

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

**DER EINFLUSS VON TEGDMA UND KOFFEIN AUF DEN ZELLYKLUS
MURINER MAKROPHAGEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Philipp Müller

2011

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

**DER EINFLUSS VON TEGDMA UND KOFFEIN AUF DEN ZELLYKLUS
MURINER MAKROPHAGEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Philipp Müller

2011

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Helmut Schweikl

2. Berichterstatter: PD Dr. Martin Rosentritt

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2011

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1 EINLEITUNG	8
1.1 Komposite in der Zahnmedizin	8
1.1.1 Bioverfügbarkeit von Monomeren zahnärztlicher Komposite	8
1.1.2 Zytotoxizität von Monomeren zahnärztlicher Komposite	10
1.1.3 Mechanismen der Zytotoxizität zahnärztlicher Monomere	11
1.1.4 Gentoxische Effekte von Monomeren zahnärztlicher Komposite	13
1.2 Der Zellzyklus und seine Regulation durch ATM und p53	15
1.3 Hemmung des Zellzyklus von Säugetierzellen durch TEGDMA und HEMA	18
1.4 Eigenschaften von Mitomycin C, Adriamycin und Koffein	19
2 FRAGESTELLUNG	23
3 MATERIAL UND METHODEN	24
3.1 Material	24
3.1.1 Chemikalien	24
3.1.2 Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultivierung	25
3.1.3 Lösungen für die Vitalitätsbestimmungen und Zellzyklusmessungen	25
3.1.4 Lösungen für den Zytotoxizitätstest (Kristallvioletttest)	27
3.1.5 Verbrauchsmaterial	28
3.1.6 Geräte	28
3.1.7 Softwareversionen	28
3.2 Methoden	29
3.2.1 Zellkultivierung	29
3.2.2 Versuchsvorbereitung	29
3.2.3 Exposition der Zellkulturen	29
3.2.4 Präparation der Zellen für FACS-Analysen	30
3.2.5 Bestimmung der Zytotoxizität	31
3.2.6 Bestimmung der Zellvitalität	32
3.2.7 Durchflusszytometrie	32
3.2.7.1 Prinzip der durchflusszytometrischen Messtechnik	32
3.2.7.2 Interpretation der Lichtsignale	33
3.2.8 Darstellung der Messdaten	34
3.2.9 Messung der DNA-Verteilung	37
3.2.10 Messung der Zellvitalität	38
3.2.11 Statistik	38

4	ERGEBNISSE	40
4.1	Wirkung von TEGDMA, Adriamycin und Mitomycin C auf die Zellproliferation	40
4.2	Der Einfluss von Koffein auf den Zellzyklus in Kombination mit TEGDMA, Adriamycin und Mitomycin C	43
4.2.1	Veränderungen in der G1 - Phase	43
4.2.2	Veränderungen in der S – Phase	44
4.2.3	Veränderungen in der G2 – Phase	46
4.3	Zytotoxizität von TEGDMA, Adriamycin und Mitomycin C	47
4.3.1	Zytotoxizität	47
4.3.2	Zellvitalität in exponierten Zellkulturen	48
5	DISKUSSION	50
5.1	Gentoxizität dentaler Monomere	50
5.1.1	Prüfung der Gentoxizität dentaler Monomere	50
5.1.2	Gentoxizität und Mutagenität dentaler Monomere	51
5.1.3	Oxidative DNA-Schäden durch dentale Monomere	52
5.1.4	Die Aktivierung von ATM und H2AX durch dentale Monomere	52
5.2	Hypothesen zur Gentoxizität und Mutagenität dentaler Monomere	54
5.3	Die Wirkung von TEGDMA, Mitomycin C und Adriamycin in RAW264.7 Makrophagen	56
5.3.1	Zytotoxizität	56
5.3.2	Die Wirkung von TEGDMA, Mitomycin C und Adriamycin auf den Zellzyklus	57
5.4	Der Einfluss von Koffein auf den Zellzyklus	60
5.5	Schlussfolgerung	62
6	ZUSAMMENFASSUNG	63
6.1	Conclusion	65
7	LITERATUR	67
8	Danksagung	75
9	Lebenslauf	76

Abkürzungsverzeichnis

BSA	bovine serum albumin
Bis-GMA	Bisphenol A-Diglycidylmethacrylat
CMF-PBS	Calcium- und Magnesiumfreie phosphatgepufferte Kochsalzlösung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	foetal bovine serum
FL 1-3	Fluoreszenz 1-3
FSC	forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
GSH	Gluthation
HEMA	2-Hydroxyethylmethacrylat
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
NAC	N-Acetylcystein
PBS	phosphate buffered saline (= phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PBS-EDTA	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit EDTA
ROS	reactive oxygen species
SSC	side scatter (Seitwärtsstreulicht)
TEGDMA	Triethylenglycoldimethacrylat
UDMA	Urethandimethacrylat
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Komposite in der Zahnmedizin

Komposite haben sich zu einer festen Größe im Repertoire der zahnärztlichen Werkstoffe entwickelt. Ihre Einsatzmöglichkeiten haben sich in den letzten Jahrzehnten stark erweitert; von der ästhetisch qualitativen Defektversorgung im Front- und Seitenzahnbereich, bis hin zur Verwendung als Fissurenversiegler, Dentinadhäsiv, Stumpfaufbaumaterial, als Befestigungswerkstoff in der Kieferorthopädie oder für Inlays, sowie mittlerweile auch als Wurzelkanal-Sealer (Schmalz und Arenholt-Bindslev, 2004). Zahnärztliche Komposite bestehen aus zwei chemisch verschiedenen Komponenten, einer organischen Kunststoffmatrix (Acrylatmonomere), dem zugehörigem Katalysatorsystem und anorganischen Füllstoffen. Man kann sie anhand ihrer Polymerisation als licht-, auto- oder dualhärtend klassifizieren oder anhand ihrer Füllstoffe. Hier unterscheidet man zwischen Makrofüllerkompositen mit 8-12 μm Partikelgröße, Mikrofüllerkompositen (0,01 – 0,04 μm), Hybridkompositen (0,6 – 1 μm) und Nanofüllerkomposite (bis herunter auf 5 nm). Die Füller bestehen aus Quarz, Glas, Keramik (splitterförmig) oder hochdispenser Kieselsäure (Mikro-/Nanofüller). Die Füllerart hat wesentlichen Anteil an den Eigenschaften des Komposites, wie zum Beispiel mechanische Stabilität, Abrasionsverhalten, Polierbarkeit und Polymerisationsschrumpfung (Schmalz und Arenholt-Bindslev, 2004).

1.1.1 Bioverfügbarkeit von Monomeren zahnärztlicher Komposite

Die chemische Haftung der beiden Phasen zahnärztlicher Komposite erfolgt über Kopplungsagenzien, meist trifunktionale Alkoxysilane (Viohl *et al.*, 1986; Peutzfeldt, 1997). Die Kunststoffmatrix der Werkstoffe auf der Basis von Acrylaten besteht aus Basismonomeren und Comonomeren. Als Basismonomere werden überwiegend die hochmolekularen Monomere Bisphenol A-Glycidylmethacrylat (Bis-GMA, Bis-4(2-hydroxy-3-methacryloxy-propyloxy)-phenyl-propan) und Urethandimethacrylat (UDMA) verwendet. Aufgrund ihrer hohen Viskosität werden ihnen niedermolekulare

Verdünner (Comonomere) zugesetzt. Ein aktuell häufig verwendetes Comonomer ist das Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA). Dentinadhäsive, die das Kompositfüllungsmaterial mit der Zahnhartsubstanz verbinden, enthalten außer Basismonomeren und Comonomeren auch kleinere Monomere wie 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) oder 4-Methacryloxyethyl-Trimellitsäureanhydrid (4-META) (Peutzfeldt, 1997; Rueggeberg, 2002).

Die Komposite auf Acrylatbasis schrumpfen in Folge der Polymerisationsreaktion der Komponenten der organischen Matrix um etwa zwei bis drei Volumenprozent (Viohl *et al.*, 1986). Dieser Schrumpf ist ein großer Nachteil in der klinischen Anwendung der Komposite, weil er zur Ausbildung von Randspalten zwischen den restaurativen Materialien und der Zahnhartsubstanz führen kann. Die dadurch begünstigte Adhäsion bakterieller Beläge (Plaque) verursacht mitunter Sekundärkaries, eine der häufigsten Ursachen zur Erneuerung zahnärztlicher Restaurationen (Friedl *et al.*, 1995; Dauvillier *et al.*, 2000). Durch die Verwendung ringöffnender Moleküle in der organischen Matrix von Kompositen wurde versucht, diesen Nachteil zu beheben. Substanzen wie Spiroorthocarbonate und Epoxide (Oxirane) erschienen unter chemischen Aspekten für dieses Vorhaben geeignet (Eick *et al.*, 1993; Kostoryz *et al.*, 2000; Eick *et al.*, 2002). Jedoch leidet die Biokompatibilität dieser Werkstoffe unter Umständen unter der meist hohen Reaktivität der Epoxide. Die chemische Verbindung reaktiver Epoxide mit biokompatiblen Siloxanen führte zur Einführung von Siloranen als Basis für neue Kompositwerkstoffe mit reduziertem Polymerisationsschrumpf (Guggenberger und Weinmann, 2000). Möglicherweise verbinden nun die Silorane die vorteilhaften Eigenschaften von Epoxiden und Siloxanen für die Entwicklung eines neuen zahnärztlichen Füllungswerkstoffes (Guggenberger und Weinmann, 2000; Weinmann *et al.*, 2005).

Funktionelle Kompositwerkstoffe entstehen erst aufgrund der Monomer-Polymer-Konversion. Weil jedoch die Polymerisation der Monomere nie vollständig ist, verbleiben nicht-polymerisierte Restmonomere im klinisch verwendeten Komposit. Abhängig vom Lösungsmittel wurden experimentell teilweise mehr als dreißig verschiedene Komponenten in Extrakten polymerisierter Komposite auf Acrylatbasis nachgewiesen (Pelka *et al.*, 1999; Michelsen *et al.*, 2003). Die Degradation dentaler Komposite und die Auslaugung von Restmonomeren durch ein bisweilen sehr aggressives Milieu in der Mundhöhle wird ergänzt durch die Aktivitäten von

Esterasen des Speichels, die langfristig die Stabilität dentaler Komposite zerstören können (Santerre *et al.*, 2001; Finer und Santerre, 2004; Lin *et al.*, 2005).

1.1.2 Zytotoxizität von Monomeren zahnärztlicher Komposite

Restmonomere und Degradationsprodukte zahnärztlicher Komposite können biologische Reaktionen in benachbarten Geweben auslösen. Unter Umständen sind auch Personen, die an der Entwicklung der Werkstoffe arbeiten sowie zahnärztliches Personal gefährdet, weil sie häufig und über eine sehr lange Zeit mit relevanten Mengen dieser Stoffe umgehen. Die Vielzahl von Analysen der Zytotoxizität von Werkstoffen und ihrer Bestandteile ist an anderen Stellen ausführlich diskutiert (Schmalz, 1998; Geurtsen, 2000). Es wurde wiederholt gezeigt, dass Extrakte von Kompositen auf Acrylatbasis abhängig von den experimentellen Parametern (Polymerisation, Liegezeit, Expositionsdauer) unterschiedlich zytotoxisch wirken (Geurtsen, 2000). Als zytotoxische Bestandteile der Werkstoffe wurden die Komponenten der organischen Basis, überwiegend die als Basismonomere und Comonomere verwendeten Dimethacrylate, identifiziert (Hanks *et al.*, 1991; Geurtsen *et al.*, 1998; Thonemann *et al.*, 2002). Aus Struktur-aktivitätsuntersuchungen ist bekannt, dass Acrylate toxischer sind als Methacrylate und dass difunktionelle Moleküle wie das Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) wirksamer sind als monofunktionelle Moleküle wie etwa das 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) (Yoshii, 1997). Für einzelne Komponenten experimenteller Werkstoffe auf der Basis von Epoxiden oder Siloranen sind bisher nur wenige Daten publiziert. Während einzelne Monomere im Agardiffusionstest durchaus stark zytotoxisch wirken können, liegen jedoch die TC50-Werte, die in quantitativen Testsystemen ermittelt wurden, meist weit über den Werten für beispielsweise Bis-GMA oder Epoxiden wie Araldit™ oder auch Epon™. Für experimentelle Werkstoffe auf Epoxidbasis wurden lediglich schwache zytotoxische Wirkungen beschrieben (Kostoryz *et al.*, 1999; Eick *et al.*, 2002).

Die Bestimmung der Zytotoxizität der Werkstoffe und ihrer Monomere wird von experimentellen Parametern wie der Wahl des biologischen Endpunkts, den Eigenschaften der verwendeten Zelllinien oder der Nachweismethoden beeinflusst (Wataha *et al.*, 1994; Schweikl und Schmalz, 1996; Geurtsen, 2000). In den meisten

Untersuchungen zur Analyse der Zellvitalität wurden Tetrazoliumsalze wie etwa MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid) verwendet, deren unterschiedlich schnelle enzymatische Umsetzung auf Veränderungen in der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen als Zellschaden verweist (Mosmann, 1983; Hanks *et al.*, 1991; Geurtsen, 2000). Die Zytotoxizität von Kompositwerkstoffen und Monomeren wurde jedoch auch über die Freisetzung des zytosolischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmt oder sie wurde über die Aufnahme von Neutralrot in saure intrazelluläre Vesikel als Marker für die Integrität zellulärer Membranen gemessen (Schweikl und Schmalz, 1996; Lonroth und Dahl, 2001; Quinlan *et al.*, 2002). Die Abschätzung der Synthese zellulärer Makromoleküle wie DNA, RNA und Proteine zeigte die Veränderung zentraler Stoffwechsellösungen unter dem Einfluss von Monomeren (Hanks *et al.*, 1991; Geurtsen, 2000). Erst eine Kombination von Nachweismethoden, die unterschiedliche biologische Endpunkte erfassen (Enzymaktivitäten, Membranintegrität, Stoffwechsellösungen) ergab die wertvollsten Hinweise der Wirkung von Monomeren auf Grundfunktionen von Säugetierzellen (Schweikl und Schmalz, 1996). Jedoch zeigen diese Nachweismethoden nur indirekt die Ursachen und bestenfalls die Ansätze der Mechanismen, die zur Reduktion der Grundfunktionen vitaler Zellen und zum Zelltod unter dem Einfluss toxischer Werkstoffe oder Substanzen führen.

1.1.3 Mechanismen der Zytotoxizität zahnärztlicher Monomere

Das Tripeptid Glutathion (GSH) ist die Thiolverbindung mit einer zentralen Funktion bei der Regulation des zellulären Thiol-Disulfid-Redoxzustands (Watson *et al.*, 2003). Die intrazelluläre Verarmung an GSH ist in vielen Fällen eines der ersten Phänomene bei der Bestimmung der Zytotoxizität vieler reaktiver organischer Chemikalien, und dieser Effekt wurde auch für Acrylate und Methacrylate beschrieben (Freidig *et al.*, 2001). Inzwischen liegen für dentale Komposite Ergebnisse vor, die deren Zytotoxizität mit einem veränderten Redoxzustand von Zielzellen verknüpfen. So wurde die Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in primären humanen Pulpazellen und Fibroblasten der Haut durch zahnärztliche Adhäsivsysteme, das Campherquinon (Photoinitiator der Polymerisationsreaktion) und das Monomer HEMA erhöht (Atsumi *et al.*, 2004;

Spagnuolo *et al.*, 2004a; Spagnuolo *et al.*, 2004b; Chang *et al.*, 2005). Die Zytotoxizität des Comonomers TEGDMA war von einem sehr raschen Abfall der intrazellulären Konzentration von GSH begleitet (Stanislawski *et al.*, 2000, Engelmann 2002; Stanislawski *et al.*, 2003). Diese Verarmung an GSH in Anwesenheit von TEGDMA korrelierte mit einem intrazellulären Anstieg von ROS in primären Zellen der menschlichen Gingiva (Mundschleimhaut) (Stanislawski *et al.*, 2003). Als Quelle für die Entstehung von ROS werden derzeit vor allem die oxidativen Stoffwechselwege in den Mitochondrien diskutiert, jedoch ist die Verbindung zur Induktion von Apoptose nicht geklärt (Hoffmann *et al.*, 2002; Mandavilli *et al.*, 2002).

Wahrscheinlich ist die Verarmung an GSH nicht mit einem Anstieg an oxidiertem GSH (GSSG) verbunden (Lefevre *et al.*, 2004). Dieses zunächst überraschende Ergebnis stützt die schon früh formulierte Hypothese, dass TEGDMA direkt an reduziertes Glutathion binden könnte (Schweikl und Schmalz, 1999; Geurtsen und Leyhausen, 2001). Man darf auch eine kovalente Bindung von TEGDMA an andere nukleophile Komponenten, etwa Cysteinreste von Proteinen, vermuten. Diese Annahmen wurden ursprünglich aus den Interaktionen von TEGDMA mit zellulärer DNA abgeleitet (Schweikl und Schmalz, 1999). Sie werden nun weiter durch Hinweise gestützt, TEGDMA könnte die Aktivität der Glutathiontransferase P1 (GSTP1) als ein nicht-kompetitiver Antagonist des Glutathions inhibieren (Lefevre *et al.*, 2004).

Der Hinweis auf die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid, Superoxidanion und Hydroxylradikalen als Signalmoleküle für die Induktion des physiologischen Zelltods (Apoptose) markiert einen neuen Ansatz in der Diskussion von Mechanismen zytotoxischer Effekte. Es gibt inzwischen experimentelle Hinweise auf die Modifizierung zellulärer Signaltransduktionswege durch ROS, etwa die Aktivierung von Stresskinasen, Mitogen-aktivierte Kinasen (MAPK) oder kleiner G-Proteine (Ras) (Hancock *et al.*, 2001; Benhar *et al.*, 2002; Torres und Forman, 2003). Andererseits wirken wohl ROS auch sekundär als Botenstoffe der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie etwa Aktivator Protein-1 (AP-1) oder Nuklearfaktor-kappa-B (NF- κ B), die wiederum die Genexpression von Komponenten der zellulären Antwort induzieren (Pinkus *et al.*, 1996; Ainbinder *et al.*, 1997).

Säugetierzellen haben ein sehr komplexes System entwickelt, das gegen oxidativen Zellschaden schützt. Dazu gehören nicht-enzymatische Antioxidantien wie Glutathion

oder Thioredoxin aber auch Enzymaktivitäten wie Superoxiddismutase (SOD), Glutathionperoxidase 1 (GPx), und Catalase (CAT) (Ames, 1983; Cerutti, 1985; Klaunig *et al.*, 2010). Sobald die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies die zellulären Kapazitäten der Entgiftung übersteigt, werden Proteine und DNA geschädigt. Dies kann den Zelltod durch Apoptose oder Nekrose zur Folge haben (Behrend *et al.*, 2003; Boonstra und Post, 2004). Antioxidantien wie N-Acetylcystein (NAC), Ascorbat und vor allem Trolox (Vitamin E) schienen die Erzeugung von Zellschäden durch Monomere wie TEGDMA und HEMA zu verhindern (Stanislawski *et al.*, 2003, Walther *et al.*, 2004). Beispielsweise schützte NAC humane Gingivazellen und Pulpafibroblasten gegen zytotoxische Effekte eines Comonomers und zweier Glasionomerzemente (GIZ) (Stanislawski *et al.*, 2000). Auch die Verarmung des intrazellulären Glutathions in Fibroblasten, die Extrakten dieser Werkstoffe exponiert waren, wurde durch NAC inhibiert. Ascorbat hingegen schien die Toxizität einiger GIC-basierter Biomaterialien sogar zu erhöhen, während Trolox die zytotoxischen Effekte der Extrakte von Kompositwerkstoffen reduzierte (Soheili *et al.*, 2003).

1.1.4 Gentoxische Effekte von Monomeren zahnärztlicher Komposite

Genomische DNA ist ein Zielmolekül von Komponenten der organischen Matrix zahnärztlicher Komposite, denn manche Monomere sind *in vitro* gentoxisch. Jedoch ist das gentoxische Potential der Mono- und Dimethacrylate sehr unterschiedlich. Für die Basismonomere Bisphenol A-Diglycidylmethacrylat (Bis-GMA) und Urethandimethacrylat (UDMA) sowie für die Monomere 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) und Methylmethacrylat (MMA) wurden in Säugetierzellen *in vitro* keine Genmutationen nachgewiesen. Dagegen induzierte das bifunktionelle Comonomer Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) dosisabhängige Effekte in Säugetierzellen. So stieg die Häufigkeit von Genmutationen um mehr als das zehnfache und die Substanz induzierte einen dosisabhängigen Anstieg der Zahl an Mikrokernen (ein Hinweis auf Chromosomenaberrationen) (Schweikl *et al.*, 1998; Schweikl *et al.*, 2001). Außerdem schien das TEGDMA im herkömmlichen Comet-Assay zum Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen eine geringe Wirkung zu zeigen (Kleinsasser *et al.*, 2004). Neben dem TEGDMA waren auch andere Monomere, die als Comonomere verwendet werden gentoxisch. Ethylenglycoldimethacrylat

(EGDMA), Diethylenglycoldimethacrylat (DEGDMA) und Tetraethylenglycoldimethacrylat (TetEGDMA) erzeugten Genmutationen in Säugetierzellen (V79/HPRT-Test). Das kleine EGDMA war die wirksamste Komponente und das größte Derivat, das TetEGDMA war am wenigsten aktiv (Schweikl *et al.*, 2002a). Der L578Y/TK-Test zum Nachweis von Genmutationen schien die Effekte der größeren Moleküle noch klarer zu detektieren als der V79/HPRT-Test (Schmitt *et al.*, 2002). Die Fähigkeit der verschiedenen Ethylenglycoldimethacrylate zur dosisabhängigen Induktion von Mikrokernen in V79-Zellen und in Mauslymphomzellen (L578Y) war ebenfalls strukturbezogen, denn die kleinen Moleküle waren aktiver als die großen (Schmitt *et al.*, 2002; Schweikl *et al.*, 2002a).

TEGDMA bewirkte ein charakteristisches Mutationsspektrum in Säugetierzellen. Die meisten TEGDMA-induzierten und mutierten V79-Zellen wiesen große Deletionen von Exonsequenzen des *hprt*-Gens (der Selektionsmarker zur Isolierung von Mutanten) auf, jedoch wurden keine Punktmutationen gefunden (Schweikl und Schmalz, 1999). Aus diesen Analysen wurde abgeleitet, dass TEGDMA ausschließlich DNA-Schäden induziert, die auf DNA-Doppelstrangbrüchen basieren. Im Unterschied zu TEGDMA war das monofunktionale Monomer HEMA in Genmutationstests nicht mutagen, die Zahl an Mikrokernen in Zellkulturen, die HEMA exponiert waren, stieg dennoch um mehr als das zehnfache (Schweikl *et al.*, 1998; Schweikl *et al.*, 2001).

Die Aktivitäten von Epoxiden (Oxiranen) im Ames-Test (bakterielles Testsystem) waren gering, denn lediglich die Substanzen Epoxycyclohexyl-methyl-epoxycyclohexancarboxylat, Di(cyclohexen-epoxidmethyl)ether und 1,4-Bis(2,3-epoxypropyloxypropyl-dimethylsilyl)benzol verursachten in den *Salmonella typhimurium*-Stämmen TA100 und TA102 (Detektion von Basenpaarsubstitutionen) mutagene Effekte (Schweikl *et al.*, 2002b). Epoxycyclohexyl-methyl-epoxycyclohexancarboxylat und Di(cyclohexenepoxidmethyl)-ether waren auch im V79/HPRT-Genmutationstest aktiv (Schweikl *et al.*, 2004). Außerdem induzierten die Substanzen in der Reihenfolge Di(cyclohexenepoxidmethyl)ether > Epoxycyclohexyl-methyl-epoxycyclohexancarboxylat > Di-3,4-Epoxycyclohexylmethyl-dimethyl-silan sehr wirksam Mikrokerne in V79-Zellen (Schweikl *et al.*, 2004). Die Zahlen der induzierten Mikrokerne lagen in einem Bereich, der auch für das Comonomer Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) in V79-Zellen bestimmt wurde (Schweikl und Schmalz, 1999). Dass hierbei zehnfach geringere Konzentrationen der reaktiven Epoxidmonomere

ausreichen, um dieselbe Wirkung zu erzielen, zeigt, dass die hier geprüften Epoxide reaktiver waren als etwa das TEGDMA (Schweikl *et al.*, 2004).

1.2 Der Zellzyklus und seine Regulation durch ATM und p53

Die Fähigkeit von Organismen, die Stabilität und Integrität des gesamten Genoms zu bewahren, ist bedeutsam für das Überleben von Zellen und ihre Fähigkeit zur Proliferation. Vor jeder Zellteilung wird die genetische Ausstattung jeder Zelle identisch redupliziert und erst anschließend an die Tochterzellen weitergegeben. Die Phasen der Vermehrung und der Verdopplung subzellulärer Strukturen folgen geordnet in einem Zellzyklus aufeinander, der sich in die mitunter sehr lange Interphase und die meist kurze Phase der Mitose (M-Phase) teilt. In der Interphase des Zellzyklus unterscheidet man für fast alle Zellen G1-, S- und G2-Phasen (Murray, 2004). In der M-Phase (Mitose) zerfällt die maternale Kernhülle und die einander entsprechenden Chromosomen werden zu gegenüberliegenden Polen der Zelle gezogen. Jede Gruppe von Tochterchromosomen wird von einer neu gebildeten Kernhülle umgeben und nach der Zellteilung entstehen zwei neue Tochterzellen (Satyanarayana und Kaldis, 2009). Hiernach erfolgt der Übergang proliferierender Zellen in die G1-Phase, in welcher das Wachstum der Zellen und damit die Synthese zellulärer Bestandteile voranschreitet, oder in die G0-Phase (Ruhephase). In die G0-Phase gehen Zellen sowohl ausdifferenziert als auch bei Mangel an Wachstumsfaktoren, Substrat oder bei biochemischen Stopp- oder Apoptosesignalen über. Zellen können über längere Zeit in der G0-Phase verweilen. Vor dem Eintritt der Zellen in die S-Phase überschreiten Zellen einen so genannten Restriktionspunkt (*cell cycle checkpoint*). Kontrollpunkte des Zellzyklus sind ein Netzwerk regulatorischer Proteine, die prüfen, ob jede der Phasen eines Zellzyklus erfolgreich abgeschlossen werden konnte. Diese molekularen Regulatoren übersetzen ein Signal, das DNA-Schäden meldet (*sensor proteins*), in eine zelluläre Antwort. Eine Kette der Signalübertragung führt dann zu einer Verzögerung des Zellzyklus oder einem vollständigen Arrest, damit Schäden repariert werden können (Nyberg *et al.*, 2002; Kaina, 2003).

Von da an benötigen die Zellen keine Wachstumshormone mehr und ein Verweilen in der G1- oder G0-Phase ist nicht mehr möglich. Weitere Restriktionspunkte und DNA-Kontrollpunkte gibt es in der G2- und der M-Phase. In der S-Phase (Synthese)

wird die DNA repliziert, um für beide Tochterzellen Kopien zu erstellen. Zusätzlich erfolgt die Bildung von RNA und Proteinen. In der G₂-Phase werden weiterhin Proteine und RNA synthetisiert, jedoch keine DNA; die Vorbereitung auf eine neue Mitose-Phase ist somit abgeschlossen. Die Übergänge zwischen den einzelnen Phasen werden durch Proteinkinasen in Interaktion mit für die jeweilige Phase spezifischen Cyclin-Proteinen geregelt. Daher heißen diese Proteinkinasen auch Cyclin-abhängige Kinasen (CDK). Die Proteinlevel der CDKs bleiben wahrscheinlich während eines Zellzyklus konstant, während die Expression und Degradation der Cycline variiert (Satyanarayana und Kaldis, 2009).

Den Übergang zwischen der G₁- und S-Phase vermitteln im Wesentlichen die CDKs 5, 4 und 2 sowie das Retinoblastomprotein (pRB). Bis zum Erreichen des Restriktionspunktes in der G₁-Phase erfolgt die Aktivierung der CDKs durch Assoziation mit Cyclin D. Sie phosphorylieren dann das Retinoblastomprotein pRb, welches die Transkriptionsfaktoren E2F und DRTF1 bindet. Nach dem Restriktionspunkt wird Cyclin E synthetisiert, welches die CDK2 aktiviert. Diese phosphoryliert jetzt das pRb-Protein (Rb 105) an einer vierten Stelle, was zu einer Freisetzung der Transkriptionsfaktoren führt, die für die S-Phase benötigt werden (Satyanarayana und Kaldis, 2009). In einem Zellzyklus prüfen mehrere Kontrollpunkte, ob DNA-Schäden vorliegen. Dabei können die Proteine der Kontrollpunkte nach der Reihenfolge ihrer zeitlichen Aktivität in Sensoren, Mediatoren, Transduktoren und Effektoren eingeteilt werden (Niida und Nakanishi, 2006).

Zwei wesentliche Kontrollproteine hierbei sind das PI3-kinaseähnliche Protein ATM, ein Transduktor, und der Transkriptionsfaktor p53, ein Effektor. Unter stressfreien Bedingungen liegt ATM als Homodimer vor, bei welchem die Kinasedomäne durch intermolekulare Bindung zu einer Proteindomäne in einem Abschnitt um Ser1981 geblockt wird. In vivo erfolgt die Aktivierung von ATM durch DNA-Schäden (Doppelstrangbrüche), welche eine Konformationsänderung im ATM verursachen, wodurch die Kinase zur intermolekularen Autophosphorylierung (Canman *et al.*, 1998) von Ser1981 stimuliert und somit die Dissoziation des Homodimers bewirkt wird. ATM wird wohl hauptsächlich durch zwei Ereignisse reguliert. Zum einen durch die intermolekulare Autophosphorylierung und die Dissoziation des Homodimers durch bisher unbekannte Chromatinveränderungen und zum anderen durch die

Translokation des aktivierten ATM zum Ort seiner Aktivität (Niida und Nakanishi, 2006; Bakkenist und Kastan, 2003).

Das aktivierte ATM wirkt unter anderem an dem sequenzspezifischen Transkriptionsfaktor p53, der seine Effekte durch Aktivierung oder Unterdrückung eines Zielgens erzeugt und so als ein zentrales Kontrollprotein für die Apoptose agiert (Vousden *et al.*, 2001). So inhibiert das p53 den Übergang von Zellen aus der G1-Phase in die S-Phase durch die Aktivierung von p21 (Cip1/Waf1) auf der Transkriptionsebene, das seinerseits den CDK4/Cyclin D-Komplex inhibiert. P53 reguliert auch den Übergang von der G2-Phase in die Phase der Zellteilung (M-Phase) und erlaubt damit die Reparatur von DNA-Schäden noch bevor diese endgültig an die nächste Zellgeneration weitergegeben werden (Schwartz und Rotter, 1998; Sigal und Rotter, 2000).

In normalen Zellen ist der p53-Gehalt infolge von Mdm2-vermittelter Ubiquitinierung und Abbau durch das Proteasom relativ niedrig. Nach DNA-Schäden wird p53 durch ATM als Folge der Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen oder durch ATR (*ATM and Rad3-related*), falls DNA- Einzelstrangbrüche vorliegen, mittels Phosphorylierung aktiviert (Banin *et al.*, 1998; Canman *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung verhindert die Interaktion mit Mdm2 und stabilisiert somit p53 (Shieh *et al.*, 1997). Die Menge an p53 in Zellen steigt infolge der Exposition gegen Stressfaktoren wie ionisierende oder UV-Strahlung, Sauerstoffmangel, Überhitzung oder gentoxische Substanzen (Lavin und Gueven, 2006). Das p53-Protein übernimmt die Regulation einer Vielzahl zellulärer Funktionen, etwa bei der Transkription, der DNA-Synthese und -Reparatur oder der Induktion von Seneszenz, aber auch beim Zellzyklusarrest und der Apoptose (Slee *et al.*, 2004).

Apoptose ist ein aktiver, energieverbrauchender Prozess mit deutlichen morphologischen Veränderungen betroffener Zellen und Gewebe (Zhiotovskiy, 2004). Es werden Proteine mit sensorischer, regulatorischer und ausführender Wirkung aktiviert. Apoptose wird zum einen über Rezeptoren in der Zellmembran (*death receptor*) induziert und führt zur Aktivierung von Effektoren (Caspasen) über regulatorische Proteine (extrinsische Form der Apoptose). Aber auch Mitochondrien übernehmen eine zentrale Stellung im Prozess der Apoptose. Sie erhalten Signale entweder ausgehend von den Membranrezeptoren oder aber der Prozess beginnt direkt an den Organellen selbst (intrinsische Apoptose) (Riedl und Shi, 2004; Zhiotovskiy, 2004).

In beiden Signalwegen wurde p53 nachgewiesen, doch es beeinflusst hauptsächlich den intrinsischen Weg. P53 reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression pro- und anti-apoptotischer regulatorischer Proteine. PUMA (*p53-upregulated modulator of apoptosis*), Bax und Noxa sind p53-abhängige Proteine, die vor allem nach induzierten DNA-Schäden exprimiert werden (Vaseva und Moll, 2009).

Welche Funktion p53 schließlich erfüllt, hängt von seiner Konzentration ab. In relativ niedriger Konzentration führt es zu Zellzyklusarrest und Reparatur von DNA-Schäden. In hoher Konzentration induziert es Apoptose, mitunter also die Eliminierung von Zellen, deren DNA irreversibel geschädigt ist. Die Höhe der Konzentration hängt wiederum von der Stärke des Stresses ab, dem Zellen und Gewebe ausgesetzt sind (Vousden und Lane, 2007). Trotz der vielen Erkenntnisse über die vielfältigen Funktionen dieses zentralen Regulatormoleküls ist die spezifische Aktivierung der verschiedenen p53-vermittelten Signaltransduktionswege weitgehend unbekannt.

1.3 Hemmung des Zellzyklus von Säugetierzellen durch TEGDMA und HEMA

Das Monomer TEGDMA wirkte, wie oben diskutiert, genotoxisch in Säugetierzellen, und man durfte daher annehmen, dass diese Substanz einen DNA-Schaden induzierte. Daraus konnte man ableiten, TEGDMA würde eine Verzögerung des Zellzyklus bewirken. Die zelluläre Antwort auf diesen genotoxischen Stress erfolgt wahrscheinlich über p53-abhängige und p53-unabhängige Signaltransduktionswege und die nachgelagerte Aktivierung von Genen, die für Proteine der Kontrollpunkte des Zellzyklus kodieren. Nach Exposition gegen TEGDMA wurde die Mehrheit p53-defizienter V79-Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus arretiert, dagegen war der Zellzyklus p53-profizienter humaner Fibroblasten überwiegend in der G1-Phase reversibel verzögert. Der Anteil der humanen Fibroblasten in der G2-Phase wurde lediglich bei hohen zytotoxischen TEGDMA-Konzentrationen irreversibel erhöht. Die Proliferation primärer humaner Pulpazellen wurde nur durch niedrige TEGDMA-Konzentrationen leicht in der G1-Phase verzögert, während hohe Konzentrationen des Monomers die Zellen in der G2-Phase arretierten. Aufgrund dieser Ergebnisse war zu vermuten, dass TEGDMA DNA-Schäden induzierte, die sowohl über p53-abhängigen als auch p53-unabhängigen Wegen zur Verzögerung der verschiedenen

Phasen des Zellzyklus führten (Schweikl *et al.*, 2005a). Für das monofunktionale HEMA wurde eine Verzögerung des Zellzyklus in der G2/M-Phase berichtet (Chang *et al.*, 2005). Die p53-defizienten V79 Zellen wurden durch HEMA vollständig in der G2 Phase arretiert und auch der Zellzyklus der p53-profizienten primären Pulpazellen war vorwiegend in der G2-Phase verzögert (Schweikl *et al.*, 2005b).

Trotz der Hinweise auf die Beteiligung des p53 an der Regulation des Zellzyklus unter dem Einfluss von Monomeren bleiben die Komponenten des Signaltransduktionsweges gänzlich unbekannt, die in Anwesenheit von TEGDMA oder auch HEMA die Zellen in Kultur in der G1- oder auch der G2-Phase arretieren können. Es gibt derzeit keine Hinweise, über welche Mechanismen TEGDMA- oder HEMA-induzierte DNA-Schäden erkannt werden (ATM oder ATR) und welche Kaskaden angestoßen werden, die letztlich zur Verzögerung des Zellzyklus führen.

1.4 Eigenschaften von Mitomycin C, Adriamycin und Koffein

Um experimentelle Hinweise auf Mechanismen des Monomer-induzierten Zellzyklusarrests zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit Medikamente aus der Krebstherapie verwendet. Ihre Wirkung auf den Zellzyklus ist in den Grundzügen bekannt und wurde hier mit TEGDMA verglichen. Mitomycin C ist ein zytotoxisch wirkendes Antibiotikum aus *Streptomyces caespitosus* zur therapeutischen (parenteralen) Anwendung als Zytostatikum, beispielsweise bei gastrointestinalen Karzinomen, Mamma-, Ovarial- oder Blasenkarzinomen. Mitomycin C arretiert den Zellzyklus überwiegend in der G2-Phase als Folge von DNA „*interstrand crosslinks*“. Die Reaktion von Mitomycin C mit Basen des DNA-Moleküls erfolgt nur nach metabolischer Aktivierung von Mitomycin C. Reduktasen katalysieren die Reduktion des Chinons zu einem Semichinonradikal mit gleichzeitiger Abspaltung der Methoxy-Gruppe (Abb.1) (Tomasz *et al.*, 1987). Dabei entsteht ein mono- und bifunktionelles Alkylanz, das DNA-Seitenstränge irreversibel verknüpft. Die daraus resultierenden DNA-Doppelstrangbrüche führen über den Sensor H2AX zur Aktivierung von ATM (Yun *et al.*, 2005, Cann und Hicks, 2007).

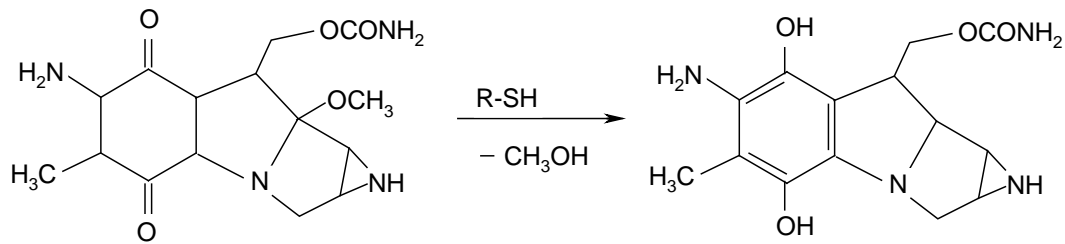


Abb. 1: Metabolische Aktivierung von Mitomycin C. Die Abbildung wurde modifiziert nach Tomasz *et al.*, 1987.

Adriamycin (Doxorubicin) ist ein Anthrazyklin aus Kulturen von *Streptomyces peuceticus*. Es wird beispielsweise zur Behandlung akuter lymphatischer Leukämie, Bronchial- und Endometriumkarzinomen oder Lymphomen eingesetzt. Im Adriamycin ist eine tetrazyklische Naphthacen-Ringstruktur an den Aminozucker Daunosamin gebunden. Bedeutung für die chemische Reaktivität hat der innen liegende Chinonring, der durch die Aufnahme eines Elektrons zu einem reaktiven und instabilen Semichinonradikal wird (Abb.2) (Bachur *et al.*, 1979). Darauf basiert die zytotoxische Wirkung des Moleküls in verschiedenen zellulären Kompartimenten. So kann Adriamycin beispielsweise freie Radikale bilden, sich in Zellmembranen einlagern, die Ca^{2+} -Homöostase stören, die Topoisomerase II inhibieren und in die DNA interkalieren.

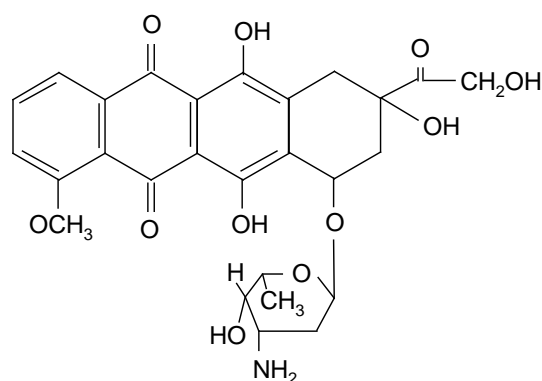


Abb. 2: Struktur von Adriamycin nach Young *et al.* (1981)

Adriamycin kann sich zwischen die Basen der DNA-Doppelhelix anlagern (Leonard *et al.*, 1992). Dadurch werden die DNA-Stränge stabilisiert und eine Entspiralisierung sowie nachfolgend eine Replikation der DNA werden inhibiert. Dabei ist die Inhibition

der Topoisomerase II ein weiterer eigener Mechanismus, weil der Komplex des Enzyms mit der DNA stabilisiert und somit inaktiviert wird (Pommier *et al.*, 1985; Deffie *et al.*, 1989). In der Folge entstehen reversible Einzel- und Doppelstrangbrüche und der Zellzyklus wird arretiert (Tewey *et al.*, 1984; Zunino und Capranico, 1990). So basiert die therapeutisch gewünschte Wirkung des Adriamycins als Zytostatikum auf diesen genotoxischen Mechanismen (Myers *et al.*, 1977). Auf molekularer Ebene verursacht Adriamycin einen p53-abhängigen Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase sowie einen p53-unabhängigen Arrest in G2. Möglicherweise ist p53 auch an der Regulation der Verzögerung des Zellzyklus in der S-Phase beteiligt (Attardi *et al.*, 2004).

Koffein ist als pflanzliches Alkaloid in Genussmitteln wie Kaffee, Tee oder Schokolade bekannt. Es handelt sich dabei um ein Methylxanthinderivat, ein in Reinform weißes, kristallines, geruchloses, bitter schmeckendes Pulver. Koffein ist ein Bestandteil der Samen des Kaffeestrauchs, und kommt in vielen anderen Pflanzen, etwa dem Teestrauch, dem Matebaum oder der Kolanuss vor.

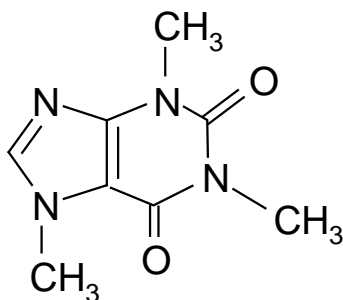


Abb. 3: Struktur des Alkaloids Koffein, ein pflanzliches Purinderivat (1,3,7-Trimethylxanthin).

Die pharmakologische Wirkung von Koffein auf den menschlichen Organismus besteht beispielsweise in der Anregung des Zentralnervensystems, der Erhöhung des Blutdrucks (Julien, 1997), einer Bronchodilatation, der Anregung der Darmperistaltik oder Verringerung der Blutfließgeschwindigkeit im Gehirn (Lunt *et al.*, 2004). Neben vielen anderen Wirkungen scheint Koffein auch bei der tumorinhibierenden Wirkung von schwarzem und grünem Tee bedeutsam zu sein (Huang *et al.*, 1997). Es ist aber auch bekannt, dass Koffein die zytotoxischen Effekte DNA-schädigender Agenzien, wie beispielsweise alkylirender Agenzien oder Strahlung,

erhöhen kann (Musk und Steel, 1990). Es verhindert nach Bestrahlung den strahleninduzierten G2/M-Arrest und bewirkt in verschiedenen Tumor-Zelllinien eine Radiosensitivierung (Crompton *et al.*, 1993). Koffein wird in der Zellzyklusforschung viel diskutiert und experimentell eingesetzt. Unter anderem wurde bislang festgestellt, dass es einen G1-Arrest verursacht, welcher wahrscheinlich unabhängig von ATM, p53 und p21 erfolgt (Hashimoto *et al.*, 2004). Des Weiteren kann Koffein die Aktivierung von ATM inhibieren und in hohen Konzentrationen Apoptose induzieren (Sarkaria *et al.*, 1999). Möglicherweise ist die Inhibition der Aktivität von ATM der Grund, dass Koffein den strahleninduzierten G2/M-Block verhindern kann (Musk und Steel, 1990).

2 Fragestellung

Das Comonomer dentaler Komposite Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) wirkt *in vitro* genotoxisch und zytotoxisch. Dabei liegt die Ursache der Zytotoxizität von TEGDMA wahrscheinlich in einer intrazellulären Verarmung an Glutathion, die mit einem Anstieg der Menge reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) korreliert. Oxidative DNA-Schäden in Gegenwart von TEGDMA wiederum sind wohl die Basis weiterer genotoxischer sowie mutagener Effekte des Monomers. Genotoxische Schäden führen sehr wahrscheinlich zu einem Arrest des Zellzyklus. In V79-Zellen wurde eine Verzögerung der G2-Phase festgestellt, in humanen Fibroblasten und primären humanen Pulpazellen war der Zellzyklus in Gegenwart von TEGDMA jedoch überwiegend in der G1-Phase verzögert. Außerdem war bekannt, dass TEGDMA in V79-Zellen große Deletionen von DNA-Sequenzen verursachte. Man durfte deshalb annehmen, TEGDMA könnte, ähnlich wie Mitomycin, wie ein *crosslinker* direkt mit nukleophilen Zentren von DNA-Basen im Sinne einer Michael-Addition reagieren und so einen G2-Arrest auslösen. Andererseits verwiesen die Produktion von ROS in TEGDMA-behandelten Zellkulturen und die Induktion oxidativer DNA-Schäden auf einen indirekten, durch ROS-vermittelten Mechanismus mit einer Verzögerung des Zellzyklus in G1.

In der vorliegenden Arbeit sollten weitere Hinweise auf den Mechanismus des Zellzyklusarrests durch dentale Monomere wie TEGDMA gefunden werden. Daher wurde die Wirkung des Monomers TEGDMA vergleichend mit den beiden Chemotherapeutika Mitomycin C, ein DNA *crosslinker*, und Adriamycin (Doxorubicin) analysiert. Während Mitomycin C den Zellzyklus eukaryontischer Zellen infolge von Doppelstrangbrüchen überwiegend in der G2-Phase arretiert, verzögert Adriamycin auch die G1-Phase. Weil die Proteinkinase ATM durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert wird und den Fortgang des Zellzyklus aus der G2- in die M-Phase inhibiert, wurden die Experimente hier auch mit Koffein, einem ATM-Inhibitor durchgeführt. Außerdem wurde zur Abschätzung zellphysiologisch relevanter Konzentrationen der Prüfsubstanzen die Zahl überlebender Zellen in behandelten Zellkulturen bestimmt und deren Vitalität vermessen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Adriamycin (Doxorubicin), CAS 25316-40-9	Sigma, Taufkirchen
bovine serum albumin (BSA), A7906-50G	Sigma, Taufkirchen
calcium-magnesium free phosphate-buffered saline (CMF-PBS)	Gibco BRL, Eggenstein
EDTA (5mM, PBS-EDTA)	Gibco BRL, Eggenstein
foetal bovine serum (FBS), 10108-165	Gibco BRL, Eggenstein
Glutardialdehyd 25%	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid, 4933	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, 4873	Merck, Darmstadt
Kaliumdisulfit, 5056	Merck, Darmstadt
Kristallviolett (Cristal Violet), C0775	Sigma, Taufkirchen
Koffein, CAS 58-08-2	Sigma, Taufkirchen
Methanol, UN1230	Sigma, Taufkirchen
Mitomycin C (MMC), CAS 50-07-7	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid, 6404	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat, 6406	PAN Biotech, Aidenbach
Natriumhydrogenphosphat, 6586	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin, 15140-122	Gibco BRL, Eggenstein
Propidiumjodid (PI), P4170	Sigma, Taufkirchen
Ribonuklease (RNase), R-4875	Sigma, Taufkirchen
RPMI 1640 Medium	PAN Biotech, Aidenbach
Triethylenglycoldimethacrylat, CAS 109-16-0	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau (TB)	Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin 2,5%	Gibco (Invitrogen Inc.), Eggenstein

3.1.2. Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultivierung

Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden steril filtriert und vor Gebrauch im Wasserbad (37° C) vorgewärmt. Das Zellkulturmedium wurde mit einer Penicillin-Streptomycin–Stammlösung (100 U/ml Penicillin, 10µg/ml Streptomycin) ergänzt.

ZELLKULTURMEDIUM:

- 500 ml RPMI-1640 (Pulvermedium)
- 55 ml 10% FBS
- 5 ml Natriumpyruvatzusatz
- 5 ml Penicillin-Streptomycin-Stammlösung

10 x PBS-EDTA (PHOSPHATPUFFER MIT EDTA), pH 7,34 :

- 80 g Natriumchlorid
- 2 g Kaliumchlorid
- 9,1 g Natriumhydrogenphosphat
- 2 g Kaliumdihydrogenphosphat
- 2 g EDTA-Natrium-Salz, Titriplex III ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$) \cdot 2H₂O
- add 1000 ml Aqua demin. (18 MOhm)

1 x PBS-EDTA (PHOSPHATPUFFER MIT EDTA):

- 100 ml 10 x PBS-EDTA
- add 1000 ml Aqua demin. (18 MOhm)

3.1.3. Lösungen für die Vitalitätsbestimmungen und Zellzyklusmessungen

KOFFEIN-AUFBEWAHRUNGSLÖSUNG (100mM):

- 777 mg Koffein
- 40 ml PBS

KOFFEIN-STAMMLÖSUNG (10mM):

- 1500µl Koffein-Aufbewahrungslösung
- 13500µl Medium

MITOMYCIN C-STAMMLÖSUNG:

93,25 µg/ml in Aqua demin. (18 MOhm)

MITOMYCIN C-EXPOSITIONSLÖSUNG (0,5µg/ml):

48µl Mitomycin C-Stammlösung

8952µl Medium

ADRIAMYCIN-STAMMLÖSUNG (50µM):

17,4µl 8,6mM Aufbewahrungslösung

2983µl Medium

ADRIAMYCIN-EXPOSITIONSLÖSUNG (10µM):

1800µl Adriamycin-Stammlösung

7200µl Medium

TEGDMA-STAMMLÖSUNG (10mM):

24,8µl TEGDMA

8975µl Medium

Durch die Zugabe der jeweiligen Expositionslösungen zu einem Gesamtplattenvolumen (Zellkulturmedium) von je 20ml ergaben sich die folgenden angestrebten Versuchskonzentrationen: Mitomycin C mit 0,05µg/ml, Adriamycin mit 1µM, TEGDMA mit 1mM, sowie die Verdünnung der Koffeinstammlösung auf Endkonzentrationen von 100µM, 400µM und 1000µM.

70 % METHANOL:

70 ml Methanol

30 ml Aqua demin. (18 MOhm)

PROPIDIUMJODID (PI):

1 mg/ml PI in CMF- PBS

RIBONUKLEASE-LÖSUNG:

1 mg/ml RNAse in CMF-PBS

1x CMF-PBS, 2% BSA (Ca²⁺- und Mg²⁺-freier PHOSPHATPUFFER):

20 g BSA

100 ml 10xCMF-PBS

900 ml Aqua demin. (18 MOhm)

FACS-Puffer:

980 ml CMF-PBS

10 ml 10% Natriumazid

10 ml FBS

3.1.4 Lösungen für den Zytotoxizitätstest (Kristallvioletttest)70 % ETHANOL:

70 ml Ethanol

30 ml Aqua demin. (18 MOhm)

1 % GLUTARDIALDEHYDFIXIERLÖSUNG:

..4 ml Glutardialdehyd 25%

..96 ml Aqua demin. (18 MOhm)

0,2 % KRISTALLVIOLETT-STAMMLÖSUNG:

0,02 g Kristallviolett (Cristal Violet)

add 100 ml Aqua demin. (18 MOhm)

0,02 % KRISTALLVIOLETT-FÄRBE LÖSUNG:

10 ml 0,2%-ige Stammlösung

90 ml Aqua demin. (18 MOhm)

3.1.5 Verbrauchsmaterial

bio-one Cellstar Tubes [188271]	Greiner, Frickenhausen
Falcon Tubes (50ml) [2070]	Becton Dickinson, Heidelberg
Eppendorf-Cups	Eppendorf AG, Hamburg
FACS-Röhrchen (352052)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kulturflaschen T162 (162 cm ²) (3151)	Corning Incorp., Corning NY
Spritzenvasalzfilter Minisart 0,2 µm (16534)	Sartorius, Göttingen

3.1.6 Geräte

Begasungsbrutschrank BB 6220	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer FacsCanto	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikroskop Diavert Ser.Nr. 896460	Leitz, Wetzlar
Milli-QUF plus	Millipore, Schwalbach/Ts.
Multiwell Spektrumphotometer, Infinite 200	TECAN, Crailsheim
Pipettierhilfe accu jet	Brand, Wertheim
Präzisionswaage MC 210 P	Sartorius, Göttingen
Sartorius Waage 1404 MP 8; No.3310033	Sartorius, Göttingen
Sterile Werkbank Laminar Flow Gelaire BSB 4	Laboratories, Merckenheim
Zentrifuge Eppendorf 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotana 460 R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotixa/P Typ 4202; Nr.2181	Hettich, Tuttlingen

3.2. Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

Sämtliche Experimente wurden mit der Zelllinie RAW264.7 Mausemakrophagen durchgeführt. Die Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC TIB-71) erworben.

Die RAW 264.7 Mausemakrophagen wurden in 162cm² Zellkulturflaschen bei 37°C und 5%CO₂ im Brutschrank inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Sobald die Zellen konfluent wuchsen, wurden sie je nach Bedarf im Verhältnis 1:2 bis 1:10 gesplittet.

3.2.2 Versuchsvorbereitung

Vor der Zellernte wurde das Zellkulturmedium abgekippt, und die Zellen wurden mit 5ml kaltem 1xPBS - EDTA gewaschen. Danach wurden 5ml 5mM EDTA in PBS zugegeben und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch kräftiges Abklopfen wurden die Zellen gelöst. Zur Verdünnung des EDTAs wurden die Zellen mit 15ml Medium gemischt. Anschließend wurden die Zellen im gewünschten Verhältnis gesplittet oder für Versuche im Hämozytometer gezählt, nachdem die Zellsuspension in 50 ml Falconröhrchen überführt, zentrifugiert und erneut resuspendiert worden war.

3.2.3 Exposition der Zellkulturen

In der Versuchsreihe erfolgte die Aussaat von $0,6 \times 10^6$ Zellen in 20ml pro 15cm-Zellkulturplatte. Insgesamt wurden je Versuchsdurchlauf Zellen auf achtzehn Platten ausgesät, welche in fünf Gruppen aufgeteilt waren. Zwei Gruppen mit je drei Platten (eine Kontrollgruppe ohne Stimulans und Inhibitor; eine Gruppe mit Inhibitor, aber ohne Stimulans) und drei Gruppen mit je vier Platten (mit TEGDMA, Mitomycin C

oder Adriamycin als Stimulans sowie Koffein als Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen).

Die Zellkulturen wurden für 24h im Inkubator inkubiert. Danach wurde das Zellkulturmedium verworfen und die Zellen 1h mit frischem Medium (10ml für die Zellkulturplatten ohne Koffeinzusatz) oder mit Koffein im Medium (9ml/1ml für die Platten mit Koffeinzusatz) vorinkubiert. Anschließend erfolgte der Expositionsstart durch Zugabe von 8ml Medium und 2ml der entsprechenden Expositionslösung (Mitomycin, Adriamycin oder TEGDMA) zu den Zellkulturplatten ohne Koffeinzusatz; sowie 7ml RAW-Medium, 2ml der entsprechenden Expositionslösung und 1ml der entsprechenden Koffeinlösung (0-100-400-1000 μM) zu den Zellkulturplatten mit Koffeinzusatz. Die Zellkulturen wurden den Substanzen für 24h exponiert. Dann wurden die Zellkulturüberstände in je einem Falconröhrchen gesammelt, und der Zellrasen wurde mit 5ml PBS gewaschen, sowie für 10 min mit 3ml PBS-EDTA versetzt. Danach wurden 10ml der entsprechenden zuvor gesammelten Zellkulturüberstände wieder zugegeben und die zusätzlich durch Klopfen gelösten Zellen in die passenden Falconröhrchen überführt. Abschließend wurde jede Zellkulturschale mit je 5ml Medium gespült und in den mittlerweile auf Eis gestellten Röhrchen gesammelt.

3.2.4 Präparation der Zellen für FACS-Analysen

Die Röhrchen wurden nun für 5min bei 600xg zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 1ml 1xCMF-PBS-2%BSA resuspendiert, in Eppendorf-Cups überführt, nochmals zentrifugiert (5min, 4500 U/min, Eppendorftischzentrifuge) und wie oben resuspendiert. Danach wurde die Zellzahl mit einem Hämozytometer bestimmt. Nun wurden die für die FACS-Analyse benötigten Volumina der jeweiligen Zellsuspension in je ein neues Eppendorf-Cup überführt und mit 1xCMF-PBS-2%BSA auf 1ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Eppendorf-Cups wurden zentrifugiert (5min, 4500 U/min, Eppendorftischzentrifuge), der Überstand wurde verworfen und die Pellets in je 1ml kaltem 70% Methanol resuspendiert und für mindestens 1h bis maximal 12h im Kühlschrank gelagert. Dies dient der Fixierung der Zellen, sowie einer Permeabilisierung der Zellmembran für den Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid. Die

Eppendorf-Cups wurden zur Weiterbehandlung der Zellen gekühlt zentrifugiert (5min, 600xg) und der Methanolüberstand wurde verworfen. Die Pellets wurden in 1 ml kaltem 1xCMF-PBS-2%BSA resuspendiert und anschließend zweimal gewaschen. Danach wurde das Zellpellet jeder Probe in 425 µl 1xCMF-PBS-2%BSA aufgenommen, mit 50 µl RNase versetzt und im 37°C warmen Wasserbad für 30min inkubiert. Propidiumjodid interkaliert bevorzugt in doppelstrangigen Nukleinsäuren, und daher soll zelluläre RNA verdaut werden, um Störfaktoren vor der Messung zu beseitigen. Abschließend erfolgte die Färbung der Proben mit je 25µl Propidiumjodid aus einer Stammlösung der Konzentration 1 mg/ml (Endkonzentration 50 µg/ml, Endprobenvolumen 0,5 ml), deren erneute Inkubation für wenige Minuten und ihre sofortige Vermessung im Durchflusszytometer zur Bestimmung des DNA-Gehaltes.

3.2.5 Bestimmung der Zytotoxizität

Die Zytotoxizität wurde mit einem Kristallvioletttest ermittelt. Dazu wurde die Zahl überlebender Zellen in behandelten und unbehandelten Kulturen bestimmt (Gilles *et al.*, 1986). Die RAW 264.7 Mausmakrophagen wurden bei 37°C für 24h verteilt auf 96 Wells ($7,5 \times 10^3$ Zellen/Well) kultiviert. Anschließend wurden die Zellkulturen entweder mit Koffein (0, 100, 400 oder 1000 µM) 1h vorinkubiert oder direkt mit 200 µl Zellkulturmedium, welches 1 mM TEGDMA, 1 µM Adriamycin oder 0,5 µg/ml Mitomycin C beinhaltete, behandelt. Nach 24h wurde das Expositionsmedium abgekippt, die Zellen mit 100 µl/Well mit 1% Glutardialdehydlösung für 30 min bei Raumtemperatur fixiert, mit 200 µl Phosphatpuffer (PBS) zweimal gewaschen und für 15 min mit 150 µl Kristallviolettfärbelösung versetzt. Danach wurden die Wells mit Leitungswasser gewaschen. Das von den Zellen gebundene Kristallviolett wurde mit 180 µl 70% Ethanol/Well wieder gelöst und die optische Dichte der Lösungen wurde bei 600 nm im Spektralphotometer (Tecan) ermittelt.

3.2.6 Bestimmung der Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellvitalität in unbehandelten und behandelten Kulturen mit einer Trypanblaufärbung wurde ein $0,25 \times 10^6$ Zellen entsprechendes Volumen aus den geernteten Zellpellets entnommen und mit FACS-Puffer auf 1ml aufgefüllt. Nach zweimaligem Waschen durch Zentrifugieren (5min, 600xg, gekühlt) und Resuspendieren mit FACS-Puffer, bei dem die Proben fortlaufend auf Eis bearbeitet wurden, erfolgte die Färbung. Hierzu wurden die Zellpellets mit 100µl FACS-Puffer und 50µl Trypanblau (Verdünnung 1:10) versetzt und 5min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Danach wurde jeweils 1ml FACS-Puffer zu den Proben pipettiert und, wie oben beschrieben, erneut gewaschen. Für die FACS-Analyse wurden die Zellpellets in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt.

3.2.7 Durchflusszytometrie

3.2.7.1 Prinzip der durchflusszytometrischen Messtechnik

Die Durchflusszytometrie (FACS = *fluorescence activated cell sorting*) ist eine laboratorische Methode für die schnelle multiparametrische Analyse einzelner Zellen. Damit ist es möglich, gemischte Zellpopulationen nach ihrem Immunphenotyp oder funktionellen Zustand zu unterscheiden oder voneinander zu trennen. Durchflusszytometer, die bei Routineuntersuchungen angewendet werden, sind außer zur Detektierung der Zellgröße und Granularität gleichzeitig auch für die Messung mehrerer Fluoreszenzfarben geeignet. Grundvoraussetzung ist, dass die Zellen in einer Einzelzellpopulation vorliegen (Ormed, 1994; Diamond, 2000; Hawley und Hawley, 2004).

Die physikalischen Eigenschaften (Größe und Granularität) von Zellen sowie die Expression spezifischer Metabolite und von Proteinen oder die Menge zellulärer DNA können untersucht werden, indem die Zellen nacheinander einzeln durch eine dünne Messkammer (hydrodynamische Fokussierungszone) fließen. Dort werden sie von der Seite von einem Laserlicht bestrahlt. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten FACS-Canto-Durchflusszytometer handelt es sich um einen monochromatischen

Argonlaser mit einer Emissionswellenlänge von 488nm. Das daraus resultierende Streulicht und die Fluoreszenzemission (bei vorheriger Anfärbung der Zellen) lassen nun Rückschlüsse auf die Eigenschaften der untersuchten Zellen zu.

Quert eine Zelle den Strahl, wird das Licht in verschiedene Richtungen gestreut. Gemessen wird das Streulicht vornehmlich in Richtung des ursprünglichen Strahls (Vorwärtsstreulicht, FSC = forward scatter) und etwa im 90° Winkel zum ursprünglichen Strahl (Seitwärtsstreulicht, SSC = side scatter). Das Vorwärtsstreulicht gibt Auskunft über die Größe der Zelle und das Seitwärtsstreulicht über die Granularität. Es können mehr als eintausend Zellen pro Sekunde analysiert werden. Die Fluoreszenzemission wird wie das Seitenstreulicht im 90° Winkel zur Strahlenrichtung des Lasers gesammelt und nach Abtrennung mit Hilfe von dichroitischen Spiegeln und Interferenzfiltern in drei Spektralbereiche bestimmter Wellenlänge aufgetrennt.

Viele Wellenlängen können bei vorangegangener Färbung mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen durch verschiedene Emissionsdetektoren von einander getrennt und gleichzeitig erfasst werden. Dies ermöglicht die Auswertung mehrerer Parameter innerhalb eines Messdurchlaufs. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen passend zur Anregungswellenlänge des Lasers mit Propidiumjodid angefärbt und mit der Fluoreszenz FL3 (Fluoreszenz 3 ab 650nm) analysiert.

3.2.7.2 Interpretation der Lichtsignale

Photomultiplier empfangen die ausgestrahlten Lichtsignale und modulieren und verstärken sie in elektrische Signale. Die Spannungspulse aus der Fluoreszenzemission einer Messung ergeben wiederum Signale, die charakteristisch in ihrer Höhe (H), Fläche (A) und Weite (W) sind.

Signal-Höhe (FL3-H)

Durchtritt ein Partikel den scharf fokussierten Laserstrahl, nimmt die Peak-Höhe des zugehörigen Signals zu und erreicht ein Maximum, wenn sich das gesamte Teilchen im Laserstrahl befindet. Bei dessen Austritt fällt das Signal auf das ursprüngliche Grundniveau zurück, vorausgesetzt, der Durchmesser des Partikels ist nicht größer

als der des Laserstrahls. Also repräsentiert die Höhe des Signals die Lichtintensität, welche nach Anregung wieder freigesetzt wird.

Signal-Fläche (FL3-A)

Die Fläche des jeweiligen Signals ergibt sich aus der Integration des Signals über die Zeit, wobei die Amplitude des Integralpulses proportional zur Fläche unter dem zugehörigen Signal ist. Die Gesamtmenge an emittiertem Licht eines angeregten Teilchens hat im Unterschied zur Signal-Höhe erst nach dem Durchtritt des Partikels durch den Laserstrahl sein Maximum erreicht.

Signal-Weite (FL3-W)

Zellen, die quantitativ eine gleiche Farbstoffmarkierung besitzen, sich aber im Durchmesser unterscheiden, liefern Signale, die bezüglich der Fläche zwar gleich sind, sich hinsichtlich der Weite jedoch unterscheiden. Mit Hilfe der Signal-Weite ist eine Unterscheidung von Zelldubletten, die trotz enzymatischer und mechanischer Vereinzelung immer wieder auftreten, und tetraploiden Zellen, die sich in der G2-Phase des Zellzyklus befinden, möglich. Die Signal-Weite eines Zelldubletts ist nicht doppelt so groß wie die Signal-Weite einer einzelnen Zelle, da die Weite proportional zur Durchflussachse ist. Ist der Laserstrahl im Durchschnitt so groß wie eine Zelle, erzeugt ein Zelldublett ein Signal das gerade 50% weiter ist als das einer einzelnen Zelle.

3.2.8 Darstellung der Messdaten

Durch einen mit dem Durchflusszytometer verbundenen Analog-Digitalwandler werden die errechneten Signale in digitale Werte konvertiert und auf dem zugehörigen Rechner in Form von list-mode Daten abgelegt. Zellpopulationen einer Messung können deshalb unabhängig voneinander betrachtet und analysiert werden. Alle Versuche wurden mit dem Durchflusszytometer FACSCanto™ gemessen und mit der zugehörigen Software dargestellt. Das Durchflusszytometer verwendet für die Darstellung der gemessenen Daten die Software FACSDiva (Version 5.0.2).

Das Programm ermöglicht diverse Darstellungen und Interpretationen der gemessenen Ereignisse. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Schablone für die Vitalitätsmessung und eine weitere für die Messung der Verteilung des DNA-Gehaltes der Zellen erstellt.

Dot Plot

Mit Dot Plots können zwei unterschiedliche Parameter dargestellt werden. Dies ermöglicht - je nach Auswahl der gegenübergestellten Parameter - einen Überblick über die vermessenen Zellen, die Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen, sowie die Diskriminierung unerwünschter Partikel (beispielsweise Zelldebris). Die Auswahl der Eliminierung erfolgt dabei über ein so genanntes *gating*. Ein Feld innerhalb des Dot Plots wird markiert, welches Zelldoubletten und Zellbruchstücke (debris) aus-, und die gewünschten Zellen einschließt. Nun werden im DNA-Histogramm nur diejenigen Zellen berücksichtigt, die sich innerhalb des *gates* befinden. Die Intensität des Vorwärtsstreulichts (FSC) gibt Auskunft über die Größe der Zellen, während das Seitwärtsstreulicht (SSC) von der inneren Struktur der Zelle abhängt und deshalb ein Maß für die Granularität ist. Die Punkte in Abbildung 4 stellen die gemessenen Zellen dar, üblicherweise 20 000 innerhalb des *gates*, die unterschiedlichen Farben zeigen die zunehmende Zelldichte von außen nach innen (blau und rot).

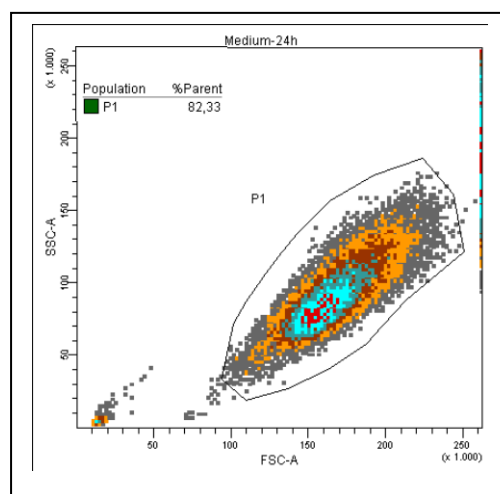


Abb. 4: Häufigkeitsdichteverteilungen (density plots) von RAW264.7 Mausemakrophagen. Das Diagramm zeigt Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) und Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) zur Beschreibung der Zellmorphologie unbehandelter Kulturen. Zusätzlich zur Darstellung morphologischer Parameter der Zellen wurde eine Region festgelegt (*gating*), innerhalb derer die Zahl der Zellen erfasst wurde.

Histogramm

Berücksichtigt man statt zwei nur einen Parameter, erhält man das DNA-Histogramm, also die Häufigkeitsverteilung aller vermessenen Zellen bezüglich eines Parameters (Abb. 5). Auf der in 1024 Kanäle unterteilten Abszisse wird die Intensität der Fluoreszenz und auf der Ordinate die Zellzahl (events) aufgetragen.

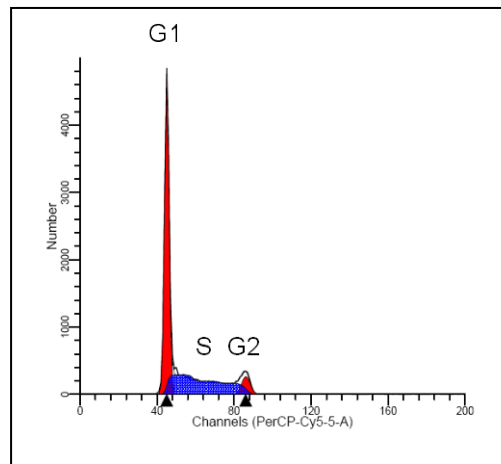


Abb. 5: Das Histogramm zeigt die Verteilung der RAW264.7 Makrophagen aus der Routinekultur auf die Phasen G1, S (blaue Farbe) und G2 des Zellzyklus. Dieses Histogramm wurde mit der ModFit LT™ Software errechnet.

Jeder dieser 1024 Kanäle entspricht einer Fluoreszenzintensität, die entweder in linearer oder logarithmischer Form aufgetragen wird. Aus diesen Angaben kann das Durchflusszytometer berechnen, welchen DNA-Gehalt die Zelle zum Zeitpunkt der Messung enthält, und damit in welcher Zellzyklusphase sie sich gerade befindet. Durch Setzen von Markern in den G1, S und G2-Bereichen des Histogramms, errechnet das Programm FACSDiva die zugehörigen Zahlenwerte und stellt sie in einer Statistik dar. Die im Ergebnisteil aufgezeigten Werte stammen allerdings nicht aus dieser Statistik, sondern aus den Berechnungen des DNA-Auswertungsprogrammes ModFit LT™

3.2.9 Messung der DNA-Verteilung

Wie schon bei der Beschreibung der Durchflusszytometrie erwähnt, wird bei der Erstellung des DNA-Histogramms nur ein Parameter berücksichtigt. Die Software errechnet die Verteilung der Fluoreszenzen aus den vitalen Zellen. Der DNA-Gehalt der Zellen ist abhängig von der Zellzyklusphase, in der sich die Zelle gerade befindet. Zellen der G0/G1-Phase sind diploid, in der S-Phase wird das Erbgut verdoppelt und in der G2-M Phase liegt vorübergehend ein tetradiploider Chromosomensatz vor. Aus der gemessenen Fluoreszenzstärke kann der Computer nun die Zellzyklusphase der Zellen berechnen und diese mittels des DNA-Histogramms darstellen. Die Spannung am FL3-H Detektor wurde hierbei stets so eingestellt, dass der G1-Peak aller Proben bei etwa 400 liegt, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Die exakte Bestimmung der relativen Zellzahlen in den einzelnen Zellzyklusphasen erfolgt über die Auswertung eines DNA-Histogramms mit Datenverarbeitungsprogrammen wie Multicycle oder ModFit. Diese Programme berechnen nach der Peak-Reflect-Methode zuerst die Anteile aller Zellen in G1 und G2 (Abb. 5). Die Schnittmengen mit den Fluoreszenzen der S-Phase werden als möglichst gering vorausgesetzt. Die restlichen Zellen werden der S-Phase zugerechnet.

Alle Daten des Durchflusszytometers werden mittels der Software FACSDiva™ (Version 5.0.2) erstellt und gespeichert. Hierbei werden die *gates* erneut gesetzt, da das Programm lediglich die Messdaten, jedoch nicht die individuell gesetzten *gates* der FACSDiva-Software erfassen kann. Die neu bearbeiteten Daten werden durch die Software als Histogrammdateien gespeichert und anschließend durch das Auswertungsprogramm ModFit LT™ weiter verarbeitet.

ModFit LT™

Die Zellzyklusanalyse sowie die Berechnung der Ploidie wurden mit der Software ModFit LT™ (Verity Software House Topsham, ME 04086-0247, USA) durchgeführt. Die S-Phase Fraktion wurde nach nullter Ordnung, d.h. nach der peak-reflect-Methode, bestimmt (Givau, 1992). Dieses Modell der Zellzyklusberechnung legt die Annahme zugrunde, dass die Peaks der Phasen G0/G1 und G2 symmetrisch und „Gauss-verteilt“ sind sowie, dass die Bereiche der Überlappung dieser Peaks mit

Fluoreszenzen, die der S-Phase zugeordnet werden, gering sind. Unter diesen Voraussetzungen wird der Anteil der Zellen, die sich in den Phasen G0/G1 und G2/M des Zellzyklus befinden errechnet und die Zellen mit dazwischen liegender Fluoreszenzintensität der S-Phase zugeordnet. Die Berechnung der Zellzyklusphasen fand jeweils mit der Grundeinstellung der Software statt, um vergleichbare Werte zu erhalten. Hat das Programm mehrere Zyklen errechnet, so wurde stets der erste errechnete Zyklus in die Bewertung aufgenommen.

3.2.10 Messung der Zellvitalität

Parallel zu Bestimmung der DNA-Verteilung wurde in einem Aliquot derselben Kultur die Zellvitalität ermittelt. Dazu wurde nach dem Färben der Zellen mit Trypanblau (vgl. Kapitel 3.2.6) mit dem FACSCantoTM Durchflusszytometer die Hauptfluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von 633nm angeregt und durch einen Detektor, bestückt mit einem 780/60nm Breitbandfilter, gemessen. Nekrotische Zellen konnten durch höhere Fluoreszenzintensitäten von der Population vitaler Zellen unterschieden werden, welches sich im Histogramm in zwei individuellen Peaks widerspiegelte. Für jede Probe wurden 20 000 Ereignisse gezählt und mit Hilfe der Software FACSDivaTM 5.0.2 analysiert.

3.2.11 Statistik

Jeder Test wurde mindestens viermal unabhängig voneinander durchgeführt. Je Versuchsreihe wurde für alle Tests dieselbe Generation einer Kultur verwandt. Die mit dem Zytotoxizitätstest ermittelten optischen Dichten der Zellen behandelte Kulturen wurden auf diejenigen unbehandelte Kontrollkulturen bezogen (=100%). Ebenso wurde das Verhältnis toter zu lebenden Zellen in behandelten Kulturen, ermittelt durch den Vitalitätstest mit Trypanblau, mit einer unbehandelten Kontrollkultur (=100%) verglichen. Die erhaltenen Werte (Überlebensraten, Vitalität, DNA-Verteilung) der unbehandelten und behandelten Zellkulturen wurden zu

Medianen (mit 25- und 75-Perzentilen) zusammengefasst. Unterschiede zwischen den Medianen der Kontrollkulturen und derjenigen behandelter Kulturen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests (SPSS 15.0) durch paarweisen Vergleich von Werten auf der 0,05 Signifikanzebene untersucht. Mediane sowie 25% und 75% Perzentilen wurden danach graphisch dargestellt (SigmaPlot Version 8.0; Rock Ware, Golden, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Wirkung von TEGDMA, Adriamycin und Mitomycin C auf die Zellproliferation

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des dentalen Monomers TEGDMA auf den Zellzyklus und damit die Proliferation von RAW264.7 Mausemakrophagen untersucht. Der Vergleich mit den beiden chemotherapeutisch verwendeten Substanzen Mitomycin C und Adriamycin, die unterschiedlich in den Zellzyklus eingreifen, sollte einen Hinweis auf den Mechanismus der Wirkung von TEGDMA geben. Dazu wurde in Vorversuchen eine für die jeweilige Substanz angemessene Konzentration ermittelt. Diese sollte einerseits in den RAW264.7 Mausemakrophagen nach 24h erkennbar wirksam sein, andererseits aber auch den Mechanismus der zellulären Komponenten der Regulation des Zellzyklus aufgrund zytotoxischer Effekte nicht hemmen. Schließlich wurden 1 mM TEGDMA, 0,5 µg/ml Mitomycin C und 1µM Adriamycin für Zellzyklusanalysen verwendet. Die Überlebensraten in den behandelten Kulturen sind unten dargestellt (vgl. 4.3.1.).

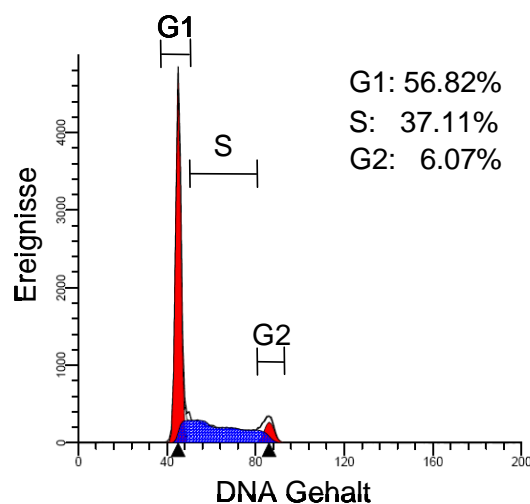


Abb. 6: Verteilung der RAW264.7 Makrophagen auf die Phasen des Zellzyklus. Dieses Histogramm der DNA-Verteilung ist repräsentativ für unbehandelte Zellkulturen und wurde mit der ModFit LT™ Software errechnet.

Noch bevor eine der Substanzen geprüft werden konnte, wurde die Verteilung der RAW264.7 Makrophagen einer unbehandelten Zellpopulation auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus analysiert. Anhand eines Histogramms der DNA-Verteilung in einem repräsentativen Experiment erkennt man, dass sich der überwiegende Teil von 56,82% der Zellen in der G1-Phase befand, während 37,11% in der S-Phase und 6,07% in der G2-Phase detektiert wurden (Abb. 6). Der relativ hohe Anteil der Zellen in der S-Phase verweist auf eine hohe Proliferationsrate dieser Zelllinie unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen.

Das Monomer TEGDMA veränderte diese normale Verteilung der Zellen auf die Phasen des Zellzyklus (Abb. 7). In einem repräsentativen Experiment stieg der Anteil der Zellen in Zellkulturen, die 1,0 mmol/L TEGDMA exponiert waren in der G1-Phase dramatisch auf 85,29%. Die Zahl der Zellen in der S-Phase sank entsprechend auf 12,76% und diejenigen in der G2-Phase auf 1,95%.

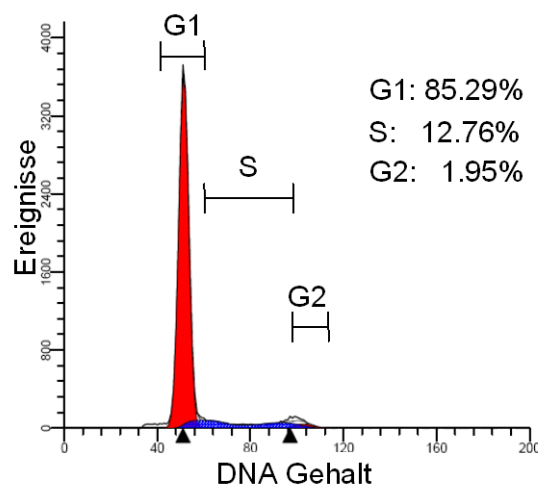


Abb. 7: Verteilung der RAW264.7 Makrophagen auf die Phasen des Zellzyklus nach Exposition gegen 1 mM TEGDMA. Das repräsentative Histogramm der DNA-Verteilung TEGDMA-behandelter Kulturen wurde mit der ModFit LT™ Software errechnet.

Anders als TEGDMA bewirkte Mitomycin C einen Arrest des Zellzyklus in der G2-Phase (Abb. 8). Die Zahl der Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus nahm von etwa 10% in unbehandelten Kulturen auf etwa 28% zu. Gleichzeitig sank die Zellzahl in der S-Phase deutlich auf 18,26% und in der G1-Phase auf 52,88% (Abb. 8). Im Unterschied zu Mitomycin C verursachte Adriamycin einen Arrest des Zellzyklus in

der G1-Phase (Abb. 9). Die Zellzahl in G1 in exponierten Kulturen stieg auf mehr als 70%. In der S-Phase wurden komplementär dazu etwa 19,39% der Zellen detektiert, während mit etwa 8% die Zahl der Zellen in G2 etwa so hoch war wie in unbehandelten Kulturen (Abb. 9).

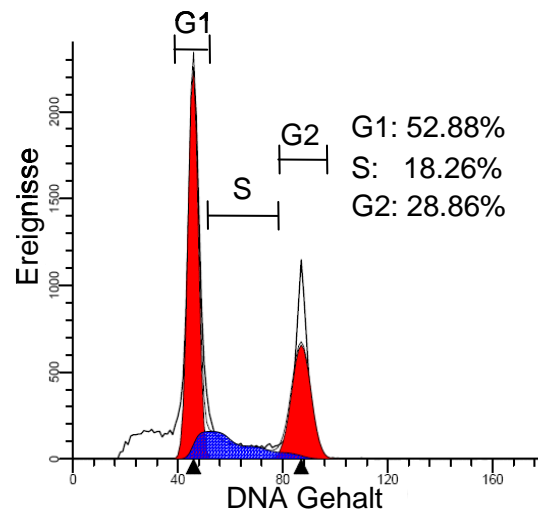


Abb. 8: Verteilung der RAW264.7 Makrophagen auf die Phasen des Zellzyklus nach Exposition gegen 0,5 µg/ml Mitomycin C. Das repräsentative Histogramm der DNA-Verteilung Mitomycin-behandelter Kulturen wurde mit der ModFit LT™ Software errechnet.

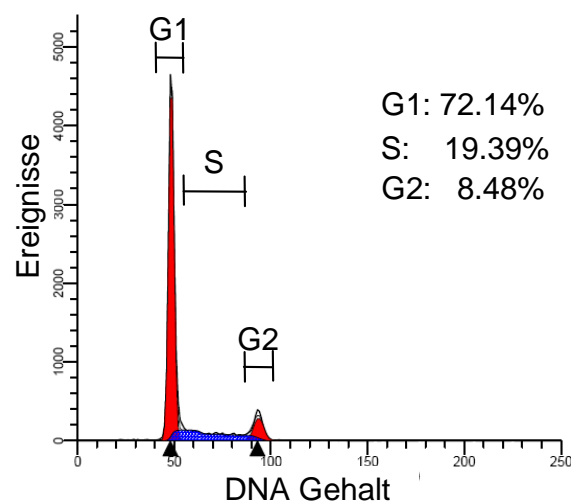


Abb. 9: Verteilung der RAW264.7 Makrophagen auf die Phasen des Zellzyklus nach Exposition gegen 1,0 µM Adriamycin. Das repräsentative Histogramm der DNA-Verteilung in Adriamycin-behandelten Kulturen wurde mit der ModFit LT™ Software errechnet.

Vergleicht man nun die Effekte von Mitomycin C und Adriamycin mit denjenigen von TEGDMA, so scheinen TEGDMA und Adriamycin ähnlich auf den Zellzyklus zu wirken. TEGDMA (von 56,82% auf 85,29%) und Adriamycin (von 56,82% auf 72,14%) erzeugten einen sehr ähnlichen Anstieg der Zahl der Zellen in der G1-Phase. Komplementär dazu sanken die Zellzahlen in der S-Phase und G2-Phase oder blieben nahezu konstant. Mitomycin C wiederum verursachte anders als TEGDMA einen deutlichen Anstieg der Zellzahl in der G2-Phase. Allen drei Substanzen gemeinsam ist, dass sie eine deutliche Abnahme der Zellzahl in der S-Phase bewirkten, denn in den mit TEGDMA behandelten Kulturen sank im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen die Zellzahl um 24,35%, mit Mitomycin C um 18,85% und mit Adriamycin um 17,72%.

4.2 Der Einfluss von Koffein auf den Zellzyklus in Kombination mit TEGDMA, Adriamycin und Mitomycin C

Eukaryontische Zellen reagieren auf die Induktion gentoxischer Schäden in Form von DNA–Strangbrüchen mit der Aktivierung von Kontrollpunkten (*checkpoints*) am Übergang der einzelnen Phasen des Zellzyklus. Damit wird verhindert, dass DNA-Schäden repliziert oder an die nächste Generation von Zellen weitergegeben werden. Die Proteinkinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated kinase*) und ATR (*ATM and Rad3-related*) vermitteln die zelluläre Reaktion auf DNA-Doppel- und Einzelstrangbrüche. Koffein ist ein Inhibitor von ATM und wurde hier verwendet, um einen Hinweis auf die Beteiligung von ATM an der Induktion des Zellzyklusarrests durch TEGDMA zu erhalten.

4.2.1 Veränderungen in der G1-Phase

Betrachtet man zunächst die Wirkung von Koffein allein auf die Zellpopulation, so lässt sich mit steigender Koffeinkonzentration (0µM - 1000µM) eine Zunahme der Zellzahl in der G1-Phase beobachten. Koffein verzögerte also den Zellzyklus in G1. Die Zahl der Zellen in G1 stieg im Median von etwa 47% in unbehandelten Kulturen auf etwa 64% in Kulturen, die 1000µM Koffein für 24h exponiert waren. Allerdings waren die Unterschiede der Mediane der Zellzahlen nicht signifikant (Abb. 10).

Die Zugabe von 1 mM TEGDMA führte zu einem signifikanten Anstieg der Zellzahl in G1 auf etwa 85% verglichen mit etwa 47% in unbehandelten Kontrollen (Abb. 10). Keine der hier verwendeten Koffeinkonzentrationen veränderte jedoch die Wirkung dieser TEGDMA-Konzentration auf den Zellzyklus der RAW264.7 Mausemakrophagen. Ähnliche wie TEGDMA wirkte die Exposition der Zellen gegen Adriamycin. In Gegenwart von Adriamycin stieg die Zahl der Zellen in G1 signifikant auf etwa 72% verglichen mit den 47% in unbehandelten Kulturen. Auch die Wirkung von Adriamycin wurde durch keine der verwendeten Koffeinkonzentrationen modifiziert (Abb. 10). Anders als TEGDMA und Adriamycin verursachte Mitomycin C (0,05µg/ml) keinen signifikanten Anstieg der Zahl der Zellen in G1. Allerdings bewirkte auch in den mit Mitomycin C behandelten Zellkulturen keine der Koffeinkonzentrationen eine signifikante Veränderung der Zellzahl in G1 (Abb. 10).

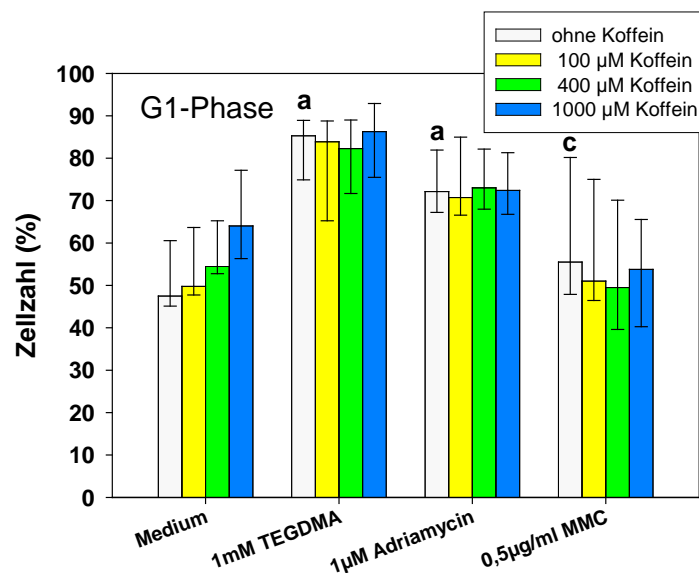


Abb. 10: Analyse der G1-Phase des Zellzyklus von RAW264.7 Makrophagen. Der Anteil der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus ist dargestellt als Reaktion von Kulturen, die TEGDMA, Adriamycin oder Mitomycin C in Anwesenheit von Koffein für 24 h exponiert wurden. Die Säulen repräsentieren Mediane (25% und 75% Perzentile), die aus Einzelwerten unabhängiger Experimente (N = 4-9) errechnet wurden; Medium = unbehandelte Kulturen. a = signifikante Unterschiede zwischen Medianen für unbehandelte Kontrollen (Medium) und exponierten Zellkulturen; c = signifikanter Unterschied zwischen Medianen für Kulturen, die mit TEGDMA oder Mitomycin C behandelt wurden.

4.2.2 Veränderungen in der S-Phase

Koffein reduzierte mit steigender Koffeinkonzentration (0µM - 1000µM) die Zahl der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus. Die Zahl der RAW264.7 Mausemakrophagen in

der S-Phase fiel von etwa 42% in unbehandelten Kulturen auf etwa 30% in den 1000 μ M Koffein exponierten Kulturen. Auch diese Unterschiede der Mediane der Zellzahlen waren jedoch nicht signifikant (Abb. 11).

TEGDMA (1 mM) alleine reduzierte, wahrscheinlich als Folge der Verzögerung der G1-Phase, die Zellzahl in der S-Phase signifikant von etwa 42% in unbehandelten Kontrollen auf etwa 13% in den exponierten Kulturen. Allerdings hatte Koffein auch hier keine signifikante Wirkung auf die durch TEGDMA verursachte Verzögerung des Zellzyklus (Abb. 11). Adriamycin wirkte auf die S-Phase so wie TEGDMA, denn es reduzierte die Zellzahl signifikant auf etwa 19%, aber die Anwesenheit von Koffein hatte keine Wirkung auf die Veränderungen des Zellzyklus durch Adriamycin (Abb. 11). Mitomycin C verursachte ebenfalls eine signifikante Reduktion Zahl der Zellen in der S-Phase verglichen mit der Verteilung der Zellen unbehandelter Kulturen. Allerdings bewirkte Koffein auch in den mit Mitomycin C behandelten Zellkulturen keine statistisch signifikante Veränderung der Zellzahl in der S-Phase (Abb. 11). Lediglich die höchste Koffeinkonzentration inhibierte die Wirkung von Mitomycin C, denn der Anteil der Zellen in der S-Phase stieg, wenngleich nicht signifikant, von etwa 18% in den nur mit Mitomycin C behandelten Kulturen auf etwa 29% in den mit Mitomycin C und 1 mM Koffein koinkubierten Ansätzen (Abb. 11).

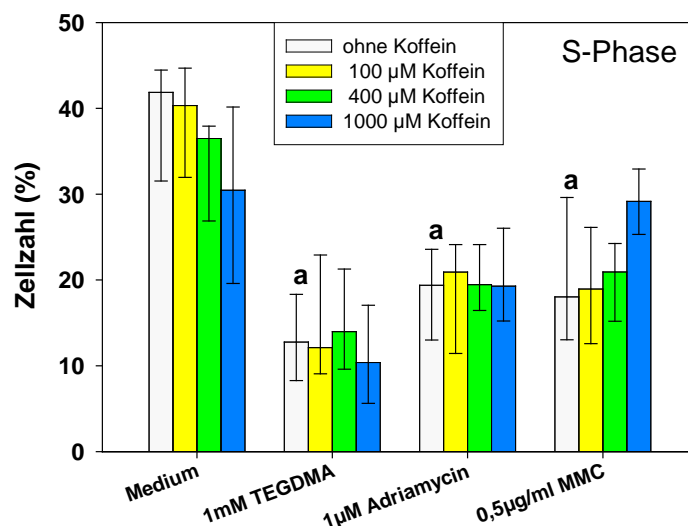


Abb. 11: Analyse der S-Phase des Zellzyklus von RAW264.7 Makrophagen. Der Anteil der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus ist dargestellt als Reaktion von Kulturen, die TEGDMA, Adriamycin oder Mitomycin C in Anwesenheit von Koffein für 24 h exponiert wurden. Die Säulen repräsentieren Mediane (25% und 75% Perzentile), die aus Einzelwerten voneinander unabhängiger Experimente (N = 4-9) errechnet wurden; Medium = unbehandelte Kulturen. a = signifikante Unterschiede zwischen Medianen für unbehandelte Kontrollen (Medium) und mit TEGDMA, Adriamycin oder Mitomycin C exponierten Zellkulturen.

4.2.3 Veränderungen in der G2-Phase

Die Anwesenheit von Koffein allein veränderte die Zahl der Zellen in der G2-Phase nur in der höchsten Konzentration, die hier getestet wurde. Verglichen mit etwa 10% der Zellen in den unbehandelten Kulturen fiel die Zellzahl in den Kulturen, die 1000µM Koffein exponiert waren auf etwa 4%. Die statistische Analyse erbrachte aber keinen signifikanten Unterschied für die Verteilung dieser Zellzahlen (Abb. 12). Mit 1 mM TEGDMA sank der Anteil der Zellen in G2 auf etwa 3% verglichen mit etwa 10% unbehandelter Kontrollen. Die hier verwendeten Koffeinkonzentrationen hatten jedoch keine erkennbare Wirkung auf die durch TEGDMA-induzierte Zahl der Zellen in der G2-Phase (Abb. 12). In Gegenwart von Adriamycin blieb der Anteil der Zellen in G2 (9%) fast genauso hoch wie in unbehandelten Kulturen, und auch keine der Koffeinkonzentrationen modifizierte diese Verteilung (Abb. 12). Wieder verschieden von TEGDMA und Adriamycin verursachte Mitomycin C einen signifikanten Anstieg der Zahl der Zellen in G2. Die Zellzahl stieg von 10% in unbehandelten Kulturen auf 22% in den Mitomycin C exponierten Zellkulturen. Interessanterweise schienen geringe Koffeinkonzentrationen diese Wirkung von Mitomycin zu verstärken, während die höchste Koffeinkonzentration dieser Tendenz entgegenwirkte (Abb. 12).

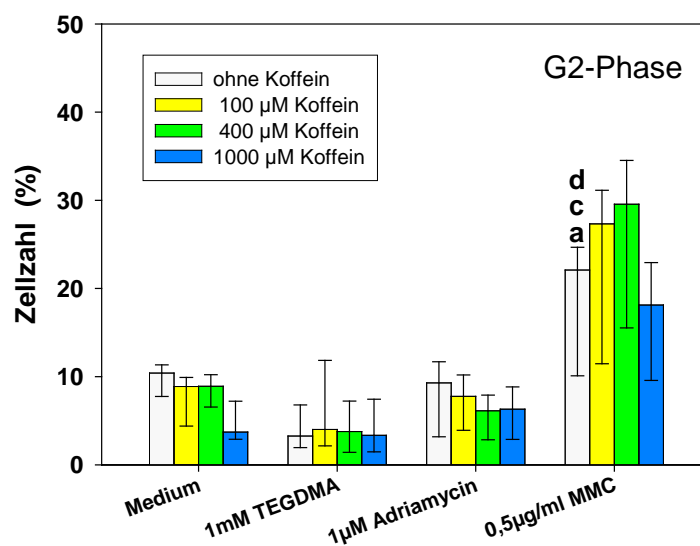


Abb. 12: Analyse der G2-Phase des Zellzyklus von RAW264.7 Makrophagen. Der Anteil der Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus ist dargestellt als Reaktion von Kulturen, die TEGDMA, Adriamycin oder Mitomycin C in Anwesenheit von Koffein für 24 h exponiert wurden. Die Säulen repräsentieren Mediane (25% und 75% Perzentile), die aus Einzelwerten voneinander unabhängiger Experimente (N = 4-9) errechnet wurden; Medium = unbehandelte Kulturen. a = signifikanter Unterschied zwischen Medianen für unbehandelte

Kontrollen (Medium) und Mitomycin C exponierten Zellkulturen; c = signifikanter Unterschied zwischen Medianen für TEGDMA und Mitomycin C exponierten Zellkulturen; d = signifikanter Unterschied zwischen Medianen für Adriamycin und Mitomycin C exponierten Zellkulturen.

4.3 Zytotoxizität von TEGDMA, Adriamycin und Mitomycin C

4.3.1 Zytotoxizität

Die Zytotoxizität der Substanzen, die den Zellzyklus der RAW264.7 Mausemakrophagen veränderten, wurde mit dem Kristallviolett-Test ermittelt. Mit diesem Verfahren wird die relative Zahl überlebender Zellen in behandelten Kulturen bezogen auf unbehandelte Kontrollen erfasst. Koffein induzierte eine konzentrationsabhängige Reduktion der Zahl überlebender Zellen. Die Zahl der Zellen sank in den Kulturen, die 400 μM und 1000 μM Koffein exponiert waren signifikant auf 94% und 78% (Abb. 13). TEGDMA alleine reduzierte die Zahl überlebender Zellen signifikant auf etwa 62% derjenigen unbehandelter Kontrollen. Die verschiedenen Koffeinkonzentrationen hatten keinen erkennbaren Einfluss auf die Zytotoxizität des TEGDMA, denn die Zellzahl wurde wiederum in etwa so reduziert, wie mit Koffein alleine (Abb. 13). Eine sehr ähnliche Wirkung hatten die Koffeinkonzentrationen in Kombination mit Adriamycin und Mitomycin C, die alleine die Zahl überlebender Zellen auf 87% und 70% reduzierten (Abb. 13).

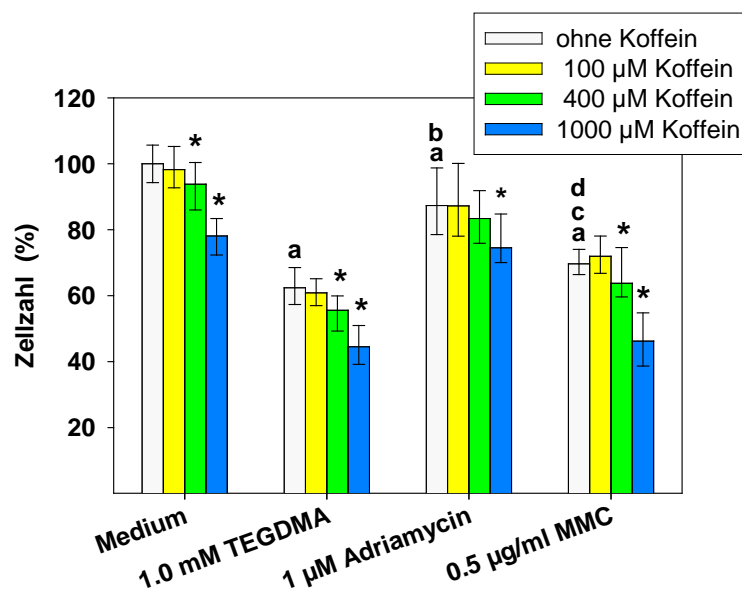


Abb. 13: Zytotoxizität von TEGDMA, Adriamycin und Mitomycin C in RAW264.7 Makrophagen. Die Zellen wurden 1 mM TEGDMA (N=96), 1 μ M Adriamycin (N=36) oder 0,5 μ g/ml Mitomycin C (MMC) (N=40) in Kombination mit Koffein (0, 100, 400 oder 1000 μ M) für 24 h exponiert. Die Zellzahlen wurden über die photometrische Bestimmung optischer Dichten errechnet und auf die Werte unbehandelter Kontrollen bezogen (Medium N=124-132) (=100%). Die Säulen repräsentieren Mediane mit 25% und 75% Perzentilen. * = signifikante Unterschiede zwischen Medianen für Kulturen, die nicht mit Koffein und solchen, die steigenden Koffeinkonzentrationen exponiert wurden; a = signifikante Unterschiede zwischen Medianen für unbehandelte Kontrollen (Medium) und einer Testsubstanz; b = signifikante Unterschiede zwischen Medianen für TEGDMA und Adriamycin exponierten Zellkulturen; c = signifikante Unterschiede zwischen Medianen für TEGDMA und Mitomycin C (MMC) exponierten Zellkulturen; d = signifikante Unterschiede zwischen Medianen für Adriamycin und Mitomycin C (MMC) exponierten Zellkulturen.

4.3.2 Zellvitalität in exponierten Zellkulturen

Die durch eine Trypanblaufärbung mit anschließender Analyse im Durchflusszytometer ermittelte Zahl vitaler Zellen in unbehandelten Kulturen betrug 79% (Abb. 14). Koffein bewirkte bis zu einer Konzentration von 1000 μ M keine signifikante Veränderung der Vitalität überlebender Zellen. Die Testsubstanzen TEGDMA, Adriamycin und Mitomycin setzten jedoch die Zellvitalität herab.

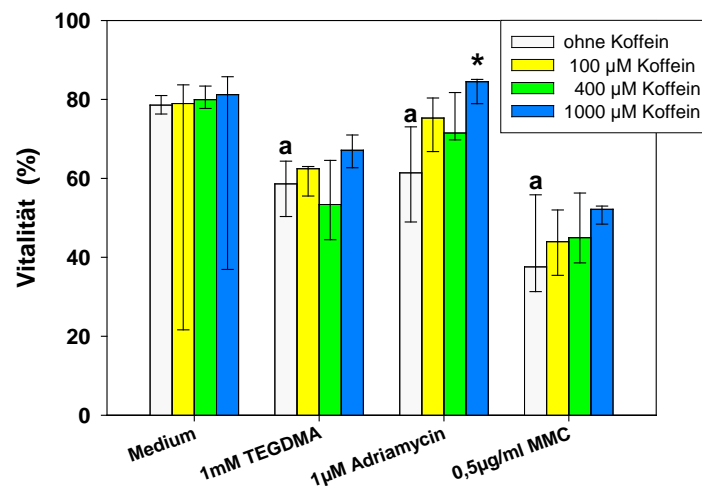


Abb. 14: Zellvitalität in RAW264.7 Makrophagen. Die Zellen wurden 1 mM TEGDMA, 1 μ M Adriamycin oder 0,5 μ g/ml Mitomycin C (MMC) in Kombination mit Koffein (0, 100, 400 oder 1000 μ M) für 24 h exponiert. Es sind Prozentwerte vitaler Zellen nach Färbung mit Trypanblau und anschließender FACS-Analyse dargestellt. Die Säulen repräsentieren Mediane mit 25% und 75% Perzentilen, die aus unabhängigen Messungen parallel zu den oben zusammengefassten Experimenten der Zellzyklusanalysen errechnet wurden (n=2-6). * = signifikante Unterschiede zwischen Medianen für Kulturen, die nicht mit Koffein und

solchen, die steigenden Koffeinkonzentrationen exponiert wurden; a = signifikante Unterschiede zwischen Medianen für unbehandelte Kontrollen (Medium) und einer Testsubstanz; es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Medianen für TEGDMA und Adriamycin, TEGDMA und Mitomycin C (MMC), sowie Adriamycin und Mitomycin C (MMC) gefunden.

TEGDMA reduzierte nicht nur, wie oben mit dem Kristallviolett-Test gezeigt, die Zellzahl, sondern auch die Vitalität dieser überlebenden Zellen auf etwa 60% (Abb. 14). Die Kombination von TEGDMA mit Koffein hatte erneut keinen signifikanten Einfluss, und die in den Ansätzen mit 1000 μ M Koffein leichte Steigerung der Zellvitalität auf 68% war nicht signifikant (Abb. 14). Adriamycin zeigte einen ähnlich toxischen Einfluss auf die Zellpopulation wie TEGDMA, denn die Vitalität der Zellen behandelter Kulturen lag bei 62%. Ähnlich wie in den mit TEGDMA behandelten Kulturen hatten geringe Koffeinkonzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Zellvitalität der Adriamycin exponierten Zellen, 1000 μ M Koffein allerdings führten zu einer auch statistisch signifikanten Steigerung auf 85%. Die hier gewählte Konzentration von Mitomycin C bewirkte die höchste Toxizität verglichen mit TEGDMA und Adriamycin. Die Zahl der vitalen Zellen betrug nur noch 38%, und auch hier erhöhte Koffein deutlich, wenn auch nicht signifikant, erst mit einer Konzentration von 1000 μ M eine Steigerung der Zellvitalität auf 51%.

5 Diskussion

5.1 Gentoxizität dentaler Monomere

5.1.1 Prüfung der Gentoxizität dentaler Monomere

Monomere dentaler Komposite können *in vitro* als Zielmolekül die genomische DNA eukaryontischer Zellen erreichen (Schweikl *et al.*, 2006). Für die Detektion möglicher Veränderungen an Bausteinen der DNA oder in ihrer Basensequenz wurden im Bereich der Pharmakologie und Toxikologie Testsysteme *in vitro* und *in vivo* zur Prüfung gentoxischer und mutagener Eigenschaften von Stoffen entwickelt. Zu Beginn solcher Prüfungen wird empfohlen, *in-vitro* Tests durchzuführen. Folgt man aktuellen nationalen und internationalen Normen (OECD 1993; ICH 1997; ISO 2003; DIN 2009), werden für die Detektion induzierter Genmutationen das bakterielle Testverfahren mit verschiedenen *Salmonella*-Stämmen (Ames-Test) verwendet und für *in-vitro* Tests mit eukaryontischen Zellkulturen werden der V79/HPRT-Test oder der L5178/TK-Test empfohlen. Dabei wird entweder die Häufigkeit der durch einen Stoff induzierten Reversion einer Mutation in einem Gen, dessen Genprodukt unter bestimmten Kulturbedingungen essentiell ist, bestimmt (Ames-Test) oder aber es wird die Inaktivierung eines Gens durch einen Stoff geprüft, dessen funktionales Produkt ansonsten zu letalen Schäden führt (V79/HPRT- und L5178Y/*tk*-Test). Diese Tests erfassen Genmutationen, jedoch nicht größere strukturelle Veränderungen oder Umstrukturierungen im Genom von Säugetierzellen wie etwa Chromosomenmutationen. Allerdings ist die Anwendung lichtmikroskopischer Methoden zeitintensiv und erfordert fachliche Expertise (Madle und Lang, 1993). Die Ermittlung von Chromosomenmutationen erfolgt meist über den klassischen zytogenetischen Chromosomenaberrationstest oder alternativ und mit weit weniger Aufwand verbunden über den Mikrokerntest. Diese Strategie und diese Methoden wurden für die Prüfung der Gentoxizität und Mutagenität dentaler Komposite verwendet.

5.1.2 Genotoxizität und Mutagenität dentaler Monomere

Die mutagene Wirkung häufig verwendeter Monomere dentaler Komposite wurde in verschiedenen Testsystemen *in vitro* geprüft. Die Basismonomere Bisphenol A-Diglycidylmethacrylat (Bis-GMA) und Urethandimethacrylat (UDMA) sowie Methylmethacrylat (MMA) induzierten keine *in vitro* erkennbaren Genmutationen (Ames-Test, HPRT-Test). Im Unterschied dazu erzeugten bifunktionelle Comonomere wie das Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA), aber auch das monofunktionelle 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) Genmutationen (HPRT- und L5178Y/*tk*-Test) und Mikrokerne (Schweikl *et al.*, 1998; Schweikl *et al.*, 2001; Schmitt *et al.*, 2002). Außerdem wurde berichtet, dass TEGDMA große Deletionen von Exonsequenzen des *hprt*-Gens (Selektionsmarker zur Isolierung von Mutanten) in V79-zellen induzierte (Schweikl und Schmalz, 1999).

Die Induktion genotoxischer Schäden durch dentale Monomere wurde mit dem Comet assay nachgewiesen. Der Comet assay oder single cell gel electrophoresis-test (SCGE-Test) ist eine schnelle, relativ einfache und sensitive Nachweismethode von DNA-Schäden in einzelnen Zellen (Östling und Johanson 1984; Singh *et al.*, 1988; Tice *et al.*, 2000). Über die Beurteilung mehrerer Zellen lässt sich ein Gesamtwert für die Schädigung einer Zellpopulation ermitteln (Tice *et al.*, 2000). Mit dieser Methode können DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche, aber auch alkalilabile Stellen in der DNA, DNA-DNA- und DNA-Protein-*crosslinking* und Einzelstrangbrüche im Zusammenhang mit unvollständiger „excision repair“ nachgewiesen werden (Tice *et al.*, 2000).

Für den Bereich dentaler Werkstoffe wurden in humanen Lymphozyten DNA-Einzelstrangbrüche nach Exposition gegen HEMA, TEGDMA, UDMA (Urethandimethacrylat) und Bis-GMA nachgewiesen. Dabei erhöhten HEMA, TEGDMA und UDMA das Maß der DNA-Migration in zellphysiologisch relevanten Konzentrationen etwa um den Faktor 3-4, mit Bis-GMA wurde sogar ein etwa 7-facher Anstieg quantifizierbarer DNA-Schäden berichtet (Kleinsasser *et al.*, 2004; Kleinsasser *et al.*, 2006).

5.1.3 Oxidative DNA-Schäden durch dentale Monomere

In Anwesenheit von TEGDMA und HEMA wurde beobachtet, dass die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Zellen verschiedenen Ursprungs schon nach einer kurzen Expositionsdauer um ein Mehrfaches stieg. Daher durfte man als Ursache für die beobachteten genotoxischen und mutagenen Effekte zumindest teilweise die Induktion oxidativer DNA-Schäden vermuten. Das 8-Hydroxydesoxyguanin (8-OxoG) ist das häufigste Produkt oxidativer DNA-Schäden (Fortini *et al.*, 2003). Die Erzeugung von 8-OxoG kann zu einer Punktmutation führen, weil nach Oxidation von Guanin eine Basenpaarung mit Adenin möglich ist und so während der DNA-Replikation eine G:C/A:T-Transversion erfolgt. Das 8-OxoG ist eine sehr häufige Basenmodifikation und dient als Biomarker für oxidativen Stress (Cooke *et al.*, 2003).

Experimentelle Analysen zeigten eine zeit- und konzentrationsabhängige Generierung von 8-OxoG nach Exposition gegen TEGDMA in humanen THP-1 Monozyten. Die Menge an oxy-DNA stieg nach 24h und 48h um den Faktor 2-3 in den mit 1-5 mM TEGDMA behandelten Zellkulturen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Eckhardt *et al.*, 2009). Bemerkenswert war auch, dass in Anwesenheit von 5mM N-Acetylcystein (NAC) die Bildung von 8-OxoG durch TEGDMA inhibiert wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden mit V79 Zellen erzielt, die für die Analyse Monomer-induzierter Mutationen verwendet werden (Schweikl, 2009).

5.1.4 Die Aktivierung von ATM und H2AX durch dentale Monomere

DNA-Schäden wie etwa die Bildung von 8-OxoG und in der Folge davon die Entstehung von DNA-Strangbrüchen aktivieren verschiedene Proteine der Kontrollpunkte im Zellzyklus. Die Kontrollpunkte sind ein Netzwerk regulatorischer Proteine, die prüfen, ob jede der Phasen eines Zellzyklus erfolgreich abgeschlossen wurde. Diese molekularen Regulatoren übersetzen ein Signal, das DNA-Schäden meldet (*sensor proteins*), in eine zelluläre Antwort. Eine Kette der Signalübertragung führt dann zu einer Verzögerung des Zellzyklus oder gar einem vollständigen Arrest, damit Schäden repariert werden können oder aber Apoptose induziert wird. Dabei aktivieren DNA-Doppelstrangbrüche eher das Tumorsuppressorprotein ATM,

Einzelstrangbrüche wohl bevorzugt die dem ATM verwandte Kinase ATR (Nyberg *et al.*, 2002; Kaina, 2003).

Für den Bereich der dentalen Monomere war bekannt, dass TEGDMA in V79-Zellen Mikrokerne induzierte, wahrscheinlich als Folge von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) (Schweikl *et al.*, 2001). Daher durfte man auch eine Aktivierung von ATM durch Phosphorylierung in Anwesenheit von Monomeren vermuten (Bakkenist und Kasten, 2003). Dieser Nachweis wurde in mit TEGDMA behandelten THP-1-Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper und Durchflusszytometrie geführt, und die Kinetik der Bildung von pATM in Anwesenheit von TEGDMA wurde bis zu 48h beobachtet. Dabei wurde nicht nach kurzen Expositionszeiten von bis zu 2h, sondern erst nach 24h ein Anstieg der Menge an pATM mit steigenden TEGDMA-Konzentrationen gemessen. Nach 48h lag die Steigerungen der Expression von pATM durch TEGDMA etwa um den Faktor 2 über denjenigen unbehandelter Kontrollen (Eckhardt *et al.*, 2009).

Nach aktuellen Modellen zur Funktion von ATM, aktiviert ATM an Kontrollpunkten des Zellzyklus die Aktivierung (Phosphorylierung) der Kinase Chk2 (*checkpoint kinase2*), während ATR wohl überwiegend auf Chk1 wirkt. *Crosstalk* zwischen diesen vier Kinaseaktivitäten erhöht jedoch die Flexibilität der zellulären Reaktionen auf induzierte DNA-Schäden (Nyberg *et al.*, 2002; Sancar *et al.*, 2004). Neben Chk2 wirkt ATM allerdings auch auf eine Reihe anderer Zielproteine, wie etwa auf BRCA1 oder H2AX.

Interessanterweise wird ATM nach der Aktivierung durch DNA-Doppelstrangbrüche in diskreten einzelnen Foci lokalisiert, während es im Falle anderer DNA-Schäden gleichmäßig im Kernplasma verteilt erscheint. Daher zeigt auch der histochemische Nachweis des Histons H2AX, eine Variante von H2A, welches wichtig ist für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität, dasselbe Muster. H2AX wird von ATM als Folge von DNA-Schäden phosphoryliert, so als γ H2AX bezeichnet und gilt als Marker von DNA-Schäden, die zu DNA-Doppelstrangbrüchen führen (Tanaka *et al.*, 2007). Allerdings kann H2AX nicht nur von ATM, sondern auch von ATR (*ATM and Rad3-related*) und von der DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) aktiviert werden. Wichtig ist, dass anscheinend mit γ H2AX auch DNA-Reparaturproteine wie Rad50, Rad51, BRCA1 oder 53BP1 (p53 binding protein 1) co-lokalisiert wurden.

Die Darstellung von γ -H2AX-Foci wurde auch genutzt, um die Effekte dentaler Monomere in humanen Gingivafibroblasten nachzuweisen (Urcan *et al.*, 2010). Die

Monomere BisGMA, TEGDMA, UDMA, und HEMA induzierten konzentrationsabhängig eine steigende Anzahl von γ -H2AX-Foci nach einer Expositionszeit von 6h. Dabei lag die Zahl der Foci in den mit TEGDMA behandelten Kulturen um den Faktor 2 über denjenigen unbehandelter Kontrollen (Urcan *et al.*, 2010).

5.2 Hypothesen zur Genotoxizität und Mutagenität dentaler Monomere

Wegen der bisher skizzierten genotoxischen und mutagenen Effekte dentaler Monomere wurden für die vorliegende Arbeit zwei konkurrierende Hypothesen zur Entstehung von DNA-Schäden durch TEGDMA formuliert. Einerseits sollten Monomere als elektrophile Substanzen direkt an nukleophile Zentren der DNA binden können. Wenn man Veränderungen funktioneller Gruppen der Substanz durch intrazelluläre Enzymaktivitäten der Zielzellen nicht berücksichtigt und man annimmt, dass TEGDMA auf direktem Weg wirksam wird, ist der folgende chemische Wirkungsmechanismus wahrscheinlich. TEGDMA könnte über den Mechanismus einer Michael-Addition, einer nukleophilen Addition von Carbanionen an α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen, an Purinbasen wie Adenin oder Guanin binden (Abb. 15). Die Reaktion könnte am N7 erfolgen, allerdings scheint die Bildung anderer DNA-Addukte ebenso möglich zu sein (Solomon, 1994).

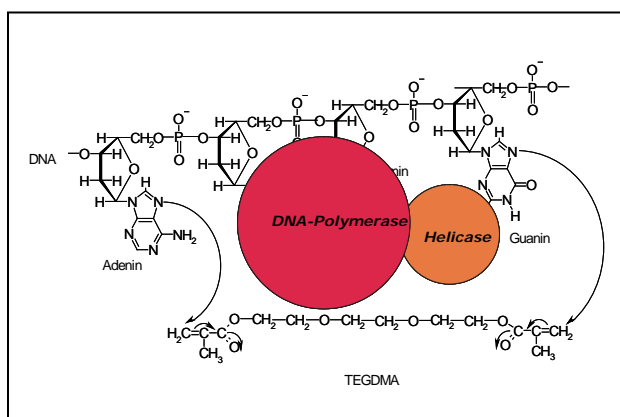


Abb. 15: Hypothese 1:
Die Bildung von DNA-TEGDMA-*crosslinks*. TEGDMA bindet kovalent an nukleophile Zentren der DNA und in der Folge replizieren Enzyme der DNA-Replikation, beispielsweise die Helicase und die DNA-Polymerase, diese Abschnitte fehlerhaft.

Weil das TEGDMA ein bifunktionales Molekül ist, könnte es sogar über beide funktionellen Methacrylatgruppen kovalente Bindungen zu DNA-Bausteinen ausbilden. Auf diese Weise wäre die über beide Acrylatgruppen und den

entsprechenden Purinbasen die Ausbildung eines *intrastrand crosslinks* möglich (Abb. 15). DNA-Strangbrüche, irreparable Deletionen großer genomischer DNA-Sequenzen oder auch Chromosomenaberrationen (Mikrokerne) wie für TEGDMA nachgewiesen könnten entstehen, wenn Enzyme der DNA-Replikation diese kovalenten *crosslinks* überspringen und so DNA-Sequenzen nicht repliziert werden. Auf diese Weise sollte letztlich ein G2-Arrest ausgelöst werden (Bridge *et al.*, 2005). Andererseits ist, wie oben skizziert, bekannt, dass Monomere oxidativen Stress erzeugen und oxidative DNA-Schäden verursachen. Die Verzögerung des Zellzyklus oder mutagene Effekte wie die Induktion von Mikrokernen wurden in Anwesenheit des Antioxidans N-Acetylcystein inhibiert (Schweikl *et al.*, 2006). Monomere könnten daher DNA-Läsionen indirekt über die Produktion von ROS und oxidativen DNA-Schäden verursachen. Die Erzeugung von 8-OxoG durch TEGDMA und andere Monomere könnte zu DNA-Strangbrüchen, der Aktivierung von Signalmolekülen wie ATM oder ATR und in der Folge von p53 führen (Abb. 16). Der durch ROS vermittelte Mechanismus der DNA-Schädigung sollte aber überwiegend eine Verzögerung des Zellzyklus in G1 bewirken (Diaz Vivancos *et al.*, 2010).

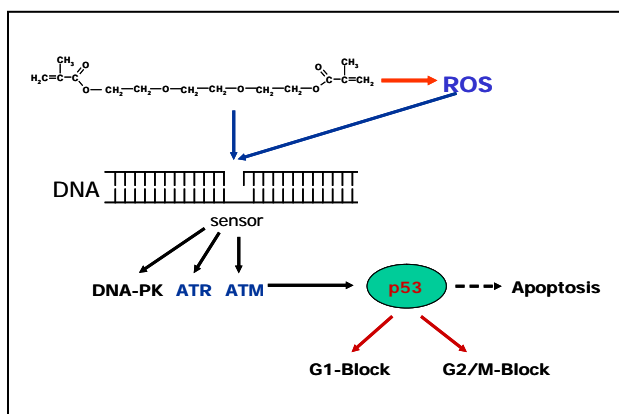


Abb. 16: Hypothese 2: Die Erzeugung von DNA-Läsionen indirekt durch Monomer-induzierte ROS und die Aktivierung von Sensoren der DNA-Schädigung.

Zur Charakterisierung des Mechanismus des Zellzyklusarrests durch Monomere wie TEGDMA wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung des Monomers vergleichend zu den beiden Chemotherapeutika Mitomycin C und Adriamycin (Doxorubicin) analysiert. Mitomycin C sollte den Zellzyklus eukaryontischer Zellen infolge von DNA-Doppelstrangbrüchen überwiegend in der G2-Phase verzögern, Adriamycin hingegen bevorzugt in der G1-Phase. Die Analysen wurden auch mit Koffein (vgl. Kapitel 5.4) durchgeführt, um damit möglicherweise einen Arrest des Zellzyklus in der G2-Phase zu inhibieren und die Beteiligung von ATM daran indirekt zu zeigen.

5.3 Die Wirkung von TEGDMA, Mitomycin C und Adriamycin in RAW264.7 Makrophagen

5.3.1 Zytotoxizität

Ein Vergleich des Mechanismus der Veränderung des Zellzyklus unterschiedlich wirkender genotoxischer Substanzen sollte in Zellen mit funktionalen Signaltransduktionswegen und hoher Vitalität analysiert werden. Zur Einschätzung der zellphysiologischen Bedingungen in den exponierten RAW264.7 Makrophagen wurde zunächst die Zytotoxizität von TEGDMA, Mitomycin C und Adriamycin untersucht. Dazu wurden verschiedene Parameter analysiert. Zum einen wurde die Zahl überlebender Zellen nach Färbung mit Kristallviolett bestimmt (Gilles *et al.*, 1986). Die auch hier beobachtete Zytotoxizität von Koffein entspricht publizierten Daten (He *et al.*, 2003). TEGDMA alleine reduzierte die Zahl überlebender RAW264.7 Makrophagen ähnlich wie für andere Zelllinien einschließlich der Zellen oraler Gewebe beschrieben (Schweikl *et al.*, 2007; Reichl *et al.*, 2008). In gleicher Weise entspricht die unter den hier gewählten Bedingungen bestimmte Zytotoxizität von Mitomycin C und Adriamycin den von anderen Autoren publizierten Ergebnissen (Goeptar *et al.*, 1995; Fimognari *et al.*, 2006). Zusätzlich zeigte die Färbung mit dem Vitalitätsfarbstoff Trypanblau und anschließender Durchflusszytometrie eine hohe Vitalität der Zellen unbehandelter Kontrollen. Allerdings sank die Vitalität TEGDMA-exponierter Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kulturen auf etwa 60%. Koffein hatte keinen Einfluss auf die Wirkung von TEGDMA. Die Wirkung der hier gewählten Konzentration von Mitomycin C war etwas stärker als diejenigen für TEGDMA und Adriamycin und stimmt wiederum mit den Beobachtungen anderer Autoren überein (Takahashi *et al.*, 1998).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die hier gewählten Konzentration von TEGDMA, Adriamycin und Mitomycin C in den Mausmakrophagen aktiv sind und die Vitalität der Zellen beeinflussen. Dennoch ist die Vitalität der Zellen behandelte Kulturen ausreichend hoch für die Analyse von Veränderungen des Zellzyklus durch unterschiedlich wirkende Substanzen. Die Zellen sollten physiologisch relevant reagieren und regulatorische Proteine aktivieren, die etwa einen DNA Schaden erkennen. Die auf diese Weise aktivierten Kontrollpunkte des Zellzyklus sollten

schließlich zu einer für jede der hier geprüften Substanzen charakteristischen Verzögerung des Zellzyklus führen können.

5.3.2 Die Wirkung von TEGDMA, Mitomycin C und Adriamycin auf den Zellzyklus

Physikalische und chemische Agenzien wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), UV- und γ -Strahlung, alkylierende und andere chemotherapeutisch wirksame Chemikalien erzeugen unterschiedliche DNA-Läsionen. Diese DNA-Schäden aktivieren ein komplexes regulatorisches Netzwerk an Kontrollpunkten des Zellzyklus in der G1-, S- und G2-Phase. Unter normalen physiologischen Bedingungen wird der Zellzyklus angehalten und eine Reparatur der geschädigten DNA versucht oder Zellen gehen in den programmierten Zelltod (Apoptose). Ein zentrales regulatorisches Protein dafür ist das p53, das auch als *guardian of the genome* bezeichnet wurde (Nyberg *et al.*, 2002; Attardi *et al.*, 2004). Umgekehrt verweist eine Veränderung in der normalen Verteilung von Zellen auf die G1-, S-, und G2-Phase auf die Aktivierung von Kontrollpunkten des Zellzyklus aufgrund der Wirkung genotoxischer Umweltfaktoren.

Für den Bereich der Zahnheilkunde ist aus *in vitro*-Analysen bekannt, dass dentale Adhäsivsysteme zellulären Stress verursachen, der den normalen Zellzyklus verändert (Mantellini *et al.*, 2003). Die Ursache dafür sind wahrscheinlich die von Monomeren verursachten DNA-Schäden (Schweikl *et al.*, 2001; Kleinsasser *et al.*, 2006). So verzögerte das *in vitro* genotoxische Monomer TEGDMA den Zellzyklus exponierter V79-Zellen (p53-defizient) in der G2-Phase. Im Unterschied dazu wirkte TEGDMA in normalen humanen Fibroblasten (p53-profizient) in zellphysiologisch relevanten Konzentrationen vor allem auf den Kontrollpunkt der G1-Phase. Dieser Effekt war jedoch reversibel (Schweikl *et al.*, 2005a). Der Anteil der Fibroblasten in der G2-Phase wurde nur durch stark zytotoxische TEGDMA-Konzentrationen erhöht. Der Zellzyklus primärer humaner Pulpazellen (p53-profizient), potenzielle Zielzellen der Substanz, war in der G1-Phase bei geringen TEGDMA-Konzentrationen leicht verzögert, jedoch stieg der Anteil der Pulpazellen in der G2-Phase in Anwesenheit hoher TEGDMA-Konzentrationen deutlich (Faktor 2) und irreversibel. Dieselbe Wirkung erzeugte TEGDMA in humanen Monozyten (Eckhardt *et al.*, 2009). Wegen

dieser Ergebnisse durfte man annehmen, TEGDMA würde sowohl über p53-abhängige als auch p53-unabhängige Wege die verschiedenen Phasen des Zellzyklus eukaryontischer Zellen beeinflussen können (Schweikl *et al.*, 2005a). Für HEMA wurden ähnliche Ergebnisse erzielt (Schweikl *et al.*, 2005b). Trotz der Hinweise auf die Beteiligung des p53 Tumorsuppressorproteins an der Verzögerung des Zellzyklus unter dem Einfluss von Monomeren bleiben die Komponenten der Signaltransduktionskette weiterhin unbekannt, über die TEGDMA auf den Zellzyklus wirken könnte. Hypothesen zur direkten Wirkung über die Ausbildung kovalenter Bindungen an nukleophile Zentren der DNA und zur indirekten Wirkung über die Generierung von ROS wurden oben diskutiert (vgl. Kapitel 5.2).

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Wirkung des Monomers TEGDMA vergleichend mit Mitomycin C und Adriamycin (Doxorubicin) analysiert. Diese chemotherapeutischen Agenzien dienen als Werkzeuge, die auf ganz verschiedene Weise eine Verzögerung des Zellzyklus in der G1- (Adriamycin) und G2-Phase (Mitomycin) erzeugen sollten. Adriamycin induziert DNA-Schäden, indem es in Basen der DNA interkaliert oder aber über die Generierung freier Radikale (Fornari *et al.*, 1994). Es wurde auch vermutet, dass die durch Adriamycin verursachte Apoptose an die Produktion von ROS geknüpft ist (Wang *et al.*, 2004). Die DNA-Strangbrüche sind jedoch das Ergebnis der indirekten Wirkung von Adriamycin als Inhibitor der Topoisomerase II. Ein Adriamycin-induzierter DNA-Schaden aktiviert wahrscheinlich ATM oder ATR, und über die daran geknüpfte Phosphorylierung von Chk2 (*checkpoint kinase 2*) wird *downstream* der Zellzyklus inhibiert (Ho *et al.*, 2005). Die Substanz induziert offensichtlich einen p53-abhängigen G1-Arrest und eine p53-unabhängige Verzögerung der G2-Phase des Zellzyklus embryonaler Mausfibroblasten (Attardi *et al.*, 2004). Mitomycin C hingegen ist eine direkt wirkende alkylierende Substanz, die DNA quervernetzt. Die daraus resultierenden DNA-Doppelstrangbrüche führen zu einem Arrest des Zellzyklus in der G2-Phase über die Aktivierung von ATM und ATR (Franchittof *et al.*, 1998; Bae *et al.*, 2008). Anscheinend aktiviert der durch mutagene Substanzen wie Mitomycin C erzeugte DNA-Schaden dauerhaft einen p53-abhängigen Signalweg und damit einen andauernden Arrest des Zellzyklus in G2 (Islaih *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit war der Zellzyklus der RAW264.7 Makrophagen in verschiedenen Phasen nach der Behandlung von Kulturen mit TEGDMA, Adriamycin oder Mitomycin C verzögert. Während TEGDMA und Adriamycin den Zellzyklus

überwiegend in G1 inhibierten, verursachte Mitomycin C vor allem einen Anstieg der Zellzahl in G2. Man darf daher annehmen, dass die Mausmakrophagen funktionierende Kontrollpunkte für die Phasen des Zellzyklus exprimieren, sehr wahrscheinlich solche, an denen auch p53 beteiligt ist (Hassan *et al.*, 2005).

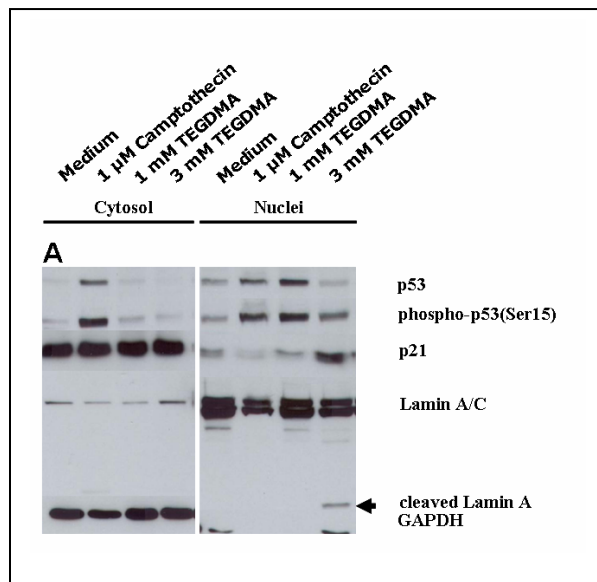


Abb. 17: Expression von p53 in RAW264.7 Makrophagen. P53, p53(Ser15) und p21 wurden in Kernen und im Zytosol von Zellen nachgewiesen, die TEGDMA und Camptothecin (Kontrolle) 24h exponiert waren. Die Abbildung ist modifiziert nach Krifka *et al.*, 2011.

Analysen in unserer Arbeitsgruppe mit Western blotting zeigten eine erhöhte Expression von p53 nach Exposition gegen TEGDMA für 24h. Außerdem wurde p53(Ser15) exprimiert, das wohl über eine Aktivierung der Expression von p21 den Zellzyklus verzögert (Abb. 17) (Krifka *et al.*, 2011).

Auffallend ist eine Ähnlichkeit der Zellreaktion auf die Anwesenheit von TEGDMA und Adriamycin. TEGDMA und Adriamycin verzögerten mit den hier verwendeten schwach zytotoxischen Konzentrationen den Zellzyklus in G1 und beide Substanzen erzeugen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Wold *et al.*, 2005; Samuelsen *et al.*, 2007). Auch in eigenen, bisher unveröffentlichten Experimenten wurde die Produktion von ROS in RAW Makrophagen nach Exposition gegen TEGDMA für 1 h gezeigt (Abb. 18).

Allerdings wurde auch vermutet, Adriamycinradikale könnten direkt oxidative DNA-Schäden erzeugen, und die Bildung von 8-OxoG und ROS wäre dazu nicht unbedingt notwendig (Oliveira-Brett *et al.*, 2006). Außerdem wurde vorgeschlagen, daß Topoisomerase II-Inhibitoren wie Adriamycin mit dem Enzym interagieren und stabile Topoisomerase-DNA-Komplexe entstehen, aus denen Einzel- und Doppelstrangbrüche resultieren. Dennoch darf man auf dem momentanen Stand des

Wissens weiterhin davon ausgehen, dass trotz bestimmter Gemeinsamkeiten in den erzeugten Phänomenen die Mechanismen hinsichtlich ihrer genotoxischen Wirkung verschieden sind. Die Einzelheiten der molekularen Mechanismen, auf denen die Verzögerung in der G1-Phase des Zellzyklus durch TEGDMA basiert, sind noch zu klären, auch wenn in Ansätzen etwa die Beteiligung von p53, wie oben diskutiert, vermutet werden darf. In der vorliegenden Arbeit wurden auch klare Unterschiede zwischen der Wirkung von TEGDMA und Mitomycin C auf den Zellzyklus der RAW264.7 Makrophagen festgestellt. Im Unterschied zum dentalen Monomer verursachte das quervernetzende Mitomycin C einen G2-Arrest, und dieses Ergebnis stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Effekten überein (Franchitto *et al.*, 1998).

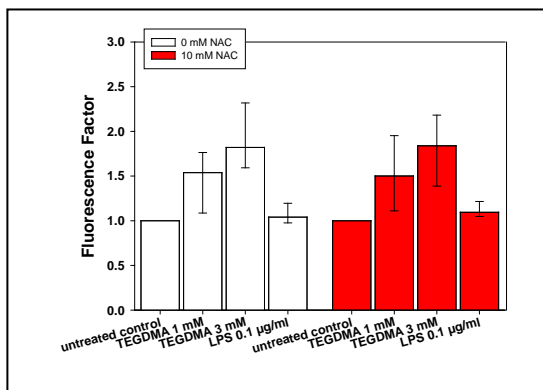


Abb. 18: Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in RAW264.7 Makrophagen. Die Zellen wurden mit TEGDMA und LPS versetzt und je mit (rot) und ohne (weiß) N-Acetylcystein für 1 h exponiert (Quelle: Prof. Schweikl, nicht veröffentlichte Beobachtung).

5.4 Der Einfluss von Koffein auf den Zellzyklus

Die RAW264.7 Mausmakrophagen wurden in der vorliegenden Arbeit auch Koffein exponiert, um eine Beteiligung der regulatorischen Proteine ATM/ATR an einer von TEGDMA erzeugten Verzögerung des Zellzyklus zumindest indirekt nachzuweisen. Bekanntermaßen inhibiert Koffein die Aktivität von ATM und ATR, möglicherweise auch diejenige der DNA-PK, die wichtig sind für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch „Nicht-Homologenes End-Joining“ (He *et al.*, 2003; Schweikl *et al.*, 2006; Friesen *et al.*, 2008). Die Hemmung von ATM und ATR durch Koffein stört Kontrollpunkte des Zellzyklus, die nach DNA-Schäden aktiviert werden und erhöht die Sensitivität der Zellen gegenüber genotoxischen Agenzien (Sabisz und Skladanowski, 2008). Koffein alleine verursachte hier eine konzentrationsabhängige

Verzögerung des Zellzyklus der RAW264.7 Makrophagen in G1. Dieser Effekt wurde auch von anderen Autoren berichtet (Ito *et al.*, 2003; Kaufmann *et al.*, 2003). Eine Verzögerung von G1 durch Adriamycin wiederum ist wohl mit einer Inhibition des Cyclin D1-cdk4-Komplexes verknüpft (Hashimoto *et al.*, 2004). Es wurde aber auch vorgeschlagen, Koffein könnte die DNA-Synthese unabhängig von ATM und p53 inhibieren (Kaufmann *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings im Unterschied zur Wirkung von Koffein alleine beobachtet, dass die Zugabe von Koffeinkonzentrationen bis zu 1.0 mM die Wirkung von TEGDMA oder Adriamycin auf den Zellzyklus nicht weiter veränderte. Anscheinend wurden also die von TEGDMA und Adriamycin am Kontrollpunkt von G1 aktivierten regulatorischen Proteine durch Koffein unter den vorliegenden Bedingungen nicht inhibiert. Es wurde jedoch immer wieder diskutiert, dass die wirksamen Koffeinkonzentrationen auch von der Zelllinie abhängen könnten und deshalb die Schwelle der Wirkung von Koffein offensichtlich ganz beträchtlich variiert (He *et al.*, 2003; Alvira *et al.*, 2007). So inhibierten beispielsweise in A549-Zellen bereits 300µM Koffein einen Arrest in G2, während erst mit 4mM eine Wirkung auf G1 in Myelomzellen nach Bestrahlung erkennbar war (Kastan *et al.*, 1991; Sarkaria *et al.*, 1999). Entsprechend war hier die Analyse der Wirkung von Koffein auf den Zellzyklus in G1 in Anwesenheit von TEGDMA und Adriamycin dadurch beeinträchtigt, dass Koffeinkonzentrationen über 1.0 mM in den RAW264.7 Mausmakrophagen zytotoxisch wirkten. Andererseits war die Wirkung von Koffein auf den Arrest der RAW264.7 Makrophagen durch Mitomycin C in G2 erkennbar. Man könnte fast annehmen, Koffein initiierte, abhängig von seiner Konzentration, zwei verschiedene Mechanismen in den mit Mitomycin behandelten Zellen. Erstens verstärken möglicherweise geringe Koffeinkonzentrationen (100 µM und 400µM) die Wirkung von Mitomycin C auf den G2-Arrest. Koffein würde so die Sensitivität der Makrophagen gegen Mitomycin erhöhen, vielleicht aufgrund eines koffeinsensitiven Reparatursystems Mitomycin-erzeugter DNA-Schäden (Ishii und Bender, 1978). Koffein könnte auf diese Weise eine erhöhte Rate einer fehlerhaften Reparatur der durch Mitomycin C bewirkten DNA-Schäden hervorrufen (Kawata *et al.*, 2005). Zweitens reduzierte jedoch ein Anstieg der Koffeinkonzentration auf 1 mM die Zahl der Zellen in G2 in den mit Mitomycin C behandelten Zellkulturen. Diese Wirkung basiert möglicherweise auf der Inhibition von ATM oder ATR durch Koffein mit einer anschließenden Inhibition der

Funktion von p53 und schließlich einem teilweisen Überschreiben des Zellzyklusarrests in G2 (Kaufmann *et al.*, 2003).

Bisher gibt es nur sehr wenige Hinweise auf die Beteiligung von ATM an zellulären Reaktionen in Anwesenheit dentaler Monomere. Eine geringe Aktivierung von ATM schien mit einer Verzögerung des Zellzyklus in G1 in TEGDMA exponierten humanen THP-1 Monozyten verknüpft zu sein (Eckhardt *et al.*, 2009). Des Weiteren wurde berichtet, dass 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) ebenfalls ATM in einer Zelllinie aus Speicheldrüsen aktivieren könnte (Samuelsen *et al.*, 2008). Dennoch ist momentan eine genau Beschreibung der Rolle von ATM in einer von TEGDMA oder HEMA induzierten Verzögerung des Zellzyklus nicht möglich.

5.5 Schlussfolgerung

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse lassen vermuten, dass der Mechanismus der durch TEGDMA induzierten Verzögerung des Zellzyklus anders ist als derjenige für die Wirkung einer quervernetzenden Substanz wie Mitomycin C. TEGDMA verzögerte den Zellzyklus der RAW264.7 Mausemakrophagen überwiegend in der G1-Phase, während eine in der zytotoxischen Wirkung fast gleichstarke Konzentration von Mitomycin C einen Arrest in G2 erzeugte. Es gibt fundierte experimentelle Hinweise darauf, dass TEGDMA reaktive Sauerstoffspezies erzeugt und wahrscheinlich oxidative DNA Schäden verursacht. Außerdem wird eine von TEGDMA verursachte Verzögerung des Zellzyklus durch das Antioxidans N-Acetylcystein verhindert. Schon aus diesen Gründen erscheint es wahrscheinlich, dass TEGDMA indirekt über die Produktion von oxidativem Stress in den Zellzyklus von Säugetierzellen eingreift. Es sei denn es gelingt in Zukunft auch der experimentelle Nachweis kovalenter TEGDMA-DNA-Addukte.

6 Zusammenfassung

Zahnmedizinisch eingesetzte Komposite können selbst nach der Polymerisation der Komponenten der organischen Matrix Restmonomere freisetzen, die nun in Zellen benachbarter Gewebe bioaktiv wirksam werden können. Zytotoxische und gentoxische Effekte *in vitro* wurden vielfach beschrieben. Die Darstellung molekularer biochemischer Wege der Zytotoxizität und der Gentoxizität dentaler Monomere hingegen erscheint schwierig, ist aber in Bezug auf die Entwicklung vernünftiger Strategien der Therapie notwendig. Für Comonomere wie TEGDMA und HEMA wurden in der Vergangenheit die Verzögerung des Zellzyklus wahrscheinlich infolge gentoxischer Effekte *in vitro* beschrieben. Allerdings wurde dieser Effekt abhängig von der jeweiligen Zelllinie sowohl in der G1-Phase als auch in der G2-Phase des Zellzyklus beobachtet. Die Mechanismen der Verzögerung des Zellzyklus in G1 oder G2 durch Monomere sind jedoch nicht genau bekannt. Zum einen ist denkbar, dass TEGDMA direkt und kovalent mit nukleophilen Zentren von DNA-Basen reagiert, so dass als Folge von DNA-TEGDMA-*crosslinks* letztlich DNA-Doppelstrangbrüche einen G2-Arrest auslösen. Andererseits ist es auch möglich, dass TEGDMA über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) oxidative DNA-Schäden verursacht und DNA-Einzelstrangbrüche eine Verzögerung des Zellzyklus in G1 bewirken. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von TEGDMA auf den Zellzyklus mit derjenigen von Adriamycin und Mitomycin C vergleichend analysiert. Während Adriamycin den Zellzyklus überwiegend in der G1-Phase verzögert, wirkt das DNA-quervernetzende Mitomycin C in der G2-Phase. Außerdem wurde in diesen Experimenten Koffein verwendet, das die Aktivität von ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), eine Proteinkinase, die DNA-Schäden erkennt, inhibiert und so einen Arrest des Zellzyklus in der G2-Phase überschreibt. Der Einfluss von TEGDMA, Adriamycin und Mitomycin C auf den Zellzyklus wurde anhand der DNA-Verteilung nach Färbung mit Propidiumjodid und anschließender FACS-Analyse bestimmt. Zusätzlich wurde die Zytotoxizität durch die Überlebensraten in behandelten Kulturen ermittelt, und ferner wurde die Vitalität dieser überlebenden Zellen nach der Färbung mit Trypanblau mit FACS charakterisiert. Sämtliche Experimente wurden mit RAW264.7 Mausemakrophagen durchgeführt, die als Modell zur Analyse der Reaktion des zellulären Immunsystems dienen.

Die Wirkung von TEGDMA (1mM) und Adriamycin (1 μ M) auf den Zellzyklus war ähnlich, aber sehr verschieden von der Wirkung von Mitomycin C (0,5 μ g/ml). TEGDMA und Adriamycin verursachten eine Verzögerung des Zellzyklus in der G1-Phase, eine ähnlich toxische Dosis Mitomycin C wirkte hingegen in der G2-Phase. Koffein (0-1000 μ M) alleine verzögerte den Zellzyklus überwiegend in der G1-Phase, veränderte jedoch den Effekt von TEGDMA und Adriamycin auf den Zellzyklus nicht. Geringe Konzentrationen von Koffein schienen die Wirkung von Mitomycin C auf G2 zu verstärken, während die höchste Koffeinkonzentration dieser Tendenz entgegenwirkte.

Die hier beobachteten Effekte wurden mit physiologisch wirksamen Konzentrationen der einzelnen Substanzen gemessen. So reduzierte 1 mM TEGDMA alleine die Zahl überlebender Zellen auf etwa 62% derjenigen unbehandelter Kontrollen, und mit Adriamycin und Mitomycin C sank die Zahl überlebender Zellen auf 87% und 70%. Die verschiedenen Koffeinkonzentrationen hatten keinen erkennbaren Einfluss auf die Zytotoxizität der Substanzen. TEGDMA reduzierte außerdem die Vitalität dieser überlebenden Zellen auf etwa 60%. Adriamycin wiederum war ähnlich zytotoxisch wie TEGDMA, allerdings führte 1mM Koffein hier zu einer auch statistisch signifikanten Steigerung der Zellvitalität. Die hier gewählte Konzentration von Mitomycin C (0,5 μ g/ml) bewirkte die höchste Toxizität verglichen mit TEGDMA und Adriamycin, aber 1 mM Koffein wirkte diesem Effekt entgegen.

Die hier erzielten Ergebnisse zusammengenommen mit den Hinweisen auf eine oxidative Schädigung der DNA durch TEGDMA sowie die durch das Antioxidans N-Acetylcystein inhibierte Verzögerung des Zellzyklus durch TEGDMA legen einen indirekten Einfluss von TEGDMA auf den Zellzyklus über oxidativen Stress nahe. Die Untersuchung molekularer Pfade über die Bestandteile dentaler Werkstoffe wie beispielsweise TEGDMA die Physiologie von Zellen und Gewebe beeinflussen, ist weiterhin wichtig, um zukünftig Materialunverträglichkeiten zu vermeiden und so alternative Strategien der Behandlung zu entwickeln.

6.1 Conclusion

Composites used in dentistry can release monomers even after polymerisation of the organic matrix. These possibly have bioactive effects in cells of neighbouring tissue. In vitro, genotoxic and cytotoxic effects have been described, but it seems difficult to outline the molecular and biochemical pathways of cytotoxicity and genotoxicity of dental monomers. Nevertheless, this outline is very important for the development of decent and intelligent therapies. In the past, it has been observed that in vitro comonomers as TEGDMA and HEMA induce a delay of the cell cycle probably as a result of genotoxic effects. These effects though have been depicted in G1-phase as in G2-phase dependent on the cell line. The mechanisms of the arrest of cell cycle in G1 or G2 by monomers are not exactly known. One theory is that TEGDMA could react directly and covalent with the nucleophilic centres of the DNA bases and that as a consequence of the DNA-TEGDMA-*crosslinks* the double helix ruptures and induces a G2 arrest. It is also possible that TEGDMA induces a G1 arrest by damaging DNA by reactive oxygen species and the result is a single strand break. Therefore, the effect of TEGDMA on cell cycle was analysed in comparison with the effects of Adriamycin and Mitomycin C. Adriamycin seems to arrest cell cycle in G1, while Mitomycin C arrests in G2 by cross-linking DNA.

Also, caffeine was applied in the experiences, as it is a substance that inhibits the protein kinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) which detects DNA damages. Thereby, the arrest in G2 phase is canceled. The effects of TEGDMA, Adriamycin and Mitomycin C on cell cycle were shown by observing DNA distribution after propidium iodide staining and a following FACS analysis.

Additionally, cytotoxicity was investigated by survival rate in the treated cell cultures. The vitality of these surviving cells was characterized by trypan blue staining with FACS. For the experiences, RAW264.7 mouse macrophages were used as a model to analyse the reaction of the cellular immune system.

The effects of TEGDMA (1mM) and Adriamycin (1µM) on cell cycle were similar, but very different to the effect of Mitomycin C (0,5 µg/ml).

TEGDMA and Adriamycin caused an arrest of cell cycle in G1 phase, whereas a similar toxic dose of Mitomycin C would react in G2 phase. Caffeine (0-1000 µM) would also retard the cycle predominantly in G1 phase, but wouldn't change the effects of TEGDMA and Adriamycin. Low concentrations of caffeine seem to intensify

the effect of Mitomycin C in G2 phase whereas highest concentrations would cause the opposite.

Physiologically effective concentrations were used to cause the observed effects. 1 mM TEGDMA reduces the number of surviving cells to 62%, Adriamycin and Mitomycin C to 87% respectively 70%. The caffeine concentrations didn't have any recognisable effect on the cytotoxicity of the substances. TEGDMA also reduces the vitality of the surviving cells to about 60%.

On the other hand, Adriamycin had a similar toxicity as TEGDMA, but 1 mM caffeine would significantly augment cell vitality. With its concentration of 0,5 µg/ml Mitomycin C effectuated the highest toxicity compared to TEGDMA and Adriamycin, but 1 mM caffeine counteracted the effect.

A couple of facts suggest an indirect influence of TEGDMA on cell cycle by oxidative stress: First of all the results of these experiences together with the indication of an oxidative damage of DNA by TEGDMA and also the inhibition of the retarding of cell cycle (caused by TEGDMA) by the antioxidant n-acetylcysteine.

The exploration of the molecular pathways of the components of dental materials as TEGDMA that affect the physiology of cells and tissue is still very important to avoid incompatibility of materials and to develop alternative strategies for therapy.

7 Literatur

Ainbinder E, Bergelson S, Pinkus R, Daniel V (1997) Regulatory mechanisms involved in activator-protein-1 (AP-1)-mediated activation of glutathione-S-transferase gene expression by chemical agents. *Eur J Biochem*, 243(1-2):49-57.

Alvira D, Yeste-Velasco M, Folch J, Casadesus G, Smith MA, Pallas M, Camins A (2007) Neuroprotective effects of caffeine against complex I inhibition-induced apoptosis are mediated by inhibition of the Atm/p53/E2F-1 path in cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res*, 85:3079-3088.

Ames RP (1983) Metabolic disturbances increasing the risk of coronary heart disease during diuretic-based antihypertensive therapy: lipid alterations und glucose intolerance. *Am Heart J*, 106:1207–1214.

Atsumi T, Ishihara M, Kadoma Y, Tonosaki K, Fujisawa S (2004) Comparative radical production and cytotoxicity induced by camphorquinone and 9-fluorenone against human pulp fibroblasts. *J Oral Rehabil*, 31:1155-1164.

Attardi LD, de Vries A, Jacks T (2004) Activation of the p53-dependent G1 checkpoint response in mouse embryo fibroblasts depends on the specific DNA damage inducer. *Oncogene*, 23:973-980.

Bachur NR, Gordon SL, Gee MV, Kon H (1979) NADPH cytochrome P-450 reductase activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:954-957.

Bae JB, Mukhopadhyay SS, Liu L, Zhang N, Tan J, Akhter S, Liu X, Shen X, Li L, Legerski RJ (2008) Snm1B//Apollo mediates replication fork collapse and S phase checkpoint activation in response to DNA interstrand cross-links. *Oncogene*, 27:5045-5056.

Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421:486-488.

Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y. (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, 281:1674–1677.

Behrend L, Henderson G, Zwacka RM (2003) Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans*, 31, 1441–1444.

Benhar M, Engelberg D, Levitzki A (2002) ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep*, 3:420-425.

Boonstra J, Post JA (2004) Molecular events associated with reactive oxygen species und cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*, 337:1–13.

Bridge WL, Vandenberg CJ, Franklin RJ, Hiom K (2005) The BRIP1 helicase functions independently of BRCA1 in the Fanconi anemia pathway for DNA crosslink repair. *Nat Genet*, 37:953-957.

Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD (1998) Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 281:1677–1679.

Cann KL, Hicks GG (2007) Regulation of the cellular DNA double-strand break response. *Biochem Cell Biol*, 85:663-674.

Cerutti PA (1985) Prooxidant states und tumor promotion. *Science*, 227:375–381.

Chang HH, Guo MK, Kasten FH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, Wang RS, Jeng JH (2005) Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomaterials*, 26:745–753.

- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*, 17:1195–1214.
- Crompton NE, Hain J, Jaussi R, Burkart W (1993) Staurosporin and radiation-induced G2-phase cell cycle blocks are equally released by caffeine. *Radiat Res*, 135: 372- 379.
- Dauvillier BS, Aarnts MP, Feilzer AJ (2000) Developments in shrinkage control of adhesive restoratives. *J Esthet Dent*, 12:291–299.
- Deffie AM, Batra JK, Goldenberg GJ (1989) Direct correlation between DNA topoisomerase II activity and cytotoxicity in adriamycin-sensitive and -resistant P388 leukemia cell lines. *Cancer Res*, 49:58-62.
- Diamond RA (2000) *In living color. Protocols in flow cytometry and cell sorting*. Berlin, Springer.
- Diaz Vivancos P, Wolff T, Markovic J, Pallardó FV, Foyer CH (2010) A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochem J*, 431:169-178.
- DIN Deutsches Institut für Normung (2009) DIN EN ISO 10993-3. Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 3: Prüfungen auf Gentoxizität, Karzinogenität und Reproduktionstoxizität. Deutsche Fassung EN ISO 10993-3:2009 Beuth Verlag, Berlin.
- Eckhardt A, Gerstmayr N, Hiller KA, Bolay C, Waha C, Spagnuolo G, Camargo C, Schmalz G, Schweikl H (2009) TEGDMA-induced oxidative DNA damage and activation of ATM and MAP kinases. *Biomaterials*, 30:2006-2014.
- Eick JD, Byerley TJ, Chappell RP, Chen GR, Bowles CQ, Chappelow CC (1993) Properties of expanding SOC/epoxy copolymers for dental use in dental composites. *Dent Mater*, 9:123-127.
- Eick JD, Kostoryz EL, Rozzi SM, Jacobs DW, Oxman JD, Chappelow CC, Glaros AG, Yourtee DM (2002) In vitro biocompatibility of oxirane/polyol dental composites with promising physical properties. *Dent Mater*, 18:413–421.
- Engelmann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W (2002) Effect of TEGDMA on the intracellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res*, 63:746–751.
- Fimognari C, Nüsse M, Lenzi M, Sciuscià D, Cantelli-Forti G, Patrizia Hrelia P (2006) Sulforaphane increases the efficacy of doxorubicin in mouse fibroblasts characterized by p53 mutations. *Mutat Res*, 601:92–101.
- Finer Y, Santerre JP (2004) Salivary esterase activity und its association with the biodegradation of dental composites. *J Dent Res*, 83:22–26.
- Fornari FA, Randolph JK, Yalowich JC, Ritke MK, Gewirtz DA (1994) Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol Pharmacol*, 45:649-656.
- Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, D'Errico M, Simonelli V, Dogliotti E (2003) 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways. *Mutat Res*, 531:127–139.
- Franchittof A, Pichierri P, Mosesso P, Palitti F (1998) Caffeine effect on the mitotic delay induced by G2 treatment with UVC or mitomycin C. *Mutagenesis*, 13:499-505.
- Freidig A, Hofhuis M, Van Holstijn I, Hermens J (2001) Glutathione depletion in rat hepatocytes: a mixture toxicity study with alpha, beta-unsaturated esters. *Xenobiotica*, 31:295-307.
- Friedl KH, Hiller KA, Schmalz G (1995) Placement and replacement of composite restorations in Germany. *Oper Dent*, 20:34-38.
- Friesen C, Uhl M, Pannicke U, Schwarz K, Miltner E, Debatin KM (2008) DNA-ligase IV and DNA-protein kinase play a critical role in deficient caspases activation in apoptosis-resistant cancer cells by using doxorubicin. *Mol Biol Cell*, 19:3283-3289.

- Geurtsen W, Lehmann F, Spahl W, Leyhausen G (1998) Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 und three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res*, 41:474–480.
- Geurtsen W (2000) Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med*, 11:333-355.
- Geurtsen W, Leyhausen G (2001) Chemical-Biological Interactions of the resin monomer triethyleneglycol-dimethacrylate (TEGDMA). *J Dent Res*, 80:2046–2050.
- Gilles RJ, Didier N, Denton M (1986) Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem*, 159:109-113.
- Givau A (1992) *Flow Cytometry First Principles*. Wiley-Liss, New York.
- Goeptar AR, te Koppele J, Glatt HR, Groot E, Seidel A, Barrenscheen M, Wölfel C, Doehmer J, Nice PE, Vermeulen NPE (1995) The cytotoxicity of mitomycin C and Adriamycin in genetically engineered V79 cell lines and freshly isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interac*, 97:149-168.
- Guggenberger R, Weinmann W (2000) Exploring beyond methacrylates. *Am J Dent*, 13:82D-84D.
- Hancock JT, Desikan R, Neill SJ (2001) Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans*, 29(Pt 2):345-350.
- Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG (1991) Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res*, 70:1450–1455.
- Hashimoto T, He Z, Ma WY, Schmid PC, Bode AM, Yang CS, Dong Z (2004) Caffeine inhibits cell proliferation by G0/G1 phase arrest in JB6 cells. *Cancer Res*, 64:3344-3349.
- Hassan F, Islam S, Mu MM, Ito H, Koide N, Mori I, Yoshida T, Yokochi T (2005) Lipopolysaccharide prevents doxorubicin-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophage cells by inhibiting p53 activation. *Mol Cancer Res* 2005, 3:373-379.
- Hawley TS, Hawley RG (eds) (2004) *Flow cytometry protocols*. Humana Press, Totowa NJ. 36.
- He Z, Ma WY, Hashimoto T, Bode AM, Yang CS, Dong Z (2003) Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways. *Cancer Res*, 63:4396-4401.
- Ho CC, Siu WY, Chow JPH, Lau A, Arooz T, Tong HY, Ng IO, Poon RY (2005) The relative contribution of CHK1 and CHK2 to adriamycin-induced checkpoint. *Exp Cell Res* 2005, 304:1-15.
- Hoffmann S, Spitkovsky D, Radicella JP, Epe B, Wiesner RJ (2002) Reactive oxygen species derived from the mitochondrial respiratory chain are not responsible for the basal levels of oxidative base modifications observed in nuclear DNA of Mammalian cells. *Free Radic Biol Med*, 36:765-773.
- Huang MT, Xie JG, Wang ZY, Ho CT, Lou YR, Wang CX, Hard GC, Conney AH (1997) Effects of tea, decaffeinated tea, and caffeine on UVB light-induced complete carcinogenesis in SKH-1 mice: demonstration of caffeine as a biologically important constituent of tea. *Cancer Res.*, 57:2623-2629.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline (S2B) (1997) Genotoxicity: a standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals. http://www.pmda.go.jp/ich/s/s2b_98_7_9e.pdf
- Ishii Y, Bender MA (1978) Caffeine inhibition of prereplication repair of mitomycin C-induced DNA damage in human peripheral lymphocytes. *Mutat Res*, 51:419-425.
- Islaih M, Halstead BW, Kadura IA, Li B, Reid-Hubbard JL, Flick L, Altizer JL, Thom Deahl J, Monteith DK, Newton RK, Watson DE (2005) Relationships between genomic, cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals. *Mutat Res*, 578:100-116.

ISO International Organization for Standardization (2003) ISO 10993-3: Biological evaluation of medical devices - Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity. Case Postale 56, CH-1211 Geneve 20.

Ito K, Nakazato T, Miyakawa Y, Yamato K, Ikeda Y, Kizaki M (2003) Caffeine induces G2/M arrest and apoptosis via a novel p53-dependent pathway in NB4 promyelocytic leukemia cells. *J Cell Physiol*, 196:276-283.

Julien RM (1997) *Drogen und Psychopharmaka*, Heidelberg; Berlin; Oxford; Spektrum, Akad. Verl., 173.

Kaina B (2003) DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochem Pharmacol*, 66:1547-1554.

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*, 51:6304-6311.

Kaufmann WK, Heffernan TP, Beaulieu LM, Doherty S, Frank AR, Zhou Y, Bryant MF, Zhou T, Luche DD, Nikolaishvili-Feinberg N, Simpson DA, Cordeiro-Stone M (2003) Caffeine and human DNA metabolism: the magic and the mystery. *Mutat Res* 2003, 532:85-102.

Kawata T, Ito H, Saito M, Uno T, Okayasu R, Liu C, Kan'o M, George K, Cucinotta FA (2005) Caffeine sensitizes nondividing human fibroblasts to x rays by inducing a high frequency of misrepair. *Radiat Res* 2005, 164:509-513.

Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA (2010) Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol*, 38:96-109.

Kleinsasser NH, Wallner BC, Harréus UA, Kleinjung T, Folwaczny M, Hickel R, Kehe K, Reichl FX (2004) Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *J Dent*, 32:229-234.

Kleinsasser NH, Schmid K, Sassen AW, Harréus UA, Staudenmaier R, Folwaczny M, Glas J, Reichl FX (2006) 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*, 27:1762-1770.

Kostoryz EL, Tong PY, Chappelow CC, Eick JD, Glaros AG, Yourtee DM (1999) In vitro cytotoxicity of solid epoxy-based dental resins and their components. *Dent Mater*, 15:363-373.

Kostoryz EL, Tong PY, Chappelow CC, Glaros AG, Eick JD, Yourtee DM (2000) In vitro toxicity of spiroorthocarbonate monomers designed for non-shrinking dental restoratives. *J Biomater Sci Polym Ed*, 11:187-196.

Krifka S, Petzel C, Bolay C, Hiller KA, Spagnuolo G, Schmalz G, Schweikl H (2011) Activation of stress-regulated transcription factors by triethylene glycol dimethacrylate monomer. *Biomaterials*, 32: 1787-1795.

Lavin MF, Gueven N (2006) The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ*, 13:941-950.

Lefeuvre M, Bourd K, Loriot MA, Goldberg M, Beaune P, Périanin A, Stanislawski L. (2004) TEGDMA modulates glutathione transferase P1 activity in gingival fibroblasts. *J Dent Res*, 83:914-919.

Leonard A, Brown T, Hunter WN (1992) Anthracycline binding to DNA: high resolution structure of d(TGTACA) complexes with 4'-epiadriamycin. *Eur J Biochem*, 204: 69-74.

Lin BA, Jaffer F, Duff MD, Tang YW, Santerre JP (2005) Identifying enzyme activities within human saliva which are relevant to dental resin composite biodegradation. *Biomaterials*, 26:4259-4264.

- Lonnroth EC, Dahl JE (2001) Cytotoxicity of dental glass ionomers evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odontol Scand*, 59:34-39.
- Lunt MJ, Ragab S, Birch AA, Schley D, Jenkinson DF (2004) Comparison of caffeine-induced changes in cerebral blood flow and middle cerebral artery blood velocity shows that caffeine reduces middle cerebral artery diameter. *Physiol Meas*, 25:467-474.
- Madle S, Lang R (1993) Assessment and evaluation of genotoxicity findings. *Mutat Res*, 291:87-91.
- Mandavilli BS, Santos JH, Van Houten B (2002) Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res*, 509:127-151.
- Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nor JE (2003) Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. *J Dent Res*, 82:592-596.
- Michelsen VB, Lygre H, Skålevik R, Tveit AB, Solheim E (2003) Identification of organic eluates from four polymer-based dental filling materials. *Eur J Oral Sci*, 111:263-271.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65:55-63.
- Murray AW (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, 116:221-234
- Musk SR, Steel GG (1990) Override of the radiation induced mitotic block in human tumour cells by methylxanthines and its relationship to the potentiation of cytotoxicity. *Int J Radiat Biol*, 57:1105-1112.
- Myers CE, McGuire WP, Liss RH, Ifrim I, Grotzinger K, Young RC (1977) Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science*, 197:165-167.
- Niida H, Nakanishi M (2006) DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis*, 21:3-9.
- Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA (2002) Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet*, 36:617-656.
- OECD (1993) OECD guidelines for the testing of chemicals. *Genetic Toxicology*, 471-485. Organization for Economic Co-operation and Development, Publications Service, 2 rue Andre-Pascal, 75775 Paris Cedex 16.
- Östling O, Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 123:291-298.
- Oliveira-Brett AM, Paquim AMC, Diculescu VC, Piedade JAP (2006) Electrochemistry of nanoscale DNA surface films on carbon. *Med Eng Phys* 2006, 28:963-970.
- Ormed MG (1994) Flow cytometry. A practical approach. Oxford, IRL Press.
- Pommier Y, Schwartz RE, Zwelling LA, Kohn KW (1985) Effects of DNA intercalating agents on topoisomerase II induced DNA strand cleavage in isolated mammalian cell nuclei. *Biochemistry*, 24:6406-6410.
- Pelka M, Distler W, Petschelt A (1999) Elution parameters und HPLC-detection of single components from resin composite. *Clin Oral Invest*, 3:194-200.
- Peutzfeldt A (1997) Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci*, 105:97-116.
- Pinkus R, Weiner LM, Daniel V (1996) Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF- κ B, and glutathione S-transferase gene expression. *J Biol Chem*, 271:13422-13429.
- Quinlan CA, Zisterer DM, Tipton KF, O'Sullivan MI (2002) In vitro cytotoxicity of a composite resin and compomer. *Int Endod J*, 35:47-55.

- Reichl FX, Seiss M, Marquardt W, Kleinsasser N, Schweikl H, Kehe K, Hickel R (2008) Toxicity potentiation by H₂O₂ with components of dental restorative materials on human oral cells. *Arch Toxicol*, 82:21-28.
- Riedl SJ, Shi Y (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5:897-907.
- Rueggeberg FA (2002) From vulcanite to vinyl, a history of resins in restorative dentistry. *J Prosthet Dent*, 87:364-379.
- Sabisz M, Skladanowski A (2008) Modulation of cellular response to anticancer treatment by caffeine: inhibition of cell cycle checkpoints, DNA repair and more. *Curr Pharm Biotechnol*, 9:325-36.
- Samuelsen JT, Dahl JE, Karlsson S, Morisbak E, Becher R (2007) 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*, 23:34-39.
- Samuelsen JT, Holme JA, Becher R, Karlsson S, Morisbak E, Dahl JE (2008) HEMA reduces cell proliferation and induces apoptosis in vitro. *Dent Mater* 2008, 24:134-140.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, 73:39-85.
- Santerre JP, Shajii L, Leung BW (2001) Relation of dental composite formulations to their degradation and the release of hydrolyzed polymeric-resin-derived products. *Crit Rev Oral Biol Med*, 12:136–151.
- Sarkaria JN, Busby EC, Tibbetts RS, Roos P, Taya Y, Karnitz LM, Abraham RT (1999) Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res*, 59:4375-4382.
- Satyanarayana A, Kaldis P (2009) Mammalian cell-cycle regulation_ several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*, 28:2925-2939.
- Schmalz G (1998) The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci*, 106 (2 Pt 2):696-706.
- Schmalz G, Arenholt-Bindslev D (2004) Biokompatibilität zahnärztlicher Werkstoffe. Elsevier -Urban & Fischer, München.
- Schmitt E, Schmalz G, Stopper H, Schweikl H (2002) Genotoxicity of acrylate-based comonomers in L5178Y mouse lymphoma cells. *J Dent Res*, 81:A-426 (3454).
- Schwartz D, Rotter V (1998) p53-dependent cell cycle control: response to genotoxic stress. *Semin Cancer Biol*, 8:325-336.
- Schweikl H, Schmalz G (1996) Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci*, 104:292-299.
- Schweikl H, Schmalz G, Rackebrandt K (1998) The mutagenic activity of unpolymerized resin monomers in *Salmonella typhimurium* und V79 cells. *Mutat Res*, 415:119–130.
- Schweikl H, Schmalz G (1999) Triethylene glycol dimethacrylate induces large deletions in the hprt gene of V79 cells. *Mutat Res*, 438:71-78.
- Schweikl H, Schmalz G, Spruss T (2001) The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res*, 80:1615–1620.
- Schweikl H, Schmalz G, Pfeifer S (2002a) Acrylates induce structure-related cytotoxic and mutagenic effects at various endpoints in vitro. *J Dent Res*, 81 (Spec Iss B), B-265 (279).
- Schweikl H, Schmalz G, Weinmann W (2002b) Mutagenic activity of structurally related oxiranes und siloranes in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res*, 521:19–27.

- Schweikl H, Schmalz G, Weinmann W (2004) The induction of gene mutations and micronuclei by oxiranes and siloranes in mammalian cells in vitro. *J Dent Res*, 83:17-21.
- Schweikl H, Altmannsberger I, Hanser N, Hiller KA, Bolay C, Brockhoff G, Spagnuolo G, Galler K, Schmalz G (2005a) Triethylene glycol dimethacrylate induces cell cycle delay in mammalian cells. *Biomaterials*, 26:4111-4118.
- Schweikl H, Altmannsberger I, Bolay C, Hiller KA, Spagnuolo G, Schmalz G (2005b) The effect of HEMA on the cell cycle of mammalian cells. *Arch Pharmacol*, 371 (Suppl 1), R117 (488)
- Schweikl H, Spagnuolo G, Schmalz G (2006) Genetic und cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res*, 85:870–877.
- Schweikl H, Hartmann A, Hiller KA, Spagnuolo G, Bolay C, Brockhoff G, Schmalz G (2007) Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dent Mater*, 23:688-695.
- Schweikl H (2009) Molekulare Toxikologie von Monomeren zahnärztlicher Komposite. Forschungsbericht. Universität Regensburg. <http://epub.uni-regensburg.de>
- Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 91:325–334.
- Sigal A, Rotter V (2000) Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res*, 60:6788-6793.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175:184-191.
- Slee Elizabeth A., Daniel J. O'Connor, Xin Lu (2004) To die or not to die: how does p53 decide?. *Oncogene* 2004, 23:2809-2818
- Soheili Majd E, Goldberg M, Stanislawski L (2003) In vitro effects of ascorbate und Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. *Biomaterials*, 24:3–9.
- Solomon JJ (1994) DNA adducts of lactones, sulfones, acylating agents and acrylic compounds. IACR Scientific Publications, 125:179-198.
- Spagnuolo G, Annunziata M, Rengo S (2004a) Cytotoxicity and oxidative stress caused by dental adhesive systems cured with halogen and LED lights. *Clin Oral Invest*, 8:81-85.
- Spagnuolo G, Mauro C, Leonardi A, Santillo M, Paternò R, Schweikl H, Avvedimento EV, Rengo S (2004b) NF-kappaB protection against apoptosis induced by HEMA. *J Dent Res*, 83:837-842.
- Stanislawski L, Soheili-Majd E, Perianin A, Goldberg M (2000) Dental restorative biomaterials induce glutathione depletion in cultured human gingival fibroblast: protective effect of N-acetyl cysteine. *J Biomed Mater Res*, 51:469–474.
- Stanislawski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Périanin A (2003) TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early und drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res A*, 66:476–482.
- Takahashi N, Murayama T, Oda M, Miyakoshi M (1998) Cell growth inhibition and DNA incorporation of mitomycin C in cell culture. *Ophthalmic Res*, 30:120-125.
- Tanaka T, Huang X, Halicka HD, Zhao H, Traganos F, Albino AP, Dai W, Darzynkiewicz Z (2007) Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytometry A*, 71:648-661.
- Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BC, Lin LF (1984) Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*, 226:466-468.

- Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H (2002) Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater*, 18:318-323.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, 35:206-221.
- Tomasz M, Lipman R, Chowdary D, Pawlak J, Verdine GL, Nakanishi K (1987) Isolation and Structure of a Covalent Cross-Link Adduct Between Mitomycin C and DNA. *Science*, 235:1204-1208.
- Torres M, Forman HJ (2003) Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors*, 17:287-296.
- Urcan E, Scherthan H, Styllou M, Haertel U, Hickel R, Reichl FX (2010) Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. *Biomaterials*, 31:2010-2014.
- Vaseva AV, Moll UM (2009) The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1787:414-420.
- Viohl J, Dermann K, Quast D, Venz S (1986) Die Chemie zahnärztlicher Füllungskunststoffe. Carl Hanser Verlag, München.
- Vousden KH, Ryan KM, Phillips AC (2001) Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol*, 13:332-337.
- Vousden KH, Lane DP (2007) p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8:275-283.
- Walther UI, Siagian II, Walther SC, Reichl FX, Hickel R (2004) Antioxidative vitamins decrease cytotoxicity of HEMA und TEGDMA in cultured cell lines. *Arch Oral Biol*, 49:125-131.
- Wang S, Konorev EA, Kotamraju S, Joseph J, Kalivendi S, Kalyanaraman B. (2004) Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms: intermediacy of H₂O₂- and p53-dependent pathways. *J Biol Chem*, 279:25535-25543.
- Wataha JC, Hanks CT, Strawn SE, Fat JC (1994) Cytotoxicity of components of resins und other dental restorative materials. *J Oral Rehabil*, 21:453-462.
- Watson WH, Chen Y, Jones DP (2003) Redox state of glutathione and thioredoxin in differentiation and apoptosis. *Biofactors*, 17:307-314.
- Weinmann W, Thalacker C, Guggenberger R (2005) Siloranes in dental composites. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 21:68-74.
- Wold LE, Aberle II NS, Ren J (2005) Doxorubicin induces cardiomyocyte dysfunction via a p38 MAP kinase-dependent oxidative stress mechanism. *Cancer Detect Prev*, 29:294-299.
- Yoshii E (1997) Cytotoxic effects of acrylates and metacrylates: relationship of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res*, 37:517-534.
- Young RC, Ozols RF, Myers CE (1981) The anthracycline antineoplastic drugs. *N Engl J Med*, 305:139-153.
- Yun J, Zhong Q, Kwak JY, Lee WH (2005) Hypersensitivity of Brca1-deficient MEF to the DNA interstrand crosslinking agent mitomycin C is associated with defect in homologous recombination repair and aberrant S-phase arrest. *Oncogene*, 24:4009-4016.
- Zhivotovsky B (2004) Apoptosis, necrosis and between. *Cell Cycle*, 3:64-66.
- Zunino F, Capranico G (1990) DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines. *Anticancer Drug Des*, 5:307-317

8 Danksagung

Mein Dank gilt meiner Familie und allen Mitarbeitern des Forschungsbereiches der Fakultät für Zahnerhaltung und Parodontologie der Universität Regensburg, insbesondere Prof. Dr. Helmut Schweikl und Dr. Alexander Eckhardt.

*"An der Schwelle jeder wissenschaftlichen Betrachtung der Welt steht die
Verwunderung." - Wilhelm Röpke*

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Philipp Müller
Geburtsdatum	12.04.1984
Geburtsort	Berlin

Hochschulausbildung

04/2004 – 06/2010	Studium der Zahnmedizin an der Universität Regensburg, Staatsexamen
-------------------	---

Promotion

03/2008 – 05/2011	„Der Einfluss von TEGDMA und Koffein auf den Zellzyklus Muriner Makrophagen“ Betreuer: Prof. Dr. Helmut Schweikl, Universitätsklinikum Regensburg
-------------------	---