>Lamivudin</b>			<b>Streptonigrin</b>		
	HepG2	TK6	SH-SY5Y		HepG2	TK6		HepG2	TK6
P53	↑	↑	↑	P53	↑	↑	P53	↑	↑
p21	O	↑	O	p21	↑	O	p21	↑	↑
CDK5	O	↑	↑	CDK5	↑	↑	CDK5	O	↑

<b>Chloroquin</b>				<b>Nikotin</b>			<b>PMA</b>		
	HepG2	TK6	SH-SY5Y		HepG2	TK6		HepG2	TK6
P53	O	O	↑	P53	O	↑	P53	↓	↓
p21	O	O	O	p21	O	↓	p21	↑	↑
CDK5	↑	↓	↑	CDK5	↑	↑	CDK5	O	↓

<b>Phenobarbital</b>		
	HepG2	TK6
P53	O	↑
p21	O	↑
CDK5	↑	↑

Ein weiteres Protein der DNA-Schadensantwort stellt pATM dar. Dieses wurde für eine Auswahl von Substanzen in den HepG2 Zellen betrachtet. Die Abbildung 42 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Die genotoxischen Substanzen MNU, Etoposid und Streptonigrin führen zu einem deutlichen, einheitlichen Anstieg des Protein-Level. Eine Behandlung mit PMA oder Phenobarbital hingegen hat keine Auswirkungen.

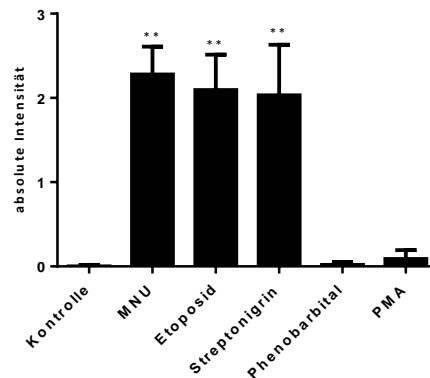


Abb. 42: pATM Proteinlevel nach Behandlung mit der LD<sub>20</sub> für 4 h in HepG2 Zellen; n=3 biologische Replikate; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001, Western Blot mit 15 µg Kernprotein

Zur Validierung der als potentielle Biomarker in Abschnitt 3.2.5 identifizierten Gene TP53INP1 und XPC, wurden diese auf Protein-Ebene in den HepG2 nach 24 h Behandlung mit der LD<sub>20</sub> untersucht. Abbildung 43, A zeigt die Ergebnisse für TP53INP1. Hier ist eine schwache Induktion nach Behandlung mit DMBA, Etoposid, MNU und Lamivudin zu sehen. Die anderen Substanzen haben nur geringfügige Auswirkungen auf die Protein-Expression. XPC (Abb. 43, B) zeigt einen statistisch signifikanten Anstieg nach Behandlung mit Etoposid. MNU, Paclitaxel, DMBA und Chloroquin bewirken lediglich einen leichten Anstieg des Protein-Level während die anderen Substanzen keine Veränderungen hervorrufen.

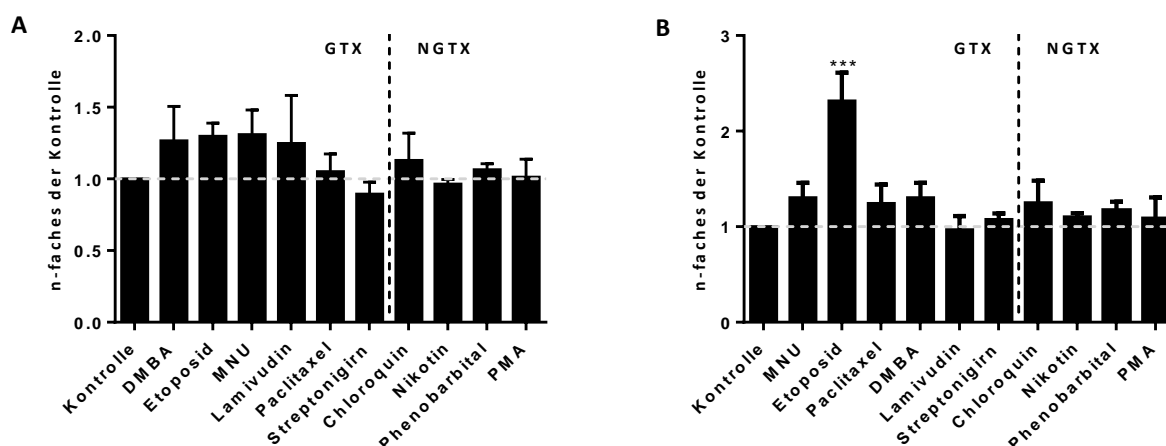


Abb. 43: TP53INP1 (A) und XPC (B) Proteinlevel nach Behandlung mit der LD<sub>20</sub> für 4 h in HepG2 Zellen; n=3 biologische Replikate; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001, Western Blot mit 30 µg Gesamtprotein

### 3.3.2 P53 Modifikationen

Anhand der P53 Modifikationen lässt sich kein spezifisches Muster für unterschiedliche Wirkmechanismen ableiten. Die Tabelle 17 zeigt die Modifikationen nach Behandlung mit der LD<sub>20</sub> für 4 (A) und 24 h (B). Ersichtlich ist, dass konzentrations- (Daten nicht gezeigt) und zeitabhängige Unterschiede zwischen den Zellsystemen und Substanzbehandlungen bestehen. Einzig die Phosphorylierung an Serin 15 zeigt eine Diskriminierung zwischen den nicht-genotoxischen und den genotoxischen Substanzen nach 24 h Behandlung. Nach Behandlung mit den nicht-genotoxischen Substanzen ist hier sowohl nach 4 h als auch nach 24 h kein erhöhter der Phosphorylierungsstatus zu sehen. Mit Ausnahme von Streptonigrin und Paclitaxel in den HepG2 Zellen ist nach 24 h eine verstärkte Phosphorylierung von P53 an Serin 15 zu verzeichnen. Eine erhöhte Phosphorylierung an den Stellen Serin 15 und Serin 33 verursacht durch ein höheres Proteinlevel von CDK5 in den SH-SY5Y Zellen ist nicht erkennbar. Auffällig ist, dass in den TK6 Zellen eine verstärkte Phosphorylierung durch die nicht-genotoxischen Kanzerogene PMA und Phenobarbital an allen Modifikationsstellen mit Ausnahme von Serin 15 auftritt. In den HepG2 Zellen ist dies nicht der Fall.

Tab. 17: P53 Modifikationen nach Behandlung mit der LD<sub>20</sub> für 4 h (A) und 24 h (B); 0 = keine Veränderung zur Kontrolle;  
 - = reduzierte Phosphorylierung/Acetylierung; + = erhöhte Phosphorylierung/Acetylierung im Vergleich zur Kontrolle

A	PMA		Pheno- barbital		Nikotin		Chloroquin			MNU		Strepto- nigrin.		DMBA/ BPDE		Etoposid			Lamivudin		Paclitaxel		
	HepG2	TK6	HepG2	TK6	HepG2	TK6	HepG2	TK6	SY5Y	HepG2	TK6	HepG2	TK6	HepG2	TK6	HepG2	TK6	SY5Y	HepG2	TK6	HepG2	TK6	SY5Y
Ser15	0	0	-	0	-	-	-	0	-	+	0	0	+	0	+	+	+	-	+	+	0	0	-
Thr18	-	+	0	+	0	+	0	0	0	+	0	+	+	0	+	-	-	-	+	0	+	0	+
Ser33	-	+	0	0	+	n.D.	0	0	0	+	-	n.D.	n.D.	0	+	+	-	+	+	+	+	0	0
Ser46	-	+	0	0	0	n.D.	+	0	-	+	0	+	+	+	+	0	-	0	0	+	+	0	+
Thr55	0	+	0	+	0	n.D.	-	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	-	0	+
Lys382	0	+	0	-	0	0	+	-	+	+	0	+	-	-	0	+	+	+	0	+	0	+	+
Ser392	-	0	-	0	0	0	0	0	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	0	0	0	+

B	PMA		Pheno- barbital		Nikotin		Chloroquin			MNU		Strepto- nigrin		DMBA/ BPDE		Etoposid			Lamivudin		Paclitaxel		
	HepG2	TK6	HepG2	TK6	HepG2	TK6	HepG2	TK6	SY5Y	HepG2	TK6	HepG2	TK6	HepG2	TK6	HepG2	TK6	SY5Y	HepG2	TK6	HepG2	TK6	SY5Y
Ser15	-	-	0	0	0	-	-	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+
Thr18	-	+	-	+	0	+	+	0	-	+	+	+	0	+	+	-	+	-	+	+	+	0	+
Ser33	0	+	+	+	0	n.D.	+	0	-	0	0	n.D.	n.D.	0	+	-	0	0	+	+	+	0	0
Ser46	0	+	-	+	-	n.D.	0	-	-	0	+	-	0	+	+	0	+	0	0	+	+	0	+
Thr55	-	+	+	+	0	n.D.	0	0	+	-	+	0	-	0	+	+	+	0	0	+	+	0	+
Lys382	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	-	+	0	+	+	0	+	0
Ser392	0	+	0	+	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0	-	0	+	0	0	+	+	+	0

### 3.4 Endpunktanalysen

Um die Auswirkungen der Behandlungen auf die Zellsysteme zu identifizieren wurden Zellzyklus-Analysen sowie Apoptose-Messungen durchgeführt. Beispielhaft sind im Folgenden die Ergebnisse nach Behandlung mit der LD<sub>20</sub> nach 4 h und 24 h, respektive für Lamivudin nach 24 h und 48 h aufgeführt. Die Behandlungen mit der Konzentration am NOAEL haben in beiden Zellsystemen nur geringfügige Auswirkungen auf den Zellzyklus und die Apoptoserate.

#### 3.4.1 Zellzyklusuntersuchungen

##### 3.4.1.1 G1/G0 Phase

In den Abbildungen 43, 44 und 45 ist die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle in den Zellzyklus-Phasen G1/G0, S und G2/M nach Behandlung mit der LD<sub>20</sub> nach 4 h und 24 h in den Zellsystemen HepG2, TK6 und SH-SY5Y dargestellt. Die Behandlung der SH-SY5Y Zellen erfolgte nur mit Etoposid, Paclitaxel und Chloroquin.

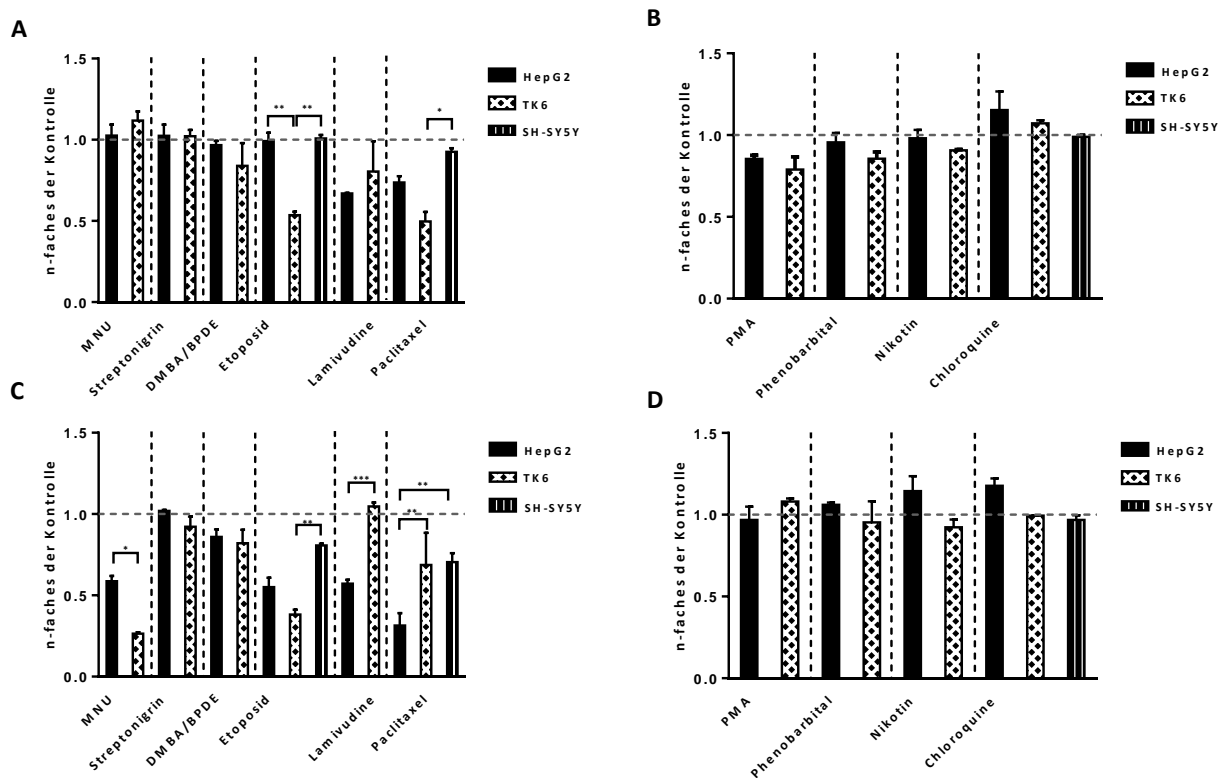


Abb. 43: G1/G0 Phase von HepG2 und TK6 Zellen nach Behandlung mit der LD<sub>20</sub> für 4 h (A und B) sowie für 24 h (C und D) dargestellt als n-faches der Kontrolle; n=3 biologische Replikate; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001



Für die nicht-genotoxischen Substanzen sind bei beiden Konzentrationen in der G1/G0 Phase (Abb 43; B,D) beider Zellsysteme nur geringfügige Änderungen im Vergleich zur Kontrolle zu sehen. Auch sind nur unerhebliche Unterschiede zwischen HepG2 und TK6 Zellen sichtbar. Bei den genotoxischen Substanzen treten sowohl Unterschiede nach Behandlung als auch zwischen den Zellsystemen bei Behandlung mit der gleichen Substanz mit equitoxischen Konzentrationen auf. Nach 4 h Behandlung mit der LD<sub>20</sub> (Abb. 43; A) sind bei MNU, Streptonigrin und DMBA/BPDE keine Änderungen im Vergleich zur Kontrolle zu sehen. Auch die Zellsysteme zeigen keine unterschiedliche Reaktion auf die Behandlung. Für Etoposid ist in den HepG2 und SH-SY5Y Zellen keine Veränderung sichtbar, in den TK6 Zellen jedoch kommt es zu einer Reduktion der Zellzahl in der G1/G0-Phase auf das 0,5-fache der Kontrolle. Lamivudin (24 h) führt in den HepG2 und TK6 Zellen zu einer verringerten Anzahl an Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Dies ist auch für Paclitaxel in allen drei Zellsystemen zu sehen. Die 24 h Behandlung mit der LD<sub>20</sub> (Abb. 43; C) hat stärkere Auswirkungen auf die Zellsysteme. Die Behandlung mit MNU hat eine Reduktion der Zellzahl in der G1/G0 Phase in beiden Zellsystemen zur Folge. In den TK6 Zellen erfolgt eine Reduktion auf das 0,25-fache der Kontrolle und ist somit um den Faktor 2 stärker ausgeprägt als in den HepG2 Zellen. Streptonigrin zeigt bei 24 h Behandlung, wie auch nach 4 h Behandlung, mit der LD<sub>20</sub> keinen Effekt in beiden Zell-Linien während nach DMBA/BPDE ein leichter Abfall zu sehen ist. Etoposid zeigt nicht nur in den TK6 Zellen einen Effekt, sondern führt auch in den HepG2 Zellen zu einer Reduktion der Anzahl der Zellen in der G1/G0 Phase auf ein mit den TK6 Zellen vergleichbares Level (ca. 0,5-faches der Kontrolle). In den SH-SY5Y Zellen befindet sich hier eine statistisch signifikant höhere Anzahl an Zellen in der G1/G0 Phase. Lamivudin (48 h) zeigt an diesem Zeitpunkt in den TK6 Zellen keine Veränderung während in den HepG2 Zellen die Zellzahl auf das 0,5-fache im Vergleich zur Kontrolle abfällt. Dieser Effekt ist etwas schwächer ausgeprägt auch nach Paclitaxel-Behandlung zu beobachten. In allen drei Zellsystemen ist ein Abfall zu sehen, in den HepG2 Zellen jedoch stärker als in den TK6 und SH-SY5Y.

## 3.4.1.2 S-Phase

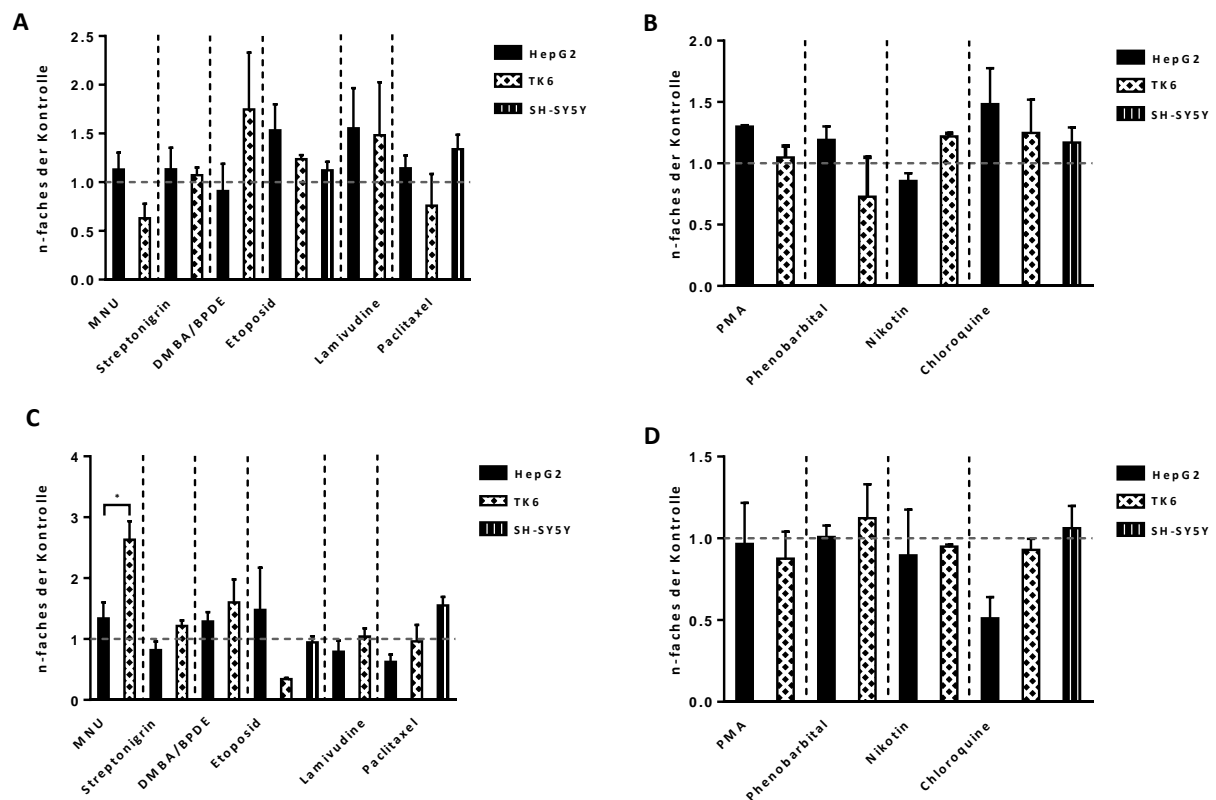


Abb. 44: S-Phase von HepG2 und TK6 Zellen nach Behandlung mit der LD<sub>20</sub> für 4 h (A und B) sowie für 24 h (C und D) dargestellt als n-faches der Kontrolle; n=3 biologische Replikate; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

Betrachtet man die Zellen, welche sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, so erkennt man auch im Falle der nicht-genotoxischen Substanzen (Abb. 44; B,D) Veränderung nach Behandlung mit der LD<sub>20</sub> nach 4 und 24 h. Auch sind Unterschiede zwischen den Zellsystemen zu sehen. PMA, Phenobarbital und Chloroquin führen nach 4 h (Abb. 44; B) zu einer Erhöhung der Zellzahl in den HepG2 Zellen. In den TK6 Zellen ist dieser Effekt lediglich nach Chloroquin-Behandlung zu sehen und tritt etwas schwächer ausgeprägt auch in den SH-SY5Y Zellen auf. Nikotin hingegen hat nur einen Anstieg der Zellzahl in den TK6 Zellen zur Folge. Im Falle von Phenobarbital ist in den TK6 Zellen eine verringerte Anzahl an Zellen in der S-Phase zu finden. 24 h nach Behandlung (Abb. 44; D) zeigen lediglich die HepG2 Zellen eine Reaktion auf die Chloroquin-Behandlung. Hier befinden sich im Vergleich zur Kontrolle weniger Zellen in der S-Phase. PMA, Phenobarbital und Nikotin führen in keiner der beiden Zellsysteme zu Veränderungen.

Die genotoxischen Substanzen haben in der S-Phase größtenteils unterschiedliche Auswirkungen auf die Zellsysteme. MNU, Streptonigrin, DMBA und Paclitaxel führen in den HepG2 Zellen nach 4 h Behandlung (Abb. 44; A) nur zu geringfügigen Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Dies trifft auch auf Streptonigrin in den TK6 Zellen zu, während MNU und Paclitaxel hier zu einer verringerten

Zellzahl in der S-Phase führen und BPDE einen S-Phase Arrest hervorruft. Der S-Phase Arrest ist auch nach Behandlung mit Lamivudin (24 h) in beiden Zellsystemen, sowie in den SH-SY5Y Zellen nach Paclitaxel-Behandlung zu sehen. Etoposid hat in allen drei Zellsystemen einen Anstieg der Zellzahl in der S-Phase zur Folge. In den HepG2 Zellen ist dieser Effekt am stärksten, in TK6 und SH-SY5Y etwas schwächer ausgeprägt.

In Abb. 44, C und D sind die Ergebnisse für die 24 h Behandlung zu sehen. MNU verursacht hier in den TK6 Zellen einen S-Phase Arrest, welcher in den HepG2 Zellen nur geringfügig ausgeprägt ist. Streptonigrin und Lamivudin zeigen nahezu keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle, sowie auch im Vergleich zwischen TK6 und HepG2 Zellen. DMBA in den HepG2; respektive BPDE in den TK6; führt in beiden Fällen zu einer leichten Erhöhung der Zellzahl in der S-Phase. Nach Behandlung mit Etoposid weisen die drei Zellsysteme deutliche Unterschiede auf. Während in den HepG2 Zellen vermehrt Zellen in der S-Phase vorhanden sind, ist die Zellzahl in den TK6 Zellen stark verringert und in den SH-SY5Y Zellen im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert. Die Behandlung mit Lamivudin und Paclitaxel hat in den HepG2 Zellen eine Reduktion der Zellzahl zur Folge, während in den TK6 Zellen keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle sichtbar sind. In den SH-SY5Y Zellen hingegen führt Paclitaxel zu einer erhöhten Anzahl an Zellen in der S-Phase.

### 3.4.1.3 G2/M Phase

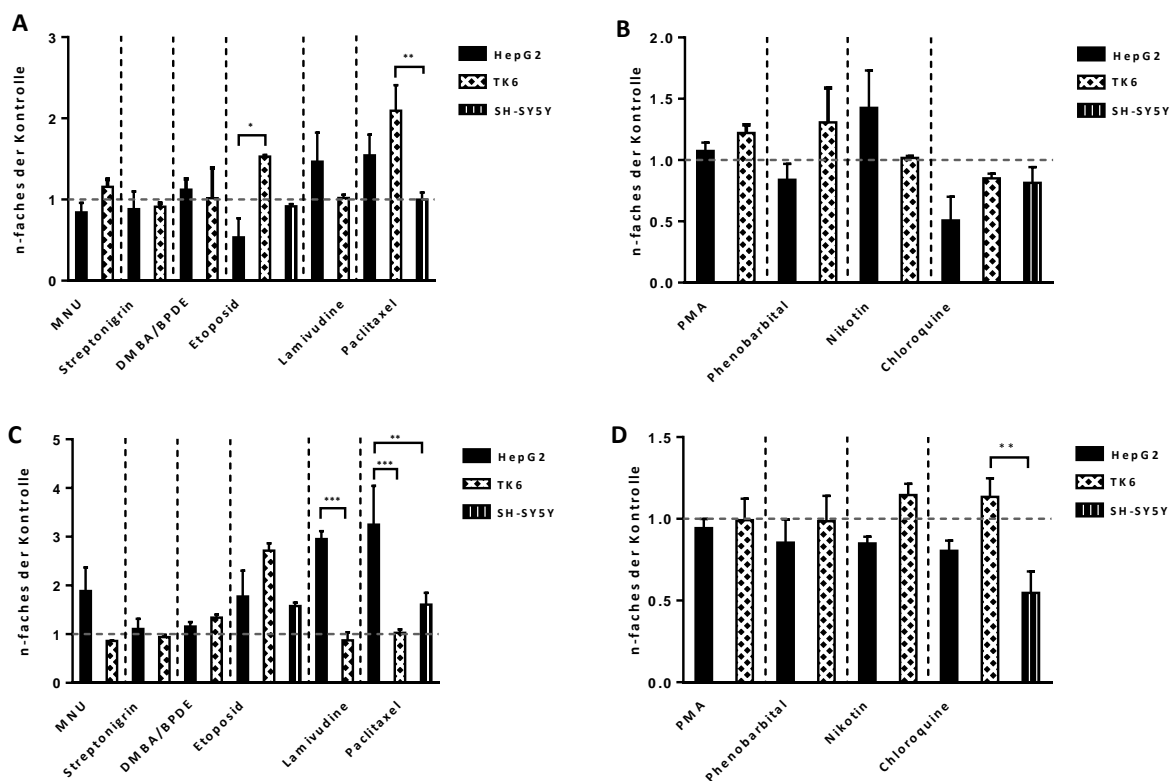


Abb. 45: G2/M-Phase von HepG2 und TK6 Zellen nach Behandlung mit der LD<sub>20</sub> für 4 h (A und B) sowie für 24 h (C und D) dargestellt als n-faches der Kontrolle; n=3 biologische Replikate; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001

Abb. 45 (A-D) zeigt die Veränderungen innerhalb der G2/M-Phase des Zellzyklus. Eine Behandlung für 4 h mit der LD<sub>20</sub> (Abb. 45; A) von MNU, Streptonigrin und DMBA respektive BPDE hat keine Auswirkungen in beiden Zellsystemen. Etoposid führt in HepG2 Zellen zu einer verringerten Zellzahl, in TK6 Zellen jedoch zu einer Erhöhung der Zellzahl in der G2/M-Phase, während in den SH-SY5Y keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle auftreten. Nach Behandlung mit Lamivudin sind keine Änderungen in den TK6 Zellen zu verzeichnen, obgleich in HepG2 Zellen eine größere Zellzahl gemessen wurde. Die erhöhte Zellzahl ist auch nach Behandlung mit Paclitaxel zu sehen. Hier ist der Effekt in HepG2 und TK6 Zellen, nicht jedoch in den SH-SY5Y zu beobachten.

Die Behandlung mit den nicht-genotoxischen Substanzen (Abb. 45; B) zeigt auch hier Auswirkungen. Nach der Behandlung mit Chloroquin sind die deutlichsten Effekte zu sehen. In den HepG2 Zellen führt diese zu einer Reduktion der Zellzahl auf das 0.5 fache der Kontrolle und auch in den TK6 und SH-SY5Y Zellen ist eine leichte Reduktion sichtbar. Nikotin hingegen führt nur in den HepG2 Zellen zu einem Ansteigen der Zellzahl. Dies ist für die Behandlung mit Phenobarbital in den TK6 Zellen zu sehen, während ein leichter Rückgang der Zellzahl in den HepG2 Zellen zu verzeichnen ist. Eine Behandlung mit PMA hat in beiden Zellsystemen einen leichten Anstieg der Zellzahl zur Folge. Diese Effekte relativieren sich im Falle der nicht-genotoxischen Substanzen nach 24 h Behandlung (Abb. 45; D). Hier ist in den HepG2 und TK6 nur eine leicht, nicht signifikante Varianz im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Einzig nach Behandlung mit Chloroquin in den SH-SY5Y Zellen ist eine Reduktion der Zellzahl in der G2/M-Phase zu verzeichnen.

Nach Behandlung mit den genotoxischen Substanzen (Abb. 45; C) hingegen sind weitere Veränderungen sichtbar. MNU, Lamivudin und Paclitaxel führen in den HepG2 Zellen zu einem deutlichen Anstieg der Zellzahl (zwei - dreifach im Vergleich zur Kontrolle). Hier ist in den TK6 Zellen keine Änderung zu verzeichnen. Werden die SH-SY5Y Zellen mit Paclitaxel behandelt, so kommt es wie auch in den HepG2 Zellen zu einem Anstieg der Zellzahl. Etoposid führt in den drei Zellsystemen zum Anstieg der Zellzahl, während nach Streptonigrin und DMBA respektive BPDE Behandlung in beiden Zell-Linien keine Veränderungen zu sehen sind.

## 3.4.2 Apoptose

Ein weiterer für die Stressantwort entscheidender Endpunkt stellt die Apoptoserate dar. In Abbildung 46 (A-D) sind die SubG1 Fraktionen der Zellzyklusuntersuchungen als Indiz für die prozentuale Anzahl an Zellen in der Apoptose für die drei Zellsysteme dargestellt. 4 h Behandlung mit der LD<sub>20</sub> mit den genotoxischen Substanzen, mit Ausnahme von MNU, führen in den HepG2 Zellen zu einem leichten Anstieg der Apoptoserate, während dies in den TK6 und SH-SY5Y Zellen nicht zu beobachten ist. Einzig Lamivudin und Paclitaxel haben einen im Vergleich zu den HepG2 und SH-SY5Y Zellen statistisch signifikant höhere Apoptoserate zur Folge. Nach 24 h Behandlung zeigen MNU, Etoposid und Paclitaxel in beiden respektive den drei Zell- Systemen einen Anstieg der Anzahl apoptotischer Zellen, jedoch in unterschiedlich starker Ausprägung. Streptonigrin und DMBA/BPDE haben hier keinen Anstieg zur Folge während Lamivudin nur in den TK6 Zellen zur Apoptose führt. Im Falle der nicht-genotoxischen Substanzen zeigen die TK6 Zellen keine erhöhte Apoptoserate nach vierstündiger Behandlung. Erst nach 24 h, mit Ausnahme von Chloroquin, zeigen sich mehr apoptotische Zellen. Mit Chloroquin ist in den HepG2 und SH-SY5Y Zellen sowohl nach 4 h als auch nach 24 h Behandlung eine gesteigerte Apoptoserate zu sehen. Wie auch Chloroquin zeigt Phenobarbital in den HepG2 Zellen nach 4 h Behandlung einen Anstieg der apoptotischen Zellen. Dieser Effekt ist nach 24 h Behandlung nicht mehr zu sehen. PMA hat nach 24 h Behandlung eine erhöhte Apoptoserate in den HepG2 Zellen zur Folge während Nikotin und Phenobarbital hier keinen Effekt zeigen.

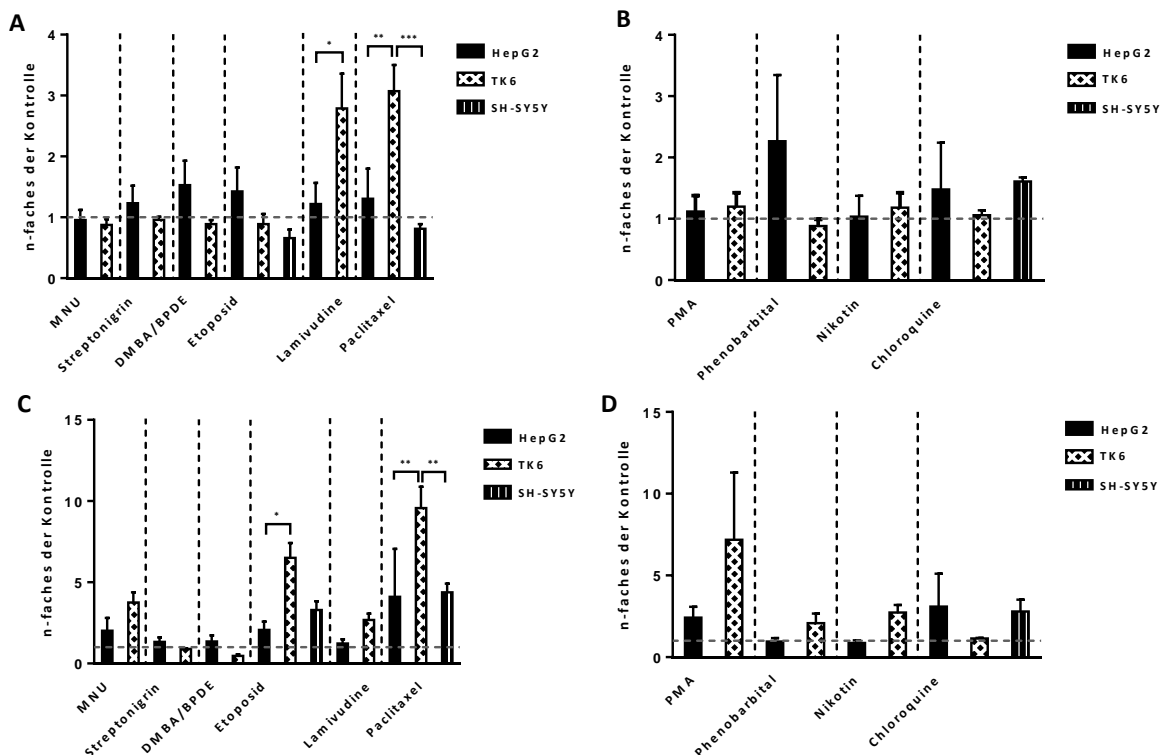


Abb. 46: SubG1 Fraktion von HepG2 und TK6 Zellen nach Behandlung mit der LD<sub>20</sub> für 4 h (A und B) sowie für 24 h (C und D) dargestellt als n-faches der Kontrolle; n=3 biologische Replikate; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001

## 4 Diskussion

Genotoxische Eigenschaften von pharmazeutischen Produkten stellen ein potentielles Risiko für die Krebsentstehung und damit eine ernste Gefahr für den Anwender dar. Um diese Gefahr zu beurteilen, ist eine Testung unabdingbar. Die hierfür zur Verfügung stehenden *in vitro* Test-Systeme sind jedoch nicht ausreichend, um eine umfassende Gefährdungsbeurteilung vornehmen zu können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieses Problem adressiert und nach Möglichkeiten gesucht, Wirkmechanismus-spezifische Signaturen zur Charakterisierung der genotoxischen Eigenschaften von Substanzen zu identifizieren. Nach Exposition mit Substanzen aus den Substanzklassen Genotoxine, nicht-genotoxische Kanzerogene und nicht-Kanzerogene wurden Genexpressionsprofile, Zellzyklusveränderungen, Apoptoserate, P53 Phosphorylierung und Expression von Schlüsselproteinen der Stressantwort in drei Zellsystemen verglichen und analysiert.

### 4.1 Charakterisierung der Zellsysteme

Initial ist es notwendig die zelltoxische Wirkung der Substanzen in den Zellsystemen zu untersuchen und Konzentrationen sowie Zeitpunkte für die Behandlung zu definieren. Mittels COMET-Assay und Mikrokerntest erfolgte die Abschätzung des genotoxischen Potentials der eingesetzten Substanzen. Diese beiden Testsysteme sind im automatisierten Substanz-Screening in der pharmazeutischen Industrie weit verbreitet und der Mikrokerntest ist Bestandteil der regulatorischen Standardtestbatterie. Bereits hier werden Limitationen dieser Tests sichtbar.

In TK6 Zellen, einem in der Genotoxizitätstestung weit verbreiteten Zell-System, führt die Behandlung mit den Genotoxinen DMBA, Lamivudin und Paclitaxel nicht zu dem erwarteten positiven Ergebnis im COMET-Assay. Im Falle von DMBA lässt sich dies durch eine fehlende metabolische Aktivierung begründen. TK6 Zellen sind nicht in der Lage Prokanzerogene wie z. B. Benzo(a)pyren zu toxifizieren [127] und machen somit den Einsatz von S9-Leberextrakt notwendig. Dieser ist jedoch zytotoxisch und hat Einfluss auf die Expression vieler Gene [13, 57]. Der Einsatz von S9-Leberextrakt ist somit kritisch zu betrachten. Dies zeigt die Grenzen von TK6 Zellen als Zellsystem in der Testung auf. Lamivudin zeigt im COMET-Assay keine genotoxische Wirkung, da lediglich eine Stunde mit der Substanz behandelt wird und Lamivudin aufgrund seines Wirkmechanismus eine längere Zeit braucht, um seine Wirkung zu entfalten. Im Falle von Paclitaxel, welches als Aneugen wirkmechanismus bedingt keine DNA-Strangbrüche erzeugt, kann im COMET-Assay keine genotoxische Wirkung nachgewiesen werden. Sowohl in den TK6 als auch den SH-SY5Y Zellen sind keine Strangbrüche sichtbar.

Die genotoxische Wirkung von PMA hingegen ist unerwartet. In vorrausgegangenen Untersuchungen an HepG2 Zellen ist keine strangbrechende Wirkung im COMET-Assay detektiert worden. Mechanistisch könnte dies auf durch PMA hervorgerufenen, oxidativen Stress zurückzuführen sein. PMA aktiviert die PKC [28], welche unter anderem über die Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) Oxidase die Bildung von ROS verursacht [102]. Die Bildung von ROS wurde hier auch direkt durch PMA Behandlung von humanen peritonealen Mesothel-Zellen gezeigt. Dass dieses Phänomen in HepG2 Zellen nicht auftritt könnte durch die schnelleren Metabolisierung des PMA im Vergleich zu den TK6 Zellen aufgrund der stärkeren metabolischen Kompetenz der HepG2 Zellen begründet sein. Durch die Zugabe eines Antioxidants oder S9-Leberextrakt könnte diese Hypothese überprüft werden. Alle anderen Substanzen zeigen die erwarteten Effekte im COMET-Assay.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren und falsch negative Ergebnisse zu identifizieren, wurde der Mikrokerntest durchgeführt. Hier ist durch die nach der Behandlung nachgeschaltete Erholungsphase, sowie die Erkennung numerischer Aberrationen, ein Effekt im Falle der im COMET-Assay negativen Substanzen zu erwarten. Durch die Behandlung mit Paclitaxel und Lamivudin wird in den TK6-Zellen tatsächlich die Bildung von Mikrokernen induziert während PMA keinen Effekt zeigt. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus den HepG2 Zellen überein. DMBA zeigt aufgrund der fehlenden metabolischen Aktivierung keinen Effekt in den TK6 Zellen.

Um sowohl direkte, als auch zeitlich verzögerte Effekte in den Folgeuntersuchungen erfassen zu können wurden die Behandlungszeitpunkte auf 4 h und 24 h festgelegt. Behandlungszeiträume von 4 h und 24 h werden standardmäßig in den meisten *in vitro* Säugerzelltests und auch in einer Vielzahl von Genexpressions-Studien verwendet, was die Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen mit anderen publizierten Studien erhöht. Als Konzentrationen wurden das *no observed adverse effect level* (NOAEL) und LD<sub>20</sub> gewählt. Die Überlagerung der Stressantwort durch andere Prozesse wird somit vermieden. Des Weiteren wird sekundären genotoxischen Effekten auf Basis von starker Zytotoxizität vorgebeugt. Die im XTT-Assay ermittelten Konzentrationen zeigen, dass die Zellsysteme im Hinblick auf die Sensitivität starke Unterschiede aufweisen. Die Sensitivität des Zellsystems ist jedoch auch abhängig von der eingesetzten Substanz. Eine generelle Einteilung der Zellsysteme entsprechend der Sensitivität gegenüber den eingesetzten Substanzen ist somit nicht möglich. In Bezug auf die genotoxischen Substanzen weisen die TK6 Zellen im Vergleich zu den HepG2 Zellen eine höhere Sensitivität auf. Die Wahl der Behandlungs-Konzentrationen auf Basis der Zytotoxizität wird in einer Studie von Li et al. (2015) kritisch betrachtet. Hier wird eine systematische Dosis-Auswahl anhand der Expression von drei Genen der Stress-Antwort, ATF3, GADD45A und CDKN1A, empfohlen [106].

## 4.2 Genexpressionsanalyse

### 4.2.1 Differentiell exprimierte Gene

Um potentielle Unterschiede zwischen den Zellsystemen deutlich zu machen, wurde zunächst die Anzahl und die Schnittmenge von durch die Behandlung regulierten Genen verglichen. Die Anzahl der differentiell exprimierten Gene (DEG) ist hierbei deutlich unterschiedlich sowie auch die Schnittmenge der regulierten Gene. Studien, in denen die Expressionsprofile verschiedener Zellsysteme verglichen werden, existieren nur wenige. Eine dieser Studien zeigt die unterschiedliche Expression sowohl vor als auch nach Behandlung von HepG2, HepaRG und primären Hepatozyten mit Aflatoxin B1 und Benzo(a)pyren. Die Schlussfolgerung der Autoren besagt, dass die Expression vor Behandlung grundlegend unterschiedlich ist und auch bei der Reaktion der Zellsysteme nach Behandlung Unterschiede bestehen [79]. Auch in den in dieser Arbeit untersuchten Zellsystemen existieren Abweichungen in Bezug auf Anzahl der DEG und der Schnittmenge in HepG2 und TK6 Zellen.

Eine initiale Betrachtung der Ähnlichkeit zwischen den Substanzen in einer *hierarchical cluster analysis* (HCA) erbrachte kein zufriedenstellendes Ergebnis in Bezug auf die Trennung von genotoxischen und nicht-genotoxischen Substanzen. In beiden Zellsystemen ergaben sich heterogene Gruppen und Untergruppen. Dies zeigt, dass eine Auswahl an Genen für die Diskriminierung der Substanzen notwendig ist. Die Einschätzung wird in einer Studie von Ellinger-Ziegelbauer et al. bestätigt [47]. Die Auswahl der Gene ist komplex und unterliegt zudem der Schwierigkeit, dass die Genauswahl auch gegen die auftretenden pleiotropen Effekte nach Behandlung diskriminieren muss [105, 215]. Eine umfangreiche Studie in TK6 Zellen ermittelte anhand der Genexpressionsprofile von 28 Substanzen verschiedener Wirkmechanismen 65 Gene, welche die Diskriminierung von direkten- und indirekten Genotoxinen sowie nicht-genotoxischen Substanzen ermöglichen sollen [105, 106]. Wendet man diese Klassifizierungsgene auf die generierten Datensätze an, so wird deutlich, dass diese abhängig von Zeit, Konzentration und Zellsystem unterschiedlich gut für die Diskriminierung geeignet sind. In HepG2 Zellen, also einem anderen als dem in der zitierten Studie verwendeten Zellsystem, wird das beste Ergebnis nach 24 h Behandlung mit der LD<sub>20</sub> erzielt. PMA und Phenobarbital als nicht-genotoxische Kanzerogene bilden eine Untergruppe, mit starker Ähnlichkeit zum nicht kanzerogenen Nikotin. Die direkt DNA-schädigenden Substanzen DMBA, Streptonigrin, und MNU bilden eine weitere Untergruppe aus. Getrennt hiervon sind die indirekt genotoxischen Substanzen Etoposid, Paclitaxel und Lamivudin zu finden. Chloroquin als nicht-Kanzerogen wird ebenfalls dieser Untergruppe zugeordnet. Dies könnte auf die durch Chloroquin induzierten ROS zurück zu führen sein [49].



Die gute Diskriminierung zeigt, dass die Festlegung der Konzentrationen anhand der Zytotoxizität gleichwertig ist zu der von Li et al. (2015) vorgeschlagenen Auswahl anhand der Reaktion der Stress-Antwort-Gene. Die Befürchtung von Li et al. (2015), dass die transkriptionelle Antwort aufgrund von Über- oder Unter-Dosierungen zu schwach sein könnte, wird nicht bestätigt. Dies trifft dagegen auf die Konzentration am NOAEL zu. Die hierdurch erzielte Expressionsantwort ist nicht aussagekräftig und lässt in beiden Testsystemen keine zuverlässige Diskriminierung zu. Die Wahl des Zeitpunktes in der Studie von Li et al. (2015) basiert auf der Annahme, dass frühe Genexpressions-Änderungen charakteristisch für den initialen Schaden sind und nicht durch nachfolgende molekulare Prozesse beeinflusst werden [47]. Dies bestätigt sich in den hier untersuchten HepG2 Zellen nicht. Auch in den Experimenten in TK6 Zellen, welche auch in der Studie von Li et al. (2015) verwendeten wurden, zeigt sich eine bessere Diskriminierung durch die Klassifizierungsgene nach einer Behandlung für 24 h. Eine Trennung der nicht-genotoxischen Kanzerogene von den nicht-Kanzerogenen ist nicht darstellbar. Die indirekt genotoxischen Substanzen Etoposid, Lamivudin und Paclitaxel weisen hier eine starke Ähnlichkeit mit den direkt genotoxischen Substanzen BPDE und MNU auf. Eine Diskriminierung zwischen diesen beiden Wirkmechanismen ist somit im Gegensatz zu den HepG2 Zellen ebenfalls nicht möglich. Eine Verbesserung könnte möglicherweise durch die systematische Dosisoptimierung wie in der Studie von Li et al. (2015) erzielt werden.

### 4.2.2 Gene Set Enrichment Analysis

Die *gene set enrichment analysis* (GSEA) wurde genutzt um potentielle Wirkmechanismus-assoziierte Unterschiede zwischen den Substanzen zu zeigen, um so zusätzliche Informationen für eine Diskriminierung nach dem Wirkmechanismus zur Verfügung zu haben. Eine Analyse auf Ebene der *GO-terms* zeigte jedoch, dass zwar Stressantwort-spezifische *GO-terms* reguliert sind, jedoch keine Diskriminierung zwischen direkt- und indirekt genotoxischen Substanzen möglich ist. DNA-Reparatur, Stressantwort, Apoptose und Zell-Zyklus assoziierte *GO-terms* sind in diesen Fällen für alle Substanzen identifiziert worden. Dies macht deutlich, dass eine *GO-term* Analyse in diesem Zusammenhang lediglich darüber Auskunft gibt ob ein DNA-Schaden vorliegt oder nicht. Den DNA-Schaden genauer einzugrenzen, ist hierbei aber nicht möglich, da in den meisten *GO-terms* zur DNA-Schadensantwort Überschneidungen bei den enthaltenen Genen vorliegen bzw. durch pleiotrope Eigenschaften vieler involvierter Gene diese in mehreren *GO-terms* vorhanden sind. Somit ist durch diese Form der Analyse kein Mehrgewinn an Informationen zu verzeichnen. Diese Einschätzung wird in einer Studie von Godderis et al. (2012), in der 15 genotoxische Substanzen mit unterschiedlichsten Wirkmechanismen untersucht wurden, bestätigt. Hier konnte keine Diskriminierung zwischen den Mechanismen erzielt werden [57]. Als Grund hierfür wird angenommen, dass keine robusten Veränderungen auf Ebene der umfassenden Genexpressions-Änderungen nach Behandlung mit

mutagenen Substanzen auftreten. Auch die in dieser Arbeit erhobenen Daten für die nicht-genotoxischen Kanzerogene und die Nicht-Kanzerogene zeigen keine systematischen Unterschiede in der GO-Analyse.

### 4.2.3 *Master Regulators*

Die Identifikation von *master regulators (MR)* ist in der Literatur im Bereich toxikogenomischer Ansätze für die Risikobewertung in der *in vitro* Testung auf Genotoxizität nicht zu finden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet, um übergeordnete Gene zu identifizieren, welche das veränderte Expressionsprofil erklären. Diese könnten potentiell interessante Kandidaten für die Diskriminierung der Substanzen nach dem Wirkmechanismus sein. Betrachtet man die Anzahl der identifizierten *MR*, werden erneut die Unterschiede zwischen den Zellsystemen deutlich. Welche und wie viele *MR* identifiziert werden konnten, war zudem zeit- und konzentrationsabhängig. Dies wiederum unterstützt die Vorgehensweise von Li et al. (2015), die Behandlungs-Dosis von der Expression der Gene ATF3, GADD45A und CDKN1A abhängig zu machen, um einheitliche, vergleichbare Expressionsantworten zu erhalten. Diese drei Gene wurden auch in den in dieser Arbeit durchgeführten *MR*-Analysen für genotoxische und nicht-genotoxische Substanzen identifiziert. Hierbei ist GADD45A ausschließlich nach Behandlung mit genotoxischen Substanzen reguliert, während die anderen beiden sowohl bei genotoxischen als auch nicht-genotoxischen Substanzen reguliert waren. In einer Studie von Hastwell et al. (2009) mit 75 untersuchten Substanzen zeigte GADD45A eine Sensitivität von 87 % sowie eine Spezifität von 95 % [67] und scheint somit ein robuster Marker für Genotoxizität zu sein.

Anhand der hier identifizierten *MR* lässt sich aber keine Diskriminierung von Wirkmechanismen vornehmen und auch nicht-genotoxische Kanzerogene zeigen keine Mechanismus-assoziierten Unterschiede zu Nicht-Kanzerogenen. Als Indikator für Genotoxizität konnte in diesen Untersuchungen TP53INP1 identifiziert werden. Dieser ist ein Kofaktor für die transkriptionelle Aktivität von P53 für anti-proliferative sowie pro-apoptische Zielgene wie beispielsweise p21 [145, 169]. Die Relevanz der identifizierten *MR* konnte über die Generierung von Netzwerken gezeigt werden. Innerhalb dieser Netzwerke sind die *MR* für eine Vielzahl der differentiell sowie auch konstitutiv exprimierten Gene verantwortlich. Die *MR* selbst sind alle nach Behandlung differentiell exprimiert. Dies bestärkt ihre Relevanz im Zuge der Stressantwort. Hierbei ist offensichtlich, dass P53 sowohl in der DNA-Schadensantwort als auch der generellen Stressantwort eine zentrale Rolle spielt.

Betrachtet man die im Folgenden generierten Protein-Interaktions-Netzwerke, so wird die funktionelle Interaktion der im *MR*-Netzwerk befindlichen Gene noch deutlicher. Das Beispiel der Expressionsantwort bei der LD<sub>20</sub> von Etoposid in den HepG2 Zellen zeigt, dass 98 % der im *MR*-

Netzwerk befindlichen Gene Interaktionen im Protein-Netzwerk aufweisen. Hier sind zahlreiche Proteine der DNA-Schadensantwort enthalten. Dies trifft auch auf die anderen Substanzen in den beiden Zellsystemen zu, jedoch werden hier andere Proteine der DNA-Schadensantwort angesprochen. Dies bedeutet, dass anhand der in den Netzwerken befindlichen, nach Behandlung regulierten Gene Unterschiede zwischen genotoxischen Wirkmechanismen erkennbar sind. Um diese Hypothese zu bestätigen, müssten Substanzen mit gleichen Wirkmechanismen im Detail verglichen werden. Stimmen die Gene für gleich wirkende Substanzen überein und weisen Unterschiede zu andersartig wirkenden Substanzen auf, so würde dies eine Strategie zur bisher nicht erreichten Diskriminierung verschiedener genotoxischer Mechanismen darstellen. Diese Untersuchungen konnten jedoch aufgrund mangelnder Kapazitäten nicht durchgeführt werden und sollten in einem weiteren Projekt adressiert werden.

### 4.2.4 Eigene Diskriminatoren

Für die Erstellung von Diskriminatoren existieren verschiedene Strategien. Ein Ansatz ist die *nearest shrunken centroid* Methode [195]. Hierbei wird eine Gruppe von Genen identifiziert, welche eine Klasse am besten repräsentiert. Diese Methode wurde in einigen Studien zur Ermittlung von Klassifizierungsgenen für genotoxische und nicht-genotoxische Substanzen angewendet und ermöglicht deren Diskriminierung [78, 106, 122]. Anwendbar ist diese Methode für eine Vielzahl von Charakterisierungs-Problemen [195]. Welche Gene hier verwendet werden, bleibt dem Anwender jedoch selbst überlassen. Notwendige Grundlage für die erfolgreiche Nutzung dieser Methode ist die Verwendung von Daten aus einem Trainingsset, um über ein Validierungsset die Qualität der Zuordnung zu einer Gruppe zu überprüfen. Eine Anwendung, welche die *nearest shrunken centroid* Methode mit der Vorhersage von Eigenschaften verbindet, und auch in einigen Studien verwendet wurde, ist die *Prediction Analysis for Microarrays* (PAM) der Universität Stanford. Da über diese Methode bisher keine Erfolge in Bezug auf die Zuordnung verschiedener Wirkmechanismen publiziert wurden und in der vorliegenden Arbeit nicht mehrere Substanzen mit gleichem Wirkmechanismus zur Verfügung standen, wurde diese Methode nicht weiter verfolgt. Dennoch ist die Analyse des generierten Datensatzes mittels PAM ein sinnvoller Ansatz, um weitere Informationen zu generieren und sollte in Zukunft noch durchgeführt werden.

Um dennoch aus diesem Datensatz Diskriminatoren zu identifizieren, die zusätzlich Aufschluss über den Wirkmechanismus geben und nicht Zellsystem-spezifisch sind, wurde ein eigener Ansatz entwickelt. Die Auswahl der Gene ist unter 3.2.4 erläutert. Aus diesen Analysen resultierten 61 Klassifizierungsgene, wovon lediglich 4 auch in der Studie von Li et al. (2015) verwendet wurden. 29 davon wiesen in einer Protein-Interaktionsanalyse direkte Beziehungen untereinander auf. Dass nicht alle Proteine direkte Beziehungen aufweisen, zeigt, dass die Gene unterschiedlichen Funktionen

zugeordnet werden können und somit die Chance besteht eine Diskriminierung nach Wirkmechanismus zu erhalten. Mit diesen 61 Klassifizierungsgenen wurde eine HCA für TK6 und HepG2 Zellen für jede Konzentration und jeden Zeitpunkt durchgeführt. In den HepG2 Zellen zeigt sich das beste Ergebnis nach 24 h Behandlung mit der Konzentration am NOAEL. Hier liegen die nicht-Kanzerogene Chloroquin und Nikotin abgegrenzt von den nicht-genotoxischen Kanzerogenen Phenobarbital und PMA vor. Eine weitere Gruppe bilden die genotoxischen Substanzen. Dieser Ansatz erreicht somit zusätzlich zu der in vielen anderen Studien gezeigten Diskriminierung von nicht-genotoxischen und genotoxischen Substanzen die Unterscheidung von nicht-kanzerogenen, zytotoxischen Substanzen und nicht-genotoxischen Kanzerogenen. Um diese Hypothese zu bestätigen müsste ein Substanz-Set mit weiteren Substanzen unterschiedlicher Wirkmechanismen mittels dieser Klassifizierungsgene zum Beispiel über PAM eingeordnet werden. Da PMA und Phenobarbital einen deutlich unterschiedlichen Wirkmechanismus aufweisen, bestehen Chancen, dass auch Substanzen mit anderen Wirkmechanismen korrekt eingestuft werden würden.

Etoposid und Streptonigrin stellen hier eine weitere Untergruppe dar. Die Gemeinsamkeit dieser Substanzen ist die Inhibition der Topoisomerase II [216, 221]. Streptonigrin vermittelt seine genotoxische Wirkung jedoch über weitere Mechanismen (siehe Abschnitt 1.7.5), so dass nur teilweise der gleiche Wirkmechanismus vorliegt. Auch Paclitaxel und DMBA bilden eine Untergruppe aus. Diese beiden Substanzen weisen nicht vergleichbare Wirkmechanismen auf. Im Umkehrschluss kann also davon ausgegangen werden, dass Substanzen mit gleichen Wirkmechanismen diesen nicht oder nur bedingt zugeordnet werden können. Dennoch wird Paclitaxel als Spindelinhibitor, die in der Studie von Li et al. (2015) als nicht-genotoxisch eingestuft wurden, hier als indirekt-genotoxisch klassifiziert. Lamivudin und MNU bilden in dieser Analyse eigene Untergruppen. Um die Validität dieser Prädiktions-Gene zu ermitteln, müsste eine weitere Analyse mit einem erweiterten Substanz-Set erfolgen. Eine Einschätzung, ob die durch Li et al. (2015) publizierten Klassifizierungsgene oder die anhand des vorliegenden Datensatzes ermittelten ein besseres Ergebnis liefern, lässt sich aufgrund der Datenlage nicht prognostizieren.

In den TK6 Zellen stellt sich die Situation etwas anders dar. Mit den Klassifizierungsgenen von Li et al. (2015) lassen sich in den TK6 Zellen genotoxische und nicht-genotoxische Substanzen trennen, während dies mit den eigenen Klassifizierungsgenen unabhängig von Zeitpunkt und Konzentration nur bedingt möglich ist. Die Unterschiede in der Klassifizierung der Substanzen in den TK6 und HepG2 Zellen mittels der eigenen Klassifizierungsgene zeigen, dass Zellsystem unabhängige Klassifizierungsgene nicht identifiziert werden konnten. Dennoch sind sie vielversprechend in Bezug auf die HepG2 Zellen. Um diese Hypothese zu stützen, wurden die Klassifizierungsgene mit den Genen der identifizierten *MR*-Netzwerke verglichen. Hierbei sind nur geringfügige Überlappungen

sichtbar. Dadurch, dass die Stressantwort in den *MR*-Netzwerken aber für jeweils die genotoxischen und die nicht-genotoxischen Substanzen ähnlich aussieht, ist diese geringe Überlappung von Vorteil in Bezug auf die Diskriminierung von unterschiedlichen Wirkmechanismen. Die Klassifizierungsgene sind somit unabhängig von der oft erheblichen Überlappung der transkriptionellen Antwort von verschiedensten Substanzen [106]. Dass sie dennoch biologische Relevanz in Bezug auf die Stressantwort haben, zeigt das Protein-Interaktions-Netzwerk der Gene der *MR*-Netzwerke und der 61 Klassifizierungsgene. Hier sind diese Gene durch zahlreiche Interaktionen miteinander verknüpft. Auffällig hierbei ist, dass genotoxische Substanzen nur ein Cluster ausbilden, während die nicht-genotoxischen Substanzen zwei Protein-Cluster zeigen. Ein Cluster steht hierbei für die allgemeine Stressantwort. Im zweiten Cluster sind vermehrt Gene der Klassifizierungsgene zu finden, die offensichtlich mit der DNA-Schadensantwort zusammenhängen. Dies bestärkt die biologische Relevanz der Klassifizierungsgene.

### 4.2.5 Biomarker

Um nicht nur Signaturen sondern einzelne Proteine zu identifizieren, welche repräsentativ für die einzelnen Substanzklassen sind, wurden im Folgenden die *MR* für die genotoxischen und nicht-genotoxischen Substanzen mit den 61 Klassifizierungsgenen verglichen. Die Expression der neun ermittelten Proteine *cyclin dependant kinase 9* (CDK9), *excision repair cross-complementation group 5* (ERCC5), *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA), *Fizzy-related protein homolog* (FZR1), *alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked* (ATRX, RAD54L), *xeroderma pigmentosum, complementation group C* (XPC), *PYD and CARD domain containing* (PYCARD), *K(lysine) acetyltransferase 5* (KAT5) und *RAD23 homolog B* (RAD23B) wurde daraufhin für alle Substanzen einzeln in den Zellsystemen betrachtet. Ob individuelle Proteine für bestimmte Wirkmechanismen stehen, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Hierfür müsste die Analyse dieser Gene für mehrere Substanzen mit dem gleichen Wirkmechanismus erfolgen.

Ein potentieller Kandidat für Topoisomerase II Inhibitoren ist die CDK9. Die CDK9 ist im Gegensatz zu den meisten CDK's nicht in die Regulation des Zellzyklus eingebunden, sondern wird vorrangig mit der Transkription in Verbindung gebracht. Neben dieser Funktion ist sie im Komplex mit Cyclin K in die Stressantwort nach Replikationsstress involviert [226]. Cyclin K ist ein Zielgen von P53 und wird nach DNA-Schaden aktiviert [134]. Dies lässt eine Rolle in der DNA-Schadensantwort vermuten. Dass die CDK9 in die DNA-Reparatur involviert ist, wurde von Liu et al. (2010) gezeigt. CDK9 bindet an Ku70, welches in der Doppelstrangbruch-Reparatur während der nicht-homologen Rekombination notwendig ist [112]. Auch in die Stressantwort nach indirektem DNA-Schaden durch Hydroxyharnstoff ist die CDK9 involviert [226] und eine Beteiligung nach UV-Bestrahlung wurde

postuliert [133]. Somit kommt die CDK9 nicht für Topoisomerase II Inhibitoren als Biomarker in Frage sondern steht allgemein für Substanzen, welche Replikationsstress verursachen.

Ebenfalls in die Replikation und die DNA-Reparatur involviert ist PCNA. Im Zuge der Replikation bildet dieses als Trimer eine DNA-Klammer, die eine Bindung von DNA-Polymerasen und anderen Proteinen vermittelt [48]. Im Rahmen der DNA-Reparatur ist die PCNA sowohl an der RAD6-abhängigen Translänionssynthese [70] als auch an der Exzisions-Reparatur beteiligt [175]. Die stärkere Expression der PCNA tritt nach Behandlung mit MNU und Streptonigrin in den HepG2 Zellen auf. Beide Substanzen weisen grundsätzliche Unterschiede in Bezug auf Ihre Wirkmechanismen auf. Somit stellt die PCNA keinen geeigneten Biomarker dar.

FZR1 ist nur im Falle von Etoposid in den HepG2 Zellen stärker exprimiert. FZR1 ist in eine Vielzahl von Zellzyklus-Prozessen involviert. Hierzu zählt auch die DNA-Schadensantwort nach UV-Bestrahlung und die Modifikation der PCNA [32]. Somit kann auch dieses Protein nicht als Biomarker für Topoisomerase II Inhibitoren fungieren. Sowohl in TK6- als auch HepG2 Zellen ist PYCARD nach Behandlung mit Etoposid und Lamivudin stärker exprimiert. PYCARD vermittelt die Zusammensetzung von großen Signal-Komplexen, welche in inflammatorische [18] und apoptotische Signalwege involviert sind [31, 126]. Durch Behandlung mit Mitomycin C (DNA-Vernetzer) und Camptothecin (Topoisomerase I Inhibitor) wird die intrinsische Apoptose mittels P53 über PYCARD reguliert [144]. Auch dieses eignet sich somit nicht als Biomarker für einen bestimmten Mechanismus.

Ein weiteres identifiziertes Protein stellt RAD23B dar. Dies ist nach Behandlung mit Etoposid in den HepG2 Zellen herunter reguliert. Funktionell ist dieses in der NER und BER involviert [174], Reparatur-Systeme die vorrangig nicht an der Reparatur von DNA-Schäden durch Etoposid beteiligt sind. Die verringerte Expression im Kontext der biologischen Funktion ist hierbei im Zusammenhang mit den durch Etoposid verursachten DNA-Schäden unerwartet. Auch RAD54L ist nach Etoposid und zusätzlich auch nach DMBA Behandlung in HepG2 Zellen herunterreguliert. Dieses Protein ist an der homologen Rekombination beteiligt, welche DSB der DNA repariert [184]. Somit ist die geringere Expression nach DMBA und Etoposid Behandlung unerwartet, da beide Substanzen DSB der DNA hervorrufen. Eine Erklärung hierfür könnte die durch den DNA-Schaden induzierte Apoptose sein [158]. In den TK6 Zellen nach BPDE Behandlung ist RAD54L stärker exprimiert. Hier werden die DNA-DSB also im Gegensatz zu den HepG2 Zellen repariert und weniger Zellen gehen in die Apoptose. Dies wird durch die Apoptose-Messung nach 4 h mit der LD<sub>20</sub> mit BPDE und Etoposid bestätigt. Hier ist die Apoptoserate in den HepG2 Zellen um das ca. 1,5 fache im Vergleich zur Kontrolle erhöht, während in den TK6 Zellen keine Veränderung in Bezug zur Kontrolle zu verzeichnen ist. Als Biomarker jedoch ist auch dieses Protein nicht geeignet.

Ebenfalls herunter reguliert ist die Lysin (K) Acetyltransferase 5 (KAT5, syn. TIP60). Diese ist in die Prozesse Apoptose und DNA-DSB-Reparatur involviert [74]. Auch hier ist die verringerte Expression im Falle von Lamivudin und Etoposid durch eine gesteigerte Apoptoserate und dadurch bedingte, verringerte DNA-Reparatur zu erklären.

Als Biomarker für die nicht-genotoxischen Substanzen kommt allein ERCC5 (syn. XPG) in Frage. Dieses ist nach Behandlung mit PMA herunter reguliert. ERCC5 ist ein Protein, welches im Zuge der NER notwendig ist [141]. Neben diesem Protein sind durch PMA auch weitere in die DNA-Reparatur involvierte Proteine wie PCNA, FZR1, ATRX, XPC und PYCARD größtenteils in beiden Zellsystemen herunter reguliert. Dies spricht für eine Beeinflussung der DNA-Schadensantwort durch PMA. Glover et al. (2014) konnten dies nach Bestrahlung von TK6 Zellen mit UV-C Strahlung zeigen [56]. Hier wurde die Bildung von  $\gamma$ H2AX Foci nach UV-C Bestrahlung mit und ohne eine Vorbehandlung mit PMA untersucht. Die hierbei persistierenden  $\gamma$ H2AX Foci in den zuvor mit PMA behandelten Zellen deuten auf eine verzögerte DNA-Schadensantwort hin. Auch wurde in dieser Studie gezeigt, dass die durch UV-C induzierte Apoptose nach Vorbehandlung mit PMA stärker ausgeprägt auftritt. Die Apoptose ist hierbei P53 vermittelt.

Das letzte identifizierte Protein ist XPC. Dieses ist für die initiale Schadenserkenkung im Zuge der NER innerhalb des GGR verantwortlich [183]. Dennoch ist die XPC Expression auch nach Behandlung mit Substanzen, welche DNA-Schäden verursachen, die nicht über die NER repariert werden, induziert. Hierzu zählen z.B. durch Etoposid verursachte DSB. Das aber auch die Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch XPC beeinflusst wird, zeigten Despras et al. [40]. Hier führte ein XPC *knock down* zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber durch Etoposid induzierten DSB. Auch zeigten diese Zellen ein verändertes Spektrum an NHEJ Produkten. Des Weiteren konnte eine direkte Interaktion mit der Thymin DNA-Glykosylase und die Beeinflussung ihrer Funktion in der BER gezeigt werden [174]. Dies verdeutlicht, dass XPC nicht nur in der NER wichtige Funktionen übernimmt sondern auch innerhalb anderer DNA-Reparatur Signalwege eine Rolle übernimmt, die bislang mechanistisch und funktionell nicht geklärt ist. Die ubiquitäre XPC Expression nach genotoxischem Stress ist durch die transkriptionelle Regulation durch P53 zu erklären. P53 konnte als direkter Transkriptionsfaktor von XPC identifiziert werden [1] und eine Expression von XPC nach P53 Aktivierung ist somit wahrscheinlich. Auch ist XPC in den MDM2-P53 Regulations-Kreislauf involviert. In XPC defizienten Zellen bleibt P53 zwar für den Abbau ubiquitinyliert, die Assoziation mit dem Proteasom ist jedoch drastisch reduziert [95]. Der Mechanismus in der Koordinierung zwischen Reparatur und Proteolyse ist bislang noch ungeklärt. Dennoch zeigt die ubiquitäre Expression von XPC die Eignung als Biomarker für Genotoxizität. Vorteil hier ist, dass auch indirekt genotoxisch wirkende Substanzen wie Paclitaxel durch diesen Biomarker erfasst werden.

Ein weiteres auffälliges Protein stellt das TP53INP1 dar. Dieses ist nicht als Biomarker für genotoxische Substanzen gelistet, da es auch durch Behandlung mit Chloroquin mit der LD<sub>20</sub> nach 24 h verstärkt exprimiert wird. Durch die potentielle genotoxische Wirkung von Chloroquin [49] wird TP53INP1 hier jedoch als Marker für Genotoxizität betrachtet und neben XPC in die biologische Validierung mit einbezogen. TP53INP1 ist ein Kofaktor von P53 und phosphoryliert dieses an Ser 46. Es ist für die Expression von anti-proliferativen und pro-apoptotischen Zielgenen von P53, wie z.B. p21 mit verantwortlich [145, 169]. TP53INP1 wurde bereits in einer weiteren Studie erfolgreich als eines von 10 Klassifizierungsgenen zur Trennung von nicht-genotoxischen und genotoxischen Substanzen verwendet [121].

### 4.3 TP53INP1 und XPC als potentielle Biomarker für Genotoxine

Die auf mRNA Ebene gezeigte Expressionsänderung nach Behandlung mit den genotoxischen Substanzen wurde im Folgenden in den HepG2 Zellen auf Proteinebene untersucht. Im Vergleich zur Kontrolle ist das Proteinlevel von TP53INP1 nach Behandlung mit DMBA, Etoposid, MNU und Lamivudin erhöht. Streptonigrin und Paclitaxel sowie die Behandlung mit den nicht genotoxischen Substanzen Nikotin, Phenobarbital und PMA zeigen kein erhöhtes Proteinlevel. Chloroquin zeigt ein leicht erhöhtes Proteinlevel. Unklare Befunde in Bezug auf die Genotoxizität des Chloroquin verdeutlichen die Schwierigkeiten bei der Einstufung der Substanz. Riccio et al. (2001) zeigten, dass Chloroquin im Ames Test positive Ergebnisse aufweist, während in Maus-Lymphom-Zellen und im Mikrokerntest an Knochenmarkszellen der Ratte kein mutagenes Potential festgestellt werden konnte [153]. Eine Einstufung als genotoxische Substanz anhand des hier vorliegenden, erhöhten TP53INP1-Proteinlevels ist demnach gerechtfertigt. Somit ergibt sich eine Sensitivität von 71 % und einer Spezifität von 100 % auf Basis von TP53INP1 als Biomarker.

Um dies zu verifizieren müsste die Expression auf mRNA und Protein Ebene mit einem erweiterten Set an Substanzen untersucht werden. Klar ist jedoch, dass das TP53INP1 aufgrund seiner anti-proliferativen und pro-apoptotischen Wirkung ein wichtiges Protein in der DNA-Schadensantwort darstellt. Nach schwerem DNA-Schaden wird die Expression von TP53INP1 durch P53 vermittelt. Dieses bildet einen Komplex mit der *homeodomain-interacting protein kinase-2* (HIPK2) [197] oder der PKC $\delta$  [225] und phosphoryliert P53 an Ser 46. Diese Phosphorylierung ist notwendig für die nachfolgende Expression von P53AIP1 und der nachgeschalteten Apoptose und wurde für Stressoren wie  $\gamma$ -Strahlung, UV-Strahlung und Doxorubicin (DNA-Interkalator) gezeigt [145]. Auch für weitere Stressoren konnte die Induktion von TP53INP1 gezeigt werden. In NIH3T3 Zellen führten Doxorubicin, UV-Bestrahlung, MMS, Ethanol, Wasserstoffperoxid und Hitze-Schock zu einer verstärkten Expression [198]. Auch nach Gemcitabin (Antimetabolit) Behandlung wird TP53INP1 induziert [80]. Die gezeigte



Induktion nach Behandlung mit den nicht-genotoxischen Stressoren jedoch schließt eine Verwendung als Biomarker aus. Für XPC hingegen ist keine Induktion durch nicht-genotoxische Substanzen in der Literatur beschrieben. Auf Proteinebene ist hier jedoch eine klare Induktion nur nach Behandlung mit Etoposid zu sehen. Im Falle von MNU, Paclitaxel und DMBA wie auch bei Chloroquin und Phenobarbital ist eine leichte Induktion zu verzeichnen. Im verwendeten Konzentrationsbereich und zu den gewählten Zeitpunkten ist somit eine Diskriminierung zwischen den genotoxischen und nicht-genotoxischen Substanzen nicht möglich.

Unerwartet sind jedoch die starke Antwort nach Behandlung mit Etoposid und die schwache Induktion nach DMBA-Behandlung. Etoposid verursacht hauptsächlich DSB, welche vornehmlich durch die NHEJ eliminiert werden [24]. DMBA-DNA-Addukte hingegen werden durch die NER beseitigt [63] und eine höhere Expression von XPC wäre zu erwarten. Die schwache Antwort nach Behandlung mit MNU und Paclitaxel ist auf Basis der Wirk- und vorrangigen Reparatur- Mechanismen zu erwarten [218], korreliert jedoch nicht mit der Expression auf mRNA Ebene.

Im Falle von Streptonigrin war aufgrund der DNA-Addukt-Bildung und die Beteiligung der NER [191] eine erhöhte Expression von XPC zu erwarten, die sich jedoch auf Protein Ebene nicht bestätigt. Dies trifft auch auf Lamivudin zu. XPC wurde hier als essentiell für die Entfernung der Nukleotide in der NER nach Behandlung mit Azidothymidin, einem nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitor analog zum Lamivudin, beschrieben [217]. Somit ist XPC nur auf mRNA Ebene als Biomarker zu verwenden. Die biologische Relevanz der XPC-mRNA-Expression ist jedoch aufgrund der gezeigten Protein-Level fraglich.

### 4.4 P53

Die Protein-Level von P53 als zentralem Protein der Stressantwort sind homogen in den drei Zellsystemen. Nach Behandlung mit Etoposid, DMBA/BPDE, MNU, Paclitaxel, Lamivudin und Streptonigrin ist P53 in TK6 und HepG2 zeit- und konzentrationsabhängig induziert. In den SH-SY5Y Zellen wird P53 auf Protein-Ebene nach Behandlung mit Paclitaxel und Etoposid ebenfalls zeit- und konzentrationsabhängig induziert. Dies bestätigt aus der Literatur bekannte Daten in verschiedensten Zellsystemen [52, 83].

Bei den nicht-genotoxischen Substanzen ist die Situation in den Zellsystemen unterschiedlich. Nikotin und Phenobarbital induzieren die P53 Protein-Level nur in TK6 und nicht in HepG2 Zellen. Für Nikotin wird in unterschiedlichen Zellsystemen teils eine P53 abhängige, teils eine P53 unabhängige Stressantwort beschrieben [11, 166]. Eine Induktion von P53 auf Protein-Ebenen durch Phenobarbital ist in der Literatur nicht zu finden. Die Reduktion der Expression hingegen ist in verschiedenen

Studien gezeigt worden [59, 61, 199]. Mechanistisch bleibt die Induktion in den TK6 Zellen somit ungeklärt. Die Erhöhung des P53 Zielgens p21 auf Protein-Ebene durch Phenobarbital in den TK6 Zellen deutet jedoch auf die Richtigkeit dieser Ergebnisse hin, da eine P53 unabhängige Induktion des p21 in den HepG2 Zellen nicht auftritt.

Nach Chloroquin-Behandlung ist das Protein-Level von P53 in den SH-SY5Y höher, während in den HepG2 und TK6 Zellen keine Induktion zu verzeichnen ist. Dies bestätigt die aus der Literatur bekannte Zelltyp-abhängige Induktion der Apoptose. In primären Maus-Fibroblasten [190] sowie auch in humanen Glioblastom-Zellen [85] wird eine P53 vermittelte Apoptose beschrieben. In verschiedenen P53 kompetenten Melanom-Zell-Linien hingegen ist eine verstärkte Apoptose ohne P53 Aktivierung gezeigt, während in MCF7 Zellen und weiteren nicht-Melanom Zelltypen durch Chloroquine keine Apoptose induziert wird [98]. Dies verdeutlicht die Zelltyp-abhängige Stress-induktion von Chloroquin, welche in der vorliegenden Arbeit in TK6, HepG2 und SH-SY5Y Zellen beobachtet wurde.

PMA verursacht in TK6 und HepG2 Zellen ein reduziertes P53 Protein-Level. Dieser direkte Zusammenhang ist in der Literatur nicht beschrieben. Bekannt ist, dass der P53 Status durch verschiedene Isoformen der PKC unterschiedlich beeinflusst wird. In einem Hefezellsystem wurde gezeigt, dass die PKC- $\alpha$  die P53 Aktivität reduziert, während andere Isoformen eine erhöhte Aktivität zur Folge haben oder aber auch keinen Einfluss ausüben [33]. Somit kann die Reduktion des P53 durch PMA auf die Aktivierung der PKC zurückgeführt werden.

### 4.5 P53 Modifikation, pATM und CDK5

Die Modifikation von P53 durch unterschiedliche Stressoren stellt einen hoch komplexen und durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflussten Vorgang im Zuge der Stressantwort dar. Eine systematische Untersuchung ob Modifikationsmuster des P53 Wirkmechanismus spezifisch sind, ist bislang nicht erfolgt. Auch die Unterschiede in verschiedenen Zellsystemen durch die unterschiedliche Ausprägung modifizierender Kinasen, wie zum Beispiel phosphoryliertem ATM und CDK5, hat bislang noch keine Beachtung im Rahmen der Testung auf Genotoxizität gefunden. Eine der initialen Modifikationsstellen nach genotoxischem Stress ist Ser 15. Diese kann neben einer Vielzahl von anderen Kinasen durch die CDK5 und pATM phosphoryliert werden. Dies bestätigen die Untersuchungen in den drei Zelltypen. Nach Behandlung mit Etoposid ist pATM induziert und eine Ser 15 Phosphorylierung konnte nachgewiesen werden. Die CDK5 ist zwar nach Behandlung in den TK6 und SH-SY5Y Zellen auf Protein-Ebene leicht erhöht, die Aktivierung von pATM deutet jedoch darauf hin, dass keine CDK5 vermittelte Phosphorylierung von Ser 15 stattfindet. Das Ser 15 durch die CDK5 nach genotoxischem Stress in den SH-SY5Y Zellen phosphoryliert wird, wurde von Lee et al. (2007) gezeigt. Nach

Behandlung mit Mitomycin C erfolgt eine Stabilisierung und Aktivierung von P53 durch die CDK5 vermittelte Phosphorylierung an Ser 15, 33 und 46 [104].

Die Stressantwort auf Mitomycin C ist in anderen Zellsystemen durch *Ataxia telangiectasia and Rad3 related* (ATR) [131], eine weitere Kinase der DNA-Stressantwort, vermittelt. Dies deutet darauf hin, dass die in anderen Zellsystemen durch ATR vermittelte Stressantwort, in den SH-SY5Y Zellen durch die CDK5 vermittelt wird. Im Zusammenhang mit DNA-Schäden, welche durch ATM erkannt werden, scheint die CDK5 in den SH-SY5Y Zellen keine entscheidende Rolle zu spielen. Dies zeigt auch die Phosphorylierung von Ser 33 und 46, zwei weiteren durch die CDK5 modifizierten Stellen des P53. Ser 33 ist nach 24 h Behandlung mit Etoposid, Paclitaxel und Chloroquine nicht phosphoryliert. Mit Ausnahme von Paclitaxel trifft dies auch für Ser 46 zu. Die Phosphorylierung an Ser 46 wird im Allgemeinen für die Induktion von Apoptose durch P53 verantwortlich gemacht [125, 142, 179]. Sie wird nach schwerem DNA-Schaden phosphoryliert und das Schicksal der Zelle wird von einem Zell-Zyklus-Arrest zur Apoptose hin verschoben. Dies korreliert mit den erzielten Ergebnissen. In den TK6 Zellen ist Ser 46 nach Behandlung mit PMA, Phenobarbital MNU, Etoposid und Lamivudin phosphoryliert. Hier ist eine erhöhte Apoptoserate zu finden. In den HepG2 Zellen ist P53 an dieser Stelle nicht phosphoryliert und eine deutlich geringere Anzahl an apoptotischen Zellen zu finden. Die Phosphorylierung nach Behandlung mit PMA und Phenobarbital zeigt hierbei, dass nicht nur nach schwerem DNA-Schaden die Apoptose durch diese Modifikation bestimmt wird. Dies wird auch durch die Vielzahl an verschiedenen Kinasen deutlich, welche die Phosphorylierung an Ser 46 vornehmen können.

Für die Entscheidung zwischen Zell-Zyklus-Arrest und Apoptose scheint auch die Acetylierung des P53 ausschlaggebend zu sein. Wird p300, eine der wichtigsten Acetyltransferasen, ausgeschaltet, kommt es zu einer verminderten Expression von p21 und einer verstärkten Expression vom *P53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA) [76], einem pro-apoptischen Protein. Dennoch ist die Acetylierung nicht nur dem Zell-Zyklus-Arrest zuzuordnen. Nach DNA-Schaden ist beispielsweise auch die HIPK2 in die Stressantwort involviert. Diese phosphoryliert P53 an Ser 46 und ist somit mitverantwortlich für die Induktion der Apoptose [35]. Die HIPK2 ermöglicht hierbei durch Ko-Lokalisation mit dem *CREB-binding protein* (CBP) die nachfolgende Acetylierung von Lys 382 [71]. Dies bewirkt einen Zell-Zyklus-Arrest und eine gesteigerte UV-induzierte Apoptose.

Diese Doppel-Rolle der Acetylierung zeigt sich auch in den Ergebnissen der durchgeführten Versuche. Gleichzeitig mit der Phosphorylierung an Ser 46 ist auch immer eine Acetylierung an Lys 382 zu beobachten. Somit scheint die Induktion der Apoptose durch die Phosphorylierung an Ser 46 bestimmt zu sein, während die Acetylierung die Expression sowohl von pro-apoptischen als auch Zell-Zyklus-Arrest Genen induzieren kann. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass auch ohne eine

Phosphorylierung an Ser 46 Apoptose auftreten kann. Auch hier spielt die Acetylierung an Lys 382 eine wichtige Rolle. Neben der Beeinflussung der transkriptionellen Aktivität des P53 wird auch die nicht-transkriptionelle Funktion des P53 moduliert. Durch die Acetylierung an Lys 382 wird die Komplexbildung aus *Bcl-2-associated X protein* (BAX) und Ku70 vermieden sowie schon bestehende Komplexe getrennt [220]. BAX ist ein pro-apoptotisches Poren-Protein durch dessen Freisetzung die Apotoserate erhöht wird. Diese Funktion der Acetylierung an Lys 382 wird durch die erhobenen Daten bekräftigt. In über 70 % führen die Behandlungen zu einer Acetylierung an Lys 382 und in vielen Fällen ist damit keine Phosphorylierung an Ser 46 verbunden. Dennoch sind Apoptose und/oder Zell-Zyklus-Veränderungen zu beobachten.

Die Ergebnisse verdeutlichen die Komplexität der P53 Modifikationen. Dennoch konnten keine Wirkmechanismus-spezifischen Modifikationsmuster festgestellt werden. Einzig die Ser 15 Phosphorylierung tritt in allen Zellsystemen ausschließlich nach genotoxischem Stress auf und kann somit als Biomarker für direkte als auch indirekte Genotoxizität angesehen werden. In den SH-SY5Y Zellen induziert Chloroquin keine Phosphorylierung an Ser 15. Dies spricht hier eher dafür, dass Chloroquin kein relevantes genotoxisches Potential besitzt. Die widersprüchliche Datenlage zum genotoxischen Potential von Chloroquin [153] zeigt sich somit auch in der Ser 15 Phosphorylierung in den drei verwendeten Zellsystemen.

#### 4.6 P21, Zellzyklusveränderungen und Apoptose

Eines der Zielgene von P53 ist p21. Dieses ist in den TK6 und HepG2 Zellen nach Behandlung mit den genotoxischen Substanzen auf Protein-Ebene, mit Ausnahme der Behandlungen mit Lamivudin und Paclitaxel, homogen induziert. Die P53 abhängige Induktion des p21 ist für zahlreiche genotoxische Stressoren beschrieben [41, 43, 46] und ist verantwortlich für den Zellzyklus-Arrest in der G1- und G2- Phase [140] sowie in der S-Phase [143] durch die Inhibition von Cyclin abhängigen Kinasen. P21 ist des Weiteren für die Inhibition der P53 vermittelten Apoptose verantwortlich [55]. Die p21 Expression wird in diesem Zusammenhang mit der Phosphorylierung des P53 an Serin 20 in Verbindung gebracht [77]. Auch kann eine P53 unabhängige Induktion des p21 erfolgen [130]. Dies ist jedoch nicht nach Schädigung der DNA beschrieben.

Nach Behandlung mit Paclitaxel kommt es nur in den TK6 Zellen zu einem erhöhten Protein-Level, während in den HepG2 Zellen keine Induktion zu verzeichnen ist. Im Falle von Lamivudin stellt sich die Situation reziprok dar. Dies deutet darauf hin, dass die Sensitivität der beiden Zellsysteme gegenüber den Behandlungen mit Paclitaxel und Lamivudin unterschiedlich ausfällt. In den TK6 Zellen sollte Lamivudin somit direkt zur Apoptose führen, während in den HepG2 Zellen der Zell-Zyklus Arrest und die Reparatur überwiegt. Dies bestätigen die Zell-Zyklus-Untersuchungen. Lamivudin führt in den HepG2 Zellen zu einem G2/M-Arrest und die Apoptoserate ist nicht erhöht, während in den TK6 Zellen signifikant mehr apoptotische Zellen vorliegen und kein G2/M-Arrest sichtbar ist. Im Falle von Paclitaxel wird diese Hypothese nicht bestätigt. Auch hier ist ein G2/M-Arrest in den HepG2 Zellen zu sehen, jedoch auch in den TK6 Zellen nach 4 h Behandlung obwohl p21 hier erst nach 24 h nachgewiesen wurde. Paclitaxel verursacht somit einen G2/M-Arrest unabhängig von p21. Dies wird durch von Mullan et al. (2001) erhobenen Daten bestätigt, die GADD45A und BRCA1 für einen G2/M-Arrest nach Behandlung mit Paclitaxel verantwortlich machen [135]. Auch ist hier eine p21 vermittelte Apoptose-Inhibition nicht zu verzeichnen. Die Apoptoserate steigt in beiden Zellsystemen zeitabhängig an. Dies bestätigt andere aus der Literatur bekannte Daten, wie die erhöhte Apoptoserate nach Behandlung mit Cisplatin in Gliom-[91] und Ovarial-Karzinom-Zellen [110] nach Überexpression von p21.

In den SH-SY5Y Zellen ist p21 nach Behandlung mit Etoposid, Paclitaxel und Chloroquin sowohl nach 4 h als auch nach 24 h Behandlung nicht nachweisbar. Dies widerspricht aus der Literatur bekannten Daten, welche eine zeitabhängige Induktion von p21 in SH-SY5Y Zellen nach Behandlung mit 20  $\mu\text{M}$  Etoposid für 1 h bis 8 h zeigen [34]. In der vorliegenden Arbeit konnte ein DNA-Schaden im COMET-Assay für Etoposid mit einen Konzentrationsbereich von 15 – 60  $\mu\text{M}$  bereits bei einer Behandlung für eine Stunde nachgewiesen werden. Auch ist eine dosis- und zeitabhängige Akkumulation des P53

sowie ein G2/M-Arrest und eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen nach Etoposid Behandlung mit deutlich geringeren Konzentrationen ( $LD_{20}$  24 h 0,2  $\mu$ M) gezeigt worden. Das p21 hier dennoch reproduzierbar nicht nachweisbar ist, deutet darauf hin, dass die gewählten Behandlungsbedingungen in den SH-SY5Y nicht zu einer Induktion führen. Dennoch kann auf Basis der gewonnenen Daten davon ausgegangen werden, dass p21 bei höheren Konzentrationen an der Stressantwort in den SH-SY5Y Zellen beteiligt ist. Um diese Frage abschließend zu klären sind weitere Untersuchungen notwendig.

Die nach Behandlung mit den genotoxischen Substanzen gezeigte homogene Antwort von P53 und p21 in den HepG2 und TK6 Zellen hat in den Zellsystemen unterschiedliche Auswirkungen auf die Endpunkte Zell-Zyklus und Apoptose. TK6 Zellen sind grundsätzlich sensitiver und zeigen eine höhere Zahl an apoptotischen Zellen. Die Induktion apoptotischer Zellen folgt jedoch für die meisten der Behandlungen mit der gleichen Substanz in den beiden Zellsystemen dem gleichen Trend. Dies trifft auch auf die Apoptoserate in den SH-SY5Y Zellen für die dort untersuchten Substanzen zu.

Die Zell-Zyklus-Veränderungen zeigen hingegen Unterschiede bei der Behandlung der Zellsysteme mit der gleichen Substanz. Diese sind jedoch hauptsächlich zeitabhängig und die Unterschiede relativieren sich, wenn man beide Zeitpunkte betrachtet. Dieser Effekt ist auf die stark unterschiedliche Verdopplungsrate der einzelnen Zellsysteme zurückzuführen und verdeutlicht die Relevanz der Auswahl des Zeitpunktes sowie des Zellsystems für die Testung auf Genotoxizität. Für die Beurteilung, ob bestimmte Mechanismen für bestimmte Effekte in der Zell-Zyklusverteilung verantwortlich sind und Rückschlüsse auf den Mechanismus getroffen werden können, müsste eine Synchronisierung der Zellen und eine Behandlung in allen Zell-Zyklus-Phasen vorgenommen werden. Für die nicht-genotoxischen Substanzen treten nur geringfügige Änderungen nach Behandlung auf. Dadurch wird deutlich, dass Zell-Zyklus-Veränderungen, wie auch die Apoptoserate, nur eingeschränkt geeignete Endpunkte sind um Informationen bezüglich des genotoxischen Wirkmechanismus zu erhalten. Dennoch sind beide Endpunkte für die Charakterisierung der Substanzen, und um erste mechanistische Unterschiede zu erkennen, von Relevanz. In diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung des P53 Modifikationsmusters in den einzelnen Zellzyklusphasen nach Behandlung innerhalb der jeweiligen Zell-Zyklus-Phase interessant. Auch die Betrachtung des Genexpressionsprofils abhängig von der Zell-Zyklus-Phase in welcher die Behandlung stattfindet, könnte hilfreich sein um Wirkmechanismus-assoziierte Muster zu identifizieren. Diese Untersuchungen wären allerdings extrem aufwändig.

#### 4.7 Abschließende Bemerkungen und Klassifizierungsmodell

Für die Klassifizierung eignen sich anhand der durchgeführten Untersuchungen die HepG2 Zellen am besten. Diese unterliegen nicht den Limitierungen der TK6 Zellen aufgrund einer höheren metabolischen Kompetenz und zeigen mit den Klassifizierungsgenen nach Li et al. (2015) die besten Ergebnisse. Die von Li et al. (2015) vorgeschlagene Dosis-Optimierung ist für die verwendeten Substanzen nicht zwingend notwendig. Der gewählte Zeitpunkt und die auf Basis der Zytotoxizitätstestung gewählten Konzentrationen sind ebenfalls zielführend. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass die drei verwendeten Zellsysteme unterschiedliche Sensitivitäten für die gleiche Substanz aufweisen. Hier wurde der größte Unterschied zwischen HepG2 und TK6 Zellen mit einem Faktor von 100 gefunden. Dies bedeutet für die Risikobewertung von unbekanntem Substanzen, dass das Zielorgan eine entscheidende Rolle spielen kann. Ausschlaggebend ist hier ob ein Schwellenwert abgeleitet werden soll. Dies spielt bei direkt genotoxischen Substanzen bislang nur eine untergeordnete Rolle. Im Falle der indirekt wirkenden Genotoxine und nicht-genotoxischen Kanzerogenen werden jedoch Schwellenwerte immer wieder diskutiert und sind für einige Substanzen anerkannt. Auf Basis der erzielten Ergebnisse spielt das Zellsystem wahrscheinlich eine wichtige Rolle für die Bestimmung eines Schwellenwertes. Dies legt nahe, dass das Zielorgan *in vivo* ein entscheidender Faktor sein kann. Vor diesem Hintergrund sollten Schwellenwerte unter Berücksichtigung des Zielorgans abgeleitet werden.

Die erhobenen Klassifizierungs-Daten zeigen, dass die alleinige Verwendung von Klassifizierungsgenen zur Erkennung von Wirkmechanismen unbekannter Substanzen nicht ausreicht. Grundlegende Bedingung für die Verwendung von Klassifizierungsgenen innerhalb des Prozesses der Risikobewertung ist eine Harmonisierung der Behandlungsbedingungen und der verwendeten Zellsysteme. Zusätzlich zu den Klassifizierungsgenen ist die *GSEA* ein potentiell Werkzeug zur Erkennung von nicht-genotoxischen Kanzerogenen. Weitere Informationen zu den unterschiedlichen Wirkmechanismen sind, auf Basis der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen, durch Genexpressionsprofile zu nicht erzielen. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit einer Kombination von *in vitro* Tests zur Aufklärung des Wirkmechanismus von unbekanntem Substanzen. Die in diesem Zusammenhang überprüften Biomarker XPC und TP53INP1 haben sich im Zuge der Untersuchungen als ungeeignet herausgestellt. Die Phosphorylierung des P53 an Ser 15 hingegen ist, für die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen, ein eindeutiges Indiz für die Genotoxizität und könnte als Biomarker innerhalb eines *weight of evidence approaches* fungieren. In Abbildung 47 ist ein Entscheidungsbaum zur Risikobewertung von unbekanntem Substanzen auf Basis der in dieser Arbeit erhobenen, für den Wirkmechanismus relevanten, Daten abgebildet. Für die Anwendung dieses Modells wäre eine Validierung notwendig.

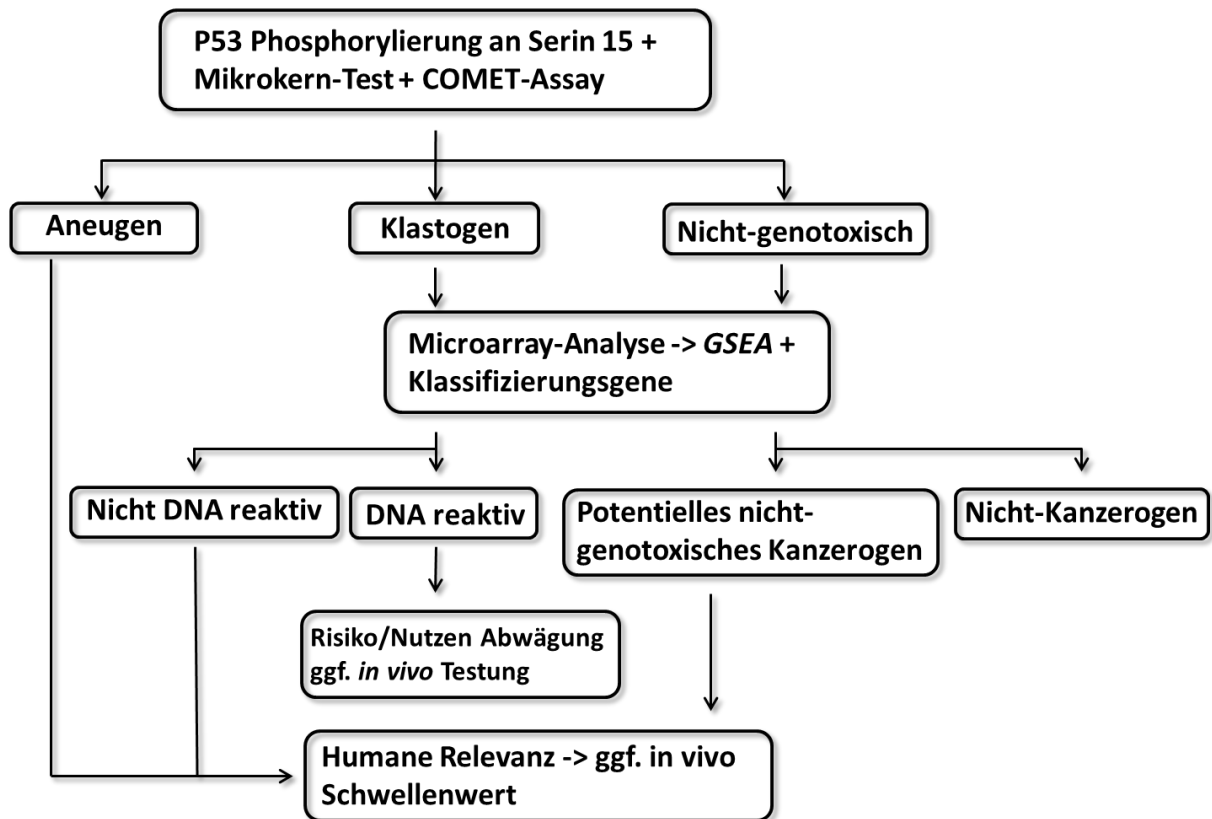


Abb. 47: Klassifizierungsmodell für die Einstufung unbekannter Substanzen



### 5 Zusammenfassung

Krebs ist eine der häufigsten krankheitsbedingten Todesursachen weltweit. Das karzinogene Potential ist deshalb bei der Risikobeurteilung von Arzneimitteln von besonderer Bedeutung. Einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Krebsentstehung ist die Mutagenese. Das mutagene Potential von Arzneimitteln kann jedoch aus ethischen Gründen nicht in klinischen Studien am Menschen untersucht werden. Neue Arzneimittelwirkstoffe müssen bereits vor der ersten Verabreichung ausreichend getestet sein. Dies kann nur mit präklinischen Tests *in vitro* und *in vivo* erfolgen. *In vitro* Tests in Säugerzellen spielen hier eine wichtige Rolle.

Da es fatal wäre eine Substanz mit einem für den Menschen relevanten mutagenen Potential zu übersehen, sind diese Testsysteme hochsensitiv aber dadurch auch relativ unspezifisch. Es kommt aus diesem Grund zu einer hohen Rate an irrelevant positiven Testbefunden. Positive Ergebnisse dieser Tests führen häufig zu langwierigen und teuren *in vivo* Folgestudien oder dem Ausschluss des potentiellen Wirkstoffkandidaten aus der weiteren Entwicklung. Dies aber gilt es im Falle von irrelevanten Effekten zu vermeiden. Um ein anwendungsrelevantes mutagenes Potential hinreichend sicher auszuschließen sind zuverlässige Daten zum Wirkmechanismus notwendig. Dazu sind Untersuchungen zu Wirkmechanismen von genotoxischen und nicht-genotoxischen Kanzerogenen unerlässlich. Die Identifikation von biologischen Signaturen, die es ermöglichen den Wirkmechanismus neuer Substanzen vorherzusagen, spielen in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle. Dies ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Ziel war es, Strategien zu entwickeln, welche die Prädiktion von Wirkmechanismen ermöglichen, somit die Risikobewertung verbessern und zur Reduktion von tierexperimentellen Studien beitragen. Um dieses Ziel zu erreichen wurden Untersuchungen zur Identifizierung klassenspezifischer Effekte von Substanzen aus verschiedenen genotoxischen Wirkklassen und nicht-genotoxische Kanzerogene auf die P53-Phosphorylierung/Acetylierung, die Expression P53- und Apoptose-Signalweg assoziierten Genen, Zellzyklusveränderungen und Apoptose in HepG2 (Leber), TK6 (Blut) und SH-SY5Y (zentrales Nervensystem) Zellen durchgeführt. Die Analyse der Ergebnisse erfolgte mit dem Fokus auf die Erkennung substanzgruppenspezifischer Unterschiede und potentieller Biomarker für die einzelnen Wirkmechanismen.

Für die Untersuchungen wurden 10 verschiedene genotoxische, nicht-genotoxische und nicht-kanzerogene Substanzen verwendet. Die Testung wurde mit der LD<sub>20</sub> sowie der Konzentration am NOAEL durchgeführt. Die Messung erfolgte nach Behandlung für 4 h und 24 h. Die Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Tests haben gezeigt, dass die Zellsysteme unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber der gleichen Substanz aufweisen. Hier wurde der größte Unterschied zwischen HepG2 und TK6 Zellen

mit einem Faktor von 100 gefunden. Dies bedeutet für die Risikobewertung von unbekanntem Substanzen, dass das Zielorgan eine entscheidende Rolle spielen kann. Ausschlaggebend ist hier ob ein Schwellenwert abgeleitet werden soll. Dies spielt bei direkt genotoxischen Substanzen bislang nur eine untergeordnete Rolle aber im Falle der indirekt wirkenden Genotoxine und nicht-genotoxischen Kanzerogenen kann das Zielorgan somit ein entscheidender Faktor sein. Vor diesem Hintergrund sollten die, auch für direkte Genotoxine, immer wieder diskutierten und für einige Substanzen anerkannten Schwellenwerte unter Berücksichtigung des Zielorgans abgeleitet werden.

Die Klassifizierungen anhand von kürzlich publizierten Klassifizierungsgenen [106] und 61 aus den eigenen genomweiten Genexpressionsanalysen entwickelten Klassifizierungsgenen, ermöglichten die Diskriminierung zwischen genotoxischen und nicht-genotoxischen Substanzen in den Zellsystemen TK6 und HepG2. Die besten Resultate wurde hierbei mit den Klassifizierungsgenen aus der Literatur nach Behandlung für 24 h mit der LD<sub>20</sub> in den HepG2 Zellen erzielt. Neben der Diskriminierung von genotoxischen und nicht-genotoxischen Substanzen zeigte sich hier auch eine Möglichkeit, direkt und indirekt wirkende Genotoxine zu unterscheiden. Die eigenen Diskriminatoren hingegen zeigen in den HepG2 Zellen nach Behandlung für 24 h mit der Konzentration am NOAEL das beste Resultat. Hier ist zusätzlich zur Diskriminierung zwischen genotoxischen und nicht-genotoxischen Substanzen eine Unterscheidung von nicht-genotoxischen und nicht-kanzerogenen Substanzen möglich. Eine weiterführende Analyse der Genexpressions-Daten mittels *gene set enrichment analysis (GSEA)* war nicht zielführend im Hinblick auf die Identifizierung von Signaturen für genotoxische Wirkmechanismen.

Zusätzlich zu den Klassifizierungsmöglichkeiten anhand der Genexpressions-profile wurde nach potentiellen Biomarkern gesucht. Die Modifikationen des P53 an Ser 15, 33, 46, 392 sowie Thr 18 und 55 und Lys 382 lieferten hierbei keine Wirkmechanismus spezifischen Signaturen. Lediglich die Phosphorylierung des P53 an Serin 15 stellt einen potentiellen Biomarker für Genotoxizität dar, der aber nicht zwischen direkter und indirekter Genotoxizität unterscheidet. Neben diesem konnten, für das verwendete Substanzset, XPC und TP53INP1, zwei Proteine der DNA-Schadensantwort, als potentielle Biomarker für Genotoxizität identifiziert werden. TP53INP1 wies hier auf Protein-Ebene eine Sensitivität von 71 % und eine Spezifität von 100 % auf. Die biologische Validierung von XPC auf Protein-Ebene stellte sich aufgrund einer hohen falsch negativ Rate sowie falsch positiven Ergebnissen als ungeeignet für die Verwendung als Biomarker für Genotoxizität heraus. Biomarker für einzelne Wirkmechanismen konnten nicht identifiziert werden. Die P53 Modifikationen, Zellzyklusveränderungen und die Apoptose, gestützt durch die Proteindaten, liefern lediglich uneindeutige Hinweise bezüglich des Wirkmechanismus.

Auf Basis der in dieser Arbeit erhobenen, für den Wirkmechanismus relevanten, Daten wurde ein Klassifizierungsmodell entwickelt. Dieses würde bei der für einen *weight of evidence approach* wichtigen Klassifizierung der Substanzen helfen. Für die Anwendung dieses Modells wäre jedoch zunächst eine Validierung notwendig, welche nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit war.

---

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] **Adimoolam, S. und J.M. Ford.** p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(20): p. 12985-12990.
- [2] **Agilent.** Instruction Manual Agilent One-Colour Microarray based Gene Expression Analysis. 2008; Available from: [http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/public/g4140-90041\\_one-color\\_tecan.pdf](http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/public/g4140-90041_one-color_tecan.pdf).
- [3] **Ahnesorg, P., P. Smith, und S.P. Jackson.** XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, 2006. 124(2): p. 301-313.
- [4] **Ajikumar, P.K., W.H. Xiao, K.E. Tyo, Y. Wang, F. Simeon, E. Leonard, O. Mucha, T.H. Phon, B. Pfeifer, und G. Stephanopoulos.** Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 2010. 330(6000): p. 70-74.
- [5] **Akerman, G.S., B.A. Rosenzweig, O.E. Domon, L.J. McGarrity, L.R. Blankenship, C.A. Tsai, S.J. Culp, J.T. MacGregor, F.D. Sistare, J.J. Chen, und S.M. Morris.** Gene expression profiles and genetic damage in benzo(a)pyrene diol epoxide-exposed TK6 cells. *Mutat Res*, 2004. 549(1-2): p. 43-64.
- [6] **Anderson, C.W. und E. Appella.** Signaling to the p53 Tumor Suppressor through Pathways activated by Genotoxic and Non-Genotoxic Stresses in *Regulation of Organelle and cell compartment signaling*, R.A. Bradshaw und E.A. Dennis, Editors. 2011. p. 235-253.
- [7] **Appella, E. und C.W. Anderson.** Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem*, 2001. 268(10): p. 2764-2772.
- [8] **ATCC.** Instruction manual XTT Assay Kit. 2011; Available from: <http://www.atcc.org/~media/56374CEEC36C47159D2040410828B969.ashx>.
- [9] **Attia, S.M., U. Kliesch, G. Schriever-Schwemmer, O.A. Badary, F.M. Hamada, und I.D. Adler.** Etoposide and merbarone are clastogenic and aneugenic in the mouse bone marrow micronucleus test complemented by fluorescence in situ hybridization with the mouse minor satellite DNA probe. *Environ Mol Mutagen*, 2003. 41(2): p. 99-103.
- [10] **Benhamou, S. und A. Sarasin.** Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. *Mutat Res*, 2000. 462(2-3): p. 149-158.
- [11] **Berger, F., F.H. Gage, und S. Vijayaraghavan.** Nicotinic receptor-induced apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. *J Neurosci*, 1998. 18(17): p. 6871-6881.
- [12] **Berridge, M.V., P.M. Herst, und A.S. Tan.** Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*, 2005. 11: p. 127-152.
- [13] **Boehme, K., Y. Dietz, P. Hewitt, und S.O. Mueller.** Genomic profiling uncovers a molecular pattern for toxicological characterization of mutagens and promutagens in vitro. *Toxicol Sci*, 2011. 122(1): p. 185-197.

- 
- [14] **Bolzan, A.D. und M.S. Bianchi.** Genotoxicity of streptonigrin: a review. *Mutat Res*, 2001. 488(1): p. 25-37.
- [15] **Braeuning, A.** Liver cell proliferation and tumor promotion by phenobarbital: relevance for humans? *Arch Toxicol*, 2014. 88(10): p. 1771-1772.
- [16] **Braithwaite, A.W., G. Del Sal, und X. Lu.** Some p53-binding proteins that can function as arbiters of life and death. *Cell Death Differ*, 2006. 13(6): p. 984-993.
- [17] **Brambilla, G. und A. Martelli.** Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals. *Mutat Res*, 2009. 681(2-3): p. 209-229.
- [18] **Bryan, N.B., A. Dorfleutner, Y. Rojanasakul, und C. Stehlik.** Activation of inflammasomes requires intracellular redistribution of the apoptotic speck-like protein containing a caspase recruitment domain. *J Immunol*, 2009. 182(5): p. 3173-3182.
- [19] **Buck, D., L. Malivert, R. de Chasseval, A. Barraud, M.C. Fondaneche, O. Sanal, A. Plebani, J.L. Stephan, M. Hufnagel, F. le Deist, A. Fischer, A. Durandy, J.P. de Villartay, und P. Revy.** Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell*, 2006. 124(2): p. 287-299.
- [20] **Buick, J.K., I. Moffat, A. Williams, C.D. Swartz, L. Recio, D.R. Hyduke, H.H. Li, A.J. Fornace, Jr., J. Aubrecht, und C.L. Yauk.** Integration of metabolic activation with a predictive toxicogenomics signature to classify genotoxic versus nongenotoxic chemicals in human TK6 cells. *Environ Mol Mutagen*, 2015.
- [21] **Bulavin, D.V., S. Saito, M.C. Hollander, K. Sakaguchi, C.W. Anderson, E. Appella, und A.J. Fornace, Jr.** Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J*, 1999. 18(23): p. 6845-6854.
- [22] **Burdon, R.H.** Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med*, 1995. 18(4): p. 775-794.
- [23] **Cai, X. und X. Liu.** Inhibition of Thr-55 phosphorylation restores p53 nuclear localization and sensitizes cancer cells to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(44): p. 16958-16963.
- [24] **Caldecott, K., G. Banks, und P. Jeggo.** DNA double-strand break repair pathways and cellular tolerance to inhibitors of topoisomerase II. *Cancer Res*, 1990. 50(18): p. 5778-5783.
- [25] **Candau, R., D.M. Scolnick, P. Darpino, C.Y. Ying, T.D. Halazonetis, und S.L. Berger.** Two tandem and independent sub-activation domains in the amino terminus of p53 require the adaptor complex for activity. *Oncogene*, 1997. 15(7): p. 807-816.
- [26] **Capranico, G., M. Palumbo, S. Tinelli, und F. Zunino.** Unique sequence specificity of topoisomerase II DNA cleavage stimulation and DNA binding mode of streptonigrin. *J Biol Chem*, 1994. 269(40): p. 25004-25009.

- [27] **Carter, M.M., S.M. Torres, D.L. Cook, Jr., C.L. McCash, M. Yu, V.E. Walker, und D.M. Walker.** Relative mutagenic potencies of several nucleoside analogs, alone or in drug pairs, at the HPRT and TK loci of human TK6 lymphoblastoid cells. *Environ Mol Mutagen*, 2007. 48(3-4): p. 239-247.
- [28] **Castagna, M., Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa, und Y. Nishizuka.** Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem*, 1982. 257(13): p. 7847-7851.
- [29] **Cerutti, P.A.** Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, 1985. 227(4685): p. 375-381.
- [30] **Chang, N.S., J. Doherty, A. Ensign, L. Schultz, L.J. Hsu, und Q. Hong.** WOX1 is essential for tumor necrosis factor-, UV light-, staurosporine-, and p53-mediated cell death, and its tyrosine 33-phosphorylated form binds and stabilizes serine 46-phosphorylated p53. *J Biol Chem*, 2005. 280(52): p. 43100-43108.
- [31] **Conway, K.E., B.B. McConnell, C.E. Bowring, C.D. Donald, S.T. Warren, und P.M. Vertino.** TMS1, a novel proapoptotic caspase recruitment domain protein, is a target of methylation-induced gene silencing in human breast cancers. *Cancer Res*, 2000. 60(22): p. 6236-6242.
- [32] **Cotto-Rios, X.M., M.J. Jones, L. Busino, M. Pagano, und T.T. Huang.** APC/CCdh1-dependent proteolysis of USP1 regulates the response to UV-mediated DNA damage. *J Cell Biol*, 2011. 194(2): p. 177-186.
- [33] **Coutinho, I., G. Pereira, M. Leao, J. Goncalves, M. Corte-Real, und L. Saraiva.** Differential regulation of p53 function by protein kinase C isoforms revealed by a yeast cell system. *FEBS Lett*, 2009. 583(22): p. 3582-3588.
- [34] **Cui, H., A. Schroering, und H.F. Ding.** p53 mediates DNA damaging drug-induced apoptosis through a caspase-9-dependent pathway in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Mol Cancer Ther*, 2002. 1(9): p. 679-686.
- [35] **D'Orazi, G., B. Cecchinelli, T. Bruno, I. Manni, Y. Higashimoto, S. Saito, M. Gostissa, S. Coen, A. Marchetti, G. Del Sal, G. Piaggio, M. Fanciulli, E. Appella, und S. Soddu.** Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol*, 2002. 4(1): p. 11-19.
- [36] **Das, K.C. und R. Dashnamoorthy.** Hyperoxia activates the ATR-Chk1 pathway and phosphorylates p53 at multiple sites. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. 286(1): p. L87-97.
- [37] **de Boer, J. und J.H. Hoeijmakers.** Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, 2000. 21(3): p. 453-460.
- [38] **DeGraff, W., S.M. Hahn, J.B. Mitchell, und M.C. Krishna.** Free radical modes of cytotoxicity of adriamycin and streptonigrin. *Biochem Pharmacol*, 1994. 48(7): p. 1427-1435.

- [39] **Demple, B. und L. Harrison.** Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem*, 1994. 63: p. 915-948.
- [40] **Despras, E., P. Pfeiffer, B. Salles, P. Calsou, S. Kuhfittig-Kulle, J.F. Angulo, und D.S. Biard.** Long-term XPC silencing reduces DNA double-strand break repair. *Cancer Res*, 2007. 67(6): p. 2526-2534.
- [41] **Di Leonardo, A., S.P. Linke, K. Clarkin, und G.M. Wahl.** DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev*, 1994. 8(21): p. 2540-2551.
- [42] **Dietrich, D.R. und J.A. Swenberg.** Preneoplastic lesions in rodent kidney induced spontaneously or by non-genotoxic agents: predictive nature and comparison to lesions induced by genotoxic carcinogens. *Mutat Res*, 1991. 248(2): p. 239-260.
- [43] **Ding, H., W. Duan, W.G. Zhu, R. Ju, K. Srinivasan, G.A. Otterson, und M.A. Villalona-Calero.** P21 response to DNA damage induced by genistein and etoposide in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 305(4): p. 950-956.
- [44] **Dizdaroglu, M.** Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res*, 1992. 275(3-6): p. 331-342.
- [45] **Doktorova, T.Y., H. Ellinger-Ziegelbauer, M. Vinken, T. Vanhaecke, J. van Delft, J. Kleinjans, H.J. Ahr, und V. Rogiers.** Comparison of hepatocarcinogen-induced gene expression profiles in conventional primary rat hepatocytes with in vivo rat liver. *Arch Toxicol*, 2012. 86(9): p. 1399-1411.
- [46] **el-Deiry, W.S., J.W. Harper, P.M. O'Connor, V.E. Velculescu, C.E. Canman, J. Jackman, J.A. Pietsenpol, M. Burrell, D.E. Hill, Y. Wang, und et al.** WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*, 1994. 54(5): p. 1169-1174.
- [47] **Ellinger-Ziegelbauer, H., J.M. Fostel, C. Aruga, D. Bauer, E. Boitier, S. Deng, D. Dickinson, A.C. Le Fevre, A.J. Fornace, Jr., O. Grenet, Y. Gu, J.C. Hoflack, M. Shiiyama, R. Smith, R.D. Snyder, C. Spire, G. Tanaka, und J. Aubrecht.** Characterization and interlaboratory comparison of a gene expression signature for differentiating genotoxic mechanisms. *Toxicol Sci*, 2009. 110(2): p. 341-352.
- [48] **Essers, J., A.F. Theil, C. Baldeyron, W.A. van Cappellen, A.B. Houtsmuller, R. Kanaar, und W. Vermeulen.** Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(21): p. 9350-9359.
- [49] **Farombi, E.O.** Genotoxicity of chloroquine in rat liver cells: protective role of free radical scavengers. *Cell Biol Toxicol*, 2006. 22(3): p. 159-167.
- [50] **Ferbeyre, G., E. de Stanchina, A.W. Lin, E. Querido, M.E. McCurrach, G.J. Hannon, und S.W. Lowe.** Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(10): p. 3497-3508.

- 
- [51] **Filler, R.B., S.J. Roberts, und M. Girardi.** Cutaneous two-stage chemical carcinogenesis. *CSH Protoc*, 2007. 2007: p. pdb prot4837.
- [52] **Fritsche, M., C. Haessler, und G. Brandner.** Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene*, 1993. 8(2): p. 307-318.
- [53] **Fukui, K.** DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. *J Nucleic Acids*, 2010. 2010.
- [54] **Gao, J., L.A. Mitchell, F.T. Lauer, und S.W. Burchiel.** p53 and ATM/ATR regulate 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced immunosuppression. *Mol Pharmacol*, 2008. 73(1): p. 137-146.
- [55] **Gartel, A.L. und A.L. Tyner.** The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther*, 2002. 1(8): p. 639-649.
- [56] **Glover, K.P., L.K. Markell, E.M. Donner, und X. Han.** Protein kinase C-activating tumor promoters modulate the DNA damage response in UVC-irradiated TK6 cells. *Toxicol Lett*, 2014. 229(1): p. 210-219.
- [57] **Godderis, L., R. Thomas, A.E. Hubbard, A.M. Tabish, P. Hoet, L. Zhang, M.T. Smith, H. Veulemans, und C.M. McHale.** Effect of chemical mutagens and carcinogens on gene expression profiles in human TK6 cells. *PLoS One*, 2012. 7(6): p. e39205.
- [58] **Goel, G., H.P. Makkar, G. Francis, und K. Becker.** Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *Int J Toxicol*, 2007. 26(4): p. 279-288.
- [59] **Gonzales, A.J., J.G. Christensen, R.J. Preston, T.L. Goldsworthy, T.D. Tlsty, und T.R. Fox.** Attenuation of G1 checkpoint function by the non-genotoxic carcinogen phenobarbital. *Carcinogenesis*, 1998. 19(7): p. 1173-1183.
- [60] **Gottfredi, V., S. Shieh, Y. Taya, und C. Prives.** p53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(3): p. 1036-1041.
- [61] **Gould, S., J. Sidaway, N. Sansom, G. Betton, und T. Orton.** Phenobarbitone-induced liver response in wild type and in p53 deficient mice. *Toxicol Lett*, 2001. 122(2): p. 131-140.
- [62] **Guerard, M., M. Baum, A. Bitsch, G. Eisenbrand, A. Elhajouji, B. Epe, M. Habermeyer, B. Kaina, H.J. Martus, S. Pfuhler, C. Schmitz, A. Sutter, A.D. Thomas, C. Ziemann, und R. Froetschl.** Assessment of mechanisms driving non-linear dose-response relationships in genotoxicity testing. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2015. 763: p. 181-201.
- [63] **Gunz, D., M.T. Hess, und H. Naegeli.** Recognition of DNA adducts by human nucleotide excision repair. Evidence for a thermodynamic probing mechanism. *J Biol Chem*, 1996. 271(41): p. 25089-25098.
- [64] **Hao, M., A.M. Lowy, M. Kapoor, A. Deffie, G. Liu, und G. Lozano.** Mutation of phosphoserine 389 affects p53 function in vivo. *J Biol Chem*, 1996. 271(46): p. 29380-29385.



- [65] **Hart, G.J., D.C. Orr, C.R. Penn, H.T. Figueiredo, N.M. Gray, R.E. Boehme, und J.M. Cameron.** Effects of (-)-2'-deoxy-3'-thiacytidine (3TC) 5'-triphosphate on human immunodeficiency virus reverse transcriptase and mammalian DNA polymerases alpha, beta, and gamma. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992. 36(8): p. 1688-1694.
- [66] **Hasmall, S.C. und R.A. Roberts.** The perturbation of apoptosis and mitosis by drugs and xenobiotics. *Pharmacol Ther*, 1999. 82(1): p. 63-70.
- [67] **Hastwell, P.W., T.W. Webster, M. Tate, N. Billinton, A.M. Lynch, J.S. Harvey, R.W. Rees, und R.M. Walmsley.** Analysis of 75 marketed pharmaceuticals using the GADD45a-GFP 'GreenScreen HC' genotoxicity assay. *Mutagenesis*, 2009. 24(5): p. 455-463.
- [68] **Hengartner, M.O.** The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000. 407(6805): p. 770-776.
- [69] **Hickok, J.R., D. Vasudevan, K. Jablonski, und D.D. Thomas.** Oxygen dependence of nitric oxide-mediated signaling. *Redox Biol*, 2013. 1: p. 203-209.
- [70] **Hoegel, C., B. Pfander, G.L. Moldovan, G. Pyrowolakis, und S. Jentsch.** RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, 2002. 419(6903): p. 135-141.
- [71] **Hofmann, T.G., A. Moller, H. Sirma, H. Zentgraf, Y. Taya, W. Droge, H. Will, und M.L. Schmitz.** Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol*, 2002. 4(1): p. 1-10.
- [72] **Hollstein, M., G. Moeckel, M. Hergenhahn, B. Spiegelhalder, M. Keil, G. Werle-Schneider, H. Bartsch, und J. Brickmann.** On the origins of tumor mutations in cancer genes: insights from the p53 gene. *Mutat Res*, 1998. 405(2): p. 145-154.
- [73] **Huang, W., J. Zhang, M. Washington, J. Liu, J.M. Parant, G. Lozano, und D.D. Moore.** Xenobiotic stress induces hepatomegaly and liver tumors via the nuclear receptor constitutive androstane receptor. *Mol Endocrinol*, 2005. 19(6): p. 1646-1653.
- [74] **Ikura, T., V.V. Ogryzko, M. Grigoriev, R. Groisman, J. Wang, M. Horikoshi, R. Scully, J. Qin, und Y. Nakatani.** Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell*, 2000. 102(4): p. 463-473.
- [75] **Ito, A., C.H. Lai, X. Zhao, S. Saito, M.H. Hamilton, E. Appella, und T.P. Yao.** p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J*, 2001. 20(6): p. 1331-1340.
- [76] **Iyer, N.G., S.F. Chin, H. Ozdag, Y. Daigo, D.E. Hu, M. Cariati, K. Brindle, S. Aparicio, und C. Caldas.** p300 regulates p53-dependent apoptosis after DNA damage in colorectal cancer cells by modulation of PUMA/p21 levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(19): p. 7386-7391.
- [77] **Jabbur, J.R., P. Huang, und W. Zhang.** DNA damage-induced phosphorylation of p53 at serine 20 correlates with p21 and Mdm-2 induction in vivo. *Oncogene*, 2000. 19(54): p. 6203-6208.

- [78] **Jennen, D.G., C. Magkoufopoulou, H.B. Ketelslegers, M.H. van Herwijnen, J.C. Kleinjans, und J.H. van Delft.** Comparison of HepG2 and HepaRG by whole-genome gene expression analysis for the purpose of chemical hazard identification. *Toxicol Sci*, 2010. 115(1): p. 66-79.
- [79] **Jetten, M.J., J.C. Kleinjans, S.M. Claessen, C. Chesne, und J.H. van Delft.** Baseline and genotoxic compound induced gene expression profiles in HepG2 and HepaRG compared to primary human hepatocytes. *Toxicol In Vitro*, 2013. 27(7): p. 2031-2040.
- [80] **Jiang, P.H., Y. Motoo, N. Sawabu, und T. Minamoto.** Effect of gemcitabine on the expression of apoptosis-related genes in human pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol*, 2006. 12(10): p. 1597-1602.
- [81] **Jin, L.J., F. Schlesinger, Y.P. Song, R. Dengler, und K. Krampfl.** The interaction of the neuroprotective compounds riluzole and phenobarbital with AMPA-type glutamate receptors: a patch-clamp study. *Pharmacology*, 2010. 85(1): p. 54-62.
- [82] **Kamendulis, L.M. und J.E. Klaunig.** Species differences in the induction of hepatocellular DNA synthesis by diethanolamine. *Toxicol Sci*, 2005. 87(2): p. 328-336.
- [83] **Kastan, M.B., Q. Zhan, W.S. el-Deiry, F. Carrier, T. Jacks, W.V. Walsh, B.S. Plunkett, B. Vogelstein, und A.J. Fornace, Jr.** A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, 1992. 71(4): p. 587-597.
- [84] **Kenny, P.J. und A. Markou.** Nicotine self-administration acutely activates brain reward systems and induces a long-lasting increase in reward sensitivity. *Neuropsychopharmacology*, 2006. 31(6): p. 1203-1211.
- [85] **Kim, E.L., R. Wustenberg, A. Rubsam, C. Schmitz-Salue, G. Warnecke, E.M. Bucker, N. Pettkus, D. Speidel, V. Rohde, W. Schulz-Schaeffer, W. Deppert, und A. Giese.** Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells. *Neuro Oncol*, 2010. 12(4): p. 389-400.
- [86] **Kirkland, D., M. Aardema, L. Henderson, und L. Muller.** Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutat Res*, 2005. 584(1-2): p. 1-256.
- [87] **Klaunig, J.E. und L.M. Kamendulis.** Chemical Carcinogenesis, in *Toxicology: The Basic Science of Poisons*, L. Casarett und C.D. Klaassen, Editors. 2008. p. 329-379.
- [88] **Klaunig, J.E.X., Y. Bachowski, S. Jiang J.** Free-radical oxygen-induced changes in carcinogenesis, in *Free Radical Toxicology*, K.B. Wallace, Editor. 1997, Taylor & Francis: London. p. 375-400.
- [89] **Kleihues, P. und G.P. Margison.** Carcinogenicity of N-methyl-N-nitrosourea: possible role of excision repair of O6-methylguanine from DNA. *J Natl Cancer Inst*, 1974. 53(6): p. 1839-1841.

- [90] **Kodama, S., C. Koike, M. Negishi, und Y. Yamamoto.** Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(18): p. 7931-7940.
- [91] **Kondo, S., B.P. Barna, Y. Kondo, Y. Tanaka, G. Casey, J. Liu, T. Morimura, R. Kaakaji, J.W. Peterson, B. Werbel, und G.H. Barnett.** WAF1/CIP1 increases the susceptibility of p53 non-functional malignant glioma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene*, 1996. 13(6): p. 1279-1285.
- [92] **Koumenis, C., R. Alarcon, E. Hammond, P. Sutphin, W. Hoffman, M. Murphy, J. Derr, Y. Taya, S.W. Lowe, M. Kastan, und A. Giaccia.** Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(4): p. 1297-1310.
- [93] **Kristiansen, E., S. Clemmensen, und P. Olsen.** Carcinogenic potential of cooked food mutagens (IQ and MeIQ) in Wistar rats after short-term exposure. *Pharmacol Toxicol*, 1989. 65(5): p. 332-335.
- [94] **Krokan, H.E. und M. Bjoras.** Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013. 5(4): p. a012583.
- [95] **Krzeszinski, J.Y., V. Choe, J. Shao, X. Bao, H. Cheng, S. Luo, K. Huo, und H. Rao.** XPC promotes MDM2-mediated degradation of the p53 tumor suppressor. *Mol Biol Cell*, 2014. 25(2): p. 213-221.
- [96] **La Vecchia, C. und E. Negri.** A review of epidemiological data on epilepsy, phenobarbital, and risk of liver cancer. *Eur J Cancer Prev*, 2014. 23(1): p. 1-7.
- [97] **Laemmli, U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. 227(5259): p. 680-685.
- [98] **Lakhter, A.J., R.P. Sahu, Y. Sun, W.K. Kaufmann, E.J. Androphy, J.B. Travers, und S.R. Naidu.** Chloroquine promotes apoptosis in melanoma cells by inhibiting BH3 domain-mediated PUMA degradation. *J Invest Dermatol*, 2013. 133(9): p. 2247-2254.
- [99] **Lane, D.P.** Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 1992. 358(6381): p. 15-16.
- [100] **Lawley, P.D. und C.J. Thatcher.** Methylation of deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. The influence of cellular thiol concentrations on the extent of methylation and the 6-oxygen atom of guanine as a site of methylation. *Biochem J*, 1970. 116(4): p. 693-707.
- [101] **Le Fevre, A.C., E. Boitier, J.P. Marchandeu, A. Sarasin, und V. Thybaud.** Characterization of DNA reactive and non-DNA reactive anticancer drugs by gene expression profiling. *Mutat Res*, 2007. 619(1-2): p. 16-29.

- [102] **Lee, H.B., M.R. Yu, J.S. Song, und H. Ha.** Reactive oxygen species amplify protein kinase C signaling in high glucose-induced fibronectin expression by human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int*, 2004. 65(4): p. 1170-1179.
- [103] **Lee, H.J., D. Srinivasan, D. Coomber, D.P. Lane, und C.S. Verma.** Modulation of the p53-MDM2 interaction by phosphorylation of Thr18: a computational study. *Cell Cycle*, 2007. 6(21): p. 2604-2611.
- [104] **Lee, J.H., H.S. Kim, S.J. Lee, und K.T. Kim.** Stabilization and activation of p53 induced by Cdk5 contributes to neuronal cell death. *J Cell Sci*, 2007. 120(Pt 13): p. 2259-2271.
- [105] **Li, H.H., J. Aubrecht, und A.J. Fornace, Jr.** Toxicogenomics: overview and potential applications for the study of non-covalent DNA interacting chemicals. *Mutat Res*, 2007. 623(1-2): p. 98-108.
- [106] **Li, H.H., D.R. Hyduke, R. Chen, P. Heard, C.L. Yauk, J. Aubrecht, und A.J. Fornace, Jr.** Development of a toxicogenomics signature for genotoxicity using a dose-optimization and informatics strategy in human cells. *Environ Mol Mutagen*, 2015.
- [107] **Li, J., B. Lee, und A.S. Lee.** Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem*, 2006. 281(11): p. 7260-7270.
- [108] **Lieber, M.R.** The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem*, 2008. 283(1): p. 1-5.
- [109] **Lill, N.L., S.R. Grossman, D. Ginsberg, J. DeCaprio, und D.M. Livingston.** Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature*, 1997. 387(6635): p. 823-827.
- [110] **Lincet, H., L. Poulain, J.S. Remy, E. Deslandes, F. Duigou, P. Gauduchon, und C. Staedel.** The p21(cip1/waf1) cyclin-dependent kinase inhibitor enhances the cytotoxic effect of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett*, 2000. 161(1): p. 17-26.
- [111] **Litron-Laboratories.** Manual in vitro MicroFlow. 2013; Available from: [http://litronlabs.com/manuals/In\\_Vitro\\_Manual\\_Standard\\_v141030.pdf](http://litronlabs.com/manuals/In_Vitro_Manual_Standard_v141030.pdf).
- [112] **Liu, H., C.H. Herrmann, K. Chiang, T.L. Sung, S.H. Moon, L.A. Donehower, und A.P. Rice.** 55K isoform of CDK9 associates with Ku70 and is involved in DNA repair. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. 397(2): p. 245-250.
- [113] **Liu, L., D.M. Scolnick, R.C. Trievel, H.B. Zhang, R. Marmorstein, T.D. Halazonetis, und S.L. Berger.** p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(2): p. 1202-1209.
- [114] **Liu, W.C. und P. Zhu.** Pilot studies on scale-up biocatalysis of 7-beta-xylosyl-10-deacetyltaoxol and its analogues by an engineered yeast. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2015. 42(6): p. 867-876.

- [115] **Lloyd, D.R. und P.C. Hanawalt.** p53-dependent global genomic repair of benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide adducts in human cells. *Cancer Res*, 2000. 60(3): p. 517-521.
- [116] **Lourenco, E.D., V.S. do Amaral, M. Lehmann, R.R. Dihl, V.M. Schmitt, K.S. Cunha, M.L. Reguly, und H.H. de Andrade.** Micronuclei induced by reverse transcriptase inhibitors in mononucleated and binucleated cells as assessed by the cytokinesis-block micronucleus assay. *Genet Mol Biol*, 2010. 33(4): p. 756-760.
- [117] **Luo, J., M. Li, Y. Tang, M. Laszkowska, R.G. Roeder, und W. Gu.** Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(8): p. 2259-2264.
- [118] **Ma, Y., U. Pannicke, K. Schwarz, und M.R. Lieber.** Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*, 2002. 108(6): p. 781-794.
- [119] **MacGregor, J.T., R. Frotschl, P.A. White, K.S. Crump, D.A. Eastmond, S. Fukushima, M. Guerard, M. Hayashi, L.G. Soeteman-Hernandez, G.E. Johnson, T. Kasamatsu, D.D. Levy, T. Morita, L. Muller, R. Schoeny, M.J. Schuler, und V. Thybaud.** IWGT report on quantitative approaches to genotoxicity risk assessment II. Use of point-of-departure (PoD) metrics in defining acceptable exposure limits and assessing human risk. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2015. 783: p. 66-78.
- [120] **MacGregor, J.T., R. Frotschl, P.A. White, K.S. Crump, D.A. Eastmond, S. Fukushima, M. Guerard, M. Hayashi, L.G. Soeteman-Hernandez, T. Kasamatsu, D.D. Levy, T. Morita, L. Muller, R. Schoeny, M.J. Schuler, V. Thybaud, und G.E. Johnson.** IWGT report on quantitative approaches to genotoxicity risk assessment I. Methods and metrics for defining exposure-response relationships and points of departure (PoDs). *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2015. 783: p. 55-65.
- [121] **Magkoufopoulou, C., S.M. Claessen, D.G. Jennen, J.C. Kleinjans, und J.H. van Delft.** Comparison of phenotypic and transcriptomic effects of false-positive genotoxins, true genotoxins and non-genotoxins using HepG2 cells. *Mutagenesis*, 2011. 26(5): p. 593-604.
- [122] **Magkoufopoulou, C., S.M. Claessen, M. Tsamou, D.G. Jennen, J.C. Kleinjans, und J.H. van Delft.** A transcriptomics-based in vitro assay for predicting chemical genotoxicity in vivo. *Carcinogenesis*, 2012. 33(7): p. 1421-1429.
- [123] **Malenka RC, N.E., Hyman SE.** Chapter 9: Autonomic Nervous System, in *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience*, B.R. Sydor A, Editor. 2009.
- [124] **Marsman, D.S., T.L. Goldsworthy, und J.A. Popp.** Contrasting hepatocytic peroxisome proliferation, lipofuscin accumulation and cell turnover for the hepatocarcinogens Wy-14,643 and clofibrac acid. *Carcinogenesis*, 1992. 13(6): p. 1011-1017.
- [125] **Mayo, L.D., Y.R. Seo, M.W. Jackson, M.L. Smith, J. Rivera Guzman, C.K. Korgaonkar, und D.B. Donner.** Phosphorylation of human p53 at serine 46 determines promoter selection and whether apoptosis is attenuated or amplified. *J Biol Chem*, 2005. 280(28): p. 25953-25959.

- 
- [126] **McConnell, B.B. und P.M. Vertino.** Activation of a caspase-9-mediated apoptotic pathway by subcellular redistribution of the novel caspase recruitment domain protein TMS1. *Cancer Res*, 2000. 60(22): p. 6243-6247.
- [127] **McGregor, D.B., I. Edwards, C.R. Wolf, L.M. Forrester, und W.J. Caspary.** Endogenous xenobiotic enzyme levels in mammalian cells. *Mutat Res*, 1991. 261(1): p. 29-39.
- [128] **Meek, D.W. und C.W. Anderson.** Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009. 1(6): p. a000950.
- [129] **Melnick, R.L., M.C. Kohn, und C.J. Portier.** Implications for risk assessment of suggested nongenotoxic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, 1996. 104 Suppl 1: p. 123-134.
- [130] **Michieli, P., M. Chetid, D. Lin, J.H. Pierce, W.E. Mercer, und D. Givol.** Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res*, 1994. 54(13): p. 3391-3395.
- [131] **Mladenov, E., I. Tsaneva, und B. Anachkova.** Activation of the S phase DNA damage checkpoint by mitomycin C. *J Cell Physiol*, 2007. 211(2): p. 468-476.
- [132] **Moraes, R.M., E. Bedir, H. Barrett, C. Burandt, Jr., C. Canel, und I.A. Khan.** Evaluation of *Podophyllum peltatum* accessions for podophyllotoxin production. *Planta Med*, 2002. 68(4): p. 341-344.
- [133] **Morawska, M.E.** A role for CDK9 in UV damage response. *Cell Cycle*, 2012. 11(12): p. 2229-2230.
- [134] **Mori, T., Y. Anazawa, K. Matsui, S. Fukuda, Y. Nakamura, und H. Arakawa.** Cyclin K as a direct transcriptional target of the p53 tumor suppressor. *Neoplasia*, 2002. 4(3): p. 268-274.
- [135] **Mullan, P.B., J.E. Quinn, P.M. Gilmore, S. McWilliams, H. Andrews, C. Gervin, N. McCabe, S. McKenna, P. White, Y.H. Song, S. Maheswaran, E. Liu, D.A. Haber, P.G. Johnston, und D.P. Harkin.** BRCA1 and GADD45 mediated G2/M cell cycle arrest in response to antimicrotubule agents. *Oncogene*, 2001. 20(43): p. 6123-6131.
- [136] **Mutoh, S., M. Sobhany, R. Moore, L. Perera, L. Pedersen, T. Sueyoshi, und M. Negishi.** Phenobarbital indirectly activates the constitutive active androstane receptor (CAR) by inhibition of epidermal growth factor receptor signaling. *Sci Signal*, 2013. 6(274): p. ra31.
- [137] **Nakatsuru, Y., K. Wakabayashi, Y. Fujii-Kuriyama, T. Ishikawa, K. Kusama, und F. Ide.** Dibenzo[A,L]pyrene-induced genotoxic and carcinogenic responses are dramatically suppressed in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Int J Cancer*, 2004. 112(2): p. 179-183.
- [138] **Newbold, R.F., W. Warren, A.S. Medcalf, und J. Amos.** Mutagenicity of carcinogenic methylating agents is associated with a specific DNA modification. *Nature*, 1980. 283(5747): p. 596-599.

- [139] **Nick McElhinny, S.A. und D.A. Ramsden.** Sibling rivalry: competition between Pol X family members in V(D)J recombination and general double strand break repair. *Immunol Rev*, 2004. 200: p. 156-164.
- [140] **Niculescu, A.B., 3rd, X. Chen, M. Smeets, L. Hengst, C. Prives, und S.I. Reed.** Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol*, 1998. 18(1): p. 629-643.
- [141] **O'Donovan, A., A.A. Davies, J.G. Moggs, S.C. West, und R.D. Wood.** XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair. *Nature*, 1994. 371(6496): p. 432-435.
- [142] **Oda, K., H. Arakawa, T. Tanaka, K. Matsuda, C. Tanikawa, T. Mori, H. Nishimori, K. Tamai, T. Tokino, Y. Nakamura, und Y. Taya.** p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*, 2000. 102(6): p. 849-862.
- [143] **Ogryzko, V.V., P. Wong, und B.H. Howard.** WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol*, 1997. 17(8): p. 4877-4882.
- [144] **Ohtsuka, T., H. Ryu, Y.A. Minamishima, S. Macip, J. Sagara, K.I. Nakayama, S.A. Aaronson, und S.W. Lee.** ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nat Cell Biol*, 2004. 6(2): p. 121-128.
- [145] **Okamura, S., H. Arakawa, T. Tanaka, H. Nakanishi, C.C. Ng, Y. Taya, M. Monden, und Y. Nakamura.** p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis. *Mol Cell*, 2001. 8(1): p. 85-94.
- [146] **Oliveros, J.C. Venny.** *An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams.* 2015: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
- [147] **Ostling, O. und K.J. Johanson.** Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984. 123(1): p. 291-298.
- [148] **Perceptive.** Comet Assay IV brochure. 2011; Available from: <http://www.perceptive.co.uk/pdf/cometassayiv.pdf>.
- [149] **Pluciennik, A., L. Dzantiev, R.R. Iyer, N. Constantin, F.A. Kadyrov, und P. Modrich.** PCNA function in the activation and strand direction of MutLalpha endonuclease in mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(37): p. 16066-16071.
- [150] **Pomerleau, O.F. und J. Rosecrans.** Neuroregulatory effects of nicotine. *Psychoneuroendocrinology*, 1989. 14(6): p. 407-423.
- [151] **RamaKrishna, N.V., P.D. Devanesan, E.G. Rogan, E.L. Cavalieri, H. Jeong, R. Jankowiak, und G.J. Small.** Mechanism of metabolic activation of the potent carcinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Chem Res Toxicol*, 1992. 5(2): p. 220-226.

- [152] **Rao, S., S.B. Horwitz, und I. Ringel.** Direct photoaffinity labeling of tubulin with taxol. *J Natl Cancer Inst*, 1992. 84(10): p. 785-788.
- [153] **Riccio, E.S., P.S. Lee, R.A. Winegar, D.J. Krogstad, D. De, und J.C. Mirsalis.** Genetic toxicology testing of the antimalarial drugs chloroquine and a new analog, AQ-13. *Environ Mol Mutagen*, 2001. 38(1): p. 69-79.
- [154] **Rice-Evans, C. und R. Burdon.** Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res*, 1993. 32(1): p. 71-110.
- [155] **Rice, J.M., B.A. Diwan, H. Hu, J.M. Ward, R.W. Nims, und R.A. Lubet.** Enhancement of hepatocarcinogenesis and induction of specific cytochrome P450-dependent monooxygenase activities by the barbiturates allobarbitol, aprobarbitol, pentobarbitol, secobarbitol and 5-phenyl- and 5-ethylbarbituric acids. *Carcinogenesis*, 1994. 15(2): p. 395-402.
- [156] **Riley, T., E. Sontag, P. Chen, und A. Levine.** Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9(5): p. 402-412.
- [157] **Robbins, B.L., T.T. Tran, F.H. Pinkerton, Jr., F. Akeb, R. Guedj, J. Grassi, D. Lancaster, und A. Fridland.** Development of a new cartridge radioimmunoassay for determination of intracellular levels of lamivudine triphosphate in the peripheral blood mononuclear cells of human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. 42(10): p. 2656-2660.
- [158] **Roos, W.P. und B. Kaina.** DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med*, 2006. 12(9): p. 440-450.
- [159] **Ross, J., S.M. Plummer, A. Rode, N. Scheer, C.C. Bower, O. Vogel, C.J. Henderson, C.R. Wolf, und C.R. Elcombe.** Human constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR) support the hypertrophic but not the hyperplastic response to the murine nongenotoxic hepatocarcinogens phenobarbital and chlordane in vivo. *Toxicol Sci*, 2010. 116(2): p. 452-466.
- [160] **Rusted, J., L. Graupner, N. O'Connell, und C. Nicholls.** Does nicotine improve cognitive function? *Psychopharmacology (Berl)*, 1994. 115(4): p. 547-549.
- [161] **Saito, S., A.A. Goodarzi, Y. Higashimoto, Y. Noda, S.P. Lees-Miller, E. Appella, und C.W. Anderson.** ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation. *J Biol Chem*, 2002. 277(15): p. 12491-12494.
- [162] **Sakaguchi, K., J.E. Herrera, S.i. Saito, T. Miki, M. Bustin, A. Vassilev, C.W. Anderson, und E. Appella.** DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes & Development*, 1998. 12(18): p. 2831-2841.
- [163] **Sakaguchi, K., S. Saito, Y. Higashimoto, S. Roy, C.W. Anderson, und E. Appella.** Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding. *J Biol Chem*, 2000. 275(13): p. 9278-9283.



- [164] **Sakaguchi, K., H. Sakamoto, M.S. Lewis, C.W. Anderson, J.W. Erickson, E. Appella, und D. Xie.** Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry*, 1997. 36(33): p. 10117-10124.
- [165] **San Filippo, J., P. Sung, und H. Klein.** Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem*, 2008. 77: p. 229-257.
- [166] **Sato, T., T. Abe, N. Nakamoto, Y. Tomaru, N. Koshikiya, J. Nojima, S. Kokabu, Y. Sakata, A. Kobayashi, und T. Yoda.** Nicotine induces cell proliferation in association with cyclin D1 up-regulation and inhibits cell differentiation in association with p53 regulation in a murine pre-osteoblastic cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 377(1): p. 126-130.
- [167] **Schrimpf, G.** *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* 2002: Spektrum Akademischer Verlag.
- [168] **Scudiero, D.A., R.H. Shoemaker, K.D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T.H. Nofziger, M.J. Currens, D. Seniff, und M.R. Boyd.** Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*, 1988. 48(17): p. 4827-4833.
- [169] **Shahbazi, J., R. Lock, und T. Liu.** Tumor Protein 53-Induced Nuclear Protein 1 Enhances p53 Function and Represses Tumorigenesis. *Front Genet*, 2013. 4: p. 80.
- [170] **Shannon, K.B., J.C. Canman, C. Ben Moree, J.S. Tirnauer, und E.D. Salmon.** Taxol-stabilized microtubules can position the cytokinetic furrow in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 2005. 16(9): p. 4423-4436.
- [171] **Shi, X., I. Kachirskiaia, H. Yamaguchi, L.E. West, H. Wen, E.W. Wang, S. Dutta, E. Appella, und O. Gozani.** Modulation of p53 function by SET8-mediated methylation at lysine 382. *Mol Cell*, 2007. 27(4): p. 636-646.
- [172] **Shieh, S.Y., M. Ikeda, Y. Taya, und C. Prives.** DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 1997. 91(3): p. 325-334.
- [173] **Shimada, T., K. Inoue, Y. Suzuki, T. Kawai, E. Azuma, T. Nakajima, M. Shindo, K. Kurose, A. Sugie, Y. Yamagishi, Y. Fujii-Kuriyama, und M. Hashimoto.** Arylhydrocarbon receptor-dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in genetically engineered C57BL/6J mice. *Carcinogenesis*, 2002. 23(7): p. 1199-1207.
- [174] **Shimizu, Y., S. Iwai, F. Hanaoka, und K. Sugasawa.** Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase. *EMBO J*, 2003. 22(1): p. 164-173.
- [175] **Shivji, K.K., M.K. Kenny, und R.D. Wood.** Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell*, 1992. 69(2): p. 367-374.

- [176] **Shouse, G.P., X. Cai, und X. Liu.** Serine 15 phosphorylation of p53 directs its interaction with B56gamma and the tumor suppressor activity of B56gamma-specific protein phosphatase 2A. *Mol Cell Biol*, 2008. 28(1): p. 448-456.
- [177] **Singh, N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice, und E.L. Schneider.** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 1988. 175(1): p. 184-191.
- [178] **Slater, A.F., C. Stefan, I. Nobel, D.J. van den Dobbelsteen, und S. Orrenius.** Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol Lett*, 1995. 82-83: p. 149-153.
- [179] **Smeenk, L., S.J. van Heeringen, M. Koepfel, B. Gilbert, E. Janssen-Megens, H.G. Stunnenberg, und M. Lohrum.** Role of p53 serine 46 in p53 target gene regulation. *PLoS One*, 2011. 6(3): p. e17574.
- [180] **Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, und D.C. Klenk.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 1985. 150(1): p. 76-85.
- [181] **Sonoda, E., H. Hohegger, A. Saberi, Y. Taniguchi, und S. Takeda.** Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair (Amst)*, 2006. 5(9-10): p. 1021-1029.
- [182] **Soussi, T. und K.G. Wiman.** Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell*, 2007. 12(4): p. 303-312.
- [183] **Sugasawa, K., J.M. Ng, C. Masutani, S. Iwai, P.J. van der Spek, A.P. Eker, F. Hanaoka, D. Bootsma, und J.H. Hoeijmakers.** Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell*, 1998. 2(2): p. 223-232.
- [184] **Swagemakers, S.M., J. Essers, J. de Wit, J.H. Hoeijmakers, und R. Kanaar.** The human RAD54 recombinational DNA repair protein is a double-stranded DNA-dependent ATPase. *J Biol Chem*, 1998. 273(43): p. 28292-28297.
- [185] **Szegezdi, E., U. Fitzgerald, und A. Samali.** Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. 1010: p. 186-194.
- [186] **Szklarczyk, D., A. Franceschini, S. Wyder, K. Forslund, D. Heller, J. Huerta-Cepas, M. Simonovic, A. Roth, A. Santos, K.P. Tsafou, M. Kuhn, P. Bork, L.J. Jensen, und C. von Mering.** STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*, 2015. 43(Database issue): p. D447-452.
- [187] **Taira, N. und K. Yoshida.** Post-translational modifications of p53 tumor suppressor: determinants of its functional targets. *Histol Histopathol*, 2012. 27(4): p. 437-443.
- [188] **Tang, M.S., S.V. Vulimiri, A. Viaje, J.X. Chen, D.S. Bilolikar, R.J. Morris, R.G. Harvey, T.J. Slaga, und J. DiGiovanni.** Both (+/-)syn- and (+/-)anti-7,12-dimethylbenz[a]anthracene-3,4-diol-1,2-epoxides initiate tumors in mouse skin that possess -CAA- to -CTA- mutations at Codon 61 of c-H-ras. *Cancer Res*, 2000. 60(20): p. 5688-5695.

- [189] **Tang, Y., J. Luo, W. Zhang, und W. Gu.** Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell*, 2006. 24(6): p. 827-839.
- [190] **Tang, Y.C., B.R. Williams, J.J. Siegel, und A. Amon.** Identification of aneuploidy-selective antiproliferation compounds. *Cell*, 2011. 144(4): p. 499-512.
- [191] **Taylor, A.M., H.B. Laher, und G.R. Morgan.** Unscheduled DNA synthesis induced by streptonigrin in ataxia telangiectasia fibroblasts. *Carcinogenesis*, 1985. 6(6): p. 945-947.
- [192] **Testoni, M.I., N.O. Bianchi, und M.S. Bianchi.** The kinetics of chromosome and DNA damage by streptonigrin in CHO cells. *Mutat Res*, 1995. 334(1): p. 23-31.
- [193] **Thorpe, E. und A.I. Walker.** The toxicology of dieldrin (HEOD). II. Comparative long-term oral toxicity studies in mice with dieldrin, DDT, phenobarbitone, -BHC and -BHC. *Food Cosmet Toxicol*, 1973. 11(3): p. 433-442.
- [194] **Thybaud, V., A.C. Le Fevre, und E. Boitier.** Application of toxicogenomics to genetic toxicology risk assessment. *Environ Mol Mutagen*, 2007. 48(5): p. 369-379.
- [195] **Tibshirani, R., T. Hastie, B. Narasimhan, und G. Chu.** Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(10): p. 6567-6572.
- [196] **Toledo, F. und G.M. Wahl.** Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(12): p. 909-923.
- [197] **Tomasini, R., A.A. Samir, A. Carrier, D. Isnardon, B. Cecchinelli, S. Soddu, B. Malissen, J.C. Dagorn, J.L. Iovanna, und N.J. Dusetti.** TP53INP1s and homeodomain-interacting protein kinase-2 (HIPK2) are partners in regulating p53 activity. *J Biol Chem*, 2003. 278(39): p. 37722-37729.
- [198] **Tomasini, R., A.A. Samir, M.I. Vaccaro, M.J. Pebusque, J.C. Dagorn, J.L. Iovanna, und N.J. Dusetti.** Molecular and functional characterization of the stress-induced protein (SIP) gene and its two transcripts generated by alternative splicing. SIP induced by stress and promotes cell death. *J Biol Chem*, 2001. 276(47): p. 44185-44192.
- [199] **Urbanek-Olejnik, K., M. Liszewska, und G. Kostka.** The effect of phenobarbital on gene expression levels of p53 and Dnmt1 in the liver of Wistar rats. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 2014. 65(3): p. 199-203.
- [200] **van Delft, J.H., E. van Agen, S.G. van Breda, M.H. Herwijnen, Y.C. Staal, und J.C. Kleinjans.** Discrimination of genotoxic from non-genotoxic carcinogens by gene expression profiling. *Carcinogenesis*, 2004. 25(7): p. 1265-1276.
- [201] **van Delft, J.H., E. van Agen, S.G. van Breda, M.H. Herwijnen, Y.C. Staal, und J.C. Kleinjans.** Comparison of supervised clustering methods to discriminate genotoxic from non-genotoxic carcinogens by gene expression profiling. *Mutat Res*, 2005. 575(1-2): p. 17-33.

- [202] **van Maanen, J.M., J. Retel, J. de Vries, und H.M. Pinedo.** Mechanism of action of antitumor drug etoposide: a review. *J Natl Cancer Inst*, 1988. 80(19): p. 1526-1533.
- [203] **Vepintsev, D.B. und A.R. Fersht.** Algorithm for prediction of tumour suppressor p53 affinity for binding sites in DNA. *Nucleic Acids Res*, 2008. 36(5): p. 1589-1598.
- [204] **Vogel, C., S. Donat, O. Dohr, J. Kremer, C. Esser, M. Roller, und J. Abel.** Effect of subchronic 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on immune system and target gene responses in mice: calculation of benchmark doses for CYP1A1 and CYP1A2 related enzyme activities. *Arch Toxicol*, 1997. 71(6): p. 372-382.
- [205] **Vogelstein, B., D. Lane, und A.J. Levine.** Surfing the p53 network. *Nature*, 2000. 408(6810): p. 307-310.
- [206] **Von Hoff, D.D., M. Rozenzweig, W.T. Soper, L.J. Helman, J.S. Penta, H.L. Davis, und F.M. Muggia.** Whatever happened to NSC--? An analysis of clinical results of discontinued anticancer agents. *Cancer Treat Rep*, 1977. 61(5): p. 759-768.
- [207] **von Sonntag, C.** New aspects in the free-radical chemistry of pyrimidine nucleobases. *Free Radic Res Commun*, 1987. 2(4-6): p. 217-224.
- [208] **Walmsley, R.M. und N. Billinton.** How accurate is in vitro prediction of carcinogenicity? *Br J Pharmacol*, 2011. 162(6): p. 1250-1258.
- [209] **Wang, J.C.** Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(6): p. 430-440.
- [210] **Wang, Y. und C. Prives.** Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature*, 1995. 376(6535): p. 88-91.
- [211] **Webley, K., J.A. Bond, C.J. Jones, J.P. Blaydes, A. Craig, T. Hupp, und D. Wynford-Thomas.** Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(8): p. 2803-2808.
- [212] **Wei, P., J. Zhang, M. Egan-Hafley, S. Liang, und D.D. Moore.** The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature*, 2000. 407(6806): p. 920-923.
- [213] **White, J.R.** Streptonigrin-transition metal complexes: binding to DNA and biological activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977. 77(1): p. 387-391.
- [214] **Williams, G.M. und J. Whysner.** Epigenetic carcinogens: evaluation and risk assessment. *Exp Toxicol Pathol*, 1996. 48(2-3): p. 189-195.
- [215] **Wilson, V.S., N. Keshava, S. Hester, D. Segal, W. Chiu, C.M. Thompson, und S.Y. Euling.** Utilizing toxicogenomic data to understand chemical mechanism of action in risk assessment. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013. 271(3): p. 299-308.

- [216] **Wu, C.C., T.K. Li, L. Farh, L.Y. Lin, T.S. Lin, Y.J. Yu, T.J. Yen, C.W. Chiang, und N.L. Chan.** Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. *Science*, 2011. 333(6041): p. 459-462.
- [217] **Wu, Q., F.A. Beland, C.W. Chang, und J.L. Fang.** XPC is essential for nucleotide excision repair of zidovudine-induced DNA damage in human hepatoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011. 251(2): p. 155-162.
- [218] **Wyatt, M.D. und D.L. Pittman.** Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol*, 2006. 19(12): p. 1580-1594.
- [219] **Yakovlev, V.A., A.S. Bayden, P.R. Graves, G.E. Kellogg, und R.B. Mikkelsen.** Nitration of the tumor suppressor protein p53 at tyrosine 327 promotes p53 oligomerization and activation. *Biochemistry*, 2010. 49(25): p. 5331-5339.
- [220] **Yamaguchi, H., N.T. Woods, L.G. Piluso, H.H. Lee, J. Chen, K.N. Bhalla, A. Monteiro, X. Liu, M.C. Hung, und H.G. Wang.** p53 acetylation is crucial for its transcription-independent proapoptotic functions. *J Biol Chem*, 2009. 284(17): p. 11171-11183.
- [221] **Yamashita, Y., S. Kawada, N. Fujii, und H. Nakano.** Induction of mammalian DNA topoisomerase II dependent DNA cleavage by antitumor antibiotic streptonigrin. *Cancer Res*, 1990. 50(18): p. 5841-5844.
- [222] **Yang, H., M. Mazur-Melnyk, J.G. de Boer, und B.W. Glickman.** A comparison of mutational specificity of mutations induced by S9-activated B[a]P and benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide at the endogenous *aprt* gene in CHO cells. *Mutat Res*, 1999. 423(1-2): p. 23-32.
- [223] **Ye, R., A.A. Goodarzi, E.U. Kurz, S. Saito, Y. Higashimoto, M.F. Lavin, E. Appella, C.W. Anderson, und S.P. Lees-Miller.** The isoflavonoids genistein and quercetin activate different stress signaling pathways as shown by analysis of site-specific phosphorylation of ATM, p53 and histone H2AX. *DNA Repair (Amst)*, 2004. 3(3): p. 235-244.
- [224] **Yeh, P.Y., S.E. Chuang, K.H. Yeh, Y.C. Song, und A.L. Cheng.** Nuclear extracellular signal-regulated kinase 2 phosphorylates p53 at Thr55 in response to doxorubicin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 284(4): p. 880-886.
- [225] **Yoshida, K., H. Liu, und Y. Miki.** Protein kinase C delta regulates Ser46 phosphorylation of p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem*, 2006. 281(9): p. 5734-5740.
- [226] **Yu, D.S., R. Zhao, E.L. Hsu, J. Cayer, F. Ye, Y. Guo, Y. Shyr, und D. Cortez.** Cyclin-dependent kinase 9-cyclin K functions in the replication stress response. *EMBO Rep*, 2010. 11(11): p. 876-882.



## Anhang

### I Pufferzusammensetzungen

#### Transferpuffer Western Blot:

150 ml 10x Tris/Glycin Puffer (Bio-Rad, GER)  
150 ml Methanol  
1,5 ml 10 % SDS Lösung  
1198,5 ml aqua dest.

#### Lysepuffer COMET-Assay Stammlösung:

146,1 g Natriumchlorid  
1,2 g Tris  
37,2 g EDTA  
800 ml aqua dest.  
Mit Natriumhydroxid-Plätzchen auf pH 10 einstellen  
33,3, ml 30 %ige Natrium-Lauroylsarcosinelösung

#### Lysepuffer COMET-Assay Gebrauchslösung:

178 ml Stammlösung  
29 ml DMSO  
2 ml Triton X 100

#### Alkalipuffer COMET-Assay Stammlösung 1:

200 g Natriumhydroxid-Plätzchen  
500 ml aqua dest.

#### Alkalipuffer COMET-Assay Stammlösung 2:

14,829 g EDTA  
200 ml aqua dest.

#### Alkalipuffer COMET-Assay Gebrauchslösung:

45 ml Stammlösung 1  
7,5 ml Stammlösung 2  
1447,5 ml aqua dest.

#### Neutralisationspuffer COMET-Assay:

48,44 g Tris  
1000 ml aqua dest.  
pH 7,5

#### Waschpuffer ELISA:

PBS  
0,05 % (v/v) Tween 20

II Verbrauchsmaterialien

Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml und 2ml	Eppendorf
Falconröhrchen 15 ml und 50 ml	TPP
Pipetten	Eppendorf
Plastikpipetten	Costar Corning
Zellkulturflaschen 25, 75 und 175 cm <sup>2</sup>	TPP
Zellkulturschalen	TPP
Zellkulturplatten	Thermo Scientific
Zellschaber	Costar Corning
96-Well ELISA Platten	R&D Systems
PCR-Platten Light Cycler 480	Hoffmann La Roche

III Chemikalien & Reagenzien

Methanol	Merck Millipore
β-Mercaptoethanol	Merck Millipore
Paclitaxel	LGC Standards
N-Nitroso-N-methylurea	Sigma
7,12-Dimethylbenzantracen	Sigma
BPDE	BIU
Streptonigrin	Sigma
Etoposid	Sigma
Lamivudin	LGC Standards
PMA	Calbiochem
Phenobarbital	Fagron
Chloroquin	Sigma
Nikotin	Sigma
DMSO	Applichem
Halt <sup>TM</sup> Protease Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific
ECL	Thermo Scientific
Tween-20	Bio-Rad
PBS	PAA
Tris	Sigma
EDTA	Sigma
Triton X 100	Sigma
Natriumhydroxid	Sigma
Natrium-Lauroylsarcosinelösung	Sigma
SDS-Lösung (10 %)	Bio-Rad
Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color	Agilent
RNA Spike-In Kit, One-Color	Agilent
Gene Expression Hybridization Kit	Agilent
Gene Expression Wash Buffer Kit	Agilent
Etidiumbromid	Sigma
Probidiumiodid	Sigma
RNase	Life Technologies
MicroFlow Kit	Litron Laboratories