

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
DIREKTOR PROF. DR. G. SCHMALZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Oxidative DNA-Schäden und Aktivierung von ATM
und MAP-Kinasen unter dem Einfluss von TEGDMA**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Nicol Gerstmayr

2009

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
DIREKTOR PROF. DR. G. SCHMALZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Oxidative DNA-Schäden und Aktivierung von ATM
und MAP-Kinasen unter dem Einfluss von TEGDMA**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Nicol Gerstmayr

2009

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Helmut Schweikl
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Michael Behr
Tag der mündlichen Prüfung:	15.07.2009

Für meine Eltern

Aus dem Projekt sind folgende Veröffentlichungen hervorgegangen:

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, N. Gerstmayr, S. Pongratz, K.-A. Hiller, G. Schmalz, H. Schweikl (2009) DNA oxidation by a dimethacrylate and an epoxy monomer. *Archives of Pharmacology*, 379, 74 (365).

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).

Vorwort

Die vorliegende Dissertation ist die Zusammenfassung eines Aufsatzes, der in der Fachzeitschrift *Biomaterials* publiziert wurde. Der vollständige Titel der in englischer Sprache verfassten Arbeit lautet:

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.

Die Titelseite der Originalarbeit verweist darauf, dass die Autoren N. Gerstmayr und A. Eckhardt zu gleichen Teilen zur Arbeit beigetragen haben.

Die englische Originalarbeit ist im Anschluss an die deutsche Zusammenfassung beigelegt. Die Literaturangaben im deutschen Text können aus der Originalarbeit entnommen werden.

Regensburg, April 2009

Nicol Gerstmayr

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	9
2.	Einleitung	9
3.	Experimentelles Vorgehen	12
4.	Ergebnisse	14
4.1.	Zytotoxizität von TEGDMA in THP-1-Zellen	14
4.2.	Die Bildung von 8-Oxoguanin in THP-1-Zellen	14
4.3.	Zellzyklusanalyse und Aktivierung von ATM	15
4.4.	Expression von phospho-p38 und phospho-ERK1/2	16
5.	Diskussion	17
5.1.	Der Einfluss von TEGDMA auf die Vitalität von THP-1-Zellen	17
5.2.	TEGDMA induziert 8-Oxoguanin in THP-1-Zellen	18
5.3.	Veränderungen des Zellzyklus und die Aktivierung von ATM	19
5.4.	Aktivierung von MAPK durch TEGDMA	22
6.	Schlussfolgerung	24
7.	Danksagung	26

Originalarbeit

1. Zusammenfassung

Die Entwicklung von Strategien zum Schutz von oralem Gewebe vor negativen Wirkungen von Kunststoffmonomeren basiert in erster Linie auf der Aufklärung zugrunde liegender molekularer Mechanismen. Die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) über die Kapazität redoxregulierender Mechanismen einer Zelle hinaus ist wahrscheinlich der Grund für Zellschäden. In der vorliegenden Arbeit wurden oxidative DNA-Schäden, die zelluläre Reaktion darauf durch die Aktivierung von ATM sowie die Signaltransduktion durch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) nach Exposition gegen das Monomer Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) analysiert. TEGDMA-Konzentrationen von 3-5 mM reduzierten die Vitalität von THP-1-Monozyten nach einer Expositionszeit von 24 und 48 Stunden und erhöhten die Menge an 8-Oxoguanin (8-oxoG) um das 3-5-fache. In Anwesenheit von N-Acetylcystein (NAC) wurden die Zellen teilweise vor dieser Toxizität geschützt. TEGDMA verzögerte den Zellzyklus, denn in Kulturen, die 3-5 mM TEGDMA exponiert wurden, stieg die Zahl der THP-1-Zellen in der G1-Phase um das Doppelte und verfünffachte sich in der G2-Phase. Außerdem wurde ATM durch TEGDMA aktiviert. Die Menge an phospho-p38 verdreifachte sich durch 3 mM TEGDMA nach 24 und 48 Stunden Expositionsdauer verglichen mit unbehandelten Kontrollen, und ERK1/2 wurde in etwa gleich stark aktiviert. Die Aktivierung beider MAPKs wurde durch NAC gehemmt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege mit der Induktion von oxidativem Stress durch Kunststoffmonomere einhergeht. Die Signalübertragung durch ATM deutet auf oxidative DNA-Schäden hin und die Aktivierung von MAPK-Signalwegen lässt auf eine stressinduzierte Regulation von Zellüberleben und Apoptose schließen.

2. Einleitung

Zytotoxische Eigenschaften zahnärztlicher Komposite basieren auf Monomeren, die zelluläre Strukturen und Funktionen verändern. Es ist bekannt, dass Monomere wie Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) und 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) wesentliche Zellfunktionen wie Enzymaktivitäten, oder Protein- und DNA-Synthese in

vielen Zelllinien verändern [1-3]. Auch genomische DNA ist ein direktes oder indirektes Zielmolekül dieser Substanzen in *in vitro*-Systemen [4,5]. Jedoch sind die molekularen Vorgänge dieser genetischen und zellulären Toxizität von Monomeren bisher weitgehend unbekannt. Erkenntnisse über die Mechanismen der Toxizität von zahnärztlichen Werkstoffen auf zellbiologischer Ebene sind dessen ungeachtet äußerst erstrebenswert, weil es die Entwicklung effektiver Strategien zum Schutz von Zielgeweben ermöglichen kann [6]. Ein detailliertes Verständnis führt zu einer besseren Einschätzung der mit restaurativen Zahnbehandlungen verbundenen Risiken.

Es scheint, dass vor allem die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nach Exposition gegen Kunststoffmonomere zu oxidativen Schäden zellulärer Strukturen führt. Obwohl die Art der Entstehung von ROS noch unklar ist, bewirken sowohl TEGDMA als auch HEMA eine Zunahme an ROS in unterschiedlichen Zelllinien [8,9]. Jedoch werden Zellen durch nichtenzymatische Antioxidantien wie N-Acetylcystein (NAC), Ascorbat und Trolox (wasserlösliches Vitamin E) vor TEGDMA- und HEMA-bedingten Schäden geschützt [7,9-11]. Interessanterweise reduziert die Produktion von ROS den Gehalt des physiologischen Sauerstoffradikalfängers Glutathion (GSH). Jedoch ist die Abnahme an reduziertem GSH offenbar nicht mit einer Zunahme an oxidiertem Glutathion (GSSG) verbunden [9,12,13].

ROS können mit zellulären Biomolekülen wie der DNA interagieren und Schäden an DNA-Basen verursachen. Das häufigste Addukt, 8-Oxoguanin (8-oxoG) könnte die Integrität des Genoms gefährden. Viele oxidative Basenveränderungen sind mutagen, weil etwa Adenin fälschlicherweise gegenüber von 8-oxoG bei der DNA-Replikation eingebaut wird und so eine A:C-Substitution erfolgt [14,15]. Dennoch wurde bislang nicht über oxidative DNA-Schäden von Zellen berichtet, welche zahnärztlichen Werkstoffen exponiert wurden. Deshalb war eine der Hypothesen der vorliegenden Arbeit, dass die Produktion von ROS über die Kapazität der redoxregulierenden Mechanismen hinaus zur Aktivierung zellulärer Verteidigungsmechanismen führen sollte. DNA-Strangbrüche als Folge von DNA-Oxidation sind in Säugetierzellen ein Signal, das von Signalproteinen erkannt wird, die ihrerseits Proteine der Kontrollpunkte der verschiedenen Phasen des Zellzyklus aktivieren. Ataxia telangiectasia-mutated (ATM), eine Serin/Threonin-Proteinkinase, wird durch die Signale über DNA-Schäden aktiviert und ist ein zentraler Regulator im Zellzyklus

von Säugetierzellen. Es verzögert oder stoppt letztlich den Zellzyklus und ermöglicht so die DNA-Reparatur oder die Aktivierung des programmierten Zelltods [16,17].

Die Aktivierung von Stoffwechselwegen, welche das Überleben und die Proliferation der Zelle kontrollieren ist eine weitere zelluläre Reaktion auf oxidativen Stress [18]. Die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) ERK1/2, JNK und p38 sind Regulatoren, die unter physiologischen Bedingungen Signale von Wachstumsfaktoren und Mitogenen vom Zytoplasma zum Kern weiterleiten. MAPKs steuern das normale Zellwachstum indem sie das Gleichgewicht zwischen Zelltod und Zellüberleben regulieren. Es ist bekannt, dass dieses komplexe System von Signalübertragungen auf Umwelteinflüsse reagiert. Die Stresskinasen JNK und p38 sind wohl hauptsächlich mit Apoptose verbunden, während ERK1/2 mit der Regulation des Zellüberlebens zusammenhängt und eher Apoptose verhindert [18,19]. Es wurde berichtet, dass JNK und ERK1/2 zelluläre Antworten auf oxidativen Stress in einer zelltyp- und zeitabhängigen Weise regulieren [20]. Die Menge an ROS scheint eine zentrale Rolle in der unterschiedlichen Aktivierung der MAPKs und der Regulierung von Apoptose zu spielen [21]. Man geht momentan davon aus, dass Apoptose und die Steuerung des Zellüberlebens letztendlich durch Interaktion zwischen diesen Regulatoren und denen des zellulären Redoxpotentials erfolgt [18].

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss des Kompositmonomers TEGDMA auf verschiedene Parameter zu untersuchen, die zum Zelltod führen können, um so einen Einblick in die zugrunde liegenden zellbiologischen Mechanismen zu bekommen. Insbesondere wurde die Bildung oxidativer DNA-Schäden bestimmt, welche mit der Aktivierung von ATM und Veränderungen im normalen Zellzyklus zusammenhängen. Zuletzt wurde der Einfluss des Monomers auf Signaltransduktionswege über die Aktivierung der Kinasen p38 und ERK1/2 untersucht. Die humane Makrophagenzelllinie THP-1 wurde dazu als Modell für Zellen des angeborenen Immunsystems verwendet. In erster Linie lösen die Zellen des angeborenen Immunsystems durch die komplexe Interaktion von Signalübertragungen Entzündungsreaktionen aus [22].

3. Experimentelles Vorgehen

Humane THP-1-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% fötalem Rinderserum kultiviert. TEGDMA (CAS-No. 109-16-0) wurde in DMSO gelöst und anschließend in Kulturmedium verdünnt. Die Menge an DMSO wurde in allen TEGDMA-Konzentrationen konstant gehalten. Ein Einfluss des Lösungsmittels auf die hier untersuchten Parameter wurde in Kontrollversuchen nicht entdeckt. NAC wurde in deionisiertem Wasser gelöst und dann in Zellkulturmedium verdünnt. Das NAC-enhaltene Medium wurde eine Stunde vor Gebrauch auf pH 7,2 bei 37°C eingestellt. Das Zellüberleben nach Exposition gegen TEGDMA allein oder in Anwesenheit von unterschiedlichen NAC-Konzentrationen wurde mit dem MTT-Test untersucht. THP-1-Zellen wurden steigenden Konzentrationen von TEGDMA (0-5 mM) und NAC (0-10 mM) für 2, 24 und 48 Stunden exponiert.

Die Bildung von 8-Oxoguanin (8-oxoG) wurde mit einem OxyDNA-Kit (Biotrin Ltd, Dublin, Irland) bestimmt. Dazu wurden THP-1-Zellen mit TEGDMA-Konzentrationen von 0–5 mM mit und ohne 5 mM NAC für 2, 24 und 48 Stunden behandelt. Wasserstoffperoxid (0,017%) wurde hier als Positivkontrolle verwendet. Die Zellen jedes Ansatzes wurden mit FITC-markierten Antikörpern gegen 8-oxoG bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden nochmals mit PBS gewaschen und anschließend mit Durchflußzytometrie analysiert. Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines FACSCalibur™ (Becton Dickinson) bestimmt. Die mittlere Fluoreszenzintensität von 20000 Zellen pro Probe wurde mittels Histogrammen mit der CellQuest™ Software ermittelt.

Für Zellzyklusanalysen wurden die THP-1-Zellen wieder steigenden TEGDMA-Konzentrationen für 2 Stunden exponiert und danach für weitere 22 und 46 Stunden in frischem Medium kultiviert. Danach wurden die Zellen gesammelt, in kaltem PBS/2%BSA resuspendiert und für mindestens 24 Stunden in Methanol bei -20° gelagert. Danach wurde das Zellpellet in PBS/2%BSA resuspendiert und mit RNase behandelt. Letztendlich wurde mit Propidiumjodid (PI) gefärbt und die Probe wurde durchflußzytometrisch analysiert (FACSCalibur™). Die PI-Fluoreszenz (FL-3) wurde in 20000 Ereignissen mit der CellQuest™ Software erfasst und gespeichert. Die Zahl

der Zellen in der G1-, S- und G2-Phase des Zellzyklus wurde mit der Multicycle Software für Windows berechnet.

Die Bildung der aktivierten Signalproteine phospho-ATM, phospho-p38 und phospho-ERK1/2 wurde ebenfalls durchflußzytometrisch analysiert. THP-1-Zellen wurden TEGDMA-Konzentrationen von 0-5 mM mit und ohne 5 mM NAC für 2, 24 und 48 Stunden exponiert. Dann wurden die Zellpellets in paraformaldehydhaltigem PBS resuspendiert und fixiert. Als nächstes wurden die Zellen in Methanol permeabilisiert und mit anti-phospho-ATM-FITC-, anti-phospho-ERK1/2-, oder anti-phospho-p38-Antikörpern markiert. Die Proben wurden anschließend durchflußzytometrisch (FACSCalibur™) analysiert. Die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten (MFIs) wurden mit Histogrammstatistiken der CellQuest™ Software ermittelt und als Maß für die Bildung von phospho-ATM verwendet. Die Bildung von phospho-p38 und phospho-ERK1/2 wurde mit der CellQuest™ Software als Prozentsatz der für das Merkmal positiven Zellen detektiert.

Alle Meßergebnisse wurden statistisch analysiert. In den Analysen zur Zellvitalität wurden insgesamt 16 einzelne Messungen (Zellkulturen) für alle getesteten TEGDMA- und NAC-Konzentrationen in vier unabhängigen Experimenten als optische Dichten erfasst. Sämtliche Daten aus den TEGDMA-behandelten Kulturen wurden auf unbehandelte Kontrollen normiert (=100%). Die Bildung von 8-Oxoguanin und phospho-ATM wurde ebenso in vier unabhängigen Experimenten bestimmt. Durchschnittliche Fluoreszenzintensitäten in unbehandelten und behandelten Zellkulturen wurden auf Messungen ungefärbter Proben bezogen. Die Fluoreszenzintensitäten behandelter Zellkulturen wurden dann auf diejenigen unbehandelter Kontrollkulturen (100%) normiert. Der Prozentsatz phospho-p38- und phospho-ERK1/2-positiver Zellen wurde in mindestens vier unabhängigen Experimenten gemessen. Die Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G1-Phase) wurde aus einzelnen Histogrammen von mindestens drei unabhängigen Experimenten errechnet. Die Meßergebnisse aus einzelnen Zellkulturen wurden zu Medianen mit 25- und 75-Perzentilen zusammengefasst. Unterschiede zwischen den Medianen der Kontrollkulturen und derjenigen TEGDMA-behandelter Kulturen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests (SPSS 15.0) durch paarweises Vergleichen von Werten auf der 0,05 Signifikanzebene untersucht.

4. Ergebnisse

4.1. Zytotoxizität von TEGDMA in THP-1-Monozyten

Die hohen Konzentrationen von 3-5 mM TEGDMA verringerten die Vitalität exponierter Zellen auf 80-90% verglichen mit unbehandelten Zellkulturen bereits nach einer kurzen Expositionszeit von 2 Stunden. NAC (1, 5 und 10 mM) hatte zu diesem Zeitpunkt keinen signifikanten Einfluss auf die Zellaktivität. Die Zytotoxizität von 3-5 mM TEGDMA stieg nach 24 Stunden Exposition, jedoch verbesserte sich nun die Zellvitalität in diesen Kulturen mit zunehmenden NAC-Konzentrationen. Keine signifikanten Unterschiede der Zellvitalität ergaben sich bei Kulturen, die geringen TEGDMA-Konzentrationen (0,5-1 mM) ausgesetzt waren, unabhängig von der Anwesenheit von NAC. Eine Abnahme der Zellvitalität wurde ebenso wenig nach einer Expositionszeit von 48 Stunden bei TEGDMA-Konzentrationen unter oder gleich 1 mM festgestellt. Demgegenüber erhöhte sich die Zytotoxizität von 3-5 mM TEGDMA mit dieser längeren Expositionsdauer, wobei alle getesteten NAC-Konzentrationen die Zellen zugleich vor TEGDMA-Zytotoxizität schützten. Bemerkenswerterweise reduzierte 10 mM NAC auch die Zellvitalität von Zellkulturen, die in 0-1 mM TEGDMA für 48 Stunden exponiert waren beträchtlich. Es schien, als ob 5 mM NAC am besten vor zytotoxischen Effekten hoher TEGDMA-Konzentrationen schütze, obgleich der Unterschied zwischen Zellvitalitäten in Kulturen mit 1 oder 5 mM NAC mit und ohne TEGDMA nicht signifikant waren ($p > 0,05$).

4.2. Die Bildung von 8-Oxoguanin in THP-1-Monozyten

THP-1-Zellen wurden 1, 3 oder 5 mM TEGDMA für 2, 24 und 48 Stunden exponiert, um die Induktion oxidativer DNA-Schäden zu analysieren. Nach 2 Stunden Exposition wurde in den mit TEGDMA behandelten Kulturen keine erhöhte Menge an 8-oxoG verglichen mit Kontrollen gefunden. Im Unterschied dazu steigerte TEGDMA die Menge an 8-oxoG in THP-1-Zellkulturen konzentrationsabhängig nach 24 Stunden. Verglichen mit unbehandelten Kontrollen wurden etwa 2-3-fach höhere Mengen an 8-oxoG in Zellkulturen detektiert, die 1, 3 und 5 mM TEGDMA exponiert waren. Die höchste TEGDMA-Konzentration, die hier getestet wurde war genauso

effektiv wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2 ; 0.017%), welches als Positivkontrolle verwendet wurde. Die Bildung von 8-oxoG halbierte sich bei jeder TEGDMA-Konzentration in Anwesenheit von 5 mM NAC. Sehr ähnliche Ergebnisse erlangte man nach 48 Stunden Expositionsdauer, allerdings wurde nun keine schützende Wirkung von NAC auf THP-1-Zellen entdeckt.

4.3. Zellzyklusanalyse und Aktivierung von ATM

DNA-Schäden führen zur Aktivierung von Signalproteinen an Zellzykluskontrollpunkten. Folglich wurde auch der Einfluss von TEGDMA auf den Zellzyklus von THP-1-Zellen bei einer Expositionsdauer von 2 Stunden untersucht. Die Zellverteilung auf die einzelnen Phasen des Zellzyklus in den behandelten und unbehandelten Zellkulturen wurde nach zusätzlichen 22 und 46 Stunden Expressionsdauer berechnet. In unbehandelten Kulturen befanden sich etwa 37% der Zellen in der G1-Phase und 62% in der S-Phase, was auf eine hohe Proliferationsaktivität der THP-1-Zellen unter den vorherrschenden experimentellen Bedingungen hindeutete. Klare Unterschiede im Zellzyklusverlauf erkannte man jedoch in Abhängigkeit von steigenden TEGDMA-Konzentrationen. Die Zahl der Zellen in der G1-Phase stieg von 37% in unbehandelten Kontrollen auf 45% in Kulturen, die 3 und 5 mM TEGDMA für 2 Stunden exponiert und danach weitere 22 Stunden kultiviert wurden. Die Zellzahl in der G2-Phase stieg ebenfalls von etwa 1% in unbehandelten Kulturen auf 15% in TEGDMA-behandelten Kulturen. Die Wirkung von TEGDMA auf die G1-Phase war noch ausgeprägter, wenn die Zellen für 48 Stunden inkubiert wurden. Die Zellzahl in G1 stieg kontinuierlich mit zunehmender TEGDMA-Konzentration von 39% in unbehandelten Kontrollen auf 59% in Kulturen mit 5 mM TEGDMA. Umgekehrt nahm der Prozentsatz an Zellen in der S-Phase entsprechend ab. Wieder war ein Anstieg der Zellzahlen in der G2-Phase zu erkennen, denn die Zellzahl stieg von etwa 2% in unbehandelten Kulturen auf 9% in Kulturen, die gegen 5 mM TEGDMA exponiert waren.

Die Aktivierung von ATM durch Phosphorylierung ist ein Schlüsselereignis in der schnellen Reaktion auf DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs). Ähnlich wie bei den Ergebnissen von 8-oxoG wurde hier pATM in den mit TEGDMA-behandelten THP-1-Zellen in Abhängigkeit von der Expressionsdauer vermehrt gebildet. Es gab aber zunächst keine signifikante Zunahme an pATM in TEGDMA-behandelten Kulturen

verglichen mit unbehandelten Kulturen nach 2 Stunden Expositionsdauer. Jedoch verstärkte sich die Bildung von pATM nach 24 Stunden in Zellkulturen mit steigenden TEGDMA-Konzentrationen um 25-50% verglichen mit unbehandelten Kontrollen. Ferner führte eine Expositionsdauer von 48 Stunden zu einer TEGDMA-induzierten Verdoppelung der pATM-Menge. Eine Abnahme an pATM wurde in Anwesenheit von NAC allerdings nicht festgestellt.

4.4. Expression von phospho-p38 und phospho-ERK1/2

Die Zahl phospho-p38-positiver Zellen stieg in TEGDMA-behandelten Zellkulturen nach 2 Stunden Expositionsdauer nicht signifikant. Ein geringer Anstieg der Zahl positiver Zellen von 8% auf 12% durch 5 mM TEGDMA wurde durch NAC nicht gehemmt. Die Menge an phospho-p38 in behandelten Kulturen nahm erst nach 24 Stunden Exposition gegen 3 und 5 mM TEGDMA um das 2,5-fache zu. Die starke Aktivierung von p38 durch 5 mM TEGDMA wurde nun durch NAC inhibiert. Die Phosphorylierung von p38 stieg nach 48 Stunden in Kulturen, die 3 und 5 mM TEGDMA exponiert wurden nochmals gleichmäßig an und wurde wieder durch NAC gehemmt.

TEGDMA aktivierte phospho-ERK1/2 auf eine sehr ähnliche Art wie phospho-p38. Nach 2 Stunden Expositionsdauer wurde noch kein signifikanter Unterschied zwischen den Mengen an phospho-ERK1/2 in TEGDMA-behandelten Zellkulturen und in unbehandelten Kontrollen gefunden. Nach 24 Stunden Exposition wurde ERK1/2 jedoch um das 4-6-fache mit 3 und 5 mM TEGDMA aktiviert. Die Mengen an aktiviertem ERK1/2 stiegen noch mehr in Zellkulturen, die 3 und 5 mM TEGDMA für 48 Stunden exponiert wurden. NAC inhibierte die TEGDMA-abhängige Bildung von phospho-ERK1/2 nach einer Expositionsdauer von 24 und 48 Stunden, aber dieser Effekt war nicht signifikant.

5. Diskussion

5.1. Der Einfluss von TEGDMA auf die Vitalität von THP-1-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde eine geringe Abnahme der Vitalität von THP-1-Monozyten nach einer kurzen Expositionsdauer lediglich mit hohen TEGDMA-Konzentrationen beobachtet, während Konzentrationen bis 1 mM TEGDMA keine Abnahme der Zellvitalität nach 24 und 48 Stunden Expositionsdauer verursachten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Widerstandsfähigkeit der THP-1-Monozytenlinie gegen zytotoxische Effekte von TEGDMA hoch ist und damit den Eigenschaften anderer vergleichsweise resistenter Zelllinien einschließlich Gingiva- und Pulpazellen gleichen [23-25]. Die zytotoxische Wirkung hoher TEGDMA-Konzentrationen in THP-1-Zellen wurde hier durch den Sauerstoffradikalfänger NAC konzentrationsabhängig reduziert. Diese Ergebnisse verweisen darauf, dass eine abnehmende Zellvitalität in Gegenwart des Kompositmonomers TEGDMA mit der Bildung von ROS und einem Ungleichgewicht im zellulären Redoxstatus assoziiert ist. Es ist aus früheren Analysen bekannt, dass neben dem zellulären Glutathion (GSH) auch andere nichtenzymatische Antioxidantien wie NAC, Vitamin C und Vitamin E in der Lage sind, Zellen zumindest teilweise vor der Zytotoxizität von Kunststoffmonomeren zu schützen [9,26,27]. Die deutliche Abnahme der THP-1-Zellvitalität in Kulturen mit hohen NAC-Konzentrationen (10 mM) und TEGDMA-Konzentrationen kleiner oder gleich 1 mM ist ein weiteres wichtiges Ergebnis. Anscheinend ist eine bestimmte Menge an ROS in THP-1-Zellen wichtig für normale Zellfunktionen. Es ist möglich, dass hohe NAC-Konzentrationen ein sehr eng reguliertes physiologisches Redoxgleichgewicht in unbehandelten Zellkulturen und Kulturen mit niedrigen TEGDMA-Konzentrationen stören. NAC könnte eine für die physiologischen Funktionen kritische Menge an ROS reduzieren [28]. Andererseits könnten hohe TEGDMA-Konzentrationen so hohe Mengen an ROS erzeugen, dass sie die Kapazität von Zellen, ein erhöhtes Niveau an oxidativem Stress auf ein physiologisches Niveau wirkungsvoll zu reduzieren, übersteigen. In der Folge werden wahrscheinlich Signaltransduktionswege aktiviert, etwa über MAP Kinasen, die Stoffwechselwege aktivieren, die Apoptose einleiten oder versuchen, das Zellüberleben zu fördern. An der Regulation dieser Stoffwechselwege sind wohl Proteine beteiligt, die reaktive Cysteinreste enthalten. So erfolgt wahrscheinlich die

Redoxregulation von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- κ B durch einen Cysteinrest [29,30]. Außerdem wurde gezeigt, dass verschiedene Reize, die ROS bilden über Nrf2 agieren, ein redoxsensitiver Transkriptionsfaktor und ein Regulator der koordinierten Expression von zytoprotektiven Genen [31,32].

5.2. TEGDMA induziert 8-Oxoguanin in THP-1-Zellen

Es ist bekannt, dass durch oxidativen Stress wichtige Zellfunktionen gestört werden, etwa über die Oxidation von Lipiden, Proteinen oder genomischer DNA. So hängt die Induktion oxidativer DNA-Schäden direkt mit einer Vielzahl degenerativer Erkrankungen zusammen. Die Bildung von 8-oxoG ist ein Merkmal für DNA-Basen-Schäden [33]. Bisher wurde die Bildung von oxidativen DNA-Schäden in Zellkulturen durch einen zahnärztlichen Werkstoff oder ein Monomer nicht gezeigt. In der vorliegenden Untersuchung induzierte TEGDMA eine konzentrationsabhängige Bildung steigender Mengen an 8-oxoG. Es scheint, als ob die Bildung von oxidativen DNA-Schäden einer langsamen Kinetik folgte, da 8-oxoG nach einer kurzen Expositionsdauer nicht entdeckt wurde, sondern erst nach 24 und 48 Stunden. Die Reduktion der 8-oxoG-Menge in Anwesenheit von NAC zeigte, dass TEGDMA den DNA-Schaden über die Bildung von ROS induzierte. Der Mechanismus und die Herkunft der ROS-Bildung in Anwesenheit zahnärztlicher Kunststoffmonomere sind momentan nicht bekannt. Es ist möglich, dass die Bildung von ROS in Anwesenheit von Monomeren durch oder als Folge einer Fenton-Reaktion vermittelt wird, wie es für Übergangselemente beschrieben wurde [34]. Man nimmt wegen der kurzen Halbwertszeit von freien Hydroxylradikalen an, dass DNA-Schäden von Radikalen verursacht werden, die lokal über DNA-assoziierte Fe^{2+} -Ionen erzeugt werden [35]. Aufgrund aktueller Erkenntnisse ist es plausibler, dass TEGDMA einen der endogenen Stoffwechselwege zur ROS-Bildung störend beeinflusst [28,36]. Ein Überschuss freier Hydroxylradikale kann DNA-Schäden wie Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüche verursachen oder abasische und basische Oxidationen erzeugen. Letztendlich kann die Bildung von 8-oxoG zu Punktmutationen führen, da diese Base die Fähigkeit besitzt, sich sowohl mit Adenin als auch mit Cytosin zu paaren mit der Folge einer G:C zu A:T-Transversion [14,15].

Die momentan verfügbaren Ergebnisse favorisieren die Ansicht, dass genotoxische und mutagene Eigenschaften von Kompositmonomeren, die *in vitro* unter verschiedenen Bedingungen beobachtet wurden, eine Folge von Basenoxidationen sind [4,5]. Auf den ersten Blick scheint es, als stünden kürzlich erzielte Ergebnisse über die Mutagenität von Monomeren wie TEGDMA und HEMA im Widerspruch zu dieser Annahme. Es wurde nämlich keine Mutagenität in *S. typhimurium* TA100 entdeckt, jedoch eine erhöhte Zahl an Mikrokernen, die auf chromosomale Schäden in V79-Zellen verweisen, nachgewiesen. Das Fehlen induzierter Basenpaar-substitutionen in *S. typhimurium* TA100 könnte auf die kurze Expositionsdauer gegen Monomere zurückzuführen sein. Die Bildung von 8-oxoG in Anwesenheit von TEGDMA folgt anscheinend einer langsamen Kinetik. Außerdem könnte eine DNA-Reparatur über die Entfernung einer oxidierten Base (Basenexzisionsreparatur) zu DNA-Einzelstrangbrüchen (SSBs) führen und der daraus folgenden Verzögerung der Replikationsgabel. Die Bildung von SSBs durch ROS wurde mit nackter DNA nachgewiesen [38,39]. Die verzögerte Öffnung des DNA-Doppelstrangs oder die Erzeugung von SSBs, welche während der Replikation zu Doppelstrangbrüchen (DSB) werden können, werden zu entsprechenden Rekombinationen und zur Induktion von DNA-Schäden führen [40]. Demnach könnte die Bildung von Mikrokernen und der Verlust großer DNA-Sequenzen, die in V79-Zellen nach Exposition gegen TEGDMA oder HEMA nachgewiesen wurde, eine Folge der Umwandlung von DNA-Einzelstrangbrüchen in klastogene DNA-Doppelstrangbrüche sein [4,37,41].

5.3. Veränderungen des Zellzyklus und die Aktivierung von ATM

Zellen reagieren auf einen DNA-Schaden durch die koordinierte Aktivierung von Sensor-, Transduktor- und Effektorproteinen, die den Zellzyklus verzögern oder stoppen, um damit die DNA-Reparatur zu ermöglichen oder Apoptose einzuleiten [17]. In der vorliegenden Arbeit induzierte das Monomer TEGDMA eine Verzögerung des Zellzyklus, was zunächst darauf verweist, dass THP-1-Zellen G1- und G2-Phasen-Kontrollpunkte aktivieren können. Möglicherweise wurde ein DNA-Schaden fast unmittelbar nach Exposition von Zellkulturen gegen TEGDMA induziert, da eine kurze Expositionsdauer eine nachhaltige Verzögerung im Zellzyklus auslöste. Außerdem deutet die Beobachtung, dass der Zellzyklus nach 46 Stunden

Erholungsdauer immer noch verzögert war darauf hin, dass der monomerinduzierte Schaden massiv war und unzureichend repariert wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden kürzlich in anderen Zelllinien beobachtet [42]. Niedrige TEGDMA-Konzentrationen verursachten eine Verzögerung der G1-Phase des Zellzyklus humaner Fibroblasten und humaner Primärzellen der Pulpa. Außerdem stieg die Zahl dieser Zellen in der G2-Phase nach Exposition gegen relativ hohe TEGDMA-Konzentrationen. Diese Ergebnisse verweisen darauf, dass das Monomer dieselben Effekte in Zellen verschiedener Gewebe verursacht, einschließlich der THP-1-Monozyten, welche hier als Modell für das angeborene Immunsystem verwendet wurden. Dennoch wurde in der vorliegenden Arbeit kein oxidativer DNA-Schaden nach einer kurzen Expositionsdauer beobachtet. Es ist möglich, dass die Menge an gebildetem 8-oxoG, welche ausreicht, um eine Verzögerung im Zellzyklus auszulösen, unterhalb der Nachweisgrenze der hier verwendeten Methode lag. Diese Annahme würde noch durch die Beobachtung gestützt werden, dass anscheinend Kontrollpunkte in den G1- und G2-Phasen sehr leicht auf DNA-Schäden reagieren. Die hier erzielten Ergebnisse lassen jedoch keine Aktivierung eines Zellzyklus-Kontrollpunktes in der S-Phase erkennen.

Die Aktivierung von ATM ist ein frühes Ereignis mit einer zentrale Rolle in der zellulären Reaktion auf DNA-Schäden. ATM wird durch Autophosphorylierung als Reaktion auf DSBs aktiviert und übermittelt dann den Schaden an Signalwege, die Zellzyklus-Kontrollpunkte und die Induktion der Apoptose regulieren [43]. Die Aktivierung von ATM in THP-1-Zellen nach Exposition gegen TEGDMA verweist auf die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen. Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Hinweis dafür, dass TEGDMA einen Überschuss an ROS erzeugt, wodurch 8-oxoG produziert wird. Die Entfernung oxidierter Basen durch Basenexzisionsreparatur könnte schließlich zu DSBs führen. Die Bildung von DSBs als Folge der zellulären Produktion von ROS und der anschließenden Aktivierung von ATM wurde eindeutig nachgewiesen [44-46]. Kürzlich wurde ebenfalls berichtet, dass das hydrophile Kunststoffmonomer 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) das Tumorsuppressorprotein p53 in Speicheldrüsenzellen von Ratten nach 12 Stunden Expositionsdauer aktivierte. Anscheinend wurde auch ATM in dieser Zelllinie nach 4 Stunden Expositionsdauer aktiviert. Allerdings wurden keine Veränderungen in der Aktivierung von p53 oder ATM nach anderen Expositionsdauern getestet [47]. Die Aktivierung

von ATM in THP-1-Zellen in der vorliegenden Arbeit war eine verzögerte Reaktion, da lediglich eine Verdopplung nach 24 und 48 Stunden Expositionsdauer entdeckt wurde.

Die Bildung von DSBs und die damit einhergehende Aktivierung von ATM wurden nach Kurz- und Langzeitexposition mit genotoxischen Agenzien beobachtet. So wurden etwa DSBs bereits 2 Minuten nach Exposition mit radioaktiver Strahlung oder karzinogenen Chemikalien bis maximal 30 Minuten nach Bestrahlung sichtbar [48]. Gleichmaßen wurde die Aktivierung von ATM durch das genotoxische Zytostatikum Doxorubicin nach 1 und 2 Stunden Expositionsdauer nachgewiesen. Es wurde angenommen, dass ROS eine Funktion in der durch Doxorubicin induzierten Aktivierung von ATM-abhängigen Signalwegen hat, und die Phosphorylierung von Chk1 und Chk2 spiegelte eine Antwort auf oxidativen Stress wider [49]. Dennoch schienen Signalwege mit einer zentralen Rolle für ATM sogar nach langen Expositionsperioden aktiv zu sein. Beispielsweise wurde die durch ATM regulierte Phosphorylierung von p53 durch HIPK2 24 Stunden nach der Bestrahlung beobachtet [50]. Es wurde allerdings auch berichtet, dass der Signalweg über ATM nach 24 Stunden und sogar längeren Expositionsperioden mit Resveratrol, einer Polyphenolverbindung, aktiviert wurde. Interessanterweise war die Aktivierung von ATM mit steigenden Mengen von Wasserstoffperoxid assoziiert [51]. Desweiteren führte wohl auch Bleinitrat zur späten Induktion von DSBs und zur Aktivierung von ATM-abhängigen Stresssignalen, wahrscheinlich aufgrund von oxidativem Stress [52]. Obwohl es möglich erscheint, dass ein ATM-Signalweg als Folge von ROS-Produktion aktiviert wird, ist die dafür notwendige Menge an ROS derzeit unbekannt. Wir können über den Grund für eine späte Aktivierung von ATM durch das Kompositmonomer TEGDMA unter den in der vorliegenden Arbeit gewählten Bedingungen momentan nur spekulieren. Wahrscheinlich erfolgt eine frühe Aktivierung von ATM durch eine hohe Menge an ROS, die zum Beispiel durch ionisierende Strahlung erzeugt wurde, als sofortige Antwort auf massiven Zellschaden und der Aktivierung von Mechanismen der zellulären Abwehr. Im Gegensatz dazu könnte eine späte Aktivierung von ATM durch geringe Mengen an ROS aufgrund schwach aktiver Fremdstoffe verursacht werden. Diese Annahme beruht auf der durch niedrige und hohe Strahlendosen bewirkten ATM-Expression [53]. Momentan ist nicht auszuschließen, dass die Erzeugung von oxidativem Stress

nach einer kurzen Expositionsdauer von THP-1-Zellen gegen TEGDMA einen relativ schwachen oxidativen DNA-Schaden auslöste und dass die Aktivierung von ATM möglicherweise unterhalb der Grenze des hier gewählten Nachweisverfahrens lag. Die Aktivierung von ATM könnte ein sehr sensibler Vorgang sein, der sogar durch schwache oxidative DNA-Schäden ausgelöst wird und eine Verzögerung im THP-1-Zellzyklus sogar nach 2 Stunden Exposition gegen TEGDMA verursacht. Derzeit können wir jedoch auch nicht ausschließen, dass die frühe Induktion der Zellzyklusverzögerung unabhängig vom Signalweg der ATM-Kinase ausgelöst wurde. Es ist möglich, dass die Zellzyklusverzögerung durch eine Anhäufung von p21 aufgrund der Aktivierung einer MAPK-Signalkaskade verursacht wurde [19].

5.4. Aktivierung von MAPK durch TEGDMA

Die Stresskinase p38 wurde in der vorliegenden Arbeit in THP-1-Zellen nach Exposition gegen TEGDMA für 24 und 48 Stunden aktiviert. Diese Aktivierung wurde wahrscheinlich durch die Erzeugung von ROS ausgelöst, da die Menge an phospho-p38 in Anwesenheit von NAC abnahm. Diese Annahme stimmt mit den bisherigen Beobachtungen und der Interpretation der Aktivierung von p38 durch ROS und besonders durch Wasserstoffperoxid überein [18,54]. Die gleiche TEGDMA-Konzentration induzierte auch die Phosphorylierung von ERK1/2 nach der gleichen Expositionsdauer und NAC inhibierte erneut die Phosphorylierung von ERK1/2. Demnach ist es wahrscheinlich, dass das gleiche Ausmaß an Ungleichgewicht im zellulären Redoxstatus die beiden verschiedenen MAP-Kinasen-Wege aktivierte. Momentan wird untersucht, ob p38 und ERK1/2 bei sehr kurzen Expositionsperioden mit TEGDMA etwa noch stärker aktiviert werden können als nach langen Expositionszeiten.

Die Aktivierung der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK1/2 durch unterschiedliche toxische Substanzen wurde in neueren Studien nach ganz verschiedenen Expositionszeiten untersucht. So wurde wie in der vorliegenden Arbeit zwar über eine anhaltende Aktivierung berichtet, die Rolle von MAPKs in der Regulation des Zellüberlebens und Apoptose allerdings sehr unterschiedlich diskutiert. Beispielsweise verursachte Cadmiumchlorid eine schnelle Phosphorylierung von p38, während die Phosphorylierung von ERK1/2 nach langer Expositionsdauer nachgewiesen wurde. Dennoch schien die Induktion von Apoptose abhängig von der

p38-Aktivierung durch ROS zu sein. Im Unterschied dazu, schien die Aktivierung von ERK1/2 in manchen Zellen in umgekehrter Beziehung zur Induktion von Apoptose zu stehen [55]. Die dauerhafte Aktivierung von ERK1/2 wurde ebenso in Zellen gefunden, welche mit aktivierten Photosensibilisatoren behandelt wurden, die in der photodynamischen Therapie verwendet werden. Wurde die dauerhafte ERK1/2-Aktivierung mit einem spezifischen Inhibitor unterbunden, so sank die Zahl überlebender Zellen, weshalb man eine schützende Wirkung der ERK1/2-Aktivierung annehmen durfte [56]. Es wurde auch eine stetige Aktivierung von p38 nach Exposition von Zelllinien gegen Arsen beobachtet, jedoch wurde die durch Arsen induzierte Apoptose wohl über die Stresskinase JNK vermittelt [57]. Außerdem verursachte die Behandlung von HeLa-Zellen mit Wasserstoffperoxid eine zeit- und dosisabhängige Induktion von Apoptose parallel zu der dauerhaften Aktivierung von ERK1/2, JNK und p38. Wahrscheinlich förderte die Aktivierung von ERK1/2 das Überleben von Zellen, weil die Inhibition von ERK1/2 die Apoptoserate erhöhte. Andererseits reduzierte eine inhibierte JNK-Aktivierung die Zahl der Zellen in Apoptose. Daher wurde angenommen, dass ERK1/2 und JNK das Überleben von Zellen in Abhängigkeit von oxidativem Stress umgekehrt beeinflussten [21]. Auch die p38 MAPK wird durch verschiedene Formen von oxidativem Stress aktiviert und steht in Zusammenhang mit der durch Oxidantien induzierten Apoptose. Dennoch fehlt momentan eine Erklärung der Mechanismen, über die MAPK die stressinduzierte Apoptose steuern [18]. Die Verwendung spezifischer Inhibitoren sollte mehr Erkenntnisse über die Rolle von p38 und ERK1/2 bei den zellulären Reaktionen nach Exposition gegen Monomere wie TEGDMA liefern.

Die Komplexität des vielfältigen Einflusses von Monomeren auf Signalkaskaden, welche den Zelltod regulieren wird durch die neuen Ergebnisse über HEMA- und TEGDMA-induzierte Zellreaktionen deutlich. So wurde berichtet, dass HEMA und TEGDMA eine ERK1/2-Phosphorylierung in einer Speicheldrüsenzelllinie nach langen Expositionszeiten auslöste. Außerdem wurde eine erhöhte Phosphorylierung sowohl von p38 als auch von JNK durch HEMA, jedoch nicht durch TEGDMA gefunden. Es wurde angenommen, dass p38 an der Induktion von Apoptose nach HEMA-Exposition beteiligt war, obwohl eine Aktivierung durch TEGDMA aufgrund fehlender Analysen nicht auszuschließen war [58]. Eigene Analysen zeigten eine Phosphorylierung von ERK1/2 durch HEMA in primären Pulpazellen bereits nach

sehr kurzen Expositionsperioden. Eine Abnahme der Zellvitalität nach der spezifischen Inhibition der Aktivierung von ERK1/2 in Gegenwart von HEMA verwies auf eine schützende Wirkung von ERK1/2. Diese ERK1/2-Aktivierung war mit einer Zunahme der ROS-Produktion assoziiert. Der Zusammenhang zwischen HEMA-induziertem ROS und der Regulation der ERK1/2-Aktivierung ist jedoch nicht bekannt [8]. Man darf annehmen, dass auch die hier gezeigte dauerhafte Aktivierung von ERK1/2 und p38 durch TEGDMA und die Effekte von NAC auf die MAPK-Aktivierung mit der TEGDMA-induzierter Zytotoxizität in THP-1-Zellen zusammenhängen. Einer Abnahme der Zellanzahl bedingt durch steigende TEGDMA-Konzentrationen wirkte NAC entgegen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass TEGDMA-induzierte Apoptose durch die Erzeugung von ROS und der zugehörigen Aktivierung der zwei MAP Kinasen vermittelt wurde. Es wurde gezeigt, dass TEGDMA eine große Vielfalt von Genen in Zellkulturen differenziell aktivierte [59]. Die Expression spezifischer Phosphatasen (DUSPs), die gezielt MAP-Kinasen inaktivieren wurde auf der Transkriptionsebene aktiviert. DUSP5 dephosphoryliert bevorzugt ERK1/2 und die Aktivierung der Genexpression von DUSP5 und DUSP1 durch TEGDMA ist ein Hinweis darauf, dass die MAPK-Signalkaskade stark aktiviert war [59]. Dennoch ist auch auf der Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht geklärt, inwieweit welche Mechanismen die Induktion von Apoptose in THP-1 und anderen Zellen unter dem Einfluss von TEGDMA aktivieren. Diese Beobachtungen, zusammen mit Berichten aus der Literatur, unterstützen die Ansicht einer sehr komplexen Interaktion zwischen ROS-Produktion, MAPK Signalwegen und der Induktion von Apoptose.

6. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die TEGDMA-induzierte Zytotoxizität in THP-1-Zellen durch die Erzeugung von oxidativem Stress vermittelt wurde, da das Zellüberleben in Gegenwart von NAC anstieg. Die Erzeugung von 8-oxoG und die schützende Rolle von NAC deuteten fern auf, dass TEGDMA oxidative DNA-Schäden auslöste. Daher darf man annehmen, dass der durch dentale Monomere verursachte oxidative Stress mit der dauerhaften Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege einhergeht. Es ist wahrscheinlich, dass TEGDMA-induzierter oxidativer DNA-Schaden in der Folge ATM aktiviert, das

seinerseits Signalwege aktivieren kann, die zu Apoptose führen. Außerdem gibt es nun Hinweise darauf, dass TEGDMA über MAP-Kinasen andere Signalwege einleitet, welche auch den Zelltod und das Überleben regulieren. Gegenwärtig scheint es so, als ob das Gleichgewicht zwischen der dauerhaften Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und der Stresskinasen p38 und JNK höchstwahrscheinlich ein zentraler Faktor in der Regulation von Zellüberleben in monomerbehandelten Zellkulturen ist. Die Ursache erhöhter ROS-Level durch TEGDMA und andere Monomere bleibt ebenso zu klären wie der Zusammenhang von oxidativem Stress und den für kunststoffinduzierte Apoptose spezifischen Stoffwechselwegen. Analysen der aufeinander folgenden Schritte der Signaltransduktion in Gegenwart von Monomeren, werden im Laufe der Zeit Einblicke geben in die verschiedenen zugrunde liegenden Mechanismen.

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Helmut Schweikl gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Dissertationsthemas, seine engagierte Betreuung und stete Hilfsbereitschaft, sowie wertvolle Ratschläge zur Durchführung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Gottfried Schmalz danke ich, dass ich diese Arbeit in seiner Klinik durchführen konnte.

Bei Herrn Dr. Alexander Eckhardt bedanke ich mich für seine Unterstützung bei jeglichen Fragen und der Veröffentlichung des Artikels.

Großer Dank gilt außerdem Frau Carola Bolay für die freundliche Zusammenarbeit und ihre Geduld.

Herrn Dr. Karl-Anton Hiller danke ich für die mathematisch-statistische Auswertung der vielen Daten und für die grafische Darstellung.

Allen Mitarbeitern des Forschungsbereichs der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie danke ich für die fachliche Beratung und Unterstützung, sowie für die angenehme und hilfsbereite Atmosphäre.

Lebenslauf

Name: Nicol Gerstmayr
Anschrift: Eichenweg 3
94086 Bad Griesbach
Telefon: 0173/3769987
Geburtsdatum: 8. April 1982
Geburtsort: Dillingen a.d. Donau

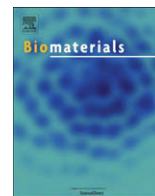
Schul Ausbildung

09/88 – 08/92 Grundschole Gundremmingen
09/92 – 08/02 Dossenberger-Gymnasium Günzburg

Studium

04/03 – 12/08 Studium der Zahnmedizin an der
Universität Regensburg
02/07 - 04/07 und wissenschaftliche Arbeiten zum Erlangen
07/07 – 11/07 des Doktorandentitels an der
Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
an der Universität Regensburg

Bad Griesbach, Juli 2009



TEGDMA-induced oxidative DNA damage and activation of ATM and MAP kinases

Alexander Eckhardt^{a,1}, Nicol Gerstmayr^{a,1}, Karl-Anton Hiller^a, Carola Bolay^a, Claudia Waha^a, Gianrico Spagnuolo^b, Carlos Camargo^c, Gottfried Schmalz^a, Helmut Schweikl^{a,*}

^aDepartment of Operative Dentistry and Periodontology, University of Regensburg, D-93042 Regensburg, Germany

^bDepartment of Oral and Maxillofacial Sciences and Interdisciplinary Research Centre on Biomaterials (CRIB), University of Naples "Federico II", Italy

^cDepartment of Operative Dentistry and Endodontics, São Paulo State University, São José dos Campos, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 October 2008

Accepted 19 December 2008

Available online 12 January 2009

Keywords:

Dental resin
TEGDMA
DNA oxidation
ATM
p38
ERK1/2

ABSTRACT

The development of strategies for the protection of oral tissues against the adverse effects of resin monomers is primarily based on the elucidation of underlying molecular mechanisms. The generation of reactive oxygen species beyond the capacity of a balanced redox regulation in cells is probably a cause of cell damage. This study was designed to investigate oxidative DNA damage, the activation of ATM, a reporter of DNA damage, and redox-sensitive signal transduction through mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by the monomer triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA). TEGDMA concentrations as high as 3–5 mM decreased THP-1 cell viability after a 24 h and 48 h exposure, and levels of 8-oxoguanine (8-oxoG) increased about 3- to 5-fold. The cells were partially protected from toxicity in the presence of *N*-acetylcysteine (NAC). TEGDMA also induced a delay in the cell cycle. The number of THP-1 cells increased about 2-fold in G1 phase and 5-fold in G2 phase in cultures treated with 3–5 mM TEGDMA. ATM was activated in THP-1 cells by TEGDMA. Likewise, the amounts of phospho-p38 were increased about 3-fold by 3 mM TEGDMA compared to untreated controls after a 24 h and 48 h exposure period, and phospho-ERK1/2 was induced in a very similar way. The activation of both MAPKs was inhibited by NAC. Our findings suggest that the activation of various signal transduction pathways is related to oxidative stress caused by a resin monomer. Signaling through ATM indicates oxidative DNA damage and the activation of MAPK pathways indicates oxidative stress-induced regulation of cell survival and apoptosis.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Investigation into the cytotoxicity of dental resin materials has identified several resin compounds which are capable of interacting with cellular structures. It is known that resin monomers like triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA) and 2-hydroxy ethyl methacrylate (HEMA) modify basic cell functions like enzyme activities, or protein and DNA synthesis in a wide variety of cell lines [1–3]. Genomic DNA has also been shown to be a direct or indirect target molecule of resin monomers, since genotoxic effects were detected in bacteria and mammalian cells. Furthermore, TEGDMA and HEMA induced DNA damage in established in vitro systems [4,5]. However, the knowledge of the molecular

mechanisms underlying the genetic as well as the cellular toxicity of resin monomers is still lacking. Obtaining insight into the mechanisms of the cytotoxicity of dental materials is highly desirable because it will allow for the development of effective strategies for the protection of tissues of the oral cavity [6]. A more detailed understanding will provide a better estimation of the risks associated with special dental therapy.

It appears that the production of reactive oxygen species (ROS) is a key event leading to cell damage in response to exposure to resin monomers. Although the etiology of ROS generation is currently unclear, both TEGDMA and HEMA caused an increase in ROS in a variety of target cells [8,9]. However, cells are protected from TEGDMA- and HEMA-induced damage in the presence of non-enzymatic antioxidants such as *N*-acetylcysteine (NAC), ascorbate, and Trolox (water-soluble vitamin E) [7,9–11]. Interestingly, it was found that the production of ROS is associated with a depletion of the physiological ROS scavenger glutathione (GSH). However, the

* Corresponding author. Fax: +49 941 944 6025.

E-mail address: helmut.schweikl@klinik.uni-regensburg.de (H. Schweikl).

¹ These authors contributed equally to this manuscript.

decrease of the amounts of reduced GSH is apparently not related to an increase in oxidized glutathione (GSSG) [9,12,13].

Irrespective of their origin, ROS can interact with cellular biomolecules like DNA and cause damage to DNA bases. The most common adduct, 8-oxoguanine (8-oxoG), could possibly represent a real threat to the integrity of the genome. Many oxidative base lesions are mutagenic, for instance, when adenine is misincorporated opposite to 8-oxoG resulting in an A:C substitution [14,15]. Yet, oxidative DNA damage has not been reported thus far in cells exposed to dental resin materials. We hypothesized that the generation of ROS levels exceeding the cellular capacity to balance oxygen homeostasis will trigger signals for adaptive cell responses. DNA strand breaks as a consequence of DNA oxidation is a signal in mammalian cells recognized by sensor proteins which in turn activate the effectors of functional cell cycle checkpoints at the various phases of the cell cycle. Ataxia-telangiectasia mutated (ATM), a member of the phosphoinositide 3-kinase-like family of serine/threonine protein kinases, is rapidly activated upon DNA damage and is a central regulator of the mammalian cell cycle. The delayed or arrested cell cycle will then allow for DNA repair or the activation of programmed cell death [16,17].

The activation of pathways which control cell survival and proliferation is a further adaptive response to oxidative stress [18]. The mitogen-activated protein kinases (MAPKs) ERK1/2, JNK, and p38 are evolutionarily conserved regulators which mediate signals created by growth factors and mitogens from the cytoplasm to the nucleus. MAPKs control normal cell growth by regulating the tight balance between pathways supporting cell survival and those leading to cell death. It is well established that this complex system of signal transduction responds to environmental stress. The stress kinases JNK and p38 are mostly associated with apoptosis, whereas the ERK1/2 pathway is primarily linked with cell survival and seems to prevent apoptosis [18,19]. However, it was reported that JNK and ERK1/2 regulate cellular responses to genotoxic stress in a cell type and cell context-dependent manner [20]. The amount of ROS also appears to play a central role in the differential activation of MAPK and the regulation of apoptosis [21]. Execution of apoptosis or the support of cell survival is finally determined by crosstalk between the regulators of distinct signaling pathways and the cellular redox status [18].

The aim of this investigation was to study the influence of the resin monomer TEGDMA on various parameters associated with cell death in order to obtain a deeper insight into the underlying mechanisms. Specifically, we present findings relating to the generation of oxidative DNA damage which is associated with the activation of ATM and alterations in the normal cell cycle. Finally, we focus on the influence of the monomer on pathways through the activation of p38 and ERK1/2 kinases. We used THP-1 monocytes as a model of the innate immune system. Cells of the *innate immune system* predominantly initiate and coordinate inflammatory processes in tissues of the oral cavity via a complex interaction of signal transduction pathways [22]. Resin monomers released from dental adhesives or composites may significantly affect cellular stress through the molecular alterations described.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA; CAS-No. 109-16-0), propidium iodide (PI), *N*-acetylcysteine (CAS-No. 616-91-1), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and RPMI 1640 medium were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Fetal bovine serum (FBS), and penicillin/streptomycin came from Life Technologies, Gibco BRL (Eggenstein, Germany). A DNA damage assay (oxyDNA) for the detection of 8-oxoguanine (8-oxoG) was purchased from Biotrin Ltd (Dublin, Ireland). Anti-mouse phospho-ATM:FITC (clone 10H11.E12 IgG1 κ) was obtained from Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA, USA).

Anti-phospho-ERK1/2 (T202/Y204):PE (clone 20A) and anti-phospho-p38 MAPK (T180/Y182):PE (clone 36) were obtained from BD Pharmingen (Heidelberg, Germany). All other chemicals used in the present study were of chemical grade.

2.2. Cell culture and exposure of cells

Human THP-1 cells (ATCC TIB 202) were cultivated in RPMI 1640 medium containing L-glutamine and 2.0 g/l NaHCO₃, supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 μ g/ml) at 37 °C in 5% CO₂. TEGDMA was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (1 M stock solution), and then diluted in culture medium. The amount of DMSO (0.86%) was kept constant in all TEGDMA concentrations. An influence of the solvent on the parameters tested here was not detected in control experiments (not shown). NAC was dissolved in deionized water (1 M stock solution) and then diluted in cell culture medium. The media containing NAC were adjusted to pH 7.2 at 37 °C for 1 h before use.

2.3. Determination of cell viability

Cell survival after exposure to TEGDMA alone or in the presence of various NAC concentrations was determined using the MTT assay. THP-1 cells were seeded at an initial cell density of 5×10^5 per well (24-well plate) at 37 °C and 5% CO₂, and exposed to increasing concentrations of both TEGDMA and NAC in quadruplicate for 2, 24, and 48 h. The influence of NAC on THP-1 cells was tested at concentrations ranging from 0 to 10 mM. Cells were washed twice with PBS after exposure, and resuspended in cell culture medium. Then, the cells were incubated in medium containing MTT (1 mg/ml) for 2 h at 37 °C. Subsequently, the MTT solution was removed after centrifugation, and the cell pellets were resuspended in DMSO to lyse the cells and dissolve the dye. Optical densities of the samples were measured photometrically at a wavelength of 570 nm (Infinite 200, TECAN, Crailsheim, Germany).

2.4. Detection of 8-oxoguanine

The generation of 8-oxoguanine (8-oxoG) was measured using an OxyDNA assay. THP-1 cells were seeded at an initial cell density of 5×10^5 per well (24-well plate) at 37 °C and 5% CO₂, and exposed to 0–5 mM TEGDMA in the presence and absence of 5 mM NAC for 2, 24, and 48 h. Hydrogen peroxide (H₂O₂; 0.017%) was used as a positive control substance. Next, the cells were collected by centrifugation (300 \times g, 10 min), and washed with FACS buffer (PBS; 1% BSA; 0.1% NaN₃). Then, the cell pellets were resuspended in 1 ml 2% paraformaldehyde in PBS, and fixed for 15 min at 37 °C. Subsequently, the cells were again washed once with FACS buffer, permeabilized in 90% methanol, and incubated on ice for 30 min. Afterwards, THP-1 cell pellets were mixed with 50 μ l blocking solution and incubated for 1 h at 37 °C. Each sample was then incubated with 100 μ l of the FITC-conjugated antibody for 1 h at room temperature. The samples were washed again with PBS and subsequently analyzed by flow cytometry. Fluorescence was determined using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 530 nm (FL-1). Mean fluorescence intensities (MFIs) of 20,000 cells of each treatment group were obtained by histogram statistics using CellQuest software.

2.5. Cell cycle analyses

THP-1 cells were seeded at an initial cell density of 5×10^5 per well (24-well plate) at 37 °C and 5% CO₂, and exposed to 0–5 mM TEGDMA for 2 h. Then, the exposure medium was discarded, the cells were washed with PBS and cultivated in fresh medium up to 24 h and 48 h. Next, the cells were collected, washed twice with PBS, and resuspended in cell culture medium. The number of cells in each culture was determined by hemocytometer counting. Then, the cells were collected by centrifugation, resuspended in 1 ml cold PBS/2% BSA, and stored for at least 24 h in 70% methanol at –20 °C. Methanol was then removed after centrifugation and the cell pellet was washed twice in PBS/2% BSA. Next, the cell pellet was resuspended in 425 μ l PBS/2% BSA, and 50 μ l RNase (1 mg/ml) was added for 20 min at 37 °C. Finally, PI (25 μ g/ml) was added for 5 min and the samples were analyzed with a flow cytometer (FACSCalibur). PI fluorescence (FL-3) was collected through a 670 nm long pass filter and fluorescence signals were amplified logarithmically. Twenty thousand events for each sample were collected with CellQuest software and the data were stored as list mode files. PI signals for the analysis of the DNA content were subjected to pulse processing to assist in gating out cell debris and doublets. The percentages of cells in G₁, S, and G₂ phases of the cell cycle were calculated after mathematical modeling of histograms using Multicycle software for Windows (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA).

2.6. Detection of pATM, phospho-p38 and phospho-ERK1/2

THP-1 cells were seeded at an initial cell density of 5×10^5 per well (24-well plate) at 37 °C and 5% CO₂, and exposed to 0–5 mM TEGDMA in the presence and absence of 5 mM NAC for 2, 24, and 48 h. Then, the cells were collected by centrifugation (300 \times g, 10 min), and washed with FACS buffer (PBS; 1% BSA; 0.1% NaN₃).

The cell pellets were resuspended in 1 ml 2% paraformaldehyde in PBS and fixed for 15 min at 37 °C. Next, the cells were again washed with FACS buffer, permeabilized in 90% methanol, and stored on ice for 30 min. Then, the cells were washed twice with FACS buffer and stained with anti-phospho-ATM-FITC, anti-phospho-ERK1/2, or anti-phospho-p38 antibodies following the manufacturer's instructions. The samples were washed again with PBS and subsequently analyzed by flow cytometry (FACSCalibur). Fluorescence was determined at appropriate excitation and emission wavelengths. Mean fluorescence intensities (MFIs) were obtained by histogram statistics using CellQuest software and taken as a measure for the generation of phospho-ATM. The formation of phospho-p38 and phospho-ERK1/2 was identified by the CellQuest software as the percentage of positive cells after staining with labeled anti-phospho-p38, or anti-phospho-ERK1/2 antibodies.

2.7. Statistical analyses

Dose–response curves of cell viability values and TEGDMA concentrations were calculated from 16 individual optical density readings obtained from four independent experiments and normalized to untreated controls (=100%). The generation of 8-oxoG and the formation of phospho-ATM were also determined in four independent experiments. Mean fluorescence intensities detected in untreated and treated cell cultures were related to those measured in unstained samples. The ratios for treated cell cultures were normalized to those obtained with untreated control cultures (=100%). The amounts of phospho-p38, and phospho-ERK1/2 were measured in at least four independent experiments as the percentage of positive cells after staining with PE-labeled anti-phospho-p38 and anti-phospho-ERK1/2 antibodies. The percentages of cell numbers in each phase of the normal cell cycle (G1, S, G2 phases) were calculated from individual histograms in at least three independent experiments. Differences between median values were statistically analyzed using the Mann–Whitney *U*-test (SPSS 15.0, SPSS, Chicago, IL, USA) for pairwise comparisons among groups at the 0.05 level of significance. The values of the median, and the upper and lower quartile were also plotted (SigmaPlot 8.0, Rock Ware, Golden, CO, USA).

3. Results

3.1. Cytotoxicity of TEGDMA in THP-1 monocytes

THP-1 cells were first exposed to increasing concentrations of TEGDMA and the ROS scavenger NAC. Concentrations of 3–5 mM TEGDMA decreased the viability of exposed cells to 80–90 percent compared to untreated cell cultures after a short exposure period of 2 h. No significant effect of 1, 5, and 10 mM NAC on cell viability was detected (Fig. 1). The cytotoxicity of TEGDMA increased with longer exposure since the viability of THP-1 cells was reduced to 55, 35, and 20 percent by 3, 4, and 5 mM TEGDMA after a 24 h exposure. However, cell viability in these cultures improved in the presence of increasing NAC concentrations (Fig. 1). No significant changes in cell viability were observed in cultures exposed to 0–1 mM TEGDMA independent of the presence of NAC. Yet, the cytotoxicity of TEGDMA concentrations higher than 1 mM was significantly reduced by all NAC concentrations tested (Fig. 1). A decrease in cell viability was still not detected in the presence of TEGDMA lower

than or equal to 1 mM after a 48 h exposure period. In contrast, cytotoxic effects of 3–5 mM TEGDMA further increased with this longer exposure period, but all NAC concentrations tested protected the cells from TEGDMA cytotoxicity. Notably, 10 mM NAC significantly reduced cell viability when the cell cultures were exposed to 0–1 mM TEGDMA for 48 h (Fig. 1). It appeared as if 5 mM NAC was most protective against the cytotoxic effects of high TEGDMA concentrations, although the differences in cell viability in cultures exposed to 1 or 5 mM NAC in the presence and absence of TEGDMA were not significant ($p > 0.05$) (Fig. 1).

3.2. Generation of 8-oxoguanine in THP-1 monocytes

THP-1 cells were exposed to 1, 3 or 5 mM TEGDMA for 2 h, 24 h, and 48 h to analyze for the induction of oxidative DNA damage. The direct production of 8-oxoG was detected using a fluorescent-labeled protein binding method both in the presence and in the absence of 5 mM NAC. No significant production of 8-oxoG was observed after a 2 h exposure period under the current experimental conditions (Fig. 2). In contrast, TEGDMA significantly increased the levels of 8-oxoG in THP-1 cell cultures in a concentration-dependent manner after 24 h. About 2- to 3-fold higher amounts of 8-oxoG were detected in cell cultures treated with 1, 3, and 5 mM TEGDMA compared to untreated controls. The highest TEGDMA concentration tested here was as effective as hydrogen peroxide, which was used as a positive control substance. The generation of 8-oxoG by each TEGDMA concentration was reduced about 2-fold in the presence of 5 mM NAC. Very similar results were obtained after a 48 h exposure period except that no protective effect of NAC on THP-1 cells was detected (Fig. 2).

3.3. Cell cycle analysis and activation of ATM

DNA damage leads to the activation of cell cycle checkpoints. Thus, the influence of TEGDMA was also analyzed for its activity on the cell cycle of THP-1 cells that were exposed for 2 h. The distribution of cells in treated and untreated cell cultures was then calculated after an additional 22 h and 46 h recovery period (Fig. 3). In the beginning, about 37% of the cells were found in G1 phase, and 62% of the cells in S phase indicating a high proliferative activity of the THP-1 cells under the current experimental conditions. Clear differences in the cell cycle progression were observed depending on the variation of the TEGDMA concentration. The number of cells in G1 phase was increased from 37% in untreated controls to 45% in cultures treated with 3 and 5 mM TEGDMA analyzed after a 24 h incubation period encompassing an initial 2 h exposure. The cell numbers in G2 phase were also increased from about 1% in

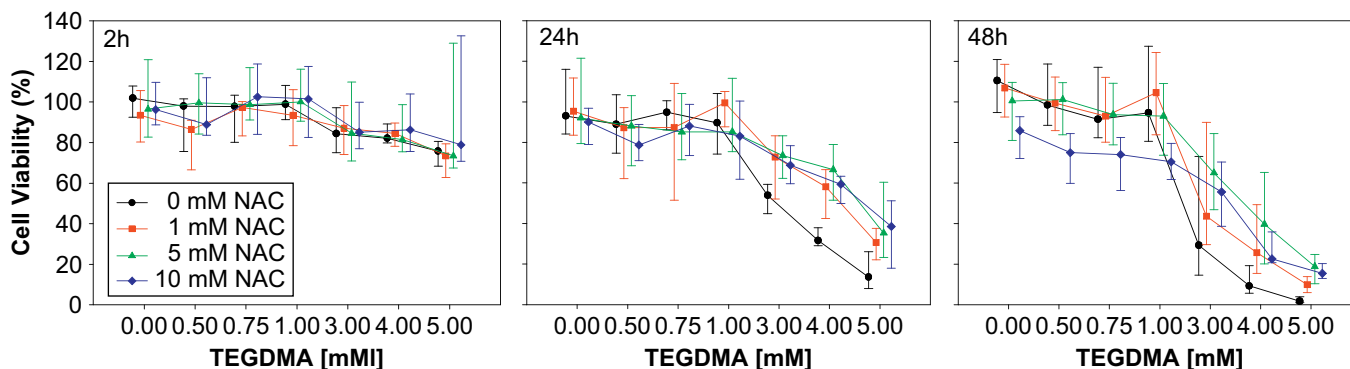


Fig. 1. Cell viability of THP-1 monocytes. The cells were exposed to increasing TEGDMA concentrations in the presence and absence of various concentrations of *N*-acetylcysteine (NAC) for 2, 24, and 48 h. Dose–response curves of cell viability values and TEGDMA and NAC concentrations were normalized to untreated controls (=100%). Symbols and bars represent medians (25% and 75% percentiles) calculated from 16 individual values ($n = 16$) in four independent experiments.

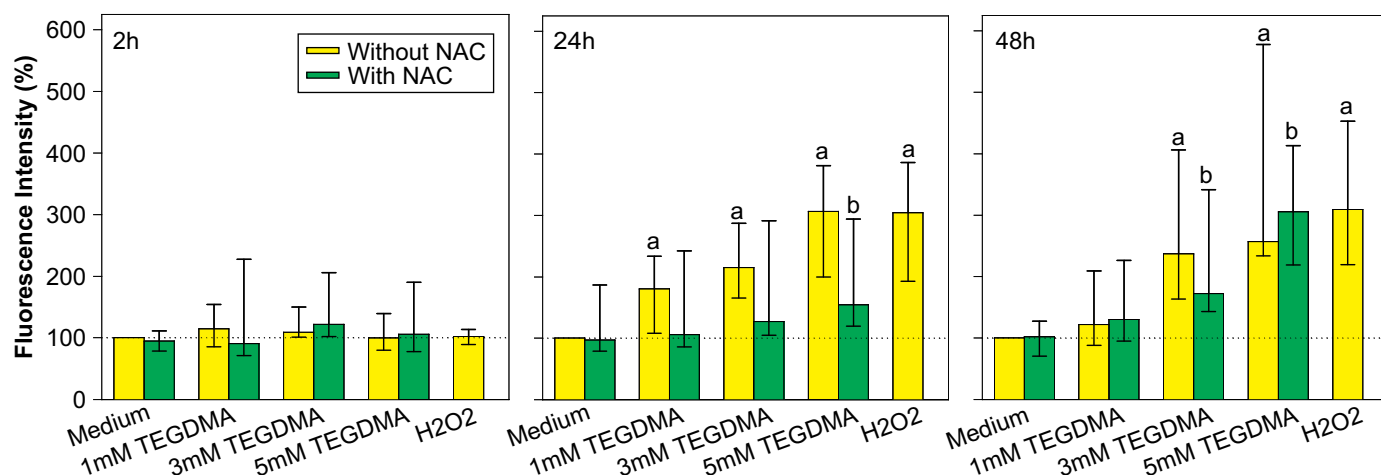


Fig. 2. Generation of 8-oxoguanine in THP-1 monocytes. The formation of 8-oxoguanine after exposure to increasing concentrations of TEGDMA was determined by flow cytometry after 2, 24, and 48 h exposure periods in the presence and absence of 5 mM NAC. Mean fluorescence intensities were normalized to untreated control cultures (medium = 100%). Bars represent medians (25% and 75% percentiles) calculated from individual histograms ($n = 4$). The lower-case letter (a) indicates significant differences between untreated cell cultures (medium) and cultures treated with TEGDMA in the absence of NAC; (b) indicates significant differences between cell cultures (medium) containing NAC and cultures treated with both TEGDMA and NAC.

untreated cultures to 15% in cultures treated with 3 and 5 mM TEGDMA (Fig. 3). These effects of TEGDMA on G2 and on the G1 phase in particular were even more pronounced when the cells were incubated for 48 h. The cell numbers in G1 phase steadily increased with increasing TEGDMA concentrations from 39% in untreated controls to 59% in cultures treated with 5 mM TEGDMA. In reverse, the percentage of the cell population in S phase was progressively reduced in parallel. An increase in the number of cells found in G2 was again observed from about 2% in untreated cultures to 9% in cultures treated with 5 mM TEGDMA (Fig. 3).

Activation of ATM by phosphorylation is a key step in the early response to DNA double-strand breaks (DSBs). Here, similar to the results obtained with 8-oxoG, pATM was generated in THP-1 cells in the presence of TEGDMA depending on the length of the exposure period (Fig. 4). Significantly elevated levels of pATM were not observed after a 2 h exposure (Fig. 4). However, the generation of pATM in cell cultures treated with increasing TEGDMA concentration was enhanced by 25–50% compared to untreated controls after 24 h. Moreover, an exposure period of 48 h led to a TEGDMA-induced increase in pATM levels by about 2-fold. Decreased amounts of pATM were not detected in the presence of NAC (Fig. 4).

3.4. Expression of phospho-p38 and phospho-ERK1/2

Significantly increased amounts of cells positive for phospho-p38 were not detected in TEGDMA-treated cell cultures after a 2 h exposure period. An increase in positive cells from 8% to 12% caused by 5 mM TEGDMA was slightly, but not significantly inhibited in the presence of NAC (Fig. 5). The amounts of phospho-p38 were significantly increased by about 2.5-fold by 3 and 5 mM TEGDMA after a 24 h exposure. The strong activation of p38 by 5 mM TEGDMA was inhibited by NAC (Fig. 5). Phosphorylation of p38 was even further increased after the exposure of THP-1 cells to 3 and 5 mM TEGDMA for 48 h, and p38 activation was again reduced by NAC (Fig. 5).

Phospho-ERK1/2 was induced by TEGDMA in a way very similar to that of phospho-p38. A significant difference in the amounts of phospho-ERK1/2 in TEGDMA-treated cell cultures and in untreated controls was not identified after a 2 h exposure period (Fig. 6). However, ERK1/2 was significantly activated 4- to 6-fold by 3 and 5 mM TEGDMA after a 24 h exposure. The amounts of activated ERK1/2 increased even more in cell cultures exposed to 3 and 5 mM TEGDMA for 48 h. NAC inhibited the formation of phospho-ERK1/2

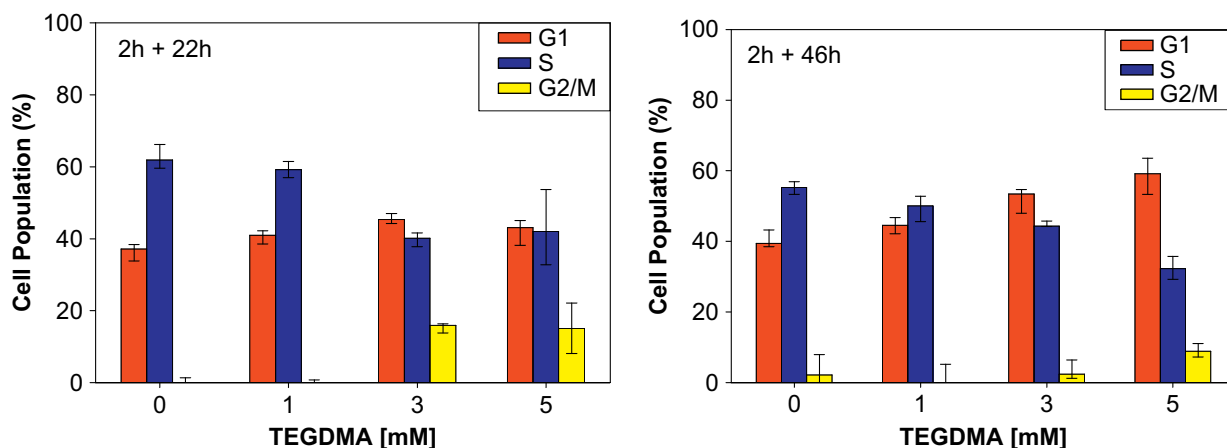


Fig. 3. Cell cycle analyses of THP-1 monocytes. The distribution of cells between the three phases of the normal cell cycle (G1, S, and G2) is presented after exposure to increasing concentrations of TEGDMA. The cells were exposed to TEGDMA for 2 h, and then cultivated in fresh medium up to 24 h and 48 h. The percentages of cell numbers in each phase were calculated from individual histograms in three to six independent experiments ($n = 3-6$). Bars represent medians (25% and 75% percentiles).

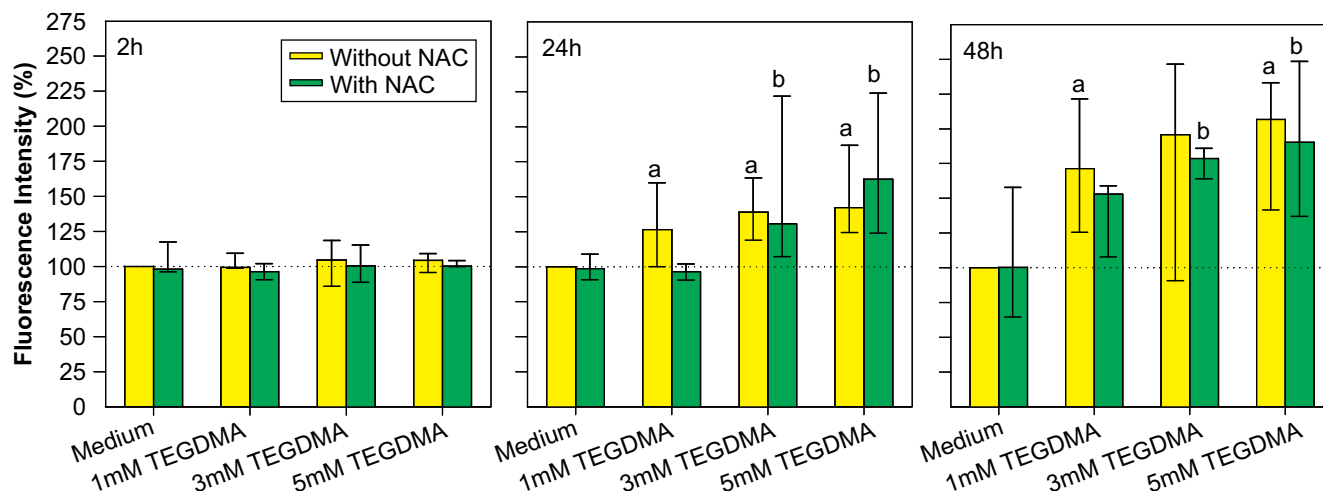


Fig. 4. Generation of phospho-ATM in THP-1 monocytes. The formation of pATM after exposure to increasing concentrations of TEGDMA was determined by flow cytometry after 2, 24, and 48 h exposure periods in the presence and absence of 5 mM NAC. Mean fluorescence intensities were normalized to untreated control cultures (medium = 100%). Bars represent medians (25% and 75% percentiles) calculated from individual histograms ($n = 4$). The lower-case letter (a) indicates significant differences between untreated cell cultures (medium) and cultures treated with TEGDMA in the absence of NAC; (b) indicates significant differences between cell cultures (medium) containing NAC and cultures treated with both TEGDMA and NAC.

by TEGDMA after a 24 h and 48 h exposure, but this effect was not significant (Fig. 6).

4. Discussion

4.1. Cytotoxicity of TEGDMA in THP-1 monocytes

In the present investigation, a small reduction in cell viability was observed only with high TEGDMA concentrations after a short exposure period and concentrations up to 1 mM TEGDMA did not reduce cell viability after 24 h and 48 h exposure periods. These results indicate that the resistance of the THP-1 monocyte cell line against TEGDMA was high and closely related to the same properties of other cell lines including primary gingival and pulp cells [23–25]. The cytotoxic effect of high concentrations of TEGDMA in THP-1 cells was reduced by the ROS scavenger NAC depending on its concentration. These findings again indicate that reduced cell viability in the presence of the resin monomer TEGDMA is

associated with the formation of ROS and an imbalance in the cellular redox status. It has been previously reported that, in addition to cellular glutathione (GSH), other non-enzymatic antioxidants such as NAC, vitamin C, and vitamin E are also able to protect cells at least partly from cytotoxicity caused by resin monomers [9,26,27]. The significant reduction in THP-1 cell viability observed here in cell cultures exposed to a high concentration of NAC (10 mM) in the presence of 0–1 mM TEGDMA is another important observation. It appears that there is a certain endogenous level of ROS in THP-1 cells critical for normal cell life. It is possible that high NAC concentrations disturb a very tightly regulated redox balance in untreated cell cultures and cultures treated with low TEGDMA concentrations. NAC could reduce the critical amount of ROS which is necessary to act as a signal essential for normal cell vitality and proliferation [28]. On the other hand, the presence of high TEGDMA concentrations may be capable of generating amounts of ROS which exceed the cells' capacity to efficiently reduce elevated levels of oxidative stress to

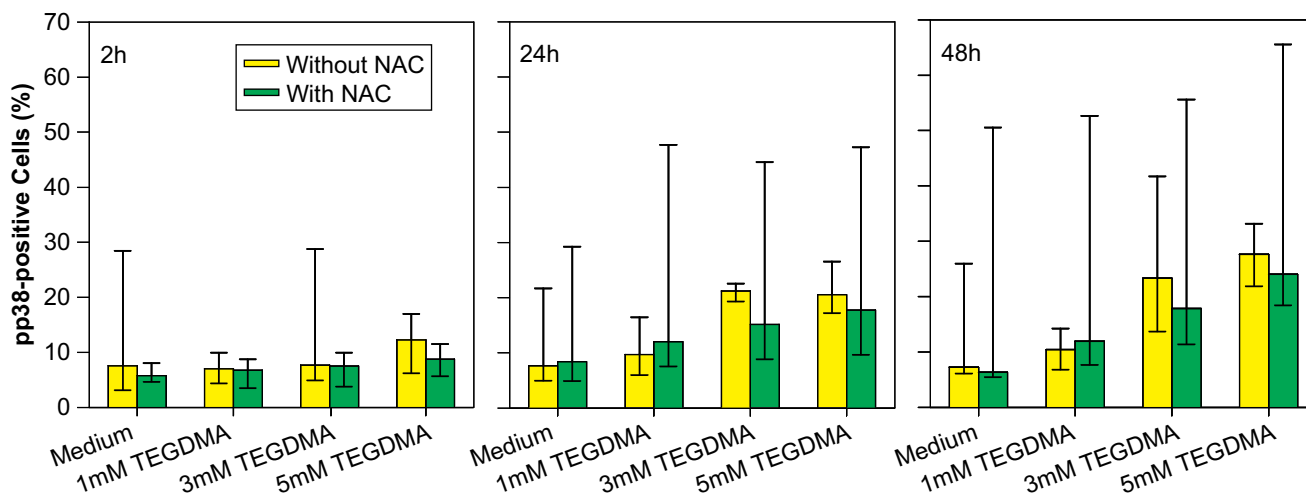


Fig. 5. The formation of phospho-p38 in THP-1 monocytes. The formation of pp38 after exposure to increasing concentrations of TEGDMA was determined by flow cytometry after 2, 24, and 48 h exposure periods in the presence and absence of 5 mM NAC. Phospho-p38 was identified by CellQuest software as the percentage of positive cells after staining with a PE-labeled anti-phospho-p38 antibody. Bars represent medians (25% and 75% percentiles) calculated from individual histograms ($n = 4$).

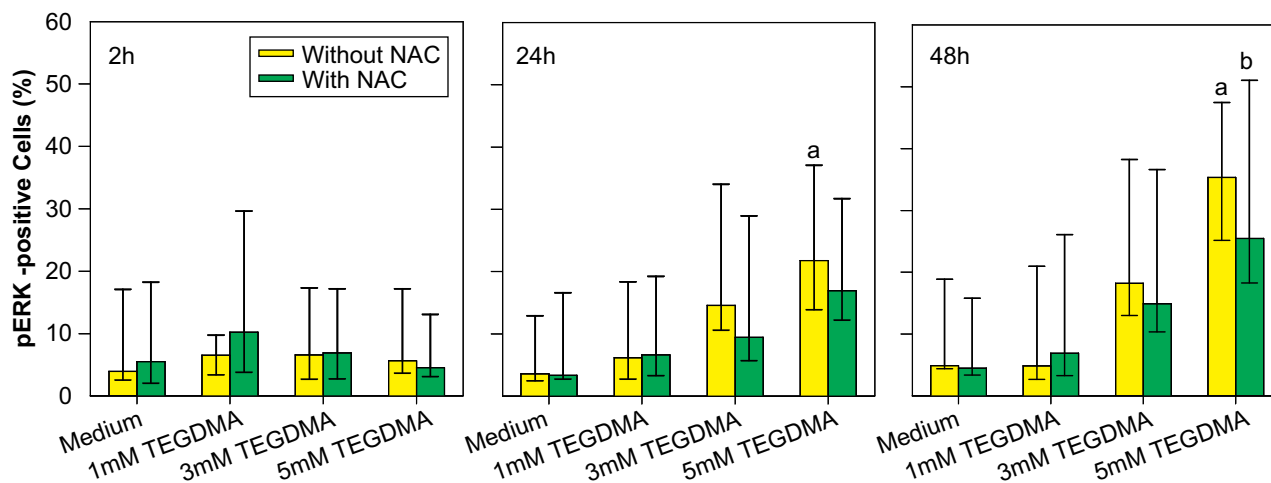


Fig. 6. The formation of phospho-ERK1/2 in THP-1 monocytes. The formation of pERK1/2 after exposure to increasing concentrations of TEGDMA was determined by flow cytometry after 2, 24, and 48 h exposure periods in the presence and absence of 5 mM NAC. Phospho-ERK1/2 was identified by CellQuest software as the percentage of positive cells after staining with a PE-labeled anti-phospho-ERK1/2 antibody. Bars represent medians (25% and 75% percentiles) calculated from individual histograms ($n = 4$). The lower-case letter (a) indicates significant differences between untreated cell cultures (medium) and cultures treated with TEGDMA in the absence of NAC; (b) indicates significant differences between cell cultures (medium) containing NAC and cultures treated with both TEGDMA and NAC.

a physiological level. As a consequence, pathways leading to the induction of apoptosis or promoting cell survival, for instance through MAP kinases, are activated. Regulation of these pathways most likely involves target proteins which contain reactive cysteine residues that participate in a thiol–disulfide reaction. For example, the redox regulation of transcription factors like AP-1 and NF- κ B probably occurs through a cysteine residue [29,30]. Furthermore, it was shown that various stimuli which create ROS act through Nrf2, a redox-sensitive transcription factor and a regulator of the coordinated expression of cytoprotective genes [31,32].

4.2. The formation of 8-oxoguanine

Our findings on the cytotoxicity of TEGDMA even in the presence of NAC after a long exposure period indicate that a burden of high TEGDMA concentrations exceeded the cells' capacity to clear high levels of ROS. It is firmly established that oxidative stress is capable of damaging major cellular functions because of lipid peroxidation, as well as protein and DNA oxidation. The induction of oxidative DNA damage, for instance, has been directly related to a variety of degenerative diseases, and the formation of 8-oxoG adducts is a marker of DNA base damage [33]. Yet, the generation of oxidative DNA damage in cell cultures by a dental resinous material or monomer has not been demonstrated thus far. Here, TEGDMA induced a concentration-dependent formation of increased amounts of 8-oxoG as detected by a fluorescent-labeled antibody. It seemed as if the formation of oxidative DNA damage followed a slow kinetic rate since 8-oxoG was not detected after a short exposure period but after 24 h and 48 h. A reduction in the amounts of 8-oxoG in the presence of NAC indicated that TEGDMA induced DNA damage via the generation of ROS. The mechanism and source of ROS generation in the presence of dental resin monomers still need to be elucidated. It seems unlikely that the formation of ROS in the presence of resin monomers is mediated by or follows a mechanism via Fenton-type reaction as described for transition metal ions [34]. It has been suggested that DNA damage is induced by radicals generated locally by DNA-associated Fe^{2+} ions, because of the short half-life of free hydroxyl radicals [35]. Based on current knowledge it is more plausible that TEGDMA might interfere with one of the endogenous pathways of ROS generation [28,36]. An

excess of free hydroxyl radicals can induce DNA damage like single-strand or double-strand breaks, abasic sites or base oxidation. Finally, the generation of 8-oxoG may lead to point mutations because of the ability of this base to pair either with adenine or with cytosine thereby creating a G:C to T:A transversion [14,15].

The present findings favor the view that genotoxic and mutagenic effects of resin monomers as observed in vitro on several occasions are a consequence of the formation of base oxidation [4,5]. At first glance, it seems as if the recent findings on the mutagenicity of monomers like TEGDMA and HEMA are contradictory to this suggestion. Mutagenicity was not detected in *Salmonella typhimurium* strain TA100 for the detection of base-pair mutations, but micronuclei indicating chromosomal damage were induced in V79 cells [4,37]. The lack of induced base-pair mutations in *S. typhimurium* strain TA100 might be due to the short exposure to the monomer in this test system when the classical protocol is followed. From the data presented here it appears that the formation of 8-oxoG in the presence of TEGDMA followed a slow kinetic. Furthermore, the removal of an oxidized base by a base or nucleotide excision repair processes could result in DNA single-strand breaks (SSBs) and a subsequent stalling of the replication fork. The generation of SSBs by ROS has even been shown with naked DNA [38,39]. The stalling of the replication fork or the generation of SSBs, which can be translated into double-strand breaks (DSBs) during replication, will lead to homologous recombination and the induction of DNA deletions [40]. Thus, the induction of micronuclei and large DNA sequence deletions, as observed in V79 cells after exposure to TEGDMA or HEMA, could be a consequence of the conversion of DNA single-strand breaks into clastogenic DNA double-strand breaks [4,37,41].

4.3. Cell cycle analysis and activation of ATM

Cells respond to DNA damage by the coordinated activation of sensor, transducer, and effector proteins to block the cell cycle and allow for DNA repair or to activate apoptosis [17]. Here, the monomer TEGDMA caused a delay in the cell cycle indicating that THP-1 cells can activate functional G1 and G2 phase checkpoints. DNA damage was probably induced almost immediately after exposure of cell cultures to TEGDMA, because a short exposure

effectively induced a cell cycle delay. In addition, the observation that the cell cycle was still delayed after a 46 h recovery period suggested that the monomer-induced damage was severe and was not repaired to a considerable extent. Similar results were observed recently in other cell lines [42]. Low TEGDMA concentrations caused a delay in G1 phase of the cell cycle in normal human fibroblasts and primary human pulp-derived cells. In addition, these cells also accumulated in G2 after exposure to relatively high TEGDMA concentrations. Thus, we provide evidence that the monomer caused the same effects in cells derived from various tissues including THP-1 monocytes which were used here as a model of the innate immune system. However, oxidative DNA damage was not detected here after a short exposure period. It is possible that the magnitude of the generation of 8-oxoG sufficient to initiate a cell cycle delay was below the detection limit of the assay used here. This assumption would also indicate that checkpoints in the G1 and G2 phases are very sensitive to the detection of DNA damage. The results presented here do not indicate the activation of a cell cycle checkpoint in the S phase under the current experimental conditions.

Activation of ATM, a member of the phosphoinositide 3-kinase-like family of serine/threonine protein kinases, is an early step and plays a central role in the cellular response to DNA damage. ATM is activated by autophosphorylation in response to DSBs, and activates downstream targets that regulate cell cycle checkpoints and apoptosis [43]. Here, the activation of ATM in THP-1 cells after exposure to TEGDMA suggests the formation of DNA double-strand breaks. This finding provides further evidence to support the assumption that TEGDMA creates an excess of ROS, which generate 8-oxoG, and the removal of the oxidized base by base excision repair could ultimately result in the formation of DSBs. The formation of DSBs as a result of the cellular production of ROS and the subsequent activation of ATM are firmly established [44–46]. Recently it was reported that the hydrophilic resin monomer 2-hydroxy ethyl methacrylate (HEMA) activated p53 in rat salivary gland cells after a 12 h exposure period. It appeared as if ATM was also activated in this cell line after a 4 h exposure as indicated by histochemical techniques. However, changes in p53 or ATM activation after other exposure periods were not tested [47]. The activation of ATM in THP-1 as detected in this study was a late response since only a 2-fold increase was detected after 24 h and 48 h exposure periods.

The formation of DSBs and the associated activation of ATM have been observed after short- and long-term exposure to genotoxic agents. DSBs were visualized in cells as early as 2 min after exposure to ionizing radiation or carcinogenic chemicals up to a maximum of 30 min after radiation [48]. Similarly, the activation of ATM by the genotoxic drug doxorubicin was observed after 1 h and 2 h exposure periods. It was suggested that ROS play a role in the doxorubicin-induced activation of ATM-dependent pathways, and the phosphorylation of Chk1 and Chk2 reflected an NAC-sensitive oxidative stress response [49]. However, pathways with a central role for ATM appear to be active even after long exposure periods. For instance, the ATM-regulated phosphorylation of p53 by HIPK2 was observed 24 h after radiation [50]. Likewise, the ATM kinase pathway was activated after 24 h and even longer exposure periods to resveratrol, a polyphenol compound. Interestingly, the activation of ATM was associated with elevated levels of mainly hydrogen peroxide [51]. Furthermore, it was also observed that lead nitrate can induce late DSBs and an activation of ATM-dependent stress signaling probably through the generation of oxidative stress [52]. Although it seems possible that an ATM kinase pathway is activated as a consequence of ROS production, the amount of ROS which is necessary for this activation is currently unknown. We can only speculate on the reason for a late activation of ATM by the

resin monomer TEGDMA under the current conditions. It appears likely that an early activation of ATM is associated with a high level of ROS production, for instance, induced by ionizing radiation, in order to immediately respond to severe cell damage and activate cell defense. In contrast, a late activation of ATM could be related to signaling pathways triggered by low levels of ROS generated by moderately active foreign compounds. This assumption is based on analogous findings of differential gene expression caused by low and high doses of radiation [53]. However, we cannot rule out that the production of oxidative stress after a short exposure period of THP-1 cells to TEGDMA caused relatively weak oxidative DNA damage and the activation of ATM was below the detection limit of the method used here. Yet, the activation of ATM could be a very sensitive mechanism that is triggered by even weak oxidative DNA damage and caused a delay in the THP-1 cell cycle even after a 2 h exposure to TEGDMA. At present, we also cannot rule out that the early induction of the cell cycle delay was initiated independent of the ATM kinase pathway. It is possible that the cell cycle delay was induced by the accumulation of p21 which was expressed upon the activation of an MAPK signaling cascade [19].

4.4. Activation of p38 MAPK and extracellular signal-related kinase (ERK1/2)

We observed that the stress kinase p38 was activated in THP-1 cells after exposure to TEGDMA for 24 and 48 h. This activation was very likely caused, at least in part, by the generation of ROS since the levels of pp38 were reduced in the presence of NAC. This suggestion is in line with previous observations and interpretations on the activation of p38 by ROS and hydrogen peroxide in particular [18,54]. Similar to the activation of p38, the same TEGDMA concentrations stimulated ERK1/2 phosphorylation after the same exposure periods, and NAC also inhibited ERK1/2 activation. Thus, it is likely that the same extent of imbalance in the cellular redox status activated the two different MAP kinase pathways. We are currently investigating whether p38 and ERK1/2 may be even more activated by TEGDMA after very short exposure periods compared to the sustained activation observed here.

The activation of MAP kinases p38, JNK and ERK1/2 by various toxic agents was observed in recent studies following different time courses. Yet, sustained activation similar to our observations was reported, but the role of MAPKs in the regulation of cell survival and apoptosis was discussed heterogeneously. For instance, it was reported that cadmium chloride induced a rapid phosphorylation of p38, but phosphorylation of ERK1/2 was detected after long exposure periods. Nevertheless, it appeared as if the induction of apoptosis was related to the activation of p38 through ROS. On the contrary, the activation of ERK1/2 seemed to be inversely correlated with the induction of apoptosis in some cell models [55]. Sustained activation of ERK1/2 was also observed in cells treated with activated photosensitizers used in photodynamic therapy. Since blocking of the sustained ERK1/2 activity with a specific inhibitor decreased cell survival, a protective effect of ERK1/2 activation was suggested [56]. Activation of p38 was sustained up to 24 h in some cell lines after exposure to arsenic, but arsenic-induced apoptosis was more related to the activation of the JNK stress kinase [57]. Moreover, treatment of HeLa cells with hydrogen peroxide caused a time- and dose-dependent induction of apoptosis in parallel to sustained activation of ERK1/2, JNK and p38 kinases. It appeared as if ERK1/2 supported cell survival since apoptosis was markedly enhanced after inhibition of ERK1/2, but apoptosis decreased when JNK activation was inhibited. Thus, it was suggested that ERK1/2 and JNK inversely influenced cell survival in response to oxidative stress, and no effect was detected with p38 [21]. However, p38 MAPKs are also activated by various types of oxidative stresses

which are followed by oxidant-induced apoptosis. Nonetheless, the mechanisms by which MAPK signaling molecules relate to the regulation of oxidative stress-induced apoptosis still need to be described in much more detail [18]. Likewise, the use of specific inhibitors will provide more insight into the precise role of p38 and ERK1/2 in cellular responses towards monomers like TEGDMA.

The complexity of the multi-faceted influence of monomers on cascades regulating cell death is further illustrated by a recent report on HEMA- and TEGDMA-induced cell responses. It was observed that HEMA and TEGDMA induced ERK1/2 phosphorylation in a salivary gland cell line after long exposure periods. Moreover, increased phosphorylation of both p38 and JNK subsequent to HEMA, but not TEGDMA exposure was reported. It was suggested that p38 was involved in the apoptotic response after HEMA exposure, although a transient activation by TEGDMA at times not examined could not be ruled out. It was concluded that sustained activation of the MAP kinase pathways is necessary for resin-induced apoptosis [58]. On the contrary, HEMA induced the phosphorylation of ERK1/2 in primary human pulp cells after very short exposure periods. A decrease in cell viability after the specific inhibition of ERK1/2 activity in the presence of HEMA suggested a pro-survival role of ERK1/2 under these specific conditions. This ERK1/2 activation was associated with an increase in the generation of ROS, although the connection between ROS induced by HEMA and the regulation of ERK1/2 response was not elucidated [8]. Here, the sustained activation of both ERK1/2 and p38 kinases by TEGDMA as well as the effects of NAC on MAPK activation is associated with TEGDMA-induced cytotoxicity in THP-1 cells. A decrease in the number of cells caused by increasing TEGDMA concentrations was counteracted by NAC. These findings suggest that TEGDMA-induced apoptosis was mediated through the generation of ROS and the related activation of the two MAP kinases. In a recent investigation, we detected a wide variety of genes related to the oxidative stress response which were differentially activated in cell cultures exposed to TEGDMA [59]. The expression of dual-specificity protein tyrosine phosphatases (DUSPs) that specifically inactivate MAP kinases was transcriptionally activated. DUSP5 preferentially dephosphorylates ERK1/2, and the activation of both DUSP5 and DUSP1 gene expression by TEGDMA suggested that the MAPK signal cascade was strongly activated [59]. Nonetheless, based on our current findings it is unclear as to which mechanisms will specifically activate the death pathway in THP-1 and other cell models under the influence of TEGDMA. These observations, together with reports from the literature, support the view of a very complex interference and crosstalk between ROS production, MAPK signaling pathways and the induction of apoptosis.

5. Conclusion

We present evidence that TEGDMA-induced cytotoxicity in THP-1 cells is mediated by the generation of oxidative stress because cell survival increased in the presence of NAC. The generation of 8-oxoG and the protective role of NAC further indicated that TEGDMA caused oxidative DNA damage. Our findings provide evidence that resin-induced oxidative stress is associated with the sustained activation of various signal transduction pathways. It is likely that TEGDMA-induced oxidative DNA damage is the cause of the activation of ATM, which by itself might activate pathways leading to apoptosis. In addition and alternatively, there is also evidence that TEGDMA triggered other pathways through MAP kinases which also regulate cell death and survival. Currently, it appears as if the balance between the sustained activation of the MAP kinases ERK1/2 and the stress kinases p38 and JNK is most likely a central factor in the regulation of cell survival in monomer-treated cell cultures. The

source of elevated ROS levels caused by TEGDMA and other monomers still needs to be elucidated as well as the relation of oxidative stress and the pathways specific for resin-induced apoptosis. The analyses of the successive steps in the transduction of signals generated in the presence of monomers will provide insight over time into the various detailed mechanisms involved.

Acknowledgments

This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grant No. Schw 431/11-1).

References

- [1] Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res* 1991;70:1450–5.
- [2] Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res* 1997;37:517–24.
- [3] Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G. Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res* 1998;41:474–80.
- [4] Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res* 2001;80:1615–20.
- [5] Kleinsasser NH, Schmid K, Sassen AW, Harreus UA, Staudenmaier R, Folwaczny M, et al. Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. *Biomaterials* 2006;27:1762–70.
- [6] Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nor JE. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. *J Dent Res* 2003;82:592–6.
- [7] Stanislawski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majid E, Goldberg M, Perianin A. 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 A* 2003;66:476–82.
- [8] Spagnuolo G, D'Anto V, Valletta R, Strisciuglio C, Schmalz G, Schweikl H, et al. Effect of 2-hydroxyethyl methacrylate on human pulp cell survival pathways ERK and AKT. *J Endod* 2008;34:684–8.
- [9] Walther UI, Siagian II, Walther SC, Reichl FX, Hicel R. Antioxidative vitamins decrease cytotoxicity of HEMA and TEGDMA in cultured cell lines. *Arch Oral Biol* 2004;49:125–31.
- [10] Paranjpe A, Cacalano NA, Hume WR, Jewett A. N-Acetylcysteine protects dental pulp stromal cells from HEMA-induced apoptosis by inducing differentiation of the cells. *Free Radic Biol Med* 2007;43:1394–408.
- [11] Schweikl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, Bolay C, Brockhoff G, et al. Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dent Mater* 2007;23:688–95.
- [12] Lefeuvre M, Amjaad W, Goldberg M, Stanislawski L. TEGDMA induces mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts. *Biomaterials* 2005;26:5130–7.
- [13] Noda M, Wataha JC, Lewis JB, Kaga M, Lockwood PE, Messer RL, et al. Dental adhesive compounds alter glutathione levels but not glutathione redox balance in human THP-1 monocytic cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;73:308–14.
- [14] Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003;17:1195–214.
- [15] Cheadle JP, Sampson JR. MUTYH-associated polyposis – from defect in base excision repair to clinical genetic testing. *DNA Repair* 2007;6:274–9.
- [16] Cline SD, Hanawalt PC. Who's on first in the cellular response to DNA damage? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:361–72.
- [17] Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004;73:39–85.
- [18] Matsuzawa A, Ichijo H. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:472–81.
- [19] Golding SE, Rosenberg E, Neill S, Dent P, Povirk LF, Valerie K. Extracellular signal-related kinase positively regulates ataxia telangiectasia mutated, homologous recombination repair, and the DNA damage response. *Cancer Res* 2007;67:1046–53.
- [20] Hamdi M, Popejusz HE, Carlotti F, Janssen JM, van derBurgt C, Cornelissen-Steijger P, et al. ATF3 and Fra1 have opposite functions in JNK- and ERK-dependent DNA damage responses. *DNA Repair (Amst)* 2008;7:487–96.
- [21] Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J* 1998;333(Pt 2):291–300.
- [22] Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 2001;13:85–94.
- [23] Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater* 2002;18:318–23.

- [24] Janke V, von-Neuhoff N, Schlegelberger B, Leyhausen G, Geurtsen W. TEGDMA causes apoptosis in primary human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2003;82:814–8.
- [25] Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G, Cosentino C, Rengo S, Schweikl H. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase amplifies TEGDMA-induced apoptosis in primary human. *J Dent Res* 2004;83:703–7.
- [26] Spagnuolo G, D'Anto V, Casentino C, Schmalz G, Schweikl H, Rengo S. Effect of *N*-acetyl-L-cysteine on ROS production and cell death caused by HEMA in human primary gingival fibroblasts. *Biomaterials* 2006;27:1803–9.
- [27] Yamada M, Kojima N, Paranjpe A, Att W, Aita H, Jewett A, et al. *N*-Acetyl cysteine (NAC)-assisted detoxification of PMMA resin. *J Dent Res* 2008;87:372–7.
- [28] Blanchetot C, Boonstra J. The ROS-NOX connection in cancer and angiogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2008;18:35–45.
- [29] Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of *N*-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:6–20.
- [30] Yu C, Rahmani M, Almenara J, Sausville EA, Dent P, Grant S. Induction of apoptosis in human leukemia cells by the tyrosine kinase inhibitor adaphostin proceeds through a RAF-1/MEK/ERK- and AKT-dependent process. *Oncogene* 2004;23:1364–76.
- [31] Nioi P, Hayes JD. Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix–loop–helix transcription factors. *Mutat Res* 2004;555:149–71.
- [32] Katoh Y, Iida K, Kang MI, Kobayashi A, Mizukami M, Tong KI, et al. Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome. *Arch Biochem Biophys* 2005;433:342–50.
- [33] Epe B. Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? *Biol Chem* 2002;383:467–75.
- [34] Moriwaki H, Osborne MR, Phillips DH. Effects of mixing metal ions on oxidative DNA damage mediated by a Fenton-type reduction. *Toxicol In Vitro* 2008;22:36–44.
- [35] Jia S, Liang M, Guo LH. Photoelectrochemical detection of oxidative DNA damage induced by Fenton reaction with low concentration and DNA-associated Fe²⁺. *J Phys Chem B* 2008;112:4461–4.
- [36] Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:143–83.
- [37] Schweikl H, Schmalz G, Rackebbrandt K. The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* and V79 cells. *Mutat Res* 1998;415:119–30.
- [38] Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 1988;240:640–2.
- [39] Lloyd DR, Phillips DH. Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) Fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutat Res* 1999;424:23–36.
- [40] Reliene R, Fischer E, Schiestl RH. Effect of *N*-acetyl cysteine on oxidative DNA damage and the frequency of DNA deletions in atm-deficient mice. *Cancer Res* 2004;64:5148–53.
- [41] Dudas A, Chovanec M. DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat Res* 2004;566:131–67.
- [42] Schweikl H, Altmannsberger I, Hanser N, Hiller KA, Bolay C, Brockhoff G, et al. The effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cell cycle of mammalian cells. *Biomaterials* 2005;26:4111–8.
- [43] Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 2003;3:155–68.
- [44] Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 2001;276:42462–7.
- [45] Jazayeri A, Falck J, Lukas C, Bartek J, Smith GC, Lukas J, et al. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 2006;8:37–45.
- [46] Weterings E, Chen DJ. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res* 2008;18:114–24.
- [47] Samuelsen JT, Holme JA, Becher R, Karlsson S, Morisbak E, Dahl JE. HEMA reduces cell proliferation and induces apoptosis in vitro. *Dent Mater* 2008;24:134–40.
- [48] Hu B, Wu L, Han W, Zhang L, Chen S, Xu A, et al. The time and spatial effects of bystander response in mammalian cells induced by low dose radiation. *Carcinogenesis* 2006;27:245–51.
- [49] 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.
- [50] Dauth I, Kruger J, Hofmann TG. Homeodomain-interacting protein kinase 2 is the ionizing radiation-activated p53 serine 46 kinase and is regulated by ATM. *Cancer Res* 2007;67:2274–9.
- [51] Heiss EH, Schilder YD, Dirsch VM. Chronic treatment with resveratrol induces redox stress- and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells. *J Biol Chem* 2007;282:26759–66.
- [52] Gastaldo J, Viau M, Bencokova Z, Joubert A, Charvet AM, Balosso J, et al. Lead contamination results in late and slowly repairable DNA double-strand breaks and impacts upon the ATM-dependent signaling pathways. *Toxicol Lett* 2007;173:201–14.
- [53] Ding LH, Shingyoji M, Chen F, Hwang JJ, Burma S, Lee C, et al. Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: a comparative study of low and high doses. *Radiat Res* 2005;164:17–26.
- [54] Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂: role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 1996;271:4138–42.
- [55] Galan A, Garcia-Bermejo ML, Troyano A, Vilaboa NE, de Blas E, Kazanietz MG, et al. Stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is an early regulatory event for the cadmium-induced apoptosis in human promonocytic cells. *J Biol Chem* 2000;275:11418–24.
- [56] Tong Z, Singh G, Rainbow AJ. Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway protects cells from photofrin-mediated photodynamic therapy. *Cancer Res* 2002;62:5528–35.
- [57] Kajiguchi T, Yamamoto K, Hossain K, Akhand AA, Nakashima I, Naoe T, et al. Sustained activation of c-jun-terminal kinase (JNK) is closely related to arsenic trioxide-induced apoptosis in an acute myeloid leukemia (M2)-derived cell line, NKM-1. *Leukemia* 2003;2189–95.
- [58] Samuelsen JT, Dahl JE, Karlsson S, Morisbak E, Becher R. Apoptosis induced by the monomers HEMA and TEGDMA involves formation of ROS and differential activation of the MAP-kinases p38, JNK and ERK. *Dent Mater* 2007;23:34–9.
- [59] Schweikl H, Hiller KA, Eckhardt A, Bolay C, Spagnuolo G, Stempf T, et al. Differential gene expression involved in oxidative stress response caused by triethylene glycol. *Biomaterials* 2008;29:1377–87.