Untersuchungen zum Einfluss der kleinen Rho GTPase Rac1 auf die Diethylnitrosamin-induzierte Hepato-Kanzerogenese und die Suszeptibilität von Leberkrebszellen gegenüber dem Tumortherapeutikum Doxorubicin.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Friedrich Wartlick

aus Backnang

Düsseldorf, Mai 2014

aus dem Institut für Toxikologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Gerhard Fritz

Korreferent: Prof. Dr. Matthias Kassack

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Zusammenfassung V

Summary VI

1 Einleitung 1

1.1 Krebs 1

1.1.1 Leberkrebs 4

1.1.2 Nitrosamine 5

1.1.3 Umwandlung von Nitrosaminen durch Cyps 6

1.1.4 Nitrosamin induzierte DNA Schäden 7

1.2 Reparatur von DNA Schäden 8

1.3 Rac1-regulierte Signalwege 14

1.4 Behandlungsmöglichkeiten des Hepatozellulären Karzinoms 17

1.4.1 Doxorubicin 18

1.4.2 Kombination von Doxorubicin mit Inhibitoren rezeptorvermittelter Signalkaskaden 22

1.4.3 Lovastatin 22

1.5 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit 24

2 Material und Methoden 25

2.1 Material 25

2.1.1 Geräte 25

2.1.2 Verbrauchsmaterial 26

2.1.3 Kits 27

2.1.4 Chemikalien 28

2.1.5 Puffer 30

2.1.6 Antikörper 32

2.1.7 Inhibitoren 35

2.1.8 Marker 36

2.1.9 Vektoren 37

2.1.10 Nukleotide 37

2.1.11 Sofware 42

2.2 Methoden 43

2.2.1 Zellkultur 43

2.2.2 Zellexperimente 43

2.2.3 Präparation von Proteinextrakten (*in vitro)* 43
2.2.4 Präparation von Kern/Zytosol-Extrakten (*in vitro)* 44
2.2.5 Western Blot Analyse 44
2.2.6 Rac1 Aktivitätsassay 44
2.2.7 Co-Immunopräzipitationsexperimente 46
2.2.8 Zellzyklusanalyse mittels FACS 46
2.2.9 Analyse von phosphoryliertem H2AX mittels FACS 46
2.2.10 Untersuchung des Doxorubicin Imports und Exports mittels FACS 47
2.2.11 Analyse der Zell-Viabilität 47
2.2.12 DNA Strangbruchanalyse (Comet assay) 48
2.2.13 TARDIS-Assay 48
2.2.14 Band-Depletion-Assay 49
2.2.15 Massenspektrometrische Untersuchung der Topoisomerase II 49
2.2.16 Tierversuche 50
2.2.17 Proteinextrakte aus Gewebe 51
2.2.18 MGMT-Aktivitätsmessung 51
2.2.19 RNA-Isolation aus Gewebe 51
2.2.20 Synthese der cDNA 51
2.2.21 Isolation genomischer DNA und Endpunkt-PCR 52
2.2.22 qRT-PCR 52
2.2.23 Fixierung von Organen und Gewebeschnitte 53
2.2.24 Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung 53
2.2.25 Immunhisto-Untersuchungen von Gewebeschnitten 53
2.2.26 TUNEL-Assay 54
2.2.27 Statistische Auswertung 54

3 Ergebnisse 55

3.1 Einfluss von Rac1 auf die Wirkung von Topoisomerase-II-Giften 55

3.1.1 Toxizität der Rac1 Inhibitoren EHT1864 und NSC23766 55
3.1.2 Wirksamkeit der Rac1 Inhibitoren 56
3.1.3 Inhibition von Rac1 schützt vor der Behandlung mit Topoisomerase-II-Giften 57
3.1.4 Rac1 Inhibition schützt vor der Doxorubicin-induzierten Veränderung der Zellzyklusverteilung 58
3.1.5 Rac1 Inhibition führt zu einer verringerten Phosphorylierung von H2AX nach Behandlung mit Topoisomerase-II-Giften. 59
3.1.6 EHT1864 schützt HepG2 und Hep3B Zellen vor Doxorubicin-induzierten DNA Schäden 61

3.1.7 Zellzyklus-Abhängigkeit der Toposimerase-II-Gifte 63

3.1.8 Einfluss einer Rac1 Inhibition auf die Doxorubicin induzierte Schadensantwort verschiedenen Zielllinien 65

3.1.9 Korrelationanalysen der durch Doxorubicin-induzierten Menge an γH2AX 67

3.2 Untersuchungen zur molekularen Ursache des EHT1864 vermittelten Schutzeffektes 69

3.2.1 Einfluss von Rac1 auf die Topo2a-Hsp90 Interaktion 69

3.2.2 Einfluss von Rac1 auf den Import/Export von Doxorubicin 71

3.2.3 Inhibitorenstudie zur Untersuchung der molekularen Mechanismen des durch Rac1 Inhibtion gegenüber Doxorubicin vermittelten genoprotektiven Effektes. 72

3.2.4 Einfluss der verschiedenen Inhibitoren auf die Assoziation der Topoisomerasen II mit der DNA 75

3.2.5 Rac1 Inhibition führt zu einer geringeren „cleavable complex“ Bildung nach Behandlung mit Doxorubicin 76

3.2.6 Einfluss von Rac1 auf den nukleären Import/Export 77

3.2.7 Einfluss von Rac1 auf Topoisomerase IIα-Phosphorylierung 79

3.3 Einfluss eines Rac1 Knock-outs auf die Doxo- und IR-vermittelte DNA-Schadensantwort *in vivo* 80

3.3.1 Quantifizierung des Mx1Cre vermittelten Rac1 KO 81

3.3.2 γH2AX-Foci Bildung nach Doxorubicingabe oder Bestrahlung *in vivo* 81

3.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse (Teil 1) 83

3.4 Einfluss von Rac1 auf die DEN-induzierte akute Stressantwort 84

3.4.1 Quantifizierung des AlbCre vermittelten Rac1 KO 84

3.4.2 Einfluss von Rac1 auf den Metabolismus 85

3.4.3 Einfluss von Rac1 auf die DEN-induzierte akute DNA-Schadensantwort 86

3.4.4 Enfluss von Rac1 auf die DEN-vermittelte Apoptose 90

3.4.5 Einfluss von Rac1 auf die Inflammation 92

3.4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der Versuche mit einer Behandlungsdauer mit DEN von 24 und 72 h 94

3.5 Einfluss von Rac1 auf die DEN-induzierte Tumorentstehung 95

3.5.1 Einfluss von Rac1 auf die Anzahl der Tumore 95

3.5.2 Einfluss von Rac1 auf die Proliferations- und Apoptoserate der Tumore 97

3.5.3 Unterschied in der Aktivierung verschiedener Signalwege 98

3.5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur DEN induzierten Kanzerogenese 100

4 Diskussion 102

4.1 Einfluss von Rac1 auf die Doxorubicin-vermittelte Zytotoxizität 103

4.1.1 Toxizität und Wirkweise der Rac1 Inhibitoren 103

4.1.2 Einfluss des p53-Status auf die durch Rac1 Inhibition vermittelte geringere Toxizität von Topoisomerase-II-Giften 104

4.1.3 Zelltypspezifität der Doxorubicin induzierten Schadensantwort und der durch Rac1 Inhibiton vermittelten Effekte....105

4.1.4 Einfluss der Hsp90-Topoisomerase-II Interaktion auf die Doxorubicin vermittelte Bildung des „cleavable complex“ 107

4.1.5 Einfluss von Rac1 auf den Import/Export von Doxorubicin....108

4.1.6 Einfluss von Rac1 auf den nukleären Import/Export 109

4.1.7 Einfluss von Rac1 auf die proteasomale Degradation des „cleavable complex“..110

4.1.8 Abhängigkeit der Doxorubicin induzierten Schadensantwort von den Zellzyklusphasen 111

4.1.9 Einfluss verschiedene Rac1-regulierte Signalwege auf die Suszebtibilität gegenüber Doxorubicin....112

4.1.10 Regulation der Topoisomerase IIα durch Rac1 abhängige Phosphorylierungsstellen....113

4.1.11 Einfluss eines leberspezifischen Rac1 KO auf die Doxorubicin vermittelte Schadensantwort *in vivo*....116

4.2 Einfluss von Rac1 auf die Kanzerogenese....117

4.2.1 Verwendung des AlbCre vermittelten Rac1 KO 118

4.2.2 Einfluss von Rac1 auf den Metabolismus von Nitrosaminen....118

4.2.3 Einfluss von Rac1 auf die DEN vermittelte DNA-Schadensantwort....120

4.2.4 Einfluss von Rac1 auf die DEN vermittelte Stressantwort 122

Basale Unterschiede in der Stressantwort 123

DEN induzierte Unterschiede in der Stressantwort 123

4.2.5 Einfluss von Rac1 auf die akute Inflammtion nach DEN-Behandlung 125

4.2.6 Einfluss von Rac1 auf die DEN induzierten chemischen Kanzerogenese 125

4.2.7 Zusammenfassung zum Einfluss von Rac1 auf die DEN induzierte Leberkanzerogenese....127

4.2.8 Ausblick....128

5 Anhang.... 130

5.1 Literaturverzeichnis 130

5.2 Abkürzungsverzeichnis....157

5.3 Publikationen und Kongressbeiträge 161

5.3.1 Liste der Publikationen 161

5.3.2 Kongressteilnahmen....161

5.4 Danksagung 162

Zusammenfassung

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist eine der häufigsten Krebs-assoziierten Todesursachen weltweit, wobei die Inzidenz weiter zunimmt. Bisher ist Sorafenib der einzige für die medikamentöse Behandlung von fortgeschrittenem HCC zugelassene Wirkstoff. Dieses wirkt dabei über die Inhibition mehrerer Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sowie der Raf-Kinase. In aktuellen Phase II/III Studien wird auch das Tumortherapeutikum Doxorubicin als Mittel zur Bekämpfung des HCC untersucht. In einer bereits abgeschlossenen vergleichenden Studie zwischen Doxorubicin und Doxorubicin/Sorafenib stellte sich die Kombinationstherapie als vorteilhaft dar. Problematisch könnte hier aber werden, dass die Kombinationstherapie eine erhöhte Kardiotoxizität aufweist. Interessanterweise kann Lovastatin, eines der häufigsten Medikamente zur Cholesterinsenkung, die Kardiotoxizität von Doxorubicin abmildern und gleichzeitig die Toxizität gegenüber Tumorzellen erhöhen. Diese Effekte des Lovastatin konnten auf seine inhibierende Wirkung der kleinen Ras homologen (Rho) GTPase Rac1 zurückgeführt werden. Die Inhibition der Rho GTPasen wirkt dabei ähnlich wie Sorafenib inhibierend auf Rezeptor-Tyrosin-Kinase-vermittelte Signalwege. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte der Einfluss eines Rac1-spezifischen Inhibitors auf die Behandlung verschiedener Zelllinien mit Doxorubicin untersucht werden. Hier konnte gezeigt werden, dass eine pharmakologische Inhibition von Rac1 in den Leberkrebszelllinien HepG2 und Hep3B zu einer geringeren Anzahl an Strangbrüchen, einer abgeschwächten DNA-Schadensantwort und zu einer erhöhten Viabilität nach Behandlung mit Doxorubicin führt. Von 12 weiteren Zelllinien konnte nur in 3 ein ähnlicher Schutzeffekt gegenüber Doxorubicin durch Rac1 Inhibition erzielt werden. Eine Inhibition von „downstream“ Kinasen wie JNK, ERK und CK1 zeigte dabei ähnliche Effekte wie die Rac1 Inhibition. Diese Inhibition führt darüber hinaus zu einer an mehreren Stellen veränderten Phosphorylierung der Topoisomerase IIα. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es durch die Inhibition von Rac1 zur Inaktivierung der Rac1 „downstream“ Kinasen wie JNK, ERK und CK1 und dadurch zu einer veränderten Phosphorylierung der Topoisomerase IIα kommt, was wiederum zu einer verminderten Suszeptibilität gegenüber dem Topoisomerase-II-Gift Doxorubicin führt. Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Einfluss eines leberspezifischen Rac1 Knockouts (KO) auf die durch Diethylnitrosamin (DEN) chemisch induzierte Leberkanzerogenese und akute hepatische Stressantworten untersucht werden. Hier konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an Rac1 zu einer verringerten basalen Cyp2E1 Expression, zu einer verstärkten DNA Schadensantwort und vermehrter Apoptose nach DEN Behandlung führt. In Bezug auf die Leberkanzerogenese durch DEN führt ein Rac1 KO zu einer deutlich geringeren Anzahl und auch kleineren Tumorarealen. Die in den KO Tieren untersuchten Tumorareale waren dabei alle p-ERK und Gluthaminsynthethase GS negativ, was darauf hindeutet, dass Rac1 sowohl für die Ras/Raf-vermittelte als auch die β-Catenin-vermittelte Kanzerogenese essentiell ist. Obwohl die Tumorareale in den Rac1 KO Tieren deutlich kleiner waren, zeigten diese, bei ähnlicher Apoptoserate, eine stark erhöhte Anzahl an mitotischen Zellen (pH3-positiv). Dies könnte auf Probleme während der Mitose hindeuten, was wiederum mit dem Einfluss von Rac1 auf die Topoisomerasen IIα oder den Aufbau der Mitosespindel zusammenhängen könnte. Insgesamt unterstreichen die Ergebnisse die Bedeutung und Komplexität Rac1-regulierter Signalkaskaden auf die durch unterschiedliche Noxen induzierten hepatischen Stressantworten und die Leberkanzerogenese im Besonderen.

Summary

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common cancer-related deaths worldwide and its incidence is further increasing. Sorafenib is up to now the only approved drug for medication of advanced HCC. Sorafenib inhibits several receptor tyrosine kinases as well as the Raf kinase. In current phase II/III clinical trials the well-known tumor therapeutic doxorubicin is also often used. A comparative trial between doxorubicin and doxorubicin/sorafenib showed the beneficial effects of the co-treatment. However, it may be problematic that the combination treatment exhibits an increased cardiotoxicity. Interestingly, lovastatin, which is widely used for cholesterol lowering could reduce the doxorubicin mediated cardiotoxicty while improving its toxic effects on cancer cells. These effects of lovastatin can be attributed to its inhibition of the small Rho GTPase Rac1. Like sorafenib, inhibition of Rho GTPases impedes receptor tyrosine-related signaling pathways. The first goal of this work was to check the influence of specific Rac1 inhibitors on the doxorubicin-mediated DNA damage response in several different cell lines. In the two liver cancer cell lines Hep3B and HepG2 Rac1 inhibition led to a reduced number of DNA breaks, an attenuated DNA damage response and a higher viability after treatment with doxorubicin. Only 3 of 12 additionally tested cell lines showed a Rac1 inhibition-mediated protective effect against doxorubicin. Blocking of Rac1 downstream kinases JNK, ERK and CK1 showed similar effects as Rac1 inhibiton. This inhibition also led to an altered phosporylation of the topoisomerase IIα at several sites. Thus, it can be concluded that Rac1 inhibition leads to an attenuation of the downstream kinases JNK, ERK and CK1 which in turn modifies the phosphorylation state of the topoisomerase IIα and thereby mediates the reduced susceptibility against the topoisomerase-II-poison doxorubicin. In the second part of this work the involvement of Rac1 in processes of liver cancerogenesis ought to be elucidated. Therefore, the influence of a liver-specific Rac1 KO on with diethylnitrosamine (DEN) chemically induced liver cancerogenesis and acute stress responses after DEN treatment were analyzed. Lack of Rac1 led to a reduced number of smaller tumors. The analyzed tumors of the Rac1 KO animals were all pERK and glutamine synthethase negative. Therefore it was concluded that Rac1 is essential for the Ras/Raf as well as the β-catenin driven cancerogenesis. Despite the fewer tumor number and smaller tumor size of the Rac1 KO mice, the rate of mitotic cells was largely increased. This may point to problems during mitosis in Rac1 KO tumors. These problems may be related to the function of Rac1 in regulatory mechanisms of the topoisomerase-IIα or the mitotic spindle formation. Altogether the results underline the importance and complexity of Rac1 regulated signaling pathways on via several noxes induced hepatic stress response and liver cancerogenesis in particular.

1 Einleitung

1.1 Krebs

Krebs ist eine der größten medizinischen Herausforderungen der heutigen Zeit. Krebserkrankungen stellen eine der häufigsten Todesursachen weltweit dar, wobei die Zahl der Krebsneuerkrankungen seit Jahren weiter zunimmt. Dabei ist Krebs keinesfalls eine Erkrankung der Neuzeit. Schon in der Antike kannte man oberflächlich feststellbare Geschwülste, die der Gestalt eines Krebses ähnlich sahen. Da quasi jedes Organ des menschlichen Körpers an Krebs erkranken kann, kennt man heute über 100 verschiedene Krebserkrankungen, die sich jedoch in ihrer Überlebensrate (Abbildung 2), Neigung zur Metastasierung und Art der Behandlung deutlich unterscheiden. In Deutschland treten Krebserkrankungen gehäuft in Organen wie Brustdrüse (Frauen), Prostata (Männer), Lunge und Dickdarm auf (Abbildung 1). Generell nimmt die Häufigkeit an Krebs zu erkranken mit dem Alter zu. Allerdings spielen je nach Krebsart auch andere Faktoren wie Geschlecht, Vorerkrankungen, kollektive Zugehörigkeit, geographischer Lebensmittelpunkt oder der generelle Lebenswandel (Ernährung, Rauchen, Sport, etc.) eine nicht unbedeutende Rolle (Block et al.,1992; Sasco et al., 2004; Thune & Furberg 2001).

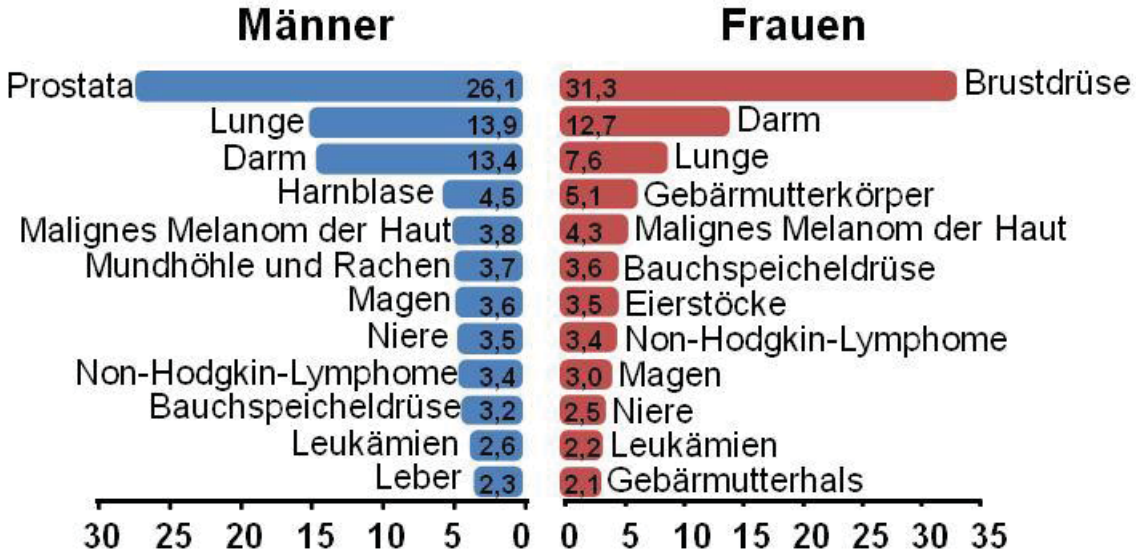


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2010 (Krebs in Deutschland 9.Ausgabe, 2013)

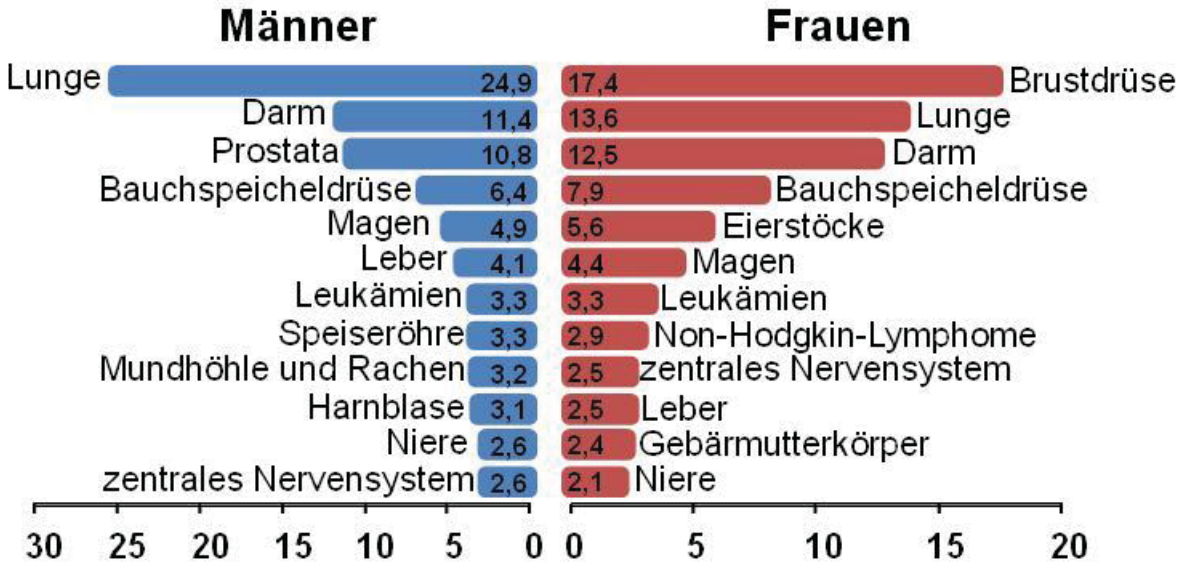


Abbildung 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2010 (Krebs in Deutschland 9.Ausgabe, 2013)

In einem Säugetier-Organismus herrscht ein kompliziertes Gleichgewicht zwischen Zellteilung (Proliferation), Zelldifferenzierung und Zelltod (Apoptose, Nekrose). Dieses Gleichgewicht wird durch sehr viele Faktoren strikt reguliert. Allerdings können durch äußere Einflüsse (Genotoxine wie Nitrosamine, Aflatoxine, Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)) aber auch spontan z.B. durch den chemischen Zerfall von DNA-Basen oder Fehlpaarungen bei der Replikation der DNA, Mutationen entstehen, die dieses Gleichgewicht bedrohen. Um dies zu verhindern, dient ein Teil der menschlichen Gene, wie z:B. die Gene der DNA-Reparatur, dem sicheren Erhalt des genetischen Codes von einer Generation zur nächsten. Unter den für Krebs verantwortlichen Mutationen finden sich vor allem solche, die entweder die Proliferation verstärken (wie z.B. Ras-aktivierende Mutationen (Bos 1989)) oder solche, die die Apoptose verhindern (wie p53-inaktivierende Mutationen (Vogelstein et. al., 2000)). Allerdings reicht eine einzelne Mutation nicht aus, denn erst wenn die zahlreichen Regulationsmechanismen der Zelle korrumpiert worden sind, kann aus einer Zelle eine Krebszelle werden (Abbildung 3). Aus diesem Grund treten bei Krebserkrankungen häufig Mutationen in Genen auf, die für den Erhalt des genetischen Codes verantwortlich sind. Der Weg zur Krebszelle kann dabei zusätzlich durch andere äußere Einflüsse wie Hormone, Wachstumsfaktoren und andere Zytokine beeinflusst werden (Hanahan & Weinberg 2011).

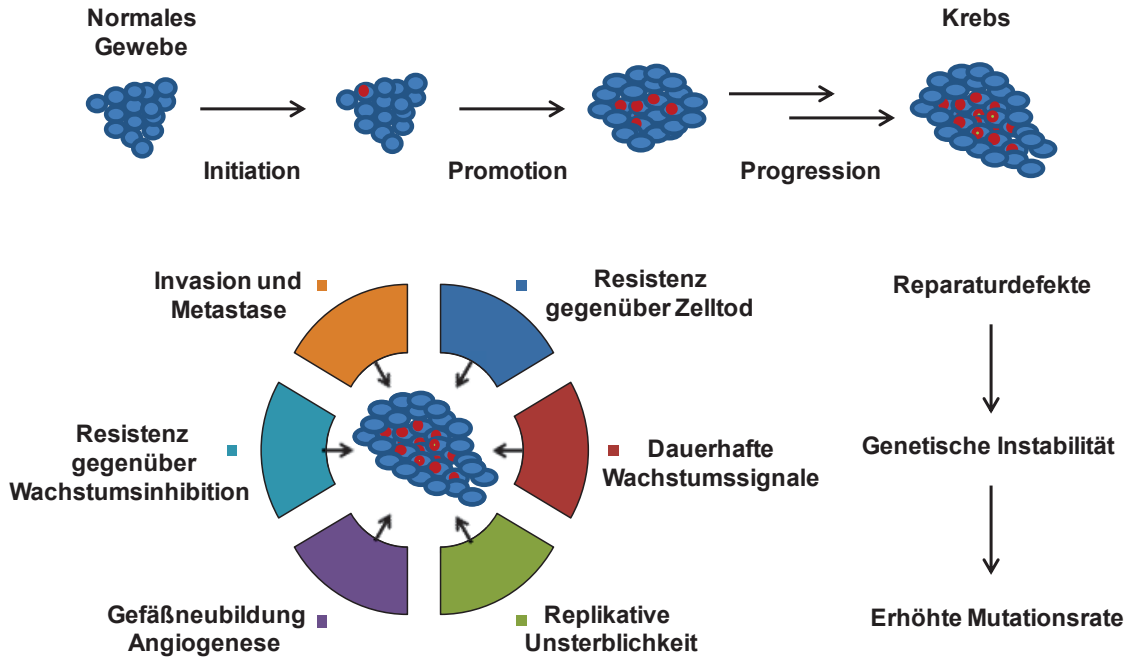


Abbildung 3: Krebsentstehung und Eigenschaften einer Krebserkrankung. Die Krebsenstehung wurde häufig in drei Teilschritte unterteilt: die Initiation, der ersten genetischen Veränderung mit der Folge einer erhöhten Proliferation, die Promotion (Wachstumstimuli die z.B. durch Gabe von Phenobarbital oder eine chronische Entzündung ausgelöst werden können) und Progression (Anhäufung weiterer Mutationen sowie die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung). Diese Einteilung beruhte hauptsächlich auf den Erfahrungen der chemisch induzierten Kanzerogenese. Tatsächlich ist die Situation wesentlich komplexer und die Übergange fließend. Es gibt aber bestimmte Eigenschaftsveränderungen die die Entstehung von Krebs charakterisieren. Reparaturdefekte sind zwar für die Entstehung eines Tumors nicht zwingend nötig erhöhen aber deutlich die Mutationsrate und somit die Geschwindigkeit der malignen Transformation und der Krebsentstehung. Modifiziert nach Hanahan & Weinberg, 2011.

Der Weg einer Zelle hin zur Krebszelle ist hoch variabel. So können die verschiedenen Eigenschaftsveränderungen des Tumors zu frühen oder zu späten Zeitpunkten der Tumorgenese auftreten. Auch können Mutationen zu unterschiedlichen Untergruppen innerhalb eines Tumors führen. Die gesamte Tumorentstehung ist damit hochvariabel und inhomogen. Sein tödliches Potential entwickelt der Krebs aber erst durch die Fähigkeit in angrenzende Strukturen hineinzuwachsen und durch Ablösung einzelner Tumorzellen und deren Verteilung über das Blut/Lymphsystem in entferntem Gewebe sekundäre Tumore zu bilden (zu Metastasieren). So sterben 90 % aller Krebspatienten nicht am Primärtumor, sondern an den Folgen der Metastasierung (Mehlen & Puisieux 2006).

1.1.1 Leberkrebs

Leberkrebs gehört zwar zu den selteneren Krebserkrankungen (Abbildung 1), ist auf Grund seiner schlechten Prognose aber trotzdem, insbesondere bei Männern, einer der häufigsten Krebstodesursachen (Abbildung 2). Den größten Teil der Leberkrebserkrankungen machen das hepatozelluläre Karzinom (HCC, etwa 65 %) und das aus interhepatischen Zellen bestehende Cholangiokarzinom (25 %) aus. Da Leberkrebs häufig erst zu sehr späten Stadien entdeckt wird sind die therapeutischen Möglichkeiten stark einschränkt und nur etwa 10 % der Erkrankten überleben die ersten fünf Jahre nach Diagnose (Krebs in Deutschland 9.Ausgabe 2013). Im Gegensatz zu anderen Karzinomerkrankungen nahm die Inzidenz von HCC in den letzten Jahren weiter zu. Grund hierfür dürfte vor allem die zunehmende Zahl an Hepatitisinfektionen sein, die die Entstehung einer Leberzirrhose und somit auch die Leberkrebsentstehung begünstigt (Abbildung 4). So entstehen über 80 % des HCC vor dem Hintergrund einer Leberzirrhose (Fattovich et al., 2004). Als weitere Risikofaktoren gelten zudem regelmäßiger hoher Alkoholkonsum, Tabakkonsum, starkes Übergewicht, Diabetes mellitus Typ 2 und erbliche Stoffwechselerkrankungen (Hassan et al. 2002). Auch die Kontamination von Lebensmitteln mit Aflatoxinen (Gift von Schimmelpilzen) oder deren Belastung mit Nitrosaminen stehen im Zusammenhang mit einem erhöhten Leberkrebsrisiko (Mitacek et al. 1999).

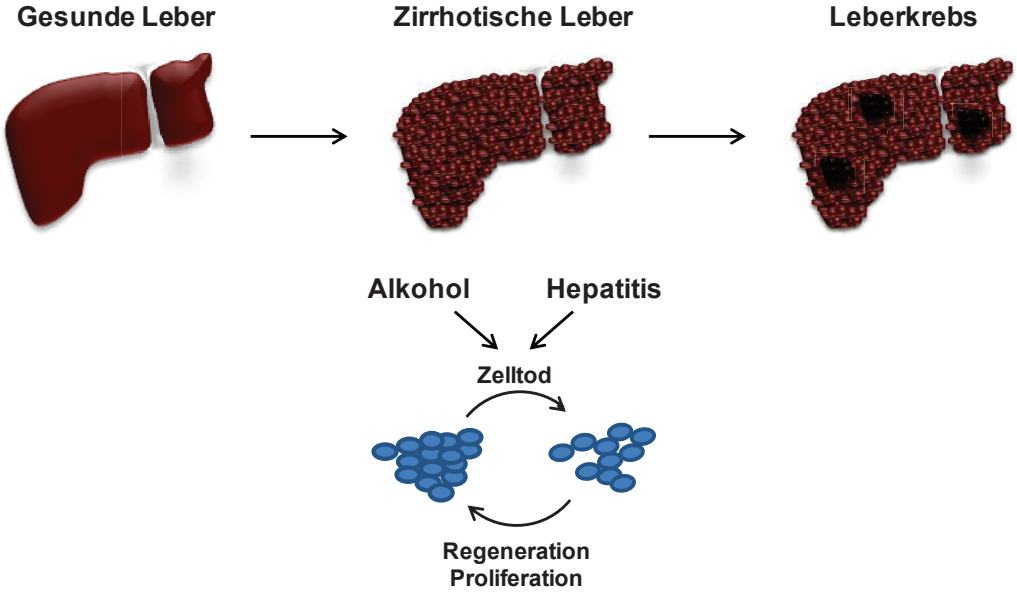


Abbildung 4: Leberkrebs und Inflammation. Der Entstehung von Leberkrebs liegt häufig eine Vorerkrankung der Leber, meist eine Leberzirrhose, zu Grunde. Diese wird oft durch Hepatitis B/C oder häufigen starken Alkoholmissbrauch hervorgerufen. Die Chronische Entzündung bzw. häufiger Alkoholmissbrauch führen zu einem Kreislauf aus Zelltod und Regeneration der Leber. Dieser Kreislauf fördert das Auswachsen von schneller wachsenden und Apoptose resistenten Zellen und fördert so die Kanzerogenese. Modifiziert nach Levrero 2006

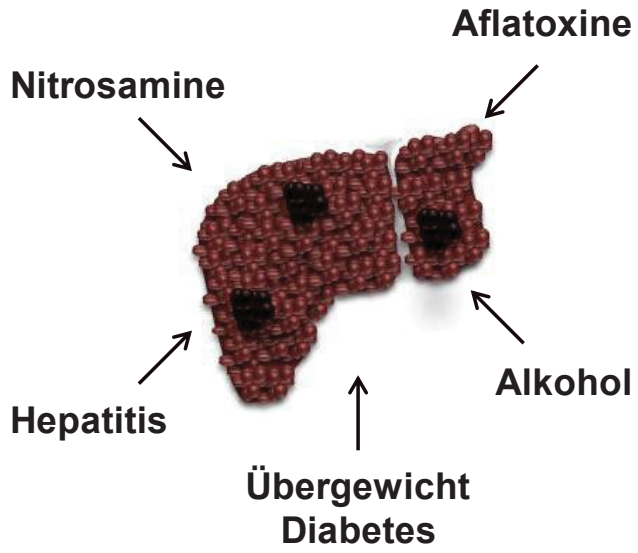


Abbildung 5: Risikofaktoren für die Entstehung von Leberkrebs. Hier kann man grundsätzlich zwischen den chronischen Faktoren wie Hepatitis, Übergewicht, Diabetes sowie chronischem Alkoholmissbrauch und der Exposition mit Genotoxinen wie Aflatoxinen und Nitrosaminen unterschieden werden. Modifiziert nach Levrero 2006

1.1.2 Nitrosamine

Nitrosamine können sich dabei aus denen in der Nahrung vorhandenen oder durch Spaltung von Proteinen entstandenen sekundären Aminen und den sich ebenfalls in der Nahrung befindlichen Nitriten bilden (Abbildung 6). Natriumnitrite werden dabei häufig bei Fleischprodukten verwendet, um die Vermehrung von Mikroorganismen (vor allem Clostridium botulinum) zu verhindern. Hohe Temperaturen begünstigen dabei die Bildung von Nitrosaminen. Heutzutage werden vielen dieser Produkte Ascorbinsäure oder ähnliche Antioxidantien zugesetzt, was die Bildung von Nitrosaminen deutlich reduziert. Aber auch die endogene Nitrosaminbildung durch Darmbakterien (Hawksworth and Hill 1971) und Nitrosamine im Tabakrauch (Brown et al., 2003) können zu einer erhöhten Nitrosaminexposition beitragen. Bereits 1956 konnte gezeigt werden, dass Dimethylnitrosamin in Ratten Leberkrebs auslösen kann (Magee 1956). Zahlreiche weitere Untersuchungen zeigten, dass etwa 90 % der untersuchten Nitrosamine in den verschiedensten Versuchstieren kanzerogene Eigenschaften besitzen. Die meisten Nitrosamine zeigen eine deutliche Organspezifität. So erzeugen Dimethylnitrosamin und Diethylnitrosamin in Versuchstieren Leberkrebs während einige Tabak-spezifische Nitrosamine Lungenkrebs verursachen (Bartsch and Montesano 1984).

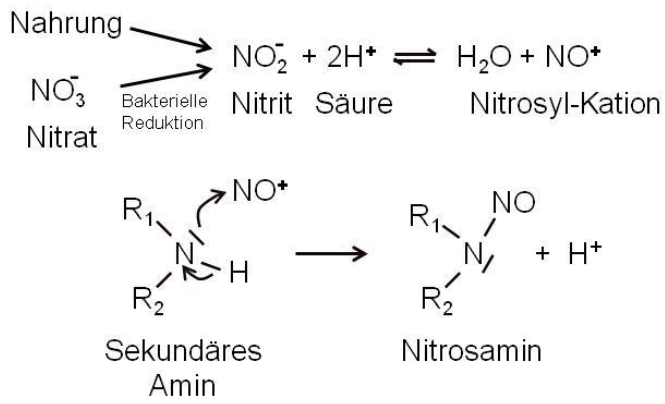


Abbildung 6: Endogene Bildung von Nitrosaminen. In der Nahrung vorkommendes Nitrtit (vor allem in Fleischprodukten) kann im Sauren Milieu mit auch in der Nahrung vorkommenden sekundären Aminen zu Nitrosaminen reagieren. Als weitere Nitritquelle gilt die bakterielle Reduktion von Nitraten. Die Entstehung von Nitrosaminen hängt im Wesentlichen von der aufgenommenen Nitritkonzentration ab.

1.1.3 Umwandlung von Nitrosaminen durch Cyps

Die Organspezifität von Nitrosaminen kann dadurch erklärt werden, dass Nitrosamine erst durch ihre metabolische Aktivierung in das eigentliche Genotoxin überführt werden und dass diese Umwandlung durch organspezifische Cytochrom P450 Enzyme (Cyps) erfolgt. Für das Diethylnitrosamin (DEN) erfolgt die Umwandlung dabei hauptsächlich durch das leberspezifische Cyp2E1 (Kang et al., 2007) (Abbildung 7).

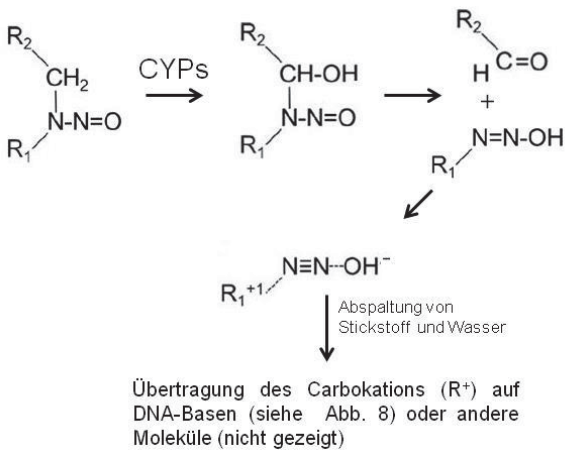


Abbildung 7: Metabolische Aktivierung von Nitrosaminen. Die Aktivierung der Nitrosamine erfolgt durch Oxidation des alpha C-Atoms. In einer darauf folgenden intramolekularen Umlagerungsreaktion wird ein Aldehyd abgespalten. Das entstandene Produkt wiederum stellt direkt (SN2-Reaktion) oder nach Abspaltung von Wasser und Stickstoff (SN1-Reaktion) ein starkes Alkylierungsreagenz dar.

Da bei dieser Enzymreaktion Sauerstoff und NADH als Kofaktoren benötigt werden, wird Cyp2E1 hauptsächlich in Zellen exprimiert, die sich in räumlicher Nähe zu den sauerstoffversorgenden Zentralvenen der Leber befinden. In einer Cyp2E1 Knockout (KO) Mausstudie konnte dementsprechend auch eine deutliche Reduktion der Tumoranzahl nach Applikation von DEN gezeigt werden (Jin Seok Kang et al. 2007). Interessanterweise wird Cyp2E1 sowohl durch chronischen Alkoholkonsum aber auch durch eine Diabeteserkrankung induziert, was beides mit einem erhöhten Leberkrebsrisiko in Verbindung gebracht wird (Song, 1995; Wang et al., 2003)).

1.1.4 Nitrosamin induzierte DNA Schäden

Das aktivierte Nitrosamin kann mit den verschiedensten Molekülen aber auch mit der DNA einer Zelle reagieren (Abbildung 8).

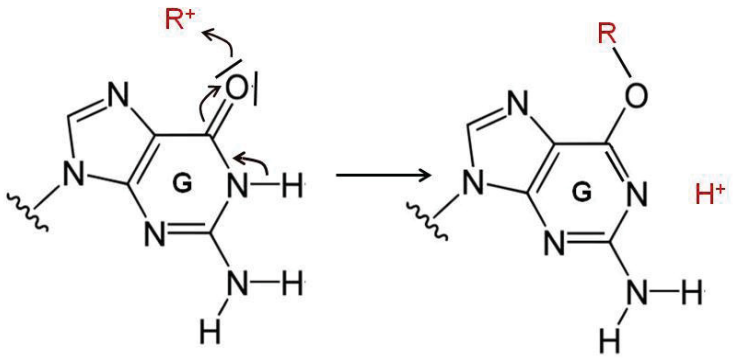


Abbildung 8: Alkylierungsreaktion am Beispiel der O6-Alkylierung des Guaninbausteins der DNA. R^+ stellt dabei das elektrophile Carbokation dar, welches auf den nukleophilen Sauerstoff des Guanins übertragen wird. Die O6-Alkylierung des Guanins stellt dabei eines der toxischsten Reaktionsprodukte dar. Die O6-Alkylierung erfolgt dabei nach SN1, N-Alkylierungen dagegen auch nach SN2 Muster. Modifiziert nach Fu et Al. 2012.

Die wichtigsten Reaktionsprodukte sind die an den verschiedenen Stellen alkylierte DNA Basen (Abbildung 9) (Fu et al., 2012).

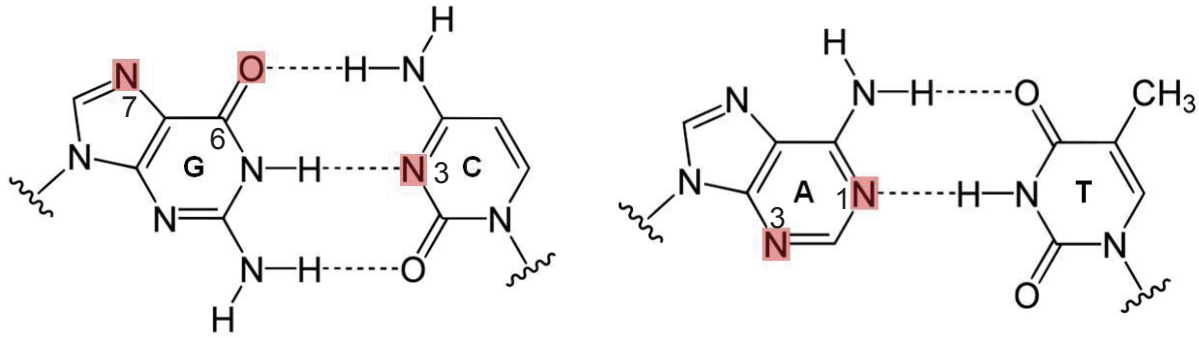


Abbildung 9: Die wichtigsten Alkylierungstellen der DNA-Basen. Alkylierungen an den rot markierten Stellen führen zu einem toxischen Replikationsblock und können darüber hinaus zu Basentransitionen (N3-Alkyl-Cytosin C→T und O6-Alkyl-Guanin G→A) und Basentransversionen (N1- und N3-Alkyl-Adenin A→T) führen. G: Guanin; C: Cytosin; A: Adenin; T: Thymin. Modifiziert nach Fu et al. 2012.

Werden diese primären Veränderungen der DNA nicht repariert, kann dies zu Basen-Fehlpaarungen und dadurch zu Mutationen, aber auch zu weiteren sekundären DNA Schäden (z.B. DNA-Doppelstrangbrüchen) führen (Abbildung 10).

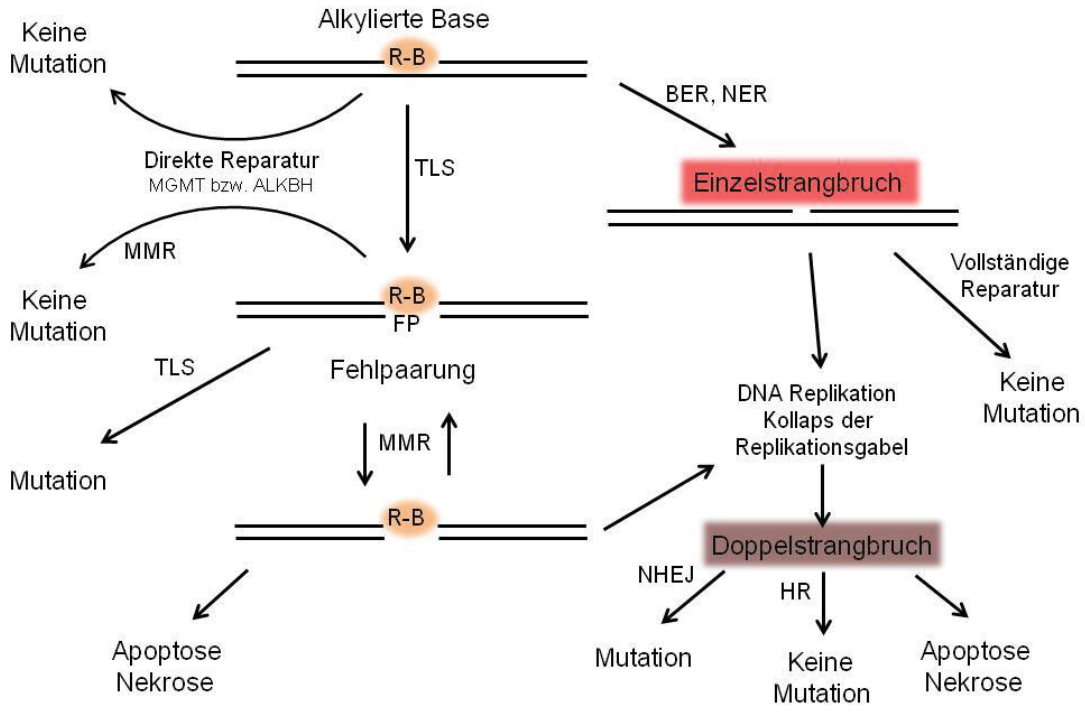


Abbildung 10: Verschiedene Reparaturwege nach einer DNA Alkylierung. Alkylierte Basen können direkt (O6-Alkylguanin (MGMT) und N3-Alkyladenin (ALKBH)) (Details siehe Abb. 11) oder durch die verschiedenen Reparaturwege BER, NER und MMR (Details siehe Abb. 12) repariert werden. Bei der BER und NER werden durch Endonukleasen die alkylierten Basen herausgeschnitten was zu einem vorübergehenden Einzelstrangbruch führt. Liegen zwei Einzelstrangbrüche nahe beieinander und auf gegenüberliegenden Strängen kann ein Doppelstrangbruch entstehen (hier nicht gezeigt). DNA Doppelstrangbrüche können allerdings auch als Folge eines Kollapses der Replikationsgabel an einem Einzelstrangbruch entstehen. Eine nicht erkannte alkylierte Base kann also auch noch in späteren Replikationsrunden einen DSB verursachen. R-B: alkylierte Base; FP: Fehlpaarung; TLS: Translesion synthesis (spezielle Polymerasen ermöglichen das Fortsetzen der DNA Replikation an Stellen mit DNA-Schäden (wie z.B. Alkylierungen) und AP-Stellen). Modifiziert nach Fu et al., 2012.

1.2 Reparatur von DNA Schäden

Um den Erhalt der genetischen Information zu gewährleisten, hat die Natur verschiedenste Reparaturmechanismen entwickelt. So können Alkylierungen der DNA mit Hilfe des Enzyms MGMT direkt repariert werden (Abbildung 11), aber auch durch die sogenannte Basenexzisionsreparatur (BER), die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und die Mismatch-Reparatur (MMR) (Abbildung 12). Doppelstrangbrüche werden dagegen entweder durch die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) oder die Homologe Rekombination (HR) repariert (Abbildung 13).

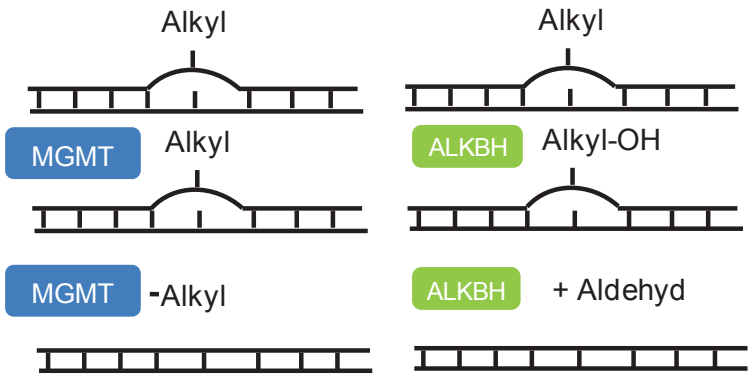


Abbildung 11: Direkte Reparatur alkylierter DNA Basen. Das wichtigste Substrat der O6-Methylguianin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ist das O6-Alkyl-Guanin. Dieses wird durch die Übertragung des Alkylrestes auf eine SH-gruppe des Enzyms direkt in Guanin umgewandelt und bedarf keiner weiteren Reparatur. Die Übertragung der Alkylgruppe auf das MGMT ist dabei irreversibel. MGMT wird somit bei der Reparatur verbraucht. Das ALKBH (Alkylation repair homolog) Enzym repariert dagegen vor allem 3-Alkyl-Cytosin und 3-Alkyl-Adenin Alkylierungen. Hierbei wird das alpha C-Atom der Alkylgruppe oxidiert, was nach anschließender Umlagerung zur Abspaltung des Alkylrestes (als Aldehyd) führt. ALKBH wird dabei Im Gegensatz zu MGMT nicht verbraucht. Modifiziert nach Fu et al., 2012.

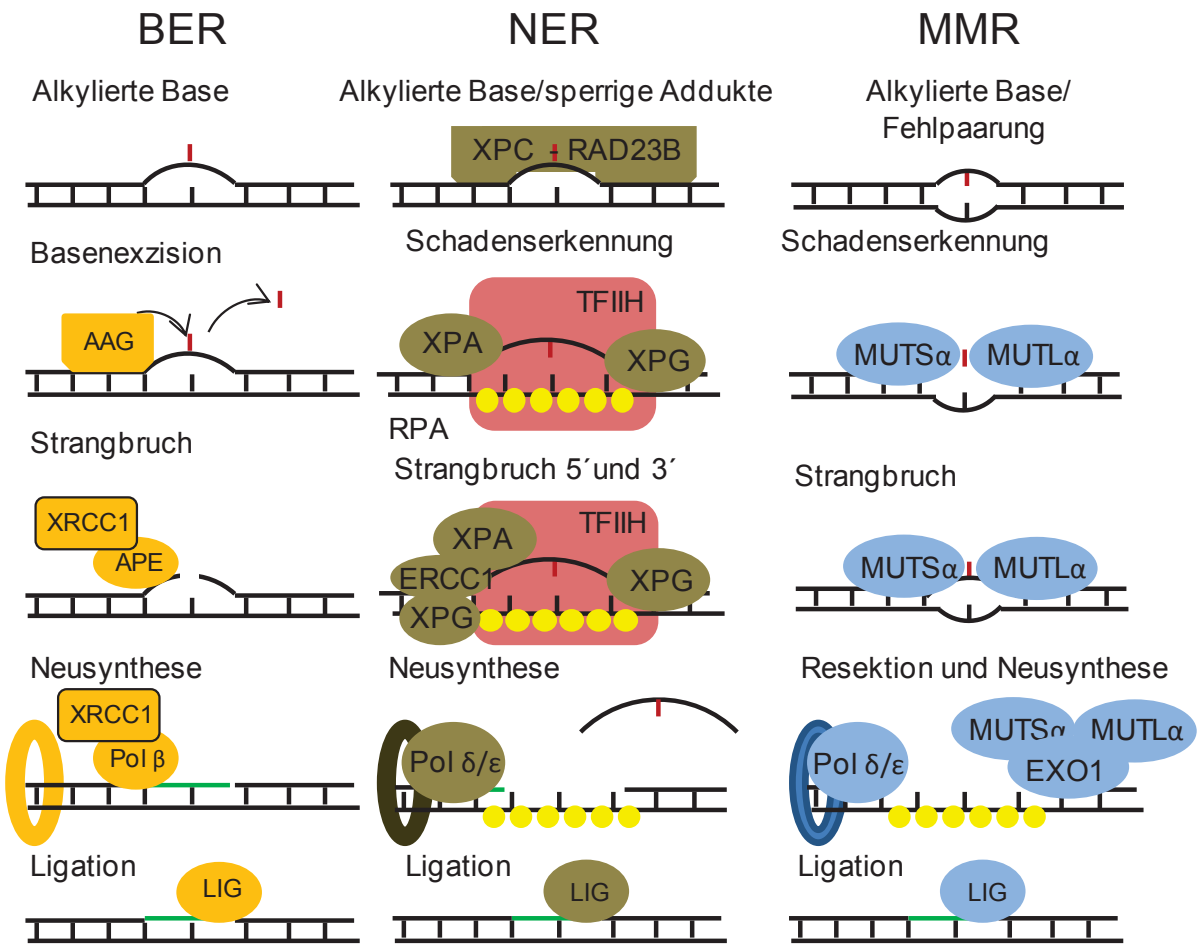


Abbildung 12: Verschiedene Reparaturwege alkylierter DNA-Basen. Die Basen Exzisions Reparatur (BER) entfernt einfache alkylierte und oxidierte Basen. Die BER wird durch eine Glycosylase wie z.B: der Alkyladenin DNA-Glycosylase initiiert, indem sie die beschädigte Base entfernt. Anschließend wird das Phosphatrückrat der DNA durch eine Endonuklease APE (apurinic-apyrimifinic endonuclease) geschnitten. In der „Short-patch" Variante wird das fehlende Nukleotid dann durch die Polymerase β neu addiert und durch eine Ligase wieder verbunden. Die „Long-patch"

BER-Variente (hier nicht gezeigt) verläuft prinzipiell ähnlich nur das hier durch die Polymerase ein längeres Stück der DNA neusynthetisiert wird und der dann entstehende Überhang durch eine Endonuklease (FLAP) entfernt wird. Die Nukleotid Exzisions Reparatur (NER) entfernt hingegen sperrigere die Helix-Struktur störende DNA-Addukte. Die NER kann prinzipiell in zwei Wege unterteilt werden die transkriptionsgekoppelte (TC-NER, hier nicht gezeigt) und die genomweite GG-NER die sich in der Art unterscheiden wie der Schaden erkannt wird. Bei der GG-NER wird der Schaden durch XPC-RAD23B erkannt. Anschließend wird ein ca. 27-29 Nukleotid den Schaden enthaltenes Stück des DNA Strangs herausgeschnitten. Der noch vorhandene Partnerstrang dient dann als Template für die Neusynthese durch Pol δ oder Pol ε, gefolgt von der anschließenden Ligation. Die Mismatch Reparatur (MMR) erkennt und entfernt fehlgepaarte Basen, wie sie auch durch Alkylierungen entstehen können. Dabei wird die Fehlpaarung durch MUTs Hetero-Dimere erkannt was in Folge zur Rekrutierung von MUTL Hetero-Dimeren und zur Einführung eines Strangbruches in 5` oder 3` Nähe zur Fehlpaarung. Dieser wird als Angriffspunkt der Exonuklease (EXO1) genutzt, um einen Teil der DNA der die Fehlpaarung enthält zu entfernen. Anschließend wird der Strang durch Pol δ oder Pol ε neusynthetisiert und von einer Ligase verbunden. Modifiziert nach Fu et al., 2012.

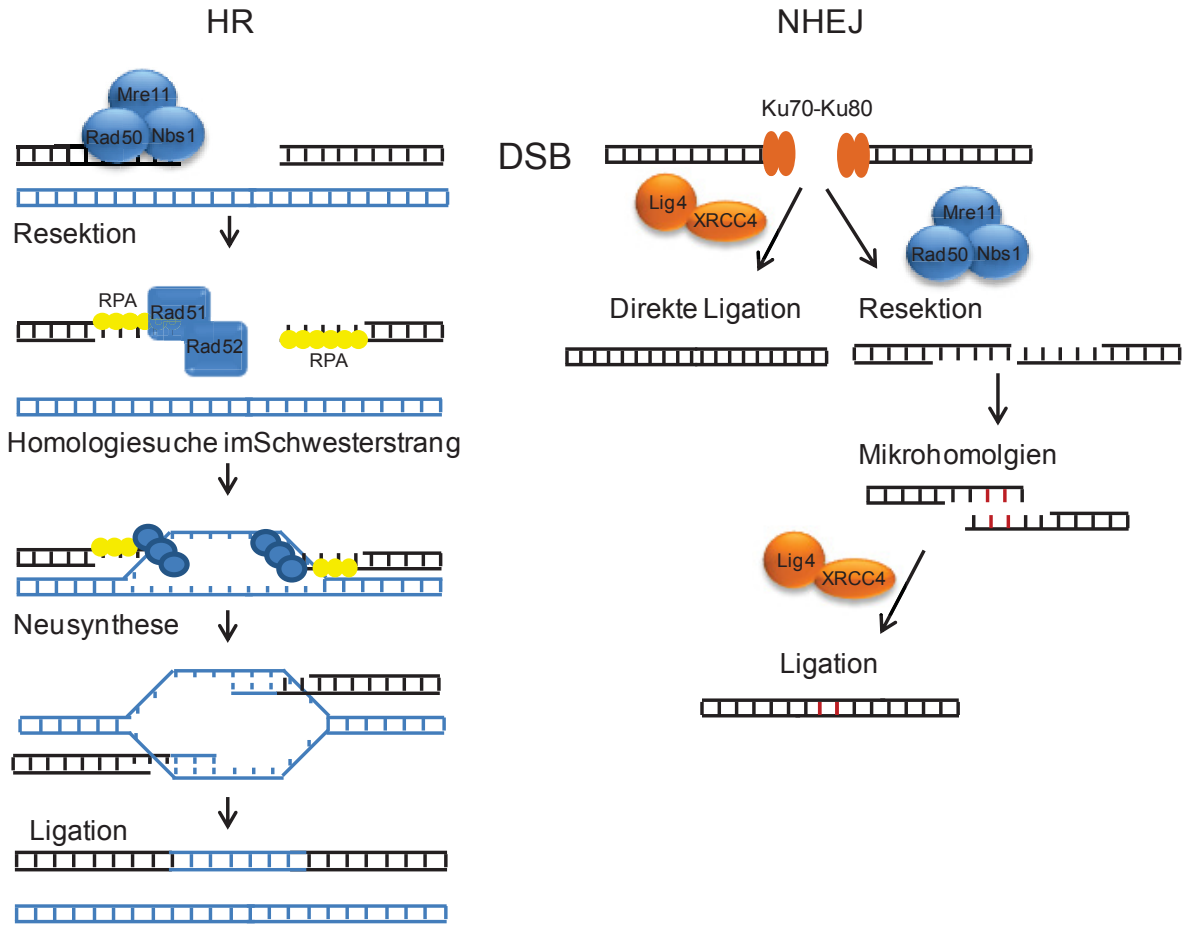


Abbildung 13: **Doppelstrangbruch (DSB) Reparaturmechanismen.** Bei der Homologen Rekombination (HR) wird der DSB durch den MRN Komplex, bestehend aus Mre11, Rad50, Nbs1 erkannt. Dieser prozessiert die die DNA Enden so dass ein 3´ Einzelstrangüberhang entsteht. An diesen Einzelstrang binden dann das Replikations protein A (replication protein A, RPA) und Rad51 und Rad52 werden zum Doppelstrangbruch rekrutiert. Rad51 vermittelt dabei die Invasion des Einzelstranges in das Schwesterchromatid, auf der Suche nach der passenden homologen Ergänzung. Wird diese gefunden wird anhand des Schwesterstrangs die DNA neusynthetisiert der Komplex aus den zwei DNA Doppelhelices wieder aufgelöst und neu ligiert. Dieser Prozess verläuft somit fehlerfrei. Bei der Nicht homologe Endverknüpfung (NHEJ) werden die Enden des DSB durch Ku70-Ku80 Heterodimere erkannt und gebunden. Falls der Bruch passende (homologen) Überhänge besitzt kann der Bruch direkt ligiert werden was in der Regel dann fehlerfrei passiert. Besitzt der DSB keine passenden Enden werden die Enden des DSB durch den MRN-Komplex prozessiert. An sogenannten Mikrohomologien können beide Stränge dann miteinander assoziieren und anschließend verknüpft werden. Dieser Weg ist fehlerbehaftet da oft ein Teil der DNA dabei verloren geht. Modifiziert nach van Attikum & Gasser 2005.

Als einen zusätzlichen Schutzmechanismus des Organismus vor mutierten Zellen können DNA Schäden eine Signalkaskade induzieren, an deren Ende der programmierte Selbstmord (Apoptose) steht (Abbildung 14).

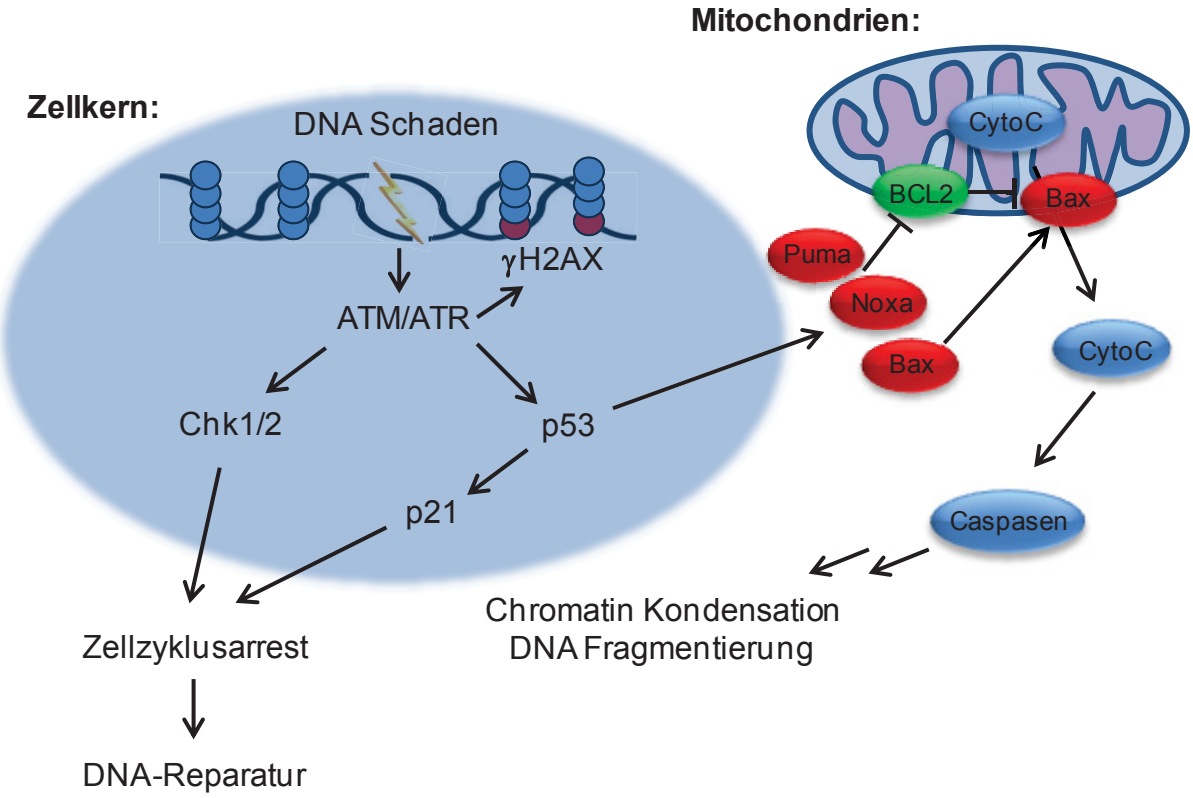


Abbildung 14: DNA-Schaden-induzierte Apoptose. DNA-Schäden führen zu Aktivierung verschiedener Signalkaskaden (Zhou & Bartek, 2004). Die Aktivierung der Kinasen ATM und ATR spielt dabei eine zentrale Rolle in der Signalweiterleitung. ATM/ATR aktivieren die Checkpoint Kinasen 1 und 2 was im weiteren Verlauf zum Anhalten des Zellzyklus (G2/M- oder G1/S-Arrest) führt. Zusätzlich wird der Tumorsupressor p53 aktiviert welcher wiederum zur Aktivierung und verstärkten Transkription von p21, einem Zellzyklusinhibitor (G1/S-Arrest), und von pro-apoptotischen Proteinen wie Puma, Noxa und Bax führt. Puma und Noxa wirken dabei inhibierend auf das anti-apoptotische Protein Bcl-2. Dieses lagert sich normalerweise in der Membran der Mitochondrien ein und hemmt dort die Cytochrom C (CytoC) Durchlässigkeit. Auch Bax lagert sich in der Membran der Mitochondrien ein, führt dort aber zu einer Erhöhung der Durchlässigkeit für CytoC. Zytosolisches CytoC wiederum führt zur Aktivierung verschiedener Caspasen. Diese besitzen Proteaseaktivität und führen zu einer Reihe von Proteinspaltungen in deren Folge es auch zur Fragmentierung der DNA und zur Chromatin-Kondensation kommt. Einer der toxischsten DNA Schäden sind Doppelstrangbrüche. Ein einzelner nicht reparierter DSB kann ausreichen um in einer Zelle den Prozess der Apoptose auszulösen (Rich et al., 2000). Ein gängiger Marker für DSB ist das phophorylierte H2AX (γH2AX) (Bonner et al. 2008). Modifiziert nach Siddik 2009.

Werden die DNA Schäden nur unzureichend repariert oder sind zu viele DNA Schäden vorhanden und die Gefahr von Mutationen groß, geht die Zelle mit großer Wahrscheinlichkeit in den „Freitod“. Darüber hinaus können entartete mutierte Zellen durch Immunzellen erkannt und vernichtet werden. (Abbildung 15) (Dranoff 2004). Mutierte Zellen unterscheiden sich aber meist nur wenig von den ursprünglichen Zellen, was die Erkennung durch das Immunsystem erschwert.

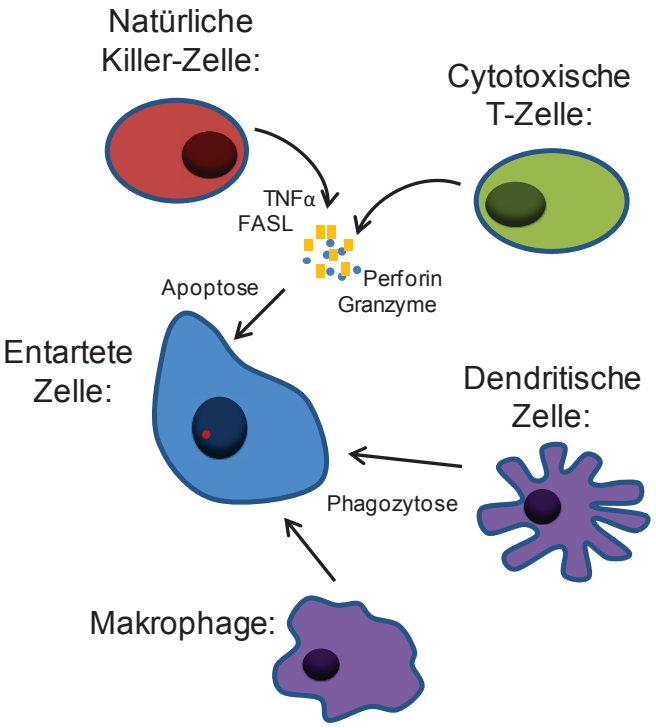


Abbildung 15: Immunsystem und Krebs. Zellen des angeborenen Immunsystems können durch spezielle Rezeptoren (wie NKG2D) bestimmte Stress induzierte Oberflächenmarker wie MICA und MICB auf den entarteten Zellen erkennen. Natürliche Killer (NK) Zellen können aber auch den Verlust des Hauptkompatibilitätskomplexes (MHC I) von Krebszellen registrieren. Nach Stimulation können NK-Zellen und Cytotoxische T-Zellen Tumorzellen durch Perforin und Granzyme, aber auch durch die Expression und Ausschüttung von Apoptose induzierende Liganden wie FASL oder TNFα zerstören. Dendritische Zellen nehmen sterbende Zellen oder deren Überreste auf, wandern zu den regionalen Lymphknoten und präsentieren vom aufgenommen Zellmaterial Stücke auf ihren Rezeptoren, um so weitere Immunzellen auf die entarteten Zellen aufmerksam zu machen. Modifiziert nach Dranoff, 2004.

Trotz der zahlreichen Maßnahmen des Organismus Mutationen zu unterdrücken, werden diese nicht alle erkannt oder repariert. Doch nicht alle Mutationen führen automatisch zu Krebs. Nur recht selten werden wichtige zentrale Regulatorproteine getroffen, die für die Krebsentstehung von zentraler Bedeutung sind. So findet sich in etwa 50 % der Tumore eine inhibierende Mutation von des Tumorsupressors p53 (Vogelstein, Lane, and Levine 2000). Unter Tumorsupressoren versteht man dabei solche Proteine die sich hemmend auf die Tumorenstehung auswirken. In dieser Gruppe finden sich vor allem Zellzyklus-hemmende und/oder Apoptose-fördernde Proteine. Bei Tumor-assoziierte Mutationen dieser Tumorsupressorgene handelt es sich in der Regel um Mutationen die zu einem Funktionsverlust des resultierenden Proteins führen. Demgegenüber stehen die Protoonkogene. Zu dieser Gruppe gehören vor allem Gene, deren durch sie kodierte Proteine Prolieferations-fördernde und/oder Apoptose-hemmende Wirkung haben. Die Tumor-assozierten Mutationen dieser Protoonkogene führen in der Regel zu einer Überexpression oder Hyperaktivierung des kodierten Proteins. Protoonkogene die eine Krebs-fördernde Mutation enthalten werden als Onkogene bezeichnet. Im Falle von Leberkrebs spielen vor allem Mutationen im Ras/Raf-Signalweg und dem β-Catenin-Signalweg eine besondere Rolle. So sind über 30 % der Lebertumore Ras-mutiert (Downward 2003) während in etwa 78 % der HCC Fälle die entarteten Zellen, im Gegensatz zu

gesunden Hepatocyten, eine vermehrte β-Catenin Expression zeigen (Tien et al. 2005). Dabei liegt β-Catenin vor allem vor dem Hintergrund einer Hepatitis-Infektion in seiner aktiven Form vor (Tien et al. 2005). Sowohl der Ras als auch der β-catenin Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Weiterleitung externer Signale (Wachstumsfaktoren und weitere Zytokine) (Abbildung 16 / Abbildung 17).

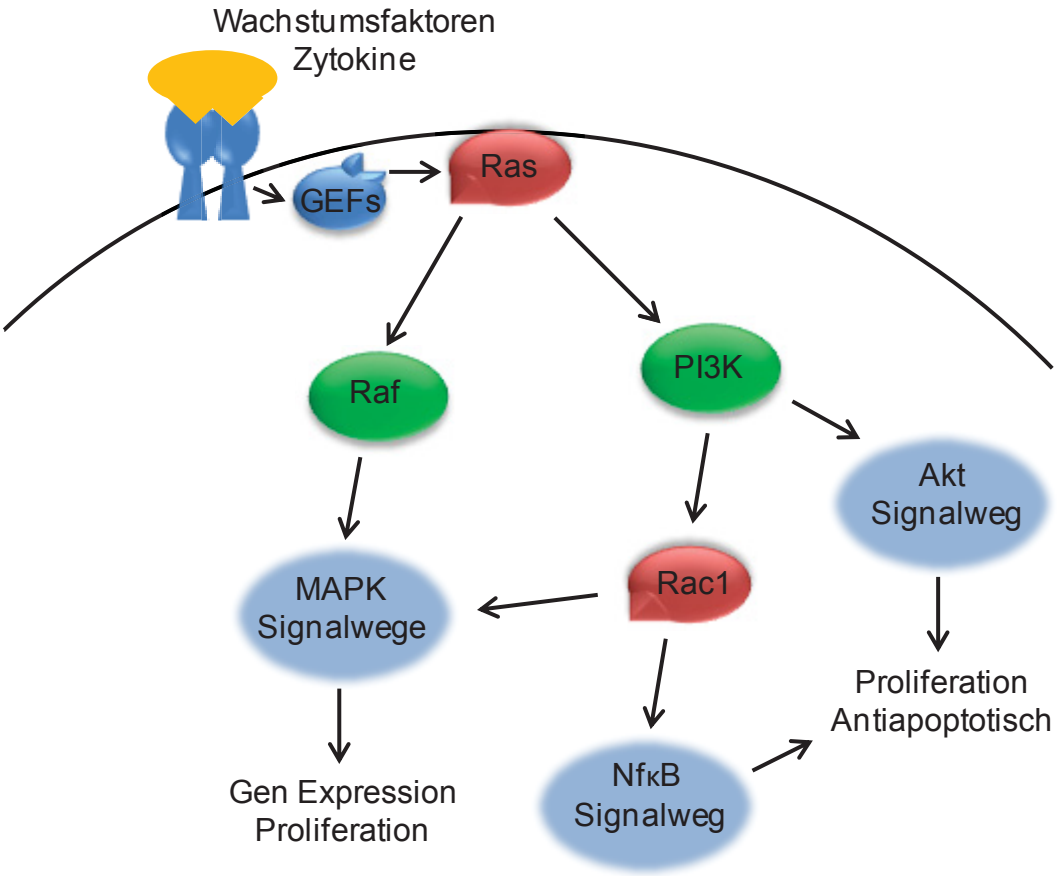


Abbildung 16: Ras Signalweg. Das Protoonkogen Ras (Rat sarcoma) kodiert für eine membranassoziierte kleine GTPase. Diese wird normalerweise nach Bindung extrazellulärer Sigalmoleküle (wie Wachstumsfaktoren) an die entsprechenden Rezeptoren aktiviert. Dabei wird durch Bindung eines Guanintriphophats (GTP) eine Konformationsänderung hervorgerufen, die wiederum die Bindung einer Vielzahl von Effektormolekülen ermöglicht. Diese Aktivierung wird durch GEFs (Guanin exchange factors) vermittelt. Die Bindung an seine verschiedenen Effektoren führt zu Aktivierung wichtiger Signalwege, wie dem MAPK (Mitogen aktivated protein Kinase), dem NFκB (eukaryotic nuclear factor κB) und dem Akt (v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene)/ PKB (Protein Kinase-B) Signalweg. Die Aktivierung von Ras führt in der Regel zu einer gesteigerten Proliferation und Aktivierung anti-apoptotischer Signalwege (Berndt et al., 2011; Nagase & Fujita, 2013). Modifiziert nach Downward 2003.

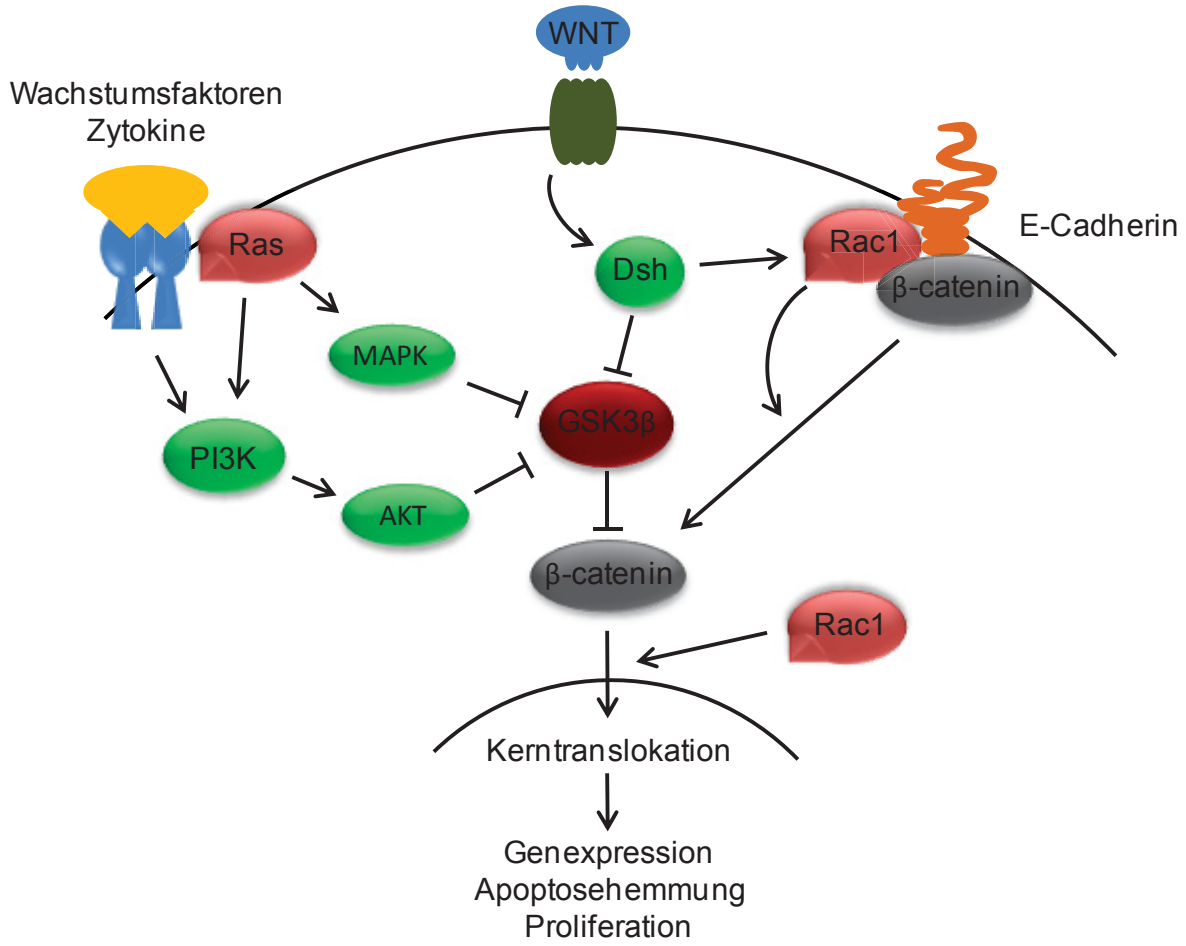


Abbildung 17: β-catenin Signalweg. β-catenin (cadherin-associated protein beta 1) ist vor allem im Zusammenhang mit E-Cadherin an der Bildung von Zell-Zellkontakten beteiligt. Allerdings spielt β-catenin auch eine wichtige Rolle in der Signaltweitergabe. Zytosolisches β-catenin wird durch GSK3β Phosphorylierung inaktiviert und im Zytosol festgehalten. GSK3β selbst wird durch verschiedene Kinasen wie der AKT und verschiedene MAPK inaktiviert (Bikkavilli and Malbon 2009). Der wichtigste Signalweg über den β-catenin aktiviert wird ist der WNT-Signalweg (Wingless-Type MMTV Integration Site Family), wobei es sich bei WNT um eine Familie verschiedener löslicher Wachstumsfaktoren handelt. Nach Aktivierung des WNT-Rezeptors bindet das sogenannte Dsh (Dishevelled) protein an GSK3β und erleichtert die Inaktivierung dieser Kinase. Das Dsh protein führt darüber hinaus auch zur Aktivierung von Rac1 und fördert die Freisetzung des an Cadherin gebundenen β-catenin (Akhtar and Hotchin 2001). Aktives Rac1 ist aber auch an der Kerntranslokalisation von β-catenin beteiligt (Wu et al., 2008). Nukleäres β-catenin wirkt anti-apoptotisch und führt zu einer verstärkten Proliferation. Mutationen in diesem Signalweg führen zu einer verstärkten Zellkontakt-unabhängigen Proliferation (Orford et al., 1999). Modifiziert nach Li et al., 2012.

1.3 Rac1-regulierte Signalwege

Interessanterweise ist Rac1 sowohl am Ras wie auch am b-catenin Signalweg beteiligt. So konnte *in vitro* bereits gezeigt werden, dass Rac1 für Transformation mit mutiertem Ras erforderlich ist (Solski et al. 1995) und auch bei der Kerntranslokalisation von β-Catenin eine wichtige Rolle spielt (Wu et al., 2008). Rac1 gehört zur Familie der kleinen Ras-homologen (Rho) GTPasen, die wiederum zu Super-Familie der Ras GTPasen gehört (Abbildung 18). Dabei handelt es sich um

kleine GTP-bindenden, monomere Proteine die von essentieller Bedeutung für die regulatorischen Prozesse der Zelle sind (Etienne-Manneville & Hall, 2002). So leiten diese GTPasen, externe Stimuli von der Zellmembran an die verschiedensten Kinasen, Transkriptionsfaktoren und Zytoskelettmodulatoren weiter.

Super-Familie der Ras GTPasen

Familie	***Rab***	***Ras***	***Arf***	***Rho***	***Ran***	***Weitere***
Anzahl der beschriebenen Isoformen	63	39	30	22	1	10
Biologisch gut charakterisierte Isoformen	Rab1 Rab5	H-Ras N-Ras K-Ras	Arf1 Arf6	RhoA Cdc42 Rac1	Ran	

Abbildung 18: Superfamilie der Ras GTPasen. Gezeigt sind die verschiedenen GTPase-Familien und beispielhaft einige gut charakterisierte Vertreter der jeweiligen Familie. Modifiziert nach Wennerberg et al., 2005.

Diese kommen dabei in zwei unterschiedlichen Zuständen vor: dem aktiven GTP gebundenen und dem inaktiven GDP gebunden. Die Aktivierung erfolgt durch GEFs (Guanin nucleotide exchange factors), die den Austausch von GDP zu GTP stimulieren. Die Inaktivierung wird dagegen durch GAPs (GTPase-activating factors) gefördert, indem diese die sehr schwache intrinsische GTPase Aktivität der GTPasen deutlich verstärken (Shutes & Der 2006). Die Rho GTPase Rac1 beeinflusst neben seiner Funktion in der Regulation des Cytoskeletts eine Reihe weiterer Signalwege (Abbildung 19). So werden wichtige Prozesse wie Apoptose (Yoshida et al., 2010), Proliferation (Olso et al., 1995), Kontaktinhibition (Liu et al., 2006), Wundheilung (Tscharntke et al. 2007), Migration (Deplazes et al. 2009) und die Glucose-Aufnahme (Chiu et al., 2011) durch Rac1 regulierte Signalwege beeinflusst.

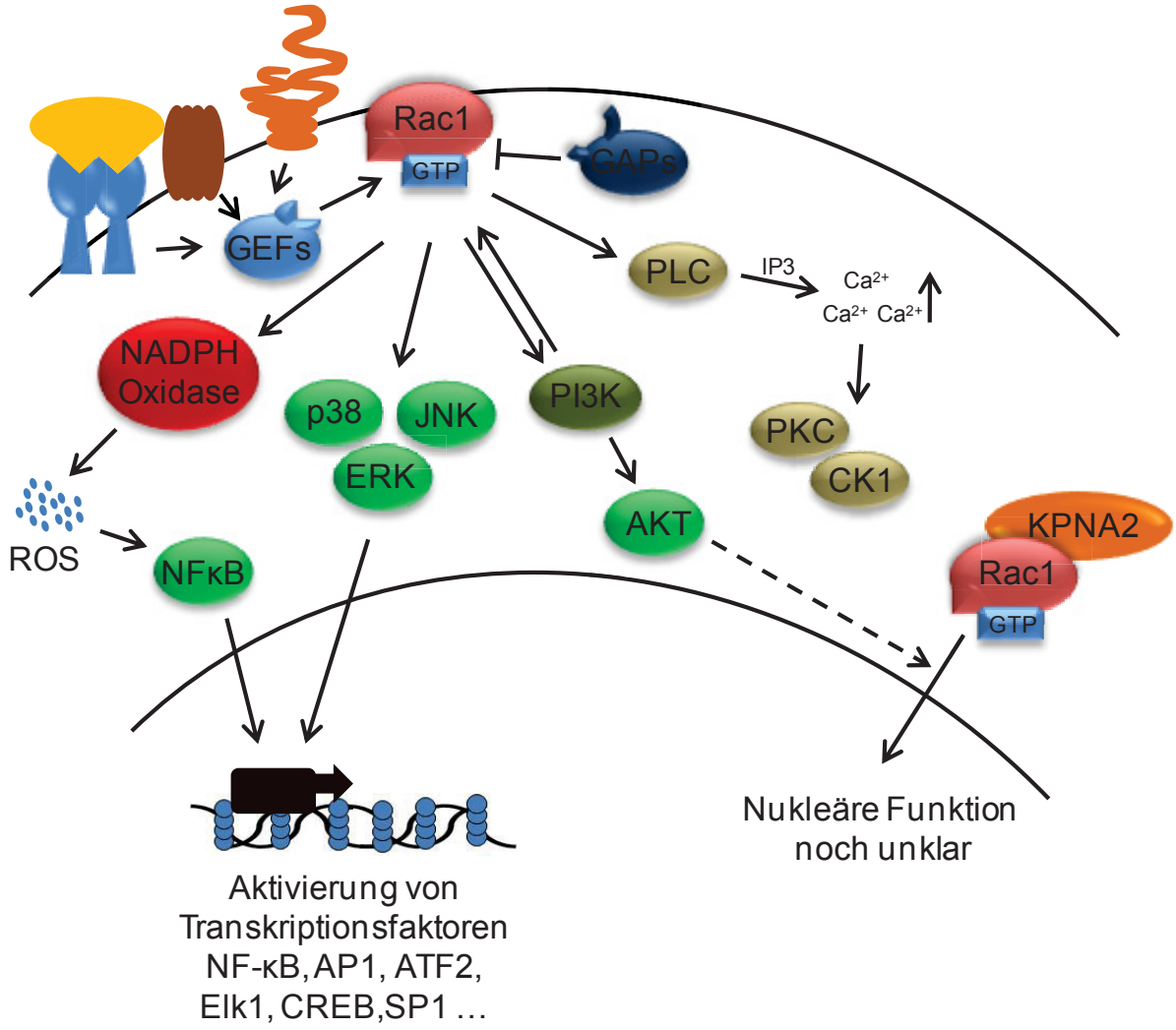


Abbildung 19: Rac1 regulierte Signalwege. Die kleine Rho (Ras-homologe) GTPase Rac1 wird wie Ras über GEFs aktiviert und über GAPs deaktiviert. Die Aktivierung von Rac1 folgt meist auf eine Aktivierung eines Tyrosinkinaserezeptors (hierunter vor allem Wachstumsrezeptoren). Aber auch Zell-Zell-Kontakte können zur Aktivierung von Rac1 führen. Aktives GTP gebundenes Rac1 bindet an eine Vielzahl von Effektoren und kann so verschiedenste Signalwege wie den MAPK oder den Akt Signalweg aktivieren. Rac1 bindet als Untereinheit auch an die NADPH Oxidase und kann so zu einer vermehrten ROS-Bildung (Reaktive Sauerstoffspezies) beitragen. Diese wiederum kann zur Aktivierung des NFκB Signalweges führen. Aktiviertes Rac1 kann zudem zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führen was wiederum über die Bildung von Inositol-3-phosphat (IP3) den Calcium-Ausfluss aus dem rauen Endoplasmatischen Retikulum fördert und in deren Folge es zur Aktivierung Calcium abhängiger Kinasen wie z.B. der Proteinkinase C (PKC) und Caseinkinase 1 (CK1) kommen kann. Zusätzlich kann Rac1 auch mit Hilfe des Kerntransporters Karyopherin 2α in den Kern transportiert werden. Möglicherweise fördert die Phosphorylierung von Rac1 durch Akt diesen Prozess. Die nukleären Funktionen von Rac1 sind aber noch unklar.

Die Auswirkungen einer Rac1 Modulation können dabei aber sehr unterschiedlich ausfallen. So kann sowohl ein Mangel an Rac1 und dem daraus resultierenden Mangel an anti-apoptotischen Impulsen als auch eine konstitutive Aktivierung von Rac1 mit der Folge einer verstärkten ROS Bildung und/oder einer verstärkten Aktivierung der JNK zu Apoptose führen (Jin et al., 2008). Auch beim Durchschreiten des Zellzyklus scheint eine Rac1 Aktivierung sowohl beim Übergang von G1/S, als

auch beim G2/M Übergang benötigt zu werden. Der G1/S Übergang wird dabei vermutlich durch eine Rac1 abhängige Aktivierung der ERK gefördert, die wiederum den Abbau des Zellzyklusinhibitors p27 induziert (Lee & Kay, 2011). Die genauen Mechanismen der Beteiligung von Rac1 beim G2/M Übergang sind dagegen noch unklar. Allerdings ist bekannt, dass Rac1 in der G2-Phase in den Kern transloziert (Michaelson et al., 2008) und dort an Topoisomerasen II bindet (Sandrock et al., 2010). Im Gegensatz zu dieser Stimulation der Proliferation durch aktives Rac1 führt die durch Zell-Zell-Kontakte hervorgerufene Aktivierung von Rac1 zur Inhibition der Proliferation. Dies scheint in der Beteiligung von Rac1 am β-Catenin Signalweg begründet zu sein (Nakagawa et al., 2001). Krebs assoziierte Mutationen im Rac1 Gen sind mit Ausnahme der Melanome (Krauthammer et al. 2012), ganz im Gegensatz zu Ras Mutationen, eher selten. Häufiger kommen dagegen Mutationen in Rac1 aktivierenden GEFs wie Tiam1 vor (Engers et al. 2000). Auch konnte in verschiedenen Krebserkrankungen (wie Colon, Pankreas, Brust und Hodenkrebs) eine erhöhte Expression von Rac1 festgestellt werden (Karlsson et al., 2009). Welchen Einfluss Rac1 auf die Leberkrebsentstehung hat, ist bisher nicht untersucht worden.

1.4 Behandlungsmöglichkeiten des Hepatozellulären Karzinoms

Da das hepatozelluläre Karzinom schlecht auf Zytostatika anspricht (Cao et al., 2012), besteht die kurative Therapieansätze im Wesentlichen in chirurgischen Maßnahmen wie der Sektion des Tumors oder einer Lebertransplantation. Da HCC allerdings oft sehr spät entdeckt werden bzw. auch oft eine Leberzirrhose vorliegt, scheidet eine Sektion des Tumors meist aus. Falls bereits Metastasen vorhanden sind, scheidet auch eine Lebertransplantation aus, da durch die dann nötigen immunsuppressiven Maßnahmen die Überlebensrate deutlich sinken würde. Desweiteren werden minimalinvasiven Methoden wie die Thermotherapie (Laser oder Radiofrequenz), die Kryotherapie mit flüssigem Stickstoff, perkutane Ethanol Injektionen oder die transarteriellen Chemoembolisation eingesetzt, um ein Fortschreiten des Krebses in den Griff zu bekommen. Ein erster Durchbruch bei der systemischen Behandlung von fortgeschrittenen hepatozellulären Karzinomen brachte der 2007 zugelassene Multikinasen-Inhibitor Sorafenib. Dieser hemmt sowohl die Raf Kinase (*downstream* von Ras) als auch verschiedene Rezeptortyrosinkinasen (*upstream* von Ras und Rac1) (Wilhelm et al. 2008). Dies

führt sowohl zur Hemmung der Tumorzell-Proliferation als auch der Tumorangiogenese. Die durchschnittliche Überlebensrate verlängert sich um etwa 3 Monate, was aber immer noch sehr unbefriedigend ist (Llovet et al. 2008). Daher wird aktuell auch weiter an neuen systemischen Behandlungsmöglichkeiten für HCC geforscht. Vor Einführung des Sorafenib wurde fortgeschrittener Leberkrebs routinemäßig mit Doxorubicin behandelt (Cao et al., 2012). So gibt es aktuell etwa 30 klinische Studien, in denen Doxorubicin, vor allem im Zusammenhang mit der transateriellen Chemoembolisation (TACE), eingesetzt wird (U.S. National Institutes of Health, 2014).

1.4.1 Doxorubicin

Doxorubicin gehört zur Gruppe der Anthrazykline und wurde aus einer Mutante des *Streptomyces peucetius* Stammes gewonnen (Arcamone et al. 2000). Es findet breite Anwendung bei verschiedensten Krebserkrankungen wie Mammakarzinomen, Weichteilsarkomen, Leukämien und soliden Tumoren (Blum & Carter, 1974). Doxorubicin wird i.v. mittels Bolus oder Infusion verabreicht. Es besitzt eine lange terminale Halbwertszeit (HWZ) von 30 h und seine Ausscheidung erfolgt hauptsächlich über die Galle. In klinisch relevanten Dosen wirkt es über die Interkalation in die DNA und als Topoisomerase-II-Gift (Abbildung 20) (D. Gewirtz 1999). Der dominierende toxische Effekt ist dabei die irreversible Inhibition von Topoisomerase II alpha und beta, was in Konsequenz zu DNA-Doppelstrangbrüchen führt (Gewirtz, 1999). Topoisomerasen der Klasse II fügen zwecks Aufhebung topologischen Stresses der DNA reversibel Doppelstrangbrüche in die DNA ein (Rose 1988). Doxorubicin bindet irreversibel an die Topoisomerase II und verhindert somit die Religation der gespaltenen DNA-Enden. Der sogenannte „cleavable complex“ aus Doxorubicin und Topoisomerase II bleibt kovalent an die DNA gebunden, bis er proteasomal abgebaut wird (Abbildung 21). Dies führt zu DNA-Doppelstangbrüchen, die, falls sie nicht repariert werden, zum Tod der Zelle führen können (Lyu et al. 2007). Im Gegensatz zur Topoisomerase II β, die auch in nicht-proliferierenden Zellen (G0/G1-Phase) exprimiert wird, wird die Topoisomerase II α verstärkt in der S-Phase und G2/M-Phase des Zellzyklus exprimiert (Goswami et al., 1996). Proliferierende Zellen (S-Phase und G2/M-Phase) werden daher verstärkt durch Doxorubicin geschädigt (Potter et al. 2002). Andere Topoisomerase-II-Gifte wie z.B. das Podophyllotoxin Etoposid binden direkt an die Topoisomerase II und wirken

so, im Gegensatz zu Doxorubicin, als nicht in die DNA interkalierende Topoisomerase-II-Gifte (Baldwin and Osheroff 2005).

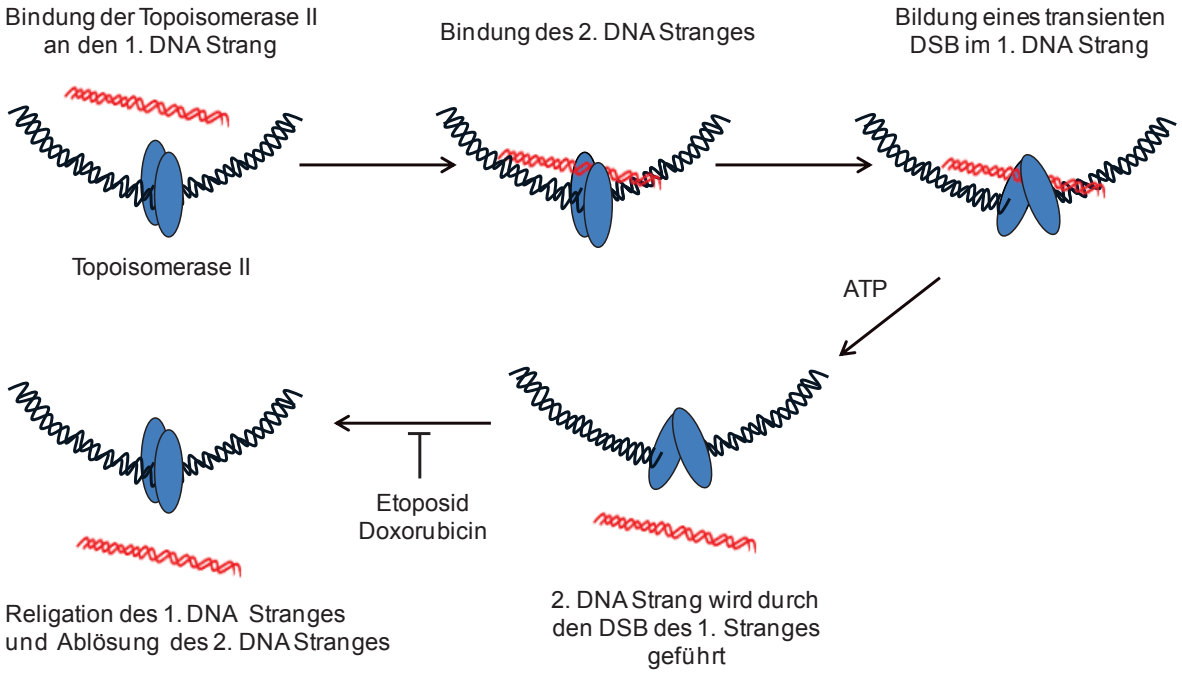


Abbildung 20: Funktionsweise von Topoisomerasen der Klasse II. Topoisomerasen vom Typ II können einen DNA-Doppelstrang durch einen anderen hindurchführen und so z.B. Spannungen die während der Replikation der DNA auftreten auflösen. Während dieses Prozesses wird in einen der Stränge ein transienter DSB gebildet durch welchen dann der zweite Strang hindurchgeführt wird. Der Prozess wird unter ATP Verbrauch vorangetrieben. Einige Tumortherapeutika wie Etoposid oder Doxorubicin verhindern die Religation des DNA Strangs, was zu stark zytotoxisch wirkenden freien DSB führen kann (Baldwin and Osheroff 2005). Bei Säugetieren kann man zwei Isoformen unterscheiden die Topoisomerase IIα, die während der S/G2/M-Phase des Zellzyklusses verstärkt exprimiert wird und der Topoisomerase IIβ, die Zellzyklus unabhängig exprimiert wird (Goswami, Roti Roti, and Hunt 1996). Modifiziert nach Nitiss 2009.

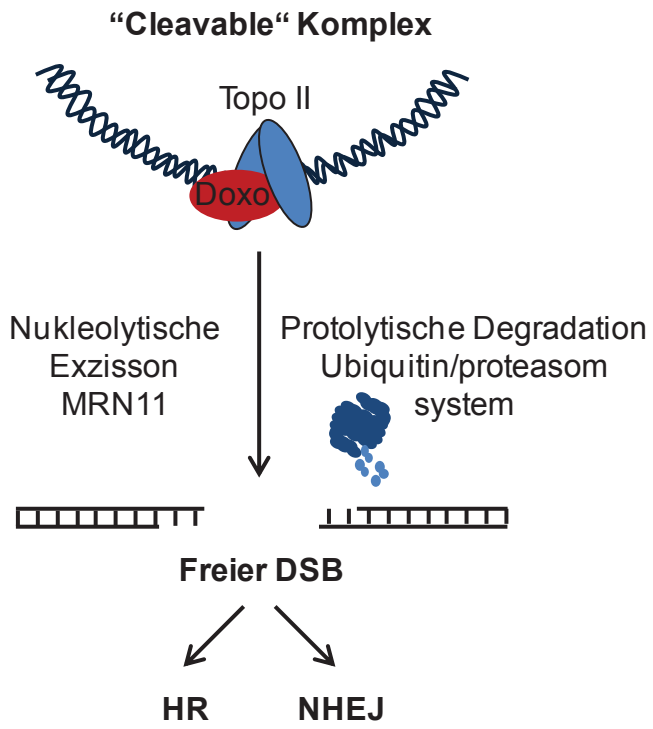


Abbildung 21 Reparatur des „Cleavable“ Komplexes. Der „Cleavable“ Komplex besteht aus kovalent an die DNA gebundener Topoisomerase II, welche z.B. durch Doxorubicin an der Religation des DSB gehindert wird. Die gebundene Topoisomerase II wird proeteasomal abgebaut, gefolgt von einer anschließenden Abtrennung des letzten an die DNA gebundenen Peptidrestes durch eine Tyrosinphosphatase TP2 (Schellenberg et al. 2012). Da die resultierenden DNA-Überhänge zusammenpassen wäre hier eine direkte Ligation durch die Nicht homologe Endverknüpfung (NHEJ) fehlerfrei. Die zweite Möglichkeit wäre die Prozessierung des DSB durch den MRN-Komplex und die anschließende Reparatur durch die Homologe Rekombination (HR) oder die NHEJ.

Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch Doxorubicin

Als weitere toxische Auswirkungen des Doxorubicins sind die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Bates 1982) (Abbildung 22), die DNA-Adduktbildung (Swift et al., 2006), sowie die Interaktion mit Helikasen (NR et al., 1992) beschrieben worden. DNA-Adduktbildung und die messbare Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies treten erst bei relativ hohen Dosen auf, die im Blut bei einer Krebstherapie nicht erreicht werden. Bei den meisten der Publikationen zur Doxorubicin-induzierten ROS Produktion wurden *in vitro* Dosen von über 10 µM verwendet. Die niedrigste *in vitro* verwendete Konzentration, bei der messbare reaktive Sauerstoffspezies auftraten, betrug 4 µM (Gewirtz, 1999). Bei der Standardtherapie beim Menschen wird aber maximal ein Serumspiegel von 1-2 µM an Doxorubicin erreicht, der schon nach kurzer Zeit (1 h) auf etwa 25-250 nM abfällt (Gewirtz, 1999). Eine direkte toxische Wirkung von Doxorubicin-induzierten ROS scheint daher im relevanten Dosisbereich nicht von Bedeutung zu sein. Wie sich aber eine, im relevanten Dosisbereich, nur schwer messbare Erhöhung der ROS-Menge auf Signalwege, wie z.B. den NFκB Signalweg, auswirkt und damit möglicherweise indirekt die Toxizität beeinflusst, bleibt weiter umstritten. Eine Zunahme an ROS kann z.B. proliferationsfördernd wirken (Havens et al., 2006) und die Aktivität der

Topoisomerase II fördern (Li et al. 1999). Dies wiederum könnte die durch Topoiomerase-II-Gifte vermittelte Toxizität verstärken.

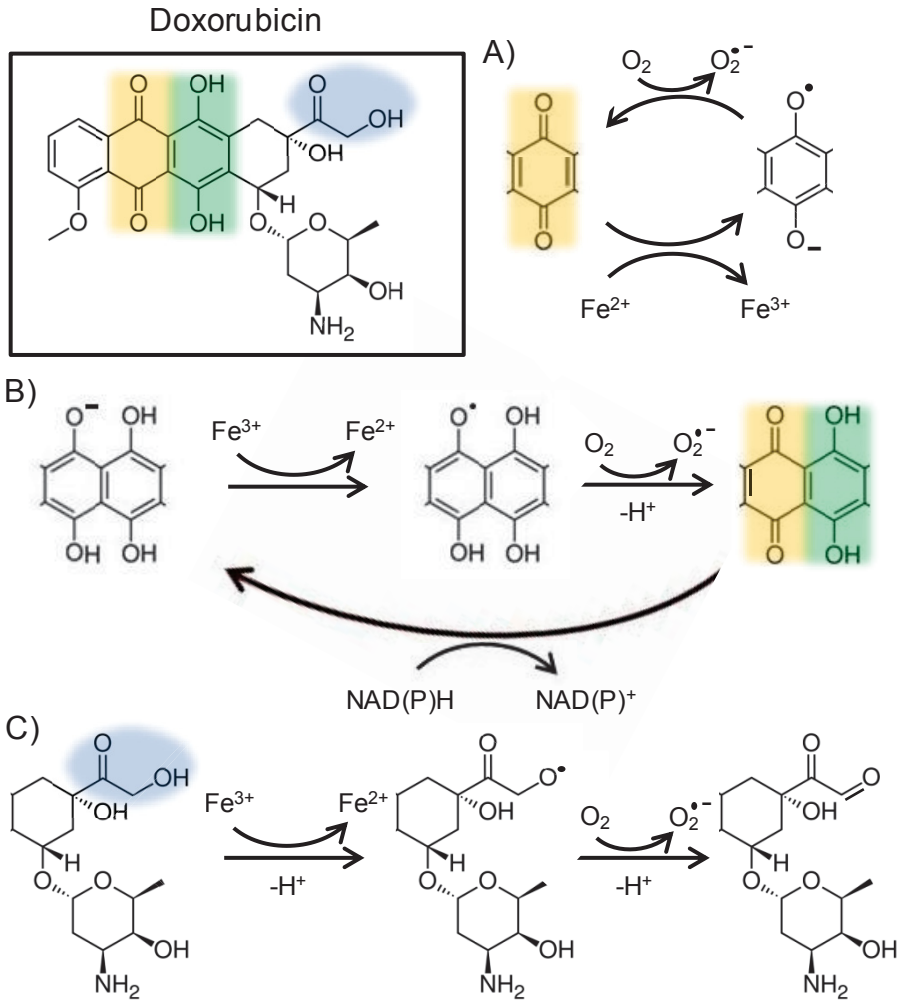


Abbildung 22 Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Doxorubicin. Die Struktur des Doxorubicin enthält mehrere Untereinheiten die zur Bildung von ROS beitragen können. Vor allem auf Grund seiner Chinon-Struktur kann es als Reaktionspartner mehrerer Einelektronentransferreaktionen dienen (A). Diese Reaktionen führen auch zur Bildung von Radikalen Sauerstoffspezies wie dem Hyperoxid-Anion. Die Chinonstruktur kann auch in NAD(P)H abhängigen Prozessen zum Hydrochinon umgewandelt werden was wiederum in zwei Einelektronentransferreaktionen unter Reduktion von Fe^{3+} und Bildung eines Hyperoxid-Anions zum Chinon zurückreagieren kann (B). Auch die alpha-Hydroxy-Keton-Struktur kann in zwei Schritten unter Bildung eines Hyperoxid-Anions zum alpha-Keto-Aldehyd oxidiert werden (C) (Torres and Simic 2012).

Die ROS Entstehung ist dabei grundsätzlich von der durch Ionisierende Strahlung (Ionizing Radiation, IR), die in dieser Arbeit als Kontrolle für nicht Topoisomerase II abhängige DNA-Schäden verwendet wurde, zu unterscheiden. IR führt nicht nur zu durch ROS-vermittelten indirekten Einzel- und Doppelstrangbrüchen, sondern kann auch durch direkte Einwirkung auf die DNA Schäden verursachen (Ross 1999). Die Art und Weise wie eine Behandlung mit Doxorubicin oder Strahlung zu DNA Schäden führt ist also grundsätzlich verschieden. Gemeinsam haben aber beide

Behandlungen, dass sie sowohl zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA führen (Agarwal et al., 2006).

1.4.2 Kombination von Doxorubicin mit Inhibitoren rezeptorvermittelter Signalkaskaden

Ein vielversprechender therapeutischer Ansatz ist die Kombination von Doxorubicin mit Inhibitoren der verschiedenen rezeptorvermittelten Signalkaskaden. So konnte bereits in einer aktuellen Phase III Studie durch die Kombination von Doxorubicin mit Sorafenib die mittlere Überlebensdauer von 6,5 Monaten (Doxo plus Placebo) auf 13,7 Monate (Doxo plus Sorafenib) und die progressionsfreie Überlebenszeit von 2,8 Monaten auf 6,4 Monate gesteigert werden (Johnson et al., 2010; Hutchinson, 2011). Die aktuell noch laufende Vergleichsstudie von Doxorubicin/Sorafenib vs. Sorafenib versucht diesen Vorteil nun weiter zu evaluieren (Dollinger, 2014). Problematisch könnte bei der Kombination von Sorafenib mit Doxorubicin aber werden, dass sowohl Sorafenib als auch Doxorubicin kardiotoxische Nebenwirkungen zeigen (Force et al., 2007; Chlebowski 1979). So führte die Kombinationsbehandlung von Sorafenib mit Doxorubicin in 19 % der Patienten zu einer Therapie-bedingten linksventrikulären systolischen Dysfunktion während dies nur 2 % der Patienten in der Vergleichsgruppe (Doxorubicin plus Placebo) betraf (Johnson et al. 2010). Interessanterweise konnte bei einer Kombinationsbehandlung von Doxorubicin mit dem Cholesterinsenker Lovastatin bei Mäusen eine reduzierte Kardiotoxizität festgestellt werden (Feleszko et al., 2000). Dabei scheint sich diese protektive Eigenschaft von Lovastatin vornehmlich auf nicht transformierte Zellen zu begrenzen während die toxische Wirkung von Doxorubicin auf Tumorzelllinien durch Lovastatin sogar noch verstärkt wird (Feleszko et al., 2000; Rozados et al., 2008).

1.4.3 Lovastatin

Statine gehören zu den am häufigsten verschriebenen und verkauften Medikamenten der USA (Kleinrock 2012). Sie hemmen die HMG-CoA-Reduktase kompetitiv und somit die Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonsäure (Kreisberg 1991), einer Vorstufe des Cholesterins (Grundy and Diego 1978). Diese HMG-CoA-Reduktase Inhibition führt aber auch zur Hemmung der Bildung von Isoprenvorstufenmolekülen (Raiteri, 1995), die wiederum für die posttranslationalen Modifikationen (Farnesylierung (C15) und Geranylgeranylierung (C20)) kleiner Rho-GTPasen

benötigt werden (Adamson et al., 1992). Diese Modifikationen sind für die C-terminale Verankerung der GTPasen an der inneren Zellmembran verantwortlich (Adamson et al., 1992; Maltese, 1990) (Abbildung 23).

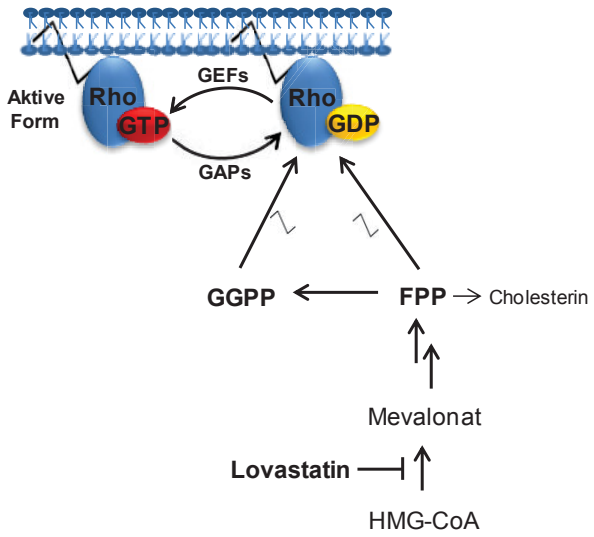


Abbildung 23 Inhibition kleiner Rho GTPasen durch Lovastatin. Statine wie Lovastatin inhibieren die HMG-CoA-Reduktase. HMG-CoA-Reduktasen sind an der Synthese von Cholesterin beteiligt. Über diesen Syntheseweg werden auch die Vorstufen (Farnesylpyrophophat (FPP) und Gernylgeranylpyrophosphat (GGPP)), die für die Prenylierung kleiner GTPasen benötigt werden, synthetisiert, Diese Prenylierung der kleinen GTPasen ist wichtig für deren Verankerung an der Membran. Fehlt diese Verankerung werden die kleinen GTPasen in ihrer Funktion gehemmt. Modifiziert nach Hamalukic et al., 2011.

Lovastatin hemmt so viele wichtige Rho-GTPase-vermittelte Signalwege. Das Prodrug Lovastatin wird vor allem im Darm und der Leber metabolisch aktiviert (Huttunen et al., 2011). In Tierversuchen mit Ratten konnte bereits eine protektive Eigenschaft von Lovastatin gegenüber der chemisch (durch Diethylnitrosamine und 2-Acetylaminofluoren) induzierten Leberkanzerogenese ermittelt werden (Björkhem-Bergman et al., 2010). Lovastatin scheint sich hier als mögliches Tumorpräventivum anzubieten (Lonardo & Loria, 2012; Tsan et al., 2013). Auch bei der Behandlung von HCC könnte Lovastatin, vor allem in Kombination mit dem Tumortherapeutikum Doxorubicin, von therapeutischem Interesse sein. Die Inhibition der kleinen GTPasen durch Lovastatin wirkt dabei wie Sorafenib hemmend auf Rezeptortyrosinkinase-abhängige Signalwege. Lovastatin schützt aber gleichzeitig vor der Doxorubicin vermittelten Kardiotoxizität. Neuste Untersuchungen zum Lovastatin-vermittelten Schutz von Normalgewebe gegenüber Doxorubicin lassen darauf schließen, dass dieser vor allem auf die Inhibition der kleinen Rho GTPase Rac1 zurückzuführen ist (Huelsenbeck et al., 2011; Yoshida et al., 2009; Wang et al., 2012).

1.5 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

Lovastatin schützt primäre humane Zellen (HUVEC) vor durch Doxorubicin induziertem Zelltod (Damrot et al. 2006). Dieser Lovastatin-vermittelte Schutzeffekt ist dabei vermeintlich auf eine Inhibition der kleinen Rho GTPase Rac1 zurückzuführen (Huelsenbeck et al., 2011). Wie eine Rac1 Inhibition vor der Doxorubicin-induzierten Toxizität schützt und warum vor allem nicht transformierte Zellen geschützt werden, ist allerdings unklar und soll im ersten Teil dieser Arbeit untersucht werden. Hierzu wurde ein Rac1 spezifischer „small molecule“ Inhibitor verwendet und der Einfluss dieser Inhibition auf die Doxorubicin-induzierte DNA Schadensantwort vor allem anhand der beiden humanen Leberkrebszelllinien HepG2 (p53wt) und Hep3B (p53mut) analysiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von Rac1 auf die Leberkanzerogenese mittels eines Leberspezifischen *Rac1 KO* Mausmodells überprüft. In früheren Arbeiten konnte bereits ein präventiver Effekt von Lovastatin auf die chemisch durch DEN induzierte Hepato-Karzinogenese gezeigt werden (Björkhem-Bergman et al., 2010). Die Bedeutung der kleinen GTPase Rac1 für die Leberkrebsenstehung, wurde in dieser Arbeit erstmalig untersucht. Auf Grund seiner wichtigen Funktion sowohl im Ras- als auch im β-Catenin-Signalweg könnte Rac1 dabei von zentraler Bedeutung sein. Um dies zu klären, wurde sowohl der Einfluss von Rac1 auf die kanzerogene Wirkung von DEN, 40 Wochen nach Behandlung, als auch sein Einfluss auf Mechanismen der Initiation von Leberkrebs 24 und 72 h nach DEN Behandlung, untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blottingkammer	Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München
Brutschrank	B5060 EK/CO2	Heraes, München
Dampfgarer	FS 20 R Multi Gourmet, Type 3216	Braun, Kronberg/Taunus
Elektrophoresekammer	Mini-Protean	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer	PerfectBlue Gelsystem Mini S	Peqlab, Erlangen
FACS	BD Accuri C6	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Feinwaage	TE313-DS	Satorius, Göttingen
Western Blot Dokumentationssystem	Fusion FX7	Peqlab, Erlangen, Germany
Geldokumentationsstation	Eagle Eye	Tratagene, La Jolla, CA, USA
Hämatologiesystem	ADVIA 120	Siemens, Deutschland
Infrarot Imaging System	Odyssey	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Mikroskop	Axiovert 35	Carl Zeiss AG, Göttingen
Mikroskop	BX 50	Olympus, Hamburg
Mikroskop	BX43	Olympus, Hamburg
Mikroskop	LSM 700	Carl Zeiss AG, Göttingen
Mikrotom	Hyrax M25	Carl Zeiss AG, Göttingen
Paraffinausgießstation	Leica EG1150H	Leica, Nussloch

pH-Meter	pH 211	Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA
Pipetten	Pipetman classic	Gilson, Middleton, WI, USA
Spannungsquelle	PowerPac	Bio-Rad, München
Spektralphotometer	Nanodrop ND 1000 UV/Vis	Peqlab, Erlangen
Sterilbank	Lamin Air, HB2472	Heraeus, München
Thermocycler, Endpunkt PCR	MyCycler	Bio-Rad, München
Thermocycler, Real-time PCR	MyIQ	Bio-Rad, München
Ultraschallstab	Sonifier 250	Branson, Dietzenbach
Ultra-Turrax	SilentCrusher S	Heidolph, Schwabach
Zellhomogenisator	TissueLyser	Qiagen, Hilden
Zellzählkammer nach Neubauer	Improved Neubauer	Optic labor, Lancing, UK
Zentrifuge	Labofuge 400 R	Heraeus, München

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tab. 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Größe	Hersteller
96well-Platte für realtime-PCR	---	Thermo scientific, Waltham, MA, USA
Abdeckfolien für realtime-PCR	---	Thermo scientific, Waltham, MA, USA
Cryogefäße	2 ml	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
Deckgläschen	24x60 mm	Engelbrecht, Edermünde
Eppendorfgefäße	0,2 ml 1,5 ml	Eppendorf, Hambrug

	2,0 ml	
Glaspipetten	5 ml 10 ml	Brand GmbH, Wertheim
Histosetten	---	Roth, Karlsruhe
Kanülen	0,45x25 mm 0,9x40 mm	B. Braun AG, Melsungen
Nitrozellulose	---	Whatman GmbH, Dassel
Objekträger, SuperfrostPlus	---	Menzel, Braunschweig
Pipettenspitzen	10 µl 100 µl 1000 µl	Starlab, Hamburg
Shreddersäulen	---	Qiagen, Hilden
Spritzen	1 ml	B. Braun AG, Melsungen
Tubes	15 ml 50 ml	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturgefäße	Schale, 10 cm Schale, 3,5 cm Platte, 6 well Flasche 25 cm2 Flasche 75 cm2	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich

2.1.3 Kits

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Kits.

Kit	Hersteller
Dako REAL EnVision Detection System	Dako, Hamburg
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche Applied Biosciences, Mannheim
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
RedTag Ready Mix	Sigma-Aldrich, München
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

SensiMix SYBR Fluorescein Kit	Bioline, Luckenwalde

2.1.4 Chemikalien

Tab. 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Gibco, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Diethylnitrosamin	Sigma-Aldrich, München
DMEM	Sigma-Aldrich, München
DMSO	Fluka, Neu Ulm
DNAse	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Doxorubicin	Zentralapotheke der Universitätsmedizin Mainz sowie der Uniklinik Düsseldorf
DTT	AppliChem, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich, München
Eisessig	Roth, Karlsruhe
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethanol	VWR, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Etoposid	Zentralapotheke der Universitätsmedizin Mainz
Fetales Kälberserum	PAA Cell Culture Company, Pasching, Österreich
Glycin	Merck, Darmstadt
Hämatoxilin	Merck, Darmstadt
Histofix	Roth, Karlsruhe

IPTG	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol	Sigma-Aldrich, München
Isotone Kochsalzlösung	B. Braun AG, Melsungen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
LB-Medium	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Chemikalienlager der Universitätsmedizin Mainz
Milchpulver, „blotting grade“	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Oligo dT	Sigma-Aldrich, München
Paraffin	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, München
Poly(I:C)	Invivogen, San Diego, CA, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich, München
Propidiumjodid	Serve, Heidelberg
Protein Block	Dako, Hamburg
RNAse	Thermo scientific, Waltham, MA, USA
RNAse Inhibitor, Maus	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Roti-Load	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 40 (37,5:1)	Roth Karlsruhe
RPMI-Medium	Sigma-Aldrich, München
Salzsäure	Roth Karlsruhe
Target Retrieval Solution	Dako, Hamburg
TEMED	Roth, Karlsruhe
To-pro3 Iodid	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Tris	Roth Karlsruhe

Trypsin/EDTA	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
Vectashield	Vector Labs, Burlingame, CA, USA
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, München
Xylol	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München

2.1.5 Puffer

Tab. 5: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
Blotting-Puffer	0,025 M Tris 0,192 M Glycin 20 % Methanol
ECL-Gesamtlösung	1 ml Komponente A 10 µl Komponente B 1µl Komponente C
ECL-Lösung Komponente A	100 mM Tris pH 8,6 50 mg Luminol
ECL-Lösung Komponente B	para-Hydroxycoumarinsäure DMSO
ECL-Lösung Komponente C	30 % Wasserstoffperoxid
Lysepuffer für DNA-Isolation	100 mM Tris 200 mM Natriumchlorid 10 mM EDTA 0,2 % SDS pH 8,5
Phosphate-buffered saline (PBS)	137 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 10 mM Natriumhydrogenphosphat 2 mM Kaliumhydrogenphosphat pH 7,4
Sammelgelpuffer	625 mM Tris

	pH 6,8
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % Natriumdodecylsulfat (w/v)
Tis-Borat-EDTA (TBE)-Puffer	100 mM Tris 10 mM EDTA 83,34 mM Borat pH 8,0
Trenngelpuffer	750 mM Tris pH 8,8
Tris-buffered saline + Tween (TBST)	50 mM Tris 150 mM Natriumchlorid 0,05 % Tween 20 pH 7,2
BSA-TPBS	PBS 1 % BSA 0,2 % (v/v) Triton X-100
Kern-Lysepuffer	10 mM Tris/HCl (pH 7.5) 500 mM NaCl 0,2 mM EDTA 1 % NP-40 1 % tergitol 1 mM DTT 1 mM PMSF 1 mM Na3VO4 Proteasen Inhibitor (complete)
Zytosol-Lysepuffer	10 mM Tris/HCl (pH 7.5) 50 mM NaCl 0,5 M Sucrose 0,1 mM EDTA 0,5 % Triton-X 100 1 mM DTT 1 mM PMSF 1 mM Na3VO4 Proteasen Inhibitor (complete)
IP-Lysepuffer	25 mM TRIS pH 7.5 150 mM NaCl 1 mM EDTA

	1 % NP-40 5 % glycerol 1 mM PMSF 1 mM Na3VO4 Proteasen Inhibitor (complete)
Pulldown-Lysepuffer	25 mM Tris pH 7,5 750 mM NaCl 5 % NP40 50mM MgCl2 5 mM EDTA 10 % Glycerin Proteasen Inhibitor (Complete)
Pulldown-Waschpuffer	25 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 50mM MgCl2 5 mM EDTA 10 % Glycerin Proteasen Inhibitor (Complete)
E.Coli-Lysepuffer	25 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5 % (v/v) Triton X-100 Proteasen Inhibitor (Complete)
DNA-Lysepuffer	100 mM Tris pH 8.5 200 mM NaCl 10 mM EDTA 0,2% SDS 0,4 mg/ml Proteinase K

2.1.6 Antikörper

Tab. 6: Auflistung der verwendeten primären und sekundären Antikörper.

Antikörper	Hersteller
2. AK HRP gekoppelt anti-mouse	Rockland, Gilbertville, PA, USA
2. AK HRP gekoppelt anti-rabbit	Rockland, Gilbertville, PA, USA

Akt	New England Biolabs, Frankfurt, Germany
Akt (pS473)	New England Biolabs, Frankfurt, Germany
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen, Paisley, UK
ATM (pS1981)	New England Biolabs, Frankfurt, Germany
BRCA1	New England Biolabs, Frankfurt, Germany
CD62E	Abcam, Cambridge, UK
Chk2	Epitomics, Burlingame, CA, USA
Chk2 (pThr68)	Epitomics, Burlingame, CA, USA
Cleaved caspase-7	New England Biolabs, Frankfurt, Germany
Cycline B1	Santa Cruz, CA, USA
Cyp2E1	Millipore, Billerica, MA, USA
E-Cadherin	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
ERK (pThr202/pTyr204)	Millipore, Billerica, MA, USA
ERK2	Santa Cruz, CA, USA
Foxo1	New England Biolabs, Frankfurt, Germany
Foxo3a	New England Biolabs, Frankfurt, Germany
GAPDH	Epitomics, Burlingame, CA, USA
GS	Thermo scientific, Waltham, MA, USA
H2AX	Millipore, Billerica, MA, USA
Heme oxygenase-1 (HO-1)	Epitomics, Burlingame, CA, USA

HSP70	Biosciences Inc., Allentown, PA, USA
Hsp90	Biosciences Inc., Allentown, PA, USA
JNK	Sigma Aldrich, Hamburg, Germany
JNK (pThr183/pTyr185)	Santa Cruz, CA, USA
LaminB2	Epitomics, Burlingame, CA, USA
MPO	Abcam, Cambridge, UK
NF-κB subunit p65	New England Biolabs, Frankfurt, Germany
p16	Santa Cruz, CA, USA
p21	Santa Cruz, CA, USA
p27	Millipore, Billerica, MA, USA
p38	Santa Cruz, CA, USA
p38 (pThr180/pTyr182)	New England Biolabs, Frankfurt, Germany
p53	Exbio Praha, Prague, Czech Republic
p53 (pS15)	New England Biolabs, Frankfurt, Germany
p-c-Jun (pS63)	Epitomics, Burlingame, CA, USA
p-Foxo1/3a (pThr24;pThr32)	Millipore, Billerica, MA, USA
pH3 (pS10)	Invtrogen, Paisley, UK
Rac1	Millipore, Billerica, MA, USA
Rad51	New England Biolabs, Frankfurt, Germany
sTNFα	Santa Cruz, CA, USA
Survivin	Santa Cruz, CA, USA
Topo IIα	Enzo Life Sciences, Lörrach, Germany

Topo IIβ	Abcam, Cambridge, UK
Topo IIα (pS1106)	Epitomics, Burlingame, CA, USA
β-Actin	Sigma Aldrich, Hamburg, Germany
γ-H2AX (pS139)	Epitomics, Burlingame, CA, USA

2.1.7 Inhibitoren

Tab. 7: Auflistung der verwendeten Inhibitoren und der verwendeten Konzentration.

Inhibitoren	Ziel des Inhibitors	Hersteller
EHT1864 (10 µM)	Rac1	Tocris, Bristol, UK
NSC23766 (100 µM)	Rac1	Tocris, Bristol, UK
SP60025 (10 µM)	JNK	Tocris, Bristol, UK
IPA-3 (10 µM)	PAK	Tocris, Bristol, UK
SB203580 (10 µM)	p38	Merck Millipore, Darmstadt, Germany
PD98059 (10 µM)	MEK1	Merck Millipore, Darmstadt, Germany
1L6-Hydroxymethyl-chiro-inositol-2-(R)-2-O-methyl-3-O-octadecyl-sn-glycerocarbonate (5 µM)	Akt	Merck Calbiochem, Darmstadt, Germany
BCR-Abl inhibitor II (10 µM)	BCR-Abl	Merck Calbiochem, Darmstadt, Germany
3-(2-Chloro-3-indolylmethylene)-1,3-dihydroindol-2-one (10 µM)	CDK1	Merck Calbiochem, Darmstadt, Germany
Geldanamycin (10 µM)	HSP90	InvivoGen, Toulouse, France

3MA (10 µM)	PI3K	InvivoGen, Toulouse, France
Pifithrin-α (30 µM)	p53	Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany
Resorufin (30 µM)	CKII	Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany
PP2 (10 µM)	Scr-Kinasen	Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany
Ivermectin (25 µM)	Kernimport	Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany
SC-3060	NFκB	Santa Cruz, CA, USA
Ratjadone C (10 µM)	Kernexport (CRM1)	Santa Cruz, CA, USA
Iressa (10 µM)	EGFR	AstraZenca, London, UK
Rac1-Switch I domain (AA 24-45) (10 µM)		JPT Peptide technology GmbH, Berlin, Germany
Rac-GAP domain (AA 74-90) (10 µM)		JPT Peptide technology GmbH, Berlin, Germany
PAK1-CRIB domain (AA 70-94) (10 µM)		JPT Peptide technology GmbH, Berlin, Germany

2.1.8 Marker

Tab. 8: Auflistung der verwendeten Marker

Marker	Hersteller
DNA Ladder Generuler 1kB	Thermo scientific, Waltham, MA, USA
PageRuler Prestained Plus Protein Ladder	Thermo scientific, Waltham, MA, USA

2.1.9 Vektoren

Tab. 9: Auflistung der verwendeten Vektoren

Vektor	Beschreibung
pGEX-GST-PAK-CRIB	IPTG induzierbar, Ampicilin Resistenz

2.1.10 Nukleotide

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Primer für die qualitative Endpunkt-PCR

Gen	Primer forward (5´- 3´)	Primer reverse (5´- 3´)
Rac1 DNA	1: ATTTTGTGCCAAGGACAGTGACA AGCT; 2: GAAGGAGAAGAAGCTGACTCCCA TC	CAGCCACAGGCAATGACAGATGTTC
Rac1 cDNA	AACCTGCCTGCTCATCAGTT	CTTGAGTCCTCGCTGTGTGA
Mx1Cre	CATGTGTCTTGGTGGGCTGA	CGCATAACCAGTGAAACAGC
Cre	CATTTGGGCCAGCTAAACAT	TAAGCAATCCCCAGAAATGC

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Primer für realtime-PCR basierte mRNA Expressionsanalysen.

Gen	Primer forward	Primer reverse
Actb	GCATTGCTGACAGGATGCAG	CCTGCTTGCTGATCCACATC
Akt1	AGAAGAGACTCTGAGCATCA	AAGGTGCCATCGTTCTTG
Apex1	AGAAATTGACCTCCGTAACC	CGCCAACCAACATTCTTAGA
Arhgdia	CCCTACCTACCCCAAACC	TGGACAACCCTGACAGTG
Atf2	TATCGTTCGTCCAGCATCA	TACTTGAGGTTGGTGAAGGTA
Atg3	ACCACCTCCTATGTGTTCA	TGTGTAGTCATATTCTATTGTTGGA
Atg7	GCACAACACCAACACACT	CGAAGGTCAGGAGCAGAA

Atm	ACCAGAGGATGCTGTTCA	ATCATTAAGTCTATGTTGAGTCCAA
Bax	CTGGACACTGGACTTCCT	GCCACAAAGATGGTCACT
Bcl2	GTGTGGTTGCCTTATGTAT	GTATATCCGCTACAAGTTACA
Becn1	GATGGGAACTCTGGAGGT	GGCTGTGGTAAGTAATGGA
Bid	CACCATGTACCTTTGTCCTATC	ACCTCTCCTAATGCTGTTCT
Birc3	GCTGACACCTTTGAGTTGA	GCAGAAGCACTTGACCTT
Brca1	TTGTGAGCGTTTGAATGA	ACCTGGCTTAGTTACTGT
Brca2	TAACGCCTGCTGACTCTC	TGCCAGATGAATCTCCTAACA
Casp2	TACTGCTCACAACCCTCTC	GGACCATCACCATTATCTAAGG
Ccna1	GAGGGCATCATATTTGAGGAT	CTTGGGTCTGTGTCTTACTTC
Ccnb1	GGTCACTAGGAACACGAAA	TTTGGTAGGGCTTTAAACAGT
Ccne1	AGCCCTGGGATGATAATTCA	GCTCTGGGTGGTCTGATT
Cd44	ACACCTACCTTCCTACTG	TTGTGGACTGTGAATTACC
Cdc25a	TCAAATGAAAGTGAATCAGGAAAT	CTTCATATTCTCGCCATCCA
Cdc25b	CACATCCCTCTCCTCACT	GAAGCCATCAGACTCAAACT
Cdkn1a	ACCTGAATAGCACTTTGGAAA	TCTGAGCAATGTCAAGAGTC
Cdkn1b	CCCTCCAGTACACTTGAT	TAAACAACAAAACCGAACAAA
Chek1	TGAACGCTTACTGAACAAGAT	CCACAGGACCAAACATCAA
Chek2	TGAGAAGGACGGACAAGT	TCTACATAGTGAAAGTGCGATTT
Collagen1	CACCCTCAAGAGCCTGAGTC	AGACGGCTGAGTAGGGAACA
Ctgf	CAAAGCAGCTGCAAATACCA	GGCCAAATGTGTCTTCCAGT
Cxcr4	ATACCTGACTTCATCTTTGCC	TGGAGTGTGACAGCTTAGA
Cyclin B1	GGTCACTAGGAACACGAAA	TTTGGTAGGGCTTTAAACAGT
Cyp1a1	CCTCCGTTACCTGCCTAA	GTCCTGACAATGCTCAATGA
Cyp1b1	GACGATGCGGAGTTCCTA	GCTGAAGTTGCGGTTGAG

Cyp2E1	AGGCTGTCAAGGAGGTGCTA	GGAAGTGTGCCTCTCTTTGG
Ddb2	AGGCAACATTCTCAGAGT	CATTCGGAGGTTCCAAAG
Ddit3	GTCAGTTATCTTGAGCCTAA	GTGTGGTGGTGTATGAAG
Elk1	AGCCTGAGGTGTCTGTAA	GTGTTGGGAAGCACTGAG
Ercc1	AAACAGGAGCAAAGTCTAAT	GGATGTAGTCTGGATGGA
Fancc	GCTTGTTGGAATCCTCTCAT	CCACGAGTTAAGTCCTGAC
Fas	AGAACCTCCAGTCGTGAA	ATCTATCTTGCCCTCCTTGA
Fasl	CTGGAATGGGAAGACACATAT	TGGTCAGCACTGGTAAGA
Fen1	GGAACGATACTGAAAGAACGG	CGGCGAAGAGGAATGTTC
Fos	AACTTCGACCATGATGTTCT	GCACTAGAGACGGACAGA
Gadd45a	GTCGCTACATGGATCAGTG	GTGACTGCTTGAGTAACTACA
Gapdh	TCTCCTGCGACTTCAACA	TCTCTTGCTCAGTGTCCTT
Gpx1	TTGGTGATTACTGGCTGC	TGATATTCAGCACTTTATTCTTAGTAG
Gstm1	ACACAGCCTTCATTCTCC	AATTCTAGGAAGCGTGAGTT
Hif1a	GAGGAGCGCCTAGGAACC	CGGAGAAAGAGACAAGTCCA
Hmox1	CCAGAGTCCCTCACAGAT	CCCAAGAGAAGAGAGCCA
Hsp1a	CGGAGGCTTCTGGAAAGA	CATCGTGGCTGAATGAACA
Hspa1b	AGACGCTGACAGCTACTC	CTCGCTTCTGGAAGGCT
Hus1	TGGAAGGAGTCTCTGAAGAA	AGGGAAAGTGTTTGTTAGTCA
Icam1	TGCTCAGGTATCCATCCAT	GGAAACGAATACACGGTGAT
Il10	CATGGGTCTTGGGAAGAGAA	CATTCCCAGAGGAATTGCAT
Il12a	GGAACTACACAAGAACGAGAG	CGCCATTATGATTCAGAGACT
Il1a	AAGCAACGGGAAGATTCTGA	TGACAAACTTCTGCCTGACG
Il1b	GGGCCTCAAAGGAAAGAATC	TACCAGTTGGGGAACTCTGC
Il6	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	CAGAATTGCCATTGCACAAC

Itgb1	GCCAGCCAAGTGACATAG	ACTTCTGTGGTTCTCCTGAT
Jun	AACTTTCCTGACCCAGAG	GCGAACTGGTATGAGTATAG
Lamp1	AAGTGGAGAACAAGAACAGAG	TCAGTGAATGGTTGGAGATG
Lig1	ATTTCGGGTTTGCGTCTC	ACCACTTGATTCCTCTCCTT
Lig4	GTGTCCTGATGCTTAGTTGT	CTCCTTGAAGTGCCTGATT
Mdm2	AAGGTGGGAGTGATCTGAA	TCTGTGTTCTCTTCTGTCTCA
Mdr1	ACCATGGAGGAAATCACAGC	TGGTGGCATCATCCAAGATA
Mgmt	GCTGCTGAAGGTTGTGAA	TCTCATTGCTCCTCCTACTG
Mmp13	GCCACCTTCTTCTTGTTGA	TAGTATGATTTCAAGTAGTGCTCTG
Mmp3	GCTGTGGGAAAGTCAATGA	GCCATAGTAGTTTTCTAGGTATT
Mmp7	GAACAGGCTCAGAATTATCTTAGA	CCACTACGATCCGAGGTAA
Mpg	CTGTATGTGTACCTCATCTATGG	CAGAGTTCACGGTCCTTG
Mre11a	TACGGCTTAGGCTCCATT	ATGCTTACTCCTGTTCTGATG
Mrp1	AGGCCTACTACCCCAGCATT	CAGTCTCTCCACTGCCACAA
Msh2	GTCTAAGGAGAATGAGTGGTATC	CCATAACGCCAACGGAAG
Nos2	GCTGTTAGAGACACTTCTGAG	CACTTTGGTAGGATTTGACTTTG
Nos3	GCATGGGCAACTTGAAGA	AGGGTGTCGTAGGTGATG
Nox1	GGCTAAATCCCATCCAGTC	CCTAAGCAGATGATATAGACGATAA
Ogg1	TGAGACTGCTGAGACAAGA	GGAAGCCATGATAAGTGACA
Pcna	GACTTAGATGTGGAGCAACTT	GGCTAAGGTCTCGGCATA
Pold1	CTCCATTTCTCCGCATCAC	CAATGTCAGCATCCACCAT
Pole	CGGTGGATTACTACTTCATTCA	CTTCTTTGGGCACATTCTCTA
Pten	ATCAAGAGATCGTTAGCAGAAA	TTGGCGGTGTCATAATGTC
Rac1	ACAAAGCCTTCTTAAAGCCTTA	GCGGTCTTCTTAGCAACA
Rad51	CAGCGATGTCCTAGATAATGTAG	TTACCACTGCGACACCAA

Rev1	TCTGCGGAGGAATTGAGA	ACACAGGATTGAAGTTGAGAC
Rev3	TTCTCAGATGGCATTCAGTATC	TCATTATGGCTCCGCTTTG
Rhoa	AAGTCTGGGTGCCTCAT	AATAATCGTGGTTGGCTTCTAA
Rhob	CAGCATCAGCCATCACTTC	CTAGGCTCGCTAACTGCA
Sele	TGCGAGAAGAACGGATAGA	CTGAATTGCCACCAGATGT
Sod1	ACCAGTTGTGTTGTCAGG	TTTCTTAGAGTGAGGATTAAAATGAG
Tgfβ	TGCGCTTGCAGAGATTAAAA	AGCCCTGTATTCCGTCTCCT
Tiam1	GGTAGAACCATTGTGGACTG	CGGTGTGGCATTTAGAGAC
Timp2	CAAAGCAGTGAGCGAGAA	CATCTTGCCATCTCCTTCTG
TNFα	AGCCCCCAGTCTGTATCCTT	CTCCCTTTGCAGAACTCAGG
Top2a	CTTCAGGAGCCGTCACCAT	GAGCAGTATATGTTCCAGTTGT
Top2b	TGGGTGAACAATGCTACAAA	TGTATGTATCAGGACGAAGGA
Trex1	GCTACCACTGGAACAACC	TGCTATGGAAGTCTTTATTCATCA
Trp53	AAGTTCTGTAGCTTCAGTTCAT	GGCAGTCATCCAGTCTTC
Trp63	AGCATCAGAAAGCAGCAA	GATCTTCAGCAACATCTCGTA
Trp73	CTCCGCACCCTTATAACC	GCTGAGCAAATTGAACTGG
Txnrd1	CAGTTCGTCCCAACGAAAAT	GCACATTGGTCTGCTCTTCA
Vcam1	ATATACTTGGAAGTGTCGTGTT	GACCATCTTCACAGGCATT
Wee1	GTAGTCTCTATTCATGGACACA	GTTGCTTTCAGTAATTGTAATTCTTT
Wrn	TGATTGCTCCTTCCTGTCT	ACTGCGACTCTGCTTCTT
Wrnip1	GCCAATGAGATCCCTTCG	AACCTTATGCTGTGCTTCTT
Xpa	GACAACCACTCACCAACATA	TGAACTTTGAACAGGGTCTTTA
Xpc	GCGAAAGAACGGGAAAGA	AAGCGAATTGGAATGATGGA
Xrcc1	CCAACCGTGTTCGCATTT	GCACTGTCATCCTCCTCTT
Xrcc3	GGAGGAAGTCTGAGTTGGT	CTCTTAACCGCAGCAGTAAT

Xrcc4	TGCCTGGACACCATTACA	CTTCTCATTCAGCACCAAGAT
αSma	GGACGTACAACTGGTATTGTGC	CGGCAGTAGTCACGAAGGAAT

2.1.11 Sofware

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Software.

Software	Hersteller
Cell^A	Olympus, Hamburg
Cellsense dimension	Olympus, Hamburg
CFlow Plus 1.0.264.15	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Image J 1.45s	National Institutes of Health, USA
iQ5 2.1 / CFX Manager 2.1	Bio-Rad, München
Mendeley Desktop 1.3.1	Mendeley, New York, NY, USA
MS Office 2007	Microsoft, Redmond, WA, USA
Primer 3 v0.4.0	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambrige, MA, USA
ZEN 2010	Carl Zeiss AG, Göttingen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die humanen Hepatom-Zelllinien HepG2 und Hep3B, die Ratten Hepatom-Zelllinie H4IIE, die humanen Darmkrebs-Zelllinien HCT116 und HT29, die humane embryonale Nierenzellen HEK293 und die Ratten Nierenepithelzellen NRK-52E wurden bei 37°C in DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die immortalisierten humanen Endothelzellen EA.hy926 wurden bei 37°C in DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum und HAT Zusatz (Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany) und den zuvor genannten Antibiotika kultiviert. Die primären humanen Nabelschnurzellen HUVEC wurden bei 37°C in ECGM2 Medium (PromoCell, Heidelberg, Germany) und Antibiotikazusatz gehalten. Die humanen DLD1Karzinomzellen, die Rattenendothelzellen RGE wurden bei 37°C in RPMI und Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum und den vorher genannten Antibiotika kultiviert. Die humanen Ovarialkarzinomzellen A2780 wurden in RPMI Medium, den genannten Antibiotika sowie 2 mM Glutamin, kultiviert. Die kultivierten Zellen wurden jeweils ab einer Konfluenz von über 80 % mittels Trypsin/EDTA vereinzelt, mit PBS gewaschen und in einer Verdünnung (1:3–1:10) mit frischem Medium neu ausgesät.

2.2.2 Zellexperimente

Alle Zellen wurden mindestens 24 h vor Beginn eines Experiments ausgesät. Falls nicht anderweitige angegeben wurden die Zellen 1 h vor Behandlung mit Doxorubicin oder Etoposid mit den jeweiligen Inhibitoren versetzt. Der Endpunkt der Experimente mit Doxorubicin war sofern nicht anders angegeben 4 h nach Start der Doxorubicin Behandlung.

2.2.3 Präparation von Proteinextrakten (*in vitro)*

Für die Präparation von Gesamt-Zellextrakten wurde die identische Anzahl von Zellen (ca. $5x10^5$) in 300 µL Roti-load Ladepuffer (Roth, Karlsruhe, Germany) lysiert, anschließend sonifiziert und 5 min bei 95°C inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, 14.000xg, RT) wurde der Überstand für Western Blot Analysen verwendet.

2.2.4 Präparation von Kern/Zytosol-Extrakten (*in vitro)*

Für die Herstellung von Kern- und Zytosol-Extrakten wurden ca. $2x10^6$ Zellen in 300 µL Zytosol-Lysepuffer für 5 min auf Eis inkubiert, anschließend zentrifugiert (10 min, 1000xg, 4°C) und der Überstand vom Pellet getrennt. Der die zytosolischen Proteine enthaltende Überstand wurde nochmals zentrifugiert (15 min, 14.000xg, 4^oC) und anschließend der Überstand mit Rotiload-Ladepuffer versetzt und nach Denaturierung (5 min bei 95°c) für Western Blot (WB) Analysen verwendet. Das die Kerne enthaltende Pellet wurde nochmals mit Zytsol-Lysepuffer gewaschen und anschließend mit etwa dem vierfachen des Pelletvolumens an Kernlyse puffer versetzt. Nach Sonifikation (5 Mal für 1 s, ampl. 25%), Zugabe von Rotiload-Ladepuffer und Denaturierung (5 min bei 95°c) wurden die Extrakte nochmals zentrifugiert (10 min, 14.000xg, RT) und anschließend für WB Experimente verwendet

2.2.5 Western Blot Analyse

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE (7,5-15 %) aufgetrennt (erst 30 min bei 15 mA pro Gel und dann 30 mA pro Gel, bis die gewünschte Auftrennung erreicht wird). Anschließend wurden die Proteine mittels Nass-Blot (60-90 min bei 300 mA) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Nach Absättigung mit einer Milchpulverlösung (5 % fettfreien Milchpulver in TBS/0.1% Tween für 1 h bei RT) wurde die Membran über Nacht (bei 4°C) mit dem Erstantikörper (1:200-1:1000) inkubiert. Nach waschen der Membran wurde diese mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper (1:5000) für 2 h bei RT inkubiert. Zur Visualisierung der gebundenen Antikörper wurde die Membran dann mit ECL-Lösung inkubiert und die Intensität der Signale mittels des Fusion FX7 Imaging System (Peqlab, Erlangen, Germany) analysiert.

2.2.6 Rac1 Aktivitätsassay

Bei dem verwendeten Rac1 Aktivitätsassay wird ausgenutzt, das nur aktives GTP gebundenes Rac1 an seinen Effektor PAK bindet. GST bindende Beads werden mit einem GST-PAK Fusionsprotein beladen. Diese Beads werden dann dazu verwendet aus einem Zelllysat aktives Rac1 zu präzipitieren. Nach Denaturierung der Beads kann die Menge an gebundenem (aktivem) Rac1 mittels Western Blot analysiert

werden. Um die Effekte der Rac1 Inhibitoren auf die Stimulation der Rac1-Aktivität zu untersuchen, wurde nach Zugabe der Inhibitoren und einer kurzen Inkubationszeit die Rac1-Aktivität durch einen Wechsel des Mediums von einem Medium mit geringen Serumgehalt zu einem Medium mit hohem Serumgehalt sowie durch Zugabe von 50 ng/ml EGF stimuliert. Zur Durchführung wurden hierzu HepG2- Zellen 24 h nach Aussaat ($1x10^6$ Zellen pro 6 cm Schale) mit PBS gewaschen und für 22 h mit DMEM 0,1 % fetalem Kälberserum inkubiert und anschließend für 2 h mit den Rac1 Inhibitoren EHT1864 oder NSC23766 behandelt. Anschließend wurde das Medium der Zellen auf DMEM-Medium mit 20 % fetalem Kälberserum und 50 ng/ml EGF gewechselt. Nach einstündiger Inkubationszeit bei 37°C wurden das Medium entfernt die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und mit eiskaltem nicht denaturierendem Lysepuffer 10 min auf Eis inkubiert und in ein vorgekühltes Eppi überführt. Nach Zentrifugation (10 min bei 13.000 rpm und 4°C) wurde vom Überstand etwa 50 µl mit Rotiload-Ladepuffer versetzt, denaturiert (5 min, 95°C) und für die Ladekontrolle verwendet. Der Rest des Überstands wurde mit 30 µg GST-PAK-Beads versetzt und über Nacht in einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Beads dreimal mit 500 µl Lyspuffer und dreimal mit Waschpuffer gewaschen (5000 rpm, 2 min). Die Beads wurden abzentrifugiert der Überstand sorgfältig entfernt und der Rückstand mit Rotiload-Ladepuffer versetzt. Um ein effektives Ablösen der an die Beads gebunden Proteine zu gewährleisten wurden die Beads 15 min bei 37°C inkubiert und für 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde die Menge an Rac1 im Lysat mittels Western Blot analysiert (12,5-15% SDS-Page). Für die GST-PAK-Beads wurden E.coli, welche das Plasmid pGEX-GST-PAK-CRIB enthielten in 10 ml mit Ampicilin (100 µg/ml) versetzten LB-Medium angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden zu 500 ml Medium 5 ml Vorkultur gegeben und für 3 h bei 37°C inkubiert, mit IPTG (0,1 mM Endkonzentration) versetzt und nach 1,5 h die E.coli zentrifugiert (2000 rpm, 10 min). Das Bakterienpellet wurde dann in E.coli-Lysepuffer (10 ml) aufgenommen, sonifiziert (5 Mal für 5 s, ampl. 25%), und abzentrifugiert (10 min, 14.000xg, 4°C). Zum Überstand wurden 500 µl mit E.coli-Lysepuffer gewaschene Glutathione Beads (50% Suspension) gegeben und für 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Beads mit 20 ml E.coli-Lysepuffer gewaschen (1000 rpm, 1 min) und für den Versuch eingesetzt.

2.2.7 Co-Immunopräzipitationsexperimente

Die Zellen wurden mit IP-Lysepuffer versetzt, sonifiziert (5 Mal für 1 s, ampl. 25%) und anschließend zentrifugiert (2 min, 14.000xg). 50 µl des Überstandes wurden als Ladekontrolle verwendet. Der Rest des Überstandes wurde mit 1 µg Antikörper versetzt, gefolgt von einer 1 h Inkubation bei 4°C unter stetigem Schütteln (Überkopfschüttler). Anschließend wurde eine Suspension von ca. 100 µL A/G-Beads (Santa Cruz, CA, USA) zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Beads abzentrifugiert (1 min, 1.000xg) und dreimal mit IP-Lysepuffer gewaschen. Das Pellet wurde dann mit Rotiload-Ladepuffer versetzt und 15 min bei 37°C unter schütteln inkubiert. Nach Denaturierung (5 min bei 95°C) wurde der Überstand für Western Blot-Analysen verwendet.

2.2.8 Zellzyklusanalyse mittels FACS

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA vereinzelt. Sowohl Medium, Waschlösung als auch die Trypsin/EDTA Lösung wurden gesammelt und abzentrifugiert (3 min bei 800 rpm). Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 100 µl PBS resuspendiert und unter vortexen mit 2 ml -20°C kaltem 80 % Ethanol versetzt. Die Proben wurden mindesten für 30 min bei -20°C inkubiert. Die Zellen werden wieder abzentrifugiert, mit RNAse versetzt (132 µl PBS mit 1 µl RNAse (1 mg/ml)) und für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einer Propidiumiodid-Lösung (367 µl 50µg/ml) versetzt, kurz stark geschüttelt und anschließend im FACS analysiert.

2.2.9 Analyse von phosphoryliertem H2AX mittels FACS

Zur Bestimmung der Menge an phosphoryliertem H2AX in den verschiedenen Zellzyklusphasen mittels FACS wurden ca. $2x10^6$ Zellen trypsiniert, mit PBS gewaschen und in 0,5 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden 4,5 ml einer eiskalten 1 % methanolfreien Formaldehydlösung (4 %) zugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Nach Waschen mit PBS und anschließender Resuspension (0,5 ml PBS) wurden 4,5 ml -20°C kalter 70 % Ethanol zugegeben und die Zellen für mindestens 2 h bei -20°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (200xg für 4 min) und der Ethanol entfernt. Der Rückstand wurde mit BSA-TPBS-Lösung gewaschen und anschließend für 5 min bei RT in 2 ml BSA-TPBS inkubiert. Nach

nochmaliger Zentrifugation (300xg für 4 min) wurden die Zellen in 100 µl mit 1 µg γH2AX Antikörper versetzter BSA-TPBS-Lösung resuspendiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 100 µl BSA-TPBS und 1 µg FITC-gekoppeltem Zweitantikörper (Alexa Fluor 488) für 1 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml BSA-TPBS und einer Inkubation von 2 min bei RT wurden die Zellen abzentrifugiert (300xg für 4 min) und in 1 ml PI Färbelösung (PBS + 100 mg/ml RNAse A (Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany) und 5 µg/ml PI) aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 1 h im Dunkeln wurden die Zellen mittels FACS analysiert.

2.2.10 Untersuchung des Doxorubicin Imports und Exports mittels FACS

Logarithmisch wachsende Zellen wurden für 1 h mit einem Rac1 Inhibitor vorbehandelt und anschließend für 2 h mit Doxorubicin (1 µM) oder für 2 h mit anschließender Rekonvaleszenzzeit (4 h) mit frischem Medium versetzt. Danach wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA vereinzelt und die Trypsinaktivität mit Medium inhibiert. Nach nochmaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert und unter vortexen mit 2 ml -20°C kaltem 80 % Ethanol versetzt und anschließend für mindestens 30 min bei -20°C inkubiert. Vor der Messung wurden die Zellen abzentrifugiert (3 min 800 rpm) und in 500 µl PBS aufgenommen. Da Doxorubicin eine Eigenfluoreszenz besitzt (Anregung: 470 nm, Emission: 575 nm) kann die in den Zellen enthaltene Menge anschließend mittels FACS analysiert werden.

2.2.11 Analyse der Zell-Viabilität

Die Zellviabilität wurde mittels des WST-Assays (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dieser Assay beruht auf der Umsetzung eines Tetrazoliumsalzes durch die Dehydrogenasen der Atmungskette der Zellen. Diese geht mit einer Veränderung des Spektrums im Bereich des sichtbaren Lichts einher. Diese Farbveränderung und somit die Menge an umgesetzten Tetrazoliumsalz lässt sich mittels Messung der Absorption bei Wellenlänge 440 nm und einer Referenzwellenlänge bei 600 nm bestimmen. Da die Menge an umgesetzten Tetrazoliumsalz proportional zur Anzahl der metabolisch aktiven Mitochondrien und damit zur Anzahl der lebenden Zellen ist, lässt dieser Assay indirekt einen Rückschluss auf die Zahl der lebenden Zellen zu. Zur

Durchführung wurden die Zellen im 96-well Formt ausgesät (10.000 Zellen in 100 µl Medium) und für 24 h bei 37°C und 5 %.CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, wie im Ergebnisteil beschrieben behandelt, und für weitere 72 h unter den oben genannten Bedingungen inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl WST Reagenz wurde die Absorption (Wellenlänge 440 nm und Referenzwellenlänge 600 nm) alle 30 min (Inkubation bei 37°C und 5 %.CO_2) mittels eines „ELISA-Readers“ bestimmt. Der lineare Bereich der Absorption liegt dabei etwa im Bereich von 0,3 bis 1,8. Für die Auswertung des WST-Assays wurde die Messung verwendet, bei der die meisten Messwerte im linearen Bereich lagen.

2.2.12 DNA Strangbruchanalyse (Comet Assay)

Die Bildung von DNA-Einzel- und Doppel-Strangbrüchen wurde mittels des alkalischen „Comet assay“ detektiert (Singh et al. 1988). Hierzu wurden Zellen in Agarose eingebettet und die Zellen anschließend lysiert. Durch eine weitere alkalische Lyse wurden dann Einzelstrangbrüche in Doppelstrangbrüche überführt. Dieser Assay erlaubt somit keine Unterscheidung zwischen DNA-Einzel- und DNA-Doppel-Strangbrüchen. In der darauf folgenden Elektrophorese wandert die DNA im Agarosegel. Je kleiner die Fragmente sind umso schneller wandern diese im Gel und bilden den für diesen Assay namensgebenden Kometenschweif aus. Der Anteil der im Schweif detektierten DNA erlaubt somit indirekt die Bestimmung der Menge an DNA-Strangbrüchen. (Ausnahmen sind hiervon Behandlungen die zu großen DNA-Addukten oder DNA-Quervernetzungen führen) Der Anteil der Schweif-DNA wurde mittels der Komet 4.02 Software, (Kinetics Imaging, UK) analysiert. Pro Versuchsbedingung wurden mindestens 50 Nuklei untersucht.

2.2.13 TARDIS-Assay

Der TARDIS (trapped in agarose-DNA immunostaining) Assay dient zur Messung des DNA-Topoisomerase IIα “cleavable complex”, der durch Einwirkung von Topoisomerase II Giften wie Doxorubicin oder Etoposid gebildet wird (Willmore et al. 1998). Die behandelten Zellen wurden in Agarose eingebettet und wie beschrieben lysiert und gewaschen. Dabei werden alle nicht kovalent an die DNA gebundenen Proteine entfernt. Die kovalent an die DNA gebundene Topoisomerase IIα wird dann mit einen spezifischen Antikörper und einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen. Das Immunfluoreszenzsignal wurde mittels des Olympus BX43

Mikroskop detektiert und pro Versuchsbedingung wurden mindestens 50 Kerne analysiert.

2.2.14 Band-Depletion-Assay

Logarithmisch waschende Zellen wurden mit den genannten Inhibitoren für 1 h vorbehandelt und anschließend für 1 h mit einer hohen Dosis Etoposid (100 µM) behandelt. Dies führt dazu dass ein Großteil der mit der DNA assoziierten Topoisomerase II kovalent an die DNA gebunden bleibt (Cleavable-Komplex). Nach der Behandlung wurde von den Zellen Porteinextrakte gewonnen und mittels SDS-PAGE und WB die Expression der Topoisomerasen II detektiert. Nur nicht kovalent an die DNA gebundene Topoisomerase II kann im WB detektiert werden, da die an die DNA gebundene Topoisomerase II nicht ins SDS-Gel einwandert. Der Band-Depletion-Assay misst die „DNA-cleavage“ Aktivität der Topoisomerasen II, da nur die Topoisomerase II kovalent an die DNA gebunden bleibt, die bei Anwesenheit von Etoposid einen transienten Doppelstrangbruch in die DNA einfügt. Eine Zunahme der im WB detektierten Topoisomerase II Menge kann somit sowohl durch eine verringerte DNA-Bindung als auch durch eine Abnahme der „DNA-cleavage“ Aktivität der Topoisomerase II erklärt werden.

2.2.15 Massenspektrometrische Untersuchung der Topoisomerase IIα

Aus Zelllysaten von behandelten oder unbehandelten Zellen wurde die Topoisomerase IIα immunopräzipitiert (siehe Co-Immunopräzipitation). Das präzipitierte Protein wurde anschließend mittels eines SDS-PAGE aufgetrennt, die Proteinbanden mit Comassie Crystal Blue Lösung (1 g/L) angefärbt und die Topoisomerase IIα Bande aus dem Gel herausgeschnitten. Die Topoisomerase IIa wurde anschließend mittels Proteasen anverdaut (Trypsin) und die Einzelstücke mittels Massenspektrometrie auf phosphorylierte Peptide hin untersucht. Diese Untersuchung und der Proteaseverdau wurden vom Molecular Proteomics Labor (BMFZ, Heinrich Heine University Düsseldorf) durchgeführt.

2.2.16 Tierversuche

Die Tiere wurden in einer spezifisch pathogen freien (SPF) Umgebung bei einer Temperatur von 22-24°C und einem Tag/Nachtzyklus von 12 h gehalten (Tierversuchsanstalt, Mainz). Futter und Wasser wurden frei zugänglich und in beliebiger Menge (ad libitum) zur Verfügung gestellt. Die Tierversuche wurden vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt.

Um in den C57BL/6 Mäuse mit $Rac1^{flox/flox/Mx1\text{-}Cre}$ (flox: flanked with loxP) Hintergrund den Rac1 KO zu induzieren wurden diese Tiere drei Mal im Abstand von zwei Tagen mit 0,5 mg synthetischer doppelsträngiger RNA (Poly(I:C)) behandelt (i.p.). Dies führt zu Bildung von Interferon α, was wiederum zur Aktvierung des Mx1-Promotors und der Expression der Cre-Rekombinase führt. Der durch das Cre/loxP-System vermittelte genetische Rac1 KO findet somit im Wesentlichen nur in Interferon α responsiven Zellen statt. Der hepatische KO wurde drei Wochen nach der letzten Poly(I:C) Behandlung analysiert. Für die Kontrolle wurden Tiere verwendet, die nicht mit Poly(I:C) behandelt wurden. Um den Einfluss des Rac1 KO auf die Doxorubicin induzierte akute Leberschädigung zu untersuchen, wurden 3 Monate alte Tiere mit 15 mg/kg Doxorubicin behandelt (i.p.) und die Tiere 96 h später nach Tierschutzvorgaben (TierSCHg, §4) mit CO2-Begasung euthanasiert und die Organe entnommen. Als Kontrolle wurde zusätzlich Tiere bestrahlt (6 Gy (Cs-137 Quelle, Ganzkörperbestrahlung (TBI)) und die Organe 24 h nach Exposition entnommen.

Für die Analysen zum Einfluss von Rac1 auf die Leberkanzerogenese wurden $Rac1^{flox/flox}$ mit C57BL/6 Hintergrund mit Mäusen verpaart die einen unter Kontrolle des Albumin-Promotors stehende Cre-Rekombinase exprimieren. Der Cre-Rekombinase vermittelte KO tritt dabei schon kurz vor der Geburt der Tiere auf. (Weisend et al. 2009). Tiere im Alter von 2 Wochen wurden dann mit 10 mg/kg DEN behandelt (i.p.). Nach 40 Wochen wurden die Tiere euthanasiert, die Organe entnommen, diese auf Tumore untersucht und für weitere Analysen verwendet.

Für die Untersuchungen zum Einfluss von Rac1 auf akute Stressantworten der Leber wurden drei Monate alte $Rac1^{flox/flox}$ und $Rac1^{flox/flox/Alb\text{-}Cre}$ Tiere mit 90 mg/kg DEN behandelt (i.p.). Nach 24 bzw. 72 h wurden die Tiere euthanasiert und die Organe für weitere Analysen entnommen. Die Organe wurden zum Teil in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Der andere Teil wurde mit Parformaldehyd fixiert und für weitere immunhistochemische Untersuchungen in Paraffin eingebettet (siehe Gewebeschnitte).

2.2.17 Proteinextrakte aus Gewebe

Etwa 15-20 mg gefrorenes Gewebe wurde mit 300-600 µl Roti-Load Proteinladepuffer (Roth, Deutschland) versetzt und mechanisch homogenisiert (TissueLyser, Qiagen, Deutschland) (3 x 30 sec bei 25 Hz). Anschließend wurde das Lysat sonifiziert, für 5 min bei 95°C inkubiert und nach Zentrifugation (5 min, 14.000xg, RT) der Überstand für Western Blot Analysen verwendet.

2.2.18 MGMT-Aktivitätsmessung

Die Aktivität des DNA Reparaturenzyms O^6-methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) wurde wie unter (Briegert, Enk, and Kaina 2007) beschrieben analysiert. Diese Untersuchungen wurden vom Institut für Toxikologie in Mainz durchgeführt.

2.2.19 RNA-Isolation aus Gewebe

Die RNA-Isolation wurde analog zum Protokoll des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Deutschland) isoliert, inklusive des optionalen DNA-Verdaus mittels DNAse I (Qiagen, Hilden). Hierbei wurden 10-15 mg Gewebe mit einem stark denaturierend wirkenden Puffer homogenisiert. Die Homogenisierung der Organproben wurde mittels TissueLyser (Qiagen, Deutschland) (25 Hz, 3 x 30 sec) und QIAshredder (Qiagen, Deutschland) durchgeführt. Das Homogenisat wurde dann auf RNA-Säulen aufgetragen, wobei die RNA reversible an die Säulen bindet. Nach mehrmaligem Waschen, dem enzymatischen Verdau möglicher DNA Verunreinigungen und nochmaligem Waschen wurde die RNA anschließend wieder eluiert. Die Konzentration und die Qualität der RNA wurden mittels Nanodrop ND-1000 (Peqlab, Erlangen) überprüft. Die Qualität wurde dabei durch das Verhältnis der Absorption 260/280 („reine“ DNA (1,8) „reine“ RNA (2,2)) und das Absorbtionsverhältnis 260/230 („reine“ RNA 2,0-2,2 ansonsten Protein- oder Puffer-Verunreinigungen) bestimmt.

2.2.20 Synthese der cDNA

Die Synthese der cDNA via reverser Transkription wurde mittels des Ominiscrpit RT Kit (Qiagen, Deutschland) mit Oligo-dT-Primern nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurde der RNAse Inhibitor (Murine, M0314) von New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) verwendet. Pro Ansatz wurden 2000 ng RNA verwendet.

Nach Zugabe aller erforderlichen Substanzen wurde der Ansatz für 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend bis zu seiner Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.21 Isolation genomischer DNA und Endpunkt-PCR

Etwa 5-10 mg Gewebe wurden in DNA-Lysepuffer über Nacht bei 55°C inkubiert und am nächsten Tag für 10 min auf 95°C erhitzt. Die so isolierte Roh-DNA wurde dann 1:12 verdünnt in der PCR eingesetzt. Die Endpunkt-PCR wurde unter Verwendung des RED Taq ReadyMix (Sigma Aldrich, Steinheim) durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Primer wurden mit der Primer3 Software ermittelt. Nach einem initialen Denaturierungsschritt (95 °C, 2 min) wurden 30 PCR Zyklen mit folgenden Einzelschritten durchgeführt: (95°C, 30 sec; 55°C, 30 sec; 72°C, 45 sec). Abschließend wurde nochmals für 10 min bei 72 °C inkubiert. Die PCR Produkte wurden dann über Agarosegele (1.2% oder 1.4%), die Ethidiumbromid enthielten aufgetrennt. Das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid wurde dann mittels seiner Fluoreszenz (Anregung im UV-Bereich) detektiert. Diese Methode wurde zur Genotypisierung der Mausbiopsien (Schwanz- oder Ohr-Biopsien) und für die qualitative Darstellung des Rac1 KO auf DNA und cDNA Ebene verwendet. Für die PCR mit cDNA wurde die bei der cDNA-Synthese erhaltene cDNA 1:10 (mit Wasser) vorverdünnt.

2.2.22 qRT-PCR

Für die quantitative Real-Time-PCR wurde das SensiMix SYBR & Fluorescein Kit (Bioline, Luckenwalde) verwendet. Pro Reaktionsansatz wurden 40 ng cDNA und 250 nM Primer eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen waren: cDNA Denaturierung für 10 min bei 95°C; danach 45 Zyklen: 95°C, 15 s 55°C, 15 s 72°C, 17 s. Die SYBR-Green Fluoreszenz wurde nach jedem Zyklus detektiert. Die ΔCT-Werte („Relative Cycle Threshold“) wurden mittels IQ5 Software (Biorad, Deutschland) bestimmt. Am Ende des kompletten Durchgangs wurde zur Qualitätskontrolle die Schmelzkurve jedes einzelnen PCR-Produktes aufgezeichnet. Anhand der Schmelzkurve können unspezifische Produkte wie Primer-Dimere erkannt werden. Zur Normalisierung innerhalb einer Bedingung wurden die PCR-Produkte von *β-Actin* und *Gapdh* verwendet. Um die Unterschiede in der Expression zwischen zwei Bedingungen darzustellen wurde diese auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Die relative mRNA Expression der unbehandelten Kontrolle ist damit immer gleich1,0.

2.2.23 Fixierung von Organen und Gewebeschnitte

Die entnommenen Organe wurden in gepuffertem Formalin (Histofix, Roth, Karlsruhe) fixiert (maximal 24 h). Anschließend wurden sie durch eine aufsteigender alkoholischer Reihe und Xylol entwässert, in Paraffin gegossen und ausgebettet. Etwa 4 µm dicke Gewebeschnitte (Hyrax M25 Mikrotom (Carl Zeiss AG, Göttingen)) wurden dann auf Menzel-Gläser (SuperfrostPlus, Menzel, Braunschweig) übertragen. Für die Immunhistochemie und die HE-Färbungen wurden die Gewebeschnitte 30 min bei 60°C inkubiert, zweimal 5 min mit Xylol entparaffiniert und anschließend mit einer absteigenden alkoholischen Reihe rehydriert.

2.2.24 Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung

Die Schnitte wurden in einer Küvette für ca. 10 min in saurem Hämalaun nach Mayer inkubiert, mit Leitungswasser gewaschen und danach 5-7 min, unter stetem langsamem Austausch des Leitungswassers „gebläut“ (inkubiert). Anschließend wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser gewaschen und etwa 2 min in Eosin inkubiert. Nach kurzem Waschen mit destilliertem Wasser wurde die Zytoplasmafärbung mit 70 %igem Ethanol differenziert (Inkubation für 3-5 min). Die Schnitte wurden anschließend mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (80/96/100/100 % je 3-5 min Inkubation) entwässert, für 3x 5 min in Xylol inkubiert und mit Entellan versiegelt.

2.2.25 Immunhisto-Untersuchungen von Gewebeschnitten

Zur Demaskierung von Antigenen (zur besseren Interaktion der Antigene mit dem Primärantikörper) wurden die Schnitte in Citratpuffer (DAKO, Hamburg) bei ca. 100°C (Dampfgarer, FS 20 R Multi Gourmet, Type 3216, Braun, Kronberg/Taunus) für 1 h inkubiert. Nach einer 20-minütiger Abkühlphase bei Raumtemperatur im Citratpuffer, wurden die Schnitte mit dest. Wasser gewaschen und für mindestens eine Stunde mit „Protein block“ (DAKO, Hamburg) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 3x 5 min mit PBS + 0,1 % Tween 20 gewaschen und über Nacht mit Primärantikörper (in PBS + 0,2 % Triton-X100) bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden dann erneut 3 x 5 min mit PBS + 0,1 % Tween 20 gewaschen und 2 h bei Raumtemperatur mit Sekundärantikörper (HRP rabbit/mouse (Dako) oder Alexa Fluor 488 goat (Invitrogen) 1:500 in PBS + 0,2 % Triton-X100)

inkubiert. Nach 3 x 5 min Waschen mit PBS wurden die Schnitte für die Immunfluoreszenz mit DAPI enthaltendem Vectashield (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) überschichtet und mit Nagellack versiegelt. Das im Vectashield enthaltene DAPI ermöglicht bei der anschließenden Fluoreszenzmikroskopie die Detektion der Zellkerne. Für die Immunhistochemie wurden die gebundenen Antikörper mit dem Dako REAL EnVision Detection Kit(Dako) visualisiert und die Kerne mit saurem Hämalaun gefärbt. Zum Auswerten wurde ein Olympus BX43 Mikroskop verwendet.

2.2.26 TUNEL-Assay

TUNEL-positive Zellen wurden mittels des „In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein“ (Roche, Mannheim) nach Herstellerprotokoll visualisiert. TUNEL-positive Zellen enthalten viele freie DNA 3’OH-Enden, welche durch die im TUNEL-Kit enthaltene die Desoxyribonukleotidyltransferase mit Fluorescein-dUTP markiert werden. Freie DNA 3’OH-Enden entstehen in großer Zahl während der Apoptose da Endonukleasen hierbei die DNA in ca. 180 bp lange Stücke schneiden. Der TUNEL-Assay kann daher als Nachweis für apoptotischen Zellen verwendet werden (Gavrieli et al., 1992). Die Anzahl der Fluorescein positiven Kerne wurden mittels des Olympus BX43 Mikroskop detektiert und mittels ImageJ ausgewertet.

2.2.27 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse wurde der parametrische Student T-test oder Mann-Whitney U-test verwendet. Statistische signifikante Unterschiede wurden mit einem (*) versehen. Ab einer Zufallswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % wurde der Unterschied zwischen verschiedenen Gruppen als signifikant angesehen ($p \leq 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Rac1 auf die Wirkung von Topoisomerase-II-Giften

Wie in früheren Arbeiten schon gezeigt werden konnte, führt eine Statin-vermittelte Inhibition des Rac1 Signalweges zu einer verminderten Doxorubicin-induzierten DNA Schadensantwort in nicht malignen Endothel- (HUVEC) und Ratten Kardiomyoblasten- (H9c2) Zellen, nicht aber in humanen Fibrosarkomzellen (HAT-1080) (Damrot et al., 2006; Huelsenbeck et al., 2011; Huelsenbeck et al., 2012). Lovastatin hemmt dabei die Verankerung und somit die Aktivität einer Vielzahl kleiner GTPasen der Ras- und Rho-Familie. Um die Frage nach dem Einfluss Rac1 regulierter Signalwege auf die durch Topoisomerase-II-Gifte vermittelte Zytotoxizität zu beantworten und die beteiligten Mechanismen näher zu untersuchen, sollte für die *in vitro* Versuche Rac1 spezifisch inhibiert werden. Zu diesem Zweck wurden in Vorversuchen die beiden kommerziell erwerblichen Rac1 spezifischen Inhibitoren EHT1864 (EHT) und NSC23766 (NSC) in Bezug auf ihre Toxizität und Effektivität einer Rac1 Hemmung miteinander verglichen.

3.1.1 Toxizität der Rac1 Inhibitoren EHT1864 und NSC23766

Um toxische Effekte der Inhibitoren in den Kombinationsexperimenten mit Topoisomerase II-Giften zu vermeiden, wurde die Viabilität von Leberkrebszelllinien 72 h nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentration von EHT bzw. NSC bestimmt. Verwendet wurden die Zelllinien Hep3B (p53-mut), welche kein p53 exprimiert und HepG2 Zelle, welche p53 profizient sind (Lee et al., 2002). Bei den Untersuchungen zur Viabilität zeigt der Inhibitor EHT1864 in beiden Zelllinien einen ähnlichen Dosis-Wirkungs-Verlauf (Abb. 24A). Die Behandlung mit NSC23766 hingegen zeigt in der verwendeten HepG2 Zelllinie über den gesamten Dosisbereich keinerlei Toxizität (Abb. 24B).

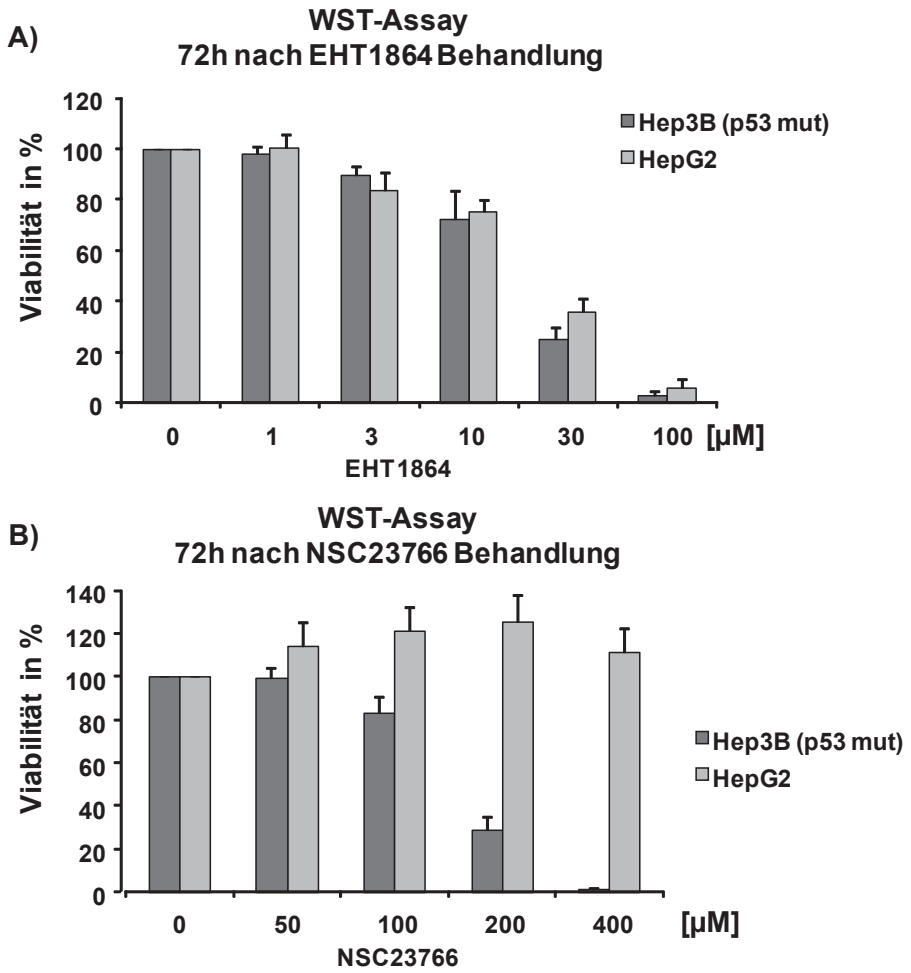


Abb. 24: Bestimmung der Toxizität von EHT1864 und NSC23766 in humanen Leberkrebs-Zelllinien. Logarithmisch wachsende HepG2 und Hep3B (p53 mut) Zellen wurden mit den in der Graphik genannten Dosen EHT1864 (A) und NSC23766 (B) für 72 h behandelt. Die Zellviabilität wurde dann mittels des im Methodenteil beschriebenen WST-Assays analysiert. Die relative Viabilität der unbehandelten Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Die IC50 Werte wurden dabei für EHT mit IC50(HepG2) = 24 µM, IC50(Heb3B) = 21 µM und für NSC mit IC50(Heb3B) = 160 µM bestimmt. Die gezeigten quantitativen Daten entsprechen dem Mittelwert ± SD aus drei unabhängigen Experimenten die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

3.1.2 Wirksamkeit der Rac1 Inhibitoren

Um die Wirksamkeit und Effektivität der Rac1 Inhibition zu überprüfen, wurden logarithmisch wachsende HepG2 Zellen, wie in Abb. 25A dargestellt, mit den beiden Inhibitoren vorbehandelt (2 h) und die Zellen anschließend mit EGF (50 ng/ml) und Serum (FCS 20 %) stimuliert, was über die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen zur Aktivierung kleiner Rho GTPasen, darunter auch Rac1 führt. Eine Stunde nach Stimulation der Zellen wurde aktives GTP-gebundenes Rac1 mit GST-PAK-Beads präzipitiert und mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen. Wie in Abb. 25B zu sehen, zeigt der Inhibitor EHT1864 im schwach toxischen Bereich (etwa 80 % Viabilität nach 72 h (Abb. 24)) eine deutlich stärkere Verminderung der Rac1 Aktivität

als der NSC23766 Inhibitor. Nach diesen Vorversuchen wurde daher in allen weiteren Experimenten der Rac1 Inhibitor EHT1864 verwendet.

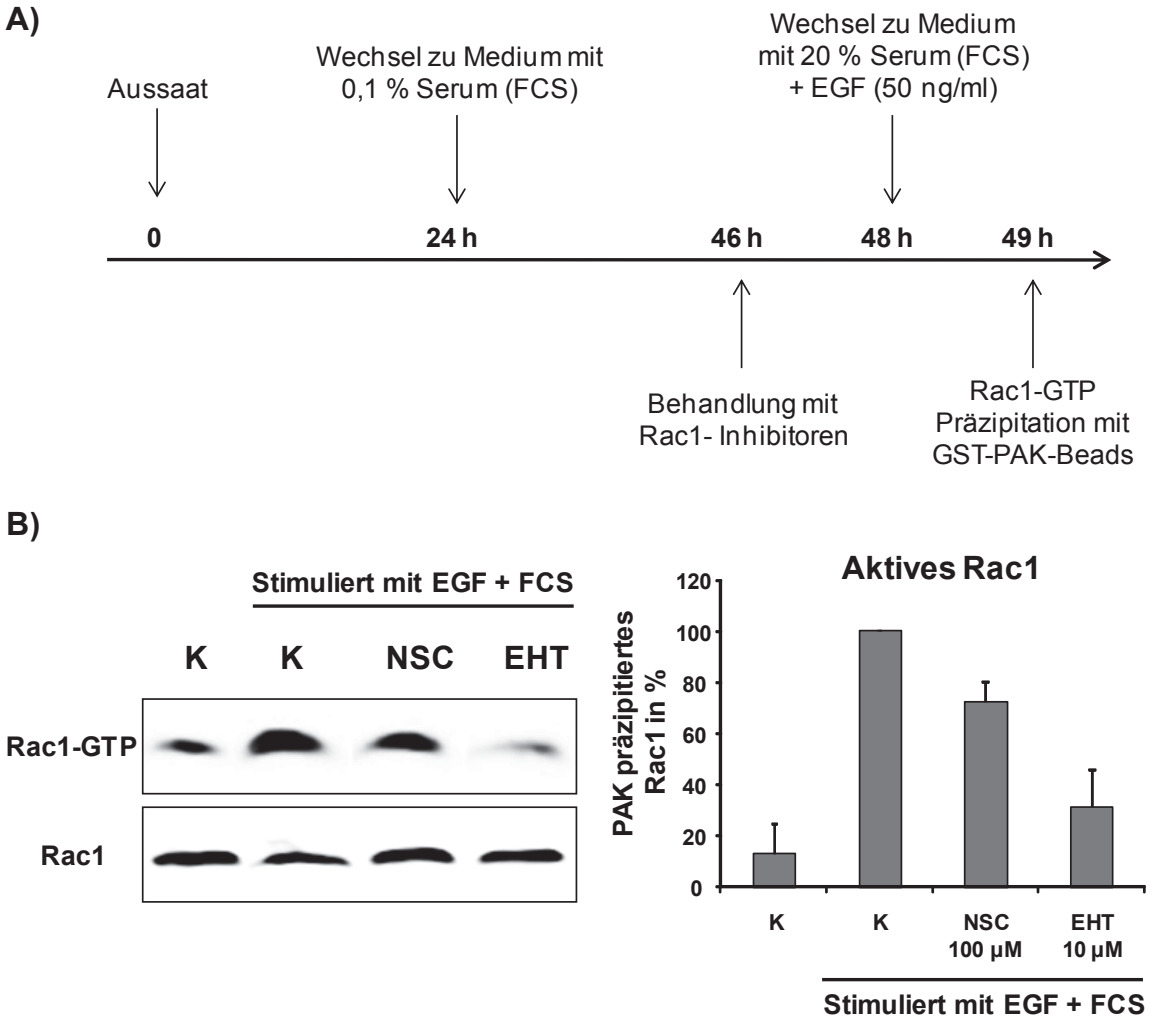


Abb. 25: EHT1864 führt zu einer stärkeren Reduktion der Interaktion von aktivem Rac1 mit PAK als NSC23766. Logarithmisch wachsende HepG2 Zellen wurden analog zum Schema in A mit EHT1864 (EHT, 10 µM) und NSC23766 (NSC, 100 µM) behandelt. Als Kontrolle wurden zusätzlich unbehandelte nicht stimulierte und unbehandelte mit Fetalem Kälberserum (FCS) und Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) stimulierte Zellen verwendet. Aktives GTP gebundenes Rac1 (Rac1-GTP) wurde mit GST-PAK-Beads präzipitiert und anschließend mittels Western Blot detektiert (B). Ein Teil des Lysats wurde vor der Präzipitation abgezweigt und zur Bestimmung der Rac1-Gesamtmenge (Rac1, aktives + inaktives Rac1) verwendet. Gezeigt sind links ein exemplarischer qualitativer Western Blot und rechts die zugehörigen quantitative Daten, gewonnen aus drei unabhängigen Experimenten. (Mittelwert±SD, *p≤0.05).

3.1.3 Inhibition von Rac1 schützt vor der Behandlung mit Topoisomerase-II-Giften

Um den Einfluss des Rac1 Inhibitors auf die Toxizität der Zytostatika Doxorubicin und Etoposid zu untersuchen, wurde die Viabilität humaner Hepatomzellen 72 h nach Behandlung mit Topoisomerase-II-Giften mittels WST-Assay gemessen. Die

Vorbehandlung mit dem Rac1 Inhibitor EHT1864 zeigt, mit einer Ausnahme (Hep3B (p53 mut); 3,0 µM Doxo), über den gesamten Dosisbereich sowohl in HepG2 als auch in Hep3B (p53 mut) Zellen eine erhöhte Viabilität nach Behandlung mit den Topoisomerase-II-Giften Doxorubicin (Abb. 26A) und Etoposid (Abb. 26B).

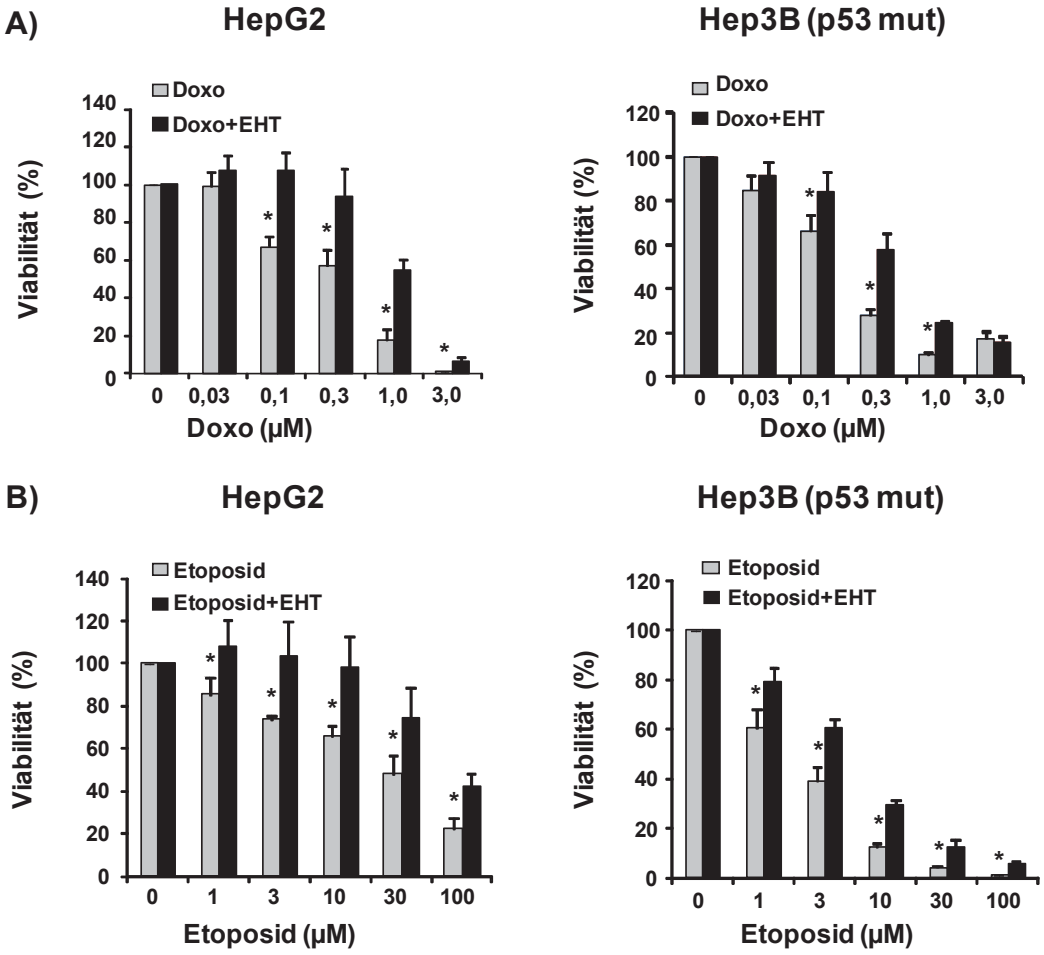


Abb. 26: Mit EHT1864 vorbehandelte humane Leber Zellen (HepG2 und Hep3B (p53 mut)) zeigen eine höhere Viabilität nach Behandlung mit Topoisomerase II Giften. Unbehandelte und mit EHT1864 (10 µM, 1 h) vorbehandelten Zellen wurden mit den in der Graphik genannten Dosen Doxorubicin (Doxo) (A) und Etoposid (B) behandelt. Die verbliebene Zellviabilität wurde dann 72 h später mittels WST-Assay bestimmt. Die entsprechende unbehandelte Kontrolle wurde jeweils gleich 100 % gesetzt. Es wurden folgende IC50-Werte berechnet: Für die HepG2 Zellen: IC50(Doxo) = 0,5 µM, IC50(Doxo+EHT) = 1,3 µM, IC50(Etoposid) = 48 µM und IC50(Etoposid+EHT) = 91 µM. Für die Hep3B (p53 mut) Zellen: IC50(Doxo) = 0,2 µM, IC50(Doxo+EHT) = 0,5 µM, IC50(Etoposid) = 2,5 µM und IC50(Etoposid+EHT) = 5,3 µM. Die gezeigten quantitativen Daten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden. *p≤0.05

3.1.4 Rac1 Inhibition schützt vor der Doxorubicin-induzierten Veränderung der Zellzyklusverteilung

Um zu überprüfen ob dieser erhöhten Viabilität eine Verhinderung der Apoptose/Nekrose (subG1) oder das Fehlen eines Zellzyklusarrestes zu Grunde

liegt, wurde eine Zellzyklusanalyse mittels FACS durchgeführt (Abb. 27A). Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl der durch Doxorubicin induzierte Anteil an subG1 als auch der erhöhte Anteil an S-Phase Zellen durch Vorbehandlung mit EHT1864 abgeschwächt wird (Abb. 27B und C).

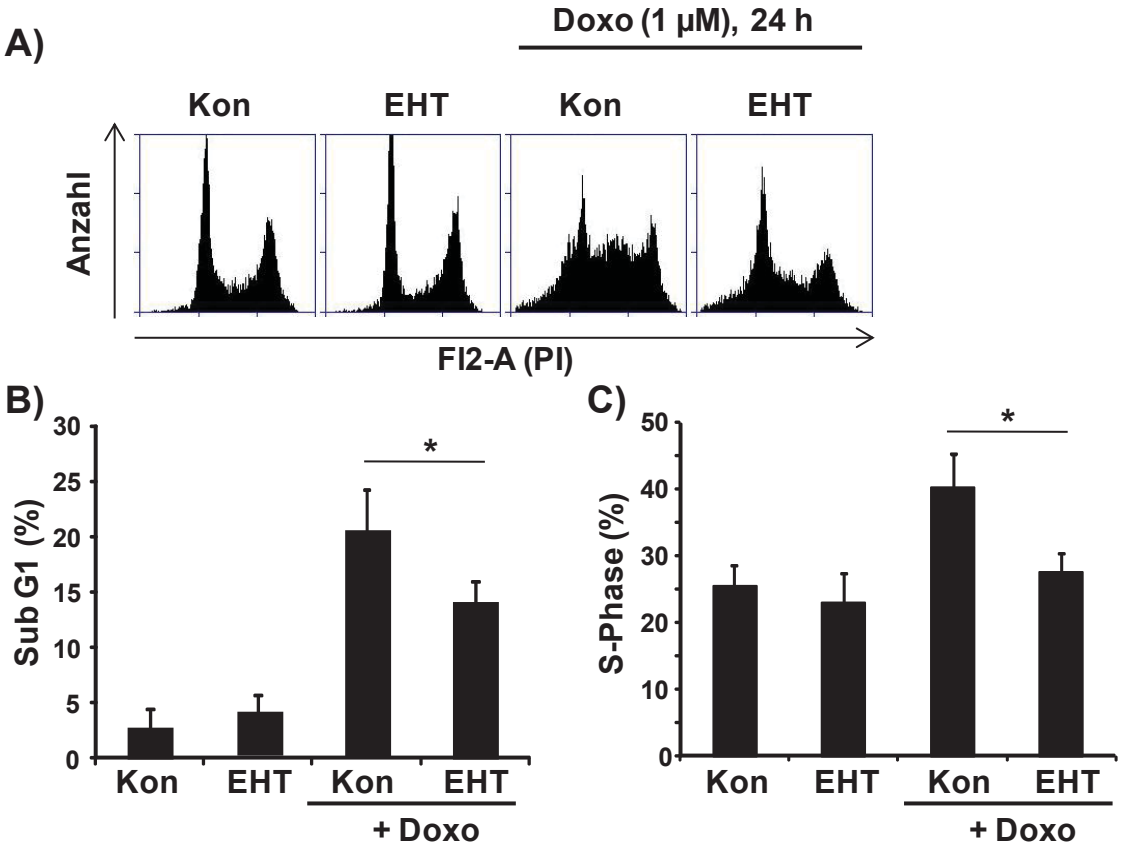


Abb. 27: Einfluss von EHT1864 auf die Doxorubicin induzierte Veränderung der Zellzyklusverteilung. Unbehandelte und mit EHT1864 (10 µM) (EHT) für 1 h vorbehandelte HepG2 Zellen wurden im Anschluss mit 1 µM Doxorubicin (Doxo) für 24 h behandelt. Zur Kontrolle wurden zusätzlich unbehandelte und nur mit EHT behandelte Zellen verwendet. Die Zellzyklusverteilung wurde mittels FACS gemessen. Gezeigt sind exemplarische Zellzyklusverteilungen der verschiedenen Bedingungen (A) und die quantitative Auswertung des Anteils der Zellen in der SubG1-Phase (B) und der S-Phase (C). Der prozentuale Anteil an SubG1-Zellen und die Zellzyklusverteilung wurden mittels FACS und der CFlowPlus-Software ermittelt. Die gezeigten quantitativen Daten wurden aus 3 unabhängigen Experimenten gewonnen. Mittelwert±SD *p≤0.05.

3.1.5 Rac1 Inhibition führt zu einer verringerten Phosphorylierung von H2AX nach Behandlung mit Topoisomerase-II-Giften.

Da beide Topoisomerase-II-Gifte Doppelstrangbrüche (DSB) induzieren, wurde die Expression des an S139 phosphorylierten H2AX (γH2AX) als Surrogatmarker für DNA-Doppelstrangbrüche, mittels Western Blot untersucht. Als Positivkontrolle wurden zusätzlich bestrahlte Zellen verwendet. Alle drei Behandlungen (Doxo, Etoposid, IR) führen zur Phosphorylierung von H2AX (Abb. 28). Eine Reduktion der

γH2AX Proteinmenge durch Inhibition von Rac1 kann aber nur in den Doxorubicin- oder Etoposid- behandelten Zellen erreicht werden (Abb. 28A und B).

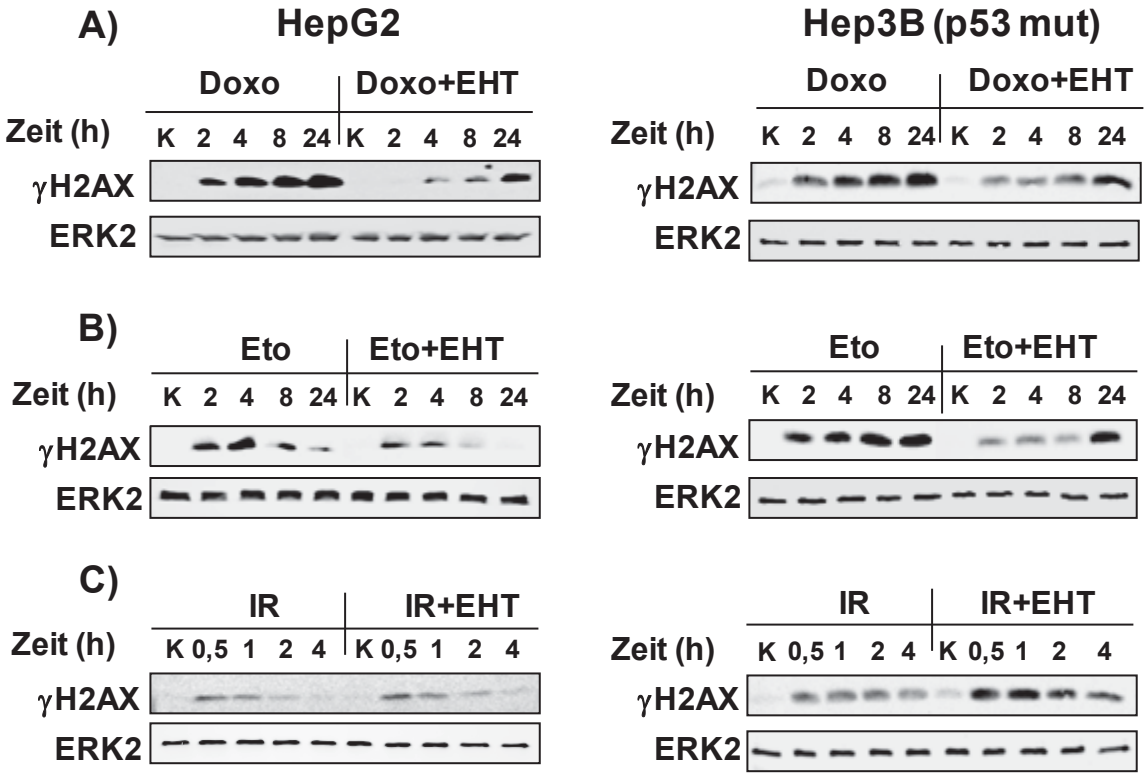


Abb. 28: Vorbehandlung mit EHT1864 führt in Leberzelllinien (HepG2 links und Hep3B rechts) zu einer Reduktion der durch Topoisomerase II Gifte induzierten Phosphorylierung von H2AX. Nach Vorbehandlung mit 10 µM EHT1864 (EHT) für 1 h wurden die Zellen entweder mit 1 µM Doxorubicin (Doxo) (A), 10 µM Etoposid (Eto) (B) oder 10 Gy ionisierender Strahlung (IR) (C) behandelt. Nach den verschiedenen Zeitpunkten (2-24 h) wurde dann die Expression von S139 phosphoryliertem H2AX (γH2AX) mittels Western Blot analysiert. Die Expression von ERK2 dient als Ladekontrolle. K: Unbehandelte Kontrolle.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Inhibition von Rac1 spezifisch vor den durch Topoisomerase-II-Gifte induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen schützt. Da sich HepG2 und Hep3B Zellen in ihrem p53 Status unterscheiden (HepG2 WT-p53 und Hep3B p53 mutiert), scheint der p53 Status auf den durch Rac1 Inhibition vermittelten genoprotektiven Effekt keinen Einfluss zu haben. Um diese Hypothese weiter zu verfestigen, wurde in der p53-profizienten Zelllinie HepG2 zusätzlich der p53 Inhibitor Pifithrin-α (Pif) verwende. Wenn man Abb. 28A mit Abb.29A vergleicht scheint die p53 Inhibition allein keinen merklichen Einfluss auf die Doxorubicin induzierte Phosphorylierung des Histons H2AX zu haben. Die Vorbehandlung mit EHT zeigt auch bei gleichzeitiger p53 Inhibition genoprotektive Effekte (Abb. 29A). Diese scheinen also unabhängig von p53 zu sein. Eine Co-Behandlung von Pifithrin–α und EHT1864 zeigt nach 72 h schon eine deutliche reduzierte Viabilität

(Abb. 29B). Daher konnte der Einfluss des p53 Inhibitors auf die durch Rac1 Inhibition vermittelte erhöhte Viabilität nach Doxorubicin- oder Etoposid-Behandlung (Abb.26) nicht bestimmt werden.

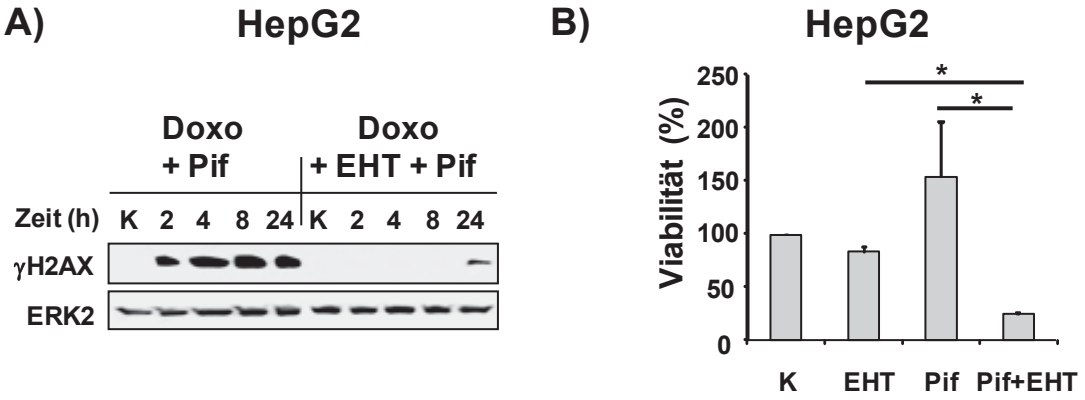


Abb. 29: Der genoprotektive Effekt von EHT1864 gegenüber Doxorubicin ist unabhängig von p53. Nach Vorbehandlung für 1 h mit 10 µM EHT1864 (EHT) und 10 µM Pifithrin-α (Pif) oder 10 µM Pifithrin-α allein wurden die Zellen mit 1 µM Doxorubicin (Doxo) behandelt. Nach den verschiedenen Zeitpunkten (2-24 h) wurde dann die Expression von S139 phosphoryliertem H2AX (γH2AX) mittels Western Blot analysiert (A). Die Expression von ERK2 dient als Ladekontrolle. Zusätzlich wurde die Viabilität 72 h nach einer Co-Behandlung von EHT1864 (10 µM) und Pifithrin (10 µM) oder Pifithrin (10 µM) und EHT1864 alleine untersucht (B). Die gezeigten quantitativen Daten entsprechen dem Mittelwert±SD aus drei unabhängigen Experimenten die in jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden. *p≤0.05

3.1.6 EHT1864 schützt HepG2 und Hep3B Zellen vor Doxorubicin-induzierten DNA Schäden

Um zu klären ob der reduzierten Phosphorylierung des Histons H2AX auch tatsächlich eine geringere Anzahl an DNA-Strangbrüchen zu Grunde liegt, wurde der alkalische Comet-Assay durchgeführt. Im alkalischen Comet-Assay werden sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche detektiert. Auch hier führte die Inhibition von Rac1 in den beiden Leberkrebszelllinien HepG2 (Abb. 30A) und Hep3B (Abb. 30B) sowohl nach Behandlung mit Doxorubicin als auch Etoposid zu einer Reduktion an fragmentierter DNA (Abb. 30).

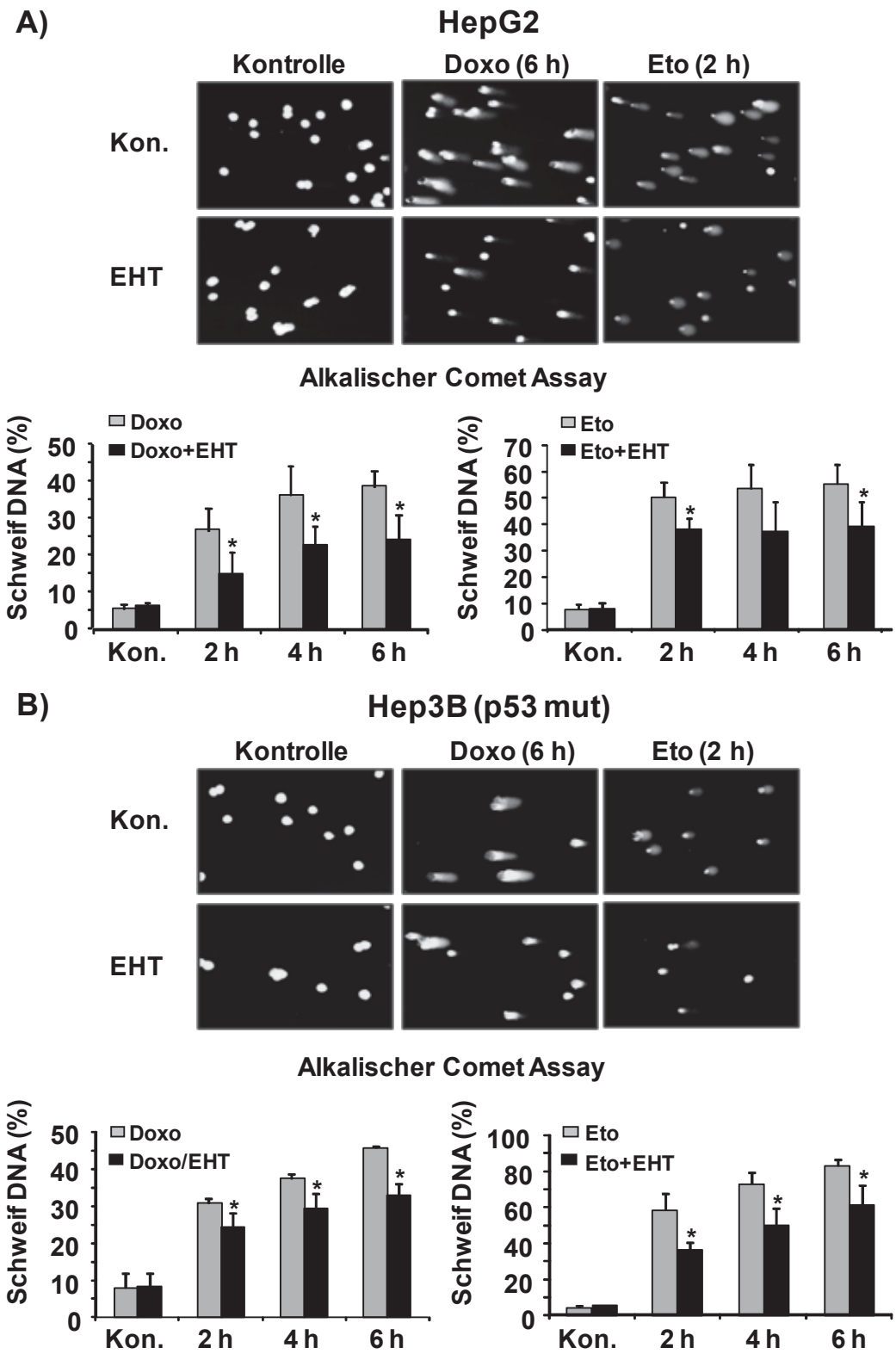


Abb. 30: Vorbehandlung mit EHT1864 führt in Leberzelllinien (HepG2 und Hep3B (p53 mut)) zu einer Reduktion der durch Topoisomerase-II-Gifte induzierten DNA Schäden. HepG2 (A) und Hep3B (p53 mut) (B) Zellen wurden mit 10 µM EHT1864 (EHT) für 1 h vorbehandelt und anschließend entweder mit 1 µM Doxorubicin (Doxo) oder 10 µM Etoposid (Eto) behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 2, 4 und 6 h wurde die Menge an DNA Strangbrüchen mittels des alkalischen Comet-Assays nachgewissen. Gezeigt sind für jede Zelllinie einige exemplarische mikroskopische Aufnahmen verschiedener Bedingungen und die entsprechende quantitative Auswertung. (Mittelwert±SD; n=6 *p≤0.05). Kon.: Unbehandelte Kontrolle

Die Resultate dieser Versuche zeigen, dass eine pharmakologische Inhibition von Rac1 sowohl in HepG2 als auch Hep3B (p53 mut) Zellen eine erhöhte Viabilität, eine verminderte Phosphorylierung des Histons H2AX (γH2AX) und eine verringerte Anzahl an DNA Schäden nach Behandlung mit Topoisomerase-II-Giften zur Folge hat. Außerdem konnte nach Bestrahlung keine Reduktion der Expression des γH2AX durch Vorbehandlung mit EHT1864 erreicht werden. Der durch die Rac1 Inhibition vermittelte genoprotektive Effekt scheint somit unabhängig vom p53 Status und spezifisch für Topoisomerase-II-Gifte zu sein.

3.1.7 Zellzyklus-Abhängigkeit der Topoisomerase-II-Gifte

Bei der Auswertung der Comet-Assays fiel auf, dass ein Teil der Zellen nach Doxorubicin bzw. Etoposid Behandlung fast unbeschädigt blieb während andere Zellen eine sehr starke Fragmentierung der DNA zeigten. Um diese Beobachtung quantitativ zu erfassen, wurde eine Verteilungskurve der DNA Schäden erstellt (Abb. 31). Dabei zeigte sich, dass die Behandlung mit Doxorubicin zu zwei Zellpopulationen mit unterschiedlich starker Schädigung führt und dass die Vorbehandlung mit EHT die Zellen vor allem vor starker Schädigung zu schützen scheint.

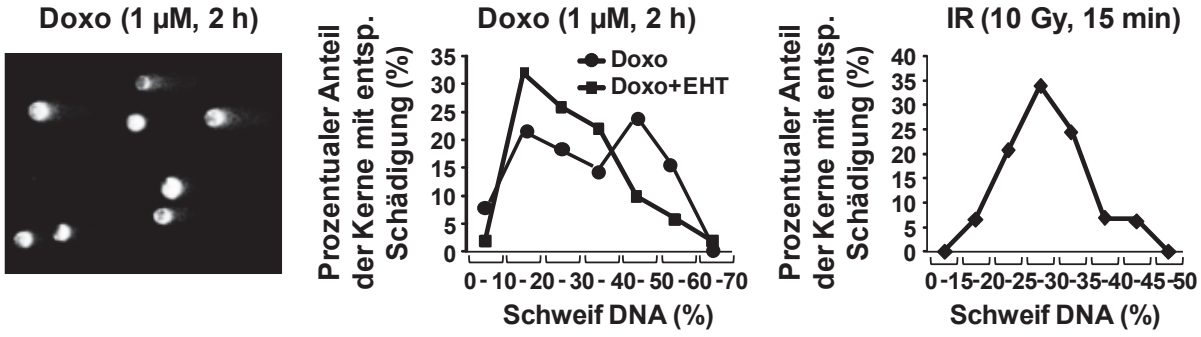


Abb. 31: Schädigung mit Doxorubicin ergibt im Gegensatz zu IR zwei unterschiedlich stark geschädigte Populationen. EHT1864 schützt vor allem die stärker geschädigten HepG2 Zellen. Logarithmisch wachsende HepG2 Zellen wurden für 1 h mit 10 µM EHT1864 (EHT) vor- und anschließend mit 1 µM Doxorubicin (Doxo) für 2 h nach-behandelt. Zur Kontrolle wurden Zellen mit 10 Gy bestrahlt (IR) und 15 min nach Behandlung geerntet. Links ist eine exemplarische mikroskopische Aufnahme des Comet-Assays gezeigt und in der Mitte das aus der Analyse mehrerer dieser Bilder gewonnene Histogramm. Die Stärke der Schädigung (Prozentualer Anteil der DNA im Schweif) wurde in 7 Kategorien für Doxo (mittleres Diagramm) und 8 Kategorien für IR (rechtes Diagramm) unterteilt. Die prozentualen Anteile der Kerne die jeweils in eine Schadenskategorie fallen ergeben dann die einzelnen y-Werte. Die gezeigten Daten wurden aus 3 unabhängigen Experimenten gewonnen, wobei jeweils mindestens 50 Kerne ausgewertet wurden.

Um die hieraus resultierende Hypothese einer Zellzyklus-Abhängigkeit des Schutzeffektes von EHT1864 zu bestätigen, wurde ein FACS-basierter Assay

durchgeführt. Dieser erlaubt die gleichzeitige Messung der γH2AX Menge und des DNA Gehalts und somit die Bestimmung des Anteils von Zellen mit geschädigter DNA in den verschiedenen Zellzyklusphasen. Hier konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor EHT1864 vor allem bei Zellen in der S- und G2-Phase die Doxorubicin-induzierte Phosphorylierung des Histons H2AX (als Marker für DSB) vermindert.

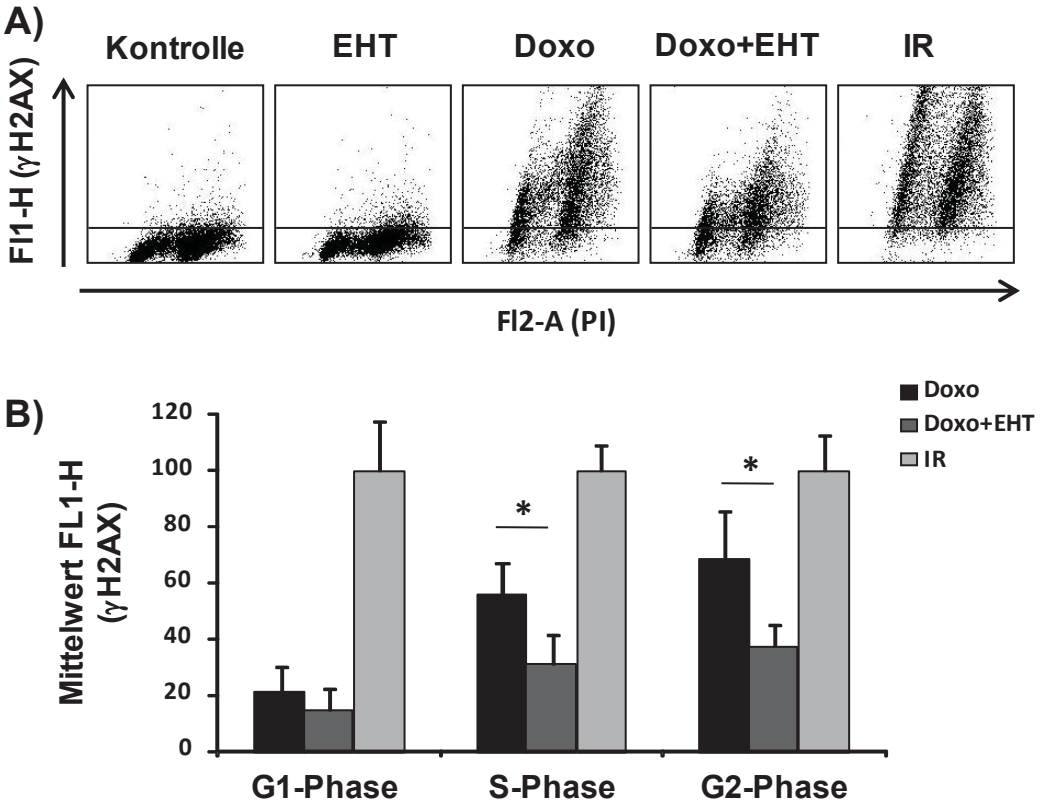


Abb. 32: EHT1864 schützt HepG2 Zellen vor Doxorubicin vornehmlich in der G2- und S-Phase. HepG2 Zellen wurden für eine Stunde mit 10 µM EHT1864 (EHT) vorbehandelt gefolgt von einer 2 stündigen Nachbehandlung mit 1 µM Doxorubicin (Doxo). Für die negativen Kontrolle wurden unbehandelte und nur mit EHT behandelte, für die positive Kontrollen bestrahlte Zellen (10 Gy; 15 min (IR)) verwendet. Die γH2AX Level wurden mittels FACS-Analyse (siehe Methoden) bestimmt. Um die entsprechenden Zellen der unterschiedlichen Zellzyklusphasen zu bestimmen wurde zusätzlich mit PI gefärbt. In A sind repräsentative FACS-Analysen der verschiedenen Bedingungen und in B die resultierenden quantitativen Daten aufgesplittet in die einzelnen Zellzyklusphasen gezeigt. Diese wurden aus 3 unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden gewonnen. Da Strahlung die Zellen Zellzyklus-unabhängig schädigt wurde die Positivkontrolle (IR) gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind Mittelwert±SD, *p≤0.05.

Die Stärke des durch eine Rac1 Inhibition vermittelten genoprotektiven Effektes gegenüber einer Doxorubicin Behandlung scheint somit Zellzyklusabhängig zu sein.

3.1.8 Einfluss einer Rac1 Inhibition auf die Doxorubicin induzierte Schadensantwort verschiedenen Zelllinien

Wie schon erwähnt wurde, führt eine Lovastatin-vermittelte Inhibition des Rac1 Signalweges zu einer verminderten Doxorubicin-induzierten DNA Schadensantwort in nicht-malignen Endothel- (HUVEC) und Ratten Kardiomyoblasten (H9c2) Zellen, nicht aber in humanen Fibrosarkomzellen (HAT-1080) (Damrot et al., 2006; Huelsenbeck et al., 2011; Huelsenbeck et al., 2012). Daraus ergab sich die Frage, ob der Schutzeffekt des Rac1 Inhibitors Zelltyp-spezifische Unterschiede aufweist. Daher wurden Zelllinien unterschiedlicher Herkunft auf den Einfluss einer EHT Vorbehandlung auf die Doxorubicin-induzierte Phosphorylierung von H2AX und dem Tumorsupressor p53 hin untersucht. Zusätzlich wurde, da Doxorubicin ein Topoisomerase-II-Gift ist, die Menge an Topoisomerase IIα und Topoisomerase IIβ und darüber hinaus die Menge von an S1106 phosphorylierter Topoisomerase IIα (pTopo2a) erfasst. Diese Phosphorylierung soll laut Literatur (Grozav et al. 2009a) einen Einfluss auf die durch Doxorubicin vermittelte Toxizität haben. Da frühere Arbeiten außerdem schon einen Zusammenhang zwischen der Expression von Hitzeschockproteinen (Hsp) und einem Schutzeffekt gegenüber Doxorubicin festgestellt hatten (Barker et al., 2006; Demidenko et al., 2006), wurde die Expression der Hsp90 und Hsp70 bestimmt. Um den Einfluss der Proliferation auf die Doxorubicin-vermittelte Schadensantwort zu testen, wurde pH3 als Marker für die Mitose untersucht. Da hier der Einfluss eines Rac1 Inhibitors auf die durch Doxorubicin vermittelte Schadensantwort untersucht werden sollte, wurde zusätzlich die Rac1 Proteinmenge analysiert.

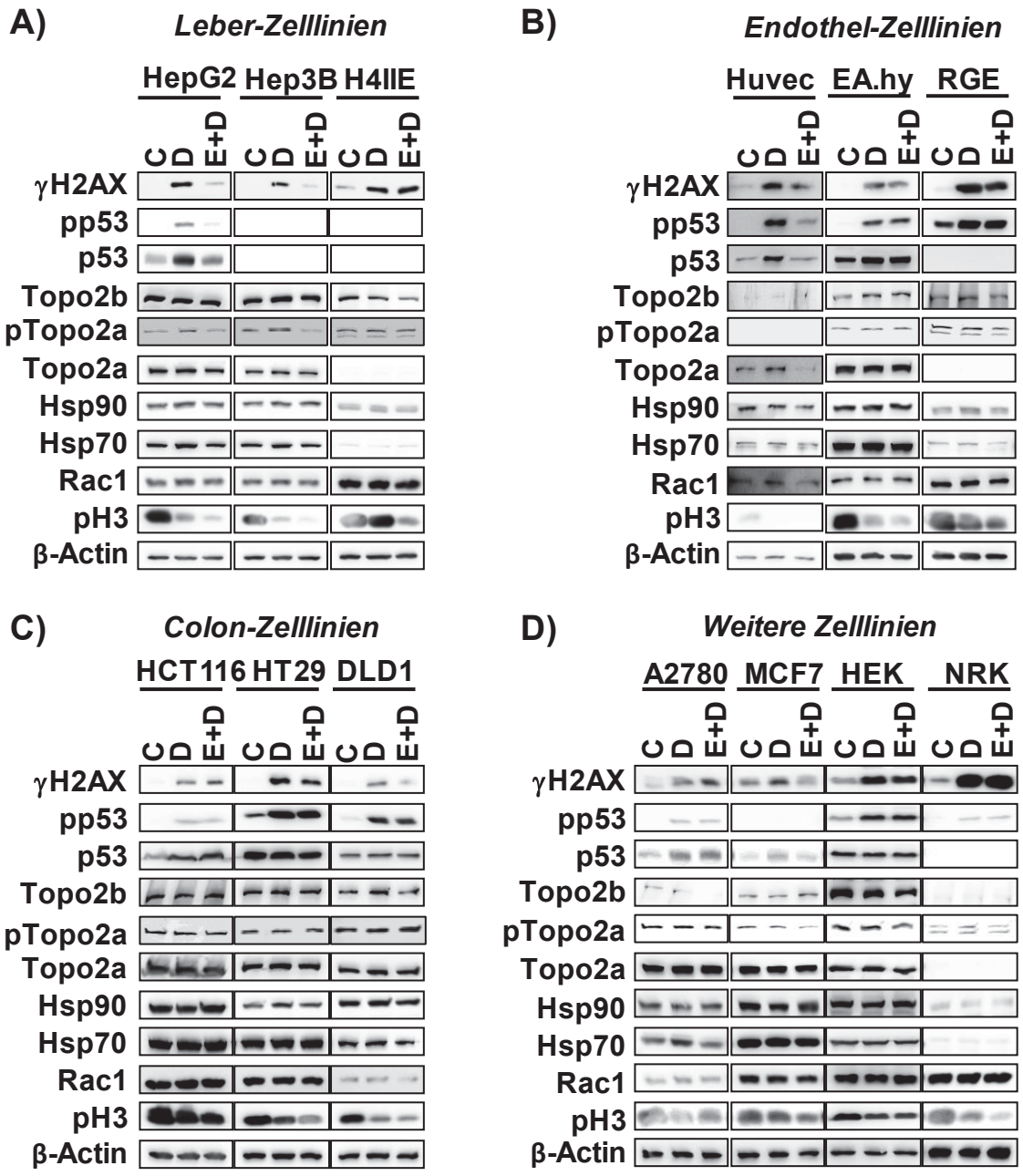


Abb. 33: Zelltyp-spezifische Inhibition der Doxorubicin induzierten DNA Schadensantwort durch EHT1864. Unbehandelte und mit 10 µM EHT1864 (E) vorbehandelte Zellen verschiedener Zelllinien wurden mit 1 µM Doxorubicin (D) für 4 h behandelt. Anschließend wurde die Proteinexpression mit den in der Graphik genannten Antikörpern untersucht. In A, Humane (HepG2, Hep3B) und Raten (H4IIE) Leber-Zelllinien; B, Humane (Huvec, EA.hy926) und Raten (RGE) Endothel Zelllinien; C, Humane Colon Carcinom Zelllinien; D, Humane Ovarialkarzinom (A2780) und Brustkrebs Zelllinien (MCF7), Humane embryonale Nieren (HEK293) und Raten Nierentubuli (NRK-52E) Zellen.

Nur 4 (HepG2, Hep3B, Huvec und MCF7) der 13 untersuchten Zelllinien zeigen nach Vorbehandlung mit EHT eine deutlich verringerte durch Doxorubicin induzierte Phosphorylierung von H2AX und p53 (Abb. 33). Außerdem korreliert in 3 dieser Zelllinien (HepG2, Hep3B und MCF7) die Reduktion der Phosphorylierung (S1106)

der Topoisomerase IIα mit der Reduktion der H2AX Phosphorylierung (zusammengefasst in Tabelle 13).

Tabelle 13: Einfluss des Rac1 Inhibitors EHT1864 auf die Doxorubicin induzierte DNA Schadensantwort in den verschiedenen Zelllinien. Analysiert wurde der Effekt von EHT1864 auf die Doxorubicin induzierte Phosphorylierung von H2AX, p53 und zusätzlich die der Topoisomerase IIα. Hierzu wurde die Expression der genannten Proteine der Doxo und der Doxo+EHT Bedingung aus Abb. 33 miteinander verglichen.

Zelllinie	γH2AX	pp53	pTopo2a
HepG2	-	-	-
Hep3B	-	n.d.	-
H4IIE	0	n.d.	0
HUVEC	-	-	n.d.
EA.hy926	0	0	0
RGE	0	0	0
A2780	+	0	0
HCT116	+	0	0
HT29	0	0	0
DLD1	-	0	0
MCF7	-	-	-
HEK	0	0	0
NRK	0	0	0

0 : kein Unterschied (im Vergleich zu Doxo)
- : 50 % geringere Expression durch Co-Behandlung mit EHT
+ : 50 % höhere Expression durch Co-Behandlung mit EHT
n.d.: nicht detektierbar

Die durch eine Rac1 Inhibition vermittelte Abschwächung der durch Doxorubicin induzierte DNA-Schadensantwort ist Zelltyp-spezifisch.

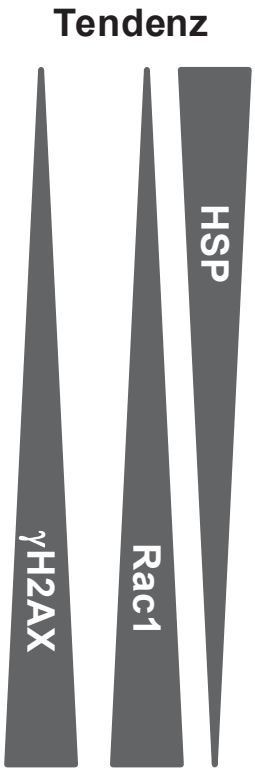
3.1.9 Korrelationanalysen der durch Doxorubicin-induzierten Menge an γH2AX.

Frühere Arbeiten ließen einen Zusammenhang zwischen der Proteinmenge an Topoisomerasen II und der Suszeptibilität von Krebszellen gegenüber Doxorubicin vermuten (Durbecq et al., 2004; Burgess et al., 2008). Bei den hier verwendeten

Zelllinien konnte keine Korrelation zwischen der basalen Topoisomerase II Expression und der durch Doxorubicin induzierten Menge an γH2AX festgestellt werden (Abb. 33). Auch scheint die Menge an pH3 der unbehandelten Kontrolle, welche die Anzahl der mitotischen Zellen vor der Doxorubicin-Behandlung wiederspiegelt, nicht mit der durch Doxorubicin induzierten γH2AX Menge zu korrelieren (Abb. 33). Interessanterweise zeigt sich dagegen, dass eine hohe Rac1 und eine niedrige Expression von Hsp (Hsp90+Hsp70) tendenziell mit einer erhöhten DNA Schadensantwort (γH2AX) korreliert (zusammengefasst in Tabelle 14).

Auf β-Actin normierte Proteinexpression von γH2AX, Rac1 und Hsp der verschiedenen Zelllinien

Zelllinie	γH2AX	Rac1	HSP
Huvec	-	-	0
A2780	-	-	0
HCT116	-	0	+
MCF7	-	0	+
DLD1	-	-	0
EA.hy	0	0	0
HT29	0	0	0
Hep3b	0	0	0
NRK	+	0	-
HepG2	+	0	0
H4IIE	+	+	-
RGE	+	0	-
HEK	+	+	0



0 : **Expression ähnlich stark wie β-Actin**
\+ : **50% höhere Expression (verglichen mit β-Actin)**
\- : **50 % niedrigere Expression (verglichen mit β-Actin)**

Tabelle 14: Die Doxorubicin induzierte DNA Schadensantwort (γH2AX) korreliert positiv mit der Proteinexpression von Rac1 und invers mit der Menge an Hitzeschock Proteinen (HSP). Analysiert wurde die Stärke der Proteinexpression (aus Abb. 33) normiert auf β-Actin. Die Zelllinien wurden in der Reihenfolge ihrer durch Doxorubicin induzierten γH2AX Menge (auf β-Actin normiert) aufgelistet (von schwach nach stark). 0: Expression ähnlich stark wie β-Actin; +: ≥ 50 % höhere Expression -: ≤ 50 % reduzierte Expression.

3.2 Untersuchungen zur molekularen Ursache des EHT1864 vermittelten Schutzeffektes

3.2.1 Einfluss von Rac1 auf die Topo2a-Hsp90 Interaktion

Wie frühere Arbeiten anderer Arbeitsgruppen zeigten, kann eine Interaktion zwischen Hsp90 und der Topoisomerase II einen möglichen Schutzmechanismus gegenüber Topoisomerase-II-Giften darstellen (Barker et al. 2006). Daher wurde sowohl die Interaktion von Hsp90 mit der Topoisomerase IIα als auch deren Interaktion mit Rac1 mittels Co-Immunopräzipitations-Experimenten untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Inhibition von Rac1 zu einer verminderten Interaktion von Rac1 mit Hsp90 führt. Auch die durch Doxorubicin verursachte reduzierte Interaktion von Topoisomerase IIα mit Hsp90 wird durch EHT1864 verhindert (Abb.34). Außerdem führt die Behandlung mit Doxorubicin zu einer erhöhten Interaktion von Rac1 mit der Topoisomerase IIα (Abb.34A). Um zu überprüfen ob Hsp90 bei den, durch Rac1 Inhibition vermittelten genoprotektiven Effekten gegenüber Doxorubicin eine Rolle spielt wurde zusätzlich zum Rac1 Inhibitor der Hsp90 Inhibitor Geldanamycin verwendet (Abb.34C). Hier konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des Hsp90 keinen Einfluss auf die Reduktion der Doxorubicin induzierten H2AX Phosphorylierung durch EHT1864 hat.

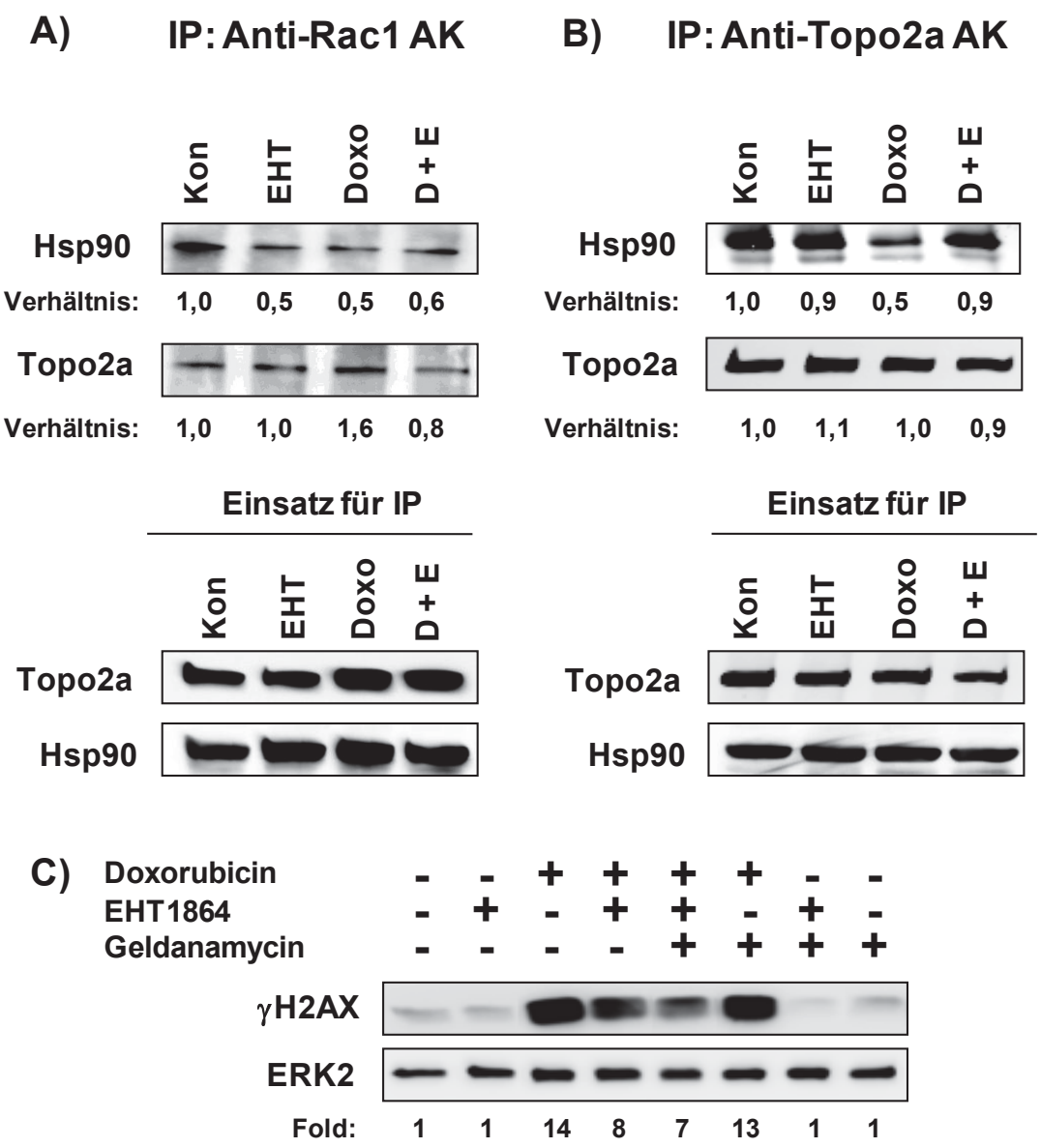


Abb.34: Einfluss der Doxorubicin- und der EHT1864-Behandlung auf die Interaktion von Topoisomerase IIα (Topo2a) mit Rac1, Topo2a mit Hsp90 und Hsp90 mit Rac1. Einfluss des Hsp90 Inhibitors Geldanamycin auf die EHT1864 vermittelten genoprotektiven Effekte gegenüber Doxorubicin. Unbehandelte und mit 10 µM EHT1864 (E) vorbehandelte Zellen wurden für 2 h mit 1 µM Doxorubicin (D) inkubiert. Anschließend wurde mit Rac1 Antikörper und mit Topoisomerase IIα Antikörper immunopräzipitiert (siehe Methodenteil). Das Co-Immunopräzipitat wurde dann auf die Menge an Hsp90 und Topoisomerase IIα mittels Western Blot untersucht (A und B). Zusätzlich wurde ein Teil des Lysats vor der Immunopräzipitation aufgetragen (unterer Teil A und B) um zu zeigen das gleich viel Ausgangssubstrat für die IP eingesetzt worden ist. (C) Hepg2 Zellen wurden mit EHT1864 und Doxorubicin wie in A/B behandelt, wobei zusätzlich ein Teil der Zellen vor der Doxorubicinzugabe mit dem Hsp90 Inhibitor Geldanamycin behandelt wurden. Anschließend wurde die Phosphorylierung des H2AX mittels WB analysiert. Die unbehandelte Kontrolle wurde gleich 1.0 gesetzt.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Hsp90-Topoisomerase IIα Interaktion keine Rolle bei den durch EHt1864 vermittelten protektiven Effekten gegenüber Doxorubicin spielt.

3.2.2 Einfluss von Rac1 auf den Import/Export von Doxorubicin

Da die Hochregulation von Transportmechanismen oft eine Möglichkeit der Resistenzbildung ist, wurde als nächstes der Export und Import von Doxorubicin untersucht. Da Doxorubicin eine Eigenfluoreszenz besitzt lässt sich die Menge des sich in der Zelle befindlichen Doxorubicins leicht mittels Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 35A) oder mittels FACS (Abb. 35B und C) bestimmen.

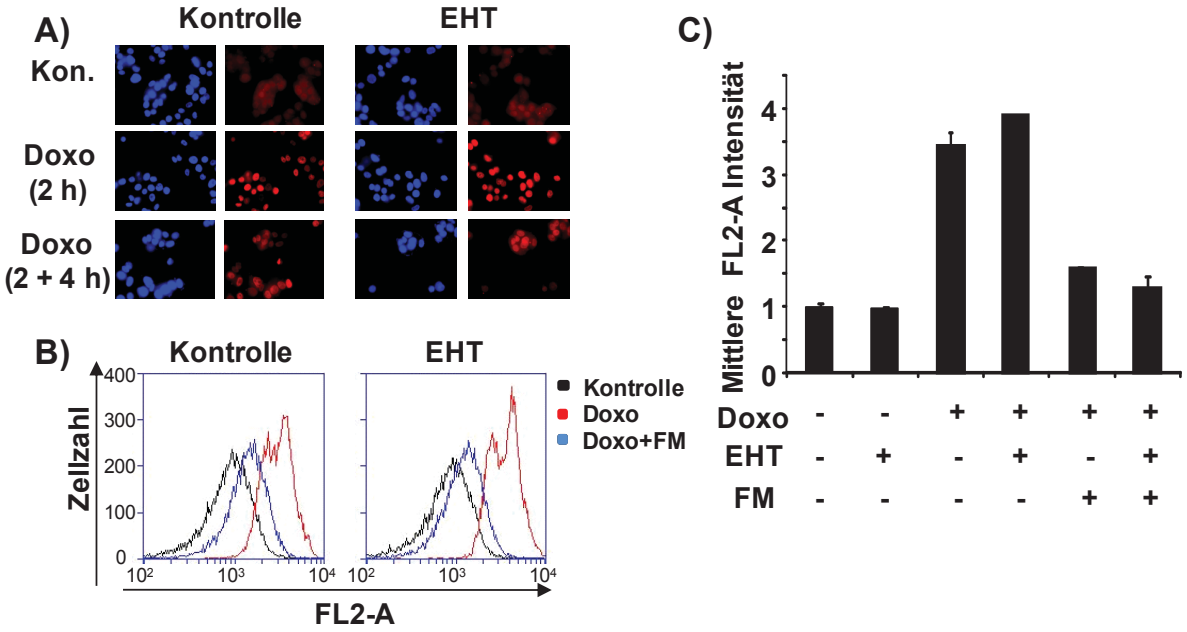


Abb. 35: Der Import und Export von Doxorubicin wird nicht durch EHT1864 beeinflusst. Unbehandelte und mit 10 µM EHT1864 (EHT) für 1 h vorbehandelte HepG2 Zellen wurden für die Analyse verwendet. Zur Messung des Imports und des Exports von Doxorubicin wurden die Zellen dann mit 1 µM Doxorubicin (Doxo) für 2 h und für die Messung des Exports zusätzlich 4 h mit frischem Medium inkubiert. Über die Autofluoreszenz des Doxorubicins wurde dann die in den Zellen enthaltene Menge an Doxorubicin entweder durch Mikroskopie (A) oder FACS-Analyse (B) nachgewiesen. Die gezeigten quantitativen Daten (C) wurden durch drei unabhängige FACS-Analysen, die in Triplikaten durchgeführt wurden, erhalten. Gezeigt ist der Mittelwert±SD. Die Fluoreszenz der unbehandelten Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. (Hintergrundfluoreszenz)

Wie gezeigt werden konnte, hat Rac1 weder einen Einfluss auf den Import noch auf den Export von Doxorubicin.

3.2.3 Inhibitorenstudie zur Untersuchung der molekularen Mechanismen des durch Rac1 Inhibition gegenüber Doxorubicin vermittelten genoprotektiven Effektes.

Um die molekularen Mechanismen der durch Rac1 beeinflussten Doxorubicin-induzierten Schadensantwort zu untersuchen, wurden verschiedene weitere Inhibitoren verwendet. Als Marker für die DNA-Schadensantwort wurden hier die Menge an phosphoryliertem Histon H2AX (S139) und des phosphorylierten Tumorsuppressorproteins p53 (S15) sowie die Erhöhung der p53 Gesamtproteinmenge analysiert. Zusätzlich wurden die Proteinmengen einiger Rac1 regulierter Kinasen (p38, JNK, Akt) sowie deren phosphorylierte (aktive) Formen (pp38, pJNK, pAkt), die Menge an phosphorylierter Topoiomerase IIα (S1106), die Topoisomerase IIa Gesamtmenge, pH3 als Marker für die Anzahl der mitotischen Zellen, die Hitzeschockproteine (Hsp90, Hsp70) und als Ladekontrolle die ERK2 Proteinexpression untersucht (Abb.36). Dabei zeigt sich, dass Inhibitoren, die oberhalb der Rac1 Signalkaskade (Iressa, BcrAbl, SRC, PI3K) wirken ähnliche Effekte in Bezug auf die Phosphorylierung des H2AX (γH2AX) zeigen wie der Rac1 Inhibitor selbst. Die Inhibition verschiedener Kinasen des MAPK Signalweges wie ERK, JNK, PAK führen ebenfalls zu einer verminderten durch Doxorubicin-induzierten γH2AX-Menge. Eine verringerte Schadensantwort kann außerdem durch die Inhibition des Proteasoms (Mg132) oder Kern-Export-Mechanismen (Ratjadone C) erreicht werden. Die Resultate sind zusammengefasst in Tabelle 15 dargestellt.

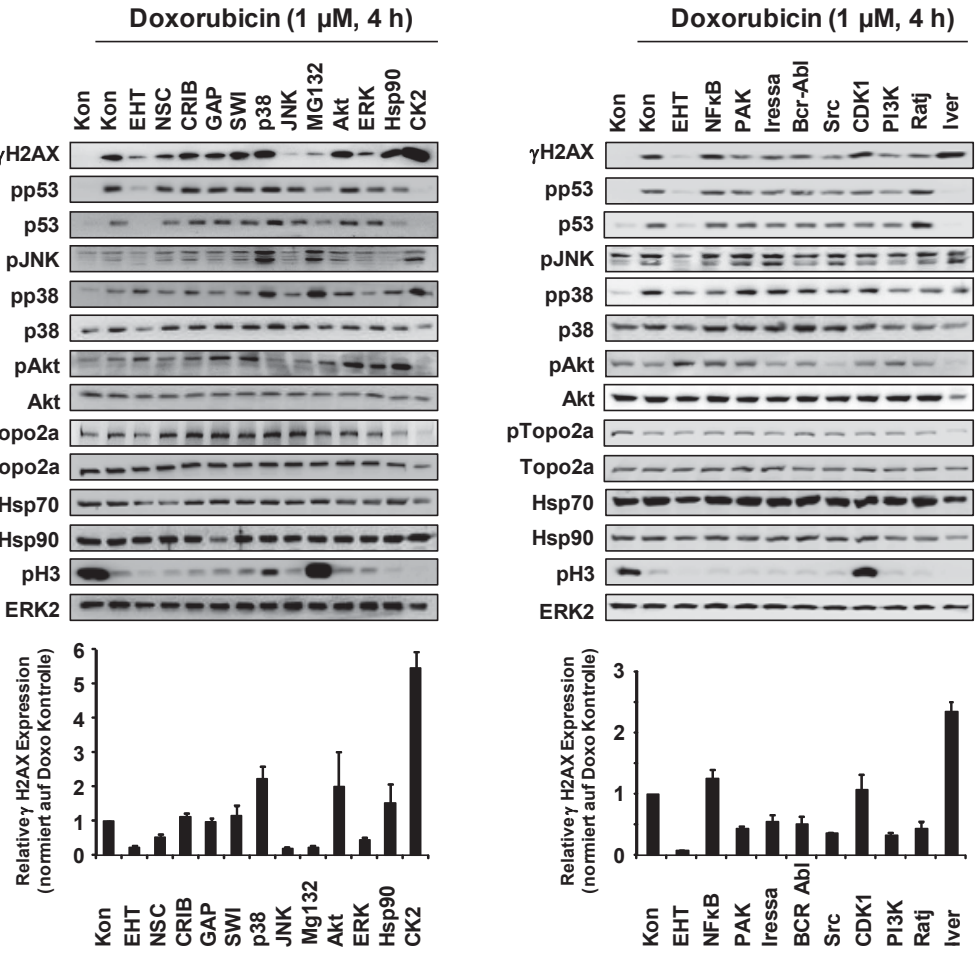


Abb.36: Verschiedene Proteinkinase-Inhibitoren zeigen vergleichbare Effekte wie EHT1864 bezüglich der Hemmung der Doxorubicin induzierten DNA Schadensantwort. Unbehandelte und mit dem jeweiligen Inhibitor (Konzentration siehe Materialteil) vorbehandelte (1 h) HepG2 Zellen wurden für 4 h mit 1 µM Doxorubicin inkubiert. Anschließend wurde die Expression verschiedener Proteine mit den in der Graphik genannten Antikörpern nachgewiesen. Für die densitometrische Auswertung der Menge an phosphoryliertem H2AX wurden die nur mit Doxorubicin behandelte Kontrolle gleich 1.0 gesetzt. Die gezeigten quantitativen Daten wurden aus zwei unabhängigen Experimenten gewonnen. Kon: Kontrolle.

Durch keinen der Inhibitoren kommt es zu einer merklichen Veränderung der Gesamtmenge an Topoisomerase IIα (Abb.36). Die Phophorylierung an S1106 wird dagegen unterschiedlich durch die verschiedenen Inhibitoren beeinflusst. Während sowohl die Behandlung mit EHT1864 als auch die Inhibition der Casein Kinase II oder des Hsp90 zu einer verminderten Phosphorylierung der Topoisomerase IIα (S1106) führt, zeigt von diesen nur die EHT-Behandlung eine Verminderung der DNA Schadensantwort. Umgekehrt führt auch die Behandlung mit dem JNK-Inhibitor zu einer verminderten Schadensantwort aber zu keiner verminderten (S1106) Phosphorylierung der Topoisomerase IIα. Diese Hypophosphorylierung an S1106 kann somit, zumindest nicht alleine, für die reduzierte Suszeptibilität gegenüber Doxorubicin verantwortlich sein.

Tabelle 15: Einfluss der verschiedenen Inhibitoren auf die Doxorubicin induzierte DNA Schadensantwort. Analysiert wurde die Menge an phosphoryliertem H2AX.

Ziel der Inhibition	Inhibitor	Effekt
Rac1	EHT	-
	NSC	-
Rac1 beinflusste Signalwege	PAK	-
	JNK	-
	ERK	-
	P38	+
	NF-κB	0
	Iressa	-
	Bcr-Abl	-
	Src	-
	PI3K	-
	Akt	0
Zellzyklus-abhängige Kinase 1	CDK1	0
Casein kinase 2	Resorufin	+
Hitzeschockprotein 90	Geldanamycin	0
Kern Import	Ivermectin	+
Kern Export	Ratjadone C	-
Proteasom	MG132	-

0: Kein Effekt; -: Reduktion um mehr als 50 %; +: Erhöhung um mindestens das doppelte

Die gezeigten Daten lassen darauf schließen, dass die Rac1 abhängigen Kinasen ERK, JNK, PAK an den durch eine Rac1 Inhibition vermittelten genoprotektiven Effekten gegenüber Doxorubicin beteiligt sind. Um die Beteiligung der Hypophosphorylierung der Topoisomerase IIα an (S1106) nochmals zu überprüfen wurde zusätzlich die für diese Phosphorylierungstelle verantwortliche Kinase (Casein Kinase 1) inhibiert (Abb. 37) (Grozav et al. 2009). Dabei konnte gezeigt werden, dass auch dieser Inhibitor zu einer verminderten DNA-Schadensantwort nach Doxorubicin Behandlung führt. Die Inhibition der Casein Kinase 1 (CK1) führt dabei zu einer verminderten DNA-Schadensantwort (weniger γH2AX und pp53) und wie erwartet auch zu einer verringerten Phosphorylierung der Topoisomerase IIα an der Stelle S1106.

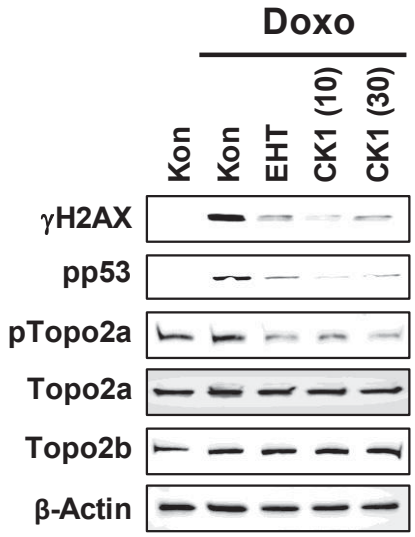


Abb. 37 Inhibition der Casein Kinase 1 (CK1) führt zu einer verminderten DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit Doxorubicin. Für den hier verwendeten CK1 Inhibitor wurden die durch 1 µM Doxorubicin induzierte Phosphorylierung von H2AX (S139), p53 (S15) und Topoisomerase IIα (S1106) analysiert. Dazu wurden logarithmisch wachsende HepG2 Zellen mit 10 oder 30 µM CK1 Inhibitor vorbehandelt und anschließend mit 1 µM Doxorubicin für 4 h inkubiert. Zusätzlich wurden unbehandelte und mit 10 µM EHT1864 (EHT) vorbehandelte Zellen verwendet.

Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass die Behandlung mit dem Rac1-Inhibitor, zu einem veränderten Phosphorylierungsstatus der Topoisomerase IIα führt, welche wiederum die geringere Suszeptibilität gegenüber Topoisomerase II-Giften bedingt.

3.2.4 Einfluss der verschiedenen Inhibitoren auf die Assoziation der Topoisomerasen II mit der DNA

Um die Hypothese zu überprüfen, dass die genprotektiven Effekte durch eine Veränderung der Topoisomerase-II-Aktivität oder der DNA-Bindung hervorgerufen werden, wurde mit einigen der Inhibitoren zusätzlich der „Band Depletion Assay“ durchgeführt (Abb. 38). Hierbei wird durch die Behandlung mit 100 µM Etoposid für eine Stunde die aktive Topoisomerase IIα/β fast vollständig an die DNA gebunden und kann deshalb nicht ins Gel einwandern. Nach Vorbehandlung mit dem Rac1 Inhibitor kann sowohl wieder mehr Topoisomerase IIα wie auch mehr Topoisomerase IIβ im Gel detektiert werden (Abb. 38). Ein ähnlicher Effekt kann durch die Inhibition verschiedener Rac1 abhängigen Kinasen (z.B. JNK, PI3K), nicht aber durch die Inhibition des Proteasoms (MG132) erreicht werden (Abb. 38).

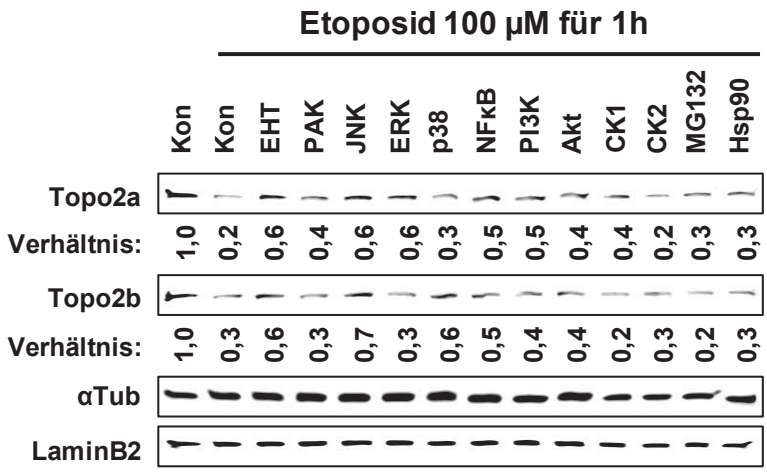


Abb. 38: EHT1864 und verschiedene Protein Kinase Inhibitoren verhindern die durch Etoposid induzierte kovalente Bindung der Topoisomerase II an die DNA. Unbehandelte und mit dem jeweils in der Graphik genannten Inhibitor vorbehandelte Zellen (1 h) wurden für 1 h mit 100 µM Etoposid behandelt. Anschließend wurden Proteinextrakte isoliert und die Menge an Topoisomerase II mittels WB analysiert .Kovalent an die DNA gebundene Proteine wandern dabei nicht ins SDS-Gel ein (siehe Methodenteil). Die unbehandelte Kontrolle wurde gleich 1.0 gesetzt.

Aus der Tatsache, dass beim „Band Depletion Assay“ auch durch Inhibition der Rac1 regulierten Kinasen (JNK, CK1, ERK) die Menge der an die DNA-gebundenen Topoisomerase IIα verringert werden kann, lässt sich vermuten, dass diese Kinasen an der Rac1 abhängigen Regulation der Topoisomerase IIα beteiligt sind.

3.2.5 Rac1 Inhibition führt zu einer geringeren „cleavable complex“ Bildung nach Behandlung mit Doxorubicin

Um zu zeigen dass auch bei klinisch relevanten Konzentrationen von Doxorubicin (Konz. ≤ 1 µM) EHT1864 die Bildung des „cleavable complex“ hemmt, wurde zusätzlich der sogenannte TARDIS-Assay durchgeführt (Abb. 39). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Rac1 die Bildung des „cleavable complex“ hemmt und dass der Proteasom Inhibitor Mg132 in Übereinstimmung mit der Literatur (Mao, Desai et al., 2001) zu einer deutlich erhöhten Anzahl an „cleavable complex“ führt (Abb. 39).

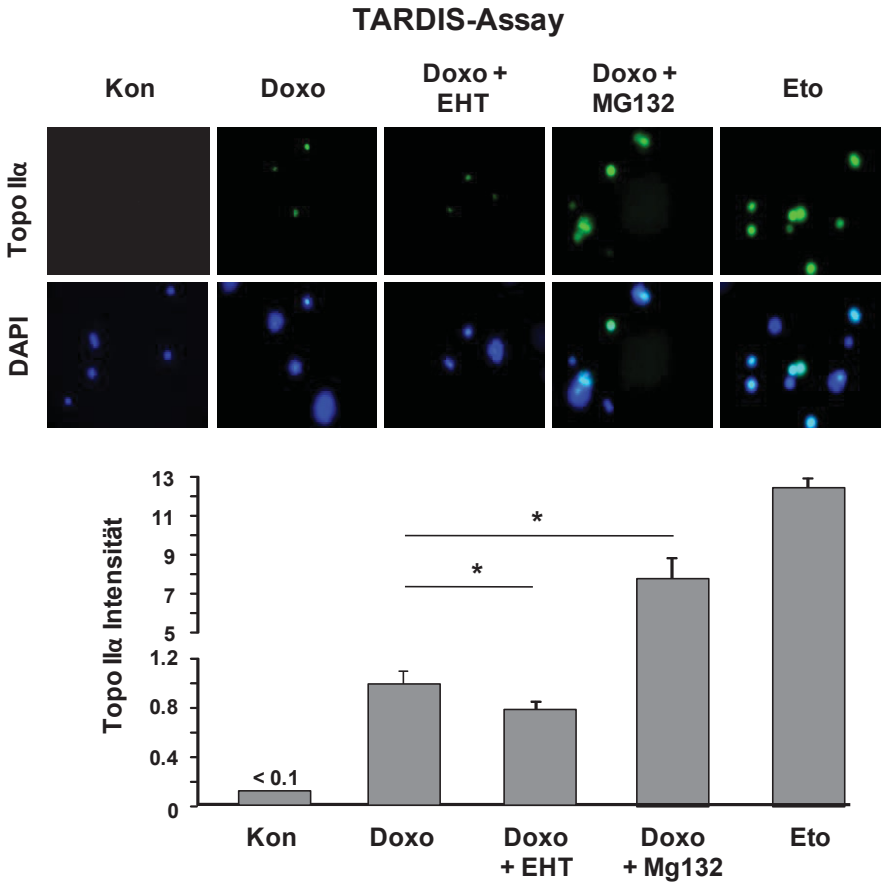


Abb. 39: Einfluss des Rac1 Inhibitors (EHT1864) und des Proteasom Inhibitors (MG132) auf die durch Doxorubicin induzierte kovalente Bindung der Topoisomerase IIα an die DNA. Logarithmisch wachsende HepG2 Zellen wurden entweder nicht behandelt oder mit EHT1864 (EHT) bzw. MG132 vorbehandelt. Nach anschließender Behandlung mit 1 µM für 3 h Doxorubicin (Doxo) wurden die Zellen mittels TARDIS-Assay (trapped in agarose-DNA immunostaining) analysiert. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit 50 µM Etoposid (Eto) behandelt. Gezeigt sind repräsentative Mikroskopaufnahmen (oben) und die aus diesen resultierenden Quantitativen Daten (unten). Die relative Fluoreszenzintensität der nur mit Doxorubicin behandelten Zellen wurde gleich 1,0 gesetzt. Die Fluoreszenzintensität der Kontrolle war kleiner 0,1. Die gewonnen quantitativen Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten wobei >50 Kerne pro Experiment ausgewertet wurden. Dargestellt sind Mittelwert±SD; *p≤0.05.

Eine Rac1 Inhibition führt auch bei klinisch relevanten Konzentrationen von Doxorubicin zu einer Hemmung der „cleavable complex“ Bildung.

3.2.6 Einfluss von Rac1 auf den nukleären Import/Export

Um zu untersuchen ob möglicherweise nukleäre Export- oder Import-Mechanismen einen Einfluss auf die Doxorubicin-vermittelte Schadensantwort haben, wurden zusätzlich Zytosol- und Kernextrakte untersucht (Abb. 40B). Die Zytosol/Kern-Verteilung der beiden Topoisomerasen IIα/β zeigt, dass der in der Literatur (Turner et al., 2004) als mögliche Resistenzbildung beschriebene Export von Topoisomerasen hier keine Rolle spielt. Auch wird weder der Import der JNK, ERK oder der p65

Untereinheit des Transkriptionfaktors NFκB durch die Behandlung merklich beeinflusst. Einen deutlichen Einfluss hat die Behandlung mit EHT1864 allerdings auf die Translokation von Rac1 in den Nukleus. Diese Translokation scheint durch die Doxorubicin Behandlung noch verstärkt zu werden. Außerdem führt die Inhibition von Rac1 zu einer leicht reduzierten nukleären Expression des am Abbau des „cleavable complex“ beteiligten Reparaturproteins BRCA1 (Abb. 40B) (Nakamura et al. 2010). Auch konnte in Kernextrakten gezeigt werden, dass die Vorbehandlung mit EHT1864 auch zu einer Abschwächung der durch Doxorubicin induzierten Phosphorylierung des ATM führt (Abb. 40A). Bei ATM handelt es sich dabei um eine der Kinasen die für die H2AX-Phosphorylierung nach DNA-Schäden verantwortlich ist (Abbildung 14) (Burma et al. 2001). Die Chk2 Phosphorylierung wird zu diesem Zeitpunkt (4 h nach Behandlung) nicht durch Doxorubicin induziert (Abb. 40A). Die Aktivierung der Chk point kinasen sind dabei von besonderer Bedeutung für den DNA-Schaden-induzierten Zellzyklusarrest (Abbildung 14) (Bartek and Lukas 2014).

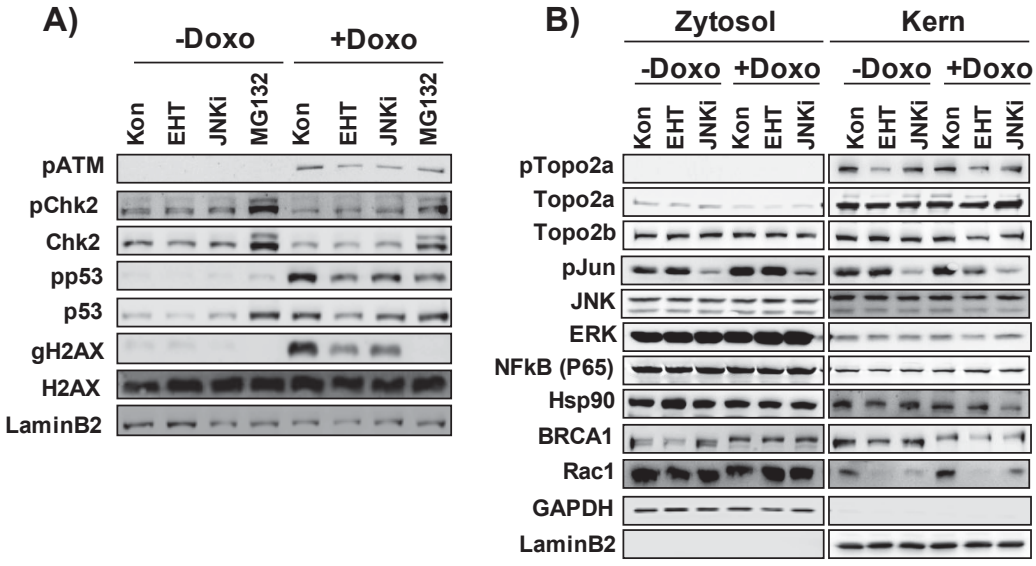


Abb. 40: EHT1864 inhibiert die durch Doxorubicin induzierte Phosphorylierung von ATM und führt zu einer reduzierten S1106 Phosphorylierung der Topoisomerase IIα und zu einem geringeren Kerntransport von Rac1. A) Logarithmisch wachsende HepG2 Zellen wurden für 1 h mit EHT1864 (EHT), JNK Inhibitor (JNKi) oder dem Proteasom Inhibitor (MG132) vorbehandelt. 4 h nach Zugabe von Doxorubicin (1 µM) wurden dann Kernextrakte isoliert und in diesen der Phosphorylations-Status von Schlüsselfaktoren der DNA Schadensantwort (ATM, Chk2, p53 und H2AX) mittels Western Blot untersucht. B) Logarithmisch wachsende Hepg2 Zellen wurden wie in A mit EHT1864, dem JNK Inhibitor SP60025 und Doxorubicin behandelt. Anschließend wurden Proteinextrakte der Zytosolischen und Kernfraktion isoliert und mittels Western Blot analysiert. Die Reinheit der Fraktionen wurde mit den Antikörpern für GAPDH und LaminB2 überprüft.

Ein durch Rac1 Inhibition induzierter Export von Topoisomerasen II kann somit als Mechanismus für die genoprotektiven Eigenschaften ausgeschlossen werden.

3.2.7 Einfluss von Rac1 auf Topoisomerase IIα Phosphorylierung

Die Inhibition von Rac1 führt zu einer verringerten Phosphorylierung der Topoisomerase IIα (S1106). Eine Hypophosphorylierung an dieser Stelle wurde auch schon als Resistenzmechanismus gegenüber Doxorubicin beschrieben (Chikamori et al. 2003). Die Inhibition der Rac1-abhängigen Kinasen ERK und JNK führt auch zu einer verminderten DNA Schadensantwort. Die genannte Phosphorylierungsstelle (S1106) entspricht aber nicht der Konsensussequenz für MAPK und wird unter diesen Bedingungen auch nicht hypophosphoryliert (Abb.36). Die Topoisomerase IIα enthält generell aber Konsensussequenzen für MAPK. Aus diesen Gründen wurde nach weiteren durch Rac1 Inhibition beeinflussten Phosphorylierungsstellen mittels Massenspektrometrie gesucht. Tatsächlich konnten weitere Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, die durch EHT beeinflusst werden. Darunter auch zwei durch MAPK phosphorylierbaren Positionen, nämlich S1213 und S1247 (Abb. 41). Da bei der hier angewandten Methode das zu untersuchende Protein mittels Proteasen in kleinere Stücke geschnitten wird, können leider nicht alle Phosphorylierungsstellen detektiert werden.

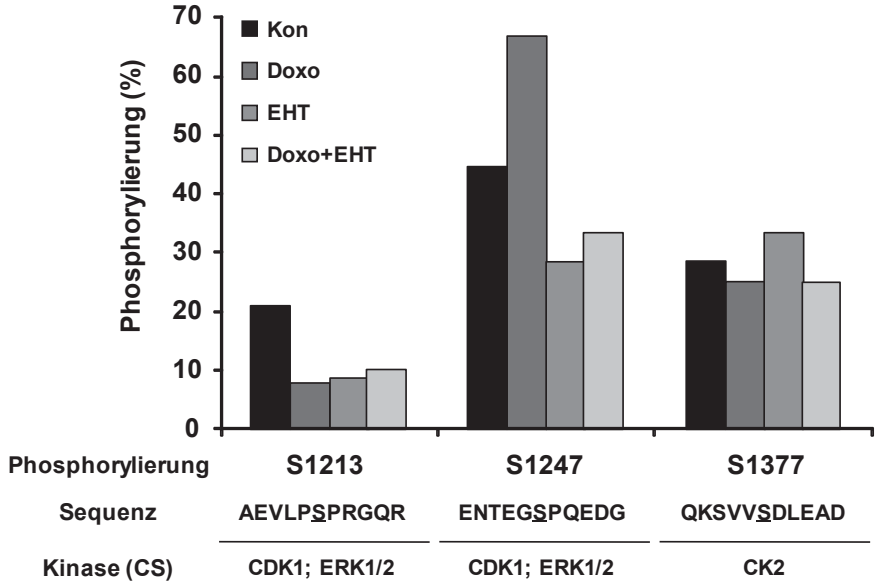


Abb. 41: EHT1864 inhibiert die Phosphorylierung der Topoisomerase IIα an den beiden MAPK Konsensussequenzen S1213 und S1247. Aus unbehandelten und mit EHT1864 (10 µM,1 h) vorbehandelten HepG2 Zellen mit oder ohne zusätzlicher Doxorubicin (Doxo) Behandlung (1 µM für 2 h) wurden nicht denaturierte Proteinextrakte gewonnen und anschließend die Topoisomerase IIα präzipitiert. Mittels Massenspektroskopie wurden dann die Anzahl der phosphorylierten Peptide (S1213, S1247 und S1377) bestimmt. Diese Zahl wurde auf die Anzahl der zugehörigen unphosphorylierten Peptide normalisiert. Die im unteren Abschnitt genannten Kinasen (CDK1, ERK1/2, CK2) sind für die jeweils über den Kinasen stehende Phosphorylierungsstellen schon in der Literatur beschrieben worden (Nousiainen et al. 2006).

Die Inhibition von Rac1 führt zu einer Hypophosphorylierung der Topoisomerase IIα an S1213, S1247 (Abb. 41) und S1106 (Abb. 40B). Die Phosphorylierungsstellen S1213, S1247 entsprechen dabei der Konsensussequenz von MAPK, wohingegen die Phosphorylierung an S1106 durch Casein Kinase 1 vermittelt wird. Sowohl die Inhibition der CK1 als auch die Inhibition der MAPK, ERK oder JNK zeigen ähnliche genoprotektive Effekte gegenüber einer Doxorubicin-Behandlung wie eine Rac1 Inhibition mit EHT1864. Daraus lässt sich schließen, dass diese Rac1 Inhibition zu einer verminderten Aktivität der Kinasen CK1, ERK und JNK führt, woraus eine Hypophosphorylierung der Topoisomerase IIα resultiert, was wiederum eine geringeren Suszeptibilität gegenüber Doxorubicin zur Folge hat.

3.3 Einfluss eines Rac1 Knock-outs auf die Doxo- und IR-vermittelte DNA-Schadensantwort *in vivo*

Um zu zeigen, dass dieser durch Rac1 Inhibition bedingte Schutz gegenüber Doxorubicin auch das Normalgewebe der Leber betrifft, wurde ein MXCre1-basiertes Rac1 KO Mausmodel verwendet. Dabei führt die Expression der Cre-Rekombinase zur Deletion des durch loxP-Sites flankierten Teils des Rac1 Gens (Abb. 42A). Da die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Mx1-Promotors steht findet die Expression nur in Interferon α responsiven Zellen statt. Die Bildung von Interferon a kann dabei durch Poly(I:C) stimuliert werden. Um die Effizienz des KO zu untersuchen, wurde die Menge der durch die Cre Rekombinase veränderte DNA und die daraus resultierende Veränderung der mRNA via PCR bestimmt. Die verbliebene Restexpression des Rac1 Proteins wurde mittels Western Blot analysiert (Abb. 42B). Der auf DNA Ebene gezeigte KO kann auf RNA und auf Proteinebene mit einer deutlichen Reduktion des Rac1 mRNA bzw. Proteingehalts bestätigt werden.

3.3.1 Quantifizierung des Mx1Cre vermittelten Rac1 KO

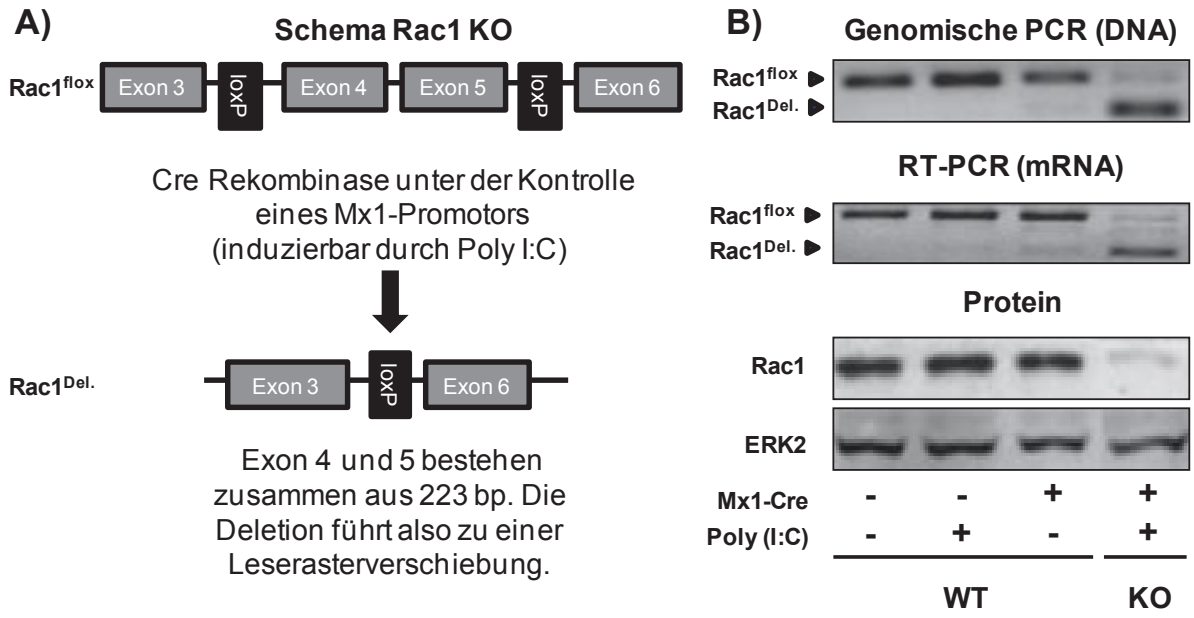


Abb. 42: Poly I:C induzierter Mx1-Cre vermittelter Knock-Out des *rac1* Genes in der Leber. Der KO wurde nach Kreuzung von $Rac1^{flox/flox}$ Tieren mit Mx1-Cre Mäusen durch Induktion der Cre-Rekombinase mit Poly I:C (250 µg; i.p.) erreicht. Die Expression der Cre-Rekombinase führt dazu, dass Exon 4 und 5 des Rac1 Gens ausgeschnitten werden (A). Um die Effizienz des KO zu demonstrieren wurde sowohl auf Ebene der DNA als auch auf Ebene der mRNA (B) eine PCR Analyse durchgeführt. Zusätzlich wurde die verbliebene Rac1 Proteinmenge mittels Western Blot Analyse detektiert (B). Diese Daten wurden in enger Zusammenarbeit mit Frau A. Bopp erhalten.

Das MXCre1-basiertes Rac1 KO Model scheint somit geeignet um den Einfluss von Rac1 auf die Doxorubicin vermittelte Schadensantwort in der Leber (*in vivo*) zu untersuchen.

3.3.2 γH2AX-Foci Bildung nach Doxorubicingabe oder Bestrahlung *in vivo*

Um zu untersuchen ob Rac1 auch *in vivo* einen Einfluss auf die Doxorubicin vermittelte DNA-Schadensantwort hat, wurde in einem Teil der Mäuse mittels Poly(I:C) der Rac1 KO induziert. Eine Woche nach der letzten Poly(I:C) Gabe wurden sowohl Tiere bei denen der KO induziert worden ist ($Rac1^{KO}$) und Tiere bei denen keine Behandlung mit Poly(I:C) stattgefunden hat ($Rac1^{WT}$) mit Doxorubicin behandelt. Als zusätzliche Kontrolle und um eine mögliche Agens-Spezifität der Rac1 vermittelten Effekte nachweisen zu können, wurden $Rac1^{KO}$- und $Rac1^{WT}$-Mäuse mit 6 Gy bestrahlt. Die genetische Deletion von Rac1 führt dabei, wie die Inhibition von Rac1 bei den *in vitro* Versuchen (Abb. 28), nur zu einer hemmende Wirkung auf die Doxorubicin-induzierte nicht aber auf die durch Strahlung induzierte Phosphorylierung des Histons H2AX (Abb. 43).

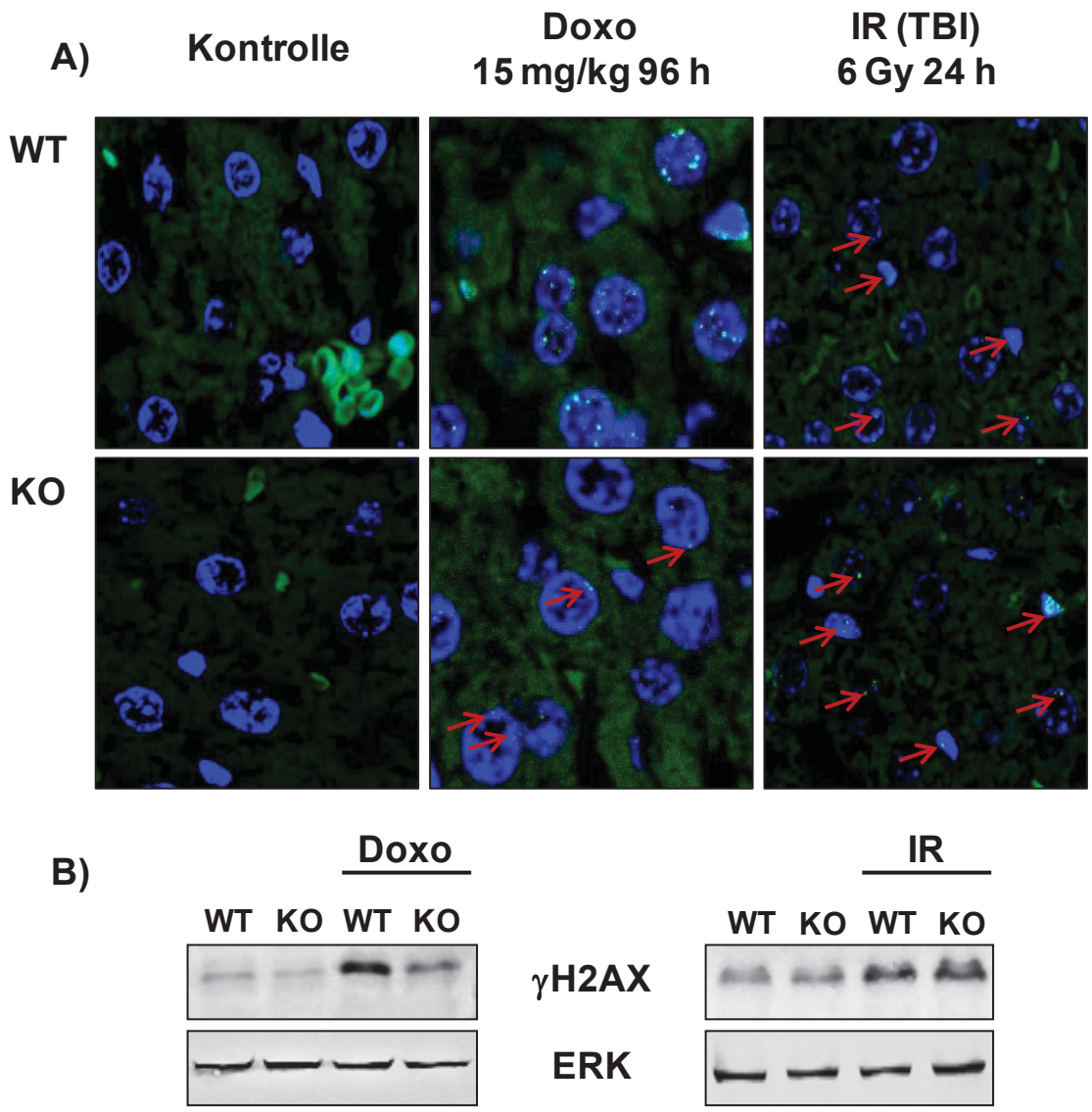


Abb. 43: Eine genetische Deletion von Rac1 verringert die durch Doxorubicin, nicht aber die durch Ionisierende Strahlung (IR) induzierte Phosphorylierung des Histons H2AX in der Leber. Der Rac1 KO wurde in $Rac1^{flox/flox/Mx1\text{-}Cre}$ Tieren (KO) mit Poly(I:C) Gabe induziert (Abb. 42). Als Kontrolle wurden nicht mit Poly I:C induzierte $Rac1^{flox/flox/Mx1\text{-}Cre}$ (WT) verwendet. Anschließend wurde die Tiere entweder mit 15 mg/kg Doxorubicin (i.p.) oder mit 6 Gy Gesamtkörperbestrahlung (TBI) behandelt. Den Tieren wurden 96 h nach Behandlung mit Doxorubicin und 24 h nach Bestrahlung die Leber entnommen. Zur Kontrolle wurden zusätzlich unbehandelte WT und KO Tiere verwendet. In Paraffinschnitte der Leber wurden dann mit Hilfe des entsprechenden Antikörpers die γH2AX Foci (rote Pfeile) detektiert (A). Um die Ergebnisse der Immunhistologischen Untersuchung zu bestätigen wurde in Proteinextrakten der Leber mittels Western Blot die Menge an phosphorylierten H2AX bestimmt (B). Als Ladekontrolle wurde hier die Menge an ERK verwendet. Die roten Pfeile weisen exemplarisch auf γH2AX-Foci hin. Diese Daten wurden in enger Zusammenarbeit mit Frau A. Bopp erhalten.

Daraus lässt sich vermuten, dass eine genetische Deletion von Rac1 normales Lebergewebe vor Doxorubicin vermittelten DNA Schäden schützt.

3.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse (Teil 1)

Die Inhibition von Rac1 *in vitro* bzw. der *Rac1* KO *in vivo* zeigen einen hemmenden Einfluss auf die durch Doxorubicin, nicht aber auf durch Strahlung induzierte DNA Schadensantwort (DDR) (Abb. 28 und Abb. 40A). Diese Hemmung der DDR wird durch die reduzierte Fragmentierung der DNA (Abb. 30) und verminderte „cleavable complex“ Bildung (Abb. 39) bestätigt. Als Ursache für diesen Schutzeffekt können sowohl Export/Import Mechanismen von Doxorubicin (Abb. 35) als auch eine verminderte Expression und ein nuklearer Export von Topoisomerase IIα/β ausgeschlossen werden (Abb. 40B). Auch wenn die Inhibition von Rac1 wieder zu einer erhöhten Interaktion von Topoisomerase IIα mit dem Hitzeschockprotein Hsp90 nach Behandlung mit Doxorubicin führt (Abb.34B), so zeigt eine Co-Behandlung von EHT und Geldanamycin (Hsp90 Inhibitor), dass die durch Rac1-Inhibition-vermittelten Schutzeffekte Hsp90 unabhängig sind (Abb.34C). Die durchgeführte Inhibitor-Studie zeigt, dass die Hemmung von in der Signalkaskade oberhalb von Rac1 stehenden Kinasen (wie z.B. EGFR, PI3K, SCR), aber auch von Rac1 abhängigen Kinasen wie (ERK, JNK, CK1) einen ähnlichen Effekt hervorrufen (Abb.36 und Abb. **37**). Diese Effekte können größtenteils durch eine verminderte Assoziation der Topoisomerase II mit der DNA (Band-Depletion-Assay, Abb. 38) bestätigt werden. Allerdings zeigt eine Inhibition des Proteasoms (MG132) zwar eine reduzierte Schadensantwort (Abb.36), aber keine reduzierte Aktivität der Topoisomerasen II (Band-Depletion-Assay, Abb. 38) und eine erhöhte Anzahl an „cleavable complex“ (TARDIS-Assay, Abb. 39). Eine Proteasom-Inhibition als Folge der EHT Behandlung kann somit bezweifelt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Topoisomerase IIα an mehreren Stellen (S1106, S1213 und S1247) Rac1-abhängig phosphoryliert wird (Abb. 40B und Abb. 41), wobei die für die Resistenz gegenüber Doxorubicin bekannte Phosphorylierungstelle S1106 durch die MAPK (JNK und ERK) nur marginal beeinflusst wird (Abb.36). Darüber hinaus verhindert EHT auch die Kern-Translokation von Rac1, welche durch Doxorubicin allein verstärkt wird (Abb. 41). Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass eine Behandlung mit EHT1864 zu einer verminderten Aktivität der Kinasen CK1, ERK und JNK führt, woraus eine Hypophosphorylierung der Topoisomerase IIα resultiert. Dies hat wiederum eine geringere Anzahl an „cleavable complex“ zur Folge, was zu weniger DNA-Doppelstrangbrüchen und somit zu einer geringeren DNA-Schadensantwort führt.

3.4 Einfluss von Rac1 auf die DEN-induzierte akute Stressantwort

Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Einfluss von Rac1 auf die durch Diethylnitrosamin (DEN) induzierte chemische Leberkanzerogenese untersucht werden. Für die Induktion von Tumoren mit DEN ist eine Behandlung zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Entwicklung der Mäuse (Tag 14) notwendig. Da der MX1Cre-induzierbare KO drei Behandlung mit Poly (I:C) innerhalb einer Woche vorsieht, ist ein KO zu diesem frühen Zeitpunkt nur schwer zu erreichen. Bei den DEN-Versuchen wurde daher das *Rac1*$^{fox/flox/AlbCre}$ KO Tiermodell verwendet. Der Albumin-Promotor wird schon kurz vor der Geburt aktiviert (Weisend et al. 2009). Der *Rac1* KO findet somit zu etwa zum Zeitpunkt der Geburt statt. Um die Wirksamkeit des AlbCre-induzierten *Rac1* KO zu zeigen, wurde die Effizienz des KO auf DNA-, RNA- und Protein-Ebene untersucht (Abb. 44). Um die Selektivität des KO zu demonstrieren, wurden zusätzlich auch Nieren-Proteinextrakte auf die verbliebene Rac1 Menge untersucht (Abb. 44D).

3.4.1 Quantifizierung des AlbCre vermittelten Rac1 KO

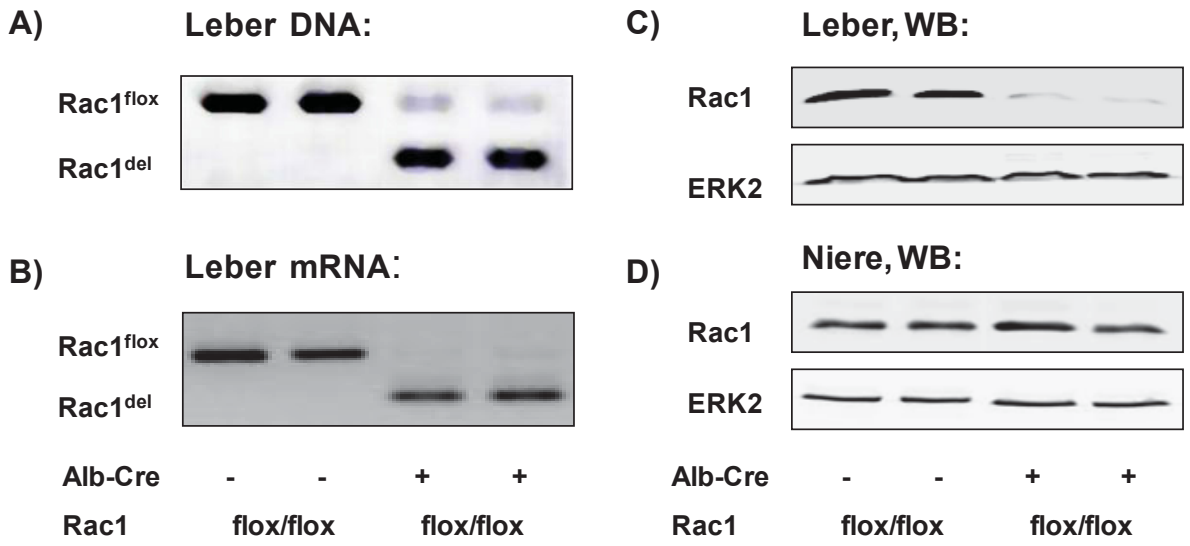


Abb. 44: Alb-Cre vermittelter konstitutiver Leber Knock-Out des *rac1* Genes. Der KO wurde durch die Kreuzung von Rac1$^{flox/flox}$ Tieren mit Alb-Cre Mäusen erreicht. Um die Effizienz des KO zu demonstrieren wurde sowohl auf Ebene der DNA (A) als auch auf Ebene der mRNA (B) eine PCR Analyse durchgeführt. Zusätzlich wurde die verbliebene Rac1 Proteinmenge (C) mittels Western Blot Analyse bestimmt. Um die Leberspezifität des AlbCre induzierten KO zu zeigen wurde die Proteinmenge außerdem in Proteinextrakten der Niere untersucht (D). Diese Daten wurden in enger Zusammenarbeit mit Frau A. Bopp erhalten.

3.4.2 Einfluss von Rac1 auf den Metabolismus

Da DEN zuerst metabolisch aktiviert werden muss bevor es als Kanzerogen wirksam ist, wurde der Einfluss des *Rac1* KO auf die Expression verschiedener Phase I und Phase II Enzyme untersucht. Unter nicht Stressbedingungen zeigen die *Rac1* KO Tiere eine geringere Expression von Cytochrom P450 Enzymen (Cyps), vor allem von Cyp2E1 (Abb. 45A), welches für den Metabolismus von DEN von besonderer Bedeutung ist (Jin Seok Kang et al. 2007). Nach Behandlung mit DEN werden die Cyps Cyp1a1 und 1b1 induziert, wobei diese Induktion (vor allem nach 72 h) im Rac1 KO Modell stärker ausfällt (Abb. 45B). Auffällig ist hier, dass die reduzierte Expression von Cyp2E1 auf mRNA-Ebene in den unbehandelten Tieren sich zwar auf Proteinebene wiederspiegelt (Abb. 45C) die Abnahme der mRNA Expression (Abb. 45B) aber erst nach 72 h auf Proteinebene sichtbar wird und im Falle des Rac1 KO Tiere nach 24 h die Proteinmenge zunimmt (Abb. 45C). Das am Abbau des Häm, welches auch als Koenzym für Cyps eine wichtige Rolle spielt, beteiligte Enzym HMox1wird durch DEN induziert, wobei die Induktion durch ein Fehlen von Rac1 nach 72 h deutlich schwächer ausfällt (Abb. 45B und C).

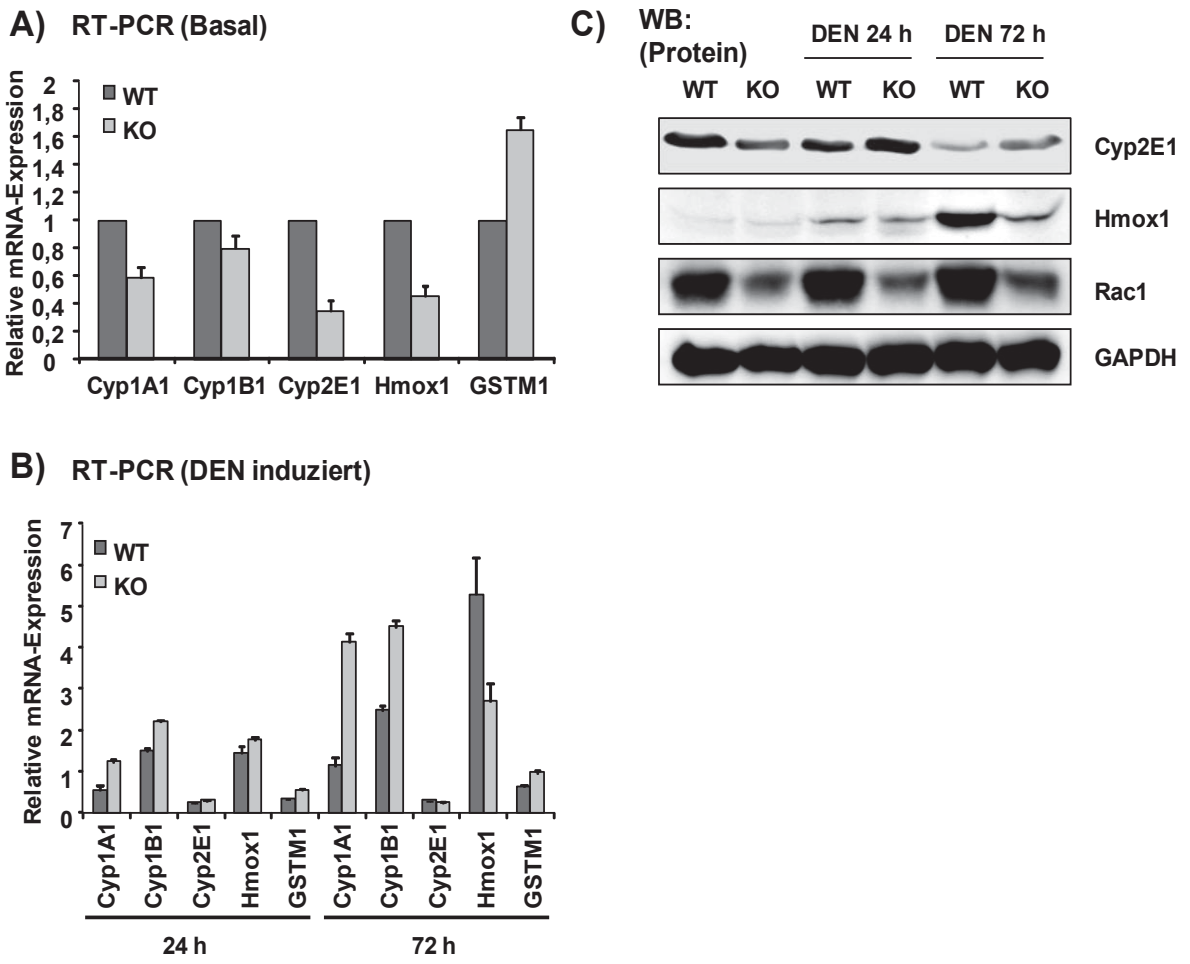


Abb. 45: Effekt des *rac1* Knock-Out auf die basale und die DEN-induzierte Expression von Faktoren des Fremdstoffmetabolismus. Der Einfluss des *rac1* Knock-Outs auf die mRNA Expression ausgewählter Faktoren des Fremdstoffmetabolismus wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht (A,B). Die mRNA Expression wurde in unbehandelten Wildtyp (WT) und Rac1 defizienten Mäusen (KO) (A) sowie in Mäusen, die mit einer einzelnen Dosis DEN (90 mg/kg; i.p.) (B) behandelt wurden, untersucht. Die mRNA Expressionslevel wurden auf GAPDH und β-Actin normalisiert und die unbehandelte Kontrolle gleich 1,0 gesetzt. Die qRT-PCR wurde jeweils dreimal in Triplikaten durchgeführt (siehe Methodenteil). Auf Proteinebene wurden Extrakte der Leber von unbehandelten Wildtyp und *rac*1 Knock-Out Mäusen sowie Tieren die mit DEN (90 mg/kg; i.p.) für 24 h und 72 h behandelt wurden (Injektion i.p.) mit Hilfe der in der Abbildung genannten Antikörper untersucht (C).

Das Fehlen von Rac1 führt zu einer Reduktion der P450 Enzymen (Cyp2E1, Cyp1A1 und Cyp1B1) Expression, dies sollte initial zu einer geringeren Anzahl an aktiven Nitrosamin-Metaboliten führen.

3.4.3 Einfluss von Rac1 auf die DEN-induzierte akute DNA-Schadensantwort

Als Hauptursache der DEN-induzierten Kanzerogenese werden die durch die DEN Metaboliten induzierten DNA-Ethylierungen und die daraus resultierenden DNA Schäden angesehen. Um den Einfluss des Rac1 KO auf die akute DNA Schadensantwort zu untersuchen, wurde die Expression verschiedener

Reparaturgene sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene untersucht. Zusätzlich wurde die Expression des phosphorylierten H2AX (γH2AX), welches ein etablierter Surrogatmarker für DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) ist, in Paraffin-fixierten Leberschnitten analysiert (Abb. 46B). Der Verlust von Rac1 führt zu einer stärkeren Expression der an der durch DEN induzierten und an der DNA Schadensantwort beteiligten Proteine γH2AX und p53 und pp53(S15) (Abb. 46A). Auch die an der Doppelstrangbruchreparatur beteiligten Proteine Brca1 und Rad51 sind sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene in Rac1 KO Tieren basal und nach DEN Induktion höher exprimiert (Abb. 46A und C). Die Immunhisto-Untersuchung zeigt, dass die Expression des DSB-Markers γH2AX nicht gleichmäßig auf alle Zellen verteilt ist sondern sich hauptsächlich in Zellen rund um die Gefäße wiederfindet (Abb. 46B). Interessanterweise ist die basale Expression des an der direkten Reparatur von Alkylierungen beteiligten Enzyms MGMT um fast 50 % reduziert (Abb. 46C).

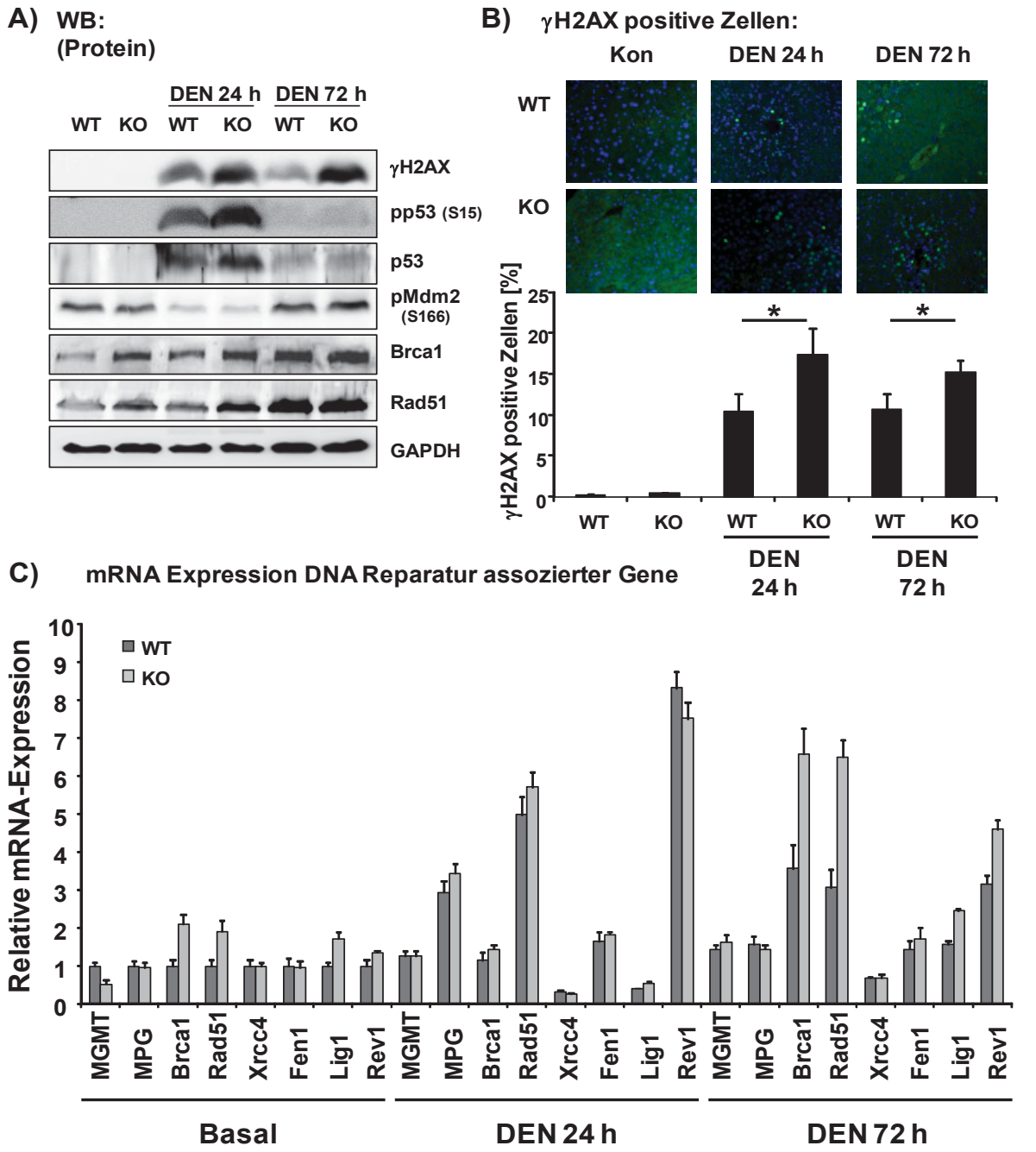


Abb. 46: Der Verlust von Rac1 führt zu einer verstärkten DEN induzierten Schadensantwort und stimuliert die Expression verschiedener DNA Reparatur assoziierter Gene. Die Protein Expression verschiedener, für die DNA Reparatur wichtigen (Brca1, Rad51) und durch DNA Schäden induzierbare Faktoren (γH2AX, p-p53, p21) wurden mittels Western Blot und den entsprechenden Antikörpern untersucht (A). Es wurden Proteinextrakte der Leber von unbehandelten sowie von behandelten (24 und 72 h nach Behandlung mit DEN 90 mg/kg; i.p.) Wildtyp (WT) und Knock-Out (KO) Tieren verwendet. Außerdem wurde die Anzahl γH2AX positiver Kerne (grün) in Leberschnitten von unbehandelten und behandelten (24 und 72 h nach Behandlung mit DEN 90 mg/kg; i.p.) Wildtyp und KO Tieren untersucht. Die Anzahl (grün leuchtender) γH2AX positiver Kerne wurde in Relation zur Gesamtzahl aller (blau leuchtender) Kerne des Ausschnittes gesetzt (B). Die gezeigten quantitativen Daten ergeben sich aus dem Mittelwert von 3-4 Tieren pro Gruppe wobei pro Tier 3 unterschiedliche Schnitte ausgewertet wurden. Gezeigt sind Mittelwert±SD, *p≤0.05%. Zusätzlich wurde die basale und DEN induzierte Veränderung der mRNA Expressionlevel verschiedener mit der DNA Reparatur assoziierter Gene untersucht (C). Die dafür verwendete Leber RNA wurde 24 h und 72 h nach DEN Behandlung isoliert. Die quantitative Analyse der verschiedenen mRNA Level wurde mittels qRT-PCR (in Triplikaten) wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt.

Rac1 ist an der Regulation der Reparaturgene Rad51 und Brca1 beteiligt und verstärkt die durch DEN vermittelten DNA-Schadensantwort. Um zu überprüfen ob die verringerte MGMT Expression ursächlich für die verstärkte DNA-Schadensantwort ist, wurde dessen Enzymaktivität gemessen (Abb. 47A). Zusätzlich wurde die Expression von verschiedenen an der Stressantwort beteiligten Kinasen sowie verschiedenen Zellzyklusmarkern analysiert (Abb. 47B und C). Dabei konnte gezeigt werden, dass die verminderte mRNA-Expression des Reparaturenzyms MGMT (Abb. 46C) nicht zu einer verminderten Enzymaktivität führt (Abb. 47A). Bei der Analyse der verschiedenen Signalkaskaden fällt auf, dass die DEN-Behandlung generell zu einer verstärkten Phosphorylierung (Aktivierung) der an der Signaltransduktion beteiligten Kinasen führt (Abb. 47B). Für Akt und ERK ist diese nach 24 h im Rac1 KO Modell erhöht, wobei die basale Expression von pERK durch ein Fehlen an Rac1 gehemmt wird (Abb. 47B). Die Aktivierung der JNK spiegelt sich dabei auch in der verstärkten Phosphorylierung des am Transkriptionsfaktor AP1 beteiligten Proteins c-Jun (Abb. 47C) wieder. Die Transkriptionsfaktoren Foxo1/3 werden normalerweise durch die Akt-Kinase phosphoryliert (Clavel et al. 2010) (pFoxo1/3) und dadurch inaktiviert. Die DEN-induzierte Aktivierung der Akt-Kinase korreliert in den Rac1 KO Tieren aber nicht mit der Phosphorylierung von Foxo1/3 (Abb. 47B). Diese Transkriptionsfaktoren (Foxo1/3) sind unter anderem an der Expression des Cyp2E1 und des Zellzyklusinhibitors p27 beteiligt (Lees, Childs, and Booth 2008). Für die am Zellzyklusarrest beteiligten Proteine (p16, p21, p27) zeigt p16 keinerlei Veränderung während p21 durch DEN induziert und verstärkt in Rac1 KO Tieren exprimiert wird (Abb. 47C). Für das am G0-Arrest beteiligte Protein p27 zeigt die Behandlung mit DEN eine generelle Reduzierung der Expression, wobei die Rac1 KO Tiere im Vergleich zu den WT Tieren unter allen Bedingungen eine höhere Expression aufweisen (Abb. 47C). Die Expression der für die Mitose typischen phosphorylierten Form des Histons H3 (pH3) wird nach DEN Behandlung verstärkt (Abb. 47C).

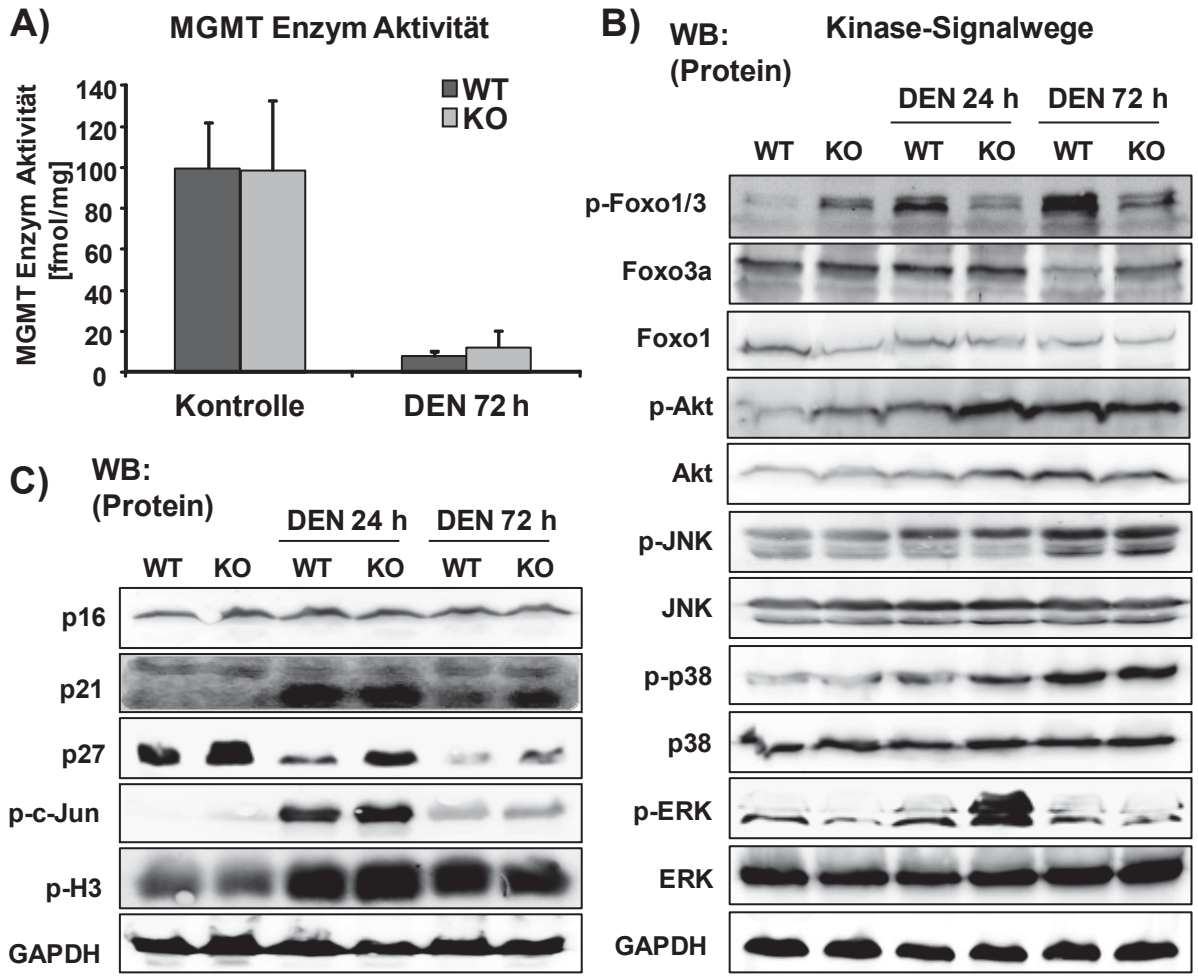


Abb. 47: Kein Unterschied der O6-methylguanin-DNA-methyltransferase (MGMT) Aktivität zwischen WT und *rac1* KO Tieren. Die DEN Behandlung führt zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden. A) Die MGMT Aktivität wurde in Leberextrakten von WT und KO Tieren vom Institut für Toxikologie der Universitätsmedizin Mainz bestimmt. Die gezeigten quantitativen Daten (Mittelwert±SD) wurden jeweils aus Leberextrakten von 6 Tieren, wobei jede Messung in Triplikaten durchgeführt wurde, gewonnen. B/C) Die Expression verschiedener an der Stressantwort beteiligten Kinasen sowie verschiedener Zellzyklusmarker wurde mittels Western Blot analysiert. Hierzu wurden Proteinextrakte der Leber von unbehandelten sowie von behandelten (24 und 72 h nach Behandlung mit DEN 90 mg/kg; i.p.) Wildtyp (WT) und Knock-Out (KO) Tieren verwendet.

Das Fehlen von Rac1 hat keinen Einfluss auf die MGMT-Aktivität. Dies kann somit als Ursache für die in den Rac1 Ko Tieren durch DEN vermittelten verstärkten Schadensantwort ausgeschlossen werden.

3.4.4 Einfluss von Rac1 auf die DEN-vermittelte Apoptose

Schädigungen der DNA können zu Mutationen und/oder dem Tod der Zelle führen. Um zu überprüfen inwieweit der Mangel an Rac1 im DEN-induzierten Zelltod eine Rolle spielt, wurde die Anzahl der TUNEL positiven Zellen und die Expression verschiedener am Zellzyklus und an der Apoptose beteiligter Gene analysiert (Abb. 48A). Dabei können 72 h nach DEN-Behandlung in Rac1 KO Tieren mehr

TUNEL positive Zellen als im WT detektiert werden (Abb. 48A). Der durch DEN verursachte Zelltod spiegelt sich auf mRNA-Ebene durch eine Induktion der Expression von FasR und BAX wieder, wobei keine großen Unterschiede zwischen WT und KO festgestellt werden konnten (Abb. 48B). Auffällig ist hier die Expression des Zellzyklusinhibitors p21 (Cdkn1a), welcher bis zu 700 fach hochreguliert wird und basal schon durch einen Mangel an Rac1 bis zu 10 fach hochreguliert wird (Abb. 48B). Diese Regulation in den unbehandelten Kontrollen spiegelt sich nicht auf Proteinebene wider (siehe Abb. 47A). Einen weiteren Unterschied zwischen WT und KO lässt sich 72 h nach DEN Behandlung in einer erhöhten Expression des Cyclin B (G2/M Phase) im Vergleich zum WT erkennen (Abb. 48B).

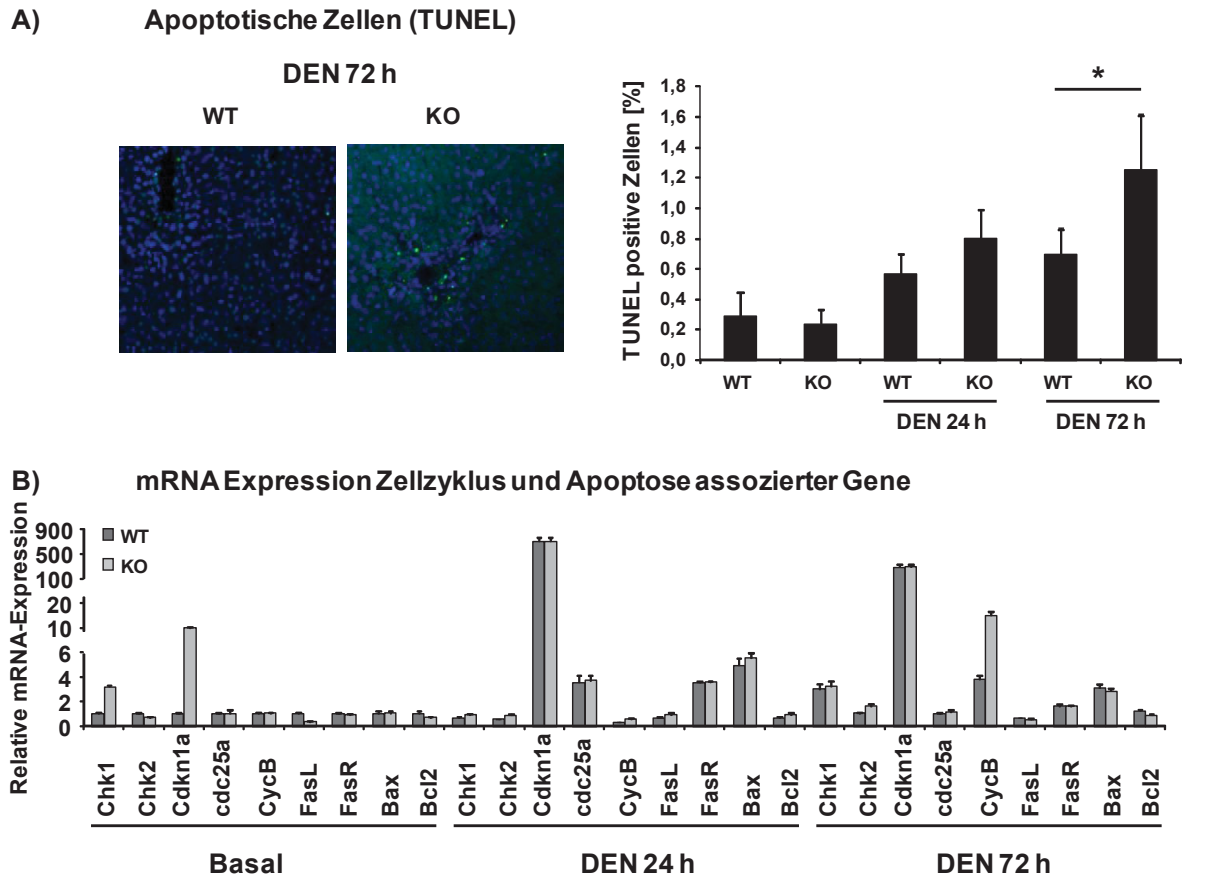


Abb. 48: Der DEN induzierte Zelltod wird durch Fehlen von Rac1 verstärkt. In Leberschnitten von unbehandelten und behandelten (24 und 72 h nach Behandlung mit DEN 90 mg/kg; i.p.) Wildtyp und KO Tieren wurden die apoptotischen Zellen mittels des TUNEL-Assay detektiert (A). Links sind repräsentative Mikroskopaufnahmen und rechts die quantitative Auswertung gezeigt. Hierzu wurden die Anzahl TUNEL-positiver (grün leuchtender) Zellkerne auf die Gesamtzellkernzahl (blau leuchtender) bezogen. Dargestellt sind der Mittelwert±SD von 3-4 Tieren pro Gruppe wobei pro Tier 3 unterschiedliche Schnitte ausgewertet wurden; (*,p≤0.05%). Die basale und DEN induzierte (24 h und 72 h nach DEN Behandlung (90 mg/kg; i.p.)) mRNA Expression verschiedener mit dem Zellzyklus und Zelltod assoziierter Gene wurde mittels qRT-PCR in Lebern von WT und KO Tieren untersucht (B). (Gezeigt sind Mittelwert±SD; n=3)

3.4.5 Einfluss von Rac1 auf die Inflammation

Für die Entstehung von Lebertumoren spielen chronische Inflammation eine wichtige Rolle. So haben Personen die an Hepatitis leiden ein deutlich erhöhtes Risiko an HCC zu erkranken (Hassan et al. 2002). Um zu untersuchen inwieweit sich der Mangel an Rac1 auf die durch DEN verursachte Immunreaktion auswirkt, wurde die Einwanderung von Makrophagen und anderen Zellen der Immunabwehr (Abb. 49A und B) und die Expression verschiedener Interleukine (Abb. 50) als Maß für die Stärke der Immunreaktion untersucht. Schon in der klassischen HE-Färbung der Paraffin-fixierten Leberschnitte lassen sich die eingewanderten Immunzellen als dunkle schwarze Punkte erkennen (die HE-Färbung ist hier als schwarz/weiß Bild gezeigt, da sich die Immunzellen so besser erkennen lassen) (Abb. 49A). Die Ergebnisse der HE-Färbung konnten dann durch eine zusätzlich durchgeführte immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Myeloperoxidase (MPO), welches hauptsächlich in Monozyten und Makrophagen exprimiert wird, bestätigt werden (Abb. 49B/C). Auch mittels WB konnte eine erhöhte Expression von MPO, E-Selektin und sTNFa nach Behandlung mit DEN festgestellt werden (Abb. 49). Erst 72 h nach DEN Behandlung zeigt sich eine Induktion verschiedener Interleukine (Abb. 50). So wird sowohl im WT als auch im KO TNFα, TGFβ und im WT auch das antiinflammatorische Zytokin IL10 und der Fibrosemarker CTGF vermehrt exprimiert (Abb. 50).

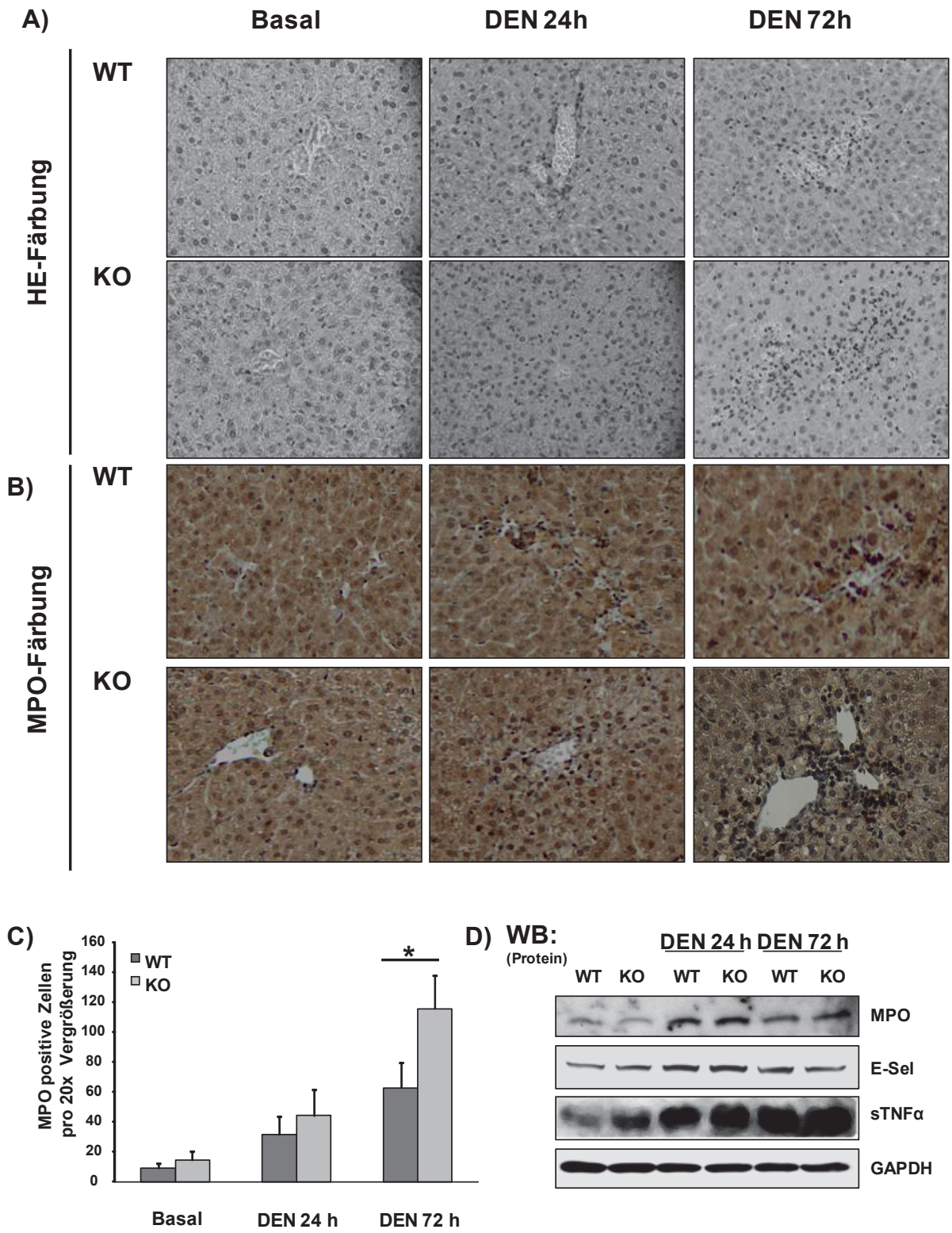


Abbildung 49 Das Fehlen von Rac1 führt in der Leber zu einer verstärkten Infiltration von Immunzellen und einer verstärkten MPO Expression 72 h nach Behandlung mit DEN. Die Infiltration von Immunzellen in das Lebergewebe wurde durch H&E Färbung (kleine schwarze Zellkerne) (A) und, zur Bestätigung, mittels MPO Färbung (B) nachgewiesen. Die gezeigten quantitativen Daten (C) repräsentieren die mittlere Anzahl von MPO positive Zellen die bei einer Vergrößerung von (20x) in Leberschnitten von n=4 Tieren, wobei jeweils 3 Schnitte pro Tier untersucht wurden, detektiert werden konnten. (*, p≤0.05%). Die Protein Expression der in der Abbildung genannten Faktoren (D) wurden aus Proteinextrakten der Leber von unbehandelten (Kontrolle) oder DEN behandelten Wildtyp (WT) und Rac1 defizienten (KO) Mäusen mittels Western Blot nachgewiesen.

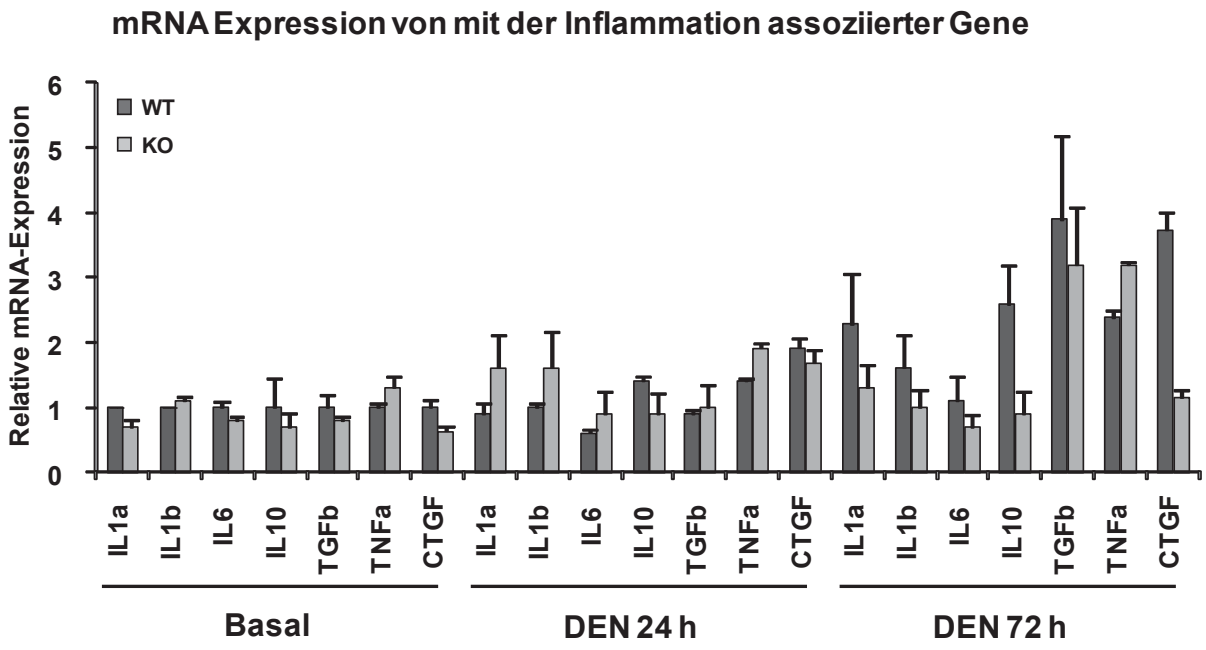


Abb. 50: Mangel an Rac1 beeinflusst die mRNA Expression verschiedener mit Inflammation und Fibrose assoziierter Gene. Die basale und DEN-induzierte Veränderung der mRNA Expression von mit der Inflammation assoziierter Gene wurde in Lebern von unbehandelten (Kontrolle) und 24 h bzw. 72 h nach DEN Behandlung mittels qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwert±SD (n=3).

3.4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der Versuche mit einer Behandlungsdauer mit DEN von 24 und 72 h

Mangel an Rac1 führt basal zu einer verminderten Expression von Cyps (Cyp1a1, Cyp1b1, Cyp2E1) (Abb. 45A). Durch DEN Behandlung wird die Expression von Cyp1a1 und Cyp1b1 erhöht und die von Cyp2E1 reprimiert (Abb. 45B). Die basal verminderte Expression der Cyps in Rac1 KO Mäusen führt aber nicht zu einer geringeren sondern zu einer verstärkten DNA-Schadensantwort (γH2AX, p53, pp53) (Abb. 46A) und parallel zu einer erhöhten Expression der für die DSB-Reparatur wichtigen Enzyme Rad51 und Brca1 (Abb. 46A/C). Die deutlichere Schadensantwort wird durch eine verstärkte DEN-induzierte Stressantwort, Phosphorylierung der verschiedenen MAPK (p38, JNK, ERK) und der Akt Kinase begleitet (Abb. 47B). Einzig ERK zeigt basal eine durch Rac1 Mangel reduzierte Phosphorylierung (Abb. 47B). Im Gegensatz zur Expression des Zellzyklusinhibitors p21, welches durch DEN parallel zur Schadensantwort induziert wird, wird die Expression von p27 durch DEN verringert (Abb. 47C). Auffällig ist hier, dass die Rac1 KO Tiere sowohl basal als auch nach DEN Behandlung im Vergleich zum WT eine erhöhte p27 Expression zeigen (Abb. 47C). Die verstärkte DNA-Schadens- und Stressantwort der Rac1 KO Tiere korreliert auch mit einer erhöhten Apoptoserate (TUNEL) (Abb. 48A)

und einer vermehrten Einwanderung von Immunzellen (Abb. 49). Die Daten lassen darauf schließen, dass durch die verstärkte DNA-Schadensantwort in den Rac1 KO Tieren eine größere Zahl der Zellen in Apoptose gehen, was wiederum in einer verstärkten Einwanderung von Immunzellen resultiert. Insgesamt sollte dies dazu führen, dass in den Rac1 KO Tieren weniger durch DEN initiierte Zellen überleben.

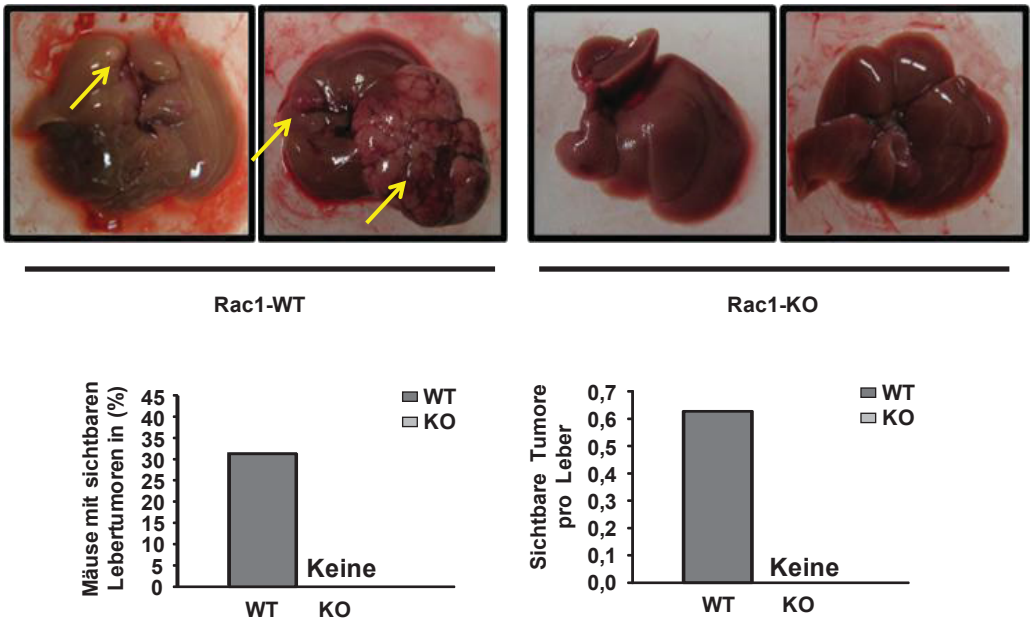
3.5 Einfluss von Rac1 auf die DEN-induzierte Tumorentstehung

Um zu überprüfen welchen Einfluss Rac1 auf die DEN vermittelte Tumorentstehung hat, wurden in Tieren im Alter von 14 Tagen mit einer einzelnen Dosis DEN (10 mg/kg) Tumore induziert. Die Anzahl und Art der Tumore wurde dann 40 Wochen später in den nun folgenden Experimenten untersucht.

3.5.1 Einfluss von Rac1 auf die Anzahl der Tumore

Nach Entnahme der Leber wurde diese makroskopisch per Auge und mikroskopisch in HE-gefärbten Leberschnitten auf Gewebsveränderungen hin untersucht. In den makroskopischen Untersuchungen konnten nur in den WT Tieren nicht jedoch in den Rac1 KO Tieren tumorartige Gewebsveränderungen festgestellt werden (Abb. 51A). Dieser deutliche Unterschied ließ sich anschließend auch auf mikroskopischer Ebene (HE-Färbung) bestätigen, wobei hier einzelne kleine Tumore auch in den KO Tieren gefunden werden konnten (Abb. 51B).

A) Makroskopisch:



n = 18 Mäuse für WT und n = 14 für KO

B) Mikroskopisch (HE Färbung)

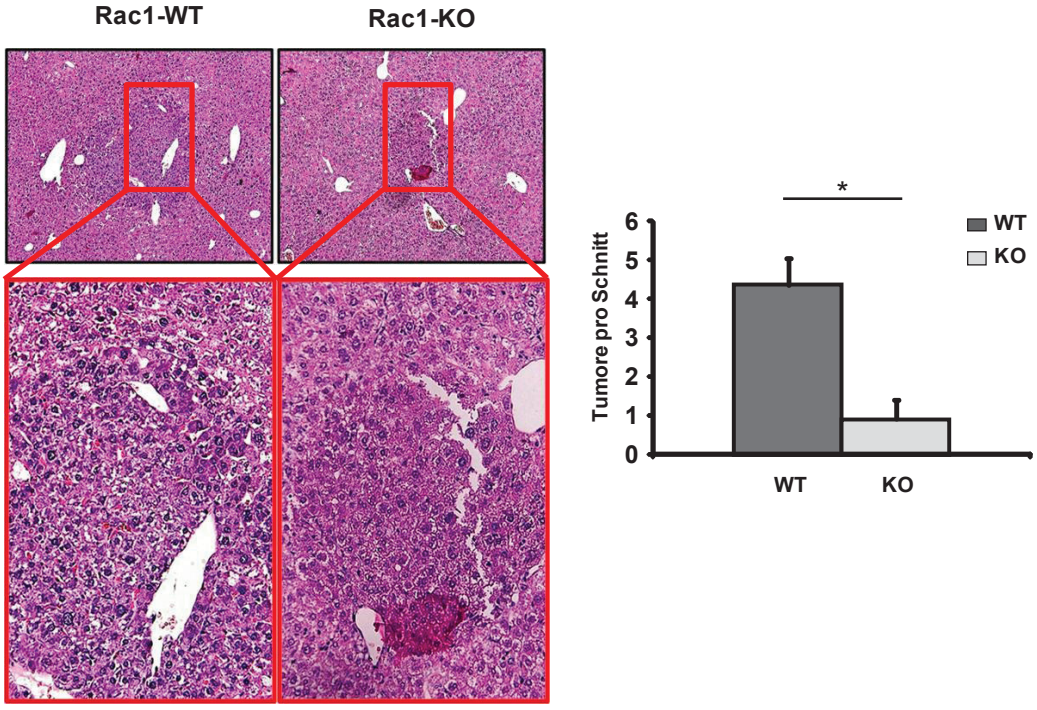


Abb. 51: Die genetische Deletion von Rac1 schützt vor der durch DEN induzierter Bildung von Lebertumoren. Lebern von Wildtyp (Rac1-WT) und *rac1* Knock-Out (Rac1-KO) Mäusen wurden 40 Wochen nach einmaliger Behandlung von 14 Tage alten Mäusen mit DEN (10 mg/kg; i.p.) makroskopisch (A) und mikroskopisch mittels HE-Färbung (B) auf die Bildung von Tumoren untersucht. Die gezeigten quantitativen Daten wurden von n=18 WT und n=14 KO Tieren erhalten. Für die Mikroskopischen Untersuchungen wurden pro Tier (n=18 WT; n=14 KO) jeweils 3 HE gefärbte Leberschnitte untersucht. Gezeigt sind repräsentative Bilder und in den Diagrammen die Mittelwerte±SD; *, p≤0.05%. Diese Daten wurden in enger Zusammenarbeit mit Frau A. Bopp erhalten.

Die Daten lassen darauf schließen, dass Rac1 die DEN induzierte chemische Kanzerogenese fördert.

3.5.2 Einfluss von Rac1 auf die Proliferations- und Apoptoserate der Tumore

Um zu untersuchen ob die in den WT Tieren entstandenen Tumore im Vergleich zu den in den Rac1 KO Tieren entstandenen Tumore eine erhöhte Proliferation oder eine reduzierte Apoptoserate aufweisen, wurden WT und KO Leberschnitte, die Tumore aufwiesen, mit dem für mitotische Zellen spezifischen Marker phospho-Histon H3 (pH3) gefärbt (Abb. 52A) und in einem Folgeschnitt die Anzahl an TUNEL positiven Zellen analysiert (Abb. 52B). Erstaunlicherweise zeigen Tumore der Rac1 KO Tiere eine deutlich erhöhte Anzahl an mitotischen Zellen gegenüber den WT Tieren. Bei der Analyse der TUNEL positiven Zellen pro Tumor lässt sich dagegen kein signifikanter Unterschied feststellen.

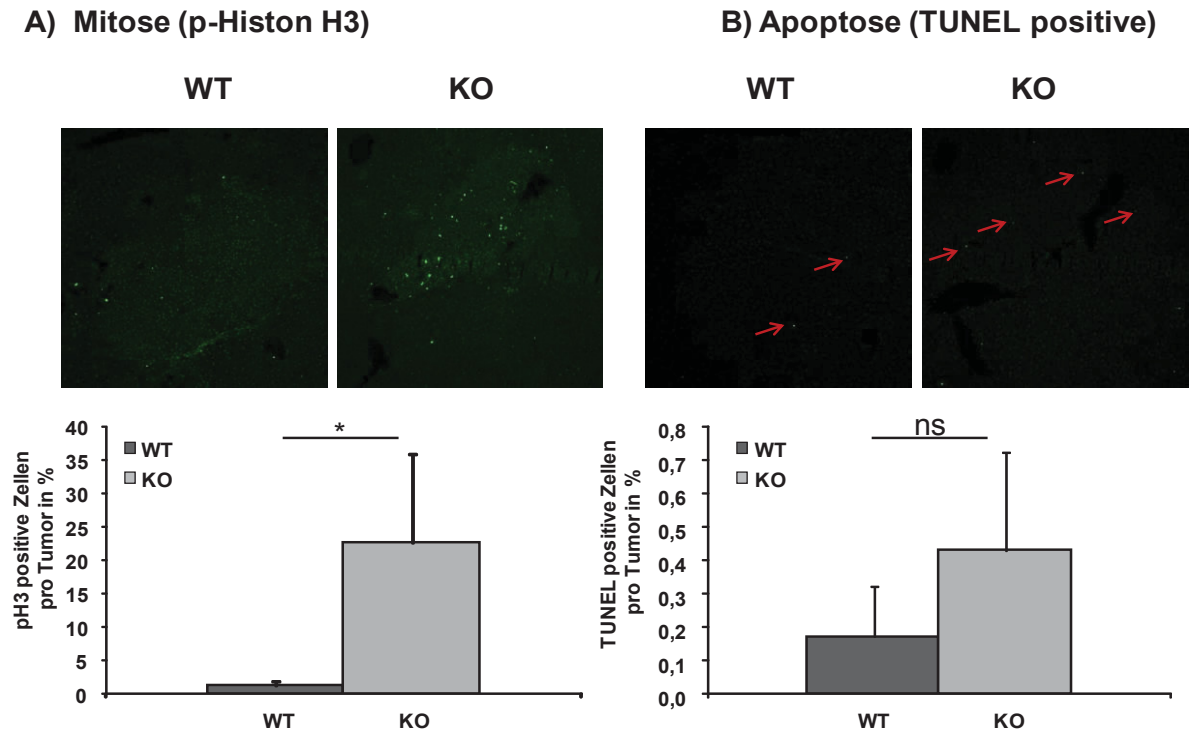


Abb. 52: Die Anzahl an pH3 positiven Zellen ist in Tumoren der *rac1* KO Tiere deutlich erhöht. Der Anteil der apoptotischen Zellen in den Tumorarealen weist dagegen keinen signifikanten Unterschied auf. Leberschnitte von Wildtyp (WT) und Mäusen mit einem leberspezifischen Rac1 KO, die Tumorgewebe enthielten wurden unter Verwendung des für die Mitose spezifischen Antikörpers pH3 gefärbt (A). Zusätzlich wurde die Anzahl an TUNEL positiven Zellen innerhalb des Tumorgewebes analysiert (B). Die gezeigten quantitativen Daten ergeben sich aus dem Verhältnis zwischen positiv gefärbten Tumorzellen zur Gesamtzahl der Tumorzellen. Für die quantitative Analyse wurden Lebern von n=6 Mäusen pro Gruppe mit je 2-10 Tumoren pro Schnitt ausgewertet. Gezeigt sind der Mittelwert±SD*, p≤0.05%, ns: nicht signifikant, Die roten Pfeile weisen auf TUNEL-positive Zellen hin.

Die hohe Anzahl an mitotischen Zellen in den Tumorarealen der Rac1 KO Tiere deutet auf eine verstärkte Proliferation hin, wohingegen die kleinere Größe und die geringere Anzahl an Tumoren auf eine geringere Proliferationsrate hinweist. Fasst man beide Beobachtungen zusammen, lässt dies auf eine verlängerte Mitosephase der Rac1 KO Tumorzellen schließen.

3.5.3 Unterschied in der Aktivierung verschiedener Signalwege

In der Entwicklung von Lebertumoren spielen Mutationen im Ras/Raf Signalweg und β-Catenin Signalweg eine wesentliche Rolle. Um zu überprüfen inwieweit der Rac1 Status in der Ausbildung von Ras/Raf oder β-Catenin-mutierten Tumoren eine Rolle spielt, wurden Leberschnitte mit dem entsprechenden Marker (pERK für Ras/Raf Mutationen und GS für β-Catenin Mutationen) analysiert (Abb. **53**). In Übereinstimmung zur aktuellen Literatur (Loeppen et al., 2002; Aydinlik et al., 2001) wurden in ca. 40 % der WT-Tumore erhöhte pERK Expressionen (Abb. **53**A) und nur in ca. 10 % eine partiell erhöhte GS Expression festgestellt (Abb. **53**B). Interessanterweise führt ein Mangel an Rac1 zu keinerlei Ausbildung weder von pERK noch GS exprimierenden Tumoren (Abb. **53**A und B).

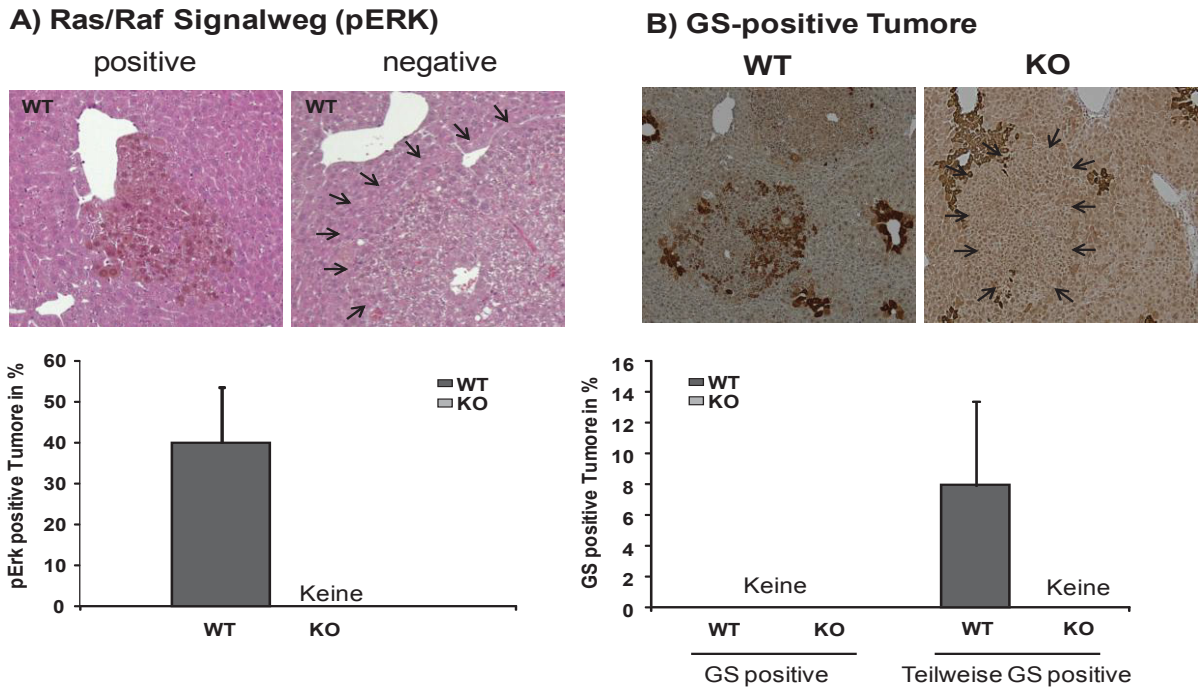


Abb. 53: Die gentische Deletion von Rac1 verhindert sowohl die Bildung von durch DEN induzierten pERK als auch von durch DEN induzierten GS positiven Lebertumoren. DEN induzierte Tumore von Wildtyp (WT) und *rac1* KO Mäusen (KO) wurden auf die Expression von pERK (A) und Gluthaminsynthethase (B) untersucht. Die quantitativen Daten wurden aus Leberschnitten von n=6 Tieren mit je 2-10 Tumoren gewonnen. Dargestellt sind Mittelwerte±SD.

Dies deutet darauf hin, dass Rac1 essentiell sowohl für das Auswachsen von Ras/Raf positiver als auch b-catenin positiver Tumore ist. Als weitere Marker wurden die Expression des Zellzyklusinhibitors und Tumorsupressorproteins p27 (Nickeleit et al. 2007), welches schon basal in den Rac1 KO Tieren erhöht exprimiert wurde (Abb. 47), die Expression von cycB1, welches hauptsächlich in der G2/M Phase von Zellen exprimiert wird, und das für die Zell-Zell-Interaktion und die Unterdrückung von metastatischen Prozessen wichtige Protein E-Cadherin (Jeanes et al., 2008), untersucht (Abb. 54). Ein Großteil der Tumore beider Gruppen zeigt eine normale oder leicht verstärkte nukleäre Expression von p27 (Abb. 54A). Nur vereinzelte WT-Tumore zeigen eine proliferationsfördernde zytosolische Lokalisation des p27 (Abb. 54A). In den KO-Tieren dagegen findet sich keine solche zytosolische Expression (Abb. 54A). Hier scheint tendenziell eine reduzierte Expression in den Tumorarealen aufzutreten (Abb. 54A). Die verstärkte Expression des CycB1 in KO Tumoren (Abb. 54B) passt zu der erhöhten pH3 Expression aus Abb. 52. Bei der E-Cadherin-Färbung fällt auf, dass die meisten WT-Tumore klar abgegrenzte Areale bilden, wohingegen in den KO-Tumoren keine klare Abgrenzung zu erkennen ist (Abb. 54C). Zusätzlich lässt sich eine verstärkte zytosolische Expression von E-Cadherin feststellen (Abb. 54C).

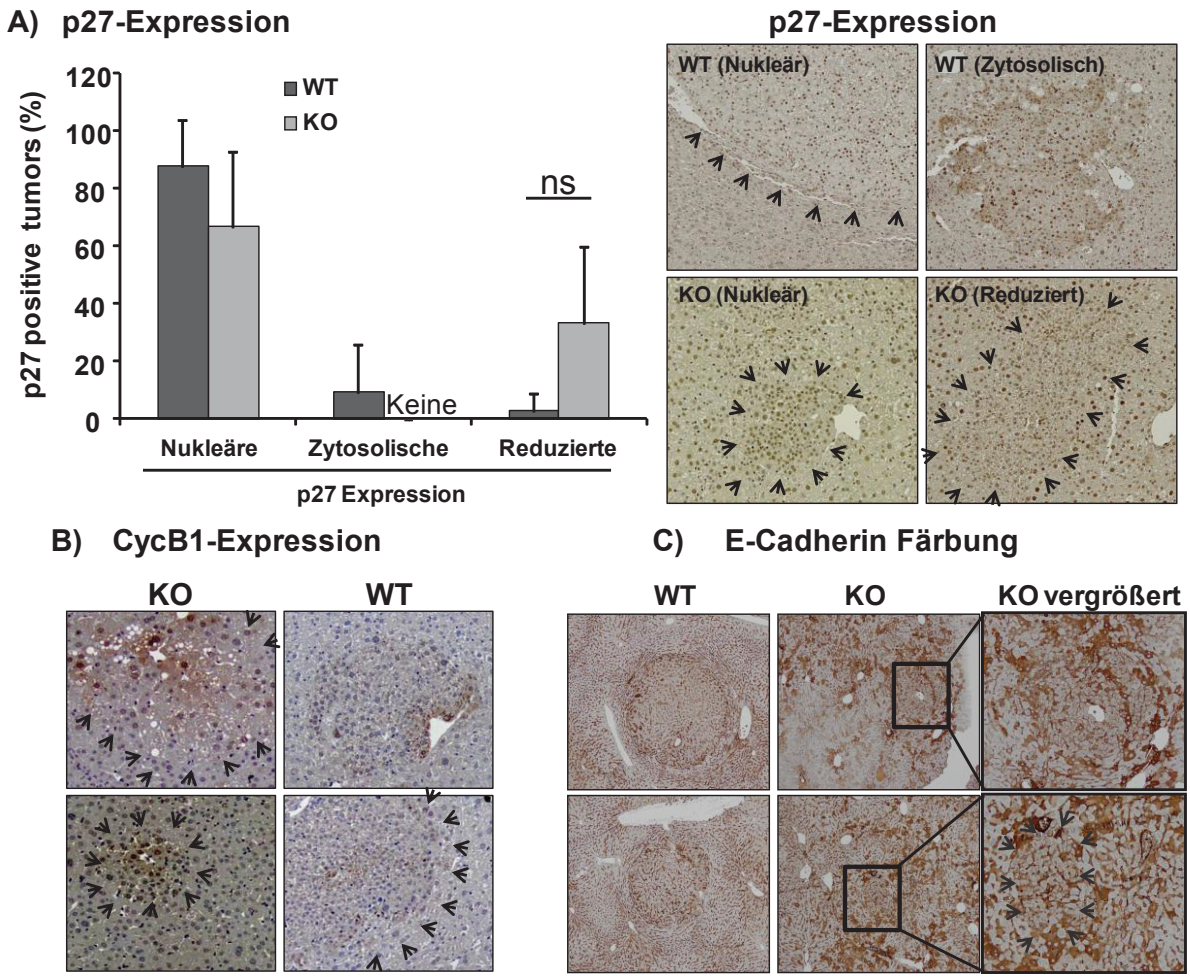


Abb. 54: Die Tumorareale der Rac1 KO Tiere zeigen eine tendenziell verringerte Expression von p27 und einer vermehrte Anzahl an CycB1 positiven Zellen. Die Tumore der KO Tiere zeigen außerdem keine klare Abgrenzung zum Normalgewebe. DEN induzierte Tumore von Wildtyp (WT) und *rac1* KO Mäusen (KO) wurden auf die Expression von p27 (A) CycB1 (B) und E-Cadherin untersucht. Gezeigt sind Repräsentative Mikroskopaufnahmen (A-C). Die (in A) dargestellten quantitativen Daten (Mittelwert±SD) wurden aus Leberschnitten von n=6 Tieren mit je 2-10 Tumoren gewonnen. Die Schwarzen Pfeile sind auf die Grenze der jeweiligen Tumorareale gerichtet.

Die diffuse Abgrenzung der Tumorareale in den Rac1 KO Tieren deutet auf ein höheres metastatisches Potential dieser Tumore hin.

3.5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur DEN induzierten Kanzerogenese

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein Mangel an Rac1 zu einer deutlich reduzierten Anzahl an Tumoren führt (Abb. 51). Als Proliferationsmarker wurde die Phosphorylierung des Histons H3 untersucht. Hier konnte festgestellt werden, dass die Anzahl an pH3 positiven Zellen in den KO Tumoren im Vergleich zum WT deutlich erhöht war (Abb. 52A), wobei gleichzeitig kein signifikanter Unterschied in der Anzahl TUNEL positiven Zellen feststellbar war (Abb. 52B). Parallel dazu zeigten die in KO Tieren gebildeten Tumore eine erhöhte Expression von cycB1 (Abb. 54B),

welches wie auch pH3 hauptsächlich in der G2/M Phase exprimiert wird. Zusammen mit der kleineren Größe und geringeren Anzahl an Tumoren der Rac1 Ko Tiere deutet dies auf verlängerte Mitosephase und somit auf Probleme in der Mitose hin. Die in KO-Tieren gebildeten Tumore zeigten verglichen mit den WT-Tumoren weder eine erhöhte Expression von pERK (Abb. 51A), einem Marker für Ras/Raf mutierte Tumoren, noch eine Expression von GS (Abb. 51B), einem Marker für β-Catenin mutierte Tumore. Darüber hinaus weisen der größte Teil der in den WT-Tieren gebildeten Tumore im Gegensatz zu den KO-Tumoren eine klare Abgrenzung gegenüber dem Normalgewebe und eine klare membranständige Expression des an den Zell-Zellkontakten beteiligten Proteins E-Cadherin auf (Abb. 54C), was auf höheres metastatisches Potential dieser Tumore hindeutet. Insgesamt lässt sich aus den gezeigten Daten schließen, dass Rac1 von essentieller Bedeutung für die Entstehung von Ras/Raf und β-catenin positiver Lebertumore ist.

4 Diskussion

Die kleine Rho (Ras homolog) GTPase Rac1 spielt eine wesentliche Rolle in einer Vielzahl verschiedener Signalwege (MAPK, Wnt, Akt) die mit Tumorprogresion oder Apoptose in Verbindung stehen. Auf Grund ihrer pleiotropen Wirkungsweise sind Rho GTPasen ein interessantes therapeutisches Ziel der Tumortherapie (Katerina et al., 2012). Die Kombination von Rho GTPase Inhibitoren mit klassischen Zytostatika scheint dabei besonders vorteilhaft. So konnte für den kardioprotektiven Effekt, den eine Vorbehandlung von Lovastatin gegenüber Doxorubicin ausübt, die kleine Rho GTPase Rac1 als ursächlich ausgemacht werden (Huelsenbeck et al. 2011). Lovastatin, ein Standardmedikament zur Senkung des Cholesterinspiegels, wirkt dabei über die Inhibition des HMG-CoA Enzyms und inhibiert somit die Synthese von Cholesterin und auch die Synthese der für die Verankerung der kleinen GTPasen wie Rac1 oder Ras wichtigen Vorstufen der Geranyl- und Farnesylreste. So führt eine Behandlung mit Lovastatin auch zur Inhibition der kleinen Rho GTPase Rac1. Viele der durch Lovastatin vermittelten Effekte wie die Inhibition der Proliferation (Crick et al. 1998), Zelltod (Agarwal et al. 2002) und anti-metastatische Wirkung (Nübel et al. 2004) können auf die Inhibition kleiner GTPasen zurückgeführt werden. Im Gegensatz zu seinem Schutz des Normalgewebes führt die Behandlung von Tumorzellen mit Lovastatin sogar zu einer verbesserten Behandlungseffizienz von anti-Krebs-Medikamenten wie Doxorubicin (Huelsenbeck et al. 2011, Feleszko et al. 2000). So wurde in ersten Studien das Doxorubicin-Derivat Epirubicin und Pravastatin zusammen in der transateriellen Chemoembolisation von Lebertumoren erfolgreich verwendet (Graf et al. 2008). Im ersten Teil dieser Arbeit wurde nun die Wirkung von Rac1 auf die Suszeptibilität gegenüber dem Tumortherapeutikum Doxorubicin in verschiedenen Zelllinien und der Mechanismus im Speziellen in Leberkrebszelllinien untersucht.

4.1 Einfluss von Rac1 auf die Doxorubicin-vermittelte Zytotoxizität

4.1.1 Toxizität und Wirkweise der Rac1 Inhibitoren

Um den Einfluss von Rac1 auf die Doxorubicin-induzierten Schadens- und Stressantworten zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit Rac1 pharmakologisch inhibiert. In den Vorversuchen wurde die Toxizität der beiden Inhibitoren NSC23766 (NSC) und EHT1864 (EHT) untersucht (Abb. 24). Eine starke Rac1 Inhibition kann dabei sowohl zu einem G1 oder G2 Arrest im Zellzyklus oder zu Apoptose führen. Der G1-Arrest wird dabei vermutlich über eine verringerte Expression von Cyclin D1 (Yoshida et al. 2010) und die Apoptose über eine Repression von anti-apoptotisch wirkenden Proteinen wie Survivin und XIAP ausgelöst (Yoshida et al. 2010; Hinterleitner et al. 2013). Die Mechanismen die hinter dem durch eine Rac1 Inhibition vermittelten G2 Arrest stehen sind dagegen noch nicht gut untersucht (Moore et al. 1997). Bekannt ist, dass Rac1 während der G2-Phase in den Kern transportiert wird (Michaelson et al. 2008) und dort an der Regulation des Spindelapparats beteiligt sein könnte (Canman et al. 2009). Darüber hinaus wird auch die Rac1 abhängige Kinase PAK für eine normalen Ablauf der Mitose benötigt (Maroto et al. 2008). Die in Abb. 24 gemessene durch eine Rac1 Inhibition bedingte Reduktion der Viabilität könnte damit sowohl auf einen Zellzyklusarrest als auch auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen sein. Die hier verwendeten Inhibitoren NSC23766 (NSC) und EHT1864 (EHT) unterscheiden sich dabei in ihrer Wirkungsweise (Abbildung 55). NSC23766 hemmt spezifisch die Interaktion von Rac1 mit den GEFs (GEF= Guanin nucleotide exchange factor, Rac1 aktivierenden Faktoren) TrioN und Tiam1 nicht aber die Aktivierung durch andere GEFs, wie Vav oder Lbc (Yuan Gao et al. 2004). EHT1864 inhibiert dagegen nicht die Interaktion von Rac1 mit seinen GEFs, sondern die GTP Bindung der kleinen Rho GTPase (Shutes et al. 2007). EHT hemmt somit allgemein die Aktivierung von Rac1 und inhibiert daher z.B. auch konstitutiv aktives Rac1(61L), welches nicht mehr durch GAPs inaktiviert werden kann (Shutes et al. 2007). In den hier untersuchten Zelllinien HepG2 und Hep3B, welche sich in ihrem p53 Status unterscheiden, wurden beide Inhibitoren auf ihre Toxizität hin untersucht. Die Behandlung mit EHT führt dabei in beiden Zelllinien zu einer ähnlichen Toxizität, wohingegen die Behandlung der HepG2-Zellen mit NSC über den gesamten Dosisbereich keinerlei Toxizität aufweist (Abb. 24). Die unterschiedliche Wirksamkeit von NSC in den beiden Zelllinien ist wohl damit zu

erklären, dass eine Aktivierung von Rac1 nach NSC Behandlung noch über andere GEFs möglich ist (Yuan Gao et al. 2004). Die Aktivierung bestimmter GEFs hängt aber im Wesentlichen von der Art und Anzahl der exprimierten Rezeptortyrosinkinasen ab (Schiller 2006). Das Expressionsprofil dieser Kinasen kann dabei von Tumor zu Tumor und somit auch von Krebszelllinie zu Krebszelllinie stark variieren (Müller-tidow et al. 2004).

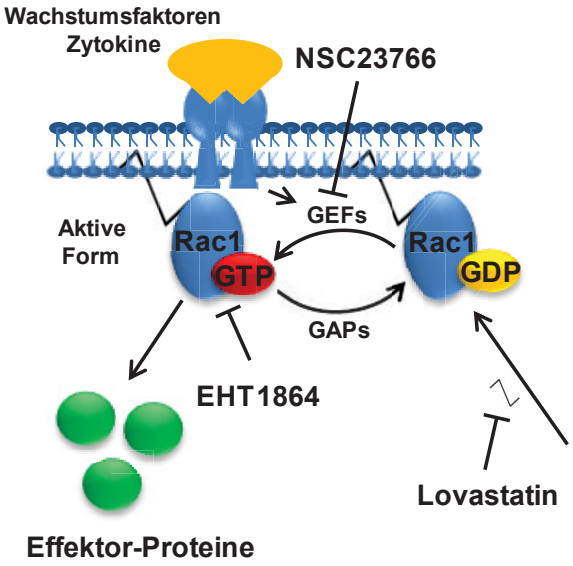


Abbildung 55 Unterschiedliche Angriffspunkte der verschiedenen Inhibitoren. NSC23766 hemmt spezifisch die Rac1 Aktivierung durch die beiden GEFs TrioN und Tiam1. Der Inhibitor EHT1864 bindet an Rac1 und verhindert dadurch die Interaktion von Rac1 mit GTP. Lovastatin hemmt dagegen die Synthese der für die Verankerung vieler Rho GTPasen wichtigen Isoprenvorstufen und somit auch deren Aktivierung.

4.1.2 Einfluss des p53-Status auf die durch Rac1 Inhibition vermittelte geringere Toxizität von Topoisomerase-II-Giften

Inhibition der Topoisomerase II durch anti-Tumormedikamente wie Anthrazykline (z.B. Doxorubicin) oder das Podophyllotoxin Etoposid führen zur Bildung von DNA Doppelstrangbrüchen (DSB), welche eine sehr starke DNA Schadensantwort, gefolgt von Apoptose, verursachen (Tewey et al. 1984). Maus Fibroblasten die kein p53 exprimieren (p53 defizient) scheinen dabei durch Doxorubicin weniger geschädigt zu werden als solche die p53 profizient sind (Dunkern et al. 2003). Auch bei Kardiomyozyten führt eine Inhibition von p53 mit Pifithrin zu einer geringeren Apoptose (Jiahao Liu et al. 2008). Dabei soll die durch Doxorubicin Behandlung aktivierte Kinase ERK2 an der Stabilisierung von p53 beteiligt sein (Jiahao Liu et al. 2008). Diese kann p53 an Threonin 55 phosphorylieren, was zu einer verstärkten DNA-Schadensantwort führen soll (Yeh et al. 2004). Da Rac1 auch an der Aktivierung von ERKs beteiligt ist (Eblen and Slack 2002) und eine Rac1 Inhibition auch die Doxorubicin induzierten Schadensantwort hemmt (Huelsenbeck et al. 2011), stellte sich hier die Frage ob der p53 Status einen Einfluss auf die durch Rac1

Inhibition vermittelte Veränderung der Suszeptibilität gegenüber Topoisomerase-II-Giften hat. Daher wurden in dieser Arbeit die beiden Leberkrebszelllinien HepG2 und Heb3B verwendet. HepG2 und Heb3B Zellen unterscheiden sich dabei in ihrem p53 Status (HepG2, p53 profizient und Hep3B, p53 defizient). Die Inhibition von Rac1 führt aber in beiden Zelllinien zu einer reduzierten DNA Schadensantwort (Abb. 28). Somit scheint diese protektive Wirkung der Rac1 Inhibition p53-unabhängig zu sein. Diese Hypothese wurde zusätzlich dadurch gestützt, dass in den p53 profizienten HepG2 Zellen auch im Falle einer p53 Inhibition durch Pifithrin die Doxorubicin-induzierte Phosphorylierung von H2AX (γH2AX) durch EHT gehemmt wird, die Vorbehandlung mit dem p53 Inhibitor Pifithrin alleine aber zu keiner merklichen Veränderung der durch Doxorubicin induzierten γH2AX-Expression führt (Abb. 29A). Interessanterweise führt eine längere Co-Behandlung von EHT1864 und Pifithrin zu einer erheblichen Toxizität der Tumorzellen (Abb. 29B). Es ist bekannt, dass p53 defiziente Fibroblasten eine verstärkte Rac1 Aktivierung im Vergleich zu p53 profizienten Zellen aufweisen (Guo et al. 2003). Auch kann in p53 defizienten B- und T-Lymphom Zelllinien durch Rac1 Inhibition die Apoptoserate deutlich erhöht werden (Bosco et al. 2010). Der dahinterstehende Mechanismus bleibt aber weiterhin unklar. Da die Behandlung mit Pifithrin zu einer erhöhten Proliferationsrate führt (Vollmar et al. 2002) und Rac1 möglicherweise beim Übergang G2/M benötigt wird (Moore et al. 1997), könnte man hier die Ursache der erhöhten Toxizität vermuten. So führt eine Ko-Behandlung von Pifithrin mit Mitose Hemmstoffen wie Paclitaxel, welches den Abbau der Mikrotubuli hemmt, zu einer verstärkte Apoptose (Zuco and Zunino 2008). Interessanterweise ist auch Rac1 an der Regulation der Mikrotubuli beteiligt (Wittmann et al. 2003). Dies deutet darauf hin, dass eine p53 Inhibition die Sensibilität gegenüber durch Rac1 Inaktivierung vermittelten Problemen während der Mitose erhöht.

4.1.3 Zelltypspezifität der Doxorubicin induzierten Schadensantwort und der durch Rac1 Inhibition vermittelten Effekte

Lovastatin schützt verschiedene Zelllinien (Huvec, H9c2) vor Doxorubicin und wirkt auch *in vivo* kardioprotektiv, verstärkt aber die Doxorubicin-vermittelte Toxizität in humanen Fibrosarkomzellen (HT-1080) (Damrot et al., 2006; Huelsenbeck et al., 2011). Um zu überprüfen inwieweit eine spezifische Rac1 Inhibition Zelltyp-abhängige Unterschiede im Bezug auf die durch Doxorubicin vermittelte

Schadensantwort zeigt wurden verschiedenen Zelllinien analysiert. Besondere Aufmerksamkeit wurde hier auf Leber, Endothel und Colon Zellen gerichtet, da diese *in vivo* der höchsten Dosis sowohl von Lovastatin als auch Doxorubicin ausgesetzt wären. Lovastatin wird oral verabreicht und wird vor allem in Darm und Leber durch Cyp3A4 metabolisiert und aktiviert (Huttunen et al. 2011). Doxorubicin wird per Infusion oder Bolus gegeben (Lipshultz et al. 2012) in der Leber metabolisiert und hauptsächlich biliär ausgeschieden wird (Ballet et al. 1987). Auffällig ist, dass in der Mehrzahl der Zelllinien die Rac1 Inhibition nicht vor Doxorubicin schützt (Abb. 33). Warum nicht alle Zelllienen durch EHT-Behandlung vor der Doxorubicin vermittelten Schadensantwort geschützt werden ist aber weiterhin unklar. Möglicherweise überlagern in diesen Tumorzelllinien, die konstitutive Aktivierung von Signalwegen die durch Rac1 Inhibition vermittelten Effekte. Von besonderer Bedeutung könnte hier der Ras-Status sein. So kommt es durch onkogenes Ras auch Rac1 unabhängig zur Aktivierung der MAPK Signalwege (Karandikar et al. 2000, Molina and Adjei 2006, Byun et al. 2009). Dies könnte dazu führen, dass die durch Rac1 Inhibition vermittelte Inaktivierung der MAPK nicht mehr relevant ist. Einige zeigten Zelllinien bei gleicher Doxorubicin Dosis eine stärkere DNA Schadensantwort (Abb. 33). Vor allem Zellen mit hoher Rac1 Expression und/oder niedriger HSP Expression zeigten tendenziell höhere Mengen an phosphoryliertem Histon H2AX (γH2AX) (Tabelle 14). Bekannt ist, dass in Doxorubicin-resistenten Tumoren erhöhte HSP Proteinmengen festgestellt wurden (Ciocca et al. 2003) und dass die Inhibition von Hsp90 mit Geldanamycin zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Topoisomerase-II-Giften führt (Barker et al. 2006). Eine mögliche Erklärung wäre, dass Hsp90-gebundene Topoisomerase II nicht mehr an die DNA binden kann und somit nicht durch Doxorubicin angegriffen werden kann (Abbildung 56). Inwieweit sich aus dem Rac1- und HSP-Expressionsprofil von Tumoren das Ansprechen auf Doxorubicin prognostizieren lassen kann, könnte ein interessanter Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Eine erhöhte Expression der Topoisomerase IIα wurde dagegen schon als Suszeptibilitätsmarker beschrieben (Durbecq et al. 2004). Hier konnte bei den verschiedenen Zelllinien aber keine Korrelation zwischen der Proteinmenge der Topoisomerasen II und einer verstärkten DNA Schadensantwort festgestellt werden (Abb. 33). Auch die Menge des phosphorylierten Histons H3 (pH3), einem Marker für mitotische Zellen, scheint für die Suszeptibilität gegenüber Doxorubicin keine Rolle zu spielen.

4.1.4 Einfluss der Hsp90-Topoisomerase-II Interaktion auf die Doxorubicin vermittelte Bildung des „cleavable complex“

Da eine vermehrte Protein-Interaktion von Hsp90 und den Topoisomerasen II einen möglichen Resistenzmechanismus gegenüber Doxorubicin darstellt (Barker et al. 2006), wurde der Einfluss von Rac1 auf diese Interaktion untersucht. Tatsächlich präzipitiert Topoisomerase IIα mit Hsp90 und diese Interaktion wird durch Doxorubicin geschwächt. Dieser Effekt kann durch die Inhibition von Rac1 revidiert werden (Abb.34). Weder die Behandlung mit Doxorubicin noch mit EHT1864 (EHT) führt dabei zu einer generellen Veränderung der Hsp90 Proteinmenge (Abb.34). Somit scheinen posttranslationale Mechanismen eine Rolle zu spielen. Die Aufhebung der durch Doxorubicin verminderten Interaktion zwischen Hsp90 und Topo2α durch Rac1 Inhibition könnte eine mögliche Erklärung für die verminderte DNA Schadensantwort nach Co-Behandlung mit EHT sein. Allerdings hat eine Co-Behandlung mit Geldanamycin, einem Hsp90 Inhibitor, keinen Einfluss auf die EHT-vermittelte Doxorubicin-induzierte Verringerung der DNA Schadensantwort (Abb.34C). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die durch EHT wieder erhöhte Interaktion zwischen Hsp90 und der Topoisomerase IIα nicht Ursache sondern Auswirkung der durch EHT verringerten Anzahl an im „cleavable complex“ gefangener Topoisomerase IIα ist (Abb. 39). Da durch eine geringere Zahl an „cleavable complex“ dann wieder mehr freie Topoisomerase IIα als Interaktionspartner für Hsp90 zur Verfügung stehen würde (Abbildung 56). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die Behandlung mit Geldanamycin auch zu einer Inhibition von Rac1 führen kann (Ya-sheng Gao et al. 2007). In Übereinstimmung mit der Literatur konnte eine Interaktion zwischen Hsp90 und Rac1 sowie der Topoisomerase IIα und Rac1 festgestellt werden (Cha et al. 2010; Sandrock et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl für die Behandlung mit Doxo oder EHT als auch für die Co-Behandlung eine verminderte Interaktion zwischen Hsp90 und Rac1 gezeigt werden. Interessanterweise wird die Interaktion zwischen Rac1 und der Topoisomerase IIα durch Doxorubicin noch verstärkt (Abb.34A). Da die Behandlung mit Doxorubicin zu einer erhöhten nukleären Rac1 Menge führt (Abb. 40B), könnte dies die verstärkte Interaktion von Rac1 mit der Topoisomerase IIα erklären. Eine zweite Möglichkeit wie Hsp-Proteine vor einer durch Doxorubicin induzierten Schadensantwort zu schützen könnten wäre

Maskierung des „cleavable complex“ durch Hsp-Proteine (Abbildung 56). Da die Inhibition von Rac1 zu einer geringeren Anzahl an durch Doxorubicin induzierten „cleavable complex“ führt (Abb. 39) wären in diesem Fall die Hsp-vermittelten Effekte nachgeschaltet.

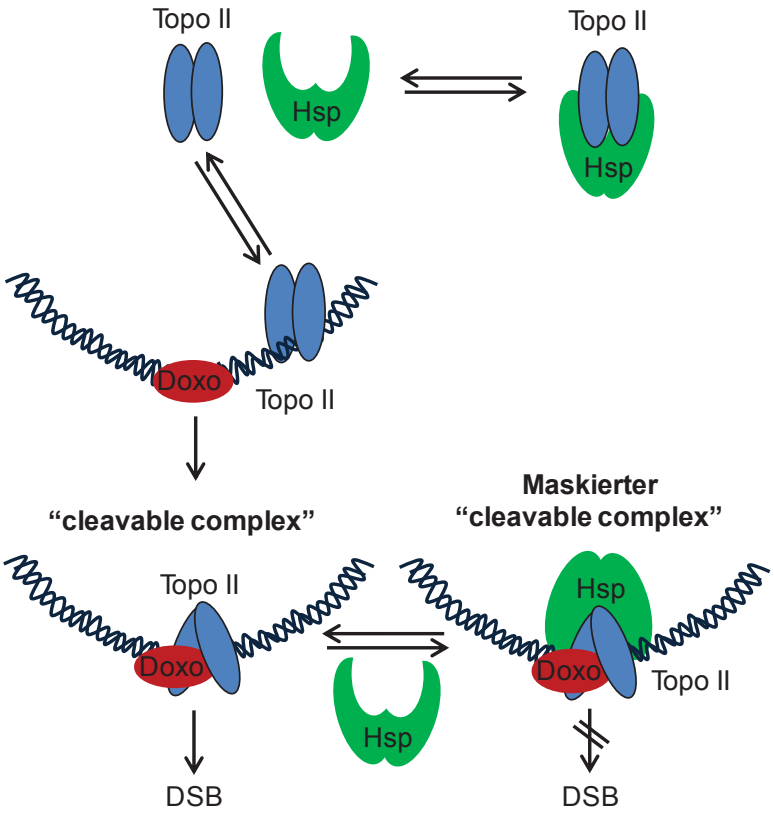


Abbildung 56 Modell einer Schutzwirkung von Hitzeschockproteinen (Hsp) gegenüber Doxorubicin induzierten Doppelstrangbrüchen (DSB). Eine Möglichkeit wie Hsp Proteine DSB verhindern können wäre die Interaktion mit freier Topoisomerase II was einen geringeren Anteil der an die DNA gebundenen Topoisomerase II bewirken und somit nach Doxorubicin Behandlung indirekt zu weniger „cleavable complex“ führen würde. Die zweite Möglichkeit wäre die Interaktion mit im „cleavable complex“ gefangener Topoisomerase II was den Abbau und somit die Freilegung des DSB verhindern würde. Zum Einfluss von Rac1 siehe Abbildung 57.

4.1.5 Einfluss von Rac1 auf den Import/Export von Doxorubicin

Hochregulation verschiedener Exporter (MDR1, MRP1) ist ein weitverbreiteter Resistenzmechanismus gegenüber Tumortherapeutika im Allgemeinen und wurde auch für Doxorubicin schon beschrieben. Dabei scheint Rac1 die MDR1Expression NF-κB vermittelt zu fördern (Kuo et al. 2002). Im Falle von Doxorubicin sind die relevanten Transporter MDR1 (ABCB1), ABCB5 (Frank et al. 2005) und der nicht ABC ähnliche Transporter RalBP1 (Awasthi et al. 2000). Dieser letzte nicht ABC analoge Transporter transportiert Glutathione-gebundenes Doxorubicin aus der Zelle und besitzt gleichzeitig ein Rac1 deaktivierende GAP Funktion (Vatsyayan 2009).

Eine Hochregulation führt dabei zur Resistenz gegenüber Doxorubicin (Vatsyayan 2009, Singhal et al. 2007). Dabei kann die Expression von RalBP1 durch Hitzeschock oder oxidativen Stress induziert werden (Cheng et al. 2001). Wie sich diese Stress-induzierte RalBP1 Expression auf die Aktivität von Rac1 auswirkt bleibt unklar. Ein „Knock down“ von RalBP1 führt allerdings zu einer erhöhten Aktivität von Rac1 (Lim et al. 2010). Die durch Hitzeschock induzierte Expression von RalBp1 könnte eine Erklärung für die geringere Schadensantwort in Zellen mit hoher Hsp-Proteinexpression sein (Tabelle 14), da diese möglicherweise auch eine erhöhte Expression an RalBP1 aufweisen. Importmechanismen von Doxorubicin wurden in der Literatur zwar bereits verschiedene (Okabe et al. 2005) diskutiert, aber generell wird angenommen, dass das sehr lipophile Doxorubicin passiv in die Zelle und den Zellkern diffundiert (Arora et al. 2012). Da Doxorubicin eine Eigenfluoreszenz besitzt, kann es direkt mittels FACS oder unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Ein größerer Einfluss der Rac1 Inhibition durch EHT1864 konnte in dieser Arbeit weder auf den Import noch den Export von Doxorubicin festgestellt werden (Abb. 35).

4.1.6 Einfluss von Rac1 auf den nukleären Import/Export

Rac1 kann Importin-α-vermittelt in den Kern translozieren und dort an Topoisomerasen II binden (Sandrock et al. 2010). Auch die Topoisomerase IIα wird über Importin α in den Kern transportiert (Mirski et al. 2007), kann allerdings auch CRM1-vermittelt wieder aus dem Kern entfernt werden (Turner et al. 2004). Ein veränderter nukleärer Anteil der Topoisomerasen II wäre eine weitere Möglichkeit der Doxorubicinresistenz (Turner et al. 2004). Darüber hinaus deuten neueste Untersuchungen darauf hin, dass Rac1 zu einem veränderten Kernimport und Export nach DNA-Schäden führt (Hinde et al. 2014). Um den Einfluss des Kernimports und –exports auf die Doxorubicin induzierte Schadensantwort zu untersuchen, wurden der Importin α Inhibitor Ivermectin (Wagstaff et al., 2012) und der CRM1 Inhibitor Ratjadone c verwendet (Meissner et al. 2004). Allerdings führt die Behandlung mit Ivermectin zu einer verstärkten Doxorubicin-induzierten H2AX Phosphorylierung während Ratjadone eher zu einer reduzierten Schadensantwort führt (Abb.36). Auch zeigt eine Auftrennung von Proteinextrakten in zytosolische und nukleäre Fraktionen weder für die Topoisomerase IIα noch die Topoisomerase IIβ durch eine der Behandlungen eine veränderte nukleäre Expression (Abb. 40B). Die EHT1864

Behandlung zeigt in Übereinstimmung mit der Literatur eine stark reduzierte nukleäre Rac1 Menge (Sandrock et al. 2010). Interessanterweise führt die Behandlung mit Doxorubicin zu einer erhöhten Menge an nukleärem Rac1 (Abb. 40B). Dies könnte darauf hindeuten, dass die, durch Doxorubicin induzierte, verstärkte Interaktion von Rac1 mit der Topoisomerase IIα (Abb.34) durch eine vermehrte Kern-Translokalisation von Rac1 verursacht wird. Insgesamt lässt sich daraus schließen, dass die Inhibition von Rac1 keinen Einfluss auf den Kernimport oder -export der Topoisomerasen II hat. Inwieweit die Kerntranslokalisation von Rac1 in der Doxorubicin-vermittelten Schadensantwort eine Rolle spielt, bleibt aber weiterhin offen.

4.1.7 Einfluss von Rac1 auf die proteasomale Degradation des „cleavable complex“

Der Einfluss von Lovastatin auf das Proteasom wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Rao et al., 1999; Wójcik et al., 2000; Murray et al. 2002). So wird vermutet, dass die Lovastatin-vermittelte Inhibition des Proteasoms für die erhöhte Expression von Zellzyklusinhibitoren verantwortlich ist (Rao et al. 1999, Efuet and Keyomarsi 2006). Andererseits konnte an isolierten proteasomalen 20S Untereinheiten und in Oesteoplasten eine durch Lovastatin induzierte proteasomale Aktivität gemessen werden (S. S. Murray et al. 2002). Auch scheint die Konformation (geöffnete oder geschlossene Ringform) des Lovastatins eine Rolle zu spielen (Rao et al., 1999). Auch für Doxorubicin wird eine stimulierende Wirkung auf die proteasomale Aktivität beschrieben (Jinbao Liu et al. 2008). Außerdem nimmt man an, dass bei der Reparatur des „cleavable complex“ die an die DNA gebundene Topoisomerase II proteasomal abgebaut wird (Mao et al. 2001). In Übereinstimmung hiermit führt die Behandlung mit Mg132 zwar zu einer verringerten Doxorubicin-induzierten DNA Schadensantwort, aber gleichzeitig zu einer erhöhten Anzahl an „cleavable complex“, da diese nicht mehr abgebaut werden. In diesem Zusammenhang könnte auch dem Reparaturgen Brca1 eine besondere Rolle zufallen, da es laut Literatur für die Ubiquitinierung der Topoisomerase IIα (als Substratmarkierung für den proteasomalen Abbau) verantwortlich ist und zudem eine wichtige Rolle in der DSB-Reparatur einnimmt (Lou et al., 2005; Shinagawa et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Rac1 Inhibition nur eine minimale Reduktion der Brca1 Expression zur Folge hat (Abb. 40B) und nicht nur zu einer Reduzierung

der Topoisomerase II-DNA Assoziation führt (Abb. 38) sondern auch zu weniger an im „cleavable complex“ gefangener Topoisomerase IIα (Abb. 39). Allerdings fällt auf, dass die Effekte auf Ebene der Topoisomerase IIα DNA-Assoziation (Band depletion assay) und der reduzierten Schadensantwort (γH2AX WB) durch EHT1864 stärker ausfallen als die mittels TARDIS-Assay bestimmte Reduzierung des „cleavable complex“. Kleinere Effekte von EHT auf die am „cleavable complex“ abbauenden Enzyme wie Brca1 könnten hierfür verantwortlich sein (Zhou et al. 2013). Interessant in diesem Zusammenhang ist auch, dass Doxorubicin gerade bei Mammakarzinomen eingesetzt wird, wo Brca1 Mutationen häufig vorkommen. So ist die Sensitivität von Brca1 defizienten Zellen gegenüber Topoiomerase-II-Giften erhöht (Treszezamsky et al. 2007).

4.1.8 Abhängigkeit der Doxorubicin induzierten Schadensantwort von den Zellzyklusphasen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Rac1 Inhibition vor allem in Zellen der S- und G2-Phase zu einer reduzierten (durch Doxorubicin induzierten) Schadensantwort führt. Diese in Übereinstimmung mit der Literatur vermutete Zellzyklusabhängigkeit der Doxorubicin-vermittelten Schädigung von Zellen (vor allem Zellen der S- und G2/M- Phase) (Cells 1996) konnte mit einem FACS-basierten Assay bestätigt werden. Der Grund für diese Effekte könntet die zellzyklusabhängige Expression und Aktivierung der Topoisomerase IIα (vor allem in der S- und G2/M-Phase) zu sein (Isaacs et al. 1998). Neueste Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass Rac1 zellzyklusabhängig (hauptsächlich in G2) in den Kern transportiert wird und dort auch an Topoisomerase II sowohl an die alpha als auch an die beta Isoform bindet (Sandrock et al., 2010; Michaelson et al., 2008). Welche Rolle nukleäres Rac1 in dieser Zellzyklusphase spielt, bleibt allerdings weiterhin unklar. Eine mögliche Funktion wäre hier die Beteiligung am G2/M Übergang durch eine Modifikation der Topoisomeraseaktivität oder –spezifität oder die Regulation des Spindelapparats (Wittmann et al. 2003). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass ein Mangel an Rac1 zu einem G2 Arrest führen kann (Moore et al. 1997).

4.1.9 Einfluss verschiedene Rac1-regulierte Signalwege auf die Suszeptibilität gegenüber Doxorubicin

Rac1 beeinflusst viele verschiedene Signalwege. Um herauszufinden inwieweit diese in den EHT1864-vermittelten Schutzeffekt involviert sind, wurden verschiedene Kinasen pharmakologisch inhibiert. So zeigten die Inhibitoren der Stress-aktivierbaren Proteinkinase c-Jun-N-terminal Kinase, der extrazellulär regulierten Kinase ERK, der p21 assozierten Kinase PAK, der Phosphoionositid-3-Kinase, der EGF Rezeptor Kinase, c-Abl und c-Src ähnliche Effekte wie der Rac1 Inhibitor EHT1864 und NSC23766 (Abb.36). Vor allem die Inhibition der ERK scheint hier von besonderer Relevanz zu sein, da bekannt ist, dass die extrazellulär regulierte Kinase (ERK) die Topoisomerase IIα aktivieren kann und somit die Doxorubicinresistenz von Brustkrebszellen beeinflusst (Shapiro et al., 1999; Wells & Hickson, 1995; Smith et al., 2006). Nicht in allen Fällen ist die Abschwächung der Doxorubicin-induzierten Phosphorylierung von H2AX begleitet von einer Reduktion der pp53 Proteinmenge. So führt die Inhibition der JNK, CK2, CDK1, Hsp90 und Ivermectin zu einer unterschiedlichen Induktion von γH2AX und pp53 (Abb.36). Da das Tumorsupressorprotein p53 einer steten posttranskriptionellen Kontrolle durch Phosphorylierung, Acetelierung, Ubiquitinierung und Abbau unterworfen ist, muss die Ursache dieser unterschiedlichen Regulation von γH2AX und pp53 der genannten Inhibitoren wohl hier gesucht werden (Oren 1999, Brooks & Gu 2003). Für die Proteinkinase CK2 ist bekannt, dass sie die Topoisomerase IIα an mehreren Stellen phosphoryliert und diese Phosphorylierungsstellen die Doxorubicinresistenz beeinflussen (Chikamori et al. 2003). Deshalb wurde zusätzlich auch der CK2 Inhibitor Resorufin verwendet (Sandholt et al., 2009). Jedoch zeigt dieser keine inhibitorischen Effekte wie die EHT Behandlung sondern erhöht vielmehr die Menge an phosphoryliertem H2AX (Abb.36). Neuere Daten deuteten darauf hin, dass nicht CK2 sondern CK1 im Wesentlichen für die Phosphorylierung der Topoisomerase IIα an der Stelle S1106 verantwortlich ist und dass eine Hypophosphorylierung die Aktivität der Topoisomerase beeinflusst und zur Resistenz gegenüber Doxorubicin beiträgt (Grozav et al. 2009). Die durch CK1 Inhibition vermittelte Hypophosphorylierung der Topoisomerase IIα (S1106) konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Diese Inhibition der CK1 führt dabei auch zu einer reduzierten Doxorubicin-induzierten Phosphorylierung von H2AX und pp53 (Abb. **37**). Bei dem

durchgeführten Band depletion assay, in dem durch sehr hohe Konzentrationen an Etoposid die aktive Topoisomerase II (sowohl α als auch β) durch Bildung des „cleavable complex“ an die DNA gebunden wird, kann der Einfluss der verschiedenen Inhibitoren auf die DNA-Assoziation der Topoisomerase II geschlossen werden. Bei den meisten der hier verwendeten Inhibitoren korreliert die Verminderung der Topoisomerase II-DNA-Assoziation gut mit der reduzierten γH2AX Proteinmenge (Abb. 38). Ausnahmen sind hier nur die Inhibitoren für p38, NFκB und Akt. Dies ist wohl damit zu begründen, dass bei der Analyse der DNA Schadensantwort niedrige Dosen von Doxorubicin (1 µM) und beim „Band depletion Assay“ sehr hohe Dosen Etoposid (100 µM) verwendet wurden. Doxorubicin kann für den „Band depletion Assay“ nicht verwendet werden, da hierzu sehr hohe Dosen von Doxorubicin verwendet werden müssten. Durch die starke Interkalation in die DNA verliert Doxorubicin bei hohen Konzentrationen (>3 µM) aber seine Wirkung auf die Topoisomerase II und es wird kein „cleavable complex“ mehr gebildet (Bodley et al. 1989, Gewirtz 1999, Huelsenbeck et al. 2012). Auf Grund der bisherigen Ergebnisse lässt sich vermuten, dass Rac1-regulierte Kinasen, wie ERK, JNK und CK1 die Konformation der Topoisomerase II durch Phosphorylierung verändern und so die Interaktion der Topoisomerasen II mit Doxorubicin und Etoposid beeinflussen.

4.1.10 Regulation der Topoisomerase IIα durch Rac1 abhängige Phosphorylierungsstellen

Die Rac1 Inhibition führt zu einer verringerten Phosphorylierung der Topoisomerase IIα an der Stelle S1106. Diese Hypophosphorylierung korreliert mit einer verringerten Anzahl an „cleavable complex“ nach Behandlung mit Topoisomerase-II-Giften (Chikamori et al. 2003, Grozav et al. 2009). Allerdings führt die Inhibition der Kinasen ERK und JNK zu keiner merklichen Veränderung der Phosphorylierung an dieser Stelle, hemmen aber die Doxorubicin induzierte DNA Schadensantwort (Abb.36). Eine reduzierte Phosphorylierung an dieser Stelle (S1106) kann also nicht allein für die Rac1-vermittelten Effekte verantwortlich sein. Eine Erklärung hierfür wäre, dass noch weitere MAPK-regulierte Phosphorylierungsstellen der Topoisomerase IIα durch EHT Behandlung verändert werden. Tatsächlich zeigt die Analyse der massenspektrometrischen Daten, dass eine EHT Behandlung sowohl alleine aber auch nach Doxorubicin Behandlung die Phosphorylierung zweier (S1213 und S1247) bereits für ERK beschriebener

Phosphorylierungsstellen (Ishida et al., 2001; Nousiainen et al., 2006), nicht aber die für CK2 beschriebene Position (S1377) (Wells et al., 1994) hemmt (Abb. 41). Die Behandlung mit Doxorubicin dagegen führt zu einer verstärkten Phosphorylierung an der Stelle S1247 und zu einer verringerten an Position S1213. Eine mögliche Erklärung für die Doxorubicin-induzierte Phosphorylierung an S1247 wäre die Doxorubicin-vermittelte Aktivierung der MAPK p38 und JNK. (Spallarossa et al. 2010, Kim & Freeman 2003). Bekannt ist, dass p38γ die Topoisomerase IIα an Position S1524 phosphorylieren kann was zu einer erhöhten Proteinstabilität der Topoisomerase IIα und einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber Topoisomerase-II-Giften führt (Qi et al. 2011). Darüber hinaus scheint die Aktivierung der MAPK p38, JNK und ERK die Expression der Topoisomerase-IIα zu fördern (Yamochi et al. 2005, Chen et al. 1999). Um die Phosphorylierungsstellen der Topoisomerase IIα zu untersuchen, wurde die Topoisomerase IIα mit Hilfe von Antikörpern präzipitiert und nach anschließender Auftrennung mittels Massenspektroskopie analysiert. Da ein Teil der Topoisomerase II durch Doxorubicin im „cleavable complex“ gefangen ist, kann dieser Teil nicht mehr präzipitiert werden und entgeht somit der Massenspektroskopie. Dies könnte daher auch zu einer Veränderung des prozentualen Anteils einer bestimmten Phosphorylierungsstelle führen. Da bei der verwendeten Dosis (1 µM) der durch Doxorubicin an die DNA gebundene Anteil im Vergleich zur Gesamtmenge der Topoisomerase IIα eher klein ist (nahezu keine Veränderung der Gesamtmenge der Topoisomerasen II nach Doxorubicin Behandlung), spielen hier die posttranskriptionalen Veränderungen aber wahrscheinlich eine wichtigere Rolle. Mit massenspektrometrischen Untersuchungen nach Behandlung mit hohen Dosen Etoposid (100 µM) könnte man hier weiter untersuchen, wie einzelne Phosphorylierungsstellen die Suszeptibilität gegenüber Topoisomerase-II-Giften beeinflussen. Da dann nahezu die gesamte aktive Topoisomerasen II im „cleavable complex“ gebunden ist, würden fast nur noch die inaktiven Formen der Topoisomerase II präzipitiert. Für die beiden durch Rac1 regulierten Phosphorylierungsstellen S1213 und S1247 wurde bereits mögliche Funktion in G2/M beschrieben. So assoziiert S1213 phosphorylierte Topoisomerase IIα mit mitotischen aber nicht mit Interphase-Chromosomen. Darüber hinaus konnte für die Topoisomerase IIα eine zellzyklusabhängige Phosphorylierung durch MAPK gezeigt werden (Ishida et al., 2001; Nousiainen et al., 2006). Zusammen mit den Daten der Inhibitoren-Studie lässt sich vermuten, dass die Rac1-

MAPK- und Rac1-CK1-vermittelte Phosphorylierung der Topoisomerase IIα die Interaktion mit den Topoisomerase-II-Giften vermindert, was wiederum zu einer geringeren Anzahl an DSB und einer verminderten DNA Schadensantwort führt (Abbildung 57). Wie Rac1 die Aktivität der Casein Kinase 1 beeinflusst ist noch wenig untersucht. Bekannt ist aber, dass Rac1 Phospholipase C aktivieren kann (Zhou et al. 2011, Li et al. 2009) wodurch es zu einem Calcium Ausstrom aus dem rauen Endoplasmatischen Retikulum kommt (Kadamur & Ross 2013). Dies führt zur Aktivierung von Phosphatasen, wie PP2B (Bandyopadhyay et al. 2002). Diese wiederum kann dann die Casein Kinase 1 (CK1) aktivieren (Cegielska et al. 1998). So führt z. B. die Behandlung mit einem Calcium Chelator zu einer verminderten Phosphorylierung der für CK1 beschriebenen Position S1106 der Topoisomerase-IIα (Chikamori et al. 2003).

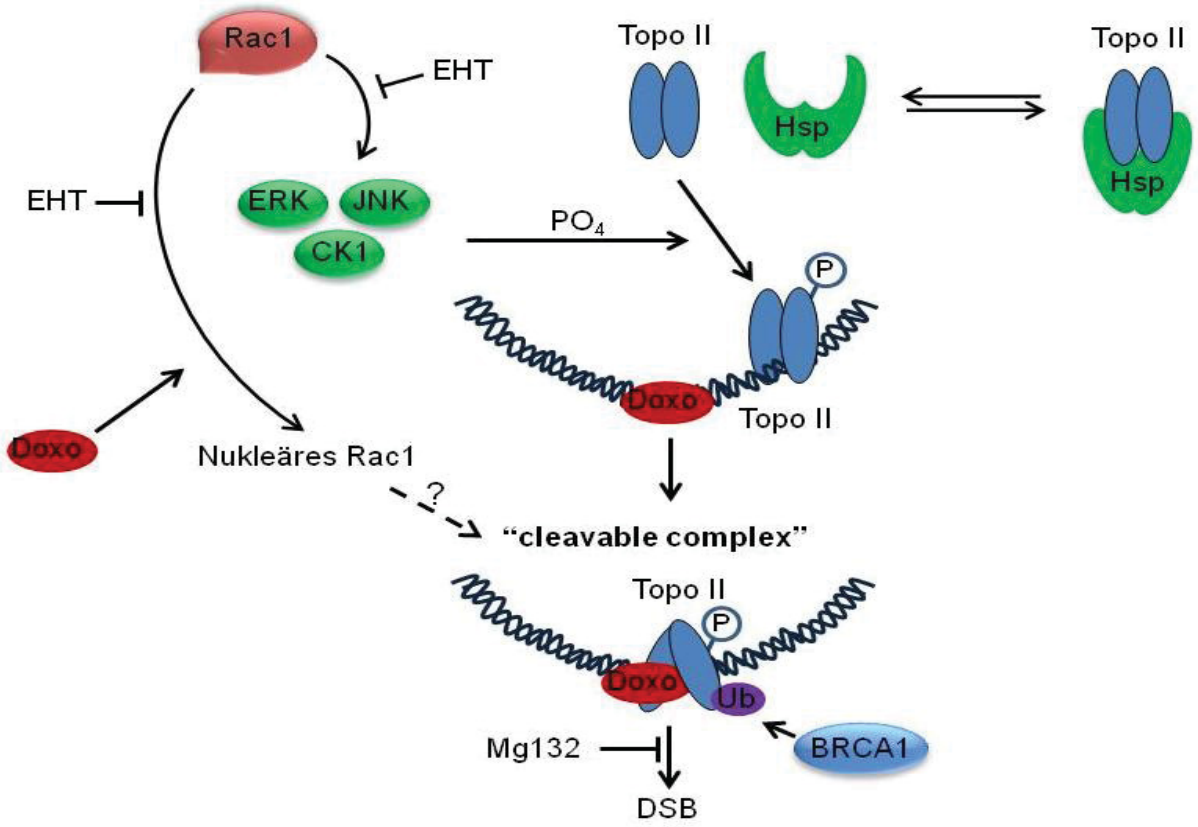


Abbildung 57 Modell zum Einfluss von Rac1 auf die Doxorubicin induzierte Bildung von DNA Doppelstrangbrüchen (DSB). Rac1 abhängige Kinasen wie ERK, JNK und CK1 phosphorylieren die Topoisomerase IIa und führen so zu einer erhöhten Aktivität und DNA-Bindung. Dies wiederum führt zu einer verstärkten Bildung von „cleavable complex“ und zur vermehrten Bildung freier DSB. Doxorubicin induziert aber auch die Translokalisation von Rac1 in den Nukleus. Inwieweit nukleäre Funktionen von Rac1 hier zur Bildung des „cleavable complex“ oder DSB beitragen ist aber unklar. Die Funktion von Hsp scheint davon unabhängig zu sein. Auch der weitere proteasomale Abbau des „cleavable complex“ zum freien DSB scheint nicht durch Rac1 beeinflusst zu werden. Für BRCA1 ist bekannt dass es an der Topoisomerase II Ubiquitinierung beteiligt ist und hier eine Rolle bei der Freilegung des DSB spielt.

4.1.11 Einfluss eines leberspezifischen Rac1 KO auf die Doxorubicin vermittelte Schadensantwort *in vivo*

Aus früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe war bekannt, dass Lovastatin humane Endothelzellen und Rattencardiomyoblasten, aber auch *in vivo* Leber und Herzgewebe vor Doxorubicin-induzierten toxischen Effekte schützt (Feleszko et al. 2000, Riad et al. 2009, Henninger et al., 2012) und dass diesen Schutzeffekten die Lovastatin-vermittelte Inhibition der kleinen Rho GTPasen Rac1 zu Grunde liegt (Huelsenbeck et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass auch ein Rac1 KO zu einer reduzierten DNA Schadensantwort (weniger phosphoryliertes H2AX) 72 h nach Behandlung mit Doxorubicin (10 mg/kg) in der Leber führt (Abb. 43). Da in nichtproliferierendem Gewebe die Expression der Topoisomerase IIα minimiert ist, gewinnt hier vor allem die Topoisomerase IIβ eine größere Bedeutung. So kann durch einen konditioneller KO der Topoisomerase IIβ im Herzen eine verminderte Kardiotoxizität nach Doxorubicin Behandlung (Lyu et al. 2007) erreicht werden. Zwar führt die Rac1 Inhibition *in vitro* auch zu einer verminderten DNA-Assoziation der Topoiomerase IIβ (Abb. 38), es bleibt aber fraglich, ob auch hier Rac1-abhängige posttranskriptionale Modifikationen eine Rolle spielen. Wie auch für Lovastatin konnte *in vivo* aber kein radioprotektiver Effekt durch Rac1-Mangel festgestellt werden (Ostrau et al. 2009). Interessanterweise führt eine wiederholte Behandlung mit Doxorubicin (subchronisch: 3x 6 mg/kg) von Rac1 KO Mäusen dagegen zu einer verstärkten DNA Schadensantwort, zu einer erhöhten Anzahl mitotischer Zellen (pH3 positive Zellen), aber zu keiner erhöhten Apoptoserate (Bopp et al., 2013). Die erhöhte Anzahl an mitotischen Zellen könnte hier für eine erhöhte regenerative Proliferation oder eine verlängerte Mitosephase sprechen. Ein Rac1 KO *per se* führt im Vergleich zu den Kontrolltieren nach 15 Monaten zu einer verstärkten Fibrose, einer erhöhten Anzahl eingewanderten MPO positiver Zellen (Monozyten, Makrophagen) und einer verstärkten Expression des Seneszenz Markers p16 (Bopp et al. 2013). In Übereinstimmung hierzu wurde für die Behandlung mit Lovastatin bereits eine vermehrte Seneszenzbildung in Prostatakrebs-Zellen beschrieben (Lee et al., 2006). Inwieweit dies auch auf eine Inhibition von Rac1 zurückzuführen ist, bleibt fraglich. Aber auch für Rac1 wurde schon ein Einfluss auf die Seneszenz von Zellen beschrieben. Interessanterweise führt dabei sowohl eine konstitutive Aktivierung von Rac1 in Endothel-Zellen

vermutlich ROS vermittelt (Alexander et al. 2004) als auch die Inaktivierung von Rac1 durch die Zyklin-abhängige Kinase 5 in Osteosarkom-Zellen zu einer Seneszenz-Bildung (Deshpande, 2002). So könnte die strikte Regulation von Rac1 einen wichtigen Faktor der Zellalterung darstellen. So ist Rac1 an der Aktivierung der NADPH Oxidase und somit an der ROS-Entstehung beteiligt (Cavallin et al., 2010). Die Entstehung von endogenen ROS gilt dabei als einer der für die Zellalterung verantwortlichen Faktoren (Liochev 2013). Darüber hinaus ist Rac1 aber auch für die Insulin-vermittelte Aufnahme von Glucose (Ueda et al. 2010) und die Insulinsekretion von Nöten (Asahara et al. 2013), wobei von vielen Faktoren des Insulinsignalwegs angenommen wird, dass sie an der Zellalterung beteiligt sind (Greer & Brunet 2008). Eine bedeutende Rolle spielt Rac1 auch in der Wundheilung, wobei hier vor allem über den Einfluss auf die Migration der Zellen spekuliert wird (Tscharntke et al. 2007). Da ein konstitutiver Rac1 KO letal ist (Sugihara et al. 1998), wurde ein konditioneller Mx1Cre-basierter Rac1 KO verwendet. Dieser KO betrifft aber auch die Expression von Rac1 in Zellen des blutbildenden Systems sowie der Immunantwort (C. M. Wells et al., 2004). Inwieweit dies auch einen Einfluss auf die chronischen und subchronischen Rac1-vermittelten Effekte nah Doxorubicin Behandlung ausübt bleibt offen.

4.2 Einfluss von Rac1 auf die Kanzerogenese

Die kleine Rho-GTPase Rac1 beeinflusst vielfältige Funktionen wie die Regulation der Zell-Zell-Interaktion (Schmitz et al., 2000), der Mitose und Meiose (Maroto et al., 2008 ; Halet & Carroll, 2007) und ist ein wichtiger Regulator verschiedener Transkriptionsfaktoren wie AP1, NF-κB und STAT (Canman & Kastan, 1996; Jefferies, 2000; Arulanandam et al., 2010). Auch die bei der Entstehung von Lebertumoren häufig mutierten Signalwege (Ras und β-Catenin) werden wesentlich durch Rac1 beeinflusst (Kissil et al., 2007; Auer et al., 1998; Wu et al., 2008). So konnte bereits die essentielle Bedeutung von Rac1 für die Ras Transformation von Zellen gezeigt werden (Kissil et al., 2007; Wang et al., 2010). Aber auch ein konditionaler c-Jun KO (ein wichtiges Ziel der Rac1-abhängigen Proteinkinase JNK und Teil des dimeren AP1 Transkriptionsfaktors) kann zu frühen Zeitpunkten die chemisch induzierte Kanzerogenese von DEN verhindern. Eine Option Rho Signalwege zu inhibieren sind Statine, welche als Cholesterinsenker eine breite Anwendung finden. Für Statine konnte gezeigt werden, dass diese die Inzidenz von

Mammatumoren nach Bestrahlung (Inano et al., 1997) und die Dimethylhydrazin-induzierte Kolonkarzinogenese inhibieren (Narisawa et al. 1994). Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die Inhibition von Rac1 durch Statine oder spezifische Inhibitoren metastatische Prozesse in Mäusen vermindert (Hamalukic et al. 2011). Zudem konnte die durch DEN induzierte Entstehung von Lebertumoren in Ratten durch Lovastatin nahezu vollständig verhindert werden (Björkhem-Bergman et al. 2010). So könnte Lovastatin in Risikogruppen (Hepatitis, Leberzirrhose) präventiv eingesetzt werden, um die Entstehung von Lebertumoren zu verhindern (Tsan et al., 2012). Um festzustellen, inwieweit Rac1 bei der Entstehung von Lebertumoren eine Rolle spielt, wurden in *Rac1 KO* und *Rac1 WT* Mäusen (im Alter von 2 Wochen) mittels DEN Lebertumore induziert, die dann 40 Wochen später analysiert wurden. Um zu überprüfen ob das Fehlen von Rac1 schon Prozesse der Tumor-Initiation beeinflusst, wurden zusätzlich die akuten DNA Schadens- und Stressantworten 24 und 72 h nach DEN Behandlung untersucht.

4.2.1 Verwendung des AlbCre vermittelten Rac1 KO

Da bei der Initiation von Lebertumoren durch DEN die Tiere erst 14 Tage alt waren, wäre eine Induktion des Mx1 Promotors mittels Poly I:C zu diesem Zeitpunkt experimentell schwierig. Da bei dem Mx1Cre-getriebenen Rac1 Leber-KO außerdem auch Zellen der Immunantwort betroffen wären (Wells et al. 2004) und inflammatorische Prozesse gerade bei der Tumorentstehung der Leber eine wichtige Rolle spielen, wurde hier ein AlbCre-getriebener Rac1-KO verwendet. Die erste Aktivierung des Albumin Promotors in der Leber findet dabei schon kurz vor der Geburt der Tiere statt (Weisend et al., 2009), so dass davon ausgegangen werden kann, dass nach 14 Tagen keine Rac1 Expression Hepatozyten mehr vorhanden ist.

4.2.2 Einfluss von Rac1 auf den Metabolismus von Nitrosaminen

DEN wird erst durch Cytochrom P450 Enzyme (Cyps) zum aktiven Kanzerogen (Carbokation) metabolisiert. Da diese Cyps hauptsächlich in der Leber exprimiert werden, wirkt DEN im Wesentlichen auch nur in der Leber genotoxisch und kanzerogen. Da Cyps meist ein sehr weites Substratspektrum haben, kann DEN durch verschiedene Cyps, hauptsächlich aber durch das Cype2E1, metabolisiert und somit aktiviert werden (Kushida et al. 2000). So zeigen Cyp2E1$^{-/-}$ Mäuse eine deutlich reduzierte Anzahl an durch DEN induzierten Lebertumoren (Kang et al.

2007). Die Expression von Cyp2E1 wird durch verschiedene Signalwege beeinflusst (Sekine et al., 2006; Zaiqi et al., 2003). So wird die Cyp2E1 Expression über die Aktivierung von Foxo1 (Konstandi et al., 2013) und auch durch antiinflammatorische Zytokine wie IL4 gefördert (Wang et al., 2010). Eine Aktivierung des β-Catenin Signalwegs scheint ebenfalls eine stimulierende Wirkung auf die Cyp2E1 Expression zu haben (Sekine et al. 2006). In den hier durchgeführten Experimenten nimmt die Cyp2E1 mRNA Expression in Übereinstimmung mit der beobachteten Inaktivierung (verstärkte Phosphorylierung) von Foxo1 (Abb. 47B) und Zunahme der Expression inflammtorischer Zytokine (Abb. 50) ab (Abb. 45A/B). Interessanterweise nimmt in den Rac1 KO Tieren die Proteinmenge an Cyp2E1 24 h nach DEN-Behandlung zu (Abb. 45C). Dies könnte durch eine Stabilisierung des Enzyms durch Interaktion mit seinem Substrat zustande kommen (Song 1995). Auffällig ist hier auch, dass die mRNA Expression anderer Cyps (Cyp1A1 und Cyp1B1) nach DEN Behandlung zunimmt (Abb. 45B). Dieser Unterschied in der Regulation der verschiedenen Cyps ist nicht ungewöhnlich. So ist bekannt, dass Cyp2E1 β-Catenin-abhängig, Cyp1A1 aber im Gegensatz dazu β-Catenin-unabhängig (Sekine et al. 2006) vor allem über die Aktivierung des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AhR) reguliert wird. Eine Hochregulation von Cyp1A1 und Cyp1B1 Enzymen wird dabei in verschiedenen Tumorarten beobachtet (Murray et al. 1997, Androutsopoulos et al. 2013). Es wird angenommen, dass eine erhöhte Expression von Cyp1 Enzymen die Aktivierung von umweltbedingten Karzinogenen steigert und somit die Tumorgenese fördert. Dabei könnten die detoxfizierende Wirkung von Cyp1 Enzymen möglicherweise unterschätzt werden (Uno et al. 2004, Androutsopoulos et al. 2009). Die Induktion von Cyps führt dabei auch zu einem gesteigerten Bedarf an Häm, ein Coenzym für Cyps. Die Hämoxigenase dagegen metabolisiert das von den Cyps nicht mehr benötigte oder überschüssige toxisch wirkende Häm (Takahashi et al. 2003). Auch in dieser Arbeit konnte eine durch DEN induzierte Expression von Hmox1 festgestellt werden wobei diese mit Abnahme der Cyp2E1-Menge deutlich zunimmt (Abb. 45). Eine erhöhte Hmox1 kann aber auch ein Zeichen für eine antiinflammatorische Modulation der Immunantwort sein. Es wird vermutet das Hmox1 dabei über die Freisetzung von Kohlenmonoxid als „second messenger“ anti-inflammatorische Prozesse fördert (Motterlini et al. 2012).

4.2.3 Einfluss von Rac1 auf die DEN vermittelte DNA-Schadensantwort

Bei einer reduzierten Metabolisierung von DEN (Abb. 45) würde man erwarten, dass weniger aktiver Metabolit entsteht und dadurch weniger DNA-Ethylierungen und weniger DNA Doppelstrangbrüche entstehen. Überraschenderweise führt der Mangel an Rac1 aber zu einer verstärkten DNA Schadensantwort (Abb. 46) und in Übereinstimmung hierzu auch zu einer erhöhten Apoptoserate nach 72 h (Abb. 48). Die in den immunohistologischen Untersuchungen (Abb. 46B) gezeigten γH2AX positiven Zellen befinden sich hauptsächlich in räumlicher Nähe der Zentralvenen, da dort auch die Cyp2E1 Expression am höchsten ist (Sekine et al. 2006). Dadurch, dass die Cyp2E1 Menge in Rac1 KO Tieren basal geringer ist, wird DEN möglicherweise vermehrt über andere Cyps, wie Cyp1A1 und Cyp1B1, metabolisiert (Bellec et al., 1996). Da die Expression von Cyp2E1- und Cyp1-Enzymen unterschiedlich reguliert wird, wäre in diesem Fall insgesamt eine größere Zahl an Leberzellen betroffen, da nun auch Cyp1A1 und Cyp1B1 exprimierende Zellen vermehrt geschädigt werden würden. Außerdem würde dadurch, dass in den Rac1 KO Tieren die initiale DEN Metabolisierung langsamer verläuft, anfänglich weniger aktive Metaboliten, diese dafür über einen längeren Zeitraum entstehen. (Graves & Swann 1993). Auch ist bekannt, dass durch DNA-Alkylierungen bei der Replikation der DNA Doppelstrangbrüche entstehen können (Abbildung 10, Fu et al., 2012). Betrachtet man den Mitosemarker pH3, erkennt man eine starke Zunahme der pH3-Menge nach 24 h, die dann nach 72 h wieder etwas abnimmt. Hier konnte aber kein gravierender Unterschied zwischen WT und KO Tieren festgestellt werden (Abb. 47C). Diese Zunahme der mitotischen Zellen ist aber wahrscheinlich nicht auf eine gesteigerte regenerative Proliferation, sondern auf einen Arrest der Zellen in G2/M zurückzuführen. Dieser Arrest wird vermutlich durch die DNA-Schaden induzierte verstärkte Expression von Inhibitoren des Zellzyklus, wie p21 ausgelöst (Bunz et al. 1998, Agarwal et al. 1995, Lossaint et al. 2011). Betrachtet man die Expression verschiedener Reparaturgene, so fällt auf, dass schon die basale mRNA-Expression von Rad51 und Brca1 erhöht und die von MGMT in Rac1 KO Tieren erniedrigt ist (Abb. 46). Es ist bekannt, dass die Expression von MGMT über AP1 (einem Rac1-abhängigen Transkriptionsfaktor) reguliert wird (Boldogh et al. 1998). MGMT kann DNA-Methylierungen direkt reparieren. Trotz der reduzierten mRNA Expression konnte kein Unterschied in Abhängigkeit des Rac1 Status bei der

gemessenen Enzymaktivität festgestellt werden (Abb. 47). Im Gegensatz hierzu korreliert die basal erhöhte mRNA Expression von Rad51 und Brca1 (beides wichtige Proteine der Homologen Rekombination (Abbildung 13)) mit der gemessenen Proteinmenge, wobei in den Rac1 KO Tieren die Brca1 und Rad51 Expression generell erhöht ist. Sowohl Brca1 als auch Rad51 verhindern dabei die Prozessierung der, durch die Alkylierung der DNA, angehaltenen Replikationsgabel (stalled replication forks) durch den MRN-Komplex und fördern die Reparatur durch die Homologe Rekombination (Schlacher et al., 2012; Zhang, 2013) (Abb. 58). Dies würde einerseits zu weniger Mutationen durch die fehlerfreie Reparatur (HR anstatt NHEJ), andererseits aber auch die verstärkte DNA-Schadensantwort durch die stabilisierte Replikationsgabel erklären (Ward & Chen 2001). Eine erhöhte Expression von Rad51 führt dabei unter anderem zu einer verlängerten G2/M-Phase und einer erhöhten p21 Expression (Klein, 2008; Raderschall et al., 2002). Dies könnte somit auch eine Ursache für die erhöhte pH3 Proteinmege nach DEN Behandlung (Abb. 47) darstellen.

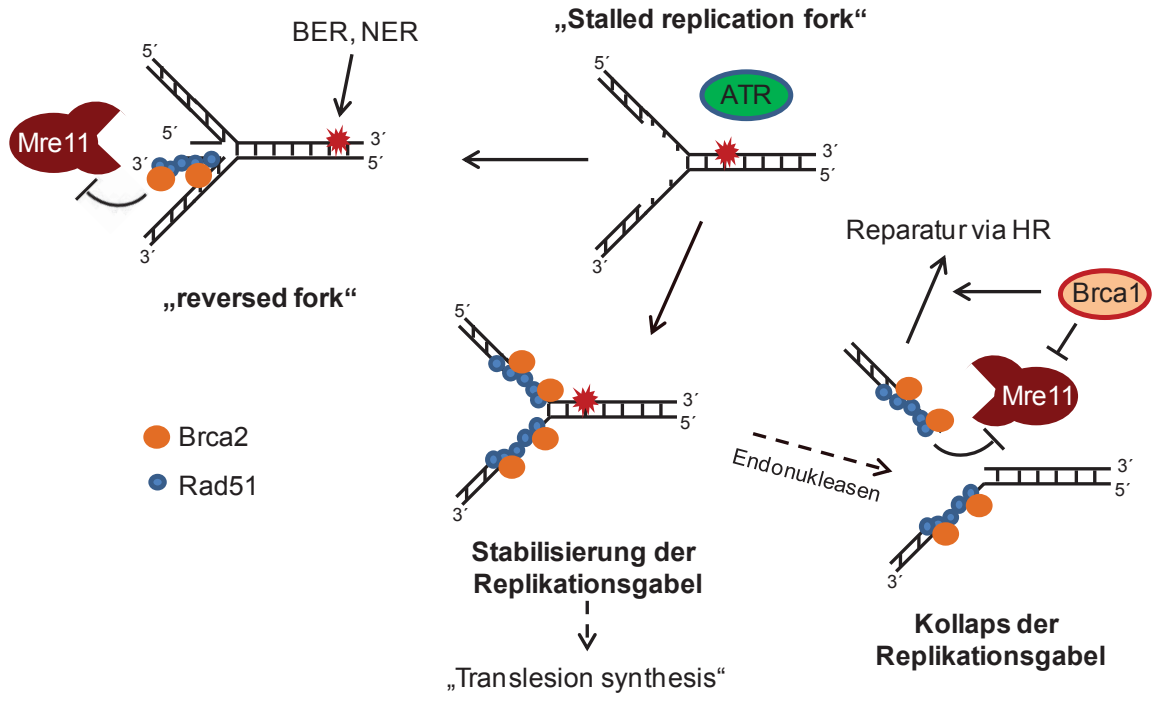


Abb. 58 Modell zum Einfluss von Brca1 und Rad51 auf die Reparatur von „Stalled replication forks“. Die „Stalled replication forks“ können durch ATR erkannt werden was zur Phosphorylierung des H2AX führt. Durch Anlagerung von Rad51 und Brca2 wird die Replikationsgabel stabilisiert. Dies hemmt die Prozessierung der freien DNA Enden durch Mre11 sowohl bei der „reversed fork“ Form als auch nach Kollabieren der Replikationsgabel. Brca1 fördert dabei die Reparatur via HR und hemmt die Prozessierung durch Mre11. Die Stabilisierung der Replikationsgabel ermöglicht dabei die Reparatur des Schadens durch andere Reparaturmechanismen wie BER oder NER, dies kann dann aber auch zum Kollaps der Replikation führen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Fortsetzung der Replikation über die Schadensstelle hinweg durch spezielle Polymerasen (Translesion Synthesis).

4.2.4 Einfluss von Rac1 auf die DEN vermittelte Stressantwort

Rac1 ist ein wichtiger Regulator der Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) wie der ERK (Ebi et al. 2013), der JNK (Xu & Greene 2006) und der p38 (Uddin et al. 2000). Die MAPK sind für die Weiterleitung vieler externen Stimuli verantwortlich (Cargnello & Roux 2011). So sind diese an der Regulation von Prozesse wie der Proliferation, der Apoptose, der Differenzierung und Migration beteiligt (Zhang & Liu 2002; Keshet & Seger 2010). Auf Grund ihrer essentiellen Funktionen spielen Fehlregulationen der MAPK auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krebs (Dhillon et al. 2007; Pritchard & Hayward 2013). Der Einfluss auf die Leberkanzerogenese dieser Kinasen wurde auch *in vivo* anhand verschiedener Knockout-Modelle untersucht. (zusammengefasst in Tab. 16).

Tab. 16: Einfluss von MAPK auf die Leberkanzerogenese (adaptiert von Min et al. 2011)

GEN	Phenotyp in der DEN induzierten Kanzerogenese	Literatur
JNK1$^{-/-}$	Abschwächung der Kanzerogenese	Hui et al. 2008 Sakurai et al. 2006
JNK2$^{-/-}$	Kein Einfluss	Hui et al. 2008
c-jun$^{f/f}$; Alfp-Cre	Abschwächung der Kanzerogenese	Eferl et al. 2003
c-jun$^{f/f}$; Mx-Cre	Abschwächung (KO zu frühen Zeitpunkten)[1] Kein Einfluss (KO zu späten Zeitpunkten)[2]	Eferl et al. 2003 Eferl et al. 2003
p38$^{f/f}$; Alfp-Cre	Verstärkung der Kanzerogenese	Hui et al. 2007
p38$^{f/f}$; Alb-Cre	Verstärkung der Kanzerogenese	Sakurai et al. 2008
p38$^{f/f}$; Mx-Cre	Verstärkung der Kanzerogenese[3] Kein Einfluss[4]	Hui et al. 2007 Sakurai et al. 2008
p38$^{f/f}$; c-jun$^{f/f}$; Mx-Cre	Abschwächung der Kanzerogenese	Hui et al. 2007

Alb: Albumin Promotorsequenz; Alfp: Albumin Promotorsequenz mit AFP (α–Fetoprotein) Enhancer Elementen; Mx: Mx1 Promotorsequenz

(1) Der c-Jun KO wurde 2 Wochen nach Tumorinitiation mittels poly-I:C Behandlung induziert.
(2) Der c-Jun KO wurde 6 Monate nach Tumorinitiation mittels poly-I:C Behandlung induziert.
(3) HCC wurde mittels Diethylnitrosamin (DEN) Behandlung in 4 Wochen alten männlichen Mäusen initiiert. Die Mäuse wurden anschließend ab Woche 8 über die Nahrung mit Phenobarbital behandelt.
(4) HCC wurde mittels DEN Behandlung von 2 Wochen alten männlichen Tieren induziert.

Der Einfluss eines ERK „Knock-Outs“ auf die Leberkrebsentstehung ist bisher nicht untersucht worden. Die Aktivierung von ERK gilt aber als einer der wichtigen Mechanismen der durch onkogenes Ras geförderten Kanzerogenese (Chang et al. 2003; Hilger et al. 2002). KO-Modelle von JNK1 und c-Jun hemmen die Entstehung von Lebertumoren wohingegen ein KO von p38 die Leberkanzerogenese fördert (Eferl et al., 2003; Hui et al., 2007; Hui et al., 2008; Sakurai et al., 2006; Sakurai et al., 2008). Bei c-Jun handelt es sich um die durch die JNK aktivierbare Untereinheit

des dimeren Transkriptionsfaktors AP-1. Interessanterweise hemmt der KO von c-Jun nur zu frühen Zeitpunkten die Entstehung von Lebertumoren. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass c-Jun die Expression von p53 reprimiert und so die Apoptose der initiierten Zellen hemmt (Eferl et al., 2003). Da Tumore mit der Zeit durch Anhäufung weiterer Mutation Eigenschaften, wie z.B. eine erhöhte Apoptose Resistenz hinzugewinnen, ist ein c-Jun KO zu späteren Zeitpunkten weniger effektiv.

Basale Unterschiede in der Stressantwort

Da eine Stimulation von Rac1 zu einer Aktivierung der MAPK führt könnte man erwarten, dass ein Fehlen von Rac1 zu einer Hemmung der MAPK führt (Clerk et al., 2001; Woo & Kim, 2002; Turkson et al., 1999). So sieht man basal zwar eine geringere Phosphorylierung der ERK, interessanterweise aber nicht der p38 oder der JNK (Abb. 47B). Auch die Rac1 abhängige Aktivierung der Akt Kinase ist bereits in der Literatur beschrieben worden (Murga et al. 2002). Dagegen führt der Rac1 KO zu einer verstärkten Akt Kinase Phosphorylierung (Abb. 47B). Die genaue Ursache bleibt unklar. Die Akt Aktivierung wird begleitet von einer basal stärkeren Phosphorylierung der Foxo1/3 Transkriptionsfaktoren (Rena et al. 1999; Kashii et al. 2000). Diese Inaktivierung könnte wiederum die Ursache für die reduzierte Expression von Cyp2E1 sein (Konstandi et al. 2013) (Abb. 45). Foxo ist allerdings auch an der Expression des Zellzyklusinhibitors p27 beteiligt (Lees et al. 2008). Allerdings wird p27 auch durch die ERK posttranslational reguliert. Die ERK markiert dabei durch Phosphorylierung p27 als Ziel des Ubiquitin/Proteasom-Systems (Lee & Kay 2011) (Abbildung 59). Die basal erhöhte Menge an p27 in Rac1 KO Tieren führt aber zu keinem Unterschied in der Menge an phosphoryliertem Histon H3 (Abb. 47), welches als Marker für mitotische Zellen und somit auch für die Proliferationsrate gilt (Van Hooser et al. 1998). Es scheint also initial keinen Unterschied in der Zahl der proliferierenden Zellen zu geben.

DEN induzierte Unterschiede in der Stressantwort

Betrachtet man die Aktivierung der Stresskinasen nach Behandlung mit DEN fällt auf, dass die meisten Kinasen (ERK, p38 und Akt) sowie auch die Phosphorylierung von c-Jun und dem Histon H3 parallel zur Schadensantwort (γH2AX und p53) sowohl in den Rac1 KO als auch den WT Tieren zunimmt (Abb. 46/Abb. 47). Die DEN-

induzierte Aktivierung dieser Kinasen scheint daher unabhängig von Rac1 zu sein. Da p27 den Eintritt in den Zellzyklus inhibiert und c-Jun diesen fördert (Behrens et al. 2002), spricht die durch DEN induzierte Abnahme von p27 bei gleichzeitiger Zunahme von c-Jun für einen vermehrten Eintritt der Leberzellen in den Zellzyklus (Abb. 47). Die p27 Expression ist dabei in den Rac1 KO-Tieren immer höher als in der zugehörigen WT Kontrolle (Abb. 47). Eine Erklärung hierfür ist die DEN vermittelte Phosphorylierung und Inhibierung der Transkriptionsfaktoren Foxo1/3 (Abb. 47), welcher unter anderem für die Expression von p27 verantwortlich sind (Lees et al. 2008). Die Phosphorylierung von ERK nimmt zumindest 24 h nach DEN Behandlung in den KO-Tieren stark zu, was zu einem verstärkten Abbau von p27 führen sollte (Abb. 47). Warum es trotz vermehrter Aktivierung von Akt nach DEN Behandlung in den Rac1 KO-Tieren zu keiner verstärkten Phosphorylierung von Foxo1/3 kommt bleibt unklar. Es ist aber bekannt, dass auch MAPK wie ERK und JNK eine Rolle in der Regulation dieses Transkriptionsfaktors spielen können und sich hier wohl verschiedene Effekte überlagern (Clavel et al., 2010; Shen et al., 2010; Roy et al., 2010; Yang et al., 2008). Die erhöhte Expression von p27 in den Rac1 KO-Tieren könnte auch eine mögliche Ursache für den nach Inhibition von Rac1 (*in vitro*) beschriebene G1 Arrest sein (Abbildung 59) (Lee & Kay, 2011).

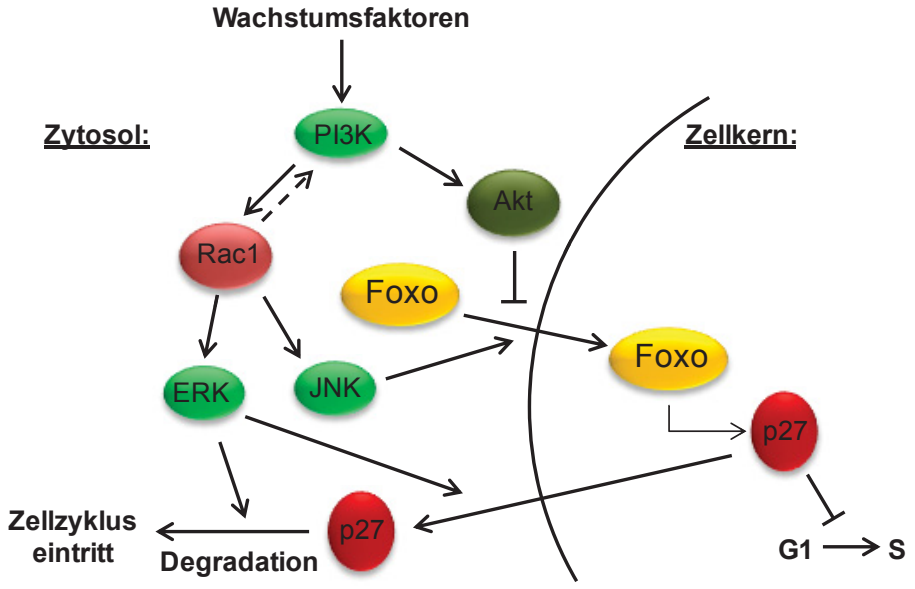


Abbildung 59 Einfluss von Rac1 auf die Expression und Stabilität von p27. Die Aktivierung der PI3K z.B. durch Wachstumsfaktoren führt zur Aktivierung des AKT Signalwegs in deren Folge die Forkhead Box Protein O Transkriptionsfaktoren (FOXO) durch Phosphorylierung inaktiviert werden und somit die Transkription des Zellzyklusinhibitors p27 gehemmt wird. Auf der anderen Seite führt die Aktivierung der PI3K auch über Rac1 zur Aktivierung der ERK was wiederum zum Nukleären Export und anschließender Degradation des p27 führt. Interessanterweise fördert die Aktivierung der JNK die Kerntranslokalistaion der FOXO Transkriptionsfaktoren. Eine vollständige schnelle Inaktivierung des Zellzyklusinhibitors p27 scheint daher sowohl eine Aktivierung des ERK wie auch des AKT Signalweges zu benötigen.

4.2.5 Einfluss von Rac1 auf die akute Inflammation nach DEN-Behandlung

Inflammatorische Prozesse spielen eine wesentliche Rolle in der Entstehung von HCC. So führen akute inflammatorische Prozesse zur Beseitigung von apoptotischen Zellen und fördern die Vernichtung veränderte Zellen (Abbildung 15). Problematisch und krebsfördernd dagegen wirkt die chronische Inflammation. So weisen etwa 80 % aller Leberkrebs-Patienten eine Leberzirrhose als Vorerkrankung auf (Fattovich et al., 2004). Auch nach Behandlung mit DEN zeigen sich Anzeichen einer beginnenden Inflammation, was sich z.B.in der erhöhten Expression von Markern wie IL1, TNFα oder MPO und einer verstärkten Einwanderung von Immunzellen ins Lebergewebe zeigt (Abbildung 49/Abb. 50). Diese inflammatorische Prozesse scheinen in den Rac1 KO-Tieren etwas stärker ausgeprägt zu sein als in den korrespondierenden WT Kontrollen. Hier könnten neben der durch die verstärkte DNA-Schadensantwort und der vermehrten Apoptoserate auch die verminderte Expression antiinflammatorischer Proteine wie IL10 eine Rolle spielen (Vries 1995). Wie sich ein Fehlen von Rac1 auf chronisch inflammatorische Prozesse auswirkt ist aber noch unklar. Bekannt ist aber, dass Rac1 in Endothelzellen über die Aktivierung von NFκB an der durch Tnfα oder IL6 induzierten Expression von Zelladhesionsmolekülen beteiligt ist (Chen et al. 2003; Wung et al. 2005). Diese Zelladhesionsmoleküle sind maßgeblich an der Invasion von Immunzellen ins Gewebe beteiligt (Janeway et al. 2001). Zudem weisen Rac1 defiziente Makrophagen nach einem inflammatorischen Stimulus eine verminderte Mobilisierung aus dem Knochenmark auf (Glogauer et al. 2003). Neben Rac1 spielt auch Rac2 eine wichtige Rolle in der Entwicklung von B- und T-Zellen (Guo et al. 2008; Minton 2003). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass das zur Behandlung von chronischen Darmentzündungen eingesetzte 6-Mercaptopurin die Rac1 Aktivierung in T-Lymphozyten und Endothelzellen hemmt. (Marinković et al. 2014). Somit könnte eine Inhibition von Rac1 einen möglichen therapeutischen Ansatz zur Behandlung von chronischen Entzündungskrankheiten darstellen.

4.2.6 Einfluss von Rac1 auf die DEN induzierten chemischen Kanzerogenese

Rac1 KO Tiere zeigen eine deutlich reduzierte Anzahl an makroskopisch sichtbaren (großen) und mikroskopisch sichtbaren Tumorarealen. Etwa 40 % aller durch DEN induzierten Tumore sind Ras- oder Raf-mutiert (Aydinlik et al. 2001; Rignall et al.,

2011). In Übereinstimmung wurde auch in dieser Arbeit bei etwa 40 % der WT Tiere eine erhöhte Expression von pERK festgestellt. Im Gegensatz hierzu weisen Rac1 KO Tiere überhaupt keine pERK positiven Tumore auf (Abb. 53). Daraus lässt sich schließen, dass die DEN-induzierte chemische Hepato-Kanzerogenese bei Rac1-Mangel unabhängig vom Ras/Raf Signalweg ist und dass Rac1 für die Ras-vermittelte Kanzerogenese essentiell ist. Dabei scheint sich die Bedeutung von Rac1 für die durch onkogenes Ras getriebene Krebsentstehung nicht nur auf die Leberkanzerogenes zu beschränken. So konnte in früheren Untersuchungen bereits gezeigt werden, dass Rac1 für die k-Ras-vermittelte Entstehung von Lungentumoren notwendig ist (Kissil et al. 2007). Der β-Catenin Signalweg ist ein weiterer wichtiger Signalweg der Leber-Kanzerogenese. So weisen etwa 80% der Lebertumore der durch DEN initiierten und mit dem Tumorpromotor Phenobarbital behandelten Mäuse eine Mutation im β-Catenin Signalweg auf (Aydinlik et al. 2001). In den hier durchgeführten Untersuchungen zeigte nur ein Teil der Zellen der WT Tumore eine Gluthaminsynthethase (GS) Expression (Abb. 53), einem Marker für die Aktivierung des β-Catenin Signalwegs (Loeppen et al., 2002). Die Ausbildung von β-Catenin-positiven Tumoren scheint erst durch die Phenobarbital Behandlung bevorzugt zu werden (Schwarz et al., 2003). Rac1 KO Tiere zeigten im Gegensatz hierzu weder GS positive noch partiell GS positive Tumore (Abb. 53). Wenn man bedenkt, dass Rac1 auch beim nukleären Transport von β-Catenin eine Rolle spielt (Wu et al., 2008), scheint dieser Befund nicht ganz unerwartet. Die geringere Anzahl und Größe der Tumore in den Rac1 KO Tieren führt zu der Frage, inwieweit dieser Befund durch eine erhöhte Apoptoserate oder verringerte Proliferation bedingt ist. Überraschenderweise zeigen die Tumore der Rac1 KO Tiere sogar eine deutlich erhöhte Anzahl an mitotischen (pH3 positiven) Zellen bei gleichzeitig ähnlicher Apoptoserate (TUNEL positive Zellen) (Abb. 52). Passend zur erhöhten Anzahl an pH3 positiven Zellen wurde in den Rac1 KO Tieren auch eine verstärkte Anzahl an CycB1 positiven Zellen festgestellt (Abb. 54). CycB1 wird hauptsächlich in Zellen der G2 und M-Phase exprimiert. Daraus lässt sich schließen, dass die hohe Zahl mitotischer Zellen in Abwesenheit von Rac1 vermutlich auf einen Arrest während der Mitose und nicht auf eine verstärkte Proliferation zurückzuführen ist und Rac1 somit für einen normalen Ablauf der Mitose notwendig ist. *In vitro* konnte dies schon von verschiedenen anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden (Michaelson et al., 2008; Moore et al., 1997). Wie genau Rac1 den Ablauf der Mitose beeinflusst ist aber noch

unklar. Mögliche Funktionen wären dabei die in dieser Arbeit gezeigte Regulation der Topoisomerasen IIα oder die Regulation der Mikrotubuli und somit des Spindelapparats (Wittmann et al. 2003). Betrachtet man darüber hinaus die Expression der für die Zell-Zell-Kontakte wichtigen Expression von E-Cadherin so zeigen die WT Tiere eine klare Abgrenzung der Tumorbereiche zum Normalgewebe (Abb. 54). Diese klare Abgrenzung ist in den KO Tieren nicht vorhanden. Diese zeigen darüber hinaus oft eine cytosolische Expression von E-Cadherin. Dies ist nicht verwunderlich, da Rac1 bei der zellulären Lokalisation des E-Cadherins eine wichtige Rolle spielt. So führt die Transfektion von Zellen mit einer dominant negative Rac1 Isoform zu einer Akkumulation des E-Cadherin im Bereich des Golgi (Wang et al. 2005), wohingegen eine konstitutiv aktive Rac1 Isoform zur Endozytose des E-Cadherins führt (Akhtar & Hotchin 2001). Die strikte Regulation von Rac1 scheint daher essentiell für die korrekte Lokalisation des E-Cadherin zu sein. Eine verringerte membranständige Expression von E-Cadherin von Tumoren wird dabei mit einer erhöhten Fähigkeit zur Metastasierung in Verbindung gebracht (Matsumura et al. 2001). Inwieweit ein Mangel an Rac1 aber tatsächlich die Metastasierung fördert bleibt fraglich. Bereits gezeigt werden konnte, dass eine Rac1 Inhibition durch IR geförderte Metastasierungsprozesse hemmt (Hamalukic et al. 2011). Hier spielt vor allem die Rac1/NFκB abhängige Expression von Zelladhesionsmolekülen wie ICAM oder E-Selektin eine wichtige Rolle. Darüber hinaus ist Rac1 durch seine Regulation des Zytoskellet auch an der Migration von Zellen beteiligt (Faix & Weber 2013).So stellt Rac1 einen möglichen Angriffspunkt zur Hemmung metastatischer Prozesse dar (Bid et al. 2013).

4.2.7 Zusammenfassung zum Einfluss von Rac1 auf die DEN induzierte Leberkanzerogenese

Zusammenfassend haben die Ergebnisse gezeigt, dass ein Fehlen von Rac1 die Leberkanzerogenese hemmt. Die verstärkte Reparatur und vermehrte Apoptose der durch DEN geschädigten Zellen in den Rac1 KO Tiere dürfte dabei zu einer geringeren Anzahl an initiierten Zellen führen. Darüber hinaus hemmt ein Rac1 KO das durch Aktivierung des Ras und b-catenin Signalwege beeinflusste Wachstum der Tumorzellen und führt zusätzlich zu einer verlängerten Mitosephase. Die Ursache für die deutlich reduzierte Anzahl an Tumoren der Rac1 KO Tiere liegt daher vermutlich

sowohl in einer geringeren Zahl an initiierter Zellen als auch einer Wachstumshemmung der veränderten Zellen begründet. (Abbildung 60).

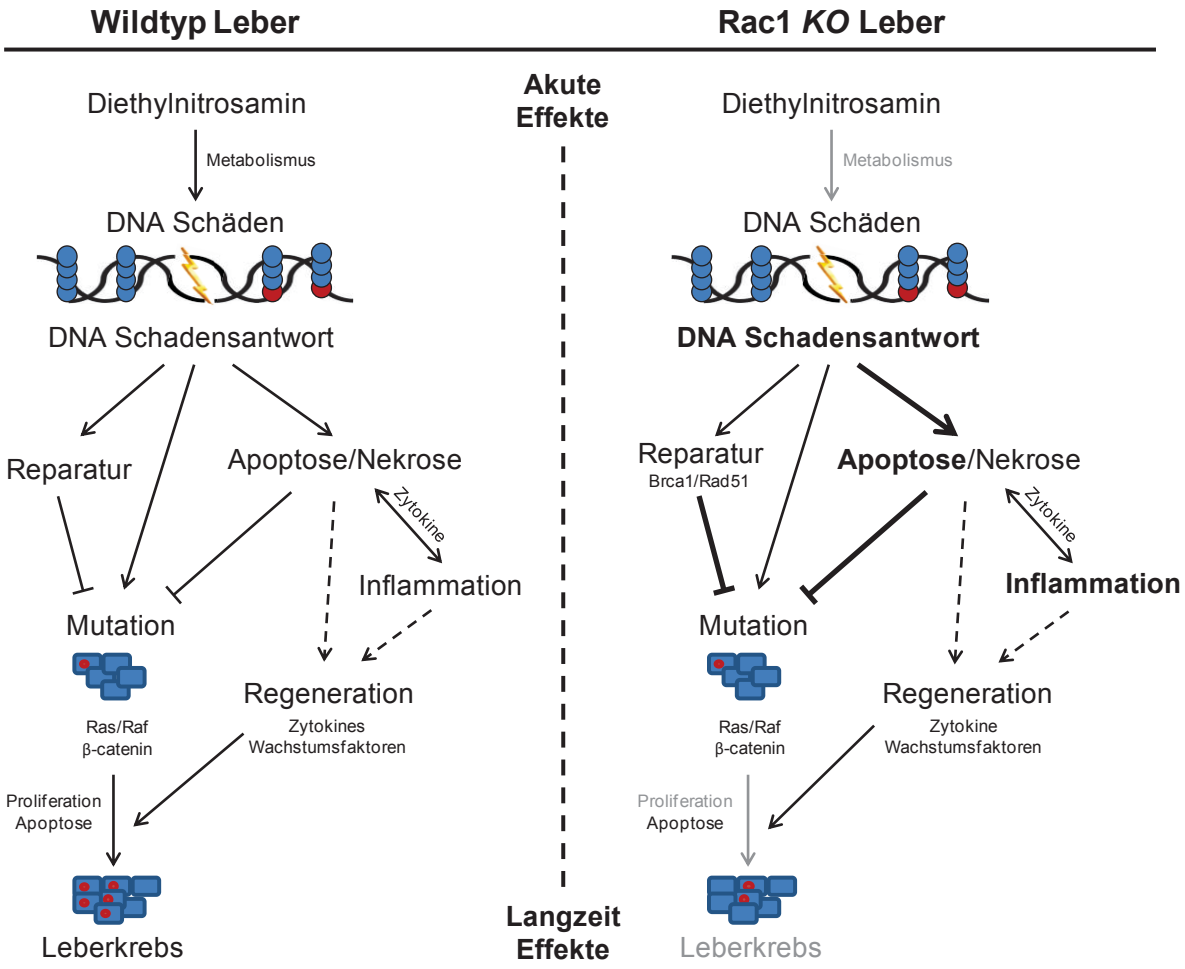


Abbildung 60 Vergleich von Rac1 WT und Rac1 KO Tieren in Bezug auf die durch DEN induzierte Leber Kanzerogenese. Im Vergleich zum WT-Tieren (links) zeigt der leberspezifische KO von Rac1 eine Reihe von Veränderungen sowohl basal als auch nach DEN-Gabe. Dabei wird Rac1 für eine effiziente Schadensantwort und Apoptoseinduktion benötigt. Darüber hinaus fördert Rac1 die Bildung von Ras/Raf und β-Catenin mutierten Tumoren. Mechanismen auf die Rac1 einen verstärkenden Effekt hat sind fett und Mechanismen auf die Rac1 einen abschwächenden Effekt hat grau dargestellt.

4.2.8 Ausblick

Um den Einfluss von Rac1 auf die Tumorpromotion von dem auf die Tumorinitiation zu trennen, könnten weitere Untersuchungen mit einem Mx1-Cre $Rac1^{flox/flox}$ Modell nützlich sein. Mit diesem könnte man Rac1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Initiation mit DEN ausschalten und so den Einfluss von Rac1 auf die Tumorpromotion bestimmen. Ein Großteil der HCC Erkrankungen entstehen vor dem Hintergrund einer Leberzirrhose (Fattovich et al., 2004), die häufig durch eine chronische

Leberentzündung (Hepatitis) (Degos et al. 2000) oder chronischem Alkoholmissbrauchs entstanden ist (Jackson and Gleeson 2010). In zukünftigen Untersuchungen könnte daher von Interesse sein wie sich eine pharmakologische Inhibition oder ein KO von Rac1 auf die Tumorentstehung auswirken würde wenn bereits eine zirrhotische Lebererkrankung vorliegt. Hierzu könnte man Tumore in neonatalen Mäusen mit Den initiieren und Leber-Zirrhose der Tumore mit regelmäßiger Ethanol-Gabe über die Nahrung fördern, was auch zu einer Promotion von Lebertumoren führt (Brandon-Warner et al. 2012). Bei Verwendung des Mx1Cre $Rac1^{flox/flox}$ Modells könnte Rac1 dann zu verschiedenen Zeitpunkten genetisch deletiert werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass Ethanol das Wachstum von Tumorzellen über die Aktivierung der ERK Kinase fördern kann (Hennig et al. 2009). Auch bei der Entstehung von anderen Krebserkrankungen könnte Rac1 eine wichtige Rolle spielen. So ist die UV-induzierte $Rac1^{P29S}$ Mutation die dritt häufigste „gain of function“ Mutation beim malignem Melanom (Davis et al. 2013). Hier könnte man in zukünftigen Experimenten untersuchen ob die Behandlung der Haut mit einem spezifischen Rac1 Inhibitor oder einem Statin (z. B. dem lipophilen Atorvastatin gelöst in DMSO) vor bzw. nach UV-Exposition die Entstehung von Hautkrebs beeinflusst. Im Zusammenhang mit der Co-Behandlung von Doxorubicin mit EHT1864 wäre es intersannt die Zelltypsezifität der Rac1 Inhibition weiter zu untersuchen. So könnte man hier untersuchen in wie weit onkogenes Ras, was unabhängig von Rac1 zu einer verstärkten Aktivierung der ERK führen sollte (Chang et al. 2003), beeinflusst ob eine Rac1 Inhibition die Doxorubicin induzierten Schadensantwort hemmt. Hierzu könnte man in HepG2 Zellen konstitutive aktivem Ras einbringen und die Zellen vor und nach Transfektion bezüglich ihrer Suszeptibilität gegenüber Doxorubicin miteinander vergleichen. Um die direkten nukleären Funktion von Rac1 von den zytosolischen/Membran-abhängigen Funktionen zu trennen könnte man Rac1 KO MEFs (Mouse embryonic fibroblasts) verwenden und in diese eine Rac1 Mutanten die hauptsächlich im Kern Rac1 PBR (PVKKRKRK) oder eine die nur im Zytosol/Membran Rac1 PBR (RRGKKKSG) vorkommt einbringen (Lanning et al. 2004). Anschließend könnte man dann die verschiedenen Gruppen bezüglich der Co-Behandlung von Doxorubicin und EHT1864 miteinander vergleichen.

5 Anhang

5.1 Literaturverzeichnis

AA Schmitz, Govek EE, Böttner B, Van Aelst L. 2000. “Rho GTPases: Signaling, Migration, and Invasion.” *Experimental Cell Research*, no. 261: 1–12.

Adamson, P, C J Marshall, a Hall, and P a Tilbrook. 1992. “Post-Translational Modifications of p21rho Proteins.” *The Journal of Biological Chemistry* 267 (28): 20033–38. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1400319.

Agarwal, Banke, Balazs Halmos, Aleksander S Feoktistov, Petr Protiva, William G Ramey, Ming Chen, Charalabos Pothoulakis, J Thomas Lamont, and Peter R Holt. 2002. “Mechanism of Lovastatin-Induced Apoptosis in Intestinal Epithelial Cells.” *Carcinogenesis* 23 (3): 521–28. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11895868.

Agarwal, M L, a Agarwal, W R Taylor, and G R Stark. 1995. “p53 Controls Both the G2/M and the G1 Cell Cycle Checkpoints and Mediates Reversible Growth Arrest in Human Fibroblasts.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (18): 8493–97. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=41183&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Agarwal, Sheba, Agnieszka A Tafel, and Roland Kanaar. 2006. “{DNA} Double-Strand Break Repair and Chromosome Translocations.” *{DNA} Repair* 5 (9–10): 1075–81. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.05.029. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786406001698.

Akhtar, N, and N a Hotchin. 2001. “RAC1 Regulates Adherens Junctions through Endocytosis of E-Cadherin.” *Molecular Biology of the Cell* 12 (4): 847–62. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=32271&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Alexander, Kamilah, Hai-su Yang, and Philip W Hinds. 2004. “Cellular Senescence Requires CDK5 Repression of Rac1 Activity” 24 (7): 2808–19. doi:10.1128/MCB.24.7.2808.

Androutsopoulos, Vasilis P, Ioannis Spyrou, Achilles Ploumidis, Alexandros Eystathios Papalampros, Michalis Kyriakakis, Demetrios Delakas, Demetrios a Spandidos, and Aristidis M Tsatsakis. 2013. “Expression Profile of CYP1A1 and CYP1B1 Enzymes in Colon and Bladder Tumors.” *PloS One* 8 (12): e82487. doi:10.1371/journal.pone.0082487. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3864999&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Androutsopoulos, Vasilis P, Aristidis M Tsatsakis, and Demetrios a Spandidos. 2009. “Cytochrome P450 CYP1A1: Wider Roles in Cancer Progression and Prevention.” *BMC Cancer* 9 (January): 187. doi:10.1186/1471-2407-9-187. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2703651&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Apoptosis, Agent Induced, Valentina Zuco, and Franco Zunino. 2008. “Cyclic Pifithrin-A Sensitizes Wild Type p53 Tumor Cells to Antimicrotubule” 10 (6): 587–96. doi:10.1593/neo.08262.

Arcamone, F, G Cassinelli, G Fantini, A Grein, P Orezzi, C Pol, and C Spalla. 2000. “Adriamycin, 14-Hydroxydaunomycin, a New Antitumor Antibiotic from S. Peucetius Var. Caesius.” *Biotechnology and Bioengineering* 67 (6). John Wiley & Sons, Inc. 704–13. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(20000320)67:6<704::AID-BIT8>3.0.CO;2-L. http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000320)67:6<704::AID-BIT8>3.0.CO.

Arora, HC, MP Jensen, Ye Yuan, and Aiguo Wu. 2012. “Nanocarriers Enhance Doxorubicin Uptake in Drug-Resistant Ovarian Cancer Cells.” *Cancer Research* 72 (3): 769–78. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2890.Nanocarriers. http://cancerres.aacrjournals.org/content/72/3/769.short.

Arulanandam, Rozanne, Mulu Geletu, Hélène Feracci, and Leda Raptis. 2010. “Activated Rac1 Requires gp130 for Stat3 Activation, Cell Proliferation and Migration.” *Experimental Cell Research* 316 (5). Elsevier Inc. 875–86. doi:10.1016/j.yexcr.2009.10.017. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19852956.

Asahara, S, Y Shibutani, K Teruyama, H Y Inoue, Y Kawada, H Etoh, T Matsuda, et al. 2013. “Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1 (RAC1) Regulates Glucose-Stimulated Insulin Secretion via Modulation of F-Actin.” *Diabetologia* 56 (5): 1088–97. doi:10.1007/s00125-013-2849-5. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3622740&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Auer, K L, J Contessa, S Brenz-Verca, L Pirola, S Rusconi, G Cooper, a Abo, et al. 1998. “The Ras/Rac1/Cdc42/SEK/JNK/c-Jun Cascade Is a Key Pathway by Which Agonists Stimulate DNA Synthesis in Primary Cultures of Rat Hepatocytes.” *Molecular Biology of the Cell* 9 (3): 561–73. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=25285&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Awasthi, Sanjay, Jizhong Cheng, Sharad S Singhal, Manjit K Saini, Utpal Pandya, Slawomir Pikula, Joanna Bandorowicz-pikula, Shivendra V Singh, Piotr Zimniak, and Yogesh C Awasthi. 2000. “Novel Function of Human RLIP76 : ATP-Dependent Transport of Glutathione.” *Biochemistry* 39: 9327–34.

Aydinlik, H, T D Nguyen, O Moennikes, a Buchmann, and M Schwarz. 2001. “Selective Pressure during Tumor Promotion by Phenobarbital Leads to Clonal Outgrowth of Beta-Catenin-Mutated Mouse Liver Tumors.” *Oncogene* 20 (53): 7812–16. doi:10.1038/sj.onc.1204982. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11753661.

Baldwin, E L, and N Osheroff. 2005. “Etoposide, Topoisomerase II and Cancer.” *Current Medicinal Chemistry. Anti-Cancer Agents* 5 (4): 363–72. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16101488.

Ballet F, Vrignaud P, Robert J, Rey C, Poapon R. 1987. “Hepatic Extraction, Metabolism and Biliary Excretion of Doxorubicin in the Isolated Perfused Rat Liver.” *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 19 (240): 5.

Bandyopadhyay, Jaya, Jiyeon Lee, Jungsoo Lee, Jin Il Lee, Changhoon Jee, Jeong-hoon Cho, Sunki Jung, et al. 2002. “Calcineurin , a Calcium / Calmodulin-Dependent Protein Phosphatase , Is Involved in Movement , Fertility , Egg Laying , and Growth in Caenorhabditis Elegans” 13 (September): 3281–93. doi:10.1091/mbc.E02.

Barker, Catherine R, Anne V McNamara, Stephen a Rackstraw, David E Nelson, Mike R White, Alastair J M Watson, and John R Jenkins. 2006. “Inhibition of Hsp90 Acts Synergistically with Topoisomerase II Poisons to Increase the Apoptotic Killing of Cells due to an Increase in

Topoisomerase II Mediated DNA Damage." *Nucleic Acids Research* 34 (4): 1148–57. doi:10.1093/nar/gkj516. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1373695&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Bartek, Jiri, and Jiri Lukas. 2014. "Chk1 and Chk2 Kinases in Checkpoint Control and Cancer." *Cancer Cell* 3 (5). Elsevier: 421–29. doi:10.1016/S1535-6108(03)00110-7. http://www.cell.com/cancer-cell/abstract/S1535-6108(03)00110-7.

Bartsch, H, and R Montesano. 1984. "Relevance of Nitrosamines to Human Cancer." *Carcinogenesis* 5 (11): 1381–93. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6386215.

Bates, Diana A. 1982. "Deoxyribose Breakdown by the Adriamycin Semiquinone for Hydroxyl Radical Participation and HzOZ : Evidence" 14 (1): 137–42.

Behrens, Axel, Maria Sibilia, Jean-Pierre David, Uta Möhle-Steinlein, François Tronche, Günther Schütz, and Erwin F Wagner. 2002. "Impaired Postnatal Hepatocyte Proliferation and Liver Regeneration in Mice Lacking c-Jun in the Liver." *The EMBO Journal* 21 (7): 1782–90. doi:10.1093/emboj/21.7.1782. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=125360&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Bellec G, Goasduff T, Dreano Y, Menez JF, Berthou F. 1996. "Effect of the Length of Alkyl Chain on the Cytochrome P450 Dependent Metabolism of N-Diakylnitrosamines." *Cancer Letters* 100 (1-2): 115–23.

Berndt, Norbert, Andrew D Hamilton, and Saïd M Sebti. 2011. "Targeting Protein Prenylation for Cancer Therapy." *Nat Rev Cancer* 11 (11). Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved. 775–91. http://dx.doi.org/10.1038/nrc3151.

Bid HK1, Roberts RD, Manchanda PK, Houghton PJ. 2013. "RAC1: An Emerging Therapeutic Option for Targeting Cancer Angiogenesis and Metastasis." *Molecular Cancer Therapeutics* 12 (10): 1925–34.

Bikkavilli, Rama Kamesh, and Craig C Malbon. 2009. "Mitogen-Activated Protein Kinases and Wnt/beta-Catenin Signaling: Molecular Conversations among Signaling Pathways." *Communicative & Integrative Biology* 2 (1): 46–49. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2649302&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Björkhem-Bergman, Linda, Jure Acimovic, Ulla-Britta Torndal, Paolo Parini, and Lennart C Eriksson. 2010. "Lovastatin Prevents Carcinogenesis in a Rat Model for Liver Cancer. Effects of Ubiquinone Supplementation." *Anticancer Research* 30 (4): 1105–12. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530415.

Block, Gladys, Blossom Patterson, and Amy Subar. 1992. "Fruit, Vegetables, and Cancer Prevention: A Review of the Epidemiological Evidence." *Nutrition and Cancer* 18 (1). Routledge: 1–29. doi:10.1080/01635589209514201. http://dx.doi.org/10.1080/01635589209514201.

BLUM, RONALD H, and STEPHEN K CARTER. 1974. "AdriamycinA New Anticancer Drug with Significant Clinical Activity." *Annals of Internal Medicine* 80 (2): 249–59. http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-80-2-249.

Bodley, Annette, Leroy F Liu, Mervyn Israel, Ramakrishnan Seshadri, Yoshihiro Koseki, Fernando C Giuliani, Stanley Kirschenbaum, Robert Silber, and Milan Potmesil. 1989. “DNA Topoisomerase II-Mediated Interaction of Doxorubicin and Daunorubicin Congeners with DNA DNA Topoisomerase II-Mediated Interaction of Doxorubicin and Daunorubicin Congeners with DNA1”, 5969–78.

Boldogh, Istvan, Chilakamarti V Ramana, Zhenping Chen, Protein Kinase, Tapan Biswas, Tapas K Hazra, Sabine Grã, Thomas Grombacher, Sankar Mitra, and Bernd Kaina. 1998. “Regulation of Expression of the DNA Repair Gene O 6 -Methylguanine-DNA Methyltransferase via Protein Kinase C-Mediated Signaling.” *Cancer Research*, 3950–56.

Bonner, William M, Christophe E Redon, Jennifer S Dickey, Asako J Nakamura, Olga A Sedelnikova, Stephanie Solier, and Yves Pommier. 2008. “[gamma]H2AX and Cancer.” *Nat Rev Cancer* 8 (12). Nature Publishing Group: 957–67. http://dx.doi.org/10.1038/nrc2523.

Bopp, A, F Wartlick, C Henninger, B Kaina, and G Fritz. 2013. “Rac1 Modulates Acute and Subacute Genotoxin-Induced Hepatic Stress Responses, Fibrosis and Liver Aging.” *Cell Death Disease* 4 (3). Nature Publishing Group: e558. doi:10.1038/cddis.2013.57. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519127.

Bos, Johannes L. 1989. “Ras Oncogenes in Human Cancer : A Review Ras Oncogenes in Human Cancer : A Review1”, 4682–89.

Bosco, Emily E, Wenjun Ni, Lei Wang, Fukun Guo, James F Johnson, and Yi Zheng. 2010. “Rac1 Targeting Suppresses p53 Deficiency-Mediated Lymphomagenesis.” *Blood* 115 (16): 3320–28. doi:10.1182/blood-2009-02-202440. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2858481&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Briegert, Manuela, Alexander H Enk, and Bernd Kaina. 2007. “Change in Expression of {MGMT} during Maturation of Human Monocytes into Dendritic Cells.” *{DNA} Repair* 6 (9): 1255–63. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.02.008. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786407000626.

Brooks, Christopher L, and Wei Gu. 2003. “Ubiquitination, Phosphorylation and Acetylation: The Molecular Basis for p53 Regulation.” *Current Opinion in Cell Biology* 15 (2): 164–71. doi:10.1016/S0955-0674(03)00003-6. http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067403000036.

Brown, BG, AJ Borschke, and DJ Doolittle. 2003. “An Analysis of the Role of Tobacco-Specific Nitrosamines in the Carcinogenicity of Tobacco Smoke.” *Nonlinearity in Biology, Toxicology, and …*. http://dose-response.metapress.com/index/7J702877G759H2P0.pdf.

Bunz, F, A Dutriaux, C Lengauer, T Waldman, S Zhou, J P Brown, J M Sedivy, K W Kinzler, and B Vogelstein. 1998. “Requirement for p53 and p21 to Sustain G2 Arrest After DNA Damage.” *Science* 282 (5393): 1497–1501. doi:10.1126/science.282.5393.1497. http://www.sciencemag.org/content/282/5393/1497.abstract.

Burgess, Darren J, Jason Doles, Lars Zender, Wen Xue, Beicong Ma, W Richard McCombie, Gregory J Hannon, Scott W Lowe, and Michael T Hemann. 2008. “Topoisomerase Levels Determine Chemotherapy Response in Vitro and in Vivo.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (26): 9053–58. doi:10.1073/pnas.0803513105.

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2435590&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Burma, S, B P Chen, M Murphy, a Kurimasa, and D J Chen. 2001. “ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-Strand Breaks.” *The Journal of Biological Chemistry* 276 (45): 42462–67. doi:10.1074/jbc.C100466200. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11571274.

Byun, Joo-Yun, Min-Jung Kim, Chang-Hwan Yoon, Hyukjin Cha, Gyesoon Yoon, and Su-Jae Lee. 2009. “Oncogenic Ras Signals through Activation of Both Phosphoinositide 3-Kinase and Rac1 to Induce c-Jun NH2-Terminal Kinase-Mediated, Caspase-Independent Cell Death.” *Molecular Cancer Research : MCR* 7 (9): 1534–42. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0542. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19723872.

Canman, Christine E, and Michael B Kastan. 1996. “Three Paths to Stress Relief.” *Nature* 384 (6606): 213–14. http://dx.doi.org/10.1038/384213a0.

Canman, Julie C, Lindsay Lewellyn, Kimberley Laband, Stephen J Smerdon, Bruce Bowerman, and Karen Oegema. 2009. “Inhibition of Rac by the GAP Activity of Centralspindilin Is Essential for Cytokinesis” 322 (5907): 1543–46. doi:10.1126/science.1163086.Inhibition.

Cao H, Phan H, Yang LX. 2012. “Improved Chemotherapy for Hepatocellular Carcinoma.” *Anticancer Research* 32 (4): 1379–86.

Cargnello, Marie, and Philippe P Roux. 2011. “Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 75 (1): 50–83. doi:10.1128/MMBR.00031-10. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3063353&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Cavallin, Lucas E, Qi Ma, Pascal Goldschmidt-Clermont, and Enrique a Mesri. 2010. “KSHV-Mediated ROS Induction Defines Novel Therapeutic Targets in Kaposi’s Sarcoma.” *Infectious Agents and Cancer* 5 (Suppl 1): A49. doi:10.1186/1750-9378-5-S1-A49. http://www.infectagentscancer.com/content/5/S1/A49.

Cegielska, Aleksandra, Kimberly Fish Gietzen, Ann Rivers, and David M Virshup. 1998. “ENZYMOLOGY : Autoinhibition of Casein Kinase I E (CKI E) Is Relieved by Protein Phosphatases and Limited Proteolysis Autoinhibition of Casein Kinase I ♪ (CKI ♪) Is Relieved by Protein Phosphatases and Limited Proteolysis *.”

Cells, P. 1996. “Cell Cycle-Dependent G2 / M Phase Arrest , Disruption B1 Activity Induced by Doxorubicin in Synchronized.”

Cha, Boram, Joo Weon Lim, Kyung Hwan Kim, and Hyeyong Kim. 2010. “HSP90beta Interacts with Rac1 to Activate NADPH Oxidase in Helicobacter Pylori-Infected Gastric Epithelial Cells.” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (9). Elsevier Ltd: 1455–61. doi:10.1016/j.biocel.2010.04.015. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20451655.

Chang, F, L S Steelman, J T Lee, J G Shelton, P M Navolanic, W L Blalock, R a Franklin, and J a McCubrey. 2003. “Signal Transduction Mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK Pathway from Cytokine Receptors to Transcription Factors: Potential Targeting for Therapeutic Intervention.” *Leukemia* 17 (7): 1263–93. doi:10.1038/sj.leu.2402945. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12835716.

Charles A Janeway, Jr, Paul Travers, Mark Walport, and Mark J Shlomchik. 2001. *The Immune System in Health and Disease*.

Chen, G, D Templeton, D P Suttle, and D W Stacey. 1999. “Ras Stimulates DNA Topoisomerase II Alpha through MEK: A Link between Oncogenic Signaling and a Therapeutic Target.” *Oncogene* 18 (50): 7149–60. doi:10.1038/sj.onc.1203149. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10597316.

Chen, XL, Qiang Zhang, Ruozhi Zhao, and Xiaoyu Ding. 2003. “Rac1 and Superoxide Are Required for the Expression of Cell Adhesion Molecules Induced by Tumor Necrosis Factor-A in Endothelial Cells.” *… of Pharmacology and …* 305 (2): 573–80. doi:10.1124/jpet.102.047894.in. http://jpet.aspetjournals.org/content/305/2/573.short.

Cheng, J Z, R Sharma, Y Yang, S S Singhal, a Sharma, M K Saini, S V Singh, P Zimniak, S Awasthi, and Y C Awasthi. 2001. “Accelerated Metabolism and Exclusion of 4-Hydroxynonenal through Induction of RLIP76 and hGST5.8 Is an Early Adaptive Response of Cells to Heat and Oxidative Stress.” *The Journal of Biological Chemistry* 276 (44): 41213–23. doi:10.1074/jbc.M106838200. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11522795.

Chikamori, Kenichi, Dale R Grabowski, Michael Kinter, Belinda B Willard, Satya Yadav, Ruedi H Aebersold, Ronald M Bukowski, et al. 2003. “Phosphorylation of Serine 1106 in the Catalytic Domain of Topoisomerase II Alpha Regulates Enzymatic Activity and Drug Sensitivity.” *The Journal of Biological Chemistry* 278 (15): 12696–702. doi:10.1074/jbc.M300837200. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12569090.

Chiu, Tim T, Thomas E Jensen, Lykke Sylow, Erik a Richter, and Amira Klip. 2011. “Rac1 Signalling towards GLUT4/glucose Uptake in Skeletal Muscle.” *Cellular Signalling* 23 (10). Elsevier Inc. 1546–54. doi:10.1016/j.cellsig.2011.05.022. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21683139.

Chlebowski, R T. 1979. “Adriamycin (doxorubicin) Cardiotoxicity: A Review.” *The Western Journal of Medicine* 131 (5): 364–68. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1271861&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Ciocca, Daniel R, Viviana R Rozados, F Darío Cuello Carrión, Silvia I Gervasoni, Pablo Matar, and O Graciela Scharovsky. 2003. “Hsp25 and Hsp70 in Rodent Tumors Treated with Doxorubicin and Lovastatin.” *Cell Stress & Chaperones* 8 (1): 26–36. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=514851&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Clavel, Stephan, Sandrine Siffroi-Fernandez, Anne Sophie Coldefy, Kim Boulukos, Didier F Pisani, and Benoît Dérijard. 2010. “Regulation of the Intracellular Localization of Foxo3a by Stress-Activated Protein Kinase Signaling Pathways in Skeletal Muscle Cells.” *Molecular and Cellular Biology* 30 (2): 470–80. doi:10.1128/MCB.00666-09. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2798458&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Clerk, Angela, Fong H Pham, Stephen J Fuller, Erik Sahai, Klaus Aktories, Richard Marais, Chris Marshall, and Peter H Sugden. 2001. “Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinases in Cardiac Myocytes through the Small G Protein Rac1” 21 (4): 1173–84. doi:10.1128/MCB.21.4.1173.

Crick, Dean C, Douglas A Andres, Romano Danesi, Marco Macchia, and Charles J Waechter. 1998. "Geranylgeraniol Overcomes the Block of Cell Proliferation by Lovastatin in C6 Glioma Cells." *Journal of Neurochemistry* 70 (6). Blackwell Science Ltd: 2397–2405. doi:10.1046/j.1471-4159.1998.70062397.x. http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70062397.x.

Damrot, J, T Nübel, B Epe, W P Roos, B Kaina, and G Fritz. 2006. "Lovastatin Protects Human Endothelial Cells from the Genotoxic and Cytotoxic Effects of the Anticancer Drugs Doxorubicin and Etoposide." *British Journal of Pharmacology* 149 (8): 988–97. doi:10.1038/sj.bjp.0706953. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2014634&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Davis, Matthew J, Byung Hak Ha, Edna C Holman, Ruth Halaban, Joseph Schlessinger, and Titus J Boggon. 2013. "RAC1P29S Is a Spontaneously Activating Cancer-Associated GTPase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (3): 912–17. doi:10.1073/pnas.1220895110. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23284172.

Degos, F, C Christidis, N Ganne-Carrie, J P Farmachidi, C Degott, C Guettier, J C Trinchet, M Beaugrand, and S Chevret. 2000. "Hepatitis C Virus Related Cirrhosis: Time to Occurrence of Hepatocellular Carcinoma and Death." *Gut* 47 (1): 131–36. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1727946&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Demidenko, Z N, C Vivo, H D Halicka, C J Li, K Bhalla, E V Broude, and M V Blagosklonny. 2006. "Pharmacological Induction of Hsp70 Protects Apoptosis-Prone Cells from Doxorubicin: Comparison with Caspase-Inhibitor- and Cycle-Arrest-Mediated Cytoprotection." *Cell Death and Differentiation* 13 (9): 1434–41. doi:10.1038/sj.cdd.4401812. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16311509.

Deplazes, Joëlle, Margit Fuchs, Sandra Rauser, Harald Genth, Ernst Lengyel, Raymonde Busch, and Birgit Luber. 2009. "Rac1 and Rho Contribute to the Migratory and Invasive Phenotype Associated with Somatic E-Cadherin Mutation." *Human Molecular Genetics* 18 (19): 3632–44. doi:10.1093/hmg/ddp312. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19584084.

Deshpande, S. S. 2002. "Constitutive Activation of rac1 Results in Mitochondrial Oxidative Stress and Induces Premature Endothelial Cell Senescence." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (1): 1e–6. doi:10.1161/01.ATV.0000047869.13737.53. http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.0000047869.13737.53.

Dhillon, a S, S Hagan, O Rath, and W Kolch. 2007. "MAP Kinase Signalling Pathways in Cancer." *Oncogene* 26 (22): 3279–90. doi:10.1038/sj.onc.1210421. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17496922.

Downward, Julian. 2003. "Targeting RAS Signalling Pathways in Cancer Therapy." *Nat Rev Cancer* 3 (1): 11–22. http://dx.doi.org/10.1038/nrc969.

Dranoff, Glenn. 2004. "Cytokines in Cancer Pathogenesis and Cancer Therapy." *Nat Rev Cancer* 4 (1). Nature Publishing Group: 11–22. http://dx.doi.org/10.1038/nrc1252.

Dunkern, Torsten R, Inga Wedemeyer, Manuela Baumgärtner, Gerhard Fritz, and Bernd Kaina. 2003. "Resistance of p53 Knockout Cells to Doxorubicin Is Related to Reduced Formation of DNA Strand Breaks rather than Impaired Apoptotic Signaling." *DNA Repair* 2 (1): 49–60.

doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1568-7864(02)00185-4. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786402001854.

Durbecq, Virginie, Marianne Paesmans, Fatima Cardoso, Christine Desmedt, Angelo Di Leo, Stephen Chan, Kay Friedrichs, et al. 2004a. "Topoisomerase-II A Expression as a Predictive Marker in a Population of Advanced Breast Cancer Patients Randomly Treated Either with Single-Agent Doxorubicin or Single-Agent Docetaxel Topoisomerase-II A Expression as a Predictive Marker in a Population of."

Ebi, Hiromichi, Carlotta Costa, Anthony C Faber, Madhuri Nishtala, Hiroshi Kotani, Dejan Juric, Patricia Della Pelle, et al. 2013. "PI3K Regulates MEK/ERK Signaling in Breast Cancer via the Rac-GEF, P-Rex1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (52): 21124–29. doi:10.1073/pnas.1314124110. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3876254&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Eblen, ST, and JK Slack. 2002. "-Rac-PAK Signaling Stimulates Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Activation by Regulating Formation of MEK1-ERK Complexes." *Molecular and …*. doi:10.1128/MCB.22.17.6023. http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Rac-PAK+Signaling+Stimulates+Extracellular+Signal-Regulated+Kinase+(+ERK+)+Activation+by+Regulating+Formation+of+MEK1-ERK+Complexes+Rac-PAK+Signaling+Stimulates+Extracellular+Signal-Regulated+Kinase+(+ERK+)+Activation+by+Regulating+Formation+of+MEK1-ERK+C#1.

Eferl, Robert, Romeo Ricci, Lukas Kenner, Rainer Zenz, Jean-Pierre David, Martina Rath, and Erwin F Wagner. 2003. "Liver Tumor Development: C-Jun Antagonizes the Proapoptotic Activity of p53." *Cell*. Cell Press. http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867403000424.

Efuet, Ekem T, and Khandan Keyomarsi. 2006. "Farnesyl and Geranylgeranyl Transferase Inhibitors Induce G1 Arrest by Targeting the Proteasome." *Cancer Research* 66 (2): 1040–51. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3416. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424040.

Elizabeth Brandon-Warner, B.S., 1, 2 Tracy L. Walling, B.S., 1 Laura W. Schrum, Ph.D., 2, 3 and Iain H. McKillop, Ph. 2012. "Chronic Ethanol Feeding Accelerates Hepatocellular Carcinoma Progression in a Sex-Dependent Manner in a Mouse Model of Hepatocarcinogesis." *Alcohol Clin Exp Res* 36 (4): 641–53. doi:10.1111/j.1530-0277.2011.01660.x.Chronic.

Engers, Rainer, Thomas P Zwaka, Lutz Gohr, Achim Weber, Claus-Dieter Gerharz, and Helmut E Gabbert. 2000. "Rho GTPase Function in Tumorigenesis." *International Journal of Cancer* 88 (3). John Wiley & Sons, Inc. 369–76. doi:10.1002/1097-0215(20001101)88:3<369::AID-IJC8>3.0.CO;2-K. http://dx.doi.org/10.1002/1097-0215(20001101)88:3<369::AID-IJC8>3.0.CO.

Faix, Jan, and Igor Weber. 2013. "A Dual Role Model for Active Rac1 in Cell Migration." *Small GTPases* 4 (2): 110–15. doi:10.4161/sgtp.23476. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3747251&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Fattovich, Giovanna, Tommaso Stroffolini, Irene Zagni, and Francesco Donato. 2004. "Hepatocellular Carcinoma in Cirrhosis: Incidence and Risk Factors." *Gastroenterology*. W.B. Saunders. http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508504015938?showall=true.

Feleszko, Wojciech, Izabela Mlynarczuk, Ewa Z Balkowiec-iskra, Izabela Młynarczuk, and Tomasz Stokłosa. 2000a. “Lovastatin Potentiates Antitumor Activity and Attenuates Cardiotoxicity of Doxorubicin in Three Tumor Models in Mice Lovastatin Potentiates Antitumor Activity and Attenuates Cardiotoxicity of Doxorubicin in Three Tumor”, 2044–52.

———. 2000b. “Lovastatin Potentiates Antitumor Activity and Attenuates Cardiotoxicity of Doxorubicin in Three Tumor Models in Mice Lovastatin Potentiates Antitumor Activity and Attenuates Cardiotoxicity of Doxorubicin in Three Tumor”, 2044–52.

Force, Thomas, Daniela S Krause, and Richard A Van Etten. 2007. “Molecular Mechanisms of Cardiotoxicity of Tyrosine Kinase Inhibition.” *Nat Rev Cancer* 7 (5). Nature Publishing Group: 332–44. http://dx.doi.org/10.1038/nrc2106.

Frank, Natasha Y, Armen Margaryan, Ying Huang, Tobias Schatton, Ana Maria Waaga-Gasser, Martin Gasser, Mohamed H Sayegh, Wolfgang Sadee, and Markus H Frank. 2005. “ABCB5-Mediated Doxorubicin Transport and Chemoresistance in Human Malignant Melanoma.” *Cancer Research* 65 (10): 4320–33. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3327. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15899824.

Fu, Dragony, Jennifer A Calvo, and Leona D Samson. 2012. “Balancing Repair and Tolerance of DNA Damage Caused by Alkylating Agents.” *Nat Rev Cancer* 12 (2). Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved. 104–20. http://dx.doi.org/10.1038/nrc3185.

Gao, Ya-sheng, Charlotte C Hubbert, Jianrong Lu, Yi-shan Lee, Joo-yong Lee, and Tso-pang Yao. 2007. “Histone Deacetylase 6 Regulates Growth Factor-Induced Actin” 27 (24): 8637–47. doi:10.1128/MCB.00393-07.

Gao, Yuan, J Bradley Dickerson, Fukun Guo, Jie Zheng, and Yi Zheng. 2004. “Rational Design and Characterization of a Rac GTPase-Specific Small Molecule Inhibitor” 101 (20).

Gewirtz, David A. 1999. “COMMENTARY A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin” 57 (98): 727–41.

Gewirtz, DavidA. 1999. “A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin.” *Biochemical Pharmacology* 57 (7): 727–41. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00307-4. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295298003074.

Glogauer, M., C. C. Marchal, F. Zhu, a. Worku, B. E. Clausen, I. Foerster, P. Marks, G. P. Downey, M. Dinauer, and D. J. Kwiatkowski. 2003. “Rac1 Deletion in Mouse Neutrophils Has Selective Effects on Neutrophil Functions.” *The Journal of Immunology* 170 (11): 5652–57. doi:10.4049/jimmunol.170.11.5652. http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.170.11.5652.

Goswami, P C, J L Roti Roti, and C R Hunt. 1996. “The Cell Cycle-Coupled Expression of Topoisomerase IIalpha during S Phase Is Regulated by mRNA Stability and Is Disrupted by Heat Shock or Ionizing Radiation.” *Molecular and Cellular Biology* 16 (4): 1500–1508. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=231134&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Graf, Hannah, Christoph Jüngst, Gundula Straub, Selin Dogan, Ralf-Thorsten Hoffmann, Tobias Jakobs, Maximilian Reiser, et al. 2008. “Chemoembolization Combined with Pravastatin Improves Survival in Patients with Hepatocellular Carcinoma.” *Digestion* 78 (1): 34–38. doi:10.1159/000156702. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18797167.

Graves, Robert J, and Peter F Swann. 1993. “Clearance of N-Nitrosodimethylamine and N-Nitrosodiethylamine by the Perfused Rat Liver: Relationship to the Km, and Vmax for Nitrosamine Metabolism.” *Biochemical Pharmacology* 45 (5): 983–89. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(93)90240-W. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000629529390240W.

Greer, Eric L, and Anne Brunet. 2008. “Signaling Networks in Aging.” *Journal of Cell Science* 121 (Pt 4): 407–12. doi:10.1242/jcs.021519. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18256383.

Grozav, Adrian G, Kenichi Chikamori, Toshiyuki Kozuki, Dale R Grabowski, Ronald M Bukowski, Belinda Willard, Michael Kinter, Anni H Andersen, Ram Ganapathi, and Mahrukh K Ganapathi. 2009a. “Casein Kinase I Delta/epsilon Phosphorylates Topoisomerase IIalpha at Serine-1106 and Modulates DNA Cleavage Activity.” *Nucleic Acids Research* 37 (2): 382–92. doi:10.1093/nar/gkn934. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2632902&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Grundy, Scott M, and San Diego. 1978. “Medical Progress Cholesterol Metabolism in Man”, 13–25.

Guo, Fukun, Jose a Cancelas, David Hildeman, David a Williams, and Yi Zheng. 2008. “Rac GTPase Isoforms Rac1 and Rac2 Play a Redundant and Crucial Role in T-Cell Development.” *Blood* 112 (5): 1767–75. doi:10.1182/blood-2008-01-132068. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2518885&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Guo, Fukun, Yuan Gao, Lei Wang, and Yi Zheng. 2003. “p19Arf-p53 Tumor Suppressor Pathway Regulates Cell Motility by Suppression of Phosphoinositide 3-Kinase and Rac1 GTPase Activities.” *The Journal of Biological Chemistry* 278 (16): 14414–19. doi:10.1074/jbc.M300341200. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12578823.

Halet, Guillaume, and John Carroll. 2007. “Rac Activity Is Polarized and Regulates Meiotic Spindle Stability and Anchoring in Mammalian Oocytes.” *Developmental Cell*. Cell Press,. http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580706005739.

Hamalukic, Melanie, Johannes Huelsenbeck, Arno Schad, Stefan Wirtz, Bernd Kaina, and Gerhard Fritz. 2011. “Rac1-Regulated Endothelial Radiation Response Stimulates Extravasation and Metastasis That Can Be Blocked by HMG-CoA Reductase Inhibitors.” *PloS One* 6 (10): e26413. doi:10.1371/journal.pone.0026413. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3198428&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Hanahan, Douglas, and Robert a Weinberg. 2011. “Hallmarks of Cancer: The next Generation.” *Cell* 144 (5). Elsevier Inc. 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230.

Hassan, Manal M, Lu-Yu Hwang, Chiq J Hatten, Mark Swaim, Donghui Li, James L Abbruzzese, Palmer Beasley, and Yehuda Z Patt. 2002. “Risk Factors for Hepatocellular Carcinoma: Synergism of

Alcohol with Viral Hepatitis and Diabetes Mellitus." *Hepatology* 36 (5). W.B. Saunders: 1206–13. doi:10.1053/jhep.2002.36780. http://dx.doi.org/10.1053/jhep.2002.36780.

Havens, Courtney G, Alan Ho, Naohisa Yoshioka, and Steven F Dowdy. 2006. "Regulation of Late G1/S Phase Transition and APC Cdh1 by Reactive Oxygen Species." *Molecular and Cellular Biology* 26 (12): 4701–11. doi:10.1128/MCB.00303-06. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1489138&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Hawksworth, G, and MJ Hill. 1971. "The Formation of Nitrosamines by Human Intestinal Bacteria." *Biochem. J.* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1177688/pdf/biochemj00606-0003.pdf.

Hennig, Matthew, MT Yip-Schneider, and Patrick Klein. 2009. "Ethanol-TGFα-MEK Signaling Promotes Growth of Human Hepatocellular Carcinoma." *Journal of Surgical …* 154 (2): 187–95. doi:10.1016/j.jss.2008.11.836.Ethanol-TGF. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022480408014911.

Henninger, C et al. 2012. "The Lipid Lowering Drug Lovastatin Protects against Doxorubicin-Induced Hepatotoxicity." *Toxicol Appl Pharamcol* 15 (261): 66–73.

Hilger, R A, M E Scheulen, and D Strumberg. 2002. "The Ras-Raf-MEK-ERK Pathway in the Treatment of Cancer." *Oncology Research and Treatment* 25 (6): 511–18. http://www.karger.com/DOI/10.1159/000068621.

Hinde, Elizabeth, Kyoko Yokomori, Katharina Gaus, Klaus M Hahn, and Enrico Gratton. 2014. "Fluctuation-Based Imaging of Nuclear Rac1 Activation by Protein Oligomerisation." *Scientific Reports* 4 (January): 4219. doi:10.1038/srep04219. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24573109.

Hinterleitner, C, J Huelsenbeck, C Henninger, F Wartlick, A Schorr, B Kaina, and G Fritz. 2013. "Rac1 Signaling Protects Monocytic AML Cells Expressing the MLL-AF9 Oncogene from Caspase-Mediated Apoptotic Death." *Apoptosis an International Journal on Programmed Cell Death*. doi:10.1007/s10495-013-0842-6. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23624644.

Huelsenbeck, J, C Henninger, a Schad, K J Lackner, B Kaina, and G Fritz. 2011a. "Inhibition of Rac1 Signaling by Lovastatin Protects against Anthracycline-Induced Cardiac Toxicity." *Cell Death & Disease* 2 (8). Nature Publishing Group: e190. doi:10.1038/cddis.2011.65. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3181415&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Huelsenbeck, Stefanie C, Anne Schorr, Wynand P Roos, Johannes Huelsenbeck, Christian Henninger, Bernd Kaina, and Gerhard Fritz. 2012. "Rac1 Protein Signaling Is Required for DNA Damage Response Stimulated by Topoisomerase II Poisons." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (46): 38590–99. doi:10.1074/jbc.M112.377903. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23012366.

Hui, Lijian, Latifa Bakiri, Andreas Mairhorfer, Norbert Schweifer, Christian Haslinger, Lukas Kenner, Vukoslav Komnenovic, Harald Scheuch, Hartmut Beug, and Erwin F Wagner. 2007. "p38[alpha] Suppresses Normal and Cancer Cell Proliferation by Antagonizing the JNK-c-Jun Pathway." *Nat Genet* 39 (6): 741–49. http://dx.doi.org/10.1038/ng2033.

Hui, Lijian, Kurt Zatloukal, Harald Scheuch, Ewa Stepniak, and Erwin F Wagner. 2008. “Proliferation of Human HCC Cells and Chemically Induced Mouse Liver Cancers Requires JNK1-Dependent p21 Downregulation” 118 (12): 3943–53. doi:10.1172/JCI37156DS1.

Hutchinson, Lisa. 2011. “Targeted Therapies: Doxorubicin and Sorafenib Improves Survival in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma.” *Nature Reviews Clinical Oncology* 8 (2). Nature Publishing Group: 61–61. doi:10.1038/nrclinonc.2010.208. http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrclinonc.2010.208.

Huttunen, KM, Hannu Raunio, and Jarkko Rautio. 2011. “Prodrugs—from Serendipity to Rational Design.” *Pharmacological Reviews* 63 (3): 750–71. doi:10.1124/pr.110.003459.enzymatic. http://intl.pharmrev.org/content/63/3/750.short.

Inano, H, K Suzuki, M Onoda, and K Wakabayashi. 1997. “Anti-Carcinogenic Activity of Simvastatin during the Promotion Phase of Radiation-Induced Mammary Tumorigenesis of Rats.” *Carcinogenesis* 18 (9): 1723–27. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9328167.

Isaacs, R J, S L Davies, M I Sandri, C Redwood, N J Wells, and I D Hickson. 1998. “Physiological Regulation of Eukaryotic Topoisomerase II.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1400 (1-3): 121–37. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9748535.

Ishida, R, R Takashima, T Koujin, M Shibata, N Nozaki, M Seto, H Mori, T Haraguchi, and Y Hiraoka. 2001. “Mitotic Specific Phosphorylation of Serine-1212 in Human DNA Topoisomerase IIalpha.” *Cell Structure and Function* 26 (4): 215–26. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11699638.

Jackson, P., and D. Gleeson. 2010. “Alcoholic Liver Disease.” *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain* 10 (3): 66–71. doi:10.1093/bjaceaccp/mkq010. http://bjarev.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/bjaceaccp/mkq010.

Jeanes, a, C J Gottardi, and a S Yap. 2008. “Cadherins and Cancer: How Does Cadherin Dysfunction Promote Tumor Progression?” *Oncogene* 27 (55): 6920–29. doi:10.1038/onc.2008.343. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2745643&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Jefferies, C. a. 2000. “Rac1 Regulates Interleukin 1-Induced Nuclear Factor Kappa B Activation in an Inhibitory Protein Kappa Balpha -Independent Manner by Enhancing the Ability of the p65 Subunit to Transactivate Gene Expression.” *Journal of Biological Chemistry* 275 (5): 3114–20. doi:10.1074/jbc.275.5.3114. http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.275.5.3114.

Jin, Shi, Ramesh M Ray, and Leonard R Johnson. 2008. “TNF-A/cycloheximide-Induced Apoptosis in Intestinal Epithelial Cells Requires Rac1-Regulated Reactive Oxygen Species” 294 (4): G928–G937. http://ajpgi.physiology.org/highwire/citation/15100/mendeley.

Johnson, Philip, Jennifer J Knox, Irina Davidenko, Juan Lacava, and Thomas Leung. 2010. “Doxorubcin Plus Sorafenib vs Doxorubicin Alone in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma” 304 (19).

Kadamur, Ganesh, and Elliott M Ross. 2013. “Mammalian Phospholipase C.” *Annual Review of Physiology* 75 (1). Annual Reviews: 127–54. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183750. http://dx.doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183750.

Kang, J. S., H. Wanibuchi, K. Morimura, F. J. Gonzalez, and S. Fukushima. 2007. “Role of CYP2E1 in Diethylnitrosamine-Induced Hepatocarcinogenesis In Vivo.” *Cancer Research* 67 (23): 11141–46. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1369. http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-07-1369.

Kang, Jin Seok, Hideki Wanibuchi, Keiichirou Morimura, Frank J Gonzalez, and Shoji Fukushima. 2007. “Role of CYP2E1 in Diethylnitrosamine-Induced Hepatocarcinogenesis in Vivo.” *Cancer Research* 67 (23): 11141–46. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1369. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18056438.

Karandikar, M, S Xu, and M H Cobb. 2000. “MEKK1 Binds Raf-1 and the ERK2 Cascade Components.” *The Journal of Biological Chemistry* 275 (51): 40120–27. doi:10.1074/jbc.M005926200. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10969079.

Karlsson, R, E D Pedersen, Z Wang, and Cord Brakebusch. 2009. “Rho {GTPase} Function in Tumorigenesis.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1796 (2): 91–98. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.03.003. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304419X09000110.

Kashii, Yoshifumi, Mie Uchida, and Keita Kirito. 2000. “Family Transcription Factor, FKHRL1, Is One of the Downstream Molecules of Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Activation Pathway in Erythropoietin Signal Transduction.” … 96 (3): 941–49. http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/96/3/941.short.

Katerina Mardilovich, Michael F Olson, and Mark Baugh. 2012. “Targeting Rho GTPase Signaling for Cancer Therapy.” *Future Oncology* 8 (2): 165–77.

Keshet, Yonat, and Rony Seger. 2010. “The MAP Kinase Signaling Cascades: A System of Hundreds of Components Regulates a Diverse Array of Physiological Functions.” In *MAP Kinase Signaling Protocols SE - 1*, edited by Rony Seger, 661:3–38. Methods in Molecular Biology. Humana Press. doi:10.1007/978-1-60761-795-2_1. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-795-2_1.

Kim, Jayoung, and MichaelR. Freeman. 2003. “JNK/SAPK Mediates Doxorubicin-Induced Differentiation and Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells.” *Breast Cancer Research and Treatment* 79 (3). Kluwer Academic Publishers: 321–28. doi:10.1023/A:1024043302583. http://dx.doi.org/10.1023/A:1024043302583.

Kissil, Joseph L, Marita J Walmsley, Linda Hanlon, Kevin M Haigis, Carla F Bender Kim, Alejandro Sweet-Cordero, Matthew S Eckman, et al. 2007. “Requirement for Rac1 in a K-Ras Induced Lung Cancer in the Mouse.” *Cancer Research* 67 (17): 8089–94. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2300. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17804720.

Klein, HL. 2008. “The Consequences of Rad51 Overexpression for Normal and Tumor Cells.” *DNA Repair* 7 (5): 686–93. doi:10.1016/j.dnarep.2007.12.008.The. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568786407004442.

Kleinrock, M. 2012. “The Use of Medicines in the United States : Review of 2011”, no. April.

Konstandi, Maria, Jie Cheng, and Frank J Gonzalez. 2013. “Sex Steroid Hormones Regulate Constitutive Expression of Cyp2e1 in Female Mouse Liver.” *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 304 (10): E1118–28. doi:10.1152/ajpendo.00585.2012. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23548611.

Krauthammer, Michael, Yong Kong, Byung Hak Ha, Perry Evans, Antonella Bacchiocchi, James P McCusker, Elaine Cheng, et al. 2012. “Exome Sequencing Identifies Recurrent Somatic RAC1 Mutations in Melanoma.” *Nat Genet* 44 (9). Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved. 1006–14. http://dx.doi.org/10.1038/ng.2359.

Krebs in Deutschland 2009/2010 9.Ausgabe. 2013. *Robert Koch-Institut (Hrsg) Und Die Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin*.

Kreisberg, R a. 1991. “Reductase Inhibitor Therapy of Hypercholesterolemia.” *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 102 (January): 153–63; discussion 163–5. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2376652&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Kuo, Macus Tien, Zesheng Liu, Yingjie Wei, Shigeru Tatebe, Gordon B Mills, and Hitoshi Unate. 2002. “Induction of Human MDR1 Gene Expression by 2-Acetylamino Flouorene Is Mediated by E Ectors of the Phosphoinositide 3-Kinase Pathway That Activate NF- K B Signaling” 22 (October 2001). doi:10.1038/sj/onc/1205117.

Kushida, H, K Fujita, a Suzuki, M Yamada, T Endo, T Nohmi, and T Kamataki. 2000. “Metabolic Activation of N-Alkylnitrosamines in Genetically Engineered Salmonella Typhimurium Expressing CYP2E1 or CYP2A6 Together with Human NADPH-Cytochrome P450 Reductase.” *Carcinogenesis* 21 (6): 1227–32. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837014.

Lanning, Cathy Cole, Janelle L Daddona, Rebecca Ruiz-Velasco, Shulamith H Shafer, and Carol L Williams. 2004. “The Rac1 C-Terminal Polybasic Region Regulates the Nuclear Localization and Protein Degradation of Rac1.” *The Journal of Biological Chemistry* 279 (42): 44197–210. doi:10.1074/jbc.M404977200. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15304504.

Lee, Jeeyun, Inkyoung Lee, Chaehwa Park, and Won Ki Kang. 2006. “Lovastatin-Induced RhoA Modulation and Its Effect on Senescence in Prostate Cancer Cells.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 339 (3): 748–54. doi:10.1016/j.bbrc.2005.11.075. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16316623.

Lee, Jeong Goo, and EunDuck P Kay. 2011a. “PI 3-kinase/Rac1 and ERK1/2 Regulate FGF-2-Mediated Cell Proliferation through Phosphorylation of p27 at Ser10 by KIS and at Thr187 by Cdc25A/Cdk2.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (1): 417–26. doi:10.1167/iovs.10-6140. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3053288&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Lee, Terence, Tracy Lau, and Irene Ng. 2002. “Doxorubicin-Induced Apoptosis and Chemosensitivity in Hepatoma Cell Lines.” *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 49 (1). Springer-Verlag: 78–86. doi:10.1007/s00280-001-0376-4. http://dx.doi.org/10.1007/s00280-001-0376-4.

Lees, Simon J, Tom E Childs, and Frank W Booth. 2008. “Age-Dependent FOXO Regulation of p27 Kip1 Expression via a Conserved Binding Motif in Rat Muscle Precursor Cells” 1582: 1238–46. doi:10.1152/ajpcell.00349.2008.

Levrero, M. 2006. “Viral Hepatitis and Liver Cancer: The Case of Hepatitis C.” *Oncogene* 25 (27): 3834–47. doi:10.1038/sj.onc.1209562. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16799625.

Li, Siwei, Qian Wang, Yi Wang, Xinmei Chen, and Zhixiang Wang. 2009. “PLC-gamma1 and Rac1 Coregulate EGF-Induced Cytoskeleton Remodeling and Cell Migration.” *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 23 (6): 901–13. doi:10.1210/me.2008-0368. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19264842.

Li, T K, a Y Chen, C Yu, Y Mao, H Wang, and L F Liu. 1999. “Activation of Topoisomerase II-Mediated Excision of Chromosomal DNA Loops during Oxidative Stress.” *Genes & Development* 13 (12): 1553–60. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=316815&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Li, Xiaohua, Mark a Frye, and Richard C Shelton. 2012. “Review of Pharmacological Treatment in Mood Disorders and Future Directions for Drug Development.” *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 37 (1). Nature Publishing Group: 77–101. doi:10.1038/npp.2011.198. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3238080&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Lim, Kian-Huat, Donita C Brady, David F Kashatus, Brooke B Ancrile, Channing J Der, Adrienne D Cox, and Christopher M Counter. 2010. “Aurora-A Phosphorylates, Activates, and Relocalizes the Small GTPase RalA.” *Molecular and Cellular Biology* 30 (2): 508–23. doi:10.1128/MCB.00916-08. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2798468&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Liochev, Stefan I. 2013. “Reactive Oxygen Species and the Free Radical Theory of Aging.” *Free Radical Biology and Medicine* 60 (0): 1–4. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584913000646.

Lipshultz, Steven E, Tracie L Miller, Stuart R Lipsitz, Donna S Neuberg, Suzanne E Dahlberg, Steven D Colan, Lewis B Silverman, et al. 2012. “Continuous Versus Bolus Infusion of Doxorubicin in Children With ALL: Long-Term Cardiac Outcomes.” *Pediatrics* 130 (6): 1003–11. doi:10.1542/peds.2012-0727. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3507254&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Liu, Jiahao, Weike Mao, Bo Ding, and Chang-seng Liang. 2008. “ERKs/p53 Signal Transduction Pathway Is Involved in Doxorubicin-Induced Apoptosis in H9c2 Cells and Cardiomyocytes.” *American Journal of Physiology- …* 02118: 1956–65. doi:10.1152/ajpheart.00407.2008. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2614569/.

Liu, Jinbao, Hanqiao Zheng, Mingxin Tang, Youn-Chul Ryu, and Xuejun Wang. 2008. “A Therapeutic Dose of Doxorubicin Activates Ubiquitin-Proteasome System-Mediated Proteolysis by Acting on Both the Ubiquitination Apparatus and Proteasome.” *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 295 (6): H2541–50. doi:10.1152/ajpheart.01052.2008. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2654028&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Liu, Wendy F, Celeste M Nelson, Dana M Pirone, and Christopher S Chen. 2006. “E-Cadherin Engagement Stimulates Proliferation via Rac1.” *The Journal of Cell Biology* 173 (3): 431–41. doi:10.1083/jcb.200510087. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2063843&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Llovet, Josep M, Sergio Ricci, Vincenzo Mazzaferro, Philip Hilgard, Edward Gane, Jean-Frédéric Blanc, Andre Cosme de Oliveira, et al. 2008. “Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma.” *New England Journal of Medicine* 359 (4). Massachusetts Medical Society: 378–90. doi:10.1056/NEJMoa0708857. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0708857.

Loeppen, Sandra, Daniela Schneider, Frank Gaunitz, Rolf Gebhardt, Raffael Kurek, Albrecht Buchmann, and Michael Schwarz. 2002a. “Overexpression of Glutamine Synthetase Is Associated with B -Catenin-Mutations in Mouse Liver Tumors during Promotion of Hepatocarcinogenesis by Phenobarbital Overexpression of Glutamine Synthetase Is Associated with ␣ -Catenin-Mutations in Mouse Liver Tu”, 5685–88.

Lonardo, Amedeo, and Paola Loria. 2012. “Potential for Statins in the Chemoprevention and Management of Hepatocellular Carcinoma.” *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 27 (11): 1654–64. doi:10.1111/j.1440-1746.2012.07232.x. http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1746.2012.07232.x.

Lossaint, G, E Besnard, D Fisher, J Piette, and V Dulic. 2011. “Chk1 Is Dispensable for G2 Arrest in Response to Sustained DNA Damage When the ATM/p53/p21 Pathway Is Functional.” *Oncogene* 30 (41). Macmillan Publishers Limited: 4261–74. http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.135.

Lou, Zhenkun, Katherine Minter-Dykhouse, and Junjie Chen. 2005. “BRCA1 Participates in DNA Decatenation.” *Nature Structural & Molecular Biology* 12 (7): 589–93. doi:10.1038/nsmb953. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15965487.

Lyu, Yi Lisa, John E Kerrigan, Chao-Po Lin, Anna M Azarova, Yuan-Chin Tsai, Yi Ban, and Leroy F Liu. 2007. “Topoisomerase IIbeta Mediated DNA Double-Strand Breaks: Implications in Doxorubicin Cardiotoxicity and Prevention by Dexrazoxane.” *Cancer Research* 67 (18): 8839–46. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1649. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17875725.

M. Dollinger. 2014. “Sorafenib Tosylate with or without Doxorubicin Hydrochloride in Treating Patients with Locally Advanced or Metastatic Liver Cancer.” http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01015833?term=nct01015833&rank=1.

M. Raiteri. 1995. “The Pharmacology of the Statins: The Evidence of a Direct Antiatherosclerotic Action.” *Ann Ital Med Int.* 10: 35–42.

Magee, B Y P N. 1956. “THE METABOLISM OF DIMETHYLNITROSAMINE” 41 (1925): 676–82.

Maltese, WA. 1990. “Posttranslational Modification of Proteins by Isoprenoids in Mammalian Cells.” *The FASEB Journal*. http://www.fasebj.org/content/4/15/3319.short.

Mao, Y, S D Desai, C Y Ting, J Hwang, and L F Liu. 2001. “26 S Proteasome-Mediated Degradation of Topoisomerase II Cleavable Complexes.” *The Journal of Biological Chemistry* 276 (44): 40652–58. doi:10.1074/jbc.M104009200. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11546768.

Marinković G1, Kroon J, Hoogenboezem M, Hoeben KA, Ruiter MS, Kurakula K, Otermin Rubio I, Vos M, de Vries CJ, van Buul JD, de Waard V. 2014. “Inhibition of GTPase Rac1 in Endothelium by 6-Mercaptopurine Results in Immunosuppression in Nonimmune Cells: New Target for an Old Drug.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192: 4370–78.

Maroto, B, M B Ye, K von Lohneysen, a Schnelzer, and U G Knaus. 2008a. “P21-Activated Kinase Is Required for Mitotic Progression and Regulates Plk1.” *Oncogene* 27 (36): 4900–4908. doi:10.1038/onc.2008.131. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18427546.

Matsumura, Takuya, Reiko Makino, and Keiji Mitamura. 2001. “Frequent Down-Regulation of E-Cadherin by Genetic and Epigenetic Changes in the Malignant Progression of Hepatocellular Carcinomas Frequent Down-Regulation of E-Cadherin by Genetic and Epigenetic Changes in the Malignant Progression of”, 594–99.

Mehlen, Patrick, and Alain Puisieux. 2006. “Metastasis: A Question of Life or Death.” *Nat Rev Cancer* 6 (6). Nature Publishing Group: 449–58. http://dx.doi.org/10.1038/nrc1886.

Meissner, Torsten, Eberhard Krause, and Uwe Vinkemeier. 2004. “Ratjadone and Leptomycin B Block CRM1-Dependent Nuclear Export by Identical Mechanisms.” *FEBS Letters* 576 (1–2): 27–30. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.056. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579304010750.

Michaelson, David, Wasif Abidi, Daniele Guardavaccaro, Mo Zhou, Ian Ahearn, Michele Pagano, and Mark R Philips. 2008a. “Rac1 Accumulates in the Nucleus during the G2 Phase of the Cell Cycle and Promotes Cell Division.” *The Journal of Cell Biology* 181 (3): 485–96. doi:10.1083/jcb.200801047. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2364699&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Min, Lihua, Baokun He, and Lijian Hui. 2011. “Mitogen-Activated Protein Kinases in Hepatocellular Carcinoma Development.” *Seminars in Cancer Biology* 21 (1). Elsevier Ltd: 10–20. doi:10.1016/j.semcancer.2010.10.011. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20969960.

Minton, Kirsty. 2003. “Rac-King up New Roles in Haematopoiesis.” *Nat Rev Immunol* 3 (12): 925. http://dx.doi.org/10.1038/nri1253.

Mirski, Shelagh E L, Kathryn E Sparks, Beate Friedrich, Matthias Köhler, Yin-Yuan Mo, William T Beck, and Susan P C Cole. 2007. “Topoisomerase {II} Binds Importin A Isoforms and exportin/CRM1 but Does Not Shuttle between the Nucleus and Cytoplasm in Proliferating Cells.” *Experimental Cell Research* 313 (3): 627–37. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.11.004. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482706004629.

Mitacek, E J, K D Brunnemann, M Suttajit, N Martin, T Limsila, H Ohshima, and L S Caplan. 1999. “Exposure to N-Nitroso Compounds in a Population of High Liver Cancer Regions in Thailand: Volatile Nitrosamine (VNA) Levels in Thai Food.” *Food and Chemical Toxicology* 37 (4): 297–305. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00017-4. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691599000174.

Molina, Julian R, and Alex a Adjei. 2006. “The Ras/Raf/MAPK Pathway.” *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 1 (1): 7–9. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17409820.

Moore, K a, R Sethi, a M Doanes, T M Johnson, J B Pracyk, M Kirby, K Irani, P J Goldschmidt-Clermont, and T Finkel. 1997a. “Rac1 Is Required for Cell Proliferation and G2/M Progression.” *The Biochemical Journal* 326 (Pt 1 (August): 17–20. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1218631&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Motterlini, Roberto, Benjamin Haas, and Roberta Foresti. 2012. “Emerging Concepts on the Anti-Inflammatory Actions of Carbon Monoxide-Releasing Molecules (CO-RMs).” *Medical Gas Research* 2 (1). Medical Gas Research: 28. doi:10.1186/2045-9912-2-28. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3536644&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Müller-tidow, Carsten, Joachim Schwäble, Björn Steffen, Burkhardt Brandt, Kerstin Becker, Eric Schulze-bahr, Hartmut Halfter, et al. 2004. “High-Throughput Analysis of Genome-Wide Receptor Tyrosine Kinase Expression in Human Cancers Identifies Potential Novel Drug Targets High-Throughput Analysis of Genome-Wide Receptor Tyrosine Kinase Expression in Human Cancers Identifies Potential Novel Dr”, 1241–49.

Murga, Cristina, Muriel Zohar, Hidemi Teramoto, and J Silvio Gutkind. 2002. “Rac1 and RhoG Promote Cell Survival by the Activation of PI3K and Akt, Independently of Their Ability to Stimulate JNK and NF-κB.” *Oncogene* 21 (2): 207–16. doi:10.1038/sj/onc/1205036. http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj/onc/1205036.

Murray, Graeme I, Martin C Taylor, Morag C E Mcfadyen, A Mckay, F Greenlee, M Danny Burke, and William T Melvin. 1997. “Tumor-Specific Expression of Cytochrome P450 CYP1B1 Tumor-Specific”, 3026–31.

Murray, Samuel S., Kristie N. Tu, Karen L. Young, and Elsa J.Brochmann Murray. 2002. “The Effects of Lovastatin on Proteasome Activities in Highly Purified Rabbit 20 S Proteasome Preparations and Mouse MC3T3-E1 Osteoblastic Cells.” *Metabolism* 51 (9): 1153–60. doi:10.1053/meta.2002.34706. http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049502000586.

Nagase, Miki, and Toshiro Fujita. 2013. “Role of Rac1-Mineralocorticoid-Receptor Signalling in Renal and Cardiac Disease.” *Nat Rev Nephrol* 9 (2). Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved. 86–98. http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2012.282.

Nakagawa, M, M Fukata, M Yamaga, N Itoh, and K Kaibuchi. 2001. “Recruitment and Activation of Rac1 by the Formation of E-Cadherin-Mediated Cell-Cell Adhesion Sites.” *Journal of Cell Science* 114 (Pt 10): 1829–38. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11329369.

Nakamura, Kyoko, Toshiaki Kogame, Hiroyuki Oshiumi, Akira Shinohara, Yoshiki Sumitomo, Keli Agama, Yves Pommier, et al. 2010. “Collaborative Action of Brca1 and CtIP in Elimination of Covalent Modifications from Double-Strand Breaks to Facilitate Subsequent Break Repair.” *PLoS Genetics* 6 (1): e1000828. doi:10.1371/journal.pgen.1000828. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2809774&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Narisawa, Tomio, Yoko Fukaura, Kunihiko Terada, Akiko Umezawa, Noritoshi Tanida, Kazunaga Yazawa4 And, and Chikako Ishikawa. 1994. “Prevention of 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Colon Tumorigenesis Y HMG-CoA Reductase Inhibitors, Pravastatin and Simvastatin, in ICR Mice.” *Carcinogenesis* 15 (9): 2045–48.

Nickeleit, Irina, Steffen Zender, Uta Kossatz, and Nisar P Malek. 2007. “P27Kip1: A Target for Tumor Therapies?” *Cell Division* 2 (January): 13. doi:10.1186/1747-1028-2-13. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1872022&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Nitiss, John L. 2009. “Targeting DNA Topoisomerase II in Cancer Chemotherapy.” *Nat Rev Cancer* 9 (5). Nature Publishing Group: 338–50. http://dx.doi.org/10.1038/nrc2607.

Nousiainen, Marjaana, Herman H W Silljé, Guido Sauer, Erich a Nigg, and Roman Körner. 2006. “Phosphoproteome Analysis of the Human Mitotic Spindle.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (14): 5391–96. doi:10.1073/pnas.0507066103. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19691289.

NR, Bachur, Yu F, Johnson R, Hickey R, Wu Y, Malkas L. 1992. “Helicase Inhibition by Anthracycline Anticancer Agents.” *Molecular Pharmacology* 41: 993–98.

Nübel, Tobias, Wolfgang Dippold, Hartmut Kleinert, Bernd Kaina, and Gerhard Fritz. 2004. “Lovastatin Inhibits Rho-Regulated Expression of E-Selectin by TNFalpha and Attenuates Tumor Cell Adhesion.” *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (1): 140–42. doi:10.1096/fj.03-0261fje. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14630701.

Okabe, Mitsunori, Michiaki Unno, Hideo Harigae, Mitsuo Kaku, Yoko Okitsu, Takeshi Sasaki, Takayuki Mizoi, et al. 2005. “Characterization of the Organic Cation Transporter SLC22A16: A Doxorubicin Importer.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333 (3): 754–62. doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.174. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15963465.

Olson, M F, a Ashworth, and a Hall. 1995. “An Essential Role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in Cell Cycle Progression through G1.” *Science (New York, N.Y.)* 269 (5228): 1270–72. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7652575.

Oren, M. 1999. “Regulation of the p53 Tumor Suppressor Protein.” *Journal of Biological Chemistry* 274 (51): 36031–34. doi:10.1074/jbc.274.51.36031. http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.274.51.36031.

Orford, K, C C Orford, and S W Byers. 1999. “Exogenous Expression of Beta-Catenin Regulates Contact Inhibition, Anchorage-Independent Growth, Anoikis, and Radiation-Induced Cell Cycle Arrest.” *The Journal of Cell Biology* 146 (4): 855–68. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2156133&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Ostrau, Christian, Johannes Hülsenbeck, Melanie Herzog, Arno Schad, Michael Torzewski, Karl J Lackner, and Gerhard Fritz. 2009. “Lovastatin Attenuates Ionizing Radiation-Induced Normal Tissue Damage in Vivo.” *Radiotherapy and Oncology* 92 (3): 492–99. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2009.06.020. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167814009003314.

Potter, Alan J, Katherine A Gollahon, Ben J A Palanca, Mary J Harbert, Young M Choi, Alexander H Moskovitz, John D Potter, and Peter S Rabinovitch. 2002. “Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle Phase Specificity of DNA Damage Induced by Radiation , Hydrogen Peroxide and Doxorubicin Unwinding Assay to Increase the Sensitivity in Detecting Low Damage within Each Cell Cycle Compartment . The Lowest Γ Each ” 23 (3): 389–401.

Pritchard, Antonia L, and Nicholas K Hayward. 2013. “Molecular Pathways: Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Mutations and Drug Resistance.” *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (9): 2301–9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0383. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23406774.

Qi, Xiaomei, Songwang Hou, Adrienne Lepp, Rongshan Li, Zainab Basir, Zhenkun Lou, and Guan Chen. 2011. “Phosphorylation and Stabilization of Topoisomerase IIα Protein by p38γ Mitogen-Activated Protein Kinase Sensitize Breast Cancer Cells to Its Poisons.” *The Journal of Biological Chemistry* 286 (41): 35883–90. doi:10.1074/jbc.M111.229260. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3195563&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Raderschall, Elke, Alex Bazarov, Jiangping Cao, Rudi Lurz, Avril Smith, Wolfgang Mann, Hans-Hilger Ropers, et al. 2002. “Formation of Higher-Order Nuclear Rad51 Structures Is Functionally Linked to p21 Expression and Protection from DNA Damage-Induced Apoptosis.” *Journal of Cell Science* 115 (Pt 1): 153–64. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801733.

Rao, S, D C Porter, X Chen, T Herliczek, M Lowe, and K Keyomarsi. 1999. “Lovastatin-Mediated G1 Arrest Is through Inhibition of the Proteasome, Independent of Hydroxymethyl Glutaryl-CoA Reductase.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (14): 7797–7802. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22141&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Rena, G., S. Guo, S. C. Cichy, T. G. Unterman, and P. Cohen. 1999. “Phosphorylation of the Transcription Factor Forkhead Family Member FKHR by Protein Kinase B.” *Journal of Biological Chemistry* 274 (24): 17179–83. doi:10.1074/jbc.274.24.17179. http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.274.24.17179.

Riad, Alexander, Sandra Bien, Dirk Westermann, Peter M Becher, Komal Loya, Ulf Landmesser, Heyo K Kroemer, Heinz P Schultheiss, and Carsten Tschöpe. 2009. “Pretreatment with Statin Attenuates the Cardiotoxicity of Doxorubicin in Mice.” *Cancer Research* 69 (2): 695–99. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3076. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19147586.

Rich, Tina, Rachel L Allen, and Andrew H Wyllie. 2000. “Defying Death after DNA Damage.” *Nature* 407 (6805). Macmillan Magazines Ltd. 777–83. http://dx.doi.org/10.1038/35037717.

Rignall, Benjamin, Albert Braeuning, Albrecht Buchmann, and Michael Schwarz. 2011. “Tumor Formation in Liver of Conditional B-Catenin-Deficient Mice Exposed to a Diethylnitrosamine/phenobarbital Tumor Promotion Regimen.” *Carcinogenesis* 32 (1): 52–57. doi:10.1093/carcin/bgq226. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21047994.

Rose, KM. 1988. “DNA Topoisomerases as Targets for Chemotherapy.” *The FASEB Journal*, 2474–78. http://www.fasebj.org/content/2/9/2474.short.

Ross, G M. 1999. “Induction of Cell Death by Radiotherapy.” *Endocrine-Related Cancer* 6 (1): 41–44. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10732785.

Roy, Sanjit K, Rakesh K Srivastava, and Sharmila Shankar. 2010. “Inhibition of PI3K/AKT and MAPK/ERK Pathways Causes Activation of FOXO Transcription Factor, Leading to Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Pancreatic Cancer.” *Journal of Molecular Signaling* 5 (January): 10. doi:10.1186/1750-2187-5-10. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2915986&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Rozados, Viviana R, Lucila I Hinrichsen, M Mercedes Binda, Silvia I Gervasoni, Pablo Matar, R Daniel Bonfil, and O Graciela Scharovsky. 2008. “Lovastatin Enhances the Antitumoral and Apoptotic

Activity of Doxorubicin in Murine Tumor Models." *Oncology Reports* 19 (5): 1205–11. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425377.

Sakurai, Toshiharu, Guobin He, Atsushi Matsuzawa, and GY Yu. 2008. "Hepatocyte Necrosis Induced by Oxidative Stress and IL-1α Release Mediate Carcinogen-Induced Compensatory Proliferation and Liver Tumorigenesis." *Cancer Cell* 14 (2): 156–65. doi:10.1016/j.ccr.2008.06.016.Hepatocyte. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610808002262.

Sakurai, Toshiharu, Shin Maeda, Lufen Chang, and Michael Karin. 2006. "Loss of Hepatic NF-Kappa B Activity Enhances Chemical Hepatocarcinogenesis through Sustained c-Jun N-Terminal Kinase 1 Activation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (28): 10544–51. doi:10.1073/pnas.0603499103. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1502270&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Sandholt, Iben Skjøth, Birgitte Brinkmann Olsen, Barbara Guerra, and Olaf-Georg Issinger. 2009. "Resorufin: A Lead for a New Protein Kinase CK2 Inhibitor." *Anti-Cancer Drugs* 20 (4): 238–48. doi:10.1097/CAD.0b013e328326472e. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19177021.

Sandrock, Kirstin, Heike Bielek, Kristina Schradi, Gudula Schmidt, and Norbert Klugbauer. 2010. "The Nuclear Import of the Small GTPase Rac1 Is Mediated by the Direct Interaction with Karyopherin alpha2." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 11 (2): 198–209. doi:10.1111/j.1600-0854.2009.01015.x. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19961560.

Sasco, A J, M B Secretan, and K Straif. 2004. "Tobacco Smoking and Cancer: A Brief Review of Recent Epidemiological Evidence." *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*. Elsevier Scientific Publishers. http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169500204800023?showall=true.

Schellenberg, Matthew J, C Denise Appel, Sanjay Adhikari, Patrick D Robertson, Dale A Ramsden, and R Scott Williams. 2012. "Mechanism of Repair of 5'-Topoisomerase II–DNA Adducts by Mammalian Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 2." *Nat Struct Mol Biol* 19 (12). Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved. 1363–71. http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2418.

Schiller, Martin R. 2006. "Coupling Receptor Tyrosine Kinases to Rho GTPases—GEFs What's the Link." *Cellular Signalling* 18 (11): 1834–43. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.01.022. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656806000817.

Schlacher, Katharina, Hong Wu, and Maria Jasin. 2012. "A Distinct Replication Fork Protection Pathway Connects Fanconi Anemia Tumor Suppressors to RAD51-BRCA1/2." *Cancer Cell* 22 (1). Elsevier Inc. 106–16. doi:10.1016/j.ccr.2012.05.015. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22789542.

Schwarz, M., I. Wanke, U. Wulbrand, O. Moennikes, and a. Buchmann. 2003. "Role of Connexin32 and -Catenin in Tumor Promotion in Mouse Liver." *Toxicologic Pathology* 31 (1): 99–102. doi:10.1080/01926230390173932. http://tpx.sagepub.com/cgi/doi/10.1080/01926230390173932.

Sekine, Shigeki, Billy Yu-Ang Lan, Melanie Bedolli, Sandy Feng, and Matthias Hebrok. 2006. "Liver-Specific Loss of Beta-Catenin Blocks Glutamine Synthesis Pathway Activity and Cytochrome

p450 Expression in Mice." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 43 (4): 817–25. doi:10.1002/hep.21131. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16557553.

Shapiro, P S, a M Whalen, N S Tolwinski, J Wilsbacher, S J Froelich-Ammon, M Garcia, N Osheroff, and N G Ahn. 1999. "Extracellular Signal-Regulated Kinase Activates Topoisomerase IIalpha through a Mechanism Independent of Phosphorylation." *Molecular and Cellular Biology* 19 (5): 3551–60. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=84147&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Shen, Bo, Lee Chao, and Julie Chao. 2010. "Pivotal Role of JNK-Dependent FOXO1 Activation in Downregulation of Kallistatin Expression by Oxidative Stress", 1048–54. doi:10.1152/ajpheart.00826.2009.

Shinagawa, Hirokuni, Yoshio Miki, and Kiyotsugu Yoshida. 2008. "BRCA1-Mediated Ubiquitination Inhibits Topoisomerase II Alpha Activity in Response to Oxidative Stress." *Antioxidants & Redox Signaling* 10 (5): 939–49. doi:10.1089/ars.2007.1851. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18162055.

Shutes, Adam, and Channing J Der. 2006. "Real-Time In Vitro Measurement of Intrinsic and Ras GAP-Mediated GTP Hydrolysis." In *Regulators and Effectors of Small GTPases: Ras Family*, edited by Channing J Der William E. Balch and Alan Hall BT - Methods in Enzymology, Volume 407:9–22. Academic Press. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(05)07002-3. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687905070023.

Shutes, Adam, Cercina Onesto, Virginie Picard, Bertrand Leblond, Fabien Schweighoffer, and Channing J Der. 2007. "Specificity and Mechanism of Action of EHT 1864, a Novel Small Molecule Inhibitor of Rac Family Small GTPases." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (49): 35666–78. doi:10.1074/jbc.M703571200. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17932039.

Siddik, ZahidH. 2009. "Drug Resistance and the Tumor Suppressor p53: The Paradox of Wild-Type Genotype in Chemorefractory Cancers." In *Drug Resistance in Cancer Cells SE - 9*, edited by Zahid H Siddik and Kapil Mehta, 209–31. Springer US. doi:10.1007/978-0-387-89445-4_9. http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-89445-4_9.

Singh, Narendra P, Michael T McCoy, Raymond R Tice, and Edward L Schneider. 1988. "A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of {DNA} Damage in Individual Cells." *Experimental Cell Research* 175 (1): 184–91. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014482788902650.

Singhal, Sharad S, Jyotsana Singhal, Maya P Nair, a G Lacko, Yogesh C Awasthi, and Sanjay Awasthi. 2007. "Doxorubicin Transport by RALBP1 and ABCG2 in Lung and Breast Cancer." *International Journal of Oncology* 30 (3): 717–25. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17273774.

Smith, Laura, Mark B Watson, Sara L O'Kane, Philip J Drew, Michael J Lind, and Lynn Cawkwell. 2006. "The Analysis of Doxorubicin Resistance in Human Breast Cancer Cells Using Antibody Microarrays." *Molecular Cancer Therapeutics* 5 (8): 2115–20. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0190. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16928833.

Solski, P A, G J Clark, M S Kinch, Roya Khosravi-far, Patricia A Solski, Geoffrey J Clark, Michael S Kinch, and Channing J Der. 1995. "Mitogen-Activated Protein Kinases Is Required for Ras Transformation . Activation of Rac1 , RhoA , and Mitogen-Activated Protein Kinases Is Required for Ras Transformation" 15 (11).

Song, B.-J. 1995. “Ethanol Induces CYP2E1 by Protein Stabilization.” *Journal of Biological Chemistry* 270 (50): 29632–35. doi:10.1074/jbc.270.50.29632. http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.270.50.29632.

Spallarossa, Paolo, Paola Altieri, Chiara Barisione, Mario Passalacqua, Concetta Aloi, Giuseppina Fugazza, Francesco Frassoni, et al. 2010. “p38 MAPK and JNK Antagonistically Control Senescence and Cytoplasmic p16INK4A Expression in Doxorubicin-Treated Endothelial Progenitor Cells.” *PloS One* 5 (12): e15583. doi:10.1371/journal.pone.0015583. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3004949&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Sugihara, K, N Nakatsuji, K Nakamura, K Nakao, R Hashimoto, H Otani, H Sakagami, et al. 1998. “Rac1 Is Required for the Formation of Three Germ Layers during Gastrulation.” *Oncogene* 17 (26): 3427–33. doi:10.1038/sj.onc.1202595. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10030666.

Swift, Lonnie P, Ada Rephaeli, Abraham Nudelman, Don R Phillips, and Suzanne M Cutts. 2006. “Doxorubicin-DNA Adducts Induce a Non-Topoisomerase II-Mediated Form of Cell Death.” *Cancer Research* 66 (9): 4863–71. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3410. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16651442.

Takahashi; Takahashi; Mizobuchi; Matsumi; Yokoyama; Morita; Miyazaki; Namba; Akagi; Sassa. 2003. “CYP2E1 Overexpression up-Regulates Both Non-Specific Δ-Aminolevulinate Synthase and Heme Oxygenase-1 in the Human Hepatoma Cell Line HLE/2E1.” *International Journal of Molecular Medicine* 11 (1): 57–62.

Tewey, KM, TC Rowe, L Yang, BD Halligan, and LF Liu. 1984. “Adriamycin-Induced DNA Damage Mediated by Mammalian DNA Topoisomerase II.” *Science*. http://www.sciencemag.org/content/226/4673/466.short.

THUNE, INGER, and ANNE-SOFIE FURBERG. 2001. “Physical Activity and Cancer Risk: Dose-Response and Cancer, All Sites and Site-Specific.” *Medicine & Science in Sports & Exercise* 33 (6). http://journals.lww.com/acsm-msse/Fulltext/2001/06001/Physical_activity_and_cancer_risk__dose_response.25.aspx.

Tien, Liem Thanh, Masahiro Ito, Mikiko Nakao, Daisuke Niino, Meirmanov Serik, Masahiro Nakashima, and Chun-yang Wen. 2005. “Expression of B -Catenin in Hepatocellular Carcinoma” 11 (16): 2398–2401.

Torres, Vukosava Milic, and Viktorija Dragojevic Simic. “Doxorubicin-Induced Oxidative Injury of Cardiomyocytes - Do We Have Right Strategies for Prevention?” In *Cardiotoxicity of Oncologic Treatments*.

Treszezamsky, Alejandro D, Lisa a Kachnic, Zhihui Feng, Junran Zhang, Chake Tokadjian, and Simon N Powell. 2007. “BRCA1- and BRCA2-Deficient Cells Are Sensitive to Etoposide-Induced DNA Double-Strand Breaks via Topoisomerase II.” *Cancer Research* 67 (15): 7078–81. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0601. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671173.

Tsan YT, Lee CH, Ho WC, Lin MH, Wang JD, Chen PC. 2013. “Statins and the Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Hepatitis C Virus Infection.” *Journal of Clinical Oncology* 31 (12): 1514–21.

Tsan, Yu-Tse, Chang-Hsing Lee, Jung-Der Wang, and Pau-Chung Chen. 2012. “Statins and the Risk of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Hepatitis B Virus Infection.” *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (6): 623–30. doi:10.1200/JCO.2011.36.0917. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22271485.

Tscharntke, Michael, Ruth Pofahl, Anna Chrostek-Grashoff, Neil Smyth, Carien Niessen, Catherin Niemann, Benedikt Hartwig, et al. 2007. “Impaired Epidermal Wound Healing in Vivo upon Inhibition or Deletion of Rac1.” *Journal of Cell Science* 120 (Pt 8): 1480–90. doi:10.1242/jcs.03426. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389689.

Turkson, James, Tammy Bowman, Jalila Adnane, Yi Zhang, Julie Y Djeu, Madhavi Sekharam, David A Frank, et al. 1999. “Requirement for Ras / Rac1-Mediated p38 and c-Jun N-Terminal Kinase Signaling in Stat3 Transcriptional Activity Induced by the Src Oncoprotein Requirement for Ras / Rac1-Mediated p38 and c-Jun N-Terminal Kinase Signaling in Stat3 Transcriptional Activity .”

Turner, Joel G, Roxanne Engel, Jennifer a Derderian, Richard Jove, and Daniel M Sullivan. 2004. “Human Topoisomerase IIalpha Nuclear Export Is Mediated by Two CRM-1-Dependent Nuclear Export Signals.” *Journal of Cell Science* 117 (Pt 14): 3061–71. doi:10.1242/jcs.01147. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173319.

U.S. National Institutes of Health. “ClinicalTrials.gov.”

Uddin, S, F Lekmine, N Sharma, B Majchrzak, I Mayer, P R Young, G M Bokoch, E N Fish, and L C Platanias. 2000. “The Rac1/p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Is Required for Interferon Alpha-Dependent Transcriptional Activation but Not Serine Phosphorylation of Stat Proteins.” *The Journal of Biological Chemistry* 275 (36): 27634–40. doi:10.1074/jbc.M003170200. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10878008.

Ueda, Shuji, Sohei Kitazawa, Kota Ishida, Yuki Nishikawa, Megumi Matsui, Hikaru Matsumoto, Takuji Aoki, et al. 2010. “Crucial Role of the Small GTPase Rac1 in Insulin-Stimulated Translocation of Glucose Transporter 4 to the Mouse Skeletal Muscle Sarcolemma.” *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (7): 2254–61. doi:10.1096/fj.09-137380. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20203090.

Uno, Shigeyuki, Timothy P Dalton, Sandrine Derkenne, Christine P Curran, Marian L Miller, Howard G Shertzer, and Daniel W Nebert. 2004. “Oral Exposure to Benzo[a]pyrene in the Mouse: Detoxication by Inducible Cytochrome P450 Is More Important than Metabolic Activation.” *Molecular Pharmacology* 65 (5): 1225–37. doi:10.1124/mol.65.5.1225. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15102951.

Van Attikum, Haico, and Susan M Gasser. 2005. “The Histone Code at DNA Breaks: A Guide to Repair?” *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (10). Nature Publishing Group: 757–65. http://dx.doi.org/10.1038/nrm1737.

Van Hooser, a, D W Goodrich, C D Allis, B R Brinkley, and M a Mancini. 1998. “Histone H3 Phosphorylation Is Required for the Initiation, but Not Maintenance, of Mammalian Chromosome Condensation.” *Journal of Cell Science* 111 (Pt 2 (December): 3497–3506. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9811564.

Vatsyayan, R. 2009. “Role of RLIP76 in Doxorubicin Resistance in Lung Cancer (Review).” *International …* 15: 752–57. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0124.A. http://www.spandidos-publications.com/ijo/34/6/1505/download?type=article&article_id=ijo_34_6_1505&item=PDF.

Vogelstein, Bert, David Lane, and Arnold J Levine. 2000. “Surfing the p53 Network.” *Nature* 408 (6810). Macmillan Magazines Ltd. 307–10. http://dx.doi.org/10.1038/35042675.

Vollmar, B, a M El-Gibaly, C Scheuer, M W Strik, H-P Bruch, and M D Menger. 2002. “Acceleration of Cutaneous Wound Healing by Transient p53 Inhibition.” *Laboratory Investigation* 82 (8): 1063–71. doi:10.1097/01.LAB.0000024363.37866.45. http://www.nature.com/doifinder/10.1097/01.LAB.0000024363.37866.45.

Vries, Jan E. de. 1995. “Immunosuppressive and Anti-Inflammatory Properties of Interleukin 10.” *Annals of Medicine* 27 (5): 537–41.

Wagstaff, Kylie M, Haran Sivakumaran, Steven M Heaton, David Harrich, and David a Jans. 2012. “Ivermectin Is a Specific Inhibitor of Importin A/β-Mediated Nuclear Import Able to Inhibit Replication of HIV-1 and Dengue Virus.” *The Biochemical Journal* 443 (3): 851–56. doi:10.1042/BJ20120150. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3327999&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Wang, Bo, Fiona G Wylie, Rohan D Teasdale, and Jennifer L Stow. 2005. “Polarized Trafficking of E-Cadherin Is Regulated by Rac1 and Cdc42 in Madin-Darby Canine Kidney Cells.” *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 288 (6): C1411–9. doi:10.1152/ajpcell.00533.2004. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15689411.

Wang, Jue, Yin Hu, Jana Nekvindova, Magnus Ingelman-Sundberg, and Etienne P a Neve. 2010. “IL-4-Mediated Transcriptional Regulation of Human CYP2E1 by Two Independent Signaling Pathways.” *Biochemical Pharmacology* 80 (10): 1592–1600. doi:10.1016/j.bcp.2010.08.005. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20723539.

Wang, Y., J. Ma, M. Wei, and T. Peng. 2012. “Rac1 Signalling Mediates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity Through Both Reactive Oxygen Species Dependent and Independent Pathways.” *Heart* 98 (Suppl 2): E21–E22. doi:10.1136/heartjnl-2012-302920a.47. http://heart.bmj.com/cgi/doi/10.1136/heartjnl-2012-302920a.47.

Wang, Z, E Pedersen, a Basse, T Lefever, K Peyrollier, S Kapoor, Q Mei, R Karlsson, a Chrostek-Grashoff, and C Brakebusch. 2010. “Rac1 Is Crucial for Ras-Dependent Skin Tumor Formation by Controlling Pak1-Mek-Erk Hyperactivation and Hyperproliferation in Vivo.” *Oncogene* 29 (23). Nature Publishing Group: 3362–73. doi:10.1038/onc.2010.95. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20383193.

Wang, Zaiqi, Stephen D Hall, Juan F Maya, Lang Li, Ali Asghar, and J C Gorski. 2003. “Diabetes Mellitus Increases the in Vivo Activity of Cytochrome P450 2E1 in Humans.” *British Journal of Clinical Pharmacology* 55 (1). Blackwell Science Ltd: 77–85. doi:10.1046/j.1365-2125.2003.01731.x. http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2125.2003.01731.x.

Ward, I M, and J Chen. 2001. “Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-Dependent Manner in Response to Replicational Stress.” *The Journal of Biological Chemistry* 276 (51): 47759–62. doi:10.1074/jbc.C100569200. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11673449.

Weisend, Carla M, Jean a Kundert, Elena S Suvorova, Justin R Prigge, and Edward E Schmidt. 2009. “Cre Activity in Fetal albCre Mouse Hepatocytes: Utility for Developmental Studies.” *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 47 (12): 789–92. doi:10.1002/dvg.20568.

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2828742&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Wells, Claire M, Marita Walmsley, Steen Ooi, Victor Tybulewicz, and Anne J Ridley. 2004. "Rac1-Deficient Macrophages Exhibit Defects in Cell Spreading and Membrane Ruffling but Not Migration." *Journal of Cell Science* 117 (Pt 7): 1259–68. doi:10.1242/jcs.00997. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14996945.

Wells, N J, and I D Hickson. 1995. "Human Topoisomerase II Alpha Is Phosphorylated in a Cell-Cycle Phase-Dependent Manner by a Proline-Directed Kinase." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 231 (2): 491–97. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7635160.

Wells, Nicholas J, Christine M Addison, M Fry, Ram Ganapathilll, and Ian D Hickson. 1994. "Serine 1524 Is a Major Site of Phosphorylation on Human and Is a Substrate for Casein Topoisomerase IIa Protein in Vivo Kinase I1 in Vitro *", 29746–51.

Wennerberg, Krister, Kent L Rossman, and Channing J Der. 2005. "The Ras Superfamily at a Glance." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 5): 843–46. doi:10.1242/jcs.01660. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15731001.

Wilhelm, Scott M, Lila Adnane, Philippa Newell, Augusto Villanueva, Josep M Llovet, and Mark Lynch. 2008. "Preclinical Overview of Sorafenib, a Multikinase Inhibitor That Targets Both Raf and VEGF and PDGF Receptor Tyrosine Kinase Signaling." *Molecular Cancer Therapeutics* 7 (10): 3129–40. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0013. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852116.

Willmore, E, a J Frank, K Padget, M J Tilby, and C a Austin. 1998. "Etoposide Targets Topoisomerase IIalpha and IIbeta in Leukemic Cells: Isoform-Specific Cleavable Complexes Visualized and Quantified in Situ by a Novel Immunofluorescence Technique." *Molecular Pharmacology* 54 (1): 78–85. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9658192.

Wittmann, Torsten, Gary M Bokoch, and Clare M Waterman-Storer. 2003. "Regulation of Leading Edge Microtubule and Actin Dynamics Downstream of Rac1." *The Journal of Cell Biology* 161 (5): 845–51. doi:10.1083/jcb.200303082. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2172968&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Wójcik, Cezary, Marcin Bury, Tomasz Stoklosa, Adam Giermasz, Wojciech Feleszko, Izabella Mlynarczuk, Eliza Pleban, Grzegorz Basak, Satoshi Omura, and Marek Jakóbisiak. 2000. "Lovastatin and Simvastatin Are Modulators of the Proteasome." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32 (9): 957–65. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1357-2725(00)00044-3. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272500000443.

Woo, Chang-hoon, and Jae-hong Kim. 2002. "M Olecules Rac GTPase Activity Is Essential for Lipopolysaccharide p38 MAP Kinase Activation in Rat-2 Fibroblasts" 13 (3): 470–75.

Wu, Ximei, Xiaolin Tu, Kyu Sang Joeng, Matthew J Hilton, David A Williams, and Fanxin Long. 2008a. "Rac1 Activation Controls Nuclear Localization of B-Catenin during Canonical Wnt Signaling." *Cell*. Cell Press. http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867408002791.

Wu, Ximei, Xiaolin Tu, Kyu Sang Joeng, Matthew J Hilton, David a Williams, and Fanxin Long. 2008b. "Rac1 Activation Controls Nuclear Localization of Beta-Catenin during Canonical Wnt Signaling."

Cell 133 (2): 340–53. doi:10.1016/j.cell.2008.01.052. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2390926&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Wung, B S, C W Ni, and D L Wang. 2005. "ICAM-1 Induction by TNFα and IL-6 Is Mediated by Distinct Pathways via Rac in Endothelial Cells." *Journal of Biomedical Science* 12 (1). Kluwer Academic Publishers: 91–101. doi:10.1007/s11373-004-8170-z. http://dx.doi.org/10.1007/s11373-004-8170-z.

Xu, Zhiheng, and Lloyd A Greene. 2006. "Activation of the Apoptotic JNK Pathway Through the Rac1-Binding Scaffold Protein POSH." In *Regulators and Effectors of Small GTPases: Rho Family*, edited by Channing J Der William E. Balch and Alan Hall BT - Methods in Enzymology, Volume 406:479–89. Academic Press. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(06)06036-8. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687906060368.

Yamochi, Toshiko, Tadanori Yamochi, Ugur Aytac, Dipeptidyl Peptidase, I V Is, Tsutomu Sato, Kazuya Sato, and Kei Ohnuma. 2005. "Regulation of p38 Phosphorylation and Topoisomerase II A Expression in the B-Cell Lymphoma Line Jiyoye by CD26 / Dipeptidyl Peptidase IV Is Associated with Enhanced In Vitro and In Vivo Sensitivity to Doxorubicin Regulation of p38 Phosphorylation and Topo."

Yang, Jer-Yen, Cong S Zong, Weiya Xia, Hirohito Yamaguchi, Qingqing Ding, Xiaoming Xie, Jing-Yu Lang, et al. 2008. "ERK Promotes Tumorigenesis by Inhibiting FOXO3a via MDM2-Mediated Degradation." *Nature Cell Biology* 10 (2): 138–48. doi:10.1038/ncb1676. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2376808&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Yeh, Pei Yen, Shuang-En Chuang, Kun-Huei Yeh, Ying Chyi Song, Lucia Ling-Yuan Chang, and Ann-Lii Cheng. 2004. "Phosphorylation of p53 on Thr55 by ERK2 Is Necessary for Doxorubicin-Induced p53 Activation and Cell Death." *Oncogene* 23 (20): 3580–88. doi:10.1038/sj.onc.1207426. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15116093.

Yoshida, Masashi, Ichiro Shiojima, Hiroyuki Ikeda, and Issei Komuro. 2009. "Chronic Doxorubicin Cardiotoxicity Is Mediated by Oxidative {DNA} Damage-ATM-p53-Apoptosis Pathway and Attenuated by Pitavastatin through the Inhibition of Rac1 Activity." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47 (5): 698–705. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.07.024. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022282809003162.

Yoshida, Tatsushi, Yaqin Zhang, Leslie a Rivera Rosado, Junjie Chen, Tahira Khan, Sun Young Moon, and Baolin Zhang. 2010a. "Blockade of Rac1 Activity Induces G1 Cell Cycle Arrest or Apoptosis in Breast Cancer Cells through Downregulation of Cyclin D1, Survivin, and X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein." *Molecular Cancer Therapeutics* 9 (6): 1657–68. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0906. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20515940.

Zhang, Junran. 2013. "The Role of BRCA1 in Homologous Recombination Repair in Response to Replication Stress: Significance in Tumorigenesis and Cancer Therapy." *Cell & Bioscience* 3 (1). Cell & Bioscience: 11. doi:10.1186/2045-3701-3-11. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3599463&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Zhang, W, and HT Liu. 2002. “MAPK Signal Pathways in the Regulation of Cell Proliferation in Mammalian Cells.” *Cell Research* 12: 9–18. http://www.nature.com/cr/journal/v12/n1/abs/7290105a.html.

Zhou, Bin-Bing S, and Jiri Bartek. 2004. “Targeting the Checkpoint Kinases: Chemosensitization versus Chemoprotection.” *Nat Rev Cancer* 4 (3). Nature Publishing Group: 216–25. http://dx.doi.org/10.1038/nrc1296.

Zhou, Lixin, Marcia Graves, Gwen MacDonald, Jane Cipollone, Christopher R Mueller, and Calvin D Roskelley. 2013. “Microenvironmental Regulation of BRCA1 Gene Expression by c-Jun and Fra2 in Premalignant Human Ovarian Surface Epithelial Cells.” *Molecular Cancer Research : MCR* 11 (3): 272–81. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0395. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23339184.

Zhou, Xiaoming, Yuichiro Izumi, Maurice B Burg, and Joan D Ferraris. 2011. “Rac1/osmosensing Scaffold for MEKK3 Contributes via Phospholipase C-gamma1 to Activation of the Osmoprotective Transcription Factor NFAT5.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (29): 12155–60. doi:10.1073/pnas.1108107108. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3141947&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

5.2 Abkürzungsverzeichnis

Tab. 17: Verwendete Abkürzung

Abkürzung	Bezeichnung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
Abcb1b	(Mdr-1) ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B
Abcc1	(Mrp-1) ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1
Acta1	actin, alpha 1, skeletal muscle
Actb	actin, beta
Akt	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
Akt (pS473)	Akt phsohoryliert an Serin 473
AlbCre	Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Albumin Promotors
AP1	activator protein 1
ATM (pS1981)	*Ataxia-telangiectasia mutated kinase* phsohoryliert an Serin 1981
Bax	BCL2-interactive cell death susceptibility regulator
BCL2	B-cell lymphoma 2
Bp	Basenpaare
Brca1	breast cancer 1, early-onset
Brca2	breast cancer 2, early-onset
BSA	bovine serum albumin
$C_2H_3Cl_3O_2$	Chloralhydrat
$C_6H_8O_7$	Citronensäure
ca.	ungefähr
$CaCl_2$	Calciumchlorid
Ccnb1	Cyclin B1
CD62E	CD62 antigen-like family member E (E-Selektin)
Cdc25a	cell division cycle 25 homolog A
Cdc42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)
Cdkn1a (p21)	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNS

CHEK1	checkpoint kinase 1
Chk2	checkpoint kinase 2
Chk2 (pThr68)	checkpoint kinase 2 phosphoryliert an Threonin 68
cleaved caspase-7	Gespaltene Caspas 7
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Cre	Cre Rekombinase
CRP	C-reaktives Protein
Ctgf	connective tissue growth factor
Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
Cycline B1	G2/mitotic-specific cyclin-B1
Cyp1a1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
Cyp1b1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
Cyp2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1
Ddb2	damage specific DNA binding protein 2
DDR	DNA damage response, DNA-Schadensantwort
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKs	DNA dependent protein kinase catalytic subunit
Doxo	Doxorubicin (Adriamycin)
DSB	Doppelstrangbruch
dUTP	Deoxyuridintriphosphat
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EHT	EHT1864 Rac1 Inhibitor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ERK	mitogen-activated protein kinase (MAPK)
ERK (pThr202/pTyr204)	ERK phosphoryliert an Threonin 202 und Tyrosin 204
E-Selektin (Esel)	endothelial leukocyte adhesion molecule 1
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fas	TNF receptor superfamily, member 6
FITC	Fluoresceinisothiocyanat (Fluorescein)
flox	loxP-Sequenz, Erkennungssequenz für die Crerekombinase
Fos	proto-oncogene c-Fos / cellular oncogene fos
Foxo1	Forkhead box protein O1
Foxo3a	Forkhead box protein O3
FPP	Farnesylpyrophosphat;
g	Gramm
GAP	GTPase activating protein
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
Gpx1	Glutathionperoxidase 1
GS	Gluthaminsynthethase
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
h	Stunde
H2AX	histone 2A family member X
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
H9c2	rat cadiomyoblasts
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
Hmox1	Hämoxygenase 1
HSP70	Hitzeschockprotein 70
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
HT-1080	human fibrosarcoma cell line
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
i.p.	intraperitoneal

ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
Il10	Interleukin 10
Il1a	Interleukin 1 alpha
IL6	Interleukin 6
Il8	Interleukin 8
IP	Immunopräzipitation
IR	ionizing radiation, ionisierende Strahlung
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
JNK (pThr183/pTyr185)	JNK phosphoryliert an Threonin 183 und Tyrosin 185
Jun	jun proto-oncogene
$KAl(SO_4)_2 \cdot 12\ H_2O$	Kalium-Alaun
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramm
Kon	Kontrolle / Kontrollgruppe
Ku70	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells
Ku80	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells
l	Liter
lgG (H+L)	Immunglobulin G (heavy + light chain)
LMP	low melting point
Lova	Lovastatin
M	Mol
mA	Milliampère
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
Mono	Monozyten
MPO	Myeloperoxidase
MRN	Mre11, Rad50, Nbs1
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Mx1Cre	Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Mx1 Promotors
n	Anzahl
n.d.	nicht detektierbar
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
$NaJO_3$	Natriumjodat
NER	nucleotide excision repair, Nukleotid-Exzisionsreparatur
Net1	neuroepithelial cell transforming 1
Neut	neutrophile Granulozyten
Nfe2l2 (Nrf2)	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NF-κB/Nfkb1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NF-κB subunit p65	NF-κB Untereinheit p65
NHEJ	non-homologous end joining, nicht-homologe Endverknüpfung
nl	Nanoliter
nM	Nanomol
NSC	NSC23766 Rac1 Inhibitor
p16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p27	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p38	p38 mitogen-activated protein kinases
p38 (pThr180/pTyr182)	p38 phosphoryliert an Threonin 180 und Tyrosin 182
p53	tumor suppressor p53
p53 (pS15)	p53 phosphoryliert an Serin 15
pChk1	phosphorylierte Checkpointkinase 1
p-c-Jun (pS63)	cJun phosphoryliert an S63
PCR	Polymerasekettenreaktion
p-Foxo1/3a (pThr24;pThr32)	Foxo1/3a phosphoryliert an Threonin 24 und 32
pH3 (pS10)	Histon H3 phosphoryliert an Serin 10

Pi	Orthophosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC-zeta	Proteinkinase C zeta
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Rac2	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2
Ras	rat sarcoma
Rev1	rev1-like terminal deoxycytidyl transferase
Rho	ras homolog
ROCK	Rho-associated protein kinase
ROS	reactive Sauerstoffspezies
RPA	replication protein A
RT	reverse Transkription
SAPK/JNK	stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase
sd	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittels
STAT	signal transducers and activators of transcription
sTNFα	soluble tumor necrose factor alpha
Taq	DNA-Polymerase des Bakteriums Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBI	total body irradiation, Ganzkörperbestrahlung
TBST	Tris-buffered saline and Tween 20 buffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFb	transforming growth factor beta
TNFa (Tnf)	tumor necrosis factor-alpha
Topo IIα (pS1106)	Topo IIα phophoryliert an S1106
Topo2α (Top2α)	Topoisomerase II alpha
Topo2β (Top2β)	Topoisomerase II beta
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp53	Tumorsuppressorgen, 53 kDa
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
UV	ultraviolette Strahlung
Wee1	WEE1 homolog 1 (S. pombe)
WST-1	water soluble tetrazolium salt-1
Xpa	xeroderma pigmentosum, complementation group A
Xpc	xeroderma pigmentosum, complementation group C
Xrcc1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1
XRCC4	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4
z.B.	zum Beispiel
β-Actin	actin, beta
γH2AX	γ-H2AX (pS139)
γ-H2AX (pS139)	Histon H2AX phosphoryliert an Serin 139
ΔCT	relativer Schwellwert-Zyklus
ΔΔCT	normalisierter relativer Schwellwert-Zyklus

5.3 Publikationen und Kongressbeiträge

5.3.1 Liste der Publikationen

Bopp, A, F Wartlick, C Henninger, B Kaina, and G Fritz. 2013. “Rac1 Modulates Acute and Subacute Genotoxin-Induced Hepatic Stress Responses, Fibrosis and Liver Aging.” *Cell Death Disease* 4 (3). Nature Publishing Group: e558. doi:10.1038/cddis.2013.57. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519127.

Hinterleitner, C, J Huelsenbeck, C Henninger, F Wartlick, A Schorr, B Kaina, and G Fritz. 2013. “Rac1 Signaling Protects Monocytic AML Cells Expressing the MLL-AF9 Oncogene from Caspase-Mediated Apoptotic Death.” *Apoptosis 18 (8) : 963-979.* doi:10.1007/s10495-013-0842-6. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23624644.

Wartlick, Friedrich, Anita Bopp, Christian Henninger, and Gerhard Fritz. 2013. “DNA Damage Response (DDR) Induced by Topoisomerase II Poisons Requires Nuclear Function of the Small GTPase Rac.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833 (12): 3093–3103. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.08.016. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488913003157.

A Bopp, F Wartlick, C Henninger, M Schwarz, B Kaina, and G Fritz “Oncogenic function of the Ras-homologous GTPase Rac1 in diethylnitrosamine (DEN)-induced formation of mouse liver tumors.” „Submitted“ to Carcinogenesis

5.3.2 Kongressteilnahmen

Vorträge

F. Wartlick; A. Bopp; M. Schwarz; G. Fritz
Influence of Rac1 on DEN-induced hepatic stress responses and formation of liver tumors. 79. Jahrestagung der DGPT, Halle/Saale, 05.-07. März 2013

Posterpräsentationen

F. Wartlick; G. Fritz
Effect of Rac1 inhibition on doxorubicin mediated cell response. 78. Jahrestagung der DGPT, Dresden, 19.-22. März 2012

F. Wartlick, A. Bopp, J. Hülsenbeck, G. Fritz
Inhibition ofRac1 protectsagainsttopoisomerase-II poisons. 77. Jahrestagung der DGPT, Frankfurt, 30. März-01. April 2011

F. Wartlick, A. Bopp, J. Hülsenbeck, G. Fritz
Rac1 - A regulator of DNA damage induced gene expression in vivo. 11th biannual international meeting of the German Society of DNA Repair Research (DGDR), Jena, 07.-10. September 2010

5.4 Danksagung

Die letzten Zeilen meiner Arbeit möchte ich all denen widmen die mich auf Weg zur Dissertation begleitet und unterstützt haben. Allen voran möchte ich Herrn Prof. Dr. Fritz danken für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut anzufertigen. Dabei möchte ich mich besonders für Ihre stete Bereitschaft meine Ergebnisse zu diskutieren sowie für Ihr unermüdliches Engagement bei der Publikation meiner Daten bedanken.

Desweitern möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Kassack für die Bereitschaft bedanken die Arbeit als Zweitgutachter zu betreuen und dafür, dass Sie sich immer die Zeit für meine Fragen genommen haben.

Herrn Prof. Dr. Schwarz möchte ich danken für seine Expertise und Hilfe bei den Studien zur DEN vermittelten Kanzerogenese.

Herrn Prof. Dr. Kaina möchte ich für die interessanten und konstruktiven Diskussion während meiner Zeit in Mainz danken.

Meinen Dank aussprechen möchte ich aber auch all meinen Kollegen und Kolleginnen für die stets gute und angenehme Arbeitsatmosphäre. Ein besonderer Dank geht dabei an Dr. J. Hülsenbeck und Dr. C. Henninger die mir gerade in der Anfangsphase dieser Arbeit die nötigen handwerklichen Fähigkeiten beigebracht haben. In guter Erinnerung behalten werde ich aber auch die vielen unterhaltsamen Stunden die wir noch nach getaner Arbeit am Institut verbracht haben. Besonders danken möchte ich außerdem A. Bopp für die gute und enge Zusammenarbeit bei unseren gemeinsamen Projekten.

Bei meiner Familie und meinen Freunden möchte ich mich bedanken für die entspannenden und unterhaltsamen Stunden die wir zusammen in den letzten Jahren verbracht haben. Meinen Eltern möchte ich für die Gewissheit danken, dass es auf der Welt immer einen Ort geben wird an dem man zu jeder Zeit willkommen ist.

Besonders bedanken möchte ich mich aber auch bei Manfred und Elisabeth Nentwig für eure Großzügigkeit, eure Freundschaft und die schöne Zeit die wir zusammen verbracht haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei dem Menschen bedanken der mich unterstützt, mich motiviert und angespornt hat. Simone ich danke dir dafür, dass du immer an mich geglaubt hast.

Vielen Dank