

Forschungsbericht
zur Verwendung der
Mittel im Rahmen der Förderung des Projektes

Molekulare Toxikologie von Monomeren zahnärztlicher Komposite

(Abschlußbericht)

Projekt:

Schw 431/11-1

Kennwort:

Biokompatibilität zahnärztlicher Werkstoffe

Fachgebiet und Arbeitsrichtung:

Fachgebiet: Zahnheilkunde - Genetische Toxikologie

Arbeitsrichtung: Biologische Werkstoffkunde

Förderung:

Mai 2006 – April 2009

Projektleiter:

Prof. Dr. rer.nat. Helmut Schweikl

Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie

Universität Regensburg

Regensburg, 25. Juni 2009

Zusammenfassung

Das Ziel des Projektes war die Analyse von Mechanismen der Regulation der Zellvitalität und der Zellproliferation (Zellzyklus) potentieller Zielgewebe (Pulpa und Mundschleimhaut) zahnärztlicher Monomere und damit die Charakterisierung ihrer Biokompatibilität. Überwiegend wurde Triethylenglykoldimethacrylat (TEGDMA), ein Comonomer zahnärztlicher Komposite, als Modellschubstanz verwendet. Es sollte die Wirkung der Monomere auf die Mechanismen der Regulation des Zellzyklus, der Induktion von Mikrokernen und der stressvermittelten Signaltransduktion untersucht sowie die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) dafür geprüft werden.

Diese Ziele des Projektes wurden bisher größtenteils erreicht und viele Daten publiziert oder sind zur Publikation vorbereitet. So wurde zum ersten Mal in der wissenschaftlichen Literatur über oxidative DNA-Schäden in TEGDMA-behandelten Zellkulturen berichtet. Überdies wurden Hinweise auf den Mechanismus der Verzögerung des Zellzyklus durch das Monomer TEGDMA erhalten und die Aktivierung der Tumorsuppressorproteine ATM (*taxia-telangiectasia mutated*) und p53, beides zentrale Regulatoren des Zellzyklus, nachgewiesen. Ferner wurde die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Zellen nach Exposition gegen das Monomer TEGDMA und das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) bestimmt. In Zusammenhang damit wurde die zeitabhängige Aktivierung von MAP Proteinkinasen vergleichend mit der Wirkung von LPS untersucht und die Induktion von Apoptose gemessen. Ganz besonders aufschlussreich für die Charakterisierung der molekularen Mechanismen zur Aktivierung zellulärer Verteidigungsstrategien gegen die Behandlung mit TEGDMA waren die Analysen der Genexpression exponierter Zellen mit DNA-Chips. Diese Arbeiten wurden in *Biomaterials* publiziert.

In vergleichenden Untersuchungen wurde außerdem die Wirkung eines Oxirans (Epoxy-cyclohexyl-methyl-epoxy-cyclo-hexancarboxylat=K-126), ein Monomer der neuen Generation von Kompositen, vergleichend mit der klassischen Modellschubstanz TEGDMA hinsichtlich der Produktion von ROS, der Induktion von oxidativen DNA-Schäden sowie der Generierung von Mikrokernen in Anwesenheit der antioxidativen Substanz N-Acetylcystein (NAC) bestimmt. Ferner wurden die Veränderungen des Zellzyklus unter dem Einfluss des Oxirans vergleichend mit TEGDMA bestimmt. Die hier geprüften zellulären Parameter wurden durch das Oxiran und das Dimethacrylat TEGDMA verschieden modifiziert.

Für sämtliche Analysen wurden ausnahmslos physiologisch relevante Konzentrationsbereiche über die Bestimmung der Zytotoxizität der Substanzen festgelegt und alle Arbeiten wurden mit Hilfe von Zellkulturen durchgeführt werden.

Die erzielten Ergebnisse sind nicht konfirmativ sondern originell und innovativ. Bisher wurde lediglich die Charakterisierung der Reparatur von DNA-Schäden wegen begrenzter Kapazitäten noch nicht wie geplant bearbeitet. Allerdings konnte in Kooperation mit den Gastwissenschaftlern Dr. T.Harorli (Atatürk Universität, Erzurum, Türkei) und Dr. J.Limtanyakul (Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand) an unserem Institut die Wirkung von TEGDMA auf zentrale Leistungen des angeborenen zellulären Immunsystems wie die Expression von Zytokinen und Oberflächenantigenen in Monozyten analysiert werden. Ein Manuskript dazu befindet sich in *Biomaterials* publiziert.

Aus den Ergebnissen aller Teilprojekte und ihrer Interpretation sind viele neue Fragen, Ideen und Ansätze entstanden, die in ein neues Arbeitsprogramm münden. Ein Antrag auf künftige Förderung durch die DFG ist daher in Vorbereitung. Im Folgenden sind hier die bisher erzielten Ergebnisse thematisch zusammengefasst und die aus dem Projekt entstandenen Publikationen gelistet.

Publikationen

Die folgenden Arbeiten aus dem Projekt wurden bisher publiziert oder sind zur Publikation vorbereitet.

Originalarbeiten:

- H. Schweikl, K.-A. Hiller, A. Eckhardt, C. Bolay, G. Spagnuolo, G. Schmalz (2008) Differential gene expression involved in oxidative stress response caused by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials*, 29, 1377-1387.
- G. Spagnuolo, V. D'Antò, R. Valletta, C. Strisciuglio, G. Schmalz, H. Schweikl, S. Rengo (2008) Effect of HEMA on human pulp cells survival pathways ERK and Akt. *J Endod*, 34, 684-688.
- A. Eckhardt, N. Gerstmayr, K.-A. Hiller, C. Bolay, C. Waha, G. Spagnuolo, C. Camargo, G. Schmalz, H. Schweikl (2009) TEGDMA-induced oxidative DNA damage and activation of ATM and MAP Kinases. *Biomaterials*, 30, 2006-2014.
- A. Eckhardt, T. Harorli, J. Limtanyakul, K.-A. Hiller, C. Bosl, C. Bolay, F.X. Reichl, G. Schmalz, H. Schweikl. Inhibition of cytokines and surface antigen expression in LPS-stimulated murine macrophages by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials*, 30, 1665-74.

In Vorbereitung:

- A. Eckhardt, P. Müller, K.-A. Hiller, C. Bolay, G. Spagnuolo, G. Schmalz, H. Schweikl. Mechanism of cell cycle arrest caused by the dental resin monomer TEGDMA. *als pdf beigefügt*.
- H. Schweikl, C. Petzel, E. Frank, C. Bosl, K.-A. Hiller, G. Spagnuolo, A. Eckhardt, G. Schmalz. MAP kinase activation, cytokine production and apoptosis in TEGDMA-treated macrophages. *in Vorbereitung (siehe Bericht)*
- H. Schweikl, C. Bolay, A. Stich, K.-A. Hiller, A. Eckhardt, G. Spagnuolo, G. Schmalz. Comparartive analysis of toxicity and genotoxicity caused by epoxy and acrylate monomers. *in Vorbereitung (siehe Bericht)*

Abstracts (Tagungsbeiträge):

- H. Schweikl, E.-M. Frank, S. Krifka, C. Petzel, A. Eckhardt, K.-A. Hiller, G. Schmalz (2009) TEGDMA-induced activation of MAP kinases in murine macrophages. *J Dent Res* (www.dentalresearch.org).
- S. Krifka, C. Bosl, K.-A. Hiller, G. Spagnuolo, G. Schmalz, H. Schweikl (2009) The resin monomer TEGDMA induces late apoptosis in murine macrophages. *J Dent Res* (www.dentalresearch.org).
- A. Eckhardt, S. Pongratz, N. Gerstmayr, K.-A. Hiller, G. Schmalz, H. Schweikl (2009) DNA oxidation by a dimethacrylate and an epoxy monomer. *Archives of Pharmacology*, 379, 74 (365).
- A. Eckhardt, G. Schmalz, H. Schweikl (2008) The use of trypan blue as live and dead stain in flow cytometry. *Cytometry*, 74B, 404.
- A. Eckhardt, N. Gerstmayr, K.-A. Hiller, C. Bolay, G. Schmalz, H. Schweikl (2008). Effect of TEGDMA on the activation of p38 and ERK. *Archives of Pharmacology*, 376, 86 (436).
- G. Schmalz, A. Eckhardt, K.-A. Hiller, G. Spagnuolo, N. Gerstmayr, H. Schweikl (2008) Effect of TEGDMA on the activation of p38 and ERK1/2. *J Dent Res* (www.dentalresearch.org).
- A. Eckhardt, K.-A. Hiller, G. Spagnuolo, G. Schmalz, H. Schweikl (2007) Influence of TEGDMA on the expression of pp38 MAPK. *J Dent Res* (www.dentalresearch.org).
- H. Schweikl, K.-A. Hiller, G. Schmalz (2007) Differential gene expression in human fibroblasts caused by a genotoxic dental resin monomer. *Biomaterialien*, 8, 185.

- H. Schweikl, K.-A. Hiller, C. Bolay, A. Eckhardt, G. Spagnuolo, G. Schmalz (2007) Changes in gene expression in human fibroblasts caused by a genotoxic dimethacrylate. www.eems-2007-basel.ch.
- H. Schweikl, K.-A. Hiller, A. Stich, C. Bolay, G. Brockhoff, A. Eckhardt, G. Schmalz (2007) Generation of reactive oxygen species and induction of a cell cycle arrest by epoxy and acrylate monomers. *Cytometry*, 71A, 755
- H. Schweikl, K.-A. Hiller, C. Bolay, A. Eckhardt, G. Schmalz (2007) Gene expression profiling in human fibroblasts exposed to a genotoxic dental resin monomer. *Archives of Pharmacology*, 375, 88 (438).

Zahnmedizinische Doktorarbeiten:

Phillip Müller. Vergleichende Studien zur Verzögerung des Zellzyklus durch Mytomycin C, Adriamycin und Triethylenglykoldimethacrylat. Universität Regensburg, *in Vorbereitung*.

Sabine Pongratz. Vergleichende Analyse der Genotoxizität und der Induktion oxidativer DNA-Schäden durch zahnärztliche Monomere. Universität Regensburg, *in Vorbereitung*.

Eva-Maria Frank. Aktivierung von MAP Kinasen durch ein dentales Monomer. Universität Regensburg, *in Vorbereitung*.

Nicol Gerstmayr. Oxidative DNA-Schäden und Aktivierung von ATM durch Triethylenglykoldimethacrylat. Universität Regensburg, 2009.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	
Publikationen	
1. Mechanismen der Genotoxizität und der Regulation des Zellzyklus	6
1.1 Allgemeines	6
1.2 Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch TEGDMA und ein Oxiran	6
1.3 Induktion oxidativer DNA-Schäden durch TEGDMA und ein Oxiran	9
1.4 Vergleichende Analyse der Erzeugung von Mikrokernen durch TEGDMA und ein Oxiran	11
1.5 Aktivierung von ATM durch TEGDMA	12
<i>Exkurs: Trypanblau-Färbung und Zellüberleben</i>	14
1.6 Charakterisierung des Mechanismus der Wirkung von TEGDMA auf den Zellzyklus	15
1.7 Zellzyklus: Kinetik der Wirkung eines Oxirans im Vergleich zu TEGDMA	19
1.8 Zeitabhängige Wirkung von TEGDMA auf den Zellzyklus	20
1.9 Die Aktivierung zellulärer Verteidigungsstrategien auf der Transkriptionsebene durch TEGDMA	21
2. Die Wirkung von Monomeren auf zelluläre Signalwege	26
2.1 Einfluss von TEGDMA auf das angeborene Immunsystem (<i>innate immunity</i>)	26
2.2 Die differentielle Aktivierung stressaktivierbarer MAP Kinasen durch Monomere	31
2.2.1 Aktivierung von MAP-Kinasen in RAW264.7-Makrophagen durch Lipopolysaccharid	31
2.2.2 Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von MAP-Kinasen in Makrophagen	32
2.2.3 Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von MAP-Kinasen in humanen Pulpazellen	40
2.2.4 Die Aktivierung von ERK1/2 durch HEMA in primären humanen Pulpafibroblasten	45
2.3 Induktion von Apoptose durch LPS und TEGDMA in RAW-Makrophagen	45
3. Literaturverzeichnis	48

1. Mechanismen der Genotoxizität und der Regulation des Zellzyklus

1.1 Allgemeines

Zelllinien

Eine Besonderheit der experimentellen Arbeiten in diesem Projekt war, dass die vielen verschiedenen Analysen zur Charakterisierung zellulärer Reaktionen auf Monomere wie TEGDMA mit einer Vielzahl verschiedener Zelllinien als Modelle für unterschiedliche Gewebe durchgeführt wurden. Für die jeweilige Fragestellung wurde unter den speziellen experimentellen Bedingungen eine vorteilhafte Zelllinie aus dem Mundraum oder dem zellulären Immunsystem verwendet. Die primären sowie die transformierten humanen Pulpazellen sind Zielzellen zahnärztlicher restaurativer Kompositmaterialien. Sie eignen sich für die Analysen der Aktivierung von MAPK oder die Produktion von ROS. Die humanen Hautfibroblasten (N1) sind den Fibroblasten der Mundschleimhaut ähnlich und adäquat für Genexpressions- und Zellzyklusanalysen; zudem sind sie in den dafür notwendigen Mengen verfügbar. Die humanen THP-1 Monozyten und die murinen RAW264.7 Makrophagen wiederum sind Modelle des zellulären Immunsystems. Sie vereinigen sämtliche Eigenschaften, die es erlauben, den Einfluss von Monomeren auf die Zellproliferation, die Signalgebung oder der Expression immunologisch wichtiger Moleküle wie Zytokine oder Oberflächenantigene zu studieren. Schließlich sind die V79-Fibroblasten des Chinesischen Hamsters die weitverbreiteten Zellen der Wahl für die Analyse genotoxischer und mutagener Eigenschaften von Chemikalien.

1.2 Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch TEGDMA und ein Oxiran

Allgemeines

Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid, Superoxidanion und Hydroxylradikale durch zahnärztliche Monomere wie TEGDMA und HEMA (2-Hydroxyethylmethacrylat) wurde von mehreren Arbeitsgruppen übereinstimmend gefunden (Stanislawski *et al.*, 2003, Walther *et al.*, 2004). ROS regulieren beispielsweise als Signalmoleküle die Induktion des physiologischen Zelltods (Apoptose), interagieren aber auch mit vielen anderen zellulären Molekülen und Signalwegen (siehe unten). Die im Folgenden präsentierten Daten sind für TEGDMA also nicht immer originell, allerdings in den hier verwendeten Modellen bisher nicht nachgewiesen. Die Produktion von ROS mußten wir notwendigerweise nachweisen, weil nur so die vielen damit assoziierten Effekte - Oxidierung von DNA, Induktion genotoxischer Effekte, die Verzögerung des Zellzyklus, Veränderung der Genexpression, Induktion von Apoptose, Aktivierung von MAPK -, die hier beschrieben wurden, zu verstehen sind.

Die Verwendung ringöffnender Moleküle als Bausteine der organischen Matrix von Kompositen wie etwa Spiroorthocarbonate und Oxirane (Epoxide) erscheint unter chemischen Aspekten als gute Alternative für Komposite auf Acrylatbasis, die einen vergleichsweise hohen Polymerisationsschrumpf aufweisen. Die chemische Verbindung reaktiver Oxirane mit biokompatiblen Siloxanen führte schließlich zur Einführung von Siloranen als Basis für neue Kompositwerkstoffe mit reduziertem Polymerisationsschrumpf (Weinmann *et al.*, 2005). Von Nachteil in der klinischen Anwendung konnte allerdings ein, dass die Biokompatibilität dieser Werkstoffe unter der meist hohen Reaktivität der Oxirane leiden würde. Aus unsere früheren Analysen war bekannt, dass die genotoxische Aktivität einiger Oxirane weit höher war als etwa die des TEGDMA, weil mehr als zehnfach geringere Konzentrationen der reaktiven Epoxidmonomere ausreichten, um dieselbe Wirkung zu erzielen (Schweikl *et al.*, 2004). Mechanismen der Zytotoxizität und Genotoxizität von Oxiranen waren bislang unbekannt. Originell und wirklich neu ist der Nachweis der Produktion von ROS durch Epoxycyclohexyl-methyl-epoxycyclo-hexancarboxylat, ein Oxiran (K-126) sowie die

Induktion von Mikrokernen in Anwesenheit von NAC, der Nachweis des durch K-126 verzögerten Zellzyklus und die Zytotoxizität im Vergleich mit dem Acrylat TEGDMA (vgl. Kapitel 1.2-1.4,1.7). Im Folgenden sind die in diesem Teilprojekt erzielten Ergebnisse beschrieben, und charakteristische Daten wurden anhand ausgewählter Beispiele grafisch dargestellt. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wurden in Zellkulturen nach Exposition gegen die Monomere TEGDMA und HEMA sowie das Oxiran K-126 (Epoxyester) nach Färbung exponierter Zellen mit Dichlorodihydrofluorescein (DCF) bestimmt. Die Bildung von ROS wurde mit verschiedenen Zelllinien analysiert, die auch für Analyse einer Reihe anderer Parameter (oxyDNA, Zellzyklus, Genexpression, MAPK, Zytokine und Oberflächen) verwendet wurden.

Reaktive Sauerstoffspezies in humanen Pulpazellen und Makrophagen nach Exposition gegen TEGDMA

Die Menge reaktiver Sauerstoffspezies war in transformierten humanen Pulpazellen (tHPC) nach Exposition gegen TEGDMA für 1 h um den Faktor 5,5 signifikant ($p < 0,05$) höher als in unbehandelten Zellkulturen (Abb. 1). Diese Menge von ROS schien in den tHPC bereits maximal zu sein, weil eine höhere TEGDMA-Konzentration zu keinem Anstieg der Fluoreszenz führte. Die RAW Makrophagen produzierten nach Exposition gegen TEGDMA ebenfalls eine erhöhte Menge an ROS, obwohl der absolute Anstieg geringer war als in den tHPC. Die antioxidative Substanz NAC reduzierte die Menge an ROS, der Unterschied zwischen TEGDMA-behandelten und unbehandelten Kulturen war jedoch nicht für alle TEGDMA-Konzentrationen statistisch signifikant. Ähnliche Ergebnisse für die Produktion von ROS wurden nach einer kürzeren Exposition der tHPC und RAW Makrophagen von 30 min erzielt (nicht dargestellt). Es ist bekannt, dass Lipopolysaccharid (LPS), ein bakterielles Endotoxin, die für die Produktion von Zytokinen verantwortlichen MAP-Kinasen (vgl. Kapitel 2.1 und 2.2), vor allem p38, in Zellen des Immunsystems zumindest teilweise über die Generierung von ROS aktiviert (Matsuzawa und Ichijo, 2005). Jedoch wurde hier mit 0.1 $\mu\text{g/ml}$ LPS keine erhöhte Menge an ROS nachgewiesen.

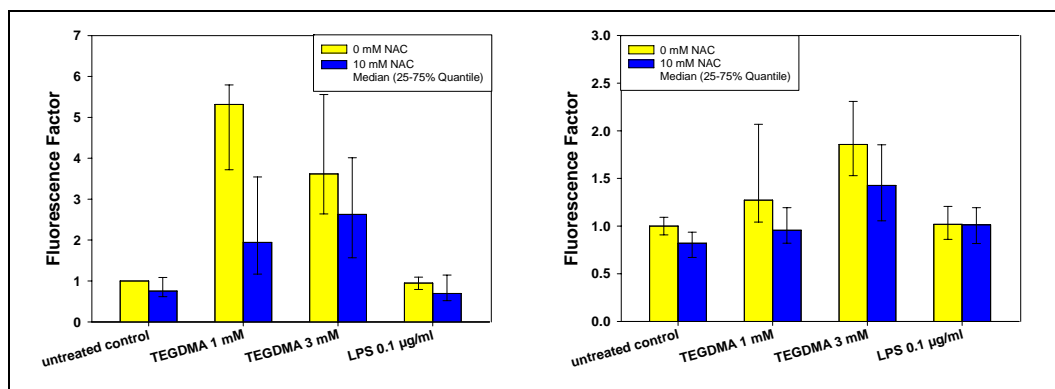


Abb. 1: Die Bildung von ROS in transformierten humanen Pulpafibroblasten (linke Grafik) und RAW-Makrophagen (rechte Grafik). Zellkulturen wurden TEGDMA für 1h exponiert. Es sind Mediane sowie 25 und 75% Perzentile gezeigt (n=4).

Reaktive Sauerstoffspezies in primären humanen Pulpafibroblasten

Das Monomer 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) erzeugte in primären humanen Pulpafibroblasten zeitabhängig einen Anstieg der Menge an ROS nach einer Expositionsdauer von 30–120 Minuten. Dieser Anstieg war in den HEMA-behandelten Zellkulturen für alle geprüften HEMA-Konzentrationen (4-14mM) signifikant höher als in unbehandelten Kontrollen. Bereits nach 30 min verursachten 10mM HEMA einen 3,5-fachen Anstieg an ROS, das nach 90 min im Maximum 4,5-fach

über dem Level in unbehandelten Kontrollen lag. Diese Ergebnisse wurden in *J Endodontics* publiziert (Spagnuolo *et al.*, 2008).

Reaktive Sauerstoffspezies in humanen Hautfibroblasten

Die Bildung von ROS wurde auch in humanen Hautfibroblasten (N1) geprüft. Diese Zellen besitzen Eigenschaften, die für die Analyse zytotoxischer und genotoxischer von Mechanismen von Vorteil sind. Sie verfügen über die für die aktuelle Fragestellung relevanten Signalwege und Regelkreise wie primäre Pulpafibroblasten (Schweickl *et al.*, 2005), und sie können in viel größerer Zellzahl angereichert werden als primäre Pulpa- und Gingivafibroblasten. Die Bildung von ROS in Anwesenheit von TEGDMA ist in N1-Zellen zeit- und konzentrationsabhängig. Eine etwa doppelte Menge an ROS wurde nach Exposition gegen 1mM TEGDMA nach 1, 2 und 6h gefunden. Die höhere TEGDMA-Konzentration von 3mM war lediglich nach den kurzen Expositionszeiten effektiver (3-fache Erhöhung) als 1mM, die von 3mM TEGDMA erzeugten Mengen an ROS nahmen aber zeitabhängig ab. Nach einer Expositionsdauer von 24h wurde lediglich mit 3 mM TEGDMA eine um den Faktor 2 erhöhte Fluoreszenzintensität ermittelt. Diese Ergebnisse verweisen darauf, dass die Produktion einer erhöhten Menge an ROS durch Monomere ein sehr frühes zelluläres Ereignis ist. Diese Daten wurden im Zusammenhang mit der Analyse der Genexpression in TEGDMA-behandelten N1-Zellkulturen erhoben (vgl. Kapitel 1.9) und wurden in *Biomaterials* publiziert (Schweickl *et al.*, 2008)

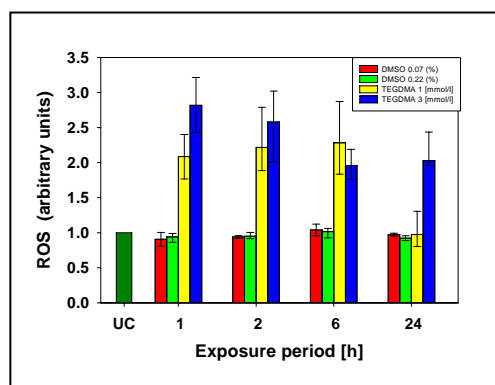


Abb. 2: Die Bildung von ROS in humanen Hautfibroblasten (N1). Zellkulturen wurden TEGDMA für 1, 2, 6 und 24h exponiert. Die Entwicklung von ROS wurde mit dem fluoreszierenden Farbstoff H₂DCFDA mit FACS bestimmt. Es sind Mediane sowie 25 und 75% Perzentile gezeigt (n=4-6). UC=unbehandelte Kontrolle

Zahnärztliche Monomere wie TEGDMA und HEMA erzeugen in verschiedenen Zelllinien reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bereits nach sehr kurzen Expositionszeiten. Diese Veränderung der zellulären Redoxhomöostase ist ein schnelles Signal mit direkter und indirekter Wirkung. Zelluläre Makromoleküle wie Nukleinsäuren können oxidiert werden und Signalkaskaden starten, die als Reaktion der Verteidigung auf oxidativen Stress den Zellzyklus verzögern. ROS aktivieren MAPK, die ihrerseits die Zellproliferation verändern, das Überleben der Zellen steuern oder Funktionen des zellulären Immunsystems wie die Sekretion von Zytokinen aktivieren. Überdies wird die Expression von Genen verändert, die – wie unten gezeigt – überwiegend Mechanismen aktivieren, die oxidativem Stress entgegenwirken und die zelluläre Homöostase wieder herstellen sollen.

Vergleichende Analyse der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch TEGDMA und ein Oxiran

In einem weiteren Teilprojekt wurde die Produktion von ROS durch TEGDMA und das Oxiran K-126 vergleichend analysiert. Auch hier wurde nach 1h Exposition der N1-Zellen gegen 1mM TEGDMA eine etwa doppelte Menge an ROS verglichen mit Kontrollen gefunden, und 3mM TEGDMA erhöhten ROS um den Faktor 3 (Abb. 3). In Anwesenheit von 10mM NAC war die Produktion von ROS nach Exposition der Zellen gegen 3mM TEGDMA um die Hälfte reduziert ($p \leq 0.05$). Das Oxiran (K-126) erhöhte mit 0.5 und 1.0mM die Fluoreszenzintensität etwa um den Faktor 4 verglichen mit unbehandelten Kontrollen. In Anwesenheit von NAC war die Fluoreszenzintensität jedoch im

Unterschied zu den TEGDMA-behandelten Zellkulturen nicht signifikant reduziert. Nach der kurzen Expositionszeit wurden keine akuten zytotoxischen Effekte gefunden, denn die TC50-Werte in mit TEGDMA und K-126 behandelten Kulturen war mit >15mM weit jenseits der verwendeten Konzentrationen (Abb. 4).

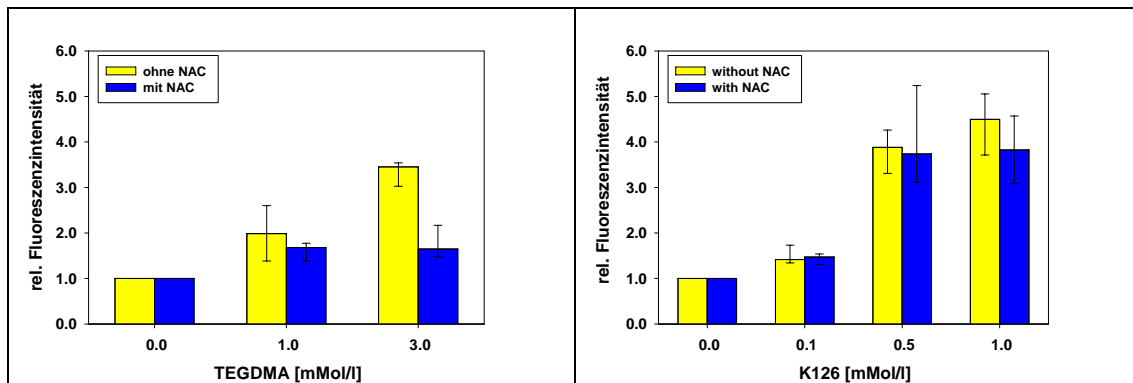


Abb. 3: Die Bildung von ROS in humanen Hautfibroblasten (N1). Zellkulturen wurden dem Dimethacrylat TEGDMA und dem Oxiran K-126 für 1h exponiert. Die Entwicklung von ROS wurde mit dem fluoreszierenden Farbstoff H₂DCFDA mit FACS bestimmt. Es sind Mediane sowie 25 und 75% Perzentile gezeigt (n=4).

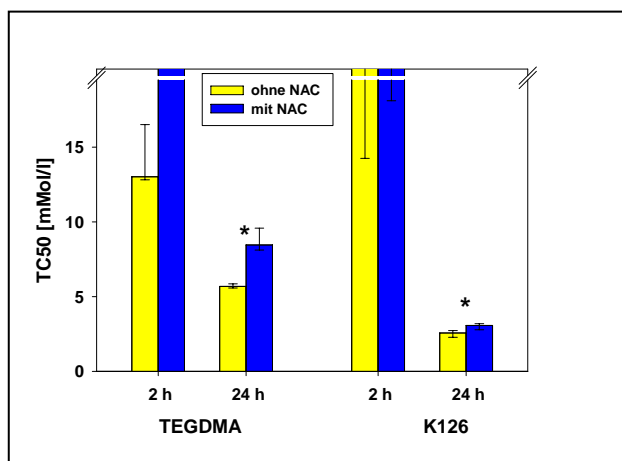


Abb. 4: Zytotoxizität von TEGDMA und dem Oxiran K-126. Humane Hautfibroblasten (N1). Zellkulturen wurden TEGDMA und dem Oxiran für 2h und 24h exponiert. TC50-Werte wurden aus Dosis-Reaktionskurven errechnet. Dazu wurden optische Dichten in Abhängigkeit von Substanzkonzentrationen gemessen. Es sind Mediane sowie 25 und 75% Perzentile gezeigt (n=4).

1.3 Induktion oxidativer DNA-Schäden durch TEGDMA und ein Oxiran

Für das Arbeitsprogramm der laufenden Förderperiode haben wir zwei konkurrierende Hypothesen zur Entstehung von DNA-Schäden formuliert. Einerseits sollten Monomere als elektrophile Substanzen direkt an nukleophile Zentren der DNA binden, etwa an N7 des Guanins, und über eine fehlerhafte Replikation an Stellen der DNA-Addukt-Bildung zu großen DNA-Schäden führen. Andererseits ist denkbar, dass Monomere erhöhte Menge an ROS produzieren, die oxidative DNA-Schäden verursachen. Zur Prüfung dieser Hypothese, haben wir die Produktion von 8-Oxoguanin durch das (Di)Methacrylat Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) vergleichend mit einem Oxiran (K-126) untersucht. Der Nachweis von 8-Oxoguanin erfolgte durchflusszytometrisch (FACSCanto) nach dem Färbung der Zellen mit einem fluoreszierenden Antikörper (Biotrin Int., Dublin).

Die zeit- und konzentrationsabhängige Generierung von 8-Oxoguanin wurde nach Exposition gegen TEGDMA in THP-1 Monozyten bestimmt, das Oxiran K-126 wurde vergleichend mit TEGDMA in V79-Zellen geprüft. Diese Zelllinie ist Standard für Mutagenitätsprüfungen und die Bildung von Mikrokernen TEGDMA und K-126 wurde damit analysiert (vgl. Kapitel 1.4). Mit beiden Zelllinien wurden auch andere Parameter (Zytokine, Mikrokerne, Zellzyklus) bestimmt, die mit den hier erzielten Ergebnissen korreliert werden.

Nach einer kurzen Expositionszeit von 2h war in THP-1 Zellen selbst mit den relativ hohen TEGDMA-Konzentrationen von 3 und 5 mM die Bildung von 8-Oxoguanin nicht detektierbar (Abb. 5). Allerdings stieg die Menge an oxy-DNA nach 24h und 48h um den Faktor 2-3 in den mit 1-5 mM TEGDMA behandelten Zellkulturen verglichen mit unbehandelten Kontrollen. In Anwesenheit von 5mM NAC war vor allem nach 24h die Bildung von 8-Oxoguanin durch TEGDMA inhibiert.

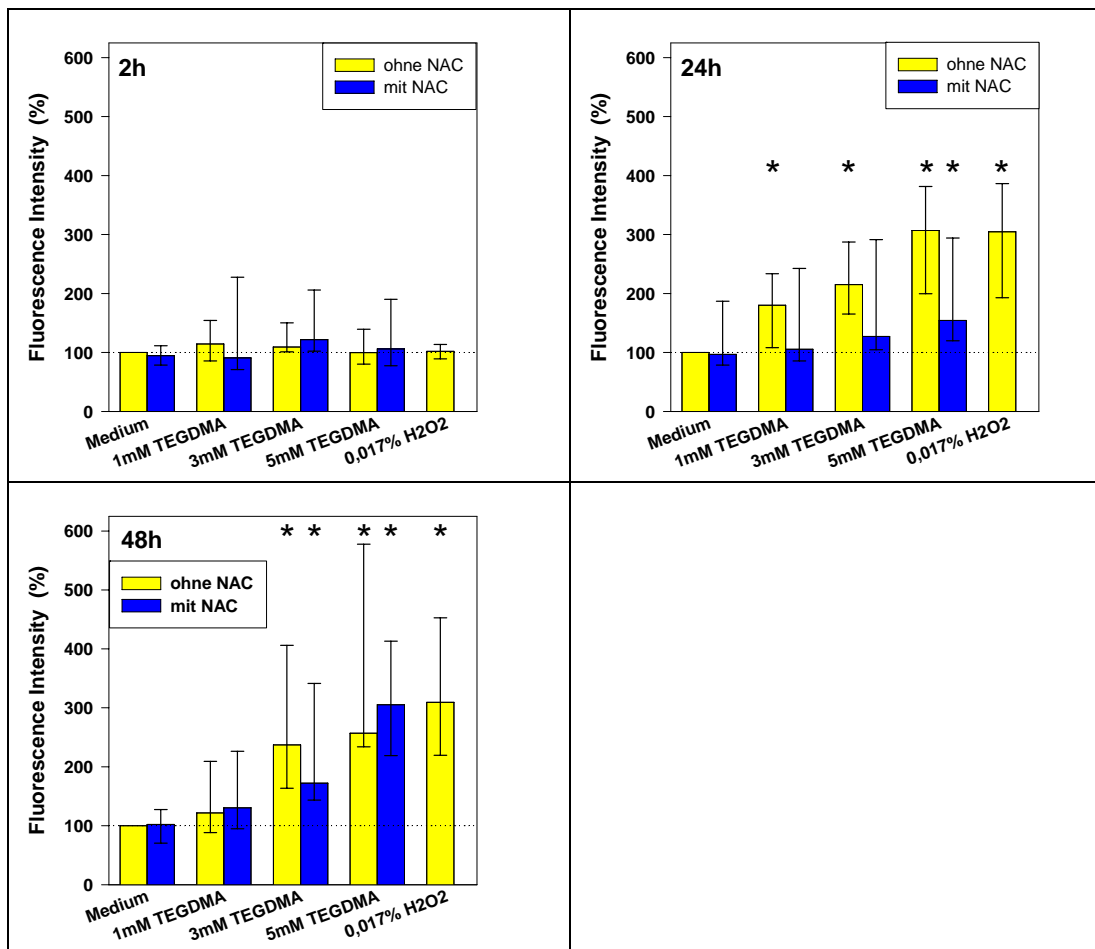


Abb 5: Die Bildung von 8-Oxoguanin in THP-1 Zellen nach Behandlung mit TEGDMA. Die Zellen wurden TEGDMA für 2h, 24h und 48h exponiert. 8-Oxoguanin wurde mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper detektiert und durchflusszytometrisch quantifiziert (FACS). Wasserstoffperoxid diente in der hier in Vorversuchen ermittelten Konzentration als Positivkontrolle. Die Mediane (plus 25% und 75% Perzentile) sind mittlere Fluoreszenzintensitäten aus vier unabhängigen Experimenten (n=4).

TEGDMA und K-126 wurden vergleichend in V79 Zellen analysiert. Ähnlich wie in THP-1 Zellen war nach einer kurzen Expositionszeit von 2h eine verglichen mit unbehandelten Kulturen erhöhte Bildung von 8-Oxoguanin durch TEGDMA und K-126 nicht nachweisbar. Lediglich eine sehr hohe Konzentration (3mM) des Oxirans erhöhte die Menge an oxy-DNA etwa 3-fach verglichen mit

unbehandelten Kontrollen. Dieser Effekt wurde durch NAC inhibiert. Die Entstehung von 8-Oxoguanin durch TEGDMA war abhängig von der Dauer der Exposition. Nach 24h Exposition erhöhten 1 und 3 mM TEGDMA die Menge an oxy-DNA etwa um den Faktor 2, nach 48h jedoch um den Faktor 7. Nach dieser langen Expositionszeit wirkte NAC der Bildung von 8-Oxoguanin entgegen (Abb. 6).

Das Oxiran bewirkte einen zeit- und konzentrationsabhängigen Anstieg der Menge an 8-Oxoguanin nach längeren Expositionszeiten (Abb. 6). Nach 24h erhöhte 1mM K-126 die Menge an 8-Oxoguanin um mehr als den Faktor 10, 3mM K-126 jedoch nur um den Faktor 3,5. Während NAC die Wirkung von 1 mM K-126 inhibierte, war die Menge an 8-Oxyguanin mit NAC in den Ansätzen mit 3mM K-126 sogar höher als ohne NAC. Wahrscheinlich schützt NAC die V79-Zellen gegen die sehr starke toxische Wirkung von 3 mM K-126, möglicherweise indem es K-126 direkt bindet. Nach einer Expositionsdauer von 48h steigt die Menge an 8-Oxoguanin schon durch 0,3mM K-126 etwa um den Faktor 2-3. Wahrscheinlich wegen der längeren Expositionsdauer entspricht die Wirkung von 1mM K-126 nun in etwa dem Effekt von 3mM K-126 nach 24h. Der Effekt von 3mM K-126 ist nach 48h Exposition wegen der sehr starken Zellschädigung nicht zu interpretieren (Abb. 6).

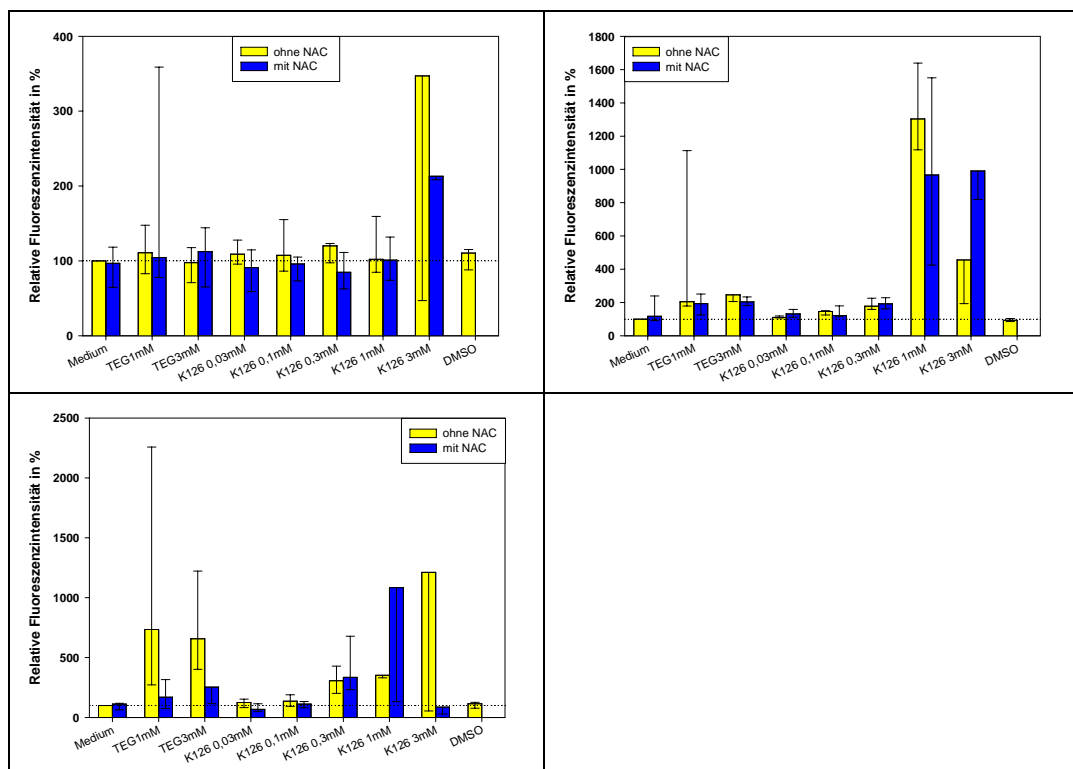


Abb. 6: Die Bildung von 8-Oxoguanin in V79-Zellen nach Behandlung mit TEGDMA oder K-126 (Oxiran). Die Zellen wurden den Substanzen mit und ohne N-Acetylcystein (NAC) für 2h, 24h und 48h exponiert. 8-Oxoguanin wurde dann mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper detektiert und durchflusszytometrisch quantifiziert (FACS). Die Mediane (plus 25% und 75% Perzentile) sind mittlere Fluoreszenzintensitäten aus vier unabhängigen Experimenten (n=4). Unbehandelte Kontrolle (Medium) =100%.

1.4 Vergleichende Analyse der Erzeugung von Mikrokernen durch TEGDMA und ein Oxiran

Es ist, wie oben als Hypothese formuliert, möglich, dass TEGDMA und das Oxiran K-126 genotoxische Effekte über unterschiedliche Mechanismen – direkt oder indirekt über die Generierung

von ROS -, erzeugen. Daher wurden diese Substanzen in ihrer Fähigkeit zur Induktion von Mikrokernen in Zellkulturen mit und ohne NAC verglichen. Die Bildung von Mikrokernen als mutagener Effekt in eukaryontischen Zellen ist ein Hinweis auf klastogene, chromosomenschädigende Eigenschaften eines Stoffes.

Das bifunktionelle Dimethacrylat TEGDMA ist in V79-Zellen mutagen, denn es führte nach 24h Exposition zu einem signifikanten Anstieg der Zahl an Mikrokernen. So wurden in Anwesenheit von 0,75 mM TEGDMA etwa um den Faktor 5 und mit 1.0 mM etwa um den Faktor 9 mehr Mikrokernere gefunden als in unbehandelten Kontrollen (Abb. 7). In Anwesenheit von 10mM NAC jedoch war die Zahl an Mikrokernen in den Ansätzen mit 1mM TEGDMA nicht signifikant verschieden von Kontrollen ($p \leq 0.05$). Das Oxiran K-126 induzierte ebenfalls einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Zahl an Mikrokernen zwischen 0mM und 0.3mM. In Kulturen, die mit 0.3 mM K-126 behandelt wurde, lag die Zahl an Mikrokernen etwa um den Faktor 6 über unbehandelten Kontrollen. Im Unterschied zur Wirkung von TEGDMA hatte die Anwesenheit von NAC keinen Einfluss auf die Bildung von Mikrokernere durch K-126 oder die Positivkontrolle Ethylmethansulfonat (EMS).

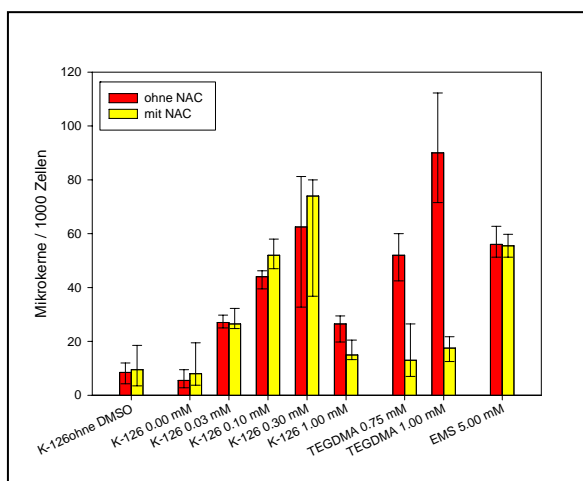


Abb. 7: Die Bildung von Mikokernen in V79-Zellen. Zellkulturen wurden dem Dimethacrylat TEGDMA und dem Oxiran K-126 mit und ohne N-Acetylcystein (NAC) für 24h exponiert. EMS (Ethylmethansulfonat) wurde als Positivkontrollen verwendet. Es sind Mediane sowie 25 und 75% Perzentile gezeigt (n=4-6).

1.5 Aktivierung von ATM durch TEGDMA

Unterschiedliche Formen von DNA-Schäden wie etwa die Bildung von 8-Oxoguanin, aktivieren verschiedene Proteine der Kontrollpunkte im Zellzyklus. Die Kontrollpunkte sind ein Netzwerk regulatorischer Proteine, die prüfen, ob jede der Phasen eines Zellzyklus erfolgreich abgeschlossen wurde. Diese molekularen Regulatoren übersetzen ein Signal, das DNA-Schäden meldet (*sensor proteins*), in eine zelluläre Antwort. Eine Kette der Signalübertragung führt dann zu einer Verzögerung des Zellzyklus oder gar einem vollständigen Arrest, damit Schäden repariert werden können oder aber Apoptose induziert wird. Dabei aktivieren DNA-Doppelstrangbrüche eher das Tumorsuppressorprotein ATM, Einzelstrangbrüche wohl bevorzugt die dem ATM verwandte Kinase ATR (Nyberg *et al.*, 2002; Kaina, 2003).

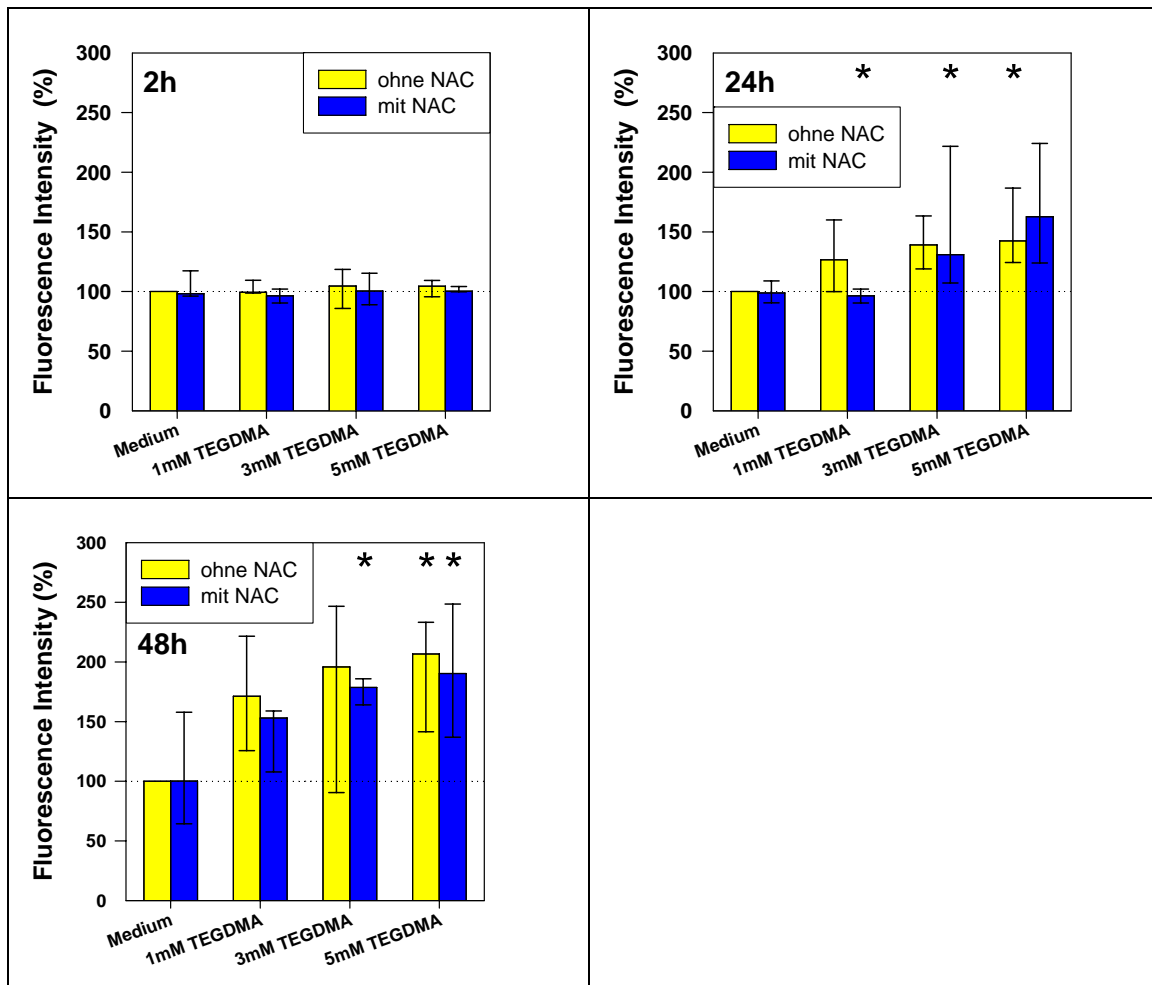


Abb. 8: Die Aktivierung von ATM in THP-1 Zellen nach Stimulation mit TEGDMA. Die Zellen wurden TEGDMA mit und ohne N-Acetylcystein (NAC) für 2h, 24h und 48h exponiert. Phospho-ATM wurde dann mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper detektiert und durchflusszytometrisch quantifiziert (FACS). Die Mediane (plus 25% und 75% Perzentile) sind mittlere Fluoreszenzintensitäten aus vier unabhängigen Experimenten (n=4). Unbehandelte Kontrolle (Medium) =100%.

Wir haben unsere Analysen zunächst auf den Nachweis von ATM konzentriert, weil aus eigenen Untersuchungen bekannt war, dass TEGDMA in V79-Zellen Mikrokerne induzierte (Schweikl *et al.*, 2001). Mikrokerne wiederum entstehen als Folge von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB). ATM wird zunächst an DSBs auf bisher noch unbekannte Weise an Serinresten phosphoryliert und somit aktiviert (Bakkenist und Kastan, 2003). Die Menge an pATM in den mit TEGDMA behandelten Kulturen sowie in unbehandelten Kontrollen wurde wieder in THP-1 mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper durchflusszytometrisch nachgewiesen. In diesen Experimenten wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als variabler Parameter detektiert, aber auch die Zahl der pATM-positiven Zellen wurde erfasst.

Die Kinetik der Bildung von pATM wurde über einen sehr weiten Zeitraum bis zu 48h nach Expositionsdauer beobachtet. Innerhalb der ersten Stunde nach Exposition wurde jedoch in Abständen von 10 min keine erhöhte Menge an pATM detektiert (nicht dargestellt). Auch nach 2h Stunden Exposition war die Menge an pATM in den TEGDMA-behandelten Kulturen von denjenigen unbehandelter Kontrollen nicht signifikant verschieden (Abb. 8).

Nach 24h stieg die Menge an pATM mit steigenden TEGDMA-Konzentrationen. So aktivierten 1, 3 und 5 mM TEGDMA die Menge an pATM um den Faktor 1,2-1,5 (Abb. 8). Nach 48 Stunden lag die Steigerungen der *mean fluorescence* mit TEGDMA sogar um den Faktor 2 über denjenigen unbehandelter Kontrollen. Die Anwesenheit des Antioxidans NAC veränderte die Menge an pATM zu keiner der hier dokumentierten Expositionszeiten signifikant (Abb. 8).

TEGDMA und eine Oxiran erzeugen ROS, oxidative DNA-Schäden und Genotoxizität. In der Folge werden Signalketten aktiviert, die diese Schäden erkennen, die Information weiterleiten und zelluläre Reaktionen der Verteidigung einleiten. Dazu gehört die Verzögerung des Zellzyklus aber auch die Aktivierung von MAPK.

Exkurs: Trypanblau-Färbung und Zellüberleben

Die Färbung von Zellen mit Trypanblau zur Unterscheidung lebender und toter Zellen im Lichtmikroskop ist seit 50 Jahren bekannt (Kaltenbach *et al.*, 1958). Diese Methode wurde in der aktuellen Förderperiode von uns für das Durchflusszytometer adaptiert. Die Anregung der gefärbten Zellen kann sowohl mit einem 488nm als auch mit einem 635nm Laser erfolgen, und das Emissionsspektrum liegt jenseits von 600nm. Dadurch werden weder der Kanal für die FITC- noch für die PE-Konjugate beeinträchtigt. Tote Zellen zeigen in der TB-Färbung eine starke Verschiebung der Fluoreszenzintensität nach rechts, welche durch ein deutliches „Tal“ vom Peak der lebenden Zellen getrennt ist. Aufgrund dieser Verschiebung ist es also möglich, eine lebend/tot Färbung auch im FACS durchzuführen.

Die TB-Färbung kann vorteilhaft mit einer extrazellulären Färbung kombiniert werden, wobei diese aufgrund der längeren Inkubationszeit vor der TB-Färbung erfolgen sollte. Außerdem ist nach der TB-Färbung eine Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd sowie eine Permeabilisierung mit Methanol möglich, so dass im Anschluss an die TB-Färbung eine intrazelluläre Färbung durchgeführt werden kann. Durch diese neue Methode ist es möglich, in derselben Probe lebende und tote Zellen zu unterscheiden und gleichzeitig FITC- und PE-konjugierte Färbungen durchzuführen. Das ist mit Propidiumiodid (PI) als Marker für tote Zellen unmöglich. Ferner muss TB nicht unmittelbar vor der Messung zugegeben werden, wodurch auch eine mögliche Kontamination des Zytometrie-arbeitsplatzes entfällt.

Erste Versuche mit dieser Färbung konnten die konzentrationsabhängige Toxizität von TEGDMA wie sie mit anderen Methoden gemessen wurde bestätigen. So waren nach nur einer halben Stunden Inkubation mit 10mM TEGDMA bereits alle untersuchten RAW264.7 Zellen tot, Messungen mit unbehandelten Zellen wiesen zwischen 5 und 10% tote Zellen auf (Abb. 9).

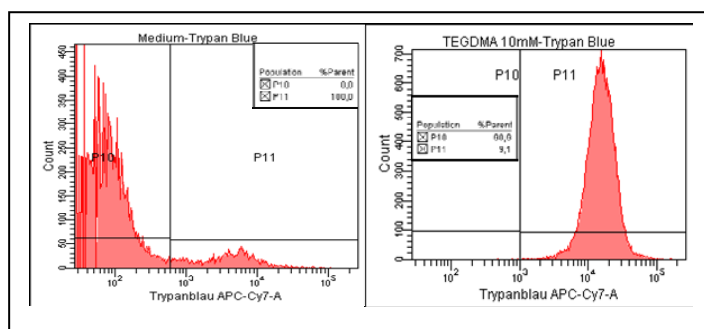


Abb. 9: Trypanblaufärbung lebender und toter Zellen in unbehandelter und mit 10mM TEGDMA behandelter Kultur.

Bei 24-stündiger Inkubation mit 1mM TEGDMA wurden in unterschiedlichen Versuchen zwischen 30 und 50% der Zellen als tot identifiziert. Vergleichende Kristallvioletttests ergaben einen durchschnittlichen Wert von 38% toten Zellen nach 24 Stunden. Die Inkubation der Zellen mit 3 bzw. 5mM TEGDMA über einen Zeitraum von 24 Stunden führte zum Tod von ca. 80 bzw. 95% der Zellen. Aufgrund der guten Handhabbarkeit

und Zuverlässigkeit wird die TB-Färbung für FACS-Analysen momentan routinemäßig mit anderen Färbungen kombiniert.

1.6 Charakterisierung des Mechanismus der Wirkung von TEGDMA auf den Zellzyklus

Vergleichende Analysen der Wirkung von TEGDMA, Adriamycin und Mitomycin C

Aus eigenen früheren Untersuchungen war bekannt, dass TEGDMA den Zellzyklus in V79-Zellen in der G2-Phase, in humanen Fibroblasten und primären Pulpazellen aber überwiegend in der G1-Phase verzögert. Molekularbiologische Untersuchungen zeigten außerdem, dass TEGDMA in V79-Zellen großen Deletionen von DNA-Sequenzen verursacht (Schweickl und Schmalz, 1999; Schweickl *et al.*, 2005). Die oben formulierte Hypothese für den Mechanismus der Wirkung von TEGDMA gilt auch hier. Daher durfte man annehmen, TEGDMA reagiere möglicherweise wie ein *crosslinker* direkt mit nukleophilen Zentren von DNA-Basen im Sinne einer Michael-Addition. Auf diese Weise sollte ein G2-Arrest ausgelöst werden (Bridge *et al.*, 2005). Andererseits verwiesen die Produktion von ROS in TEGDMA-behandelten Zellkulturen und – wie hier auch gezeigt – die Induktion oxidativer DNA-Schäden auf einen indirekten, durch ROS-vermittelten Mechanismus. Dieser sollte die Verzögerung des Zellzyklus in G1 bewirken. Zur Charakterisierung des Mechanismus des Zellzyklusarrests wurde die Wirkung des Monomers TEGDMA vergleichend mit den beiden Chemotherapeutika Mitomycin C und Adriamycin (Doxorubicin) analysiert.

Adriamycin wurde ursprünglich als ein Gift der Topoisomerase II diskutiert, inzwischen ist jedoch bekannt, dass viele Effekte des Adriamycin über die Produktion einer erhöhten Menge an ROS vermittelt werden (Kurz *et al.*, 2004). Eine dauerhafte Behandlung von Zellen mit Adriamycin erhöht die Menge an P53 begleitet von einer p53-regulierten Expression der Mangansuperoxidismutase (SOD2) und der Glutathionperoxidase. Wahrscheinlich wegen der erhöhten Produktion von ROS werden p53-abhängige Kontrollpunkte im Zellzyklus am Übergang von der G1- in die S-Phase aktiviert, so dass exponierte Zellen in der G1-Phase akkumulieren (Attardi, 2004).

Mitomycin C (MMC) folgt einem gänzlich anderen Mechanismus der Induktion von DNA-Schäden. Es wird zwar auch in der Krebstherapie eingesetzt, um den Zellzyklus schnell proliferierenden Tumorzellen zu arretieren, wirkt jedoch als *crosslinker*, eine Substanz, die DNA-Stränge quervernetzt. Die Folge davon sind DNA-Doppelstrangbrüche und ein deshalb ausschließlich in der G2-Phase verzögerter Zellzyklus (Iyer *et al.*, 1963; Franchittof *et al.*, 1998): Weil die Proteinkinase ATM durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert wird und den Fortgang des Zellzyklus aus der G2- in die M-Phase inhibiert, wurden die Experimente hier auch mit Koffein durchgeführt. Koffein inhibiert das aktivierte ATM, der G2-Kontrollpunkt wird deshalb in Anwesenheit von Koffein zumindest partiell überschrieben und folglich gibt es keine Verzögerung der G2-Phase des Zellzyklus (Blasina *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000;). Weil deshalb auch Apoptose nicht induziert wird, kann schadhafte DNA auf die folgende Generation von Zellen vererbt werden.

Als vorteilhaftes Modell für die vorliegende Untersuchung wurden RAW-Makrophagen verwendet, die rasch proliferieren, einen stabilen Genotyp sowie sämtliche Kontrollpunkte des Zellzyklus besitzen. Die Zellen wurden den Substanzen 24h exponiert. Danach wurde die Verteilung der Zellen einer Kultur auf die einzelnen Phasen des Zellzyklus durch die Bestimmung der DNA-Menge mit einem Durchflusszytometer (FACSCanto, BD). Resultierende Histogramme wurden mit der ModFit LT Software (Verity Software House) analysiert.

Repräsentative Histogramme zeigen etwa 47.4% der Zellen unbehandelter Kontrollen in G1, 41.9% in der S- und 10.7% in der G2-Phase (Abb. 10). In TEGDMA-behandelten (1mM) Kulturen stieg die Zahl der Zellen in G1 auf 85.3%, und 1µM Adriamycin erhöhte die Zellzahl ebenfalls in G1 (72.1%). Im Unterschied dazu akkumulierten in den mit Mitomycin C (0,5 µg/ml) behandelten Kulturen die Zellen in der G2-Phase (28.9%) des Zellzyklus. Die hier verwendeten Konzentrationen wurden in

Vorversuchen als optimal für die Wirkung auf die einzelnen Phasen des Zellzyklus bei geringer Zytotoxizität ermittelt (Abb. 11 und 13).

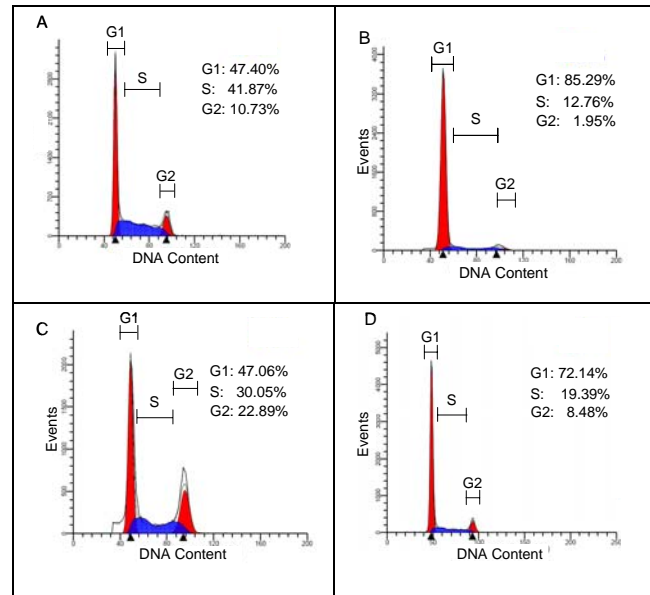


Abb. 10: Verteilung der RAW264.7 Makrophagen auf die Phasen des Zellzyklus. Die Histogramme zeigen die Verteilung unbehandelter Zellkulturen (A) oder solche, die mit 1mM TEGDMA (B), 0.5µg/ml Mitomycin C (C) oder 1µM Adriamycin (D) für 24 h behandelt wurden. Die Histogramme zeigen Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

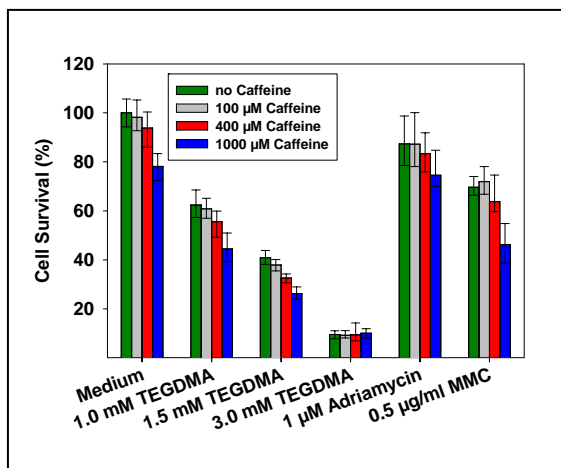


Abb. 11. Zytotoxizität von TEGDMA, 1µM Adriamycin und 0.5µg/ml Mitomycin C in RAW-Makrophagen. Die Zellen wurden den Substanzen 24h auch in Gegenwart von Koffein exponiert. Anschließend wurde die Zahl der überlebenden Zellen photometrisch (Kristallviolett-Test) bestimmt. Es sind Mediane und Perzentile (25 und 75%) dargestellt (n=16).

Der ATM-Inhibitor Koffein allein induzierte konzentrationsabhängig eine Verzögerung des Zellzyklus der RAW-Zellen in der G1-Phase (Abb. 12A). Die Zahl der Zellen stieg von etwa 47% in unbehandelten Kulturen auf 64% in Kulturen, die mit 1mM Koffein behandelt wurden. Höhere Koffeinkonzentrationen konnten wegen der hohen Zytotoxizität der Substanz in Verbindung mit Adriamycin und MMC in RAW-Makrophagen nicht getestet werden (nicht gezeigt). Koffein war also

unter den hier gewählten Bedingungen wirksam. Die Wirkung des Koffeins auf G1 basiert wahrscheinlich auf der Produktion von ROS und war aus der Literatur bekannt (Hashimoto *et al.*, 2004). Diese Effekte wurden hier reproduziert.

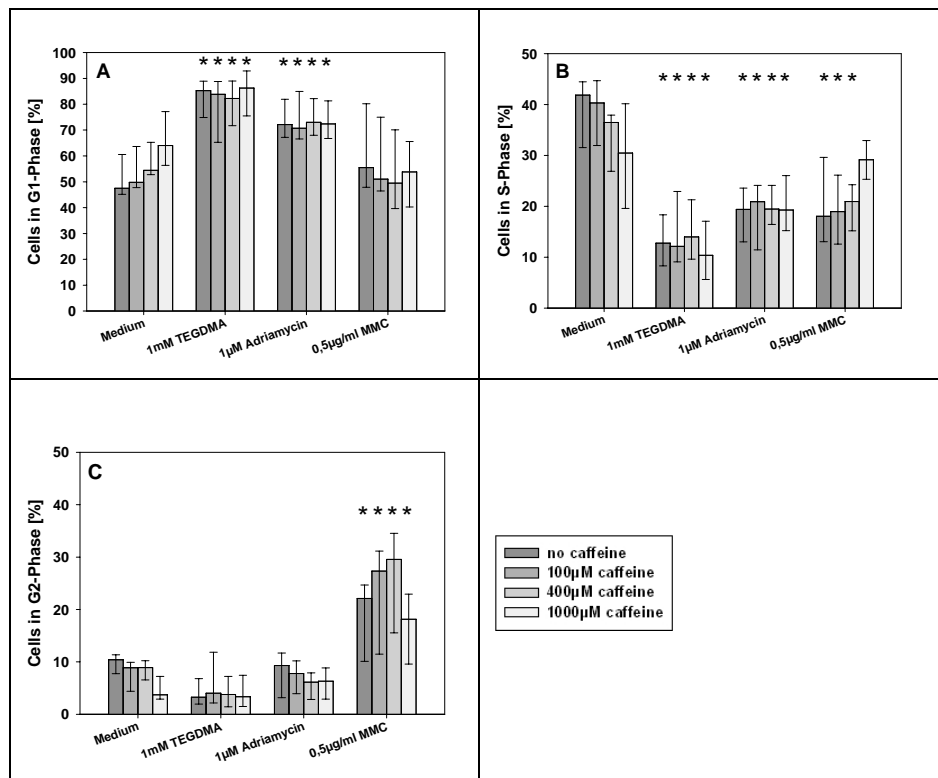


Abb. 12: Verteilung der RAW264.7 Makrophagen auf die G1- (A), S- (B) und die G2-Phase des Zellzyklus (C). Die Säulen zeigen Median und Perzentile (25% und 75%) (n=4; p<0.05)

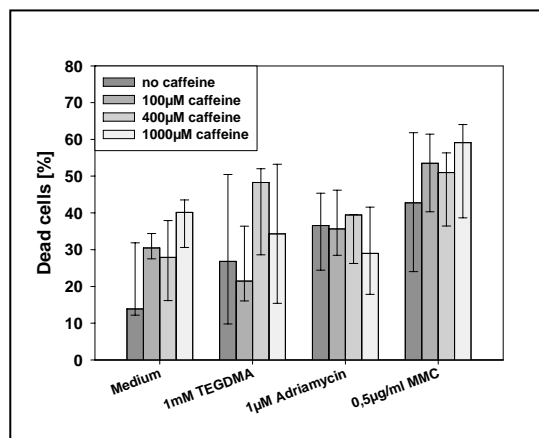


Abb. 13: Anteil toter Zellen in den Zellkulturen für die Zellzyklus-Analysen. Der Anteil der toten Zellen wurde nach dem Färben der Zellen mit Trypanblau parallel zur Bestimmung DNA-Verteilung mit einem Durchflusszytometer bestimmt. Es wird deutlich, dass diese Methode einen relativ hohen Anteil der Zellen, die mit Koffein, TEGDMA, Adriamycin oder MMC behandelt wurden, als tot identifiziert. Dagegen ist der Anteil vitaler Zellen in unbehandelten Zellkulturen hoch.

Die Wirkung von Mitomycin C

MMC verursachte einen Anstieg der Zahl der RAW-Makrophagen in der G2-Phase des Zellzyklus. Die Zahl der Zellen stieg von 10,7% in der unbehandelten Kontrolle auf 22,1% in MMC-behandelten Kulturen (Abb. 12C). Parallel dazu fiel der Anteil der Zellen in der S-Phase von 41,9% auf 18,3%,

und der Anteil der Zellen in G1 war in MMC-behandelten Zellkulturen nicht signifikant erhöht (Abb. 12A). Eine Vorinkubation der Zellen mit 100 oder 400µM Koffein vor der Stimulation mit MMC resultierte in einem weiteren, allerdings nicht signifikanten Anstieg der Zellen in G2 auf 27,3 und 29,6%. Andererseits sank der Anteil an Zellen in G2 nach Inkubation mit MMC und 1000µM Koffein auf 18,1%. Diese Koffeinkonzentration konnte den durch MMC verursachten Arrest des Zellzyklus in der G2-Phase zumindest teilweise überschreiben

Die Wirkung von Adriamycin

Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen erhöhte 1µM Adriamycin die Zahl der Zellen in G1 von 47,4% auf 72,1% (Abb. 12A). Parallel dazu sank die Zellzahl in der S-Phase von 41,9% auf 19,4% und in der G2-Phase von 10,7% auf 8,5% (Abb. 12B,C). Wie in den Experimenten mit MMC wurde die Wirkung von Adriamycin auch unter dem Einfluss von Koffein geprüft. Das Koffein veränderte jedoch die Wirkung von Adriamycin nicht signifikant.

Die Wirkung von TEGDMA

TEGDMA (1mM) alleine induzierte eine Verzögerung des Zellzyklus in der G1-Phase. Mit 85,3% der Zellen in G1 war dieser Arrest noch etwas deutlicher als mit Adriamycin (Abb. 12A). Die Zahl der Zellen in der S-Phase sank auf 12,8% und diejenige in G2 auf 2,0% (Abb. 12B,C). Wie schon für Adriamycin beobachtet, hatte Koffein keinen signifikanten Einfluss auf die Wirkung von 1 mM TEGDMA (Abb. 12).

Aus den hier skizzierten Ergebnissen darf man schließen, dass der Mechanismus der TEGDMA-induzierten Verzögerung des Zellzyklus demjenigen des Adriamycin zumindest sehr ähnlich ist. Beide Substanzen induzierten überwiegend eine Verzögerung der G1-Phase im Zellzyklus der RAW-Makrophagen. Mitomycin C hingegen verursachte einen Arrest des Zellzyklus in der G2-Phase. TEGDMA wirkt daher wahrscheinlich primär nicht direkt und als quervernetzende Substanz, sondern eher indirekt über die Erzeugung von ROS und oxidativen DNA-Schäden. Daher hat auch Koffein keinen nachweisbaren Effekt und anscheinend übernimmt ATM in der Regulation der Verzögerung des Zellzyklus durch TEGDMA keine Funktion. Auch die früher beobachtete Verzögerung des Zellzyklus in der G2-Phase ist daher eher durch die starken oxidativen Schäden durch sehr hohe TEGDMA-Konzentrationen verursacht, die hier auch nachgewiesen wurden (vgl. Kapitel 1.3). Der in unseren früheren Arbeiten beschriebene TEGDMA-induzierte Arrest des Zellzyklus in G2 der V79-Zellen beruht sehr wahrscheinlich darauf, dass diese Zellen p53-defizient sind. Sie verfügen damit wahrscheinlich über keinen funktionierenden Kontrollpunkt in der G1-Phase (Schweikl *et al.* 2005).

Die Mechanismen der Regulation einer Verzögerung des Zellzyklus in Anwesenheit von TEGDMA sind mit den bisher erzielten Ergebnissen allerdings nicht erschöpfend charakterisiert. Die aktuelle Hypothese beschreibt nun die indirekt DNA-Schädigung durch ROS, nicht mehr die direkte Schädigung durch *crosslinks*. Daher soll jetzt die Regulation des Zellzyklus in Gegenwart oxidativer DNA-Schäden analysiert werden. Dabei übernehmen wahrscheinlich MAPK eine zentrale Funktion. Diese Annahme basiert unmittelbar auf zwei Argumenten. Zum einen auf der hier gezeigten differenziellen Aktivierung von MAPKs durch TEGDMA (vgl. Kapitel 2.2.2 und 2.2.3). Zum anderen auf der aus der Literatur bekannten Bedeutung der MAPK für die Regulation des Zellzyklus (vgl. Kapitel 2.1.2 im Fortsetzungsantrag). Daher ist geplant, die Beteiligung der MAPK an der Regulation des Zellzyklus zu prüfen (vgl. Arbeitsprogramm im Fortsetzungsantrag). Aus den zu erwartenden Ergebnissen sollten sich weitere Hinweise auf den Mechanismus der toxischen Wirkung von TEGDMA – der Modellsubstanz für Acrylate – sowie die darüber aktivierten zellulären Verteidigungsstrategien ergeben.

1.7 Zellzyklus: Kinetik der Wirkung eines Oxirans im Vergleich zu TEGDMA

Das Dimethacrylat TEGDMA und das Oxiran Epoxycyclohexyl-methyl-epoxycyclo-hexancarboxylat (= Epoxyd K-126) steigerten die Menge an ROS in humanen Hautfibroblasten (N1) und erzeugten oxyDNA (vgl. Kapitel 1.2 und 1.3). Vor allem die unterschiedliche Wirkung von N-Acetylcystein auf die Bildung von Mikrokernen durch beide Substanzen lässt jedoch unterschiedliche Mechanismen, auf denen die beobachteten genotoxischen Effekte beider Substanzen basieren vermuten (vgl. Kapitel 1.4). Nun ist bekannt, dass oxidative DNA-Schäden von zelleigenen regulatorischen Proteinen - etwa ATM (vgl. Kapitel 1.5) -, erkannt werden, die dann kontrollierend in den Ablauf des Zellzyklus eingreifen. Zur näheren vergleichenden Charakterisierung des Wirkungsmechanismus eines Oxirans mit demjenigen eines Acrylats wurde nun auch ihre Wirkung auf die Phasen des Zellzyklus humaner Hautfibroblasten (N1) untersucht. N1-Zellen besitzen in dieser Hinsicht dieselben Eigenschaften wie primäre humane Pulpazellen (Schweickl *et al.*, 2005). Veränderungen des Zellzyklus wurden anhand des prozentualen Anteils von Zellen in der G1-, S- und G2-Phase mit FACS ermittelt.

TEGDMA und das Oxiran veränderten den Zellzyklus in unterschiedlicher Weise. Eine Konzentration von 1mM TEGDMA führt bereits nach einer Expositionszeit von 2h zu einer Verzögerung des Zellzyklus in der G1-Phase. Die Zahl der Zellen in G1 stieg signifikant ($p < 0,05$) von 67% in unbehandelten Kontrollen auf 78% in TEGDMA-behandelten Kulturen (Abb. 14). In ähnlicher Weise stieg die Zahl der Zellen in G1 nach 6 und 24h von 62% und 64% in unbehandelten Kontrollen auf 72% und 73% in TEGDMA-behandelten Kulturen. Eine signifikante Veränderung der Zellzahl in G2 wurde nach 2h zwischen unbehandelten Kontrollen und TEGDMA-behandelten Kulturen nicht gemessen. Allerdings stieg die Zahl der Zellen in G2 in den TEGDMA-exponierten Zellkulturen nach 6h auf 24% (Abb. 14). Es ist denkbar, dass gerade zu diesem Zeitpunkt die Kontrollpunkte (*checkpoints*) am Übergang von G1 in die S-Phase und von G2 in M (Mitose) besonders aktiviert waren.

Die Wirkung des Oxirans auf den Zellzyklus war anders als die des TEGDMA, und abhängig von der einwirkenden Konzentration und der Dauer der Exposition. Sämtliche Konzentrationen von K-126 verursachten nach 2h eine Verzögerung des Zellzyklus in der G2-Phase. Die Zahl der Zellen in G2 stieg in den Kulturen, die 0,1, 0,3 oder 2,0mM K-126 exponiert waren von 15% in unbehandelten Kontrollen auf 22%, 21% und 29% (Abb. 14). Parallel dazu sank die Zellzahl in der G1-Phase von 67% auf 56%, 60% und 54% (Abb. 14). Nach 6h Exposition war die Zellzahl in G1 lediglich in den mit 0,1 und 0,3mM K-126 behandelten Kulturen von 62% auf 56% und 55% reduziert. Nach 24h sank die Zahl der Zellen durch 0,1 und 0,3mM K-126 weniger stark von 64% auf 60% und 62%. In den mit 2,0mM K-126 behandelten Kulturen war nach 6h und 24h Exposition die Zellzahl in G1 ähnlich hoch wie in der ursprünglich ausgesäten Zellkultur (Abb. 14). Man darf daher vermuten, dass mit zunehmender Expositionsdauer steigende K-126 Konzentrationen stärker zytotoxisch wirken und einen steigenden Anteil an Zellen irreversibel im momentanen Stadium des Zellzyklus fixieren. Diese Hypothese wird gestützt durch die Veränderungen der Zahl der Zellen in der G2-Phase. Die Zellzahl in G2 stieg nach 6h in den Kulturen, die 0,1mM K-126 exponiert waren von 15% in unbehandelten Kontrollen auf 23%, mit 0,3mM K-126 jedoch nur auf 20%. Nach 24h Exposition induzierte 0,1mM K-126 noch eine Erhöhung der Zahl der Zellen von 21% in unbehandelten Kontrollen auf 27%, mit 0,3 und 2,0mM K126 jedoch sank die Zellzahl auf 17% und 7% (Abb. 14).

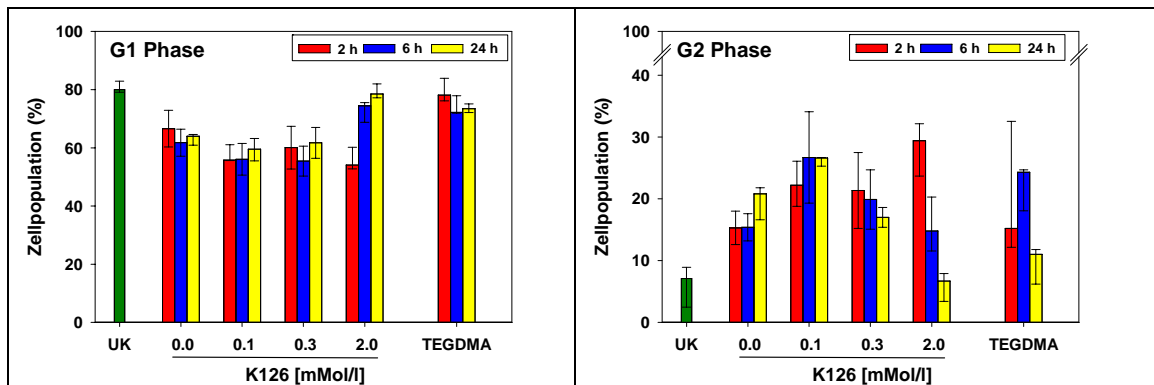


Abb. 14: Die Wirkung eines Oxirans (K-126) auf den Zellzyklus im Vergleich zu TEGDMA. Die Grafen zeigen die Verteilung der humanen Hautfibroblasten (N1) zwischen den Phasen G1 und G2 des Zellzyklus nach der Exposition gegen steigende Konzentrationen von K-126 im Vergleich zur Wirkung von 1mM TEGDMA dargestellt. Der Prozentsatz der Zellen in jeder Phase wurde basierend auf individuellen Histogrammen in 3-5 unabhängigen Experimenten berechnet. Die Balken stellen die Mediane (mit 25% und 75% Perzentilen) dar.

TEGDMA wirkt also auch in normalen humanen Hautfibroblasten und verzögert den Zellzyklus vor allem in G1, das Oxiran jedoch in G2. Höhere Konzentrationen des Oxirans sind wegen der starken Zytotoxizität physiologisch irrelevant. Man darf daher annehmen, dass die beiden Vertreter der Acrylate und Oxirane (Epoxide) über vollkommen verschiedene Mechanismen genotoxisch wirken. TEGDMA wahrscheinlich indirekt über ROS und oxidative DNA-Schäden, das Oxiran hingegen wirkt wahrscheinlich direkt, nicht über oxidative DNA-Schäden (vgl. Kapitel 1.3).

Auch für die nähere Charakterisierung der Wirkung des Oxirans auf den Zellzyklus sollte die Funktion von MAPK analysiert werden. Die Untersuchung der Wirkung eines Epoxids auf die Aktivierung von MAPK wäre sogar für sich über den Bereich der unmittelbaren Anwendung von Werkstoffen in der Zahnheilkunde hinaus wichtig.

1.8 Zeitabhängige Wirkung von TEGDMA auf den Zellzyklus

Parallel zu den Analysen der TEGDMA-induzierten Veränderungen der Genexpression (vgl. Kapitel 1.9) wurde auch die zeitabhängige Wirkung des Monomers auf den Zellzyklus normaler humaner Fibroblasten bestimmt. Diese Ergebnisse sind in *Biomaterials* publiziert (Schweikl *et al.*, 2008). Dazu wurden Zellkulturen 2, 6 und 24 Stunden mit TEGDMA behandelt und die Zahl der Zellen in der G1-, S- und G2-Phase nach jeweils 24h bestimmt (Abb. 15). Die Zahl der Zellen in den jeweiligen Phasen des Zellzyklus veränderte sich mit der TEGDMA-Konzentration und mit der Expositionsdauer. Bereits nach einer Exposition von 2h stieg die Zahl der Zellen in der G1-Phase von 53% in unbehandelten Kontrollen auf 65% und 71% in den Kulturen, die mit 1 und 3mM TEGDMA behandelt worden waren. Entsprechend sank die Zellzahl in der S- und G2-Phase. Ähnliche Ergebnisse wurden nach 6h Exposition erzielt, lediglich die Zahl der Zellen in der G2-Phase wurde durch 3mM TEGDMA nach 6h verglichen mit der Situation nach 2h erhöht. Die hohe TEGDMA-Konzentration war dann auch in der Verzögerung der G1-Phase nach 24h Exposition sehr wirksam (Abb. 15). Weil 3mM TEGDMA bereits nach 6h signifikante Veränderungen der Zahl der Zellen in der G1- und in der G2-Phase bewirkten, wurden diese Konzentration und diese Expositionsdauer für die Analyse der Genexpression mit DNA-Mikroarrays gewählt (vgl. Kapitel 1.9).

Die zeitabhängige Prüfung der Wirkung von TEGDMA auf dem Zellzyklus zeigte, dass das Monomer bereits nach sehr kurzen Expositionzeiten den Zellzyklus behandelter Zellen veränderte. Dies verweist möglicherweise auf die sehr frühe Induktion von DNA-Schäden durch TEGDMA und

parallel dazu die sehr frühe Aktivierung von Kontrollpunkten (*checkpoints*) an den Übergängen zu den aufeinander folgenden Phasen des Zellzyklus. Es ist sehr wahrscheinlich, dass auch an dieser frühen Aktivierung des Kontrollpunktes MAP Kinasen beteiligt sind und eine Verbindung zu den durch DNA-Schäden aktivierten regulatorischen Proteinen des Zellzyklus wie ATM oder P53 besteht. Daher soll die Funktion der MAPK für die Regulation des Zellzyklus im beantragten Folgeprojekt charakterisiert werden (vgl. Arbeitsprogramm im Fortsetzungsantrag)

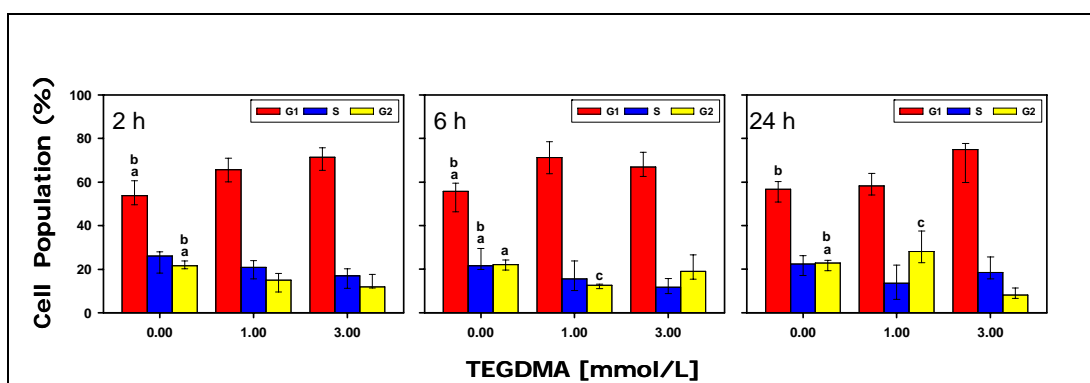


Abb 15. Analyse des Zellzyklus in humanen Hautfibroblasten. Die Verteilung der Zellen auf die drei Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2) nach Exposition gegen 1 und 3mM TEGDMA ist hier dargestellt. Die Säulen stellen Mediane (25% und 75% Perzentile) dar (n=3-5). Die Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zellpopulationen in G1, S oder G2: (a) signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten Kulturen solchen, die mit 1mM TEGDMA behandelt wurden; (b) signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten Kulturen solchen, die mit 3mM TEGDMA behandelt wurden; (c) signifikante Unterschiede zwischen Kulturen, die mit 1 und 3 mM TEGDMA behandelt wurden.

1.9 Die Aktivierung zellulärer Verteidigungsstrategien auf der Transkriptionsebene durch TEGDMA

Allgemeines

Die Analyse der Expression von Proteinen mit zentraler Funktion für die Regulation des Zellzyklus auf der Transkriptionsebene wurde als ein Teilprojekt des Arbeitsprogramms der aktuellen Förderperiode durchgeführt. Die ursprünglich geplante Strategie der Analyse einzelner Gene mit PCR wurde jedoch durch die Anwendung von Affymetrix DNA-Mikroarrays ersetzt. Diese Untersuchung der Veränderung im gesamten Genom exponierter Zellen war über die Zusammenarbeit mit Experten am hiesigen Kompetenzzentrum für Fluoreszenz Bioanalytik KFB (Biopark Regensburg) möglich geworden. Für die präzise Prüfung der Affymetrix-Rohdaten selbst haben wir allerdings nicht auf Standardprogramme zurückgegriffen, sondern die eigenen personellen Ressourcen (Dr. K.-A. Hiller, Diplommathematiker) genutzt.

Dieses Projekt war nicht zuletzt deshalb sehr erfolgreich, weil auf diese Weise eine unerwartet große Zahl von Genen mit Funktionen in der zellulären Antwort auf die Exposition gegen Monomere identifiziert wurde. Für diese in ihrer Expression veränderten Gene wurden Netzwerke identifiziert, und es war möglich, auf zelluläre Verteidigungsstrategien zu schließen. So wurden vor allem Gene in den TEGDMA-behandelten Kulturen differenziell reguliert, die eine protektive Funktion in der zellulären Reaktion auf oxidativen Stress auf drei Ebenen übernehmen: Auf der Ebene der Regulation der Transkriptionsfaktoren selbst, auf der Ebene der Steuerung der Signaltransduktion etwa über MAP Kinasen und damit assoziierte Phosphatasen sowie auf der Effektorebene, etwa über das Thioredoxin-System übernehmen. Diese Ergebnisse wurden in *Biomaterials* publiziert (Schweickl *et al.*, 2008)

Analyse der Genexpression in TEGDMA-behandelten Zellkulturen

Die Veränderungen der Genexpression in TEGDMA-behandelten Zellkulturen wurden mit Affymetrix DNA-Mikroarrays (HG-U133A 2.0) untersucht. Parallel dazu wurden Veränderungen des Zellzyklus sowie der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) gemessen (vgl. Kapitel 1.2 und 1.8).

Die DNA-Mikroarrays mit insgesamt 22.227 Probesets wurden zunächst mit der GeneChip Operating Software (GCOS) analysiert. Danach wurden diese Rohdaten nach eigenen Vorgaben mit SPSS (Version 13.0, SPSS, Chicago) statistisch bearbeitet. Dazu wurde das Verhältnis eines Signals eines Probesets auf Arrays mit Proben TEGDMA-behandelter Kulturen mit dem Signal desselben Probesets in Kontrollen als *signal-log-ratios* (SLR) verglichen. Auf diese Weise wurden insgesamt 9 Werte für ein Probeset errechnet und Mediane dieser SLRs wurde herangezogen, um Veränderungen in der Expression von Genen in TEGDMA-behandelten Kulturen zu erkennen. Diese SLRs wurden danach mit der Ingenuity Pathways Analysis (IPA) Software (Ingenuity Systems, Mountain View) bearbeitet, um funktionelle Beziehungen identifizierter Gene und Netzwerke zu beschreiben (geneontology).

Die DNA-Chips detektierten nach den oben beschriebenen Kriterien 10.727 Transkripte in den insgesamt 22.277 Probesets als präsent (P) in behandelten und unbehandelten Kulturen. Davon fehlten 25 Transkripte in Kontrollen, wurden aber in behandelten Kulturen detektiert, und 28 Transkripte wurden in Kontrollen detektiert, waren aber in behandelten Kulturen nicht nachweisbar. Auf der Basis von SLRs ≥ 1.0 wurden insgesamt 50 Gene identifiziert, deren Expression mindestens 2-fach erhöht war, während die Expression von 113 Genen mit SLRs ≤ -1.0 mindestens um die Hälfte reduziert war. Ingenuity Pathways Analysis (IPA) erzeugte hierarchische Cluster von Genprodukten mit den am häufigsten betroffenen allgemeinen Zellfunktionen. Dabei war die Veränderung der Expression von Genen statistisch überrepräsentiert, die eine Funktion in der Regulation des Zellzyklus, der Zellproliferation und des Zelltods übernehmen. Dazu zählen beispielsweise ATF3 (*activating transcription factor 3*), DUSP1 (*dual specificity phosphatase 1*), Mdm2 (*transformed 3T3 cell double minute 2*), TXNIP (*thioredoxin interacting protein*) und CCNA2. Außerdem war die Expression von Genprodukten verändert, die mit DNA-Replikation, Rekombination und der DNA-Reparatur assoziiert sind. Jedoch war die Veränderung der Expression zentraler Regulatoren des Zellzyklus wie etwa MYC (SLR = +0.63), ATM (SLR = -0.28), ATR (SLR = -0.44) oder p53 (SLR = -0.29) eher gering. Man darf daher annehmen, dass diese Proteine sowie ihre Zielproteine nach 6h Exposition der Zellkulturen gegen TEGDMA wahrscheinlich eher durch posttranslationale Modifizierung, beispielsweise durch Phosphorylierung aktiviert werden. Daher erscheint es auch sinnvoll, die Aktivierung dieser Proteine mittels Proteomanalyse zu charakterisiert.

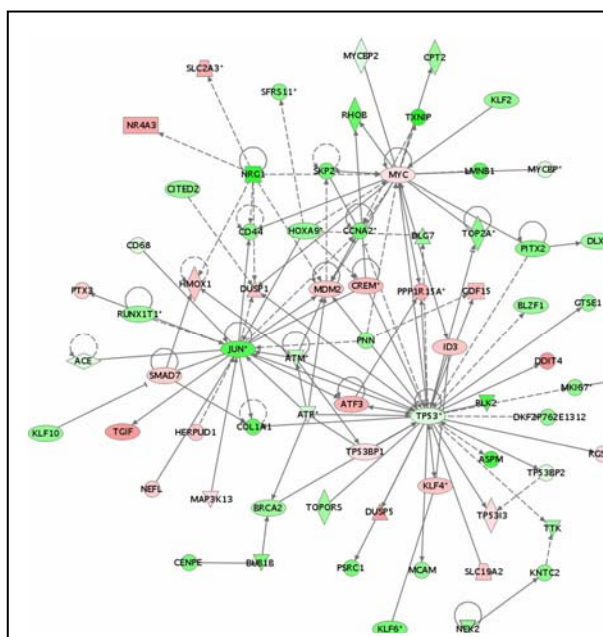


Abb. 16. Netzwerk von Genen mit veränderter Expression in TEGDMA-behandelten Zellkulturen. Die Zellen wurden nach 6h Exposition analysiert. Die mRNAs mit veränderter Expression aufgrund der errechneten SLRs wurden mit IPA analysiert. Raufregulierte Gene erscheinen in rot, runterregulierte Gene in grün.

Die Netzwerke von Genprodukten mit korrelierten Funktionen, die mit IPA entwickelt wurden, stellten MYC und vor allem p53 in zentraler Position dar (Abb. 16). Das p53 regelt als Transkriptionsfaktor so verschiedene Signalwege wie die zur Apoptose, der Regulation des Zellzyklus oder der DNA-Reparatur. Viele der hier identifizierten differenziell exprimierten Gene in den TEGDMA-behandelten Zellkulturen werden offensichtlich von p53 reguliert (*downstream targets*). So wurde ersichtlich, dass beispielsweise p53 in TEGDMA-behandelten Kulturen unmittelbar auf DDIT4 (*DNA-damage-inducible transcript 4*) (SLR = 2.3267), ID3 (*inhibitor of differentiation/DNA binding 3*) (SLR = 1.2146), die Transkriptionsfaktoren ATF3 (SLR = 1.7071) und KLF4 (*Kruppel-like factor 4*) (SLR = 1.1985) oder die MAPK-Phosphatase DUSP5 (*dual-specificity protein tyrosine phosphatase 5*) (SLR = 2.0471) wirkt.

Mit Faktor 17 war in den TEGDMA-behandelten Kulturen die Expression von *GEM* (SLR = 4.0687) am stärksten hochreguliert. *GEM* gehört zu den kleinen G-Proteinen der RAS-Familie und übernimmt Funktionen bei der Organisation des Zytoskeletts. Andererseits war die Expression von *TXNIP* (*thioredoxin-interacting protein*) (SLR = -2.3543) - ein Protein für die Regulation des zellulären Redoxzustandes und der Apoptose -, in den TEGDMA behandelten Kulturen am stärksten inhibiert (5-fach) (Abb. 17). Alle anderen Gene, deren Expression durch TEGDMA stark verändert war, werden im Folgenden in Zusammenhang ihrer Funktion und ihrer Position in einem funktionalen Netzwerk von Genen ausführlicher diskutiert.

Die relativ geringe Zahl an Genen, deren Expression anscheinend durch TEGDMA differenziell reguliert wird, verweist auf eine spezifische Reaktion exponierter Zellen (vgl. Tabellen in Schweickl *et al.*, 2008). Die meisten dieser Gene übernehmen Funktionen im Netzwerk der zellulären Reaktion auf oxidativen Stress, der Regulation des Zellzyklus und der Organisation der Zellstruktur. Damit besteht der große Fortschritt der hier erzielten Ergebnisse in der Identifizierung der Gene und Genprodukte, die die oben beschriebenen Phänomene der Produktion von ROS, oxidativer DNA-Schäden, Induktion von Mikrokernen, Verzögerung des Zellzyklus, Aktivierung von Signaltransduktionswegen oder Apoptose regulieren.

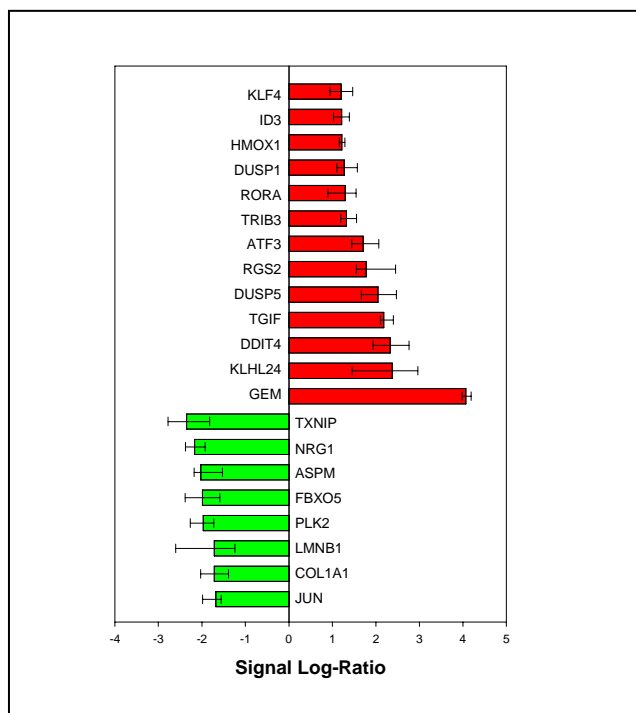


Abb. 17. Die am meisten veränderten Gene in TEGDMA-behandelten Zellkulturen. Die Veränderungen sind als mediane SLRs dargestellt (n=9).

Gene mit direkter Kontrolle über die Reaktion auf TEGDMA-induzierten oxidativen Stress

Viele der hier identifizierten Gene mit veränderter Expression fungieren in der zellulären Reaktion auf TEGDMA-induzierten oxidativen Stress. So wurde die Expression von ATF3 (*activating transcription factor 3*), ein Mitglied der Familie der ATF/CREB Transkriptionsfaktoren durch TEGDMA stark aktiviert. Diese Transkriptionsfaktoren reagieren auf unterschiedliche Faktoren, die zellulären Stress auslösen, einschließlich oxidativen Stress und DNA-Schäden. Die Aktivierung von ATF3 ist ein starker Hinweis darauf, dass der gesamte Signalweg über NFκB aktiviert wird. Die Aktivierung von NFκB durch das Monomer HEMA wurde von unserer Arbeitsgruppe kürzlich gezeigt. ATF3 stabilisiert wahrscheinlich auch das p53 und damit die zelluläre Reaktion auf genotoxischen Stress. RORA (*receptor-related orphan receptor alpha*) ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der durch oxidativen Stress aktiviert wird und eine Funktion bei der Regulation der Zellproliferation und der Apoptose übernimmt.

Die Aktivierung der Expression von DUSP1 und DUSP5 durch TEGDMA ist ein indirekter Hinweis darauf, dass die MAPK Signalkaskade durch Phosphorylierung sehr stark aktiviert wurde. Diese starke und dauerhafte Aktivierung durch TEGDMA wurde zumindest für ERK1/2 nach 6h Exposition in den RAW-Zellen in der laufenden Förderperiode nachgewiesen (vgl. Kapitel 2.2.1). DUSP1 und DUSP5 gehören zur Familie der dualspezifischen Tyrosinphosphatasen (DSPs), die spezifisch MAP Kinasen über die Dephosphorylierung von Phosphothreonin und Phosphotyrosin inaktivieren (Fox *et al.*, 2004). Anscheinend wird die Transkription von DUSP5 direkt von p53 reguliert und ist möglicherweise ein neuer Mechanismus, wie p53 den Zellzyklus negativ regulieren kann. Auch die Expression von DUSP1 wird in humanen Hautfibroblasten durch oxidativen Stress gefördert. Möglicherweise übernimmt auch DUSP1 eine Rolle in der negativen Regulation der Zellproliferation (Owens und Keyse, (2007). Auch diese Beobachtung korreliert mit den hier erzielten Ergebnissen, denn TEGDMA inhibiert den Zellzyklus (vgl. Kapitel 1.7 und 1.8).

Die Annahme, TEGDMA könnte unmittelbar und dauerhaft MAPK aktivieren und dualspezifischen Proteinphosphatasen entgegenwirken, wird durch die Aktivierung der Expression von TRiB3 (*tribbles homolog 3*) gestützt. TRiB3 ist eine Proteinkinase, die ihrerseits durch zellulären Stress aktiviert wird und AKT1, MAPK8, P38 MAPK und ERK aktiviert. TRiB3 selbst wird wiederum durch NFκB reguliert. TRiB3 gilt als proapoptotisches Protein, das den Akt/PKB-abhängigen Signalweg aktiviert. Anscheinend koordinieren TRiB3 als regulatorisches Protein mehrere Signalwege, für die bisher kein Zusammenhang hergestellt werden konnte (Hegedus *et al.*, 2006).

Die Hochregulierung des kürzlich beschriebenen Stressgens DDIT4 (*DNA-damage-inducible transcript 4*) ist ein weiterer Hinweis darauf, dass ROS wohl die hauptsächliche Ursache für die zelluläre Wirkung von TEGDMA sind. Auch die Induktion oxidativer DNA-Schäden, ein wesentliches Signal für die Aktivierung von DDIT4, ist einer der Effekte in Zellen, die TEGDMA exponiert waren (vgl. Kapitel 1.4). DDIT4 ist wahrscheinlich im Signalweg über AKT an der Induktion von Apoptose beteiligt. TEGDMA induzierte als weiteres redox-sensitives Protein die Expression der Hämoxxygenase-1 (HMOX1). HO-1 ist eines der Proteine mit antioxidativer Funktion, dessen Expression durch das Nrf2/ARE-System reguliert wird und das Zellen gegen oxidative Schäden schützt (Chen und Kunsch, 2004).

Die vermehrte Expression von Genprodukten mit protektiver Funktion gegen oxidativen Stress wird komplementiert durch die sehr starke Inhibition der Expression von TXNIP durch TEGDMA. TXNIP (thioredoxin-interacting protein) ist ein negativer Regulator der Funktion von Thioredoxin (Nishiyama *et al.*, 1999). TXNIP bindet als ubiquitäres Protein mit hoher Affinität an Thioredoxin und verhindert damit die Reduktion oxidierter SH-Gruppen durch Thioredoxin via NADPH-Oxidation. Das Thioredoxin-System selbst ist ein Thioloxidoreduktase-System, das den zellulären Redoxzustand reguliert (Patwari *et al.*, 2006).

Gene, die den Zellzyklus und die Zellproliferation regulieren

Neben der Regulation der Expression von Genen mit Funktionen in der unmittelbaren Reaktion auf oxidativen Stress, war die Expression von Genen, die den Zellzyklus und die Zellproliferation steuern durch TEGDMA verändert. Vor allem in diesem Netzwerk wurden Gene identifiziert, die in dieser Funktion bisher selbst über die beschriebenen Phänomene nicht mit der Wirkung dentaler Monomere zu verbinden waren. Beispielsweise wurde die Expression von ID3 (*inhibitor of differentiation/DNA binding 3*) durch TEGDMA hochreguliert. ID3 gehört in die Familie von Transkriptionsfaktoren der *helix-loop-helix* (HLH) Proteine. Die Expression von ID1 und ID3 in recht verschiedenen Zelltypen wird mit der Regulation der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung assoziiert (Asp *et al.*, 1998). Möglicherweise diesem Genprodukt beigeordnet ist die Funktion des TG-interacting factor (TGIF), ein Mitglied der TALE (*three-amino-acid loop extension*) *homeodomain-containing proteins*, konservative Regulatoren der Transkription. Dieses Protein ist ein Regulator der G1-Phase des Zellzyklus. Die induzierte Expression von KLF4 (*Kruppel-like factor 4*) als Reaktion auf TEGDMA könnte zu einer erhöhten Expression von p21 führen, ein CDK-Inhibitor und Regulator des Zellzyklus als Reaktion auf die Induktion von DNA-Schäden. KLF4 könnte ebenfalls p53 regulieren, und es wurde vorgeschlagen, dass KLF4 bevorzugt Signalwege der DNA-Reparatur aktiviert (Rowland *et al.*, 2005).

Die erhöhte Expression von RGS2 (*regulator of G-protein signaling*) ist ein Hinweis darauf, dass ein Teil der Information zwischen der Bildung von oxidativem Stress durch TEGDMA und der Regulation des Zellzyklus wahrscheinlich über kleine G-Proteine übertragen wird. RGS2 fungiert unmittelbar an der Signalübertragung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren und seine Expression wird auch über Signale der Zellzyklusregulation als Folge von oxidativem Stress gesteuert (Song und Jope, 2006).

Andererseits fördern auch die inhibierte Expression von NRG1, JUN, PLK2 und FBXO5 regulatorische Mechanismen, die schließlich die Zellproliferation inhibieren. So ist beispielsweise FBXO5 (*F-box protein 5* oder *Emi1*) ein Inhibitor des *anaphase promoting complex* (APC), ein entscheidender Regulator der Zellteilung. *Emi1* (*early mitotic inhibitor*) inhibiert den Abbau von Cyclin und erlaubt damit die Akkumulation von Cyclin in der Interphase des Zellzyklus (Jackson, 2004). Die inhibierte Expression von *Emi1* durch TEGDMA führt wahrscheinlich dazu, dass Cycline kontinuierlich durch APC mit Ubiquitin markiert und durch das Proteasom abgebaut werden. Folglich werden weniger funktionale Komplexe zwischen, beispielsweise Cyclin A und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) gebildet und der Übergang aus der G1- in die S-Phase ist verzögert.

Gene mit Funktionen in der Organisation der zellulären Struktur

Andere Gene mit veränderter Expression durch TEGDMA übernehmen Funktionen in der Organisation der Zellstruktur. Die Inhibition von ASPM (*abnormal spindle-like microcephaly associated*) etwa verweist darauf, dass TEGDMA die korrekte Ausbildung der mitotischen Spindelfasern und damit die Zellproliferation stören könnte (Zhong *et al.*, 2005). Es aber auch möglich, dass ASPM an der Reaktion auf induzierte DNA-Schäden und der Regulation der Kontrollpunkte des Zellzyklus beteiligt ist. Lamine wiederum stabilisieren den Zellkern, die Chromatinstruktur und die Genexpression. Die reduzierte Expression von LMNB1 (Lamin B1) führt wahrscheinlich zur Inhibition der Matrix zur Ausbildung von Mikrotubuli während der Mitose (Tsai *et al.*, 2006). COL1A1 (*type I collagen*) bildet ebenfalls Fibrillen und ist wichtig für die Ausbildung der Zell-Matrix-Adhäsion und die Zelldifferenzierung. Die Inhibition der Expression von COL1A1 erfolgt wahrscheinlich über Ras und einen MAPK Signalweg (Thomas *et al.*, 2005).

Die Expression von GEM, ein kleines GTP-bindendes Protein, wurde in den TEGDMA-behandelten Kulturen am stärksten raufreguliert. GEM gehört zusammen mit RAD, REM1 und REM2 zu den RGK-Proteinen, ein Teil der Ras-Superfamilie. GEM ist ein negativer Regulator des Rho-Rho Kinase Signalwegs zur Organisation des Zytoskeletts (Splingard *et al.*, 2007). Eine stark erhöhte Menge von GEM führt zu morphologischen Veränderungen, die intakte Mikrotubuli und Mikrofilamente benötigen (Oyama *et al.*, 2004).

Man darf daher annehmen, dass GEM und vielleicht KLH24 hochreguliert sind, um dem Abbau des Zytoskeletts wegen schwerer Zellschäden entgegenzuwirken. Außerdem könnte KLH24 eine ähnliche Rolle übernehmen wie etwa Keap1 (*Kelch-like ECH associating protein 1*), weil TEGDMA mehrere Gene als Reaktion auf oxidativen Stress aktiviert oder inaktiviert. Keap1 ist ein redox-sensitives thiolreiches Sensorprotein, das Nrf2 (*nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*) reguliert.

Diese Untersuchung zeigt, dass TEGDMA zellulären Stress mit einer spezifischen Reaktion auf der Ebene der Transkription erzeugte. Die meisten der differenziell regulierten Gene spielen eine zentrale Rolle in funktionalen Netzwerken der Reaktion auf oxidativen Stress, der Regulation der Zellproliferation und Morphologie, des Zelltods, der Genexpression und der DNA Replikation und Reparatur. Diese Analysen der Expression führten auch zur Detektion neuer Gene, die die Zellproliferation und die Zellstruktur als Reaktion auf die Behandlung mit TEGDMA regulieren. Die Produktion von ROS und die damit verbundene Regulation der zellulären Redox-Homöostase sind die entscheidend wichtigen Faktoren der Aktivierung oder Inaktivierung der Genexpression. MAP Kinasen und die sie regulierenden Phosphatasen (DUSP) übernehmen auch hier eine zentrale Funktion der Regulation. Die koordinierte Induktion von Genen der Reaktion auf oxidativen Stress ist somit ein kritischer Mechanismus der Protektion gegen TEGDMA-induzierte Zellschäden.

2. Die Wirkung von Monomeren auf zelluläre Signalwege

2.1 Der Einfluss von TEGDMA auf das angeborene Immunsystem (*innate immunity*)

Die Expression von Zytokinen und Oberflächenantigenen sind zwei zentrale Leistungen der angeborenen Immunantwort (*innate immunity*). Ähnlich wie die Regulation der Zellproliferation vor allem als zelluläre Reaktion auf DNA-Schäden oder die Aktivierung der zellulären Abwehr erhöhter Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), wird auch die Immunantwort über MAP Kinasewege gesteuert (Dong *et al.*, 2002). So regulieren die MAPK p38 und JNK sowie ERK1/2 die Kinetik der Expression von Zytokinen und Oberflächenantigenen als Reaktion auf Pathogene deren Bestandteile wie etwa Lipopolysaccharid (LPS).

Weil Immunzellen, Monozyten und Makrophagen, auch Zielzellen zahnärztlicher restaurativer Werkstoffe und ihrer Bestandteile sein können, wurde nun von uns geprüft, ob die Modells substanz TEGDMA auch auf die Expression von Zytokinen und Oberflächenantigenen wirken kann. Diese Ergebnisse sind in *Biomaterials* im Druck (Eckhardt *et al.*, 2009) und werden im Folgenden kurz zusammengefasst.

Es wurde die Expression von CD14 bestimmt, ein Oberflächenantigen, das Fremdkörper wie LPS bindet und dadurch eine Signalkaskade aktiviert. Außerdem wurden Veränderungen der Expression kostimulatorischer Moleküle, die Rezeptoren anderer Immunzellen während der Antigenpräsentation stimulieren, analysiert, etwa die von CD40, CD80 und CD86. Ferner wurden antigenpräsentierende Moleküle, die bakterielle Antigene binden und auf der Zelloberfläche präsentieren und damit für Zellen kenntlich machen, wie MHC I und MHC II (*major histocompatibility complex* I und II) untersucht. Schließlich wurde die Expression von CD54 (*intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1) untersucht, ein interzelluläres Adhäsionsmolekül, das die Bindung der Zellen untereinander verstärkt. Während bei dieser Art der Signaltransduktion der direkte Kontakt von Zelle zu Zelle nötig ist, werden Zytokine durch die Zellen in die Umgebung sezerniert und können dann durch andere Zellen detektiert und aufgenommen werden. In unseren Studien untersuchten wir die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und Interleukin 6 (IL-6) sowie des TNF α Antagonisten IL-10. TNF- α fördert eine entzündliche Immunantwort und ist einer der wichtigsten Signalstoffe, die durch LPS aktiviert werden (Männel und Echtenacher, 2000). Die Produktion von IL-6 wird wiederum von TNF- α -gesteuert. Zu den Funktionen von IL-6 gehören die Rekrutierung von

Neutrophilen, die Förderung der Proliferation von T-Zellen sowie die Produktion von Chemokinen (Horn *et al.*, 2000). Um eine zu starke Immunantwort zu verhindern, werden diese Funktionen durch IL-10 inhibiert. Ferner hemmt IL-10 die Aktivierung von CD80, CD86 und MHC I sowie die Aktivität von Makrophagen (Moore *et al.*, 2001).

Hier wurde der Einfluss steigender TEGDMA-Konzentrationen auf die Expression von Oberflächenantigenen und Zytokinen in LPS-stimulierten oder ansonsten unbehandelten RAW-Makrophagen untersucht. Da die unterschiedlichen Zytokine zu verschiedenen Zeiten sezerniert werden, wurden die Messungen nach 6, 24 und 48 h durchgeführt. Die Menge an freigesetzten TNF- α , IL-6 und IL-10 wurde mit ELISA bestimmt, die Analyse der Oberflächenantigene erfolgte zu den gleichen Zeitpunkten über einen fluoreszenzmarkierten Antikörper mit FACS (Beckman Coulter EPICS XL Durchflusszytometer).

Expression von Oberflächenantigenen

Die Stimulation von RAW-Zellen mit LPS führt zu einer etwa 100-fach höheren Oberflächenexpression seines Rezeptors CD14 nach 24 h verglichen mit unbehandelten Kontrollen (Abb. 18). Während geringe TEGDMA-Konzentrationen die LPS-stimulierte CD14-Expression leicht erhöhten, wurde die Expression von CD14 durch höhere TEGDMA-Konzentrationen inhibiert. Diese Reduktion lag bei LPS und 2mM TEGDMA bei 62% (Abb. 18).

Die Expression des T-Zell-Interaktionsmoleküls CD40 wurde durch TEGDMA in Verbindung mit LPS konzentrationsabhängig reduziert (Abb. 18). Setzt man die Expression nach Stimulation mit LPS zu 100%, so erreichten die Kombination von LPS mit 0,125 und 2,0mM TEGDMA noch 73 bzw. 3% des Vergleichswertes. Die CD40-Expression in unbehandelten Zellen lag bei 2% des LPS Wertes.

Diese Konzentrationsabhängigkeit konnte nach 24 h auch bei den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 beobachtet werden, allerdings waren die Effekte nicht ganz so ausgeprägt wie bei CD40 (Abb. 18). So resultierte die Kombination von LPS und 2mM TEGDMA in einer 74-prozentigen Reduktion der CD80-Expression sowie in einer 40-prozentigen Reduktion der CD86-Expression, jeweils bezogen auf die Werte von LPS.

Im Gegensatz dazu wurde die Expression von CD54 auf der Zelloberfläche durch TEGDMA in Verbindung mit LPS erhöht (Abb. 18). Auch dieser Effekt war konzentrationsabhängig: Bei Zugabe von LPS und 0,125mM TEGDMA lag die Erhöhung der CD54 Expression im Vergleich zu LPS bei 20%, nach Zugabe von LPS und 2,0mM TEGDMA dagegen bei 80%, jeweils nach 24 h Inkubationszeit. Auch wenn bei der Expression von MHC I eine Steigerung durch LPS und TEGDMA im Vergleich zu LPS alleine zu beobachten war, so waren diese Änderungen nicht signifikant (Abb. 18).

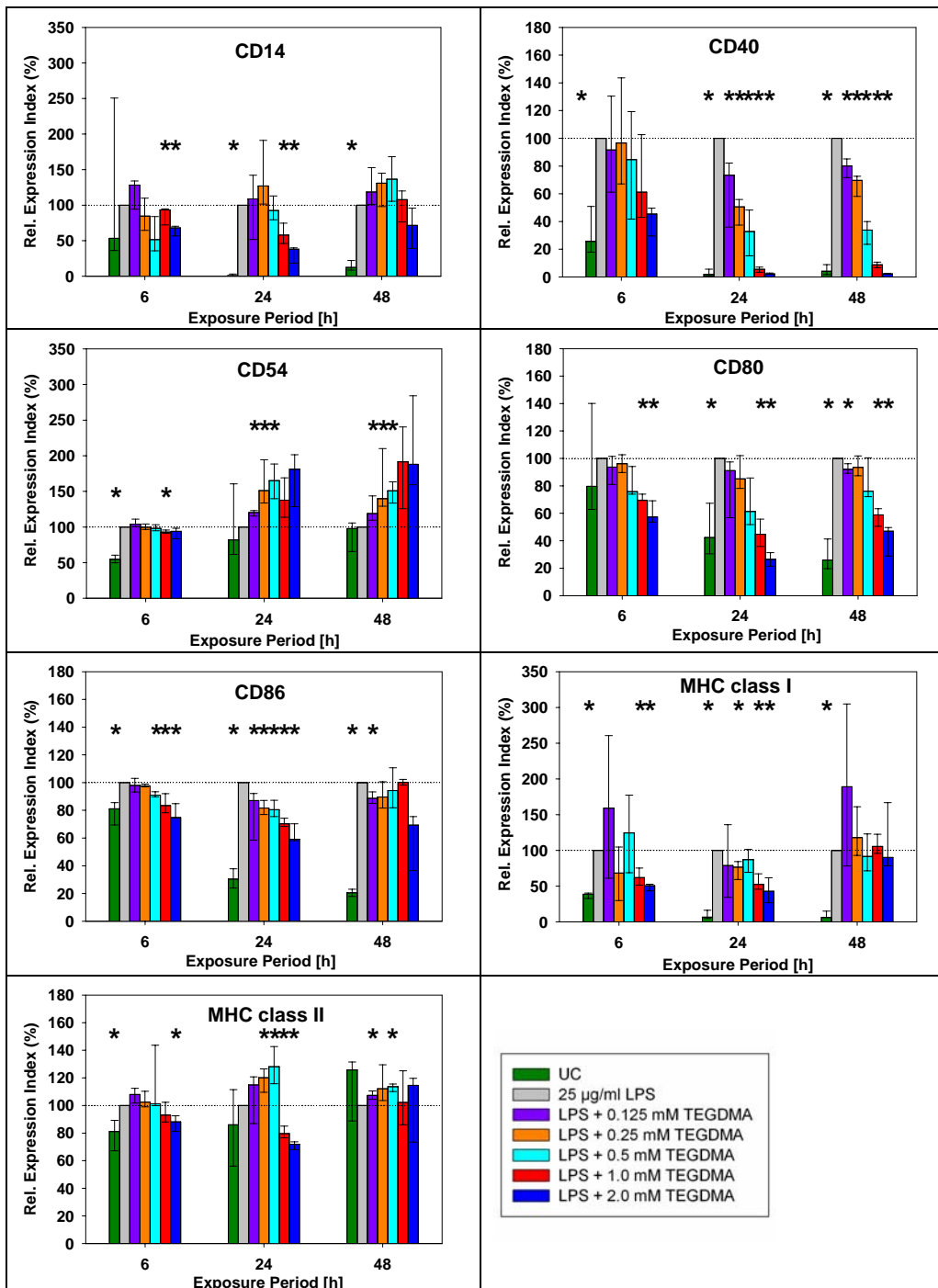


Abb. 18. Expression von Oberflächenantigenen in RAW Zellen nach Stimulation mit LPS oder LPS und steigenden TEGDMA-Konzentrationen. Sämtliche Indices für die Expression der Oberflächentigene sind auf LPS-stimulierte Zellkulturen bezogen (=100%). UC=unbehandelte Kontrolle. Es sind Mediane und Perzentile (25 und 75%) dargestellt (n=4-5).

Bei MHC II zeigten sich je nach Konzentration unterschiedlich Effekte: Während niedrige Konzentrationen (0,125- 0,5mM) nach 24 h zu einer Erhöhung führten, konnte bei 1,0 und 2,0mM

eine Senkung der Expression im Vergleich zur LPS Kontrolle beobachtet werden. Bei Stimulation mit TEGDMA ohne LPS zeigten sich meist nur geringfügige Änderungen in der Oberflächenantigenexpression. Signifikant waren nur die Verringerung der CD14 Expression bei 0,125 – 0,5mM TEGDMA, die Erhöhung der CD54 und MHCII Expression bei Zugabe von 2mM TEGDMA sowie der CD86 Expression bei 1 und 2mM TEGDMA. Diese Effekte traten jeweils nach 48 h auf (Daten nicht gezeigt).

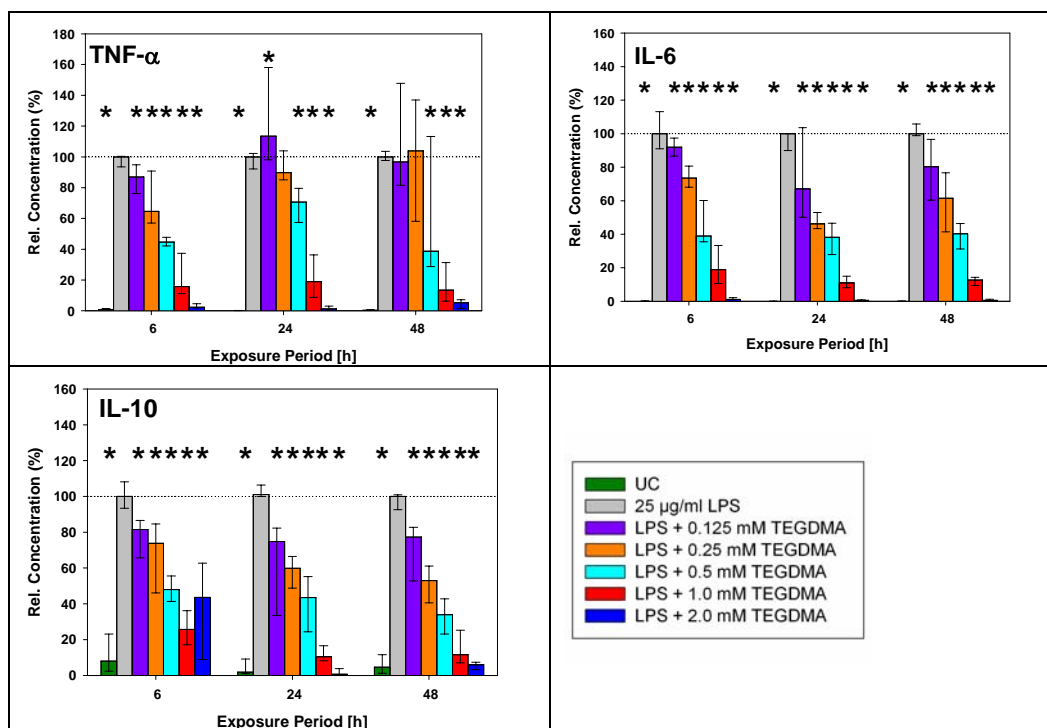


Abbildung 19: Sekretion von Zytokinen nach Stimulation von RAW Zellen mit LPS oder LPS und TEGDMA. Die Konzentrationen der Zytokine sind auf LPS-stimulierte Zellkulturen bezogen (=100%). UC=unbehandelte Kontrolle. Es sind Mediane und Perzentile (25 und 75%) dargestellt (n=4-5).

Sekretion von Zytokinen

Eine angemessene Zytokinantwort ist ein wichtiger Faktor in der Reaktion des Immunsystems auf pathogene Einflüsse. In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass keine der getesteten TEGDMA Konzentrationen (0,125 – 2,0mM) zur Sekretion der Zytokine TNF- α , IL-6 oder IL-10 führte (Abb. 19). Die Kombination von TEGDMA und LPS resultierte fast immer in einem Rückgang der Zytokinproduktion im Vergleich zu nur mit LPS behandelten Proben (Abbildung). Nach 24-stündiger Stimulation konnte dagegen eine signifikante Ausnahme gemessen werden: LPS und 0,125mM TEGDMA führten zu einer Erhöhung im Vergleich zu LPS. Eine weitere Erhöhung nach Kostimulation mit LPS und 0,25mM TEGDMA war nach 48h Exposition nicht signifikant (Abb. 19). Dagegen waren alle Reduktionen nach 6h signifikant und konzentrationsabhängig. So konnte z.B. nach Stimulation mit LPS und 0,125mM TEGDMA noch 87% der Vergleichskonzentration ohne LPS, bei LPS und 0,5mM bzw. 2,0mM nur noch 45 bzw. 2% der Vergleichskonzentration gemessen werden. Zu den Zeitpunkten 24 und 48 h führten LPS und TEGDMA Konzentrationen von 0,5 – 2,0mM zu signifikant niedrigeren TNF- α Sekretionen (Abb. 19).

Bei den Zytokinen IL-6 und IL-10 wurden zu allen Zeitpunkten und bei allen untersuchten TEGDMA/LPS Kombinationen signifikante Senkungen der Sekretion im Vergleich zu LPS gemessen (Abb. 19). Auch bei diesen Zytokinen betrug die maximale Reduktion mehr als 90%.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen, dass TEGDMA einen deutlichen Einfluss auf die Immunantwort von Makrophagen hat. Vermutlich inhibiert TEGDMA einen entscheidenden Schritt in der Immunantwort auf LPS. Dies zeigte sich in der signifikant reduzierten Zytokinsekretion. Die verringerte CD14-Expression vermindert die Zellantwort auf bakterielle Pathogene wie LPS. Auch die Reduktion in der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 deutet darauf hin, dass TEGDMA einen starken Einfluss auf die Immunkompetenz der untersuchten Makrophagen hat. Nimmt man diese Faktoren zusammen, so legen sie die Vermutung nahe, dass TEGDMA eine adäquate Immunantwort auf bakterielle Infektionen verhindern kann. Ferner kann diese Inhibition die Interaktion zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort unterbinden oder zumindest stark einschränken. Die Ergebnisse verweisen auch darauf, dass die Expression der Oberflächenantigene in den LPS-stimulierten und mit TEGDMA behandelten Zellen über wenigstens zwei verschiedene Wege reguliert wird. Zum einen wird die Expression der Oberflächenantigene durch LPS stimuliert. Zum anderen ist der Einfluss von TEGDMA auf die verschiedenen Oberflächenantigene unterschiedlich. So könnte die geringe Aktivierung der LPS-stimulierten CD14-Expression durch geringe TEGDMA-Konzentrationen und die Runterregulierung durch hohe TEGDMA-Konzentrationen bedeuten, dass CD14 anders reguliert wird als andere Oberflächenantigene. Möglicherweise ist die Regulation von CD14 an die von TNF- α wegen der Ähnlichkeit des Einflusses auf die LPS-Stimulation gekoppelt. Es gibt Anhaltspunkte in der Literatur, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 möglicherweise das Bindeglied zwischen der koordinierten TNF- α und CD14 Expression ist (Imai *et al.*, 2000). Damit könnte auch die MAP Kinase ERK1/2 eine wichtige Rolle spielen, die ihrerseits die Aktivität von AP-1 reguliert (Chalmers *et al.*, 2007). Die Runterregulierung der kostimulatorischen Oberflächenantigene CD40, CD80 und CD86 könnte bedeuten, dass ein redox-sensitiver Signalweg über AP-1 inhibitorisch auf diese Moleküle wirkt, die die Zell-Zell-Interaktion regulieren (Gwinn und Vallyathan, 2006).

Es gibt auch starke Hinweise darauf, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 ebenfalls die gesteigert Expression von CD54 durch TEGDMA steuert. Diese würde bedeuten, dass derselbe Mechanismus, der die Expression von Zytokinen und von CD14 inhibiert, die Expression eines anderen wichtigen Oberflächenantigens von Zellen des angeborenen Immunsystems, CD54 (ICAM-1) erhöht. Wiederum wurde berichtet, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) die Expression von CD54 steigern (Park *et al.*, 2006). Die Zellen reagieren dann über die Aktivierung von NF κ B, aber andere Faktoren können durchaus beteiligt sein (Munoz *et al.*, 1996). Möglicherweise wird die Expression von CD54 über ROS und einen ERK1/2-abhängigen Signalweg reguliert (Traore *et al.*, 2007).

Diese gravierend inhibitorischen Effekte von TEGDMA auf zentrale Funktionen des angeborenen Immunsystems sollen nun im Folgeprojekt näher charakterisiert werden. Bisher wurde lediglich das Phänomen beschrieben, der Mechanismus der Inhibition der Expression der Oberflächenantigene und Zytokine durch TEGDMA ist nicht bekannt. Es gibt starke Hinweise darauf, dass MAPK dabei eine zentrale Funktion übernehmen, es ist jedoch unbekannt, welche der MAPKs auf welche Weise durch TEGDMA spezifisch inhibiert wird. Ferner bliebe zu klären, wie schnell und an welcher Stelle die inhibitorische Wirkung von TEGDMA einsetzen kann. Außerdem verweist die im Unterschied zu allen anderen Oberflächenantigenen erhöhte Expression von CD54 durch TEGDMA auf vollkommen andere Mechanismen der Regulation. Die einzelnen Teilprojekte dieses Vorhaben sind im neuen Arbeitsprogramm formuliert (vgl. Fortsetzungsantrag).

2.2 Die differentielle Aktivierung stressaktivierbarer MAP Kinasen durch Monomere

2.2.1 Aktivierung von MAP-Kinasen in RAW264.7-Makrophagen durch Lipopolysaccharid

Die Aktivierung der MAP-Kinasen p38, ERK1/2 und JNK wurde in Form phosphorylierter Proteine mit phosphospezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen. Das Maß dieser Aktivierung ist als Verhältnis der phosphorylierten Form der MAPK zur gesamten Menge der jeweiligen MAPK ausgedrückt. Dazu wurde die Intensität einer Proteinbande im Western blot mit einem Densitometer (Scanner) gemessen und mit der Software Optimas 6.0 und einem Standard für Grauwerte quantifiziert.

Das bakterielle Endotoxin LPS ist ein bekannter Aktivator der MAP-Kinasen p38, ERK1/2 und JNK in Zellen des Immunsystems (Matsuzawa und Ichijo, 2005). LPS wurde auch hier verwendet, um die Aktivierung der MAP-Kinasen in RAW264.7 Makrophagen nach kurzen Expositionszeiten zu prüfen. Dazu wurden subkonfluente Kulturen (etwa 50% konfluent) von RAW-Zellen zwei verschiedenen Konzentrationen (0.1 und 0.5 µg/ml) von LPS für 15 min exponiert.

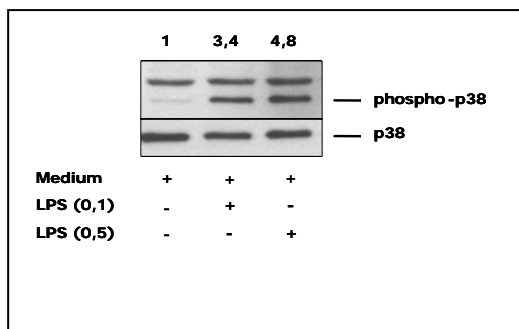


Abb. 20: Die Aktivierung von p38 in RAW 264.7 Makrophagen durch LPS. Phospho-p38 und p38 wurden mit spezifischen Antikörpern mit Western blotting in unbehandelten Kulturen (Medium) und in LPS-stimulierten Kulturen nachgewiesen. Die Zellkulturen wurden mit 0,1 oder 0,5 µg/ml LPS für 15 min stimuliert. Die Zahlen über den Bahnen zeigen die Höhe der Aktivierung als Verhältnis von phospho-p38/p38 bezogen auf unbehandelte Kulturen. Die Intensität der Banden wurden mit einem Densitometer (Scanner) gemessen und mit der Software Optimas 6.0 und einem Standard für Grauwerte quantifiziert.

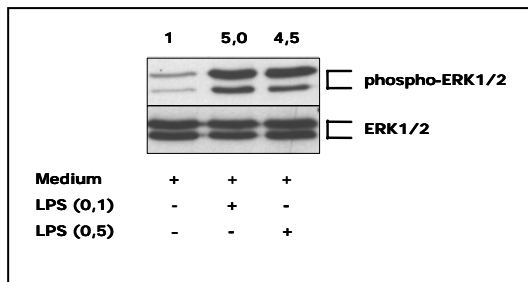


Abb. 21: Die Aktivierung von ERK1/2 in RAW264.7 Makrophagen durch LPS. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde mit einem spezifischen Antikörper mit Western blotting in unbehandelten Kulturen (Medium) und in LPS-stimulierten Kulturen nachgewiesen. Die Zellkulturen wurden mit 0,1 oder 0,5 µg/ml LPS für 15 min stimuliert. Die Zahlen über den Bahnen zeigen die Höhe der Aktivierung als Verhältnis von phospho-ERK1/2 / ERK1/2 bezogen auf unbehandelte Kulturen.

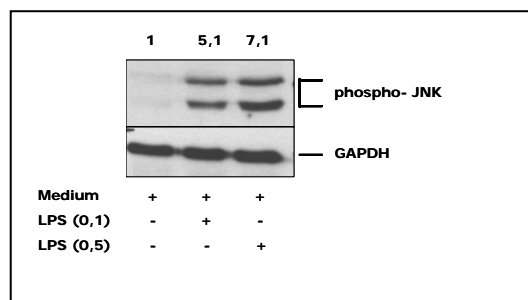


Abb. 22: Die Aktivierung von JNK in RAW264.7 Makrophagen durch LPS. Die Phosphorylierung von JNK1/2 wurde mit einem spezifischen Antikörper mit Western blotting in unbehandelten Kulturen (Medium) und in LPS-stimulierten Kulturen nachgewiesen. Die Zellkulturen wurden mit 0,1 oder 0,5 µg/ml LPS für 15 min stimuliert. Die Zahlen über den Bahnen zeigen die Höhe der Aktivierung als Verhältnis von phospho-JNK / GAPDH (Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase) bezogen auf unbehandelte Kulturen.

Die aktivierte, phosphorylierte Form des p38 war in unbehandelten RAW-Makrophagen nur schwach nachzuweisen. Die Stimulation der Zellen mit LPS hingegen führte zu einem deutlichen Anstieg der Menge an aktiviertem phosphorylierten p38. Die Aktivierung von p38 lag um den Faktor 3,4 (0,1 µg/ml LPS) und 4,8 (0,1 µg/ml LPS) über der Expression in unbehandelten Kontrollen. Die Expression der nicht aktivierten Form des p38 war in allen Kulturen gleich hoch (Abb. 20). Ähnliche Ergebnisse wie für p38 wurden für die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und JNK erzielt (Abb. 21 und 22).

Diese Experimente zeigen, dass beiden Formen der MAP-Kinasen, die aktivierte phosphorylierte sowie die nicht aktivierte Form, in RAW-Zellen unter den hier definierten experimentellen Bedingungen nachweisbar sind. Außerdem führt eine Stimulation der RAW-Makrophagen mit zwei verschiedenen LPS-Konzentrationen zu einer deutlichen Aktivierung von p38, ERK1/2 und JNK nach kurzen Expositionszeiten. Inwieweit die beiden LPS-Konzentrationen die MAP-Kinasen unterschiedlich stark aktivieren können, wurde hier nicht weiter untersucht, weil lediglich die Wirkung von LPS an sich wichtig war. Das hier gewählte Modell mit LPS als aktivierender Substanz sollte somit auch geeignet sein, eine Veränderung der aktiven Form der MAP-Kinasen durch dentale Monomere wie TEGDMA zu detektieren. Der Einfluss des TEGDMA auf die Aktivität der MAP-Kinasen wurde nun vergleichend mit LPS untersucht. Extrakte von RAW-Zellkulturen, in denen, wie oben beschrieben, die phosphorylierten Formen der drei MAP-Kinasen nach kurzzeitiger Stimulation mit LPS nachgewiesen wurde, dienten als Kontrollen im Western blotting.

2.2.2 Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von MAP-Kinasen in Makrophagen

Die rasche Antwort der RAW-Zellen auf die Stimulierung mit LPS stimmt mit den frühen Beobachtungen anderer Autoren zur Wirkung von LPS überein, und ist physiologisch sinnvoll, weil das angeborene Immunsystem als Abwehrsystem rasch auf bakterielle Pathogene reagieren sollte (Matsuzawa und Ichijo, 2005). Die Aktivierung von Signaltransduktionssystemen wie das der MAP Kinasen durch zytotoxische Monomere wie TEGDMA war bisher in Zellen des Immunsystems unbekannt. Es gab keine Hinweise, ob MAP Kinasen überhaupt durch Monomere aktiviert werden und ob diese Aktivierung zeitabhängig erfolgen könnte. Hier wurde die Aktivierung der MAP-Kinasen p38, ERK1/2 und JNK durch TEGDMA in den RAW-Zellen nach kurzen (15min und 30min), mittleren (1h und 2h) und langen (6h und 24h) Inkubationszeiten vergleichend mit LPS analysiert.

Die Aktivierung von p38 nach kurzen Expositionszeiten

Die aktivierte phosphorylierte Form des p38 war, wenn auch nur schwach, auch in unbehandelten RAW-Kulturen nachzuweisen. Die Stimulation der Zellen mit 0,1 µg/ml LPS für 15 min hingegen führte, wie erwartet, zu einem deutlichen Anstieg der Menge an phospho-p38. Die Aktivierung von p38 lag etwa um den Faktor 4 über der Expression in unbehandelten Kontrollen (Abb. 23). Eine etwa 3-fache Aktivierung des p38 wurden nach Kostimulation der RAW-Zellen mit LPS und 3mM TEGDMA bestimmt. Allerdings aktivierten 3 mM TEGDMA allein die p38 MAPK nicht. Daher darf man annehmen, dass die p38 Aktivierung durch die Kombination LPS/TEGDMA nach der kurzen Inkubationszeit von 15 min ausschließlich von LPS verursacht wurde (Abb. 23). Die nicht aktivierte Form des p38 war in unbehandelten und behandelten RAW-Kulturen gleichmäßig exprimiert (Abb. 23).

Eine entgegengesetzte Wirkung von LPS und TEGDMA auf die Aktivierung von p38 wurde bereits nach einer Expositionszeit von 30 min beobachtet (Abb. 23). Nun aktivierte LPS das p38 schon nicht mehr, die Kombination von LPS/TEGDMA jedoch aktivierte p38 etwa um den Faktor 3. Im Unterschied zu der kurzen Inkubationszeit von 15 min erhöhte nun auch TEGDMA alleine die Menge an phospho-p38 um den Faktor 2 verglichen mit unbehandelten Kulturen. Im Unterschied zur Stimulation von 15 min verursachte nach 30 min nun sehr wahrscheinlich nur TEGDMA, nicht das

LPS, die Aktivierung von p38 in der Kombination LPS/TEGDMA. Die Expression des nicht aktivierten p38 war wieder in sämtlichen RAW-Kulturen in etwa gleich (Abb. 23).

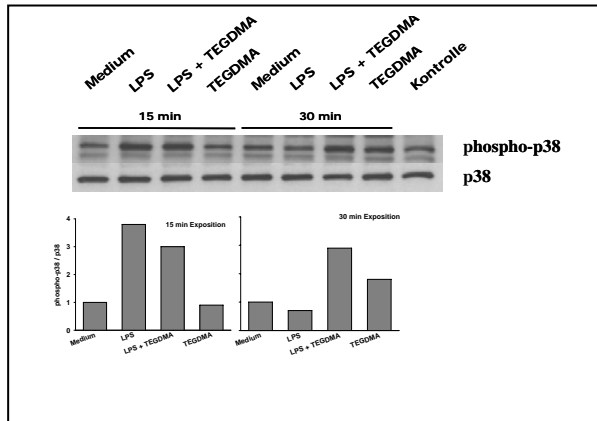


Abb. 23. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von p38 in RAW264.7 Makrophagen. Die Phosphorylierung von p38 wurde mit einem spezifischen Antikörper mit Western blotting in unbehandelten Kulturen (Medium), LPS, LPS plus TEGDMA, und TEGDMA-stimulierten Kulturen nachgewiesen. Die Zellkulturen wurden den Substanzen für 15 und 30 min exponiert. Als Kontrolle für den Immunblot wurden Extrakte von LPS-stimulierten Zellkulturen aus Vorversuchen verwendet (Kontrolle). Die Graphiken unter den Bahnen zeigen die Höhe der Aktivierung als Verhältnis von phospho-p38/p38 bezogen auf unbehandelte Kulturen.

Die Aktivierung von p38 nach mittleren Expositionenzeiten

Die MAPK p38 war auch nach mittleren Expositionenzeiten von 1h und 2 h in unbehandelten RAW-Kulturen in phosphorylierter Form nachweisbar (Abb. 24). Im Unterschied zu den kurzen Stimulationszeiten führten allerdings LPS und TEGDMA zu keiner Aktivierung von p38. Im Gegenteil, in den Kulturen, die für 1h mit LPS, LPS/TEGDMA oder TEGDMA alleine behandelt wurden sank die Menge an aktiviertem p38 sogar auf etwa 70-80% verglichen mit unbehandelten Kontrollen. Nach einer Expositionsdauer von 2h wurde phospho-p38 in LPS, LPS/TEGDMA oder TEGDMA behandelten Kulturen ebenfalls nachgewiesen, die Aktivierung in den stimulierten Kulturen lag allerdings nur etwa um den Faktor 1,2 über derjenigen unbehaltener Kulturen (Abb. 24). Das nicht aktivierte p38 wurde in allen RAW-Kulturen erneut in etwa gleicher Höhe nachgewiesen (Abb. 24).

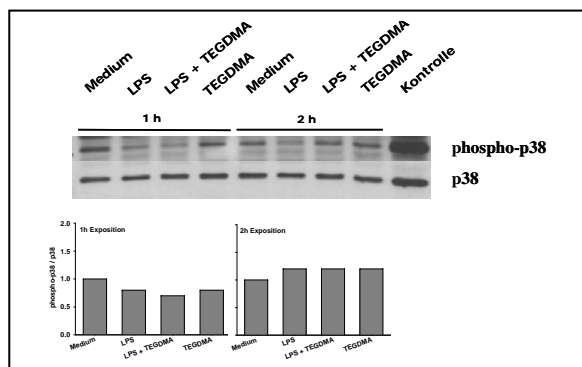


Abb. 24. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von p38 in RAW264.7 Makrophagen. Die Zellkulturen wurden den Substanzen für 1 Stunde (h) und 2 Stunden exponiert. Als Kontrolle für den Immunblot wurden Extrakte von LPS-stimulierten Zellkulturen aus Vorversuchen verwendet (Kontrolle). Die Graphiken unter den Bahnen zeigen die Höhe der Aktivierung als Verhältnis von phospho-p38/ p38 bezogen auf unbehandelte Kulturen. Es sind Daten aus einem repräsentativen Experiment gezeigt.

Die Aktivierung von p38 nach langen Expositionenzeiten

Nach langen Inkubationszeiten von 6h und 24h war phospho-p38 in unbehandelten RAW-Kulturen nicht mehr nachzuweisen (Abb. 25). Die Stimulation der Zellen mit LPS für 6h aktivierte p38 nur sehr geringfügig um den Faktor 1,2. Hingegen aktivierten LPS/TEGDMA und TEGDMA alleine das p38 deutlich um den Faktor 2. Die stärkste Aktivierung von p38 wurde nach einer Expositionszeit von 24h bestimmt. LPS erhöhte die Menge an phospho-p38 um den Faktor 4,5, und mit LPS/TEGDMA und TEGDMA alleine wurde sogar eine 15-fache Aktivierung gefunden. Daher darf man wiederum

vermuten, dass die starke Aktivierung von p38 in der Kombination LPS/TEGDMA wohl durch TEGDMA alleine verursacht wurde.

Die nicht aktivierte Form von p38 war nach 6h Exposition gegen LPS, LPS/TEGDMA und TEGDMA alleine in allen Ansätzen ähnlich hoch exprimiert wie in unbehandelten Kulturen. Bemerkenswert ist jedoch, dass nach einer Expositionszeit von 24h die mit LPS, LPS/TEGDMA und TEGDMA behandelten Kulturen weniger Gesamt-p38 exprimierten als unbehandelte Kontrollen (Abb. 25).

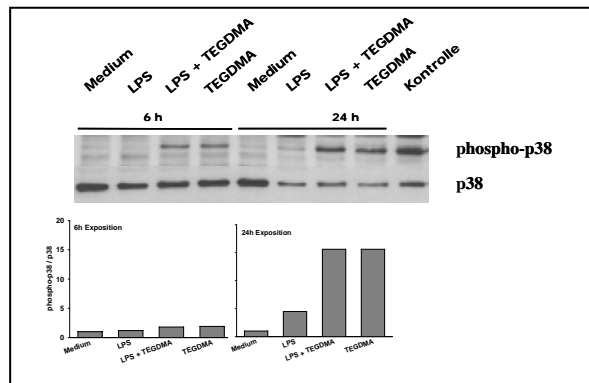


Abb. 25. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von p38 in RAW264.7 Makrophagen. Die Phosphorylierung von p38 wurde mit einem spezifischen Antikörper mit Western blotting in unbehandelten Kulturen (Medium), LPS, LPS plus TEGDMA, und TEGDMA-stimulierten Kulturen nachgewiesen. Die Zellkulturen wurden den Substanzen für 6 Stunden (h) und 24 Stunden exponiert. Als Kontrolle für den Immunblot wurden Extrakte von LPS-stimulierten Zellkulturen aus Vorversuchen verwendet (Kontrolle). Die Graphiken unter den Bahnen zeigen die Höhe der Aktivierung als Verhältnis von phospho-p38/ p38 bezogen auf

unbehandelte Kulturen.

Die Aktivierung von p38 durch LPS erfolgt in den RAW-Zellen schnell, und ist bereits nach 30 min beendet. Die Aktivierung der MAP Kinase p38 durch Phosphorylierung ist das Signal für die Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine (Matsuzawa und Ichijo, 2005). Man darf daher annehmen, dass bereits nach 15 min Exposition das Signal für die Sekretion von Zytokinen aktiviert wurde. Dieses Ergebnis korreliert mit der Freisetzung von Zytokinen nach identischen Expositionszeiten (vgl. Kapitel 2.1). TEGDMA alleine aktiviert auch p38, allerdings erst nach 30 min, es aktiviert jedoch die Sekretion von Zytokinen nicht. Im Gegenteil, TEGDMA alleine und in Kombination mit LPS inhibiert die Sekretion von Zytokinen nach 30 min (vgl. Kapitel 2.1). Bemerkenswert ist hier vor allem auch, dass p38 die einzige MAP Kinase ist, die nach der Expositionszeit von 30 min durch TEGDMA alleine aktiviert wurde.

Die Aktivierung von p38 durch LPS, LPS/TEGDMA und TEGDMA steigt nach einer langen Expositionsdauer zeitabhängig. Dabei fällt auf, dass nun die Aktivierung von p38 durch TEGDMA wesentlich stärker ist als durch LPS. Man darf deshalb hier einen anderen Mechanismus der LPS-Aktivierung vermuten als bei der ähnlich hohen Aktivierung nach der kurzen Expositionszeit von 15 min. LPS ist in RAW-Zellen nach einer Expositionszeit von 24h zytotoxisch, denn die Zahl der überlebenden Zellen sank auf etwa 80 Prozent (Abb. 32). Möglicherweise genügt bereits eine kurze Stimulation mit LPS (15-30 min) für die induzierte Expression von Zytokinen und Oberflächenantigenen, denn p38 ist in den Zellen nach 30 min sowie 1h und 2h nicht mehr mit LPS aktivierbar. Nach langen Inkubationszeiten hingegen scheinen LPS und TEGDMA über die Aktivierung von p38 andere Zellprogramme zu starten als nach 15 min. Vermutlich ist die späte und lang anhaltende Aktivierung von p38 mit der Induktion von Apoptose verbunden (vgl. Kapitel 2.3). Experimente, die nun mit spezifischen pharmakologisch wirksamen Inhibitoren für den p38-Kinase-Weg durchgeführt werden, sollten darauf Hinweis geben können (vgl. Arbeitsprogramm im Fortsetzungsantrag).

Die Aktivierung von ERK1/2 nach kurzen Expositionszeiten

Die aktivierte Form von ERK1/2 war in unbehandelten RAW-Kulturen nachweisbar, und die Stimulation der Zellen mit 0,1 µg/ml LPS für 15 und 30 min führte zu einem Anstieg von phospho-ERK1/2. Die Aktivierung von ERK1/2 lag nach 15 min etwa um den Faktor 6,5 und nach 30 min um

den Faktor 6,1 über der Expression in unbehandelten Kontrollen (Abb. 26). Nach der Kostimulation der RAW-Zellen mit LPS/TEGDMA wurde nach 15 min eine Steigerung von phospho-ERK1/2 um den Faktor 4,7 und nach 30 min sogar um den Faktor 8,4 nachgewiesen. Allerdings hatte TEGDMA alleine nach 15 und 30 min Expositionsdauer keinen Einfluss auf die Aktivierung von ERK1/2 (Faktor 0,8). Die Expression von nicht aktiviertem ERK1/2 war in allen Zellkulturen in etwa gleich hoch.

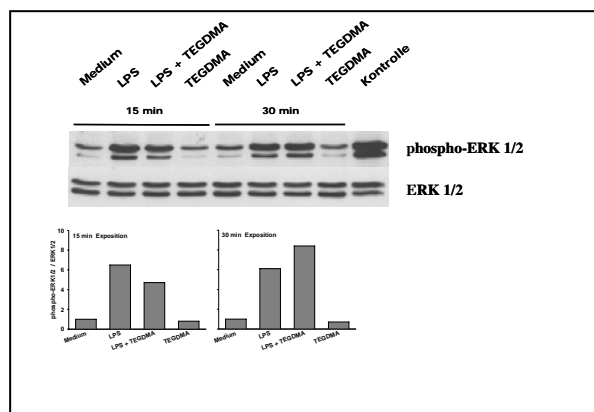


Abb. 26. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von ERK1/2 in RAW264.7 Makrophagen. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde mit einem spezifischen Antikörper mit Western blotting in unbehandelten Kulturen (Medium), LPS, LPS plus TEGDMA, und TEGDMA-stimulierten Kulturen nachgewiesen. Die Zellkulturen wurden den Substanzen für 15 und 30 Minuten (min) exponiert. Als Kontrolle für den Immunblot wurden Extrakte von LPS-stimulierten Zellkulturen aus Vorversuchen verwendet (Kontrolle). Die Graphiken unter den Bahnen zeigen die Höhe der Aktivierung als Verhältnis von phospho-ERK1/2/ERK1/2 bezogen auf unbehandelte Kulturen.

Die Aktivierung von ERK1/2 nach mittleren Expositionzeiten

ERK1/2 wurde auch nach 1 h Stimulation der Zellen mit LPS noch um den Faktor 3,0 aktiviert, und nach der Kostimulation der RAW-Zellen mit LPS und TEGDMA wurde dieselbe Aktivierung entdeckt. In den Kulturen, die mit TEGDMA alleine behandelt wurden, sank jedoch die Menge an phospho-ERK1/2 unter diejenige in unbehandelten Kulturen (Faktor 0,4). Nach 2h Exposition wurde ERK1/2 mit LPS lediglich 1,8-fach aktiviert, und nach der Kostimulation der RAW-Zellen mit LPS und TEGDMA wurde keine Aktivierung (Faktor 0,8) gefunden. Wie nach 1h Expositionszeit sank auch nach 2 h die Menge an phospho-ERK1/2 unter diejenige in unbehandelten Kulturen (Faktor 0,4). Die gesamte Menge an ERK1/2 – aktiviert und nicht aktiviert - war in allen Zellkulturen erneut gleich hoch 8Abb. xy).

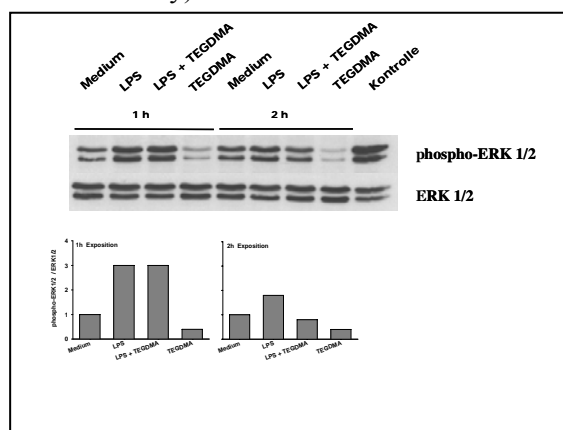


Abb. 27. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von ERK1/2 in RAW 264.7 Makrophagen. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde mit einem spezifischen Antikörper mit Western blotting in unbehandelten Kulturen (Medium), LPS, LPS plus TEGDMA, und TEGDMA-stimulierten Kulturen nachgewiesen. Die Zellkulturen wurden den Substanzen für 1 Stunde (h) und 2 Stunden exponiert. Als Kontrolle für den Immunblot wurden Extrakte von LPS-stimulierten Zellkulturen aus Vorversuchen verwendet (Kontrolle). Die Graphiken unter den Bahnen zeigen die Höhe der Aktivierung als Verhältnis von phospho-ERK1/2 / ERK1/2 bezogen auf unbehandelte Kulturen.

Die Aktivierung von ERK1/2 nach langen Expositionszeiten

Nach langen Inkubationszeiten von 6 und 24h war phospho-ERK1/2 in unbehandelten RAW-Kulturen vergleichsweise gering exprimiert und vor allem nach 6h hauptsächlich die phosphorylierte Form von ERK1 nachweisbar (Abb. 28). Nach 6h Exposition aktivierte LPS alleine ERK1/2 um den Faktor 2,2, die Kombination LPS/TEGDMA lediglich 1,4-fach. TEGDMA alleine verringerte sogar die Menge an phospho-ERK1/2 geringfügig verglichen mit unbehandelten Kulturen (Faktor 0,9). Die gesamte

Menge an ERK1/2 – phosphoryliert und nicht phosphoryliert - war in allen Zellkulturen nach 6h Exposition gleich.

Nach einer Expositionszeit von 24h erhöhte LPS die Menge an phospho-ERK1/2 um den Faktor 7,0 verglichen mit Kontrollen. In den mit LPS/TEGDMA behandelten Kulturen wurde ERK1/2 um den Faktor 19 aktiviert und TEGDMA alleine war genauso so wirksam. Auffallend ist, dass nach dieser langen Expositionszeit die Expression des gesamten ERK1/2 in den mit LPS, LPS/TEGDMA und TEGDMA behandelten Kulturen, ähnlich wie mit p38 beobachtet, wieder schwächer ist als in unbehandelten Kontrollen.

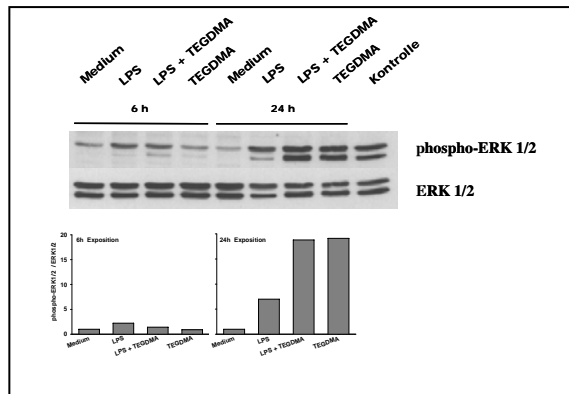


Abb. 28. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von ERK1/2 in RAW 264.7 Makrophagen. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde mit einem spezifischen Antikörper mit Western blotting in unbehandelten Kulturen (Medium), LPS, LPS plus TEGDMA, und TEGDMA-stimulierten Kulturen nachgewiesen. Die Zellkulturen wurden den Substanzen für 6 Stunden (h) und 24 Stunden exponiert. Als Kontrolle für den Immunblot wurden Extrakte von LPS-stimulierten Zellkulturen aus Vorversuchen verwendet (Kontrolle). Die Graphiken unter den Bahnen zeigen die Höhe der Aktivierung als Verhältnis von phospho-ERK1/2 / ERK1/2 bezogen auf unbehandelte Kulturen.

Die Muster der Aktivierung von ERK1/2 und p38 durch LPS und TEGDMA sind nach kurzen Expositionszeiten durchaus verschieden. Zum einen ist ERK1/2 anders als p38 auch nach 30 min mit LPS stimulierbar. Zweitens wird ERK1/2 wohl nach kurzen Expositionszeiten durch TEGDMA nicht aktiviert. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Expression von Zytokinen und Oberflächenantigenen wohl primär über die Aktivierung von p38 gesteuert wird. Wahrscheinlich ist sogar die inhibitorische Wirkung von TEGDMA auf die Expression von Zytokinen und Oberflächenantigenen selbst über die Aktivierung von p38 vermittelt und nicht über ERK1/2. Sie setzt möglicherweise erst nach 30 min ein, denn erst dann wird p38 durch TEGDMA aktiviert (vgl. Kapitel 2.1).

Die Aktivierung von ERK1/2 ist auch nach 1h und 2h Exposition anders als die Aktivierung von p38. ERK1/2 ist auch nach 1h durch LPS aktivierbar, wenn auch nicht mehr so stark wie nach den kurzen Expositionszeiten. Man kann also eine zeitabhängige Abnahme der Wirkung von LPS bis zu einer Expositionsdauer von 2h beobachten. Daraus darf man auch schließen, dass der Mechanismus für die späte Aktivierung von ERK1/2 durch LPS nach 6 und 24 h Exposition anders sein sollte, als derjenige für die frühe Aktivierung zwischen 15 min und 2h.

TEGDMA alleine inhibierte die Bildung von phospho-ERK1/2 nach 1 und 2 h Exposition, und nach 2h hemmt es auch die Wirkung von LPS auf die Aktivierung von ERK1/2. Diese könnte ein Hinweis darauf sein, dass ERK1/2 möglicherweise auch eine Funktion bei der Regulation des Zellzyklus der RAW-Zellen übernimmt. Die beobachtete Verzögerung des Zellzyklus durch TEGDMA – in der G1-Phase - führt vielleicht über die Inhibition der Aktivierung von ERK1/2.

Die kontinuierliche Verringerung der Aktivierung von ERK1/2 durch LPS beginnend mit der Exposition bis hin zu 2h könnte auch ein Mechanismus sein, über den ERK1/2 der Wirkung von LPS auf p38 entgegenwirkt. Dieser könnte zu beitragen, dass nicht dauerhaft Zytokine produziert werden und das Phänomen des septischen Schocks ausgelöst wird. Andererseits ist momentan nicht auszuschließen, dass über einen alternativen Weg das aktivierte p38 seine eigene Inhibition startet – als *feed-back-loop* über MK2 oder über einen Sensor – möglicherweise auch MK2 -, der die Freisetzung des Schlüsselzytokins TNF- α erkennt (vgl. Arbeitsprogramm im Fortsetzungsantrag).

Weil auch TEGDMA alleine die Menge an phospho-ERK1/2 geringfügig reduzierte, inhibierte es in Kombination mit LPS wahrscheinlich auch die schwache LPS-Stimulierung. Die TEGDMA-inhibierte Aktivierung von ERK1/2 könnte auch helfen, den Zellzyklus zu verlangsamen oder umgekehrt könnten die TEGDMA-induzierten DNA-Schäden über die so aktivierten Checkpoints des Zellzyklus inhibitorisch auf ERK1/2 wirken.

Nach 24h jedoch ist ein anderer Mechanismus der Aktivierung von ERK1/2 wahrscheinlich. Die starke Aktivierung von ERK1/2 durch LPS und noch viel mehr durch TEGDMA erfolgt dann wahrscheinlich über Signalwege, die dem durch LPS und TEGDMA induzierten und wahrscheinlich durch p38 und JNK vermittelten programmierten Zelltod (Apoptose) (vgl. Kapitel 2.3) entgegenwirken. ERK1/2 wird wahrscheinlich als *pro-survival factor* sowohl von LPS als auch von TEGDMA aktiviert, um das Überleben der Zellen zu fördern, und p38 entgegenzuwirken.

Die Aktivierung von JNK nach kurzen Expositionszeiten

Die aktivierte Form von JNK war in unbehandelten RAW-Kulturen nur sehr schwach nachweisbar. Nach Stimulation der Zellen mit 0,1 µg/ml LPS für 15 min stieg die Menge an phospho-JNK jedoch deutlich um den Faktor 6,8 bezogen auf die Expression von GAPDH. Nach 30 min Expositionszeit war die Menge von phospho-JNK nur noch im den Faktor 2,4 höher als in unbehandelten Kulturen. Die Kostimulation der RAW-Zellen mit LPS und TEGDMA bewirkte einen 4-fachen Anstieg der Menge an phospho-JNK nach 15 min und eine 3,7-fache Zunahme nach 30 min. TEGDMA alleine hatte nach 15 und 30 min Exposition keinen Einfluss auf die Menge an phospho-JNK (Faktor 1,0 und 1,1). Die Expression von GAPDH, auf die phospho-JNK bezogen wurde, war in allen Zellkulturen gleich hoch.

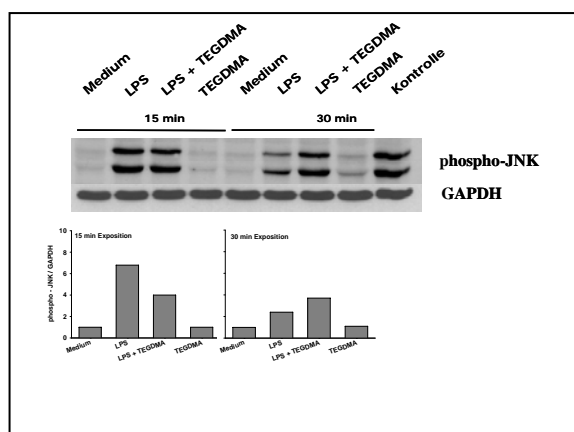


Abb. 29. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von JNK in RAW264.7 Makrophagen. Die Phosphorylierung von JNK1/2 wurde mit einem spezifischen Antikörper mit Western blotting in unbehandelten Kulturen (Medium), LPS, LPS plus TEGDMA, und TEGDMA-stimulierten Kulturen nachgewiesen. Die Zellkulturen wurden den Substanzen für 15 und 30 Minuten (min) exponiert. Als Kontrolle für den Immunblot wurden Extrakte von LPS-stimulierten Zellkulturen aus Vorversuchen verwendet (Kontrolle). Die Graphiken unter den Bahnen zeigen die Höhe der Aktivierung als Verhältnis von phospho-JNK1/2 / GAPDH bezogen auf unbehandelte Kulturen.

Die Aktivierung von JNK nach mittleren Expositionszeiten

Die aktive Form von JNK war nach den mittleren Expositionszeiten von 1h und 2 h in unbehandelten und in den mit LPS, LPS/TEGDMA oder TEGDMA behandelten Kulturen nur sehr schwach nachweisbar. Phospho-JNK wurde nur in den experimentellen Kontrollen, den Extrakten aus LPS-stimulierten Zellen, eindeutig detektiert. Kulturen, die 1h LPS, LPS/TEGDMA oder TEGDMA exponiert waren, enthielten in etwa die gleich Menge an phospho-JNK (Faktor 0,8) wie unbehandelte Zellkulturen. Ähnliche Ergebnisse wurden nach einer Expositionszeit von 2h erzielt (Faktor 0,8-1,1). GAPDH wurde wieder in allen Zellkulturen in gleichen Mengen nachgewiesen.

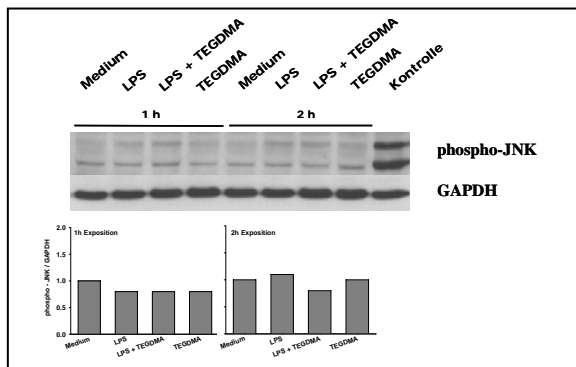


Abb. 30. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von JNK in RAW264.7 Makrophagen. Die Zellkulturen wurden den Substanzen für 1 h und 2h exponiert. Als Kontrolle für den Immunblot wurden Extrakte von LPS-stimulierten Zellkulturen aus Vorversuchen verwendet (Kontrolle). Die Graphiken unter den Bahnen zeigen die Höhe der Aktivierung als Verhältnis von phospho-JNK1/2 / GAPDH bezogen auf unbehandelte Kulturen.

Die Aktivierung von JNK nach langen Expositionszeiten

Phospho-JNK war auch nach langen Expositionszeiten von 6h und 24 h in unbehandelten und in den mit LPS, LPS/TEGDMA oder TEGDMA alleine behandelten Kulturen fast nicht nachweisbar. Kulturen, die für 1h LPS, LPS/TEGDMA oder TEGDMA exponiert waren, enthielten etwa soviel phospho-JNK (Faktor 0,9-0,8) wie unbehandelte Kontrollen. Nach einer Expositionszeit von 24h erhöhte LPS alleine die Menge an phospho-JNK um den Faktor 1,6 und die Kombination LPS/TEGDMA aktivierte JNK 1,4-fach. Auch in den TEGDMA behandelten Kulturen wurde eine Zunahme um den Faktor 1,3 beobachtet. GAPDH wurde wieder in allen Zellkulturen in etwa den gleichen Mengen nachgewiesen.

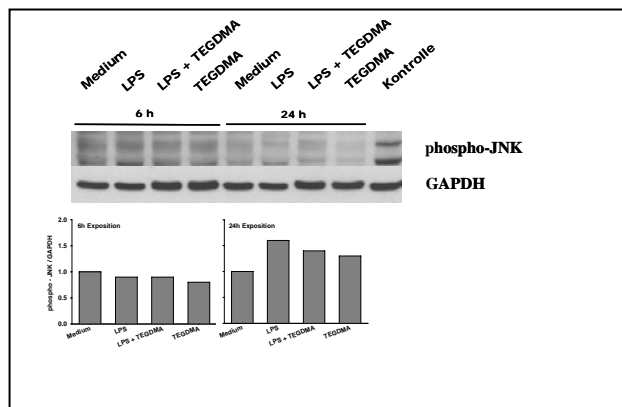


Abb. 31. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von JNK in RAW264.7 Makrophagen. Die Zellkulturen wurden den Substanzen für 6h und 24h exponiert. Als Kontrolle für den Immunblot wurden Extrakte von LPS-stimulierten Zellkulturen aus Vorversuchen verwendet (Kontrolle). Die Graphiken unter den Bahnen zeigen die Höhe der Aktivierung als Verhältnis von phospho-JNK1/2 / GAPDH bezogen auf unbehandelte Kulturen.

Die Aktivierung von JNK durch LPS ist nach 15 min etwa so hoch wie diejenige von ERK1/2, und JNK ist auch nach 30 min - anders als p38 -, mit LPS stimulierbar. Die Kombination LPS/TEGDMA aktiviert JNK, ähnlich wie ERK1/2, sogar noch etwas stärker LPS alleine. TEGDMA alleine aktivierte allerdings JNK nach kurzen Expositionszeiten nicht. Deshalb sind möglicherweise ROS für die Aktivierung von JNK in diesem System ohne Bedeutung. Diese Beobachtung gilt auch für die mittleren Expositionszeiten von 1h und 2h, denn eine erhöhte Menge an phospho-JNK war zu diesen Zeitpunkten nicht nachweisbar. Das Muster der frühen Aktivierung von JNK durch LPS und TEGDMA ist damit verschieden von demjenigen für p38, aber der Aktivierung von ERK1/2 sehr ähnlich. Die Aktivierung von JNK folgt allerdings nach 1 und 2h eher dem Muster für p38, nicht demjenigen für ERK1/2. Diese Beobachtung verweist auf eine klare Trennung der Funktionen von p38 und JNK einerseits und ERK1/2 andererseits. Allerdings ist die Aktivierung von p38 und JNK durch LPS und TEGDMA auch dann nicht identisch und daher sind wohl auch ihre Funktionen jeweils andere.

Nach der langen Expositionszeit von 6h ist JNK bezogen auf die Menge an exprimiertem GAPDH gar nicht aktiviert. Außerdem ist die Aktivierung von JNK selbst nach 24h bei weitem nicht so deutlich nachzuweisen wie etwa in den Kulturen, die nur für kurze Zeit LPS oder der Kombination LPS/TEGDMA exponiert waren. Dieses Muster der Aktivierung nach langen Expositionszeiten ist damit deutlich verschieden von der Aktivierung von p38 und auch ERK1/2.

Die geringe oder fehlende Aktivierbarkeit von JNK durch LPS und auch TEGDMA nach mittleren und langen Expositionszeiten lässt zumindest zweierlei vermuten. Erstens, scheint JNK in RAW-Zellen in Anwesenheit von TEGDMA für die Aktivierung von Signalwegen, die zu Apoptose führen keine Rolle zu spielen. Diese Beobachtung könnte durchaus eine zellspezifische Erscheinung sein, denn JNK wurde in anderen Zelltypen mit Apoptose assoziiert (Bode und Dong, 2007). Zweitens ist JNK, möglicherweise - anders als p38 und ERK1/2 -, nur von untergeordneter Funktion bei der Regulation des Zellzyklus überhaupt und besonders in Anwesenheit von TEGDMA. Umgekehrt darf man wegen der immer nachweisbaren aber unterschiedlichen Aktivierung von p38 und ERK1/2 auf eine Funktion dieser MAP Kinasen bei der Regulation des Zellzyklus, aber auch den anderen hier beschriebenen Phänomenen wie Expression von Zytokinen und Induktion von Apoptose schließen. Die Entscheidung, welcher der Wege in Anwesenheit einer Substanz wie TEGDMA oder LPS genommen wird, scheint abhängig zu sein vom Zeitpunkt und der Dauer der Einwirkung. Auch die Frage, welche der MAPKs für die Induktion an welchen Zeitpunkt spezifisch ist für die unterschiedlichen Funktionen, ist unbekannt. Diese Frage sollte in der beantragten Förderperiode geklärt werde.

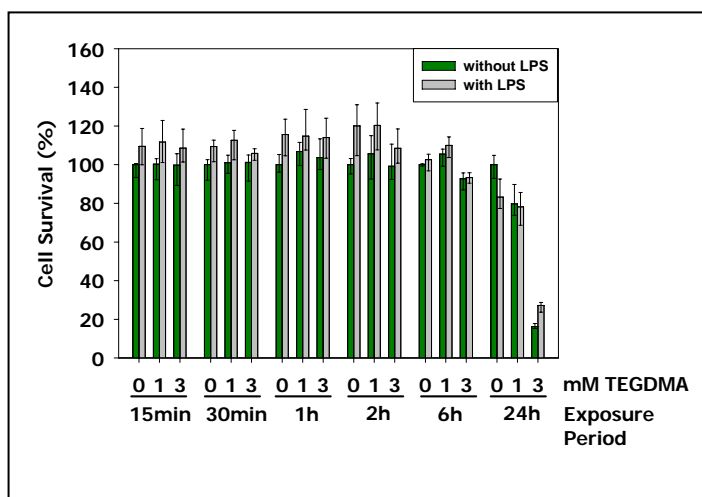


Abb. 32. Zytotoxizität von TEGDMA und LPS in RAW-Makrophagen. Die Zellen wurden TEGDMA mit und ohne LPS (0,1 µg/ml) für die angegebenen Zeiten exponiert. Die überlebenden Zellen wurden danach mit dem Kristallviolett-Test ermittelt. Dazu wurden optische Dichten in Abhängigkeit von Substanzkonzentrationen gemessen. Die Zahl der überlebenden Zellen in den TEGDMA-behandelten Gruppen wurden auf diejenigen unbehandelte Kontrollen normiert (=100%). Es sind Mediane sowie 25 und 75% Perzentile gezeigt (n=16-32).

C. Die Aktivierung von MAP-Kinasen in THP-1 Monozyten

Die Aktivierung von p38 und ERK1/2 in humanen THP-1 Monozyten verlief so wie in RAW-Makrophagen. FACS-Analysen nach intrazellulären Färbungen mit spezifischen Antikörpern zeigten keine signifikanten Veränderungen der für phospho-p38 und phospho-ERK1/2 positiven Zahl der Zellen nach Exposition gegen 1 und 3mM TEGDMA (Abb. 33 und 34). Ein geringer Anstieg der phospho-p38-positiven Zellen wurde durch NAC inhibiert. Nach einer Exposition von 24h und 48h wurde p38 durch 3 und 5mM TEGDMA in den THP-1 etwa 2-3-fach aktiviert. In Anwesenheit von NAC war die Aktivierung von p38 durch TEGDMA jedoch geringer. Phospho-ERK1/2 wurde durch TEGDMA nach diesen langen Expositionszeiten auf ähnliche Weise aktiviert wie p38. Ein signifikanter Anstieg der für phospho-ERK1/2 positiven Zellen (Faktor 4-6) wurde nach 24h

Exposition gemessen, und dieser Effekt war nach 48h sogar noch etwas stärker. NAC inhibierte die Aktivierung von ERK1/2 durch TEGDMA nach 24h und 48h Exposition (Abb. 33 und 34).

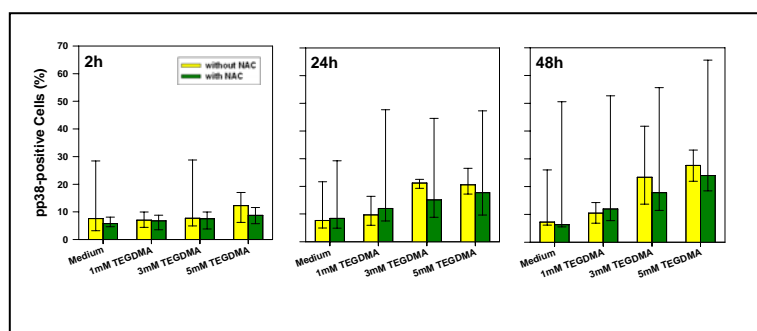


Abb. 33. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von p38 in THP-1 Monozyten. Die Phosphorylierung von p38 wurde mit einem spezifischen Antikörper mit FACS nachgewiesen. Die Mediane zeigen die Zahl der phospho-p38-positiven Zellen (plus 25 und 75% Perzentile; n=4).

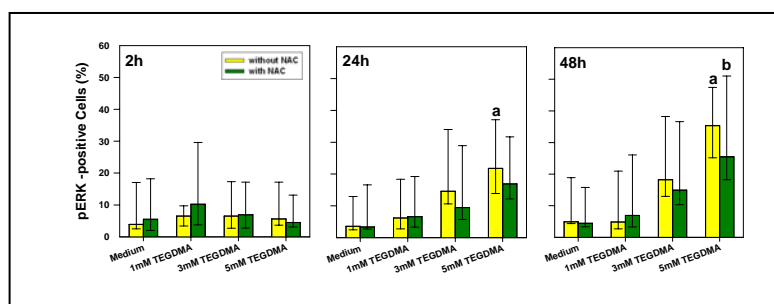


Abb. 34. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von ERK1/2 in THP-1 Monozyten. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde mit einem spezifischen Antikörper mit FACS nachgewiesen. Die Mediane zeigen die Zahl der phospho-ERK1/2-positiven Zellen (plus 25 und 75% Perzentile; n=4).

2.2.3 Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von MAP-Kinasen in humanen Pulpazellen

Die Aktivierung von MAP Kinasen durch zytotoxische Monomere wie TEGDMA wurde auch in transformierten humanen Pulpazellen bestimmt. Bisher gibt es keine Berichte über die Aktivierung von MAPK und den Verlauf dieser Aktivierung über die Zeit in diesen Zielzellen von Monomeren. Die Aktivierung der MAPK p38, ERK1/2 und JNK durch TEGDMA wurde wie in den RAW-Makrophagen nach kurzen (15 und 30min), mittleren (1h und 2h) und langen (6h und 24h) Inkubationszeiten vergleichend mit LPS analysiert.

Die Aktivierung von p38

Die aktivierte phosphorylierte Form des p38 war in den Pulpazellen nach kurzen (15 und 30 min) und mittleren (1h und 2h) Expositionszeiten in keiner der Kulturen nachzuweisen. Weder die Stimulation der Zellen mit 0,1 µg/ml LPS für 15 und 30 min noch die Exposition gegen 3mM TEGDMA oder die Kombination aus LPS/TEGDMA erhöhten die Menge an phospho-p38. Auch unbehandelte Kulturen aktivierten p38 nicht in nachweisbaren Mengen (Abb. 35 und 36). Jedoch war phospho-p38 in den als Kontrolle für den Immunblot verwendeten Extrakten aus LPS-stimulierten (15min) RAW-Zellen deutlich detektierbar.

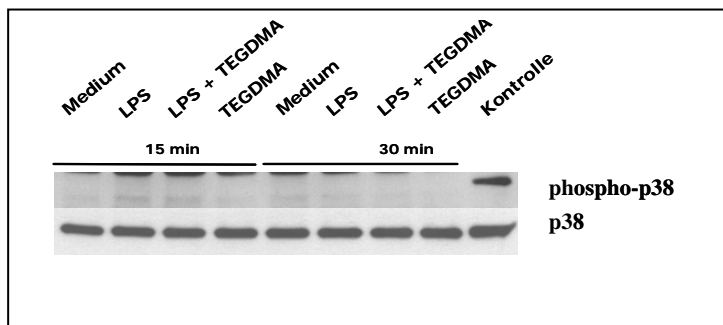


Abb. 35. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von p38 in transformierten humanen Pulpazellen nach kurzen Expositionszeiten (15 und 30 min). Die Proteine wurden wie für die RAW-Makrophagen beschrieben nachgewiesen (siehe oben). Kontrolle= Extrakte aus LPS-stimulierten RAW-Makrophagen.

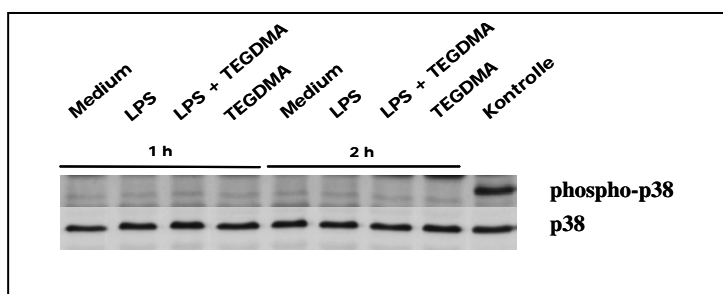


Abb. 36. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von p38 in transformierten humanen Pulpazellen nach mittleren (1h und 2h) Expositionszeiten. Die Proteine wurden wie für die RAW-Makrophagen beschrieben nachgewiesen (siehe oben). Kontrolle= Extrakte aus LPS-stimulierten RAW-Makrophagen.

Auch nach der langen Inkubationszeit von 6h war phospho-p38 in unbehandelten Pulpazellen und in Kulturen, die LPS, LPS/TEGDMA oder 3mM TEGDMA alleine exponiert waren, nicht nachzuweisen (Abb. 37). Erst nach 24h Expositionsdauer wurde p38 aktiviert. TEGDMA alleine erhöhte die Menge an phospho-p38 etwa um den Faktor 12, und mit LPS/TEGDMA wurde noch eine verglichen mit unbehandelten Kontrollen etwa doppelte Aktivierung gefunden (Abb. 37). Daher darf man annehmen, dass auch die humanen Pulpazellen auf LPS reagieren. Jedoch scheint LPS anders als in RAW-Zellen die Aktivierung von p38 in Pulpazellen zu inhibieren. Verschieden von den RAW-Zellen war in den Pulpazellen lediglich in den Ansätzen mit TEGDMA - nicht in denjenigen mit LPS und LPS/TEGDMA -, die nicht aktivierte Form von p38 nach einer Expositionszeit von 24h weniger exprimiert als in unbehandelten Kontrollen.

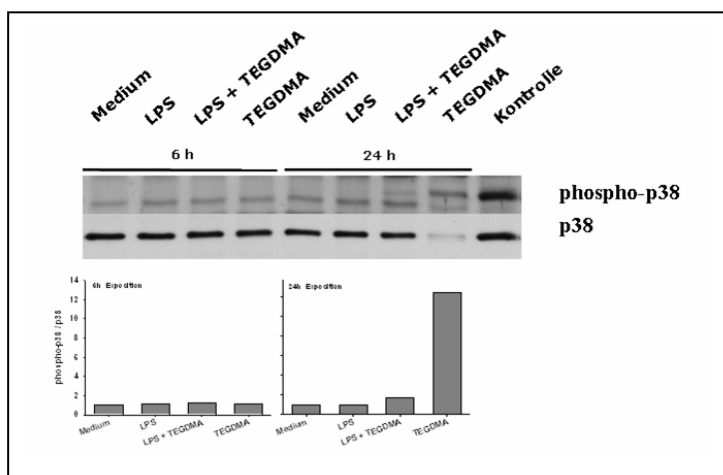


Abb. 37. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von p38 in transformierten humanen Pulpazellen nach langen (6h und 24h) Expositionszeiten. Die Proteine wurden wie für die RAW-Makrophagen beschrieben nachgewiesen (siehe oben).

Die Aktivierung von ERK1/2

Die aktivierte phosphorylierte Form von ERK1/2 wurde in den Pulpazellen detektiert. Die Stimulation der Zellen mit 0,1 µg/ml LPS, 3 mM TEGDMA oder beiden Substanzen gemeinsam führte aber nach 15min Exposition noch zu keinem nennenswerten Anstieg von phospho-ERK1/2. Allerdings aktivierte 3mM TEGDMA nach 30 min Expositionsdauer ERK1/2 in den Pulpazellen – anders als in RAW - etwa um den Faktor 2. LPS und LPS/TEGDMA erhöhten die Menge an ERK1/2 nur unerheblich (Faktor 1,2) (Abb. 38).

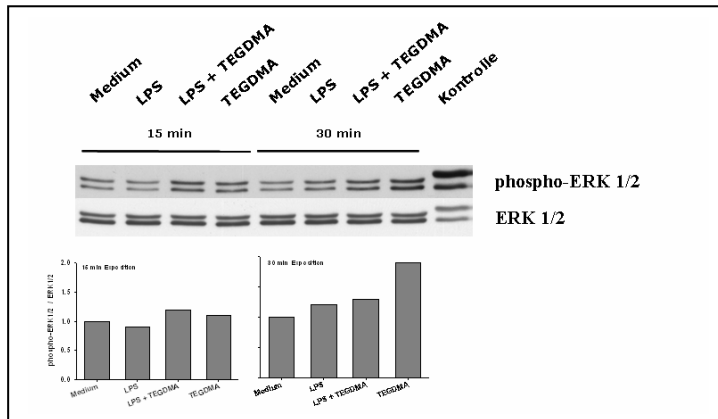


Abb. 38. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von ERK1/2 in transformierten humanen Pulpazellen nach kurzen Expositionszeiten (15 und 30 min). Die Proteine wurden wie für die RAW-Makrophagen beschrieben nachgewiesen (siehe oben).

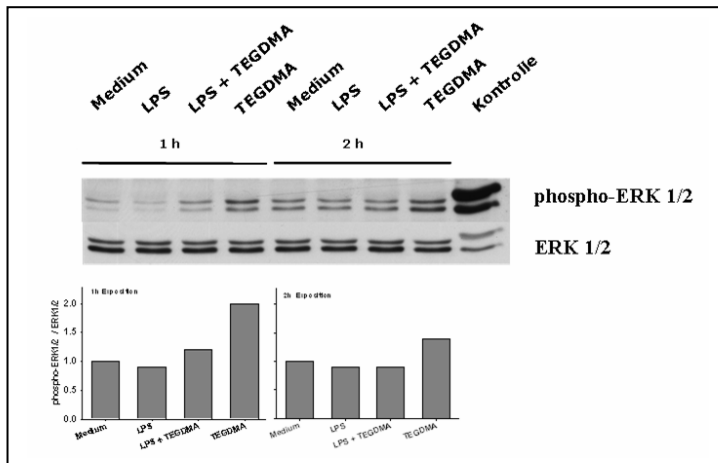


Abb. 39. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von ERK1/2 in transformierten humanen Pulpazellen nach mittleren Expositionszeiten (1h und 2h). Die Proteine wurden wie für die RAW-Makrophagen beschrieben nachgewiesen (siehe oben).

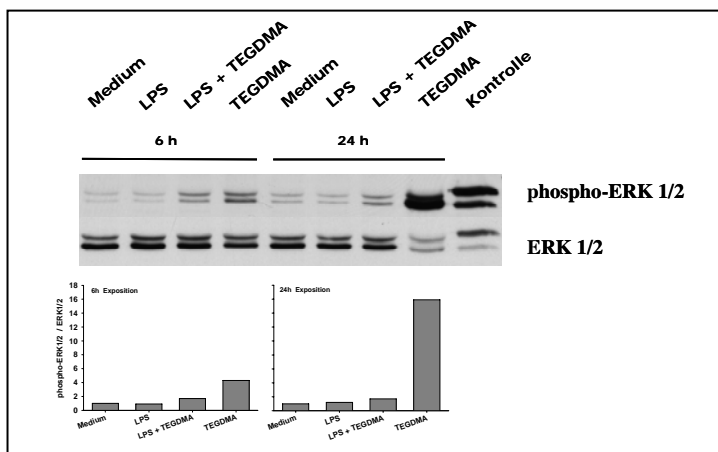


Abb. 40. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von ERK1/2 in transformierten humanen Pulpazellen nach langen Expositionszeiten (6h und 24h). Die Proteine wurden wie für die RAW-Makrophagen beschrieben nachgewiesen (siehe oben).

Auch nach mittleren Expositionszeiten ist in allen Kulturen die phosphorylierte Form von ERK1/2 nachweisbar. Jedoch aktivierte auch nach 1h und 2h wiederum nur 3mM TEGDMA ERK1/2 um den Faktor 1,5-2 (Abb. 39). ERK1/2 wurde nach langen Expositionszeiten von 3mM TEGDMA sehr stark aktiviert. Die Menge an phospho-ERK1/2 lag nach 6h etwa um den Faktor 4, nach 24h um den Faktor 16 über denjenigen unbehandelter Kontrollen (Abb. 40). LPS alleine aktivierte ERK1/2 nicht, es inhibierte jedoch die Aktivierung durch TEGDMA. Wiederum war die Expression des Gesamt-ERK1/2 in den mit TEGDMA alleine, aber nicht in den mit LPS und LPS/TEGDMA behandelten Kulturen nach einer Expositionszeit von 24h verglichen mit unbehandelten Kontrollen stark reduziert (Abb. 40).

Die Aktivierung von JNK

Die Aktivierung von JNK in den humanen Pulpazellen folgte nach kurzen (15 und 30 min) und mittleren (1h und 2h) Expositionszeiten dem für p38 beschriebenen Muster. In keiner der unbehandelten Kulturen oder denjenigen, die 0,1µg/ml LPS, 3mM TEGDMA oder der Kombination LPS/TEGDMA exponiert waren, wurde phospho-JNK detektiert (Abb. 41 und 42).

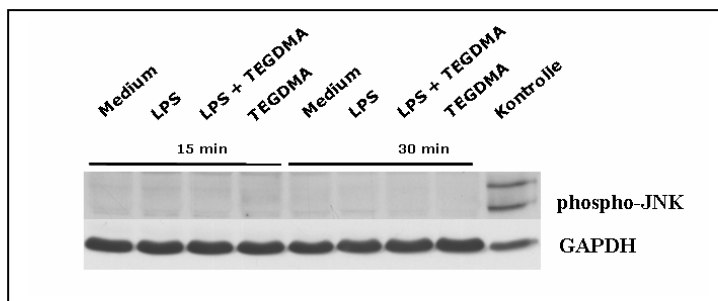


Abb. 41. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von JNK in transformierten humanen Pulpazellen nach kurzen Expositionszeiten (15 und 30 min). Die Proteine wurden wie für die RAW-Makrophagen beschrieben nachgewiesen (siehe oben).

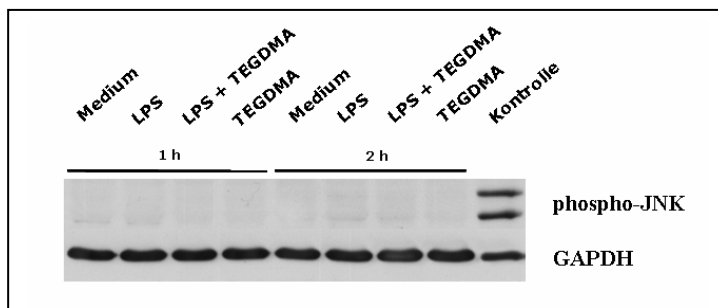


Abb. 42. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von JNK in transformierten humanen Pulpazellen nach mittleren (1h und 2h) Expositionszeiten. Die Proteine wurden wie für die RAW-Makrophagen beschrieben nachgewiesen (siehe oben).

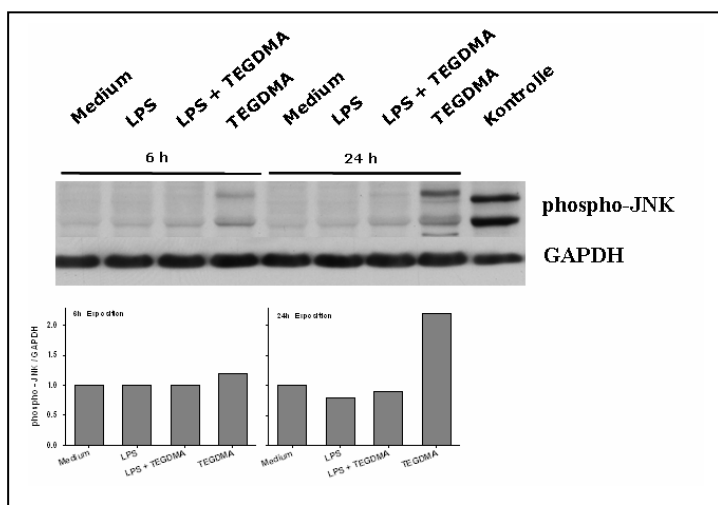


Abb. 43. Der Einfluss von TEGDMA auf die Aktivierung von JNK in transformierten humanen Pulpazellen nach langen (6h und 24h) Expositionszeiten. Die Proteine wurden wie für die RAW-Makrophagen beschrieben nachgewiesen (siehe oben).

Nach 6h Expositionsdauer war phospho-JNK in unbehandelten Pulpazellen und in Kulturen, die LPS und LPS/TEGDMA exponiert waren, nicht nachzuweisen. Lediglich 3mM TEGDMA aktivierte JNK gering (Abb. 43). Ähnlich wie p38, wurde JNK nach einer Expositionsdauer von 24h durch TEGDMA alleine aktiviert, denn die Menge an phospho-JNK stieg etwa um den Faktor 2 verglichen mit Kontrollen. Diese Aktivierung von JNK ist möglicherweise – im Verbund mit phospho-p38 ? -, mit der Induktion von Apoptose assoziiert, denn 3mM TEGDMA reduzierten die Zahl der überlebenden Zellen auf etwa 35% verglichen mit Kontrollen (Abb. 44). Wie oben bereits für p38 und ERK1/2 diskutiert, scheint LPS auch die Aktivierung von JNK durch TEGDMA zu inhibieren. Man darf daher vermuten, dass TEGDMA die Stresskinasen in den Pulpazellen über denselben Mechanismus aktiviert. Ob und in welcher Weise die stressaktivierbaren (SAPK) p38 und JNK zur Induktion von Apoptose beitragen und ob beide MAPK dafür von gleicher Bedeutung sind, ist nicht bekannt. Ebenso muss momentan offen bleiben, auf welche Weise LPS eine schützende Funktion gegen die Wirkung von TEGDMA in Pulpazellen übernehmen kann und welche der MAPK daran beteiligt ist. Diese Fragen sollen in der beantragten neuen Förderperiode experimentell bearbeitet werden (vgl. Arbeitsprogramm im Fortsetzungsantrag). Möglicherweise übernimmt in diesem Geschehen auch die Menge der durch TEGDMA produzierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine Funktion.

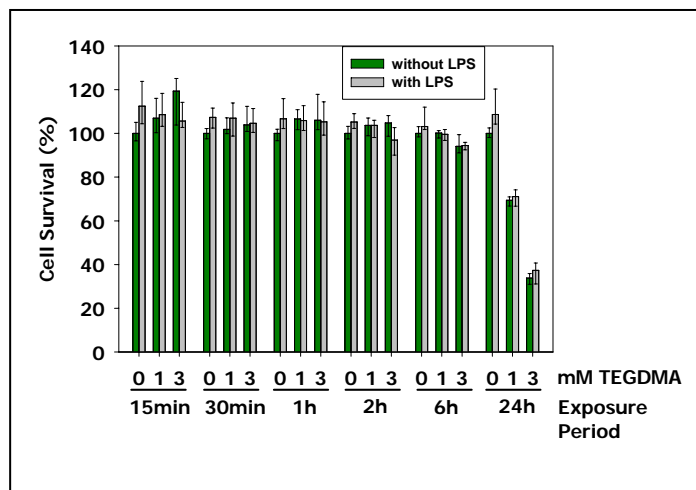


Abb. 44. Zytotoxizität von TEGDMA und LPS in humane Pulpazellen. Die Zellen wurden TEGDMA mit und ohne LPS (0,1 µg/ml) für die angegebenen Zeiten exponiert. Die überlebenden Zellen wurden danach mit dem Kristallviolett-Test ermittelt. Dazu wurden optische Dichten in Abhängigkeit von Substanzkonzentrationen gemessen. Die Zahl der überlebenden Zellen in den TEGDMA-behandelten Gruppen wurden auf diejenigen unbehandelter Kontrollen normiert (=100%). Es sind Mediane sowie 25 und 75% Perzentile gezeigt (n=4).

Das Muster der Aktivierung von MAPK in Pulpazellen ist anders als in RAW-Makrophagen nach Exposition gegen LPS und TEGDMA. Anders als in RAW-Zellen wirkt nur TEGDMA in Pulpazellen aktivierend. LPS ist aber in Pulpazellen auch wirksam; es inhibiert die Aktivierung der drei MAP Kinasen vor allem nach langen Expositionsdauern. Möglicherweise schützt es die Zellen gegen die toxische Wirkung von TEGDMA. Der Mechanismus der Inhibition der TEGDMA-Aktivierung von MAPK durch LPS soll im geplanten Projekt untersucht werden (=identisch mit der Charakterisierung des Mechanismus der TEGDMA-Aktivierung).

Somit ergibt sich ein besonders interessantes Szenario über den Vergleich der beiden Zelllinien. TEGDMA inhibiert in den RAW-Zellen die LPS-stimulierte Sekretion von Zytokinen und Oberflächenantigenen. Umgekehrt wirkt LPS der Aktivierung der MAPK in Pulpazellen entgegen und möglicherweise auch der TEGDMA-induzierten Apoptose. Welche der MAPK nun spezifisch welchen dieser Effekte aktiviert oder wie sich verschiedenen MAPK wechselseitig beeinflussen, soll im neuen Vorhaben geklärt werden.

2.2.4 Die Aktivierung von ERK1/2 durch HEMA in primären humanen Pulpafibroblasten

Neben der Wirkung des Dimethacrylats TEGDMA wurde auch der Einfluss des Monomers 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) auf die Aktivierung von ERK1/2 analysiert. Dieses Projekt wurde mit der Gruppe um Prof. Dr. S. Rengo/Dr. G. Spagnuolo (Universität „Federico II“, Neapel, Italien) bearbeitet, die im Antrag auf Förderung als Kooperationspartner benannt waren. ERK1/2 wird innerhalb von 30–90 min nach Exposition gegen 10mM HEMA aktiviert (Abb. 45). Umgekehrt inhibierte HEMA aber ganz erheblich die anti-apoptotisch wirkende PI3K/Akt. Diese Ergebnisse wurden in *J Endodontics* publiziert und sind dort ausführlich diskutiert (Spagnuolo *et al.*, 2008). Man kann daraus schließen, dass HEMA wie TEGDMA wirkt. In geringen Konzentrationen oder nach kurzen Expositionszeiten werden zelluläre Mechanismen der Verteidigung gegen oxidativen Stress aktiviert, um die Homöostase wiederherzustellen. Hohe Monomerkonzentrationen und lange Expositionszeiten hingegen verschieben das ursprüngliche Gleichgewicht zwischen pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Faktoren in Richtung des programmierten Zelltods.

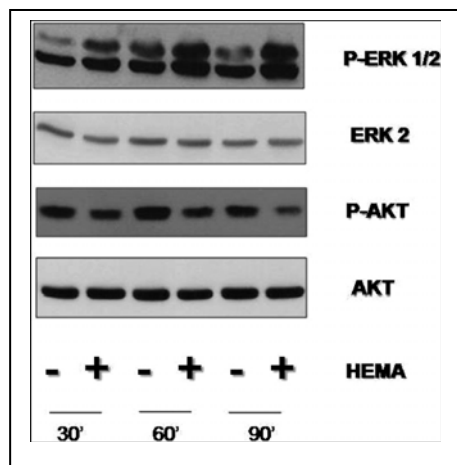


Abb 45. Die Wirkung von HEMA auf ERK1/2 und AKT. Humane Pulpazellen wurden 10mM HEMA exponiert; Proteine in Zelllysaten wurde danach mit SDS-PAGE getrennt und mit spezifischen Antikörpern gegen phospho-Akt/Akt oder phospho-ERK1/2/ERK1/2 detektiert. Die Abbildung wurde aus *Spagnuolo et al.*, *J Endodon*, 2008,34,684-8 entnommen und wird nur für diesen Bericht verwendet.

2.3 Induktion von Apoptose durch LPS und TEGDMA in RAW-Makrophagen

Lipopolysaccharid und TEGDMA aktivierten die MAKP p38, JNK und ERK1/2 in unterschiedlichem Ausmaß und nach unterschiedlicher Expositionsdauer (vgl. Kapitel 2.2). Die frühe Aktivierung von p38 durch LPS war bereits nach 30 min beendet, während ERK1/2 auch nach längeren Expositionszeiten durch LPS aktiviert wurde, wenngleich mit zunehmender Dauer weniger stark. LPS, aber noch mehr TEGDMA aktivierten dann nach 6h und vor allem nach 24h die drei MAPK sehr stark. Daher durfte man einerseits vermuten, dass die Zellen auf die Schädigung durch LPS und TEGDMA zunehmend mit der Aktivierung von Mechanismen reagierten, die das Überleben fördern. Diese könnte die starke Aktivierung von ERK1/2 erklären. Andererseits konnte man auch annehmen, dass die Aktivierung der Stresskinasen (SAPK) p38 und JNK erst den LPS- und TEGDMA-induzierten Zelltod durch Apoptose einleitete. Diese Hypothese zu prüfen, ist ein Teilprojekt im neuen Arbeitsprogramm und dort im einzelnen formuliert (vgl. Arbeitsprogramm im Fortsetzungsantrag). Zunächst sollte jedoch hier geprüft werden, ob exponierte Zellkulturen nach den längeren Expositionszeiten in die Apoptose gehen und wie hoch der Anteil dieser Zellen in einer Kultur ist. Daher wurden LPS- und TEGDMA-behandelte Zellkulturen sowie unbehandelte Kontrollen erst mit FITC-markiertem Annexin und Propidiumiodid (PI) gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch (FACS) vermessen. PI positive Zellen sind nekrotisch (Q1), Annexin-positive Zellen (Q4) sind apoptotisch und PI- und Annexin-positive Zellen (Q2) befinden sich in der späten Phase der Apoptose.

Zellen, die weder Annexin noch PI annehmen, sind vital (Q3). Im Folgenden werden Ergebnisse aus einem Experiment beispielhaft für die Wirkung von LPS, TEGDMA, und Camptothecin, das hier als Positivkontrolle verwendet wurde (Legarza und Yang, 2006), präsentiert. Die Daten aus mindestens vier Wiederholungsexperimenten zeigen die Reproduzierbarkeit; sie werden hier nicht dargestellt, sind aber für ein Manuskript vorbereitet.

Weit mehr als 90% der Zellen unbehandelter Kulturen (Medium) von RAW-Makrophagen sind vital (Abb. 46). Nach einer Expositionsdauer von 6h erhöhte 1 μ M Camptothecin den Anteil der Zellen in Apoptose (Q4) auf 13,3% verglichen mit 0,5% in unbehandelten Kontrollen. LPS hat zu diesem Zeitpunkt keine erkennbare Wirkung auf die Zellkultur, ebenso 3mM TEGDMA auch wenn der Anteil der Zellen in der späten Apoptose auf 5,8% (Q2) steigt verglichen mit 3,5% in Kontrollen (Abb. 46). Nach 24h Expositionszeit sind die Zahlen der Zellen in Apoptose und Nekrose beträchtlich gewachsen (Abb. 47). In Kulturen, die 1 μ M Camptothecin ausgesetzt waren, sinkt zwar der Anteil der Zellen in Apoptose, es steigt jedoch derjenige in der späten Phase der Apoptose und Nekrose auf 47% und 31,3% (Q1) verglichen mit 2% und 5,9% in unbehandelten Kontrollen. LPS erhöhte den Anteil der Zellen in der späten Apoptose auf 16,4%, allerdings waren immer noch 78,1% der Zellen vital. Die Toxizität von 3mM TEGDMA nahm dramatisch zu, denn 9,9% der Zellen waren nekrotisch, 33,7% befanden sich in der späten Phase der Apoptose und 14,6% in Apoptose. Lediglich 41,7% wurden nach PI- und Annexinfärbung als vital erkannt (Abb. 47).

Werden die Zellkulturen einer Kombination aus LPS und TEGDMA exponiert, so scheint das LPS die RAW-Zellkulturen zumindest nach einer Expositionsdauer von 24h in geringem Maße vor der Toxizität des TEGDMA zu schützen. In Gegenwart von LPS wurden 53,0% vitale Zellen detektiert verglichen mit 41,7% in Kulturen, die mit TEGDMA alleine behandelt wurden (Abb. 47). Nach 6h Exposition entsprechen die jeweiligen Anteile der Zellen in den verschiedenen Stadien der Apoptose und Nekrose denjenigen mit TEGDMA allein (nicht dargestellt). LPS hat nach 6h noch keine schützende Funktion gegen die Toxizität des TEGDMA, verstärkt allerdings auch nicht den Effekt des Monomers (Abb. 46).

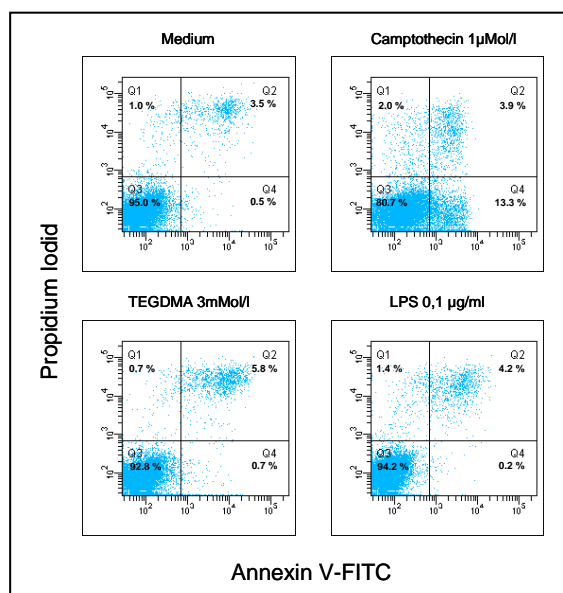


Abb. 46. Induktion von Apoptose in RAW-Makrophagen durch LPS und TEGDMA. Die Abbildung zeigt Dotplots nach FACS-Analysen. Zellkulturen wurden den Substanzen für 6h dauerhaft exponiert. Anschließend wurden die Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen AnnexinV-FITC und Propidiumjodid (PI) gefärbt und mit einem Durchflusszytometer vermessen und mit der FACSDiva 5.0.2 Software analysiert. Q1= Anteil der PI-gefärbten Zellen; Q2= Anteil der Annexin- und PI-gefärbten Zellen; Q3= Anteil der Annexin-gefärbten Zellen; Q4=Anteil der nicht gefärbten Zellen.

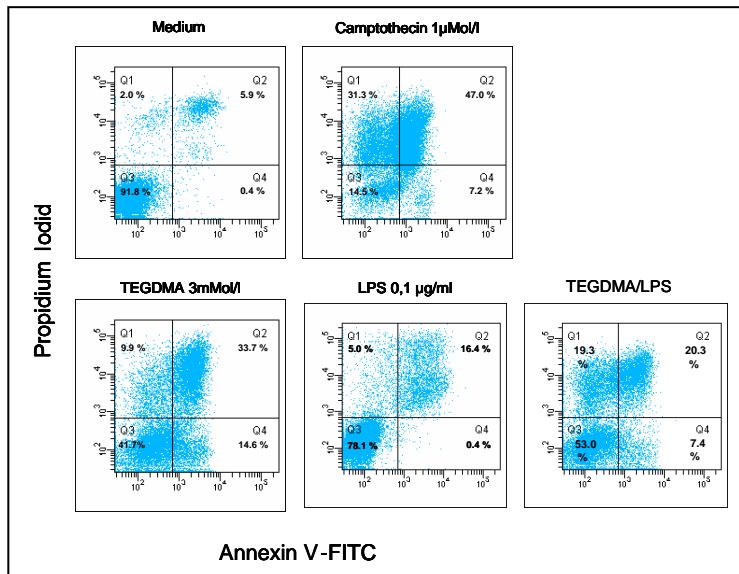


Abb. 47. Induktion von Apoptose in RAW-Makrophagen durch LPS und TEGDMA. Die Abbildung zeigt Dotplots nach FACS-Analysen. Zellkulturen wurden den Substanzen für 24h dauerhaft exponiert. Anschließend wurden die Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen AnnexinV-FITC und Propidiumjodid (PI) gefärbt und mit einem Durchflusszytometer vermessen und mit der FACSDiva 5.0.2 Software analysiert. Q1= Anteil der PI-gefärbten Zellen; Q2= Anteil der Annexin- und PI-gefärbten Zellen; Q3= Anteil der Annexin-gefärbten Zellen; Q4=Anteil der nicht gefärbten Zellen.

TEGDMA und LPS sowie die Kombination aus LPS und TEGDMA induzieren Apoptose in RAW-Zellen. Der Grad der Toxizität der beiden Substanzen nimmt mit längerer Expositionsdauer zu. Originell ist nun die Beobachtung, dass die Zunahme des Anteils der Zellen in Apoptose und Nekrose nach 24h verglichen mit 6h exakt der Zunahme des Grads der Aktivierung der verschiedenen MAPK entspricht. Die Zahl der Zellen in Apoptose und Nekrose ist in den TEGDMA-behandelten Kulturen 24h höher als nach 6h, und genau so ist der Grad der Aktivierung der MAPK nach 24h höher als nach 6h (vgl. Kapitel 2.2). Außerdem bewirkt 3mM TEGDMA einen höheren Anteil an Zellen in Apoptose und Nekrose als 0.1 µg/ml LPS und entsprechend höher ist der Grad der Aktivierung der MAPK. Also steuern vor allem MAPK den Prozess der TEGDMA-induzierten Apoptose. Das Gleichgewicht zwischen der Wirkung der MAPK, die das Überleben der Zellen unter diesen Bedingungen befördert – etwa ERK1/2 – neigt sich auf diese Seite der Wirkung derjenigen MAPK, die wegen großer Zellschäden die Apoptose einleiten – etwa p38/JNK. Eine Antwort auf diese Frage - welche der MAPK nun spezifisch die TEGDMA-induzierte Apoptose reguliert -, ist momentan nicht bekannt und soll mittels Inhibitoren für die MAPK experimentell erarbeitet werden. Einzelheiten dazu sind im Arbeitsprogramm formuliert.

3. Literaturverzeichnis

- Attardi LD, de Vries A, Jacks T (2004) Activation of the p53-dependent G1 checkpoint response in mouse embryo fibroblasts depends on the specific DNA damage inducer. *Oncogene*, 23, 973-980.
- Asp J, Thornemo M, Inert S, Lindahl A (1998) The helix-loop-helix transcription factors Id1 and Id3 have a functional role in control of cell division in human normal and neoplastic chondrocytes. *FEBS Lett*, 438, 85-90.
- Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421, 499-506.
- Blasina A, Price BD, Turenne GA, McGowan CH (1999) Caffeine inhibits the checkpoint kinase ATM. *Curr Biol*, 9, 1135-8.
- Bode AM, Dong Z (2007) The functional contrariety of JNK. *Mol Carcinog*, 46, 591-8.
- Bridge WL, Vandenberg CJ, Franklin RJ, Hiom K. The BRIP1 helicase functions independently of BRCA1 in the Fanconi anemia pathway for DNA crosslink repair. *Nat Genet*, 2005, 37, 953-7.
- Chalmers CJ, Gilley R, March HN, Balmanno K, Cook SJ. The duration of ERK1/2 activity determines the activation of c-Fos and Fra-1 and the composition and quantitative transcriptional output of AP-1. *Cell Signal*, 2007, 19, 695-704
- Chen XL, Kunsch C. Induction of cytoprotective genes through Nrf2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Pharm Des* 2004;10:879-91.
- Dong C, Davis RJ, Flavell RA (2002). MAP Kinases in the immune response. *Ann Rev Imm*, 20, 55-72.
- Eckhardt A, Harorli T, Limtanyakul J, Hiller K-A, Bosl C, Bolay C, Reichl FX, Schmalz G, Schweikl H. Inhibition of cytokines and surface antigen expression in LPS-stimulated murine macrophages by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials*, *in press*.
- Fox GC, Shafiq M, Briggs DC, Knowles PP, Collister M, Didmon MJ, *et al.* (2004) Redox-mediated substrate recognition by Sdp1 defines a new group of tyrosine phosphatases. *Nature*, 447, 487-92.
- Franchitto A, Pichierri P, Mosesso P, Palitti F. Caffeine effect on the mitotic delay induced by G2 treatment with UVC or mitomycin C. *Mutagenesis* 1998;13:499-505.
- Gwinn MR, Vallyathan V (2006) Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 9,27-39.
- Hashimoto T, He Z, Ma WY, Schmid PC, Bode AM, Yang CS, Dong Z (2004) Caffeine inhibits cell proliferation by G0/G1 phase arrest in JB6 cells. *Cancer Res*, 64, 3344-9.
- Hegedus Z, Czibula A, Kiss-Toth E (2006) Tribbles: novel regulators of cell function; evolutionary aspects. *Cell Mol Life Sci*, 63, 1632-41.
- Horn F, Henze C, Heidrich K (2000) Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function. *Immunobiology*, 202, 151-167.
- Imai K, Takeshita A, Hanazawa S (2000) Transforming growth factor-beta inhibits lipopolysaccharide-stimulated expression of inflammatory cytokines in mouse macrophages through downregulation of activation protein 1 and CD14 receptor expression. *Infect Immun*, 68,2418-23.
- Iyer VN, Szybalski W (1963) A Molecular mechanism of Mitomycin action: Linking of complementary DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 50, 355-362.
- Jackson PK (2004) Linking tumor suppression, DNA damage and the anaphase-promoting complex. *Trends Cell Biol*, 14, 331-4.
- Kaltenbach J P, Kaltenbach M H, Lyons W B. Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells, 1958,

- Experimental Cell Research 1958;11;112-117
- Kaina B (2003) DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochem Pharmacol*, 66, 1547-1554.
- Kurz EU, Douglas P, Lees-Miller SP. Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 2004, 279, 53272-81
- Männel DN, Echtenacher B (2000) TNF in the inflammatory response. *Chem Immunol*, 74, 141-161.
- Legarza K, Yang LX. New molecular mechanisms of action of camptothecin-type drugs. *Anticancer Res*, 2006, 26(5A): 3301-5
- Matsuzawa A, Ichijo H (2005) Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal*, 7, 472-81
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Ann Rev Imm*, 19, 683-765.
- Munoz C, Castellanos MC, Alfranca A, Vara A, Esteban MA, Redondo JM et al. (1996) Transcriptional up-regulation of intracellular adhesion molecule-1 in human endothelial cells by the antioxidant pyrrolidine dithiocarbamate involves the activation of activating protein-1. *J Immunol*, 157,3587-97.
- Nishiyama A, Matsui M, Iwata S, Hirota K, Masutani H, Nakamura H, *et al.* (1999) Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J Biol Chem*, 274, 21645-50.
- Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA (2002) Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet*, 36, 617-656.
- Oyama F, Kotliarova S, Harada A, Ito M, Miyazaki H, Ueyama Y, *et al.* (2004) Gem GTPase and tau: morphological changes induced by gem GTPase in cho cells are antagonized by tau. *J BiolChem*, 279:27272-7.
- Owens DM, Keyse SM (2007) Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*, 26, 3203-13.
- Park LJ, Ju SM, Song HY, Lee JA, Yang MY, Kang YH et al. (2006) The enhanced monocyte adhesiveness after UVB exposure requires ROS and NF-kappaB signaling in human keratinocyte. *J Biochem Mol Biol*, 39,618-25.
- Patwari P, Higgins LJ, Chutkow WA, Yoshioka J, Lee RT (2006). The interaction of thioredoxin with Txnip. Evidence for formation of a mixed disulfide by disulfide exchange. *J Biol Chem*, 281, 21884-91.
- Rowland BD, Bernards R, Peeper DS (2005) The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol*, 7, 1074-82.
- Thomas EK, Nakamura M, Wienke D, Isacke CM, Pozzi A, Liang P (2005) Endo180 binds to the C-terminal region of type I collagen. *J Biol Chem*, 280, 22596-605.
- Traore K, Sharma RB, Burek CL, Trush MA (2007) Role of ROS and MAPK in TPA-induced ICAM-1 expression in the myeloid ML-1 cell line. *J Cell Biochem*, 100:1010-21.
- Tsai MY, Wang S, Heidinger JM, Shumaker DK, Adam SA, Goldman RD, *et al.* (2006) A mitotic lamin B matrix induced by RanGTP required for spindle assembly. *Science*, 311, 1887-93.
- Schweikl H, Schmalz G (1999) Triethylene glycol dimethacrylate induces large deletions in the hprt gene of V79 cells. *Mutat Res*, 438, 71-78.
- Schweikl H, Schmalz G, Spruss T (2001) The induction of micronuclei *in vitro* by unpolymerized resin monomers, *J Dent Res*, 80, 1615-1620.

- Schweikl H, Schmalz G, Weinmann W (2004) The induction of gene mutations and micronuclei by oxiranes and siloranes in mammalian cells *in vitro*. *J Dent Res*, 83, 17-21.
- Schweikl H, Altmannsberger I, Hanser N, Hiller K.-A., Bolay C, Brockhoff G, Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G (2005) The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. *Biomaterials*, 26, 4111 – 4118.
- Schweikl H, Hiller K-A, Eckhardt A, Bolay C, Spagnuolo G, Schmalz G (2008) Differential gene expression involved in oxidative stress response caused by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials*, 29, 1377-1387.
- Song L, Jope RS (2006) Cellular stress increases RGS2 mRNA and decreases RGS4 mRNA levels in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett*, 402, 205-9.
- G. Spagnuolo, V. D'Antò, R. Valletta, C. Strisciuglio, G. Schmalz, H. Schweikl, S. Rengo (2008) Effect of HEMA on human pulp cells survival pathways ERK and Akt. *J Endod*, 34, 684-688.
- Splingard A, Menetrey J, Perderiset M, Cicolari J, Regazzoni K, Hamoudi F, *et al.* (2007) Biochemical and structural characterization of the gem GTPase. *J Biol Chem*, 282, 1905-15.
- Stanislowski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Perianin A (2003) TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res*, 66A, 476-482.
- Walther UI, Siagian II, Walther SC, Reichl FX, Hickel R (2004) Antioxidative vitamins decrease cytotoxicity of HEMA and TEGDMA in cultured cell lines. *Arch Oral Biol*, 49, 125-131.
- Weinmann W, Thalacker C, Guggenberger R (2005) Siloranes in dental composites. *Dent Mater*, 21, 68-74.
- Zhong X, Liu L, Zhao A, Pfeifer GP, Xu X. The abnormal spindle-like, microcephaly-associated (ASPM) gene encodes a centrosomal protein. *Cell Cycle* 2005;4:1227-9.
- Zhou BB, Chaturvedi P, Spring K, Scott SP, Johanson RA, Mishra R, Mattern MR, Winkler JD, Khanna KK (2000) Caffeine abolishes the mammalian G(2)/M DNA damage checkpoint by inhibiting ataxia-telangiectasia-mutated kinase activity. *J Biol Chem*, 275, 10342-8.