

AUS DER POLIKLINIK FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. W. BUCHALLA  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DIE AKTIVIERUNG VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN DURCH EIN  
DENTALES MONOMER**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Kilian David Hansen  
aus Siegburg

2013



AUS DER POLIKLINIK FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. W. BUCHALLA  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DIE AKTIVIERUNG VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN DURCH EIN  
DENTALES MONOMER**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Kilian David Hansen  
aus Siegburg

2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Helmut Schweikl

2. Berichterstatter: PD Dr. Dipl. Ing. Martin Rosentritt

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2014

Meinen Eltern gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Werkstoffkundliche Grundlagen der Komposit-Kunststoffe</b>	<b>9</b>
<b>1.1.1 Kompositfüllungswerkstoffe</b>	<b>9</b>
<b>1.1.2 Zytotoxische Eigenschaften von Kompositen</b>	<b>13</b>
<b>1.1.3 Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)</b>	<b>14</b>
<b>1.1.4 Apoptose in Anwesenheit dentaler Monomere</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)</b>	<b>16</b>
<b>1.2.1 Allgemeines</b>	<b>16</b>
<b>1.2.2 Aktivierung der MAPK durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS)</b>	<b>17</b>
<b>1.3 Transkriptionsfaktoren</b>	<b>19</b>
<b>2. Fragestellung</b>	<b>22</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Material</b>	<b>23</b>
<b>3.1.1 Chemikalien und Lösungen</b>	<b>23</b>
<b>3.1.2 Verbrauchsmaterial</b>	<b>25</b>
<b>3.1.3 Geräte</b>	<b>25</b>
<b>3.1.4 Antikörper</b>	<b>26</b>
<b>3.1.5 Lösungen, Medien und Puffer</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Methoden</b>	<b>33</b>
<b>3.2.1 Arbeiten mit Zellkulturen</b>	<b>33</b>
<b>3.2.2 Zellkultur und Exposition von Zellen</b>	<b>33</b>
<b>3.2.3 Herstellung der Expositionslösungen und Exposition der Zellen</b>	<b>34</b>
<b>3.2.4 Ernten der Zellen nach Exposition</b>	<b>34</b>
<b>3.2.5 Lyse der Zellen: Isolierung von Kernen und Zytosol</b>	<b>35</b>
<b>3.2.6 Proteinbestimmung</b>	<b>36</b>
<b>3.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b>	<b>36</b>
<b>3.2.8 Übertragung von Proteinen auf Membranen (Western Blot)</b>	<b>38</b>
<b>3.2.9 Nachweis von Proteinen auf Membranen durch Immunfärbung</b>	<b>38</b>
<b>3.2.10 Nachweis durch ECL</b>	<b>39</b>
<b>3.2.11 Strippen von Blotmembranen</b>	<b>39</b>

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Expression von Transkriptionsfaktoren <i>downstream</i> von MAPK .</b>	<b>41</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Die Expression von c-Jun, ATF-2 und ATF-3 in HeLa .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Die Expression von c-Jun, ATF-2 und ATF-3 in tHPC .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Die Expression von c-Jun, ATF-2 und ATF-3 in RAW264.7 Mausmakrophagen .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2</b>	<b>Die Expression von p53 und p21.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Die Expression von p53 und p21 in HeLa.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Die Expression von p53 und p21 in tHPC.....</b>	<b>49</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Die Expression von p53 und p21 in RAW264.7 Mausmakrophagen ....</b>	<b>51</b>
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>53</b>
<b>5.1</b>	<b>Die TEGDMA induzierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zusammenhang mit DNA-Schäden .....</b>	<b>56</b>
<b>5.2</b>	<b>Die TEGDMA induzierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zusammenhang mit der Aktivierung der MAPK.....</b>	<b>58</b>
<b>5.3</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>61</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>62</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>65</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>67</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>78</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>79</b>

## Abkürzungsverzeichnis:

Bis-GMA	Bisphenol A-Diglycidylmethacrylat
CMF-PBS	Calcium- und Magnesiumfreie phosphatgepufferte Kochsalzlösung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS	foetal bovine serum
GSH	Glutathion
HEMA	2-Hydroxyethylmethacrylat
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
LPS	Lipopolysaccharid
MKT	Mikrokerntest
NAC	N-Acetylcystein
NF- $\kappa$ B	Nuklearfaktor- kappa B
8-OxoG	Hydroxydesoxyguanin
PBS	phosphate buffered saline (= phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PBS-EDTA	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit EDTA
ROS	reactive oxygen species
TEGDMA	Triethylenglycoldimethacrylat

# 1. Einleitung

Komposite gelten heute als eine der wichtigsten Werkstoffgruppen in der Zahnmedizin. Viele Patienten fordern und erwarten zahnfarbene Restaurationen sowohl im Frontzahnbereich als auch im Seitenzahnbereich. Komposite sind hierfür in der Zahnmedizin der heutige Goldstandard (Sadowsky, 2006; Cramer *et al.*, 2011; Ferracane, 2011). Komposit-Kunststoffe werden aber auch als Fissurenversiegler, als Stumpfaufbaumaterial oder als Befestigungsstoffe für Brackets verwendet. In der Primärversorgung steht heute überwiegend die minimalinvasive Kompositfüllung im Vordergrund (Zimmerli *et al.*, 2010; Ilie und Hickel, 2011; Demarco *et al.*, 2012).

Relevante Faktoren für eine erfolgreiche klinische Anwendung eines Komposites sind die biologische Verträglichkeit und die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Werkstoffs. Komposite, deren organische Matrix auf Basis von Acrylaten besteht, enthalten methylsubstituierte Acrylate und Substanzen für die kontrollierte Polymerisation (Peutzfeldt, 1997; Rueggeberg, 2002). Basis neuerer dentaler Komposite sind ringöffnende Substanzen als Komponenten der organischen Matrix. So gelten Silorane als geeignetes Mittel, die Polymerisationsschrumpfung zu reduzieren (Weinmann *et al.*, 2005).

## 1.1 Werkstoffkundliche Grundlagen der Komposit-Kunststoffe

### 1.1.1 Kompositfüllungswerkstoffe

Moderne zahnärztliche Komposite bestehen aus drei Hauptkomponenten. Die organische und anorganische Komponente werden in der Regel durch ein trifunktionales Alkoxysilan verbunden (Peutzfeldt, 1997). Monomere, Komonomere und verschiedene Additiva bilden die organische Matrix eines Komposites.

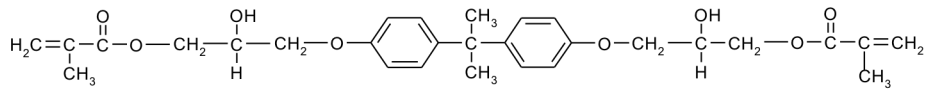
Substanzielle Bestandteile der organischen Matrix sind Basismonomere, wie Bisphenol A-Diglycidylmethacrylat (Bis-GMA) oder Urethandimethacrylat (UDMA) (Bowen, 1963). Der Anteil des bifunktionalen Komonomers TEGDMA an der organischen Matrix beträgt in modernen dentalen Kompositen etwa 15-25% (Stanislowski *et al.*, 2003) (Abb. 1). TEGDMA ist kleiner als Bis-GMA, reduziert die Viskosität der organischen Matrix und erhöht den Grad der Quervernetzungen

sowie des Polymerisationsgrades (Peutzfeldt, 1997). Deshalb wird TEGDMA auch in dünnfließenden Kompositen und Adhäsiv-Systemen eingesetzt, um eine ausreichende Benetzbarkeit der Zahnhartsubstanz erreichen zu können und eine fließfähige Masse zu gewährleisten (Ilie und Hickel, 2011).

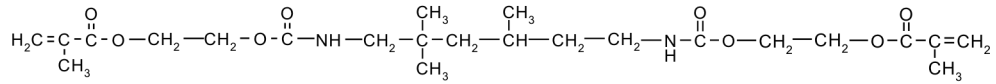
Füllkörper, die anorganische Komponente des Komposites, die meist mehr als 50% des Gesamtgewichtes in einem Kunststoff ausmachen, verbessern mechanische Eigenschaften wie Abrasions- und Standfestigkeit und reduzieren innere Spannungen sowie die Polymerisationsschrumpfung (Asmussen und Munksgaard, 1987; Silikas *et al.*, 2000). Sie bestehen vor allem aus Bariumglas, Keramiken und Siliziumdioxid (Chen, 2010; Cramer *et al.*, 2011).

Methacryloxy-silan (MPS), ein trifunktionales Alkoxysilan stellt über eine kovalente Bindung den festen Verbund zwischen anorganischen Füllkörpern und organischer Matrix her. MPS bindet an die Füllkörper über Siliziumoxid-Gruppen, wohingegen die Bindung an das Polymernetz über Methacrylatgruppen erreicht wird (Peutzfeldt, 1997; Lim *et al.*, 2002). Inhibitoren und Initiatoren wie butyliertes Hydroxytoluol und Katalysatoren kontrollieren die Polymerisation (Ferracane *et al.*, 1995; Atsumi *et al.*, 2001).

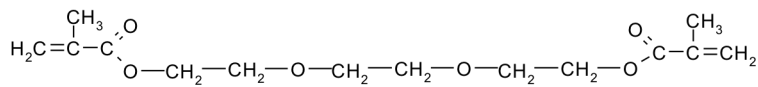
Durch Aushärtung des Kunststoffes entsteht eine Polymerisationsschrumpfung von 2-3 Volumenprozent, die Spannungen zwischen Zahn und Komposit erzeugen (Davidson und Feilzer, 1997). Diese Spannungen führen bei zu großen Schichtdicken des Polymerisationsstückes zur Randspaltbildung und im weiteren Verlauf zu Sekundärkaries im betreffenden Gebiet (Dauvillier *et al.*, 2000; Forss und Widstrom, 2004). Kleinere Monomermoleküle und hohe Anteile an Verdünnermonomeren wie TEGDMA weisen höhere Polymerisationsschrumpfungen auf als große Monomermoleküle, etwa Bis-GMA (Peutzfeldt, 1997). Eine neue Generation von Kompositen basiert auf ringöffnenden Substanzen wie Siloranen. Epoxidgruppen als ringöffnende Komponenten zeichnen sich, verglichen mit Methacrylaten, durch eine geringere Polymerisationsschrumpfung aus (Weinmann *et al.*, 2005) (Abb. 2).



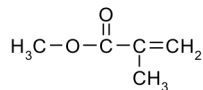
2,2'-Bis-[4-(2-hydroxy-3-methacryloyloxy-propoxy)phenyl]propan (Bis-GMA)



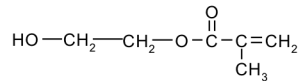
Urethandimethacrylat (UDMA)



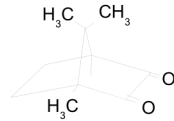
Triethylenglykoldimethacrylat (TEGDMA)



Methylmethacrylat (MMA)



2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA)



Campherchinon (CQ)



N,N-Dimethyl-p-toluidin (DMT)

Abbildung 1: Basis- und Konomere der organischen Matrix zahnärztlicher Komposite (übernommen aus Frank, 2010 mit Genehmigung von Prof. Schweikl)

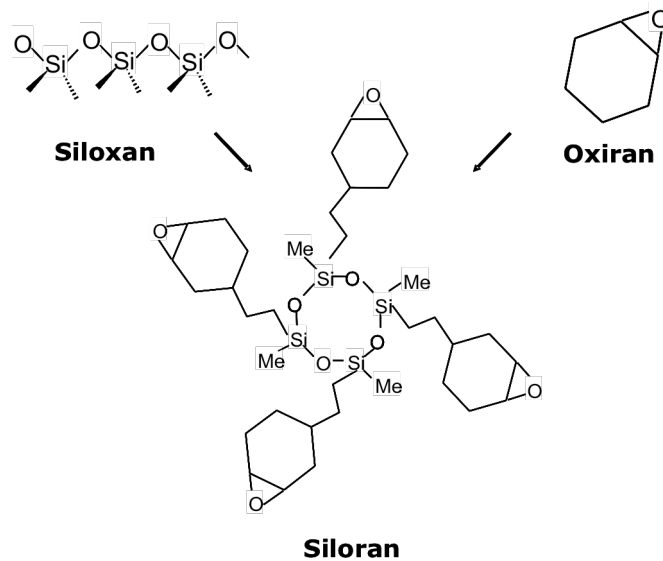


Abbildung 2: Struktur ringöffnender Silorane (modifiziert nach Weinmann *et al.*, 2005) (übernommen aus Frank, 2010 mit Genehmigung von Prof. Schweikl)

Biologisch-mechanisch funktionelle Kompositwerkstoffe entstehen erst nach einer vollständigen Polymerisation der Monomere der organischen Matrix. Da eine Polymerisationsreaktion der Dimethacrylate selbst unter klinischen Bedingungen nie vollständig verläuft, bleibt immer ein Restmonomergehalt im Kunststoff erhalten (D'Arcangelo *et al.*, 2012). Diese ungebundenen Monomere wurden nicht nur unter experimentellen Bedingungen mit wässrigen oder organischen Lösungen ausgelaugt, sondern waren auch im Speichel nachweisbar. Sowohl Pelka als auch Michelsen und Mitarbeiter wiesen 1999 und 2003 experimentell mehr als dreißig verschiedene Komponenten in Extrakten polymerisierter Komposite auf Methacrylatbasis nach (Pelka *et al.*, 1999; Michelsen *et al.*, 2003). In der klinischen Situation, der Mundhöhle, können verschiedene Parameter den Restmonomeranteil zahnärztlicher Komposite begünstigt herauslösen. Dies können osmotische, mechanische oder thermische Einflüsse sein und durch die Nahrungsmittelaufnahme in ganz natürlicher Weise vorhanden sein (Gopferich, 1996; Santerre *et al.*, 2001; Finer und Santerre, 2004a).

Die Freisetzung von Monomeren und nicht polymerisierten Anteilen hat entscheidenden Einfluss auf die Stabilität und die Biokompatibilität des Komposites. Durch die Einwirkung von Esterasen, wie die von inflammatorischen Zellen abstammende Cholesterinesterase und Pseudocholesterinesterase, kann es zu Abnutzungserscheinungen und einer Reduktion der Härte der Komposite kommen (Freund und Munksgaard, 1990; Munksgaard, 2005). Die im humanen Speichel enthaltenen Esterasen können synergetisch die Degradation von Kompositen fördern (Finer und Santerre, 2004a; Khalichi *et al.*, 2004).

Santerre und Mitarbeiter zeigten, dass TEGDMA und seine Derivate von der Pseudocholesterinesterase degradiert werden konnten. Die Esterasen wurden nicht nur von körpereigenen Geweben (Zellen der Speicheldrüsen) oder Leukozyten und Makrophagen gebildet, sondern wurden ebenfalls von oralen Mikroorganismen wie von dem Bakterium *Porphyromonas gingivalis* freigesetzt (Santerre *et al.*, 2001; Finer und Santerre, 2004b). Monomere sind somit verfügbar und können möglicherweise lokal auf Gewebe der Mundhöhle wirken (Engelmann *et al.*, 2005).

### **1.1.2 Zytotoxische Eigenschaften von Kompositen**

Die meist als Basismonomere und Komonomere verwendeten Dimethacrylate wurden als Ursache zytotoxischer Wirkung der Werkstoffe identifiziert (Hanks *et al.*, 1991; Thonemann *et al.*, 2002; Pagoria und Geurtsen, 2005). Man darf annehmen, dass toxische Konzentrationen von Monomeren im Gewebe der Zahnpulpa von der Behandlungsdauer und -intensität sowie von der Dicke des Dentins und dessen Permeabilitätseigenschaften abhängen (Hume und Gerzina 1996; (Murray *et al.*, 2002; Thonemann *et al.*, 2002). Struktur-Aktivitätsuntersuchungen haben gezeigt, dass Acrylate toxischer sind als Methacrylate. Außerdem sind bifunktionelle Moleküle wie Triethylenglycol-dimethacrylat wirksamer als monofunktionelle Komponenten wie etwa 2-Hydroxyethylmethacrylat (Yoshii, 1997).

Genomische DNA ist ein direktes oder indirektes Zielmolekül dieser Komonomere in *in-vitro*-Systemen. Während Basismonomere wie Bisphenol A-Diglycidyl-dimethacrylat (Bis-GMA) oder Urethandimethacrylat (UDMA) sowie Methylmethacrylat (MMA) keine Genmutationen zeigten, verursachten Triethylenglycol-

dimethacrylat (TEGDMA) oder auch das monofunktionelle HEMA Genmutationen (HPRT-Test) und Mikrokerne (Schweikl *et al.*, 1998; Schweikl *et al.*, 2001). Eine mögliche Ursache dieser Mutationen ist die Induktion oxidativer DNA-Schäden, die zu DNA-Strangbrüchen führen können (Eckhardt *et al.*, 2009). TEGDMA und HEMA verzögerten den Zellzyklus eukaryotischer Zellen. Dies war wahrscheinlich die Folge der oben beschriebenen DNA-Schäden. In Anwesenheit des Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (Schweikl *et al.*, 2005; Schweikl *et al.*, 2007; Schweikl *et al.*, 2008; Eckhardt *et al.*, 2009).

### 1.1.3 Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Der rasche Abfall der intrazellulären Konzentration von Glutathion (GSH) und der damit verbundene, parallele Anstieg der Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) war mit der Zytotoxizität dentaler Komonomere wie HEMA oder TEGDMA verbunden (Stanislawski *et al.*, 2003; Engelmann *et al.*, 2004).

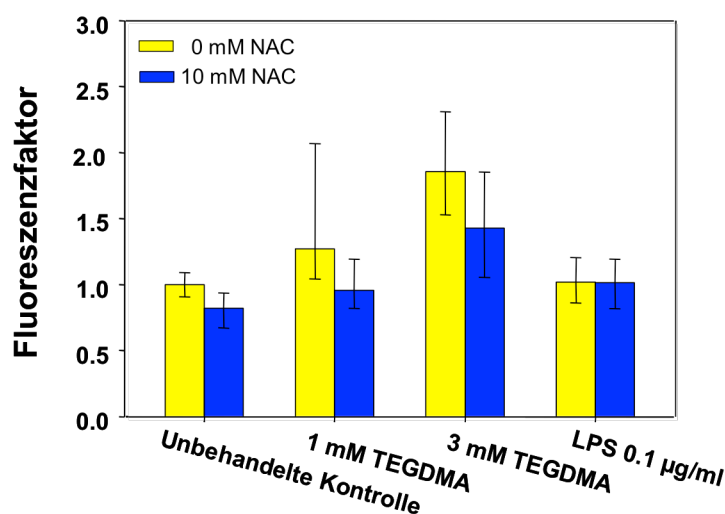


Abbildung 3: Die Bildung von ROS in RAW264.7 Makrophagen. Zellkulturen wurden mit TEGDMA (und LPS) für 1h mit oder ohne NAC (N-Acetylcystein) exponiert. Die Balken zeigen Mediane sowie 25 und 75% Perzentile (n=4). Die Abbildung wurde modifiziert übernommen (Schweikl, 2009).

Stanislawski und Mitarbeiter zeigten eine zeitabhängige (15-60min) Mengenzunahme von ROS durch TEGDMA in humanen Fibroblasten. RAW264.7 Makrophagen produzierten ebenfalls, nach Exposition gegen TEGDMA eine

erhöhte Menge an ROS, während Lipopolysaccharid (LPS), ein bakterielles Endotoxin, den oxidativen Stress in den Makrophagen nicht erhöhte (Schweikl, 2009) (Abb. 3). Die antioxidative Substanz N-Acetylcystein (NAC) allerdings reduzierte die Menge an ROS. Neben NAC inhibierten auch andere Antioxidantien wie Ascorbat oder Trolox (Vitamin E) die Erzeugung von Zellschäden durch TEGDMA, HEMA oder auch PMMA (Stanislawski *et al.*, 2003; Walther *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2008).

Durch den Hinweis, dass eine erhöhte Menge an ROS als Signalmoleküle für die Induktion des physiologischen Zelltods (Apoptose) relevant ist, gewinnt dieser neue Ansatz in der Diskussion von Mechanismen zytotoxischer Effekte dentaler Monomere an Bedeutung. Möglicherweise spielt dabei neben der Erzeugung oxidativer DNA-Schäden auch die Aktivierung der zellulären Signaltransduktionswege über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) und Transkriptionsfaktoren *downstream* eine wesentliche Rolle (Krifka *et al.*, 2010).

#### **1.1.4 Apoptose in Anwesenheit dentaler Monomere**

Apoptose, ein zelleigenes aktives Programm zur Regulation des Zelltods, konnte durch zahnärztliche Komposite, ihre Monomere und deren Metabolite induziert werden. Der induzierte Zelltod wurde von Kompositwerkstoffen und Polymethacrylaten in unterschiedlichen Zelllinien hervorgerufen (Cimpan *et al.*, 2000a; Cimpan *et al.*, 2000b; Gough und Downes, 2001; Gough *et al.*, 2002; Quinlan *et al.*, 2002). Interessanterweise schien die Induktion von Apoptose durch Dentinadhäsive in Odontoblasten, nicht differenzierten Pulpazellen oder Makrophagen vom Grad der Polymerisation des Materials abhängig zu sein (Mantellini *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse verweisen auf eine zentrale Rolle nicht polymerisierter Komponenten bei der Induktion von Apoptose. Für das Monomer HEMA, das Komonomer TEGDMA und das Basismonomer Bis-GMA ist die Induktion von Apoptose gut dokumentiert. Spagnuolo führte die Experimente in primären humanen Gingiva- und Pulpazellen durch (Janke *et al.*, 2003; Engelmann *et al.*, 2004; Spagnuolo *et al.*, 2004a; Spagnuolo *et al.*, 2004b). TEGDMA und LPS sowie die Kombination aus LPS/TEGDMA induzierten außerdem Apoptose in RAW264.7 Makrophagen (Schweikl, 2009; Krifka *et al.*, 2011). Bemerkenswert war, dass der Anteil der Zellen in Apoptose und Nekrose nach 24h Exposition verglichen mit 6h parallel zur Aktivierung verschiedener

MAPK zunahm. Es wurde daher vermutet, dass MAPK möglicherweise auch die Monomer-induzierte Apoptose steuern könnten (Schweikl, 2009; Krifka *et al.*, 2010).

## 1.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

### 1.2.1 Allgemeines

Es gibt eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen in eukaryotischen Zellen. Diese werden meist durch Rezeptoren an der Zelloberfläche oder intrazelluläre Sensoren, die verschiedene interne und externe Signale (Stressors) erkennen, angestoßen. Verschiedene zelluläre Reaktionen wie die Zellproliferation, die Freisetzung von Zytokinen oder die Einleitung von Apoptose werden über die Aktivierung von MAPK reguliert (Takeda *et al.*, 2008). Die MAP-Kinasen werden gewöhnlich in drei Familien eingeteilt: Die p38-MAPKs, die *extracellular-signal-regulated kinases* (ERK1/2 oder p42/p44-MAPK) sowie die c-Jun N-terminalen Kinasen 1-3 (JNK) (Aicher *et al.*, 1999; Chang, 2001; Puig-Kroger *et al.*, 2001). Jede MAPK-Familie steuert bestimmte Zielgene über Transkriptionsfaktoren und hat unterschiedliche Aufgaben, trotzdem gibt es ausgeprägte Interaktionen zwischen den einzelnen MAPK, so dass man von einem Netzwerk von Signalen und nicht von gänzlich unabhängigen parallelen Systemen ausgeht (Zhang *et al.*, 1997; Rescigno *et al.*, 1998; Cobb, 1999).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wirken als *second messenger* für die Steuerung der Zellproliferation, wirken also mitogen über die Aktivierung der MAPK ERK1/2 (Matsuzawa und Ichijo, 2005). Stressfaktoren wie UV-Strahlung, Röntgenstrahlen oder Chemikalien wie Cadmiumchlorid oder Arsenit sowie allgemeiner oxidativer Stress aktivieren die MAPK JNK und p38 (Matsuzawa und Ichijo, 2005).

Diese Signalwege der MAPK sind strukturell ähnlich, funktionell jedoch sehr verschieden. So dient nach übereinstimmender Ansicht der Weg über ERK1/2 überwiegend der Regulation der Zelldifferenzierung und Proliferation und wird durch Wachstumsfaktoren begünstigt. Die Aktivierung von ERK1/2 erfolgt meist über Tyrosinkinase-Rezeptoren. Dies geschieht mittels einer Aktivierung von Ras, der MAPKK Raf-1 und der nachgeschalteten Aktivierung von MEK1/2, für die

bisher außer ERK1/2 keine weiteren Substrate bekannt sind (Chambard *et al.*, 2007). Die MAPK ERK1/2, JNK und p38 steuern auch die Balance zwischen Apoptose und Überleben von Zellen unter Stressbedingungen. Apoptose und die Aktivierung von MAPK wurden für eine Reihe von toxischen und genotoxischen Substanzen und Agenzien direkt korreliert, dabei scheint die Induktion von Apoptose von aktivierenden Faktoren, den betroffenen Zelltypen sowie der Höhe und der Dauer des Stresses abhängig zu sein (Matsuzawa und Ichijo, 2005). So führt etwa der Entzug eines Wachstumsfaktors zur dauerhaften Aktivierung von JNK und p38 sowie zur Inhibition von ERK1/2. Beide Wirkungen induzieren Apoptose (Xia *et al.*, 1995).

Die Bildung von ROS und allgemein oxidativer Stress sind wesentliche Parameter der Aktivierung von MAPK. Umgekehrt führte die Inhibition der Aktivierung von p38 aufgrund einer Deletion von ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*), eine MAPKKK *upstream* von p38, zur Resistenz gegen die Induktion von Apoptose durch oxidativen Stress (Tobiome *et al.*, 2001; Matsuzawa *et al.*, 2002). Oxidativer Stress ist damit ein zentraler Faktor für die Induktion von Apoptose über die Aktivierung von MAPK wie p38.

### **1.2.2 Aktivierung der MAPK durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS)**

Zahnärztliche Monomere wie TEGDMA oder HEMA aktivieren MAPK offensichtlich über recht komplizierte Mechanismen. Es wurde berichtet, TEGDMA und HEMA würden nach langen Expositionszeiten ERK1/2 in Speicheldrüsenzelllinien aktivieren, während p38 und JNK durch HEMA nicht, jedoch durch TEGDMA aktiviert werden sollten (Samuelsen *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse wurden allerdings nur für einen Zeitpunkt - 6h nach Expositionsstart - ermittelt und sind daher nur bedingt aussagekräftig, auch in der damit assoziierten Induktion von Apoptose. In humanen Pulpazellen scheint die TEGDMA-induzierte Apoptose nicht über ERK1/2 vermittelt zu sein, da ein spezifischer pharmakologischer Inhibitor dieses Signalweges die Zahl der Zellen in Apoptose nicht veränderte (Spagnuolo *et al.*, 2004a). Allerdings wurde eine sehr rasche Aktivierung von ERK1/2 durch HEMA nachgewiesen. Eine reduzierte Zellvitalität nach Inhibition von ERK1/2 in Anwesenheit von HEMA verweist darauf, dass ERK1/2 unter

diesen Bedingungen eine anti-apoptotische Funktion übernimmt (Spagnuolo *et al.*, 2008).

Eine detaillierte Analyse zeigte schließlich auch die differentielle Aktivierung von MAPK durch Monomere wie TEGDMA in Zellen des Immunsystems. So bewirkte zwar die Stimulation der Zellen mit 0,1 µg/ml LPS einen deutlichen Anstieg der Menge an phospho-p38 bereits nach 15 min, allerdings aktivierte TEGDMA die p38 MAPK zu diesem frühen Zeitpunkt nicht. Bereits nach einer Expositionszeit von 30 min erhöhte TEGDMA die Menge an phospho-p38 jedoch um den Faktor 2, ERK1/2 oder JNK wurden dagegen nicht aktiviert (Krifka *et al.*, 2010). TEGDMA inhibierte nach 1h und 2h Exposition sogar die Bildung von phospho-ERK1/2, nach langen Expositionszeiten von 6h und vor allem 24h war allerdings die Expression von ERK1/2, p38 und JNK drastisch erhöht. Es ist anzunehmen, dass die starke Aktivierung von ERK1/2 durch TEGDMA über Signalwege erfolgt, die der durch TEGDMA induzierten und vermutlich durch p38 und JNK vermittelten Apoptose entgegenwirken. ERK1/2 wird wahrscheinlich als *pro-survival factor* von TEGDMA aktiviert, um das Überleben der Zellen zu fördern und p38 entgegenzuwirken (Krifka *et al.*, 2010). Die Vermutung, die späte und lang anhaltende Aktivierung von p38 könnte mit der Induktion von Apoptose verbunden sein, hat sich aber nach Experimenten mit spezifischen pharmakologisch wirksamen Inhibitoren für ERK1/2, p38 oder JNK bisher nicht bestätigt (Krifka *et al.*, 2011). Andererseits schützte das Antioxidans N-Acetylcystein humane Monozyten vor TEGDMA-induzierten, zytotoxischen Effekten und inhibierte, damit assoziiert, die Aktivierung der MAPK p38 und ERK1/2 nach langen Expositionszeiten (Eckhardt *et al.*, 2009). Sehr ähnliche Ergebnisse wurden in Mausmakrophagen beobachtet (Krifka *et al.*, 2010). Diese Beobachtungen, die Erzeugung von ROS, die späte Induktion von Apoptose sowie parallel dazu die Aktivierung von MAPK könnten bedeuten, dass Monomere wie TEGDMA oder HEMA Apoptose über oxidative DNA-Schäden oder alternativ dazu über die Aktivierung von MAPK und Transkriptionsfaktoren *downstream* induzieren könnten (Abb. 4).

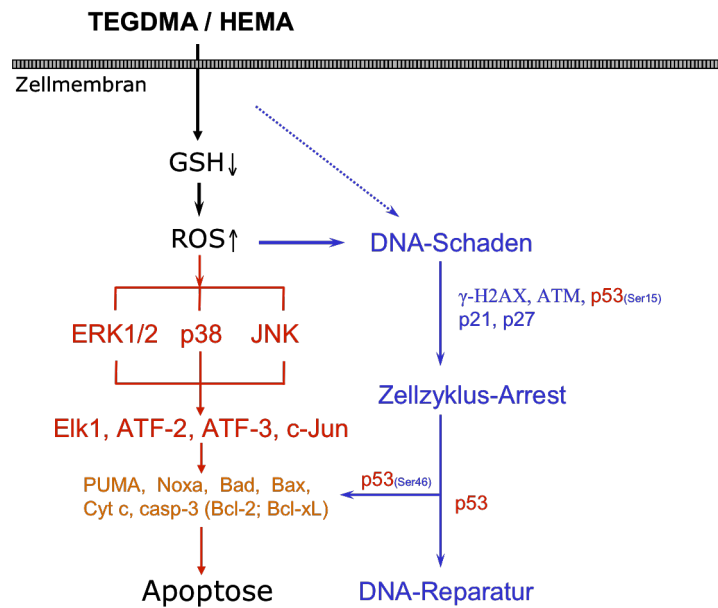


Abbildung 4: Hypothetisches Modell der Induktion von Apoptose durch dentale Monomere. Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) oder 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) reduzieren intrazellulär den Gehalt an Glutathion (GSH), parallel dazu steigt die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Dieser oxidative Stress induziert DNA-Schäden und aktiviert ausgehend davon Signaltransduktionsketten über  $\gamma$ H2AX, ATM, p53, p21 oder p27. Dieser Pathway führt über einen Zellzyklus-Arrest zu DNA-Reparatur oder zur Induktion von Apoptose über den mitochondrialen Pathway (PUMA, Noxa, u.a.). Alternativ könnten ROS über die MAPK ERK1/2, p38 oder JNK Transkriptionsfaktoren *downstream* wie Elk1, ATF-2, ATF-3 oder c-Jun aktivieren und so Apoptose auslösen.

### 1.3 Transkriptionsfaktoren

MAPK steuern ihrerseits Zielgene *downstream*, etwa Transkriptionsfaktoren wie Sp1, E2F, Elk-1 oder *activator protein 1* (AP-1) (Murphy und Blenis, 2006; Katz *et al.*, 2007). Es werden beispielsweise Untereinheiten von AP-1, c-Jun und c-Fos, von MAPK unter Stressbedingungen durch Phosphorylierung aktiviert (Nomura *et al.*, 2006). Der Transkriptionsfaktor c-Jun ist Teil der Familie der Jun-Transkriptionsfaktoren, zu denen auch JunB und JunD gehören. AP-1 wiederum ist ein homo- oder heterodimeres Protein aus Fos, Jun und ATF, kann an TRE (*TPA responsive elements*) oder auch CRE (*cAMP response element*) binden und die entsprechenden Gene aktivieren. Extrazelluläre Signale wie Wachstumsfaktoren, Chemokine oder Stress können die AP-1-abhängige Transkription

aktivieren. Dabei wird beispielsweise die Aktivität von c-Jun durch die Phosphorylierung an Ser46 oder Ser73 durch JNK gesteuert (Besirli *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2007). AP-1 ist an der Regulation vieler unterschiedlicher Funktionen beteiligt, etwa der Zellproliferation, der Differenzierung oder Apoptose, aber auch an der Zelltransformation, Invasion oder Metaplasie. Andere AP-1-abhängige Zielgene regulieren das Zellüberleben, die intrazelluläre Hypoxie oder die Angiogenese (Teodoro *et al.*, 2006).

Der Transkriptionsfaktor ATF-2 (*activating transcription factor-2*) ist ein Mitglied der ATF/CREB-Familie von Leucin-Zipper-Proteinen und kann an AP-1 oder an CRE-Abschnitte der DNA binden. ATF-2 interagiert mit Onkoproteinen und Tumorsuppressoren und stellt ein Ziel des SAPK/JNK- und des p38 MAPK-Pathways dar. Verschiedene Formen zellulären Stresses, wie genotoxische Agenzien, inflammatorische Zytokine oder UV-Bestrahlung fördern die Aktivierung von ATF-2 (Kawasaki *et al.*, 2000). Zellulärer Stress führt über die Phosphorylierung zur Aktivierung von ATF-2 (Thr69 und Thr71), dass dann auch den Bcl-2-Promotor aktivieren kann (Natal *et al.*, 2006).

Der Transkriptionsfaktor ATF-3 (*activating transcription factor 3*) ist ebenfalls ein Mitglied der Familie ATF/cAMP-bindender Proteine. ATF 3 wird sehr rasch unter verschiedenen Stresssituationen wie etwa Exposition gegen UV- und ionisierende Strahlung oder toxische Werkstoffe sowie durch Hypoxie hochreguliert. ATF-3 ist ein proapoptotisches Protein (Huang *et al.*, 2008). Es ist nicht vollständig geklärt, ob der JNK/SAPK-Pathway in die Induktion von ATF-3 durch Stress involviert ist. Man darf aber annehmen, dass ATF-3 sowohl p53-abhängig als auch p53-unabhängig induziert wird (Hai *et al.*, 1999; Hai und Hartman, 2001; Morton *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008). ATF-3 unterstützt die Aktivierung von Caspasen und Proteasen und beschleunigt somit den Prozess der Apoptose (Syed *et al.*, 2005). Zahlreiche Proteine interagieren mit ATF-3. So könnte ATF-3 mit HBV-assoziierten Erkrankungen korrelieren (Tarn *et al.*, 1999) und eine wichtige Funktion bei der Bildung von Metastasen einnehmen (Ishiguro *et al.*, 1996; Ishiguro *et al.*, 2000).

Der Transkriptionsfaktor p53 fungiert als ein zentraler Tumorsuppressor (Soussi *et al.*, 1994; Vogelstein *et al.*, 2000). Dieses Protein wird durch eine Vielzahl von Agenzien, die zellulären Stress erzeugen, aktiviert und reagiert auf Ereignisse wie DNA-Schäden oder Hypoxie. p53 bindet an eine Konsensussequenz in der

Promotorregion verschiedener Gene und ist somit in der Lage, zahlreiche biologische Funktionen einschließlich Zellzyklus, Apoptose oder DNA-Reparatur zu regulieren. Es ist bekannt, dass p53 bei der Reparatur genotoxischer Schäden (Gatz und Wiesmuller, 2006), dem Überleben der Zellen und der Regulation von oxidativem Stress (Bensaad und Vousden, 2005) eine zentrale Rolle übernimmt.

Die Phosphorylierung von p53 an Ser15 inhibiert *downstream* die Zellproliferation (Zellzyklus) nach transkriptioneller Aktivierung von p21 (Gartel, 2009). Die Phosphorylierung von Ser46 hingegen führt vermutlich zur Induktion von Apoptose, etwa über die Aktivierung pro-apoptotischer BH3-*only* Proteine wie PUMA oder Noxa (Saito *et al.*, 2002; Villunger *et al.*, 2003). Neben den intranukleären Funktionen von p53 existieren einige von der Transaktivierung unabhängige Funktionen. So verstärkt p53 etwa die apoptotische Zellreaktion über die Interaktion mit Proteinen, die im Zytosol oder den Mitochondrien lokalisiert sind (Moll *et al.*, 2005).

Die Aktivität von p53 wird *upstream* durch Stressfaktoren aus der Umwelt sowohl auf der Ebene der Transkription als auch durch posttranslationale Modifizierung reguliert. Neben der Regulation der Expression von p53 auf der Transkriptionsebene wird das Protein reversibel phosphoryliert und reguliert so seinerseits verschiedene Faktoren *downstream* (Lavin und Gueven, 2006; Lim *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009).

## 2. Fragestellung

Dentale Monomere wie Triethylenglykoldimethacrylat (TEGDMA) wirken genotoxisch und zytotoxisch via Apoptose *in vitro*. Es ist außerdem bekannt, dass dentale Monomere die zelluläre Redoxhomöostase durch vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) stören können, oxidative DNA-Schäden erzeugen und als zelluläre Reaktion Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) aktivieren. Diese Ergebnisse überwiegend deskriptiver Analysen zeigten eine Parallelität, aber keine Mechanismen der ursächlichen Verbindung dieser Effekte. Man darf jedoch vermuten, dass der in Monomer-exponierten Zellkulturen beobachtete Zelltod durch Apoptose die Folge von Signalen ist, die von oxidativen DNA-Schäden oder von ROS-aktivierten MAPK ausgehen und von Transkriptionsfaktoren vermittelt werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Expression von Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, die *downstream* von MAPK liegen und von diesen aktiviert werden. Dazu zählen die stressaktivierbaren Transkriptionsfaktoren c-Jun, ATF-2 und ATF-3. Außerdem sollte die Expression von p53 und p21 untersucht werden, die als zelluläre Antwort auf mögliche DNA-Schäden verändert sein könnte.

Für diese Analysen wurden drei verschiedene Zelllinien verwendet. HeLa (Henrietta Lacks-Zellen) dienten als menschliche Epithelzellen aus dem Cervixkarzinom als Kontrolle für die Expression von p53. RAW264.7 Mausemakrophagen wurden als Repräsentanten des zellulären angeborenen Immunsystems verwendet und als Modell für spezifische Pulpreaktion wurden transformierte humane Pulpazellen (tHPC) eingesetzt. Diese Zellen wurden dem Modellmonomer TEGDMA und einer Kontrollsubstanz (Camptothecin) exponiert. Die Expression der Transkriptionsfaktoren wurde mit Western Blotting untersucht.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Lösungen

Accutase	PAA, Pasching, Österreich
Acrylamid "Rotiphorese Gel 40" (29:1), Art. Nr. A515.1	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS), Art.9592.2	Roth, Karlsruhe
Blotting Membran (Nitrocellulose Protran BA83), Lot. 7030005, Conv. No.7097683	Whatman GmbH, Dassel
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
C <sub>12</sub> E <sub>10</sub> (Polyoxyethylen-10-laurylether) (P9769-5000)	Sigma, Taufkirchen
Camptothecin (MBL-JM-1039-1)	MBL International Woburn, USA
Complete Mini (Protease- Inhibitoren) (11836153001)	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Dulbecco´s modified essential medium (DMEM)	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
ECL (Plus) Western Blotting Detection System	GE Healthcare Limited Buckinghamshire, UK
EDTA-Natrium (Best.Nr.03685)	Fluka AG, Schweiz
Essigsäure, Lot#K34277263 507	Merck, Darmstadt
fötales Rinderserum (fetal bovine serum) (Lot 07Q5364F)	Gibco Invitrogen Inc., USA
Glycerin (4094.1000), 05 K 13393594	Merck, Darmstadt
Glycin (Nr. 1.04201.1000)	Merck, Darmstadt
HCl (rauchend, 37%) (UN1789)	Merck, Darmstadt
Isopropanol (AO206967001)	AcrosOrganics, U.S.A

Kaliumchlorid (4933)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (4873)	Merck, Darmstadt
Laemmli sample buffer (Nr.161-0737)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Lipopolysaccharid (E.coli) (L2880)	Sigma, Taufkirchen
Methanol (UN1230) (1.06009.2511)	Merck, Darmstadt
Milchpulver Blotting Grade (Art. T145.1)	Roth, Karlsruhe
Minimal essential medium $\alpha$ (MEM $\alpha$ )	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid (6404)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS) (CN 30.3)	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid (S7920)	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydrogencarbonat (6406)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (6346)	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat (sodium pyruvat) (311810)	Gibco Invitrogen Inc., USA
Natriumvanadat ( $\text{NaVO}_4$ )(S6508)	Sigma, Taufkirchen
NP-40, (74385), Nonidet P 40 Substitute	Fluka AG, Schweiz
Penicillin-Streptomycin (15140-122)	Gibco Invitrogen Inc., USA
Ponceau S Rot (258387 1086 K 3355), C.I.Nr.27195	Fluka AG, Schweiz
Precision Plus Protein Standards (No.161-0375)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Re-Blot Plus Mild antibody stripping solution (10x), Chemicon (2502)	Roth, Karlsruhe
Roti Block (A151.1)	Roth, Karlsruhe
TEGDMA (Triethylenglycoldimethacrylat) (109-16-0)	Sigma, Taufkirchen
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethylen-diamid) (2367.3)	Roth, Karlsruhe

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (36524987 646)

Merck, Darmstadt

Trypsin 2,5 %

Invitrogen Inc., USA

Tween20 (P7949)

Sigma, Aldrich Chemie  
GmbH, Steinheim

### 3.1.2 Verbrauchsmaterial

Amersham Hyperfilm ECL (18x24cm)

GE Healthcare, München

CellStar tubes 15 ml (188 271)

Greiner, Frickenhausen

Falcon Zentrifugenröhrchen 50 ml (0420705)

Becton Dickinson GmbH  
Heidelberg

Filterpapier Mini Trans-Blot (1703932)

Bio-Rad Laboratories,  
München

Gel Loading Tips (Round Eppendorf) LC1010

Invitrogen, Carlsbad CA  
USA

Nitrocellulose Protran

Whatmann GmbH, Dassel

Sterilfilter (0,2 µm), Celluloseacetat (16534 070554)

Sartorius, Göttingen

Gewebekulturschalen:

Bio-one Cellstar 145/20 mm, Art.Nr.639160

Greiner, Frickenhausen

Costar 96-Well-Platten, Cat.No.3598

Corning Incorporated, USA

Kulturflaschen T162 (162 cm<sup>2</sup>) (3151)

Corning Incorporated, USA

Kulturflaschen T75 (75cm<sup>2</sup>) (3376)

Corning Incorporated, USA

### 3.1.3 Geräte

Inkubationsschrank

Heraeus Instruments,  
Hanau

Mikroskop Diavert, Ser. Nr. 896460

Leitz, Wetzlar

Milli-QUF plus, Reinstwasseranlage

Millipore GmbH,  
Schwalbach

Mini Protean 3 Cell, Gelelektrophoreseapparatur (679/29215)	Bio-Rad Laboratories, München
Mini Protean Tetra Cell, Gelelektrophoreseapparatur (552BR0)	Bio-Rad Laboratories, München
Mixing Block MB-102 BIOER	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
pH-Meter Kalimatic	Knick, Berlin
Sartorius Analysenwaage MC 210P	Sartorius, Göttingen
Sartorius Waage 1404 MP 8; No.3310033	Sartorius, Göttingen
Schüttelgerät REAX 2000	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Schüttler G.F.L.3018	GFL, Burgwedel
Spektralphotometer Infinite F200	TECAN GmbH, Crailsheim
Sterile Werkbank Laminar Flow Gelaire, BSB4	Flow Laboratories, Merckenheim
Wasserbad Schüttler G.F.L. 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Eppendorf 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotixa/ P Typ 4202 Nr.2181	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotina 420R; Rotor 4723	Hettich, Tuttlingen

### 3.1.4 Antikörper

#### Primäre Antikörper

ATF-2	Rabbit Polyclonal IgG, C-19 sc-187	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
ATF-3	Polyclonal Rabbit Antibody (C-19) sc-188	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
c-Jun	Rabbit Polyclonal Antibody (H-79) sc-1694	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
GAPDH	Anti-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, 6C5 (MAB374)	Millipore GmbH, Schwalbach

Lamin A/C p21	Rabbit Polyclonal Antibody (2032) Polyclonal Rabbit Antibody (H-164) sc-756	Cell Signaling, NEB, Frankfurt Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
p27 [Kip1]	Purified Mouse Anti-p27 [Kip1] (610242) Clone ID: 57/Kip1/p27	BD Transductions Laboratories, Heidelberg
p53 (1C12) p53 (N-Term)	Mouse mAb (2524) mouse IgG1 Rabbit Monoclonal Antibody, 1005-1, UniProtID: P04637	Cell Signaling, NEB, Frankfurt Epitomics, Biomol GmbH, Hamburg
p53(Ser15) p53(Ser46)	Nr. 9284, Rabbit Polyclonal Antibody, Rabbit Monoclonal Antibody, EP42Y, UniProt ID:P04637, 2190-0	Cell Signaling, NEB, Frankfurt Epitomics, Biomol GmbH, Hamburg
Phospho-ATF-2 (Thr69/71)	Polyclonal Antibody, rabbit, #9225	Cell Signaling, NEB, Frankfurt
Phospho-c-Jun (Ser63) II	Rabbit Polyclonal Antibody (9261)	Cell Signaling, NEB, Frankfurt

### **Sekundäre Antikörper**

Goat Anti Mouse (179- 5616)	IgG, HRP-linked Verdünnung 1:3000	Bio-Rad Laboratories, München
GoatAntiRabbit (1907)	Verdünnung 1:3000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
GoatAntiRabbit (7074)	HRP-linked; Verdünnung 1:1000	Cell Signaling, NEB, Frankfurt

### **3.1.5 Lösungen , Medien und Puffer für die Zellkultivierung**

Alle Lösungen und Puffer wurden steril filtriert. Jedem Liter Medium wurden Antibiotika in Form von 10 ml Penicillin-Streptomycin-Stammlösung (10000 U/ml Penicillin, 10mg/ml Streptomycin) vor Gebrauch zugegeben. Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden für die Kultivierung der Zellen vor Gebrauch vorgewärmt.

Medium für RAW264.7 Mausemakrophagen:

Medium RPMI 1640 mit L-Glutamin, 2 g/l NaHCO<sub>3</sub>

10% FBS

1 mmol/L Natriumpyruvat

Medium für HeLa-Zellen (Humanes Cervix-Adenokarzinom):

Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)

10% FBS

4,5 g/l Glukose

Medium für tHPC:

MEM $\alpha$

10% FBS

50  $\mu$ g/ml Geneticin

10x PBS-EDTA (phosphatgepufferte Salzlösung mit EDTA), pH 7.3:

80 g Natriumchlorid

2 g Kaliumchlorid

2 g Natriumhydrogenphosphat/9,1 g Kaliumhydrogenphosphat

2 g EDTA- Natriumsalz

Titriplex III(C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)x 2 H<sub>2</sub>O

add 1000 ml Aqua demin. (18 MOhm)

1x PBS-EDTA (Phosphatgepufferte Salzlösung mit EDTA):

100 ml 10 x PBS-EDTA

add 1000 ml Aqua demin. (18 MOhm)

10 x CMF-PBS (Kalzium- und magnesiumfreie phosphatgepufferte Salzlösung):

80 g Natriumchlorid

2 g Kaliumchlorid

2 g Kaliumhydrogenphosphat

9,1g Natriumhydrogenphosphat

add 1000 ml Aqua demin. (18 MOhm)

Trypsin 0,25 % in CMF-PBS:

100 ml Trypsin 2,5%

900 ml 10x CMF-PBS

Puffer für die Isolierung von Zellkernen:

Puffer A (Waschpuffer)

10 mmol/L Tris-Cl (pH7,4)

60 mmol/L KCl

1 mmol/L Na-EDTA (pH8,0)

1 mmol/L DTT

Puffer B (für 10ml Lysispuffer) (Präparation von Zytosol)

40 µl NP-40 (100%Lsg)

9,96 ml Puffer „A“

5 mmol/L NaF

1 mmol/L NaVO<sub>4</sub>

1x complete Mini (Protease-Mix)

Puffer C (10ml) (Präparation von Zellkernen)

20 mmol/L Tris-Cl (pH 8,0)

400 mmol/L NaCl

1,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O

1,5 mmol/L Na-EDTA

25% Glycerin

1 mmol/L DTT

5 mmol/L NaF

1 mmol/L NaVO<sub>4</sub>

1x Complete Mini (Protease-Mix)

## Lösungen und Puffer für Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

### Lösungen

40% Acrylamid-Mix (29:1 Acrylamide: Bis-Acrylamide)

Rotiphorese® Gel 40 (29:1) (Roth, Art. #A515.1)

10% Ammoniumpersulfat:

1 g auf 10 ml H<sub>2</sub>O

1 ml Aliquots bei -20°C lagern

TEMED

N,N,N',N' -Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan

Roth, Art. # 2367.3 (für 25ml)

### Puffer

Laemmli – Probenpuffer (Bio-Rad)

161-0737 1x Sample Buffer

161-0791 4x Sample Buffer (in Kombination mit β-Mercapthoethanol oder DTT)

Invitrogen:

NP0007 NuPage LDS Sample Buffer (4x)

NP004 Sample reducing agent (10x)

6x Laemmli-Probenpuffer:

	Stammlösungen	Volumen	Endkonzentration
Tris-HCl, pH 6,8	2M	175 µl	350mM
SDS	0,1g in 280,1µl H <sub>2</sub> O	280,1 µl	10%
Glycerin	87%	344,9 µl	30%
DTT	3M	200 µl	0,6M
Bromphenolblau	1mg		0,1%

Probenauftragspuffer:

950  $\mu$ l 1x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad)

50  $\mu$ l  $\beta$ -Mercapthoethanol

10x SDS – Laufpuffer:

1,92 M Glycin

0,25 M Tris

1 % SDS

Herstellung für 1,0 l

144,13 g Glycin

30,29 g Tris

add 1000 ml Aqua demin. (18 M $\Omega$ m)

Transfer-Puffer (TGM):

Rezept:

192 M Glycin

25 mmol/L Tris- HCl (pH 8,3)

10% Methanol

Herstellung: 750 ml

144,00 ml 1 M Glycin

18,75 ml 1 M Tris- HCl, pH 8,3

150,00 ml Methanol

437,25 ml Aqua demin. (18 M $\Omega$ m)

Waschpuffer TBS für 1,0 l:

Rezept: 150 mmol/L NaCl

25 mmol/L Tris-Cl (pH 7,4)

Herstellung für 1,0 l:

150 ml            1 M NaCl  
25 ml            1 M Tris-Cl (pH 7,4)  
add 1000 ml    Aqua demin. (18 MOhm)

Waschpuffer TBST (TBS + 0,1% Tween 20):

Rezept:

150 mmol            NaCl  
25 mmol            Tris- HCl (pH7,4)  
0.1%                Tween 20

Herstellung für 1,0 l:

150 ml            1 M NaCl  
25 ml            1 M Tris, H<sub>2</sub>NC (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>  
1 ml              Tween 20  
add 1000 ml    Aqua demin. (18 MOhm)

Blocking-Puffer

5 % Milch in TBST

Herstellung:

2,5g    Milchpulver    (Roth, Art.-Nr T145.1)  
50 ml    TBST

Diese Lösung wird immer frisch angesetzt.

Roti-Block

Herstellung:

1 ml    Roti-Block (10X)  
9 ml    Aqua demin. (18 MOhm)

Diese Lösung wird immer frisch angesetzt.

Antikörper – Puffer:

AK in 5% Milch in TBST

Herstellung:

2,5 g Milchpulver

50 ml TBST

Dieser Puffer darf maximal dreimal benutzt, soll bei -20°C gelagert und nur in lauwarmem Wasser aufgetaut werden.

AK in Roti-Block

Herstellung:

1 ml Roti-Block (10X)

9 ml TBST

Diese Lösung wird immer frisch angesetzt.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Arbeiten mit Zellkulturen**

Der Umgang mit transformierten humanen Pulpazellen (tHPC), RAW264.7 Makrophagen und HeLa erfolgte an einer Sicherheitswerkbank (laminar flow). Die jeweiligen Lösungen wurden vor dem Einsatz in der Werkbank steril filtriert. Mehrfach eingesetzte Geräte und Materialien wurden vor Gebrauch mit 70% Ethanol gereinigt. Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden für die Kultivierung der Zellen vor Gebrauch stets vorgewärmt.

### **3.2.2 Zellkultur und Exposition von Zellen**

RAW264.7 Mausmakrophagen (ATCC TIB71) wurden von der deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen und in komplettem RPMI1640 Medium mit L-Glutamin (siehe oben, L-Glutamin, Sodium-pyruvat und 2,0 g/l NaHCO<sub>3</sub> mit 10% FBS (fetal bovine serum) und

Penicillin-Streptomycin-Lösung) kultiviert. Sobald ein subkonfluent Monolayer gewachsen war, wurden die Zellen passagiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Hämozytometer (Zellkammer nach Neubauer). Transformierte humane Pulpazellen (tHPC) wurden routinemäßig im kompletten MEM $\alpha$ -Medium (siehe oben) unter Standardbedingungen kultiviert (10% FBS, Penicillin (100U/ml), Geneticin (50 mg/ml) und Streptomycin (100 mg/ml) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>) (Galler *et al.*, 2006). HeLa-Zellen aus der deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) wurden in komplettem Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) (siehe oben, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 5% FBS, 4,5 g/l Glukose, Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (100 mg/ml) inkubiert. Sobald ein subkonfluent Monolayer gewachsen war, wurden die Zellen passagiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Hämozytometer (Zellkammer nach Neubauer).

### **3.2.3 Herstellung der Expositionslösungen und Exposition der Zellen**

Um eine 10 mmol/L TEGDMA Stammlösung herzustellen, benötigte man 27,6  $\mu$ l TEGDMA (3,81 mol/l) mit 10 ml komplettem Zellkulturmedium. Aus dieser Stammlösung stellte man mit Medium die Expositionslösung mit 1 und 3 mmol/L TEGDMA her.

In analoger Weise wurde die 1  $\mu$ mol/L Camptothecin Lösung angesetzt. Camptothecin wurde in Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung in Aliquots (1mg/ml) tiefgefroren (-20°C). Aus dieser Stammlösung wurde dann in analoger Weise mit dem Medium die Expositionslösung mit 1  $\mu$ mol/L Camptothecin erzeugt. Die RAW264.7 Makrophagen, die transformierten humanen Pulpazellen (tHPC) und die HeLa-Zellen wurden 1 und 3 mmol/L TEGDMA bzw. 1  $\mu$ mol/L Camptothecin-Lösung exponiert. Dies geschah bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 24 Stunden.

### **3.2.4 Ernten der Zellen nach Exposition**

Nach Exposition wurde das Medium (Kulturüberstände) mit der Pipette abgenommen und in 50 ml Falcon-Röhrchen auf Eis gesammelt. Die Zellen auf den Kulturschalen wusch man danach mit 10 ml eiskaltem CMF-PBS. Dieses

Volumen konnte nun mit dem Medium im 50 ml Falcon-Röhrchen (auf Eis) vereint werden. Die adhärennten Zellen auf den Kulturschalen wurden dann mit 3 ml eiskaltem PBS-EDTA (5 mmol) (pH 7,2) überschichtet. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst. Man gab 10 ml PBS-EDTA hinzu, um die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon-Röhrchen auf Eis zu überführen. Die Kulturschale wurde anschließend zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen und die Pufferlösung ebenfalls mit der Zellsuspension im 50 ml Falcon-Röhrchen vereint. Danach wurden alle Röhrchen 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert (HettichRotina 420R; Rotor 4723). Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets in je 500 µl CMF-PBS resuspendiert. Die Pellets, die aus den ursprünglichen Zellkulturüberständen gesammelt wurden, wurden mit den zugehörigen Pellets der adhärennten Zellen vereint, nochmals mit CMF-PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Zellpellets in 500 µl CMF-PBS resuspendiert, in ein Eppendorf-Cup überführt und 5 Minuten bei 2300 U/min zentrifugiert. Danach wurden die Überstände erneut verworfen und die Zellpellets abhängig von ihrer Größe in Lysepuffer (80 - 200 µl) resuspendiert (vgl. 3.2.5).

### **3.2.5 Lyse der Zellen: Isolierung von Kernen und Zytosol**

Die Zellpellets wurden mit 1 ml Lysepuffer (1 Teil Puffer A plus 2 Teile CMF-PBS) resuspendiert und für 5 min auf Eis gestellt. Danach wurde bei 2500 U/min 3 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das neue Pellet wurde in 1 ml Puffer B resuspendiert, für 3 min auf Eis gestellt und danach wieder bei 2500 U/min 3 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand entspricht nun der Zytosolfraktion und wurde in einem neuen Eppendorf-Cup bei -80°C gelagert. Das Pellet wurde wieder in 1 ml Puffer A gewaschen, danach wurde bei 2500 U/min 3 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100-160 µl Puffer C (Kernfraktion) resuspendiert, 2x gevortext und jeweils 5 min auf Eis gestellt. Nach dem Zentrifugieren bei 14000 U/min für 10 min bei 4°C wurde der Überstand (Kernproteine) abgenommen und in einem neuen Eppendorf-Cup bei -80°C gelagert. Der Proteingehalt dieser Fraktionen wurde dann bestimmt und Western-Blotting analysiert (siehe unten).

### 3.2.6 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zelllysaten erfolgte nach dem Prinzip des Bicinchonic Acid Assay (BCA). Dabei ist die Biuret-Reaktion, die Reduktion eines Kupfer<sup>2+</sup> Komplexes zu Kupfer<sup>1+</sup>, mit der Fähigkeit von Bicinchoninsäure, mit Cu<sup>1+</sup>-Ionen einen stabilen Farbkomplex zu bilden, kombiniert (Smith *et al.*, 1985). BCA stellt einen violett-blauen Komplex mit Cu<sup>1+</sup> in basischer Umgebung dar, anhand dessen die Reduktion von basischem Cu<sup>2+</sup> durch Proteine aufgezeigt werden kann. Das kommerziell verfügbare Kit enthält ein Reagens A (B9643) (BCA, sodium carbonate, sodium tartrate, sodium bicarbonate in 0,1 M NaOH, pH 11,25), ein Reagens B (C2284) (4% (w/v) Kupfer<sup>2+</sup>-Sulfatpentahydrat) sowie eine Protein-Standard-Lösung (P0914) (BSA = bovines Serumalbumin; 1 mg/ml BSA in 0,15 M NaCl mit 0,05% Natriumazid). Unmittelbar vor Gebrauch wurde eine Arbeitslösung hergestellt, indem man Reagens A mit Reagens B verdünnte (1:50). Die Proteinbestimmung wurde in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Der Proteinstandard BSA wurde im Lysepuffer in Konzentrationen von 0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 und 1,0 mg/ml in 25 µl in doppelten Ansätzen vorgelegt. Die Proteinproben wurden üblicherweise 1:10 und 1:20 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und von jeder Verdünnung wurden zweimal je 25 µl pro Well pipettiert. Als Kontrolle (Blindprobe) wurde Puffer ohne Protein getestet.

Die Proteinproben (25 µl) wurden mit 200 µl der Arbeitslösung versetzt und auf einem Schüttler bei Raumtemperatur gut gemischt. In den Proben mit hohem Proteingehalt war sofort eine Farbveränderung (lila) zu beobachten. Die Blindprobe behielt die grüne Farbe bei. Die Proben wurden nun im Wärmeschrank für 30 Minuten inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur gekühlt. Die Absorption der Lösungen in den einzelnen Wells wurde bei 562 nm mittels eines Spektral-Photometers der Firma Tecan gemessen und die Proteinkonzentration mittels Standardkurve (BSA-Standards) bestimmt.

### 3.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden mit einem Mini-PROTEAN Tetra Cell System (Bio-Rad) in einem Gel im elektrischen Feld abhängig von ihrer Molekulargröße aufgetrennt. Unter Verwendung des diskontinuierlichen Verfahrens mit dem SDS-PAGE-

System (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System) nach Laemmli (Laemmli, 1970), wurde die Gelelektrophorese in vertikalen Gelkammern durchgeführt. Dieses diskontinuierliche Verfahren besteht aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Der pH-Wert, die Ionenstärke und die Porengröße der Gele können variiert werden. Die Gele enthalten je nach gesuchtem Protein einen höheren oder niedrigeren Polyacrylamidanteil, d.h. je kleiner das gesuchte Protein, umso größer ist der Polyacrylamidanteil und desto engmaschiger ist das Gel. Es wurde eine Gelapparatur der Firma Bio-Rad verwendet. Die Mengen für die Herstellung der Polyacrylamidgele sind auf die Größe dieser Gelapparatur abgestimmt. Für Sammel- und Trenngel in der angegebenen Konzentration wurden folgende Substanzen und Volumina verwendet:

Acrylamidgele:

	Sammelgel	Trenngel			
Volumen	4 ml	11 ml			
Acrylamid-Konz.	5%	5%	10%	12%	15%
40% Acrylamid-Mix	0,5 ml	1,375ml	2,75ml	3,3ml	4,125ml
1,5M Tris pH 8,8	-	2,75ml	2,75ml	2,75ml	2,75ml
1M Tris pH 6,8	0,5ml	-	-	-	-
H <sub>2</sub> O	2,927ml	6,705ml	5,33ml	4,78ml	3,955ml
10% SDS	40µl	110µl	110µl	110µl	110µl
10% Ammoniumpersulfat	30µl	55µl	55µl	55µl	55µl
TEMED	3µl	5,5µl	5,5µl	5,5µl	5,5µl

Bemerkung: Die Volumina sind für die Bio-Rad Mini Gelapparatur errechnet und reichen für zwei Gele.

Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten mit dem Sammelgel nach Routineverfahren überschichtet. Die Proteinproben, üblicherweise 20µg, wurden mit 1x SDS Auftragspuffer (15 µl 1xLaemmli Sample Buffer, Bio-Rad) mit Mercapthoethanol plus 15 µl Proteinprobe) versetzt, für 5min bei 95°C erhitzt (denaturiert) und danach sofort für mindestens 10 min auf Eis gestellt. Als nächstes wurden sie kurz bei 300U/min (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert,

kurz gemischt (Vortex) und anschließend auf das Gel aufgetragen. Als Marker wurde ein Precious-Plus Proteinstandard von Bio-Rad verwendet.

Der Laufpuffer enthielt 25 mmol/L Tris, 192 mmol/L Glycin, 0,1 % SDS (pH 8,02). Die Elektrophorese wurde in der Regel mit einer konstanten Spannung von 70V/Gel gestartet und lief 15 Minuten. Nachdem die Probe vollständig ins Sammelgel eingelaufen war, wurde die Spannung auf 110V/Gel erhöht. Die Proteinauftrennung erfolgte je nach Größe des nachzuweisenden Proteins für 1-1,5 Stunden.

### **3.2.8 Übertragung von Proteinen auf Membranen (Western Blot)**

Die Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran, Whatman) angepasster Größe erfolgte mit einer Apparatur der Firma Bio-Rad (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell) in einem Nassblot-Verfahren („Wet-Tank-Blotting“). Die Nitrocellulose-Membran wurde zunächst in einer Schale in Transferpuffer äquilibriert. Pro Blot wurden zwei Stück Whatman-Papier vorbereitet. Diese wurden ebenfalls in Transferpuffer getaucht und auf die Blotapparatur gelegt. Anschließend folgten die Membranen und das in Transferpuffer äquilibrierte Gel. Den Abschluss des „Sandwiches“ stellten mit Puffer getränkte Schwämme dar. Diese Kassette wurde dann in die mit kaltem Transferpuffer gefüllte Blotkammer überführt. Die Blotkammer wurde während des Transfers mit Eiswasser in einem Kühlbehälter gelagert. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei einer konstanten Stromstärke von 350mA. Die reversible Ponceau-Färbung der Blotmembran mittels Ponceau-S diente der Kontrolle des Proteintransfers.

### **3.2.9 Nachweis von Proteinen auf Membranen durch Immunfärbung**

In der Regel wurden unspezifische Bindungsstellen der Membranen in 5% Milch in TBST für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Tischrüttler blockiert. Die Membran wurde 2x für je 5 Minuten in TBST gewaschen und anschließend mit den primären Antikörpern anti-ATF-2, anti-ATF-3, anti-Phospho-ATF-2, anti-c-Jun, anti-Phospho-c-Jun, p53 (N-Term), p53(Ser15) oder p53(pS46), anti-GAPDH, anti-Lamin A/C, anti-p21, anti-p53(1C12) oder anti-p27 [Kip1] in 10 ml TBST (in 5%

Milch bei Raumtemperatur für zwei Stunden oder über Nacht im Kühlschrank (bei 4°C) inkubiert (Hybridisierung).

Nach der Hybridisierung wurde die Lösung mit dem primären Antikörper entfernt und die Membran dreimal jeweils zehn Minuten mit TBST gewaschen. Schließlich wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem auf die Spezies des primären Antikörpers abgestimmten sekundären Antikörper in 5% Milch in TBST (10ml) inkubiert.

### **3.2.10 Nachweis durch ECL**

Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper wurden mit dem ECL-System (*enhanced chemiluminescent*) von GE Healthcare detektiert. Dazu wurde zunächst die zuletzt mit PBS gewaschene Membran mit der Proteinseite nach oben vorsichtig auf Zellstoff abgetupft. Die ECL-Reagenzien A und B wurden im Verhältnis 1:1 oder 40:1 (ECL Plus) in einem Gesamtvolumen von 4 ml gemischt und so das vom Hersteller empfohlene Verhältnis von 0,125ml/cm<sup>2</sup> Membran erhalten. Diese Lösung wurde nun auf die in einer Plastikbox aufbewahrten Membran gegeben. Daraufhin wurde die Box für eine Minute (5 Minuten bei ECL Plus) bei Raumtemperatur geschwenkt, um eine stets gleichmäßige Benetzung der Membranoberfläche zu gewährleisten. Danach entfernte man die Membran mit einer Pinzette, schwenkte sie kurz und tupfte sie auf Zellstoff ab. Daraufhin legte man sie in eine Entwicklungskassette (Hypercassette Amersham Biosciences) und bedeckte sie mit einer transparenten Folie frei von Luftblasen. Die Kassette wurde geschlossen, um die Membran samt Entwicklungslösung vor Licht zu schützen. In einer Dunkelkammer wurde nun ein lichtempfindlicher Film (Amersham Hyperfilm ECL; GE Healthcare) in die Kassette auf die Membran gelegt und für die gewünschte Zeit (zwischen wenigen Sekunden und wenigen Minuten) exponiert. Nach der Exposition erfolgte die Fixierung und Entwicklung des Films in einer Entwicklungsmaschine.

### **3.2.11 Strippen von Blotmembranen**

Die auf einer Membran gebundenen Antikörper konnten durch Stripping bei Bedarf wieder entfernt werden. Dazu wurde die Membran 3 x 10 Minuten zunächst bei

Raumtemperatur mit PBS gewaschen, um die ECL-Entwicklungslösung zu entfernen. Nach dem Waschen wurde die Membran mit einer mit Wasser 1:10 verdünnten Stripplösung (Re-Blot Plus Mild Solution 10x, Millipore-CHEMICON) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Stripplösung entfernt und die Membran kurz in Wasser, danach 3 x 10 Minuten in PBS gewaschen. Nach dem Entfernen des PBS stand die Membran für eine erneute Immunfärbung - beginnend mit dem Blocking wie oben beschrieben - zur Verfügung.

Das Strippen von Blotmembranen ist vor allem für die Berechnung des Verhältnisses von phosphorylierter Form eines Transkriptionsfaktors zur Gesamtmenge des Transkriptionsfaktors bzw. zur Menge eines Referenzproteins (siehe unten) besonders wichtig. Auf diese Weise werden beide Formen in einem Aliquot eines extrahierten und durch PAGE aufgetrennten Proteingemisches aus demselben Experiment auf derselben Membran nachgewiesen. Das Strippen von Membranen dient auch dazu, etwa durch den Nachweis konstitutiv exprimierter Proteine wie GAPDH oder Lamin A/C auf der gestrippten Membran zu zeigen, dass in jeder Spur dieselbe Menge an Protein separiert wurde und so Unterschiede in der Expression induzierbarer Proteine erkennbar werden. GAPDH stellte in der vorliegenden Versuchsreihe das Referenzprotein für die zytosolische Fraktion, Lamin A/C diente als Standard für die Kernfraktion.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Die Expression von Transkriptionsfaktoren *downstream* von MAPK

#### 4.1.1 Die Expression von c-Jun, ATF-2 und ATF-3 in HeLa

Um die Expression der Transkriptionsfaktoren c-Jun und phospho-c-Jun, ATF-2, phospho-ATF-2 oder ATF-3, nachzuweisen, wurden HeLa-Zellen zunächst mit 1 oder 3 mM TEGDMA oder Camptothecin für 24 Stunden exponiert. Proteine der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt und mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. Dabei zeigte sich, dass die Behandlung mit Camptothecin für 24 Stunden zu einer erhöhten Expression von c-Jun in den Zellkernen im Vergleich zu unbehandelten Zellkulturen führte (Abb. 5). In der zytoplasmatischen Fraktion konnte nur eine sehr schwache Bande c-Juns nachgewiesen werden. Parallel dazu konnte in den Zellkernen die Aktivierung von c-Jun (durch Phosphorylierung) detektiert werden (Abb. 5). Hohe Konzentrationen von TEGDMA (3mM) induzierten ebenfalls die Expression von c-Jun. So war eine in der Kernfraktion deutlich sichtbare Bande von c-Jun erkennbar (Abb. 5). Dies deutet daraufhin, dass TEGDMA die Expression von c-Jun aktiviert, wenn auch weniger stark als die Kontrollsubstanz Camptothecin (Abb. 5).

ATF-2 war im nuklearen Anteil unbehandelter Zellen erkennbar, phospho-ATF-2 und ATF-2 waren allerdings im Zytosol nicht detektierbar (Abb. 5). Gleichzeitig schien die Exposition von Camptothecin für 24 Stunden ATF-2 durch Phosphorylierung zu aktivieren (Abb.5). Die Expression von ATF-3 wurde in der Kernfraktion der HeLa-Zellen nach 24 Stunden Expositionszeit von Camptothecin stark aktiviert, zusätzlich war es ebenfalls als schwache Bande im Zytosol detektierbar (Abb.5). Umgekehrt inhibierte TEGDMA die Expression von phospho-ATF-2 und ATF-2 sowie von ATF-3 (Abb. 5).

Die Expression von Lamin in den Zellkernproben sowie der Nachweis von GAPDH ausschließlich in der zytoplasmatischen Fraktion zeigten die genügend gute Trennung beider Zellfraktionen (Abb. 5). Der Nachweis eines Lamin-Fragments in den mit Camptothecin behandelten Zellkulturen verweist auf die Induktion von Apoptose (Abb. 5).

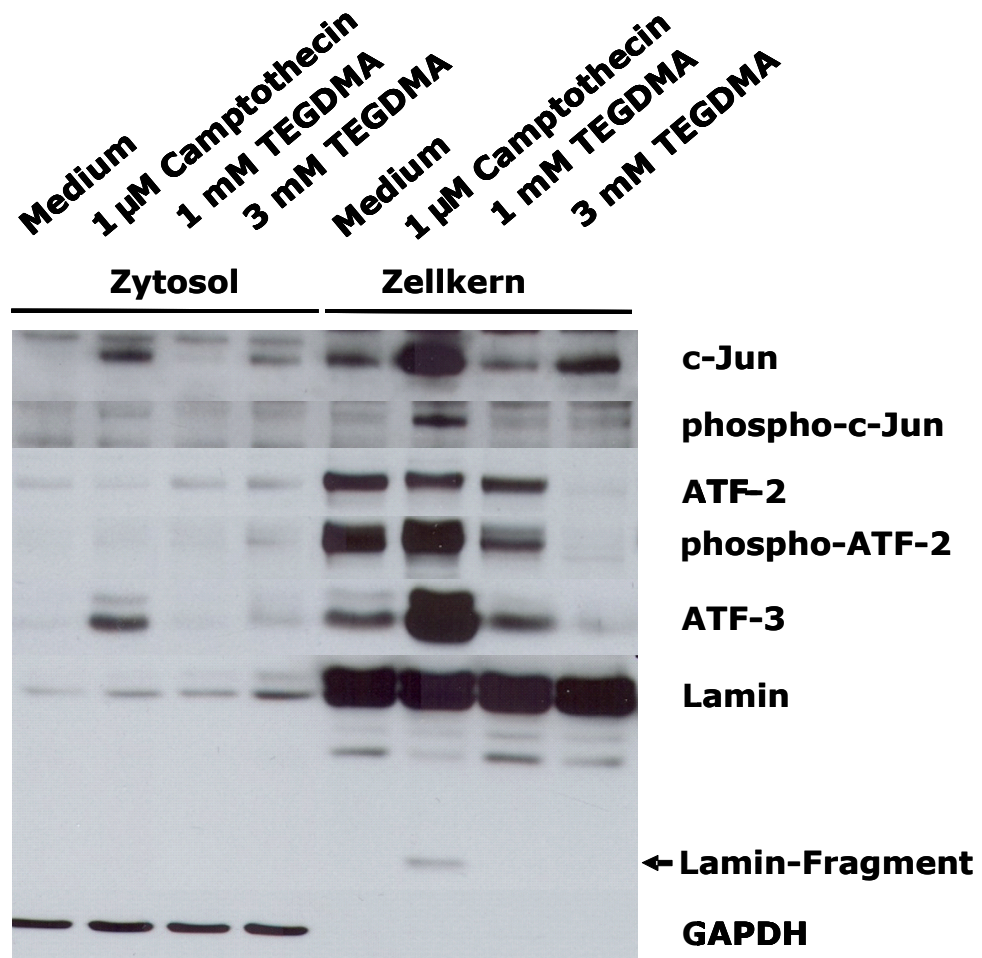


Abbildung 5: Der Einfluss von TEGDMA und Camptothecin auf die Expression von c-Jun, ATF-2 und ATF-3 in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 1 oder 3 mM TEGDMA oder Camptothecin für 24 Stunden exponiert. Proteine der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt und mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. GAPDH und Lamin dienten als Marker für Zytosol oder Zellkerne und zeigen den Grad der Reinheit beider Fraktionen. Die Abbildung zeigt repräsentativ Ergebnisse aus einem von insgesamt drei Experimenten.

#### **4.1.2 Die Expression von c-Jun, ATF-2 und ATF-3 in tHPC**

Die Expression von c-Jun war in transformierten humanen Pulpazellen (tHPC) in den Zellkernen unbehandelter Zellen deutlich nachweisbar (Abb. 6). Eine hohe Konzentration von 3mM TEGDMA schien nach einer Expositionszeit von 24 Stunden im Zellkern die Expression von c-Jun und phospho-c-Jun (anders als in der HeLa-Zelllinie) zu inhibieren (Abb. 6). Camptothecin führte zu keiner deutlichen Erhöhung der Expression von c-Jun oder seiner aktivierten Form (phospho-c-Jun) (Abb. 6).

In der tHPC-Zelllinie konnte c-Jun ebenfalls im Zytosol detektiert werden, während phospho-c-Jun nicht nachweisbar war (Abb. 6). ATF-2 und phospho-ATF-2 wiederum wurden in den Zellkernen nachgewiesen, im Zytosol allerdings war lediglich eine sehr schwache Bande für ATF-2 detektierbar (Abb. 6). Hierbei war auffällig, dass eine Inhibition der Expression von ATF-2 und phospho-ATF-2 in Zellkulturen stattfand, die Camptothecin oder 3mM TEGDMA-Lösung exponiert worden waren (Abb. 6).

Ähnlich wie in der HeLa-Zelllinie wurde die Expression von ATF-3 in den tHPC nur in der Kernfraktion von Camptothecin deutlich stimuliert (Abb. 6). Im Zytosol war ATF-3 nicht detektierbar (Abb. 6). TEGDMA hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Expression von ATF-3 (Abb. 6). Die Expression von Lamin in den Zellkernen sowie der Nachweis von GAPDH ausschließlich im Zytosol zeigten wiederum die genügend gute Trennung beider Zellfraktionen (Abb. 6). Ein Fragment von Lamin in den Camptothecin exponierten Zellkulturen wurde hier nicht nachgewiesen (Abb. 6).

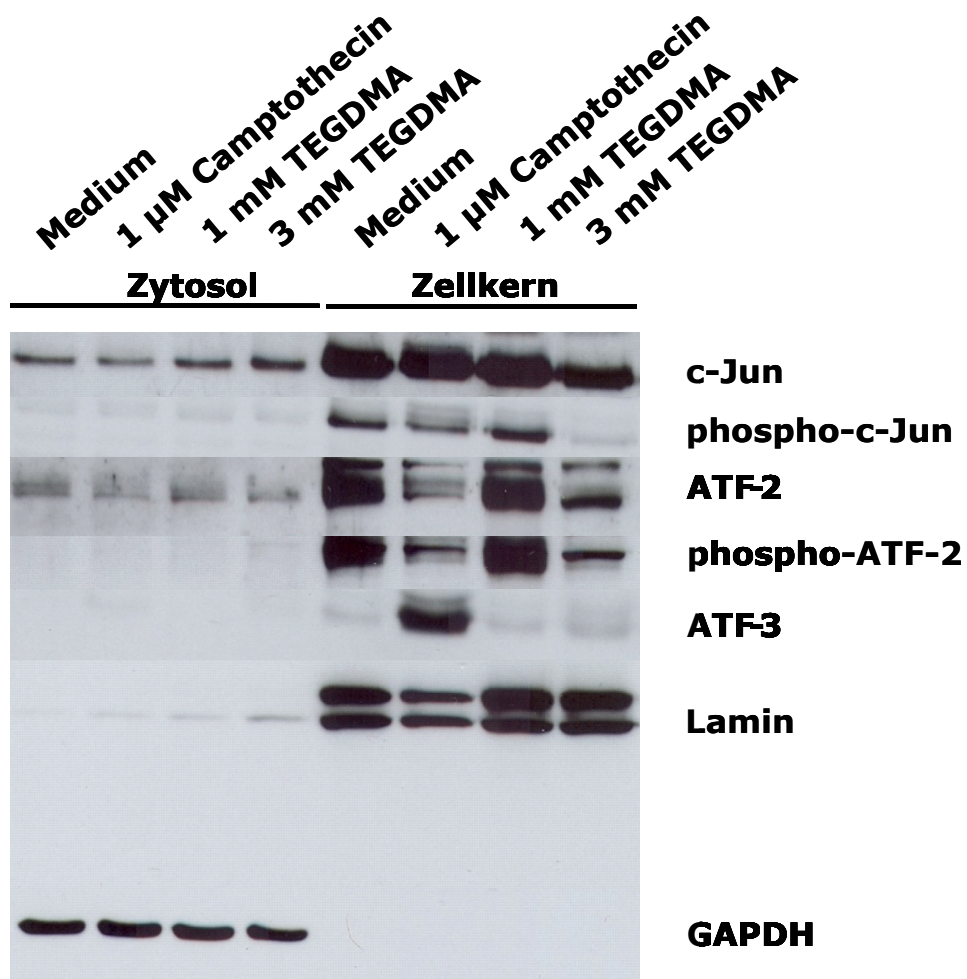


Abbildung 6: Der Einfluss von TEGDMA und Camptothecin auf die Expression von c-Jun, ATF-2 und ATF-3 in tHPC. Die Zellen wurden 1 oder 3 mM TEGDMA oder Camptothecin für 24 Stunden exponiert. Proteine der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt und mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. GAPDH und Lamin dienten als Marker für Zytosol oder Zellkerne und zeigen den Grad der Reinheit beider Fraktionen. Die Abbildung zeigt repräsentativ Ergebnisse aus einem von insgesamt drei Experimenten.

#### **4.1.3 Die Expression von c-Jun, ATF-2 und ATF-3 in RAW264.7 Mausmakrophagen**

RAW264.7 Mausmakrophagen exprimierten nach einer Expositionszeit von 24 Stunden c-Jun im Zytosol nur schwach (Abb. 7). Dagegen konnte keine Expression im Zytosol für die Transkriptionsfaktoren ATF-2, die aktivierte Form phospho-ATF-2 oder ATF-3 detektiert werden (Abb. 7). Im Unterschied dazu wurden c-Jun, ATF-2 und ATF-3 in den Zellkernen unbehandelter Zellkulturen deutlich exprimiert. TEGDMA und Camptothecin reduzierten die Expression von c-Jun, ATF-2 und ATF-3 (Abb. 7). Die Inhibition der Expression des aktivierten phospho-ATF-2 war sogar noch deutlicher als diejenige von ATF-2 (Abb. 7). Nach 24-stündiger Exposition gegen 1 $\mu$ M Camptothecin war im Zellkern eine deutliche, aber reduzierte Bande c-Juns erkennbar (Abb. 7). In analoger Weise konnte dies bei ATF-2, phospho-ATF-2 und ATF-3 detektiert werden (Abb. 7).

Die Expression von Lamin in den Zellkernen sowie der Nachweis von GAPDH ausschließlich im Zytosol zeigten die genügend gute Trennung beider Zellfraktionen (Abb. 7). Der Nachweis eines Lamin-Fragments in den mit TEGDMA behandelten Zellkulturen verweist auf die Induktion von Apoptose (Abb. 7).

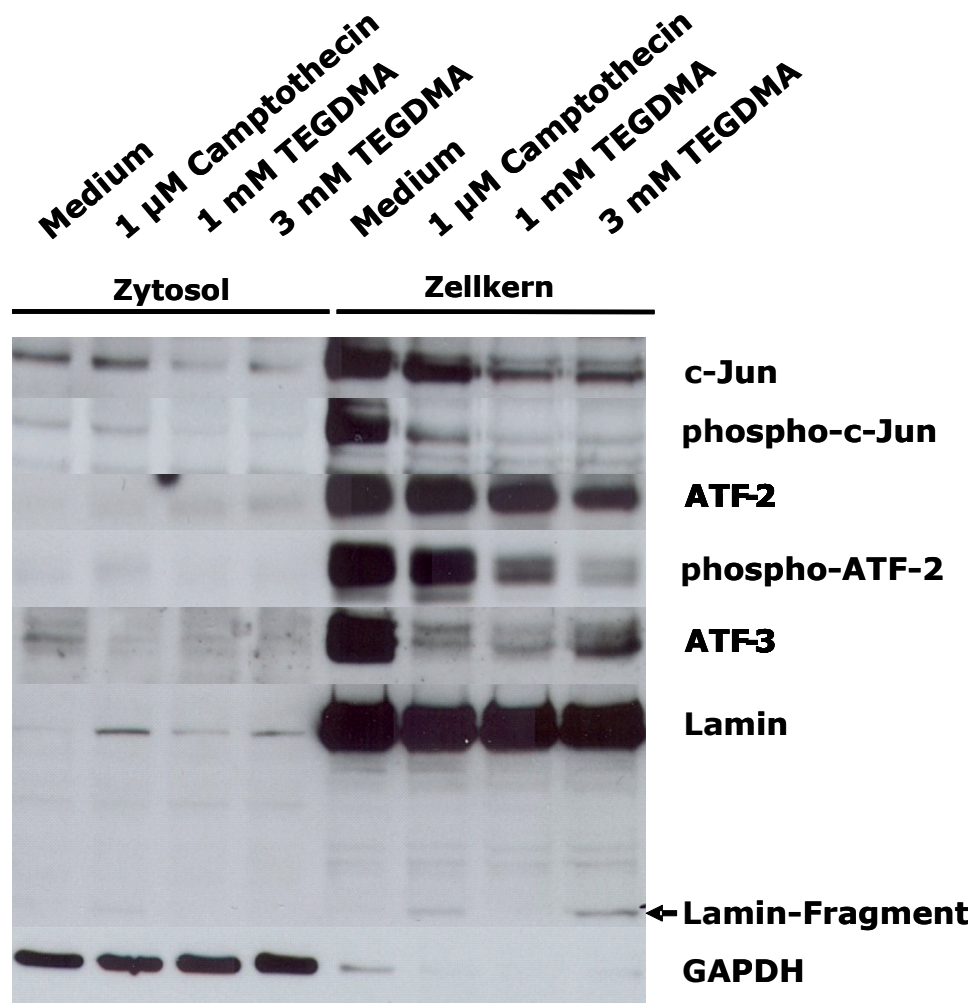


Abbildung 7: Der Einfluss von TEGDMA und Camptothecin auf die Aktivierung von c-Jun, ATF-2 und ATF-3 in RAW264.7 Mausemakrophagen. Die Zellen wurden 1 oder 3 mM TEGDMA oder Camptothecin für 24 Stunden exponiert. Proteine der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt und mit spezifischen Antikörpern im Western-Blot detektiert. GAPDH und Lamin dienten als Marker für Zytosol oder Zellkerne und zeigen den Grad der Reinheit beider Fraktionen. Die Abbildung zeigt repräsentativ Ergebnisse aus einem von insgesamt drei Experimenten.

## 4.2 Die Expression von p53 und p21

### 4.2.1 Die Expression von p53 und p21 in HeLa

Um die Expression des Transkriptionsfaktors p53 und des p21 Proteins nachzuweisen, wurden HeLa-Zellen 1 oder 3 mM TEGDMA oder Camptothecin für 24 Stunden exponiert. Proteine der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt und mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. p53 wurde in Kulturen, die mit Camptothecin vorbehandelt worden waren, exprimiert, und eine besonders starke Expression zeigte sich in den Zellkernen (Abb. 8). Bemerkenswert war auch die Expression von p53 in Zellkernen in Anwesenheit beider TEGDMA-Konzentrationen (Abb. 8). Eine Expression von p53Ser15 und p53Ser46 war auch in Zellkernen von Zellkulturen, die Camptothecin exponiert worden waren, detektierbar (Abb. 8).

Während die Expression einer posttranslationalen Modifikation von p53 (p53Ser15) in TEGDMA-exponierten HeLa-Zellen unter den hier beschriebenen experimentellen Bedingungen nicht detektierbar war, konnte p53(Ser46) in unbehandelten und in mit 1 mM TEGDMA behandelten HeLa-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 8). Der p53-induzierbare Cyclin-abhängige Kinase (CDK)-Inhibitor p21 wurde im Zytosol und im nuklearen Anteil unbehandelter HeLa-Zellen exprimiert (Abb. 8). Die Expression von p21 war in Zellkernen von Zellen, die mit Camptothecin behandelt wurden erhöht. Auch eine hohe TEGDMA-Konzentration führte zu einer verstärkten Expression von p21 in den Zellkernen und im Zytoplasma (Abb. 8).

Die Expression von Lamin in den Zellkernen sowie der Nachweis von GAPDH ausschließlich im Zytosol zeigten erneut die genügend gute Trennung beider Zellfraktionen (Abb. 8). Der Nachweis eines Lamin-Fragments in den mit Camptothecin behandelten Zellkulturen verweist auf die Induktion von Apoptose (Abb. 8).

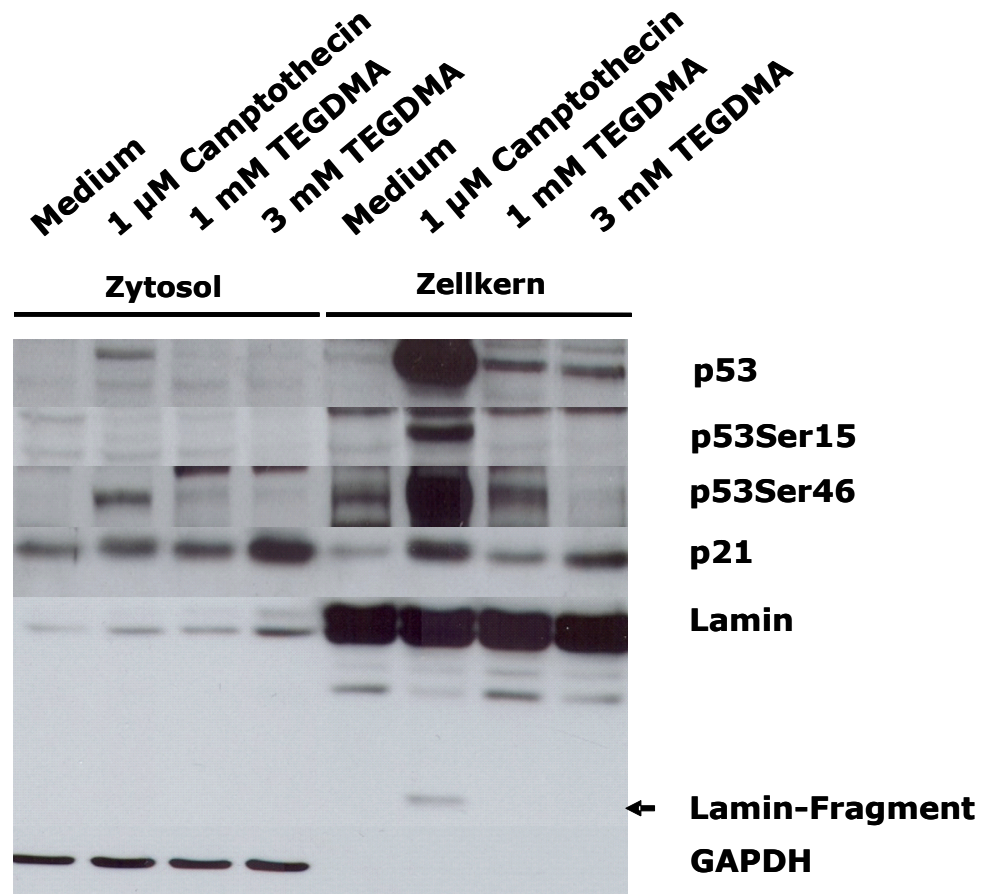


Abbildung 8: Der Einfluss von TEGDMA und Camptothecin auf die Aktivierung von p53 und p21 in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 1 oder 3 mM TEGDMA oder Camptothecin für 24 Stunden exponiert. Proteine der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt und mit spezifischen Antikörpern im Western-Blot detektiert. GAPDH und Lamin dienten als Marker für Zytosol oder Zellkerne und zeigen den Grad der Reinheit beider Fraktionen. Die Abbildung zeigt repräsentativ Ergebnisse aus einem von insgesamt drei Experimenten.

#### 4.2.2 Die Expression von p53 und p21 in tHPC

In unbehandelten tHPC-Zellen war nach einer Expositionszeit von 24 Stunden der Transkriptionsfaktor p53 in Zellkernen und in der zytoplasmatischen Fraktion nachweisbar. Möglicherweise war die Expression von p53 in den Zellkernen nach Exposition gegen TEGDMA leicht erhöht (Abb. 9). Die Phosphorylierung von p53 an Ser15 konnte in allen Zellfraktionen gezeigt werden (Abb.9). Während für Camptothecin eine etwas stärkere Proteinbande für p53Ser15 im Zytosol detektiert wurde, induzierte TEGDMA p53Ser15 in den Zellkernen geringfügig stärker (Abb. 9). Ein ähnliches Muster der Expression war für p53Ser46 erkennbar. Während für Camptothecin eine etwas stärkere Proteinbande für p53Ser46 im Zytosol detektiert wurde, induzierte TEGDMA p53Ser46 in den Zellkernen etwas stärker (Abb. 9). Die Expression von p21 wurde in den Zellkernen unbehandelter Zellkulturen nur sehr schwach nachgewiesen, stieg aber in Kulturen an, welche mit Camptothecin und vor allem TEGDMA vorbehandelt worden waren. Camptothecin führte zu einer deutlich erhöhten p21 Expression im Zytoplasma, während TEGDMA die Expression weniger stark induzierte (Abb. 9). Die Expression von Lamin in den Zellkernen sowie der Nachweis von GAPDH ausschließlich im Zytosol zeigten die genügend gute Trennung beider Zellfraktionen. Fragmente von Lamin wurden hier nicht detektiert (Abb. 9).

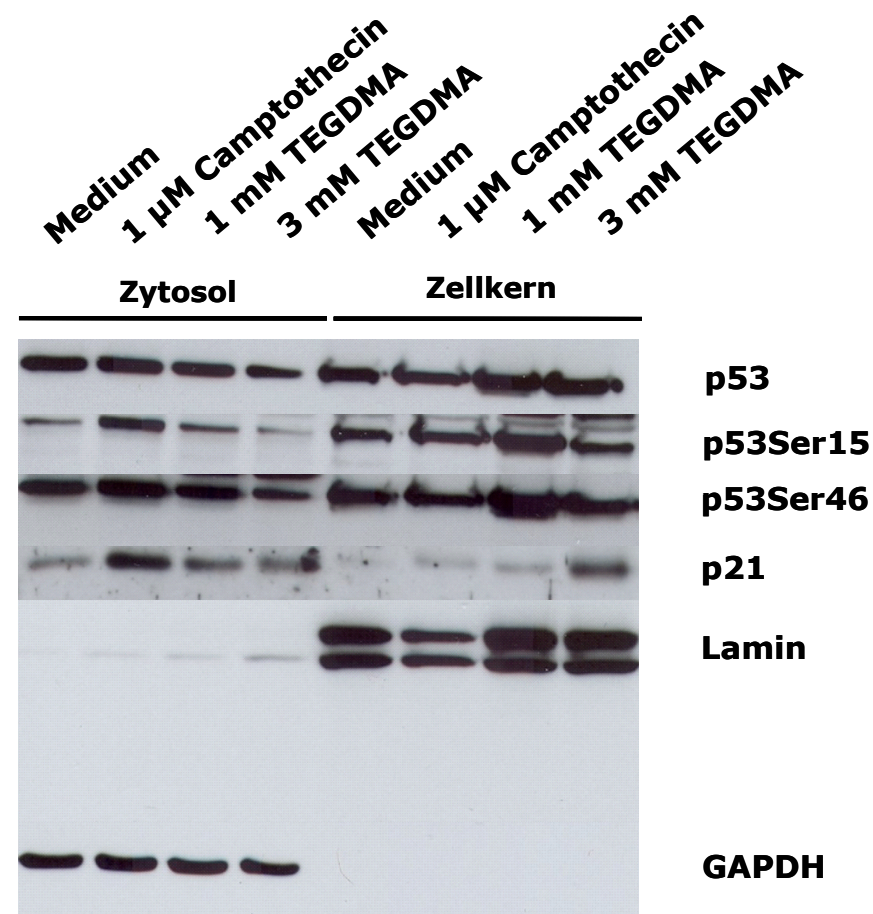


Abbildung 9: Der Einfluss von TEGDMA und Camptothecin auf die Aktivierung von p53 und p21 in tHPC. Die Zellen wurden 1 oder 3 mM TEGDMA oder Camptothecin für 24 Stunden exponiert. Proteine der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt und mit spezifischen Antikörpern im Western-Blot detektiert. GAPDH und Lamin dienten als Marker für Zytosol oder Zellkerne und zeigen den Grad der Reinheit beider Fraktionen. Die Abbildung zeigt repräsentativ Ergebnisse aus einem von insgesamt drei Experimenten.

#### **4.2.3 Die Expression von p53 und p21 in RAW264.7 Mausmakrophagen**

In unbehandelten RAW264.7 Mausmakrophagen war nach einer Expositionszeit von 24 Stunden der Transkriptionsfaktor p53 in den Zellkernen nachweisbar. Durch die Exposition gegen Camptothecin wurde p53 sehr stark und mit 1 mM TEGDMA leicht erhöht exprimiert (Abb. 10). Eine starke Bande für p53 wurde ebenfalls im Zytosol von Zellen, die mit Camptothecin behandelt worden waren, nachgewiesen (Abb.10). Die Expression von p53Ser15 war nach Exposition der Zellen gegen Camptothecin im Zellkern detektierbar. Ein Effekt von TEGDMA war hier nicht eindeutig nachweisbar (Abb. 10). Für die Diagnostik in Mauszellen steht bislang kein Antikörper zur Verfügung, der spezifisch für den Nachweis von p53Ser46 eingesetzt werden kann, so dass die Expression von p53Ser46 nicht untersucht werden konnte. Nach der Exposition mit Camptothecin war lediglich eine deutliche Bande von p21 im Zytosol nachweisbar (Abb. 10).

Die Expression von Lamin in den Zellkernen sowie der Nachweis von GAPDH ausschließlich im Zytosol zeigten die genügend gute Trennung beider Zellfraktionen (Abb.10). Ein Spaltprodukt von Lamin A war im nuklearen Anteil der mit 3 mM TEGDMA oder Camptothecin exponierten RAW264.7 Zellen zu finden (Abb. 10).

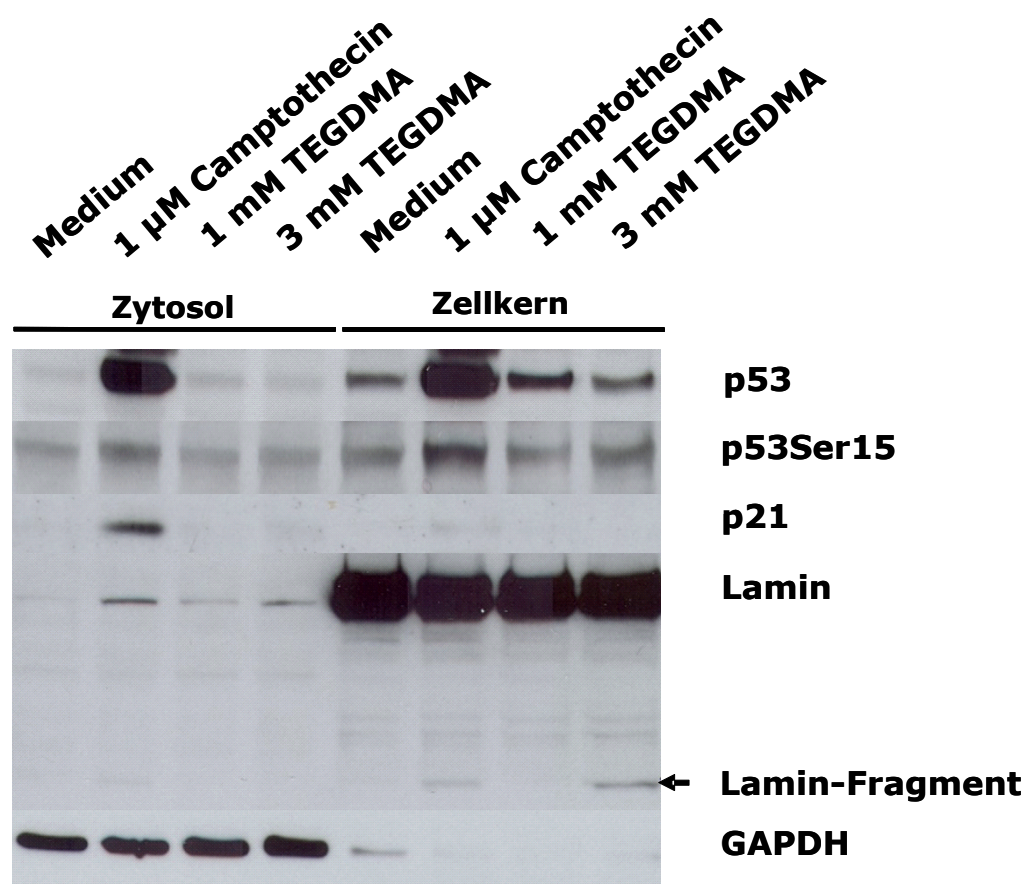


Abbildung 10: Der Einfluss von TEGDMA und Camptothecin auf die Aktivierung von p53 und p21 in RAW264.7-Mausmakrophagen. Die Zellen wurden 1 oder 3 mM TEGDMA oder Camptothecin für 24 Stunden exponiert. Proteine der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt und mit spezifischen Antikörpern im Western-Blot detektiert. GAPDH und Lamin dienten als Marker für Zytosol oder Zellkerne und zeigen den Grad der Reinheit beider Fraktionen. Die Abbildung zeigt repräsentativ Ergebnisse aus einem von insgesamt drei Experimenten.

## 5. Diskussion

Monomere dentaler Kunststoffe wie HEMA oder TEGDMA verursachen eine Vielzahl zytotoxischer Reaktionen in eukaryotischen Zellen. Letzteres konnte in zahlreichen in-vitro Studien festgestellt werden. Die verschiedenen Zellreaktionen bezogen sich auf Zytotoxizität, Apoptose, Genotoxizität und die Hemmung bzw. Störung von Funktionen der Zellen des angeborenen Immunsystems. Eine Hypothese besagt, dass dentale Monomere vermittelt durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) unterschiedliche Auswirkungen auf lebenswichtige Zellreaktionen besitzen. Dies geschieht wahrscheinlich durch eine komplexe redox-sensitive Regulation spezifischer Zellfunktionen (Schweikl *et al.*, 2006). ROS entstehen physiologisch aufgrund einer unvollständigen Reduktion von molekularem Sauerstoff, meist entstehen Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) oder hochreaktive Hydroxylradikale ( $HO^\cdot$ ) (Droge, 2002; Genestra, 2007). Sie werden somit nicht nur als zelluläre Antwort auf exogene Stresssignale erzeugt, sondern sind auch Produkte des physiologisch-aeroben Stoffwechsels eukaryotischer Zellen. Sie bilden ein biologisches Paradoxon, nicht nur toxisch, sondern auch als Signalmolekül zu wirken. So können beispielsweise ROS chemisch mit Atomen der Zielproteine reagieren und zu kovalenten Proteinmodifikationen führen. Neben nachteiligen Effekten auf Lipide und Proteine interagieren ROS wahrscheinlich mit Teilen der DNA (Memisoglu und Samson, 2000; Wilson *et al.*, 2003). Es entstehen schwere Schäden, wie Doppelstrangbrüche, Basenmodifikationen oder DNA-Protein-Quervernetzungen, welche eine Destabilität des Genoms bewirken können (Tsunoda *et al.*, 2010; Berquist und Wilson, 2012). Es wurde gezeigt, dass verschiedene Kunststoffmonomere genotoxische und mutagene Wirkungen *in vitro* induzieren können (Schweikl *et al.*, 2006).

Gegen die oben beschriebenen nachteiligen Effekte von ROS haben eukaryotische Zellen eine Vielzahl von komplexen redox-sensitiven Regulationen spezifischer Zellfunktionen entwickelt (Schweikl *et al.*, 2006). Dabei gilt die intrazelluläre Redox-Homöostase als ein Indiz für die angemessene Zellfunktion und wird durch ein hochkomplexes System antioxidativer nichtenzymatischer und enzymatischer Komponenten gesteuert (Halliwell, 1999; Circu und Aw, 2010). Glutathion (GSH), ein Tripeptid, welches aus Glycin, Cystein und Glutamat

besteht, nimmt die wichtigste Funktion in der Redoxregulation ein (Forman *et al.*, 2009; Lu, 2009). Die antioxidativen Eigenschaften von GSH werden durch die reversible Oxidation der Sulfhydrylgruppe (-SH) gewährleistet (Brigelius-Flohe, 1999; Lu, 2009).

Die Rolle der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) für die monomer-induzierte Apoptose ist bisher nur in einigen Einzelheiten untersucht worden (Samuelsen *et al.*, 2007; Eckhardt *et al.*, 2009; Krifka *et al.*, 2010). So wurde kürzlich festgestellt, dass die extrazellulären Signal-regulierenden Kinasen (ERK1/2) und die Stress-aktivierten Kinasen p38 und JNK in Mausmakrophagen abhängig von der Expositionsdauer differenziell phosphoryliert wurden. Lange Expositionen der RAW264.7 Zellkulturen gegen TEGDMA führten zu einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 und p38. Es wurde angenommen, dass diese Aktivierung im Zusammenhang mit der Induktion von Apoptose stehen könnte, welche parallel mit der Expositionsdauer zunahm (Krifka *et al.*, 2010).

Es könnte die Möglichkeit bestehen, dass die größere Anfälligkeit von RAW264.7 Makrophagen gegen TEGDMA im Zusammenhang mit der Herunterregulation der Stress-aktivierten Transkriptionsfaktoren ATF-2 und ATF-3 steht. Dies soll im Folgenden diskutiert werden. Zudem konnten Unterschiede in der Wirksamkeit von TEGDMA und Camptothecin festgestellt werden, die wahrscheinlich auf unterschiedliche Mechanismen ihrer Wirkung in der jeweiligen Zelllinie zurückzuführen sind. Die Unterschiede zwischen der Wirksamkeit von TEGDMA und Camptothecin in RAW264.7 Makrophagen, tHPC und HeLa-Zellen heben die verschiedenen Mechanismen der Zelllinien hervor. Es wurde berichtet, dass Camptothecin während der DNA-Synthese über die Spaltung des DNA-Strangs den Zelltod über den Weg der Apoptose hervorruft (Legarza und Yang, 2006). Dagegen zeigt die hier beschriebene Hypothese einen anderen Weg über die Induktion des Zelltodes durch TEGDMA auf, die von einem indirekten Mechanismus durch die Erzeugung von ROS ausgeht (Schweikl *et al.*, 2006).

Die konzentrationsabhängige Abnahme der Zahl an vitalen Zellen nach langen Expositionszeiten korrelierte mit der Aktivierung der MAPK in Gegenwart von TEGDMA. Dies gilt sowohl in Mausmakrophagen als auch in transformierten humanen Pulpazellen (tHPC) (Krifka *et al.*, 2010). Wahrscheinlich induzierte

TEGDMA die Apoptose in primären humanen Pulpazellen nicht über den ERK1/2 Signalweg, da der Anteil der Zellen, welche in Apoptose gingen, nach der pharmakologischen Inhibition dieses Weges nicht verändert wurde (Spagnuolo *et al.*, 2004a). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass ERK1/2 als *pro-survival-factor* aktiviert wurde, wenn Zellen auf eine hohe TEGDMA-Konzentrationen mit der anhaltenden Aktivierung der Stress-Kinasen p38 oder JNK reagierten. (Spagnuolo *et al.*, 2004a; Krifka *et al.*, 2010). Neben der Bedeutung von MAPK für die monomer-induzierte Apoptose, könnte die Aktivierung von ERK1/2 und p38 in THP-Monozyten nach Exposition gegen TEGDMA auch für Reaktionen des zellulären Immunsystems bedeutsam sein. Es wurde beobachtet, dass TEGDMA die Freisetzung der Zytokine TNF-alpha, IL-6 und IL-10 inhibierte. Die Aktivierung der MAPK wurde allerdings in Anwesenheit des Radikalfängers NAC reduziert (Eckhardt *et al.*, 2009). Es wird diskutiert, ob die Aktivierung der MAPK durch TEGDMA in den Zellen des angeborenen Immunsystems durch ROS indiziert wird.

Aufgrund dieser unterschiedlichen Phänomene wie Genotoxizität, der Störung von Funktionen in Zellen des Immunsystems oder die Induktion von Apoptose wurde die Hypothese entwickelt, dass die Aktivierungen dieser unterschiedlichen Zellreaktionen auf verschiedene Monomer-induzierte Stresssignale zurückzuführen sind, die über MAPK vermittelt werden. So kann vermutet werden, dass über MAPK geeignete nachgeschaltete Zielgene spezifisch aktiviert werden können.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Analyse der Monomer-induzierten Expression von Transkriptionsfaktoren mit der damit assoziierten Induktion der Apoptose eine Erweiterung unseres Verständnisses der molekularen Zellmechanismen sein. Neben MAPK und Transkriptionsfaktoren *downstream* könnte alternativ dazu, infolge von oxidativen DNA-Schäden auch die Expression des Tumorsuppressors p53 in monomer exponierten Zellen aktiviert sein. Als „Wächter des Genoms“ ist p53 ein wichtiges regulatorisches Protein in der Koordination Monomer-induzierter Zellantworten (Lavin und Gueven, 2006; Krifka *et al.*, 2011). Neben der Aktivierung auf der Transkriptionsebene wird p53 *upstream* durch posttranslationale Modifikation wie die Phosphorylierung an Ser15 und Ser46 durch ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), aktiviert. Die vielen

Funktionen von p53 umfassen die Regulation der Expression von Proteinen für die DNA-Reparatur, die Zellzyklusprogression oder die Induktion von Apoptose (Toledo und Wahl, 2006; Kruse und Gu, 2009; Nyberg *et al.*, 2002; Roos und Kaina, 2006). Dabei ist die Phosphorylierung von p53 an Ser15 verbunden mit der Induktion der Expression von p21, einem Inhibitor der Zellproliferation (Lavin und Gueven, 2006; Gartel, 2009).

### **5.1 Die TEGDMA induzierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zusammenhang mit DNA-Schäden**

Während in der vorliegenden Arbeit die Expression von p53 in der Zellkernfraktion der HeLa-Zelllinie durch Camptothecin stark gesteigert war, erhöhte das Monomer TEGDMA die Expression von p53 nur schwach. p53 konnte nicht in der zytoplasmatischen Fraktion der HeLa-Zelllinie detektiert werden. Camptothecin steigerte die Expression von p53 sowohl in dem Zellkern der tHPC-Zelllinie als auch in den RAW264.7 Mausmakrophagen, TEGDMA hingegen führte nur zu einer geringen Expression von p53. Camptothecin stimulierte ebenso die Entstehung von phosphorylierten p53 an Ser15 und Ser46 in Zellkernen. Dagegen war offensichtlich die Aktivierung von p53 in TEGDMA exponierten HeLa-Zellen unter den vorliegenden Versuchsbedingungen sehr schwach. Diese Ergebnisse der verschieden starken Expression verweisen auf unterschiedliche Mechanismen der Aktivierung von p53 durch TEGDMA und Camptothecin.

Die Beobachtungen mit HeLa-Zellen und RAW264.7 Mausmakrophagen in der vorliegenden Arbeit bestätigen frühere Studien anderer Autoren. Es zeigten sich niedrige Spiegel von p53 in Kontrollzellen durch eine Degradierung durch das Proteasom (Lavin und Gueven, 2006). Die allerdings relativ hohe Expression von p53 sowohl im Zellkern als auch in der zytoplasmatischen Fraktion von tHPC-Zellen ist wahrscheinlich die Konsequenz des Transformationsprozesses primärer Pulpazellen. Die Transformation dieser Zellen mit dem Virusonkogen SV40 T-Ag resultierte in der Erzeugung der stabilen Zelllinie tHPC mit einer verlängerten Lebensdauer in Kultur aufgrund der Bindung von SV40 T-Ag an p53 und pRb (Retinoblastom) (Galler *et al.*, 2006).

Camptothecin und TEGDMA erhöhten auch die Expression von p53 in tHPC-Zellen. Außerdem wurde eine schwache Erhöhung der Expression von p53Ser46 in den Zellkernen der HeLa-Zelllinie, die mit Camptothecin und TEGDMA exponiert waren, festgestellt. Aus der Phosphorylierung von Ser46 könnte der Schluss gezogen werden, dass diese besondere Aktivierung von p53 im Zusammenhang mit dem Beginn der p53-abhängigen Apoptose nach oxidativer DNA-Schädigung steht und dadurch die Aktivierung der Apoptose-Zielgene PUMA und Noxa stattgefunden haben könnte (Yu und Zhang, 2008). Dieser Mechanismus der Monomer-induzierten Apoptose, auf dem möglicherweise die beobachteten Wirkungen von Monomeren wie TEGDMA oder HEMA basieren, wird momentan in einem Folgeprojekt experimentell bearbeitet.

In der HeLa-Zelllinie als Kontrollzelllinie wurde auch die Expression von p53Ser15 deutlich detektiert. Dieselbe Art der Phosphorylierung von p53 in tHPC und RAW264.7 Makrophagen erfolgt sehr wahrscheinlich durch ATM als Antwort auf eine Monomer-induzierte oxidative DNA-Schädigung (Lavin und Gueven, 2006). Für den Bereich der Zahnheilkunde wurde die Expression von ATM und p53Ser15 in einer Speicheldrüsen-Zelllinie nach langer HEMA-Exposition festgestellt (Samuelsen *et al.*, 2008). Nach dem derzeitigen Paradigma wird die Aktivierung von ATM, einem Mitglied der *phosphoinositide 3-kinase-like* Familie der Serin/Threonin Protein-Kinase durch Autophosphorylierung als Erstantwort auf DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) induziert. In der Folge aktiviert ATM seinerseits eine Reihe von *downstream* gelegenen Zielen darunter das Histon H2AX, das als Marker für DNA-Doppelbrüche (DSBs) gilt. Des Weiteren aktiviert ATM die Checkpoint-Kinase Chk2 und andere Ziele wie p53, das dann je nach Stärke des ursprünglichen Schadens entweder den Zellzyklus über p21 oder aber apoptotische Prozesse reguliert (Shiloh, 2003; Tanaka *et al.*, 2007).

p21 wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl in der zytoplasmatischen als auch in der nuklearen Fraktion un behandelter Zellen detektiert. Durch die Vorbehandlung mit TEGDMA und Camptothecin konnte eine Erhöhung der Expression von p21 sowohl in der Kern- als auch in der zytoplasmatischen Fraktion festgestellt werden. p21 spielt eine duale Rolle in der Zellzyklus-Sequenz, weil es die DNA-Synthese und die CDK Aktivität reguliert. Zudem wird es als zellstabilisierend beschrieben. Differenzierte Makrophagen enthalten eine relativ große Menge an p21 und werden nur in geringem Grad mit Apoptose in Verbindung gebracht.

Zudem ist die zelluläre Lokalisation von p21 ein wichtiger Teil der Kontrolle der verschiedenen Funktionen des Proteins. Während die nukleäre p21-Funktion streng in Bezug zur Zellzyklusprogression einzuordnen ist, ist die zytoplasmatische p21-Fraktion an der Regulation des Zellüberlebens beteiligt. p21 bildet im Zytosol vermutlich einen Komplex mit der Apoptose-regulierenden Signalkinase (ASK1), welche die Stress-aktivierbare MAPK p38 inhibiert. So wurde gezeigt, dass p21 Zellen vor dem Zelltod schützen kann. Dies bezieht sich sowohl auf zytotoxische Agenzien als auch auf ionisierende Strahlung (Asada *et al.*, 1999; Zhan *et al.*, 2007). Man darf daher auch annehmen, dass die relativ hohen Mengen an p21, die hier in der zytoplasmatischen Fraktion detektiert wurden, als Zellantwort und Schutz vor der Zellschädigung durch TEGDMA zu interpretieren sind. Dieses Ergebnis könnte mit dem Spaltprodukt von Lamin in Verbindung stehen, das auf die Induktion von Apoptose verweist und in TEGDMA-behandelten RAW264.7 und in den mit Camptothecin behandelte HeLa-Zellen nachgewiesen wurde. Lamin A/C und GAPDH wurden als spezifische Marker für den nuklearen Anteil und für die zytoplasmatische Fraktion genutzt. Die Spaltung von Lamin wurde in verschiedenen Ausgangszuständen detektiert und es wird angenommen, dass dies eine spezifischen Rolle im nuklearen Apoptose-Prozess spielt (Rao *et al.*, 1996).

## **5.2 Die TEGDMA induzierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zusammenhang mit der Aktivierung der MAPK**

Zelluläre Stressreaktionen werden durch die Aktivierung von Signaltransduktionswegen vermittelt. Diese sind in der Lage, neben vielen anderen auch die Expression von „*immediate early genes*“ zu regulieren. Sie codieren für Transkriptionsfaktoren, welche ihrerseits *downstream* die Aktivierung von Genprodukten steuern. Diese Proteine regulieren letztlich Apoptose oder unterstützen das Zellüberleben. Kürzlich wurde berichtet, dass die Induktion der „*immediate early genes*“ wie c-Jun und c-Fos und die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren ATF-2 und ATF-3 sehr weitreichend, also durch verschiedenste externe und interne Faktoren induzierbar waren. Diese Faktoren können Serum, Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Phorbolster, aber auch

ionisierende Strahlung und pharmakologische Noxen sein. Die MAPK ERK1/2 und die Stress-aktivierbaren Proteinkinasen JNK (c-Jun N-terminal Kinase) und p38 könnten als *second messenger* in dieser Signalkaskade der Aktivierung von „*immediate early genes*“ dienen (Whitmarsh, 2007). So wird beispielsweise der Transkriptionsfaktorkomplex AP-1, der als Homo- oder Heterodimer aus Fos/Jun oder Mitgliedern der ATF-Familie vorliegt, über die Phosphorylierung von Jun durch JNK aktiviert. Der JNK/Jun-Weg reguliert verschiedenste Zielgene mit AP1-Bindungsstellen, einschließlich Zellzyklus-, Apoptose- und Zellüberlebensgene (Whitmarsh, 2007; Wagner und Nebreda, 2009).

In der vorliegenden Untersuchung wurde gezeigt, dass Camptothecin die Expression des Proto-Onkoproteins c-Jun im Zellkern von HeLa-Zellen steigerte. Dagegen konnte nicht beobachtet werden, dass die Expression von phospho-c-Jun oder c-Jun durch TEGDMA erhöht wurde. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Beobachtungen überein, die zeigten, dass Camptothecin, das inhibierend auf die DNA-Topoisomerase wirkt, und so DNA-Schäden provoziert, den intrazellulären JNK-Signalweg in HeLa-Zellen aktivierte (Guo *et al.*, 2006). Die Expression von c-Jun in tHPC-Zellen wurde im Gegensatz dazu sowohl im Nukleus als auch in der zytoplasmatischen Fraktion detektiert, und außerdem inhibierte TEGDMA hier vermutlich die Phosphorylierung von c-Jun. Andere Untersuchungen zeigten, dass die Phosphorylierung von c-Jun durch JNK vermutlich proteinstabilisierend wirkt und somit zu einer Verstärkung der Transkriptionsaktivität führt. Es gibt andererseits auch Hinweise darauf, dass die Phosphorylierung von c-Jun ein Signal für die Degradierung des Proteins über den Ubiquitin-Pathway ist (Whitmarsh, 2007).

Momentan gibt es keine plausible Hypothese, warum es in der vorliegenden Arbeit in den mit den beiden genotoxischen Agenzien Camptothecin und TEGDMA behandelten RAW264.7 Mausmakrophagen zu einer reduzierten Expression von c-Jun und phospho-c-Jun kam. Andere Autoren haben vorgeschlagen, dass der wichtigste Weg der Apoptose in Neuronen durch JNK-c-Jun vermittelt, allerdings durch die Degradierung von c-Jun inhibiert wird. Dadurch könnten Neuronen hohe Konzentrationen von JNK tolerieren. Da c-Jun ein ATF-2 Zielgen darstellt, könnte

die hier beobachtete reduzierte Expression von c-Jun eine Konsequenz der Downregulation von ATF-2 sein (Bhounik *et al.*, 2007).

ATF-2 (*activating transcription factor 2*) ist ein Mitglied der bZip Domäne (Leucin-Zipper-Proteine) und Bestandteil von AP-1 (Bhounik und Ronai, 2008). Es wird durch die Stress-aktivierten Proteinkinasen JNK oder p38 aktiviert. Dies geschieht in der Anwesenheit von zellulärem Stress wie proinflammatorischen Zytokinen, UV-Strahlung, DNA-Schädigung oder Veränderungen der Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). ATF-2 wird allerdings auch durch den Ras-ERK-Pathway aktiviert. Man vermutet, dass spezifische Signalwege der Aktivierung von ATF-2 zu einer spezifischen differenzierten Aktivierung der heterodimeren ATF-2 Partner im Komplex AP-1 führen. ATF-2 gilt als notwendiger Bestandteil der zellulären Stressantwort auf DNA-Schäden einschließlich des Schutzes vor der Wirkung ionisierender Strahlung (Bhounik *et al.*, 2007).

Aufgrund der hier durchgeführten Experimente ist anzunehmen, dass die ATF-2-Expression durch die Exposition gegen TEGDMA in HeLa, RAW264.7 Makrophagen und tHPC inhibiert wurde. Es wurde aber auch berichtet, dass in RAW264.7 Makrophagen, die mit LPS (Lipopolysaccharid) stimuliert wurden, ATF-2 durch Phosphorylierung aktiviert war. ATF-2 ist ein Zielgen des JNK/p38 Signalwegs. Man durfte deshalb vermuten, dass ATF-2 in Mausmakrophagen über eine durch die *Toll-like receptors* (TLRs) vermittelte Transkriptionskontrolle beteiligt sein könnte (Hirose *et al.*, 2009).

Krifka und Mitarbeiter zeigten kürzlich, dass die LPS-stimulierte Zytokinproduktion durch die Anwesenheit von TEGDMA direkt herunterreguliert werden konnte. Andererseits wurden ATF-2 und ATF-3 in RAW264.7 Makrophagen durch LPS verstärkt exprimiert (Krifka *et al.*, 2010). Diese Ergebnisse bestätigen vorherige Untersuchungen (Hirose *et al.*, 2009; Takii *et al.*, 2010). Da in der jetzigen Untersuchung die Inhibition der ATF-2 Expression nachgewiesen wurde, darf man annehmen, dass ATF-2 ebenfalls in der TEGDMA-induzierten Inhibition der Zytokinproduktion involviert sein könnte.

ATF-3 ist ein weiteres Mitglied der ATF/CREB-Familie von Transkriptionsfaktoren und *immediate early genes*. Nach aktuellem Stand des Wissens besitzen sie keine gewebespezifische Aktivität und spezifische Stressoren sind ebenfalls unbekannt. Außerdem ist bis heute die biologische Rolle von ATF-3 nicht eindeutig geklärt, es wurden aber Funktionen bei der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und der

zellulären Stressantwort beschrieben (Thompson *et al.*, 2009). Zum jetzigen Zeitpunkt scheint es so, als ob die Aktivierung von ATF-3 in der nukleären Fraktion der HeLa- und tHPC-Zellen, die mit Camptothecin vorbehandelt worden waren, eine entscheidende Rolle auch in der Stress-Antwort darstellt. Andererseits ist unklar, warum ATF-3 in RAW264.7 Makrophagen herunterreguliert wurde. Möglicherweise steht dies in Zusammenhang mit einer über ATF-3 und TLR regulierten inflammatorischen Zellantwort (Thompson *et al.*, 2009).

### **5.3 Schlussfolgerung**

Die hier vorliegende Untersuchung zeigt, dass TEGDMA zelluläre Signalwege verändert, die durch DNA-Schäden oder aber *downstream* von MAPK aktiviert werden. Dazu wurden Zellen verschiedener Gewebe (Zellen des Immunsystems, humane Pulpazellen und Cervixkarzinomzellen) benutzt. Dabei wurde die Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 möglicherweise als Folge von DNA-Schäden durch TEGDMA in mehreren Zelllinien festgestellt. Andererseits wurde die Expression von Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, ATF-2 oder ATF-3 *downstream* von MAPK in Anwesenheit von TEGDMA inhibiert. Interessanterweise sind die Aktivierung von p53 mit der Induktion von Apoptose und die Inhibition der Expression von c-Jun, ATF-2 oder ATF-3 mit der reduzierten Zytokinfreisetzung in RAW264.7 Mausmakrophagen zeitlich assoziiert (Krifka *et al.*, 2010, Krifka *et al.*, 2011). Eine direkte kausale Korrelation wird momentan mit pharmakologischen und genetischen Inhibitoren untersucht.

## 6. Zusammenfassung

Biologische Effekte kunststoffbasierter dentaler Füllungsmaterialien in eukaryotischen Zellen basieren auf zellulären Mechanismen, deren Spezifität aktuell nur teilweise bekannt ist. So sind Monomere der organischen Matrix dentaler Komposite wie Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) zytotoxisch, genotoxisch und mutagen *in vitro* aufgrund oxidativer DNA-Schäden oder inhibieren Funktionen des angeborenen Immunsystems wie die Freisetzung von Zytokinen. Möglicherweise basieren diese unterschiedlichen Phänomene auf der Störung der zellulären Redoxhomöostase durch die vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als Folge der Exposition von Zellen gegen dentale Monomere. Die bisherigen Ergebnisse überwiegend deskriptiver Analysen zeigten eine Parallelität von zellulären Reaktionen wie der Aktivierung Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK) und Apoptose, aber keinen ursächlichen Zusammenhang. So darf man vermuten, dass der in Monomer-exponierten Zellkulturen beobachtete Zelltod durch Apoptose die Folge von Signalen ist, die zwei unterschiedliche Ursachen haben könnten. Zum einen könnte Apoptose die Folge von Signalen sein, die von oxidativen DNA-Schäden ausgehen. Andererseits könnten ROS direkt MAPK und damit verknüpfte Transkriptionsfaktoren *downstream* aktivieren, die schließlich Apoptose induzieren.

Ziel dieser Studie war es, einerseits den Einfluss des Kunststoffmonomers TEGDMA auf die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren c-Jun, ATF-2 und ATF-3 *downstream* von MAPK zu untersuchen. Außerdem sollte die Expression von p53 und p21 untersucht werden, die als zelluläre Antwort auf mögliche DNA-Schäden verändert sein könnte.

Für diese Analysen wurden drei verschiedene Zelllinien verwendet. HeLa dienten als menschliche Epithelzellen aus dem Cervixkarzinom als Kontrolle für die Expression von p53. RAW264.7 Mäusemakrophagen wurden repräsentativ für Zellen des angeborenen Immunsystems verwendet und als Modell für spezifische Pulpreaktionen wurden transformierte humane Pulpazellen (tHPC) eingesetzt. Diese Zellen wurden dem Monomer TEGDMA (1 oder 3 mM) und einer Kontrollsubstanz (Camptothecin) für 24h exponiert. Die Expression der Transkriptionsfaktoren c-Jun, ATF-2, ATF-3, p53 und p21 und die jeweils

phosphorylierten Formen phospho-c-Jun, phospho-ATF-2, p53Ser15 und p53Ser46 wurden mit spezifischen Antikörpern in Zellkernen und im Zytosol mit Western Blotting untersucht.

Die Expression von p53 war in Zellkernen von HeLa durch Camptothecin stark erhöht, während TEGDMA die Expression von p53 nur schwach stimulierte. Camptothecin förderte auch die Expression von p53Ser15 und p53Ser46 in Zellkernen, mit TEGDMA hingegen wurde lediglich eine geringe Expression von p53Ser46 beobachtet. In der tHPC-Zelllinie erhöhte Camptothecin die Bildung von p53Ser15 und p53Ser46 im Zytosol, TEGDMA indessen steigerte die Expression von p53, p53Ser15 und p53Ser46 im Zellkern. In RAW264.7 Mausemakrophagen induzierte Camptothecin vor allem die starke Expression von p53 in Zellkernen und auch p53Ser15 war nachweisbar. TEGDMA wiederum stimulierte lediglich eine geringe Expression von p53. Die Expression von p21 wurde mit Camptothecin und TEGDMA in Kernen und im Zytosol von HeLa und tHPC erhöht. In den RAW264.7 Mausemakrophagen war p21 nur nach Exposition gegen Camptothecin nachweisbar.

Die *immediate early response* Genprodukte c-Jun, ATF-2 und ATF-3 wurden in Zellkernen aller Zelllinien exprimiert. Camptothecin steigerte die Expression von c-Jun, phospho-c-Jun, ATF-2, phospho-ATF-2 und ATF-3 vor allem in den Zellkernen von HeLa und weniger deutlich auch in tHPC. In RAW264.7 Mausemakrophagen wurde jedoch keine Steigerung, sondern eine Inhibition dieser Proteine detektiert. TEGDMA schien die Expression von c-Jun, phospho-c-Jun, ATF-2, phospho-ATF-2 und ATF-3 in allen Zelllinien zu inhibieren.

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass TEGDMA zelluläre Signalwege hin zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren verändert. Während die Expression von p53 durch TEGDMA eher stimuliert wurde und damit auf die Induktion von DNA-Schäden verweist, wurde die Expression von Transkriptionsfaktoren *downstream* von MAPK durch TEGDMA inhibiert. Ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen Monomer-induzierten DNA-Schäden, der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren sowie der Induktion von Apoptose soll nun mit pharmakologischen und genetischen Inhibitoren weiter untersucht werden. Die Bedeutung der Inhibition von Transkriptionsfaktoren *downstream* von MAPK wird im Zusammenhang mit der Analyse von Reaktionen des zellulären Immunsystems auf Monomere untersucht werden. Die Ergebnisse der

vorliegenden Arbeit verweisen darauf, dass die Induktion von Apoptose in verschiedenen Zelllinien durch Monomere wie TEGDMA durch die aktuellen Paradigmen einfacher, linearer Modelle der Signaltransduktion nicht hinreichend erklärt werden können.

## Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Basis- und Komonomere der organischen Matrix zahnärztlicher Komposite (übernommen aus Frank, 2011 mit Genehmigung von Prof. Schweikl) .....	10
Abbildung 2: Struktur ringöffnender Silorane (modifiziert nach Weinmann <i>et al.</i> , 2005); übernommen aus Frank, 2010 (Frank, 2010) mit Genehmigung von Prof. Schweikl) .....	11
Abbildung 3: Die Bildung von ROS in RAW264.7 Makrophagen. Zellkulturen wurden mit TEGDMA (und LPS) für 1h mit oder ohne NAC (N-Acetylcystein) exponiert. Die Balken zeigen Mediane sowie 25 und 75% Perzentile (n=4). Die Abbildung wurde modifiziert übernommen (Schweikl, 2009). .....	13
Abbildung 4: Modell der Induktion von Apoptose durch dentale Monomere. Triethylglycoldimethacrylat (TEGDMA) oder 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) reduzieren intrazellulär den Gehalt an Glutathion (GSH), parallel dazu steigt die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Dieser oxidative Stress induziert DNA-Schäden und aktiviert ausgehend davon Signaltransduktionsketten über $\gamma$ H2AX, ATM, p53, p21 oder p27. Dieser Pathway führt über einen Zellzyklus-Arrest zu DNA-Reparatur oder zur Induktion von Apoptose über den mitochondrialen Pathway (PUMA, Noxa, u.a.). Alternativ könnten ROS über die MAPK ERK1/2, p38 oder JNK Transkriptionsfaktoren <i>downstream</i> wie Elk1, ATF-2, ATF-3 oder c-Jun aktivieren und so Apoptose auslösen.....	18
Abbildung 5: Der Einfluss von TEGDMA und Camptothecin auf die Expression von c-Jun, ATF-2 und ATF-3 in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 1 und 3 mM TEGDMA oder Camptothecin für 24 Stunden exponiert. Proteine der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt und mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. GAPDH und Lamin dienten als Marker für Zytosol oder Zellkerne und zeigen den Grad der Reinheit beider Fraktionen. Die Abbildung zeigt repräsentativ Ergebnisse aus einem von insgesamt drei Experimenten.....	42
Abbildung 6: Der Einfluss von TEGDMA und Camptothecin auf die Expression von c-Jun, ATF-2 und ATF-3 in tHPC. Die Zellen wurden 1 und 3 mM TEGDMA oder Camptothecin für 24 Stunden exponiert. Proteine der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt und mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. GAPDH und Lamin dienten als Marker für Zytosol oder Zellkerne und zeigen den Grad der Reinheit beider Fraktionen. Die Abbildung zeigt repräsentativ Ergebnisse aus einem von insgesamt drei Experimenten. ....	44
Abbildung 7: Der Einfluss von TEGDMA und Camptothecin auf die Aktivierung von c-Jun, ATF-2 und ATF-3 in RAW264.7 Mausmakrophagen. Die Zellen wurden 1 und 3 mM TEGDMA oder Camptothecin für 24 Stunden exponiert. Proteine der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt und mit spezifischen Antikörpern im Western-Blot detektiert. GAPDH und Lamin dienten als Marker für Zytosol oder Zellkerne und zeigen den Grad der Reinheit beider Fraktionen. Die Abbildung zeigt repräsentativ Ergebnisse aus einem von insgesamt drei Experimenten.....	46

- Abbildung 8: Der Einfluss von TEGDMA und Camptothecin auf die Aktivierung von p53 und p21 in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 1 und 3 mM TEGDMA oder Camptothecin für 24 Stunden exponiert. Proteine der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt und mit spezifischen Antikörpern im Western-Blot detektiert. GAPDH und Lamin dienten als Marker für Zytosol oder Zellkerne und zeigen den Grad der Reinheit beider Fraktionen. Die Abbildung zeigt repräsentativ Ergebnisse aus einem von insgesamt drei Experimenten..... 48
- Abbildung 9: Der Einfluss von TEGDMA und Camptothecin auf die Aktivierung von p53 und p21 in tHPC. Die Zellen wurden 1 und 3 mM TEGDMA oder Camptothecin für 24 Stunden exponiert. Proteine der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt und mit spezifischen Antikörpern im Western-Blot detektiert. GAPDH und Lamin dienten als Marker für Zytosol oder Zellkerne und zeigen den Grad der Reinheit beider Fraktionen. Die Abbildung zeigt repräsentativ Ergebnisse aus einem von insgesamt drei Experimenten..... 50
- Abbildung 10: Der Einfluss von TEGDMA und Camptothecin auf die Aktivierung von p53 und p21 in RAW264.7-Mausmakrophagen. Die Zellen wurden 1 und 3 mM TEGDMA oder Camptothecin für 24 Stunden exponiert. Proteine der Zellextrakte wurden elektrophoretisch getrennt und mit spezifischen Antikörpern im Western-Blot detektiert. GAPDH und Lamin dienten als Marker für Zytosol oder Zellkerne und zeigen den Grad der Reinheit beider Fraktionen. Die Abbildung zeigt repräsentativ Ergebnisse aus einem von insgesamt drei Experimenten..... 52

## 7. Literaturverzeichnis

- Aicher, A., G. L. Shu, D. Magaletti, T. Mulvania, A. Pezzutto, A. Craxton und E. A. Clark (1999) Differential role for p38 mitogen-activated protein kinase in regulating CD40-induced gene expression in dendritic cells and B cells. *J Immunol* 163:5786-5795.
- Asada, M., T. Yamada, H. Ichijo, D. Delia, K. Miyazono, K. Fukumuro und S. Mizutani (1999) Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO J* 18:1223-1234.
- Asmussen, E. und E. C. Munksgaard (1987) [Dentin adhesives]. *Tandlaegebladet* 91:534-536.
- Atsumi, T., I. Iwakura, S. Fujisawa und T. Ueha (2001) Reactive oxygen species generation and photo-cytotoxicity of eugenol in solutions of various pH. *Biomaterials* 22:1459-1466.
- Barnabas, S., T. Hai und O. M. Andrisani (1997) The hepatitis B virus X protein enhances the DNA binding potential and transcription efficacy of bZip transcription factors. *J Biol Chem* 272:20684-20690.
- Bensaad, K. und K. H. Vousden (2005) Savior and slayer: the two faces of p53. *Nat Med* 11:1278-1279.
- Berquist, B. R. und D. M. Wilson, 3rd (2012) Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions. *Cancer Lett* 327:61-72.
- Besirli, C. G., E. F. Wagner und E. M. Johnson, Jr. (2005) The limited role of NH<sub>2</sub>-terminal c-Jun phosphorylation in neuronal apoptosis: identification of the nuclear pore complex as a potential target of the JNK pathway. *J Cell Biol* 170:401-411.
- Bhoumik, A., P. Lopez-Bergami und Z. Ronai (2007) ATF2 on the double - activating transcription factor and DNA damage response protein. *Pigment Cell Res* 20:498-506.
- Bhoumik, A. und Z. Ronai (2008) ATF2: a transcription factor that elicits oncogenic or tumor suppressor activities. *Cell Cycle* 7:2341-2345.
- Bowen, R. L. (1963) Properties of a silica-reinforced polymer for dental restorations. *J Am Dent Assoc* 66:57-64.
- Brigelius-Flohe, R. (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 27:951-965.
- Chambard, J. C., R. Lefloch, J. Pouyssegur und P. Lenormand (2007) ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* 1773:1299-1310.

Chang, N. S. (2001) Hyaluronidase activation of c-Jun N-terminal kinase is necessary for protection of L929 fibrosarcoma cells from staurosporine-mediated cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 283:278-286.

Chen, M. H. (2010) Update on dental nanocomposites. *J Dent Res* 89:549-560.

Cimpan, G., M. Hadaruga und V. Miclaus (2000a) Lipophilicity characterization by reversed-phase liquid chromatography of some furan derivatives. *J Chromatogr A* 869:49-55.

Cimpan, M. R., R. Matre, L. I. Cressey, B. Tysnes, S. A. Lie, B. T. Gjertsen und N. Skaug (2000b) The effect of heat- and auto-polymerized denture base polymers on clonogenicity, apoptosis, and necrosis in fibroblasts: denture base polymers induce apoptosis and necrosis. *Acta Odontol Scand* 58:217-228.

Circu, M. L. und T. Y. Aw (2010) Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48:749-762.

Cobb, M. H. (1999) MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 71:479-500.

Cramer, N. B., J. W. Stansbury und C. N. Bowman (2011) Recent advances and developments in composite dental restorative materials. *J Dent Res* 90:402-416.

D'Arcangelo, C., F. De Angelis, M. Vadini, F. Carluccio, L. M. Vitalone und M. D'Amario (2012) Influence of curing time, overlay material and thickness on three light-curing composites used for luting indirect composite restorations. *J Adhes Dent* 14:377-384.

D'Autreaux, B. und M. B. Toledano (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:813-824.

Dauvillier, B. S., M. P. Aarnts und A. J. Feilzer (2000) Developments in shrinkage control of adhesive restoratives. *J Esthet Dent* 12:291-299.

Davidson, C. L. und A. J. Feilzer (1997) Polymerization shrinkage and polymerization shrinkage stress in polymer-based restoratives. *J Dent* 25:435-440.

Demarco, F. F., M. B. Correa, M. S. Cenci, R. R. Moraes und N. J. Opdam (2012) Longevity of posterior composite restorations: not only a matter of materials. *Dent Mater* 28:87-101.

Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-95.

Eckhardt, A., N. Gerstmayr, K. A. Hiller, C. Bolay, C. Waha, G. Spagnuolo, C. Camargo, G. Schmalz und H. Schweikl (2009) TEGDMA-induced oxidative DNA damage and activation of ATM and MAP kinases. *Biomaterials* 30:2006-2014.

- Engelmann, J., V. Janke, J. Volk, G. Leyhausen, N. von Neuhoff, B. Schlegelberger und W. Geurtsen (2004) Effects of BisGMA on glutathione metabolism and apoptosis in human gingival fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 25:4573-4580.
- Engelmann, J., J. Volk, G. Leyhausen und W. Geurtsen (2005) ROS formation and glutathione levels in human oral fibroblasts exposed to TEGDMA and camphorquinone. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 75:272-276.
- Ferracane, J. L. (2011) Resin composite--state of the art. *Dent Mater* 27:29-38.
- Ferracane, J. L., J. K. Hopkin und J. R. Condon (1995) Properties of heat-treated composites after aging in water. *Dent Mater* 11:354-358.
- Finer, Y. und J. P. Santerre (2004a) The influence of resin chemistry on a dental composite's biodegradation. *J Biomed Mater Res A* 69:233-246.
- Finer, Y. und J. P. Santerre (2004b) Salivary esterase activity and its association with the biodegradation of dental composites. *J Dent Res* 83:22-26.
- Forman, H. J., H. Zhang und A. Rinna (2009) Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 30:1-12.
- Forss, H. und E. Widstrom (2004) Reasons for restorative therapy and the longevity of restorations in adults. *Acta Odontol Scand* 62:82-86.
- Frank EV (2010) Die Wirkung eines dentalen Monomers auf die Expression von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen. Dissertation. Universität Regensburg.
- Freund, M. und E. C. Munksgaard (1990) Enzymatic degradation of BISGMA/TEGDMA-polymers causing decreased microhardness and greater wear in vitro. *Scand J Dent Res* 98:351-355.
- Galler, K. M., H. Schweikl, B. Thonemann, R. N. D'Souza und G. Schmalz (2006) Human pulp-derived cells immortalized with Simian Virus 40 T-antigen. *Eur J Oral Sci* 114:138-146.
- Gartel, A. L. (2009) p21(WAF1/CIP1) and cancer: a shifting paradigm? *Biofactors* 35:161-164.
- Gatz, S. A. und L. Wiesmuller (2006) p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ* 13:1003-1016.
- Genestra, M. (2007) Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal* 19:1807-1819.
- Göpferich, A. (1996) Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 17:103-114.

Gough, J. E. und S. Downes (2001) Osteoblast cell death on methacrylate polymers involves apoptosis. *J Biomed Mater Res* 57:497-505.

Gough, J. E., C. A. Scotchford und S. Downes (2002) Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis. *J Biomed Mater Res* 61:121-130.

Guo, X., J. Zhang, X. Fu, Q. Wei, Y. Lu, Y. Li, G. Yin, Y. Mao, Y. Xie, Y. Rui und K. Ying (2006) Analysis of common gene expression patterns in four human tumor cell lines exposed to camptothecin using cDNA microarray: identification of topoisomerase-mediated DNA damage response pathways. *Front Biosci* 11:1924-1931.

Hai, T. und M. G. Hartman (2001) The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 273:1-11.

Hai, T., C. D. Wolfgang, D. K. Marsee, A. E. Allen und U. Sivaprasad (1999) ATF3 and stress responses. *Gene Expr* 7:321-335.

Halliwell, B. (1999) Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 31:261-272.

Hanks, C. T., S. E. Strawn, J. C. Wataha und R. G. Craig (1991) Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res* 70:1450-1455.

Hirose, N., T. Maekawa, T. Shinagawa und S. Ishii (2009) ATF-2 regulates lipopolysaccharide-induced transcription in macrophage cells. *Biochem Biophys Res Commun* 385:72-77.

Hong, Q., L. J. Hsu, L. Schultz, N. Pratt, J. Mattison und N. S. Chang (2007) Zfra affects TNF-mediated cell death by interacting with death domain protein TRADD and negatively regulates the activation of NF-kappaB, JNK1, p53 and WOX1 during stress response. *BMC Mol Biol* 8:50.

Huang, X., X. Li und B. Guo (2008) KLF6 induces apoptosis in prostate cancer cells through up-regulation of ATF3. *J Biol Chem* 283:29795-29801.

Ilie, N. und R. Hickel (2011) Resin composite restorative materials. *Aust Dent J* 56 Suppl 1:59-66.

Ishiguro, T., H. Nagawa, M. Naito und T. Tsuruo (2000) Inhibitory effect of ATF3 antisense oligonucleotide on ectopic growth of HT29 human colon cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 91:833-836.

Ishiguro, T., M. Nakajima, M. Naito, T. Muto und T. Tsuruo (1996) Identification of genes differentially expressed in B16 murine melanoma sublines with different metastatic potentials. *Cancer Res* 56:875-879.

Janke, V., N. von Neuhoff, B. Schlegelberger, G. Leyhausen und W. Geurtsen (2003) TEGDMA causes apoptosis in primary human gingival fibroblasts. *J Dent Res* 82:814-818.

Katz, M., I. Amit und Y. Yarden (2007) Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 1773:1161-1176.

Kawasaki, H., K. Taira und K. Yokoyama (2000) Histone acetyltransferase (HAT) activity of ATF-2 is necessary for the CRE-dependent transcription. *Nucleic Acids Symp Ser*:259-260.

Khalichi, P., D. G. Cvitkovitch und J. P. Santerre (2004) Effect of composite resin biodegradation products on oral streptococcal growth. *Biomaterials* 25:5467-5472.

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

Krifka, S., C. Petzel, K. A. Hiller, E. M. Frank, C. Bosl, G. Spagnuolo, F. X. Reichl, G. Schmalz und H. Schweikl (2010) Resin monomer-induced differential activation of MAP kinases and apoptosis in mouse macrophages and human pulp cells. *Biomaterials* 31:2964-2975.

Kruse, J. P. und W. Gu (2009) Modes of p53 regulation. *Cell* 137:609-622.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

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

Legarza, K. und L. X. Yang (2006) New molecular mechanisms of action of camptothecin-type drugs. *Anticancer Res* 26:3301-3305.

Li, C., H. Chen, F. Ding, Y. Zhang, A. Luo, M. Wang und Z. Liu (2009) A novel p53 target gene, S100A9, induces p53-dependent cellular apoptosis and mediates the p53 apoptosis pathway. *Biochem J* 422:363-372.

Lim, B. S., J. L. Ferracane, R. L. Sakaguchi und J. R. Condon (2002) Reduction of polymerization contraction stress for dental composites by two-step light-activation. *Dent Mater* 18:436-444.

Lim, Y. P., T. T. Lim, Y. L. Chan, A. C. Song, B. H. Yeo, B. Vojtesek, D. Coomber, G. Rajagopal und D. Lane (2007) The p53 knowledgebase: an integrated information resource for p53 research. *Oncogene* 26:1517-1521.

Lu, R., X. Wang, Z. F. Chen, D. F. Sun, X. Q. Tian und J. Y. Fang (2007) Inhibition of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase

pathway decreases DNA methylation in colon cancer cells. *J Biol Chem* 282:12249-12259.

Lu, S. C. (2009) Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 30:42-59.

Mantellini, M. G., T. M. Botero, P. Yaman, J. B. Dennison, C. T. Hanks und J. E. Nor (2003) Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. *J Dent Res* 82:592-596.

Matsuzawa, A. und H. Ichijo (2005) Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal* 7:472-481.

Matsuzawa, A., H. Nishitoh, K. Tobiume, K. Takeda und H. Ichijo (2002) Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: advanced findings from ASK1 knockout mice. *Antioxid Redox Signal* 4:415-425.

Memisoglu, A. und L. Samson (2000) Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat Res* 451:39-51.

Michelsen, V. B., H. Lygre, R. Skalevik, A. B. Tveit und E. Solheim (2003) Identification of organic eluates from four polymer-based dental filling materials. *Eur J Oral Sci* 111:263-271.

Moll, U. M., S. Wolff, D. Speidel und W. Deppert (2005) Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol* 17:631-636.

Morton, S., R. J. Davis und P. Cohen (2004) Signalling pathways involved in multisite phosphorylation of the transcription factor ATF-2. *FEBS Lett* 572:177-183.

Munksgaard, E. C. (2005) Plasticizers in denture soft-lining materials: leaching and biodegradation. *Eur J Oral Sci* 113:166-169.

Murphy, L. O. und J. Blenis (2006) MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* 31:268-275.

Murray, P. E., P. J. Lumley und A. J. Smith (2002) Preserving the vital pulp in operative dentistry: 2. Guidelines for successful restoration of unexposed dentinal lesions. *Dent Update* 29:127-134.

Natal, C., J. A. Oses-Prieto, B. Pelacho, M. J. Iraburu und M. J. Lopez-Zabalza (2006) Regulation of apoptosis by peptides of fibronectin in human monocytes. *Apoptosis* 11:209-219.

Nomura, K., Y. Takeuchi und K. Fukunaga (2006) MAP kinase additively activates the mouse *Per1* gene promoter with CaM kinase II. *Brain Res* 1118:25-33.

Nyberg, K. A., R. J. Michelson, C. W. Putnam und T. A. Weinert (2002) Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* 36:617-656.

Pagoria, D. und W. Geurtsen (2005) The effect of N-acetyl-L-cysteine and ascorbic acid on visible-light-irradiated camphorquinone/N,N-dimethyl-p-toluidine-induced oxidative stress in two immortalized cell lines. *Biomaterials* 26:6136-6142.

Pelka, M., W. Distler und A. Petschelt (1999) Elution parameters and HPLC-detection of single components from resin composite. *Clin Oral Investig* 3:194-200.

Peutzfeldt, A. (1997) Resin composites in dentistry: the monomer systems. *Eur J Oral Sci* 105:97-116.

Puig-Kroger, A., M. Relloso, O. Fernandez-Capetillo, A. Zubiaga, A. Silva, C. Bernabeu und A. L. Corbi (2001) Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* 98:2175-2182.

Quinlan, C. A., D. M. Zisterer, K. F. Tipton und M. I. O'Sullivan (2002) In vitro cytotoxicity of a composite resin and compomer. *Int Endod J* 35:47-55.

Rao, L., D. Perez und E. White (1996) Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135:1441-1455.

Rescigno, M., M. Martino, C. L. Sutherland, M. R. Gold und P. Ricciardi-Castagnoli (1998) Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med* 188:2175-2180.

Roos, W. P. und B. Kaina (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 12:440-450.

Rueggeberg, F. A. (2002) From vulcanite to vinyl, a history of resins in restorative dentistry. *J Prosthet Dent* 87:364-379.

Sadowsky, S. J. (2006) An overview of treatment considerations for esthetic restorations: a review of the literature. *J Prosthet Dent* 96:433-442.

Saito, S., A. A. Goodarzi, Y. Higashimoto, Y. Noda, S. P. Lees-Miller, E. Appella und C. W. Anderson (2002) ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* 277:12491-12494.

Samuelsen, J. T., J. E. Dahl, S. Karlsson, E. Morisbak und R. Becher (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, J. T., J. A. Holme, R. Becher, S. Karlsson, E. Morisbak und J. E. Dahl (2008) HEMA reduces cell proliferation and induces apoptosis in vitro. *Dent Mater* 24:134-140.

Santerre, J. P., L. Shajii und B. W. Leung (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.

Schweikl, H. (2009). Molekulare Toxikologie von Monomeren zahnärztlicher Komposite. Forschungsbericht. Universität Regensburg. <http://epub.uni-regensburg.de>

Schweikl, H., A. Hartmann, K. A. Hiller, G. Spagnuolo, C. Bolay, G. Brockhoff und G. Schmalz (2007) Inhibition of TEGDMA and HEMA-induced genotoxicity and cell cycle arrest by N-acetylcysteine. *Dent Mater* 23:688-695.

Schweikl, H., K. A. Hiller, C. Bolay, M. Kreissl, W. Kreismann, A. Nusser, S. Steinhauser, J. Wiczorek, R. Vasold und G. Schmalz (2005) Cytotoxic and mutagenic effects of dental composite materials. *Biomaterials* 26:1713-1719.

Schweikl, H., K. A. Hiller, A. Eckhardt, C. Bolay, G. Spagnuolo, T. Stempfll und G. Schmalz (2008) Differential gene expression involved in oxidative stress response caused by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials* 29:1377-1387.

Schweikl, H., G. Schmalz und M. Federlin (1998) Mutagenicity of the root canal sealer AHPlus in the Ames test. *Clin Oral Investig* 2:125-129.

Schweikl, H., G. Schmalz und T. Spruss (2001) The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res* 80:1615-1620.

Schweikl, H., G. Spagnuolo und G. Schmalz (2006) Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res* 85:870-877.

Shiloh, Y. (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3:155-168.

Silikas, N., G. Eliades und D. C. Watts (2000) Light intensity effects on resin-composite degree of conversion and shrinkage strain. *Dent Mater* 16:292-296.

Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goetze, B. J. Olson und D. C. Klenk (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.

Soussi, T., Y. Legros, R. Lubin, K. Ory und B. Schlichtholz (1994) Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int J Cancer* 57:1-9.

Spagnuolo, G., V. D'Anto, R. Valletta, C. Strisciuglio, G. Schmalz, H. Schweikl und S. Rengo (2008) Effect of 2-hydroxyethyl methacrylate on human pulp cell survival pathways ERK and AKT. *J Endod* 34:684-688.

Spagnuolo, G., K. Galler, G. Schmalz, C. Cosentino, S. Rengo und H. Schweikl (2004a) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase amplifies TEGDMA-induced apoptosis in primary human pulp cells. *J Dent Res* 83:703-707.

Spagnuolo, G., C. Mauro, A. Leonardi, M. Santillo, R. Paterno, H. Schweikl, E. V. Avvedimento und S. Rengo (2004b) NF-kappaB protection against apoptosis induced by HEMA. *J Dent Res* 83:837-842.

Stanislowski, L., M. Lefevre, K. Bourd, E. Soheili-Majd, M. Goldberg und A. Perianin (2003) TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res A* 66:476-482.

Syed, V., K. Mukherjee, J. Lyons-Weiler, K. M. Lau, T. Mashima, T. Tsuruo und S. M. Ho (2005) Identification of ATF-3, caveolin-1, DLC-1, and NM23-H2 as putative antitumorigenic, progesterone-regulated genes for ovarian cancer cells by gene profiling. *Oncogene* 24:1774-1787.

Takeda, K., T. Noguchi, I. Naguro und H. Ichijo (2008) Apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress and immune response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:199-225.

Takii, R., S. Inouye, M. Fujimoto, T. Nakamura, T. Shinkawa, R. Prakasam, K. Tan, N. Hayashida, H. Ichikawa, T. Hai und A. Nakai (2010) Heat shock transcription factor 1 inhibits expression of IL-6 through activating transcription factor 3. *J Immunol* 184:1041-1048.

Tanaka, T., X. Huang, H. D. Halicka, H. Zhao, F. Traganos, A. P. Albino, W. Dai und Z. Darzynkiewicz (2007) Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytometry A* 71:648-661.

Tarn, C., M. L. Bilodeau, R. L. Hullinger und O. M. Andrisani (1999) Differential immediate early gene expression in conditional hepatitis B virus pX-transforming versus nontransforming hepatocyte cell lines. *J Biol Chem* 274:2327-2336.

Teodoro, J. G., A. E. Parker, X. Zhu und M. R. Green (2006) p53-mediated inhibition of angiogenesis through up-regulation of a collagen prolyl hydroxylase. *Science* 313:968-971.

Thompson, M. R., D. Xu und B. R. Williams (2009) ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer. *J Mol Med (Berl)* 87:1053-1060.

Thonemann, B., G. Schmalz, K. A. Hiller und H. Schweikl (2002) Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater* 18:318-323.

Tobiume, K., A. Matsuzawa, T. Takahashi, H. Nishitoh, K. Morita, K. Takeda, O. Minowa, K. Miyazono, T. Noda und H. Ichijo (2001) ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2:222-228.

Toledo, F. und G. M. Wahl (2006) Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 6:909-923.

Tsunoda, M., T. Sakaue, S. Naito, T. Sunami, N. Abe, Y. Ueno, A. Matsuda und A. Takenaka (2010) Insights into the structures of DNA damaged by hydroxyl radical: crystal structures of DNA duplexes containing 5-formyluracil. *J Nucleic Acids* 2010:107289.

Villunger, A., E. M. Michalak, L. Coultas, F. Mullauer, G. Bock, M. J. Ausserlechner, J. M. Adams und A. Strasser (2003) p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 302:1036-1038.

Vogelstein, B., D. Lane und A. J. Levine (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408:307-310.

Wagner, E. F. und A. R. Nebreda (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 9:537-549.

Walther, U. I., Siagian, II, S. C. Walther, F. X. Reichl und R. Hickel (2004) Antioxidative vitamins decrease cytotoxicity of HEMA and TEGDMA in cultured cell lines. *Arch Oral Biol* 49:125-131.

Weinmann, W., C. Thalacker und R. Guggenberger (2005) Siloranes in dental composites. *Dent Mater* 21:68-74.

Whitmarsh, A. J. (2007) Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1773:1285-1298.

Wilson, D. M., 3rd, T. M. Sofinowski und D. R. McNeill (2003) Repair mechanisms for oxidative DNA damage. *Front Biosci* 8:d963-981.

Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis und M. E. Greenberg (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326-1331.

Yamada, M., N. Kojima, A. Paranjpe, W. Att, H. Aita, A. Jewett und T. Ogawa (2008) N-acetyl cysteine (NAC)-assisted detoxification of PMMA resin. *J Dent Res* 87:372-377.

Yoshii, E. (1997) Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res* 37:517-524.

Yu, J. und L. Zhang (2008) PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene* 27 Suppl 1:S71-83.

Zhan, J., J. B. Easton, S. Huang, A. Mishra, L. Xiao, E. R. Lacy, R. W. Kriwacki und P. J. Houghton (2007) Negative regulation of ASK1 by p21Cip1 involves a small domain that includes Serine 98 that is phosphorylated by ASK1 in vivo. *Mol Cell Biol* 27:3530-3541.

Zhang, Z., Q. Song, M. Lin, Y. Ding, X. Kang und Z. Yao (1997) Immunomodulated signaling in macrophages: Studies on activation of Raf-1, MAPK, cPLA(2) and secretion of IL-12. *Sci China C Life Sci* 40:583-592.

Zimmerli, B., M. Strub, F. Jeger, O. Stadler und A. Lussi (2010) Composite materials: composition, properties and clinical applications. A literature review. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 120:972-986.

## 8. Danksagung

Herzlich möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Helmut Schweikl bedanken. Seine engagierte, stets freundliche und sehr zuvorkommende Art waren zu jeder Zeit mehr als nur ein Ansporn. Herzlichen Dank für die vielen fundierten Anregungen und Tipps, die letztlich das Entstehen der Arbeit förderten.

Dem Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie Herrn Prof. Dr. G. Schmalz danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können, und die freundliche Überlassung eines Arbeitsplatzes.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Christine Petzel für ihre Hilfsbereitschaft im Labor und die angenehme warmherzige, offene und streckenweise sehr humorvolle Zusammenarbeit. Mein Dank gebührt meinen Freunden, insbesondere Johannes Klement und meiner Familie, die mich in allen Lebenssituationen unschätzbar unterstützt haben.