

Einfluss der Immunsuppressiva Cyclosporin A
und Everolimus auf die funktionelle DNA-Reparaturfähigkeit
sowie auf die Regulation von DNA-Reparatur-Genen

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium“

der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Christiane Kuschal

aus Karl-Marx-Stadt

Göttingen 2009

Referent: PD. Dr. W. Kramer

Korreferent: Prof Dr. J. Brockmüller

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Oktober 2009

Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.

Galileo Galilei

Zusammenfassung

Cyclosporin A verursacht im Gegensatz zu Everolimus ein dramatisch erhöhtes Hautkrebsrisiko bei Transplantationspatienten. Die molekulargenetische Wirkung von Cyclosporin A, welche über eine immunsuppressive Wirkung hinauszugehen scheint, ist weitgehend unerforscht. Auch Xeroderma Pigmentosum (XP-) Patienten besitzen ein mehr als 1000-fach erhöhtes Hautkrebsrisiko aufgrund einer defekten Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) von UV-induzierten DNA-Schäden. Daher sollte in dieser Dissertation der Einfluss des Immunsuppressivums Cyclosporin A im Vergleich zu Everolimus auf die funktionelle DNA-Reparaturfähigkeit in verschiedenen Zellsystemen sowie auf die Regulation von DNA-Reparatur-Genen untersucht werden.

Anhand funktioneller DNA-Reparatur-Studien konnte eine Cyclosporin A-induzierte Hemmung der NER in immortalisierten SV40-transformierten Fibroblasten- und EBV-transformierten Lymphoblastenzelllinien nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Cyclosporin A wurde durch Everolimus die NER nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse könnten eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Hautkrebsrisiko bei Transplantationspatienten darstellen.

Um den molekularen Mechanismus der Cyclosporin A-vermittelten Hemmung der NER besser zu verstehen, wurden anhand von Expressionsanalysen alle XP-Gene (XPA bis XPG) darauf hin untersucht, ob sie von Cyclosporin A auf mRNA- oder Proteinebene differenziell reguliert werden. Cyclosporin A verminderte die mRNA-Expression von *XPB*, *XPC*, *XPD* und *XPG*. Auf Proteinebene führte Cyclosporin A lediglich zu einer reduzierten XPA- und XPG-Proteinexpression. Durch Überexpression von XPA und XPG in normalen und XP-defizienten Fibroblastenzelllinien konnte die funktionelle Bedeutung dieser beiden Proteine auf die Cyclosporin A-induzierte NER-Inhibierung bestätigt werden, da das XPA- oder das XPG-Protein die Cyclosporin A-Wirkung auf die NER vollständig aufheben konnte.

Ferner wurde untersucht, ob die Cyclosporin A-induzierte NER-Hemmung über ähnliche molekulare Mechanismen wie die immunsuppressive Wirkung, nämlich über eine Hemmung der Calcium-abhängigen Phosphatase Calcineurin und über Calcineurin-abhängige Signalwege (z. B. CREB, NFAT), vermittelt wird. Es zeigte sich, dass Calcium die NER ansteigen lässt. Darüber hinaus konnte auch eine Calcineurin-Überexpression die NER erhöhen sowie die Cyclosporin A-induzierte Inhibierung der NER wieder vollständig aufheben. Weiterhin wurde demonstriert, dass eine Calcineurin-Herunterregulierung mittels RNAi die XPA- und XPG-Proteinexpression

reduzierte. Diese Ergebnisse belegen, dass die Cyclosporin A-induzierte NER-Inhibierung durch Calcineurin und über eine Herunterregulierung der XPA- und XPG-Proteinexpression vermittelt wird. Überdies konnte gezeigt werden, dass eine CREB-Überexpression die NER ebenfalls erhöhte, was auf die Mitbeteiligung einer CREB-vermittelten Transkriptionsregulation hinweist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass Cyclosporin A über einen Calcineurin-abhängigen Signalweg eine differenzielle Regulation der XPA- und XPG-Proteine bewirkt, welche die NER inhibiert. So kann zumindest zum Teil das erhöhte Hautkrebsrisiko von Transplantationspatienten auf der molekularen Ebene erklärt werden.

Abstract

Unlike other immunosuppressive drugs including Everolimus, Cyclosporin A causes a dramatic increase of UV-induced skin cancer in transplant patients. The molecular mechanisms of Cyclosporin A are still unclear and seem to exceed the immunosuppressive effect. Xeroderma pigmentosum (XP-) patients suffer from a more than 1000-fold increased skin cancer risk due to a defective nucleotide excision repair (NER) of UV-induced DNA damages. Therefore, this doctoral thesis examined the influence of Cyclosporin A compared to Everolimus on functional DNA repair capacity in different cell systems and on regulation of DNA-repair genes.

Functional DNA repair assays revealed that Cyclosporin A inhibited the nucleotide excision repair pathway in immortalized SV-40 fibroblasts and EBV-lymphoblasts. In contrast, Everolimus did not affect the cellular nucleotide excision repair capacity. These results might explain the different skin cancer risk depending on the immunosuppressive medication.

To further understand the mechanism of the Cyclosporin A-induced NER-inhibition, XP-mRNA- and -protein-expression levels (XPA-XPG) were analysed in order to identify the XP-genes, which are differentially regulated by Cyclosporin A. It could be demonstrated that Cyclosporin A reduced *XPB*-, *XPC*-, *XPD*- and *XPG*- mRNA expression. In addition, Cyclosporin A downregulated XPA- and XPG-proteinexpression. Overexpression of XPA and XPG in normal fibroblasts and XP-deficient cell lines confirmed the role of XPA and XPG in Cyclosporin A-induced reduction of NER, as XPA- or XPG-proteins fully complemented the diminished NER in Cyclosporin A-treated cells.

The immunosuppressive effect of Cyclosporin A is modulated via the calcium-dependent phosphatase calcineurin and calcineurin-dependent signalling (i.e. CREB, NFAT). These pathways were analysed regarding the Cyclosporin A-induced NER-inhibition. It could be demonstrated that calcium enhanced NER. Furthermore, calcineurin overexpression resulted in an increased NER and complemented the Cyclosporin A-induced reduction of NER. In addition, calcineurin knockdown via RNAi reduced XPA- and XPG- protein expression. Thus, the Cyclosporin A-induced reduction of NER is modulated via inhibition of calcineurin, which in turn is mediated by downregulation of XPA- and XPG-proteins. Likewise, CREB-overexpression also increased NER, indicating that NER may also in part be modulated transcriptionally.

The findings of this doctoral thesis reveal that Cyclosporin A inhibits nucleotide excision repair via a calcineurin-dependent signalling pathway and differential XPA- and XPG-protein regulation. This may explain the skin cancer proneness in organ transplant patients on molecular levels.

Abkürzungsverzeichnis

Neben den international gültigen physikalischen Einheiten, chemischen Symbolen und international gebräuchlichen Abkürzungen fanden folgende Abkürzungen Verwendung:

| | |
|-------------|--|
| Anneal | Annealing temperature (Temperatur für Anlagerung der <i>Primer</i>) |
| Aqua bidest | zweifach destilliertes Wasser |
| AP-1 | Activating Protein 1 |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AMP | Adenosin-5'-monophosphat |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| BCIP | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat |
| BER | Basen-Exzisions-Reparatur (engl.: base excision repair) |
| BSA | Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin) |
| cAMP | zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat |
| cDNA | komplementäre DNA (engl.: complementary DNA) |
| CBP | CREB-bindendes Protein |
| Cdk | Cyclin-abhängige Kinasen (engl.: cyclin dependent kinases) |
| CPD | Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer(e) |
| 6-4PP | Pyrimidin-6,4-Pyrimidon Photoprodukt(e) |
| CMV | Cytomegalovirus |
| CRE | cAMP-responsives Element |
| CREB | cAMP-responsives-Element-bindendes Protein |
| CS | Cockayne Syndrom |
| CsA | Cyclosporin A |
| Cyp A | Cyclophilin A |
| DDB | „damaged DNA“ Bindepotein |
| DEAE | Diethylaminoethyl |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMEM | engl: Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| ddNTP | Didesoxyribonukleosidtriphosphat |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| DSB | Doppelstrangbruch-Reparatur (engl.: double strand break repair) |
| DTT | Dithiothreitol |
| dTTP | Desoxythymidintriphosphat |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |

| | |
|----------------|---|
| ECL | engl.: enhanced chemiluminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N'-Tetra-Acetat |
| ELISA | Enzymgebundener Immunabsorbtiionstest (engl.: enzyme-linked immuno sorbent assay) |
| ERK 1/2 | Extrazellulär Signal-regulierte Kinasen 1 + 2 |
| FBS | fötale Rinderserum (engl.: fetal bovine serum) |
| FKBP | FK506-bindendes Protein |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| GGR | Globale Genomreparatur (engl.: global genome repair) |
| HCR | Wirtzellreaktivierung (engl.: host cell reactivation) |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| HR | Homologe Rekombination |
| HRP | Meerrettichperoxidase (engl.: horseradish peroxidase) |
| JNK | c-Jun-N-terminale Kinase |
| IgG | Immunglobulin G |
| LB | Luria Bertani |
| LUC | Luciferase |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Protein Kinase |
| MEM | engl: Minimal Essential Medium Eagle |
| MmAb | Monoklonaler Antikörper aus Maus (engl.: mouse monoklonal antibody) |
| MMP | Matrixmetalloproteinasen |
| MTT | 3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid |
| NFAT | Nukleärer Faktor von aktivierten T-Zellen (engl: nuclear factor of activated T-cells) |
| NF- κ B | Nukleärer Faktor Kappa B (engl.: nuclear factor kappa B) |
| NBT | Nitroblau-Tetrazoliumsalz |
| NER | Nukleotid-Exzisions-Reparatur (engl.: nukleotide excision repair) |
| NHEJ | nicht-homologe Endverknüpfung (engl.: non-homologous end-joining) |
| nt | Nukleotid |
| OD | optische Dichte |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl.: phosphate buffered saline) |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PPi | anorganisches Pyrophosphat |
| PRR | Postreplikatorisches Reparatursystem (engl.: post replication repair) |
| qRT-PCR | quantitative <i>Realtime</i> PCR |
| RLU | relative Lichteinheiten (engl.: relative light units) |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| RPA | Replikationsprotein A |

| | |
|---------|---|
| RpAb | Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen (engl.: rabbit polyklonal antibody) |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| RPMI | engl.: Roswell Park Memorial Institute |
| RT-PCR | Reverse-Transkriptase-PCR |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium-dodecylsulfate) |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes (Standarderror of the Mean) |
| SOB | Super Optimal Broth |
| S-Phase | Synthese-Phase |
| S-TBS | TBS mit zugesetztem CaCl ₂ und MgCl ₂ |
| SV | Simian Virus |
| SUMO | engl.: small ubiquitin-like modifier |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| Taq | thermus aquaticus |
| TBS | Tris-gepufferte Kochsalzlösung (engl.: tris buffered saline) |
| TCR | Transkriptionsgekoppelte Reparatur (engl.: transcription-coupled repair) |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TGFβ1 | transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor β1) |
| TLS | Transläsionale Synthese (engl.: translesion synthesis) |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| Tris | Tris-hydroxymethyl-aminomethan |
| TTD | Trichothiodystrophie |
| Tween | Polyoxyethylensorbitanmonolaurat |
| UTR | Untranslatierte Region |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| XP | Xeroderma Pigmentosum |
| XPV | Xeroderma Pigmentosum Variante |

Es wurden folgende Fachtermini verwendet, deren Übersetzung ins Deutsche schwierig und in der Literatur weniger üblich ist:

| | |
|------------|---|
| Blot: | Übertragung von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran |
| Coating: | Beschichten von Wellplatten mit DNA oder Proteinen |
| Stripping: | Ablösen von gebundenem Antikörper von einer Nitrocellulosemembran |
| Reprobing: | erneute Hybridisierung nach dem „Stripping“ |
| Konfluent: | das Zusammentreffen oder Verschmelzen zweier oder mehrerer Objekte zu einem Ganzen (Zellkultur: dicht wachsende Zellen) |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------|
| ZUSAMMENFASSUNG | I |
| ABSTRACT..... | III |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | V |
| INHALTSVERZEICHNIS | VIII |
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Immunsuppressiva und deren (Neben-) Wirkungen bei Transplantationspatienten | 1 |
| 1.1.1 Die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus | 2 |
| 1.1.1.1 Eigenschaften, Klinische Anwendungen und Nebenwirkungen | 2 |
| 1.1.1.2 Molekulare Wirkmechanismen | 3 |
| 1.1.2 Die mTor-Inhibitoren Rapamycin und Everolimus..... | 6 |
| 1.1.2.1 Eigenschaften, Klinische Anwendung und Nebenwirkungen..... | 6 |
| 1.1.2.2 Molekulare Wirkmechanismen | 7 |
| 1.1.3 Azathioprin und Mycophenolat-Mofetil | 9 |
| 1.1.4 Glucocorticoide..... | 10 |
| 1.2 UV-Strahlung und die Wirkung auf die Haut..... | 12 |
| 1.3 UV-induzierte DNA Schäden..... | 13 |
| 1.4 DNA Reparaturmechanismen | 14 |
| 1.4.1 Die Exzisionsreparatur..... | 15 |
| 1.4.1.1 Die Basen-Exzisions-Reparatur (BER) | 15 |
| 1.4.1.2 Die Mismatch-Reparatur | 16 |
| 1.4.1.3 Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) | 16 |
| 1.4.2 Reparatur durch Rekombination (Doppelstrangbruch-Reparatur) | 18 |
| 1.4.3 Die Transläsionale Synthese (TLS) | 18 |
| 1.5 NER-assoziierte Erkrankungen | 19 |
| 1.5.1 Xeroderma Pigmentosum (XP)..... | 20 |
| 1.5.2 Cockayne Syndrom (CS)..... | 21 |
| 1.5.3 Trichothiodystrophie (TTD) | 22 |
| 1.6 Die XP-Proteine..... | 23 |
| 1.7 Zielsetzung..... | 28 |
| 2. MATERIAL UND METHODEN | 29 |
| 2.1 Material | 29 |
| 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial | 29 |
| 2.1.2 Chemikalien | 31 |
| 2.1.3 Puffer und Lösungen | 32 |
| 2.1.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme | 35 |
| 2.1.5 Enzyme und Marker | 36 |
| 2.1.6 Antikörper, Primer, Plasmide und RNAi | 37 |
| 2.1.7 Bakterienstämme, Zelllinien und Kulturmedien | 40 |
| 2.1.8 Datenbanken und Computerprogramme | 41 |
| 2.2 Methoden..... | 42 |
| 2.2.1 Zellkultur- und Transfektionsmethoden | 42 |
| 2.2.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien | 42 |
| 2.2.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung | 42 |
| 2.2.1.3 Behandlung und Stimulation der Zellen..... | 43 |
| 2.2.1.4 Zellzahlbestimmung | 43 |
| 2.2.1.5 UV-Überlebensstest (Post-UV cell survival) | 44 |
| 2.2.1.6 Transiente Transfektion von Lymphoblasten | 45 |

| | | |
|----------|--|----|
| 2.2.1.7 | Transiente Transfektion von Fibroblasten | 46 |
| 2.2.1.8 | Der Wirts-Zell-Reaktivierungsassay zur Messung der NER | 47 |
| 2.2.1.9 | Kultivierung von Bakterien | 49 |
| 2.2.1.10 | Transformationsmethoden in <i>E. coli</i> | 50 |
| 2.2.2 | <i>Molekularbiologische Methoden</i> | 50 |
| 2.2.2.1 | Isolierung von Plasmid-DNA | 50 |
| 2.2.2.2 | Isolierung von DNA und RNA | 51 |
| 2.2.2.3 | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 51 |
| 2.2.2.4 | Aufreinigung von DNA | 52 |
| 2.2.2.5 | Kontrolle von Plasmid-DNA durch Restriktionsverdau und | 52 |
| | Sequenzierung | 52 |
| 2.2.2.6 | Polymerase Kettenreaktion (PCR) | 54 |
| 2.2.2.7 | cDNA Synthese (Reverse Transkription) | 55 |
| 2.2.2.8 | Agarosegelelektrophorese | 56 |
| 2.2.2.9 | Quantitative Realtime PCR (qRT-PCR) | 56 |
| 2.2.2.10 | ELISA zum Nachweis von DNA-Photoprodukten | 58 |
| 2.2.3 | <i>Proteinbiochemische Methoden</i> | 59 |
| 2.2.3.1 | Isolierung von Gesamtprotein | 59 |
| 2.2.3.2 | Isolierung von Cytosol- und Kernprotein | 60 |
| 2.2.3.3 | Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford | 60 |
| 2.2.3.4 | Elektrophoretische Trennung der Proteine (SDS-PAGE) | 61 |
| 2.2.3.5 | Transfer von Proteinen auf Trägermembran | 62 |
| 2.2.3.6 | Kontrolle der geblocteten Proteine | 62 |
| 2.2.3.7 | Immunochemischer Protein-Nachweis | 63 |
| 2.2.3.8 | Reprobing von Nitrocellulosemembranen | 64 |
| 3. | ERGEBNISSE | 65 |
| 3.1 | Wirkung von Cyclosporin A und Everolimus auf die Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden | 65 |
| 3.1.1 | <i>Einfluss von Cyclosporin A und Everolimus auf das Zell-Überleben nach UV-Bestrahlung</i> | 65 |
| 3.1.1.1 | UV-Titrationskurvenbestimmung für beide Zelllinien | 65 |
| 3.1.1.2 | Cyclosporin A-Titrationskurvenbestimmung für beide Zelllinien | 67 |
| 3.1.1.3 | Everolimus-Titrationskurvenbestimmung für beide Zelllinien | 68 |
| 3.1.1.4 | Bestimmung des dosisabhängigen Einflusses von Cyclosporin A und Everolimus auf das Zellüberleben nach UV-Bestrahlung | 69 |
| 3.1.2 | <i>Einfluss von Cyclosporin A und Everolimus auf die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)</i> | 70 |
| 3.1.2.1 | Cyclosporin A-Einfluss auf die NER | 71 |
| 3.1.2.2 | Everolimus-Einfluss auf die NER | 73 |
| 3.1.3 | <i>Einfluss von Cyclosporin A und Everolimus auf die Reparaturkinetik von UV-induzierten Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren und Pyrimidin-6,4-Pyrimidon Photoprodukten</i> | 75 |
| 3.1.3.1 | Einfluss auf Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) | 75 |
| 3.1.3.2 | Einfluss auf Pyrimidin-6,4-Pyrimidon Photoprodukte (6-4PP) | 76 |
| 3.2 | Wirkung von Cyclosporin A auf die XP-Gene und XP-Proteine | 77 |
| 3.2.1 | <i>Expression der XP-mRNA in Cyclosporin A-behandelten Fibroblasten</i> | 77 |
| 3.2.2 | <i>Expression der XP-mRNA in Cyclosporin A-behandelten Lymphoblasten</i> | 78 |
| 3.2.3 | <i>Expression der XP-Proteine in Cyclosporin A-behandelten Fibroblasten</i> | 79 |
| 3.3 | XPA-, XPC- und XPG- Überexpression in Cyclosporin A- behandelten Zelllinien | 82 |
| 3.3.1 | <i>Überexpression von XPA, XPC und XPG in normalen Fibroblasten und Cyclosporin A-Effekt auf die NER</i> | 83 |
| 3.3.2 | <i>Überexpression von XPA in XPA-defizienten Fibroblasten und Cyclosporin A-Effekt auf die NER</i> | 84 |
| 3.3.3 | <i>Überexpression von XPC in XPC-defizienten Fibroblasten und Cyclosporin A-Effekt auf die NER</i> | 86 |
| 3.4 | Wirkungen von Calcium, Calcineurin und CREB auf die Nukleotid-Exzisions-Reparatur | 87 |

| | |
|--|-----|
| 3.4.1 Einfluss von Calcium auf die NER | 88 |
| 3.4.2 Einfluss einer Calcineurin-Überexpression auf die NER | 89 |
| 3.4.3 Einfluss einer Calcineurin-Herunterregulierung auf die NER | 91 |
| 3.4.4 Einfluss einer Calcineurin-Herunterregulierung auf die XP-Protein-Expression | 93 |
| 3.4.5 Einfluss einer CREB-Überexpression auf die NER | 94 |
| 3.4.6 Einfluss einer CREB-Herunterregulierung auf die NER | 96 |
| 4. DISKUSSION | 97 |
| 4.1 Cyclosporin A, jedoch nicht Everolimus, vermindert die Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden durch Inhibierung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) | 98 |
| 4.2 Cyclosporin A reguliert die XP-Gene differenziell auf mRNA- und Proteinebene | 102 |
| 4.2.1 Cyclosporin A inhibiert die Expression des XPA-Proteins, nicht aber die Expression der XPA-mRNA | 102 |
| 4.2.2 Cyclosporin A inhibiert die Expression der XPG-mRNA und des XPG-Proteins | 105 |
| 4.2.3 Cyclosporin A inhibiert die Expression der XPC-mRNA, nicht aber die Expression des XPC-Proteins | 106 |
| 4.2.4 Cyclosporin A inhibiert die Expression der XPB- und XPD-mRNA, nicht aber die Expression der XPB- und XPD-Proteine | 108 |
| 4.3 XPA und XPG, aber nicht XPC, komplementieren die Cyclosporin A-induzierte NER- Inhibierung | 109 |
| 4.4 Calcium, Calcineurin und CREB sind in die NER involviert | 112 |
| 4.4.1 Calcium moduliert die NER | 112 |
| 4.4.2 Calcineurin moduliert die NER | 112 |
| 4.4.3 Calcineurin moduliert die Proteine XPA und XPG | 114 |
| 4.4.4 CREB moduliert die NER | 117 |
| 4.5 Ausblick | 119 |
| 5. LITERATURVERZEICHNIS | 123 |
| 6. ANHANG | 144 |
| 6.1 Veröffentlichungen | 144 |
| 6.1.1 Publikationen | 144 |
| 6.1.2 Kongressbeiträge | 144 |
| 6.2 Lebenslauf | 145 |
| 7. DANKSAGUNG | 146 |

1. EINLEITUNG

1.1 Immunsuppressiva und deren (Neben-) Wirkungen bei Transplantationspatienten

Durch den Einsatz von Immunsuppressiva (Kortikosteroide, Antimetabolite, Cyclosporin A, Tacrolimus, und andere) erzielte die Transplantationsmedizin seit den achtziger Jahren große Fortschritte. Die Abstoßungsraten von Nieren-, Leber- und Herztransplantaten wurden deutlich reduziert und Langzeitüberlebensraten nach Transplantationen und die damit verbesserte Lebensqualität sind deutlich gestiegen (Diethelm *et al.*, 1992; Delmonico *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1998; Iman *et al.*, 2001).

Entscheidend für eine erfolgreiche Transplantation sind dabei die durch Immunsuppressiva modulierten zellvermittelten Immunreaktionen. Die zugrunde liegenden Mechanismen der Transplantatabstoßung begründen sich in einer komplexen Immunreaktion aus humoraler und zellulärer Immunantwort (Thorsby, 1999). Die Fremderkennung eines Transplantats beruht vor allem auf MHC I- und MHC II-Antigen-Erkennung, wodurch über spezifische Cytokine wie IL-2 oder IL-6 eine T-Zellrezeptor (TZR)-vermittelte Immunantwort induziert wird. Die B-Zell- und T-Zell-Aktivierung und die Stimulation intrazellulärer Signaltransduktionsprozesse führen zur akuten und chronischen Transplantatabstoßung. Die Wirksamkeit der Immunsuppressiva beruht auf einer Hemmung dieser komplexen Immunreaktionen, um die Abstoßung des Transplantats zu verhindern. Meist werden sie in Kombination eingesetzt. Zu den wichtigsten unerwünschten Nebenwirkungen zählen in Abhängigkeit des eingesetzten Immunsuppressivums eine erhöhte Infektionsgefahr, kardiovaskuläre Erkrankungen, Nephro- und Neurotoxizität, gastrointestinale Symptome (z. B. Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe), sowie ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Diabetes mellitus und Tumoren der Haut, der Niere und des Knochenmarks. Transplantierte Patienten besitzen ein drei- bis vierfach erhöhtes Krebsrisiko, wobei das Risiko für die Entwicklung von Hautkrebs in Regionen mit hoher Sonneneinstrahlung bei über 50% im Vergleich zur gesunden Normalbevölkerung liegt (Penn, 1998; Euvrard *et al.*, 2003). Präkanzerosen treten im Wesentlichen an sonnenlichtexponierten Arealen wie Gesicht, Ohren, Unterarmen und Handrücken auf (Euvrard *et al.*, 1995). In den ersten 5 Jahren nach der Transplantation entwickeln sich bei 40% der Patienten maligne und prä-maligne Hautveränderungen (Bouwes Bavinck *et al.*, 1996). Auch die Entwicklung des Kaposi-Sarkoms wird 400 bis 500-mal häufiger beobachtet als bei der Normalbevölkerung (Penn, 2000). Als mögliche Ursache für die erhöhte Malignität-Entwicklung nach Transplantationen wird ein Zusammenspiel von unterdrücktem

Immunsystem und einem direkten karzinogenen Effekt des jeweiligen Immunsuppressivums diskutiert (Domhan *et al.*, 2009). Im Folgenden werden die wichtigsten Immunsuppressiva und deren molekularen Wirkmechanismen sowie mögliche Effekte auf die Tumorentwicklung aufgezeigt.

1.1.1 Die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus

1.1.1.1 Eigenschaften, Klinische Anwendungen und Nebenwirkungen

Die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus sind zwei bedeutende immunsuppressiv wirksame Arzneimittel mit ähnlichen pharmakodynamischen Eigenschaften und vergleichbarem Nebenwirkungsprofil (Fukudo *et al.*, 2005). Cyclosporin A wird vom Bodenpilz *Tolypocladium inflatum* Gams aus der Familie der *Fungi imperfecti* gebildet. Andere von *Tolypocladium inflatum* Gams gebildete Cyclosporine haben ebenfalls eine immunsuppressive Wirksamkeit, allerdings weitaus geringer als die von Cyclosporin A (Borel, 1989). Es ist ein neutrales, lipophiles zyklisches Polypeptid aus 11 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 1203 Dalton (Borel, 1981; Wenger, 1986). Die immunsuppressive Wirkung von Cyclosporin A zeigte sich vor allem in der erstmals erfolgreichen Transplantation von Dünndarm, Lunge und Pankreas (Stiller, 1996; Kahan, 1999). Nieren- und Knochenmarkstransplantationen sind die Hauptindikatoren für Cyclosporin A. Daneben wird es auch zur Prophylaxe von „graft-versus-host disease“ eingesetzt. Weitere Anwendungsgebiete liegen unter anderem in der Therapie von Multipler Sklerose, Rheumatoider Arthritis, Lupus erythematoses, Psoriasis, primär biliärer Zirrhose, Myasthenia gravis und atopischer Dermatitis (Dougados *et al.*, 1993; Gregory *et al.*, 1996; Czech *et al.*, 2000; Yocum *et al.*, 2000; Cattran *et al.*, 2001; Faerber *et al.*, 2001). Zu den wichtigsten unerwünschten Nebenwirkungen von Cyclosporin A zählen Nephrotoxizität und arterielle Hypertonie, Hepatotoxizität, Hypertrichose, Diabetes mellitus sowie ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von lymphoproliferativen Erkrankungen und Malignomen (Mihatsch *et al.*, 1998; Schroder *et al.*, 1998).

Das Makrolidantibiotikum Tacrolimus (FK506) wird vom Bodenpilz *Streptomyces tsukulaensis* gebildet. Tacrolimus wurde erstmals 1989 nach einer Herztransplantation eingesetzt. Es hat eine stärkere Wirkung als Cyclosporin A und wird aufgrund weniger Lebertransplantatabstoßungen bevorzugt bei Lebertransplantationen und bei therapierefraktären Abstoßungen als sogenannte „Rescue-Therapie“ eingesetzt (Kino *et al.*, 1987; Peters *et al.*, 1993; Mihatsch *et al.*, 1998; Henry, 1999). Daneben wird es auch in der Behandlung der atopischen Dermatitis als Lokalthherapie eingesetzt

(Reitamo, 2001). Allerdings zeigt Tacrolimus schwere Nebenwirkungen und aufgrund des eingeschränkten Anwendungsbereiches bleibt Cyclosporin A das wichtigste Immunsuppressivum (Thiel *et al.*, 1994; Pirsch *et al.*, 1997; Spencer *et al.*, 1997; Mihatsch *et al.*, 1998; Cao *et al.*, 1999).

1.1.1.2 Molekulare Wirkmechanismen

Die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus (FK506) binden an ihre zelleigenen cytosolischen Rezeptoren – den Immunophilinen (peptidyl-prolyl cis-trans Isomerasen) – (Cyclosporin A an Cyclophilin A bzw. Tacrolimus an FK-506-bindendes Protein, FKBP12) und werden dadurch aktiviert (Handschumacher *et al.*, 1984; Takahashi *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1991) (Abbildung 1). Die immunsuppressive Wirkung beruht auf einer Hemmung der humoralen Immunantwort durch Inhibierung der T-Zellrezeptor-Signalübertragung und der B-Zell-Funktion, vermittelt durch Hemmung der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin (Suzuki *et al.*, 1990; Clipstone *et al.*, 1992; Fruman *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1994).

Die T-Zellrezeptor vermittelte Immunantwort wird durch MHC-II-Antigene induziert, welche in T-Lymphozyten die Phospholipase C aktivieren, die wiederum einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg durch Bildung von Inositol-Trisphosphat (IP3) und Diazylglycerol (DAG) generiert. Diese erhöhte Ca^{2+} -Konzentration aktiviert Calmodulin (*calcium modulated protein*), ein ubiquitäres regulatorisches Protein welches verschiedene Zielproteine – wie Proteinkinasen – reguliert und die Ca^{2+} -Freisetzung moduliert (Broeke *et al.*, 2004). Durch den intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg bindet Calmodulin an Calcineurin. Calcineurin, auch PP2B (Protein Phosphatase 2B) genannt, besteht aus einer katalytischen A-Untereinheit (CNA) und einer regulatorischen (auto-inhibierenden) B-Untereinheit (CNB) (Klee *et al.*, 1998). CNA enthält eine Bindestelle für die Calcineurin B-Untereinheit sowie für Calmodulin, während CNB eine Ca^{2+} -Bindestelle enthält (Rusnak *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2001).

Die Bindung von Calmodulin an eine Region in der Nähe des C-Terminus der katalytischen A-Untereinheit von Calcineurin verdrängt die auto-inhibierende Domäne und gibt die aktive Seite frei (Stemmer *et al.*, 1994). Dieser enzymatisch aktive Komplex dephosphoryliert die cytosolische Komponente des nukleären Faktors von aktivierten T-Zellen (NFATc), der daraufhin in den Kern von T-Lymphozyten translozieren kann (Loh *et al.*, 1996; Beals *et al.*, 1997). Dort bindet NFATc an die nukleäre Komponente (NFATn), und dieser aktivierte Komplex induziert zusammen mit

AP-1 die Transkription von für die humorale Immunantwort relevanten Genen, wie IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 und IL-8, Interferon- γ , und TNF- α (Andersson *et al.*, 1992; Goldfeld *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 1997).

Über eine Hemmung von Calcineurin inhibieren Cyclosporin A und Tacrolimus die NFAT-vermittelte Expression immunrelevanter Gene, und damit die Aktivierung und Proliferation von B-Zellen und zytotoxischen T-Zellen (Flanagan *et al.*, 1991; Schreiber *et al.*, 1992; Ho *et al.*, 1996; Ruhlmann *et al.*, 1997) (Abbildung 1). Infolgedessen wird die Transplantatabstoßung durch Calcineurin-vermittelte Modulation der humoralen Immunantwort gehemmt.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der von Cyclosporin A und Tacrolimus inhibiert wird, ist das cAMP-responsive-Element-bindende Protein (CREB) (Schwaninger *et al.*, 1995). Dieses ubiquitär exprimierte Protein bindet an Gene, welche im Promotor ein cAMP-responsives Element (CRE) besitzen. CREB ist u. a. an der T-Zell-Entwicklung/Aktivierung und Induktion der IL-2-Produktion beteiligt (Rudolph *et al.*, 1998). Es sind verschiedene Spleißvarianten von CREB bekannt (Sakai *et al.*, 1999). CREB wird durch Phosphorylierung am Serin 133 (CREB-341) aktiviert (Parker *et al.*, 1996; Mayr *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung erfolgt über die cAMP-stimulierte Proteinkinase A sowie über Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinasen I, II und IV, und über die extrazellulär Signal-regulierte Kinase (ERK) (Montminy, 1997; Sun *et al.*, 1994; Enslin *et al.*, 1995; Xing *et al.*, 1998). An das phosphorylierte CREB bindet der Koaktivator CBP (CREB-bindendes Protein), der die CREB-vermittelte Transkription aktiviert (Kwok *et al.*, 1994). Die immunsuppressive Wirkung von Cyclosporin A und Tacrolimus wird durch eine Hemmung der cAMP-stimulierten und Ca²⁺-induzierten CREB-vermittelten Transkription erzielt. Diese Hemmung erfolgt über eine Hemmung von Calcineurin, wobei das dephosphorylierte Substrat unbekannt ist und CREB am Serin 133 weiter phosphoryliert bleibt (Schwaninger *et al.*, 1995; Kruger *et al.*, 1997; Siemann *et al.*, 1999).

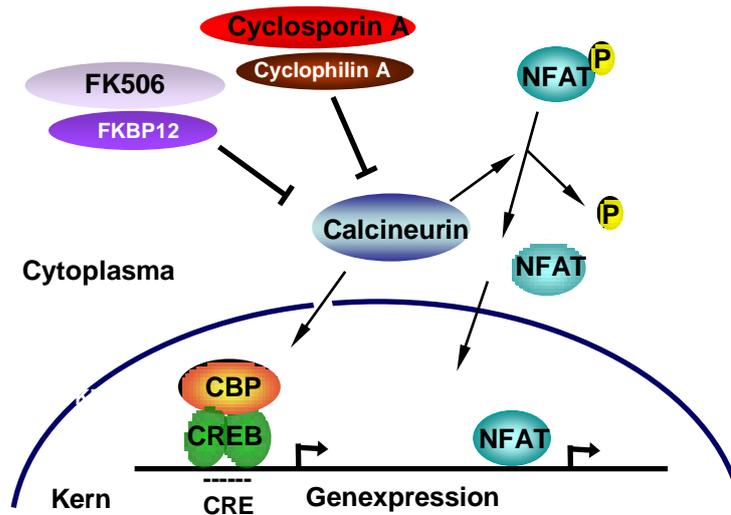


Abbildung 1: Molekularer Wirkmechanismus der Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin A und Tacrolimus (FK506). Abkürzungen sind im Text erklärt.

Calcineurin wird ubiquitär gebildet; da in Lymphozyten vergleichsweise wenig Calcineurin vorkommt, äußert sich die Inhibition von Calcineurin in einer Suppression der humoralen Immunantwort (Fukudo *et al.*, 2005). Cyclosporin A und Tacrolimus können Calcineurin nur inhibieren, wenn sie an ihre Immunophiline binden. Am Beispiel von Cyclosporin A/Cyclophilin A soll dies kurz erläutert werden: Alle bekannten eukaryotischen Cyclophiline haben Affinität zu Cyclosporin A (Colgan *et al.*, 2005). Das menschliche Cyclophilin 18 (hCyp18, entspricht dem Cyclophilin A) kann am stärksten an Cyclosporin A binden (Fischer, 1994). Die katalytische Domäne von Cyp A bildet eine hydrophobe Tasche, in die Cyclosporin A binden kann und somit die Isomeraseaktivität von Cyclophilin A beeinflusst. Dadurch ändert Cyclosporin A seine Konformation und kann mit Calcineurin einen Komplex bilden (Liu *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 2004). Ein anderes Cyclophilin, Cyp B, kann ebenfalls stark an Cyclosporin A binden, Cyp A jedoch scheint der Hauptmediator der vermittelten Immunsuppression zu sein (Colgan *et al.*, 2005). Neben dem Calcineurin-Signalweg wird die immunsuppressive Wirkung von Cyclosporin A auch durch den JNK/p38-Signalweg vermittelt (Matsuda *et al.*, 2000). Die Hemmung der T-Zell-Aktivierung ist in diesem Signalweg unabhängig von Calcium und Calcineurin (Metcalfe *et al.*, 1994).

Als Ursache einer Entwicklung von Tumoren, besonders von kutanen Melanomen, unter einer Cyclosporin A-Therapie wird üblicherweise ein unterdrücktes Immunsystem und der damit insuffizienten Eliminierung von Tumorzellen angesehen (Masuhara *et al.*, 1993). Möglicherweise begünstigt eine Hochregulation von TGF β 1 in Cyclosporin A-Patienten das Wachstum bereits vorhandener Tumore (Hojo *et al.*, 1999). Darüber

hinaus wird neben dieser Tumorprogression auch ein Effekt von Cyclosporin A auf die Tumorinitiation diskutiert. Vereinzelt Literaturhinweise bringen die molekularen Wirkmechanismen von Cyclosporin A in einen Zusammenhang mit einer Inhibierung der DNA-Reparatur (Ahlers *et al.*, 1999; Herman *et al.*, 2001; Herman *et al.*, 2002; Sugie *et al.*, 2002; Yarosh *et al.*, 2005). Yarosh *et al.* (2005) zeigten, dass die Reparatur von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren in Keratinozyten durch Cyclosporin A inhibiert wurde. Des Weiteren wurde in UV-bestrahlten peripheren-Blutmononucleären-Zellen (PBMC) die Inkorporation von radioaktiv-markierten Thymidin durch Cyclosporin A und Tacrolimus inhibiert (Herman *et al.*, 2001). Ein erhöhtes Tumorwachstum unter einer Tacrolimus-immunsuppressiven Therapie wurde u. a. 2002 von Schumacher *et al.* (2002) beschrieben. Ob Tacrolimus ein ähnliches Hautkrebsrisiko für Transplantationspatienten verursacht wie Cyclosporin A, ist allerdings unklar, denn bisher wurden geringere onkogene Effekte beobachtet (Fung *et al.*, 2001).

1.1.2 Die mTor-Inhibitoren Rapamycin und Everolimus

1.1.2.1 Eigenschaften, Klinische Anwendung und Nebenwirkungen

Die mTOR-Inhibitoren Rapamycin (auch Sirolimus genannt) und Everolimus gehören zu der Gruppe der Proliferationshemmer. Rapamycin wurde aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert und nach seinem Fundort, den Osterinseln „Rapa Nui“ benannt (Vezina *et al.*, 1975). Rapamycin gehört wie Cyclosporin A und Tacrolimus zu den makrozyklischen Immunsuppressiva (Sehgal, 2003). Rapamycin hat ein Molekulargewicht von 914 Dalton (Paiva *et al.*, 1991). Seine antimykotische, antiproliferative und antitumoröse Wirkungen erlauben eine breite klinische Anwendung (Sehgal, 2003). Seit 1999 ist es als Immunsuppressivum zugelassen (Marx *et al.*, 2001). Rapamycin inhibiert nicht nur die Proliferation von T- und B-Lymphozyten, sondern auch die von Hepatozyten, Fibroblasten und nicht-lymphoiden Tumorzellen (Dumont *et al.*, 1990). Zentraler Angriffspunkt von Rapamycin ist die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), welche die Signalwege der Proliferation und Angiogenese reguliert (Vivanco *et al.*, 2002). Daneben inhibiert Rapamycin die STAT3-Signalkaskade, welche in vielen Tumoren hochreguliert ist (Klampfer, 2006). Die antiproliferative Wirkung von Rapamycin wird in der Kardiologie genutzt um Restenosen durch Hyperplasie nach Stent-Implantationen zu verhindern (Gregory *et al.*, 1993; Gallo *et al.*, 1999; Poston *et al.*, 1999). Zu den unerwünschten Nebenwirkungen bei einer Rapamycin-immunsuppressiven Therapie zählen erhöhte Lipid- und Cholesterolspiegel, Thrombozytopenie, Myelosuppression, milde Stomatitis,

und Polyarthralgie. Im Gegensatz zu Cyclosporin A und Tacrolimus ist Rapamycin nicht nephrotoxisch (Saunders *et al.*, 2001).

Everolimus ist ein synthetisches Derivat von Rapamycin. Everolimus besitzt *in vitro* und *in vivo* die gleichen Eigenschaften wie Rapamycin, die Bindung an FKBP12 ist jedoch dreifach verringert (Schuler *et al.*, 1997; Bohler *et al.*, 1998; Sedrani *et al.*, 1998). Everolimus ist hydrophiler, hat eine kürzere Halbwertszeit und besitzt eine größere Bioverfügbarkeit im Vergleich zu Rapamycin (Formica *et al.*, 2004).

Die antiproliferativen Effekte von Rapamycin und Everolimus machen sie zu einem wirksamen Medikament in der Krebstherapie (Hosoi *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2003; Chan, 2004; Faivre *et al.*, 2006). Bei Patienten nach einer Nierentransplantation wurde ein Rückgang des Kaposi-Sarkoms beobachtet (Campistol *et al.*, 2004; Stallone *et al.*, 2005; Lebbe *et al.*, 2006). Durch Inhibierung der VEGF- (*Vascular Endothelial Growth Factor*) Produktion kommt es zusätzlich zur Regression des Tumors (Guba *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass Rapamycin Akt (Proteinkinase B)-positive Lymphome in die Remission bringt (Wendel *et al.*, 2004). Akt Signaltransduktionswege sind in Tumoren aktiv und vermitteln Chemoresistenz gegenüber Doxorubicin oder Cyclophosphamid (Min *et al.*, 2003; Rajasekhar *et al.*, 2003). Daher stellt eine Kombination aus Rapamycin und Doxorubicin eine geeignete Therapie für die Behandlung von Lymphomen dar. Everolimus wird bei der Therapie von Posttransplantations-Lymphoproliferativen Erkrankungen (PTLD), Mantelzelllymphomen und Nierenzellkarzinomen eingesetzt (Majewski *et al.*, 2000; Haritunians *et al.*, 2007; Motzer *et al.*, 2008).

1.1.2.2 Molekulare Wirkmechanismen

Rapamycin und Everolimus binden wie Tacrolimus an das Immunophilin FKBP12. Im Gegensatz zum Tacrolimus/FKBP12-Komplex, der die Phosphatase Calcineurin inhibiert, bindet der Rapamycin/Everolimus/FKBP12-Komplex an mTORC1, ein Protein, welches mit mTORC2 den Komplex mTOR (*mammalian target of rapamycin*) bildet (Loewith *et al.*, 2002). Statt mTOR wird auch häufig die Bezeichnung FRAP (FKBP-Rapamycin-assoziiertes Protein) verwendet (Bierer *et al.*, 1990). Durch diese Bindung werden die mTOR-Signalwege inhibiert (Abbildung 2). Die Serin-Threonin-Kinase mTOR ist ein Mediator der G1-Progression des Zellzyklus und spielt in der Regulation verschiedenster Signalwege wie Wachstum und Metabolismus eine entscheidende Rolle (Heitman *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1994; Bjornsti *et al.*, 2004).

Darüber hinaus wird die Rolle von mTOR in der Transformation von Epithelzellen beschrieben (Sodhi *et al.*, 2006). Die Aktivierung und Autophosphorylierung von mTOR erfolgt über Cytokin- oder wachstumsfaktorinduzierte Signale. Zu den mTOR-Signalwegen zählen die Regulation der p70S6-Kinase sowie des Cyclin E/Cdk2 Proteinkomplexes (Brown *et al.*, 1994; Sabatini *et al.*, 1995; Zheng *et al.*, 1995; Nojima *et al.*, 2003). Die p70S6-Kinase phosphoryliert das ribosomale 40D-Protein-S6, was zu einer erhöhten Translation von mRNA-Transkripten mit einer Polypyrimidinsequenz am 5'-Terminus führt (Jefferies *et al.*, 1994; Jefferies *et al.*, 1997). Der von mTOR aktivierte Cyclin E/Cdk2-Komplex synthetisiert Zellzyklusproteine. Ferner aktiviert mTOR den zur CREB/ATF-Familie gehörenden Transkriptionsfaktor CREM, welcher zur Transkription von PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) beiträgt (Feuerstein *et al.*, 1995; Feuerstein *et al.*, 1996; Javier *et al.*, 1997; Sehgal, 2003). Im Gegensatz zu CREB agiert CREM als *down*-Regulator der cAMP-induzierten Transkription (Foulkes *et al.*, 1991). Des Weiteren ist mTOR durch Phosphorylierung des eIF-4E *binding protein* (4E-BP1) an der Translation der für das Zellwachstum und Zellproliferation notwendigen Gene beteiligt (Beretta *et al.*, 1996; Brunn *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2006).

Rapamycin und Everolimus blockieren die mTOR-vermittelten Signaltransduktionswege, wodurch letztendlich über IL-2 die T- und B-Zellaktivierung und -Proliferation gehemmt und der Zellzyklus in der mittleren G1-Phase inhibiert wird (Terada *et al.*, 1993). Die Inhibierung der p70S6-Kinase-Aktivität durch Rapamycin führt zu einer verminderten Expression ribosomaler Proteine und Elongationsfaktoren, wie den eEF-1 α und den eEF-2-Elongationsfaktor für die Proteinsynthese (Terada *et al.*, 1994). Über die Hemmung von CREB/ATF wird der Zellzyklusregulator PCNA gehemmt, der für den Übergang der G1-Phase in die S-Phase verantwortlich ist (Javier *et al.*, 1997). Rapamycin blockiert die Phosphorylierung des 4E-BP1 und hemmt damit die eIF-4E-abhängige Translation (Beugnet *et al.*, 2003). Da fast alle zellulären Proteine eIF-4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*) benötigen, scheint dies der Hauptmechanismus der antiproliferativen Wirkung von Rapamycin zu sein (Graves *et al.*, 1995; Beretta *et al.*, 1996). Weiterhin inhibiert Rapamycin durch mTOR die Synthese von Zellzyklusproteinen (Cdk1 und Cyclin A) über eine Hemmung der Kinaseaktivität des Cyclin E/Cdk2-Komplexes (Morice *et al.*, 1993; Nourse *et al.*, 1994).

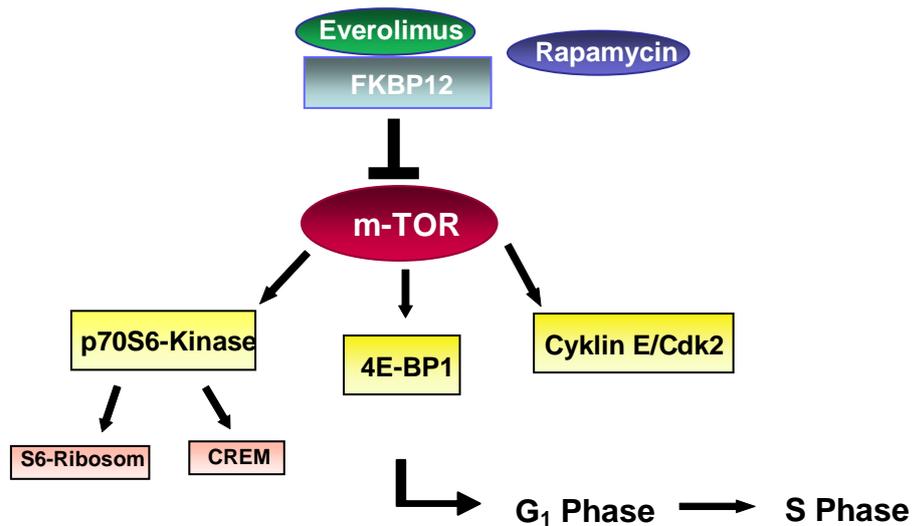


Abbildung 2: Molekularer Wirkmechanismus der mTOR-Inhibitoren Everolimus und Rapamycin. Abkürzungen sind im Text erklärt.

1.1.3 Azathioprin und Mycophenolat-Mofetil

Azathioprin ist ein antiproliferativ wirksames Pro-Pharmakon, dessen Metabolit 6-Mercaptopurin die Proliferation der T- und B-Lymphozyten hemmt. 6-Mercaptopurin inhibiert dabei die Purinnukleotid-Synthese und greift in die RNA-Synthese und den RNA-Metabolismus ein. Klinische Anwendung findet Azathioprin neben der Transplantationsmedizin unter anderem auch bei Multipler Sklerose, Lupus erythematodes, Arthritis und Morbus Crohn. Neben den allgemeinen durch Immunsuppressiva ausgelösten Nebenwirkungen (Kapitel 1.1) besitzt Azathioprin auch ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung maligner Erkrankungen, besonders für Hautkrebs. Ein Zusammenspiel zwischen UVA-Strahlung und dem aktiven Metaboliten von 6-Mercaptopurin (6-Thioguanin) wird als mögliche Ursache herangezogen (O'Donovan *et al.*, 2005). Dieser Metabolit wird in die DNA von Hautzellen eingebaut und durch UVA-Strahlung in Guanin-6-Sulfat umgewandelt, welches durch fehlerhafte transläsionale Synthese (Kapitel 1.4.3) zu Mutationen führen kann (Swann *et al.*, 1996). Der mutagene Effekt von Guanin-6-Sulfat begünstigt daher die Entwicklung von Hautkrebs (O'Donovan *et al.*, 2005).

Neben Azathioprin zählt Mycophenolat-Mofetil ebenfalls zu den Antimetaboliten. Mycophenolat-Mofetil inhibiert die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase und hemmt damit die Synthese von Guanosin, welches essentiell für die Proliferation von T-Zellen ist (Allison *et al.*, 1996; Mathew, 1998; van *et al.*, 1999). Als potentes

Immunsuppressivum induziert es Apoptose und wirkt antiangiogenetisch (Messina *et al.*, 2004; Vegso *et al.*, 2007). Neben der hohen Lymphozyten-Spezifität und Zytotoxizität besitzt Mycophenolat-Mofetil auch antiproliferative Eigenschaften (Morath *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu Azathioprin wurde ein geringeres Risiko für die Malignomentwicklung festgestellt (O'Neill *et al.*, 2006). Diese anti-tumoralen Effekte von Mycophenolat-Mofetil könnten für einen Einsatz in der Transplantationsmedizin interessant sein (Halloran *et al.*, 1997; Koehl *et al.*, 2007).

Antimetabolite werden meist mit Kortikoiden und Calcineurin-Inhibitoren kombiniert (Dual- oder Tripeltherapie). Dies führt zu einer nachweislich wirksameren Immunsuppression als eine reine Monotherapie und vermindert Nebenwirkungen, besonders des (Haut-) Krebsrisikos.

1.1.4 Glucocorticoide

Die zu den Kortikosteroiden gehörenden Glucocorticoide sind in der Transplantationsmedizin in zweierlei Hinsicht sehr effektiv: in geringen Dosen wirken sie entzündungshemmend und antiallergisch, in hohen Dosen zeigen sie immunsuppressive Wirkung. Prednison und sein aktiver Metabolit Prednisolon gehören zu den synthetischen Glucocorticoiden. Zur Prophylaxe werden sie auch in Kombination mit anderen Immunsuppressiva eingesetzt. Glucocorticoide binden an einen Rezeptor, der im Cytoplasma an HSP90 gebunden ist. Der Rezeptor löst sich von HSP90 und wandert in den Zellkern. Glucocorticoide inhibieren die Leukozytenmigration, modulieren die TNF- α - und IL-1 Synthese, interagieren mit den Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B und vermindern damit die antigenstimulierte T-Zell-Aktivierung (Fessler *et al.*, 1996; Bischof *et al.*, 1998; Matsue *et al.*, 2002). Die antiinflammatorischen Eigenschaften durch Verminderung der Leukotrien-, Prostaglandin- und Thromboxansynthese wirken einer Transplantatabstoßung entgegen. Zu den unerwünschten Nebenwirkungen zählen ein deutlich erhöhtes kardiovaskuläres Risiko sowie eine sogenannte Posttransplantationsosteoporose (Kasiske *et al.*, 1996). Ein erhöhtes Risiko für die Tumorentwicklung ist bisher nur in Kombination mit Cyclosporin A und Azathioprin beschrieben worden (Glover *et al.*, 1997; Jensen *et al.*, 1999a; Guenova *et al.*, 2009). Karagas *et al.* (2001) beobachteten ein erhöhtes Plattenepithelkarzinom- und ein leicht erhöhtes Basalzellkarzinom-Risiko in nicht-transplantierten Patienten unter einer dauerhaften Glucocorticoideinnahme.

In Abbildung drei sind die molekularen Wirkmechanismen der Immunsuppressiva in einer schematischen Darstellung stark vereinfacht zusammengefasst.

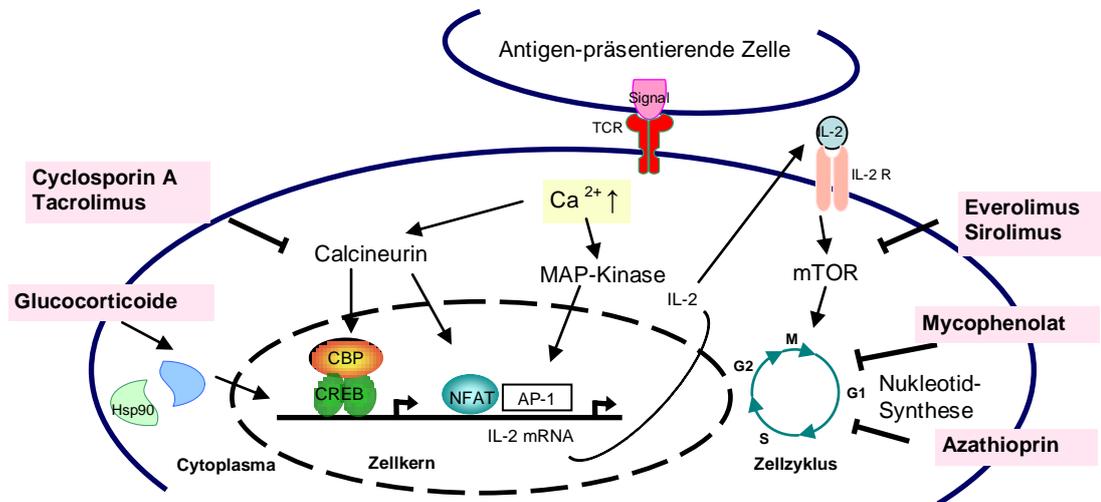


Abbildung 3: Stark vereinfachte schematische Darstellung über die Wirkungsweisen verschiedener Immunsuppressiva bei einer T-Zell-Rezeptor (TCR)-vermittelten Immunantwort. Abkürzungen sind im Text erläutert.

1.2 UV-Strahlung und die Wirkung auf die Haut

Die elektromagnetische Strahlung der Sonne gelangt in Form von UV-Strahlung (100 – 400 nm), sichtbarem Licht (400 – 700 nm) und infraroter Strahlung (700 nm – 1 mm) auf die Erdoberfläche. Die UV-Strahlung wird in drei Wellenlängenbereiche unterteilt: die UVC-Strahlung hat eine Wellenlänge von 100 – 280 nm und wird durch die Erdatmosphäre nahezu vollständig absorbiert, der UVB-Bereich hat eine Wellenlänge von 280 – 320 nm und der UVA-Bereich eine Wellenlänge von 320 – 400 nm (Soehnge *et al.*, 1997).

Der Wirkungsort der Strahlung ist beim Menschen in erster Linie die Haut, welche sich aus Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subcutis (Unterhaut) zusammensetzt. Die Epidermis besteht zu 90% aus Keratinozyten, welche im Stratum basale gebildet werden, von dort durch das Stratum spinosum und Stratum granulosum zum Stratum corneum wandern und als reife Korneozyten die Hornschicht bilden. Die im Stratum basale liegenden Melanozyten synthetisieren Melanin zum Schutz vor UV-Strahlung. In der Dermis liegen Fibroblasten netzartig mit Kollagenfaserbündeln, Glykosaminglykanen und Proteoglykanen vor. UV-Strahlung wird von den Hautschichten unterschiedlich absorbiert. Die Eindringtiefe der Strahlung nimmt dabei mit steigender Wellenlänge zu. So können bis zu 33% der UVB-Strahlen das Stratum corneum passieren und je nach Dicke der Epidermis auch das Stratum basale der Epidermis erreichen (Bruls *et al.*, 1984). Die langwelligen UVA-Strahlen können bis zu 50% vom Stratum corneum absorbiert werden und bis in die Dermis gelangen (Bruls *et al.*, 1984). Zwar wird nur etwa 1% der UVA-Strahlung von der Subcutis absorbiert, allerdings ist der UVA-Anteil am natürlichen Sonnenlicht ungefähr 20-fach höher als der UVB Anteil (Parrish *et al.*, 1982; Pitts, 1990).

Eine Überdosierung an natürlicher oder künstlicher UV-Strahlung löst akute Entzündungsreaktionen der Haut (Schwellung, Rötung, Sonnenbrand, photoallergische Reaktionen) sowie chronische Hautreaktionen, wie Immunsuppression und vorzeitige Hautalterung (*Photoaging*) aus. Weitere Folgen sind die Entwicklung von Hautmalignomen, einschließlich Basalzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom und kutanem Melanom (Slominski *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001; Krutmann, 2003).

Neben diesen Effekten gibt es auch noch weitere Wirkungen von UV-Strahlung. Dazu gehören unter anderem positives psychisches Wohlbefinden, eine Erhöhung des HDL-Cholesterins, verstärkte Bildung von Vitamin D₃, Blutdruckabnahme, Modulation der

Schilddrüsenaktivität und des Kortisolspiegels (Barth *et al.*, 1994; Chel *et al.*, 1998; Norris, 2001; Gambichler *et al.*, 2002). Weitere biologische Wirkungen von UV-Strahlung auf die Haut äußern sich zum Beispiel in aktivierten Signaltransduktionsprozessen, welche verstärkten Kollagenabbau und die Degradation der extrazellulären Matrix der Dermis auslösen (Di *et al.*, 2005; Lemaitre *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2006). Des Weiteren werden durch UV-Strahlung über die MAPKinasen p38, JNK1/2/3 und ERK 1/2 zahlreiche andere Signaltransduktionsprozesse aktiviert, welche über die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und p53 Proliferation, Differenzierung, Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Apoptose modulieren (She *et al.*, 2002; Bode *et al.*, 2003; Latonen *et al.*, 2005; Mi *et al.*, 2009).

1.3 UV-induzierte DNA Schäden

Zu den UV-induzierten DNA-Schäden gehören neben der Bildung von DNA-Photoprodukten auch Einzelstrangbrüche oder Protein-DNA-Quervernetzungen (Sinha *et al.*, 2002). UVB- und UVC-Strahlung kann direkt von der DNA absorbiert werden und ist hauptsächlich für DNA-Schäden verantwortlich. UVC-Strahlung wird zwar von der Ozonschicht absorbiert, findet beim experimentellen Arbeiten allerdings häufig Anwendung, da das Absorptionsmaximum der DNA bei 260 nm liegt und so durch UVC-Strahlung 2 bis 10 mal mehr Schäden entstehen als durch UVB-Strahlung (Ravanat *et al.*, 2001). DNA-Photoprodukte entstehen hauptsächlich durch eine Photoadditionsreaktion zwischen zwei Pyrimidinbasen (Cytosin und Thymin, Abbildung 4) (Friedberg *et al.*, 2006). In weitaus geringerer Anzahl entstehen als Photoprodukte Adenin-Dimere oder Adenin-Thymin-Dimere (Zhao *et al.*, 1996). Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) entstehen aus einer Zykladdition der C5-C6-Doppelbindungen benachbarter Pyrimidinbasen (Ley *et al.*, 1983; Afaq *et al.*, 2005). Pyrimidin-6,4-Pyrimidon Photoprodukte (6-4PP) entstehen aus einer Zykladdition der C5-C6-Doppelbindung eines 5` Pyrimidins und der C4 Carbonyl-Gruppe eines 3` Pyrimidins (Rosenstein *et al.*, 1987). Das Verhältnis von UV-induzierten CPD und 6-4PP ist ungefähr 3:1 (Sinha *et al.*, 2002). Da 6-4PP eine größere Distorsion der DNA-Helixstruktur bewirken als CPD, werden sie leichter erkannt und bis zu 5-mal schneller repariert (Reardon *et al.*, 2003).

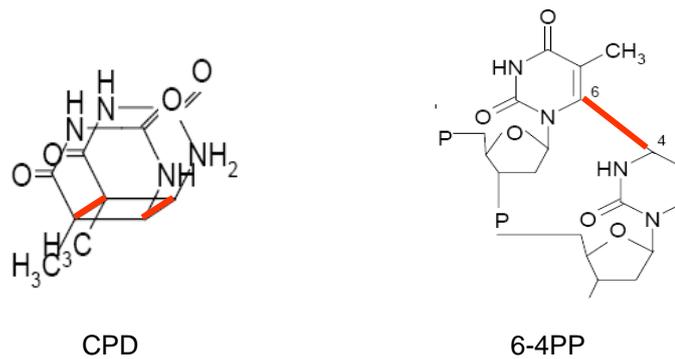


Abbildung 4: Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) und Pyrimidin-6,4-Pyrimidon Photoprodukten (6-4PP) unter UV-Strahlung (rot: Dimerbindung)

Neben den durch UVB- und UVC-Strahlung induzierten „direkten“ Schäden an der DNA kann UVA-Strahlung über Photorezeptoren anderer endogener Stoffe die DNA indirekt schädigen. Dies geschieht vor allem durch Riboflavine, Porphyrine, NAD(P)H und Hämproteine, welche langwellige Strahlung absorbieren und die Entstehung von ROS (*reactive oxygen species*) (Superoxidationen, Hydroxyl-Radikale, Singulett-Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid) induzieren (Ravanat *et al.*, 2001). Neben oxidativen Schäden an Lipiden und Proteinen bilden ROS Pyrimidindimere, Strangbrüche, Basenmodifikationen und DNA-Protein-Quervernetzungen (Stary *et al.*, 1997; de Laat *et al.*, 1996). UV-Strahlung induziert auch die Oxidation von Basen und die Bildung von 8-oxoGuanosin aus Guanin (Douki *et al.*, 1999). Dieses paart sich häufig mit Adenin, wodurch Transversionen von Guanin-Cytosin zu Thymin-Adenin entstehen können (Kasai *et al.*, 1991; Stary *et al.*, 1997).

1.4 DNA Reparaturmechanismen

Verschiedene Reparaturmechanismen stehen Prokaryoten und Eukaryoten zur Verfügung, um unterschiedlichste, durch UV-Strahlung, genotoxische Chemikalien oder durch endogene toxische Nebenprodukte induzierte DNA-Schäden zu reparieren. Die Reparatursysteme weisen aufgrund ihrer Komplexität Interaktionen und Überlappungen auf. Einer Aktivierung eines Reparaturmechanismus geht dabei in der Regel eine Aktivierung von „DNA damage checkpoints“ voraus, welche je nach Zellzyklus die DNA-Replikation oder -Transkription blockieren um DNA-Reparatur zu ermöglichen (Sancar *et al.*, 2004).

Die Photoreaktivierung von Pyrimidindimeren stellt einen sehr alten Mechanismus der DNA-Reparatur da, welcher in Prokaryoten, Eukaryoten, Archaeobakterien und einigen Säugern, aber nicht beim Menschen zu finden ist (Menck, 2002). Der Mechanismus der photoenzymatischen Reparatur beruht auf dem Enzym Photolyase, welches in einem lichtunabhängigen Schritt entweder an CPD (Photolyase) oder 6-4PP (6-4 Photolyase) bindet (Essen *et al.*, 2006). Durch Aktivierung mit UVA-Strahlung der Wellenlänge 350-450 nm wird der Antennenkomplex MTHF angeregt und überträgt die Anregungsenergie auf den katalytischen Kofaktor FADH. Dieser gibt daraufhin ein Elektron an das Photoprodukt ab, was zu einer Monomerisierung führt. Interessanterweise haben die in Säugern vorkommenden Cryptochrome in ihrer Sequenz und Struktur eine hohe Ähnlichkeit zu Photolyasen, sie fungieren als Photorezeptoren für den circadianen Rhythmus (Sancar *et al.*, 2004; Partch *et al.*, 2005). Photolyase-Cremes stellen neue therapeutische Ansätze zur Photoreaktivierung von UVB-induzierten Photoprodukten beim Menschen dar (Steger *et al.*, 2000).

Im Folgenden wird ein Überblick über die wichtigsten menschlichen DNA-Reparaturmechanismen gegeben.

1.4.1 Die Exzisionsreparatur

1.4.1.1 Die Basen-Exzisions-Reparatur (BER)

Fehlerhafte Basenpaarung, durch UVA-induzierte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowie durch Deaminierung und Alkylierung chemisch veränderte Basen werden von DNA-Glykolyasen erkannt und durch Einschneiden der N-glykosidischen Bindung zwischen Base und Desoxyribose aus dem DNA-Strang entfernt (Krokan *et al.*, 2000). Bestimmte Glykolyasen (hOGG1) können durch ihre Lyaseaktivität an der 3` Seite der Läsion schneiden, wodurch ein Einzelstrangbruch entsteht. Die Endonuklease APE1 schneidet danach an der 5`-Seite. Bei der *short-patch*-BER wird der frei verbliebene Phosphatrest durch DNA Polymerase beta (pol β) ersetzt und die DNA Ligase III verbindet die beiden DNA Stränge. Bei der *long-patch*-BER übernimmt ein Komplex aus RFC/PCNA-RNA, Polymerase delta (pol δ) und Polymerase epsilon (pol ϵ) die Reparatursynthese und fügt mehrere Nukleotide in 3`-Richtung ausgehend ein. Der überstehende DNA-Strang wird von der FEN1-Endonuklease entfernt und die DNA-Stränge durch DNA-Ligase I verbunden (Sancar *et al.*, 2004).

1.4.1.2 Die Mismatch-Reparatur

Die während einer Replikation auftretenden fehlerhaften Basenpaarungen sowie die häufig in Bereichen von Mikrosatelliten-Sequenzen entstehenden Deletionen und Insertionen werden von der Mismatch-Reparatur erkannt und repariert. Die falsche Basenpaarung wird durch das hMutS α Proteindimer (hMSH2/hMSH6) erkannt, während sogenannte „loops“ in Mikrosatelliten-Sequenzen durch das hMutS β -Proteindimer (hMSH2/hMSH3) detektiert werden. Der fehlerhafte Strang wird durch die Exonuklease 1 herausgeschnitten und es erfolgt eine Resynthese des entfernten DNA-Abschnittes durch die Polymerasen δ (delta) und ϵ (epsilon) (Hoeijmakers, 2001). Eine defekte Mismatch-Reparatur äußert sich in einer erhöhten Mutationsrate und einer ansteigenden Mikrosatelliteninstabilität, was die Krebsentstehung begünstigen kann. Zu den auftretenden Krebserkrankungen bei vererbten Defekten in der Mismatch-Reparatur gehören Hereditärer Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNCC), Muir-Torre Syndrom und Turcot Syndrom (Thoms *et al.*, 2007b).

1.4.1.3 Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)

Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur entfernt vielfältige DNA-Läsionen, wie zum Beispiel durch UV-Strahlung induzierte Photoprodukte, durch Chemotherapeutika wie Cisplatin hervorgerufene Inter- und Intrastrangverbindungen, sowie auch unförmige Basenaddukte, die durch polyzyklische aromatische Hydrogenkarbone entstehen und unter anderem im Zigarettenrauch vorkommen (Friedberg *et al.*, 2006; Thoms *et al.*, 2007b). Bei Ausfall der BER werden kleinere durch Alkylierung oder Oxidation entstehende Basenschäden ebenfalls von der NER repariert (Rybanska *et al.*, 2003). Die NER wurde erstmals bei *E. coli* beschrieben (Sancar *et al.*, 1988). Die Reparaturproteine Uvr A, Uvr B und Uvr C binden als Komplex an UV-induzierte CPD, eine Helikase entfernt acht Nukleotide und eine Polymerase synthetisiert den fehlerhaften DNA-Strang (Levin *et al.*, 1991).

Die NER ist ein Multienzymprozess, welcher DNA-Schäden in aufeinander folgenden Schritten sowohl im globalen Genom als auch in aktiv transkribierten Teilen des Genoms unabhängig des Zellzyklus entfernt (Shuck *et al.*, 2008). Der Unterschied der beiden Reparaturwege liegt in der Schadenserkennung, welche bei der globalen Genomreparatur (GGR) vom Proteinkomplex XPC/hHR23B/Zentrin und durch XPE (DDB1-DDB2-containing E3-ubiquitin ligase complex) erfolgt (Fousteri *et al.*, 2008). Bei der transkriptionsgekoppelten Reparatur (TCR) führt die Blockierung des RNA Polymerase II Komplexes (RNAPII α) an der DNA-Läsion zur Rekrutierung der

Reparaturproteine CSA und CSB, welche die Reparaturkaskade initiieren (Fousteri *et al.*, 2008). Die weiteren Schritte beider Reparaturwege sind identisch: Der TFIIH-Komplex bindet an die geschädigte DNA und ermöglicht die Rekrutierung von XPA-RPA, welche den Schaden verifizieren und die Einzelstrang-Region stabilisieren. Nachdem die Helikasen XPB und XPD den Doppelstrang öffnen, schneiden die Endonukleasen XPG und XPF-ERCC1 die DNA 3` und am 5`-Ende ein 24 bis 32 Nukleotide langes DNA-Fragment heraus. Die Lücke wird durch die DNA-Polymerasen δ und ϵ aufgefüllt und durch die DNA-Ligase I oder DNA-Ligase III PCNA-abhängig geschlossen (Shuck *et al.*, 2008). Die folgende Abbildung gibt eine zusammenfassende Übersicht beider Reparaturwege der NER.

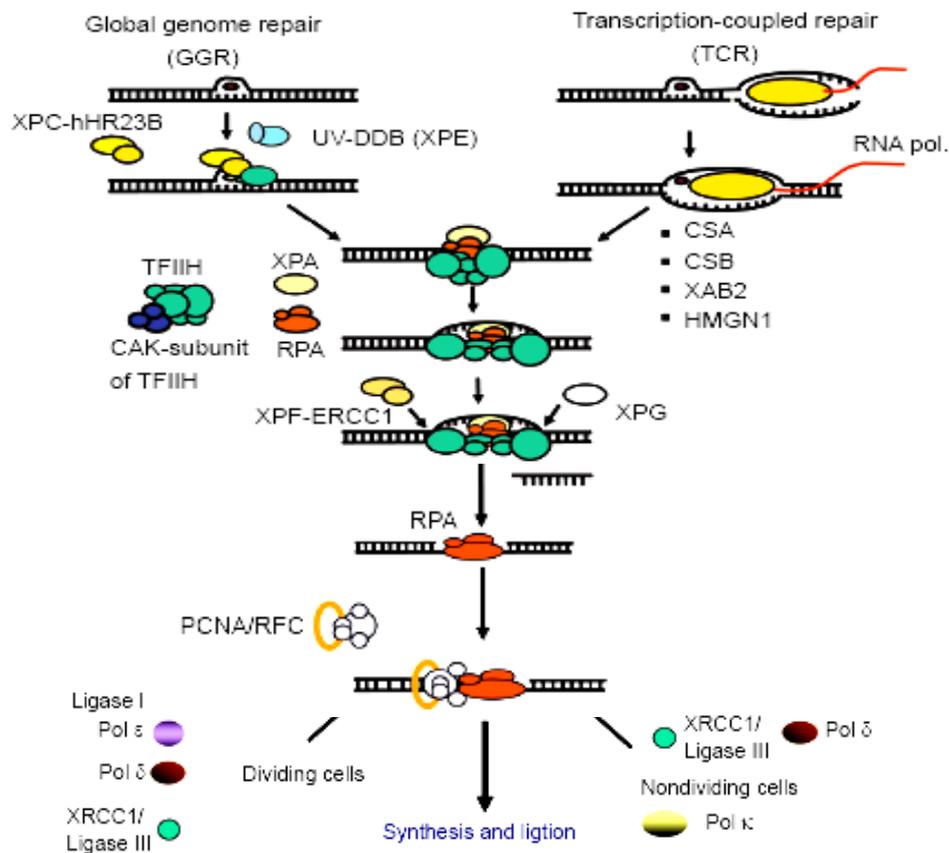


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Globalen Genomreparatur (GGR) und der Transkriptionsgekoppelten Reparatur (TCR) (modifiziert nach Fousteri *et al.*, 2008).

Defekte in der NER äußern sich in den drei seltenen autosomal-rezessiv vererbten Syndromen Xeroderma Pigmentosum (XP), Cockayne Syndrom (CS) und die photosensitive Form der Trichothiodystrophie (TTD) (Kapitel 1.5).

1.4.2 Reparatur durch Rekombination (Doppelstrangbruch-Reparatur)

Durch ionisierende Strahlung, freie Radikale, Chemotherapeutika sowie während der Replikation entstehen Doppelstrangbrüche, welche durch homologe Rekombination (HR) und nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) repariert werden (Jackson, 2002). Die homologe Rekombination erfolgt bevorzugt in der späten S- und G2-Phase, da sie die homologe Sequenz des Partnerchromosoms benötigt. Die NHEJ findet vorwiegend in der G1- und frühen S-Phase statt und ist fehlerbehaftet, da die beiden DNA-Enden ohne eine zur Verfügung stehende Matrize wieder zusammengefügt werden. Um die Enden vor Abbau zu schützen, binden zuerst die Proteine Ku70 und Ku80 (Walker *et al.*, 2001). Der Proteinkomplex MRE11-RAD50-NBS1 sowie Artemis und FEN1 modifizieren die 3'-und 5'-Überhänge der Bruchstelle so, dass Insertionen oder Deletionen entstehen (Hopfner *et al.*, 2001; D'Amours *et al.*, 2002). Der XRCC4-DNA Ligase IV Komplex ligiert die beiden Enden (Wilson *et al.*, 1997). Bei der homologen Rekombination werden mithilfe des Proteinkomplexes MRE11-RAD50-NBS1 ebenfalls Überhänge an den Bruchstellen erzeugt. Weitere Proteine, die an die Überhänge binden, sind RAD51, RAD52 und RPA (Thompson *et al.*, 2002; Costanzo *et al.*, 2004). Anschließend kommt es zur Stranginvasion in den DNA-Doppelstrang des Schwesterchromatids (West, 2003). In der Folge wird der fehlende DNA-Abschnitt synthetisiert und ligiert (Khanna *et al.*, 2001). Eine Störung dieses Reparatursystems führt zu verschiedenen genetischen Krankheiten, von denen Ataxia telangiectasia (AT) und Nijmegen-Breakage-Syndrom (NBS) am besten charakterisiert sind (Chun *et al.*, 2004).

1.4.3 Die Transläsionale Synthese (TLS)

Verbleibt ein DNA-Schaden trotz Reparaturmechanismen auf der DNA, blockiert er während der Replikation die Polymerase und es kommt zu einem Replikationsstopp, der im Zelltod resultieren würde. Um dies zu verhindern, hat die Zelle ein postreplikatorisches Reparatursystem (PRR = *post replication repair*) entwickelt, mit dessen Hilfe die DNA trotz Schadens korrekt repliziert werden kann und Mutationen an den Tochtersträngen der DNA verhindert werden. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von Transläsionaler Synthese (TLS) (Masutani *et al.*, 2000; Gratchev *et al.*, 2003; Lehmann, 2005). Sie wird von speziellen Polymerasen ausgeführt, die zur Y-Familie gehören und den DNA-Schaden „überlesen“ (*bypass*)

können (Ohmori et al. 2001). Die Polymerase η (pol η) ist dabei am besten untersucht worden (Yuasa et al., 2000). Sie kann über UV-induzierte CPD hinweg lesen und die korrekte Base (Adenin) am gegenüberliegenden Strang des Schadens einfügen (Yuasa et al., 2000; Gratchev et al., 2003). Bei der Transläsionalen Synthese wird die Replikationsgabel vor dem DNA-Schaden gestoppt, Rad18 bindet an den Einzelstrang und rekrutiert Rad16, welche zusammen PCNA mono-ubiquitinieren. PCNA und Rad18 rekrutieren Polymerase η an den Einzelstrang („*polymerase switch*“), welche die Polymerase δ (delta) verdrängt und an ihrer Stelle die Replikation entlang des Schadens fortsetzt (Lehmann, 2005). Nachdem über den Schaden hinweg gelesen wurde, dissoziiert Polymerase η vom Strang und Polymerase δ setzt die Replikation fort.

Das *XPV*-Gen ist auf dem Chromosom sechs lokalisiert, besteht aus 11 Exons (Exon 1 ist dabei untranslatiert) und ist zum *RAD30*-Gen der Hefe homolog (Masutani et al., 1999). *Frameshift*- oder *Missense*-Mutationen im *XPV*-Gen führen zur fehlerhaften TLS (Inui et al., 2008). *XPV* (Variante)-Patienten haben keine funktionsfähige pol η und durch den Einbau falscher Basen akkumulieren sie Mutationen, die durch fehlerhafte TLS anderer Polymerasen entstanden sind (Broughton et al., 2002). Da pol η UV-induzierte CPD überlesen kann, besitzen *XPV*-Patienten eine erhöhte UV-Mutabilität und zeigen klinisch trotz funktionsfähiger NER die gleichen Symptome wie *XP*-Patienten, die einen Defekt in der NER besitzen (Thoms et al., 2007b; Inui et al., 2008).

1.5 NER-assoziierte Erkrankungen

Eine defekte Nukleotid-Exzisions-Reparatur ist Ursache für die drei seltenen, autosomal-rezessiv vererbten Krankheiten Xeroderma Pigmentosum (XP), Cockayne Syndrom (CS) und die photosensitive Form der Trichothiodystrophie (TTD) (Kraemer et al., 2007). Klinische Symptome aller Patienten sind eine stark erhöhte Sonnenempfindlichkeit und Hyperpigmentierungen in UV-exponierter Haut (de Boer et al., 2000). Die Genotyp-Phänotyp-Korrelationen sind aufgrund der verschiedenen Mutationen in einem oder mehreren der 13 beteiligten Gene komplex, sodass man insgesamt 7 verschiedene klinische Entitäten unterscheidet (Abbildung 6) (Runger et al., 2008). Neben einer klinischen differenziellen Diagnose werden die Patienten vor allem auch molekulargenetisch untersucht (Emmert et al., 2009).

1.5.1 Xeroderma Pigmentosum (XP)

Xeroderma Pigmentosum-Patienten besitzen im Gegensatz zu CS- und TTD-Patienten ein mehr als 1000-fach erhöhtes Risiko, Hautmalignome zu entwickeln (Bootsma *et al.*, 2002). Ihre trockene, pergamentähnliche Haut weist in UV-exponierten Arealen sowohl Hyper- als auch Hypopigmentierungen auf, und bereits in der Kindheit entwickeln sie Plattenepithel- und Basalzellkarzinome sowie kutane Melanome (Kraemer *et al.*, 1994; Bootsma *et al.*, 2002). Entsprechend ihrer Gendefekte unterteilt man XP-Patienten in 7 XP-Komplementationsgruppen XPA bis XPG und in die XP-Variante XPV (de Boer *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2003). Das Krankheitsbild tritt auf, wenn Patienten homozygot, *compound* heterozygot oder hemizygot sind; heterozygote Träger gelten als gesund (Bootsma *et al.*, 2002). Die Symptome variieren je nach Komplementationsgruppe sehr stark und hängen sowohl von der Art und Lokalisation der Mutation als auch von der Stärke des Funktionsverlustes ab (Bootsma *et al.*, 2002).

Darüber hinaus entwickeln ungefähr 20% aller betroffenen XP-Patienten neurologische Störungen wie Schwerhörigkeit, Verlust von Sehnenreflexen, und progredienter geistiger Verfall durch neuronale Degeneration (de Boer *et al.*, 2000; Leibelung *et al.*, 2006; Emmert *et al.*, 2006a). Diese Patienten fallen in die Komplementationsgruppen XPA, XPB, XPD oder XPG (Abbildung 6).

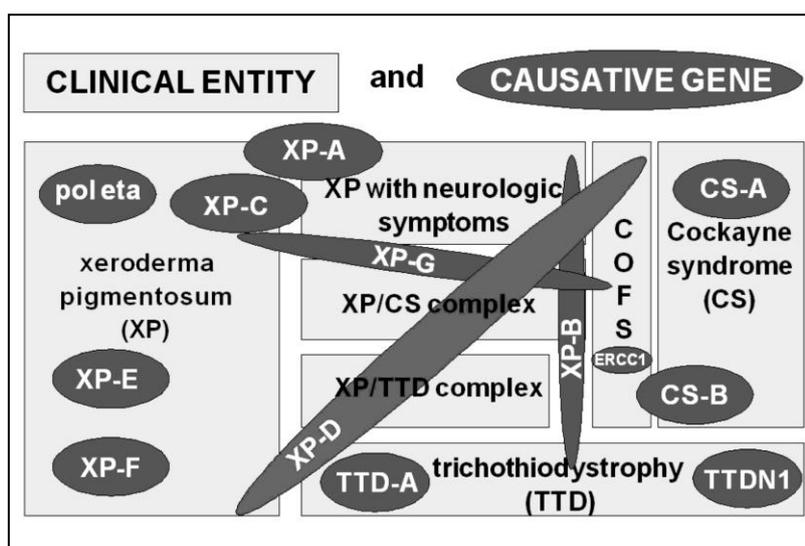


Abbildung 6: NER-Defektsyndrome und ihre klinischen Entitäten (modifiziert nach Runger *et al.*, 2008): Unterschiedliche Gendefekte in einem Gen können in verschiedenen Krankheiten resultieren. Genmutationen in verschiedenen Genen können jedoch auch denselben Phänotyp auslösen.

Die Zuordnung in eine Komplementationsgruppe erfolgt anhand von Virus-transformierten Lymphoblasten-Zelllinien oder primären bzw. Virus-transformierten Fibroblasten-Zelllinien, welche aus Blut- oder Hautzellproben generiert werden (XP-Zelllinien) (Khan *et al.*, 1998; Emmert *et al.*, 2000). Da alle Zellen der XP-Patienten einen Defekt in der NER haben (Bootsma *et al.*, 2002), können mit XP-Zellen funktionelle UV-Überlebens- und DNA-Reparaturtests durchgeführt werden. XP-Zellen zeigen hierbei eine schlechtere NER als normale Fibroblasten (Emmert *et al.*, 2002). Die Charakterisierung des Gendefektes erfolgt funktionell durch Komplementierung mit einem XP-Gen-kodierenden Reporter-genplasmid (Kapitel 2.2.1.8). So kann beispielsweise die Überexpression des XPA-Proteins in einer XPA-Zelllinie den XPA-Defekt korrigieren und die NER erhöhen (Levy *et al.*, 1995). Darüber hinaus werden die Patienten molekulargenetisch anhand Basensequenzanalysen, mRNA- und Proteinexpressionen charakterisiert.

Xeroderma Pigmentosum dient als Modellerkrankung für die Entwicklung UV-induzierter Hauttumore und trägt dazu bei, die molekularen Mechanismen der Hautkarzinogenese in der gesunden Normalbevölkerung zu verstehen (Thoms *et al.*, 2007b). Polymorphismen in XP-Genen können zu einer veränderten Krebs-suszeptibilität in der Normalbevölkerung führen (Blankenburg *et al.*, 2005). Modulatoren der NER-Fähigkeit könnten daher als Marker für ein individuelles Hautkrebsrisiko dienen und neue Optionen zur Diagnose und Therapie darstellen (Thoms *et al.*, 2007b).

1.5.2 Cockayne Syndrom (CS)

Cockayne Syndrom (CS)-Patienten weisen kein erhöhtes Hautkrebsrisiko auf (Emmert *et al.*, 2006a). Sie besitzen einen Defekt in der transkriptionsgekoppelten Reparatur (TCR), wohingegen die globale Genomreparatur (GGR) vollständig intakt ist. CPD-Läsionen können von CS-Zellen nicht repariert werden, während die Reparatur von 6-4PP vollständig funktionsfähig ist (Herouy *et al.*, 2003; Thoms *et al.*, 2007b). CS-Patienten zeigen neben einer Sonnenempfindlichkeit der Haut viele schwere neurologische Störungen, die auf eine primäre Demyelinisierung von Neuronen und Verkalkung der Basalganglien zurückzuführen sind. Zu den klinischen Symptomen zählen Mikrozephalie, Minderwuchs, ein sogenanntes Vogelgesicht, motorische Störungen, Zahnkaries und deutliche vorzeitige Alterung (Rapin *et al.*, 2000).

CS Patienten werden entsprechend der defekten Gene in die Komplementationsgruppen CSA und CSB eingeteilt (Christmann *et al.*, 2003). Die beiden Proteine sind in der TCR involviert und interagieren vermutlich mit der Polymerase II, welche durch einen entstandenen DNA-Schaden gehemmt wird. Wahrscheinlich spielen sie ebenfalls eine Rolle bei der Wiederaufnahme der Replikation nach Eliminierung des DNA-Schadens durch die NER. Es ist derzeit noch nicht genau bekannt, wie die genetischen Defekte zu den klinischen Symptomen führen und warum CS-Patienten kein erhöhtes Hautkrebsrisiko aufweisen (de Boer *et al.*, 2000; Leibelung *et al.*, 2006). Patienten, welche sowohl Symptome von Xeroderma Pigmentosum als auch Cockayne Syndrome aufweisen, werden in die klinische Entität XP/CS eingeordnet. An dieser Entität zeigt sich deutlich die Polyphänie eines XP-Gens, da diese Patienten Mutationen in den XP- Genen haben und neben XP auch Symptome von CS zeigen (Emmert *et al.*, 2006b).

1.5.3 Trichothiodystrophie (TTD)

Die Hälfte der Trichothiodystrophie-Patienten weisen eine erhöhte Lichtempfindlichkeit der Haut auf, zeigt jedoch wie CS-Patienten kein erhöhtes Hautkrebsrisiko. TTD-Zellen sind nicht in der Lage CPD-Läsionen durch NER zu reparieren. Ein typisches Symptom sind kurze, brüchige Haare, verursacht durch einen geringen Gehalt an schwefelreichen Proteinen, welche den Haaren ihre natürliche Festigkeit geben (Itin *et al.*, 2001). Die Haare weisen unter dem Polarisationsmikroskop ein typisches Tigerschwanzmuster auf. Weitere Symptome sind Verhornungsstörungen (Ichthyose) und Entzündungen der Haut (Erytheme) sowie herabgesetzte Fertilität.

Gendefekte in *XPB*, *XPD*, *TTD-A* (TTD Komplementationsgruppe A) und *TTDN1* (nicht-photosensitive Trichothiodystrophie) verursachen das Krankheitsbild der TTD (Giglia-Mari *et al.*, 2004). Diese Gene gehören zum TFIIH-Komplex, welcher sowohl in der Transkription als auch in der NER eine Rolle spielt (de Boer *et al.*, 2000). Die Einordnung von Patienten in die klinische Entität XP/TTD erfolgt aufgrund von Untersuchungen der Mutationen in *XPB* oder *XPD*, welche sowohl einen XP-Phänotyp als auch einen TTD-Phänotyp verursachen (Taylor *et al.*, 1997). Bisher sind zwei Patienten beschrieben worden, die eine XP phänotypische Mutation und eine TTD phänotypische Mutation im *XPD*-Gen aufweisen (Broughton *et al.*, 2001). Diese Untersuchungen zeigen, dass unterschiedliche Defekte in demselben Gen in verschiedene NER Defektssyndrome resultieren. XP-Symptome resultieren aus

Mutationen, welche die NER beeinflussen, während CS- und TTD-Symptome durch Mutationen verursacht werden, welche eher die Transkription beeinflussen (Lehmann, 2001).

1.6 Die XP-Proteine

Alle XP-Gene kodieren für unterschiedliche Proteine, welche essentiell für die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) sind (Lindahl *et al.*, 1999; Herouy *et al.*, 2003). Darüber hinaus spielen sie auch in anderen Reparatur- und Zellzyklusprozessen eine Rolle (Sugasawa *et al.*, 2001; Shuck *et al.*, 2008). Im Folgenden wird eine Übersicht über die 7 XP-Proteine gegeben.

Xeroderma Pigmentosum Gruppe A Protein (XPA)

Das XPA Protein besteht aus 273 Aminosäuren und wird durch das *XPA*-Gen auf dem Chromosom neun durch sechs Exons kodiert (Tanaka *et al.*, 1990). Das Protein hat eine Größe von 31 kDa (Miura *et al.*, 1991). Die funktionelle Form von XPA ist ein Homodimer (Yang *et al.*, 2002). Es bindet mit seiner C-terminal lokalisierten Zink-Finger-Domäne zusammen mit RPA (Replikationsprotein A) als Heterotrimer an DNA-Schäden, welche sowohl in transkriptionell aktiven Genen als auch in inaktiven Abschnitten des Genoms liegen (Li *et al.*, 1995; Stigger *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2002). Daher ist XPA in beiden Reparaturwegen, TCR und GGR, beteiligt. Neben seiner Rolle als Schadenserkenner dient es vor allem auch als Schadensverifizierer und rekrutiert den Transkriptionsfaktorkomplex TFIIH (Nocentini *et al.*, 1997; Volker *et al.*, 2001). Des Weiteren katalysiert XPA die Dissoziation der CAK-Untereinheit (Cdk-aktivierender Kinasekomplex) des TFIIH-Komplexes (Coin *et al.*, 2008). Diese CAK-Untereinheit bindet während der Transkription den TFIIH-Kern, dissoziiert allerdings bei der NER (Chen *et al.*, 2003a). Somit zeigt XPA auch eine andere funktionelle Rolle in der NER.

XP-Patienten, die einen Defekt im *XPA*-Gen aufweisen, sind komplett NER-defizient und entwickeln häufig schwerwiegende Symptome. Diese Patienten zeigen auf beiden Allelen Mutationen und exprimieren kein XPA-Protein (States *et al.*, 1998). Bisher sind 19 Mutationen im *XPA*-Gen identifiziert worden, die meisten liegen in Exon 3, 4 und 6 und führen zu einer Trunkierung des Proteins (Mellon *et al.*, 2002; Tanioka *et al.*, 2005). Darüber hinaus gibt es auch *Nonsense*- und *Missense*-Mutationen. Patienten

mit Spleißstellen-Mutationen oder Mutationen im Exon 6 exprimieren noch geringe *XPA* mRNA-Mengen und zeigen mildere Symptome.

Xeroderma Pigmentosum Gruppe B Protein (XPB)

Das XPB-Protein ist eine 3'–5' Helikase aus 782 Aminosäuren und wird durch das *XPB*-Gen auf dem Chromosom zwei durch 15 Exons kodiert (Weeda *et al.*, 1990). Das Protein hat ein Molekulargewicht von 89 kDa. Die Helikase ist Bestandteil des Transkriptionsfaktorkomplexes TFIIH und öffnet bei der GGR und TCR den DNA-Doppelstrang (Schaeffer *et al.*, 1993; Evans *et al.*, 1997b). Überdies spielt XPB auch eine Rolle bei der Transkription, indem es die Promotorregion der zu synthetisierenden DNA öffnet (Holstege *et al.*, 1996). Aufgrund der multiplen Funktionen des XPB-Proteins äußert sich ein defektes *XPB*-Gen in einem breiten Krankheitsbild (Weeda *et al.*, 1997). Ein XP-Phänotyp entsteht durch Mutationen, welche die NER beeinflussen, während CS- oder TTD-Patienten eher Mutationen aufweisen, welche die transkriptionelle Funktion des Proteins beeinflussen (Hwang *et al.*, 1996). Weltweit gibt es nur sehr wenige XPB-Patienten, da es sich um ein essentielles Protein handelt (Oh *et al.*, 2006).

Xeroderma Pigmentosum Gruppe C Protein (XPC)

Das auf dem Chromosom drei lokalisierte XPC-Gen wird durch 16 Exons kodiert und bildet ein aus 940 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 125 kDa (Legerski *et al.*, 1994; Masutani *et al.*, 1994; Khan *et al.*, 2002). Das XPC-Protein bildet mit hHR23B und Zentrin einen Komplex und erkennt nur DNA-Schäden im Genom, die nicht transkriptionell aktiv sind. Es fungiert dabei als Initiator der GGR und rekrutiert die anderen NER-Proteine (Volker *et al.*, 2001; Sugasawa *et al.*, 2002). Darüber hinaus interagiert XPC auch mit der Thymin-DNA-Glycolase und kann die Aktivität von hOGG1 stimulieren und spielt somit auch eine Rolle in der BER von oxidativen DNA-Schäden (Shimizu *et al.*, 2003; D'Errico *et al.*, 2006). Die meisten XP-Patienten lassen sich in die Komplementationsgruppe C einordnen. Die Patienten können Schäden im globalen Genom nicht reparieren, zeigen aber eine normale TCR. Neurologische Symptome sind selten, sie besitzen eine milde Sonnenempfindlichkeit, weisen starke Hyperpigmentierungen auf und entwickeln frühzeitig Hautkrebs (Khan *et al.*, 1998).

Xeroderma Pigmentosum Gruppe D Protein (XPD)

Das XPD-Protein besteht aus 760 Aminosäuren und wird durch das *XPD*-Gen auf dem Chromosom 19 durch 23 Exons kodiert (Weber *et al.*, 1990; Sung *et al.*, 1993). Das Protein hat eine Größe von 87 kDa (Armellini *et al.*, 2005) und ist mit ihrer 5'-3' - Helikaseaktivität Teil des Transkriptionsfaktors TFIIH. In entgegengesetzter Richtung zu XPB öffnet XPD den DNA-Strang und hat somit ebenfalls eine duale Rolle bei der NER und in der Transkription (Coin *et al.*, 1998). Während allerdings für die NER die Helikaseaktivität essentiell ist, hat XPD bei der RNA Pol II Transkription eher eine strukturelle oder stimulatorische Funktion für die Ausbildung der TFIIH-Ringstruktur (Winkler *et al.*, 2000). Das XPD Protein reguliert des Weiteren auch die Kinaseaktivität des CAK und verbindet ihn mit TFIIH (Chen *et al.*, 2003a).

Die durch Mutationen im *XPD*-Gen verursachten klinischen Symptome sind so komplex wie bei XPB-Patienten und resultieren dabei eher aus einer fehlerhaften Transkription als aus einer fehlerhaften NER (Broughton *et al.*, 1995; Coin *et al.*, 1998). Es gibt sechs verschiedene klinische Entitäten mit milden oder schwerwiegenden Symptomen von XP, TTD, und Kombinationen mit CS (Emmert *et al.*, 2009). *XPD*-Mutationen in der DNA-DNA Helikase-Domäne verursachen XP oder XP/CS, während Mutationen in der DNA-RNA Helikase-Domäne zu Transkriptionsfehlern führen und TTD verursachen (Lehmann, 2001).

Xeroderma Pigmentosum Gruppe E Protein (XPE)

Das XPE-Protein ist ein Dimer aus einer 127 kDa DDB1-Untereinheit und einer 48 kDa DDB2-Untereinheit, welche beide auf dem Chromosom 11 kodiert werden (Dualan *et al.*, 1995; Nichols *et al.*, 1996). Das Heterodimer bindet an CPD in der globalen Genomreparatur und dient wie XPC als Schadenserkenner (Tang *et al.*, 2000). DDB2 wird durch UV-Strahlung und in Abhängigkeit von p53 aktiviert (Wakasugi *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2002a; Wang *et al.*, 2004). In der transkriptionsgekoppelten Reparatur ist XPE nicht involviert (Hwang *et al.*, 1999). XPE-Patienten weisen Mutationen im *DDB2*-Gen auf, sie zeigen milde XP-Symptome und keine neurologischen Auffälligkeiten (Nichols *et al.*, 1996). XPE-defiziente Zellen haben eine NER-Kapazität bis zu 60% von Normalzellen (Itoh *et al.*, 2000).

Xeroderma Pigmentosum Gruppe F Protein (XPF)

Das auf dem Chromosom 16 liegende *XPF*-Gen wird durch 16 Exons kodiert und bildet eine aus 916 Aminosäuren bestehende Endonuklease mit einem Molekulargewicht von 103 kDa (Liu *et al.*, 1993). Das XPF-Protein bindet an ERCC1 und schneidet in 5'-Richtung des DNA-Stranges, nachdem XPG in 3'-Richtung geschnitten hat (Brookman *et al.*, 1996; Sijbers *et al.*, 1996). In der Doppelstrangbruch-Reparatur entfernt XPF DNA-*crosslinks* (Sancar *et al.*, 2004). Die XPF-Komplementationsgruppe ist selten, die meisten Patienten leben in Japan. Es gibt nur wenige Patienten mit Hautkrebs. Neurologische Auffälligkeiten treten, wenn überhaupt, im Erwachsenenalter auf (Matsumura *et al.*, 1998).

Xeroderma Pigmentosum Gruppe G Protein (XPG)

Das XPG-Protein ist eine aus 1186 Aminosäuren bestehende Endonuklease und wird durch das *XPG-Gen* auf dem Chromosom 13 kodiert (Mudgett *et al.*, 1990; Emmert *et al.*, 2001). Das Protein hat ein Molekulargewicht von 133 kDa und schneidet den schadhafte DNA-Strang in Richtung 3' (O'Donovan *et al.*, 1994). Dabei interagiert XPG mit RPA und TFIIH (Lee *et al.*, 2003). Ferner stabilisiert XPG den Transkriptionsfaktorkomplex TFIIH und ist an der Regulation von Genexpressionen beteiligt (Ito *et al.*, 2007). Das XPG-Protein spielt auch bei der Reparatur oxidativer DNA-Schäden eine Rolle (Cooper *et al.*, 1997; Nospikel *et al.*, 1997). Bisher lassen sich 13 Patienten der XPG-Komplementationsgruppe zuordnen. Die klinischen Symptome sind vielfältig. Patienten mit *Missense*-Mutationen haben noch eine geringe Nukleaseaktivität und zeigen milde Symptome, während ein völliger Ausfall des XPG-Proteins in XP/CS-phänotypischen Symptomen mit neurologischen Erkrankungen resultiert (Emmert *et al.*, 2002; Lalle *et al.*, 2002).

Folgende Tabelle gibt einen abschließenden Überblick über die an der NER-Kaskade beteiligten XP-Proteine mit ihren Untereinheiten bzw. Interaktionspartnern sowie ihren posttranslationalen Modifikationen.

Tabelle 1: Die an der NER beteiligten XP-Proteine

| NER Faktor | Untereinheit/ Interaktionspartner | Aktivität | Posttranslationale Modifikation |
|-------------------|--|-----------------------|--|
| XPA | RPA | Schadensverifizierung | Phosphorylierung |
| XPB | TFIIH | Helikase | De-/Phosphorylierung |
| XPC | hHR23B Zentrin-2 | Schadenserkennung | Ubiquitinylierung Sumoylierung |
| XPD | TFIIH | Helikase | |
| XPE | DDB1, DDB2 E3-Ligase | Schadenserkennung | Ubiquitinylierung |
| XPF | ERCC1 | 3`-Endonuklease | |
| XPG | | 5`-Endonuklease | |

1.7 Zielsetzung

Die Immunsuppressiva Cyclosporin A und Everolimus werden in der Transplantationsmedizin erfolgreich eingesetzt. Die Ursachen des stark erhöhten Hautkrebsrisikos bei Transplantationspatienten unter einer Cyclosporin A Therapie – nicht jedoch bei einer immunsuppressiven Therapie mit Everolimus – sind nach wie vor unklar, erinnern jedoch stark an das ebenfalls deutlich erhöhte Hautkrebsrisiko bei Xeroderma Pigmentosum (XP-) Patienten. Daher sollte in dieser Arbeit die molekulargenetische Wirkung von Cyclosporin A und Everolimus auf die DNA Reparatur untersucht werden.

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war, die unterschiedliche Wirkung von Cyclosporin A und Everolimus auf die Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden funktionell zu charakterisieren. Die funktionellen Untersuchungen erfolgten dabei an immortalisierten SV40-transformierten Fibroblasten-Zelllinien und EBV-transformierten Lymphoblasten-Zelllinien, Vertreter zweier wichtiger Gewebekompartimente (Blut und Haut).

Die molekularen Zusammenhänge eines möglicherweise Cyclosporin A-spezifischen Effektes auf die Karzinogenese-Initiation sind bisher weitgehend unerforscht. Hinweise liefert die defekte Nukleotid-Exzisions-Reparatur bei XP-Patienten. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde daher der Einfluss von Cyclosporin A auf die Expression der XP-Gene auf mRNA- und Protein-Ebene analysiert. Hierbei sollten die jeweiligen XP-Gene und -Proteine identifiziert werden, die durch Cyclosporin A differenziell exprimiert werden.

Der dritte Teil dieser Arbeit untersuchte die funktionelle Bedeutung einzelner durch Cyclosporin A modulierte XP-Gene auf die Nukleotid-Exzisions-Reparatur. Ein möglicher Effekt von Cyclosporin A auf XP-Gene sollte mittels Protein-Überexpression von XPA, XPC und XPG in normalen und in XP-defizienten Fibroblasten-Zelllinien charakterisiert werden.

Im abschließenden vierten Teil dieser Arbeit sollten die Signalwege einer Modulation der Nukleotid-Exzisions-Reparatur analysiert werden. Hierbei sollte geklärt werden, ob eine Cyclosporin A-induzierte Hemmung der NER durch die Phosphatase Calcineurin vermittelt und über den Transkriptionsfaktor CREB reguliert wird.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2 aufgezählt. Verwendete Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 2: Geräte

| Gerät | Hersteller |
|--|------------------------------------|
| Blotkammer | Rettberg, Göttingen |
| Brutschrank Modell 200 | Memmert, Büchenbach |
| CO ₂ -Inkubator | Sanyo, München |
| Du 640® Spectrophotometer | Beckmann, München |
| Elektrophoresekammer | Biometra, Göttingen |
| Elektroporationsgerät | Bio-Rad, München |
| Geldokumentationsanlage Kamara/BioDoc | Biometra, Göttingen |
| Controller/UV-Tisch Fluo-Link | |
| Glomax™ 96 Microplate | Promega, Mannheim |
| LAS 4000 | Fujifilm, Düsseldorf |
| Lightcycler | Roche, Mannheim |
| Luminometer | Promega, Mannheim |
| Megafuge 1,0, Model G25 | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| Mikroskop Axiowert 100 | Carl Zeiss, Oberkochen |
| Mikrowelle | Panasonic, Hamburg |
| Minigelplatten (8,6 cm x 7,7cm x 0,75 mm) | Biometra, Göttingen |
| Mini Rocking Platform | Biometra, Göttingen |
| pH-Meter | Schütt, Göttingen |
| Röntgenfilm-EntwicklungsmaschineSRX 101A | Konica Minolta, München |
| Spektralphotometer Dynatech MR 5000 | Dynatech, Denkendorf |
| Sequenziergerät ABI Prism Model 310 Genetic Analyzer | Applied Biosystems, Darmstadt |
| Sorvall RC6+ | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| Spannungsgerät Power Ease 500 | Invitrogen, Karlsruhe |
| Sterilbank Hera Safe | Thermo Fisher Scientific, Schwerte |
| Thermomixer 5436 | Eppendorf, Hamburg |
| Thermotron Inkubationsschüttler | Infors, Bottmingen (Schweiz) |
| T-Gradient Thermoblock | Biometra, Göttingen |
| Tischzentrifuge 5415 C | Eppendorf, Hamburg |
| UNO Thermoblock | Biometra, Göttingen |

| | |
|---------------------------------|-------------------------------|
| UVC 500 Ultraviolet Crosslinker | Amersham Bioscience, Freiburg |
| Vibrofix VF1 Electronic | IKA Labortechnik, Staufen |
| Video Monitor WV-BM 900 | Panasonic, Hamburg |
| Video Graphic Printer UP-890CE | Sony, Berlin |
| Waage BP2100; MC1 | Sartorius, Göttingen |

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterialien | Hersteller |
|--|---------------------------------|
| Autoradiographie-Filmkassette | RS Laborgeräte, Heidelberg |
| Elektroporationsküvette | Bio-Rad, München |
| Gewebekulturschale 94/16 mm | Greiner bio-one, Frickenhausen |
| Gewebekulturplatte 6 well, 96 well | Greiner bio-one, Frickenhausen |
| Immuno 96 MicroWell™ Plate, medisorp | Nunc, Wiesbaden |
| Kryo-Röhrchen (2 mL) | Greiner bio-one, Frickenhausen |
| Lumi-Film Chemiluminescent Detection (ECL) | Roche, Mannheim |
| Multiply® -µStrip Pro 8er Kette | Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf |
| Neubauer-Zählkammer | Brand, Wertheim |
| Nitrocellulose, 0.45µM Protran BA85 | Whatman, Dassel |
| Parafilm | Brand, Wertheim |
| Pasteurpipetten 230 mm | Brand, Wertheim |
| Pipette 10 ml | Brand, Wertheim |
| Pipetten sterile (2,5 ml, 10 ml) | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl) | Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf |
| Plastikröhrchen 3,5 ml | Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf |
| Polypropylen-Röhrchen sterile 15 ml, 50 ml | Greiner bio-one, Frickenhausen |
| Polystyrene-Röhrchen | Becton-Dickinson, |
| Reaktionsgefäße 0,2 mL steril, RNase frei | Biozym, Hessisch Oldendorf |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml | Eppendorf, Hamburg |
| Schikanekolben, Glasflaschen | Schott, Mainz |
| Whatmann-Filterpapiere | Whatmann, Dassel |
| Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² und 175 cm ² | Greiner bio-one, Frickenhausen |
| Zellkulturplatte 35/10 mm | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| Zellschaber 25 cm | Becton-Dickinson, Heidelberg |

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 4 listet alle verwendeten Chemikalien auf.

Tabelle 4: Chemikalien

| Chemikalien | Hersteller |
|---|----------------------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid 40% | Bio-Rad, München |
| Agar | Fluka Chemie, Neu-Ulm |
| Agarose-Seakem® | Cambrex, Oberhaching |
| Ammoniumpersulfat | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Ampicillin | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| β-Mercaptoethanol | Merck, Darmstadt |
| Bidestilliertes Wasser (Bideest-Anlage) | Sartorius, Göttingen |
| Bradford Mix Roti® | Quant Roth, Karlsruhe |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| BSA | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Calciumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Calcium Ionophor A23187 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Cyclosporin A | Alexis, Lörrach |
| Coomassie Brilliant Blau R250 | Serva, Heidelberg |
| DEAE-Dextran | GE Healthcare, München |
| DEPC | Invitrogen, Karlsruhe |
| DMEM | PAA, Cölbe |
| DMSO | Merck, Darmstadt |
| DTT | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| dNTP-Mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) | Fermentas, St. Leon-Rot |
| EDTA | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| EGTA | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Essigsäure (100%) | Merck, Darmstadt |
| Everolimus | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Ethanol 98% (p.a.) | Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid (1%) | Roth, Karlsruhe |
| FBS | Biochrom AG, Berlin |
| Formamid | Amaresco, Solon (USA) |
| 5 x Lysepuffer | Promega, Mannheim |
| Glutamin (200 mM) | PAA, Cölbe |
| Glycin | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| HCl | Merck, Darmstadt |
| Hefeextrakt | Difco, Augsburg |
| HEPES-Puffer | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

| | |
|--------------------------------|-------------------------------|
| Isopropanol | Merck, Darmstadt |
| KCl | Merck, Darmstadt |
| Ladepuffer (Loading Dye 5 x) | Qiagen, Hilden |
| Lipofectamin 2000 | Invitrogen, Karlsruhe |
| Magnesiumchlorid | Merck, Darmstadt |
| MEM | PAA, Cölbe |
| Methanol | Mallinckrodt Baker, Griesheim |
| NaCl | Merck, Darmstadt |
| Nonidet P40 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Opti-MEM | Gibco® Invitrogen, Karlsruhe |
| Passive Lysis 5x Buffer | Promega, Mannheim |
| Penicillin-Streptomycin (100x) | PAA, Cölbe |
| PMSF | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Ponceau S | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Roti-Quant | Roth, Karlsruhe |
| RPMI-1640 Zellkulturmedium | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Schwefelsäure | Merck, Darmstadt |
| SDS | Roth, Karlsruhe |
| TEMED | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| TFA | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| TMB | Invitrogen, Karlsruhe |
| Trypsin / EDTA | Biochrom AG, Berlin |
| Tris-Base | Merck, Darmstadt |
| Trypanblau | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Trypton | Difco, Augsburg |
| Tween 20 | Merck, Darmstadt |
| Tween 80 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

2.1.3 Puffer und Lösungen

Häufig verwendete Puffer und Lösungen sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

| Proteinbiochemie | |
|--|-------------|
| Isolierung von Cytosolprotein (Puffer I) | 10 mM Hepes |
| pH 7,9 | 10 mM KCl |
| | 0,1 mM EGTA |
| | 0,1 mM EDTA |
| | 1,0 mM DTT |

Proteinbiochemie-Fortsetzung

| | |
|--|---|
| | 0,05 mM PMSF |
| Isolierung von Kernprotein (Puffer II) pH 7.9 | 20 mM Hepes 400 mM NaCl 1 mM EGTA 1 mM EDTA 1 mM DTT 0,05 mM PMSF |
| Trenngelpuffer, pH 8,8 (Puffer A) | 45,5 g Tris-HCl 1,0 g SDS In 250 ml Aqua bidest |
| Sammelgelpuffer, pH 6,8 (Puffer B) | 15,1 g Tris-HCl 1,0 g SDS In 250 ml Aqua bidest |
| Elektrophoresepuffer, pH 8,3 | 0,192 M Glycin 0,025 M Tris-Base 0,1% SDS In 2 L Aqua bidest |
| Blotpuffer, pH 8,3 | 0,192 M Glycin 0,025 M Tris-Base In 800 ml Aqua bidest + 200 ml Methanol |
| Blocklösung (Invitrogen) | 14 ml Aqua bidest 4 ml Blocker/Diluent (Teil A; "buffered saline solution") 2 ml Blocker/Diluent (Teil B; "Hammersten casein solution") |
| Waschpuffer (Invitrogen) | 150 ml Aqua bidest 10 ml Antibody Wash Solution |
| ECL-Lösung (Invitrogen) | 594 µl Chemiluminescence Substrate 31,25 µl Substrate Enhancer |

Proteinbiochemie-Fortsetzung

| | |
|------------------------------|--|
| Spaltpuffer, 3%ig pH 7,4 | 30 mM Tris 3% SDS 15% Glycin 0,04% Bromphenolblau direkt vor Gebrauch 10% β -Mercaptoethanol hinzufügen |
| Coomassie Proteinfärbelösung | 0,15% Coomassie Brilliant Blau R250 50% MeOH 10% Essigsäure Mit Aqua bidest auffüllen |
| Coomassie Entfärbelösung | 10% MeOH 10% Essigsäure Mit Aqua bidest auffüllen |
| Ponceau S-Lösung | Ponceau S 0,2% 3% TFA |
| Stripping-Puffer, pH 6,7 | 345 μ l β -Mercaptoethanol 10 ml 10%iges SDS 39,655 ml Tris HCl (63mM) |

Sonstige Lösungen

| | |
|------------------------------|--|
| Ampicillin Stocklösung | 50 mg/ml Ampicillin In Aqua bidest steril filtrieren |
| BSA 3% (w/v) in 1x PBS | 0,3 g BSA In 10 ml 1x PBS steril filtriert |
| Ladepuffer | 0.5 M EDTA 50% Glycerol 0,01% Bromphenolblau |
| 10 x PBS, pH 7,2 | 1,5 M NaCl 30 mM KCl 80 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 10 mM KH_2PO_4 |
| 10 x TBE-Stammlösung, pH 8,3 | 0,9 M Tris 0,89 M Borsäure |

Sonstige Lösungen-Fortsetzung

| | |
|------------------|--|
| | 25 mM EDTA |
| 10 x TBS, pH 7,4 | 0,25 M Tris 1,37 M NaCl 50 mM KCl 6 mM Na ₂ HPO ₄ |
| S-TBS | 50 ml 10 x TBS 5 ml 100 X CaCl ₂ & MgCl ₂ 445 ml Aqua bidest |
| Einfriermedium | MEM, DMEM, oder RPMI 40% FBS 20% DMSO |
| SOC-Medium | SOB-Medium + 20 mM Glucose 1% Hefeextrakt 2% Casein 10 mM NaCl 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ |

2.1.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Tabelle 6 listet die verwendeten Reaktionssysteme auf.

Tabelle 6: Reaktionssysteme

| Reaktionssystem | Hersteller |
|---|-------------------------------|
| AllPrep™ DNA/RNA Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit | Applied Biosystems, Darmstadt |
| CellTiter96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay | Promega, Mannheim |
| Dual-Luciferase® Reporter Assay System | Promega, Mannheim |

| Reaktionssystem | Hersteller |
|---|-------------------------------|
| Passive Lysis 5x Buffer | Promega, Mannheim |
| PureYield [™] Plasmid Maxiprep System | Promega, Mannheim |
| QIAamp® DNA Blood Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAgen®Plasmid Midi Kit | Qiagen, Hilden |
| QuantiTect® SYBR green PCR Kit | Applied Biosystems, Darmstadt |
| Revert Aid H Minus First strand c-DNA-Synthese Kit | Fermentas, St.Leon-Roth |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| WesternBreeze® Chemiluminescent Western Blot Immunodetection System | Invitrogen, Karlsruhe |
| WesternBreeze® Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit | Invitrogen, Karlsruhe |

2.1.5 Enzyme und Marker

In Tabelle 7 sind alle verwendeten Enzyme aufgelistet. Häufig verwendete Marker gibt die Tabelle 8 an.

Tabelle 7: Enzyme

| Enzyme | Hersteller |
|----------------------------------|--------------------------|
| BamHI | Promega, Mannheim |
| EcoRI | Fermentas, St. Leon-Roth |
| HindIII | Fermentas, St. Leon-Roth |
| NcoI | Fermentas, St. Leon-Roth |
| XbaI | Fermentas, St. Leon-Roth |
| Taq-DNA-Polymerase | USB Europe GmbH, Staufen |
| Taq-DNA-Polymerase (recombinant) | Fermentas, St. Leon-Roth |

Tabelle 8: Marker

| Marker | Hersteller |
|--|--------------------------|
| Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus | Fermentas, St. Leon-Roth |
| Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder | Fermentas, St. Leon-Roth |
| MagicMark™ XP Standard to Antibodies | Invitrogen, Karlsruhe |
| Precision Plus Protein™ Standards, Broad Range | Bio-RAD, München |

2.1.6 Antikörper, Primer, Plasmide und RNAi

Die Tabelle 9 listet die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper auf.

Tabelle 9: Primär- und Sekundärantikörper

| Primärantikörper | Verdünnung | Katalognummer | Hersteller |
|------------------|------------|---------------|--|
| XPA MmAb | 1:1000 | MC-340 | Kamiya Biomedicals, Seattle, WA, (USA) |
| XPB RpAb | 1:500 | GTX70311 | Biozol, Eching |
| XPC MmAb | 1:1000 | Ab6264 | Abcam, Cambridge (UK) |
| XPD MmAb | 1:500 | Ab54676 | Abcam, Cambridge (UK) |
| DDB1 RpAb | 1:1000 | Ab21080 | Abcam, Cambridge (UK) |
| DDB2 MmAb | 1:50 | Ab51017 | Abcam, Cambridge (UK) |
| XPF RpAb | 1:500 | Ab73720 | Abcam, Cambridge (UK) |
| XPG RpAb | 1:500 | Ab64931 | Abcam, Cambridge (UK) |
| β-Actin MmAb | 1:5000 | A-5316 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| RCC1 MmAb | 1:1000 | 610378 | BDBiosciences, Heidelberg |

| Primärantikörper | Verdünnung | Katalognummer | Hersteller |
|--|---|---------------|-----------------------|
| Calcineurin RpAb | 1:2000 | Ab71149 | Abcam, Cambridge (UK) |
| 64 M-2 (Anti 6-4PP MmAb) | 1:2000 | D195-1 | MBL, Japan |
| TDM-2 (Anti CPD MmAb) | 1:2000 | D194-1 | MBL, Japan |
| Sekundärantikörper | Verdünnung | Katalognummer | Hersteller |
| Biotin-F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L) | 1:2000 | 62-6340 | Invitrogen, Karlsruhe |
| HRP-Streptavidin Conjugate | 1:10000 | 43-4323 | Invitrogen, Karlsruhe |
| alkalische Phosphatase conjugated anti-mouse alkalische Phosphatase conjugated anti-rabbit | Entnommen aus Western Breeze® Chemiluminescent bzw Chomogenic Western Blot Immunodetection System | | Invitrogen, Karlsruhe |

Tabelle 10 gibt die verwendeten *Primer* wider.

Tabelle 10: Liste der *Primer*

| Gen | Exon | Länge bp | Primer | Anneal |
|------|-------|----------|--|--------|
| XPA | 5,6 | 120 | Hs_XPA_1_SG QuantiTect® <i>Primer</i> Assay | 57°C |
| XPB | 10,11 | 60 | Hs_ERCC3_1_SG QuantiTect® <i>Primer</i> Assay | 55°C |
| XPC | 11,12 | 112 | <i>Forward Primer</i> 5'-3' CGTGGACGGGAAGGTGC <i>Reverse Primer</i> 5'-3' GGCCACGCGGTGTAGAT | 54°C |
| XPD | 12,13 | 63 | Hs_ERCC2_1_SG QuantiTect® <i>Primer</i> Assay | 55°C |
| DDB1 | 2,3 | 141 | Hs_DDB1_1_SG QuantiTect® <i>Primer</i> Assay | 55°C |
| DDB2 | 4,5 | 72 | Hs_DDB2_1_SG QuantiTect® <i>Primer</i> Assay | 55°C |
| XPF | 2,3 | 118 | Hs_ERCC4_1_SG QuantiTect® <i>Primer</i> Assay | 54°C |
| XPG | 3,4,5 | 98 | Hs_ERCC5_1_SG QuantiTect® <i>Primer</i> Assay | 49°C |

| Gen | Exon | Länge bp | Primer | Anneal |
|----------|-------|-------------|--|--------|
| GAPDH | 1,2,3 | 119 | Hs_GAPDH_2_SG QuantiTect® Primer Assay | 55°C |
| CREB wt | 3 | 523 | Forward Primer 5'-3' | 62°C |
| CREB mut | | | CAATGGGCAGACAGTTCAAGTC | |
| | | | Reverse Primer 5'-3' | |
| | | | GATCTGCTGTCCATCAGTGGTC | |

Die zur Transfektion verwendeten Plasmide und RNAi sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Liste der Plasmide und RNAi

| Name | Menge | Katalognummer / Hersteller / Bezug |
|------------|-------------|---|
| pCNA | 100-250 ng | Überlassen von E. Oetjen, Molekulare Pharmakologie, Universität Göttingen (Oetjen <i>et al.</i> 2005) |
| pCNB | 100-250 ng | Überlassen von E. Oetjen, Molekulare Pharmakologie, Universität Göttingen (Oetjen <i>et al.</i> 2005) |
| pcmvLUC | 125 ng | Überlassen von M. Hedayati und L. Grossman, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA |
| pRL-CMV | 125 ng | E2261, Promega, Mannheim |
| pXPA | 125 ng | Überlassen von Dr. K. H. Kraemer, NCI, Bethesda, MD, USA (Emmert <i>et al.</i> 2002) |
| pXPC3 | 125-500 ng | Überlassen von Dr. K. H. Kraemer, NCI, Bethesda, MD, USA (Emmert <i>et al.</i> 2002) |
| pXPG | 250 ng | Überlassen von Dr. K. H. Kraemer, NCI, Bethesda, MD, USA (Emmert <i>et al.</i> 2002) |
| pCREB | 200 ng | Überlassen von E. Oetjen, Molekulare Pharmakologie, Universität Göttingen (Oetjen <i>et al.</i> 2005) |
| pCREBS133A | 200 ng | Überlassen von E. Oetjen, Molekulare Pharmakologie, Universität Göttingen (Oetjen <i>et al.</i> 2005) |
| RNAi I | 20-200 pmol | PP3CaHSS108397(3_RNA), Invitrogen, Karlsruhe |

| Name | Menge | Katalognummer / Hersteller / Bezug |
|---|-------------|--|
| RNAi II | 20-200 pmol | PP3CaHSS183012(3_RNA), Invitrogen, Karlsruhe |
| Stealth [™] RNAi Negative Control | 20 pmol | 12935-300, Invitrogen, Karlsruhe |

2.1.7 Bakterienstämme, Zelllinien und Kulturmedien

Folgende Tabelle 12 gibt die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme an.

Tabelle 12: Verwendete Bakterienstämme

| <i>E.coli</i> Bakterienstamm | Kulturmedium | Bezug/ Referenz |
|------------------------------|--|-----------------|
| DH5 α | LB Medium (pH 7.0): | Invitrogen |
| MLB-100 | 10% Trypton (w/v) 5% Hefeextrakt (w/v) 10% NaCl (w/v) 50 μ g/ml Ampicillin Für LB-Platten: 15 g/l Agar | Sambrook, 2001 |

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Zelllinien

| Zelllinie | Zellursprung | Kulturmedium (= komplett) | Bezug/ Referenz |
|-----------|--|---|---|
| AG10107 | EBV-transformierte Lymphoblasten | RPMI-1640 10% (v/v) FBS 1% Glutamin 1% Pen/Strep | Coriell Cell Repositories, Camden, NJ, USA |
| GM00637 | SV40-transformierte Fibroblasten | MEM 10% (v/v) FBS 1% Glutamin 1% Pen/Strep | Coriell Cell Repositories, Camden, NJ, USA |
| XP2OS | SV40-transfomierte XPA-defiziente Fibroblasten | MEM 10% (v/v) FBS 1% Glutamin 1% Pen/Strep | Überlassen von Dr. K. H. Kraemer, NCI, Bethesda, MD, USA (Satoka <i>et al.</i> , 1990) |

| Zelllinie | Zellursprung | Kulturmedium (= komplett) | Bezug/ Referenz |
|---------------|---|---|---|
| XP2OSpCAH19WS | SV40-transformierte XPA-defiziente Fibroblasten, stabil transfiziert mit XPA | MEM 10% (v/v) FBS 1% Glutamin 1% Pen/Strep | Levy <i>et al.</i> , 1995 Dr. Kenneth H. Kraemer, NCI, Bethesda, MD, USA |
| | SV40-transformierte XPC-defiziente Fibroblasten | DMEM 10% (v/v) FBS 1% Pen/Strep | Dr. Kenneth H. Kraemer, NCI, Bethesda, MD, USA |

2.1.8 Datenbanken und Computerprogramme

Folgende Datenbanken und Computerprogramme sind verwendet worden (Tabelle 14).

Tabelle 14: Verwendete Datenbanken und Computerprogramme

| Datenbank / Computerprogramm | Herkunft / Hersteller |
|--|--|
| Adobe Photoshop | Adobe Systems GmbH, München |
| BioLinX 2.0 | Dynatech Laboratories, Denkendorf |
| DNA Sequencing Analysis Version 5.2 | Applied Biosystems, Darmstadt |
| LightCycler LCDA Version 3.5.28 | Roche, Mannheim |
| Multi Gauge | Fujifilm, Düsseldorf |
| NCBI (National Center for Biotechnology Information) Datenbank | NCBI, Bethesda, USA www.ncbi.nlm.nih.gov |
| SigmaPlot 9.0 | Systat.Software GmbH, Erkrath |

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur- und Transfektionsmethoden

2.2.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Die Kultivierung humaner Lymphoblasten und Fibroblasten erfolgte stets unter sterilen Bedingungen mit autoklavierten oder sterilisierten Materialien und Lösungen. Die Zellen wurden je nach benötigter Zellmenge in 25 cm², 75 cm² oder 175 cm² Zellkulturflaschen mit Belüftungskapen in einem 37°C und 5% CO₂-befeuchtenden Inkubator kultiviert. Der Zustand der jeweiligen Zelllinien wurde regelmäßig mikroskopisch kontrolliert und je nach Proliferationsrate und Stoffwechselaktivität wurde das Medium alle zwei bis sechs Tage gewechselt. Waren Fibroblastenzellen konfluent, wurden sie passagiert und in größeren oder mehreren Zellkulturflaschen neu ausgesät. Dazu wurde unter der Sterilbank das Medium von den Zellen abgenommen und restliches Medium durch einmaliges Waschen mit 10 ml 1x PBS entfernt. Um die adhärent-wachsenden Fibroblasten in Suspension zu bringen, wurden sie für 5 min in 4 ml Trypsin / EDTA inkubiert. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche wurde durch Zugabe von 10 ml komplettem Medium gestoppt, da das enthaltene FBS das agierende Trypsin sättigt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 188 x g für 10 min pelletiert, in frischem Medium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen umgesetzt. Die in Suspension wachsenden Lymphoblasten wurden durch Teilung auf mehrere Flaschen und anschließend mit frischem Medium ausgedünnt.

2.2.1.2 Kryokonservierung und Revitalisierung

Zur langfristigen Lagerung der Zelllinien wurden Stammkulturen hergestellt und in flüssigem Stickstoff gelagert. In 0,5 ml inkomplettem Medium wurden 1×10^6 Fibroblastenzellen bzw. 1×10^7 Lymphoblastenzellen mit je 0,5 ml Einfriermedium in einem Kryo-Röhrchen vermischt und sofort in ein Isopropanol-gefülltes Gefriergefäß überführt. So wurden die Zellen schonend mit einer Rate von 1°C/min heruntergekühlt und konnten – nachdem sie für 24 h bei -80°C eingefroren worden sind – anschließend in flüssigem Stickstoff überführt werden. Zur Revitalisierung wurde die Kryokultur zügig im 37°C Wasserbad aufgetaut, in 5 ml komplettem Medium überführt und für 5 min bei 188 x g abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert, in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt und unter den Standardbedingungen kultiviert. Die XP-defizienten Zelllinien wurden aufgrund ihres langsameren Wachstums in 25 cm² Zellkulturflaschen herangezogen.

2.2.1.3 Behandlung und Stimulation der Zellen

Bei allen Zellkulturexperimenten wurden die Zellen vor der eigentlichen Durchführung des Experimentes bereits für 24 h in Medium mit oder ohne Immunsuppressiva inkubiert. GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten wurden unter Zusatz von Cyclosporin A und Everolimus inkubiert, während die Inkubation der XP-defizienten Zelllinien nur unter Zusatz von Cyclosporin A stattfand. Dem Medium der GM00637 Fibroblasten wurde für Versuche zur NER und CREB-vermittelten Transkription (Kapitel 3.4) außerdem noch das Calcium-Ionophor A23187 zugegeben, welches den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel erhöhen sollte.

Cyclosporin A wurde in einer Stammlösung von 830 μM angesetzt. Dazu wurde das Pulver abgewogen und in 0,1 mg/ml Ethanol sowie 0,02 mg/ml Tween 80 unter ausgiebigem Schütteln auf einem Schüttelinkubator gelöst. Anschließend wurde inkomplettes Medium bis zu einer Gesamtkonzentration für 1 mg/ml zugetropft. Die so erhaltene Stammlösung wurde steril filtriert und lichtgeschützt bei -20°C gelagert. Die Endkonzentrationen (0,5 nM – 1,5 μM) in Zellkulturexperimenten wurden direkt vor einem Experiment durch Verdünnung in den entsprechenden kompletten Medien angesetzt.

Zur Herstellung einer 10 mM Everolimus Stammlösung wurden 2,5 mg des Pulvers in 261 μl Ethanol gelöst und dann mittels inkompletten Medium auf eine Konzentration von 1 mM verdünnt. Diese Stammlösung wurde ebenfalls lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt und kurz vor den Zellkulturexperimenten mit den entsprechenden Medien auf Endkonzentrationen von 2,5 nM bis 30 μM verdünnt.

Für eine 1 mM Calcium-Ionophor A23187 Stammlösung wurde 1 mg A23187 in 191 μl Ethanol gelöst, ausgiebig geschüttelt und anschließend 1,719 ml inkomplettes Medium dazu pipettiert. Nach ausgiebigem Schütteln wurde diese Stammlösung lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt. GM00637 Fibroblasten wurden mit dem Calcium-Ionophor nicht vorinkubiert, sondern erst nach Transfektion stimuliert.

2.2.1.4 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden Neubauer-Zählkammern verwendet (0,0025 $\text{mm}^2 \times 0,1 \text{ mm}$), bei denen sich die Zellzahl pro ml bei bekanntem Volumen der Zählkammer ermitteln lässt. Bei dieser Bestimmung wurden 10 μl der Zellsuspension mit 90 μl Trypanblau vermischt und davon 10 μl auf die Kammer pipettiert. Die lebenden Zellen verblieben ungefärbt und konnten mittels Mikroskop in vier Großquadranten ausgezählt werden. Tote Zellen färbten sich blau, da Trypanblau durch defekte Zellmembranen ins

Cytosol eindringen und dort die Zellproteine binden kann. Die Zellzahl pro ml berechnete sich nach folgender Formel: Zellen x 10 x 2500.

2.2.1.5 UV-Überlebenstest (Post-UV cell survival)

Um die Sensitivität einer Zelllinie gegenüber UV-Licht und bestimmten Immunsuppressiva messen zu können, wurden UV-Überlebenstests durchgeführt, welche mittels dem CellTiter96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay gemessen worden sind. Dieser Test bestimmt die Proliferationsrate der Zellen in einer Zellkultur nach Behandlung mit UV oder Inkubation mit bestimmten Substanzen anhand der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen. Die mitochondriale Succinatdehydrogenase metabolisch aktiver Zellen wandelt das wasserlösliche Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) in ein blaues Formazansalz um. Nach Zugabe einer Stopplösung wird die Intensität der Formazanlösung photometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt. Das Verhältnis der Menge der Formazan-Bildung in UV- und immunsuppressiv-behandelten Zellen zur Menge der Formazan-Bildung in unbehandelten Zellen, angegeben in Prozent, ermöglicht somit eine Aussage über die Vitalität der Zellen bzw. Zytotoxizität der Inkubationssubstanzen.

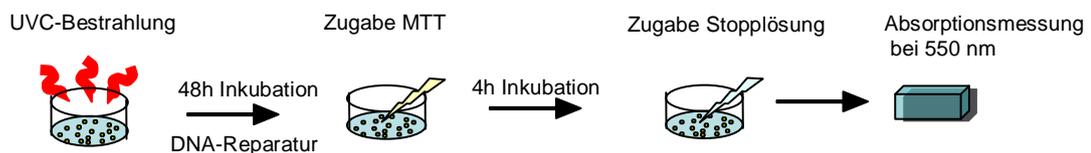


Abbildung 7: Schematische Darstellung des UV-Überlebenstests

Der Test wurde an GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten durchgeführt. Dazu wurden je 4000 GM00637 Fibroblasten in eine 96well-Platte in 100 µl des entsprechenden Kulturmediums mit oder ohne Immunsuppressiva in verschiedenen Endkonzentrationen ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit verschiedenen UVC-Dosen (10-50 J/m²) in einem Ultraviolett Crosslinker mit 254 nm UVC-Röhren bestrahlt. AG10107 Lymphoblasten wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen über Nacht mit oder ohne Immunsuppressiva inkubiert, am nächsten Tag herunter zentrifugiert und je 7000 Zellen in einem Volumen von 50 µl 1x PBS in eine 96well-Platte pipettiert. Dann wurde mit 10 bis 70 J/m² UVC bestrahlt. Anschließend sind die GM00637 Fibroblasten und

AG10107 Lymphoblasten mit 100 µl frischem Medium mit oder ohne Immunsuppressiva für 48 h inkubiert worden. Nach dieser Inkubationszeit wurde pro well 15 µl Dye-Solution zu den Zellen gegeben und die Platte für 4 h im Inkubator gelagert. Die Reduktion von MTT zu blauem Formazan wurde durch Zugabe von 100 µl Stopp-Solution beendet. Zur vollständigen Zelllyse wurde die Platte über Nacht lichtgeschützt gelagert. Anschließend erfolgte die colorimetrische Bestimmung des Formazan im Photometer (Dynatech MR 5000, siehe Tab. 2). Mithilfe der Software BioLynx 2,0 wurde die Absorption quantitativ ausgewertet. Als Leerwert wurden Medium-gefüllte wells ohne Zellen eingesetzt. Das UV-Überleben der Zellen (Post-UV cell survival) errechnete sich aus dem Verhältnis des Überlebens bestrahlter Zellen relativ zum Zellüberleben unbestrahlter Zellen.

2.2.1.6 Transiente Transfektion von Lymphoblasten

Unter einer transienten Transfektion versteht man das Einschleusen von Fremd-DNA, meist in Form eines ringförmigen Plasmides, in eukaryotische Zellen. Anschließend exprimieren die Zellen vorübergehend die auf der DNA kodierten Gene. Im Gegensatz zur stabilen Transfektion wird die DNA nicht in das Genom integriert. Als „Reportergene“ werden Luciferase, β -Galaktosidase, Chloramphenicol-Acetyltransferase oder GFP verwendet. Die zu transfizierenden Plasmide sind Tabelle 11 zu entnehmen.

AG10107 Lymphoblasten wurden mit der DEAE-Dextran-Methode transfiziert. (modifiziert nach Sambrook, 2001). Bei diesem Verfahren lagert sich DNA an das Polykation DEAE-Dextran an und bildet ein Polykation-DNA-Kopräzipitat. Dieser Komplex wird dem Kulturmedium von Suspensionszellen zugegeben, welche ihn durch Endozytose aufnehmen. Bei der nächsten Zellteilung schließlich gelangt die DNA in den Zellkern und es schließen sich Transkriptions- sowie Translationsprozesse an.

Für den Versuch wurden die 24 h vorinkubierten Zellen aus einer 75 cm² Zellkulturflasche für 10 min bei 188 x g zentrifugiert und das abgezogene Medium aufbewahrt („konditioniertes Medium“). Die Zellen wurden anschließend mit S-TBS gewaschen, erneut bei 188 x g für 10 min zentrifugiert und je 2 x 10⁶ Zellen in einem Volumen von 200 µl S-TBS in Polystyrene Röhrchen überführt. In den Polystyrenen Röhrchen wurde zuvor der Plasmid-DEAE-Dextran-Mix pipettiert (siehe Tabelle 15). Nach Zugabe der Zellsuspension wurde das Polystyrene Röhrchen rasch ca. 4 sec gevortext und dann für 15 min im Inkubator gelagert. Diese „Transfektionszeit“ wurde

mit je 1 ml konditioniertem Medium unter vortexen beendet. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 188 x g und 10 min. Danach wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in je 2 ml konditioniertem und frischem Medium mit oder ohne Immunsuppressiva im Verhältnis 1:1 resuspendiert. Die transfizierten Zellen wurden für 48 h im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 15: Plasmid-DEAE-Dextran-Mix

| Plasmid-DNA-Konzentration | Pipettierschema für 1 Ansatz |
|----------------------------------|---|
| 0 ng | Plasmid: 0 µl DEAE-Dextran (2mg/ml): 12,5 µl S-TBS: 37,5 µl |
| 125 ng pcmvLUC 125 ng pRL-CMV | pcmvluc: 2,5 µl pRL-CMV: 2,5 µl DEAE-Dextran (2mg/ml): 12,5 µl S-TBS: 32,5 µl |

2.2.1.7 Transiente Transfektion von Fibroblasten

Die in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten wurden mit Lipofectamin transfiziert. Bei diesem Prinzip bildet sich ein Präzipitat aus Nucleinsäuren und kationischen Lipiden. Dieser Nucleinsäure-Liposomen-Komplex wird ähnlich wie DEAE-Dextran durch Endozytose aufgenommen. Zur Transfektion wurden die Zellen am Vortag in einer Zelldichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen in 6well-Gewebekulturplatten im entsprechenden Medium mit oder ohne Immunsuppressiva ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgezogen und die Zellen einmal mit je 2 ml Opti-MEM gewaschen. Der Nucleinsäure-Lipofectamin-Mix wurde ähnlich der Protokollvorlage des Lipofectamin 2000 Transfection System in Polystyrene Röhren pipettiert. Folgende Änderungen des Pipettierschemas wurden gemacht: je Transfektionsansatz wurde ein Gemisch A aus 2 µl Lipofectamin in 750 µl Opti-MEM für 5 min inkubiert. Ein Gemisch B enthält die zu transfizierende Nucleinsäuremenge in 250 µl Opti-MEM (siehe Tabelle 11). Diese beiden Gemische wurden nach 5 min vereinigt und zur Präzipitatbildung für 30 min bei RT inkubiert. Je 1 ml des Nucleinsäure-Lipofectamin-Mixes wurde dann in die wells pipettiert und die Platten für 5 h in den Inkubator gestellt. Nach der Inkubationszeit wurde der Nucleinsäure-Lipofectamin-Mix wieder entfernt, die Zellen mit 2 ml frischem Kulturmedium mit oder ohne Immunsuppressiva überschichtet und für 48 h im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.8 Der Wirts-Zell-Reaktivierungsassay zur Messung der NER

Die Messung der zellulären DNA-Reparaturfähigkeit erfolgte anhand des Wirts-Zell-Reaktivierungsassays. Mithilfe dieses Assays wurde quantitativ die Nukleotid-Exzisions-Reparatur von Wirtszellen untersucht, welche zuvor verschiedenen Substanzen ausgesetzt waren. Dieser sensitive und spezifische Assay basiert auf folgendem Prinzip (Abbildung 8): Ein nicht-replizierendes Plasmid (pcmvLUC), welches ein Firefly-Luciferase-Reportergen trägt, wird *in-vitro* mit 1000 J/m^2 UVC bestrahlt, sodass sich innerhalb des Plasmides UV-induzierte DNA-Schäden, die Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und Pyrimidin-6-4-Pyrimidon Photoprodukte (6-4PP), mit einer Ratio von 3:1 bilden. Es ist bekannt, dass 56 J/m^2 UVC 1 Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer pro $\sim 900 \text{ bp}$ generiert (Protic-Sabljić *et al.*, 1985). Innerhalb des Luciferase Reporter Gens (1656 bp) würden sich bei einem 1000 J/m^2 bestrahlten Plasmides insgesamt ca. 32 CPD bilden.

Die zu untersuchende Zellreihe wird mit dem Plasmid transfiziert und nach zwei Tagen Prozessierung in der Wirtszelle die Aktivität der exprimierten Firefly-Luciferase im Zelllysats in einem Luminometer gemessen. Nur ein innerhalb des Luciferase-Reportergens vollständig repariertes Plasmid führt zur Expression des Luciferase-Proteins (Qiao *et al.*, 2002). Verbleibt ein unrepariertes Photoprodukt auf dem Plasmid, kann das Reportergen nicht exprimiert werden. Die Menge an exprimierter Firefly Luciferase spiegelt die Reparaturfähigkeit der Wirtszellen wider und berechnete sich aus dem Verhältnis der Luciferaseaktivität des UVC-bestrahlten Plasmides relativ zur Luciferaseaktivität des nicht UVC-bestrahlten Plasmides. Zur Normalisierung der gemessenen Firefly-Luciferase-Aktivität wurde außerdem ein Plasmid kotransfiziert, welches ein Reportergen für die Renilla-Luciferase enthält. Die Aktivität der Renilla-Luciferase lässt sich im Luminometer unabhängig von der Firefly-Luciferase bestimmen. Sie dient als interne Kontrolle zur Normalisierung der gemessenen Firefly-Luciferase-Aktivität. Aufgrund der Kotransfektion des Renilla-Luciferase-Plasmides können zum Beispiel unspezifisch toxische Effekte der verwendeten Substanzen auf die Zellen erkannt und ausgeschlossen werden.

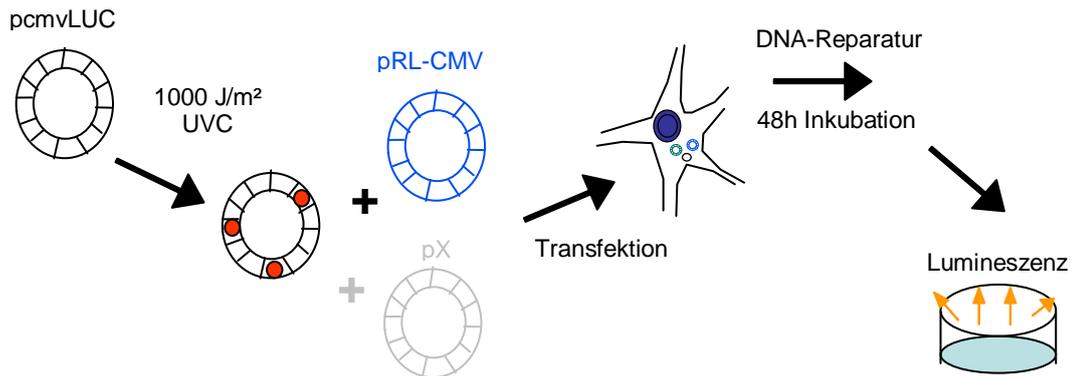


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Wirts-Zell-Reaktivierungsassay

Zusätzlich können neben der Transfektion von pcmvLUC und pRL-CMV auch weitere Expressionsplasmide oder RNAi kotransfiziert werden (Abbildung 8, grau pX), welche entweder ein Protein überexprimieren oder herunterregulieren (Tabelle 11). Diese Versuche dienen zum einen der Komplementierung von defizienten XP-Zelllinien, zum anderen wurde die Wirkung von Cyclosporin A auf diese Proteine untersucht.

Für eine Messung der zellulären NER wurden 48 h nach der Transfektion die Zellen wie folgt vorbereitet: Die Lymphoblasten wurden für 10 min bei 188 x g zentrifugiert, das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Dann wurde erneut zentrifugiert, das PBS vorsichtig abgesaugt und die Zellen in je 200 µl Lysepuffer für 30 min bei RT inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1300 x g zentrifugiert. Bei transfizierten Fibroblasten wurde das Medium von den Platten gesaugt, einmal mit 1x PBS gewaschen und die Zellen ebenfalls mit je 200 µl Lysepuffer inkubiert. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden restliche Zellen abgelöst und die Suspension für den Zentrifugationsschritt ebenfalls in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand enthielt die zytosolischen Proteine, mit denen die Bestimmung der Luciferase-Aktivitäten im Luminometer erfolgen konnte. Die für die Messungen benötigten Lösungen (Beetle Luciferin für Firefly Luciferase; Coelenterazin für Renilla Luciferase) wurden dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System der Firma Promega entnommen und die Messungen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Beide Luciferase-Enzyme oxidieren ihr jeweiliges Substrat, das Luciferin, wobei als Nebenprodukt Energie in Form von Licht entsteht (Tabelle 16). Die Firefly-Luciferase benötigt zusätzlich ATP und Mg^{2+} und es entstehen AMP, PP_i , und CO_2 .

Tabelle 16: Luciferinreaktion

| Substrat | Enzym | Produkte |
|--|-------------------------|--|
| Beetle Luciferin +ATP + Mg ²⁺ + O ₂ | Firefly Luciferase → | Oxyluciferin + AMP + PP _i + CO ₂ + Licht |
| Coelenterazine + O ₂ | Renilla Luciferase → | Coelenteramide + CO ₂ + Licht |

Die Lichtemission ist proportional zu der eingesetzten Luciferase-Menge und kann im Luminometer quantifiziert werden. Die gemessenen Werte wurden als relative Lichteinheiten (RLU) dargestellt. Als Leerwert wurden RLU von Wells ohne Zellsat gemessen.

2.2.1.9 Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht von Bakterien erfolgte in LB-Medium, welches in Aqua bidest angesetzt, autoklaviert und nach dem Abkühlen mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion versetzt wurde. Fertiges LB-Medium wurde bei RT aufbewahrt. Zur Herstellung von Agarplatten wurde das LB-Medium mit 15 g Agar pro Liter Medium versetzt, autoklaviert, nach dem Abkühlen mit Antibiotika versetzt und unter sterilen Bedingungen in Gewebekulturschalen gegossen. Die fest gewordenen Agarplatten wurden bei 4°C gelagert.

Die Anzucht von Bakterien auf einer Agarplatte erfolgte nach einer Transformation (Kapitel 2.2.1.10). Die transformierten Bakterien wurden auf eine Agarplatte pipettiert und mit gebogenen Glas-Pasteurpipetten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienkolonien entweder für eine Vorkultur weiter verwendet oder die Platten mit Parafilm verschlossen im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Zur Herstellung einer Bakteriensuspension wurden in sterilen 15 ml Röhrchen 5 ml LB-Medium mit einer Bakterienkolonie von einer Agarplatte versetzt und im Inkubationsschüttler bei 37°C für 8 h bei 180 U/min geschüttelt. Die leichte Schrägstellung (~40°) diente der besseren Sauerstoffversorgung der Bakterien. Diese Vorkultur wurde anschließend im Schikane-Kolben mit 200 ml LB-Medium über Nacht im Inkubationsschüttler weiter kultiviert (Hauptkultur).

2.2.1.10 Transformationsmethoden in *E. coli*

Kompetente MLB-100 Bakterien wurden nach einem Protokoll von Sambrook (2001) hergestellt, sodass sie für die Elektroporation verwendet werden konnten. Dabei wurden die Zellen für ca. 5 msec einem elektrischen Impuls ausgesetzt, der mikroskopisch kleine Poren in der Zellmembran verursacht, wodurch die DNA in die Zelle gelangen kann. Um eine hohe Effizienz der Elektroporation zu erzielen, war besonders darauf zu achten, dass die Temperatur der kompetenten Bakterien nicht mehr als 4°C betrug. Für die Transformation wurde ein Aliquot (80 µl) der Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 50 ng Plasmid-DNA vermischt und durch ein kurzes Auf- und Abpipettieren in der Bakterienlösung verteilt. Das Gemisch wurde in eine vorgekühlte sterile Elektroporationsküvette überführt und sofort die Elektroporation (2500 kV, 25 µF und 200 Ω) in einem Elektroporationsgerät durchgeführt. Der gesamte Inhalt der Küvette wurde in 900 µl SOC-Medium (Tabelle 5) aufgenommen und im Inkubationsschüttler bei 37°C für 1 h bei 110 U/min inkubiert. Danach wurden 100 bis 300 µl auf eine Agar-Platte ausplattiert (Siehe Kapitel 2.2.1.9)

Kompetente DH5α Bakterien wurden mit der Hitzeschock-Methode transformiert. Dafür wurden 80 µl auf Eis aufgetaute Bakterien mit Plasmid-DNA vermischt, kurz gevortext und abzentrifugiert, und das Gemisch für 30 min auf Eis gelagert. Dann erfolgte der Hitzeschock: auf einem Termomixer wurden die Bakterien für 1 min bei 42°C inkubiert, danach für 2 min auf Eis gestellt und anschließend in 1 ml LB-Medium aufgenommen. Für 1 h wurde das Gemisch im Inkubationsschüttler bei 37°C und 110 U/min inkubiert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Ausgehend von einer Bakterien-Hauptkultur (siehe Kapitel 2.2.1.9) wurde für eine Isolierung der Plasmid-DNA entweder das QIAgen Plasmid Midi-Kit (Qiagen, Hilden) oder das PureYield™ Plasmid Maxiprep System (Promega, Mannheim) nach Anleitung der Hersteller verwendet. Die Übernacht-Kultur wurde für beide Protokolle für 15 min bei 755 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde resuspendiert und die Bakterien mit einem alkalischen Lysepuffer lysiert. Die Präzipitation der Proteine erfolgte durch Zugabe eines schwach sauren Neutralisationspuffers. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand auf eine Säule des jeweiligen Kits gegeben. Beim QIAgen Plasmid Midi-Kit wurde durch Zugabe eines Puffers mit sehr hoher Salzkonzentration die Plasmid-DNA von der Matrix eluiert und durch eine abschließende Fällung mit Isopropanol konzentriert. Dann folgte ein 10-minütiger

Zentrifugationsschritt bei 4°C und 15800 x g. Die gereinigte DNA wurde in Nuklease-freiem Wasser aufgenommen. Beim PureYield™ Plasmid Maxiprep System beschleunigte das Anlegen eines Vakuums die einzelnen Waschschrte. Die DNA wurde mit Nuklease-freiem Wasser unter Zentrifugieren eluiert. Die Konzentration der DNA wurde im Photometer gemessen (Kapitel 2.2.2.3).

2.2.2.2 Isolierung von DNA und RNA

Die gleichzeitige Isolierung von DNA und RNA aus GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten erfolgte unter Verwendung des AllPrep™ DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers. Das Kit bietet den Vorteil einer gleichzeitigen Isolierung von DNA und RNA. Die Zellen wurden zunächst in 1x PBS gewaschen, zur Lyse in einem Puffer aufgenommen und in ein AllPrep DNA *Spin Column* überführt. Die DNA bindet durch einen Zentrifugationsschritt an die Säule, während die RNA die Säule passiert. Da die RNA sehr anfällig für spontane und enzymatische Hydrolyse ist und leicht von RNAsen abgebaut werden kann, wurde mit ihr sofort weitergearbeitet. Dazu wurde sie in 70%igem EtOH aufgenommen und in eine RNeasy *Spin Column* überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 15 sec bei 8000 x g wurde die Säule mit zwei verschiedenen Waschpuffern gewaschen und anschließend zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Die Säule wurde danach nochmals abzentrifugiert, um Rückstände des Puffers zu entfernen. Die Elution der RNA erfolgte mittels Zugabe von 50 µl DEPC-Wasser und einem Zentrifugationsschritt für 1 min bei 8000 x g. Die an die AllPrep DNA *Spin Column* gebundene DNA wurde ebenfalls mit zwei verschiedenen Puffern des Kits gewaschen und zentrifugiert. Mittels Elutionspuffer wurde die DNA von der Säule gelöst. Die Konzentrationsbestimmungen von DNA und RNA erfolgte im Photometer (Kapitel 2.2.2.3). Alternativ wurden DNA und RNA getrennt voneinander isoliert. Dazu bediente man sich dem Rneasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) und dem QIAamp® DNA Blood Kit und isolierte entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls.

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch in einem Spektralphotometer. Je 2 µl der Nukleinsäure wurde in 98 µl Aqua bidest verdünnt (1:50 Verdünnung) und gegen einen Referenzwert (100 µl Aqua bidest) in Quarzküvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die

Nukleinsäurekonzentration wird aus der optischen Dichte (OD) bei 260 nm, der Verdünnung der DNA und einem spezifischen Multiplikationsfaktor (M) berechnet:

$$C \text{ Nukleinsäure } (\mu\text{g} / \text{ml}) = \text{OD}_{260\text{nm}} \times M \times \text{Verdünnung}$$

Der Multiplikationsfaktor (M) für dsDNA beträgt 50, der für RNA 40. Zur Beurteilung der Reinheit der Nukleinsäure wurde der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und der Absorption bei 280 nm herangezogen, wobei ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 für eine hohe Reinheit sprach.

2.2.2.4 Aufreinigung von DNA

Um DNA von Proteinen und Zellbestandteilen zu reinigen, erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Dabei wurden gleiche Volumina an Phenol und Chloroform zur DNA gegeben und intensiv gemischt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei $5200 \times g$ für 10 min wurde die wässrige obere Phase mit der DNA in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol der Waschschritt wiederholt. Die DNA, welche sich in der wässrigen Phase befindet, wurde anschließend mit Ethanol gefällt, um sie zu konzentrieren und von Salzverunreinigungen zu befreien. Für eine Präzipitation wurden zur DNA 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung und 2,5 Volumen 96%igen EtOH gegeben. Dieser Ansatz wurde für 15 min bei -80°C gelagert und dann für 20 min bei $15800 \times g$ zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70%igem EtOH gewaschen, anschließend getrocknet und in einem entsprechenden Volumen Aqua bidest aufgenommen.

2.2.2.5 Kontrolle von Plasmid-DNA durch Restriktionsverdau und Sequenzierung

Zur Kontrolle der isolierten Plasmide (Kapitel. 2.2.2.1) wurden diese durch Restriktionsverdau oder Sequenzierung verifiziert. Beim Restriktionsverdau wird die DNA an gezielten Positionen durch Restriktionsendonukleasen gespalten. Diese erkennen kurze definierte Nukleotidsequenzen und schneiden die DNA innerhalb oder in einem definierten Abstand zu dieser Region. Der Schnitt kann entweder versetzt oder gegenüberliegend erfolgen. Während beim versetzten Schneiden überhängende Enden, sogenannte *blunt ends* entstehen, führt das gegenüberliegende Schneiden zu stumpfen Enden (*sticky ends*). Da sich überhängende Enden leichter ligieren lassen, werden diese bevorzugt für Klonierungen eingesetzt.

Für den Restriktionsverdau wurden 100 bis 200 ng Plasmid-DNA mit 1 µl des jeweiligen Restriktionsenzym unter Zusatz des entsprechenden Restriktionspuffers in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 1 h im 37°C Brutschrank inkubiert (siehe Tabelle 7). Das Restriktionsenzym wird meist im Überschuss angesetzt. Prinzipiell verdaut 1 Unit Enzym 1 µg DNA in 1 h. Die Plasmide pCNA und pCNB wurden in verschiedenen Ansätzen mit NcoI, EcoRI, und BamH1 verdaut. Das Plasmid pXPA wurde mit XbaI linearisiert, das Plasmid pXPC-3 mit HindIII verdaut. Das Plasmid pXPG wurde in verschiedenen Ansätzen mit EcoRI, XbaI und HindIII verdaut. Der Verdau wurde durch Inkubation bei 65°C gestoppt und anschließend auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (Kapitel 2.2.2.8) und bei 100 V aufgetrennt. Die entstanden Fragmente wurden anschließend mit den Vektorkarten oder mit den verdauten Plasmiden aus dem Stock verglichen.

Die Plasmide pCREB und pCREBS133A wurden zur Überprüfung der korrekten Transformation nach der Methode von (Sanger *et al.*, 1977) ansequenziert. Der zu sequenzierende Abschnitt wurde in einer PCR-Reaktion amplifiziert (Kapitel 2.2.2.6), bei der neben Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs), auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) verwendet worden sind, denen die 3'OH-Gruppe fehlt. Werden diese in einen neu synthetisierten Strang eingebaut, kommt es zum Kettenabbruch. Da die Kettenabbruch-Reaktionen zufällig erfolgen, entstehen während der Sequenzier-PCR verschieden lange DNA-Fragmente, welche am Ende je ein anderes fluoreszierendes ddNTP haben. Bei der sich anschließenden Sequenzierung werden die unterschiedlichen DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand ihrer fluoreszierenden Basen (Adenin: Grün, Thymin: Rot, Cytosin: Blau, Guanin: Schwarz) können die einzelnen Fragmente nach Anregung durch einen Laserstrahl detektiert und identifiziert werden.

Die CREB-Sequenz weist an Position 133 der Transaktivierungsdomäne die Basensequenz TCC auf, welche für die Aminosäure Serin kodiert. Zur Aktivierung der CREB-vermittelten Transkription muss dieses Serin phosphoryliert werden, damit der Koaktivator CBP binden und die transkriptionelle Aktivität von CREB vermittelt werden kann. Das Plasmid pCREBS133A hat anstelle des T ein G, sodass statt Serin die Aminosäure Alanin kodiert wird. Dadurch unterbleibt die Bindung von CBP an CREB, für die eine Phosphorylierung des Serin an Position 133 der Transaktivierungsdomäne erforderlich ist.

Zur Amplifikation wurde das BigDye® -Terminator Cycle Sequencing Kit verwendet und die Sequenzreaktion entsprechend den Herstellerangaben angesetzt. Die Plasmid-DNA wurde in einer Konzentration von 200 bis 300 ng eingesetzt, die *Primer* (Tabelle 10) für die CREB-Wildtyp (CREB wt)- bzw. CREB-Mutante (CREB mut)- Sequenz wurden in einer Konzentration von 10 pmol/µl hinzugegeben. Nach der Sequenzier-PCR wurde die DNA mit 96%igem EtOH gefällt (Kapitel. 2.2.2.4), um nicht gebundene ddNTP`s zu entfernen. Die gereinigte DNA wurde anschließend in 12,5 µl Aqua bidest und 7,5 µl Formamid aufgenommen, für 2 min auf 90°C erhitzt, kurz auf Eis abgekühlt, und danach in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Kapillar-Sequenziergerät ABI310. Die digitale Sammlung der Daten mit der 310 *Data Collection Software* und die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit der Sequenzierung-Analyse 5.2.0. Software (Applied Biosystems, Darmstadt). Nach Abgleich der erhaltenen Sequenzen mit den entsprechenden Genkarten konnte die CREB mut-Sequenz anhand des Basenaustausch T-G an Position 133 als Serin-Alanin-Mutante identifiziert werden.

2.2.2.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Das Prinzip einer PCR entspricht der Replikation, bei der eine DNA-Polymerase einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Matrize synthetisiert. Dieser Vorgang wird zyklisch wiederholt, wobei die synthetisierte DNA bei jedem Zyklus wieder neu als *Template* zur Verfügung steht. Durch die zyklische Wiederholung von Hitzedenaturierung des Doppelstranges, Anlagern (*Annealing*) der *Primer* und Verlängerung (*Elongation*) des DNA-Stranges durch die hitzestabile Taq-DNA Polymerase, wird die DNA exponentiell amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden zur Sequenzierung (Kapitel 2.2.2.5), cDNA-Synthese (Kapitel 2.2.2.7), oder qRT-PCR (Kapitel 2.2.2.9) eingesetzt. Beim *Annealing* der *Primer* ist die Wahl der Temperatur entscheidend und richtet sich nach folgender Formel: $T_m = (C+G) \times 4^\circ\text{C} + (A+T) \times 2^\circ\text{C}$. Ausschlaggebend ist dabei die niedrigere Temperatur der eingesetzten *Primer*. Als *Annealing*temperatur wurde eine 2°C niedrigere als die errechnete niedrigere Temperatur eingestellt. Idealerweise sollten die *Primer* zwischen 18 und 24 bp lang sein. Die Synthesedauer des Doppelstranges wird in Abhängigkeit zur Länge des PCR-Produktes eingestellt. Im Allgemeinen wird 1 kbp in 1 min synthetisiert. Als *Template* wurde 1 µl verdünnte cDNA (1:5), 1 bis 100 ng Plasmid-DNA oder 600 ng genomische DNA eingesetzt. Die Standard-PCR-Reaktionen (Tabelle 17) fanden in 50 µl-Ansätzen statt und wurden, um eine Fehlhybridisierung der *Primer* zu vermeiden, auf Eis pipettiert.

Tabelle 17: Verwendete PCR-Programme

| PCR Programm | Sequenz-PCR | RT-PCR | qRT-PCR |
|------------------------|--------------|-------------|------------------------------|
| Initiale Denaturierung | 95°C 15 min | 70°C 5 min | 95°C 15 min |
| Denaturierung | 95°C, 30 sec | | 94°C, 15 sec |
| Annealing | 55°C, 15 sec | 60°C , 4min | 49°C – 55°C, 15 sec – 30 sec |
| Elongation | 60°C, 4min | | 72°C, 10 sec – 20 sec |
| Zykluswiederholung | 30 x | | 30 – 40 x |
| Finale Elongation | 70°C, 5 min | 70°C 10 min | 72°C, 10 min |

Nach Abschluss der Amplifikation wurde ein Aliquot des Reaktionsansatzes mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (Kapitel 2.2.2.8). Der restliche Ansatz wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.2.7 cDNA Synthese (Reverse Transkription)

Bei der cDNA-Synthese katalysiert die Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, aus mRNA eine komplementäre DNA. Dabei wird in der RT-PCR erst ein RNA-DNA-Hybridstrang generiert und anschließend die RNA hydrolisiert. Bei der Synthese schließlich entsteht einzelsträngige cDNA. Die PCR wurde mit Hilfe des *First strand c-DNA-Synthese-Kits* der Firma Fermentas nach Herstelleranweisungen durchgeführt. Als *Primer* wurden Oligo (dt)-*Primer* verwendet. Diese lagern sich im Bereich des Poly (A)-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA an und sorgen dafür, dass alle mRNA-Moleküle selektiv in cDNA umgeschrieben werden. Die Tabelle 18 listet den PCR-Ansatz auf:

Tabelle 18: Ansatz für eine RT-PCR

| | |
|-------------------------------------|----------|
| RNA | 500 ng |
| Oligo dt <i>Primer</i> (0,5 µg/ µl) | 1 µl |
| 5*Reaktionspuffer | 4 µl |
| Rnase Inhibitor | 1 µl |
| 10mM d` NTP Mix | 2 µl |
| Rev. Transkriptase | 1 µl |
| Aqua bidest | ad 20 µl |

Die PCR erfolgte in zwei Schritten (Kapitel 2.2.2.6), wobei zunächst die cDNA Erststrangsynthese mit der RNA als *Template* erfolgte. In der zweiten PCR, diente die gebildete cDNA als *Template*. Das Amplifikat wurde bis zur weiteren Verwendung für eine *Realtime* RT-PCR (Kapitel 2.2.2.9) bei -20°C gelagert.

2.2.2.8 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente werden zur Auftrennung und Analyse durch horizontale Agarosegelelektrophorese im elektrischen Feld aufgetrennt. Die DNA wandert durch ihre negative Ladung in Abhängigkeit ihrer Größe zur Anode. Die Laufgeschwindigkeit nimmt mit steigender Molekülgröße ab und richtet sich nach der Porengröße des Gels, die von der Konzentration an Agarose abhängt (0,5% bis 2% (w/v)). In Abhängigkeit der zu erwartenden Fragmentgröße wurden 0,8 bis 1,5%ige Agarosegele mit NuSieve-Agarose in 100 ml 1 x TBE-Puffer angesetzt. Zum Lösen der Agarose wurde der Puffer auf 50°C erhitzt und anschließend in eine Elektrophoresekammer gegossen. Zur Ausbildung von Geltaschen wurde ein Kamm eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 6 x Ladepuffer versetzt, um ein Absinken auf den Boden der Tasche zu ermöglichen, die Lauffront verfolgen sowie degradierende Enzyme durch das enthaltene EDTA inhibieren zu können. Die Größenauftrennung der DNA-Fragmente erfolgte für 1,5 Stunden bei einer Spannung von 100 V. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde ein geeigneter Längenstandard neben der Probe aufgetragen. Zur Visualisierung der Fragmente wurde das Gel für ca. 10 min in ein Ethidiumbromid-Färbebad (Endkonzentration 0,1 µg/ml) gelegt. Der Fluoreszenzfarbstoff interkaliert zwischen die Basen der DNA und lässt diese unter UV-Licht fluoreszieren. An einem UV-Transilluminator-System wurden die gefärbten DNA-Fragmente sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

2.2.2.9 Quantitative Realtime PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, welche zusätzlich die gewonnene cDNA quantitativ während eines jeden PCR Zyklus erfasst. Auf diese Weise ist die Expression der zu untersuchenden Gene auf RNA Ebene anhand ihrer cDNAs quantifizierbar. Die qRT-PCR wurde mit Hilfe des QuantiTect® SYBR green PCR Kits der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die quantitative Bestimmung der cDNA-Menge erfolgt anhand des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR green, der in die Basen von DNA-Doppelsträngen interkaliert. Somit wird nach jedem PCR Zyklus mit Zunahme an DNA ein Anstieg der Fluoreszenzintensität bei

einer Wellenlänge von 530 nm gemessen. Dieser Anstieg erfolgt in den ersten Zyklen exponentiell und wird dann aufgrund zunehmender Störfaktoren (Verbrauch von Substraten, Bildung von Monophosphatnukleotiden und Pyrophosphat) linear. Am Beginn der exponentiellen Phase liegt der Schwellenwert-Zyklus (*Cycle Threshold*, Ct), bei dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über der Hintergrund-Fluoreszenz liegt. Der Ct-Wert ist der Schnittpunkt einer Fluoreszenzkurve mit dem Schwellenwert. Er wird zur Quantifizierung der Expressionen verwendet, da sich die *Templatemengen* einzelner Amplifikationen in diesem Bereich untereinander vergleichen lassen. Eine höhere oder niedrigere *Templatemenge* resultiert also in einem signifikant früheren oder späteren Anstieg der Fluoreszenz.

Für die quantitative Auswertung ist eine Standardkurve zusätzlich erforderlich. Da der Logarithmus einer eingesetzten Menge linear und umgekehrt proportional zum Ct ist, kann bei einer bekannten Ausgangsmenge durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den Ct eine Standardkurve konstruiert werden. Dadurch ist es möglich, für jede unbekannte Probe den Logarithmus der Kopienzahl zu bestimmen. Für die Erstellung einer Standardkurve wurde die Konzentration des für die qRT-PCR-Reaktion spezifischen Produktes photometrisch bestimmt und eine Verdünnungsreihe angesetzt. Der Bereich der Standardkurve musste für jedes Gen abhängig von seiner Expression angepasst werden. Dieser lag ausgehend von einer 500 amol/ μ l-Stocklösung zwischen 500 amol/ μ l bis 5×10^{-4} amol/ μ l. Die eingesetzte cDNA-Menge eines zu untersuchenden Gens kann durch Verwendung eines Referenzgens normalisiert werden. In dieser Doktorarbeit wurde auf das sogenannte *housekeeping* Gen GAPDH normalisiert.

Ein qRT-PCR-Ansatz für eine Probe setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 19: Ansatz für eine qRT-PCR

| | |
|--|---------------|
| cDNA | 100 ng |
| <i>Primer sense</i> (10 pmol/ μ l) | 1 μ l |
| <i>Primer antisense</i> (10 pmol/ μ l) | 1 μ l |
| SYBR-Green Mix (HotStarTaq™ DNA Polymerase, PCR Puffer, d’NTP-Mix, 25 mM MgCl ₂) | 10 μ l |
| Aqua bidest | Ad 20 μ l |

Für jedes Gen wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Auswertung der Daten wurde mit Hilfe der LightCycler LCDA Version 3.5.28 Software durchgeführt. Nach

Abschluss der Amplifikation wurde die Spezifität der PCR-Produkte durch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wurde bei steigender Temperatur von 50 bis 95°C die Fluoreszenzabnahme jeder Probe gemessen, welche aus einer Strangtrennung des DNA-Doppelstranges und der Freisetzung des SYBR green resultiert. Die Temperatur, bei der es zur Strangtrennung kommt, ist für jedes PCR-Produkt spezifisch und wurde daher anhand der jeweiligen Schmelztemperatur bestimmt. Unspezifische Produkte oder *Primer*-Dimere können so durch zusätzliche Maxima von spezifischen Produkten unterschieden werden.

2.2.2.10 ELISA zum Nachweis von DNA-Photoprodukten

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (ELISA) zeichnet sich dadurch aus, dass ein Enzym chemisch mit einem Antikörper oder Antigen gekoppelt wird. Dabei wird die unmarkierte Komponente an einen festen Träger gebunden (*Coating*). Bei den meisten durchgeführten ELISA wird das Antigen an eine Mikrotiterplatte gebunden und die Anlagerung des markierten Antikörpers getestet. Die Antikörperbindung wird mit Hilfe einer enzymatischen Farbreaktion dargestellt, deren Extinktion in einem Photometer bestimmt werden kann.

In dieser Doktorarbeit wurde ein ELISA zur Quantifizierung UV-induzierter Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und Pyrimidin-6,4-Pyrimidon Photoprodukte (6-4PP) in der DNA nach den Angaben des Protokolls von (Mori *et al.*, 1991) durchgeführt. Dabei reagieren die in der DNA vorhandenen Photoprodukte mit monoklonalen Antikörpern gegen CPD (TDM-2) und 6-4PP (64 M-2) zu Immunkomplexen. Die isolierte DNA (Kapitel 2.2.2.2) von bestrahlten Zellen, die für 0 h, 6 h oder 24 h in Kulturmedium mit oder ohne Immunsuppressiva inkubiert worden sind, wurde auf spezielle 96well Mikrotiterplatten *gecoatet*, um eine optimale Haftung zu ermöglichen. Die Platten wurden vorher mit 0,003% Protaminsulfat beschichtet, getrocknet, dann mit Aqua bidest gewaschen und erneut getrocknet. Die DNA wurde durch zweiminütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert und dann auf Eis gestellt, um Renaturierung zu verhindern. Dazu wurde die DNA für die Detektion von 6-4PP in einer Konzentration von 200 ng in 50 µl, für die Detektion von CPD in einer Konzentration von 10 ng in 50 µl 1x PBS verdünnt. Die einzelsträngige DNA wurde auf die Platte aufgetragen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Die getrockneten Platten wurden fünfmal mit 1x PBS + 0,05% Tween 20 gewaschen. Dieser Waschschrift wurde nach jedem Inkubationsschritt wiederholt. Um unspezifische Bindungen des TDM-2 oder 64 M-2 Antikörpers abzublocken, wurden die Platte mit 200 µl einer 2%igen FBS in PBS-

Lösung für 30 min bei 37° inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die Inkubation mit je 100 µl des TDM-2 oder 64 M-2 Antikörpers in einer 1:2000 Verdünnung für 30 min bei 37°C. Anschließend wurde mit einem monoklonalen biotinylierten zweiten Antikörper (Biotinylated F(ab')₂ goat anti-mouse IgG) in einer 1:2000 Verdünnung beschichtet. Nach einem weiteren Waschschrift wurde ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat in einer 1:10000 Verdünnung dazugegeben, welches spezifisch an das Biotin bindet. Nach dem Entfernen des überflüssigen Peroxidase-Konjugates in einem weiteren Waschschrift wurde das chromogene Substrat TMB zugegeben. Durch die Reaktion der Streptavidin-gekoppelten Peroxidase mit dem Substrat TMB kam es zu einem blauen Farbumschlag der ursprünglich farblosen Lösung. Die Enzym-Substrat-Reaktion wurde mit 50 µl 2M H₂SO₄ abgestoppt, wodurch der blaue in einen gelben Farbton umschlug. Die Absorption der Verfärbung wurde bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm im ELISA-Reader bestimmt. Anhand der Färbung konnte auf den prozentualen Anteil der Photoprodukte in der jeweiligen Probe geschlossen werden. Die Reparaturkinetik der Photoprodukte errechnete sich aus der Ratio der Absorption von DNA, die nach 6 oder 24 h repariert wurde relativ zur DNA, welche gleich nach Bestrahlung isoliert wurde.

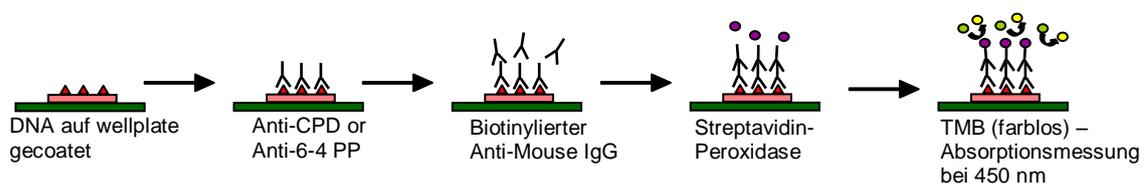


Abbildung 9: Schematische Darstellung des ELISA

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

Zur Analyse von Proteinen wurden jeweils 4×10^6 Zellen in 10 cm Kulturschalen mit den entsprechenden Medium und Zusätzen für 24 h kultiviert.

2.2.3.1 Isolierung von Gesamtprotein

Die im Medium kultivierten Zellen wurden einmal mit 5 ml 1x PBS gewaschen und in 200 µl Passive Lysis 5x Buffer aufgenommen. Anschließend wurde das Homogenisat für 30 min bei 15800 x g und 4°C zentrifugiert. Das im Überstand vorhandene Gesamtprotein wurde im Photometer quantifiziert (Kapitel 2.2.3.3).

2.2.3.2 Isolierung von Cytosol- und Kernprotein

Zur Isolierung von Cytosol- und Kernprotein wurden die kultivierten Zellen dreimal mit 10 ml 1x PBS gewaschen, der Überstand entfernt und das Zellsediment in 400 μ l Puffer I (Tabelle 5) resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 15 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 25 μ l 10% Nonidet P 40 zugegeben und für 5 min bei 5200 x g zentrifugiert. Der Überstand mit den cytosolischen Proteinen wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Konzentration im Photometer bestimmt (Kapitel 2.2.3.3). Das Zellsediment mit den Zellorganellen und Membranbestandteilen wurde viermal mit je 1 ml Puffer I (ohne PMSF) für 5 min bei 5200 x g zentrifugiert und die Überstände verworfen. Anschließend wurden 50 μ l Puffer II (Tabelle 5) zugegeben und die Probe über Nacht bei -80°C gelagert. Am nächsten Tag erfolgte eine 15-minütige Inkubation in einem Ultraschallbad bei 4°C, anschließend wurde für 30 min bei 4°C und 15800 x g zentrifugiert. Der Überstand mit den Kernproteinen wurde abgenommen und für eine Proteinbestimmung vorbereitet (Kapitel 2.2.3.3.).

2.2.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte nach Bradford (1976) in einem Spectrophotometer. Hierbei bindet der Farbstoff Coomassie Blau an die Argininreste von Proteinen, wodurch das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm verschoben wird. Für eine Messung wurde 1 μ l Probe mit 800 μ l Aqua bidest und 200 μ l Bradford Mix Roti® in einem 3,5 ml Glasröhrchen vermischt.

Die Absorption wurde gegen einen Leerwert bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Anhand einer zuvor erstellten Eichgeraden, welche mit 0 bis 0,25 mg/ml BSA erstellt wurde, konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden. Die in μ g / μ l angegebenen Proteinkonzentrationen wurden im Spaltpuffer (Tabelle 5) auf eine Konzentration von 50 μ g oder 100 μ g in einem Gesamtvolumen von 20 μ l, 25 μ l oder 30 μ l gebracht. Ein 1:1 Verhältnis von Protein zu Spaltpuffer sollte dabei eingehalten werden, um alle Proteine ausreichend zu denaturieren. War mehr Protein in einer Probe vorhanden, wurde durch Zugabe von Aqua bidest und damit einer Erhöhung des Gesamtvolumens entsprechend verdünnt. Das im Spaltpuffer erhaltene anionische Detergenz SDS denaturiert die Proteine, während das β -Mercaptoethanol Disulfidbrücken reversibel spaltet. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.3.4 Elektrophoretische Trennung der Proteine (SDS-PAGE)

Die SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) ist eine denaturierende Gelelektrophorese in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel, bei der Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die aufzutrennenden Proteine werden dabei zunächst in einem Sammelgel konzentriert und dann in einem Trenngel gemäß der Größe aufgetrennt. Die vollständige Entfaltung der Proteine erfolgt durch das im Spaltpuffer enthaltene SDS, welches die Proteine mit negativ geladenen (sich abstoßenden) Sulfatgruppen umhüllt. Die negative Nettoladung der Proteine ermöglicht somit eine Größen-Auftrennung der Polypeptidketten nach ihrem Molekulargewicht in Richtung Anode. Das Polyacrylamid-Gel wirkt dabei wie ein Sieb, wobei die Porenweite des Gels mit steigender Konzentration an Polyacrylamid sinkt. Mittels Markerproteinen kann über eine Eichgerade das Molekulargewicht eines Proteins bestimmt werden. Je nach Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins wurden 6%ige bis 10%ige Gele hergestellt (siehe Tabelle 20).

Zur Herstellung der Gele wurden die in Tabelle 20 aufgeführten Lösungen verwendet. Nach Zugabe von TEMED und APS wurde das Trenngel zügig aufgrund der beginnenden Polymerisation in die Gelelektrophorese-Kammer gegossen. Um eine gleichmäßige Polymerisation und eine exakte Grenzschicht zu gewährleisten, wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 60 min war die Polymerisation abgeschlossen. Nach Entfernung des Isopropanols wurde das mit TEMED und APS versetzte Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm mit 10 Taschen eingesetzt. Nachdem das Sammelgel auspolymerisiert war, konnten die Gele bis zum Gebrauch vor dem Austrocknen geschützt und bei 4°C für bis zu 5 Tage gelagert werden.

Tabelle 20: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele

| Reagenz | Trenngel 6% | Trenngel 7,5% | Trenngel 10% | Sammelgel |
|---------------------|----------------|---------------|--|-----------|
| Puffer C | 1,2 ml | 1,5 ml | 2 ml | 375 µl |
| Aqua bidest | 3,3 ml | 3 ml | 2,5 ml | 1,5 ml |
| Puffer A | 1,5 ml | 1,5 ml | 1,5 ml | - |
| Puffer B | - | - | - | 625 µl |
| TEMED | 3 µl | 3 µl | 3 µl | 2,5 µl |
| APS (1,5 g in 10ml) | 30 µl | 30 µl | 30 µl | 37,5 µl |
| | | | | |
| Protein | DDB1, XPF, XPG | XPB, XPC, XPD | Calcineurin, DDB2, β-Actin, RCC1, XPA | |

Die Proben (Kapitel 2.2.3.1 und 2.2.3.2) wurden erneut für 5 min bei 95°C erhitzt, kurz anzentrifugiert und in die Geltaschen aufgetragen. Zur Größenbestimmung der Proteinbanden wurden in eine Geltasche je 4 µl der beiden Proteinmarker (Tabelle 8) pipettiert. Die Elektrophoresekammer wurde mit Elektrophoresepuffer befüllt und die Elektrophorese bei 20 mA und 200 V pro Gel gestartet. Der Stromfluss wurde auf 30 mA pro Gel erhöht, wenn die Proteine in das Trenngel eingewandert sind. Die Elektrophorese wurde beendet, nachdem die Bromphenolblaufront den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte (nach 2 bis 3 Stunden).

2.2.3.5 Transfer von Proteinen auf Trägermembran

Nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgte in einer Blotkammer durch Anlegen einer Spannung der elektrophoretische Proteintransfer auf eine proteinbindende Nitrocellulosemembran (Towbin *et al.*, 1979). Hierbei wurde eine so genannte *semidry*-Apparatur verwendet, bei welcher das Gel und die Nitrocellulosemembran zwischen Transferpuffer getränkten Filterpapieren liegen. Es wurden Nitrocellulosemembranen mit einer Porengröße von 0,45 µm verwendet, welche zusammen mit sechs Filterpapieren für 15 bis 30 min in Transferpuffer inkubiert wurden, bevor der Zusammenbau in der Blotkammer erfolgte. Unmittelbar nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurde das Trenngel kurz in Transferpuffer getaucht. Die einzelnen Bestandteile wurden anschließend luftblasenfrei nach folgendem Schema aufeinander geschichtet und in eine Blotkammer mit einer Edelstahlkathode und einer Glas/Graphitanode gelegt: auf den Boden der Blotkammer (Anode) wurden drei getränkte Whatmann-Filterpapiere luftblasenfrei gelegt. Darauf wurde erst die Nitrocellulosemembran, dann das Gel platziert. Schließlich wurden drei weitere getränkte Whatmann-Filterpapiere auf das Gel gelegt. Der Deckel (Kathode) wurde aufgesetzt und die Apparatur angeschlossen. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 100 mA für 45 min.

2.2.3.6 Kontrolle der geblotteten Proteine

Die Effizienz der Proteinübertragung auf die Nitrocellulosemembran wurde durch Färbung der Proteine mit Ponceau S überprüft (Salinovich *et al.*, 1986). Hierzu wurde die Nitrocellulosemembran für 10 sec in Ponceau S-Lösung geschwenkt und danach die Hintergrundfärbung durch Leitungswasser entfernt. Die gefärbten Proteinbanden konnten durch mehrmaliges Waschen in Leitungswasser wieder entfärbt werden. Das Polyacrylamid-Gel wurde zur Kontrolle des Transfers für 10 min in einer Coomassie

Proteinfärbelösung (Tabelle 5) gefärbt. Mittels einer Coomassie Entfärbelösung (Tabelle 5) und eines Aktivkohle-Beutels wurde das Gel anschließend über mehrere Stunden entfärbt. Der Farbstoff bleibt als blauer Komplex unspezifisch an den Proteinen gebunden. War der Blotvorgang erfolgreich, waren auf dem Gel nur noch schwache Proteinbanden zu sehen.

2.2.3.7 Immunchemischer Protein-Nachweis

Der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran und die anschließende immunologische Analyse der Proteine mittels spezifischen Antikörpern wird Western Blot Analyse genannt. Um eine unspezifische Bindung des primären Antikörpers an die Nitrocellulosemembran zu verhindern, müssen freie Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran vor Antikörperbehandlung blockiert werden. Dieses wurde durch Vorbehandlung mit Blocklösung (Tabelle 5) erreicht. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran für 30 min in 5 ml Blocklösung bei leichtem Schwenken inkubiert. Danach wurde dreimal für 5 min mit je 5 ml Aqua bidest gespült und die Nitrocellulosemembran mit dem primären Antikörper (Tabelle 9) über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Die optimale Verdünnung der primären Antikörper richtete sich nach deren Sensitivität und wurde im Verhältnis zur eingesetzten Proteinmenge zuvor spezifisch ausgetestet.

Am folgenden Tag wurde zur Entfernung von überschüssigem ungebundenem Antikörper die Nitrocellulosemembran viermal für 5 min in einer Waschlösung (Tabelle 5) gewaschen. Anschließend folgte eine Inkubation für 60 min bei RT in 5 ml des sekundären alkalische-Phosphatase-gekoppelten Antikörpers (Tabelle 9) Nach vier weiteren Waschschritten wurde die Nitrocellulosemembran mit Aqua bidest gespült und für die Detektion der Immunkomplexe entweder für 5 min in 625 µl ECL-Lösung inkubiert oder für 10 bis 20 min in 5 ml Chromagen-Lösung geschwenkt. Beide Reagenzien wurden dem Kit WesternBreeze® Chemiluminescent bzw Chromogenic Western Blot Immunodetection System (Invitrogen) entnommen. Das in der Chromagen-Lösung enthaltene Substrat BCIP wird durch die Aktivität der alkalischen Phosphatase erst in ein Indoxyl und dann zu blauem Indigo überführt. Dieses reduziert das zur Farbverstärkung eingesetzte NBT zum purpurnen Diformazan. Diese Reaktion wurde durch Schwenken in Aqua bidest gestoppt. Das in der ECL-Lösung enthaltene Substrat CDP-Star® reagiert nach Abspaltung eines Phosphatrestes durch die alkalische Phosphatase zu einem angeregten, instabilen Zustand, aus dem es unter Emission von Chemolumineszenz zerfällt. Durch Exposition von ECL-Filmen in einer

Autoradiographie-Filmkassette kann diese detektiert werden. Die Expositionszeiten der einzelnen Antikörper variierten dabei zwischen 5 sec und 30 min. Die Filmentwicklung erfolgte mit der Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine SRX 101A. Ein Teil der Antikörper konnte während der Doktorarbeit mit der Geldokumentationsanlage LAS 4000 immunchemisch nachgewiesen werden. Dabei wurde die Chemolumineszenz mit einer CCD Kamera festgehalten und das entstehende Bild digital gespeichert.

Die Dokumentation und Quantifizierung der Immunreaktion erfolgte mittels der digitalen Geldokumentationsanlage LAS 4000 (Tabelle 2) und der mitgelieferten Multi Gauge Software (Tabelle 14) wobei die Quantifizierung der Signale immer unter Abziehen eines manuell festgelegten Hintergrundes erfolgte. Alle Signale wurden mit den Signalen der jeweiligen Ladekontrollen (β -Actin für Cytosol, RCC1 für Kern) verrechnet, um kleine Unterschiede in der aufgetragenen Proteinmenge auszugleichen.

2.2.3.8 Reprobing von Nitrocellulosemembranen

Die Nitrocellulosemembran kann bis zum nächsten immunologischen Protein-Nachweis in Klarsichtfolie eingewickelt bei -20°C gelagert werden. Für die Detektion weiterer Proteine auf einer bereits entwickelten Nitrocellulosemembran müssen primärer und sekundärer Antikörper entfernt werden um die gleichen Signale nicht erneut zu detektieren. Dieser Vorgang wird als *Stripping* bezeichnet. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran in *Stripping*-Puffer (Tabelle 5) für 30 min bei 50°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Die im Puffer enthaltenden Detergenzien wurden durch gründliches Waschen mit 1x PBS wieder entfernt. Die Waschschritte wurden bis zur Geruchsfreiheit der Nitrocellulosemembran wiederholt. Danach erfolgte das *Reprobing*: durch Inkubation für 30 min in 5 ml Blocklösung wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran blockiert und es konnte wiederholt mit primärem Antikörper inkubiert werden (Kapitel. 2.2.3.7).

3. ERGEBNISSE

3.1 Wirkung von Cyclosporin A und Everolimus auf die Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden

Der Einfluss von Cyclosporin A und Everolimus auf eine „UV-Response“ wurde an ausgewählten menschlichen Zelllinien, den immortalisierten SV40 transformierten GM00637 Fibroblastenzellen und den EBV-transformierten AG10107 Lymphoblastenzellen durchgeführt. Diese normalen menschlichen Zellarten repräsentieren zwei wichtige Gewebekompartimente (Haut und Blut) des menschlichen Organismus und werden in der molekularen Diagnostik von Xeroderma Pigmentosum Patienten verwendet. Der Einfluss von Cyclosporin A und Everolimus auf die Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden wurde anhand drei verschiedener Testverfahren untersucht. Der Zellüberlebensstest nach UV-Bestrahlung misst auf einfache Weise die Fähigkeit von Fibroblasten und Lymphoblasten, mit UV-Schäden ganz allgemein zurechtzukommen. Dieser Test spiegelt ungefähr die klinischen Symptome einer Sonnen-Sensitivität wider. Der Wirts-Zell-Reaktivierungsassay (*host cell reactivation*, HCR) ist ein sensibler und spezifischer Test für die quantitative Messung der funktionellen Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) anhand der Fähigkeit von Wirtszellen, UV-geschädigte Plasmid-DNA zu reparieren. Um die Reparaturkinetik von UV-induzierten Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) und Pyrimidin-6,4-Pyrimidon Photoprodukten (6-4PP) messen zu können, wurde ein ELISA mit speziellen monoklonalen Antikörpern gegen diese UV-Schäden etabliert (Mori *et al.*, 1991). Die GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten wurden 24 h vor Versuchsbeginn in Kulturmedium mit oder ohne Immunsuppressiva inkubiert.

3.1.1 Einfluss von Cyclosporin A und Everolimus auf das Zell-Überleben nach UV-Bestrahlung

3.1.1.1 UV-Titrationskurvenbestimmung für beide Zelllinien

Das zelluläre Überleben nach UV-Bestrahlung spiegelt die Fähigkeit einer Zelle wider, mit UV-induzierten DNA-Schäden umzugehen. Normale immortalisierte SV40-transformierte GM00637 Fibroblastenzelllinien und EBV-transformierte AG10107 Lymphoblastenzelllinien wurden mit verschiedenen Dosen (0 J/m² bis 70 J/m²) UVC-Strahlung bestrahlt und nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen ihr zelluläres Überleben bestimmt. Während der zweitägigen Inkubationszeit wurden die durch UVC-Strahlung entstandenen DNA-Schäden durch NER eliminiert oder durch Transläsionale

Synthese (TLS) über sie hinweg gelesen. Mittels des UV-Überlebenstests sollte die Wirkung der Immunsuppressiva Cyclosporin A oder Everolimus auf das Zellüberleben untersucht und es sollte analysiert werden, ob sich das Zellüberleben nach Bestrahlung und nach Zugabe von Cyclosporin A oder Everolimus ändert.

Um das zelluläre Überleben der Zelllinien besser vergleichen zu können, wird häufig die D_{50} angegeben, welche die Dosis darstellt, bei der 50% der Zellen überleben. Die folgende Abbildung 10 zeigt die UV-Dosis-Response-Kurve von GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten. Als Kontrollzelllinie diente die XPA-defiziente Zelllinie XP2OS, welche einen Defekt im XPA-Gen aufweist.

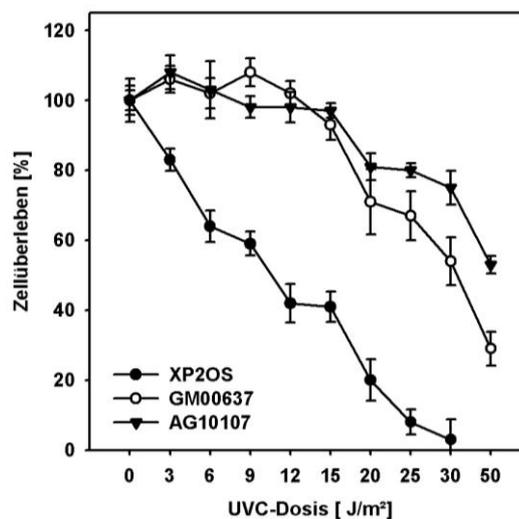


Abbildung 10: UV-Dosis-Response-Kurve von GM00637 Fibroblasten, AG10107 Lymphoblasten und der XPA-defizienten Zelllinie XP2OS.

Abbildung 10 stellt das unterschiedliche Zellüberleben der normalen GM00637 Fibroblastenzelllinie und der normalen AG10107 Lymphoblastenzelllinie im Vergleich zur XPA-defizienten Fibroblastenzelllinie XP2OS dar. Die D_{50} für GM00637 Fibroblasten betrug 30 J/m^2 , die für AG10107 Lymphoblasten 50 J/m^2 . Bei der Zelllinie XP2OS lag die D_{50} bei ca. 10 J/m^2 . Im Gegensatz zu der normalen GM00637 Fibroblastenzelllinie und der normalen AG10107 Lymphoblastenzelllinie ist bei der XPA-defizienten Fibroblastenzelllinie XP2OS die NER defekt und die Zellen können die UV-induzierten DNA-Schäden nicht reparieren (Satokata *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1990; Kobayashi *et al.*, 1998; Asahina *et al.*, 1999; Mellon *et al.*, 2002). Dass bei dieser XPA-defizienten Zelllinie mit steigender UVC-Dosis ein geringes Überleben gemessen werden konnte, liegt daran, dass außer NER noch andere Prozesse als UV-Schadensantwort aktiv sind, wie zum Beispiel TLS (Nakajima *et al.*, 2004).

3.1.1.2 Cyclosporin A-Titrationskurvenbestimmung für beide Zelllinien

Versetzte man das Kulturmedium von GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten mit Cyclosporin A oder Everolimus, ließen sich nach zwei Tagen dosisabhängige toxische Effekte in beiden Zelllinien beobachten (Abbildungen 11). Im Vergleich zu unbehandelten Zellen sank das zelluläre Überleben bei GM00637 Fibroblasten ab einer Cyclosporin A-Dosis von 0,5 μM auf 83% und verringerte sich weiter auf 28% bei einer Konzentration von 2 μM (Abbildung 11a). Demgegenüber nahm das Zellüberleben bei AG10107 Lymphoblasten bei einer Konzentration von 0,5 μM Cyclosporin A auf 79% ab und verringerte sich weiter auf 54% bei einer Konzentration von 2 μM (11b). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass Cyclosporin A mit steigender Konzentration auf beide Zelllinien toxisch wirkt.

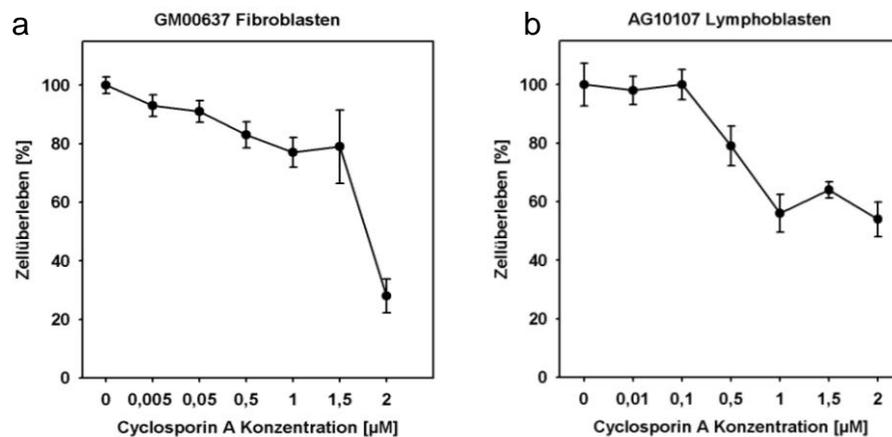


Abbildung 11: Cyclosporin A-Dosis-Response-Kurve von GM00637 Fibroblasten (a) und AG10107 Lymphoblasten (b). Die Mittelwerte \pm SEM sind für jede Konzentrationen angegeben. Insgesamt sind $n = 9$ unabhängige Experimente (in achtfachen Ansätzen) durchgeführt worden.

In dieser Arbeit wurde der Konzentrationsbereich ab 0,5 μM Cyclosporin A als toxischer Bereich für das Zellüberleben von GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten definiert. Um möglichst nah an klinisch relevanten Konzentrationen im Serumspiegel von Organtransplantierten zu sein, wurde für Untersuchungen des zellulären Überlebens nach UV-Bestrahlung ein Konzentrationsbereich gewählt, welcher nahe dem therapeutischen Bereich liegt. Für Organtransplantierte der Universitätsklinik Göttingen liegen die Cyclosporin A-Serumspiegelwerte bei 100 bis 300 $\mu\text{g/l}$ (entspricht 0,08 μM bis 0,25 μM) (www.clinchem.med.uni-goettingen.de). Ein Vergleich des Zellüberlebens von GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten (Abbildung 11) zeigte, dass die gewählten Konzentrationen (0,005 bis 2 μM) sowohl in einem toxischen als auch einem nicht-toxischen Bereich lagen.

3.1.1.3 Everolimus-Titrationskurvenbestimmung für beide Zelllinien

Die Dosis-Response-Kurven von Everolimus-behandelten GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten sind in Abbildung 12 ersichtlich. Bei GM00637 Fibroblasten verringerte sich das zelluläre Überleben bei einer Kultivierung mit 5 nM Everolimus auf 86% und sank weiter auf 60% bei 1 μ M (12a). AG10107 Lymphoblasten zeigten bei 5 nM ein Zellüberleben von 77%, welches mit steigender Everolimus-Konzentration (bis 100 nM) nicht weiter abnahm (12b).

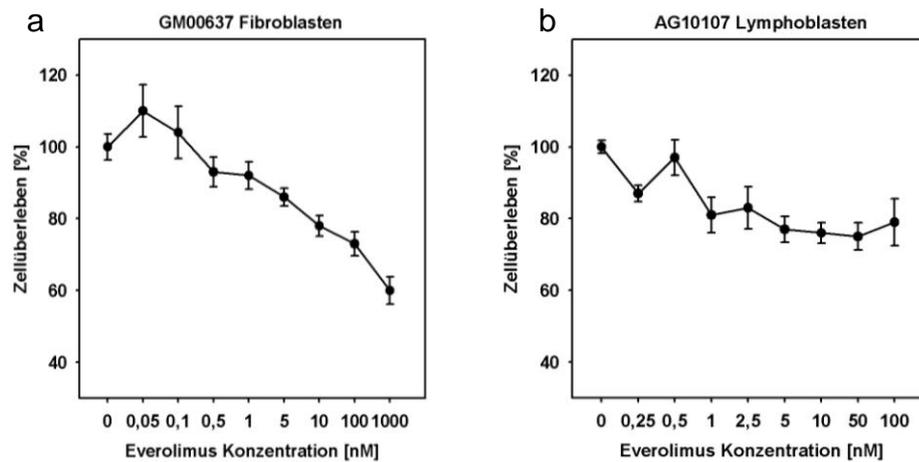


Abbildung 12: Everolimus-Dosis-Response-Kurve von GM00637 Fibroblasten (a) und AG10107 Lymphoblasten (b). Die Mittelwerte \pm SEM sind für jede Konzentration angegeben. Insgesamt sind $n = 10$ unabhängige Experimente (in achtfachen Ansätzen) durchgeführt worden.

Die Serumkonzentrationen von Everolimus in Organtransplantierten liegen bei 3 bis 8 μ g/l (www.clinchem.med.uni-goettingen.de) und entsprechen einer Konzentration von 3,1 nM bis 8,3 nM. Als toxischer Konzentrationsbereich wurde die Konzentration von 5 nM Everolimus definiert. Die gewählten Konzentrationen des Zellüberlebensstests lagen somit im klinisch-relevanten Bereich und zeigten bei GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten eine toxische Wirkung. Da in beiden Zelllinien allerdings auch bei viel höheren Konzentrationen (bis 1 μ M Everolimus) ein Zellüberleben von 60% beobachtet worden ist (Abbildung 12), wurden hohe Konzentrationen ebenfalls für eine mögliche Wirkung auf das Zellüberleben nach UV-Bestrahlung gewählt.

3.1.1.4 Bestimmung des dosisabhängigen Einflusses von Cyclosporin A und Everolimus auf das Zellüberleben nach UV-Bestrahlung

Nachdem die relevanten UVC-Dosen und die Konzentrationen für Cyclosporin A und Everolimus bestimmt wurden, war das nächste Ziel, den Einfluss beider Immunsuppressiva auf das Zellüberleben nach UV-Bestrahlung zu untersuchen. Dazu wurden GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten mit ihrer jeweiligen D_{50} UVC-Dosis (30 J/m^2 für GM00637 Fibroblasten und 50 J/m^2 für AG10107 Lymphoblasten) bestrahlt und mit verschiedenen Konzentrationen an Cyclosporin A oder Everolimus für zwei Tage inkubiert. Das Zellüberleben nach UV-Bestrahlung wurde definiert als die Ratio des Zellüberlebens von bestrahlten Zellen mit bzw. ohne Immunsuppressiva relativ zum Zellüberleben von unbestrahlten Zellen mit oder ohne Immunsuppressiva. Bei diesem „relativen“ Zellüberleben ließen sich evtl. toxische Effekte von Cyclosporin A oder Everolimus eliminieren.

In Abbildung 13 ist das relative Zellüberleben von GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten unter Cyclosporin A- bzw. Everolimus-Behandlung dargestellt. Es ist zu erkennen, dass mit steigenden Cyclosporin A-Konzentrationen das relative Zellüberleben in beiden Zelllinien stark abnahm. In GM00637 Fibroblasten sank das relative Zellüberleben bereits ab einer Cyclosporin A-Konzentration von $0,005 \mu\text{M}$ auf 78% und erreichte bei einer Konzentration von $1,5 \mu\text{M}$ einen Wert von 42% (Abbildung 13a). Ähnliche Beobachtungen waren in AG10107 Lymphoblasten zu erkennen: das relative Zellüberleben verringerte sich bei einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ Cyclosporin A auf 76% und zeigte bei einer Konzentration von $1,5 \mu\text{M}$ einen Wert von nur noch 32% (Abbildung 13b).

Im Gegensatz zu Cyclosporin A wurde das relative Zellüberleben in GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten durch Everolimus-Behandlung nicht moduliert (Abbildung 13c und d). Obwohl die Everolimus-Konzentrationen vor allem in unbestrahlten GM00637 Fibroblasten eine toxische Wirkung verursachten (Abbildung 12), eliminierte sich dieser Effekt durch einen Vergleich mit bestrahlten Zellen und es zeigte sich kein Einfluss von Everolimus, auch bei sehr hohen Konzentrationen (bis zu $1 \mu\text{M}$) auf das relative Zellüberleben.

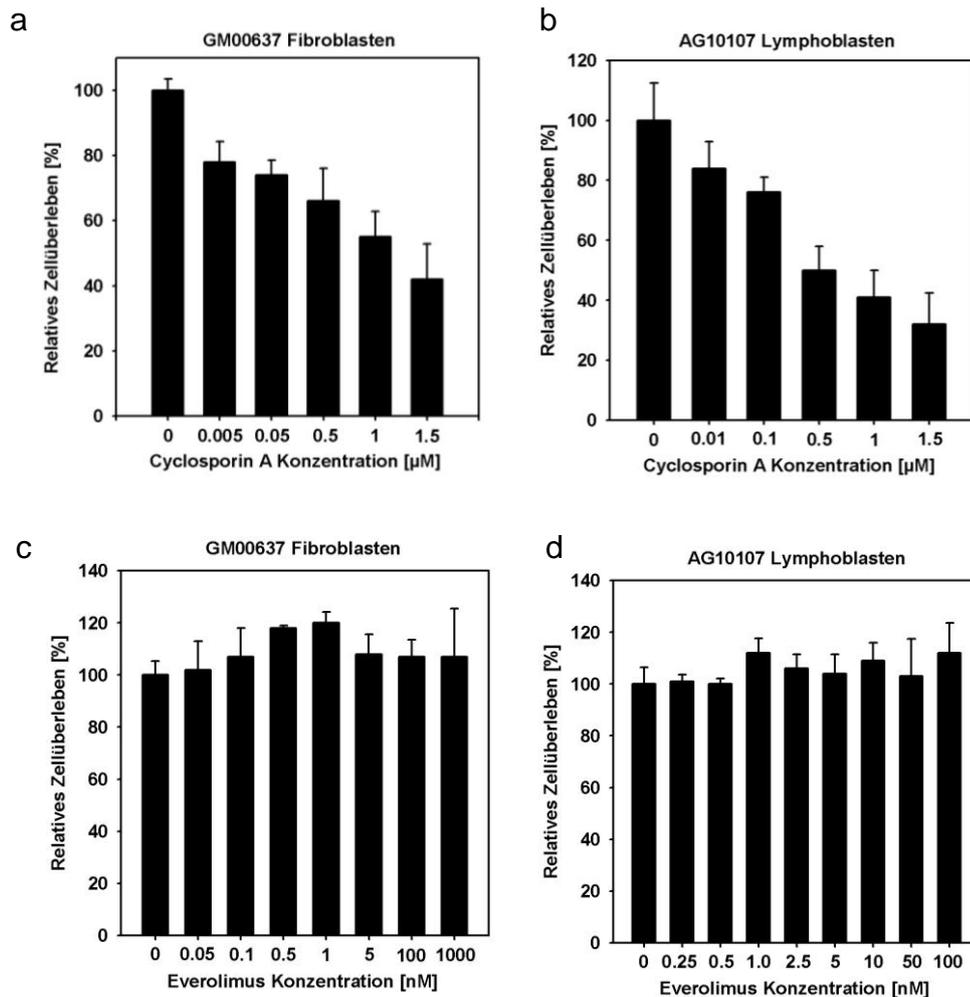


Abbildung 13: Relatives Zellüberleben von GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten mit steigenden Konzentrationen an Cyclosporin A (a, b) und steigenden Konzentrationen an Everolimus (c, d). Die Mittelwerte \pm SEM sind für jede Konzentration angeben. Insgesamt sind $n = 7$ unabhängige Experimente (achtfach) durchgeführt worden.

3.1.2 Einfluss von Cyclosporin A und Everolimus auf die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)

Der Wirts-Zell-Reaktivierungsassay (*host cell reactivation*, HCR) misst die Nukleotid-Exzisions-Reparatur-Fähigkeit von Wirtszellen anhand der Enzymaktivität der auf einem Expressionsplasmid kodierten Luciferase (pcmvLUC) (Carreau *et al.*, 1995; Qiao *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2003; Thoms *et al.*, 2007a). Das nichtreplizierende Plasmid pcmvLUC wurde mit 1000 J/m^2 UVC-Strahlung bestrahlt, um Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und Pyrimidin-6,4-Pyrimidon Photoprodukte (6-4PP) zu generieren. Diese UV-Dosis generiert CPD und 6-4PP in einer Ratio von 3:1. Es ist bekannt, dass 56 J/m^2 UVC-Strahlung 1 CPD alle 900 bp generiert (Protic-Sabljić *et al.*, 1985). Dies entspräche für das Luciferasegen in pcmvLUC (1656 bp) ca. 32 CPD. Nach

Transfektion in GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten sollen die UV-induzierten DNA-Schäden von der Wirtszelle durch NER repariert werden. Verbleibt nur ein unrepariertes Photoprodukt auf der DNA, kann die Luciferase nicht exprimiert werden (Wei *et al.*, 2003). Die Expression des Luciferasegens spiegelt daher die NER-Kapazität der Wirtszellen wider. Diese Reparaturkapazität errechnet sich aus der Luciferaseaktivität des UV-bestrahlten Plasmides im Vergleich zur Luciferaseaktivität des nicht bestrahlten Plasmides. Die Aktivität der Firefly Luciferase wurde gegen die Aktivität der Renilla Luciferase eines zweiten Expressionsplasmides (pRL-CMV) normalisiert, um die Transfektionseffizienz, Zellproliferation, oder Toxizität zu eliminieren. Dieses Plasmid wurde in allen Ansätzen kotransfiziert. Die Lichteinheiten werden in RLU angegeben.

Die Reparaturkapazität bei normalen Fibroblasten und Lymphoblasten liegt bei einem 1000 J/m² UVC-bestrahltem Plasmid zwischen 20% und 50%, was bedeutet, dass 20% bis 50% aller Plasmide vollständig von den Wirtszellen repariert worden sind (Emmert *et al.*, 2002). Andere Arbeitsgruppen errechneten bei normalen Zellen NER-Kapazitäten von 13% bis 20% (Parris *et al.*, 1992; Moriwaki *et al.*, 1994; Otto *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2003). In NER-defizienten Zellen wird ein UVC-bestrahltes Plasmid viel weniger bis gar nicht exprimiert (Emmert *et al.*, 2002). Um signifikant unterschiedliche Reparturniveaus zwischen normalen und defizienten Zellen messen zu können, wird die NER von sehr stark bestrahlten Plasmiden gemessen (1000 J/m² UVC).

3.1.2.1 Cyclosporin A-Einfluss auf die NER

GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten wurden nach Transfektion mit verschiedenen Konzentrationen an Cyclosporin A für 48 h inkubiert und anschließend die Aktivität der Firefly- und Renilla-Luciferase gemessen. In Abbildung 14 sind die auf Renilla normalisierten Lichteinheiten der Firefly Luciferase des unbestrahlten und 1000 J/m² UVC- bestrahlten pcmvLUC gegen steigende Cyclosporin A-Konzentrationen aufgetragen. Diese Lichteinheiten spiegelten die Luciferaseaktivität wider. Bei GM00637 Fibroblasten nahmen die Lichteinheiten beim unbestrahlten Plasmid mit steigenden Cyclosporin A-Konzentrationen nicht ab (Abbildung 14a). Im Gegensatz dazu sanken die Lichteinheiten des bestrahlten Plasmides in Anwesenheit von Cyclosporin A dosisabhängig. Bei einer Konzentration von 0,2 µM waren nur noch 66% RLU detektierbar. Ähnliches konnte bei AG10107 Lymphoblasten beobachtet werden (Abbildung 14c). Cyclosporin A führte zwar zu einer leicht verminderten

Luciferaseaktivität des unbestrahlten Plasmides, die Luciferaseaktivität des bestrahlten Plasmides war allerdings deutlich reduziert. Die Lichteinheiten des bestrahlten Plasmides zeigten bei einer Cyclosporin A-Konzentration von 0,25 μM nur 74,1% im Vergleich zu unbestrahltem Plasmid (95,7%)

Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur der GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten errechnete sich aus der Ratio der auf Renilla normalisierten Luciferaseaktivität des bestrahlten versus unbestrahlten Plasmides. Unbehandelte GM00637 Fibroblasten zeigten eine relative NER von 13% (Abbildung 14b). Diese Reparaturkapazität sank mit steigender Konzentration an Cyclosporin A deutlich auf nur 3% bei 0,2 μM . Die relative NER in unbehandelten AG10107 Lymphoblasten betrug 15,5% (Abbildung 14d). Cyclosporin A führte ebenfalls zu einer erheblichen Abnahme der NER bis auf 7,9% in 0,35 μM Cyclosporin A-behandelten Lymphoblasten. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass in zwei verschiedenen Zellsystemen, GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten, die Cyclosporin A-Behandlung zu einer verminderten Nukleotid-Exzisions-Reparatur führte.

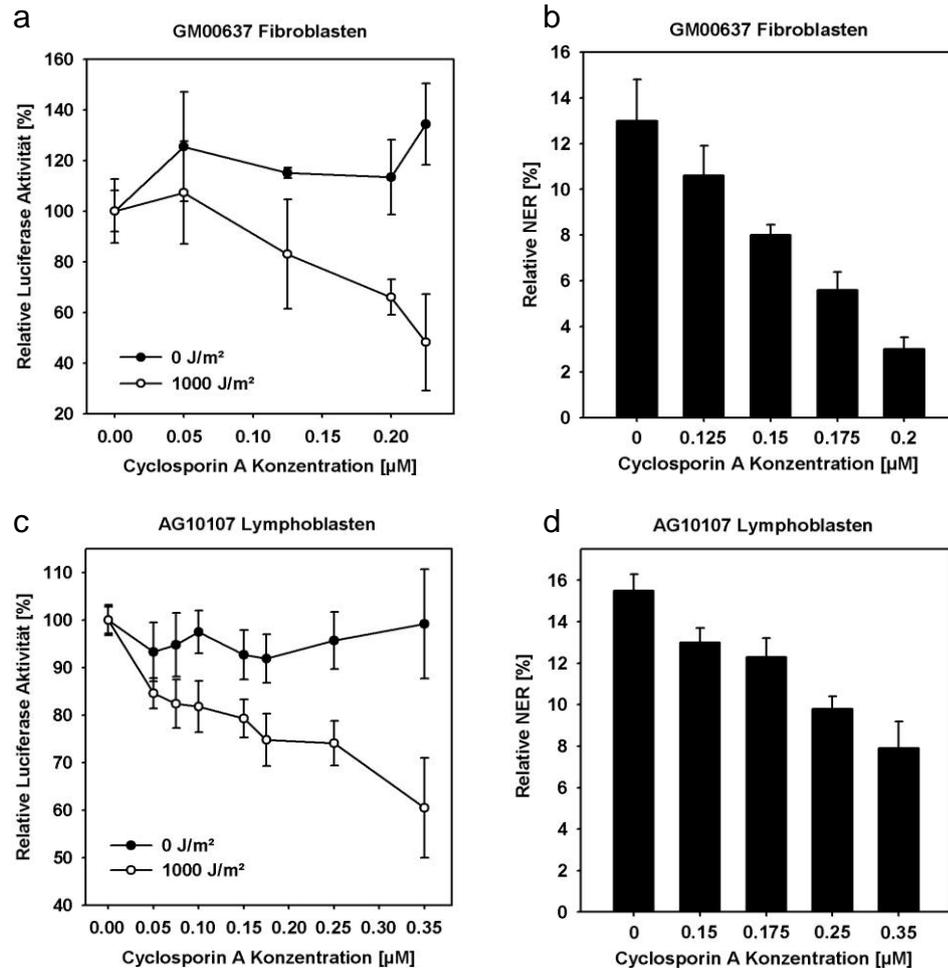


Abbildung 14: Wirkung von Cyclosporin A auf die Luciferaseaktivität nach Transfektion eines mit 0 J/m² oder 1000 J/m² bestrahlten pcmvLUC in GM00736 Fibroblasten (a) und AG10107 Lymphoblasten (c), sowie auf die relative Nukleotid-Exzisions-Reparatur in beiden Zelllinien (b, d). Die Mittelwerte \pm SEM sind für jede Konzentration angegeben. Insgesamt sind $n = 5$ unabhängige Experimente (in Triplikaten) durchgeführt worden.

3.1.2.2 Everolimus-Einfluss auf die NER

In gleicher Weise wurden GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten nach Transfektion mit verschiedenen Konzentrationen an Everolimus für 48 h inkubiert und anschließend die Aktivität der Firefly- und Renilla-Luciferase gemessen. Im Gegensatz zur Inkubation mit Cyclosporin A (Abbildung 14) wurde bei GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten bei einer Inkubation mit Everolimus keine Veränderung ihrer NER-Kapazität beobachtet. Die Abbildung 15 veranschaulicht, dass steigende Konzentrationen von Everolimus die Luciferase-Aktivitäten sowohl des unbestrahlten, als auch des bestrahlten Plasmides verminderten. Bei GM00637 Fibroblasten nahmen die Lichteinheiten beider Plasmide erst bei einer Konzentration oberhalb 10 μM Everolimus ab (Abbildung 15a), während die Lichteinheiten beider Plasmide von AG10107 Lymphoblasten bereits bei einer Konzentration von 1 nM deutlich reduziert

waren (80% im Vergleich zu unbehandelten Zellen, Abbildung 15c). Die relative Reparaturkapazität, die sich aus der Luciferaseaktivität von bestrahltem zu unbestrahltem Plasmid errechnete, war bei GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten mit steigenden Konzentrationen an Everolimus allerdings unverändert (Abbildung 15b und d). Dies verdeutlicht, dass Everolimus die Nukleotid-Exzisions-Reparatur in GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten nicht beeinflusst hat.

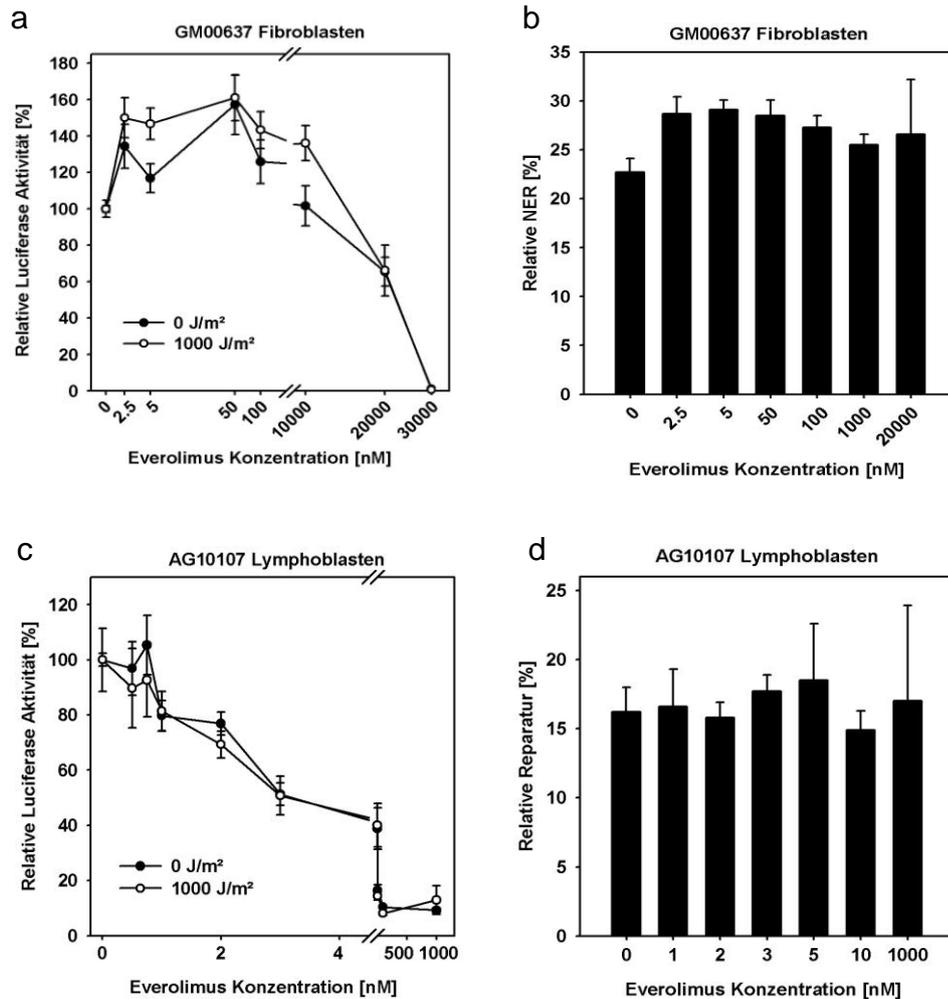


Abbildung 15: Wirkung von Everolimus auf die Luciferaseaktivität nach Transfektion eines mit 0 J/m² oder 1000 J/m² bestrahlten pcmvLUC in GM00736 Fibroblasten (a) und AG10107 Lymphoblasten (c), sowie auf die relative Nukleotid-Exzisions-Reparatur in beiden Zelllinien (b, d). Die Mittelwerte \pm SEM sind für jede Konzentration angegeben. Insgesamt sind n = 4 unabhängige Experimente (in Triplikaten) durchgeführt worden

3.1.3 Einfluss von Cyclosporin A und Everolimus auf die Reparaturkinetik von UV-induzierten Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren und Pyrimidin-6,4-Pyrimidon Photoprodukten

Der Einfluss von Cyclosporin A und Everolimus auf die Nukleotid-Exzisions-Reparatur wurde anhand der Reparaturkinetik von UV-induzierten DNA-Photoprodukten, den Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) und Pyrimidin-6,4-Pyrimidon Photoprodukten (6-4PP), mittels ELISA spezifisch analysiert. Die Elimination dieser Photoprodukte (Kapitel. 2.2.2.10) wird anhand photoprodukt-spezifischer monoklonaler Antikörper gegen CPD und 6-4PP detektiert (Mori *et al.*, 1991). Enzymmarkierte tertiäre Antikörper lösen über ihr Enzym eine Farbreaktion aus, die photometrisch gemessen wird. Die Absorptionswerte repräsentieren die Anzahl an nicht-reparierten Photoprodukten nach bestimmten Zeitintervallen.

GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten wurden in Kulturmedium mit oder ohne Immunsuppressiva 24 h vorinkubiert, anschließend mit UVC-Strahlung entsprechend ihrer D_{50} bestrahlt und entweder ihre DNA sofort oder nach 6 h oder 24 h Inkubationszeit (in Kulturmedium mit oder ohne Immunsuppressiva) isoliert. Die Reparaturkinetik der Photoprodukte errechnete sich aus der Ratio der Absorption von DNA, welche nach 6 h oder 24 h repariert wurde relativ zur DNA, welche unmittelbar nach UVC-Bestrahlung isoliert wurde.

3.1.3.1 Einfluss auf Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD)

Unbehandelte GM00637 Fibroblasten enthielten 6 h nach UVC-Bestrahlung 79% CPD (Abbildung 16a). Nach 24 h haben GM00637 Fibroblasten 36% der CPD repariert, somit waren noch 64% an CPD detektierbar. Eine vergleichbare Reparaturkinetik von CPD ist bei AG1010 Lymphoblasten beobachtet worden (Abbildung 16b). Auch in anderen Arbeitsgruppen zeigten Fibroblasten bzw. Keratinozyten ähnliche Reparaturkinetiken (Emmert *et al.*, 2000; Canning *et al.*, 2006). GM00637 Fibroblasten, welche mit 5 nM bzw. 100 nM Everolimus kultiviert worden sind, ließen ebenfalls keine Veränderung der CPD-Reparatur erkennen. Hier wurden nach 6 h noch 71% (5 nM) bzw. 58% (100 nM) an CPD detektiert und nach 24 h ist die Anzahl noch vorhandener CPD nur leicht auf 63% (5 nM) bzw. 59% (100 nM) zurückgegangen. Im Gegensatz zur unveränderten Reparaturkinetik von Everolimus-behandelten GM00637 Fibroblasten resultierte eine Kultivierung in 0,1 μ M Cyclosporin A in eine nahezu komplette

Inhibierung der Reparatur von CPD. Nach 6 h und 24 h waren in GM00637 Fibroblasten noch 98 bis 96% CPD detektierbar.

Die Reparaturkinetik von AG10107 Lymphoblasten ähnelte den GM00637 Fibroblasten (Abbildung 16b). Die in 5 nM und 50 nM Everolimus-kultivierten AG10107 Lymphoblasten enthielten nach 24 h noch 59% und 58% CPD. Die Kultivierung mit Cyclosporin A (0,5 μ M) führte hier ebenso zu einer nahezu vollständigen Blockierung der Reparatur von CPD, nur ungefähr 4% der CPD wurden repariert.

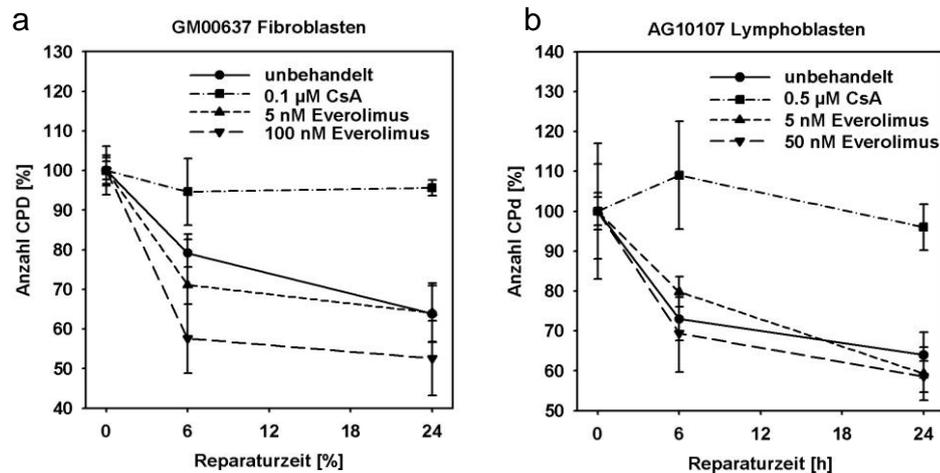


Abbildung 16: Reparaturkinetik von UV-induzierten CPD in Cyclosporin A- und Everolimus-kultivierten GM00637 Fibroblasten (a) und AG10107 Lymphoblasten (b). Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert \pm SEM von n=4 unabhängigen Experimenten (in Triplikaten).

3.1.3.2 Einfluss auf Pyrimidin-6,4-Pyrimidon Photoprodukte (6-4PP)

Des Weiteren wurde die Reparaturkinetik von Pyrimidin-6,4-Pyrimidon Photoprodukten in unbehandelten und mit Cyclosporin A oder Everolimus kultivierten GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten untersucht. UVC-Bestrahlung generiert 6-4PP zu einem Drittel im Verhältnis zu CPD (Sinha *et al.*, 2002). In Abbildung 17 ist zu erkennen, dass nach 24 h in unbehandelten sowie in Everolimus-kultivierten GM00637 Fibroblasten noch 59% bzw. 51% an 6-4PP detektiert wurden und unbehandelte AG10107 Lymphoblasten 50% 6-4PP aufwiesen, sowie 53% 6-4PP in 100 nM Everolimus-behandelten AG10107 Lymphoblasten detektiert wurden. Wie erwartet, hatte Everolimus keinen Effekt auf die Elimination von 6-4PP in beiden Zelllinien. Demgegenüber führte die Kultivierung mit Cyclosporin A in GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten zu einer kompletten Inhibierung der Reparatur von 6-4PP sowohl nach 6 h als auch nach 24 h in beiden Zelllinien (Abbildung 17).

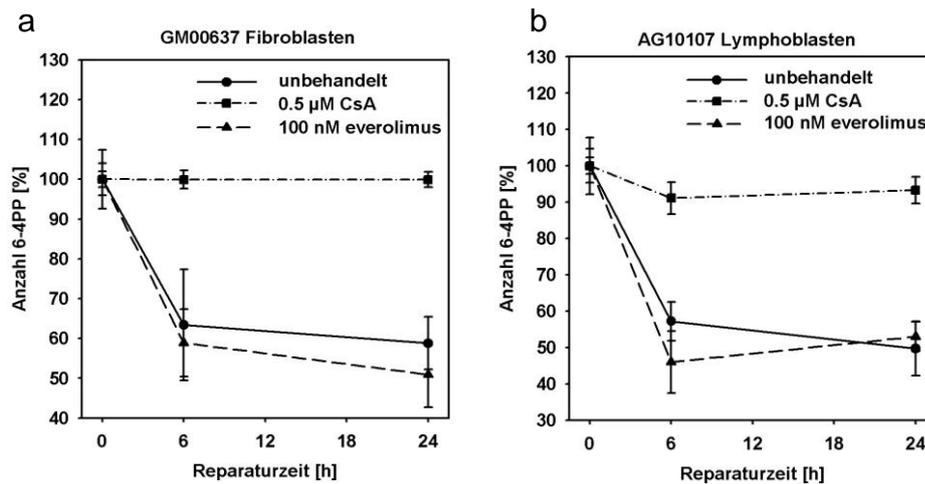


Abbildung 17: Reparaturkinetik von UV-induzierten 6-4PP in Cyclosporin A- und Everolimus-kultivierten GM00637 Fibroblasten (a) und AG10107 Lymphoblasten (b). Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert \pm SEM von n=4 unabhängigen Experimenten (in Triplikaten).

3.2 Wirkung von Cyclosporin A auf die XP-Gene und XP-Proteine

Die molekularen Zusammenhänge der Cyclosporin A-induzierten Inhibierung der NER sind bisher weitgehend unbekannt. Da Organtransplantierte unter einer Cyclosporin A-Therapie ein stark erhöhtes Hautkrebsrisiko ähnlich wie Xeroderma Pigmentosum-Patienten besitzen, könnte der Cyclosporin A-Effekt auf die NER durch eine mögliche Modulation der für die NER relevanten XP-Gene erfolgen. Der Einfluss von Cyclosporin A auf die quantitative Expression der XP-Gene wurde auf mRNA- und Protein-Ebene untersucht. Dabei wurden alle 7 XP-Gene, *XPA* bis *XPG*, in GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten, die in Cyclosporin A-versetztem Medium kultiviert wurden, mittels quantitativer *realtime*-PCR (qRT-PCR; Kapitel 2.2.2.9) und Western Blot (Kapitel 2.2.3.7) analysiert.

3.2.1 Expression der XP-mRNA in Cyclosporin A-behandelten Fibroblasten

Für eine Analyse der XP-mRNA von Cyclosporin A behandelten GM00637 Fibroblasten wurden die Zellen in 0 µM, 0,1 µM und 0,5 µM Cyclosporin A-versetztem Kulturmedium für 1, 3, 6 und 24 h kultiviert, anschließend die mRNA isoliert (Kapitel 2.2.2.2) und daraus die cDNA synthetisiert (Kapitel 2.2.2.7) Die Expression der XP-

Gene wurde in allen Proben bestimmt und gegen die GAPDH-Expression normalisiert. Die Transkriptmenge in unbehandelten GM00637 Fibroblasten wurde als 100% definiert. Nach 24 h wurde eine signifikant verringerte mRNA-Menge von *XPB*, *XPC*, *XPD* und *XPG* detektiert ($p < 0,005$; Tabelle 21).

Tabelle 21: XP-mRNA-Expression (normalisiert zu GAPDH) in 0 μM , 0,1 μM und 0,5 μM Cyclosporin A-kultivierten GM00637 Fibroblasten. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 11$ unabhängigen Experimenten. n.s. = nicht signifikant. Die durch Cyclosporin A-herunterregulierten Gene sind durch einen roten Pfeil gekennzeichnet.

| Cyclosporin A | 0 μM | 0,1 μM | 0,5 μM | Veränderung der Expression |
|---------------|-----------------|-------------------|-------------------|----------------------------|
| XPA-mRNA | 100% \pm 3,0 | 115,0% \pm 3,9 | 115,6% \pm 9,1 | \leftrightarrow n.s. |
| XPB-mRNA | 100% \pm 3,5 | 75,0% \pm 3,8 | 78,1% \pm 4,9 | \downarrow $p = 0,0015$ |
| XPC-mRNA | 100% \pm 5,1 | 89,9% \pm 3,2 | 80,2% \pm 2,9 | \downarrow $p = 0,003$ |
| XPD-mRNA | 100% \pm 4,1 | 94,3% \pm 4,7 | 81,7% \pm 2,9 | \downarrow $p = 0,002$ |
| DDB1-mRNA | 100% \pm 4,8 | 88,7% \pm 7,1 | 86,5% \pm 6,2 | \leftrightarrow n.s. |
| DDB2-mRNA | 100% \pm 2,4 | 100,2% \pm 3,8 | 96,5% \pm 6,4 | \leftrightarrow n.s. |
| XPF-mRNA | 100% \pm 4,7 | 99,4% \pm 4,9 | 86,3% \pm 6,1 | \leftrightarrow n.s. |
| XPG-mRNA | 100% \pm 4,6 | 86,3% \pm 4,6 | 81,1% \pm 4,0 | \downarrow $p = 0,005$ |

In Tabelle 21 ist zu erkennen, dass die in Cyclosporin A-kultivierten GM00637 Fibroblasten nach 24 h eine signifikant verminderte *XPB*, *XPC*, *XPD* und *XPG* mRNA (78,11%, 80,2%, 81,7%, 81,1%; $p < 0,005$) im Vergleich zu unbehandelten Zellen zeigten. Dabei war die Transkriptmenge in 0,1 μM und 0,5 μM behandelten Zellen nicht signifikant unterschiedlich. Die mRNA-Transkriptmenge in *DDB1*, *DDB2* (*XPE*), und *XPF* wurde dagegen nicht durch Cyclosporin A beeinflusst. Diese Daten verdeutlichen, dass Cyclosporin A die mRNA von *XPC*, welches als Schadenserkenner der GGR fungiert, herunterregulierte, sowie die Transkriptmenge beider Helikasen (*XPB* und *XPD*) und der Endonuklease *XPG* verminderte.

3.2.2 Expression der XP-mRNA in Cyclosporin A-behandelten Lymphoblasten

Analog zu GM00637 Fibroblasten wurden die XP-mRNA Expressionen von AG10107 Lymphoblasten, welche in 0 μM , 0,1 μM und 0,5 μM Cyclosporin A kultiviert waren, gemessen. Die Transkriptmenge von *XPB*, *XPC* und *XPG* nahm in dieser Zelllinie nach 24 h Kultivierung in 0,5 μM Cyclosporin A ebenfalls signifikant ab (82,5%, 76,5%,

83,0% $p < 0,05$). Im Gegensatz zu GM00637 Fibroblasten war die mRNA von *XPD* unverändert. Die Transkriptmenge von *XPA*, *DDB1*, *DDB2* (*XPE*) und *XPF* wurde ebenfalls nicht durch Cyclosporin A beeinflusst.

Tabelle 22: XP-mRNA-Expression (normalisiert zu GAPDH) in 0 μM , 0,1 μM und 0,5 μM Cyclosporin A-kultivierten AG10107 Lymphoblasten. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 8$ unabhängigen Experimenten. n.s. = nicht signifikant. Die durch Cyclosporin A-herunterregulierten Gene sind durch einen roten Pfeil gekennzeichnet.

| Cyclosporin A | 0 μM | 0,1 μM | 0,5 μM | Veränderung der Expression |
|---------------|-----------------|-------------------|-------------------|----------------------------|
| XPA-mRNA | 100% \pm 2,7 | 103,3% \pm 13,9 | 84,7% \pm 9,7 | \leftrightarrow n.s. |
| XPB-mRNA | 100% \pm 3,3 | 100,9% \pm 5,3 | 82,5% \pm 2,2 | \downarrow $p = 0,0065$ |
| XPC-mRNA | 100% \pm 3,5 | 86,8% \pm 8,7 | 76,5% \pm 6,8 | \downarrow $p = 0,006$ |
| XPD-mRNA | 100% \pm 3,4 | 101,1% \pm 2,9 | 96,8% \pm 2,7 | \leftrightarrow n.s. |
| DDB1-mRNA | 100% \pm 4,1 | 93,5% \pm 3,3 | 99,5% \pm 3,6 | \leftrightarrow n.s. |
| DDB2-mRNA | 100% \pm 7,8 | 108,4% \pm 19,8 | 88,6% \pm 7,2 | \leftrightarrow n.s. |
| XPF-mRNA | 100% \pm 5,7 | 120,8% \pm 13,5 | 89,9% \pm 3,2 | \leftrightarrow n.s. |
| XPG-mRNA | 100% \pm 4,4 | 89,3% \pm 7,1 | 83,0% \pm 6,1 | \downarrow $p = 0,036$ |

Die Ergebnisse der quantitativen *realtime*-PCR zeigten einen signifikanten Einfluss von Cyclosporin A auf die mRNA-Expression von *XPB*, *XPC*, *XPD* und *XPG* in GM00637 Fibroblasten und auf die mRNA-Expression von *XPB*, *XPC* und *XPG* in AG10107 Lymphoblasten. Studien über XP-Patienten belegen, dass eine verminderte mRNA eines XP-Gens mit einer defekten NER und klinischen XP-Symptomen korreliert (Emmert *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2006). In Bezug auf die bisherigen Ergebnisse dieser Doktorarbeit lässt sich daher vermuten, dass die unter Cyclosporin A stark reduzierte NER-Kapazität in GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten (Kapitel 3.1) aus einer verminderten mRNA-Expression von *XPB*, *XPC*, *XPD* und *XPG* resultieren könnte.

3.2.3 Expression der XP-Proteine in Cyclosporin A-behandelten Fibroblasten

Die Wirkung von Cyclosporin A auf die XP-Protein-Expression wurde mittels Western Blot analysiert (Kapitel 2.2.3.7). GM00637 Fibroblasten wurden für 24 h in Medium mit 0 μM , 1 μM oder 0,5 μM Cyclosporin A kultiviert, anschließend die Cytosol- und Kernproteine isoliert (Kapitel 2.2.3.2) und die XP-Proteine nacheinander mit

verschiedenen Antikörpern immunchemisch nachgewiesen. Die XP-Protein-Expressionen wurden gegen β -Actin (für cytosolische Proteine) oder RCC1 (für Kernproteine) normalisiert, um den Effekt unterschiedlicher Proteinladungsmengen (50 bis 100 μ g) zu eliminieren. Die Konzentrationen der XP-Proteine errechnete sich aus der Ratio von XP: β -Actin (für cytosolische Proteine) oder XP:RCC1 (für Kernproteine).

In Abbildung 18 ist zu erkennen, dass die Protein-Konzentrationen von XPB, XPC, XPD, DDB2 (XPE) und XPF von Cyclosporin A-behandelten Zellen ähnlich stark exprimiert wurden wie die unbehandelten Zellen. Das XPB- und das DDB2-Protein war in unbehandelten und Cyclosporin A-behandelten Zellen im Kern vorhanden, während das XPC- und XPD-Protein auch im Cytosol, das XPC allerdings etwas schwächer exprimiert, detektierbar war. Das XPF-Protein war dagegen nur im Cytosol vorhanden. Das DDB1-Protein war in Cyclosporin A behandelten Zellen im Cytosol weniger exprimiert, dagegen nahm es im Kern dosisabhängig zu. Dies lässt vermuten, dass Cyclosporin A eine Translokation des DDB1-Proteins vom Cytosol in den Kern bewirkt. Tatsächlich transloziert DDB1 unter UV-Strahlung durch eine erhöhte Expression seines Dimerpartners DDB2 in den Kern (Liu *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zu diesen unveränderten XP-Protein-Expressionsmengen war die Menge an XPG- und XPA-Protein in 0,1 μ M und 0,5 μ M Cyclosporin A-behandelten Zellen deutlich reduziert. Das XPG-Protein, welches nur im Cytosol vorhanden ist, war in 0,1 μ M und 0,5 μ M Cyclosporin A-behandelten Zellen nur noch zu 46% bzw. 25% detektierbar. Hier zeichnete sich eine klare Cyclosporin A-Dosisabhängigkeit ab. Das XPA-Protein war im Cytosol ebenfalls deutlich reduziert und im Kern von Cyclosporin A-behandelten Zellen nicht mehr detektierbar. Das XPA-Protein zeigte sich als zwei Banden, die einer Größe von 38 kDa und 40 kDa entsprechen. Die in 0,1 μ M und 0,5 μ M Cyclosporin A-kultivierten GM00637 Fibroblasten wiesen eine deutlich reduzierte 40 kDa Proteinbande (12% der normalen Proteinmenge) auf, während die 38 kDa Proteinbande leicht erhöht war (120% in 0,1 μ M und 126% in 0,5 μ M Cyclosporin A-behandelten im Vergleich zu unbehandelten Zellen). Im Kern konnten beide Proteinbanden nicht mehr detektiert werden.

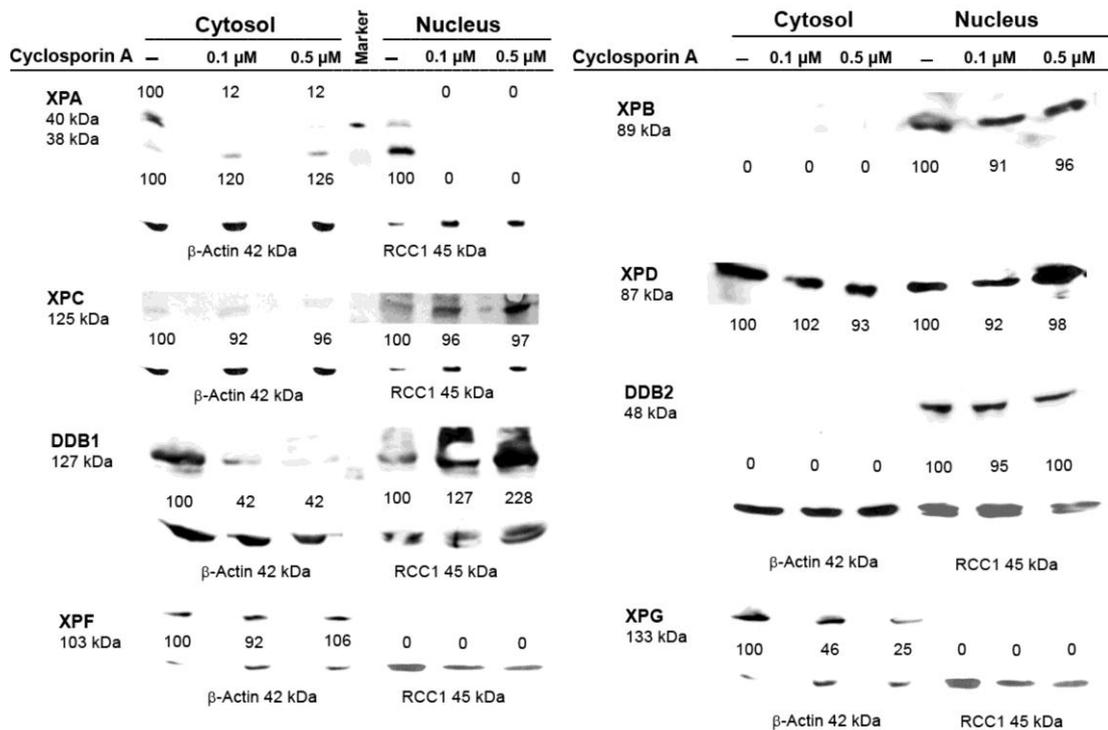


Abbildung 18: Wirkung von 0 μM , 0,1 μM und 0,5 μM Cyclosporin A auf die cytosolische und nukleäre Protein-Expression von XPA, XPB, XPC, XPD, DDB1, DDB2 (XPE), XPF und XPG in GM00637 Fibroblasten. Angegeben ist die jeweilige Ratio der Banden-Intensitäten zwischen XP-Protein und β -Actin (Cytosol) oder XP-Protein und RCC1 (Kern) relativ zu unbehandelten Kontrollen. Dargestellt ist je ein repräsentativer Blot von insgesamt drei bis fünf unabhängigen Versuchen.

Um die 38 kDa und 40 kDa Proteinbanden als XPA zu verifizieren, erfolgte ein immunchemischer Nachweis des XPA-Proteins in den XPA-defizienten Fibroblastenzelllinien XP2OS und XP12RO. In Abbildung 19 ist ersichtlich, dass beide Proteinbanden in XP2OS und XP12RO nicht detektierbar waren. Dies stimmt mit vorherigen Berichten überein (Miura *et al.*, 1991). In der XP2OS Zelllinie hat an der 3' Spleißakzeptor-Stelle im Intron drei ein Basenaustausch (G>C) stattgefunden. Dadurch ergibt sich eine Leserasterverschiebung (engl.: *frameshift*) und ein vorzeitiges Stoppcodon. Die Translation resultiert in einem trunkierten Protein, welches nur aus 130 AS anstelle der kompletten 273 AS besteht (Satokata *et al.*, 1990; Miyamoto *et al.*, 1992; Rademakers *et al.*, 2003). Die Zelllinie XP12RO hat ein Basenaustausch (C619T) im Exon drei, was zu einer reduzierten mRNA-Menge und keiner XPA-Protein-Expression führt (Satokata *et al.*, 1992; McDowell *et al.*, 1993). Es ist nicht genau bekannt, an welcher Stelle der Antikörper gegen das XPA-Protein bindet. Da jedoch keine Proteinbanden in den XPA-defizienten Zelllinien XP2OS und XP12RO detektiert worden sind, muss sich das Epitop des Antikörpers im C-terminalen Bereich des Proteins befinden.

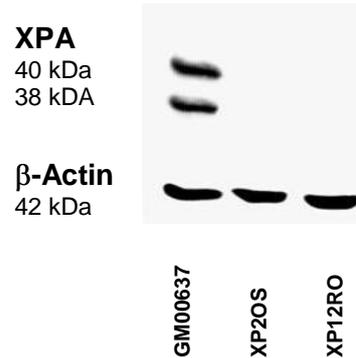


Abbildung 19: Immunchemischer Nachweis des XPA-Proteins in GM00637 Fibroblasten und in den XPA-defizienten Fibroblastenzelllinien XP2OS und XP12RO.

3.3 XPA-, XPC- und XPG- Überexpression in Cyclosporin A-behandelten Zelllinien

Die zuvor gezeigten Ergebnisse einer differentiellen Regulation der XP-Gene und XP-Proteine durch Cyclosporin A könnten als mögliche Erklärungen für die Cyclosporin A-induzierte Inhibierung der NER dienen. Da allerdings, wie bei *XPA*, *XPB*, *XPC* und *XPB* beobachtet, die Expression von *XP*-mRNA nicht zwangsläufig mit der Expression von XP-Protein korreliert, wurde auf funktioneller Ebene die Bedeutung der beiden durch Cyclosporin A-regulierten XP-Gene *XPA* und *XPG* als auch auf das *XPC*-Gen als Kontrolle für eine Cyclosporin A-induzierte Inhibierung der NER untersucht.

Die Endonuklease *XPG* wurde auf die funktionelle NER überprüft, bei der Cyclosporin A sowohl die Expression von mRNA als auch von Protein herunterregulierte. Als zweites XP-Gen wurde *XPA* untersucht, welches als Schadensverifizierer in beiden Reparaturwegen – GGR und TCR – involviert ist und einen limitierenden Faktor für die NER darstellt (Koberle *et al.*, 2006). *XPA* zeigte unter Cyclosporin A eine verminderte Proteinexpression, nicht aber eine verminderte mRNA-Expression. Als drittes XP-Gen wurde *XPC* analysiert, welches als Schadenserkenner nur in der GGR fungiert und vorzugsweise CPD repariert (Emmert *et al.*, 2000). *XPC* wurde durch Cyclosporin A – im Gegensatz zu *XPA* – auf mRNA-Ebene, nicht aber auf Proteinebene beeinflusst und diente somit als Kontrolle.

Mit der HCR-Methode (Kapitel 2.2.1.8) wurde in GM00637 Fibroblasten sowie in *XPA*-, und *XPC*- defizienten Fibroblasten der Einfluss einer *XPA*-, *XPC*-, oder *XPG*-Protein-Überexpression auf die Cyclosporin A-induzierte Inhibierung der NER untersucht.

Die Überexpression der XP-Proteine erfolgte mittels Kotransfektion eines *XPA*-, *XPC*-, oder *XPG*-cDNA-enthaltenden Plasmides unter der Kontrolle eines SV40-Promotors (Tabelle 11).

3.3.1 Überexpression von XPA, XPC und XPG in normalen Fibroblasten und Cyclosporin A-Effekt auf die NER

Anhand der verminderten Expression von XPA- und XPG-Protein in Cyclosporin A-kultivierten GM00637 Fibroblasten (Abbildung 18) wurde vermutet, dass diese beiden Proteine auch funktionelle Bedeutung in der Cyclosporin A-vermittelten Inhibierung der NER in dieser Zelllinie besitzen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die verminderte NER in Cyclosporin A-kultivierten GM00637 Fibroblasten durch Überexpression von entweder XPA- oder XPG-Protein komplementiert werden kann. Darüber hinaus wurde zu Kontrollzwecken auch das XPC-Protein in Cyclosporin A-behandelten GM00637 Fibroblasten überexprimiert um das Ergebnis der Western Blot Analysen zu untermauern, dass Cyclosporin A auf die Regulation des XPC-Proteins keine Wirkung zeigt.

In Abbildung 20 ist die relative NER in GM00637 Fibroblasten dargestellt, die in normalem oder 0,1 μ M Cyclosporin A-versetztem Medium kultiviert und entweder mit einem *XPA*-, *XPC*-, oder *XPG*-cDNA-enthaltenden Plasmid kotransfiziert worden sind. Die relative NER, die sich aus den Luciferaseaktivitäten von unbestrahltem und bestrahltem pcmvLUC errechnet (Kapitel 3.1.2), wurde hier bei unbehandelten GM00637 Fibroblasten 100% gesetzt. In diesem Versuch verminderte Cyclosporin A die NER in GM00637 Fibroblasten signifikant auf 87% ($p = 0,04$). Wurde das XPA-Protein durch Kotransfektion eines *XPA*-cDNA-enthaltenden Plasmides überexprimiert, konnte der Cyclosporin A-Effekt auf die NER nicht mehr beobachtet werden. Ein ähnliches Ergebnis wurde durch Überexpression des XPG-Proteins mittels eines *XPG*-cDNA-enthaltenden Plasmides erzielt. Die inhibitorische Wirkung von Cyclosporin A auf die NER in GM00637 Fibroblasten konnte somit durch Überexpression des XPA- als auch des XPG-Proteins vollkommen aufgehoben werden. Im Gegensatz zu XPA und XPG konnte die Überexpression des XPC-Proteins mittels eines *XPC*-cDNA-enthaltenden Plasmides die Cyclosporin A-induzierte Inhibierung der NER nicht komplementieren. In Cyclosporin A-kultivierten GM00637 Fibroblasten, bei denen das XPC-Protein überexprimiert wurde, ist eine relative NER von 85% detektiert worden (Abbildung 20).

Diese Ergebnisse demonstrieren die Bedeutung des XPA- und XPG-Proteins in der Cyclosporin A-vermittelten Inhibierung der relativen NER, denn sie bestätigen, dass die Überexpression des XPA- und XPG-Proteins, nicht aber des XPC-Proteins, die inhibitorische Wirkung von Cyclosporin A vollständig komplementieren konnte. Dies unterstützt zusätzlich die Western Blot Analysen, in denen gezeigt wurde, dass Cyclosporin A eine verminderte Proteinexpression von XPA und XPG, nicht aber von XPC verursacht (Abbildung 18).

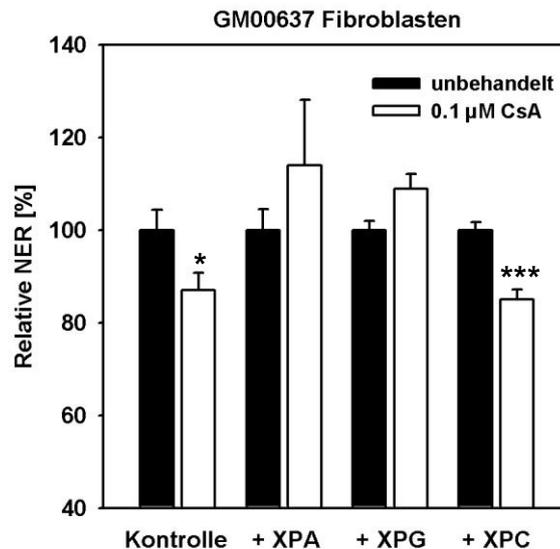


Abbildung 20: Effekt der XPA-, XPC-, und XPG-Protein-Überexpression auf die relative NER in unbehandelten und 0,1 µM Cyclosporin A-kultivierten GM00637 Fibroblasten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n=3$ unabhängigen Experimenten (in Triplikaten), (* $p<0.05$; *** $p<0.0005$).

3.3.2 Überexpression von XPA in XPA-defizienten Fibroblasten und Cyclosporin A-Effekt auf die NER

Die inhibitorische Wirkung von Cyclosporin A auf die NER konnte in GM00637 Fibroblasten durch Überexpression von XPA aufgehoben werden (Kapitel 3.3.1). XPA scheint somit ein zentraler Angriffspunkt von Cyclosporin A zu sein, was immunchemisch ebenfalls nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.2.3). Um die Bedeutung von XPA in der Cyclosporin A-induzierten NER-Inhibierung zu verifizieren, wurde die NER in XPA-defizienten Fibroblasten (XP2OS) untersucht, welche in Medium ohne Cyclosporin A oder mit 0,1 µM Cyclosporin A kultiviert worden sind (Abbildung 21). Zusätzlich wurde in dieser Zelllinie das XPA-Protein mittels XPA-cDNA-enthaltenden Plasmides überexprimiert, um einen eventuellen Effekt auf eine möglicherweise Cyclosporin A-abhängige NER festzustellen.

Die relative NER in der XPA-defizienten Fibroblastenzelllinie XP2OS war stark reduziert (0,7%) im Vergleich zu GM00637 Fibroblasten (28%) (Abbildung 21). Die NER der stark geschädigten XPOS-Zelllinie wies eine ähnlich geringe NER-Kapazität auf wie andere XPA defiziente Zelllinien (Landi *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2003; Tanioka *et al.*, 2005). Eine weitere Abnahme der Reparaturkapazität war in Cyclosporin A-kultivierten XP2OS Zellen im Vergleich zu GM00637 Fibroblasten (24%) nicht detektierbar (Abbildung 21). Eine XPA-Protein-Überexpression führte zu einer Zunahme der relativen NER auf 10,8%. Sind diese transient-korrigierten XP2OS-Fibroblasten in 0,1 μM Cyclosporin A-versetztem Medium kultiviert worden, konnte ebenfalls keine Abnahme der relativen NER beobachtet werden. Ein ähnlich fehlender Cyclosporin A-Effekt auf die relative NER ist in der stabil-korrigierten XP2OS-Fibroblastenzelllinie (XP2OS-pAHC19WS) festgestellt worden. Diese Zelllinie exprimiert XPA stabil unter einem CMV-chicken-Promotor. Die in Cyclosporin A-kultivierten XP2OS-pAHC19WS wiesen eine ähnliche Reparaturkapazität (6,1% in 0,1 μM Cyclosporin A-Medium) wie unbehandelte Zellen auf (5,6%).

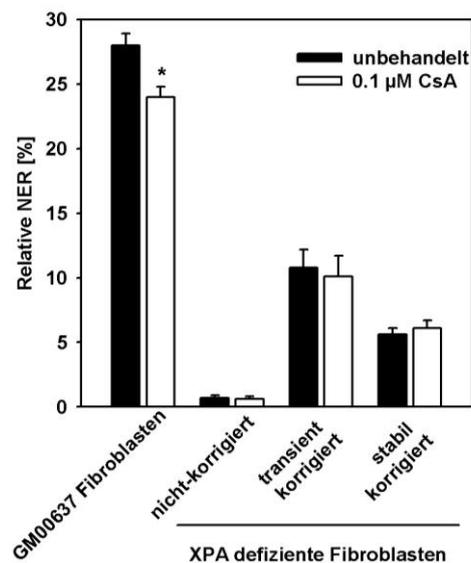


Abbildung 21: Effekt der XPA-Protein-Überexpression auf die relative NER in transient oder stabil korrigierten XPA-defizienten Fibroblasten, die in Medium ohne oder mit 0,1 μM Cyclosporin A kultiviert worden sind. GM00637 Fibroblasten dienen als Kontrolle der Cyclosporin A-induzierten NER-Inhibierung. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von n=5 unabhängigen Experimenten (in Triplikaten), (* p<0.05).

3.3.3 Überexpression von XPC in XPC-defizienten Fibroblasten und Cyclosporin A-Effekt auf die NER

Die Überexpression von XPC in GM00637 Fibroblasten führte nicht zu einer Korrigierung der Cyclosporin A-induzierten NER-Inhibierung (Kapitel 3.3.1). Um dieses Ergebnis zu reproduzieren, wurde die NER in XPC-defizienten Fibroblasten (XP4PA-SV-EB) untersucht, welche in Medium ohne oder mit 0,1 μM Cyclosporin A kultiviert worden sind (Abbildung 22). Zusätzlich wurde in dieser Zelllinie ebenfalls das XPC-Protein mittels XPC-cDNA-enthaltenden Plasmides überexprimiert, um zu überprüfen, ob Cyclosporin A tatsächlich keinen Einfluss auf das XPC-Protein zeigt.

Die XPC-defiziente Zelllinie XP4PA-SV-EB war wie die XPA-defiziente Zelllinie XP2OS ebenfalls sehr geschädigt und mittels HCR-Methode (Kapitel 3.1.2) konnte eine relative NER von nur 0,1% detektiert werden (Abbildung 22). Eine ähnlich geringe NER-Kapazität wurde auch von Zellen anderer XPC-Patienten beobachtet (Legerski *et al.*, 1994; Emmert *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2006; Emmert *et al.*, 2006b). Eine weitere Abnahme der Reparaturkapazität durch Cyclosporin A-Behandlung konnte nicht mehr gemessen werden. Die Überexpression des XPC-Proteins erhöhte die relative NER ca. 38-fach (3,8%). Diese transient-komplementierten XP4PA-SV-EB-Fibroblasten zeigten nach 0,1 μM Cyclosporin A-Kultivierung eine stark reduzierte relative NER. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass XPC die Cyclosporin A-induzierte Inhibierung der NER nicht aufheben konnte, und korreliert mit den Daten der GM00637 Fibroblasten (Abbildung 20), bei denen eine XPC-Komplementierung ebenfalls nicht die verminderte NER korrigieren konnte. Die Ergebnisse stimmen ebenfalls mit den Western Blot Analysen überein (Abbildung 18), die demonstrieren, dass XPC kein Angriffspunkt von Cyclosporin A darstellt.

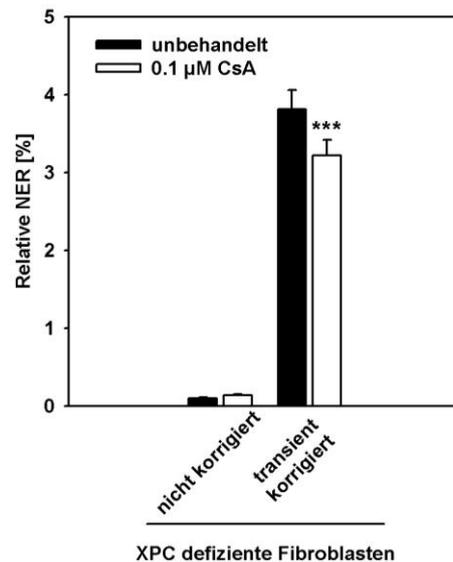


Abbildung 22: Effekt der XPC-Protein-Überexpression auf die relative NER in transient korrigierten XPC defizienten Fibroblasten, welche in Medium ohne oder mit 0,1 µM Cyclosporin A behandelt worden sind. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von $n=3$ unabhängigen Experimenten (in Triplikaten), (***) $p < 0.0005$.

3.4 Wirkungen von Calcium, Calcineurin und CREB auf die Nukleotid-Exzisions-Reparatur

Die bisherigen Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Cyclosporin A-induzierte Hemmung der NER durch eine Inhibierung des XPA- und XPG-Proteins erfolgte, welches immunchemisch und mittels HCR nachgewiesen werden konnte. Demgegenüber scheint die differenzielle mRNA-Expression von *XPB*, *XPC* und *XPB* keine funktionelle Bedeutung der Cyclosporin A-induzierten NER-Inhibierung zu haben. Cyclosporin A vermittelt seine immunsuppressive Wirkung durch Inhibierung der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin (Ho *et al.*, 1996). Es gibt vereinzelt Literaturhinweise, dass Calcium spontane und auch UV-induzierte DNA-Reparatur moduliert (Gaffer *et al.*, 1997; Ahlers *et al.*, 1999; Ori *et al.*, 2005). Aus diesem Grund sollte der Einfluss von Calcium auf die NER in GM00637 Fibroblasten charakterisiert werden. In einem nächsten Schritt sollte ermittelt werden ob die Cyclosporin A-induzierte Hemmung der NER durch die Phosphatase Calcineurin vermittelt wird. Die Hemmung von Calcineurin über Cyclosporin A führt zur einer Inhibierung der beiden Transkriptionsfaktoren NFAT und CREB und damit zu einer verminderten Expression der für die humorale Immunantwort relevanten Gene (Flanagan *et al.*, 1991; Ho *et al.*, 1996; Oetjen *et al.*, 2005). Daher wurde im letzten Schritt der Einfluss des Transkriptionsfaktors CREB auf die NER-Kapazität untersucht.

3.4.1 Einfluss von Calcium auf die NER

Calcium-Ionen (Ca^{2+}) modulieren als sogenannte „second messenger“ zahlreiche Signalwege durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT, CREB, NF- κ B, JNK1 und MEF2, welche die Expression verschiedenster für die Immunfunktion, Zellproliferation und -Differenzierung relevanten Gene regulieren (Braun *et al.*, 1979; Dolmetsch *et al.*, 1997; Feske *et al.*, 2001; Winslow *et al.*, 2005). UV-Strahlung induziert Calcium-Signalwege (Schieven *et al.*, 1993). Darüber hinaus wurde über gestörte Calcium-Signalwege in XP- und Ataxia telangiectasia-Patienten berichtet (Schallreuter *et al.*, 1991; Kondo *et al.*, 1993).

Basierend auf diesen Untersuchungen sollte die Wirkung von Calcium auf die NER mittels Calcium-Ionophoren untersucht werden. Calcium-Ionophore transportieren selektiv divalente Kationen ($\text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$) durch biologische Membranen (Akerman *et al.*, 1981). Das Calcium-Ionophor A23187 bildet mit Ca^{2+} stabile Komplexe und wird daher besonders bei Untersuchungen zur Aktivität von Calcium verwendet (Reed *et al.*, 1972). A23187 erhöht die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration (Martina *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994). GM00637 Fibroblasten wurden mit 0,25 μM oder 0,5 μM A23187 kultiviert und die relative NER ermittelt, welche sich aus den Luciferaseaktivitäten von unbestrahltem und bestrahltem pcmvLUC errechnet (Kapitel 3.1.2). Die relative NER ist bei unbehandelten GM00637 Fibroblasten 100% gesetzt worden. In Abbildung 23 ist ersichtlich, dass sowohl 0,25 μM als auch 0,5 μM des Calcium-Ionophores A23187 die relative NER signifikant auf 128 % ($p=0,025$) bzw. 121% ($p=0,034$) erhöhte. Dieses Ergebnis belegt, dass die relative Reparaturfähigkeit in GM00637 Fibroblasten durch eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration vermittelt wird und unterstützt bisherige Beobachtungen einer durch Calcium modulierten DNA-Reparatur (Gafter *et al.*, 1997; Ahlers *et al.*, 1999; Ori *et al.*, 2005).

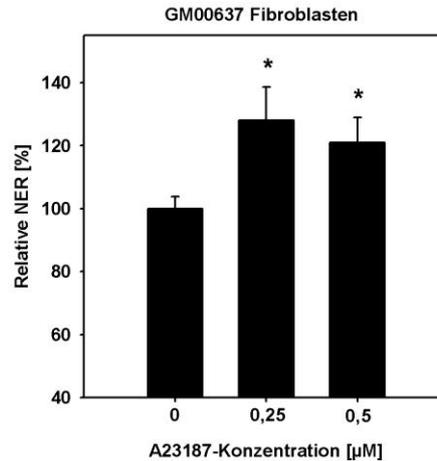


Abbildung 23: Wirkung eines intrazellulären Calcium-Anstieges durch das Calcium-Ionophor A23187 auf die relative NER in GM00637 Fibroblasten. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von $n=3$ unabhängigen Experimenten (in Triplikaten) (* $p<0.05$).

3.4.2 Einfluss einer Calcineurin-Überexpression auf die NER

Es konnte zuvor beobachtet werden, dass ein intrazellulärer Calcium-Anstieg in GM00637 Fibroblasten die relative NER erhöhte. Durch einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration wird die Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin aktiviert (Crabtree, 1999). Um zu prüfen, ob die zuvor gezeigte Cyclosporin A-induzierte Inhibierung der NER durch Calcineurin vermittelt wird, wurde der Einfluss der Calcineurin-Überexpression auf die NER-Kapazität untersucht. Dazu wurde sowohl die aktive katalytische A-Untereinheit von Calcineurin (Calcineurin A) als auch die regulatorische B-Untereinheit (Calcineurin B) in GM00637 Fibroblasten überexprimiert. Dies geschah mittels Kotransfektion eines Calcineurin A- oder Calcineurin B-Expressionsvektors (pCNA bzw pCNB, Tabelle 11) und HCR (Kapitel 2.2.1.8). In Abbildung 24 ist die relative NER, welche sich durch die Luciferaseaktivität des bestrahlten versus unbestrahlten pcmvLUC ermittelt, in GM00637 Fibroblasten dargestellt. Die relative NER ist in unbehandelten GM00637 Fibroblasten dabei 100% gesetzt.

Die Überexpression von Calcineurin A führte zu einer Dosis-abhängigen Zunahme der relativen NER auf das 2 bis 3 fache (Abbildung 24a). Die Calcineurin A-Untereinheit ist auf dem Plasmid ohne autoinhibitorische Domäne kodiert und bedarf daher keiner Aktivierung durch Calcineurin B (Oetjen *et al.*, 2005). Wurde das Calcineurin A-Plasmid in einer Menge von 200 ng transfiziert, stieg die NER signifikant auf 230% ($p=0,0003$). Dieses Ergebnis belegt, dass die NER in GM00637 Fibroblasten allein durch Überexpression von Calcineurin A erhöht wird. Des Weiteren wurde als Kontrolle die

regulatorische Untereinheit von Calcineurin (Calcineurin B) in GM00637 Fibroblasten überexprimiert (Abbildung 24b). Calcineurin B lagert sich in Anwesenheit von Ca^{2+} an die katalytische Calcineurin A-Untereinheit und aktiviert dadurch Calcineurin A (Milan *et al.*, 1994; Rusnak *et al.*, 2000). Da die alleinige Calcineurin B-Überexpression die Calcineurin-Phosphataseaktivität nicht induzieren kann, zeigte sich wie erwartet kein Einfluss auf die NER. Eine Überexpression beider Untereinheiten erhöhte die relative NER nur bei einer Konzentration von je 200 ng signifikant auf 140% ($p=0,006$), ansonsten wurde die Wirkung eher gedämpft (Abbildung 24c). Dies lässt sich durch unspezifische Hemmungseffekte aller transfizierten Plasmide erklären, die zu einer verminderten Luciferaseaktivität führen können.

Überdies wurde die aktive katalytische Calcineurin A-Untereinheit in 0,1 μM Cyclosporin A-kultivierten GM00637 Fibroblasten überexprimiert (Abbildung 24d). Die relative NER bei 0,1 μM Cyclosporin A behandelten Zellen betrug in diesem Versuch 82,5% ($p<0,005$). Eine Kotransfektion mit 150 ng oder 200 ng pCNA in diesen Zellen hob die inhibitorische Cyclosporin A-Wirkung auf die NER vollkommen auf. Somit konnte die Überexpression von Calcineurin – durch Überexpression der aktiven katalytischen Calcineurin A – die Cyclosporin A-induzierte NER-Inhibierung vollständig komplementieren und die Zellen zu ihrer „normalen“ Reparaturfähigkeit verhelfen.

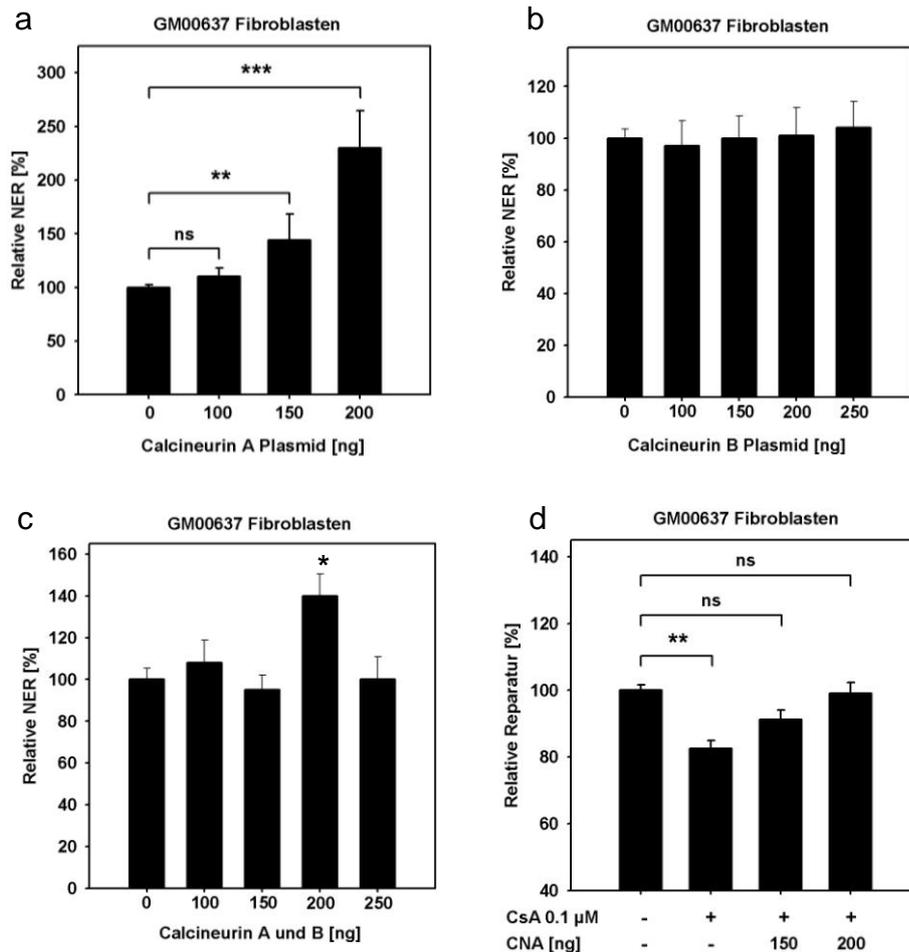


Abbildung 24: Analyse der relativen NER in GM00637 Fibroblasten, bei denen die aktive katalytische Calcineurin A-Untereinheit (a), die regulatorische Calcineurin B-Untereinheit (b), beide Calcineurin-Untereinheiten (c) oder die aktive katalytische Calcineurin A-Untereinheit in 0,1 µM Cyclosporin A-kultivierten GM00637 Fibroblasten überexprimiert wurde (d). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von n=3 unabhängigen Experimenten (in Triplikaten), (ns = nicht signifikant, * p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.0005).

3.4.3 Einfluss einer Calcineurin-Herunterregulierung auf die NER

Die Wirkung von Calcineurin auf die NER in GM00637 Fibroblasten wurde durch Calcineurin-Herunterregulierung zusätzlich analysiert. Die Calcineurin-Herunterregulierung erfolgte mittels RNAi gegen die katalytische A-Untereinheit, welche in GM00637 Fibroblasten kotransfiziert wurde (Kapitel 2.2.1.8). Die Effizienz der Herunterregulierung wurde mittels Western Blot Analysen überprüft (2.2.3.7).

In Abbildung 25 ist die relative NER von unbehandelten und Calcineurin A-RNAi-transfizierten GM00637 Fibroblasten dargestellt. Ähnlich zur indirekten pharmakologischen Calcineurin-Inhibierung über Cyclosporin A bewirkte die direkte Calcineurin A-Inhibierung durch RNAi-*knockdown* ebenfalls eine signifikant reduzierte relative NER. Diese verminderte Reparaturfähigkeit wurde durch Kotransfektion von 20

pmol je zwei verschiedener RNAi gegen Calcineurin A erzielt, welche im Vergleich zu einer Kontroll-RNAi (95%) die relative NER auf 78% (RNAi I) bzw. 85% (RNAi II) reduzierten (Abbildung 25a). Diese NER-Inhibierung lag im Bereich einer Cyclosporin A-induzierten Verminderung der Reparaturfähigkeit, welche in mehreren Versuchen reproduzierbar war (z.B. Abbildung 24d). Die Kotransfektion von höheren Konzentrationen an RNAi bis zu 200 pmol reduzierte die relative NER jedoch nicht weiter als 54% (Abbildung 25b). Die Effizienz der Calcineurin A-Herunterregulierung wurde immunchemisch nachgewiesen (Abbildung 25c). Die Transfektion der RNAi führte zu einer verminderten Calcineurin A-Proteinexpression auf 37% (RNAi I) bzw. 56% (RNAi II). Diese Ergebnisse belegen zum einen, dass die NER in GM00637 Fibroblasten durch Calcineurin moduliert werden kann und darüber hinaus bestätigen sie, dass die Cyclosporin A-induzierte Inhibierung der NER durch Calcineurin vermittelt wird.

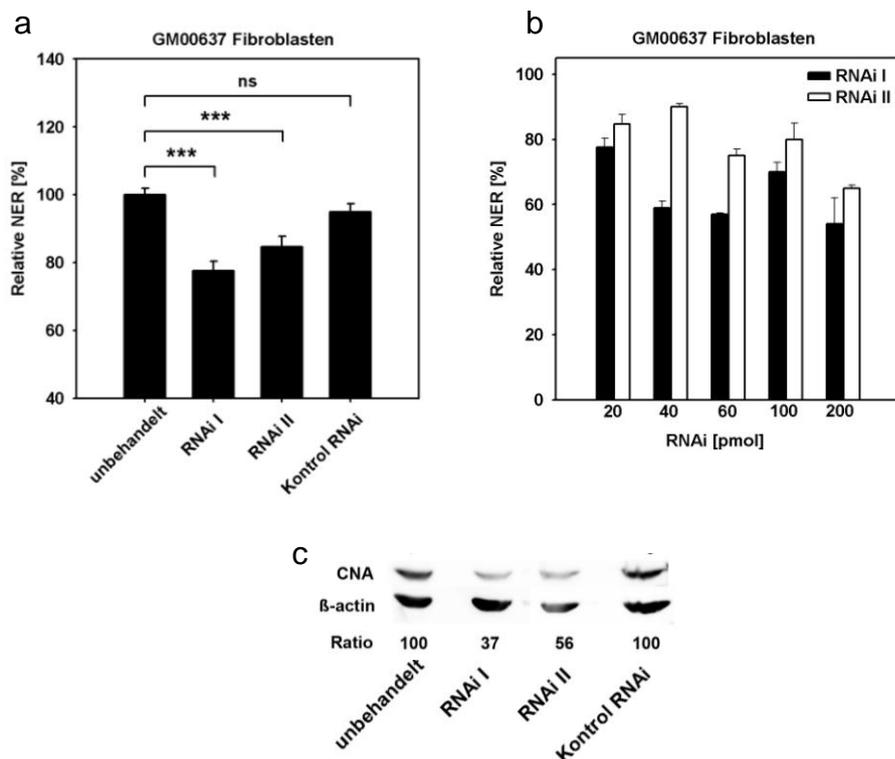


Abbildung 25: Wirkung der Calcineurin A-Herunterregulierung mittels 20 pmol RNAi (a) und 20 pmol-200 pmol RNAi (b) gegen die katalytische aktive Calcineurin A-Untereinheit auf die relative NER in GM00637 Fibroblasten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n=4$ unabhängigen Experimenten (in Triplikaten), (ns = nicht signifikant, *** $p<0.0005$). Die Herunterregulierung wurde immunchemisch nachgewiesen und auf β -Actin normalisiert (c).

3.4.4 Einfluss einer Calcineurin-Herunterregulierung auf die XP-Protein-Expression

Es konnte vorab dargestellt werden, dass die Cyclosporin A-induzierte Hemmung der NER durch Calcineurin vermittelt wird. Ferner wurde der Einfluss des XPA- und XPG-Proteins auf die verminderte NER in Cyclosporin A-kultivierten GM00637 Fibroblasten mittels Western Blot Analysen (Kapitel 3.2.3) und funktionell durch Überexpression von XPA und XPG (Kapitel 3.3) analysiert. Basierend auf diesen Daten wurde vermutet, dass die Cyclosporin A-induzierte Reduzierung der Proteine XPA und XPG und damit die verminderte NER ebenfalls durch Calcineurin vermittelt wird. Aus diesem Grund wurde in GM00637 Fibroblasten untersucht, ob eine Calcineurin A-Herunterregulierung mittels RNAi die Expression der Proteine XPA und XPG in ähnlicher Weise moduliert wie Cyclosporin A. Zu Kontrollzwecken wurde ebenfalls der Einfluss auf die XPC-Proteinexpression untersucht. Hier sollte sich, wie in Cyclosporin A-kultivierten GM00637 Fibroblasten demonstriert (Kapitel 3.2.3), keine verminderte Expression des XPC-Proteins zeigen.

Die Kotransfektion zwei verschiedener RNAi gegen die aktive katalytische Calcineurin A-Untereinheit reduzierte die Expression des Calcineurin A Proteins signifikant auf 37% (RNAi I) bzw. 56% (RNAi II; Abbildung 25c). Dies führte zu einer signifikant verminderten XPA- und XPG-Proteinexpression (Abbildung 26). Dabei verringerte ein Calcineurin A-*knockdown* das 38 kDa XPA-Protein auf 63% (RNAi I) bzw. 21% (RNAi II) und das XPG-Protein auf 19% (RNAi I) und 27% (RNAi II) in Gesamtzelllysaten von GM00637 Fibroblasten. Die 40 kDa XPA-Proteinbande wurde nicht berücksichtigt, da die Kontroll-RNAi ebenfalls eine verminderte Proteinexpression zeigt. Die Ergebnisse dieser Western Blot Analysen korrelieren mit der Cyclosporin A-induzierten Verminderung der XPA- und XPG-Proteinexpression (Abbildung 18) und demonstrieren, dass der Einfluss von Cyclosporin A die XPA- und XPG-Proteine über Calcineurin vermittelt wird.

Im Gegensatz zu der unveränderten Proteinexpression in 0,1 μ M und 0,5 μ M Cyclosporin A-kultivierten GM00637 Fibroblasten (Abbildung 18) resultierte der Calcineurin A-*knockdown* zu einer erhöhten XPC-Proteinexpression (Abbildung 26). Dies unterstützt die vorhergehenden Ergebnisse einer nicht-inhibitorischen Wirkung von Cyclosporin A auf das XPC Protein. Die Tatsache, dass 0,1 μ M und 0,5 μ M Cyclosporin A-kultivierte GM00637 Fibroblasten keine erhöhte XPC-Proteinexpression zeigen wie ein Calcineurin A-*knockdown* Zellen (Abbildung 18), lässt vermuten, dass

die gewählte Cyclosporin A-Konzentration zu niedrig gewählt wurde und daher keine Erhöhung detektiert werden konnte. Diese Vermutung würde auch die verschieden stark reduzierte XPG-Proteinexpression in Calcineurin A-RNAi behandelten (19% und 27%) und in Cyclosporin A-behandelten GM00637 Fibroblasten (46% und 25%, Abbildung 18) erklären.

Diese Daten verdeutlichen die bisher dargestellten Ergebnisse einer Cyclosporin A-induzierten Hemmung der NER und einer verminderten Expression des XPA- und XPG-Proteins, welche über Calcineurin vermittelt wird.

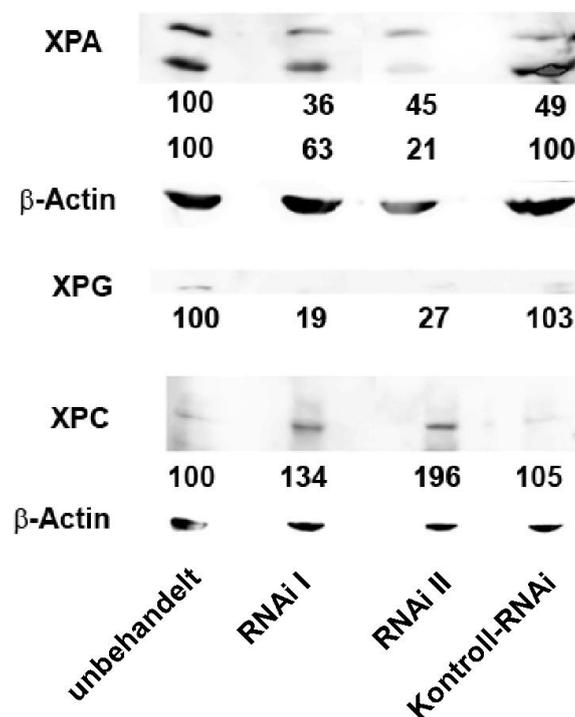


Abbildung 26: Effekt der RNAi-vermittelten Calcineurin-Herunterregulierung auf die XP-Proteine XPA, XPC und XPG in GM00637 Fibroblasten. Die Zahlen unter jedem Blot geben die Ratio der Banden-Intensitäten zwischen XP-Protein und β -Actin relativ zu unbehandelten Kontrollen wider.

3.4.5 Einfluss einer CREB-Überexpression auf die NER

Die bisherigen Ergebnisse bestätigen eine Calcineurin-vermittelte Regulation der NER, welche ähnlich zu Cyclosporin A nicht nur die Reparaturfähigkeit in GM00637 Fibroblasten moduliert, sondern auch die Expression der XPA- und XPG-Proteine reguliert. Die XPA- und XPG-Proteinexpression könnte demnach über einen Calcineurin-abhängigen Signalweg reguliert werden, welcher durch die Phosphataseaktivität von Calcineurin entweder posttranslational oder transkriptionell

wirkt. Da Calcineurin die Expression verschiedenster Gene u. a. über die Transkriptionsfaktoren NFAT oder CREB reguliert (Flanagan *et al.*, 1991; Ho *et al.*, 1996; Oetjen *et al.*, 2005), sollte in dieser Arbeit geklärt werden, ob Calcineurin die NER über den Transkriptionsfaktor CREB moduliert. Dazu wurde ein Expressionsvektor für CREB (pCREB) in GM00637 Fibroblasten kotransfiziert und die relative NER gemessen. Da eine transkriptionelle Aktivität von CREB durch Ca^{2+} induziert wird (Oetjen *et al.*, 2005), wurden GM00637 Fibroblasten zusätzlich mit 0,25 μM und 0,5 μM des Calcium-Ionophores A23187 kultiviert. Die Wirkung der pCREB-Kotransfektion auf die relative NER wurde durch die Luciferaseaktivität des bestrahlten versus unbestrahlten pcmvLUC (Kapitel 2.2.1.8) in GM00637 Fibroblasten ermittelt. In Abbildung 27 ist zu erkennen, dass CREB ohne Ca^{2+} -Induktion durch A23187 die relative NER der CREB-kotransfizierten GM00637 Fibroblasten nicht beeinflusst. Sind die CREB-kotransfizierten GM00637 Fibroblasten in Medium mit 0,25 μM oder 0,5 μM A23187 kultiviert worden, erhöhte sich die relative NER signifikant auf 131% ($p=0,0007$) bzw. 163% ($p=0,007$). Ausgehend vom zuvor dargestellten Ergebnis, dass Calcium alleinig die relative NER auf etwa 120% erhöht (Abbildung 23) lässt sich in diesem gezeigten Ergebnis eine additive Wirkung von Calcium + CREB auf die Reparaturfähigkeit vermuten. Dieses Ergebnis belegt, dass die Calcineurin-vermittelte Modulation der relativen NER zumindest teilweise über den Transkriptionsfaktor CREB reguliert wird.

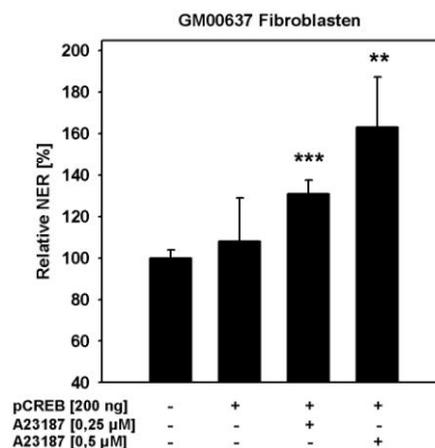


Abbildung 27: Wirkung von CREB auf die relative NER in GM00637 Fibroblasten, die mit 0 μM , 0,25 μM oder 0,5 μM A23187 inkubiert worden sind. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n=2$ unabhängigen Experimenten (in Triplikaten), ** $p<0.005$, *** $p<0.0005$.

3.4.6 Einfluss einer CREB-Herunterregulierung auf die NER

Als Negativ-Kontrolle für einen CREB-vermittelten NER-Anstieg wurde ein Expressionsvektor pCREBS133A in GM00637 Fibroblasten kotransfiziert, welcher die CREB Sequenz kodiert, jedoch an der Position 133 anstelle der Base T die Base G besitzt. Dadurch wird statt Serin (TCC) die Aminosäure Alanin (GCC) kodiert. Zur Aktivierung der CREB-vermittelten Transkription muss dieses Serin phosphoryliert werden, damit der Koaktivator CBP binden und die transkriptionelle Aktivität von CREB vermittelt werden kann (Parker *et al.*, 1996; Mayr *et al.*, 2001). Wird Serin durch Alanin ersetzt, unterbleibt die Bindung von CBP an CREB, für die eine Phosphorylierung des Serin an Position 133 der Transaktivierungsdomäne erforderlich ist (Oetjen *et al.*, 2005).

Die Kotransfektion dieser dominant-negativen CREB Serin-Alanin-Mutante zeigte auf die relative NER in GM00637 Fibroblasten keine Wirkung (Abbildung 28). Eine zusätzliche Kultivierung in 0,5 μM A23187 ließ die relative NER signifikant auf 119% ansteigen ($p=0,02$). Dieser Anstieg in der relativen Reparaturfähigkeit wurde bereits zuvor in alleinig mit A23187-kultivierten GM00637 Fibroblasten dargelegt (Abbildung 23) und ist damit ein reproduzierbares Ergebnis einer erhöhten relativen NER durch intrazellulären Calcium-Anstieg.

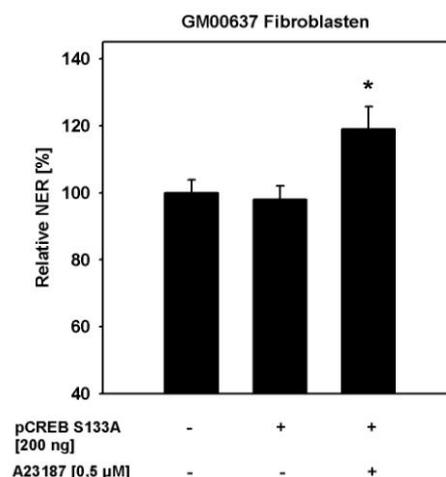


Abbildung 28: Wirkung der Serin-Alanin mutierten inaktiven Form von CREB (CREBS133A) auf die relative NER in GM00637 Fibroblasten, welche mit 0 μM oder 0,5 μM A23178 kultiviert worden sind. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n=2$ unabhängigen Experimenten (in Triplikaten), * $p<0.05$.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Immunsuppressiva Cyclosporin A und Everolimus auf die Nukleotid-Exzisions-Reparatur untersucht. Die hierbei dargestellten Wirkmechanismen einer Karzinogenese-Initiation von Cyclosporin A liefern neue Erklärungen für das stark erhöhte Hautkrebsrisiko bei einer Cyclosporin A-basierten immunsuppressiven Therapie und zeigen neue Kenntnisse auf, warum unter einer Everolimus-immunsuppressiven Therapie bisher kein erhöhtes Hautkrebsrisiko festzustellen ist.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden in transformierten Fibroblasten- und Lymphoblasten-Zelllinien unter dem Einfluss beider Immunsuppressiva untersucht. Des Weiteren wurde die Wirkung von Cyclosporin A auf die Expression der für die Nukleotid-Exzisions-Reparatur relevanten XP-Gene analysiert. Darüber hinaus konnten die XP-Gene identifiziert werden, welche durch Cyclosporin A differenziell auf mRNA und Proteinebene exprimiert werden. Der Einfluss von Cyclosporin A auf einzelne XP-Proteine wurde anschließend funktionell auf die Nukleotid-Exzisions-Reparatur in normalen und XP-defizienten Zelllinien untersucht. Im letzten Teil wurden die Wirkungen der Phosphatase Calcineurin und des Transkriptionsfaktors CREB auf die Cyclosporin A-induzierte Hemmung der NER analysiert.

Die erzielten Ergebnisse dienen zum Verständnis der molekularen Zusammenhänge einer Cyclosporin A-vermittelten Begünstigung der Tumorinitiation bei Transplantationspatienten. Diese wird aufgrund einer verminderten Nukleotid-Exzisions-Reparatur durch Modulation der XP-Gene *XPA* und *XPG* in einem Calcineurin-abhängigen Signalweg vermittelt.

4.1 Cyclosporin A, jedoch nicht Everolimus, vermindert die Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden durch Inhibierung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss von Cyclosporin A und Everolimus auf die Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden in GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten analysiert. Ausgangspunkt dieser Untersuchung waren verschiedene Studien über Immunsuppressiva und deren Nebenwirkungen, welche unabhängig ihrer Wirkung auf Immunzellen den schädigenden Effekt von UV-Strahlung verstärken (van Leeuwen *et al.*, 2009). Organ-Transplantationspatienten besitzen ein stark erhöhtes Hautkrebsrisiko (McGregor *et al.*, 1995; DiGiovanna, 1998). Zu den typischen UV-induzierten Hautkrebsformen, welche Transplantationspatienten in einem aggressiveren Verlauf im Gegensatz zur gesunden Normalbevölkerung entwickeln, zählen das Plattenepithelkarzinom, das Basalzellkarzinom und das kutane Melanom (Jensen *et al.*, 1999b; Buell *et al.*, 2005; Euvrard *et al.*, 2006). Das Plattenepithelkarzinom-Risiko beträgt bei Transplantationspatienten über 50% (Queille *et al.*, 2007). Innerhalb der ersten fünf Jahre entwickeln 40% aller Transplantationspatienten prä-maligne und maligne Hautveränderungen (Ulrich *et al.*, 2002).

Das Hautkrebsrisiko variiert dabei unter den verschiedenen immunsuppressiven Therapien und ist bei Calcineurin-Inhibitoren im Vergleich zu mTOR-Inhibitoren erhöht (Halloran, 2000). Neben einer insuffizienten Elimination von Tumorzellen aufgrund des supprimierten Immunsystems könnte darüber hinaus auch ein direkter onkogener Effekt die Tumorprogression erhöhen (Guba *et al.*, 2004; Tiu *et al.*, 2006). Cyclosporin A erhöht die Expression von TGF- β , welcher zur Tumorprogression beitragen könnte (Andjelic *et al.*, 1997; Maluccio *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005; Hojo *et al.*, 1999). Interessanterweise wird nach Absetzen der immunsuppressiven Therapie teilweise ein Rückgang der Tumore beobachtet (Euvrard *et al.*, 2004; Otley *et al.*, 2005). Die molekularen Zusammenhänge eines durch Cyclosporin A begünstigten Tumorwachstums sind allerdings überwiegend unbekannt. Auch das geringe oder möglicherweise sogar fehlende Hautkrebsrisiko von mTOR-Inhibitoren konnte bisher nicht umfassend geklärt werden (Euvrard *et al.*, 2004; Mathew *et al.*, 2004; Kauffman *et al.*, 2005). Da Transplantationspatienten hauptsächlich Sonnenlicht-induzierten Hautkrebs entwickeln, könnte ein unmittelbarer Zusammenhang mit einer Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden bestehen (de Boer *et al.*, 2000; Bootsma *et al.*, 2002). Auch Xeroderma Pigmentosum (XP-) Patienten besitzen ein vielfach erhöhtes

Risiko für die Entwicklung von Hautkrebs aufgrund einer defekten Nukleotid-Exzisions-Reparatur. Daher schien es interessant zu sein, die Nebenwirkungen von Cyclosporin A und Everolimus in Bezug auf eine mögliche UV-induzierte Karzinogenese-Initiation hin zu untersuchen.

In dieser Arbeit konnte als erstes gezeigt werden, dass mit steigenden Cyclosporin A-Konzentrationen das relative Zellüberleben nach UV-Bestrahlung in immortalisierten SV40-transformierten GM00637 Fibroblasten und EBV-transformierten AG10107 Lymphoblasten stark abnahm, während unter Everolimus kein Einfluss festzustellen war (Abbildung 13). Des Weiteren wurde in beiden mit Cyclosporin A oder Everolimus behandelten Zelllinien die NER-Kapazität anhand der Enzymaktivität einer auf einem Expressionsplasmid kodierten Luciferase analysiert. Dabei konnte belegt werden, dass Cyclosporin A die Nukleotid-Exzisions-Reparatur in GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten inhibiert, dagegen Everolimus die NER-Kapazität nicht beeinflusst (Abbildungen 14 und 15). In einigen bisherigen Studien ergaben sich Hinweise auf eine verminderte DNA Reparatur, welche als mögliche Erklärung eines stark erhöhten Hautkrebsrisikos unter einer Cyclosporin A-Therapie dienen könnte. Diese wurde allerdings indirekt durch eine verminderte Tritium- oder 5'-Bromdesoxyuridin- (BrdU-) Aufnahme in Cyclosporin A-behandelten peripheren-Blut-mononukleären-Zellen (PBMC) und in der Epidermis von BALB/c-Mäusen gemessen (Herman *et al.*, 2002; Sugie *et al.*, 2002). In dieser Arbeit konnte durch Messung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur eine direkte Inhibierung von Cyclosporin A auf diesen Reparaturweg belegt werden. Interessanterweise konnte in 0,2 µM Cyclosporin A-kultivierten GM00637 Fibroblasten eine ähnlich niedrige Reparaturkapazität gemessen werden (Abbildung 14b) wie in Fibroblastenzelllinien von XP-Patienten, welche einen genetischen Defekt aufweisen (ca. 3%; Emmert *et al.*, 2002).

Ferner konnte bestätigt werden, dass die durch UVC-Strahlung generierten Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und Pyrimidin-6,4-Pyrimidon Photoprodukte (6-4PP) in Cyclosporin A-kultivierten GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten kaum eliminiert wurden, wohingegen in Everolimus-behandelten Zellen die Reparaturkinetik nicht beeinflusst wurde (Abbildungen 16 und 17). Eine Studie von Yarosh *et al.* (2005) konnte bereits zeigen, dass Cyclosporin A die Eliminierung von CPD in menschlichen Keratinozyten inhibiert. UV-induzierte 6-4PP entstehen ungefähr mit einer Frequenz von 20 bis 30% im Vergleich zur Menge an gebildeten CPD (Sinha *et al.*, 2002). Beide Photoprodukte spielen je nach Reparaturfähigkeit der Zelle in der UV-induzierten Apoptose und in der Karzinogenese eine unterschiedliche Rolle (de

Lima-Bessa *et al.*, 2008). Während in XP-defizienten Zellen beide Photoprodukte durch fehlende Reparatur zur Apoptose führen, induzieren in normalen Zellen vorwiegend 6-4PP Apoptose, CPD führen dagegen zum Zellzyklusarrest (Lo *et al.*, 2005). In NER-defizienten Zellen sind 6-4PP allerdings toxischer als CPD, da CPD von der Transläsionalen Synthese (TLS) durch Polymerase η umgangen werden können (Masutani *et al.*, 1999; de Lima-Bessa *et al.*, 2008). Dass eine fehlende Reparatur von 6-4PP ein erhöhtes Hautkrebsrisiko verursacht, zeigen Cockayne Syndrom- (CS)- und Trichothiodystrophie- (TTD)- Patienten, welche 6-4PP im Gegensatz zu CPD reparieren können und keinen Hautkrebs entwickeln, während XP-Patienten keine der beiden Photoprodukte reparieren können und ein vielfach erhöhtes Hautkrebsrisiko besitzen (Riou *et al.*, 2004). Dass Cyclosporin A die Reparatur von 6-4PP hemmt, wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt.

Die Ursache der unterschiedlichen biologischen Wirkungen von CPD und 6-4PP liegt in der Verteilung der Läsionen in der DNA und den unterschiedlichen Reparaturkinetiken. 6-4PP entstehen bevorzugt zwischen den Nukleosomen in *linker* DNA, während CPD auch in Bereichen der Nukleosomen generiert werden (Mitchell *et al.*, 1990; Gale *et al.*, 1990; Thoma, 1999). 6-4PP werden von der Nukleotid-Exzisions-Reparatur besser erkannt und dadurch schneller repariert (Courdavault *et al.*, 2005). Innerhalb der ersten 3 Stunden nach UV-Strahlung werden bereits 80 bis 90% 6-4PP repariert, während nach 6 Stunden nur ca. 20% CPD repariert werden und nach 24 h noch ca. 50 bis 60% an CPD vorhanden sind (Nakagawa *et al.*, 1998). UV-induzierte CPD werden bevorzugt von XPC und DDB2 detektiert (Hwang *et al.*, 1999; Wittschieben *et al.*, 2005), während XPA eine größere Affinität für 6-4PP aufweist (Jones *et al.*, 1993; Mellon *et al.*, 2002; Koberle *et al.*, 2006). Dass in dieser Arbeit die Eliminierung beider Photoprodukte in Cyclosporin A-behandelten Fibroblasten und Lymphoblasten inhibiert wurde, verdeutlicht, dass Cyclosporin A sowohl die Reparatur von CPD als auch von 6-4PP hemmt.

Die in dieser Arbeit dargestellten Daten lassen deutlich erkennen, dass Everolimus auf die Nukleotid-Exzisions-Reparatur keinen Einfluss hat. Klinische Studien offenbaren, dass mTOR-Inhibitoren einer Tumorprogression eher entgegenwirken können. Everolimus wird als immunsuppressive Therapie bevorzugt eingesetzt, da es das Nebenwirkungsspektrum in Bezug auf UV-induzierten Hautkrebs und anderen seltenen Hautkrebsarten wie Kaposi Sarkom deutlich reduziert (Stallone *et al.*, 2005; de Fijter, 2007; Meier *et al.*, 2009). In Abhängigkeit von UVB-Strahlung erhöht die mTOR vermittelte p70S6-Kinase-Aktivität die Matrix-Metalloproteinase 1- (MMP1-) Expression

(Brenneisen *et al.*, 2000). MMP1 kommt eine besondere Rolle in der Entwicklung von Hauttumoren zu, da eine UV-induzierte erhöhte Expression von MMP1 zu verstärktem Kollagenabbau und damit zu einem leichteren Metastasieren führt (Lemaitre *et al.*, 2006). Als mögliche Erklärung einer Anti-Tumor-Aktivität dient vor allem die Inhibierung des mTOR-Signalweges, welcher in vielen Tumorarten hyperaktiviert ist und zu einer verstärkten Angiogenese durch Hochregulierung von VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) führt, den Zellzyklus arretiert und die IL-10-Produktion erhöht (Guba *et al.*, 2002; Luan *et al.*, 2002; Nepomuceno *et al.*, 2003; Guertin *et al.*, 2005). Die Anti-Tumor-Aktivität von mTOR-Inhibitoren zeigte sich klinisch in einer Inhibierung des Wachstums von Rhabdomyosarkomen, Neuroblastomen, Glioblastomen oder auch B-Zell-Lymphomen (Huang *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2003). In Mäusen wurde das Wachstum von Plattenepithelkarzinomen reduziert (Khariwala *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde in Cyclosporin A-behandelten Mäusen ein verringertes UV-induziertes Hautkrebsrisiko nach Zugabe von Everolimus zu einer Cyclosporin A-basierten Therapie beschrieben (Wulff *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit ließ sich zwar keine eindeutige Anti-Tumor-Aktivität von Everolimus in Bezug zur DNA-Reparatur beobachten. Allerdings scheinen Everolimus-kultivierte GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten eine zum Teil bessere „UV-Schadensantwort“ als unbehandelte Zellen zu besitzen. Das relative Zellüberleben nach UV-Bestrahlung schien in Everolimus-kultivierten Fibroblasten und Lymphoblasten leicht höher zu sein als in unbehandelten Zellen (Abbildung 13). Die relative NER-Kapazität war unter Everolimus etwas höher im Vergleich zu normal kultivierten Zellen (Abbildung 15). Die Elimination der UV-induzierten Photoprodukte erfolgte in GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten nach 24 h etwas schneller als in unbehandelten Zellen (Abbildungen 16, 17a). Diese Ergebnisse sind statistisch nicht signifikant, weisen aber einen Trend zu einer besseren DNA-Reparaturfähigkeit von UV-induzierten DNA-Schäden in Everolimus-kultivierten Fibroblasten und Lymphoblasten auf, welcher einen Beitrag zum verminderten Hautkrebsrisiko unter mTOR-Inhibitor-Therapie leisten könnte.

4.2 Cyclosporin A reguliert die XP-Gene differenziell auf mRNA- und Proteinebene

Anhand von Zellkulturstudien zur Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden an normalen Lymphoblasten und Fibroblasten konnte dargestellt werden, dass Cyclosporin A im Gegensatz zu Everolimus die Nukleotid-Exzisions-Reparatur hemmt. Xeroderma Pigmentosum-Patienten besitzen ein mehr als 1000-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Hautkrebs aufgrund einer defekten Nukleotid-Exzisions-Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden, verursacht durch genetische Defekte der XP-Gene *XPA* bis *XPG*. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Cyclosporin A auf die Regulation der XP-Gene und Proteine untersucht. Damit sollte geklärt werden, ob die Cyclosporin A-induzierte NER-Inhibierung durch eine Modulation der XP-Gene verursacht wird.

Alle 7 XP-Gene, *XPA* bis *XPG*, sind essentiell an der NER beteiligt. Während in der transkriptionsgekoppelten Reparatur UV-induzierte DNA-Schäden von einem Komplex aus CSA/CSB und der Polymerase II erkannt werden, fungiert in der globalen Genomreparatur das XPC Protein als Schadenserkenner und initiiert die Reparaturkaskade. Die Helikasen XPB und XPD, Komponenten des TFIIH-Komplexes, entwinden den DNA-Strang. Das Entwinden führt zur Rekrutierung des XPA-RPA-Proteinkomplexes, welche den Schaden verifizieren und die Endonukleasen XPF und XPG zur Läsion dirigieren. Nachdem XPG in 3'-Richtung eingeschnitten hat, schneidet XPF zusammen mit ERCC1 den Strang in 5'-Richtung. Die Lücke wird anschließend neu synthetisiert und ligiert. In dieser Arbeit konnte in AG10107 Lymphoblasten und GM00637 Fibroblasten eine Cyclosporin A-vermittelte Herunterregulierung der XP-mRNA von *XPB*, *XPC*, *XPD* und *XPG* beobachtet werden. Auf Proteinebene verminderte Cyclosporin A in GM00637 Fibroblasten nur die Expression von XPA und XPG. In den folgenden Abschnitten werden diese Ergebnisse erläutert und diskutiert.

4.2.1 Cyclosporin A inhibiert die Expression des XPA-Proteins, nicht aber die Expression der XPA-mRNA

In dieser Arbeit ließ sich ein Cyclosporin A-Effekt auf das XPA-Protein, nicht jedoch auf die *XPA*-mRNA erkennen (Tabellen 21 und 22 und Abbildung 18). XPA stellt ein limitierendes Protein für eine erfolgreiche NER dar (Koberle *et al.*, 2006). Die Anzahl an XPA-Molekülen in einer Zelle ist mit 200000 ziemlich hoch und im Vergleich mit anderen NER-Proteinen am höchsten (Araujo *et al.*, 2001; Koberle *et al.*, 2006).

Im Gegensatz dazu ist die *XPA*-mRNA-Menge mit nur 5 bis 8 Transkripten pro Zelle ziemlich gering und zeigt, dass *XPA* konstitutiv auf sehr geringem Niveau exprimiert wird (Layher *et al.*, 1997). Nach UV-Strahlung erhöht sich die *XPA*-Proteinmenge nicht (Goukassian *et al.*, 2000). Wird die Menge an *XPA*-Protein auf unter 10% reduziert, kann die NER nicht mehr erfolgen (Koberle *et al.*, 2006). Die hohe Anzahl an *XPA*-Molekülen im Vergleich zu anderen NER-Faktoren unterstreicht die essentielle Bedeutung des *XPA*-Proteins in der NER. Die relativ geringe *XPA*-Transkriptmenge scheint nicht nur langlebiger als andere mRNA-Transkripte zu sein, sondern auch mit hoher Effizienz das *XPA*-Protein zu exprimieren, damit eine Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden ungehindert erfolgen kann. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass ein *XPA*-mRNA-Transkript mehrfach translatiert wird (Koberle *et al.*, 2006). Die Tatsache, dass durch UV-Strahlung das *XPA*-mRNA und -Protein nicht reguliert werden (Goukassian *et al.*, 2000), unterstreicht die Bedeutung einer vorrätigen *XPA*-Proteinmenge in der Zelle, welche transkriptionell nicht moduliert wird. Das in dieser Arbeit dargestellte Ergebnis einer Cyclosporin A-vermittelten Herunterregulierung von *XPA* auf Protein-, nicht aber auf mRNA-Ebene könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine transkriptionelle Regulation des *XPA*-Gens möglicherweise nicht erforderlich ist, um eine funktionsfähige NER-Kapazität zu leisten. Demnach hätte Cyclosporin A keinen Angriffspunkt auf die transkriptionelle Regulation von *XPA*.

Der *XPA*-Promotor zeigt sehr wenige mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die *XPA* negativ als auch positiv regulieren könnten. Ein positives Element im Promotor ist in der 5'-untranslatierten Region lokalisiert und könnte die Translation erhöhen (Topping *et al.*, 1995). Des Weiteren codiert das Exon 2 eine Bindedomäne für ERCC1 (Li *et al.*, 1995). Ein Protein, welches *XPA* auf transkriptioneller Ebene regulieren kann, ist HMGA1 (high-mobility group A1), ein Proto-Onkogen, welches in verschiedenen Krebsarten (Brustkrebs, Lungenkrebs, Leukämien) überexprimiert ist (Giannini *et al.*, 2005; Sgarra *et al.*, 2005; Liau *et al.*, 2006). Die Bindung von HMGA1 an das negative Kontrollelement des *XPA*-Promotors (-268 bis -276) führt zu einer verringerten *XPA*-mRNA-Expression und zu einer verminderten Reparatur von CPD nach UV-Strahlung (Adair *et al.*, 2007). Auf diese Weise könnte eine transkriptionelle Regulation von *XPA* die NER-Funktion modulieren. Da in dieser Arbeit keine Herunterregulierung der *XPA*-mRNA beobachtet wurde (Tabelle 21 und 22), könnte davon ausgegangen werden, dass eine verminderte NER nicht durch eine Modulation der *XPA*-mRNA sondern durch *XPA*-Proteinregulierung erfolgt. Da bisher keine weiteren transkriptionellen Regulationsmechanismen von *XPA* bekannt sind, ist zu vermuten, dass *XPA* möglicherweise posttranslational modifiziert werden kann. Wäre dies der Fall, könnte

die Cyclosporin A-vermittelte XPA-Protein-Herunterregulierung eventuell Ursache einer posttranslationalen Regulation sein.

XPA ist ein Zink-Finger Protein und spielt als Schadenserkenner und Schadensverifizierer sowohl in der globalen Genomreparatur (GGR) als auch in der transkriptionsgekoppelten Reparatur (TCR) eine wichtige Rolle. In der GGR akkumuliert es an DNA-Läsionen in Abhängigkeit von XPC (Rademakers *et al.*, 2003). Die funktionelle Form von XPA ist ein Homodimer, welches mit RPA (Replikationsprotein A) einen Komplex bildet (Yang *et al.*, 2002). Dieses Heterotrimer bindet in beiden Reparaturwegen an DNA-Läsionen und verifiziert den Schaden. Das XPA-Protein wandert als zwei unterschiedlich große Proteinbanden mit einer Größe von 38 kDa und 40 kDa im Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE). Diese zwei unterschiedlichen Banden wurden bereits von Miura *et al.* (1991) beschrieben, wobei die 38 kDa Proteinbande als ein Degradationsprodukt der 40 kDa definiert wurde. In dieser Arbeit reduzierte Cyclosporin A im Cytosol die 40 kDa Proteinbande, während im Kern durch Cyclosporin A beide Proteinbanden nicht mehr detektierbar waren (Abbildung 18). Die 40 kDa Proteinbande wird als eine posttranslational modifizierte Form von XPA beschrieben (Miura *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2006). Es ist allerdings bis jetzt nicht klar, ob die zwei detektierten Proteinbanden posttranslationale Modifikationen von XPA darstellen oder nicht. Durch UV-Strahlung kann XPA zwar phosphoryliert werden, doch diese Modifikation ist als dritte Bande oberhalb von 40 kDa im SDS-PAGE sichtbar (Wu *et al.*, 2006). Es ist eher unwahrscheinlich, dass die zwei verschiedenen XPA-Proteinbanden unterschiedliche Reduktionszustände aufgrund von Disulfidbrücken darstellen, da Iakoucheva *et al.* (2001b) die Cysteine von XPA als reduzierend identifizierten und somit keine Disulfidbrücken detektiert werden konnten (Iakoucheva *et al.*, 2001b; Wu *et al.*, 2006). Die in dieser Arbeit durchgeführten Western Blot Analysen erfolgten mit SDS und β -Mercaptoethanol unter reduzierenden Bedingungen. Daher kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den zwei verschiedenen XPA-Proteinbanden um Disulfidbrücken handelt. Eine definitive Erklärung für das Auftreten dieser zwei Banden konnte auch in dieser Arbeit nicht gefunden werden. Weiterführende Untersuchungen wären daher interessant, welche Aufschluss über die Cyclosporin A-induzierte verminderte 40 kDa Proteinbande geben könnten.

Die Möglichkeit, dass im Western Blot das 34 kDa große Replikationsprotein A (RPA) detektiert wurde, kann ebenfalls ausgeschlossen werden, denn RPA komplexiert nur durch UV-Strahlung mit XPA (Yang *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003). Der XPA/RPA-

Komplex erhöht zwar die Bindung an DNA-Läsionen, dennoch können sowohl das XPA-Monomer als auch das XPA-Dimer an schadhafte DNA binden, wobei das XPA-Dimer eine höhere Affinität zu DNA-Läsionen besitzt (Yang *et al.*, 2002 ;Liu *et al.*, 2005). RPA besteht aus drei Untereinheiten (70 kDa, 34 kDa, 11 kDa) von denen die 70 kDa-Untereinheit innerhalb der DNA-Bindedomäne von XPA (AS 153-176) bindet, während die 34 kDa-Untereinheit im N-Terminus von XPA (AS 1-58) bindet (Stigger *et al.*, 1998; Buchko *et al.*, 1998). RPA kann auch unabhängig von XPA an UV-geschädigte DNA binden, und assistiert wahrscheinlich auch bei der Synthese und Ligation des neuen DNA-Abschnittes (Rademakers *et al.*, 2003). Die p34 Untereinheit von RPA kann phosphoryliert werden und könnte die DNA-Replikation und Rekombination regulieren (Oakley *et al.*, 2001). Auf die Interaktion mit XPA oder auf die NER-Funktion hat die phosphorylierte Form von RPA allerdings keinen Einfluss (Stigger *et al.*, 1998). Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass Cyclosporin A über RPA zu einer verminderten XPA-Proteinmenge führt. Dies könnte allerdings Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein, um eine Interaktion von Cyclosporin A mit RPA auszuschließen.

4.2.2 Cyclosporin A inhibiert die Expression der XPG-mRNA und des XPG-Proteins

Die Beobachtung, dass Cyclosporin A sowohl die XPG-mRNA als auch das XPG-Protein herunterregulierte, deutet auf eine funktionelle Bedeutung auf die durch Cyclosporin A verminderte NER. Tatsächlich ließ sich durch Überexpression des XPG-Proteins die verminderte NER in Cyclosporin A-kultivierten Fibroblasten vollständig korrigieren (Abbildung 20). Das XPG-Protein besitzt in der NER mehrere Funktionen: zum einen stabilisiert es den TFIIH-Komplex, zum anderen koordiniert es die Endonukleaseaktivität von XPF, und es rekrutiert die Proteine PCNA, DNA Polymerase delta und DNA Ligase I für die Strangsynthese (Gary *et al.*, 1997; Constantinou *et al.*, 1999; Araujo *et al.*, 2001; Reardon *et al.*, 2003). Überdies kommt dem XPG-Protein auch eine Funktion in der Basen-Exzisions-Reparatur (BER) zu: es stimuliert die Bindung der Glykolyase NTH1 an schadhafte DNA, welche oxidative DNA-Schäden eliminiert. Die Reparatur oxidativer DNA-Schäden ist zum Beispiel bei *XPG-Missense-Mutationen* noch intakt (Cooper *et al.*, 1997; Le *et al.*, 2000). Cyclosporin A könnte demzufolge auch die BER über XPG beeinflussen. Da XPG im Komplex mit TFIIH auch in der Transkription eine Rolle spielt (Ito *et al.*, 2007), könnte die Cyclosporin A-induzierte Herunterregulierung von XPG auch die generelle Transkription beeinflussen.

Bartels *et al.* (2007) konnten eine prozessive Funktion von XPA auf die Endonukleasen XPF und XPG feststellen. Allerdings zeigten Rademakers *et al.* (2003), dass die Rekrutierung von XPG unabhängig von XPA erfolgt. In XPA-defizienten Zellen können XPF und XPG den schadhaften Strang nicht mehr schneiden (Feng *et al.*, 1997). Der Cyclosporin A-Effekt auf XPG könnte demnach zusätzlich durch die Inhibierung von XPA erfolgen. Es bleibt allerdings zu klären, ob Cyclosporin A eine direkte Interaktion zwischen XPA und XPG inhibiert.

4.2.3 Cyclosporin A inhibiert die Expression der XPC-mRNA, nicht aber die Expression des XPC-Proteins

In dieser Arbeit konnte in beiden Cyclosporin A-behandelten GM00637 Fibroblasten und AG10107 Lymphoblasten eine reduzierte XPC-mRNA-Menge detektiert werden (Tabelle 21 und 22). Die durch Cyclosporin A verminderte XPC-mRNA-Expression scheint allerdings keine direkte funktionelle Rolle in der Cyclosporin A-induzierten NER-Inhibierung zu spielen, denn ein Cyclosporin A-Effekt auf das XPC-Protein ließ sich nicht beobachten (Abbildung 18). Die XPC-Proteinmenge ist mit nur ca. 25000 Molekülen pro Zelle im Vergleich zu allen anderen NER-Proteinen am geringsten (Araujo *et al.*, 2001). Die XPC-mRNA-Menge weist mit 10 Transkripten pro Zelle eine normale bis leicht erhöhte Transkriptionsaktivität auf (Lockhart *et al.*, 2000; Warrington *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2002). Nach UV-Strahlung ist eine Zunahme an XPC mRNA und -Protein zu beobachten (Adimoolam *et al.*, 2002; Ferguson *et al.*, 2005).

Die Wirkung von Cyclosporin A auf die XPC-mRNA, nicht aber auf das XPC-Protein, könnte sich durch transkriptionelle Regulation von XPC erklären lassen. Die Transkription von XPC wird über Hypermethylierungen des Promotors reguliert, was zu einer verminderten Proteinmenge führt (Wu *et al.*, 2007b). Diese transkriptionelle Modifikation scheint eine wichtige Rolle für die XPC-Genexpression darzustellen, welche mit einer verringerten DNA-Reparaturfähigkeit assoziiert ist und bisher vor allem bei der Entstehung von Lungentumoren beschrieben wurde (Wu *et al.*, 2007b). In dieser Arbeit wurden Hypermethylierungen des XPC-Promotors allerdings nicht untersucht. Im Promotor von XPC gibt es verschiedene mögliche Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren OCT-1, EGR-1, Sp1, AP-1, E2F1 sowie für p53 (Adimoolam *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2007b; Lin *et al.*, 2009). Der von Calcineurin regulierte Transkriptionsfaktor NFAT kann mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel mit AP-1, EGR-1 und Sp1 kooperativ an DNA binden und die Transkription regulieren

(Rao *et al.*, 1997; Santini *et al.*, 2001). Calcineurin beeinflusst die Interaktion des Transkriptionsfaktors NFAT mit den Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 und damit die Sp1/Sp3-abhängige Transkription des Cdk-Inhibitor 1 (p21; Santini *et al.*, 2001). Wird p21 aktiviert, arretiert es den Zellzyklus, und spielt besonders bei der Keratinozyten-Differenzierung eine bedeutende Rolle (Santini *et al.*, 2001; Gartel *et al.*, 2005). In der Studie von Santini *et al.* (2001) konnte Cyclosporin A die Promotor-Aktivität von p21 inhibieren und die p21-Proteinexpression vermindern. Basierend auf dieser Studie wäre daher zu vermuten, dass die XPC-mRNA-Expression über eine kooperative Bindung von NFAT mit den Transkriptionsfaktoren Sp1, AP-1 und EGR-1 reguliert wird und diese Calcineurin-sensitiv ist. Für eine Erklärung der Cyclosporin A-vermittelten XPC-mRNA-Herunterregulierung wäre es daher interessant zu untersuchen, ob XPC auf mRNA-Ebene durch diese Transkriptionsfaktoren reguliert werden könnte.

Die Kenntnis von XPC-Interaktionspartnern, über die Cyclosporin A die XPC-mRNA möglicherweise herunterregulieren und das XPC-Protein dennoch stabilisieren könnte, würde einen zusätzlichen Hinweis für die Cyclosporin A-induzierte verminderte XPC-mRNA-, nicht aber XPC-Proteinmenge geben. XPC bildet zusammen mit hHR23B und Zentrin 2 einen Komplex und fungiert als Schadenserkenner in der globalen Genomreparatur (Evans *et al.*, 1997b). Das Protein Zentrin 2, welches die Zentromerformierung reguliert, stabilisiert XPC zusätzlich an die DNA und koppelt die NER vermutlich an die Zellteilung (Araki *et al.*, 2001). Zu den weiteren Faktoren, welche in der Schadenserkennung involviert sind, gehören, TFIIH, DDB2 und p53. Der XPC-hHR23B-Komplex interagiert mit TFIIH und rekrutiert ihn zur Schadensstelle (Araujo *et al.*, 2001). Das DDB1/DDB2 Proteindimer akkumuliert unabhängig von XPC an CPD und die Überexpression an DDB2 erhöht die Rekrutierung von XPC an DNA-Läsionen (Fitch *et al.*, 2003). Weiterhin stimuliert p53 die Transkription von XPC und DDB2 und deren Rekrutierung an schadhafte DNA (Adimoolam *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2002b; Wang *et al.*, 2004). DDB2 ist mit p53 nur in der globalen Genomreparatur und nicht in der transkriptionsgekoppelten Reparatur beteiligt (Ford *et al.*, 1997). Durch UV-Strahlung wird das XPC-Protein durch SUMO-1 und Ubiquitin modifiziert (Wang *et al.*, 2005). Diese Modifikationen können nur in Anwesenheit der XPA- und DDB2-Proteine erfolgen. Während die Ubiquitylierung Proteine zum Degradieren bringt, reguliert die Sumoylierung die Transkription, inhibiert die Ubiquitylierung und erleichtert Protein-Protein-Interaktionen sowie -Lokalisationen (Gill, 2004; Johnson, 2004). DDB2 könnte nach seiner Funktion als Schadenserkenner durch XPC-Sumoylierung die Rekrutierung und Bindung von XPC an die DNA-Läsion zusätzlich erleichtern und anschließend XPC ubiquitinieren (Sugasawa *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005).

Interessanterweise wird in XPA- und XPE-defizienten Zellen XPC nicht modifiziert (Sugasawa *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). XPA und DDB2 könnten durch Ubiquitylierung und Sumoylierung des XPC-Proteins den XPC-hHR23B-Komplex stabilisieren.

Es wäre möglich, dass sich der in dieser Arbeit gezeigte immunchemische Nachweis einer unveränderten XPC-Proteinmenge in Cyclosporin A-behandelten GM00637 Fibroblasten durch Sumoylierung über XPA und/oder DDB2 erklären lässt. Dadurch würde das XPC-Protein nicht abgebaut werden. Zwar ist eine Sumoylierung und Ubiquitylierung bisher nur nach UV-Strahlung beobachtet worden (Wang *et al.*, 2005), allerdings könnte eine verminderte Funktion eines NER-Proteins – in diesem Fall XPA – zu einer erhöhten Funktion anderer NER-Proteine führen, um DNA-Schäden vollständig reparieren zu können. Da Cyclosporin A die XPA-Proteinexpression verminderte, auf DDB2 allerdings keinen Einfluss zeigte (Abbildung 18), könnte DDB2 die Degradation des XPC-Proteins unterbinden. Somit ließe sich eine unveränderte XPC-Proteinmenge in Cyclosporin A-behandelten Fibroblasten erklären. Die könnte Ziel weiterer Untersuchungen sein.

4.2.4 Cyclosporin A inhibiert die Expression der XPB- und XPD-mRNA, nicht aber die Expression der XPB- und XPD-Proteine

Die durch Cyclosporin A-verminderte *XPB*- und *XPD*-mRNA Expression (Tabelle 21 und 22) und die unveränderte *XPB*- und *XPD*-Proteinexpression (Abbildung 18) deuten darauf hin, dass die funktionelle Inhibierung der NER durch Cyclosporin A nicht durch Hemmung dieser beiden Helikasen *XPB* und *XPD* erfolgte. Die beiden Helikasen *XPB* und *XPD* gehören zum TFIIH-Komplex (Schultz *et al.*, 2000). Dieser Komplex ist in die Transkription, Zellzykluskontrolle und NER involviert (Drapkin *et al.*, 1994). Die 3`-5`Helikase-Aktivität von *XPB* ist sowohl für die NER als auch für die Transkription notwendig, dagegen hat die 5`-3`Helikase-Aktivität von *XPD* nur Helikasefunktion in der NER und wird in der Transkription eine stimulatorische oder strukturelle Funktion zugeschrieben (Winkler *et al.*, 2000). *XPD* reguliert die Kinaseaktivität der CAK (Cdk-aktivierender Kinasekomplex)-Untereinheit von TFIIH und verbindet die beiden Untereinheiten des TFIIH miteinander (Chen *et al.*, 2003a; Ito *et al.*, 2007).

Eine in dieser Arbeit gezeigte veränderte *XPB*- und *XPD*-mRNA Expression durch Cyclosporin A könnte möglicherweise Ursache einer indirekten Regulierung durch andere Proteine sein, die sich nur auf mRNA- nicht aber auf Proteinebene zeigt. Ein

besonders interessantes Beispiel wäre die Interaktion von XPB und XPD mit p53 (Wang *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2000). Das Tumorsuppressorprotein p53 hat eine zentrale Bedeutung für die UV-induzierte Krebsentstehung, da es bei Aktivierung durch UV-Strahlung als Transkriptionsfaktor den Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur oder Apoptose induzieren kann (Wang *et al.*, 1995; Latonen *et al.*, 2005). In Abhängigkeit von UV-Strahlung wird p53 entweder eine apoptotische Funktion oder eine NER-Funktion zugeschrieben (Li *et al.*, 1998). In XPD-defizienten Zellen ist die p53-induzierte Apoptose reduziert, was vermuten lässt, dass XPD die Aktivität von p53 reguliert (Robles *et al.*, 1999). Umgekehrt hemmt p53 die Helikaseaktivität von XPB und XPD (Leveillard *et al.*, 1996). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang eine Studie von Sugie *et al.* (2002) welche zeigte, dass Cyclosporin A die p53-Funktion inhibieren kann und eine verminderte NER durch Interaktion von Cyclosporin A mit p53 erfolgt. Bisher wurde diese Interaktion von Cyclosporin A mit p53 nicht genauer charakterisiert. Dies wäre im Zusammenhang mit der Cyclosporin A-vermittelten mRNA-Herunterregulierung von *XPB* und *XPD* eine interessante Fragestellung, die weiter untersucht werden könnte.

4.3 XPA und XPG, aber nicht XPC, komplementieren die Cyclosporin A-induzierte NER-Inhibierung

In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Cyclosporin A-induzierte NER-Inhibierung in GM00637 Fibroblasten durch die XP-Proteine XPA und XPG, nicht aber durch XPC, vollständig komplementiert werden kann (Abbildung 20). Eine XPC-Protein-Überexpression konnte den Cyclosporin A-Effekt nicht korrigieren. Über die Proteine XPA und XPG wurde demzufolge die Cyclosporin A-Wirkung vermittelt. Dementsprechend stimmen die immunhistochemischen Nachweise einer verminderten Expression der Proteine XPA und XPG in GM00637 Fibroblasten mit den funktionellen Komplementierungsdaten überein.

XP-Zelllinien zeigen zum Teil gar keine funktionsfähige NER. Bei XPA-Patienten liegt dies an einer stark verminderten mRNA- und Protein-Expression, die zum Teil bis auf 5% reduziert ist (Satokata *et al.*, 1990; Miyamoto *et al.*, 1992; Vogel *et al.*, 2000; Sidwell *et al.*, 2006). Die defekte XPA-Zelllinie XP2OS hat eine mRNA-Expression von nur noch 12,5% im Vergleich zu normalen GM00637 Fibroblasten (Levy *et al.*, 1995). In dieser Arbeit wurde in dieser XPA-defizienten Zelllinie die defekte NER bestätigt (Abbildung 21), welche nach Überexpression des XPA-Proteins anstieg. Alleinig konnte

Cyclosporin A die angestiegene NER nicht wieder inhibieren. Dies bestätigt erneut, dass XPA-Überexpression den Cyclosporin A-Effekt komplementieren kann. Die NER in der XPC-defizienten Zelllinie XP4PA-SV-EB, in denen das XPC-Protein transient überexprimiert wurde, war in dieser Arbeit unter dem Einfluss von Cyclosporin A weiterhin reduziert (Abbildung 22). Auch diese Daten stimmen mit der funktionellen Komplementierung in GM00637 Fibroblasten überein, in denen die XPC-Überexpression die Cyclosporin A-induzierte NER-Inhibierung ebenfalls nicht korrigieren kann (Abbildung 20).

Eine Erklärung für die unveränderte NER in Cyclosporin A-kultivierten XP2OS-Zellen, die transient (*XPA*-Gen unter der Kontrolle eines SV40-Promotors) oder stabil (*XPA*-Gen unter der Kontrolle eines CMV-chicken Promotors) transfiziert worden sind, könnte in der Menge des exprimierten XPA Proteins liegen. Die Überexpression von XPA könnte in einer so großen XPA-Proteinmenge in den Zellen resultieren, dass der inhibitorische Effekt von Cyclosporin A auf die NER nicht mehr detektierbar ist. Transfektionsstudien mit XPA zeigten eine mehr als 14-fach höhere XPA-Proteinmenge in der stabil transfizierten XP2OS-pCAH19WS Zelle im Vergleich zu normalen GM00637 Fibroblasten (Levy *et al.*, 1995). Es ist bekannt, dass die NER erst bei einer verminderten XPA-Proteinmenge von 10% nicht mehr funktionell ist (Koberle *et al.*, 2006). Eine inhibitorische Wirkung von Cyclosporin A auf das XPA-Protein wäre nach Überexpression von XPA in der funktionellen NER somit nicht mehr nachweisbar.

Eine andere Begründung für den fehlenden Cyclosporin A-Effekt in beiden transient oder stabil transfizierten XPA-defizienten XP2OS-Zelllinien wären regulatorische Sequenzabschnitte in der 5'-untranslatierten Region des XPA-Gens, welche auf dem transfizierten Expressionsvektor (pXPA) nicht mehr codiert sind. Das HMGA1-Onkogen, welches in verschiedenen Tumorarten hochreguliert ist, bindet zum Beispiel in der 5'-untranslatierten Region von XPA und ist ein negativer Regulator der XPA-Transkription (Adair *et al.*, 2007). Es ist unklar, ob Cyclosporin A die HMGA1-Bindung an XPA verstärken könnte. Allerdings reguliert HMGA1 in Abhängigkeit von Sp1 die Transkription des Insulin-Rezeptors (Foti *et al.*, 2003; Kolb *et al.*, 2007) und wie oben erwähnt, interagiert Calcineurin mit Sp1 (Santini *et al.*, 2001). Falls XPA in seiner 5'-untranslatierten Region zusätzlich auch positive regulatorische Abschnitte enthält, welche durch Cyclosporin A inhibierbar wären, würde dies zu einer Hemmung von XPA und damit zu einer verminderten NER führen. Ein Cyclosporin A-Effekt auf die NER von XP2OS-Zellen bliebe daher durch fehlende 5'-untranslatierte Regionen aus.

Da beide XPA-defizienten XP2OS-Zelllinien, sowohl die transient als auch die stabil XPA-überexprimierenden, alle anderen XP-Proteine normal exprimieren, wäre anzunehmen, dass sich der in dieser Arbeit gezeigte inhibitorische Effekt von Cyclosporin A auf XPG in GM00637 Fibroblasten in einer zusätzlichen Verminderung der NER in beiden XPA-defizienten XP2OS-Zelllinien zeigt. Dies wurde allerdings in dieser Arbeit nicht beobachtet. Cyclosporin A könnte womöglich eine unterschiedlich starke inhibitorische Wirkung auf die Proteine XPA und XPG besitzen. Diese wurde in GM00637 Fibroblasten immunchemisch zwar nicht nachgewiesen, allerdings könnte in den XPA-Zelllinien die inhibitorische Wirkung auf XPG viel geringer und damit nicht detektierbar sein.

Die fehlende Cyclosporin A-Wirkung könnte sich ferner in einer regulatorischen Funktion von XPA auf XPG begründen. Da in normalen GM00637 Fibroblasten die Überexpression von XPA oder XPG jeweils den Cyclosporin A-Effekt vollständig komplementieren konnte (Abbildung 20), liegt die Vermutung nahe, dass diese beiden Proteine miteinander interagieren könnten. Bisher wurde gezeigt, dass die XPG-Endonukleaseaktivität von XPA abhängig ist (Evans *et al.*, 1997a). Auch Bartels *et al.* (2007) demonstrierten in ihren Arbeiten, dass XPA ein prozessiver Faktor für die Aktivität der Endonukleasen XPF und XPG darstellt. Im N-Terminus von XPA kann ERCC1 binden, was für die NER-Aktivität essentiell ist (Li *et al.*, 1995). Zudem ist auch die DNA-Bindedomäne von XPA für eine normale Endonukleaseaktivität essentiell (Bartels *et al.*, 2007). Interessanterweise wird XPA durch UV-Strahlung am Serin 196 innerhalb der DNA-Bindedomäne durch ATR phosphoryliert (Wu *et al.*, 2006). Eine regulatorische Funktion auf XPF und XPG könnte dadurch ausbleiben. In den XPA-komplementierten XP2OS-Zellen könnte die Überexpression von XPA das XPG-Protein soweit stabilisieren, dass die Cyclosporin A-Inhibierung auf XPG nicht mehr vorhanden ist und die NER unverändert bleibt. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob ein ähnlicher Cyclosporin A-Effekt auf die NER in XPG-defizienten und XPG-komplementierten Zellen zu beobachten ist.

4.4 Calcium, Calcineurin und CREB sind in die NER involviert

Die in dieser Arbeit bisher dargestellten Ergebnisse einer Cyclosporin A-induzierten Hemmung der NER durch Inhibierung des XPA- und XPG-Proteins führten zu der Frage, wie Cyclosporin A diese Inhibierung herbeiführt. Da Cyclosporin A seine immunsuppressive Wirkung über eine Hemmung der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin erzielt (Ho *et al.*, 1996), wurde untersucht, ob Cyclosporin A die Hemmung der NER über diese Phosphatase vermittelt. Da Calcineurin Calcium-abhängig ist, wurde zuvor der Einfluss von Calcium auf die NER ermittelt. Ferner wurde die Bedeutung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP-responsives-Element-bindendes Protein), welcher durch Calcineurin reguliert wird, auf die NER untersucht.

4.4.1 Calcium moduliert die NER

Die Kultivierung der GM00637 Fibroblasten mit dem Calcium-Ionophor A23187 ließ deren intrazelluläre Calciumkonzentration ansteigen. Dies wiederum führte zu einer Erhöhung der NER (Abbildung 23). Es gibt vereinzelt Literaturhinweise, dass Calcium spontane und auch UV-induzierte DNA-Reparatur moduliert (Gafter *et al.*, 1997; Ahlers *et al.*, 1999; Ori *et al.*, 2005). Calcium spielt eine essentielle Rolle in der Aktivierung der für die Immunantwort relevanten Gene (Feske *et al.*, 2001). In Lymphozyten wurde durch UV-Strahlung ein Anstieg der Calcium-Konzentration im Cytosol beobachtet (Gafter *et al.*, 1997). Eine geschädigte DNA-Reparaturfähigkeit wurde daher mit einem gestörten Calcium-Metabolismus, zum Beispiel durch Inhibierung der Tyrosin-Phosphatase, in Zusammenhang gebracht (Gafter *et al.*, 1997). Der in dieser Arbeit gezeigte Anstieg der NER in GM00637 Fibroblasten durch Calcium unterstützt damit bisherige Studien einer Calcium-vermittelten DNA-Reparatur.

4.4.2 Calcineurin moduliert die NER

Die Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin (PP2B) wird von Calcium aktiviert. Bei einer zu geringen Calcium-Konzentration liegt Calcineurin inaktiv vor (Rusnak *et al.*, 2000). Calcineurin wird ubiquitär exprimiert, und man geht davon aus, dass Zelltypen mit geringer Calcineurin-Konzentration sensitiver gegenüber Calcineurin-Inhibitoren

sind als Zelltypen mit einer höheren Calcineurin-Konzentration (Crabtree, 1999). Es gibt Hinweise, dass Calcineurin in epidermalen Keratinozyten funktionell relevant ist (Al-Daraji *et al.*, 2002). In Fibroblasten scheint es in die Kollagensynthese involviert zu sein (Chen *et al.*, 2003b). Die immunsuppressive Wirkung von Cyclosporin A wird durch Inhibierung von Calcineurin erzielt. Ob die in dieser Arbeit gezeigte NER-Inhibierung von Cyclosporin A auch über eine Hemmung von Calcineurin vermittelt wird oder ob dies ein Calcineurin-unabhängiger Cyclosporin A-Effekt ist, war bisher unklar. In dieser Arbeit konnte erstmals ein direkter funktioneller Zusammenhang zwischen Calcineurin und DNA-Reparatur belegt werden. Es wurde demonstriert, dass Calcineurin die NER modulieren kann, da die Überexpression von Calcineurin in GM00637 Fibroblasten zu einer stark erhöhten DNA-Reparaturfähigkeit führte (Abbildung 24) und die Herunterregulierung von Calcineurin durch RNAi die NER stark verminderte (Abbildung 25). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Cyclosporin A-induzierte Inhibierung der NER über Calcineurin vermittelt wird, da die Überexpression von Calcineurin zu einer kompletten Korrigierung der verminderten NER in Cyclosporin A-behandelten Zellen führte (Abbildung 24).

Auch andere Serin-Threonin-Phosphatasen wie PP1 oder PP2A könnten zu einer Modulation der DNA-Reparatur beitragen. Diese Phosphatasen sind Calcium-unabhängig (Cohen, 1997). Typ 1 Phosphatasen (PP1) dephosphorylieren die Beta-Untereinheit von Phosphorylase-Kinasen, Typ 2 Phosphatasen (PP2A, PP2B, PP2C) dagegen die Alpha Untereinheit (Rusnak *et al.*, 2000). PP1 und PP2A können durch Okadainsäure, Tautomycin, Fostriecin und Microcystin-LR inhibiert werden (Clarke *et al.*, 1993; Walsh *et al.*, 1997; Honkanen *et al.*, 2002). Herman *et al.* (2002) zeigten, dass die DNA-Reparatur in peripheren-Blut-mononucleären-Zellen (PBMC) mit der Phosphataseaktivität von PP1, nicht aber von PP2A korrelierte. Dabei wurde die Phosphataseaktivität indirekt durch einen Phosphatase-Inhibitor und anhand von freigesetztem anorganischem Phosphat gemessen. Ariza *et al.* (1996) beobachteten in HeLa-Zellextrakten eine verminderte NER durch Inhibierung von PP1 und PP2A, welche durch PP2A-Zugabe wieder korrigiert wurde. Daher könnten auch andere Phosphatasen in der NER involviert sein. Diese Vermutung würde mit den in dieser Arbeit gezeigten RNAi-Experimenten übereinstimmen, bei denen eine Calcineurin-Herunterregulierung die NER nicht weiter als auf 50% reduzieren konnte.

Die interessante Frage, wie Calcineurin selbst reguliert wird, könnte einen weiteren Hinweis auf die funktionelle Rolle von Calcineurin in der NER liefern. Calcineurin kann durch Proteinkinase C, Kaseinkinase I und II sowie durch ERK 1 (extrazellulär signal-

regulierte Kinase 1) phosphoryliert werden. Durch Ca^{2+} /Calmodulin kann diese Phosphorylierung verhindert werden (Rusnak *et al.*, 2000). Da phosphoryliertes Calcineurin ebenfalls von Calmodulin gebunden und aktiviert werden kann, ist bisher unklar, ob diese Art der Regulation einen Effekt auf die Calcineurin-Aktivität hat. Interessanterweise stimuliert die Überexpression von Proteinkinase C oder ERK 1/2 die NER-Aktivität (Lin *et al.*, 2003; Louat *et al.*, 2004). Falls eine erhöhte NER-Aktivität durch ERK 1 bzw. Proteinkinase C über eine verstärkte Calcineurin-Aktivität durch Calcineurin-Phosphorylierung vermittelt wäre, könnte dies ein zusätzlicher Hinweis auf die regulatorische Funktion von Calcineurin auf die NER sein. Tiu *et al.*, (2006) detektierten in Cyclosporin A-behandelten Plattenepithelkarzinomzellen eine verminderte Expression von ERK 1. Die Rolle der Calcineurin-Regulierung über ERK 1 bzw. Proteinkinase C könnte somit ein interessanter Ansatzpunkt sein für weiterführende Untersuchungen bezüglich der Calcineurin-Funktion in der NER, welche durch Cyclosporin A inhibiert wird.

4.4.3 Calcineurin moduliert die Proteine XPA und XPG

In dieser Arbeit konnte eine Modulation der Proteine XPA und XPG durch Calcineurin beobachtet werden. Eine Herunterregulierung von Calcineurin mittels RNAi führte zu einer verminderten Proteinexpression von XPA und XPG (Abbildung 26). Dieses Ergebnis verifiziert die inhibitorische Wirkung von Cyclosporin A auf die XPA- und XPG-Proteinexpression (Abbildung 18) und verdeutlicht den Einfluss von Calcineurin auf die XPA- und XPG-Proteine, über welche eine NER-Modulierung vermittelt wird. Die Beobachtung, dass eine Calcineurin-Herunterregulierung durch RNAi sowohl die Proteinexpression von XPA als auch von XPG vermindert, unterstützt die in dieser Arbeit bereits diskutierte Vermutung einer Interaktion der beiden Proteine XPA und XPG (Kapitel 4.3).

Ausgehend von diesen Ergebnissen stellte sich die Frage, wie Calcineurin die NER und das XPA- und XPG-Protein modulieren könnte. Calcineurin könnte über posttranslationale Modifikationen, zum Beispiel durch Dephosphorylierungen, die NER modulieren. Es gibt bereits Studien, die zeigen, dass Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen wichtige Regulationsmechanismen in der DNA-Reparatur darstellen. PP2A zum Beispiel kann durch Dephosphorylierung von p53 nach erfolgreicher NER die Zellzyklusfunktion wiederherstellen (Mi *et al.*, 2009). Es ist bisher nicht bekannt, ob neben PP2A auch Calcineurin (PP2B) zu einer Dephosphorylierung

von p53 beitragen könnte. Da eine Inhibierung von Cyclosporin A eine verminderte Phosphataseaktivität von Calcineurin zur Folge hat, könnte eine mögliche p53-Hemmung durch Calcineurin vielleicht die normale Zellzyklusfunktion als auch die DNA-Reparatur beeinflussen. Dies wäre ein interessanter Ansatz für weitere Untersuchungen bezüglich möglicher Interaktionen von Calcineurin mit p53.

Eine Studie von Coin *et al.* (2004) zeigte, dass XPB an Serin 751 durch die Kaseinkinase 2 phosphoryliert werden kann und dies zu einer verminderten NER führt, die Transkriptionsfunktion aber intakt lässt. Diese Phosphorylierung hat auf die XPB-Helikaseaktivität selbst keinen Einfluss, sondern verhindert die XPF Nukleaseaktivität und kontrolliert die NER zusätzlich (Coin *et al.*, 2004). XPB muss daher nach Öffnung des DNA-Doppelstranges dephosphoryliert werden. Die Dephosphorylierung von XPB durch PP2A ermöglicht den korrekten 5'-Schnitt von XPF und sichert die Fortführung der NER (Coin *et al.*, 2004). Basierend auf den in dieser Arbeit dargestellten immunchemischen Nachweisen, dass das XPB-Protein unter Cyclosporin A nicht vermindert exprimiert wurde (Abbildung 18), ist es eher unwahrscheinlich, dass Calcineurin analog zu PP2A XPB dephosphorylieren könnte. Da die Studie von Coin *et al.* (2004) jedoch die Möglichkeit einer posttranslationalen Modifikation von XPB durch PP2A aufzeigt, wäre es denkbar, dass auch andere XP-Proteine durch Phosphatasen reguliert werden könnten. Die Möglichkeit einer posttranslationalen Modifikation von XPA und XPG durch Calcineurin wäre daher ein interessanter Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen.

Phosphorylierungen verschiedener NER-Proteine können zu einer positiven oder negativen Regulation der NER-Aktivität führen (Wu *et al.*, 2007a). UV-Strahlung induziert ATR-abhängige Signalwege, welche den Zellzyklus arretieren, die Transkription blockieren oder die NER regulieren können (Sancar *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2007a; Huen *et al.*, 2008). Die Kinasen ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3-related*) gehören zu der Phosphatidylinositol-3-Kinase-ähnlichen Kinaseproteinfamilie (PIKK, Abraham, 2001). Zu den Aufgaben beider Kinasen zählt die Kontrolle verschiedener Signalkaskaden, welche den Zellzyklus, die Transkription, die DNA-Reparatur und Apoptose induzieren (Zhou *et al.*, 2000; Kastan *et al.*, 2000). Die Kinase ATR hat für die NER-Funktion insofern Bedeutung, da sie die für die NER notwendigen Proteine XPA, CEP164 (zentrosomales Protein 164 kDa) und Chk1 (Checkpoint-Kinase 1) phosphorylieren kann (Wu *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2009). Neben dem im N-Terminus von XPA codierten Kernlokalisierungs-Signal (NLS), welches XPA vom Cytosol in den Kern dirigiert, kann

eine XPA-Lokalisation in den Kern auch durch Phosphorylierung erfolgen (Iakoucheva *et al.*, 2001a). Dabei phosphoryliert ATR als UV-Schadensantwort XPA innerhalb seiner DNA-Bindedomäne (Wu *et al.*, 2006). Durch diese Phosphorylierung kann XPA in den Kern translozieren (Wu *et al.*, 2007a). Da erst 16 h nach UV-Strahlung das XPA-Protein phosphoryliert vorliegt und XPA während der NER in unphosphoryliertem Zustand agiert, könnte die phosphorylierte Form von XPA daher eine NER-Funktion bei anhaltenden DNA-Schäden haben, welche durch die Kontrollfunktion von ATR später eliminiert werden könnte (Wu *et al.*, 2006). Ein weiteres Protein, das nach UV-Strahlung durch ATR phosphoryliert wird, ist das zentrosomale Protein CEP164, welches an die AS 4 bis 97 des XPA-Proteins bindet und damit die Lokalisation an den schadhaften Strang erhöht (Pan *et al.*, 2009). Umgekehrt wird für eine Cep164 Lokalisation an UV-induzierte CPD das XPA-Protein benötigt. Die durch ATR phosphorylierten Proteine XPA und Cep164 sind wiederum für eine Phosphorylierung der Chk1-Kinase notwendig, welche DNA-Replikation und Zellzyklusarrest induzieren kann (Cortez *et al.*, 2001). Interessanterweise ist in XPA-defizienten Zellen die Chk1-Phosphorylierung vermindert, wahrscheinlich aufgrund von insuffizienter Lokalisation von Cep164 an CPD.

Diese Studien deuten auf eine zusätzlich Rolle von XPA in der Zellzykluskontrolle in Abhängigkeit von ATR-Signalkaskaden. Die Proteinphosphatase PP2A dephosphoryliert u. a. CEP164, Chk1, Chk2 sowie ATM und zeigt somit auch einen möglichen Einfluss in der Doppelstrangbruch-Reparatur (Douglas *et al.*, 2001; Dozier *et al.*, 2004; Goodarzi *et al.*, 2004; Chowdhury *et al.*, 2005; Leung-Pineda *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2009). Es ist bisher nicht bekannt, ob neben PP2A auch Calcineurin (PP2B) die Proteine CEP164, Chk1/Chk2 oder ATM dephosphorylieren könnte, es wäre aber ein weiterer denkbarer Hinweis auf die Interaktion mit XPA. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob die in dieser Arbeit gezeigte Calcineurin-vermittelte NER-Modulierung über XPA in einem möglichen Zusammenhang mit CEP164 und ATR bzw. ATM stehen könnte, und damit Cyclosporin A auch andere Reparaturwege, wie die Doppelstrangbruchreparatur durch Rekombination, beeinflusst.

Die Cyclosporin A-induzierte NER-Inhibierung über Calcineurin könnte neben einer möglichen direkten oder indirekten Phosphataseaktivität, welche DNA-Reparaturgene posttranslational regulieren würde, zum anderen auch über eine verminderte transkriptionelle Aktivität von DNA-Reparaturgenen erfolgen. Es gibt bisher nur wenige Genexpressionsstudien über mögliche Zielgene von Cyclosporin A. Baiao *et al.* (2007) bestimmten das Genexpressionsprofil in Cyclosporin A-kultivierten peripheren-Blut-

mononucleären-Zellen (PBMC) mittels einer cDNA *microarray*-Analyse. Insgesamt konnten 12 induzierte und 3 reprimierte Gene identifiziert werden, welche nach Cyclosporin A-Behandlung in PBMC differenziell exprimiert wurden. Das zur XPG/RAD2 Endonuklease Familie gehörende Endonukleasegen *FEN1* (Flap Endonuklease 1), wird durch Cyclosporin A erhöht exprimiert. Das FEN1-Protein eliminiert in der Doppelstrangbruch-Reparatur 5'-Überhänge (Kim *et al.*, 1998). Ein durch Cyclosporin A reprimiertes Gen ist das zur B-Zell-Translokations-Genfamilie gehörende *BTG2*. Dieses Gen spielt in der Regulation des Zellzyklus eine Rolle, könnte als Tumorsuppressorgen fungieren und ist möglicherweise durch Interaktion mit *CAF1* (*Chromatin-Assembly-Factor 1*) auch in der DNA-Reparatur beteiligt (Tirone, 2001 ;Lim, 2006; Baiao *et al.*, 2007). Bisher ist nicht bekannt, ob Cyclosporin A diese Gene über Calcineurin moduliert.

4.4.4 CREB moduliert die NER

Die Cyclosporin A-induzierte Hemmung des Calcium/cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktors CREB (cAMP-responsives-Element-bindendes Protein) ist auf die verminderte Transkription immunrelevanter Gene bereits gut untersucht worden (Flanagan *et al.*, 1991; Ho *et al.*, 1996; Oetjen *et al.*, 2005). CREB gehört zur Leucin-Zipper-Familie und kommt als Homodimer und Heterodimer mit anderen Leucin-Zipper-Proteinen vor und spielt als Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle u. a. für die Regulation der Glucose-Homeostase, Neurodegeneration und des Zellwachstums (Oetjen *et al.*, 2006). CREB kann von der Proteinkinase A phosphoryliert werden (Jean *et al.*, 1998). Ob eine verminderte transkriptionelle Aktivität von CREB auch die Transkription von DNA-Reparaturgenen hemmt, war bisher unbekannt. In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss des Transkriptionsfaktors CREB auf die NER untersucht. Die Überexpression des durch Calcium aktivierten Transkriptionsfaktors CREB (Oetjen *et al.*, 2005) führte in GM00637 Fibroblasten, die mit dem Calcium-Ionophor A23187 kultiviert worden sind, zu einer dosisabhängigen Erhöhung der relativen NER (Abbildung 27). Dieses Ergebnis bestätigte den durch Calcium vermittelten NER-Anstieg (Abbildung 23) und zeigt somit eine additive Wirkung von Calcium und CREB auf die NER.

Mittels Kotransfektion der dominant-negativen CREB-Serin-Alanin-Mutante konnte zusätzlich bestätigt werden, dass CREB in der Regulation der NER involviert ist. Diese Mutante, welche zwar mit endogenem CREB dimerisieren kann, ist durch das fehlende

phosphorylierte Serin an Position 133, welches für eine Bindung des Koaktivators CBP (CREB-bindendes Protein) für eine CREB-vermittelte Transkription essentiell ist, transkriptionell inaktiv (Walton *et al.*, 1992; Mayr *et al.*, 2001). Die CREB-Serin-Alanin-Mutante führte in GM00637 Fibroblasten zu keinem Anstieg der NER, sondern nur in zusätzlicher Gegenwart des Calcium-Ionophores A23187 (Abbildung 28). Dieser Anstieg der relativen NER wurde bereits durch intrazellulären Calcium-Anstieg in A23187-kultivierten GM00637 Fibroblasten beobachtet (Abbildung 23) und unterstützt somit die Calcium-abhängige Modulation der NER. Allerdings zeigte die dominant-negative CREB-Serin-Alanin-Mutante auch keine Hemmung der NER. Neben CREBS133A-Homodimeren könnten sich auch weiterhin Homodimere aus endogenem CREB bilden, sodass möglicherweise ein Hemm-Effekt auf die relative NER nicht beobachtet werden konnte.

Die Ergebnisse der Überexpressionen von CREB und der inaktiven CREB-Serin-Alanin-Mutante geben einen Hinweis darauf, dass die relative NER zumindest teilweise über CREB reguliert sein könnte und bieten eine mögliche Erklärung der Calcineurin-vermittelten Modulation der relativen NER über den Transkriptionsfaktor CREB. Es ist daher zu vermuten, dass die in dieser Arbeit gezeigte Cyclosporin A-induzierte NER-Inhibierung über Calcineurin möglicherweise durch den Transkriptionsfaktor CREB vermittelt wird. Dies liefert einen denkbaren Hinweis auf die transkriptionelle Regulation von CREB auf die für die NER relevanten XP-Gene. Die gezeigten Ergebnisse dieser Arbeit, dass Cyclosporin A die XP-Gene sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene regulieren kann, deutet neben einer direkten oder indirekten Phosphataseaktivität von Calcineurin anscheinend auch auf eine transkriptionelle Regulation dieser Gene durch CREB hin. Somit könnte eine Calcineurin-vermittelte Modulation der NER vermutlich auch über die transkriptionelle Aktivität von CREB auf DNA-Reparaturgene erfolgen.

Bisherige Studien zeigen, dass der CREB-Koaktivator CBP Cyclosporin A-responsiv ist und die Cyclosporin A-induzierte Hemmung der CREB-vermittelten Transkription zumindest teilweise über CBP moduliert wird (Oetjen *et al.*, 2005). Die transkriptionelle Aktivität von CBP wird dabei durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase II und IV vermittelt (Hu *et al.*, 1999). Neben CREB reguliert CBP die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, p/CIP (p300/CBP-*Co-integrator-associated protein*) und p/CAF (p300/CBP-*associated factor*) (Torchia *et al.*, 1997). Essentiell für die CBP-Funktion als Koaktivator und die damit verbundene CREB-abhängige Transkription ist die Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität von CBP sowie die Komplexbildung mit den beiden Kofaktoren p/CAF und p/CIP (Torchia *et al.*, 1997; Korzus *et al.*, 1998). Die

innerhalb von CBP liegenden Domänen für eine Interaktion mit den beiden Kofaktoren p/CAF und p/CIP sind Cyclosporin A-sensitiv (Oetjen *et al.*, 2005). Interessanterweise stimuliert CBP die Aktivität des Transkriptionsfaktors E2F1 (Trouche *et al.*, 1996). Lin *et al.* (2009) zeigten, dass E2F1 nach UV-Strahlung an den XPC-Promotor bindet und die Transkription erhöht. Der Transkriptionsfaktor E2F1 (*E2-promotor binding factor*) reguliert die Expression von Genen für Zellzyklus und Zellwachstum (Muller *et al.*, 2000). Darüber hinaus wird E2F1 als DNA-Schadensantwort hochreguliert (Polager *et al.*, 2002; Hsieh *et al.*, 2002). Aktiviert wird er durch Phosphorylierung über Cyclin A/Cdk2, ATM, ATR und TFIIH (Vandel *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2001). Die Arbeit von Trouche *et al.* (1996) zeigte, dass CBP als Koaktivator des Transkriptionsfaktors E2F1 fungiert. Vermutlich könnte dies ein indirekter Hinweis sein, dass XPC zumindest teilweise auch über CBP reguliert werden könnte. Da Cyclosporin A die CREB-vermittelte Transkription durch Interaktion mit CBP moduliert (Oetjen *et al.*, 2005), könnte sich die in dieser Arbeit gezeigte verminderte XPC-mRNA-Expression durch Cyclosporin A möglicherweise durch Hemmung des CREB-Koaktivators CBP erklären lassen. Daher würden weiterführende Untersuchungen bezüglich der Interaktion zwischen CBP mit XPC interessante Hinweise auf die Rolle einer möglichen transkriptionellen Regulation von XPC liefern.

4.5 Ausblick

Während der Arbeit zur Charakterisierung der Cyclosporin A- und Everolimus-Wirkung auf die Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden ergaben sich neue Anhaltspunkte für weitergehende Untersuchungen.

Der Calcineurin-Inhibitor Tacrolimus zeigt ähnliche Wirkungen und Nebenwirkungen wie Cyclosporin A, ist jedoch von Cyclosporin A strukturell verschieden. Tacrolimus verursacht ein ähnlich erhöhtes Hautkrebsrisiko. Der mTOR-Inhibitor Sirolimus ist klinisch wie Everolimus mit keinem erhöhten Hautkrebsrisiko verbunden. Des Weiteren gibt es unter einer immunsuppressiven Therapie mit Azathioprin ebenfalls ein leicht erhöhtes Hautkrebsrisiko. Im Gegensatz dazu besitzt Mycophenolat-Mofetil ein vermindertes Risiko für die Malignomentwicklung. Da die Kenntnis der molekularen Ursachen eines erhöhten Hautkrebsrisikos unter verschiedenen immunsuppressiven Therapien eine sehr hohe klinische Relevanz hat, bietet es sich an, auch andere Immunsuppressiva auf einen möglichen Einfluss der Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden zu untersuchen. Falls weitere Immunsuppressiva eine Wirkung auf die NER

zeigen, könnten auch deren molekulare Signalwege analysiert werden, was zu neuen Erkenntnissen über die Ursachen eines erhöhten Hautkrebsrisikos bei Transplantationspatienten führen könnte.

Die verminderte NER unter Cyclosporin A, nicht aber unter Everolimus, wurde in dieser Arbeit in immortalisierten SV40-transformierten GM00637 Fibroblastenzelllinien und EBV-transformierten AG10107 Lymphoblastenzelllinien analysiert. Diese Zellarten repräsentieren zwei wichtige Gewebekompartimente (Haut und Blut) des menschlichen Organismus und werden typischerweise in der molekularen Diagnostik von Xeroderma Pigmentosum-Patienten als *pars pro toto* verwendet. Es wäre interessant, ob beide Immunsuppressiva eine ähnliche Wirkung in anderen Zelllinien, in primären Zellen und auch *in-vivo* verursachen. An Hautproben von Transplantationspatienten könnte untersucht werden, ob Cyclosporin A ein ähnliches Expressionsmuster von DNA-Reparaturgenen verursacht. Hierdurch könnte zusätzlich bestätigt werden, dass Cyclosporin A bei Transplantationspatienten eine unterschiedliche Wirkung auf die NER von UV-induzierten DNA-Schäden verursacht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen wichtigen Hinweis, wie Cyclosporin A die NER inhibiert. Die Hemmung von Cyclosporin A auf die NER erfolgte über die Phosphatase Calcineurin und den XP-Proteinen XPA und XPG. Calcineurin könnte die NER durch zwei verschiedene Mechanismen modulieren: die mRNA-Daten dieser Arbeit deuten auf eine transkriptionelle Regulation von XPG, die immunchemischen Nachweise auf eine posttranslationale Modifikation von XPA hin. Diese Regulationsmechanismen sollten Gegenstand zukünftiger Forschungen sein. Ko-Immünpräzipitationen oder „*pull-down-assays*“ wären ein interessanter experimenteller Ansatz, mögliche Interaktionen der Proteine Calcineurin mit XPA oder XPG bzw. XPA mit XPG nachzuweisen. Eine Interaktion zwischen XPA und XPG könnte zum Teil das Ergebnis dieser Arbeit erklären, dass XPA- oder XPG-Überexpression jeweils den Cyclosporin A-Effekt aufheben konnte. Die Möglichkeit einer posttranslationalen Modifikation von XPA durch Calcineurin wäre ein interessanter Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen.

Weiterführend sollte die durch Cyclosporin A-vermittelte unterschiedliche XPA-Proteinexpression der 38 kDa und 40 kDa Proteinbande analysiert werden. Bis jetzt wird vermutet, dass die beiden XPA-Proteinbanden posttranslationale Modifikationen von XPA darstellen. Massenspektrometrische Analysen des XPA-Proteins könnten Aufschluss über die zwei verschiedenen Molekulargewichte von XPA geben. Die durch

enzymatischen Verdau durch spezielle Endopeptidasen entstehenden XPA-Peptid-Fragmentierungsmuster könnten mittels Massenspektrometrie analysiert werden. Sogenannte „*peptide maps*“-Datenbanken und spezielle Computerprogramme ermöglichen eine Analyse der Fragmentierungsmuster und lassen Rückschlüsse auf die posttranslationalen Modifikationen am XPA-Protein zu.

Die Cyclosporin A-induzierte NER-Inhibierung über Calcineurin könnte durch eine verminderte transkriptionelle Regulation der XP-Gene erfolgen. Die in dieser Arbeit gezeigte Modulation der NER durch den Calcineurin-abhängigen Transkriptionsfaktor CREB lässt vermuten, dass CREB in die NER – möglicherweise durch Regulation der XP-Gene – involviert ist. Weitere funktionelle Analysen müssten folgen, um eine transkriptionelle Rolle von CREB auf DNA-Reparaturgene in der NER bestätigen zu können. Darüber hinaus steht auch noch die Untersuchung der Bedeutung des Calcineurin-abhängigen Transkriptionsfaktors NFAT aus. Mit der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) könnte die Interaktion von CREB oder NFAT mit Zielgenen charakterisiert werden. Interessant wäre zum Beispiel, ob CREB oder NFAT an die Promotoren der XP-Gene binden. Alternativ könnte auch mit der „*CHIP-on-chip*“ Technologie transkriptionelle Ziele beider Transkriptionsfaktoren identifiziert werden.

Der Einfluss von CREB auf die NER kann darüber hinaus auch an F9- (murine embryonale Karzinom-) Zellen untersucht werden. Diese Zellen enthalten nur minimale Mengen von endogenem CREB und könnten daher zur Untersuchung der Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden mittels transfizierten exogenen CREB genutzt werden.

Promotor-Analysen könnten zusätzliche Hinweise auf eine mögliche CREB- oder NFAT-vermittelte transkriptionelle Regulation der XP-Gene liefern. Dabei werden verschieden große Fragmente eines XP-Promotors vor ein Luciferasegen eines Expressionsplasmides kloniert, dem zuvor der Promotor entfernt wurde. Mittels der in dieser Arbeit verwendeten Methode der Wirtzellreaktivierung (HCR) ist es möglich, die Aktivität des jeweiligen Promotorkonstruktes anhand der Luciferaseexpression zu bestimmen. Anhand Kotransfektion von CREB könnte die Aktivität zusätzlich analysiert werden. Als weitere Methode bietet sich der sogenannte „*Gel Retardation Assay*“ an, bei der die zu untersuchenden Promotorelemente radioaktiv markiert und mit Proteinen inkubiert werden. Diese Protein-DNA-Komplexe können im nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel von freier DNA unterschieden werden. Um die in dieser Arbeit gezeigte Cyclosporin A-vermittelte Herunterregulierung der mRNA von *XPB*, *XPC* und *XPD* validieren zu können, wären Promotoranalysen dieser XP-Gene sinnvoll. Dabei

könnten auch andere Transkriptionsfaktoren untersucht werden, welche Calcineurinsensitiv sind, wie zum Beispiel EGR-1, Sp1 und AP-1, die mit dem Calcineurinregulierten Transkriptionsfaktor NFAT kooperativ binden können. An dieser Stelle sei noch einmal betont, dass zur Regulation der XP-Gene bisher sehr wenig bekannt ist.

Darüber hinaus könnte bei Transplantationspatienten, welche eine immunsuppressive Therapie unter Cyclosporin A erhalten, durch Genotypisierungen mögliche XP-Polymorphismen analysiert werden. Hierbei könnten die XP-Genvarianten möglicherweise in Korrelation zum jeweiligen Hautkrebsrisiko der Patienten stehen. Eine klinische Datenbank sowie eine RNA- und DNA-Datenbank von ca. 600 Nierentransplantierten befindet sich gerade im Aufbau. Damit ergibt sich aus den bisherigen und avisierten Untersuchungen eine direkte klinische Relevanz. Gibt es einen Zusammenhang zwischen funktionell relevanten Polymorphismen und dem Hautkrebsrisiko, könnte nach alternativen immunsuppressiven Therapien geforscht werden.

Einen neuen Therapieansatz bei Transplantationspatienten bieten sogenannte RCAN-Peptide („Regulatoren von Calcineurin“; Mulero *et al.*, 2009). Im Gegensatz zur Cyclosporin A-induzierten Hemmung der Phosphataseaktivität von Calcineurin, binden die RCAN-Peptide an die katalytische Domäne und die *Linker*-Region von Calcineurin und inhibieren selektiv NFAT-Bindestellen. Die Dephosphorylierung von NFAT wird damit inhibiert. Die katalytische Aktivität von Calcineurin wird dabei allerdings nicht beeinflusst. Diese RCAN-Peptide könnten therapeutische Alternativen zu einer Cyclosporin A-immunsuppressiven Therapie darstellen, indem NFAT-Signalwege gehemmt werden, die Calcineurin-Phosphataseaktivität aber intakt bleibt und so möglicherweise weniger Nebenwirkungen auslöst (Noguchi *et al.*, 2004). Dies wäre zum Beispiel insbesondere interessant im Hinblick auf Nebenwirkungen von Cyclosporin A, welche nicht durch NFAT vermittelt werden. Transplantationspatienten zeigen ein erhöhtes Diabetesrisiko aufgrund der Cyclosporin A-vermittelten Inhibierung der CREB-abhängigen Insulinproduktion (Oetjen *et al.* 2003). Falls neben dieser unerwünschten Wirkung von Cyclosporin A auch das Hautkrebsrisiko über CREB vermittelt wird, könnte durch eine immunsuppressive Therapie mit RCAN-Peptiden dieses Nebenwirkungsprofil (Hautkrebs, Diabetes) möglicherweise umgangen werden.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Abraham RT: Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15:2177-2196 (2001).
- Adair JE, Maloney SC, Dement GA, Wertzler KJ, Smerdon MJ, Reeves R: High-mobility group A1 proteins inhibit expression of nucleotide excision repair factor xeroderma pigmentosum group A. *Cancer Res* 67:6044-6052 (2007).
- Adimoolam S, Ford JM: p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12985-12990 (2002).
- Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H: Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat Res* 571:153-173 (2005).
- Ahlers C, Kreideweiss S, Nordheim A, Ruhlmann A: Cyclosporin A inhibits Ca²⁺-mediated upregulation of the DNA repair enzyme DNA polymerase beta in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Biochem* 264:952-959 (1999).
- Akerman KE, Nicholls DG: Calcium transport by intact synaptosomes. Influence of ionophore A23187 on plasma-membrane potential, plasma-membrane calcium transport, mitochondrial membrane potential, respiration, cytosolic free-calcium concentration and noradrenaline release. *Eur J Biochem* 115:67-73 (1981).
- Al-Daraji WI, Grant KR, Ryan K, Saxton A, Reynolds NJ: Localization of calcineurin/NFAT in human skin and psoriasis and inhibition of calcineurin/NFAT activation in human keratinocytes by cyclosporin A. *J Invest Dermatol* 118:779-788 (2002).
- Allison AC, Eugui EM: Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clin Transplant* 10:77-84 (1996).
- Andersson J, Nagy S, Groth CG, Andersson U: Effects of FK506 and cyclosporin A on cytokine production studied in vitro at a single-cell level. *Immunology* 75:136-142 (1992).
- Andjelic S, Khanna A, Suthanthiran M, Nikolic-Zugic J: Intracellular Ca²⁺ elevation and cyclosporin A synergistically induce TGF-beta 1-mediated apoptosis in lymphocytes. *J Immunol* 158:2527-2534 (1997).
- Araki M, Masutani C, Takemura M, Uchida A, Sugasawa K, Kondoh J, Ohkuma Y, Hanaoka F: Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 276:18665-18672 (2001).
- Araujo SJ, Nigg EA, Wood RD: Strong functional interactions of TFIIH with XPC and XPG in human DNA nucleotide excision repair, without a preassembled repairosome. *Mol Cell Biol* 21:2281-2291 (2001).
- Ariza RR, Keyse SM, Moggs JG, Wood RD: Reversible protein phosphorylation modulates nucleotide excision repair of damaged DNA by human cell extracts. *Nucleic Acids Res* 24:433-440 (1996).
- Armellini MG, Muotri AR, Marchetto MC, de Lima-Bessa KM, Sarasin A, Menck CF: Restoring DNA repair capacity of cells from three distinct diseases by XPD gene-recombinant adenovirus. *Cancer Gene Ther* 12:389-396 (2005).
- Asahina H, Han Z, Kawanishi M, Kato T, Jr., Ayaki H, Todo T, Yagi T, Takebe H, Ikenaga M, Kimura SH: Expression of a mammalian DNA photolyase confers light-dependent repair activity and reduces mutations of UV-irradiated shuttle vectors in xeroderma pigmentosum cells. *Mutat Res* 435:255-262 (1999).
- Baiao AM, Wowk PF, Sandrin-Garcia P, Junta CM, Fachin AL, Mello SS, Sakamoto-Hojo ET, Donadi EA, Passos GA: cDNA microarray analysis of cyclosporin A (CsA)-treated human peripheral blood mononuclear cells reveal modulation of genes associated with apoptosis, cell-cycle regulation and DNA repair. *Mol Cell Biochem* 304:235-241 (2007).
- Bartels CL, Lambert MW: Domains in the XPA protein important in its role as a processivity factor. *Biochem Biophys Res Commun* 356:219-225 (2007).
- Barth J, Kohl V, Hanefeld M: [Behavior of lipids, other serum parameters and cardiovascular functions in ultraviolet therapy]. *Hautarzt* 45:702-707 (1994).
- Beals CR, Clipstone NA, Ho SN, Crabtree GR: Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev* 11:824-834 (1997).
- Beretta L, Gingras AC, Svitkin YV, Hall MN, Sonenberg N: Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J* 15:658-664 (1996).

- Beugnet A, Wang X, Proud CG: Target of rapamycin (TOR)-signaling and RAIP motifs play distinct roles in the mammalian TOR-dependent phosphorylation of initiation factor 4E-binding protein 1. *J Biol Chem* 278:40717-40722 (2003).
- Bierer BE, Mattila PS, Standaert RF, Herzenberg LA, Burakoff SJ, Crabtree G, Schreiber SL: Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9231-9235 (1990).
- Bischof F, Melms A: Glucocorticoids inhibit CD40 ligand expression of peripheral CD4+ lymphocytes. *Cell Immunol* 187:38-44 (1998).
- Bjornsti MA, Houghton PJ: The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4:335-348 (2004).
- Blankenburg S, Konig IR, Moessner R, Laspe P, Thoms KM, Krueger U, Khan SG, Westphal G, Berking C, Volkenandt M, Reich K, Neumann C, Ziegler A, Kraemer KH, Emmert S: Assessment of 3 xeroderma pigmentosum group C gene polymorphisms and risk of cutaneous melanoma: a case-control study. *Carcinogenesis* 26:1085-1090 (2005).
- Bode AM, Dong Z: Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. *Sci STKE* 2003:RE2 (2003).
- Bohler T, Waiser J, Budde K, Lichter S, Jauho A, Fritsche L, Korn A, Neumayer HH: The in vivo effect of rapamycin derivative SDZ RAD on lymphocyte proliferation. *Transplant Proc* 30:2195-2197 (1998).
- Bootsma D, Kraemer KH, Cleaver JE, Hoeijmakers JH: Nucleotide excision repair syndromes: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and trichothiodystrophy., Vogelstein B, Kinzler KW (eds): *The Genetic Basis of Human Cancer.*, pp 211-237 (McGraw-Hill, New York 2002).
- Borel JF: From our laboratories: cyclosporin A. *Triangle* 20:97-105 (1981).
- Borel JF: The cyclosporins. *Transplant Proc* 21:810-815 (1989).
- Bouwes Bavink JN, Hardie DR, Green A, Cutmore S, MacNaught A, O'Sullivan B, Siskind V, Van Der Woude FJ, Hardie IR: The risk of skin cancer in renal transplant recipients in Queensland, Australia. A follow-up study. *Transplantation* 61:715-721 (1996).
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254 (1976).
- Braun J, Sha'afi RI, Unanue ER: Crosslinking by ligands to surface immunoglobulin triggers mobilization of intracellular 45Ca^{2+} in B lymphocytes. *J Cell Biol* 82:755-766 (1979).
- Brenneisen P, Wenk J, Wlaschek M, Krieg T, Scharffetter-Kochanek K: Activation of p70 ribosomal protein S6 kinase is an essential step in the DNA damage-dependent signaling pathway responsible for the ultraviolet B-mediated increase in interstitial collagenase (MMP-1) and stromelysin-1 (MMP-3) protein levels in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 275:4336-4344 (2000).
- Broeke RT, Leusink-Muis T, Hilberdink R, Van A, I, van den WE, Villain M, De CF, Blalock JE, Nijkamp FP, Folkerts G: Specific modulation of calmodulin activity induces a dramatic production of superoxide by alveolar macrophages. *Lab Invest* 84:29-40 (2004).
- Brookman KW, Lamerdin JE, Thelen MP, Hwang M, Reardon JT, Sancar A, Zhou ZQ, Walter CA, Parris CN, Thompson LH: ERCC4 (XPF) encodes a human nucleotide excision repair protein with eukaryotic recombination homologs. *Mol Cell Biol* 16:6553-6562 (1996).
- Broughton BC, Thompson AF, Harcourt SA, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, Botta E, Stefanini M, King MD, Weber CA, Cole J, .: Molecular and cellular analysis of the DNA repair defect in a patient in xeroderma pigmentosum complementation group D who has the clinical features of xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome. *Am J Hum Genet* 56:167-174 (1995).
- Broughton BC, Berneburg M, Fawcett H, Taylor EM, Arlett CF, Nardo T, Stefanini M, Menefee E, Price VH, Queille S, Sarasin A, Bohnert E, Krutmann J, Davidson R, Kraemer KH, Lehmann AR: Two individuals with features of both xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy highlight the complexity of the clinical outcomes of mutations in the XPD gene. *Hum Mol Genet* 10:2539-2547 (2001).
- Broughton BC, Cordonnier A, Kleijer WJ, Jaspers NG, Fawcett H, Raams A, Garritsen VH, Stary A, Avril MF, Boudsocq F, Masutani C, Hanaoka F, Fuchs RP, Sarasin A, Lehmann AR: Molecular analysis of mutations in DNA polymerase eta in xeroderma pigmentosum-variant patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:815-820 (2002).
- Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL: A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369:756-758 (1994).

- Bruls WA, Slaper H, van der Leun JC, Berrens L: Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. *Photochem Photobiol* 40:485-494 (1984).
- Brunn GJ, Hudson CC, Sekulic A, Williams JM, Hosoi H, Houghton PJ, Lawrence JC, Jr., Abraham RT: Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* 277:99-101 (1997).
- Buchko GW, Ni S, Thrall BD, Kennedy MA: Structural features of the minimal DNA binding domain (M98-F219) of human nucleotide excision repair protein XPA. *Nucleic Acids Res* 26:2779-2788 (1998).
- Buell JF, Gross TG, Woodle ES: Malignancy after transplantation. *Transplantation* 80:S254-S264 (2005).
- Campistol JM, Gutierrez-Dalmau A, Torregrosa JV: Conversion to sirolimus: a successful treatment for posttransplantation Kaposi's sarcoma. *Transplantation* 77:760-762 (2004).
- Cao S, Cox KL, Berquist W, Hayashi M, Concepcion W, Hammes GB, Ojogho OK, So SK, Frerker M, Castillo RO, Monge H, Esquivel CO: Long-term outcomes in pediatric liver recipients: comparison between cyclosporin A and tacrolimus. *Pediatr Transplant* 3:22-26 (1999).
- Carreau M, Eveno E, Quilliet X, Chevalier-Lagente O, Benoit A, Tanganelli B, Stefanini M, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, Sarasin A, .: Development of a new easy complementation assay for DNA repair deficient human syndromes using cloned repair genes. *Carcinogenesis* 16:1003-1009 (1995).
- Catran DC, Appel GB, Hebert LA, Hunsicker LG, Pohl MA, Hoy WE, Maxwell DR, Kunis CL: Cyclosporine in patients with steroid-resistant membranous nephropathy: a randomized trial. *Kidney Int* 59:1484-1490 (2001).
- Chan S: Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer. *Br J Cancer* 91:1420-1424 (2004).
- Chel VG, Ooms ME, Popp-Snijders C, Pavel S, Schothorst AA, Meulemans CC, Lips P: Ultraviolet irradiation corrects vitamin D deficiency and suppresses secondary hyperparathyroidism in the elderly. *J Bone Miner Res* 13:1238-1242 (1998).
- Chen J, Laroche S, Li X, Suter B: Xpd/Ercc2 regulates CAK activity and mitotic progression. *Nature* 424:228-232 (2003a).
- Chen Y, Zhao M, Fu M, Yao W, Tang C: The role of calcineurin in the lung fibroblasts proliferation and collagen synthesis induced by basic fibroblast growth factor. *Chin Med J (Engl)* 116:857-862 (2003b).
- Cheng L, Spitz MR, Hong WK, Wei Q: Reduced expression levels of nucleotide excision repair genes in lung cancer: a case-control analysis. *Carcinogenesis* 21:1527-1530 (2000).
- Chowdhury D, Keogh MC, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J: gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell* 20:801-809 (2005).
- Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B: Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193:3-34 (2003).
- Chun HH, Gatti RA: Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair (Amst)* 3:1187-1196 (2004).
- Clarke PR, Siddhanti SR, Cohen P, Blackshear PJ: Okadaic acid-sensitive protein phosphatases dephosphorylate MARCKS, a major protein kinase C substrate. *FEBS Lett* 336:37-42 (1993).
- Clipstone NA, Crabtree GR: Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357:695-697 (1992).
- Cohen PT: Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* 22:245-251 (1997).
- Coin F, Marinoni JC, Rodolfo C, Fribourg S, Pedrini AM, Egly JM: Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH. *Nat Genet* 20:184-188 (1998).
- Coin F, Auriol J, Tapias A, Clivio P, Vermeulen W, Egly JM: Phosphorylation of XPB helicase regulates TFIIH nucleotide excision repair activity. *EMBO J* 23:4835-4846 (2004).
- Coin F, Oksenysh V, Mocquet V, Groh S, Blattner C, Egly JM: Nucleotide excision repair driven by the dissociation of CAK from TFIIH. *Mol Cell* 31:9-20 (2008).
- Colgan J, Asmal M, Yu B, Luban J: Cyclophilin A-deficient mice are resistant to immunosuppression by cyclosporine. *J Immunol* 174:6030-6038 (2005).
- Constantinou A, Gunz D, Evans E, Lalle P, Bates PA, Wood RD, Clarkson SG: Conserved residues of human XPG protein important for nuclease activity and function in nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 274:5637-5648 (1999).

- Cooper PK, Nospikel T, Clarkson SG, Leadon SA: Defective transcription-coupled repair of oxidative base damage in Cockayne syndrome patients from XP group G. *Science* 275:990-993 (1997).
- Cortez D, Guntuku S, Qin J, Elledge SJ: ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* 294:1713-1716 (2001).
- Courdavault, C. Baudouin, M. Charveron, B. Canguilhem, A. Favier, J. Cadet, and T. Douki: Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA Repair (Amst)* 4 836-844 (2005)
- Costanzo V, Paull T, Gottesman M, Gautier J: Mre11 assembles linear DNA fragments into DNA damage signaling complexes. *PLoS Biol* 2:E110 (2004).
- Crabtree GR: Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell* 96:611-614 (1999).
- Czech W, Brautigam M, Weidinger G, Schopf E: A body-weight-independent dosing regimen of cyclosporine microemulsion is effective in severe atopic dermatitis and improves the quality of life. *J Am Acad Dermatol* 42:653-659 (2000).
- D'Amours D, Jackson SP: The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:317-327 (2002).
- D'Errico M, Parlanti E, Teson M, de Jesus BM, Degan P, Calcagnile A, Jaruga P, Bjoras M, Crescenzi M, Pedrini AM, Egly JM, Zambruno G, Stefanini M, Dizdaroglu M, Dogliotti E: New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *EMBO J* 25:4305-4315 (2006).
- de Boer J, Hoeijmakers JH: Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21:453-460 (2000).
- de Fijter JW: Use of proliferation signal inhibitors in non-melanoma skin cancer following renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 22 Suppl 1:i23-i26 (2007).
- de Lima-Bessa KM, Armelini MG, Chigancas V, Jacysyn JF, marante-Mendes GP, Sarasin A, Menck CF: CPDs and 6-PPs play different roles in UV-induced cell death in normal and NER-deficient human cells. *DNA Repair (Amst)* 7:303-312 (2008).
- de LA, van TM, van der Leun JC, van Vloten WA, de Gruij FR: Cell cycle kinetics following UVA irradiation in comparison to UVB and UVC irradiation. *Photochem Photobiol* 63:492-497 (1996).
- Delmonico FL, Tolkoff-Rubin N, Auchincloss H, Jr., Williams WW, Jr., Fang LT, Bazari H, Farrell ML, Cosimi AB: Management of the renal allograft recipient: immunosuppressive protocols for long-term success. *Clin Transplant* 8:34-39 (1994).
- Di GN, Coroneo M, Wakefield D: Epidermal growth factor receptor signaling is partially responsible for the increased matrix metalloproteinase-1 expression in ocular epithelial cells after UVB radiation. *Am J Pathol* 167:489-503 (2005).
- Diethelm AG, Laskow DA, Hudson SL, Deierhoi MH, Barber WH, Barger BO, Julian BA, Gaston RS, Curtis JJ: Benefits of quadruple immunosuppressive therapy in recipients of living related donor kidneys. A review of 855 operations. *Ann Surg* 215:606-616 (1992).
- DiGiovanna JJ: Posttransplantation skin cancer: scope of the problem, management, and role for systemic retinoid chemoprevention. *Transplant Proc* 30:2771-2775 (1998).
- Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI: Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 386:855-858 (1997).
- Domhan S, Zeier M, Abdollahi A: Immunosuppressive therapy and post-transplant malignancy. *Nephrol Dial Transplant* 24:1097-1103 (2009).
- Dougados M, Torley H: Efficacy of cyclosporin A in rheumatoid arthritis: worldwide experience. *Br J Rheumatol* 32 Suppl 1:57-59 (1993).
- Douglas P, Moorhead GB, Ye R, Lees-Miller SP: Protein phosphatases regulate DNA-dependent protein kinase activity. *J Biol Chem* 276:18992-18998 (2001).
- Douki T, Perdiz D, Grof P, Kuluncsics Z, Moustacchi E, Cadet J, Sage E: Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation: biological role. *Photochem Photobiol* 70:184-190 (1999).
- Dozier C, Bonyadi M, Baricault L, Tonasso L, Darbon JM: Regulation of Chk2 phosphorylation by interaction with protein phosphatase 2A via its B' regulatory subunit. *Biol Cell* 96:509-517 (2004).
- Drapkin R, Reardon JT, Ansari A, Huang JC, Zawel L, Ahn K, Sancar A, Reinberg D: Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II. *Nature* 368:769-772 (1994).
- Dualan R, Brody T, Keeney S, Nichols AF, Admon A, Linn S: Chromosomal localization and cDNA cloning of the genes (DDB1 and DDB2) for the p127 and p48 subunits of a human damage-specific DNA binding protein. *Genomics* 29:62-69 (1995).

- Dumont FJ, Melino MR, Staruch MJ, Koprak SL, Fischer PA, Sigal NH: The immunosuppressive macrolides FK-506 and rapamycin act as reciprocal antagonists in murine T cells. *J Immunol* 144:1418-1424 (1990).
- Emmert S, Kobayashi N, Khan SG, Kraemer KH: The xeroderma pigmentosum group C gene leads to selective repair of cyclobutane pyrimidine dimers rather than 6-4 photoproducts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2151-2156 (2000).
- Emmert S, Schneider TD, Khan SG, Kraemer KH: The human XPG gene: gene architecture, alternative splicing and single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 29:1443-1452 (2001).
- Emmert S, Slor H, Busch DB, Batko S, Albert RB, Coleman D, Khan SG, Abu-Libdeh B, DiGiovanna JJ, Cunningham BB, Lee MM, Crollick J, Inui H, Ueda T, Hedayati M, Grossman L, Shahlavi T, Cleaver JE, Kraemer KH: Relationship of Neurologic Degeneration to Genotype in Three Xeroderma Pigmentosum Group G Patients. *J Invest Dermatol* 118:972-982 (2002).
- Emmert S, Leibel D, Runger TM: Syndromes with genetic instability: model diseases for (skin) cancerogenesis. *J Dtsch Dermatol Ges* 4:721-731 (2006a).
- Emmert S, Wetzig T, Imoto K, Khan SG, Oh KS, Laspe P, Zachmann K, Simon JC, Kraemer KH: A novel complex insertion/deletion mutation in the XPC DNA repair gene leads to skin cancer in an Iraqi family. *J Invest Dermatol* 126:2542-2544 (2006b).
- Emmert S, Ueda T, Zumsteg U, Weber P, Khan SG, Oh KS, Boyle J, Laspe P, Zachmann K, Boeckmann L, Kuschal C, Bircher A, Kraemer KH: Strict sun protection results in minimal skin changes in a patient with xeroderma pigmentosum and a novel c.2009delG mutation in XPD (ERCC2). *Exp Dermatol* 18:64-68 (2009).
- Enslin H, Tokumitsu H, Soderling TR: Phosphorylation of CREB by CaM-kinase IV activated by CaM-kinase IV kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 207:1038-1043 (1995).
- Essen LO, Klar T: Light-driven DNA repair by photolyases. *Cell Mol Life Sci* 63:1266-1277 (2006).
- Euvrard S, Kanitakis J, Pouteil-Noble C, Disant F, Dureau G, Finaz d, V, Claudy A, Thivolet J: Aggressive squamous cell carcinomas in organ transplant recipients. *Transplant Proc* 27:1767-1768 (1995).
- Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A: Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med* 348:1681-1691 (2003).
- Euvrard S, Ulrich C, Lefrancois N: Immunosuppressants and skin cancer in transplant patients: focus on rapamycin. *Dermatol Surg* 30:628-633 (2004).
- Euvrard S, Kanitakis J, Decullier E, Butnaru AC, Lefrancois N, Boissonnat P, Sebbag L, Garnier JL, Pouteil-Noble C, Cahen R, Morelon E, Touraine JL, Claudy A, Chapuis F: Subsequent skin cancers in kidney and heart transplant recipients after the first squamous cell carcinoma. *Transplantation* 81:1093-1100 (2006).
- Evans E, Fellows J, Coffey A, Wood RD: Open complex formation around a lesion during nucleotide excision repair provides a structure for cleavage by human XPG protein. *EMBO J* 16:625-638 (1997a).
- Evans E, Moggs JG, Hwang JR, Egly JM, Wood RD: Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *EMBO J* 16:6559-6573 (1997b).
- Faerber L, Braeutigam M, Weidinger G, Mrowietz U, Christophers E, Schulze HJ, Mahrle G, Meffert H, Drechsler S: Cyclosporine in severe psoriasis. Results of a meta-analysis in 579 patients. *Am J Clin Dermatol* 2:41-47 (2001).
- Faivre S, Kroemer G, Raymond E: Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 5:671-688 (2006).
- Feng B, Stemmer PM: Ca²⁺ binding site 2 in calcineurin-B modulates calmodulin-dependent calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry* 40:8808-8814 (2001).
- Feng S, Parrish DD, Lambert MW: A processive versus a distributive mechanism of action correlates with differences in ability of normal and xeroderma pigmentosum group A endonucleases to incise damaged nucleosomal DNA. *Carcinogenesis* 18:279-286 (1997).
- Ferguson BE, Oh DH: Proficient global nucleotide excision repair in human keratinocytes but not in fibroblasts deficient in p53. *Cancer Res* 65:8723-8729 (2005).
- Feske S, Giltner J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A: Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol* 2:316-324 (2001).
- Fessler BJ, Paliogianni F, Hama N, Balow JE, Boumpas DT: Glucocorticoids modulate CD28 mediated pathways for interleukin 2 production in human T cells: evidence for posttranscriptional regulation. *Transplantation* 62:1113-1118 (1996).

- Feuerstein N, Huang D, Hinrichs SH, Orten DJ, Aiyar N, Prystowsky MB: Regulation of cAMP-responsive enhancer binding proteins during cell cycle progression in T lymphocytes stimulated by IL-2. *J Immunol* 154:68-79 (1995).
- Feuerstein N, Firestein R, Aiyar N, He X, Murasko D, Cristofalo V: Late induction of CREB/ATF binding and a concomitant increase in cAMP levels in T and B lymphocytes stimulated via the antigen receptor. *J Immunol* 156:4582-4593 (1996).
- Fischer G: Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases and their effectors. *Angew Chem Int Ed Engl* 33:1415-1436 (1994).
- Fitch ME, Nakajima S, Yasui A, Ford JM: In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the DDB2 gene product. *J Biol Chem* 278:46906-46910 (2003).
- Flanagan WM, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR: Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 352:803-807 (1991).
- Ford JM, Hanawalt PC: Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *J Biol Chem* 272:28073-28080 (1997).
- Formica RN, Jr., Lorber KM, Friedman AL, Bia MJ, Lakkis F, Smith JD, Lorber MI: The evolving experience using everolimus in clinical transplantation. *Transplant Proc* 36:495S-499S (2004).
- Foti D, Iuliano R, Chiefari E, Brunetti A: A nucleoprotein complex containing Sp1, C/EBP beta, and HMGI-Y controls human insulin receptor gene transcription. *Mol Cell Biol* 23:2720-2732 (2003).
- Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P: CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* 64:739-749 (1991).
- Fousteri M, Mullenders LH: Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res* 18:73-84 (2008).
- Friedberg EC, Aguilera A, Gellert M, Hanawalt PC, Hays JB, Lehmann AR, Lindahl T, Lowndes N, Sarasin A, Wood RD: DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair (Amst)* 5:986-996 (2006).
- Fruman DA, Klee CB, Bierer BE, Burakoff SJ: Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3686-3690 (1992).
- Fukudo M, Yano I, Masuda S, Okuda M, Inui K: Distinct inhibitory effects of tacrolimus and cyclosporin a on calcineurin phosphatase activity. *J Pharmacol Exp Ther* 312:816-825 (2005).
- Fung JJ, Jain A, Kwak EJ, Kusne S, Dvorchik I, Egtesad B: De novo malignancies after liver transplantation: a major cause of late death. *Liver Transpl* 7:S109-S118 (2001).
- Gafer U, Malachi T, Ori Y, Breitbart H: The role of calcium in human lymphocyte DNA repair ability. *J Lab Clin Med* 130:33-41 (1997).
- Gale JM, Smerdon MJ: UV induced (6-4) photoproducts are distributed differently than cyclobutane dimers in nucleosomes. *Photochem Photobiol* 51:411-417 (1990).
- Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Marx S, Roque M, Adelman S, Chesebro J, Fallon J, Fuster V, Marks A, Badimon JJ: Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation* 99:2164-2170 (1999).
- Gambichler T, Bader A, Vojvodic M, Bechara FG, Sauermann K, Altmeyer P, Hoffmann K: Impact of UVA exposure on psychological parameters and circulating serotonin and melatonin. *BMC Dermatol* 2:6 (2002).
- Gartel AL, Radhakrishnan SK: Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* 65:3980-3985 (2005).
- Gary R, Ludwig DL, Cornelius HL, MacInnes MA, Park MS: The DNA repair endonuclease XPG binds to proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and shares sequence elements with the PCNA-binding regions of FEN-1 and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J Biol Chem* 272:24522-24529 (1997).
- Giannini G, Cerignoli F, Mellone M, Massimi I, Ambrosi C, Rinaldi C, Gulino A: Molecular mechanism of HMGA1 deregulation in human neuroblastoma. *Cancer Lett* 228:97-104 (2005).
- Giglia-Mari G, Coin F, Ranish JA, Hoogstraten D, Theil A, Wijgers N, Jaspers NG, Raams A, Argentini M, van der Spek PJ, Botta E, Stefanini M, Egly JM, Aebbersold R, Hoeijmakers JH, Vermeulen W: A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nat Genet* 36:714-719 (2004).
- Gill G: SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* 18:2046-2059 (2004).

- Glover MT, Deeks JJ, Raftery MJ, Cunningham J, Leigh IM: Immunosuppression and risk of non-melanoma skin cancer in renal transplant recipients. *Lancet* 349:398 (1997).
- Goldfeld AE, Flemington EK, Boussiotis VA, Theodos CM, Titus RG, Strominger JL, Speck SH: Transcription of the tumor necrosis factor alpha gene is rapidly induced by anti-immunoglobulin and blocked by cyclosporin A and FK506 in human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:12198-12201 (1992).
- Goodarzi AA, Jonnalagadda JC, Douglas P, Young D, Ye R, Moorhead GB, Lees-Miller SP, Khanna KK: Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. *EMBO J* 23:4451-4461 (2004).
- Goukassian D, Gad F, Yaar M, Eller MS, Nehal US, Gilchrist BA: Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *FASEB J* 14:1325-1334 (2000).
- Gratchev A, Strein P, Utikal J, Sergij G: Molecular genetics of Xeroderma pigmentosum variant. *Exp Dermatol* 12:529-536 (2003).
- Graves LM, Bornfeldt KE, Argast GM, Krebs EG, Kong X, Lin TA, Lawrence JC, Jr.: cAMP- and rapamycin-sensitive regulation of the association of eukaryotic initiation factor 4E and the translational regulator PHAS-I in aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7222-7226 (1995).
- Gregory CR, Huie P, Shorthouse R, Wang J, Rowan R, Billingham ME, Morris RE: Treatment with rapamycin blocks arterial intimal thickening following mechanical and alloimmune injury. *Transplant Proc* 25:120-121 (1993).
- Gregory MJ, Smoyer WE, Sedman A, Kershaw DB, Valentini RP, Johnson K, Bunchman TE: Long-term cyclosporine therapy for pediatric nephrotic syndrome: a clinical and histologic analysis. *J Am Soc Nephrol* 7:543-549 (1996).
- Guba M, Graeb C, Jauch KW, Geissler EK: Pro- and anti-cancer effects of immunosuppressive agents used in organ transplantation. *Transplantation* 77:1777-1782 (2004).
- Guba M, von BP, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK: Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 8:128-135 (2002).
- Guenova E, Lichte V, Hoetzenecker W, Woelbing F, Moehrle M, Roecken M, Schaller M: Nodular malignant melanoma and multiple cutaneous neoplasms under immunosuppression with azathioprine. *Melanoma Res* 19:271-273 (2009).
- Guertin DA, Sabatini DM: An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med* 11:353-361 (2005).
- Halloran P, Mathew T, Tomlanovich S, Groth C, Hooftman L, Barker C: Mycophenolate mofetil in renal allograft recipients: a pooled efficacy analysis of three randomized, double-blind, clinical studies in prevention of rejection. The International Mycophenolate Mofetil Renal Transplant Study Groups. *Transplantation* 63:39-47 (1997).
- Halloran PF: Sirolimus and cyclosporin for renal transplantation. *Lancet* 356:179-180 (2000).
- Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW: Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* 226:544-547 (1984).
- Haritunians T, Mori A, O'Kelly J, Luong QT, Giles FJ, Koeffler HP: Antiproliferative activity of RAD001 (everolimus) as a single agent and combined with other agents in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 21:333-339 (2007).
- Heitman J, Movva NR, Hiestand PC, Hall MN: FK 506-binding protein proline rotamase is a target for the immunosuppressive agent FK 506 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1948-1952 (1991).
- Henry ML: Cyclosporine and tacrolimus (FK506): a comparison of efficacy and safety profiles. *Clin Transplant* 13:209-220 (1999).
- Herman M, Weinstein T, Korzets A, Chagnac A, Ori Y, Zevin D, Malachi T, Gafter U: Effect of cyclosporin A on DNA repair and cancer incidence in kidney transplant recipients. *J Lab Clin Med* 137:14-20 (2001).
- Herman M, Ori Y, Chagnac A, Weinstein T, Korzets A, Zevin D, Malachi T, Gafter U: DNA repair in mononuclear cells: role of serine/threonine phosphatases. *J Lab Clin Med* 140:255-262 (2002).
- Herouy Y, Krutmann J, Norgauer J, Schopf E: [Xeroderma pigmentosum: children of the moon]. *J Dtsch Dermatol Ges* 1:191-198 (2003).
- Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, Nourse J, Crabtree GR: The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol* 80:S40-S45 (1996).
- Hoeijmakers JH: Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366-374 (2001).

- Hojjo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, Shimbo T, Suthanthiran M: Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 397:530-534 (1999).
- Holstege FC, van d, V, Timmers HT: Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *EMBO J* 15:1666-1677 (1996).
- Honkanen RE, Golden T: Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era? *Curr Med Chem* 9:2055-2075 (2002).
- Hopfner KP, Karcher A, Craig L, Woo TT, Carney JP, Tainer JA: Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. *Cell* 105:473-485 (2001).
- Hosoi H, Dilling MB, Shikata T, Liu LN, Shu L, Ashmun RA, Germain GS, Abraham RT, Houghton PJ: Rapamycin causes poorly reversible inhibition of mTOR and induces p53-independent apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res* 59:886-894 (1999).
- Hsieh JK, Yap D, O'Connor DJ, Fogal V, Fallis L, Chan F, Zhong S, Lu X: Novel function of the cyclin A binding site of E2F in regulating p53-induced apoptosis in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 22:78-93 (2002).
- Hu SC, Chrivia J, Ghosh A: Regulation of CBP-mediated transcription by neuronal calcium signaling. *Neuron* 22:799-808 (1999).
- Huang C, Mattjus P, Ma WY, Rincon M, Chen NY, Brown RE, Dong Z: Involvement of nuclear factor of activated T cells activation in UV response. Evidence from cell culture and transgenic mice. *J Biol Chem* 275:9143-9149 (2000).
- Huang S, Houghton PJ: Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 3:371-377 (2003).
- Huen MS, Chen J: The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Res* 18:8-16 (2008).
- Hwang BJ, Ford JM, Hanawalt PC, Chu G: Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:424-428 (1999).
- Hwang JR, Moncollin V, Vermeulen W, Seroz T, van VH, Hoeijmakers JH, Egly JM: A 3' --> 5' XPB helicase defect in repair/transcription factor TFIIH of xeroderma pigmentosum group B affects both DNA repair and transcription. *J Biol Chem* 271:15898-15904 (1996).
- Iakoucheva LM, Kimzey AL, Masselon CD, Bruce JE, Garner EC, Brown CJ, Dunker AK, Smith RD, Ackerman EJ: Identification of intrinsic order and disorder in the DNA repair protein XPA. *Protein Sci* 10:560-571 (2001a).
- Iakoucheva LM, Kimzey AL, Masselon CD, Smith RD, Dunker AK, Ackerman EJ: Aberrant mobility phenomena of the DNA repair protein XPA. *Protein Sci* 10:1353-1362 (2001b).
- Iman A, Rao M, Juneja R, Jacob CK: Immunosuppression in live-related donor renal transplantation. *Natl Med J India* 14:75-80 (2001).
- Inui H, Oh KS, Nadem C, Ueda T, Khan SG, Metin A, Gozukara E, Emmert S, Slor H, Busch DB, Baker CC, DiGiovanna JJ, Tamura D, Seitz CS, Gratchev A, Wu WH, Chung KY, Chung HJ, Azizi E, Woodgate R, Schneider TD, Kraemer KH: Xeroderma pigmentosum-variant patients from America, Europe, and Asia. *J Invest Dermatol* 128:2055-2068 (2008).
- Itin PH, Sarasin A, Pittelkow MR: Trichothiodystrophy: update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes. *J Am Acad Dermatol* 44:891-920 (2001).
- Ito S, Kuraoka I, Chymkowitch P, Compe E, Takedachi A, Ishigami C, Coin F, Egly JM, Tanaka K: XPG stabilizes TFIIH, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. *Mol Cell* 26:231-243 (2007).
- Itoh T, Linn S, Ono T, Yamaizumi M: Reinvestigation of the classification of five cell strains of xeroderma pigmentosum group E with reclassification of three of them. *J Invest Dermatol* 114:1022-1029 (2000).
- Jackson SP: Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23:687-696 (2002).
- Javier AF, Bata-Csorgo Z, Ellis CN, Kang S, Voorhees JJ, Cooper KD: Rapamycin (sirolimus) inhibits proliferating cell nuclear antigen expression and blocks cell cycle in the G1 phase in human keratinocyte stem cells. *J Clin Invest* 99:2094-2099 (1997).
- Jean D, Harbison M, McConkey DJ, Ronai Z, Bar-Eli M: CREB and its associated proteins act as survival factors for human melanoma cells. *J Biol Chem* 273:24884-24890 (1998).

- Jefferies HB, Reinhard C, Kozma SC, Thomas G: Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4441-4445 (1994).
- Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G: Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J* 16:3693-3704 (1997).
- Jensen P, Hansen S, Moller B, Leivestad T, Pfeffer P, Fauchald P: Are renal transplant recipients on CsA-based immunosuppressive regimens more likely to develop skin cancer than those on azathioprine and prednisolone? *Transplant Proc* 31:1120 (1999a).
- Jensen P, Hansen S, Moller B, Leivestad T, Pfeffer P, Geiran O, Fauchald P, Simonsen S: Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens. *J Am Acad Dermatol* 40:177-186 (1999b).
- Johnson ES: Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73:355-382 (2004).
- Jones CJ, Wood RD: Preferential binding of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein to damaged DNA. *Biochemistry* 32:12096-12104 (1993).
- Kahan BD: Cyclosporine: a revolution in transplantation. *Transplant Proc* 31:14S-15S (1999).
- Karagas MR, Cushing GL, Jr., Greenberg ER, Mott LA, Spencer SK, Nierenberg DW: Non-melanoma skin cancers and glucocorticoid therapy. *Br J Cancer* 85:683-686 (2001).
- Kasai H, Chung MH, Jones DS, Inoue H, Ishikawa H, Kamiya H, Ohtsuka E, Nishimura S: 8-Hydroxyguanine, a DNA adduct formed by oxygen radicals: its implication on oxygen radical-involved mutagenesis/carcinogenesis. *J Toxicol Sci* 16 Suppl 1:95-105 (1991).
- Kasike BL, Guijarro C, Massy ZA, Wiederkehr MR, Ma JZ: Cardiovascular disease after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 7:158-165 (1996).
- Kastan MB, Lim DS: The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:179-186 (2000).
- Kauffman HM, Cherikh WS, Cheng Y, Hanto DW, Kahan BD: Maintenance immunosuppression with target-of-rapamycin inhibitors is associated with a reduced incidence of de novo malignancies. *Transplantation* 80:883-889 (2005).
- Khan SG, Levy HL, Legerski R, Quackenbush E, Reardon JT, Emmert S, Sancar A, Li L, Schneider TD, Cleaver JE, Kraemer KH: Xeroderma pigmentosum group C splice mutation associated with autism and hypoglycinemia. *J Invest Dermatol* 111:791-796 (1998).
- Khan SG, Muniz-Medina V, Shahlavi T, Baker CC, Inui H, Ueda T, Emmert S, Schneider TD, Kraemer KH: The human XPC DNA repair gene: arrangement, splice site information content and influence of a single nucleotide polymorphism in a splice acceptor site on alternative splicing and function. *Nucleic Acids Res* 30:3624-3631 (2002).
- Khan SG, Oh KS, Shahlavi T, Ueda T, Busch DB, Inui H, Emmert S, Imoto K, Muniz-Medina V, Baker CC, DiGiovanna JJ, Schmidt D, Khadavi A, Metin A, Gozukara E, Slor H, Sarasin A, Kraemer KH: Reduced XPC DNA repair gene mRNA levels in clinically normal parents of xeroderma pigmentosum patients. *Carcinogenesis* 27:84-94 (2006).
- Khanna KK, Jackson SP: DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27:247-254 (2001).
- Khariwala SS, Kjaergaard J, Lorenz R, Van LF, Shu S, Strome M: Everolimus (RAD) inhibits in vivo growth of murine squamous cell carcinoma (SCC VII). *Laryngoscope* 116:814-820 (2006).
- Kim K, Biade S, Matsumoto Y: Involvement of flap endonuclease 1 in base excision DNA repair. *J Biol Chem* 273:8842-8848 (1998).
- Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, .: FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)* 40:1256-1265 (1987).
- Klampfer L: Signal transducers and activators of transcription (STATs): Novel targets of chemopreventive and chemotherapeutic drugs. *Curr Cancer Drug Targets* 6:107-121 (2006).
- Klee CB, Ren H, Wang X: Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem* 273:13367-13370 (1998).
- Kobayashi T, Takeuchi S, Saijo M, Nakatsu Y, Morioka H, Otsuka E, Wakasugi M, Nikaido O, Tanaka K: Mutational analysis of a function of xeroderma pigmentosum group A (XPA) protein in strand-specific DNA repair. *Nucleic Acids Res* 26:4662-4668 (1998).
- Koberle B, Roginskaya V, Wood RD: XPA protein as a limiting factor for nucleotide excision repair and UV sensitivity in human cells. *DNA Repair (Amst)* 5:641-648 (2006).

- Koehl GE, Wagner F, Stoeltzing O, Lang SA, Steinbauer M, Schlitt HJ, Geissler EK: Mycophenolate mofetil inhibits tumor growth and angiogenesis in vitro but has variable antitumor effects in vivo, possibly related to bioavailability. *Transplantation* 83:607-614 (2007).
- Kolb S, Fritsch R, Saur D, Reichert M, Schmid RM, Schneider G: HMGA1 controls transcription of insulin receptor to regulate cyclin D1 translation in pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 67:4679-4686 (2007).
- Kondo N, Inoue R, Nishimura S, Kasahara K, Kameyama T, Miwa Y, Lorenzo PR, Orii T: Defective calcium-dependent signal transduction in T lymphocytes of ataxia-telangiectasia. *Scand J Immunol* 38:45-48 (1993).
- Korzus E, Torchia J, Rose DW, Xu L, Kurokawa R, McInerney EM, Mullen TM, Glass CK, Rosenfeld MG: Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 279:703-707 (1998).
- Kraemer KH, Lee MM, Andrews AD, Lambert WC: The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Arch Dermatol* 130:1018-1021 (1994).
- Kraemer KH, Patronas NJ, Schiffmann R, Brooks BP, Tamura D, DiGiovanna JJ: Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience* 145:1388-1396 (2007).
- Krokan HE, Nilsen H, Skorpen F, Otterlei M, Slupphaug G: Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett* 476:73-77 (2000).
- Kruger M, Schwaninger M, Blume R, Oetjen E, Knepel W: Inhibition of. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 356:433-440 (1997).
- Krutmann J: [Premature skin aging by ultraviolet radiation and other environmental hazards. The molecular basis]. *Hautarzt* 54:809-817 (2003).
- Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bachinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, Goodman RH: Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370:223-226 (1994).
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685 (1970).
- Lalle P, Nospikel T, Constantinou A, Thorel F, Clarkson SG: The founding members of xeroderma pigmentosum group G produce XPG protein with severely impaired endonuclease activity. *J Invest Dermatol* 118:344-351 (2002).
- Landi MT, Baccarelli A, Tarone RE, Pesatori A, Tucker MA, Hedayati M, Grossman L: DNA repair, dysplastic nevi, and sunlight sensitivity in the development of cutaneous malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst* 94:94-101 (2002).
- Latonen L, Laiho M: Cellular UV damage responses--functions of tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta* 1755:71-89 (2005).
- Layher SK, Cleaver JE: Quantification of XPA gene expression levels in human and mouse cell lines by competitive RT-PCR. *Mutat Res* 383:9-19 (1997).
- Le PF, Kwok EE, Avrutskaya A, Gentil A, Leadon SA, Sarasin A, Cooper PK: Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. *Cell* 101:159-171 (2000).
- Lebbe C, Euvrard S, Barrou B, Pouteil-Noble C, Garnier JL, Glotz D, Legendre C, Frances C: Sirolimus conversion for patients with posttransplant Kaposi's sarcoma. *Am J Transplant* 6:2164-2168 (2006).
- Lee JH, Park CJ, Arunkumar AI, Chazin WJ, Choi BS: NMR study on the interaction between RPA and DNA decamer containing cis-syn cyclobutane pyrimidine dimer in the presence of XPA: implication for damage verification and strand-specific dual incision in nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res* 31:4747-4754 (2003).
- Legerski RJ, Liu P, Li L, Peterson CA, Zhao Y, Leach RJ, Naylor SL, Siciliano MJ: Assignment of xeroderma pigmentosum group C (XPC) gene to chromosome 3p25. *Genomics* 21:266-269 (1994).
- Lehmann AR: The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases. *Genes Dev* 15:15-23 (2001).
- Lehmann AR: Replication of damaged DNA by translesion synthesis in human cells. *FEBS Lett* 579:873-876 (2005).
- Leibeling D, Laspe P, Emmert S: Nucleotide excision repair and cancer. *J Mol Histol* 37:225-238 (2006).
- Lemaitre V, D'Armiento J: Matrix metalloproteinases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 78:1-10 (2006).

- Leung-Pineda V, Ryan CE, Piwnica-Worms H: Phosphorylation of Chk1 by ATR is antagonized by a Chk1-regulated protein phosphatase 2A circuit. *Mol Cell Biol* 26:7529-7538 (2006).
- Leveillard T, Andera L, Bissonnette N, Schaeffer L, Bracco L, Egly JM, Wasylyk B: Functional interactions between p53 and the TFIIH complex are affected by tumour-associated mutations. *EMBO J* 15:1615-1624 (1996).
- Levin JD, Shapiro R, Demple B: Metalloenzymes in DNA repair. *Escherichia coli* endonuclease IV and *Saccharomyces cerevisiae* Apn1. *J Biol Chem* 266:22893-22898 (1991).
- Levy DD, Saijo M, Tanaka K, Kraemer KH: Expression of a transfected DNA repair gene (XPA) in xeroderma pigmentosum group A cells restores normal DNA repair and mutagenesis of UV-treated plasmids. *Carcinogenesis* 16:1557-1563 (1995).
- Ley RD, Peak MJ, Lyon LL: Induction of pyrimidine dimers in epidermal DNA of hairless mice by UVB: an action spectrum. *J Invest Dermatol* 80:188-191 (1983).
- Li L, Peterson CA, Lu X, Legerski RJ: Mutations in XPA that prevent association with ERCC1 are defective in nucleotide excision repair. *Mol Cell Biol* 15:1993-1998 (1995).
- Li G, Ho VC: p53-dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high- and low-dose ultraviolet radiation. *Br J Dermatol* 139:3-10 (1998).
- Li AG, Lu SL, Han G, Kulesz-Martin M, Wang XJ: Current view of the role of transforming growth factor beta 1 in skin carcinogenesis. *J Invest Dermatol Symp Proc* 10:110-117 (2005).
- Liau SS, Jazag A, Whang EE: HMGA1 is a determinant of cellular invasiveness and in vivo metastatic potential in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 66:11613-11622 (2006).
- Lim IK: TIS21 (/BTG2/PC3) as a link between ageing and cancer: cell cycle regulator and endogenous cell death molecule. *J Cancer Res Clin Oncol* 132:417-426 (2006).
- Lin WC, Lin FT, Nevins JR: Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev* 15:1833-1844 (2001).
- Lin YW, Chuang SM, Yang JL: Persistent activation of ERK1/2 by lead acetate increases nucleotide excision repair synthesis and confers anti-cytotoxicity and anti-mutagenicity. *Carcinogenesis* 24:53-61 (2003).
- Lin PS, McPherson LA, Chen AY, Sage J, Ford JM: The role of the retinoblastoma/E2F1 tumor suppressor pathway in the lesion recognition step of nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* 8:795-802 (2009).
- Lindahl T, Wood RD: Quality control by DNA repair. *Science* 286:1897-1905 (1999).
- Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66:807-815 (1991).
- Liu P, Siciliano J, White B, Legerski R, Callen D, Reeders S, Siciliano MJ, Thompson LH: Regional mapping of human DNA excision repair gene ERCC4 to chromosome 16p13.13-p13.2. *Mutagenesis* 8:199-205 (1993).
- Liu W, Nichols AF, Graham JA, Dualan R, Abbas A, Linn S: Nuclear transport of human DDB protein induced by ultraviolet light. *J Biol Chem* 275:21429-21434 (2000).
- Liu Y, Liu Y, Yang Z, Utzat C, Wang G, Basu AK, Zou Y: Cooperative interaction of human XPA stabilizes and enhances specific binding of XPA to DNA damage. *Biochemistry* 44:7361-7368 (2005).
- Lo HL, Nakajima S, Ma L, Walter B, Yasui A, Ethell DW, Owen LB: Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest. *BMC Cancer* 5:135 (2005).
- Lockhart DJ, Winzeler EA: Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405:827-836 (2000).
- Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN: Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 10:457-468 (2002).
- Loh C, Shaw KT, Carew J, Viola JP, Luo C, Perrino BA, Rao A: Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J Biol Chem* 271:10884-10891 (1996).
- Louat T, Canitrot Y, Jousseume S, Baudouin C, Canal P, Laurent G, Lautier D: Atypical protein kinase C stimulates nucleotide excision repair activity. *FEBS Lett* 574:121-125 (2004).
- Luan FL, Hojo M, Maluccio M, Yamaji K, Suthanthiran M: Rapamycin blocks tumor progression: unlinking immunosuppression from antitumor efficacy. *Transplantation* 73:1565-1572 (2002).
- Majewski M, Korecka M, Kossev P, Li S, Goldman J, Moore J, Silberstein LE, Nowell PC, Schuler W, Shaw LM, Wasik MA: The immunosuppressive macrolide RAD inhibits growth of human Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes in vitro and in vivo: A potential

- approach to prevention and treatment of posttransplant lymphoproliferative disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4285-4290 (2000).
- Maluccio M, Sharma V, Lagman M, Vyas S, Yang H, Li B, Suthanthiran M: Tacrolimus enhances transforming growth factor-beta1 expression and promotes tumor progression. *Transplantation* 76:597-602 (2003).
- Martina M, Kilic G, Cherubini E: The effect of intracellular Ca²⁺ on GABA-activated currents in cerebellar granule cells in culture. *J Membr Biol* 142:209-216 (1994).
- Marx SO, Marks AR: Bench to bedside: the development of rapamycin and its application to stent restenosis. *Circulation* 104:852-855 (2001).
- Masuhara M, Ogasawara H, Katyal SL, Nakamura T, Shinozuka H: Cyclosporine stimulates hepatocyte proliferation and accelerates development of hepatocellular carcinomas in rats. *Carcinogenesis* 14:1579-1584 (1993).
- Masutani C, Kusumoto R, Iwai S, Hanaoka F: Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase ϵ . *EMBO J* 19:3100-3109 (2000).
- Masutani C, Sugasawa K, Yanagisawa J, Sonoyama T, Ui M, Enomoto T, Takio K, Tanaka K, van der Spek PJ, Bootsma D, .: Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *EMBO J* 13:1831-1843 (1994).
- Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, Dohmae N, Yokoi M, Yuasa M, Araki M, Iwai S, Takio K, Hanaoka F: The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase ϵ . *Nature* 399:700-704 (1999).
- Mathew TH: A blinded, long-term, randomized multicenter study of mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplantation: results at three years. *Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. Transplantation* 65:1450-1454 (1998).
- Mathew T, Kreis H, Friend P: Two-year incidence of malignancy in sirolimus-treated renal transplant recipients: results from five multicenter studies. *Clin Transplant* 18:446-449 (2004).
- Matsuda S, Koyasu S: Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 47:119-125 (2000).
- Matsue H, Yang C, Matsue K, Edelbaum D, Mummert M, Takashima A: Contrasting impacts of immunosuppressive agents (rapamycin, FK506, cyclosporin A, and dexamethasone) on bidirectional dendritic cell-T cell interaction during antigen presentation. *J Immunol* 169:3555-3564 (2002).
- Matsumura Y, Nishigori C, Yagi T, Imamura S, Takebe H: Characterization of molecular defects in xeroderma pigmentosum group F in relation to its clinically mild symptoms. *Hum Mol Genet* 7:969-974 (1998).
- Mayr BM, Canetti G, Montminy MR: Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10936-10941 (2001).
- McDowell ML, Nguyen T, Cleaver JE: A single-site mutation in the XPAC gene alters photoproduct recognition. *Mutagenesis* 8:155-161 (1993).
- McGregor JM, Proby CM: Skin cancer in transplant recipients. *Lancet* 346:964-965 (1995).
- Meier F, Guenova E, Clasen S, Eigentler T, Forschner A, Leiter U, Zielinski C, Knautd B, Garbe C, Berneburg M: Significant response after treatment with the mTOR inhibitor sirolimus in combination with carboplatin and paclitaxel in metastatic melanoma patients. *J Am Acad Dermatol* 60:863-868 (2009).
- Mellon I, Hock T, Reid R, Porter PC, States JC: Polymorphisms in the human xeroderma pigmentosum group A gene and their impact on cell survival and nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* 1:531-546 (2002).
- Menck CF: Shining a light on photolyases. *Nat Genet* 32:338-339 (2002).
- Messina E, Gazzaniga P, Micheli V, Guaglianone MR, Barbato S, Morrone S, Frati L, Agliano AM, Giacomello A: Guanine nucleotide depletion triggers cell cycle arrest and apoptosis in human neuroblastoma cell lines. *Int J Cancer* 108:812-817 (2004).
- Metcalfe S, Alexander D, Turner J: FK506 and cyclosporin A each inhibit antigen-specific signaling in the T cell line 171 in the absence of a calcium signal. *Cell Immunol* 158:46-58 (1994).
- Mi J, Bolesta E, Brautigan DL, Larner JM: PP2A regulates ionizing radiation-induced apoptosis through Ser46 phosphorylation of p53. *Mol Cancer Ther* 8:135-140 (2009).
- Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, Yamaguchi Y, Nickeleit V, Ryffel B: The side-effects of ciclosporine-A and tacrolimus. *Clin Nephrol* 49:356-363 (1998).

- Milan D, Griffith J, Su M, Price ER, McKeon F: The latch region of calcineurin B is involved in both immunosuppressant-immunophilin complex docking and phosphatase activation. *Cell* 79:437-447 (1994).
- Min YH, Eom JI, Cheong JW, Maeng HO, Kim JY, Jeung HK, Lee ST, Lee MH, Hahn JS, Ko YW: Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable. *Leukemia* 17:995-997 (2003).
- Mitchell DL, Nguyen TD, Cleaver JE: Nonrandom induction of pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproducts in ultraviolet-irradiated human chromatin. *J Biol Chem* 265:5353-5356 (1990).
- Miura N, Miyamoto I, Asahina H, Satokata I, Tanaka K, Okada Y: Identification and characterization of xpac protein, the gene product of the human XPAC (xeroderma pigmentosum group A complementing) gene. *J Biol Chem* 266:19786-19789 (1991).
- Miyamoto I, Miura N, Niwa H, Miyazaki J, Tanaka K: Mutational analysis of the structure and function of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein. Identification of essential domains for nuclear localization and DNA excision repair. *J Biol Chem* 267:12182-12187 (1992).
- Montminy M: Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 66:807-822 (1997).
- Moon HI, Chung JH: The effect of 2',4',7-trihydroxyisoflavone on ultraviolet-induced matrix metalloproteinases-1 expression in human skin fibroblasts. *FEBS Lett* 580:769-774 (2006).
- Morath C, Zeier M: Review of the antiproliferative properties of mycophenolate mofetil in non-immune cells. *Int J Clin Pharmacol Ther* 41:465-469 (2003).
- Mori T, Nakane M, Hattori T, Matsunaga T, Ihara M, Nikaido O: Simultaneous establishment of monoclonal antibodies specific for either cyclobutane pyrimidine dimer or (6-4)photoproduct from the same mouse immunized with ultraviolet-irradiated DNA. *Photochem Photobiol* 54:225-232 (1991).
- Morice WG, Brunn GJ, Wiederrecht G, Siekierka JJ, Abraham RT: Rapamycin-induced inhibition of p34cdc2 kinase activation is associated with G1/S-phase growth arrest in T lymphocytes. *J Biol Chem* 268:3734-3738 (1993).
- Moriwaki S, Tarone RE, Kraemer KH: A potential laboratory test for dysplastic nevus syndrome: ultraviolet hypermutability of a shuttle vector plasmid. *J Invest Dermatol* 103:7-12 (1994).
- Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grunwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, Urbanowitz G, Berg WJ, Kay A, Lebwohl D, Ravaud A: Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* 372:449-456 (2008).
- Mudgett JS, MacInnes MA: Isolation of the functional human excision repair gene ERCC5 by intercosmid recombination. *Genomics* 8:623-633 (1990).
- Mulero C, Aubareda A, Orzaez M, Messeguer J, Serrano-Candelas E, Martinez-Hoyer S, Messeguer A, Perez-Paya E, Perez-Riba E: Inhibiting the calcineurin-NFAT (nuclear factor of activated T cells) signaling pathway with a regulator of calcineurin-derived peptide without affecting general calcineurin phosphatase activity. *J Biol Chem* 284:9394-9401 (2009).
- Muller H, Helin K: The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* 1470:M1-12 (2000).
- Nakagawa A, Kobayashi N, Muramatsu T, Yamashina Y, Shirai T, Hashimoto MW, Ikenaga M, Mori T: Three-dimensional visualization of ultraviolet-induced DNA damage and its repair in human cell nuclei. *J Invest Dermatol* 110:143-148 (1998).
- Nakajima S, Lan L, Kanno S, Takao M, Yamamoto K, Eker AP, Yasui A: UV light-induced DNA damage and tolerance for the survival of nucleotide excision repair-deficient human cells. *J Biol Chem* 279:46674-46677 (2004).
- Nepomuceno RR, Balatoni CE, Natkunam Y, Snow AL, Krams SM, Martinez OM: Rapamycin inhibits the interleukin 10 signal transduction pathway and the growth of Epstein Barr virus B-cell lymphomas. *Cancer Res* 63:4472-4480 (2003).
- Nichols AF, Ong P, Linn S: Mutations specific to the xeroderma pigmentosum group E Ddb-phenotype. *J Biol Chem* 271:24317-24320 (1996).
- Nocentini S, Coin F, Saijo M, Tanaka K, Egly JM: DNA damage recognition by XPA protein promotes efficient recruitment of transcription factor II H. *J Biol Chem* 272:22991-22994 (1997).
- Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, Oshiro N, Hidayat S, Yoshino K, Hara K, Tanaka N, Avruch J, Yonezawa K: The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J Biol Chem* 278:15461-15464 (2003).

- Norris JM: Can the sunshine vitamin shed light on type 1 diabetes? *Lancet* 358:1476-1478 (2001).
- Noguchi H, Matsushita M, Okitsu, Moriwaki A, Tomizawa K, Kang S, Li ST, Kobayashi N, Matsumoto S, Tanaka K, Tanaka N, Matsui H: A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nat. Med.* 10:305-309 (2004)
- Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, Coats S, Polyak K, Lee MH, Massague J, Crabtree GR, Roberts JM: Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 372:570-573 (1994).
- Nouspikel T, Lalle P, Leadon SA, Cooper PK, Clarkson SG: A common mutational pattern in Cockayne syndrome patients from xeroderma pigmentosum group G: implications for a second XPG function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3116-3121 (1997).
- O'Donovan A, Scherly D, Clarkson SG, Wood RD: Isolation of active recombinant XPG protein, a human DNA repair endonuclease. *J Biol Chem* 269:15965-15968 (1994).
- O'Donovan P, Perrett CM, Zhang X, Montaner B, Xu YZ, Harwood CA, McGregor JM, Walker SL, Hanacka F, Karran P: Azathioprine and UVA light generate mutagenic oxidative DNA damage. *Science* 309:1871-1874 (2005).
- O'Neill JO, Edwards LB, Taylor DO: Mycophenolate mofetil and risk of developing malignancy after orthotopic heart transplantation: analysis of the transplant registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 25:1186-1191 (2006).
- Oakley GG, Loberg LI, Yao J, Risinger MA, Yunker RL, Zernik-Kobak M, Khanna KK, Lavin MF, Carty MP, Dixon K: UV-induced hyperphosphorylation of replication protein a depends on DNA replication and expression of ATM protein. *Mol Biol Cell* 12:1199-1213 (2001).
- Oetjen E, Grapentin D, Blume R, Seeger M, Krause D, Eggers A, Knepel W: Regulation of human insulin gene transcription by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and tacrolimus at concentrations that inhibit calcineurin activity and involving the transcription factor CREB. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 367:227-236 (2003).
- Oetjen E, Thoms KM, Laufer Y, Pape D, Blume R, Li P, Knepel W: The immunosuppressive drugs cyclosporin A and tacrolimus inhibit membrane depolarization-induced CREB transcriptional activity at the coactivator level. *Br J Pharmacol* 144:982-993 (2005).
- Oetjen E, Lechleiter A, Blume R, Nihalani D, Holzman L, Knepel W: Inhibition of membrane depolarisation-induced transcriptional activity of cyclic AMP response element binding protein (CREB) by the dual-leucine-zipper-bearing kinase in a pancreatic islet beta cell line. *Diabetologia* 49:332-342 (2006).
- Oh KS, Khan SG, Jaspers NG, Raams A, Ueda T, Lehmann A, Friedmann PS, Emmert S, Gratchev A, Lachlan K, Lucassan A, Baker CC, Kraemer KH: Phenotypic heterogeneity in the XPB DNA helicase gene (ERCC3): xeroderma pigmentosum without and with Cockayne syndrome. *Hum Mutat* 27:1092-1103 (2006).
- Ori Y, Herman M, Chagnac A, Malachi T, Gafter U, Korzets A: Spontaneous DNA repair in human mononuclear cells is calcium-dependent. *Biochem Biophys Res Commun* 336:842-846 (2005).
- Otley CC, Maragh SL: Reduction of immunosuppression for transplant-associated skin cancer: rationale and evidence of efficacy. *Dermatol Surg* 31:163-168 (2005).
- Otto AI, Riou L, Marionnet C, Mori T, Sarasin A, Magnaldo T: Differential behaviors toward ultraviolet A and B radiation of fibroblasts and keratinocytes from normal and DNA-repair-deficient patients. *Cancer Res* 59:1212-1218 (1999).
- Paiva NL, Demain AL, Roberts MF: Incorporation of acetate, propionate, and methionine into rapamycin by *Streptomyces hygroscopicus*. *J Nat Prod* 54:167-177 (1991).
- Pan YR, Lee EY: UV-dependent interaction between Cep164 and XPA mediates localization of Cep164 at sites of DNA damage and UV sensitivity. *Cell Cycle* 8:655-664 (2009).
- Parker D, Ferreri K, Nakajima T, LaMorte VJ, Evans R, Koerber SC, Hoeger C, Montminy MR: Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Mol Cell Biol* 16:694-703 (1996).
- Parrish JA, Jaenicke KF, Anderson RR: Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin. *Photochem Photobiol* 36:187-191 (1982).
- Parris CN, Kraemer KH: Ultraviolet mutagenesis in human lymphocytes: the effect of cellular transformation. *Exp Cell Res* 201:462-469 (1992).
- Partch CL, Sancar A: Cryptochromes and circadian photoreception in animals. *Methods Enzymol* 393:726-745 (2005).
- Penn I: Occurrence of cancers in immunosuppressed organ transplant recipients. *Clin Transpl* 147-158 (1998).

- Penn I: Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression. *Drug Saf* 23:101-113 (2000).
- Peters DH, Fitton A, Plosker GL, Faulds D: Tacrolimus. A review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. *Drugs* 46:746-794 (1993).
- Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS: A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 63:977-983 (1997).
- Pitts DG: Sunlight as an ultraviolet source. *Optom Vis Sci* 67:401-406 (1990).
- Polager S, Kalma Y, Berkovich E, Ginsberg D: E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene* 21:437-446 (2002).
- Poston RS, Billingham M, Hoyt EG, Pollard J, Shorthouse R, Morris RE, Robbins RC: Rapamycin reverses chronic graft vascular disease in a novel cardiac allograft model. *Circulation* 100:67-74 (1999).
- Protic-Sabljić M, Kraemer KH: One pyrimidine dimer inactivates expression of a transfected gene in xeroderma pigmentosum cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6622-6626 (1985).
- Qiao Y, Spitz MR, Guo Z, Hadeyati M, Grossman L, Kraemer KH, Wei Q: Rapid assessment of repair of ultraviolet DNA damage with a modified host-cell reactivation assay using a luciferase reporter gene and correlation with polymorphisms of DNA repair genes in normal human lymphocytes. *Mutat Res* 509:165-174 (2002).
- Queille S, Luron L, Spatz A, Avril MF, Ribrag V, Duvillard P, Hiesse C, Sarasin A, Armand JP, ya-Grosjean L: Analysis of skin cancer risk factors in immunosuppressed renal transplant patients shows high levels of UV-specific tandem CC to TT mutations of the p53 gene. *Carcinogenesis* 28:724-731 (2007).
- Rademakers S, Volker M, Hoogstraten D, Nigg AL, Mone MJ, Van Zeeland AA, Hoeijmakers JH, Houtsmuller AB, Vermeulen W: Xeroderma pigmentosum group A protein loads as a separate factor onto DNA lesions. *Mol Cell Biol* 23:5755-5767 (2003).
- Rajasekhar VK, Viale A, Socci ND, Wiedmann M, Hu X, Holland EC: Oncogenic Ras and Akt signaling contribute to glioblastoma formation by differential recruitment of existing mRNAs to polysomes. *Mol Cell* 12:889-901 (2003).
- Rao A, Luo C, Hogan PG: Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15:707-747 (1997).
- Rapin I, Lindenbaum Y, Dickson DW, Kraemer KH, Robbins JH: Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum. *Neurology* 55:1442-1449 (2000).
- Ravanat JL, Douki T, Cadet J: Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B* 63:88-102 (2001).
- Reardon JT, Sancar A: Recognition and repair of the cyclobutane thymine dimer, a major cause of skin cancers, by the human excision nuclease. *Genes Dev* 17:2539-2551 (2003).
- Reed PW, Lardy HA: A23187: a divalent cation ionophore. *J Biol Chem* 247:6970-6977 (1972).
- Reitamo S: Tacrolimus: a new topical immunomodulatory therapy for atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 107:445-448 (2001).
- Riou L, Eveno E, van HA, Van Zeeland AA, Sarasin A, Mullenders LH: Differential repair of the two major UV-induced photolesions in trichothiodystrophy fibroblasts. *Cancer Res* 64:889-894 (2004).
- Robles AI, Wang XW, Harris CC: Drug-induced apoptosis is delayed and reduced in XPD lymphoblastoid cell lines: possible role of TFIIH in p53-mediated apoptotic cell death. *Oncogene* 18:4681-4688 (1999).
- Rosenstein BS, Mitchell DL: Action spectra for the induction of pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts and cyclobutane pyrimidine dimers in normal human skin fibroblasts. *Photochem Photobiol* 45:775-780 (1987).
- Rudolph D, Tafuri A, Gass P, Hammerling GJ, Arnold B, Schutz G: Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in mice lacking the cAMP response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4481-4486 (1998).
- Ruhlmann A, Nordheim A: Effects of the immunosuppressive drugs CsA and FK506 on intracellular signalling and gene regulation. *Immunobiology* 198:192-206 (1997).
- Runger TM, DiGiovanna JJ, Kraemer KH: Hereditary Diseases of genome instability and DNA repair. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ (eds). *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. McGraw Hill: New York:1311-1325 (2008)
- Rusnak F, Mertz P: Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80:1483-1521 (2000).
- Rybanska I, Pirsel M: Involvement of the nucleotide excision repair proteins in the removal of oxidative DNA base damage in mammalian cells. *Neoplasma* 50:389-395 (2003).

- Sabatini DM, Pierchala BA, Barrow RK, Schell MJ, Snyder SH: The rapamycin and FKBP12 target (RAFT) displays phosphatidylinositol 4-kinase activity. *J Biol Chem* 270:20875-20878 (1995).
- Sakai N, Tolbert LM, Duman RS: Identification and functional analysis of novel cAMP response element binding protein splice variants lacking the basic/leucine zipper domain. *Mol Pharmacol* 56:917-925 (1999).
- Salinovich O, Montelaro RC: Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 156:341-347 (1986).
- Sambrook J, Russell DW: *Molecular Cloning, a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001).
- Sancar A, Sancar GB: DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem* 57:29-67 (1988).
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S: Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73:39-85 (2004).
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467 (1977).
- Santini MP, Talora C, Seki T, Bolgan L, Dotto GP: Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21(WAF1/CIP1) expression in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9575-9580 (2001).
- Satokata I, Tanaka K, Miura N, Miyamoto I, Satoh Y, Kondo S, Okada Y: Characterization of a splicing mutation in group A xeroderma pigmentosum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9908-9912 (1990).
- Satokata I, Tanaka K, Miura N, Narita M, Mimaki T, Satoh Y, Kondo S, Okada Y: Three nonsense mutations responsible for group A xeroderma pigmentosum. *Mutat Res* 273:193-202 (1992).
- Saunders RN, Metcalfe MS, Nicholson ML: Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. *Kidney Int* 59:3-16 (2001).
- Schaeffer L, Roy R, Humbert S, Moncollin V, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, Chambon P, Egly JM: DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science* 260:58-63 (1993).
- Schallreuter KU, Pittelkow MR, Wood JM: Defects in antioxidant defense and calcium transport in the epidermis of xeroderma pigmentosum patients. *Arch Dermatol Res* 283:449-455 (1991).
- Schieven GL, Kiriwara JM, Gilliland LK, Uckun FM, Ledbetter JA: Ultraviolet radiation rapidly induces tyrosine phosphorylation and calcium signaling in lymphocytes. *Mol Biol Cell* 4:523-530 (1993).
- Schreiber SL, Crabtree GR: The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 13:136-142 (1992).
- Schroder F, Herzig S: [Cyclosporine]. *Dtsch Med Wochenschr* 123:121-122 (1998).
- Schuler W, Sedrani R, Cottens S, Haberlin B, Schulz M, Schuurman HJ, Zenke G, Zerwes HG, Schreier MH: SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation* 64:36-42 (1997).
- Schultz P, Fribourg S, Poterszman A, Mallouh V, Moras D, Egly JM: Molecular structure of human TFIIH. *Cell* 102:599-607 (2000).
- Schumacher G, Oidtmann M, Rosewicz S, Langrehr J, Jonas S, Mueller AR, Rueggeberg A, Neuhaus R, Bahra M, Jacob D, Gerlach H, Neuhaus P: Sirolimus inhibits growth of human hepatoma cells in contrast to tacrolimus which promotes cell growth. *Transplant Proc* 34:1392-1393 (2002).
- Schwaninger M, Schofl C, Blume R, Rossig L, Knepel W: Inhibition by antidepressant drugs of cyclic AMP response element-binding protein/cyclic AMP response element-directed gene transcription. *Mol Pharmacol* 47:1112-1118 (1995).
- Sedrani R, Cottens S, Kallen J, Schuler W: Chemical modification of rapamycin: the discovery of SDZ RAD. *Transplant Proc* 30:2192-2194 (1998).
- Sehgal SN: Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* 35:7S-14S (2003).
- Sgarra R, Tessari MA, Di BJ, Rustighi A, Zago P, Liberatori S, Armini A, Bini L, Giancotti V, Manfioletti G: Discovering high mobility group A molecular partners in tumour cells. *Proteomics* 5:1494-1506 (2005).
- She QB, Ma WY, Dong Z: Role of MAP kinases in UVB-induced phosphorylation of p53 at serine 20. *Oncogene* 21:1580-1589 (2002).
- Shimizu Y, Iwai S, Hanaoka F, Sugawara K: Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase. *EMBO J* 22:164-173 (2003).

- Shuck SC, Short EA, Turchi JJ: Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res* 18:64-72 (2008).
- Sidwell RU, Sandison A, Wing J, Fawcett HD, Seet JE, Fisher C, Nardo T, Stefanini M, Lehmann AR, Cream JJ: A novel mutation in the XPA gene associated with unusually mild clinical features in a patient who developed a spindle cell melanoma. *Br J Dermatol* 155:81-88 (2006).
- Siemann G, Blume R, Grapentin D, Oetjen E, Schwaninger M, Knepel W: Inhibition of cyclic AMP response element-binding protein/cyclic AMP response element-mediated transcription by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506 depends on the promoter context. *Mol Pharmacol* 55:1094-1100 (1999).
- Sijbers AM, de Laat WL, Ariza RR, Biggerstaff M, Wei YF, Moggs JG, Carter KC, Shell BK, Evans E, de Jong MC, Rademakers S, de RJ, Jaspers NG, Hoeijmakers JH, Wood RD: Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell* 86:811-822 (1996).
- Sinha RP, Hader DP: UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* 1:225-236 (2002).
- Slominski A, Wortsman J: Neuroendocrinology of the skin. *Endocr Rev* 21:457-487 (2000).
- Smith CS, Ortega G, Parker L, Shearer WT: Cyclosporin A blocks induction of tumor necrosis factor-alpha in human B lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 204:383-390 (1994).
- Sodhi A, Chaisuparat R, Hu J, Ramsdell AK, Manning BD, Sausville EA, Sawai ET, Molinolo A, Gutkind JS, Montaner S: The TSC2/mTOR pathway drives endothelial cell transformation induced by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor. *Cancer Cell* 10:133-143 (2006).
- Soehnge H, Ouhtit A, Ananthaswamy ON: Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation. *Front Biosci* 2:d538-d551 (1997).
- Spencer CM, Goa KL, Gillis JC: Tacrolimus. An update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation. *Drugs* 54:925-975 (1997).
- Stallone G, Schena A, Infante B, Di PS, Loverre A, Maggio G, Ranieri E, Gesualdo L, Schena FP, Grandaliano G: Sirolimus for Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 352:1317-1323 (2005).
- Strydom C, Robert C, Sarasin A: Deleterious effects of ultraviolet A radiation in human cells. *Mutat Res* 383:1-8 (1997).
- States JC, McDuffie ER, Myrand SP, McDowell M, Cleaver JE: Distribution of mutations in the human xeroderma pigmentosum group A gene and their relationships to the functional regions of the DNA damage recognition protein. *Hum Mutat* 12:103-113 (1998).
- Stege H, Roza L, Vink AA, Grewe M, Ruzicka T, Grether-Beck S, Krutmann J: Enzyme plus light therapy to repair DNA damage in ultraviolet-B-irradiated human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1790-1795 (2000).
- Stemmer PM, Klee CB: Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry* 33:6859-6866 (1994).
- Stigger E, Drissi R, Lee SH: Functional analysis of human replication protein A in nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 273:9337-9343 (1998).
- Stiller CR: An overview of the first decade of cyclosporine. *Transplant Proc* 28:2005-2012 (1996).
- Sugasawa K, Okamoto T, Shimizu Y, Masutani C, Iwai S, Hanaoka F: A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes Dev* 15:507-521 (2001).
- Sugasawa K, Shimizu Y, Iwai S, Hanaoka F: A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair (Amst)* 1:95-107 (2002).
- Sugasawa K, Okuda Y, Saijo M, Nishi R, Matsuda N, Chu G, Mori T, Iwai S, Tanaka K, Tanaka K, Hanaoka F: UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* 121:387-400 (2005).
- Sugie N, Fujii N, Danno K: Cyclosporin-A suppresses p53-dependent repair DNA synthesis and apoptosis following ultraviolet-B irradiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 18:163-168 (2002).
- Sun P, Enslen H, Myung PS, Maurer RA: Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev* 8:2527-2539 (1994).
- Sung P, Bailly V, Weber C, Thompson LH, Prakash L, Prakash S: Human xeroderma pigmentosum group D gene encodes a DNA helicase. *Nature* 365:852-855 (1993).

- Suzuki N, Sakane T, Tsunematsu T: Effects of a novel immunosuppressive agent, FK506, on human B cell activation. *Clin Exp Immunol* 79:240-245 (1990).
- Swann PF, Waters TR, Moulton DC, Xu YZ, Zheng Q, Edwards M, Mace R: Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science* 273:1109-1111 (1996).
- Takahashi N, Hayano T, Suzuki M: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* 337:473-475 (1989).
- Tan T, Chu G: p53 Binds and activates the xeroderma pigmentosum DDB2 gene in humans but not mice. *Mol Cell Biol* 22:3247-3254 (2002a).
- Tan T, Chu G: p53 Binds and activates the xeroderma pigmentosum DDB2 gene in humans but not mice. *Mol Cell Biol* 22:3247-3254 (2002b).
- Tanaka K, Miura N, Satokata I, Miyamoto I, Yoshida MC, Satoh Y, Kondo S, Yasui A, Okayama H, Okada Y: Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain. *Nature* 348:73-76 (1990).
- Tang JY, Hwang BJ, Ford JM, Hanawalt PC, Chu G: Xeroderma pigmentosum p48 gene enhances global genomic repair and suppresses UV-induced mutagenesis. *Mol Cell* 5:737-744 (2000).
- Tanioka M, Budiyan A, Ueda T, Nagano T, Ichihashi M, Miyachi Y, Nishigori C: A novel XPA gene mutation and its functional analysis in a Japanese patient with xeroderma pigmentosum group A. *J Invest Dermatol* 125:244-246 (2005).
- Taylor EM, Broughton BC, Botta E, Stefanini M, Sarasin A, Jaspers NG, Fawcett H, Harcourt SA, Arlett CF, Lehmann AR: Xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy are associated with different mutations in the XPD (ERCC2) repair/transcription gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8658-8663 (1997).
- Terada N, Lucas JJ, Szepesi A, Franklin RA, Domenico J, Gelfand EW: Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic of the middle to late G1 phase of the cycle. *J Cell Physiol* 154:7-15 (1993).
- Terada N, Patel HR, Takase K, Kohno K, Nairn AC, Gelfand EW: Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11477-11481 (1994).
- Thiel G, Bock A, Spondlin M, Brunner FP, Mihatsch M, Rufli T, Landmann J: Long-term benefits and risks of cyclosporin A (sandimmun)--an analysis at 10 years. *Transplant Proc* 26:2493-2498 (1994).
- Thoma F: Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. *EMBO J* 18:6585-6598 (1999).
- Thompson LH, Schild D: Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* 509:49-78 (2002).
- Thoms KM, Baesecke J, Emmert B, Hermann J, Roedling T, Laspe P, Leibel D, Truemper L, Emmert S: Functional DNA repair system analysis in haematopoietic progenitor cells using host cell reactivation. *Scand J Clin Lab Invest* 67:580-588 (2007a).
- Thoms KM, Kuschal C, Emmert S: Lessons learned from DNA repair defective syndromes. *Exp Dermatol* 16:532-544 (2007b).
- Thorsby E: MHC structure and function. *Transplant Proc* 31:713-716 (1999).
- Tirone F: The gene PC3(TIS21/BTG2), prototype member of the PC3/BTG/TOB family: regulator in control of cell growth, differentiation, and DNA repair? *J Cell Physiol* 187:155-165 (2001).
- Tiu J, Li H, Rassekh C, van der SP, Kovach R, Zhang P: Molecular basis of posttransplant squamous cell carcinoma: the potential role of cyclosporine a in carcinogenesis. *Laryngoscope* 116:762-769 (2006).
- Topping RS, Myrand SP, Williams BL, Albert JC, States JC: Characterization of the human XPA promoter. *Gene* 166:341-342 (1995).
- Torchia J, Rose DW, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass CK, Rosenfeld MG: The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387:677-684 (1997).
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354 (1979).
- Trouche D, Cook A, Kouzarides T: The CBP co-activator stimulates E2F1/DP1 activity. *Nucleic Acids Res* 24:4139-4145 (1996).
- Ulrich C, Christophers E, Sterry W, Meyer T, Stockfleth E: [Skin diseases in organ transplant patients]. *Hautarzt* 53:524-533 (2002).

- van GT, Hilbrands LB, Vanrenterghem Y, Weimar W, de Fijter JW, Squifflet JP, Hene RJ, Verpooten GA, Navarro MT, Hale MD, Nicholls AJ: A randomized double-blind, multicenter plasma concentration controlled study of the safety and efficacy of oral mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection after kidney transplantation. *Transplantation* 68:261-266 (1999).
- van Leeuwen MT, Grulich AE, McDonald SP, McCredie MR, Amin J, Stewart JH, Webster AC, Chapman JR, Vajdic CM: Immunosuppression and other risk factors for lip cancer after kidney transplantation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:561-569 (2009).
- Vandel L, Kouzarides T: Residues phosphorylated by TFIIH are required for E2F-1 degradation during S-phase. *EMBO J* 18:4280-4291 (1999).
- Vegso G, Sebestyen A, Paku S, Barna G, Hajdu M, Toth M, Jaray J, Kopper L: Antiproliferative and apoptotic effects of mycophenolic acid in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Leuk Res* 31:1003-1008 (2007).
- Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN: Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 28:721-726 (1975).
- Vivanco I, Sawyers CL: The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2:489-501 (2002).
- Vogel U, Dybdahl M, Frentz G, Nexø BA: DNA repair capacity: inconsistency between effect of over-expression of five NER genes and the correlation to mRNA levels in primary lymphocytes. *Mutat Res* 461:197-210 (2000).
- Volker M, Mone MJ, Karmakar P, van HA, Schul W, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, van DR, Van Zeeland AA, Mullenders LH: Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell* 8:213-224 (2001).
- Wakasugi M, Kawashima A, Morioka H, Linn S, Sancar A, Mori T, Nikaido O, Matsunaga T: DDB accumulates at DNA damage sites immediately after UV irradiation and directly stimulates nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 277:1637-1640 (2002).
- Walker JR, Corpina RA, Goldberg J: Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412:607-614 (2001).
- Walker S, Habib S, Thompson D, Khaghani A, Yacoub M, Banner N: Risks and benefits of withdrawing cyclosporine from the long-term immunosuppression regimen of heart and heart-lung transplant recipients. *Transplant Proc* 30:1149-1151 (1998).
- Walsh AH, Cheng A, Honkanen RE: Fostriecin, an antitumor antibiotic with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases types 1 (PP1) and 2A (PP2A), is highly selective for PP2A. *FEBS Lett* 416:230-234 (1997).
- Walton KM, Rehfuss RP, Chrivia JC, Lochner JE, Goodman RH: A dominant repressor of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-regulated enhancer-binding protein activity inhibits the cAMP-mediated induction of the somatostatin promoter in vivo. *Mol Endocrinol* 6:647-655 (1992).
- Wang X, Sada K, Yanagi S, Yang C, Rezaul K, Yamamura H: Intracellular calcium dependent activation of p72syk in platelets. *J Biochem* 116:858-861 (1994).
- Wang XW, Yeh H, Schaeffer L, Roy R, Moncollin V, Egly JM, Wang Z, Freidberg EC, Evans MK, Taffe BG, .: p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet* 10:188-195 (1995).
- Wang QE, Zhu Q, Wani G, Chen J, Wani AA: UV radiation-induced XPC translocation within chromatin is mediated by damaged-DNA binding protein, DDB2. *Carcinogenesis* 25:1033-1043 (2004).
- Wang QE, Zhu Q, Wani G, El-Mahdy MA, Li J, Wani AA: DNA repair factor XPC is modified by SUMO-1 and ubiquitin following UV irradiation. *Nucleic Acids Res* 33:4023-4034 (2005).
- Wang L, Rhodes CJ, Lawrence JC, Jr.: Activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) by insulin is associated with stimulation of 4EBP1 binding to dimeric mTOR complex 1. *J Biol Chem* 281:24293-24303 (2006).
- Warrington JA, Nair A, Mahadevappa M, Tsyganskaya M: Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics* 2:143-147 (2000).
- Weber CA, Salazar EP, Stewart SA, Thompson LH: ERCC2: cDNA cloning and molecular characterization of a human nucleotide excision repair gene with high homology to yeast RAD3. *EMBO J* 9:1437-1447 (1990).
- Weeda G, van Ham RC, Masurel R, Westerveld A, Odijk H, de WJ, Bootsma D, van der Eb AJ, Hoeijmakers JH: Molecular cloning and biological characterization of the human excision repair gene ERCC-3. *Mol Cell Biol* 10:2570-2581 (1990).

- Weeda G, Eveno E, Donker I, Vermeulen W, Chevallier-Lagente O, Taieb A, Sary A, Hoeijmakers JH, Mezzina M, Sarasin A: A mutation in the XPB/ERCC3 DNA repair transcription gene, associated with trichothiodystrophy. *Am J Hum Genet* 60:320-329 (1997).
- Wei Q, Lee JE, Gershenwald JE, Ross MI, Mansfield PF, Strom SS, Wang LE, Guo Z, Qiao Y, Amos CI, Spitz MR, Duvic M: Repair of UV light-induced DNA damage and risk of cutaneous malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst* 95:308-315 (2003).
- Wendel HG, De SE, Fridman JS, Malina A, Ray S, Kogan S, Cordon-Cardo C, Pelletier J, Lowe SW: Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature* 428:332-337 (2004).
- Wenger R: Cyclosporine and analogues: structural requirements for immunosuppressive activity. *Transplant Proc* 18:213-218 (1986).
- West SC: Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:435-445 (2003).
- Wilson TE, Grawunder U, Lieber MR: Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining. *Nature* 388:495-498 (1997).
- Winkler GS, Araujo SJ, Fiedler U, Vermeulen W, Coin F, Egly JM, Hoeijmakers JH, Wood RD, Timmers HT, Weeda G: TFIIH with inactive XPD helicase functions in transcription initiation but is defective in DNA repair. *J Biol Chem* 275:4258-4266 (2000).
- Winslow MM, Crabtree GR: Immunology. Decoding calcium signaling. *Science* 307:56-57 (2005).
- Wittschieben BO, Iwai S, Wood RD: DDB1-DDB2 (xeroderma pigmentosum group E) protein complex recognizes a cyclobutane pyrimidine dimer, mismatches, apurinic/apyrimidinic sites, and compound lesions in DNA. *J Biol Chem* 280:39982-39989 (2005).
- Wu X, Shell SM, Yang Z, Zou Y: Phosphorylation of nucleotide excision repair factor xeroderma pigmentosum group A by ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related-dependent checkpoint pathway promotes cell survival in response to UV irradiation. *Cancer Res* 66:2997-3005 (2006).
- Wu X, Shell SM, Liu Y, Zou Y: ATR-dependent checkpoint modulates XPA nuclear import in response to UV irradiation. *Oncogene* 26:757-764 (2007a).
- Wu YH, Tsai Chang JH, Cheng YW, Wu TC, Chen CY, Lee H: Xeroderma pigmentosum group C gene expression is predominantly regulated by promoter hypermethylation and contributes to p53 mutation in lung cancers. *Oncogene* 26:4761-4773 (2007b).
- Wulff BC, Kusewitt DF, VanBuskirk AM, Thomas-Ahner JM, Duncan FJ, Oberyszyn TM: Sirolimus reduces the incidence and progression of UVB-induced skin cancer in SKH mice even with co-administration of cyclosporine A. *J Invest Dermatol* 128:2467-2473 (2008).
- Xing J, Kornhauser JM, Xia Z, Thiele EA, Greenberg ME: Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 18:1946-1955 (1998).
- Xu G, Marcusson JA, Hemminki K: DNA photodamage induced by UV phototherapy lamps and sunlamps in human skin in situ and its potential importance for skin cancer. *J Invest Dermatol* 116:194-195 (2001).
- Yang ZG, Liu Y, Mao LY, Zhang JT, Zou Y: Dimerization of human XPA and formation of XPA2-RPA protein complex. *Biochemistry* 41:13012-13020 (2002).
- Yarosh DB, Pena AV, Nay SL, Canning MT, Brown DA: Calcineurin inhibitors decrease DNA repair and apoptosis in human keratinocytes following ultraviolet B irradiation. *J Invest Dermatol* 125:1020-1025 (2005).
- Yocum DE, Allard S, Cohen SB, Emery P, Flipo RM, Goobar J, Jayawardena S, Job-Deslandre C, Jubb RW, Kruger K, Lopes VA, Manger B, Mur E, Nygaard H, Weiner SM, Rainer F, Sack MR, Schiff MH, Schnitzer TJ, Trigg LB, Whatmough I, Schmidt AG: Microemulsion formulation of cyclosporin (Sandimmun Neoral) vs Sandimmun: comparative safety, tolerability and efficacy in severe active rheumatoid arthritis. On behalf of the OLR 302 Study Group. *Rheumatology (Oxford)* 39:156-164 (2000).
- Yuasa M, Masutani C, Eki T, Hanaoka F: Genomic structure, chromosomal localization and identification of mutations in the xeroderma pigmentosum variant (XPV) gene. *Oncogene* 19:4721-4728 (2000).
- Zhang Y, Baumgrass R, Schutkowski M, Fischer G: Branches on the alpha-C atom of cyclosporin A residue 3 result in direct calcineurin inhibition and rapid cyclophilin 18 binding. *Chembiochem* 5:1006-1009 (2004).

-
- Zhao X, Taylor JS: Mutation spectra of TA*, the major photoproduct of thymidyl-(3'5')-deoxyadenosine, in *Escherichia coli* under SOS conditions. *Nucleic Acids Res* 24:1561-1565 (1996).
- Zheng XF, Florentino D, Chen J, Crabtree GR, Schreiber SL: TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin. *Cell* 82:121-130 (1995).
- Zhou BB, Elledge SJ: The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408:433-439 (2000).
- Zhou NY, Bates SE, Bouziane M, Stary A, Sarasin A, O'Connor TR: Efficient repair of cyclobutane pyrimidine dimers at mutational hot spots is restored in complemented *Xeroderma pigmentosum* group C and trichothiodystrophy/xeroderma pigmentosum group D cells. *J Mol Biol* 332:337-351 (2003).

6. ANHANG

6.1 Veröffentlichungen

6.1.1 Publikationen

1. Thoms KM, Kuschal C, Emmert S (2007) Lessons learned from DNA repair defective syndromes. *Exp Dermatol.* 16(6):532-544.
2. **Kuschal C**, Thoms KM, Mori T, Kobayashi N, Boeckmann L, Laspe P, Emmert S. (2009) Cyclosporin A, but not everolimus, inhibits DNA repair in human fibroblasts and lymphoblasts. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 47(1):38-40.
3. Emmert S, Ueda T, Zumsteg U, Weber P, Khan SG, Laspe P, Zachmann K, Kuschal C, Boeckmann L, Bircher A, Kraemer KH (2009) Strict sun protection results in minimal skin changes in a patient with xeroderma pigmentosum and a novel c.2009delG mutation in XPD (ERCC2). *Exp Dermatol.* 18(1):64-8.
4. Boeckmann L Thoms KM, Gutzmer R, Has C, Kunz M, Kuschal C, Laspe P, Struever D, Emmert S. (2009) Modulation of the efficacy of temozolomide and dacarbazine melanoma treatment by DNA-repair factors in vivo and in vitro. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 47(1):33-5.
5. **Thoms KM, Kuschal C**, Oetjen E, Mori T, Kobayashi N, Laspe P, Boeckmann L, Schön MP, Emmert S (2009) Cyclosporin A, but not everolimus, inhibits DNA repair mediated by calcineurin: Implications for tumorigenesis under immunosuppression. *eingereicht*
6. **Kuschal C, Thoms KM**, Boeckmann L, Laspe P, Apel A, Schön MP, Emmert S (2009) Cyclosporin A inhibits nucleotide excision repair via downregulation of the xeroderma pigmentosum group A and G proteins which is mediated by calcineurin. *Manuskript*

6.1.2 Kongressbeiträge

1. Posterpräsentation, Deutsche Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung 2006, Hamburg: *Immunomodulation of Nucleotide Excision Repair – Role of Cyclosporine A.*
2. Vortrag, Aggressive Lymphoma Workshop 2007, Göttingen: *Modulation of DNA Repair Capacity – Polymorphism Studies.*
3. Posterpräsentation, Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung 2008, Erlangen: *Cyclosporin A but not everolimus inhibits DNA repair in human fibroblasts and lymphoblasts.*
4. Vortrag, Central European Society for Anticancer Drug Research 2008, Göttingen: *Cyclosporin A but not everolimus inhibits DNA repair in human fibroblasts and lymphoblasts.*
5. Posterpräsentation, Deutsche Gesellschaft für DNA-Reparaturforschung 2008, Berlin: *Cyclosporin A but not everolimus inhibits nucleotide excision repair in human fibroblasts and lymphoblasts.*
6. Vortrag, Workshop Women in Radiation Sciences - a Century after Marie Curie 2009, München: *Cyclosporin A inhibits nucleotide excision repair via downregulation of xeroderma pigmentosum group A protein but not other xeroderma pigmentosum proteins.*

6.2 Lebenslauf

Christiane Kuschal
Goethestraße 17
99755 Ellrich

Geburtsdatum: 21. März 1982
Geburtsort: Karl-Marx-Stadt
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

1988 bis 1992 Grundschole „Hans Grundig“ Ellrich
1992 bis 1993 Staatl. Herder-Gymnasium Nordhausen
1993 bis 1998 Staatl. Gymnasium „Michael Neander“ Ilfeld
1998 bis 2000 Staatl Herder-Gymnasium Nordhausen
Abitur Juli 2000

Studium

Oktober 2000 bis Universität Kassel
Oktober 2002 Lehramtsstudium Biologie und Englisch, Gymnasialstufe

Oktober 2002 Diplomstudium Biologie

Mai 2005 bis Deutsches Primatenzentrum Göttingen GmbH, Abteilung
bis Februar 2006 Primatengenetik
Diplomarbeit: Genomische Analyse der MHC-Klasse-II-Genregion des
Grauen Mausmaki (*Microcebus murinus*)

Promotion Georg-August-Universität Göttingen, Abteilung Dermatologie,
Venerologie und Allergologie

seit April 2006 assoziierte Stipendiatin des DFG Graduiertenkollegs 1034 *Die
Bedeutung genetischer Polymorphismen in der Onkologie: Von den
Grundlagen zur individualisierten Therapie* (Sprecher: Prof. Dr. Jürgen
Brockmöller)

seit September 2007 Stipendiatin des DFG Graduiertenkollegs 1034

7. DANKSAGUNG

Herrn PD Dr. Wilfried Kramer danke ich herzlich für die freundliche und unkomplizierte Betreuung und die Vertretung meiner Doktorarbeit seitens der biologischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen. Ganz herzlich möchte ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Brockmüller für die Übernahme des Korreferats danken und für die Möglichkeit, als Stipendiatin im DFG Graduiertenkolleg 1034 *Die Bedeutung genetischer Polymorphismen in der Onkologie: Von den Grundlagen zur individualisierten Therapie* diese Dissertation anzufertigen. Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Steffen Emmert für die Überlassung des Themas und die freundliche Aufnahme in seine Abteilung danken. Die vielen guten Ratschlägen, sein Engagement und seine jederzeit motivierenden Worte halfen über so manch kleine Krise hinweg.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Kai-Martin Thoms, der meine Neugier für dieses interessante Gebiet geweckt und gefördert hat. Seine stete Unterstützung, seine gute praktische und theoretische Anleitung sowie die angenehme freundschaftliche Zusammenarbeit haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an Antje Apel, Petra Laspe und Karolin Zachmann für die nette Labor-Atmosphäre, die unermüdliche Hilfsbereitschaft, die hervorragende Labor-Betreuung sowie für die unterhaltsamen Gespräche, nicht nur während der Kaffeepausen. Lars Böckmann danke ich für seine kompetente Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragen, die nützlichen Hinweise während dem Schreiben dieser Arbeit und für die rettende Hilfe bei so manch kleinen Problemchen. Ich danke euch für eure Geduld und Herzlichkeit, aber vor allem dafür, dass es eine sehr schöne Zeit im Labor gewesen ist. Ein lieber Dank auch an alle Ehemaligen des Labors, besonders an Alexandra Baumann und Maria Nassiri, für die freundschaftliche Verbundenheit über das Labor hinaus.

Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. Elke Oetjen bedanken, die mir freundlicherweise die Calcineurin- und CREB-Plasmide zur Verfügung gestellt hat und für ihre wertvollen Ratschläge. Herzlich danken möchte ich auch allen Stipendiaten des Graduiertenkollegs 1034 für die freundliche Atmosphäre und den Ideenaustausch während der Montagsseminare und Klausurtagungen.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie und meiner Verwandtschaft danken, ohne deren Zuspruch und Unterstützung ich es mit Sicherheit nicht bis zu diesem Punkt geschafft hätte. Ein großes Dankeschön geht an meine Freunde, deren Ablenkung und Spaß mein Leben außerhalb des Labors bereichert haben.

Ein besonderer Dank geht an Constanze für ihren Rückhalt und ihre Liebe.